

右旋糖苷修饰超氧化物歧化酶及其产物活性研究

Study on dextran-modified SOD and its enzyme activity

李 亮¹ 赵有玺¹ 冀颐之¹ 龚 平²

LI Liang¹ ZHAO You-xi¹ JI Yi-zhi¹ GONG Ping²

(北京联合大学生物化学工程学院, 北京 100023)

(College of Biological and Chemical Engineering, Beijing Union University, Beijing 100023, China)

摘要:右旋糖苷经高碘酸钠氧化及活化后,开环生成两个醛基,与超氧化物歧化酶(SOD)发生加成反应,从而对其进行修饰。修饰后的 SOD 可有效保持其原有活性,且热稳定性、酸碱稳定性及在乙醇中的稳定性均有所提高。采用红外光谱对其结构进行分析,证实 SOD 被右旋糖苷成功修饰。

关键词:超氧化物歧化酶;修饰;酶活性;红外光谱

Abstract: After the dextran oxidized and activated by NaIO_4 , two aldehyde groups were obtained by ring-opening reaction. Then, the addition reaction happened between activated dextran and SOD. The modified SOD could keep its enzyme activity effectively, and the stability of the modified SOD in acid, alkali, ethanol, and at high temperature was improved, respectively. It approved that the SOD was modified by dextran successfully through the Infrared spectrum analysis of its structure.

Keywords: SOD; modification; enzyme activity; infrared spectrum

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD),是一类广泛存在于生物体内的金属酶。因为能够催化超氧阴离子自由基发生歧化反应,已成为生化研究领域的热门课题。SOD 在防辐射、抗衰老、消炎、抑制肿瘤及自身免疫治疗等方面显示出独特的功能^[1],在医学、食品、化妆品等领域应用价值很大。不同介质中 SOD 活性的稳定性,是制约其应用的关键因素之一。常用的解决方法包括对 SOD 相关氨基酸残基进行化学修饰,水溶性大分子(如聚乙二醇、聚蔗糖和聚烯属羟基氧化物等)对 SOD 进行共价修饰,以及酶切改造等等^[2-5]。

在牛血清白蛋白、月桂酸、褪黑素、不饱和脂肪酸、环糊精、羧甲基纤维素、肝素、卵磷脂等可用于修饰 SOD 的修饰剂^[6,7]中,右旋糖苷作为一种具有良好的生物相容性和水溶性的天然大分子多糖,其糖链上的醛基经活化后可与酶蛋白

分子上的游离氨基共价结合^[8,9],是目前应用广泛的酶分子及蛋白质修饰剂之一。但关于其修饰 SOD 的报道较少^[10]。

本研究拟采用右旋糖苷修饰 SOD,通过紫外分光光度法测定修饰酶在高温环境、酸性、碱性以及有机溶剂条件下的酶活性稳定性变化,并采用红外光谱法确认修饰反应。旨在改善 SOD 在不同环境条件下的酶活稳定性,为 SOD 的应用提供试验数据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料与试剂

超氧化物歧化酶:植物来源,200 IU/mg,北京经科宏达生物技术有限公司;

右旋糖苷:重均分子量(M_w)为 1 500,国药集团北京化学试剂公司;

高碘酸钠、亚硫酸氢钠、磷酸盐、三羟甲基氨基甲烷 Tris 盐、EDTA、酒精等试剂:除特别注明外均为分析纯,国药集团北京化学试剂公司。

1.1.2 主要仪器设备

傅里叶变换红外光谱仪:PE Spectrum 2 型,美国 PE 公司;

紫外—可见光分光光度计:PE lambda35 型,美国 PE 公司。

1.2 方法

1.2.1 右旋糖苷修饰 SOD 反应原理 右旋糖苷是由 α -葡萄糖通过 α -1,6-糖苷键连接而成的高分子多糖,具有良好的生物相容性和水溶性。通过高碘酸将右旋糖苷上邻双羟基氧化成醛基,醛基再与酶分子上的氨基结合生成修饰酶。用高碘酸来调节右旋糖苷的氧化程度。一般氧化程度达 20%~25%时,与酶具有较高的结合能力。

