

(19) 中华人民共和国国家知识产权局



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102021151 A

(43) 申请公布日 2011.04.20

(21) 申请号 200910092875.8

(22) 申请日 2009.09.09

(71) 申请人 中国科学院生物物理研究所  
地址 100101 北京市朝阳区大屯路 15 号

(72) 发明人 董先智 王保全 李昭华

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任  
公司 11021

代理人 王旭

(51) Int. Cl.

C12N 9/02 (2006.01)

权利要求书 1 页 说明书 6 页 附图 3 页

### (54) 发明名称

提取超氧化物歧化酶的方法和试剂盒

### (57) 摘要

本发明涉及一种提取超氧化物歧化酶的方法,其特征在于,包含去除杂蛋白的步骤,其中使用丙烯酸聚合物作为杂蛋白沉淀剂。本发明还涉及用于提取超氧化物歧化酶的试剂盒,其特征在于,包括所述作为杂蛋白沉淀剂的丙烯酸聚合物。

1. 一种提取超氧化物歧化酶的方法，其特征在于，包含去除杂蛋白的步骤，其中使用丙烯酸聚合物作为杂蛋白沉淀剂。
2. 根据权利要求1所述的提取超氧化物歧化酶的方法，其特征在于，所述丙烯酸聚合物是聚丙烯酸或者聚丙烯酸盐。
3. 根据权利要求1所述的提取超氧化物歧化酶的方法，其特征在于，所述丙烯酸聚合物的使用终浓度范围为0.1% -2.5% (Wt/V)。
4. 根据权利要求1所述的提取超氧化物歧化酶的方法，其特征在于，所述丙烯酸聚合物的分子量范围为3000-10000 道尔顿。
5. 根据权利要求1所述的提取超氧化物歧化酶的方法，其特征在于，所述去除杂蛋白的步骤在温度55-65°C下进行。
6. 根据权利要求5所述的提取超氧化物歧化酶的方法，其特征在于，在所述去除杂蛋白的步骤中还使用酶保护剂。
7. 根据权利要求6所述的提取超氧化物歧化酶的方法，其特征在于，所述酶保护剂是海藻糖。
8. 根据权利要求7所述的提取超氧化物歧化酶的方法，其特征在于，所述酶保护剂的使用终浓度为1% -10% (Wt/V)。
9. 根据权利要求5、6或7中任一项所述的提取超氧化物歧化酶的方法，其特征在于，在所述去除杂蛋白的步骤中还使用氯化铜，其中在提取体系达到55-65°C后，再加入氯化铜。
10. 根据权利要求9所述的提取超氧化物歧化酶的方法，其特征在于，所述氯化铜的使用终浓度为0.5% -2% (Wt/V)。
11. 根据以上权利要求中任一项所述的提取超氧化物歧化酶的方法，其特征在于，在所述去除杂蛋白步骤之前进行破碎生物体样品步骤，在所述去除杂蛋白步骤之后进行沉淀步骤，复溶超滤浓缩步骤，和冷冻干燥步骤。
12. 用于提取超氧化物歧化酶的试剂盒，其特征在于，包括作为杂蛋白沉淀剂的丙烯酸聚合物。
13. 根据权利要求12所述的提取超氧化物歧化酶的试剂盒，其特征在于，所述丙烯酸聚合物是聚丙烯酸或者聚丙烯酸盐。
14. 根据权利要求12所述的提取超氧化物歧化酶的试剂盒，其特征在于，所述丙烯酸聚合物的分子量范围为3000-10000 道尔顿。
15. 根据权利要求12所述的提取超氧化物歧化酶的试剂盒，其特征在于，还包括酶保护剂。
16. 根据权利要求15所述的提取超氧化物歧化酶的试剂盒，其特征在于，所述酶保护剂是海藻糖。
17. 根据权利要求12-16中任一项所述的提取超氧化物歧化酶的试剂盒，其特征在于，还包括氯化铜。

## 提取超氧化物歧化酶的方法和试剂盒

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种提取蛋白质的方法和试剂盒，具体地，一种提取超氧化物歧化酶 (SOD) 的方法和试剂盒。

