DOI:10.12441/spyswjs.20241115002 [文章编号] 1673-1689(2025)12-0165-08

超氧化物歧化酶和过氧化氢酶融合蛋白的设计、表达及稳定性研究

江 卓[1,2] 卢维纳[1] 林 奇[1,2] 罗 湛[1,2] 吕正兵[1,2] 聂作明[1,2*]

(1. 浙江理工大学生命科学与医药学院,浙江 杭州 310018; 2. 浙江理工大学绍兴生物医药研究院,浙江 绍兴 312369)

摘要:【目的】设计一种超氧化物歧化酶(SOD)和过氧化氢酶(CAT)酶活力和稳定性均较高的融合蛋白。**【方法】**以AcSOD11和FeCAT蛋白质为研究对象,设计3种融合蛋白AcSOD11-(GGGGS)*3-FeCAT、FeCAT-(GGGGS)*3-AcSOD11和FeCAT-(EAAAK)*3-AcSOD11,分别命名为AcSOD11-G3-FeCAT、FeCAT-G3-AcSOD11和FeCAT-E3-AcSOD11,并在大肠杆菌BL21(DE3)中进行可溶性表达,然后对3种融合蛋白进行热稳定性和pH稳定性检测。**【结果】**3种融合蛋白的SOD比酶活无显著差异,而CAT比酶活存在显著差异,FeCAT-G3-AcSOD11的CAT比酶活最高(531 U/mg),FeCAT-E3-AcSOD11的最低,表明(GGGGS)*3柔性肽连接有利于保持CAT的酶活力。抗逆性研究发现,FeCAT-G3-AcSOD11中CAT和SOD的高温和酸碱耐受性都较强。**【结论】**该研究成功构建了3种融合蛋白,得到一种SOD和CAT酶活力和稳定性均较高的融合蛋白FeCAT-G3-AcSOD11,为SOD和CAT的联合应用提供了理论依据。

关键词:超氧化物歧化酶;过氧化氢酶;融合表达;pH稳定性;热稳定性

Design, Expression, and Stability Evaluation of a Superoxide Dismutase-catalase Fusion Protein

JIANG Zhuo[1,2] *LU Weina*[1] *LIN Qi*[1,2] *LUO Zhan*[1,2] *LYU Zhengbin*[1,2] *NIE Zuoming*[1,2*]

(1. College of Life Sciences and Medicine, Zhejiang Sci-Tech University, Hangzhou 310018, China; 2. Shaoxing Academy of Biomedicine, Zhejiang Sci-Tech University, Shaoxing 312369, China)

Abstract: [**Objective**] This study aims to design a fusion protein with high activities and high stability of superoxide dismutase (SOD) and catalase (CAT). [**Method**] Using AcSOD11 and FeCAT proteins as the research subjects, three fusion proteins of SOD and CAT were designed: AcSOD11- (GGGGS)*3-FeCAT, FeCAT-(GGGGS)*3-AcSOD11, and FeCAT-(EAAAK)*3-AcSOD11, which were named AcSOD11-G3-FeCAT, FeCAT-G3-AcSOD11, and FeCAT-E3-AcSOD11, respectively. Soluble expression of these three fusion proteins was achieved in *Escherichia coli* BL21(DE3). The thermal stability and pH stability of the three fusion proteins were then assessed. [**Result**] The three fusion proteins showed no significant difference in the specific activity of SOD, while they had significant differences in the specific activity of CAT. The specific activity of CAT was the highest (531 U/mg) in FeCAT-G3-AcSOD11 and the lowest in FeCAT-E3-AcSOD11, indicating that the flexible (GGGGS)*3 peptide linker was favorable for maintaining CAT enzyme activity. Stress resistance studies demonstrated that both CAT and SOD in FeCAT-G3-AcSOD11 exhibited strong tolerance to high temperatures and varying pH conditions. [**Conclusion**] This study successfully constructed three fusion proteins and obtained FeCAT-G3-AcSOD11, a highly stable fusion protein with high enzyme activities of both SOD and CAT,

通信作者:聂作明(1975—),男,博士,教授,硕士研究生导师,主要从事酶的开发与应用研究。E-mail:wuxinzm@zstu.edu.cn

收稿日期:2024-11-15 **修回日期:**2025-01-10

providing a theoretical foundation for the combined application of SOD and CAT.