1.2.2 修饰反应过程

(1) 透析袋预处理:将透析袋剪成适当长度(15 cm)的

作者简介:李亮(1990—),男,北京联合大学在读硕士研究生。

E-mail: liliang_fx@163.com

通讯作者:龚平

收稿日期:2014-12-15

小段;在 600 mL 的 2%(*m/V*)碳酸氢钠和 1 mmol/L EDTA (pH 8.0)中将透析袋煮沸 10 min;用蒸馏水彻底清洗透析袋 1 h;置于 1 mmol/L EDTA (pH 8.0)中煮沸 10 min;冷却后,存放于 1 mmol/L EDTA 中,确保透析袋始终浸设在溶液内。

(2) 右旋糖苷活化处理:称取 0.5 g 右旋糖苷,加入 100 mL 蒸馏水中,水浴溶解,当溶液澄清时取出放置至室温,再置于冰箱,让其温度降至 4 ℃;配制 12%的高碘酸钠溶液,于 4 ℃向活化后的右旋糖苷中逐滴加入 12%的高碘酸钠溶液 0.5 mL,避光条件下继续搅拌 20 min,避光低温保存过夜;以新配置的 5%的亚硫酸氢钠溶液滴定未反应的高碘酸钠至琥珀色,滴定到接近终点时会出现红褐色沉淀,摇动会溶解,不可出现黑色沉淀颗粒;将滴定后的活化糖苷用蒸馏水透析至完全透明时,换水继续透析 2 h 后取出;将透析出的活化糖苷用聚乙二醇反透析至约 3~5 mL。

(3) SOD 的修饰:将反透析后的活化糖苷,溶解于 10 mL 的碳酸缓冲溶液 (pH 9.0)中;取 0.01 g SOD,溶于 5 mL 蒸馏水,将调好 pH 值的活化糖苷滴加入 SOD 溶液并缓慢搅拌,4 ℃反应 20 h,期间每隔一段时间缓慢摇匀;加入 7.5%的甘氨酸溶液终止反应;4 h 后取出反应液,放入截留分子量为 3 500 的透析袋中蒸馏水透析,至透析液 pH 值为中性时,取出透析物冷冻干燥得到冻干品,冻干品呈白色或淡黄色。

1.2.3 原 SOD 酶和右旋糖苷修饰酶酶活测定 采用邻苯三酚终止剂法^[11]。

1.2.4 修饰反应的结构分析 采用红外光谱法。KBr 压片。

2 结果与分析

2.1 SOD 酶活的热稳定性分析

分别将植物 SOD 干粉、右旋糖苷修饰 SOD 溶解于蒸馏水中,置于 70 ℃水浴,一定时间后取出进行酶活分析,结果见图 1。

由图 1 可知,修饰后 SOD 初始活性有所下降。这可能

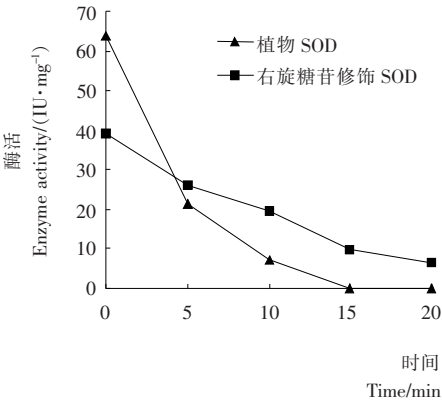


图 1 修饰前后 SOD 在 70 ℃下酶活随时间的变化
Figure 1 The relation of SOD enzyme activity on time, before and after modification

是由于右旋糖苷的加入使 SOD 分子量增大导致的,也可能是由于 70 ℃已经超出酶的最适温度,导致酶变性加剧引起的。但是经右旋糖苷修饰后的 SOD 热稳定性要高于未经修饰的。这是因为酶与右旋糖苷交联后,使酶的天然构象产生“刚性”,不易伸展打开,减少了酶分子内部基团的热振动,从而增强了酶的热稳定性^[12]。原酶在 70 ℃条件下,酶活明显下降,5 min 后下降到 30%,15 min 后完全失活。而经修饰后的 SOD 失活速率明显低于原酶,5 min 内仅下降到 70%,20 min 后仍具活性。

