

# 超声波对菜豆种子超氧化物歧化酶活性的影响

钱春梅<sup>1</sup>, 谭兆赞<sup>1</sup>, 李 云<sup>2</sup>, 巫光宏<sup>1</sup>, 黄卓烈<sup>1</sup>

(1 华南农业大学 生命科学学院, 广东 广州 510642; 2 华南农业大学 园艺学院, 广东 广州 510642)

**摘要:**菜豆种子粗酶液经乙醇-氯仿-丙酮沉淀、DEAE-纤维素柱层析和 Sephadex G-75 柱层析, 获得比活力为 127.45 U/mg 的超氧化物歧化酶(SOD), 该酶活性受 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 KCN 强烈抑制。经电泳鉴定为 3 种 SOD 同工酶, 部分纯化的 SOD 证明为 Cu, Zn-SOD。经不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳获得其中 1 种电泳纯的酶, 超声波处理此酶后, 酶活力发生改变, 适宜的超声波参数能显著提高酶活力。经超声波处理后, SOD 的紫外吸收光谱无明显变化, 而紫外差示光谱在一定波长范围内出现正峰和负峰。

**关键词:**菜豆; 超氧化物歧化酶; 超声波

中图分类号: Q554

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2004)03-0073-05

## Effect of ultrasound on the activity of superoxide dismutase from kidney bean seeds

QIAN Chun-mei<sup>1</sup>, TAN Zhao-zan<sup>1</sup>, LI Yun<sup>2</sup>, WU Guang-hong<sup>1</sup>, HUANG Zhuo-lie<sup>1</sup>

(1 College of Life Science, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China;

2 College of Horticulture, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** Isoenzyme of superoxide dismutase(SOD) from kidney beans (*Phaseolus vulgaris* L.) seeds was purified by steps involving crude extract, chloroform-ethanol treatment, acetone precipitation, DEAE-cellulose chromatography and Sephadex G-75 chromatography. It had a specific activity of 127.45 U/mg. Its activity was strongly inhibited by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> and KCN. It was proved that the purified enzyme was copper-and zinc-containing SOD. One of the isoenzymes was purified to homogeneity by discontinuous PAGE. The activity of this SOD could be changed by ultrasound treatment. The activity of SOD was increased after it was dealt with by ultrasound of suitable parameters. The ultraviolet absorption spectrum of SOD had no obvious change after treatment by ultrasound. Differential UV-spectra presented distinct positive peaks and negative peaks within certain wavelength after ultrasound treatment.

**Key words:** kidney bean; superoxide dismutase; ultrasound

超氧化物歧化酶(EC 1.15.1.1, superoxide dismutase, SOD)广泛存在于需氧生物体内,能清除超氧阴离子自由基对机体的伤害。自1969年McCord等<sup>[1]</sup>发现SOD功能以来,已从动物、植物和微生物等多种生物体内分离出SOD。SOD在医药、日用化工和食品工业上得以广泛应用<sup>[2]</sup>。豆科植物的SOD含量较高,已从豌豆<sup>[3]</sup>、大豆<sup>[4]</sup>、饭豆<sup>[5]</sup>和蚕豆<sup>[6]</sup>等豆科植物中提纯了Cu, Zn-SOD。

超声波是物质介质中的一种弹性机械波,作为一种物理的能量形式,在医学、化工等领域有着广泛

的应用。近年来,超声波技术正向生物学领域扩展。高大维等<sup>[7]</sup>用超声波处理固定化的糖化酶来分解淀粉,发现在一定的超声波作用范围内,酶的活力提高,而K<sub>m</sub>值下降,但该酶的最适温度和最适pH保持不变。黄卓烈等<sup>[8]</sup>利用超声波处理酵母过氧化氢酶和多酚氧化酶,发现这两种酶的催化活性有较大幅度的提高。超声波在低强度及适宜的频率条件下,具有空穴作用、磁致伸缩作用和机械振荡作用,改变酶分子的构象,促进细胞代谢过程中底物与酶的接触和产物的释放,从而促进酶生物催化活性<sup>[9]</sup>。本文

收稿日期:2003-12-31

作者简介:钱春梅(1969-),女,讲师,硕士。通讯作者:黄卓烈(1950-),男,教授,硕士。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(10074016)