Keywords: superoxide dismutase; catalase; fusion expression; pH stability; thermal stability

SOD是一种携带金属离子的抗氧化酶，能催化有害的超氧自由基转化为氧气和H_2O_2，从而具有保护细胞免受氧化损伤、防止氧化应激、维护细胞内氧化还原平衡及调节信号传导等重要作用[1-3]。根据其金属离子的不同，SOD主要分为铜锌SOD（Cu/Zn-SOD）、锰SOD（Mn-SOD）和铁SOD（Fe-SOD）[4]。Cu/Zn-SOD主要以同源二聚体形式分布于植物细胞的细胞质、叶绿体和动物细胞的细胞核、溶酶体、过氧化物酶体、细胞质、细胞外基质，以及原核生物的周质空间等区域[5]。Fe-SOD则多以同源二聚体或四聚体形式存在，主要分布于部分植物细胞叶绿体和原核生物细胞质[6]。Mn-SOD通常以同源二聚体或四聚体形式存在于真核生物的线粒体及原核生物的周质空间中[7]。来源于耐热菌的SOD往往表现出极强的热稳定性质，也有研究对SOD进行改造从而使其在高温下仍然保持相对稳定的酶活力[8]。

CAT是一种广泛存在于生物体中的重要的抗氧化酶[9]，可以将H_2O_2转化为水和氧气[10]。CAT可以维持细胞内的氧化还原平衡、防御ROS引起的氧化应激损伤[11]。根据蛋白质催化中心结构的不同，CAT可分为2类：1）具有铁卟啉结构的CAT，称为铁过氧化氢酶（FeCAT），已发现的CAT中超过85%属于此类[12]；2）以锰离子代替铁离子的卟啉结构CAT，称为锰过氧化氢酶（MnCAT）[13]。一些极端嗜热菌产生的CAT不仅耐热，还能在广泛的pH范围内保持稳定的酶活力。例如，从嗜热菌*Metallosphaera hakonensis*中克隆的CAT，在pH为10时酶活力最高，表现出优异的耐碱性[13]。

由于SOD和CAT都是人体内重要的抗氧化酶，并且CAT可以将SOD清除有害自由基过程中产生的低毒性的H_2O_2转化为无害的水和氧气，因此SOD和CAT往往需联合使用以期达到最佳抗氧化效果。有研究者利用纳米载体将SOD和CAT进行共同包埋，从而增强SOD和CAT之间的级联反应[14]，但是会增加原料成本，且两者联用的效果有限。基于此，本研究以AcSOD11和FeCAT蛋白质为研究对象，构建了3种融合蛋白（AcSOD11-G3-FeCAT、FeCAT-G3-AcSOD11、FeCAT-E3-AcSOD11），为后续两者联用蛋白质药物的研究与应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料

大肠杆菌BL21（DE3）-pET-28a-*AcSOD11*菌种：浙江理工大学生化分子实验室；pMUT1-MLH质粒：浙江理工大学生化分子实验室；pET-28a-*FeCAT*质粒：苏州金唯智生物科技有限公司；引物：杭州有康生物科技有限公司。

50 mg/mL硫酸卡那霉素：生工生物工程（上海）股份有限公司；BCA蛋白质定量检测试剂盒：宝日医生物技术（北京）有限公司；CAT活性检测试剂盒：北京索莱宝科技有限公司；质粒DNA小提试剂盒：南京诺唯赞生物科技股份有限公司。

1.1.2 仪器与设备

超声波破碎仪：NE-300Z型，方需科技（上海）有限公司；垂直电泳仪：Mini-PROTEAN® Tetra型，伯乐生命医学产品（上海）有限公司；紫外-可见分光光度计：UV-5500型，上海元析仪器有限公司。

1.2 方法

1.2.1 AcSOD11和FeCAT融合蛋白的设计及其重组表达载体的构建

根据AcSOD11和FeCAT的三维结构，用不同的连接肽将FeCAT融合在AcSOD11的C端或N端，设计了3种融合蛋白。利用柔性肽（GGGGS）*3作为连接肽，将FeCAT融合在AcSOD11的C端，命名为AcSOD11-G3-FeCAT；利用柔性肽（GGGGS）*3作为连接肽，将FeCAT融合在AcSOD11的N端，命名为FeCAT-G3-AcSOD11；利用刚性肽（EAAAK）*3作为连接肽，将FeCAT融合在AcSOD11的C端，命名为FeCAT-E3-AcSOD11。随后构建了这3种融合蛋白的表达系统。

首先利用质粒提取试剂盒提取pET-28a-*AcSOD11*质粒，以pET-28a-*AcSOD11*为模板，分别利用引物Fe-F和Fe-R进行PCR扩增，将模板线性化。以pMUT1-MLH为模板，使用引物CAT-F和CAT-R进行PCR扩增，得到柔性肽和目的基因的融合片段（GGGGS）*3-*FeCAT*。利用（GGGGS）*3的柔性肽作为*AcSOD11*和*FeCAT*基因的连接器。然后利用胶回收试剂盒回收PCR

