

# 深海嗜热菌耐高温 Mn-超氧化物歧化酶的性质研究

邓盾<sup>1,2</sup>, 张云<sup>1,3</sup>, 孙爱君<sup>1,3</sup>, 梁甲元<sup>1,3</sup>, 胡云峰<sup>1,3,4</sup>

(1. 中国科学院南海海洋研究所, 中国科学院热带海洋生物资源与生态重点实验室, 广东广州 510301) (2. 中国科学院大学, 北京 100049) (3. 中国科学院南海海洋研究所, 广东省海洋药物重点实验室, 广东广州 510301) (4. 南海生物资源开发与利用协同创新中心, 广东广州 510301)

**摘要:**嗜热菌 *Bacillus* sp. SCSIO 15121 是从南中国海沉积物中分离的, 本研究从其基因组中克隆了一个编码超氧化物歧化酶的基因 *SODBa3*, 该基因长度为 609 bp, 对应着 202 个氨基酸残基。本研究构建 pET28a(+)-*SODBa3* 表达载体, 并在大肠杆菌 BL21 (DE3) 中实现了 *SODBa3* 的可溶性异源表达。本文研究了重组 *SODBa3* 的酶学性质, 最适 pH 为 8.0~8.5, 最适反应温度为 60 °C, 酶活为 3215.6 U/mg。经鉴定, *SODBa3* 对 CH<sub>3</sub>Cl-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH 敏感, 但对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 不敏感, 因此 *SODBa3* 是一种 Mn 离子特异的 SOD。采用圆二色谱结合不同温度下酶活的变化研究酶的热稳定性, 结果说明 *SODBa3* 在 40~70 °C 处理 1 h 酶活保持较高的稳定性, 在 100 °C 下处理 1 h 剩余酶活为 50%。金属离子耐受性试验表明 5 mM 的 Mn<sup>2+</sup> 对 *SODBa3* 的酶活有促进作用, *SODBa3* 对乙醇和 DMSO 的耐受性较好, 剩余酶活分别为对照的 112.56±9.77 和 98.55±6.47%, 这些结果表明 *SODBa3* 具有较好的工业应用前景。

**关键词:** 深海微生物; Mn-超氧化物歧化酶; 枯草芽孢杆菌; 高耐热性

文章编号: 1673-9078(2016)9-77-83

DOI: 10.13982/j.mfst.1673-9078.2016.9.012

## Characterization of a Thermostable Manganese Superoxide Dismutase from a Deep-sea Thermophilic Bacterium

DENG Dun<sup>1,2</sup>, ZHANG Yun<sup>1,3</sup>, SUN Ai-jun<sup>1,3</sup>, LIANG Jia-yuan<sup>1,3</sup>, HU Yun-feng<sup>1,3,4</sup>

(1. Key Laboratory of Tropical Marine Bio-resources and Ecology, Guangdong Key Laboratory of Marine Materia Medica, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China) (2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China) (3. Guangdong Key Laboratory of Marine Materia Medica, South China Sea Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510301, China) (4. South China Sea Bio-Resource Exploitation and Utilization Collaborative Innovation Center, Guangzhou 510301, China)

**Abstract:** An SOD gene (*SODBa3*) was cloned from the genome of *Bacillus* sp. SCSIO 15121 that was originally isolated from the sediment of the South China Sea. *SODBa3* contains 609 base pairs (bp) and corresponds to 202 amino acid residues. The pET28a(+)-*SODBa3* expression vector was constructed in this study, and heterologous expression of soluble *SODBa3* was achieved in *Escherichia coli* BL21 (DE3). Enzymatic properties of the recombinant *SODBa3* were then studied; the optimal pH and reaction temperature were 8.0~8.5 and 60 °C, respectively, and the specific activity of *SODBa3* was 3215.6 U/mg. The results showed that the activity of *SODBa3* was sensitive to CH<sub>3</sub>Cl-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH but was not affected by hydrogen peroxide, indicating that *SODBa3* is a Mn<sup>2+</sup>-dependent enzyme. The thermostability of *SODBa3* was also studied by circular dichroism spectroscopy and by examination of changes in the activity of *SODBa3* at various temperatures. The results revealed that *SODBa3* was relatively stable during treatment at 40~70 °C for one hour, and the residual activity was 50% after incubation at 100 °C for one hour. The metal ion tolerance experiment indicated that 5 mM Mn<sup>2+</sup> had stimulating effects on *SODBa3* activity; *SODBa3* showed good tolerance to 10% ethanol and dimethyl sulfoxide (DMSO), and the residual activities were 112.56±9.77% and 98.55±6.47% of the control activity, respectively. These findings indicate that microbial *SODBa3* has high potential for utilization in the industry.

