

以聚乙二醇为层析伴侣同时制备 SOD、过氧化氢酶和血红蛋白 Simultaneous Purification of Superoxide Dismutase, Catalase and Hemoglobin from Bovine Erythrocyte Lysate with PEG 600 as Chaperon

王永权, 路秀玲, 苏志国*

WANG Yong-Quan, LU Xiu-Ling and SU Zhi-Guo*

中国科学院过程工程研究所生化工程国家重点实验室, 北京 100080

State Key Laboratory of Biochemical Engineering, Institute of Process Engineering, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China

摘要 发展了一条从红细胞裂解液中同时制备超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶和血红蛋白的新工艺。采用 0.75% 的聚乙二醇 600 作为层析伴侣, 使血红蛋白直接流过阴离子交换层析柱, 同时吸附 SOD 和过氧化氢酶。经过梯度洗脱获得 SOD 和过氧化氢酶组分, 再经过疏水性相互作用层析与凝胶过滤层析相串联, 使 SOD 和过氧化氢酶得到纯化。纯化后的 SOD 和过氧化氢酶的比活力分别达到 15932u/mg 和 65918u/mg, 血红蛋白的纯度达到 99.9% 以上。总回收率为: SOD, 47.4%; 过氧化氢酶, 29.6%; 血红蛋白, 88.7%。

关键词 超氧化物歧化酶, 过氧化氢酶, 血红蛋白, 离子交换层析, 疏水性相互作用层析

中图分类号 R392.11 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2005)03-0466-07

Abstract Superoxide dismutase, catalase and hemoglobin were purified simultaneously from the same batch of bovine erythrocyte lysate. The process involves an initial anion exchange chromatography, followed by a hydrophobic interaction chromatography and gel filtration chromatography. 0.75% polyethylene glycol 600 was added as a purification chaperon before the anion exchange chromatography. The hemoglobin fraction passed through the ion exchange column without being retained. The superoxide dismutase and catalase were adsorbed by the column and were eluted separately during elution. The two eluted fractions containing crude superoxide dismutase and catalase were further purified with hydrophobic interaction chromatography and gel filtration chromatography in sequence. The specific activities of superoxide dismutase and catalase were 15932u/mg and 65918u/mg, respectively. SDS-polyacrylamide gel electrophoresis and gel filtration chromatography were used to analyze the purity of the proteins. The purity of superoxide dismutase, catalase and hemoglobin were 77.6%, 81.9% and 99.9%, respectively. The total recoveries for superoxide dismutase, catalase and hemoglobin were 47.4%, 29.6% and 88.7%, respectively.

Key words superoxide dismutase, catalase, hemoglobin, ion exchange chromatography, hydrophobic interaction chromatography

Received: January 10, 2005; Accepted: March 4, 2005.

This work was supported by the Grants from the National Natural Science Foundation of China (No. 20136020) and the Key Project of Innovation Program by Chinese Academy of Sciences.

* Corresponding author. Tel: 86-10-62561817; E-mail: zgsu@home.ipe.ac.cn

国家自然科学基金重点基金项目 (No. 20136020) 和中国科学院知识创新重点方向项目。

生物原料中某一组分的含量通常很低,将其提取纯化成高纯度产品必须经过多个分离单元。层析是最有效的工具之一,它通过原料液中不同组分在固相介质上的吸附和扩散速度的差异,实现组分之间的彼此分离,具有高效快速的优点。通过分离条件的优化和不同层析之间的组合或串联,可以同时从一种原料液中纯化出几种高纯度的产品。但迄今为止,大多数的生物分离过程只侧重于其中一种产品的开发,而其他有用组分常常没有被分离回收,不仅造成原料的浪费,而且也使生产成本居高不下。