产物，将PCR产物进行无缝克隆，然后热激转化进入DH5α感受态细胞中。挑取单菌落至5 mL培养基中，于37 ℃、220 r/min培养12 h，委托杭州有康生物科技有限公司进行测序验证，得到质粒pET-28a-*AcSOD11*-G3-*FeCAT*。

随后以pET-28a-*AcSOD11*为模板，分别用引物XCL-F和XXX-R、XXX-F和XXX-R进行PCR扩增，得到线性化载体，再利用pET-28a-*FeCAT*为模板，分别利用引物CA-F和CL-R、CA-F和CR-R进行PCR扩增，得到目的基因片段，利用胶回收试剂盒回收PCR产物，将其无缝克隆后热激转化进入DH5α感受态细胞中，挑取阳性单克隆菌株，委托杭州有康生物科技有限公司进行测序验证，分别得到pET-28a-*FeCAT*-G3-*AcSOD11*和pET-28a-*FeCAT*-E3-*AcSOD11*质粒。引物序列见表1所示。

表1　引物序列

Table 1　Primer sequences

名称	序列（5′—3′）
Fe-F	TAAGAATTCGAGCTCCGTCGACAAG
Fe-R	CCACTTTCGCCAGCGCTTCTTTATA
CAT-F	TATAAAGAAGCGCTGGCGAAAGTGG
CAT-R	TCGACGGAGCTCGAATTCTTAGCCCGCCACGCTCGCATCAAT
XCL-F	TGGCGGTGGCAGCGGCGGCGGTGGTAgCATGGAACAGCAAGAACGCTTTCAGC
XXX-R	GCGCTTCCATGGTATATCTCCTTCTTAAAGTTAAAC
CA-F	GAGATATACCATGGAAGCGCGCAAAGCGCCGCG
CL-R	CGCCGCCGCTGCCACCGCCACCACTGCCACCACCGCCGCCCGCCACGCTCGCATCAAT
XXX-F	GAAGCGGCGGCGAAAGAAGCGGCGGCGAAAATGGAACAGCAAGAACGCTTTCAGC
CR-R	GCTTCTTTCGCCGCCGCTTCTTTCGCCGCCGCTTCGCCCGCCACGCTCGCATCAA

1.2.2　AcSOD11和FeCAT融合蛋白的原核表达

取5 mL培养12 h的DH5α-pET-28a-*AcSOD11*-G3-*FeCAT*、DH5α-pET-28a-*FeCAT*-G3-*AcSOD11*和DH5α-pET-28a-*FeCAT*-E3-*AcSOD11*重组菌株，利用质粒提取试剂盒提取质粒，取10 μL加到100 μL BL21（DE3）感受态细胞中，冰上孵育30 min，42 ℃热激45 s，然后加入900 μL预热至37 ℃的LB培养基，放入37 ℃、220 r/min的摇床中培养1 h。培养结束后，12 000 r/min离心2 min，去除700 μL培养基，剩余菌液涂布至含卡那霉素的平板中，37 ℃培养12 h，挑取单克隆菌落置于5 mL含卡那霉素的LB培养基中，37 ℃培养12 h，得到对应的BL21（DE3）重组菌株。

将上述得到的重组菌株BL21（DE3）-pET-28a-*AcSOD11*-G3-*FeCAT*、BL21（DE3）-pET-28a-*FeCAT*-G3-*AcSOD11*和BL21（DE3）-pET-28a-*FeCAT*-E3-*AcSOD11*按体积分数1%接种至5 mL LB培养基中，于37 ℃、220 r/min的摇床中培养6 h，再加入5 μL的IPTG（1 mol/L），于37 ℃、220 r/min的摇床中诱导培养12 h。12 000 r/min离心3 min，收集菌悬液，用500 μL的1×PBS重悬，用超声波破碎仪进行破碎，超声条件为：破碎3 s，暂停5 s，功率270 W，共破碎2 min。超声破碎完全后，菌悬液由浑浊变为澄清。12 000 r/min离心3 min，取上清液，用0.45 μm的滤膜过滤得到相应的蛋白质溶液。将未用IPTG诱导表达的菌株、用IPTG诱导表达的菌株、破碎细胞的上清液、破碎细胞的沉淀进行SDS-PAGE。