**Key words:** deep-sea microorganism; Mn-superoxide dismutase; *Bacillus subtilis*; high heat resistance

收稿日期: 2015-10-22

基金项目: 中国科学院战略性先导科技专项 (XDA11030404)

作者简介: 邓盾 (1985-), 男, 博士, 研究方向: 生物催化与酶工程

通讯作者: 胡云峰 (1980-), 男, 博士, 研究员, 研究方向: 生物催化与酶工程

以超氧自由基为代表的活性氧能够引起 DNA、RNA、蛋白质和脂类的氧化损伤,对生物可造成严重损害。超氧化物歧化酶(Superoxide dismutases, SODs, EC 1.15.1.1)是一类分布广泛的金属酶,其作用是清除生物体内的活性氧,帮助生物渡过逆境。在代谢过程中 SODs 把超氧自由基转化成  $O_2$  和  $H_2O_2$ ,  $H_2O_2$  再被过氧化氢酶进一步降解为无害的  $H_2O$ , 从而完成对氧自由基的清除。根据金属离子辅基的不同,可将 SOD 分为三大类: Cu/Zn-SOD, Fe 或 Mn-SOD 以及 Ni-SOD, 其中 Ni-SOD 主要存在于海洋放线菌和蓝细菌中。不同的 SOD 在细胞中分布区域不同,也表明了进化过程中生物对于氧化损伤形成了多层次的防御体系。

由于具有抗氧化作用, SODs 在食品、农业、医药、化妆品以及生物电池制造等领域有着广泛应用。在食品中 SODs 常被用作膳食补充剂<sup>[1,2]</sup>, 也可以用作易变质食品的防腐剂。在医药方面, SODs 可用作肿瘤辅助治疗的药物来防止肿瘤的进一步发展,还具有减少抗癌药物对细胞损害的作用<sup>[3]</sup>。在化妆品中, SODs 被广泛用于保护皮肤。另外,基于 SODs 的生物传感器在食品和医药领域也有着广泛应用<sup>[4]</sup>。由于高温是导致酶变性和失活的重要因素,而工业生产和实际应用中也会使用到高温处理,这对于 SODs 的热稳定性就有了更高要求。分离和鉴定热稳定 SODs 是目前的研究热点,一般认为枯草芽孢杆菌对人畜是无害的,因此从枯草芽孢杆菌中开发出耐热 SODs 有着重要意义。

海洋占地球 2/3 的面积,生物资源丰富,而且环境复杂,许多生物都能适应了高盐、高压、高温等环境,这为我们从海洋中获得具有特性的酶提供了充分来源。但是从海洋微生物中分离和鉴定 SODs 的报道却不多见。实验室前期获得了一株耐高温的枯草芽孢杆菌(*Bacillus* sp.SCSIO 15121),它能够在 60 °C 培养环境中生长,本研究对其中的耐高温 SODs 进行了克隆、表达和鉴定。

## 1 材料方法

### 1.1 材料与仪器

#### 1.1.1 菌株与质粒

*Bacillus* sp.SCSIO 15121 分离自南中国海(89 ° 29.22'E, 10 ° 00.12'N)-3400 米沉积物中,样品于 2014 年 4 月 26 日,乘坐南海海洋研究所科考船采集,为灰白色粘土质粉砂,样品采集后于 -20 °C 冷库中保藏。质粒 pET-28a(+) 购自 Novagen, USA, *Escherichia coli* DH5 和 *Escherichia coli* BL21(DE3) (Promega) 分别作为目的基因的克隆和表达宿主。

#### 1.1.2 试剂

主要试剂: 细菌基因组提取试剂盒,限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Xho* I 购自 Thermo Fisher Scientific Inc. T4 连接酶 TransStart<sup>®</sup> FastPfu DNA PolyMerase 购自北京全式金生物科技有限公司。DNA 胶回收试剂盒购自 Omega bio-tek。质粒提取试剂盒购自上海捷瑞生物科技有限公司。Ni Sephtraose<sup>™</sup> 6 Fast Flow 和 PD-10 脱盐柱购自 GE Healthcare Life Sciences, UK。其它试剂皆为分析纯。

#### 1.1.3 仪器

PCR 仪: 美国伯乐 S1000<sup>™</sup> Thermal Cycler; 冷冻离心机: 德国 Beckman Allegra X-30R 酶标仪: 瑞士 Tecan Infinite M200 Pro; 高压灭菌锅: 日本松下 MLS-3781L-PC; 摇床: 上海世平叠加式叠加式摇床 PJS-2012R; 超声破碎仪: 宁波新芝生物科技股份有限公司 SCIENTZ-II D; pH 计: 德国 Sartorius DB-10。

## 1.2 方法

### 1.2.1 基因克隆及载体构建

*Bacillus* sp.SCSIO 15121 基因组简化测序由上海美吉生物科技有限公司完成,通过生物信息学分析,发现其基因组中含有 3 个注释为 SOD 的开放阅读框(Open reading frame, ORF),根据其中一种超氧化物歧化酶的 ORF(SODBa3)信息设计引物,交由生工生物工程(上海)股份有限公司合成,引物具体信息如下:

SODBa3 F 5'-CCGGAATTCATGGCTTACAAAC TTCCAG-3'(下划线表示 *EcoR* I 酶切位点);