超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase, SOD, EC 1.15.1.1)和过氧化氢酶(Catalase, CAT, EC 1.11.1.6)在防治癌症、炎症、衰老等与氧自由基损伤有关的疾病的作用已经得到了深入研究^[1]。现已从红细胞^[2]和真菌^[3]等多种原料分离得到 SOD 和 CAT。传统的分离方法,包括有机溶剂法、硫酸铵沉淀等,通常存在着产率和纯化程度相对较低的缺点。近年来,亲和层析技术在 SOD 和 CAT 的纯化中得到了应用。如 Ahmed 等人^[4]利用以抗 SOD 抗体为配基的层析柱纯化了一种寄生虫来源的 SOD, Wu 等人^[5]则利用固定化金属亲和层析法(IMAC)从昆虫细胞中提取了 CAT。虽然亲和层析法专一性高,通常可一步得到高纯度分离产物,但其高昂的设备成本使其难以实现规模制备。疏水性相互作用层析操作条件温和,蛋白活性回收率高,适于分离酶类物质。Stepanik^[2]等人纯化了人血 SOD、CAT 和过氧化物酶。他们采用 DEAE-纤维素离子交换柱除去血红蛋白,然后使用凝胶渗透层析将 SOD 和 CAT 分离,最后分别使用疏水性相互作用层析和硫酸铵沉淀法纯化两种酶。但是单纯使用离子交换层析不能有效地将血红蛋白和其他蛋白分开,残留的血红蛋白会影响 SOD 和 CAT 的纯化效果。本论文采用聚乙二醇(PEG)伴随式离子交换层析,避免了血红蛋白的残留,有效地解决了这一问题,而且通过盐浓度梯度洗脱,SOD 和 CAT 可直接在此步骤得到初步分离,简化了操作流程。

PEG 是一种亲水性的非离子线型高聚物,同时具有一定的疏水性,能够帮助减少蛋白质的聚集。PEG 在蛋白质离子交换层析中的作用机理尚无统一认识。Timasheff 等人^[6]提出的共溶剂排阻理论认为,PEG 与蛋白质共溶于溶液中时可形成各自的水化层,将对方从自己的周围排阻出去。结果是在蛋白质表面附近的区域内,共溶剂分子的浓度小于液相主流的共溶剂分子浓度,使得整个体系呈不均匀

性,体系的自由能高。因此体系中的蛋白质将保持紧凑的结构以减少其比表面,从而降低由于结构变化导致失活的几率。这就是 PEG 的存在可稳定蛋白质活性的原因。我们认为,PEG 对离子交换凝胶中的某些基团可起到屏蔽作用,降低蛋白质在介质上的吸附强度。这不仅有利于保持蛋白质活性,同时可以促进血红蛋白透过层析柱,提高血红蛋白回收率。

血红蛋白是人工血液代用品的起始原料,它的成本决定着血液代用品的成本。如果能在纯化血红蛋白的同时,将另外两种重要的蛋白质 SOD 和 CAT 制备出来,将不仅实现了原料的充分利用,而且有可能降低这三种蛋白质的制备成本。

1 材料和方法

1.1 材料与仪器

新鲜牛血采自北京卓辰畜牧有限公司。牛血红蛋白、牛血超氧化物歧化酶、牛肝过氧化氢酶和牛血清白蛋白标准品购自 Sigma-Aldrich(USA)公司。Q Sepharose Big Beads 阴离子交换介质, Butyl Sepharose 4 Fast Flow 疏水介质和 Sephadex G25 Superfine 凝胶过滤介质均购自 Amersham Pharmacia(Sweden)公司。PEG600, 邻苯三酚和 SDS-PAGE 电泳标准蛋白为国产商品。

ÄKTA Purifier 10 中压液相层析系统和测酶活所用的紫外-可见分光光度计 Ultraspec 2000 购自 Pharmacia Biotech 公司。Waters 2695-2995 高效液相层析系统购自 Waters(USA)公司。凝胶记录系统(Gel Doc 2000™)和酶联免疫检测仪 Model 550 购自 BIO-RAD(USA)公司。Hemox 血氧分析仪购自 TCS(USA)公司。0.1m² 板式膜切向过滤膜具和 0.45μm 微滤膜购自 Millipore Pellicon(USA)公司。截留分子量为 10kD 的超滤膜购自 PALL(USA)公司。