1.2.3　AcSOD11和FeCAT融合蛋白的比酶活测定

分别将5 μL含有pET-28a-*AcSOD11*-G3-*FeCAT*、pET-28a-*FeCAT*-G3-*AcSOD11*和pET-28a-*FeCAT*-E3-*AcSOD11*质粒的BL21（DE3）重组菌株置于5 mL的LB培养基中，37 ℃、220 r/min摇床培养6 h。加入5 μL的IPTG（1 mol/L）诱导12 h。12 000 r/min离心3 min，用500 μL的1×PBS洗涤沉淀，再用500 μL的1×PBS重悬，放入超声波破碎仪中进行破碎。利用GB/T 5009.171—2003中修改的Marklund方法[15]和CAT活性检测试剂盒分别测定AcSOD11、FeCAT、AcSOD11-G3-FeCAT、FeCAT-G3-AcSOD11和FeCAT-E3-AcSOD11中SOD和CAT的酶活力，再使用BCA蛋白质定量试剂盒测定蛋白质质量浓度，利用式（1）分别计算蛋白质中SOD和CAT的比酶活。

$$U=\frac{E}{c} \quad (1)$$

式中：

U——SOD或CAT的比酶活，U/mg；

E——SOD或CAT的酶活力，U/mL；

c——蛋白质的质量浓度，mg/mL。

1.2.4 AcSOD11和FeCAT融合蛋白的热稳定性检测

取3种AcSOD11和FeCAT融合蛋白各100 μL，在80 ℃金属浴中分别加热20、40、60、80、100、120 min，用修改的Marklund方法和CAT活性检测试剂盒测定各时间点SOD和CAT的酶活力。每组设置3个平行样本，以AcSOD11和FeCAT为对照，其未加热（0 min）时的SOD、CAT相对酶活力均为100%，计算其他加热时间样品中的SOD、CAT相对酶活力。

1.2.5 AcSOD11和FeCAT融合蛋白的pH稳定性检测

取3种SOD和CAT融合蛋白各100 μL，用一系列缓冲液（pH 2~12）稀释10倍，37 ℃金属浴加热30 min，离心，取上清液，测定SOD和CAT的酶活力。每组3个平行样本，以AcSOD11和FeCAT为对照，其在pH为7时的SOD、CAT相对酶活力均为100%，计算不同pH缓冲液处理后，融合蛋白的SOD、CAT相对酶活力。

1.2.6 统计分析

使用GraphPad Prism 8.0软件进行统计分析和绘图。用t检验或单因素方差分析（One-way ANOVA）评估组间差异（n≥3），P<0.05表示差异显著，P<0.01表示差异非常显著，P<0.001表示差异极显著，P<0.000 1表示差异极其显著。

2 结果与讨论

2.1 AcSOD11和FeCAT融合蛋白的设计及其重组表达载体的构建结果

CAT是一种抗氧化酶，可以将SOD抗氧化的产物H_2O_2转化为水和氧气。将FeCAT分别融合在AcSOD11蛋白质的C端或N端，设计了3种强大的兼具两者酶活力的融合蛋白：AcSOD11-G3-FeCAT、FeCAT-G3-AcSOD11和FeCAT-E3-AcSOD11，见图1（a）。

进一步构建融合蛋白的重组表达载体。以pET-28a-*AcSOD11*为模板，进行PCR扩增，得到线性化载体条带；再以pMUT1-MLH为模板，进行PCR扩增，得到目的基因的ORF条带，见图1（b）~（c）。利用胶回收试剂盒回收扩增的载体和目的基因，通过无缝克隆技术成功构建融合表达载体pET-28a-*AcSOD11*-G3-*FeCAT*，对构建的融合表达载体进行测序鉴定，见图1（d），结果表明，融合表达载体构建成功。此外，用同样的方法构建了pET-28a-*FeCAT*-G3-*AcSOD11*和pET-28a-*FeCAT*-E3-*AcSOD11*重组质粒。

2.2 AcSOD11和FeCAT融合蛋白的原核表达结果

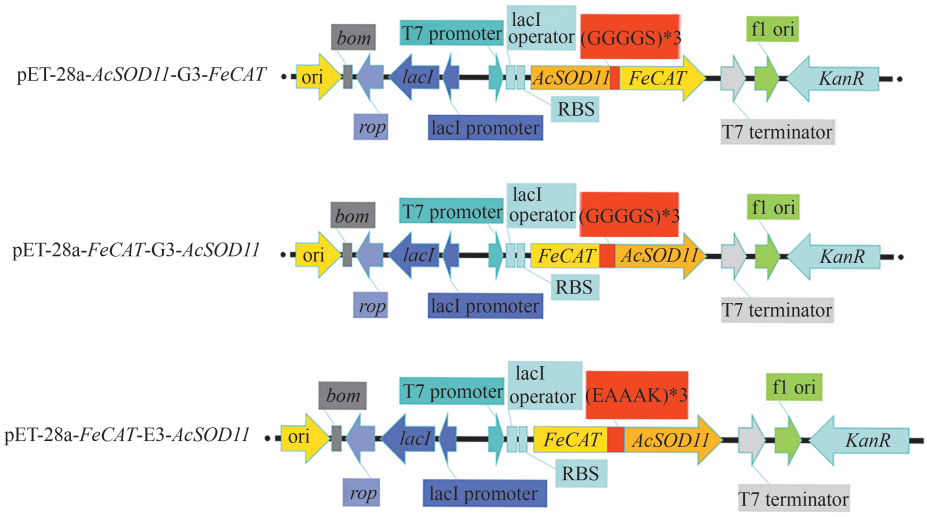
将携带*AcSOD11*和*FeCAT*基因重组质粒的BL21（DE3）菌株接种至5 mL的LB液体培养基中，用IPTG诱导表达。如图2所示，IPTG诱导样品显示出特异的目的蛋白质条带，表明3种融合蛋白AcSOD11-G3-FeCAT、FeCAT-G3-AcSOD11和FeCAT-E3-AcSOD11均正常表达，且表达量无明显差异（见图中箭头处）。将融合蛋白超声破碎后，鉴定其蛋白质表达模式，结果表明，3种融合蛋白均为可溶性表达。