SODBa3 R 5'-CCGCTCGAGTTATTTTGCTTCG CTGTAAAG-3'(下划线表示 *Xho* I 酶切位点)。

PCR 扩增程序为①95 °C 变性 5 min; ②95 °C 变性 1 min; ③54 °C 退火 30 s; ④72 °C 延伸 1 min 10 s, ②到④进行 30 个循环; ⑤72 °C 延伸 10 min, 冷却到 16 °C。将 PCR 产物在 1% 琼脂糖凝胶中,于 120 V 电压下电泳 20 min,置于凝胶成像系统中观察。回收 600 bp 左右的条带。PCR 产物和 pET-28a(+) 分别用 *EcoR* I 和 *Xho* I 酶切,分别回收。按照插入片段和载体摩尔比 3:1 的比例,用 T4 连接酶连接 20 min 后,转入大肠杆菌 DH5a 感受态细胞,冰浴 30 min,于 42 °C 水浴锅热激 90 s,冰浴 2 min 后加入 500 μL LB 液体培养基,37 °C 200 r/min 培养 1 h。培养物离心后涂布在含有 50 μL/mL 的卡那霉素 LB 平板,培养 16 h 左右后挑选单菌落,经酶切和测序验证无误后,表示载体构建成功。

### 1.2.2 序列分析

ORF 分析采用在线程序 FramePlot 4.0beta

(<http://nocardia.nih.gov/fp4/>)完成。信号肽序列预测采用 SignalP 4.0 预测工具 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/>)。分子量和等电点计算使用 ExPASy 在线程序 ([http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/))。使用 BLAST 进行蛋白序列比对 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>)。三级结构预测用 Automatic Modeling Mode server (<http://www.sbg.bio.ic.ac.uk/phyre2/html/page.cgi?id=index>)。多序列比对使用 MEGA 5.0 程序。

### 1.2.3 SODBa3 表达与纯化

将构建好的 pET-28a(+)-SODBa3 转入到大肠杆菌 BL21(DE3)感受态细胞中, 具体方法参照 1.2.1。BL21(DE3)培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.5 左右之间, 加 IPTG 至浓度 0.2 mM, 同时加入 1 mM MnCl<sub>2</sub>, 25 °C 培养 16 h。菌液 4000 r/min, 4 °C 离心 10 min, 收集菌体。300 mL 菌体用 20 mL (50 mM, pH 7.2) PBS 缓冲液重悬菌体, 超声破碎 15 min, 4 °C, 10000 r/min 离心 10 min, 收集上清。

上清由镍柱结合后, 用 30 mM 咪唑洗脱杂蛋白, 再用 5 mL, 500 mM 咪唑洗脱目的蛋白, 收集中间 3.5 mL。使用 PD10 脱盐柱进行脱盐, 具体方法参照厂家说明书。纯化的蛋白用 10%的 SDS-PAGE 鉴定分子量和纯度。

### 1.2.4 SODBa3 酶活测定

SOD 活力测定采用氮蓝四唑(NBT)光还原法<sup>[5]</sup>, 具体步骤如下: ①取 54 mL, 14.5 mmol/L DL-甲硫氨酸; 2 mL, 0.05 mol/L 的 3 μmol/L EDTA (pH 7.8 磷酸缓冲液配制); 2 mL, 2.25 mmol/L 的 NBT; 2 mL, 60 μmol/L 的核黄素溶液混合, 配制成反应混合液, 避光放置。②在盛有 3 mL 反应混合液的试管中, 加入酶液, 混合后放在透明试管架上, 在光照培养箱内照光 20 min。③取出试管, 迅速测定 OD<sub>560</sub> 的数值。以缓冲液代替酶液的照光管为最大还原值, 不照光管为对照。

酶活单位定义: 单位时间内 NBT 还原反应被抑制 50%时所需的酶量为一个酶活单位。

### 1.2.5 SODBa3 最适 pH 和最适反应温度

配制 50 mM 的不同 pH 值的缓冲溶液: NaAc/HAc (pH 5.0~6.0), 磷酸缓冲液(pH 6.5~7.5), Tris-HCl (pH 8.0~9.0)和甘氨酸-NaOH (pH 9.5~10.0)。按照 1.2.4 的方法, 于 35 °C 下测定 SODBa3 在不同缓冲液中的酶活, 以最大酶活值为 100%。将 50 mM, pH 7.5 的缓冲液置于不同温度(30~90 °C)下预热 30 min, 按照 1.2.4 的方法测定不同温度对重组 SODBa3 酶活的影响, 以最大酶活值为 100%。

### 1.2.6 SODBa3 的热稳定性

将酶液在 40~100 °C 处理 1 h 后置于 50 mM, pH 8.5 的缓冲液中, 按照 1.2.4 的方法在 pH 8.5 的缓冲液中, 于 60 °C 下测定酶活。以酶活最高的处理组为 100%。

### 1.2.7 圆二色谱测定方法

为了比较不同温度(40~100 °C)对 SODBa3 结构的影响, 采用圆二色谱测定 200~260 nm 范围内蛋白的吸收光谱变化。蛋白浓度控制在 0.1 mg/mL, 样品置于 1 mm 石英比色皿中, 圆二色谱光谱扫描速度设置为 100 nm/min, 每 0.1 nm 读取一次数据。

### 1.2.8 有机溶剂和变性剂对 SODBa3 酶活的影响

酶液与终浓度为 10%(V/V)的有机溶剂, 0.1%(V/V)的 β-巯基乙醇和 2 M 的尿素(未加酶液的为空白对照)于 4 °C 处理 1 h 后, 按照 1.2.4 的方法在 pH 8.5 的缓冲液中, 60 °C 下测定酶活。以未处理酶液的酶活为 100%。