报告菜豆种子 SOD 的提纯和酶类型鉴定,并探讨了超声波对 SOD 酶活力的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

供试材料为矮生菜豆,品种“供给者”*Phaseolus vulgaris*.L. cv.Gongjizhe 种子,购于中国农业科学院蔬菜花卉研究所,种子于室温下浸泡 48 h 后用于提取 SOD。

### 1.2 SOD 活性测定

参照 Giannopolitis 等<sup>[10]</sup>的方法,以抑制 NBT 光化学还原 50% 的酶量为 1 个活力单位(U)。

### 1.3 蛋白质含量测定

参照 Bradford<sup>[11]</sup>的方法,以牛血清白蛋白为标准蛋白质。

### 1.4 菜豆种子 SOD 的初步纯化

称取一定量充分吸胀的种子,加入 2 倍体积的 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.8),组织捣碎机捣碎。匀浆置 4 ℃ 冰箱浸提 30 min 后,4 ℃、1 000 r/min 离心 8 min,上清液再于 4 ℃、12 000 r/min 离心 20 min,上清液即为粗酶液。向粗酶液加入 0.25 倍体积乙醇和 0.15 倍体积氯仿混合液(-20 ℃),搅拌 10 min,同前离心,弃沉淀。向上清液加入 0.5 倍体积丙酮(-20 ℃),搅拌 10 min,同前离心,弃沉淀。再向上清液加入 1 倍体积丙酮,同前离心,收集沉淀。用 10 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.8)溶解,同前离心,除去不溶性杂质。上清液上经预处理的 DEAE-纤维素柱(2 cm × 16 cm),以含 0~0.8 mol/L NaCl 的 10 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.8)进行离子强度线性梯度洗脱,流速为 6 min/管,3 mL/管。收集具有酶活力的蛋白峰洗脱液,用 PEG 浓缩后,上 Sephadex G-75 层析柱(2 cm × 40 cm),以 10 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.8)进行洗脱,流速同上。

### 1.5 SOD 同工酶鉴定和提纯

经初步纯化的酶液用聚乙二醇 6 000 (PEG 6 000)浓缩至蛋白质约 1 mg/mL,参照李建武等<sup>[12]</sup>的方法,用不连续的聚丙烯酰胺凝胶进行电泳,分离胶液质量浓度为 0.075 g/mL、浓缩胶液质量浓度为 0.03 g/mL。电泳后分别进行活性染色和蛋白染色。切取第 3 条酶带,加入少量 50 mmol/L 磷酸缓冲液(pH 7.8)浸泡,4 ℃浸提 12 h,10 000 r/min,4 ℃离心 20 min,取上清液用 PEG 浓缩后,再进行电泳鉴定纯度,并进行超声波处理。

### 1.6 超声波对 SOD 活性的影响

在分别以处理时间、超声波频率和功率为单因素进行试验后,再采用 L9(3<sup>4</sup>)正交表作正交试验,讨

论超声波对 SOD 活性的影响。仪器是无锡市超声波电子设备厂生产的 H66025 型超声波发生器。

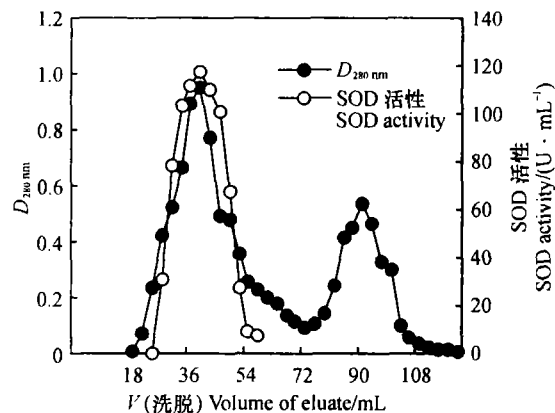
### 1.7 紫外吸收光谱和紫外差示光谱

用 UV-2401PC 型分光光度计(日本 SHIMADZU 公司)分别测定未经超声波处理和超声波处理后的酶液在 190~300 nm 的吸收光谱。以纯酶为基准,测定 SOD 在 190~300 nm 的紫外差示光谱。