1.2 分离方法

1.2.1 红细胞溶胀液的制备:将新鲜牛血 4℃ 条件下离心除去血浆,压积的红细胞用 1.6% 和 0.9% NaCl 溶液分别洗涤 2 次。向压积红细胞中加入等体积的去离子水,4℃ 静置 30min。25000g 离心 10min,弃去沉淀。以 0.45μm 微滤膜过滤,得溶血物,4℃ 保存。

1.2.2 阴离子交换层析:采用 ÄKTA Purifier 10 中压液相层析系统和 Φ2.8cm × 30cm 的 Q Sepharose Big beads 填充层析柱。用 pH 7.2 10mmol/L 磷酸盐缓冲液(10mmol/L KH₂PO₄ 溶液和 10mmol/L Na₂HPO₄ 溶

液按一定比例混合配制,含 0.75% 的 PEG600)平衡。将红细胞溶胀液的 pH 值和盐浓度调节到与平衡缓冲液一致,直接上柱,用平衡液以 5mL/min 流速淋洗,血红蛋白随平衡缓冲液透过。然后以 pH 7.2 的 10mmol/L 磷酸盐-250mmol/L NaCl 缓冲液(含 0.75% 的 PEG600)进行梯度洗脱,洗脱时间 50min,流速 5mL/min,检测波长为 280nm。层析得到的血红蛋白纯品经 10kD 滤膜过滤脱盐后,用冷冻干燥法制成干粉即为血红蛋白成品。

1.2.3 疏水性相互作用层析:采用 ÄKTA Purifier 10 中压液相层析系统和 $\Phi 2.0\text{cm} \times 20\text{cm}$ 的 Butyl Sepharose Fast Flow 4 层析柱填充。用含 1.2mol/L $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 的 pH6.0 50mmol/L 磷酸缓冲液平衡。调节阴离子交换层析各洗脱液的 pH 值和离子强度到与上述缓冲液一致,分别上柱淋洗,流速 2mL/min。然后以 pH6.0 50mmol/L 磷酸缓冲液梯度洗脱,流速 2mL/min。检测波长为 280nm。

1.2.4 凝胶过滤:将 G25 Superfine 凝胶过滤填充柱 ($\Phi 2.8\text{cm} \times 30\text{cm}$, 含 50mL 介质)连接到 ÄKTA Purifier 10 中压液相层析系统中,用水充分平衡。将疏水相互作用层析得到的 SOD 和 CAT 活性组分液分别进料,收集活性组分。

1.3 分析方法

1.3.1 SOD 活力的测定:按改进的 Marklund 法^[7],测量缓冲液是 pH8.2 的 0.1mol/L Tris-HCl 溶液。先向缓冲液中加入一定量样品溶液,再加入邻苯三酚溶液,325nm 测其动力学曲线,每毫升反应液中,每分钟抑制邻苯三酚自氧化率达 50% 的酶量定义为一个酶单位。

1.3.2 CAT 活力的测定:按 Aebi 法^[8],通过测定 240nm 光吸收改变量计算出催化分解的 H_2O_2 量。一个酶活单位可定义为在 25°C 和 pH7.0 时,反应混合物中 H_2O_2 浓度在 9.2 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 至 10.3 $\mu\text{mol}/\text{mL}$ 之间时,每分钟分解 1 μmol H_2O_2 所需要的过氧化氢酶量。

1.3.3 血红蛋白的活性分析:将血红蛋白溶于 Hemox 缓冲液(pH 7.4),在 37°C 下用 Hemox 血氧分析仪测定氧分解曲线。 P_{50} 是指结合氧位置有 50% 被氧所占据(50% 氧饱和度)时的氧分压,可从氧分解曲线查得。通过计算 40% ~ 75% 氧饱和度比值的对数与氧分压的对数之比,可求出 Hill 系数。

1.3.4 蛋白质浓度测定:按改进的 Bradford 法^[9],在酶联免疫检测仪 Model 550 上以 0.03mg/mL 牛血清白蛋白(BSA)作为标准蛋白质溶液进行测量。

1.3.5 SDS-PAGE 电泳:按 Laemmli 方法进行^[10]。垂直板电泳在 200V 电压下运行 30min。用考马斯亮蓝 R-250 染色 1h。脱色后的胶版采用凝胶成像扫描系统(Gel Doc 2000™)和 Quantity One 软件进行分析。