### 1.2.9 金属离子对 SODBa3 酶活的影响

在使用 pH 7.0 的缓冲液配制金属离子溶液, 酶与 5 mM 金属离子(未加酶液的为空白对照)4 °C 处理 1 h 后, 按照 1.2.4 的方法在 pH 8.5 的缓冲液中, 于 60 °C 下测定酶活。以未处理酶液的酶活为 100%。

### 1.2.10 SODBa3 活性电泳、染色及类型的鉴定

SOD 活性电泳采用 NBT 染色法, 先配制以下溶液:

1 号染液, 称取 200 mg NBT 溶于 100 mL 去离子水中, 配成  $2.45 \times 10^{-3}$  mol/L 的 NBT 溶液, 可反复使用, 直至出现沉淀。

2 号染液, 称取 1.05 mg 核黄素, 加入 418 μL TEMED, 用 50 mmol/L pH 7.8 磷酸缓冲液定容至 100 mL, 配成  $2.8 \times 10^{-2}$  mol/L TEMED 和  $2.8 \times 10^{-5}$  mol/L 的核黄素溶液。

3 号染液, 称取 0.29 g EDTA, 用 50 mmol/L 的磷酸缓冲液(pH 7.8)定容至 1 L, 配成  $1 \times 10^{-4}$  mol/L 的 EDTA 溶液。

去掉 SDS-PAGE 中的 SDS, 于 120 V 下跑 2 h, 将凝胶置于 1 号染液 15 min, 2 号染液 20 min, 以上步骤在黑暗中进行。

对于 SOD 金属离子类型鉴定, 放入在 2 号染液前加入抑制剂, 及加入 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 CH<sub>3</sub>Cl-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH (3:5, V/V)处理 1 h。最后放入 3 号染液, 于光下曝光至白色条带清晰。

### 1.2.11 数据统计分析

数据采用平均值±标准偏差表示; 采用 Excel 2010 软件绘图。数据统计 SPSS 19.0 软件进行, 采用

One-way ANOVA 和 Students' T test 检验对数据进行分  
析, 显著差异为  $p < 0.05$ 。

## 2 结果与讨论

### 2.1 SODBa3 序列分析

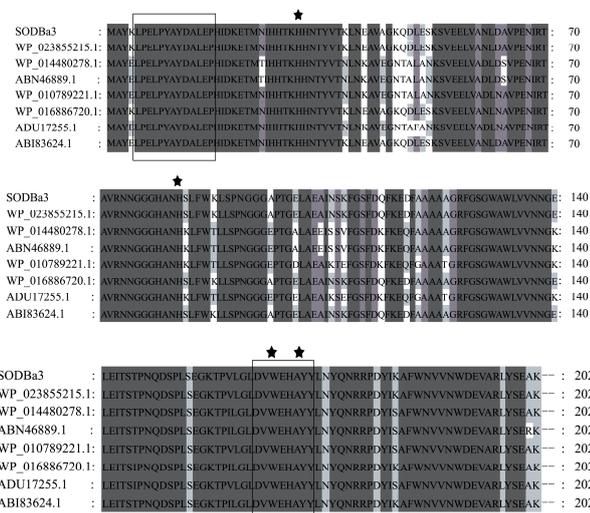


图1 SODBa3 和其它 Mn-SOD 序列比对

Fig.1 Sequence alignment of SODBa3 with some other Mn-SODs

*Bacillus* sp.SCSIO 15121 分离自 YPV 培养基, 可以在 70 °C 培养条件下生长, 经 16s rDNA 测序比  
对, 和 *Bacillus licheniformis* 的相似度达 97.29%, 是一个嗜热菌。通常情况下认为海底是一个低温环  
境, 应该以嗜冷微生物居多, 但事实上海底的生态  
环境复杂, 不仅存在寒冷环境, 同时高压、高盐等  
环境和海底热液活动区也非常常见, *Bacillus* sp.  
SCSIO 15121 的分离也证实了海底生态环境的多样  
性。

通过对 *Bacillus* sp. SCSIO 15121 基因组进行测  
序并注释, 其中包含 3 个注释为 SOD 的 ORF, 其  
中一个 SOD (SODBa3) 的编码基因由 609 bp 组成,  
GC 含量为 45%, 对应着 202 个氨基酸残基。经预  
测, 氨基酸序列中不含信号肽。SODBa3 氨基酸 Blast  
结果显示和 *Bacillus* sp.中的假定 SOD (Accession  
No. WP\_023855215.1)相似度达到 100%, 但是这个  
酶的酶学性质没有被研究。SODBa3 氨基酸序列和  
其它 SOD 比对结果见图 1, 其序列中存在 Mn-SOD  
特征序列 LPXLPYXXXLEP 和 DXWEHXXY<sup>[6,7]</sup>,  
说明 SODBa3 可能是一个 Mn-SOD。通过  
SWISSMODEL 对 SODBa3 的三级结构进行模拟,  
SODBa3 和 *Bacillus subtilis* 中的 Mn-SOD(PDB code  
2rcv)<sup>[8]</sup>相似度最高达到 88.12%。其活性中心由 3 个

组氨酸 His27, His82, His168 和一个 Asp164 组成,  
这 4 个氨基酸在三级结构中的位置很近, 构成活性  
中心, 这和其它 Mn-SOD 中的情况类似<sup>[7]</sup>。