2.3 AcSOD11和FeCAT融合蛋白的比酶活测定结果

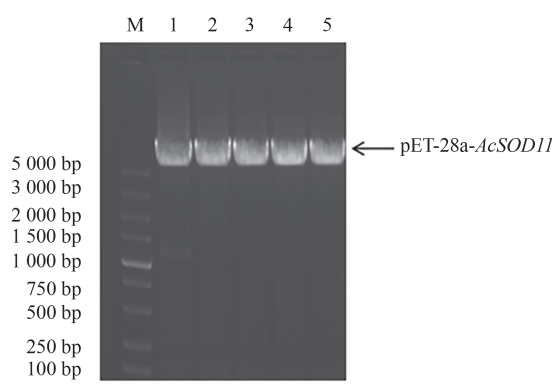
用修改的Marklund方法和CAT活性检测试剂盒分别测定上述融合蛋白的SOD、CAT酶活力，计算3种融合蛋白AcSOD11-G3-FeCAT、FeCAT-G3-AcSOD11和FeCAT-E3-AcSOD11的比酶活。如图3所示，3种融合蛋白的SOD比酶活无显著差异，分别为179.5、171.6、190.4 U/mg。然而，3种融合蛋白的CAT比酶活相差较大，其中FeCAT-G3-AcSOD11融合蛋白的CAT比酶活最高，达531 U/mg，显著高于另外2种融合蛋白，FeCAT-E3-AcSOD11融合蛋白的CAT比酶活最低。结果表明，（EAAAK）*3刚性肽的刚性连接对融合蛋白的SOD、CAT酶活力影响较大，不适合用于这2个蛋白质的融合连接。此外，与AcSOD11和FeCAT相比，3种融合蛋白的SOD、CAT比酶活都极其显著下降，表明2种蛋白质的融合可能会影响蛋白质的天然构象，从而导致酶活力损失。另外，AcSOD11-G3-FeCAT和FeCAT-G3-AcSOD11的SOD比酶活无显著差异，而CAT比酶活差异显著，表明2种蛋白质融合的顺序对SOD构象的影响较小，而对CAT构象的影响较大，从而导致了AcSOD11-G3-FeCAT和FeCAT-G3-AcSOD11的CAT比酶活相差较大。