## 2 结果与分析

### 2.1 菜豆种子 SOD 的分离纯化

经 DEAE-纤维素柱洗脱,出现 2 个蛋白峰,其中第一个与酶活力峰重叠。收集此峰洗脱液共 26 mL(第 13 管到 21 管)。这与饭豆种子<sup>[5]</sup>洗脱出 2 个 SOD 活力峰不同,也与蚕豆种子<sup>[6]</sup>蛋白峰和酶活力峰不重叠不同。在 Sephadex G-75 层析柱的洗脱过程中,出现 2 个蛋白峰,而且第一个峰与酶活力峰重叠(图 1)。经过以上几个步骤,酶比活力为 127.45 U/mg,酶被纯化了 116.93 倍,产率 4.4%(表 1)。



10 mmol/L pH 7.8 磷酸缓冲液洗脱;流速:6 min/管,3 mL/管  
The elution was performed at a flow rate of 6 min/tube,  
3 mL/tube with 10 mmol/L pH 7.8 phosphate buffer

图 1 菜豆种子 SOD 的 Sephadex G-75 柱层析洗脱曲线  
Fig. 1 Sephadex G-75 column elution pattern of SOD from kidney bean seeds

### 2.2 同工酶鉴定

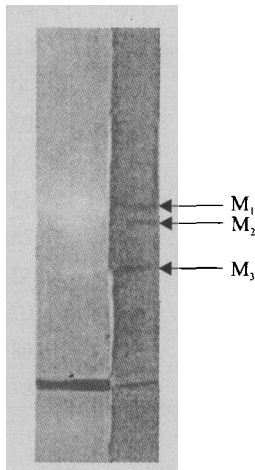
经乙醇-氯仿、丙酮沉淀、DEAE-纤维素柱层析和 Sephadex G-75 柱层析纯化的酶液,经不连续的聚丙烯酰胺凝胶电泳后,分别进行蛋白染色和活性染色,出现 3 条对应的蛋白带和活性带(图 2),分离出 SOD 的一组同工酶(M<sub>1</sub>、M<sub>2</sub>、M<sub>3</sub>)。豆类中的 SOD 含量高,饭豆种子在逐步纯化后,得到 2 组共 6 条 SOD 同工酶谱带<sup>[5]</sup>,蚕豆种子表现为单一条带<sup>[6]</sup>,而 Sawada<sup>[3]</sup>在豌豆种子提纯 SOD 也未纯化到均一。

在部分纯化的酶液中,分别加入不同浓度的 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 KCN,于 30 ℃ 恒温水浴中保温 30 min,取出迅

表1 菜豆种子 SOD 的纯化

Tab. 1 Purification of SOD from kidney bean seeds

纯化步骤 purification step	$V_{总}$ total volume /mL	$m$ (总蛋白 total protein) /mg	总活力 total activity /U	比活力 specific activity /(U·mg <sup>-1</sup> )	产率 yield /%	纯化倍数 purification multiple
粗酶液 crude extract	250	19 627	21 316	1.09	100.0	1.00
乙醇-氯仿处理 chloroform-ethanol	210	6 294	20 397	3.24	95.7	2.97
丙酮处理 acetone precipitation	48	1 145	5 563	4.86	26.1	4.46
DEAE-纤维素 DEAE-cellulose	26	96	2 671	27.68	12.5	25.39
Sephadex G-75	8	7	942	127.45	4.4	116.93