1.3.6 凝胶过滤层析分析:采用 WATERS 2695-2995 高效液相系统,层析柱为 Shodex Protein KW-308 凝胶过滤填充柱(Showa Denko, Japan)。用含有 0.1 mol/L 硫酸钠的磷酸缓冲液(50 mmol/L, pH 7.0)充分平衡,流速为 0.5mL/min。样品上柱后,以 0.5mL/min 运行 30min。SOD 样品的检测波长为 280nm 和 259nm。CAT 和血红蛋白的检测波长为 280nm 和 405nm。应用 WATERS 2695-2995 系统的操作软件 Empower 可分析蛋白质纯度。

2 结果与讨论

2.1 纯化效果及活性分析

操作流程见图 1。SOD、CAT 和血红蛋白的等电点分别是 4.95, 5.6 和 6.7。利用其等电点差别,在阴离子交换层析步骤将三种蛋白质初步分离,可以极大地提高分离效率。

在离子交换层析过程中添加 PEG 可以改变溶液的极性,从而改变介质的分配系数。PEG 伴随式离子交换层析不仅可以改善血红蛋白的分配系数,提高血红蛋白的回收率,还可以避免部分血红蛋白在洗脱液中残留的现象,从而消除其对后期分离操作效果的不利影响。PEG 疏水性的强弱与分子量的大小呈线性关系。为了降低其与血红蛋白和分离介质之间的相互作用,以利于在超滤和凝胶过滤步骤中除去,选用了低分子量的 PEG600。

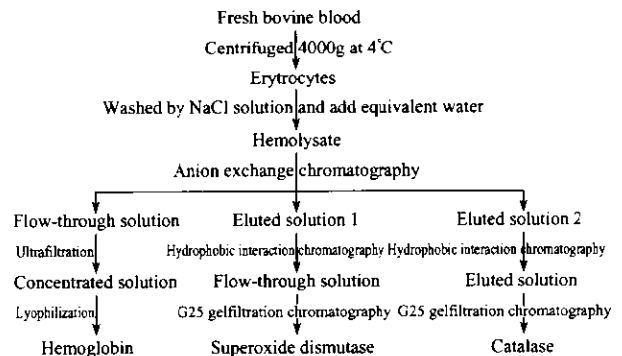


图 1 从牛血分离纯化血红蛋白、超氧化物歧化酶和过氧化氢酶
Fig. 1 Purification of hemoglobin, SOD and catalase from bovine blood

阴离子交换层析的分离结果见图 2。通过应用

PEG 伴随法,血红蛋白在 Q Sepharose Big Beads 离子交换层析步骤中完全透过,而 SOD 和 CAT 随后在不同盐浓度下先后被洗脱下来,从而实现三种蛋白的一步分离。洗脱组分 1 为 SOD 活性组分。洗脱组分 2 为 CAT 活性组分。

理论上,蛋白质等电点越低,其与阴离子交换介质的结合能力越强,洗脱也就越困难。但是我们发现,等电点较低的 SOD 的洗脱盐浓度反而比等电点相对高的 CAT 的洗脱盐浓度低。其原因可能是等电点作为表征蛋白质所带电量的重要参数,只是一个整体的数量概念。而蛋白质实际上只有部分基团与离子交换介质的基团相互作用,不同的蛋白质所带的基团种类不同,局部空间结构也不尽相同,因而吸附强度也不相同。另外,PEG 与介质中部分疏水基团间的相互作用也可能影响蛋白质在离子交换层析中的吸附特性。所以,CAT 虽然等电点较高,但其仍可以由于局部具有疏水性基团而与介质有很强的相互作用,因而不易被洗脱出来。

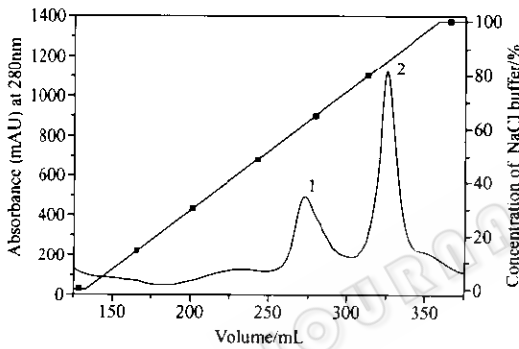


图2 红细胞溶胀液的 Q Sepharose Big Beads 离子交换层析洗脱图谱

Fig. 2 Ion exchange chromatogram of bovine hemolysate on Q Sepharose Big Beads

—■— concentration (%) of 10mmol/L phosphate-250mmol/L NaCl buffer with 0.75% PEG600, pH 7.2.