### 背景技术

[0002] 超氧化物歧化酶 (Superoxidedismutase) 简称 SOD，是一种广泛存在于动、植物及微生物中的金属酶，它至少可分为以下三种类型：CuZn-SOD(微蓝绿色)、Mn-SOD(微粉红色)、Fe-SOD(微淡黄色)。

[0003] SOD 是一种氧自由基清除剂，它的存在与人体衰老延缓、肿瘤的预防、自身免疫力和防护辐射能力有着密切的关系。目前临床上主要运用 SOD 延缓机体衰老，保护机体免疫功能，防止和消除色素沉着，消除局部炎症，由于它无抗原性、无毒副作用，被广泛应用于食品、药品、化妆品和保健品等领域 [1]。

[0004] 现有的 SOD 纯化过程中，粗分级工艺是不可避免的环节，其中必须使用大量的有机溶剂（如乙醇，氯仿等）或无机盐（如硫酸铵，磷酸盐等），通过有机溶剂和无机盐的分级沉淀以去除大部分杂蛋白，获得粗品 SOD。然后才能使用后续工艺，如丙酮沉淀、超滤浓缩、透析、柱层析等，进行深入提纯。使用有机溶剂和无机盐对蛋白质溶液进行分级沉淀存在较大的局限性。首先，使用分级沉淀法提取目标蛋白后，废弃液中常常含有高浓度的有机溶剂或无机盐，这些有毒 / 有害物质的回收非常困难，而一旦排放又会对环保造成巨大压力；其次，有机溶剂和无机盐分级沉淀法操作周期长，提取液经常要在低温下静置过夜；另外，为了促使蛋白质沉淀，有机溶剂和无机盐的使用量通常都很大，抬高了产品的成本。因此，经济、高效、环保的蛋白质纯化技术一直是蛋白质提纯领域的瓶颈环节 [2]。目前 SOD 的提取 / 生产工艺中，依然沿用传统的分级沉淀技术，这使得 SOD 生化产品的成本和产量一直难以达到理想水平 [3, 4]。

### 发明内容

[0005] 本发明涉及一种利用丙烯酸聚合物作为杂蛋白沉淀剂提取超氧化物歧化酶的新方法。提取的产品纯度较高，稳定性好。该方法简单环保，成本低，周期短，有利于大规模提纯 SOD 产品。

[0006] 本发明还涉及用于提取超氧化物歧化酶的试剂盒。

[0007] 本发明的内容包括：

[0008] 1、一种提取超氧化物歧化酶的方法，其特征在于，包含去除杂蛋白的步骤，其中使用丙烯酸聚合物作为杂蛋白沉淀剂。

[0009] 2、根据以上 1 所述的提取超氧化物歧化酶的方法，其特征在于，所述丙烯酸聚合物是聚丙烯酸或者聚丙烯酸盐。

[0010] 3、根据以上 1 或 2 所述的提取超氧化物歧化酶的方法，其特征在于，所述丙烯酸聚合物的使用终浓度范围为 0.1% -2.5%（重量 / 体积 (Wt/V)）。

[0011] 4、根据以上 1-3 中任一项所述的提取超氧化物歧化酶的方法，其特征在于，所述丙烯酸聚合物的分子量范围为 3000-10000 道尔顿。

[0012] 5、根据以上 1-4 中任一项所述的提取超氧化物歧化酶的方法，其特征在于，所述去除杂蛋白的步骤在温度 55-65℃ 下进行。

[0013] 6、根据以上 1-5 中任一项所述的提取超氧化物歧化酶的方法，其特征在于，在所述去除杂蛋白的步骤中还使用酶保护剂。

[0014] 7、根据以上 6 所述的提取超氧化物歧化酶的方法，其特征在于，所述酶保护剂是海藻糖。

[0015] 8、根据以上 6 或 7 所述的提取超氧化物歧化酶的方法，其特征在于，所述酶保护剂的使用终浓度为 1% -10% (Wt/V)。

[0016] 9、根据以上 5-8 中任一项所述的提取超氧化物歧化酶的方法，其特征在于，在所述去除杂蛋白的步骤中还使用氯化铜，其中在提取体系达到 55-65℃ 后，再加入氯化铜。