2.4 AcSOD11和FeCAT融合蛋白的热稳定性检测结果

将上述3种融合蛋白放入金属浴锅中，高温

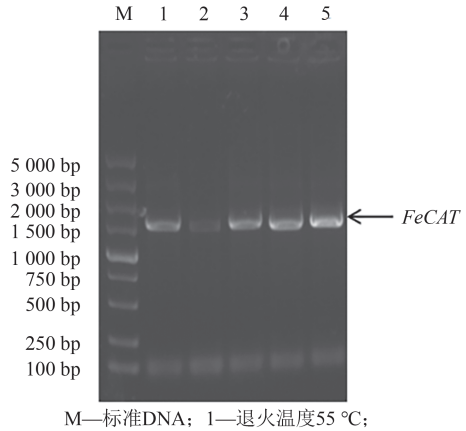


(a) 重组质粒图谱



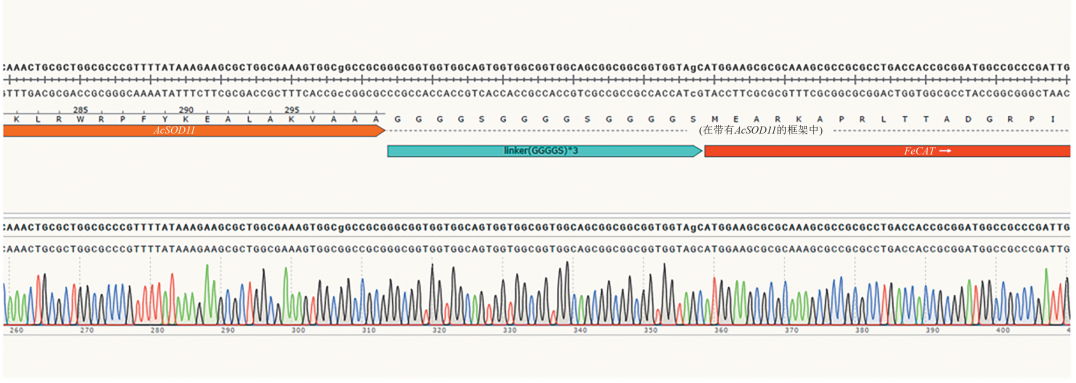
M—标准DNA；1—退火温度55 ℃；2—退火温度57 ℃；3—退火温度59 ℃；4—退火温度61 ℃；5—退火温度63 ℃。

(b) pET-28a-*AcSOD11*载体电泳图



M—标准DNA；1—退火温度55 ℃；2—退火温度57 ℃；3—退火温度59 ℃；4—退火温度61 ℃；5—退火温度63 ℃。

(c) 目的基因*FeCAT*电泳图

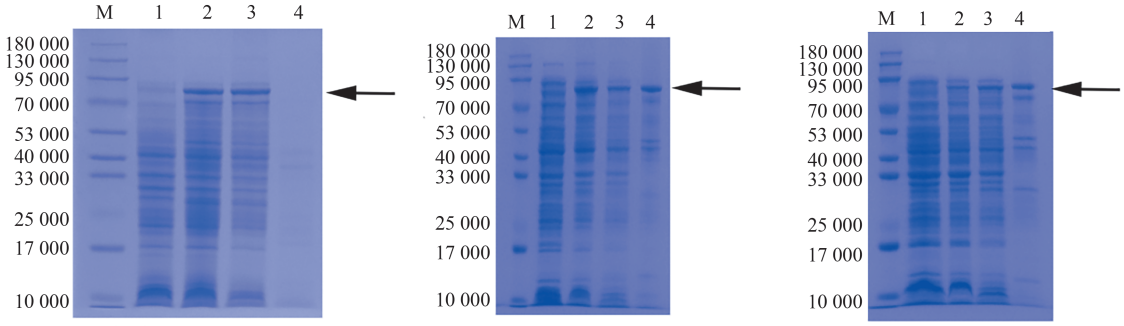


(d) pET-28a-*AcSOD11*-G3-*FeCAT*测序结果

图 1　表达 AcSOD11 和 FeCAT 融合蛋白的重组质粒构建

Fig. 1　Construction of recombinant plasmids for the expression of AcSOD11 and FeCAT fusion proteins

(80 ℃)加热 120 min，每 20 min 取样一次，利用修改的 Marklund 方法和 CAT 活性检测试剂盒分别测定 SOD 和 CAT 酶活力。以 0 min 时 SOD、CAT 相对酶活力为 100%，测定其他加热时间的样品中 SOD、CAT 相对酶活力。如图 4(a)所示，80 ℃加热 120 min，AcSOD11 的 SOD 酶活力保持相对稳定，几乎无酶活力损失，显示出较高的热稳定性。然而，AcSOD11-G3-FeCAT、FeCAT-E3-AcSOD11 和