血红蛋白的纯化效果见表 1。采用 PEG 伴随式阴离子交换法分离血红蛋白和其他微量蛋白,可避免由于使用有机溶剂导致的血红蛋白活性完全丧失和牛红细胞 CAT 的活性损失^[11]。

表 1 牛血红蛋白的纯化效果

Table 1 Purification of hemoglobin from bovine erythrocytes

Operation unit	P_{50} /Pa	Hill coefficient	Total recovery/%	Purity /%
Red blood cell	3783	2.67	100	93.1
Hemolyzate	3277	2.55	99	93.0
Q Big Beads	3197	2.32	89.5	99.9
Desalted and lyophilized	3159	2.24	88.7	99.9

表 2 显示,与不加 PEG600 相比,PEG 伴随式离

子交换层析不仅更好地保持了血红蛋白的生物活性,而且显著提高了血红蛋白的回收率。

表 2 PEG600 对血红蛋白生物活性和回收效率的影响
Table 2 Effects of PEG600 as cosolvent on the bioactivity and recovery of hemoglobin

	Before chromatography	After chromatography without PEG600	After Chromatography with 0.75% PEG600
P_{50} /Pa	3277	2933	3159
Hill coefficient	2.55	2.24	2.32
Recovery/%	\	75.0	88.7

离子交换洗脱组分加入疏水层析柱后,SOD 由于其强亲水性在 1.2mol/L 的 $(NH_4)_2SO_4$ 中可直接透过丁基疏水介质(图 3,峰 1 为 SOD 活性组分),而杂蛋白则吸附于介质上,并可梯度洗脱下来。透过液经 G25 凝胶过滤柱除去 $(NH_4)_2SO_4$ 和 PEG600 后,即可得到 SOD 纯品。SOD 的纯化效果见表 3。

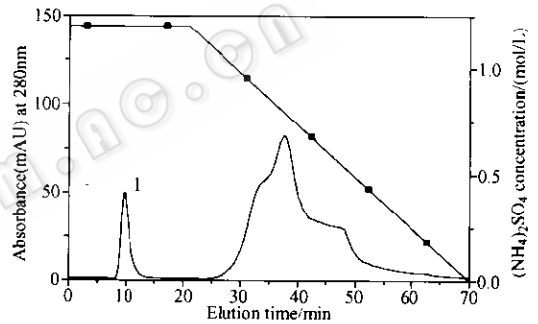


图 3 离子交换层析洗脱组分 1 的丁基疏水性相互作用层析图谱

Fig. 3 Hydrophobic interaction chromatogram on butyl Sepharose 4 Fast Flow of eluted fraction 1 of ion-exchange chromatography

—■— $(NH_4)_2SO_4$ concentration (mol/L).

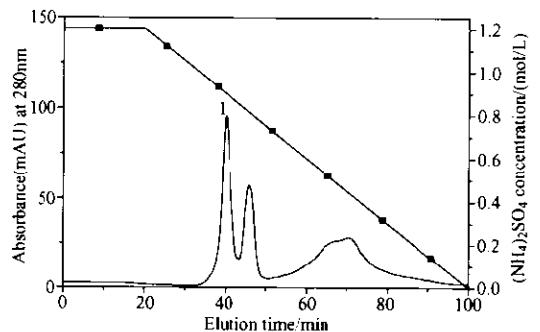


图 4 离子交换层析洗脱组分 2 的丁基疏水相互作用层析图谱

Fig. 4 Hydrophobic interaction chromatogram on butyl Sepharose 4 Fast Flow of eluted fraction 2 of ion-exchange chromatography

—■— $(NH_4)_2SO_4$ concentration (mol/L).