### 2.2 SODBa3 的表达纯化

通过 [http://web.expasy.org/compute\\_pi/](http://web.expasy.org/compute_pi/) 计算,  
SODBa3 理论分子量为 22.53 ku, pI 为 5.33。  
SDS-PAGE 电泳结果显示(图2)重组 SODBa3 的分子量为  
27 ku 左右, 比理论分子量稍大, 类似的结果也出  
现在文献<sup>[9]</sup>中, 可能是由于 N 端 6 个组氨酸标签或蛋  
白翻译后被修饰等原因影响了蛋白的电泳行为<sup>[10]</sup>。  
SODBa3 在 BL21(DE3)中实现了可溶性表达, 而且可  
溶性蛋白比例较高。使用不同咪唑浓度洗脱蛋白, 大  
多数蛋白在咪唑浓度为 300 mM 时洗脱下来。

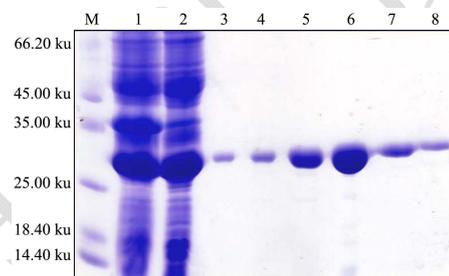


图2 重组蛋白 SODBa3 样品的 SDS-PAGE 图

Fig.2 The SDS-PAGE profile of purified recombinant protein SODBa3

注: M, Marker; 1, IPTG 诱导后 *E. coli* BL21(DE3),  
pET28a-SODBa3 总蛋白; 2, IPTG 诱导后 *E. coli* BL21(DE3),  
pET28a-SODBa3 上清; 3~8, 80、150、200、300、400 和 500 mM  
咪唑洗脱液。

### 2.3 pH 对 SODBa3 活性的影响

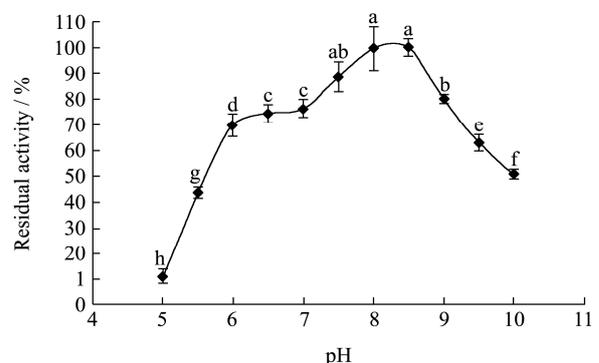


图3 pH 对 SODBa3 活性的影响

Fig.3 Effects of pH on the activity of SODBa3

注: 采用单因素方差分析进行统计分析, 不同的小写字母  
表示在 0.05 水平上(双侧)具有的显著性差异。

SODBa3 在不同(pH 5.0~10.0)的缓冲液中的活性  
不同, 结果见图 3。SODBa3 在碱性范围(pH 7.0~10.0)

内的酶活性较好, 相对酶活均大于 50%, pH 小于 6 时酶活急剧下降, SODBa3 最适 pH 为 8.0~8.5。在已报道的 *Bacillus* 属的 SOD 中, 有不少最适酶活都是在碱性范围内, 和本研究表现出一致性<sup>[9,11,12]</sup>。

### 2.4 温度对 SODBa3 活性的影响

实验比较了不同温度(30~90 °C)下, SODBa3 活性变化情况, 结果见图 4。随温度变化, SODBa3 的酶活也从 14~100%变化不等, 酶活最高在 60 °C, 高于或低于 60 °C酶活呈均下降趋势。可见 SODBa3 的最适反应温度为 60 °C。

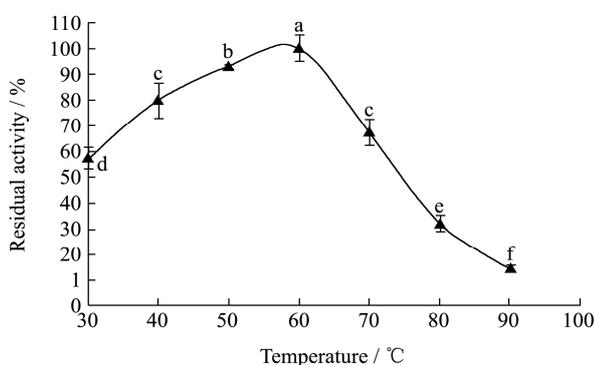


图 4 温度对 SODBa3 活性的影响

Fig.4 Effects of temperature on the activity of SODBa3

注: 采用单因素方差分析进行统计分析, 不同的小写字母表示在 0.05 水平上(双侧)具有显著性差异。

### 2.5 SODBa3 的热稳定性

SODBa3 在不同温度(40~100 °C)下孵育 1 h, 在 Tris-HCl (pH 8.5)缓冲液中, 于 60 °C下测定酶活, 结果见图 5。SODBa3 的酶活在 40 °C的稳定性最高, 50 °C~70 °C保持较高活性, 80~100 °C酶活呈下降趋势。值得注意的是 SODBa3 在 100 °C处理 1 h 后, 剩余酶活仍然可达到 50%, 由此可见 SODBa3 是一个耐高温酶, 并且活性电泳实验也证实了这一结果(图 6)。