[0017] 10、根据以上 9 所述的提取超氧化物歧化酶的方法，其特征在于，所述氯化铜的使用终浓度为 0.5% -2% (Wt/V)。

[0018] 11、根据以上 1-10 中任一项所述的提取超氧化物歧化酶的方法，其特征在于，在所述去除杂蛋白步骤之前进行破碎生物体样品步骤，在所述去除杂蛋白步骤之后进行沉淀步骤，复溶超滤浓缩步骤，和冷冻干燥步骤。

[0019] 12、用于提取超氧化物歧化酶的试剂盒，其特征在于，包括作为杂蛋白沉淀剂的丙烯酸聚合物。

[0020] 13、根据以上 12 所述的提取超氧化物歧化酶的试剂盒，其特征在于，所述丙烯酸聚合物是聚丙烯酸或者聚丙烯酸盐。

[0021] 14、根据以上 12 或 13 所述的提取超氧化物歧化酶的试剂盒，其特征在于，所述丙烯酸聚合物的分子量范围为 3000-10000 道尔顿。

[0022] 15、根据以上 12-14 中任一项所述的提取超氧化物歧化酶的试剂盒，其特征在于，还包括酶保护剂。

[0023] 16、根据以上 12-15 中任一项所述的提取超氧化物歧化酶的试剂盒，其特征在于，所述酶保护剂是海藻糖。

[0024] 17、根据以上 12-16 中任一项所述的提取超氧化物歧化酶的试剂盒，其特征在于，还包括氯化铜。

[0025] 本发明通过以下方式来实施：

[0026] (1) 破碎生物体样品步骤：于生物体样品中，加入 1-1.5 倍的蒸馏水或缓冲液，充分搅拌或破碎，继续放置 30min，过滤得到滤液；

[0027] (2) 去除杂蛋白步骤：于所述滤液中加入作为杂蛋白沉淀剂的丙烯酸聚合物，使其在该提取体系中的终浓度为 0.1% -2.5% (Wt/V)，然后置于 60-65℃ 恒温水浴中加热至 55-65℃，再加入氯化铜溶液，使其在该提取体系中的终浓度为 0.5% -2% (Wt/V)，恒温 10-15min，过滤除去杂蛋白，收集蓝绿色滤液；

[0028] (3) 沉淀步骤：于收集的蓝绿色滤液中加入 0.8-1.0 倍体积的预冷丙酮，充分搅拌，静置 2-4 个小时，得到沉淀。

[0029] (4) 复溶超滤浓缩步骤：将所述沉淀溶解于一定量的 pH7.6 的磷酸盐缓冲液中，除去非溶沉淀，用分子量 6000 道尔顿超滤膜进行超滤浓缩，连续补水三次进行浓缩，收集浓缩液；和

[0030] (5) 冷冻干燥步骤：将浓缩液进行  $-50^{\circ}\text{C}$  冷冻干燥，收集冻干粉末。

[0031] 上述技术发明工艺中丙烯酸聚合物可以是聚丙烯酸或者聚丙烯酸盐，分子量范围为 3000-10000 道尔顿。

[0032] 优选地，步骤 (2) 中还可以使用酶保护剂，即在步骤 (1) 获得的滤液中加入作为杂蛋白沉淀剂的丙烯酸聚合物后，加入酶保护剂，使其在该提取体系中的终浓度为 1% -10% (Wt/V)，然后置于  $60-65^{\circ}\text{C}$  恒温水浴中加热至  $55-65^{\circ}\text{C}$ ，再加入氯化铜溶液，恒温 10-15min，过滤除去杂蛋白，收集蓝绿色上清液。酶保护剂可以是非还原性二糖——海藻糖。