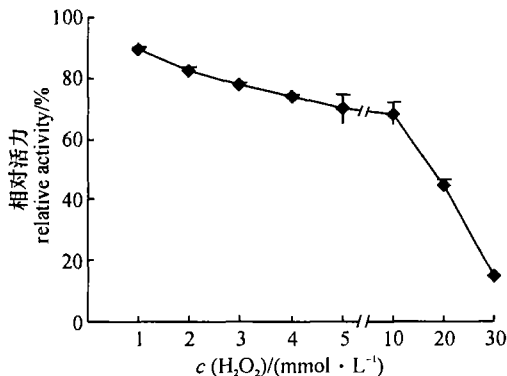


A: 活性染色 B: 蛋白质染色  
A: activity staining B: protein staining

图2 菜豆种子 SOD 同工酶图谱

Fig. 2 Diagram of SOD isoenzyme from kidney bean seeds

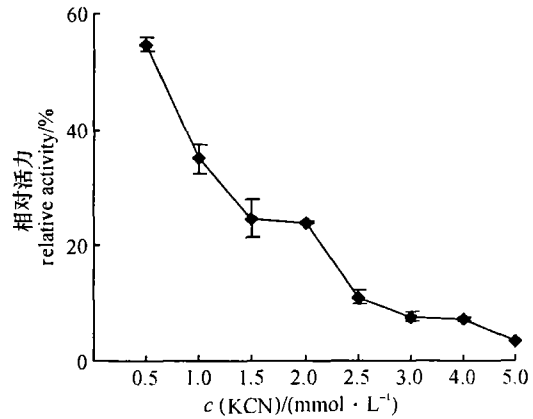
速冷却至 25 °C,测定酶活力. 以未经处理的酶活力为 100%,计算相对活力. 结果(图 3、4)表明,部分纯化的菜豆 SOD 分别和 30 mmol/L H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 5 mmol/L KCN 水溶液作用 30 min, 相对活力为 14.8% 和 3.3%,抑制作用明显,根据王爱国等<sup>[4]</sup>的鉴定法,所提取的菜豆 SOD 为 Cu, Zn-SOD.



未经处理的酶活力:55.5 U/mL;蛋白质质量浓度:0.95 mg/mL;  
enzyme activity in untreated sample: 55.5 U/mL;  
protein content:0.95 mg/mL

图3 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 对菜豆种子 SOD 活性的影响

Fig. 3 Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the activity of SOD from kidney bean seeds



未经处理的酶活力:54.1 U/mL;蛋白质质量浓度:0.92 mg/mL;  
enzyme activity in untreated sample: 54.1 U/mL;  
protein content:0.92 mg/mL

图4 KCN 对菜豆种子 SOD 活性的影响

Fig. 4 Effect of KCN on the activity of SOD from kidney bean seeds

### 2.3 超声波处理对 SOD 催化性质的影响

2.3.1 超声波处理对 SOD 活性的影响 将经 1.4 制备的部分纯化酶液,在 10 °C 下,用不同功率和频率的超声波处理不同的时间,以未经超声波处理的酶活力为 100%,测定酶活力提高的百分率. 用 20 W, 15 kHz 的超声波处理不同的时间,其中处理 12 min 时,酶活力提高了 15.4%;用 20 W,不同频率的超声波处理 10 min,其中用 16.5 kHz 时,酶活力提高了 20.3%;用不同功率,16.5 kHz 的超声波处理 10 min,在 20~40 W 间,酶活力提高百分率随功率的增加而增加,在 40 W 时达到最大,提高了 26.3%.

在此基础上,考虑到 3 个因素的交互作用,采用 L<sub>9</sub>(3<sup>4</sup>)正交表作正交试验,表头设计和结果见表 2. 经 SAS 分析,得到以下二次回归方程:

$$Y = -146.84 + 10.54 X_1 + 28.05 X_2 - 4.00 X_3 - 0.60 X_1^2 + 0.16 X_1 X_2 - 1.41 X_2^2 - 0.02 X_1 X_3 + 0.29 X_2 X_3 \quad (P < 0.0001)$$

结果表明:当  $X_1 = 10.2$ ,  $X_2 = 14.4$ ,  $X_3 = 36.5$  时,方程有最佳响应值  $Y = 0.3552$ . 即用 36.5 W, 14.4 kHz 的超声波处理酶液 10.2 min,可使酶活力提高的

百分率为 35.52%。整个模型的  $P < 0.0001$ , 所以回归方程能通过验证。且各项系数的  $P$  值均  $< 0.05$ , 各个因素对酶活力提高的效果显著。

切下电泳后的第 3 条 SOD 同工酶 ( $M_3$ ) 活性染色的谱带, 加入少量 50 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 7.8) 浸泡, 4 °C 浸提 12 h, 10 000 r/min, 4 °C 离心 20 min, 取上清液用 PEG 浓缩, 电泳后进行蛋白染色和活性染