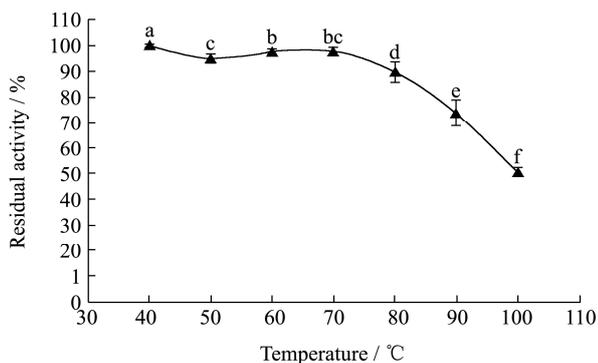


图 5 SODBa3 的热稳定性

Fig.5 Thermal stability of SODBa3

注: 采用单因素方差分析进行统计分析, 不同的小写字母表示在 0.05 水平上(双侧) 具有显著性差异。

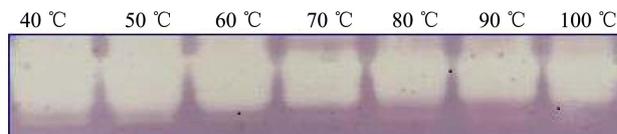


图 6 不同温度处理 1 h 后, SODBa3 活性电泳情况

Fig.6 Native PAGE analysis of SODBa3 after incubation at various temperatures for one hour

### 2.6 圆二色谱分析 SODBa3 的稳定性

圆二色谱(circular dichroism spectroscopy, CD)可以用来检测蛋白的二级结构和评价蛋白的稳定性。在不同的温度下, SODBa3 在 200~260 nm 范围内表现出不同的光谱特征, 在 210 nm 和 225 nm 处形成 2 个底部(图 7)。当 SODBa3 在 40~70 °C 处理时, 210~225 nm 表现出较好的稳定性, 说明在这个范围内酶的二级结构是稳定的, 这一结果和上面温度稳定性试验基本一致, 说明 SODBa3 是一个高温酶。

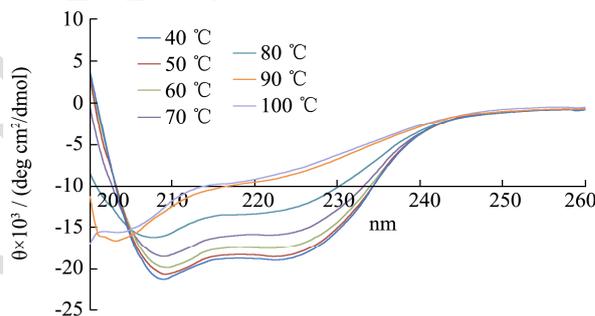


图 7 不同温度处理 SODBa3 的圆二色谱图

Fig.7 Circular dichroism spectra of a purified SODBa3 sample after incubation at various temperatures

### 2.7 SODBa3 金属辅基类型

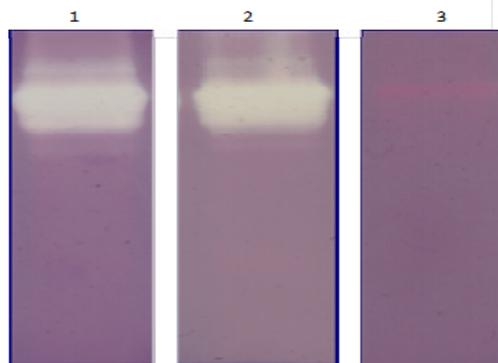


图 8 鉴定 SODBa3 金属辅基类型活性电泳图

Fig.8 Identification of the metal cofactor type of SODBa3 by native PAGE

注: 1, SODBa3 未处理; 2, 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 处理 SODBa3; 3, CH<sub>3</sub>Cl-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH(3:5, V/V)处理 SODBa3。

Fe-SOD 和 Mn-SOD 同属于 SODA 亚家族, 它们在进化上关系较近, 往往难以区分。由于 Fe-SOD 中含有比较保守的色氨酸, 而 Mn-SOD 在相应的位置是天冬氨酸, 因此 Fe-SOD 对 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 敏感, 而 Mn-SOD 对 CH<sub>3</sub>Cl-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH 敏感。通过实验可以发现 SODBa3 对 10 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 不敏感, 对 CH<sub>3</sub>Cl-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH(3:5, V/V) 敏感(图 8), 符合 Mn-SOD 特征, 这一结果和上述的序列比对结果一致。

## 2.8 金属离子对 SODBa3 活性的影响

表 1 不同金属离子对 SODBa3 活性影响

Table 1 Effects of various metal ions on the activity of SODBa3

金属离子	终浓度/mM	相对酶活/%
Control		100±3.55
Mg <sup>2+</sup>	5	78.92±3.11*
Ca <sup>2+</sup>	5	81.98±2.38*
Zn <sup>2+</sup>	5	83.11±5.56*
Cu <sup>2+</sup>	5	110.11±3.21
Co <sup>2+</sup>	5	86.09±4.74*
Ni <sup>2+</sup>	5	98.41±6.04
Ba <sup>2+</sup>	5	73.89±3.69*
Mn <sup>2+</sup>	5	135.26±7.87*