2.2 SOD 在酸性条件下酶活稳定性分析

分别将植物 SOD 干粉、右旋糖苷修饰 SOD 溶解于 pH 5.2 Na₂HPO₃—KH₂PO₃ 缓冲溶液,置于 30 ℃水浴,一定时间后取出进行酶活力测定,结果见图 2。

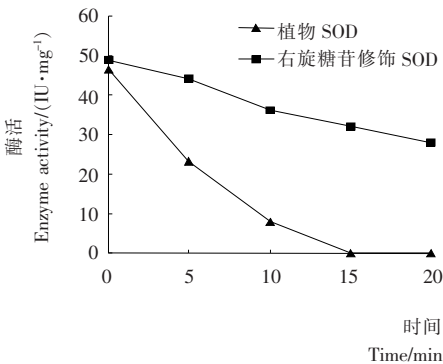


图 2 修饰前后 SOD 在酸性 Na₂HPO₃—KH₂PO₃ 缓冲溶液中酶活随时间的变化

Figure 2 The relation of SOD enzyme activity on time in acid Na₂HPO₃—KH₂PO₃ buffer solution, before and after modification

由图 2 可知,SOD 在酸性条件下酶活整体下降。这可能是因为该 pH 值低于 SOD 酶的最适 pH,导致酶失活引起的。经右旋糖苷修饰后的 SOD 在酸性环境中稳定性明显高于未经修饰的。这是因为右旋糖苷的空间保护,降低了 SOD 酶活性中心的暴露程度,从而减缓了活性损失的速度。原酶在 pH 5.2 条件下,酶活明显下降,5 min 后下降 50%,15 min 后完全失活。而经修饰后的 SOD 失活速率明显低于原酶,5 min 后仅下降 10%,20 min 后仍具有活性。

2.3 SOD 在碱性条件下酶活稳定性分析

分别将植物 SOD 干粉、右旋糖苷修饰 SOD 溶解于 pH 10.8 Na₂CO₃—NaHCO₃ 缓冲溶液,置于 30 ℃水浴,一定时间后取出进行酶活测定,结果见图 3。

比较图 2、3 可知,SOD 在碱性条件下的酶活比酸性条件高。这可能是 pH 值变化能引起酶分子中可离解极性基团的离解状态和电荷发生改变,改变酶的构型和构象,影响了酶分子的电荷分布,从而影响酶的最适 pH 值所致^[13]。图 3 中,经右旋糖苷修饰后的 SOD 在碱性环境中稳定性要好于未经修饰的。原酶在 pH 10.8 条件下,酶活明显下降,

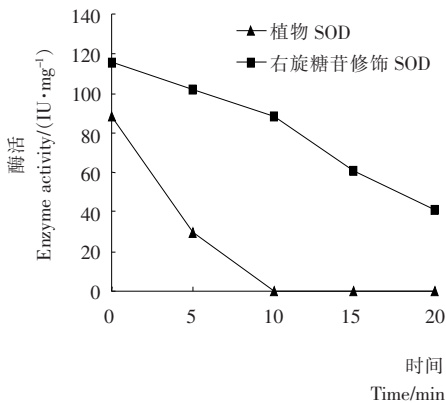


图 3 修饰前后 SOD 在碱性 $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{—NaHCO}_3$ 缓冲溶液中酶活随时间的变化

Figure 3 The relation of SOD enzyme activity on time in base $\text{Na}_2\text{CO}_3\text{—NaHCO}_3$ buffer solution, before and after modification

5 min 后下降了 70%，10 min 后已完全失活。而经修饰后的 SOD 失活速率明显低于原酶，5 min 内仅下降了 10%，20 min 后仍具有初始酶活力的 40%。