[0033] 与现有技术相比较，本发明的特点是：

[0034] (1) 分离过程时间短，操作简单便捷。

[0035] (2) 不使用氯仿、乙醇等有机溶剂和硫酸铵、磷酸盐等无机盐，清洁环保，杂蛋白去除效率高。

[0036] (3) 降低了生产成本。

[0037] (4) 产品性能稳定、活性高，允许大规模生产。

#### 附图说明

[0038] 图 1 显示实施例 1 中实验 1 所获得产物的紫外吸收曲线图。

[0039] 图 2 显示实施例 1 中实验 1 所获得产物的 SDS-PAGE 凝胶电泳图，其中泳道 1 中加载分子量标记；泳道 2 中加载所获得产物。

[0040] 图 3 显示  $\text{H}_2\text{O}_2$  对实施例 1 中实验 1 所获得产物的酶活性抑制曲线。

[0041] 图 4 显示 KCN 对实施例 1 中实验 1 所获得产物的酶活性抑制曲线。

[0042] 图 5 显示实施例 1 中实验 6 中使用 TritonX-100 所获得产物的 SDS-PAGE 凝胶电泳图，其中泳道 1 中加载分子量标记；泳道 2 中加载所获得产物。

#### 具体实施方式

[0043] 下面结合实施例对本发明作进一步的说明：

[0044] 实施例 1：提取超氧化物歧化酶

[0045] 实验 1：

[0046] 1、取动物猪血样品（自然凝固后取其中血块）1kg，加入 1L 的蒸馏水，充分搅拌，直至血块成碎状为止，继续放置 30min 充分溶血，用滤布过滤，收集滤液，即为溶血液；

[0047] 2、向以上收集的溶血液里加入溶血液体积 5% 浓度为 2% (Wt/V) 的聚丙烯酸（平均分子量 3000D），置于  $60^{\circ}\text{C}$  恒温水浴中加热，至溶血液温度达  $55^{\circ}\text{C}$  时，加入液体体积 5% 的浓度为 10% (Wt/V) 的氯化铜溶液，恒温 10min，纱布过滤除去杂蛋白，收集蓝绿色滤液；

[0048] 3、于蓝绿色滤液中加入 0.8 倍体积的预冷丙酮，均匀混合，静止 2 小时收集沉

淀，再将沉淀重新溶解于一定量的pH7.6的磷酸盐缓冲液中，除去非溶沉淀，用截留分子量为的6000道尔顿超滤膜（购自Millipore公司）对上液进行超滤浓缩，连续补水三次，浓缩、纯化，收集浓缩液，-50℃冷冻干燥，得到浅兰色冻干粉末。

[0049] 实验 2：

[0050] 1、取动物猪血样品（自然凝固后取其中血块）1kg，加入1.5L的蒸馏水，充分搅拌，直至血块成碎状为止，继续放置30min充分溶血，用滤布过滤，收集滤液，即为溶血液；

[0051] 2、向溶血液里加入溶血液体积10%浓度为5%（Wt/V）的聚丙烯酸（平均分子量10000D），以及终浓度为10%（Wt/V）的海藻糖，置于65℃恒温水浴中加热，至溶血液温度达60℃时，加入液体体积5%的浓度为10%（Wt/V）的氯化铜溶液，恒温10min，纱布过滤除去杂蛋白，收集蓝绿色滤液；

[0052] 3、于蓝绿色滤液中加入0.8倍体积的预冷丙酮，均匀混合，静止2小时收集沉淀，再将沉淀重新溶解于一定量的pH7.6的磷酸盐缓冲液中，除去非溶沉淀，用截留分子量为的6000道尔顿超滤膜对上液进行超滤浓缩，连续补水三次，浓缩、纯化，收集浓缩液，-50℃冷冻干燥，得到浅兰色冻干粉末。

[0053] 实验 3：

[0054] 1、取新鲜牛肝脏匀浆1kg，加入1.5L的pH7.6的磷酸盐缓冲液，充分搅拌，直至形成均匀乳状液为止，继续放置30min充分溶解，用滤纸过滤混合物，收集滤液；

[0055] 2、向所述滤液里加入滤液体积25%浓度为10%（Wt/V）的聚丙烯酸钠（平均分子量5000D），以及终浓度为1%（Wt/V）的海藻糖，置于60℃恒温水浴中加热，至溶血液温度达55℃时，加入液体体积20%的浓度为10%（Wt/V）的氯化铜溶液，恒温15min，纱布过滤除去杂蛋白，收集蓝绿色滤液；