CAT的亲水性弱于SOD,因此离子交换洗脱组分2洗脱在相同操作条件下加入疏水相互作用层析柱后,CAT并不直接透过,而是在梯度洗脱过程中被

分离出来(图4,峰1为CAT活性组分)。洗脱液经G-25凝胶过滤柱后,即可得到CAT纯品。

CAT的纯化效果见表4。

表3 牛红细胞 SOD 的纯化效果
Table 3 Purification of SOD from bovine erythrocytes

Operation unit	Volume activity / (u/mL)	Total activity / u	Volume protein / (μg/mL)	Specific activity / (u/mg)	Recovery ratio / %	Purification fold
Hemolyzate	476	47600	39875	11.9	100	1
Q big beads	503	40240	453.5	1109	84.5	93
HIC-Butyl	507	35692	47.2	10742	75.0	902
G 25	376	22560	23.6	15932	47.4	1339

表4 牛红细胞 CAT 的纯化效果
Table 4 Purification of CAT from bovine erythrocytes

Operation unit	Volume activity (u/mL)	Total activity (10 ⁶ u)	Volume protein / (μg/mL)	Specific activity / (u/mg)	Recovery ratio / %	Purification fold
Hemolyzate	10526	1052600	39875	264	100	1
Q big beads	7142	615385	453.5	15750	58.5	60
HIC-Butyl	2547	550152	59.4	48038	36.3	183
G 25	2083	311569	31.6	65918	29.6	250

2.2 电泳分析结果

图5显示了阴离子交换层析过程中PEG600对血红蛋白纯度的影响。与未加PEG的对照相比较,添加PEG后几乎所有的血红蛋白制备物仅显示一条带,说明PEG600的使用提高了血红蛋白的纯度。

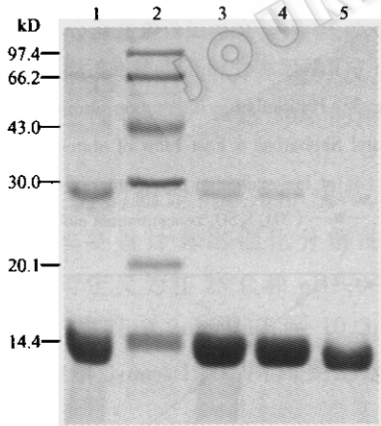


图5 离子交换层析过程中的血红蛋白纯度及PEG600对其影响
Fig. 5 SDS-PAGE of bovine hemoglobin during purification by ion exchange chromatography escorted with PEG600

1: bovine hemoglobin standard (Sigma); 2: marker; 3: hemolysate; 4: hemoglobin purified without PEG600; 5: hemoglobin purified with 0.75% PEG600.

在电泳图谱(图6)中仅显示一条带,其分子量与商品牛红细胞SOD完全一致,约为16kD。疏水层析纯化的SOD样品由于含高浓度的(NH₄)₂SO₄,其泳道在电泳过程中将由于盐离子的扩散而变宽,并使相邻泳道变窄。图7同理。

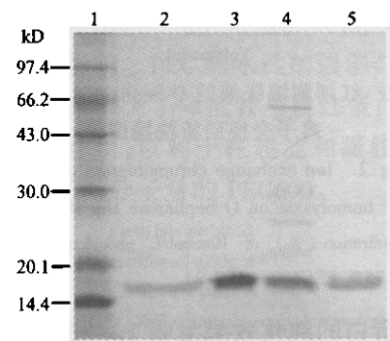


图6 过程中牛红细胞SOD及标准品的SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳。

Fig. 6 SDS-PAGE of bovine erythrocyte SOD during purification and bovine erythrocyte SOD standard(Sigma)

1: marker; 2: SOD fraction of HIC; 3: bovine erythrocyte SOD standard (Sigma); 4: fraction 1 of Q Sepharose big beads; 5: SOD fraction of G25.