注: 采用 Students' T test 进行统计分析, “\*”表示在 0.05 水平上(双侧)存在显著性差异。

采用 8 种金属离子测试 SODBa3 的金属离子耐受性, 为了避免金属离子沉淀, 酶液和金属离子在 50 mM Tris-HCl pH 为 7.0 的溶液中孵育 30 min, 然后测定酶活, 结果见表 1。由表可知, Mn<sup>2+</sup>对酶活有促进作用, 为对照 135.26±7.87%。Cu<sup>2+</sup>和 Ni<sup>2+</sup>对酶活没有显著影响, 分别为对照的 110.11±3.2 和 98.41±6.04%, 其它金属离子对酶活均有抑制作用的影响较小。

## 2.9 有机溶剂、抑制剂和变性剂对 SODBa3 酶活的影响

实验比较了不同有机溶剂、激活剂和变性剂对 SODBa3 酶活的影响, 结果见表 2。在所选的 5 种有机溶剂中, 乙醇(10%, V/V)和二甲基亚砜(10%, V/V)对酶活没有显著的影响, 分别为对照的 112.56±9.77 和 98.55±6.47%, 说明 SODBa3 对乙醇和二甲基亚砜有较好的耐受性, 而其它有机溶剂均表现出一定抑制

作用。在生物电池的电极制备过程中, 常常使用有机溶剂进行固定, 良好的有机溶剂耐受性有利于电极的制备, 因此 SODBa3 在生物电池的制备方面具有较大应用价值。激活剂 Tween 20、Triton X-100、EDTA 以及变性剂 β-ME 和尿素对酶活均有抑制作用, 但是 SODBa3 对 EDTA 和尿素的耐受性相对较好, 分别为对照的 82.13±2.83%和 80.20±7.45%。

表 2 不同有机溶剂、抑制剂和变性剂对 SODBa3 活性影响

Table 2 Effects of various organic solvents, inhibitors, and denaturants on the activity of SODBa3

有机溶剂、抑制剂和变性剂	浓度	相对酶活/%
Control		100±2.35
Tween 20	0.1%	28.54±2.10*
Triton X-100	0.1%	19.36±4.07*
乙醇 Ethanol	10%	112.56±9.77
乙酸乙酯 Ethyl Acetate	10%	68.33±3.94*
乙腈 Acetonitrile	10%	83.17±5.13*
二甲基亚砜 DMSO	10%	98.55±6.47
丙酮 Acetone	10%	76.37±6.29*
β-巯基乙醇 β-ME	0.1%	33.40±3.55*
尿素 Urea	2 M	80.20±7.45*
EDTA	1 mM	82.13±2.83*

注: 采用 Students' T test 进行统计分析, “\*”表示在 0.05 水平上(双侧)存在显著性差异。

## 2.10 SODBa3 酶活及酶学性质比较

从嗜热微生物中得到的 SOD 一般具有较好的热稳定性, 一些典型的热稳定 SOD 的性质见表 3。在已报道的 SOD 中, 酶活最高(不同测定方法会有差异)的是来源于热泉细菌 *Bacillus licheniformis* 的 SODM20<sup>[11]</sup>, 其比酶活达到 9780 U/mg, 虽然 SODBa3 的酶活比 SODM20 低, 但是热稳定性要高于 SODM20。热稳定性较高的是 *Thermus thermophilus* HB27 中一个 SOD, 在 100 °C 处理 1 h 剩余 57% 的酶活, 110 °C 处理 1 h 还有 20% 的酶活<sup>[15]</sup>。SODBa3 的热稳定性和这个酶较为接近, 但是 SODBa3 酶活为 3215.6 U/mg, 要高于 *T. thermophilus* HB27 中的这个 SOD。由此可见, SODBa3 具有出色的热稳定性。

工业生产中常常使用热灭菌的方法进行消毒, 比如食品中的巴氏灭菌法, SODBa3 较高的热稳定性增加了其应用的可能性。另外, 通常认为 *Bacillus* 属的微生物对人畜是无害的, 因而 SODBa3 具有较高的生物安全性和应用价值。

表3 SODBa3和其它热温度SOD酶学性质比较

Table 3 Comparison of the basic properties of SODBa3 with those of some other thermostable SODs

来源	基本性质	比酶活	参考文献
<i>Bacillus</i> sp. SCSIO15121	最适pH 8.5; 最适反应温度60 °C; 100 °C处理 1 h剩余50%的酶活	3215.60 U/mg (氯化NBT法)	本研究
<i>Geobacillus</i> sp. EPT3	最适pH 8.0; 最适反应温度55 °C; 90 °C处理 1 min剩余57%的酶活	未提供	[6]
<i>Bacillus licheniformis</i>	最适pH 8.0; 最适反应温度55 °C; 95 °C处理 10 min剩余50%的酶活	9780 U/mg (氯化NBT法)	[11]
<i>Bacillus subtilis</i> ATCC 9372	最适pH 8.0; 55 °C处理90 min剩余75%的酶活	2553.21 U/mg(邻苯三酚法)	[12]
<i>Chlamydia pneumoniae</i>	最适pH 7.5; 90 °C处理30 min剩余10%的酶活	840 U/mg (细胞色素C- 黄嘌呤氧化酶法)	[13]
<i>Thermomyces lanuginosus</i>	最适pH 7.5; 最适反应温度55 °C; 80 °C处理 28 min剩余50%的酶活	1760.8 U/mL (氯化NBT法)	[14]
<i>Thermus thermophilus</i> HB27	最适pH 5.0; 最适反应温度80 °C; 100 °C处理 1 h剩余57%的酶活	1417.5 U/mg(邻苯三酚法)	[15]