[0056] 3、于蓝绿色滤液中加入1.0倍体积的预冷丙酮，均匀混合，静止3小时收集沉淀，再将沉淀重新溶解于一定量的pH7.6的磷酸盐缓冲液中，除去非溶沉淀，用截留分子量为的6000道尔顿超滤膜对上液进行超滤浓缩，连续补水三次，浓缩、纯化，收集浓缩液，-50℃冷冻干燥，得到浅兰色冻干粉末。

[0057] 实验 4：

[0058] 1、取洗净的银杏叶1kg，加入1L的蒸馏水，充分搅拌破碎，直至形成匀浆为止，继续放置30min，用滤布过滤混合物，收集滤液；

[0059] 2、向所述滤液里加入滤液体积10%浓度为25%（Wt/V）的聚丙烯酸钾（平均分子量8000D），以及终浓度为5%（Wt/V）的海藻糖，置于65℃恒温水浴中加热，至溶液温度达60℃时，加入液体体积20%的浓度为10%（Wt/V）的氯化铜溶液，恒温10min，纱布过滤除去杂蛋白，收集蓝绿色滤液；

[0060] 3、于蓝绿色滤液中加入1.0倍体积的预冷丙酮，均匀混合，静止4小时收集沉淀，再将沉淀重新溶解于一定量的pH7.6的磷酸盐缓冲液中，除去非溶沉淀，用截留分子量为的6000道尔顿超滤膜对上液进行超滤浓缩，连续补水三次，浓缩、纯化，收集浓缩液，-50℃冷冻干燥，得到浅兰色冻干粉末。

[0061] 实验 5：

[0062] 1、取虫草真菌（*Cordyceps fungus*）的培养物1kg，加入1L的蒸馏水，充分搅拌

破碎，直至形成匀浆为止，继续放置 30min，用滤布过滤混合物，收集滤液；

[0063] 2、向收集的滤液里加入滤液体积 10% 浓度为 25% (Wt/V) 的聚丙烯酸钾（平均分子量 8000D），以及终浓度为 5% (Wt/V) 的海藻糖，置于 65℃ 恒温水浴中加热，至溶液温度达 60℃ 时，加入液体体积 20% 的浓度为 10% (Wt/V) 的氯化铜溶液，恒温 10min，纱布过滤除去杂蛋白，收集蓝绿色滤液；

[0064] 3、于蓝绿色滤液中加入 1.0 倍体积的预冷丙酮，均匀混合，静止 4 小时收集沉淀，再将沉淀重新溶解于一定量的 pH7.6 的磷酸盐缓冲液中，除去非溶沉淀，用截留分子量为 6000 道尔顿超滤膜对上液进行超滤浓缩，连续补水三次，浓缩、纯化，收集浓缩液，-50℃ 冷冻干燥，得到浅兰色冻干粉末。

[0065] 实验 6：对照组

[0066] 对照组以与实施例 1 实验 1 相类似的程序进行，唯一区别在于使用 TritonX-100， $[AlCl_3]_n$  等有机或无机聚合物，或分子量 > 10000 道尔顿的聚丙烯酸（钠），或分子量 < 3000 道尔顿的聚丙烯酸（钠），以替代分子量范围为 3000-10000 道尔顿的聚丙烯酸或者聚丙烯酸盐，最后得到冻干粉末。

[0067] 实施例 2：酶种类的鉴定

[0068] 采取紫外光谱法、SDS-PAGE 法、 $H_2O_2$  和 KCN 抑制试验鉴定实施例 1 中实验 1 所得到的结晶粉末样品。

[0069] a) 紫外光谱法（参见图 1）：在 190nm-500nm 范围内，用紫外光谱扫描实施例 1 中实验 1 所得到的冻干粉末样品，其紫外吸收最高峰在 258nm-265nm 处，与典型的 SOD 吸收光谱曲线一致。