经疏水相互作用层析和G25凝胶过滤层析纯化的CAT在电泳图谱(图7)仅显示一条带,其分子量与商品牛肝CAT一致,约为60kD。

经疏水层析和G25凝胶过滤层析纯化的SOD

2.3 高效凝胶过滤分析纯度

血红蛋白由于含有血红素,在 405nm 有最大吸收。高效凝胶过滤分析显示,纯化的血红蛋白在 280nm 和 405nm 均为单一峰(图 8),其纯度在 99.9% 以上, A_{405}/A_{280} 为 7.2:1。图中可以观察到,主峰前有一小峰状的前延。根据文献,人红细胞中的血红蛋白分为 HbA, HbA2 和 HbF 等亚型,而占 97% 以上的 HbA 中又含有微量的 HbA1a, HbA1b, HbA1c 等糖基化血红蛋白亚型。我们认为,牛血红蛋白同样具有多种亚型,某种微量的血红蛋白亚型由于具有较特殊的分子形态,或者其分子量略高于其他血红蛋白,导致血红蛋白主峰的前延。

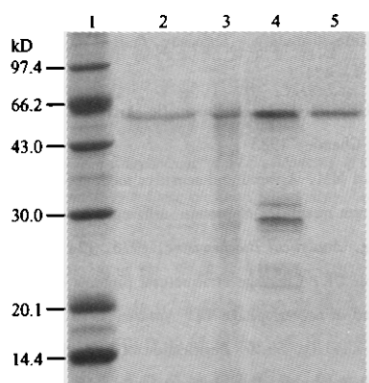


图 7 纯化过程中牛红细胞 CAT 及标准品的 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳

Fig. 7 SDS-PAGE of bovine erythrocyte CAT during purification and bovine liver CAT standard (Sigma)

1: marker; 2: CAT fraction of HIC; 3: bovine erythrocyte CAT standard (Sigma); 4: fraction 1 of Q Sepharose big beads; 5: CAT fraction of G25.

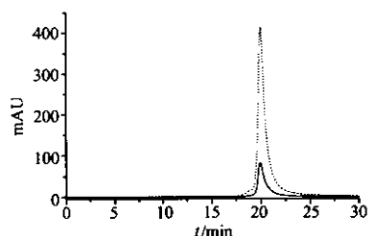


图 8 纯化的血红蛋白在 Shodex Protein KW-308 填充柱的凝胶过滤分析色谱图

Fig. 8 Chromatograms of purified hemoglobin on analytical gel filtration in Shodex Protein KW-308

Solid line: absorbance at 280nm; dotted line: absorbance at 405nm.

凝胶过滤层析结果显示,纯化的 SOD 的纯度为 77.6%,接近于 Sigma 公司试剂级商品牛红细胞 SOD

(86%)。纯化的 SOD 的 A_{259}/A_{280} 为 1.39,与 SOD 标准品的 1.40 十分相近(图 9)。

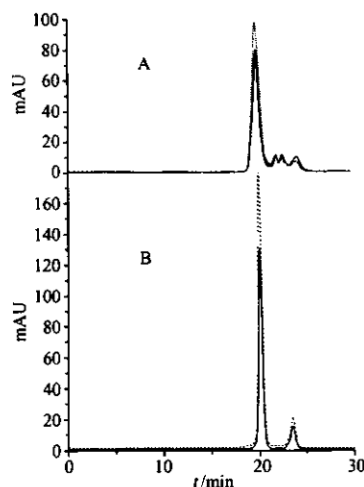


图 9 纯化 SOD 在 Shodex Protein KW-308 填充柱的凝胶过滤分析色谱图

Fig. 9 Chromatograms of purified SOD on analytical gel filtration in Shodex Protein KW-308

(A) purified bovine erythrocyte SOD; (B) bovine erythrocyte SOD standard (Sigma). Solid line: absorbance at 280nm; dotted line: absorbance at 259nm.