色, 结果出现一条对应的蛋白带和活性带, 说明该酶已被纯化到电泳纯。

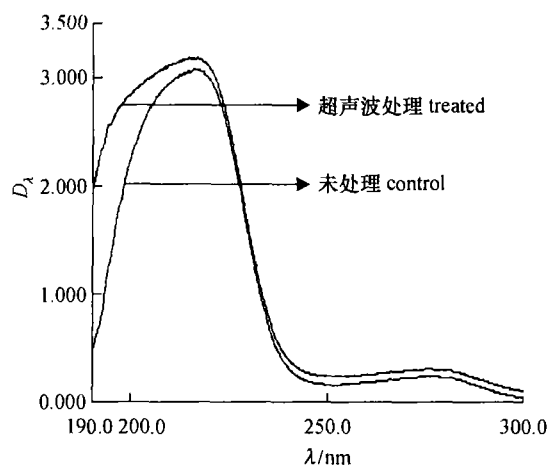
按回归方程所列出的各因素的值, 4 °C 下, 在 40 W、15.0 kHz 条件下超声波处理纯酶液 10 min, 测得酶活力提高百分率为 32.04%, 和理论值相关性为 0.9020。由此可见, 超声波在低强度及适宜的频率条件下可促进酶的生物催化活性。

表 2 超声波处理正交试验设计表  $L_9(3^4)$  及测定结果

Tab. 2 Optimization of ultrasound treatment

试验号 No.	$t(X_1)$ /min	$f(X_2)$ /kHz	$p(X_3)$ /W	空列 blank	酶活力提高百分率 percentage increase of enzyme activity/%
1	5(1)	13.5(1)	20(1)	1	21.40
2	5(1)	15.0(2)	40(2)	2	19.03
3	5(1)	16.5(3)	60(3)	3	27.83
4	10(2)	13.5(1)	40(2)	3	33.53
5	10(2)	15.0(2)	60(3)	1	39.28
6	10(2)	16.5(3)	20(1)	2	18.52
7	15(3)	13.5(1)	60(3)	2	12.07
8	15(3)	15.0(2)	20(1)	3	20.08
9	15(3)	16.5(3)	40(2)	1	18.87

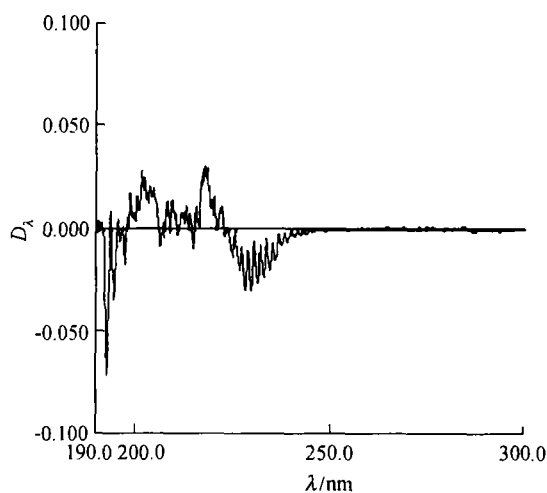
2.3.2 超声波处理对 SOD 的紫外吸收光谱和紫外差示光谱的影响 测定 SOD 纯酶 ( $M_3$ ) 以及超声波处理过的 SOD 在 190 ~ 300 nm 的吸收。未经超声波处理的 SOD 纯酶在紫外光区的吸收峰在 275.5 nm, 超声波处理 (40 W, 15.0 kHz, 10 min) 后紫外吸收峰出现在 276.3 nm (图 5), 光谱无明显变化。再以纯酶为基准, 测定经超声波处理酶液的紫外差示光谱, 发现在 190 ~ 250 nm 波长范围内出现正峰和负峰, 250 ~ 300 nm 之间无变化 (图 6)。



酶活力: 117.5 U/mL, 蛋白质质量浓度: 1.08 mg/mL  
enzyme activity: 117.5 U/mL, protein content: 1.08 mg/mL

图 5 菜豆种子 SOD 的紫外吸收光谱

Fig. 5 Ultraviolet absorption spectrum of SOD from kidney bean seeds



酶活力: 117.5 U/mL, 蛋白质质量浓度: 1.08 mg/mL  
enzyme activity: 117.5 U/mL, protein content: 1.08 mg/mL

图 6 超声波处理后菜豆种子 SOD 的紫外差示吸收光谱

Fig. 6 Differential UV spectrum of SOD treated with ultrasound from kidney bean seeds

### 3 讨论

菜豆种子经多步的分离纯化, 得到 3 条 SOD 同工酶谱带, 其活性染色带和蛋白染色带相互对应。部分纯化后的 SOD 对  $H_2O_2$  和 KCN 敏感, 证明为 Cu, Zn-SOD。

超声波对酶活力的影响因素很多。对水相的酶促系统而言, 超声波频率、超声波功率和处理时间为

主要影响因素,适宜的超声波处理条件能使酶活力提高.之前的研究主要探讨单因素的影响<sup>[8]</sup>,没有考虑各因素的交互作用.本试验采用正交试验的方法,对超声波频率、超声波功率和处理时间作回归分析,得到三者的最优组合.