[0070] b) SDS-PAGE 法（参见图 2）：使用 SDS-PAGE 凝胶电泳检测实施例 1 中实验 1 所得到的冻干粉末样品的溶液，结果显示，该样品溶液在电泳中呈现出一个主要条带。由于 SOD 有两个相同的亚基，因此参照蛋白质分子量标记可以计算出其亚基分子量在 16KD 附近（如箭头所示），这和文献报道的 SOD 亚基分子量（在 15.0-17.0KD 之间）一致。

[0071] c)  $H_2O_2$  抑制试验（参见图 3）：取 6 支干净的试管，各加入 1.5% 的  $H_2O_2$  10、20、30、40、50ul 及适量实施例 1 中实验 1 所得到的冻干粉末样品的溶液，以双蒸水补足为 3ml，30℃ 水浴恒温 30min，迅速冷却到 25℃ 的室温，以双蒸水的酶活力为标准，计算相对酶活力，并绘制相对酶活力曲线。结果表明该样品对  $H_2O_2$  敏感，与 SOD 特征相符。

[0072] d) KCN 抑制试验（参见图 4）：取 6 支干净的试管，各加入 10mM KCN 100、200、300、400、500ul，及适量实施例 1 中实验 1 所得到的冻干粉末样品的溶液，以双蒸水补足为 3ml，30℃ 水浴恒温 30min，迅速冷却到 25℃ 的室温，以双蒸水的酶活力为标准，计算相对酶活力，并绘制相对酶活力曲线。结果表明该样品对 KCN 敏感，与 Cu/Zn-SOD 的特征符合。

[0073] 由以上方法可知，按照此流程制备的冻干粉末样品具有 SOD 的典型特征，因此确定为 SOD，且提取率在 0.1-0.2% 左右。

[0074] 本发明人还分别对实施例 1 中实验 2、3、4 和 5 中获得的浅兰色冻干粉末分别采取紫外光谱法、SDS-PAGE 法、 $H_2O_2$  和 KCN 抑制试验进行鉴定，其结果均与实施例 2 中关于实施例 1 的实验 1 的结果相近似，显示出 SOD 的典型特征。且提取率大致在

0.05-0.2%范围内变化，具体随原料等因素的变化而有所变化。

[0075] 此外，本发明人还对实施例1的实验6中获得的冻干粉末进行 SDS-PAGE 电泳。图5显示关于使用 TritonX-100 提取获得的产物的 SDS-PAGE 电泳结果，该结果显示产物中含有多种不同的蛋白质成分。这表明，使用该方法不能去除 SOD 以外的其他杂蛋白，因此不能用于提取 SOD。关于使用实施例1中实验6中其他物质的结果与图5所示的结果近似。

[0076] 实施例3：酶活力检测

[0077] 取实施例1中实验1所得到的冻干粉末少量，按照 SOD 试剂盒（购自南京建成生物公司）的操作说明进行 SOD 活力测定。结果表明，按照此流程制备的冻干粉末样品，其活力稳定保持在 3000U/mg pro 以上。且该样品在 -20℃冰箱中保存6个月，活力基本不变。

[0078] 本发明人还通过前述方法分别对实施例1中实验2、3、4和5中获得的浅兰色冻干粉末进行了酶活力检测，结果显示其产物活力均稳定保持在 3000U/mg pro 以上。且在 -20℃冰箱中保存6个月，活力基本不变。

[0079] 此外，本发明人还通过前述方法对实施例1中实验6中获得的冻干粉末进行了酶活力检测，结果显示所获得的产物的活力均 < 1500U/mg pro，或根本不具有酶活力。具体检测结果如表1所示。

[0080] 表1. 对照组（实施例1中实验6）产物的酶活力检测结果

[0081]	使用的杂蛋白沉淀剂	产物溶液的颜色	酶活力检测值 U/mg pro
	TritonX-100	褐色	<1500
	[AlCl <sub>3</sub> ] <sub>n</sub>	灰色	无

[0082] 参考文献

[0083] [1]Joe V.Bannister, William H.Bannister.Aspects of the structure, function, and applications of superoxide-dismutase[J].CRC Critical Reviews in Biochemistry.1987, 22(2) : 111-179.