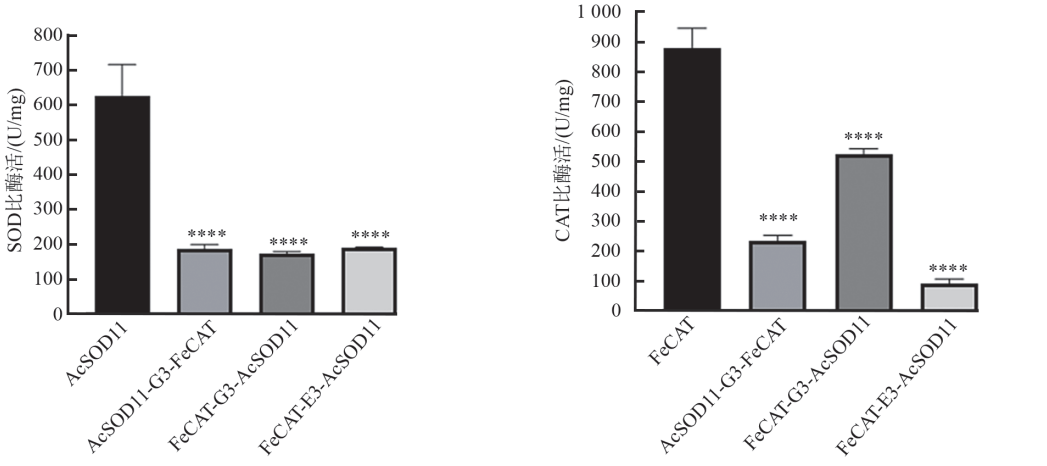


(a) AcSOD11-G3-FeCAT (b) FeCAT-G3-AcSOD11 (c) FeCAT-E3-AcSOD11

M—标准蛋白质；1—未用 IPTG 诱导表达的菌株；2—用 IPTG 诱导表达的菌株；3—破碎细胞的上清液；4—破碎细胞的沉淀。

图 2 AcSOD11 和 FeCAT 融合蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of AcSOD11 and FeCAT fusion proteins



****—与AcSOD11相比，差异极其显著(P<0.000 1)。

(a) SOD比酶活

****—与FeCAT相比，差异极其显著(P<0.000 1)。

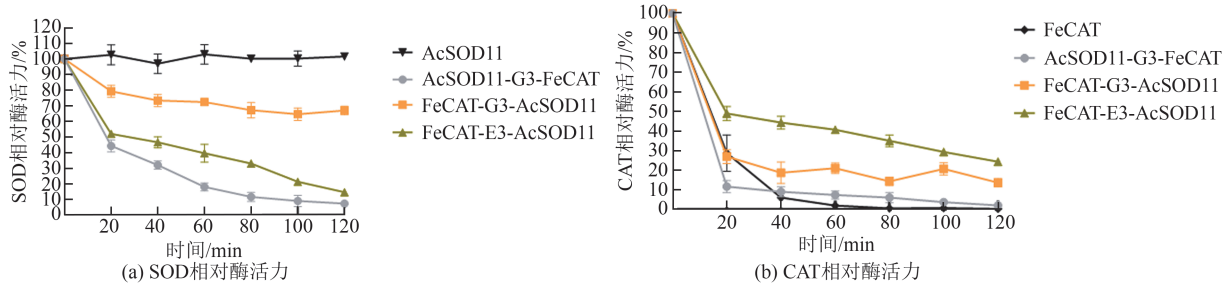
(b) CAT比酶活

图 3 融合蛋白的 SOD 比酶活和 CAT 比酶活

Fig. 3 Specific activities of SOD and CAT in fusion proteins

FeCAT-G3-AcSOD11 融合蛋白的 SOD 热稳定性均低于 AcSOD11。其中 FeCAT-G3-AcSOD11 融合蛋白在 80 ℃加热 120 min 内的 SOD 酶活力较稳定，其相对酶活力仍可达 80% 左右，也表现出较强的热稳定性。但是 AcSOD11-G3-FeCAT 和 FeCAT-E3-AcSOD11 融合蛋白在 80 ℃加热 20 min 时，SOD 相对酶活力迅速下降至 50% 左右，随后缓慢下降，显示出较低的热稳定性。柔性肽(GGGGS)*3 连接 AcSOD11 和 FeCAT 的顺序不同对 SOD 热稳定性影响较大，与 AcSOD11-G3-FeCAT 相比，FeCAT-G3-AcSOD11 的 SOD 热稳定性大幅提高。CAT 热稳定性检测结果见图 4(b)，FeCAT 在 80 ℃加热 120 min 内，相对酶活力迅速下降至 7% 左右，表明热稳定性较差。而 AcSOD11-G3-FeCAT、FeCAT-E3-AcSOD11 和 FeCAT-G3-AcSOD11 融合蛋白的 CAT 热稳定性均高于 FeCAT。其中 AcSOD11-G3-FeCAT、FeCAT-E3-AcSOD11 和 FeCAT-G3-AcSOD11 融合蛋白在 80 ℃加热 20 min 后，CAT 相对酶活力分别迅速下降至 10%、50% 和 26% 左右，之后随着时间的延长继续缓慢下降，表明 3 种融合蛋白的 CAT 热稳定性存在差异。

上述结果表明，与 AcSOD11、FeCAT 相比，3 种融合蛋白的 SOD 热稳定性均弱于 AcSOD11，3 种融合蛋白的 CAT 热稳定性均强于 FeCAT，推测这 2 种蛋白质的融合可能改变了蛋白质的天然构象，从而影响了酶的热稳定性。3 种融合蛋白中，FeCAT-G3-AcSOD11 融合蛋白的 SOD 热稳定性相对较强，FeCAT-E3-AcSOD11 融合蛋白的