2.4 SOD 在乙醇溶液中酶活稳定性分析

分别将植物 SOD 干粉、右旋糖苷修饰 SOD 溶解于浓度分别为 5%，10%，15%，20%，25%，30% 的乙醇缓冲溶液，5 min 后取出进行酶活力测定，结果见图 4。

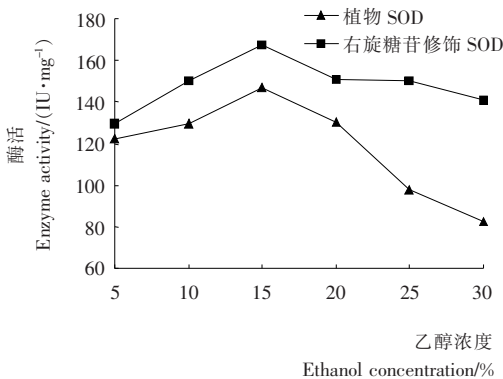


图 4 修饰前后 SOD 在乙醇溶液中酶活的变化

Figure 4 The relation of SOD enzyme activity on ethanol concentration

由图 4 可知，随乙醇浓度升高，SOD 活性呈现先升高后下降的趋势；修饰后的 SOD 比未修饰的酶活高，在乙醇浓度为 30% 时，前者的酶活是后者的 1.7 倍。这可能是由于水溶性有机溶剂乙醇使 SOD 溶解能力升高，酶活因此升高；随着乙醇浓度的逐渐升高，溶剂极性降低，SOD 内部的非极性疏水基翻出机率增大，从而使酶的活力降低^[14]。

2.5 SOD 修饰反应红外光谱分析

修饰反应前后物质的红外光谱图见图 5、6。

图 5 中 $3\,442\text{ cm}^{-1}$ 吸收带是肽键的 —NH 振动吸收带。

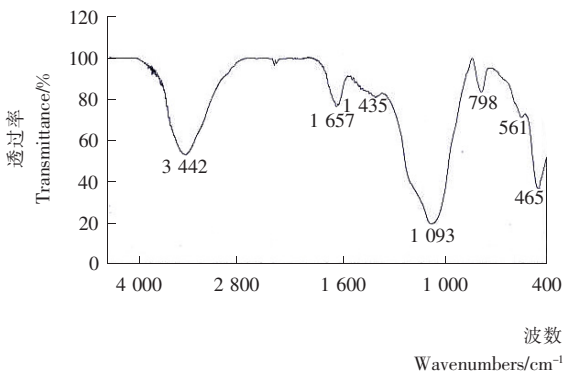


图 5 SOD 红外光谱图

Figure 5 The IR Spectra of SOD

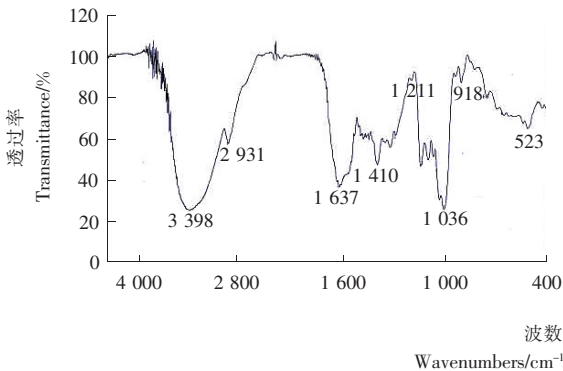


图 6 右旋糖苷修饰 SOD 的红外光谱图

Figure 6 The IR spectra of dextran-modified SOD

由于活化右旋糖苷修饰的 SOD 中醇羟基 —OH 的伸缩振动^[15,16]，该吸收带迁移至 $3\,398\text{ cm}^{-1}$ 处，形成更强的吸收（图 6）。由于 —OH 之间，以及 —OH 和 —NH 的氢键缔合，使得峰型变宽。