[0084] [2]李良铸, 李明晔主编。《现代生化药物生产关键技术》。化学工业出版社, 2006年第一版。

[0085] [3]Ning He, Qingbiao Li, Daohua Sun, Xueping Ling.Isolation, purification and characterization of superoxide dismutase from garlic[J].Biochemical Engineering Journal.2008, 38 : 33-38.

[0086] [4]Dhiraj Vyas, Sanjay Kumar.Purification and partial characterization of a low temperature responsive Mn-SOD from tea[J].Biochemical and Biophysical Research Communications.2005, 329 : 831-838.



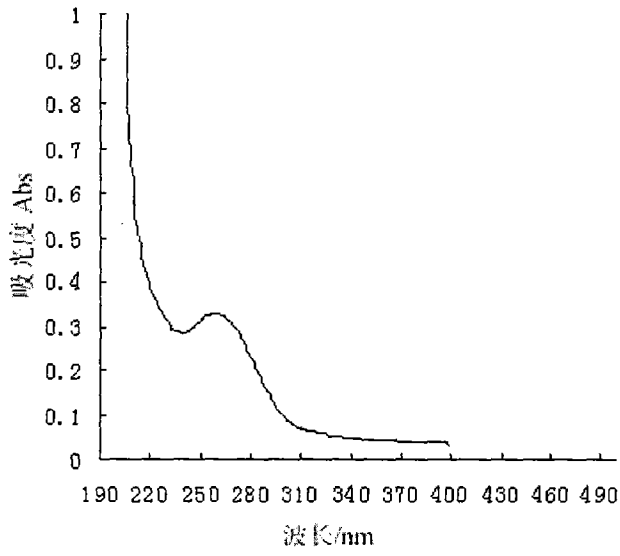


图 1

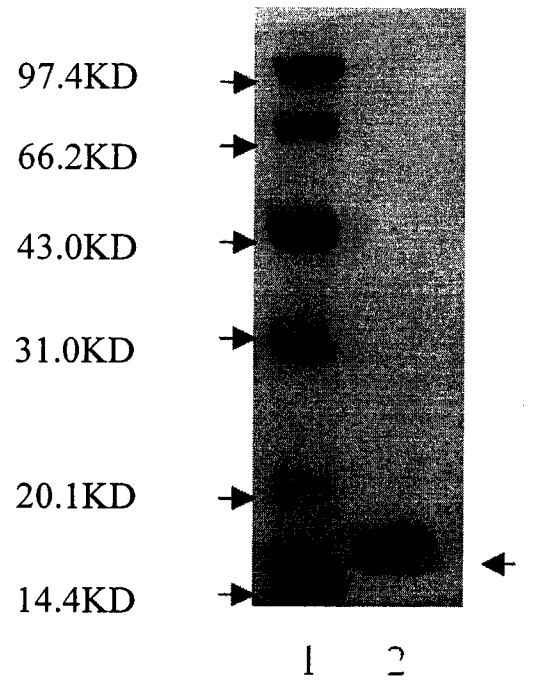


图 2

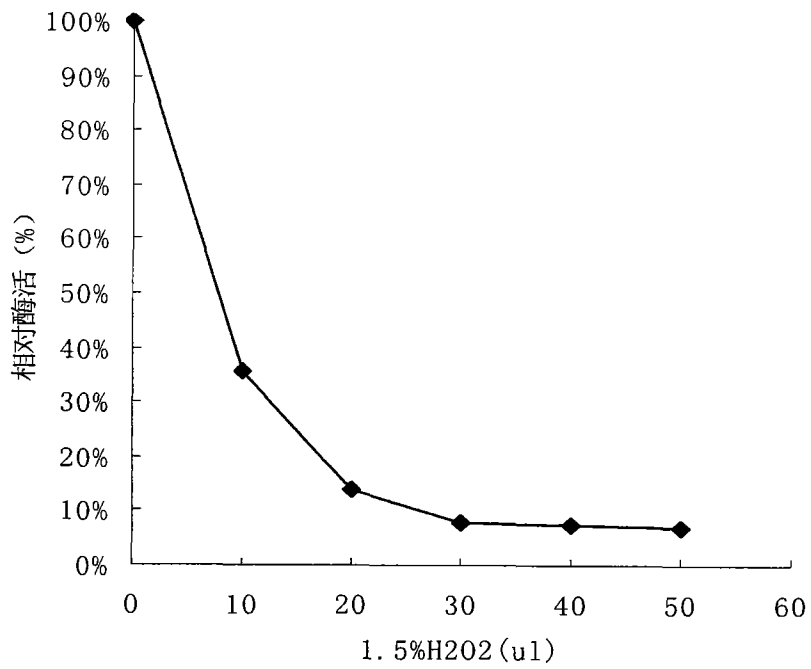


图 3

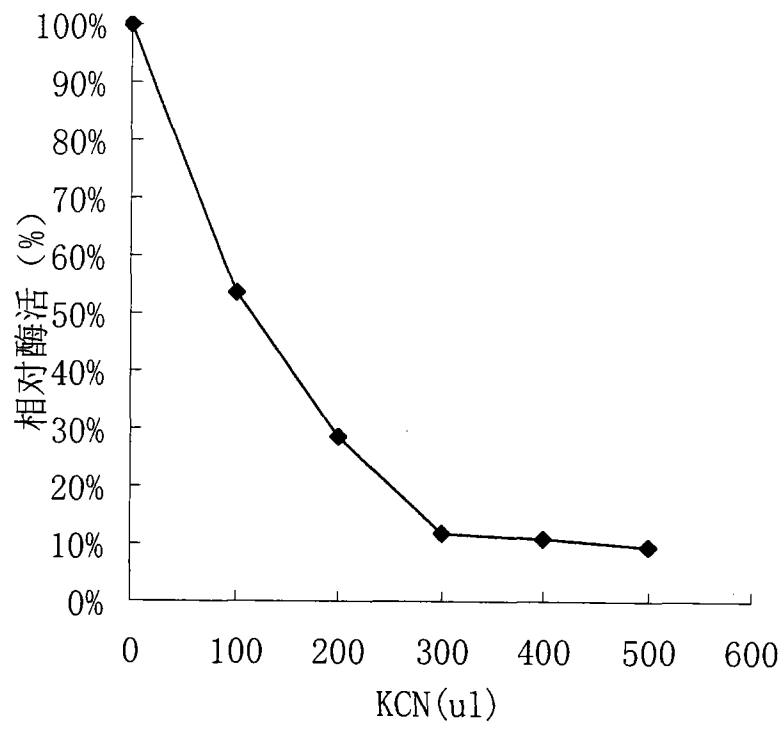


图 4

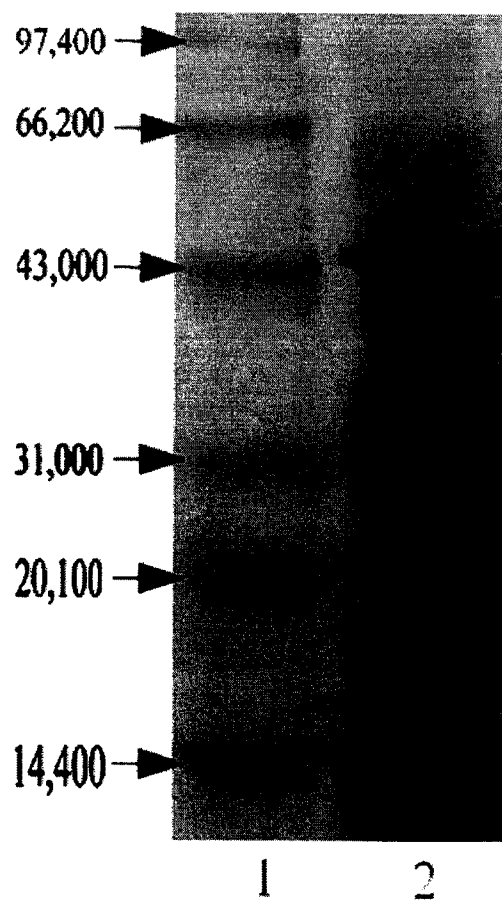


图 5