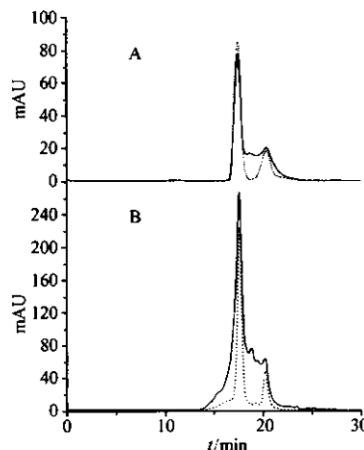


图 10 纯化 CAT 在 Shodex Protein KW-308 填充柱的凝胶过滤分析色谱图

Fig. 10 Chromatograms of purified CAT on analytical gel filtration in Shodex Protein KW-308

(A) purified bovine erythrocyte CAT; (B) bovine liver CAT standard (Sigma). Solid line: absorbance of total protein at 280nm; dotted line: absorbance of hema group at 405nm.

CAT 很容易因为其四聚体结构解聚而失去活性^[12]。在分离纯化过程中,各种操作步骤不可避免地涉及含酶溶液的搅拌、泵送、吸附和解吸。这些步骤对于易裂解的多聚亚基蛋白质很容易造成失活。而我们纯化的 CAT,其纯度达到 81.9%,高于商品 CAT(65.3%)(图 10)。其中很可能是由于 PEG 的存

在,稳定了CAT分子的四聚体结构,这点和PEG对血红蛋白的稳定作用很相似。纯化的CAT血红素在405nm有强吸收, A_{405}/A_{280} 为1.13,接近于文献值。

3 总结

本论文采用串联层析技术从牛红细胞中同时纯化了血红蛋白,SOD和CAT等三种蛋白质。在用Q Sepharose Big Beads阴离子交换层析纯化血红蛋白的过程中,采用PEG600为层析伴侣,不仅提高了血红蛋白的回收率和血红蛋白生物活性,而且促进了血红蛋白的完全透过层析柱,从而实现了与SOD和CAT的有效分离。PEG600属小分子量PEG,容易通过超滤和凝胶过滤层析去除,不会影响血红蛋白的纯度。在离子交换层析之后串联了疏水层析,使得SOD和CAT得到进一步分离纯化。电泳和凝胶过滤分析显示,纯化的血红蛋白、SOD和CAT在纯度方面接近于或优于商用标准品,但我们所采用的工艺成功地从一批原料出发,同时得到三种蛋白质,以较少的纯化步骤高效率地制备牛血红蛋白、SOD和CAT。由于使用常规的层析介质和分离方法,流程易于放大,具有较好的工业生产前景。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Djordjevic VB. Free radicals in cell biology. *International Review of Cytology*, 2004, **237**: 57 - 89
- [2] Stepanik TM, Ewing DD. Coisolation of glutathione peroxidase, catalase and superoxide dismutase from human erythrocytes. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 1990, **20**: 157 - 169
- [3] Monti D, Baldaro E, Riva S. Separation and characterization of two catalase activities isolated from the yeast *Trigonopsis variabilis*. *Enzyme and Microbial Technology*, 2003, **32**: 596 - 605
- [4] Ahmed H, Schott EJ, Gauthier JD *et al.* Superoxide dismutases from the oyster parasite *Perkinsus marinus*: purification, biochemical characterization, and development of a plate microassay for activity. *Analytical Biochemistry*, 2003, **318**: 132 - 141
- [5] Wu S, Huang H, Lin C. Expression and functional characterization of *Helicobacter pylori* catalase from baculovirus-infected insect cells. *Enzyme and Microbial Technology*, 2004, **35**: 482 - 487
- [6] Timasheff SN. Stability of Protein Phamaceuticals. New York: Plenum Press, 1992
- [7] Marklund S, Marlund G. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase. *European Journal of Biochemistry*, 1974, **47**: 469 - 474
- [8] Aebi HE. Methods of Enzymatic Analysis. 3rd ed, Weinheim: Verlag Chemie, 1983
- [9] Bradford MM. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, **72**: 248 - 254
- [10] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227**: 680 - 685
- [11] Lu X, Zhao D, Su Z. Purification of hemoglobin by ion exchange chromatography in flow-through mode with PEG as an escort. *Artificial Cells, Blood Substitutes, and Biotechnology*, 2004, **32**: 209 - 228
- [12] Schroeder WA, Shelton JR, Shelton JB *et al.* The complete amino acid sequence of bovine liver catalase and the partial sequence of bovine erythrocyte catalase. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 1982, **214**: 397 - 421