目前认为较低的超声波功率会对酶起激活作用,大功率的超声波会使酶失活.这是由于较弱的超声波对细胞产生的破坏较小,而强超声波的空化作用使细胞破碎,酶活力降低<sup>[13]</sup>.本试验所用的参数,符合这个规律.

邹承鲁<sup>[14]</sup>的工作表明:酶活力的表现必须依赖酶分子的构象.据推测,超声波作用提高酶活力的原因可能有2种:(1)超声波产生的微流效应可能促进底物迅速进入酶催化部分及产物进入介质,从而提高了酶的催化效率;(2)超声波的空化作用所产生的冲击波改变酶分子的构象,从而影响酶促反应的进程.本文结果显示,超声波处理后,紫外吸收光谱无明显变化,表明SOD分子的构型并无明显改变.而紫外差示光谱出现了正峰和负峰,说明了SOD的分子构象发生了明显的变化.超声波改变了Cu、Zn-SOD的分子构象,从而导致酶活力提高,这可能是超声波处理提高SOD活力的作用本质,同时也说明酶分子的天然构象并非总是处于活性的最佳状态.

#### 参考文献:

- [1] McCORD J M, FRIDOVICH I. Superoxide dismutase: An enzymic function for erythrocyte (hemocuprein) [J]. *J Biol Chem*, 1969, 244: 6 049 - 6 055.
- [2] 袁勤生. SOD在医药、食品和日化工业上的应用[J]. *中国生化药物杂志*, 1994, 15: 289 - 294.
- [3] SAWADA Y, OHYAMA T, YAMAZAKI I. Preparation and physicochemical properties of green pea superoxide dismutase [J]. *Biochem Biophys Acta*, 1972, 268: 305 - 312.
- [4] 王爱国, 罗广华, 邵从本. 大豆种子超氧化物歧化酶的研究[J]. *植物生理学报*, 1983, 9(1): 77 - 84.
- [5] 程光宇, 吴国荣, 魏锦城, 等. 饭豆铜锌超氧化物歧化酶的纯化及性质[J]. *南京师范大学学报(自然科学版)*, 1994, 17(2): 121 - 126.
- [6] 郭振飞, 卢少云, 李明启. 蚕豆种子超氧化物歧化酶的纯化及性质[J]. *热带亚热带植物学报*, 1996, 4(3): 60 - 64.
- [7] 高大维, 陈满香, 梁 竑, 等. 超声波催化糖化酶水解淀粉的初步研究[J]. *华南理工大学学报(自然科学版)*, 1994, 22 (1): 70 - 73.
- [8] 黄卓烈, 林 茹, 何 平, 等. 超声波对酵母过氧化氢酶及多酚氧化酶活力的影响[J]. *中国生物工程杂志*, 2003, 23(4): 89 - 93.
- [9] 邱树毅, 姚汝华, 宗敏华. 超声波在生物工程中的应用[J]. *生物工程进展*, 1999, 19(3): 45 - 48.
- [10] GIANNOPOLITIS C N, RIES S K. Superoxide dismutase: II. Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings [J]. *Plant Physiol*, 1977, 59(2): 315 - 318.
- [11] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248 - 254.
- [12] 李建武, 萧能愿, 余瑞元, 等. 生物化学实验原理和方法 [M]. 北京: 北京大学出版社, 2000. 189 - 196, 324 - 326.
- [13] 林勤保, 高大维. 超声波对酶反应的影响[J]. *声学技术*, 1997, 16(1): 26 - 28.
- [14] 邹承鲁. 酶活性部分的柔性[J]. *科学通报*, 1989, 34 (5): 321 - 325.

【责任编辑 柴 焰】