更为关键的红外吸收变化出现在官能团区。图 5 SOD 红外图谱中 $1\,657\text{ cm}^{-1}$ 吸收峰是由肽键中 C=O 双键振动引起的。而图 6 中，相关吸收在修饰的 SOD 中出现了 $1\,637\text{ cm}^{-1}$ 的吸收带。这是多糖类物质最特征的红外吸收之一。该吸收带由部分活化糖苷在与 SOD 共价结合时带入，由此证实该 SOD 被糖苷成功修饰。

3 结论

本试验采用右旋糖苷对超氧化物歧化酶进行修饰，通过红外光谱证实该修饰反应的发生。通过邻苯三酚终止剂法分别测定了高温（70℃）、酸性及碱性条件下以及水溶性有机溶剂中修饰前后 SOD 活性变化情况。酶活测定结果表明，经修饰后的 SOD 在 70℃ 高温、pH 5.2 的酸性、pH 10.8 的碱性条件下 20 min 不失活，且可以保持一定活性。右旋糖苷修饰能提高 SOD 酶活稳定性，是增强酶稳定性的有效方法之一。

本研究对提高 SOD 稳定性，改善 SOD 易失活及在体内的半衰期较短等应用性能提供了一种可行手段，为 SOD 在

（下转第 184 页）

对木枣多糖的超声波辅助酸性缓冲液浸提工艺进行优化研究。结果表明,其提取工艺条件为:以 pH 为 5.6 的柠檬酸盐缓冲溶液为提取剂,液料比 23.1 : 1($V : m$),超声波功率 420 W,提取温度 68 ℃,时间 30 min。该条件下木枣多糖的实测提取率为 $(67.38 \pm 0.16)\%$ 。与传统热水提取法相比,超声波辅助酸性缓冲溶液浸提木枣多糖能显著缩短提取时间,降低提取温度,提高多糖提取率,可为木枣的开发利用和木枣多糖的研究提供依据,但是关于此方法提取的木枣多糖的生物活性还有待于进一步的研究。

参考文献

1 柳杨,罗瑞明.长枣多糖水提工艺参数的响应面分析及优化[J].食品与机械,2010,26(5):128~130.

2 Hung Chi-feng, Hsu Bo-yang, Chang Shyh-chung. Antiproliferation of melanoma cells by polysaccharide isolated from Zizyphus jujuba[J]. Nutrition,2012,28(1):98~105.

3 亓树艳,王荔,莫晓燕.大枣多糖的提取工艺及抗氧化作用研究[J].食品与机械,2012,28(4):117~120.

4 Li Jin-wei, Shan Liang, Liu Yuan-fa, et al. Screening of a functional polysaccharide from Zizyphus Jujuba cv. Jinsixiaozao and its property[J]. International Journal of Biological Macromolecules,2011,49(3):255~259.

5 曹犇.木枣多糖抗小鼠运动疲劳的实验研究[J].食品科学,2008,29(9):571~574.

6 池爱平,陈锦屏,熊正英.木枣多糖抗疲劳组分对力竭游泳小鼠糖代谢的影响[J].中国运动医学杂志,2007,26(4):411~415.

7 曹奔,池爱平.酶法提取木枣多糖对游泳小鼠血清酶的影响[J].食品科学,2006,27(10):531~534.

(上接第 174 页)

医药、食品及化妆品等方面的推广应用提供了试验数据。

参考文献

1 毛绍春,李竹英,李聪.酸果蔓中 SOD 酶的提取及活性测定[J].食品与机械,2007,23(1):62~63,68.

2 杨清媛,张相年,赵树进.聚乙二醇化学修饰超氧化物歧化酶的研究进展[J].中国老年学杂志,2012(20):4597~4599.

3 齐敬总,王凤山,张鸿伟,等.低分子肝素修饰超氧化物歧化酶及修饰酶的理化性质研究[J].中国药学杂志,2006,41(2):150~153.

4 杨学山,王本启,王正娟,等.月桂酰氯修饰羊血超氧化物歧化酶工艺优化及酶学性质[J].食品科学,2014(7):128~131.

5 Mulbaier M, Giannis A. The synthesis and oxidative properties of polymer-supported IBX[J]. Angew. Chem. Int. Ed., 2001,40(23):4393~4394.