### 3 结论

本研究从南中国海沉积物中分离到一个耐高温的枯草芽孢杆菌(*Bacillus* sp. SCSIO15121), 通过全基因组测序, 获得了3个注释为SOD的ORF。本研究克隆其中一个SODBa3, 并构建了pET28a(+)-SODBa3表达载体, 实现了其在大肠杆菌BL21(DE)3中的可溶性表达, 经鉴定该酶最适pH为8.0~8.5, 最适反应温度60 °C, 比酶活为3215.60 U/mg。SODBa3具有良好的热稳定性, 100 °C处理1 h后还有50%的酶活。与其它SOD比较后发现, SODBa3是目前热稳定性最好的SOD之一。另外, SODBa3对H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>不敏感, 对CH<sub>3</sub>Cl-C<sub>2</sub>H<sub>5</sub>OH敏感, 是一个Mn-SOD。此外, Mn<sup>2+</sup>对SODBa3酶活有促进作用, 酶活为对照135.26±7.87%。最后, SODBa3对乙醇和二甲基亚砷有较好的耐受性, 酶活分别为对照的112.56±9.77和98.55±6.47%。这些结果表明SODBa3在工业应用中较大的价值。

### 参考文献

- [1] Decorde K, Ventura E, Lacan D, et al. An SOD rich melon extract extramel (R) prevents aortic lipids and liver steatosis in diet-induced model of atherosclerosis [J]. Nutrition Metabolism and Cardiovascular Diseases, 2010, 20(5): 301-307
- [2] Carillon J, Lacan D, Rouanet J M. SODB reduced obesity markers in hamsters beneficial effects in hepatic and adipose tissue by modulating oxidative status [J]. Agro. Food Industry Hi-Tech., 2014, 25(4): 14-17
- [3] Marek T A, Dziurkowska Marek A, Nowak A, et al. Oxygen free radicals in human acute pancreatitis -The dynamics of oxidant/antioxidant balance in the early phase of the disease [J]. Gastroenterology, 1996, 110(4): 415-415
- [4] Tian Y, Mao L, Okajima T, et al. Superoxide dismutase-based third-generation biosensor for superoxide anion [J]. Analytical Chemistry, 2002, 74(10): 2428-2434
- [5] Beaucham.C, Fridovic.I. Superoxide dismutase-improved assays and an assay applicable to acrylamide gels [J]. Analytical Biochemistry, 1971, 44(1): 276-287
- [6] Zhu Y B, Wang G H, Ni H, et al. Cloning and characterization of a new manganese superoxide dismutase from deep-sea thermophile *Geobacillus* sp. EPT3 [J]. World Journal of Microbiology & Biotechnology, 2014, 30(4): 1347-1357
- [7] Jackson S M J, Cooper J B. An analysis of structural similarity in the iron and manganese superoxide dismutases based on known structures and sequences [J]. Bio. Metals, 1998, 11(2): 159-173
- [8] Liu P, Ewis H E, Huang Y J, et al. Structure of *Bacillus subtilis* superoxide dismutase [J]. Acta Crystallographica Section F-Structural Biology and Crystallization Communications, 2007, 63(Pt12): 1003-1007
- [9] Areekit S, Kanjanavas P, Khawsak P, et al. Cloning, Expression, and characterization of thermotolerant manganese superoxide dismutase from *Bacillus* sp. MHS47 [J]. International Journal of Molecular Sciences, 2011, 12(1): 844-856
- [10] Liu Z H, Yang C P, Qi X T, et al. Cloning, heterologous

- expression, and functional characterization of a Chitinase gene, Lbchi32, from *limonium bicolor* [J]. *Biochemical Genetics*, 2010, 48(7-8): 669-679
- [11] Boyadzhieva I P, Atanasova M, Emanuilova E. A novel, thermostable manganese-containing superoxide dismutase from *Bacillus licheniformis* [J]. *Biotechnology Letters*, 2010, 32(12): 1893-1896
- [12] Zhao Y, Li Y, Li R Q. Construction of a new genetic engineering bacterium for preparation of superoxide dismutase with high productivity [J]. *Advanced Manufacturing Technology*, 2011, 314-316(Pts 1-3): 1973-1976
- [13] Yu J, Yu X M, Liu J H. A thermostable manganese-containing superoxide dismutase from pathogen *Chlamydia pneumoniae* [J]. *FEBS Letters*, 2004, 562(1-3): 22-26
- [14] Li D C, Gao J, Li Y L, et al. A thermostable manganese-containing superoxide dismutase from the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* [J]. *Extremophiles*, 2005, 9(1): 1-6
- Liu J G, Yin M M, Zhu H, et al. Purification and characterization of a hyperthermostable Mn-superoxide dismutase from *Thermus thermophilus* HB27 [J]. *Extremophiles*, 2011, 15(2): 221-226