6 阎家麒,徐龙伟,高应,等.修饰超氧化物歧化酶的制备、性质及其在化妆品中应用的研究[J].日用化学工业,1992(6):4~9.

7 周志刚.超氧化物歧化酶的化学修饰进展[J].安徽医药,2010(6):623~626.

8 Nakamura S, Kato A, Kobayashi K. New antimicrobial charac-

184

8 杨春,丁卫英,邓晓燕,等.超声波辅助浸提木枣多糖优化工艺的研究[J].农产品加工(学刊),2008(5):24~26.

9 樊君,尚红伟,王华敏,等.大枣多糖的提取工艺研究[J].食品研究与开发,2002,23(3):29~31.

10 Li Jin-wei, Liu Yuan-fa, Fan Liu-ping, et al. Antioxidant activities of polysaccharides from the fruiting bodies of Zizyphus Jujuba cv. Jinsixiaozao[J]. Carbohydrate Polymers,2011,84(1):390~394.

11 张利芳. 苦瓜多糖的纯化及其免疫和抗氧化活性作用[D].武汉:华中农业大学,2010.

12 刘鹏,程显好,刘亚丽,等.虫草菌丝体多糖的提取方法[J].食品与发酵工业,2007,33(3):140~142.

13 Wang Zhao-mei, Cheung Yi-ching, Leung Po-hong, et al. Ultrasonic treatment for improved solution properties of a high-molecular weight exopolysaccharide produced by a medicinal fungus[J]. Biore-source Technology,2010,101(14):5517~5522.

14 曾里,夏之宁.超声波和微波对中药提取的促进和影响[J].化学研究与应用,2002,14(3):245~249.

15 闪俊杰,杜振雷,李青,等.超声波在化学工业中的应用[J].河北工业科技,2009,26(2):127~130.

16 杨昱,白靖文,俞志刚.超声辅助提取技术在天然产物提取中的应用[J].食品与机械,2011,27(1):170~174.

17 Chen Xiao-ping, Wang Wan-xiang, Li Shui-bing, et al. Optimization of ultrasound-assisted extraction of Lingzhi polysaccharides using response surface methodology and its inhibitory effect on cervical cancer cells[J]. Carbohydrate Polymers,2010,80(10):944~948.

18 潘利华,徐学玲,罗建平.超声辅助提取水不溶性大豆膳食纤维及其物理特性[J].农业工程学报,2011,27(9):387~392.

teristics of lysozyme-dextran conjugate[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1991, 39(4): 647~650.

9 Mateo C, Palomo J M, van Langen L M, et al. A new, mild cross-linking methodology to prepare cross-linked enzyme aggregates[J]. Biotechnology and Bioengineering, 2004, 86(3): 273~276.

10 曹向宇,刘剑利,朱俊丰,等.右旋糖苷修饰玉米 SOD 研究[J].食品研究与开发,2010(3):17~19.

11 王会文,刘建荣,静天玉,等.微量超氧化物歧化酶邻苯三酚/Vc 测活法[J].河北大学学报(自然科学),2000,20(1):61~62.

12 舒薇,贺丽苹,崔堂兵,等.聚乙二醇修饰对木瓜凝乳蛋白酶酶学及药物生物学性质的影响[J].华南农业大学学报,2006,27(1):65~68.

13 张建萍,刘恩岐,巫永华,等.右旋糖苷对生姜蛋白酶的化学修饰及其酶学性质影响[J].食品科学,2013,34(9):228~233.

14 赵洁,徐斐,曹慧,等.水溶性有机溶剂对鸡肝酯酶酶活力的影响[J].食品科学,2012,33(15):216~219.

15 蔡为荣,顾小红,汤坚.仙人掌多糖的提取及其结构初步研究[J].食品与机械,2007,23(4):68~71,101.

16 冯文娟,徐泽平,周传兵,等.酵母 β -1,3-D-葡聚糖提取及结构鉴定[J].食品与机械,2013,29(5):151~153.