(a) SOD相对酶活力　(b) CAT相对酶活力

图 4　融合蛋白的热稳定性

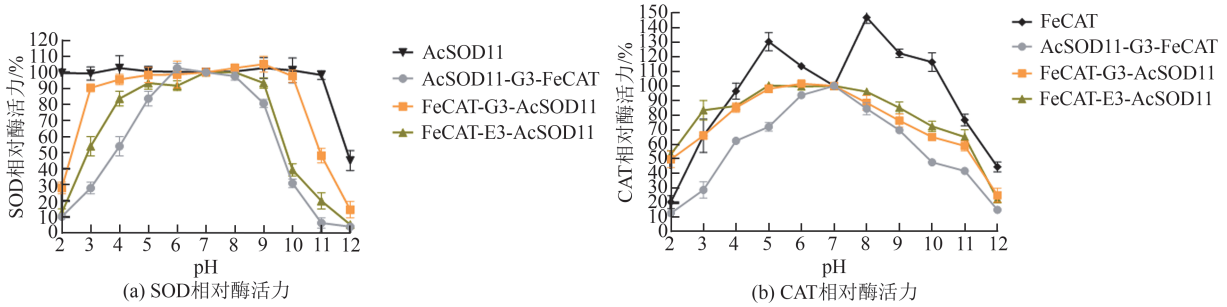
Fig. 4　Thermal stability of fusion proteins

CAT 热稳定性较好。综合 SOD 和 CAT 热稳定性检测结果，FeCAT-G3-AcSOD11 融合蛋白对高温的耐受性最强，是一种兼具 SOD 和 CAT 双酶活性且具备强热稳定性的理想融合蛋白。

2.5　AcSOD11 和 FeCAT 融合蛋白的 pH 稳定性检测结果

将上述 3 种融合蛋白用一系列缓冲液（pH 2~12）进行稀释，放入金属浴锅中，37 ℃加热 30 min，离心后分别利用修改的 Marklund 方法和 CAT 活性检测试剂盒检测 SOD 和 CAT 酶活力。以 pH 为 7 时 SOD、CAT 相对酶活力为 100%，计算其他 pH 时样品的 SOD、CAT 相对酶活力。如图 5(a)所示，当 pH 为 2~11 时，AcSOD11 的 SOD 相对酶活力维持在 95% 以上，显示出较高的 pH 稳定性；AcSOD11-G3-FeCAT 的 SOD 相对酶活力随着酸性或碱性的增强而降低，显示出较低的 pH 稳定性。当 pH 为 3~10 时，FeCAT-G3-AcSOD11 的 SOD 相对酶活力保持在 90% 以上，显示出较高的 pH 稳定性。当 pH 为 4~9 时，FeCAT-E3-AcSOD11 的 SOD 酶活力相对稳定；但是在极端的酸性或碱性条件下，其 SOD 相对酶活力下降明显，表明 FeCAT-E3-AcSOD11 具有一定的 pH 稳定性。CAT 的 pH 稳定性检测结果见图 5(b)。当 pH 为 8 时，FeCAT 的 CAT 相对酶活力最大；当 pH 为 2 时，其 CAT 相对酶活力为 20% 左右；当 pH 为 12 时，其 CAT 相对酶活力为 40% 左右，表明 CAT 的 pH 稳定性较差。AcSOD11-G3-FeCAT 在 pH 为 7 时的 CAT 相对酶活力最大，在较强的酸性或碱性条件下，其 CAT 相对酶活力均迅速降低至 10% 左右，显示出较低的 pH 稳定性。FeCAT-E3-AcSOD11 和 FeCAT-G3-AcSOD11 在 pH 为 6 时的 CAT 相对酶活力最大，在强酸性条件下，两者的 CAT 相对酶活力仍可达 50% 左右；而在 pH 为 6~12 时，其 CAT 相对酶活力随着 pH 的增加缓慢下降至 20% 左右。与 AcSOD11 相比，3 种融合蛋白的 SOD pH 稳定性均较弱；与 FeCAT 相比，3 种融合蛋白的 CAT 相对酶活力随 pH 增大或减小时下降较为平缓，pH 稳定性均较强，推测 2 种蛋白质的融合影响了蛋白质的天然构象，从而影响了酶的 pH 稳定性。

结果表明，3 种融合蛋白中，FeCAT-G3-AcSOD11 融合蛋白的 SOD pH 稳定性最强，FeCAT-G3-AcSOD11 和 FeCAT-E3-AcSOD11 融合蛋白的 CAT pH 稳定性较强。综合考虑 SOD 和 CAT 的 pH 稳定性，FeCAT-G3-AcSOD11 融合蛋白的 pH 稳定性最佳，是一种兼具 SOD 和 CAT 双酶活性且在极端 pH 下表现出高稳定性的理想融合蛋白。



(a) SOD相对酶活力　(b) CAT相对酶活力

图 5　融合蛋白的 pH 稳定性

Fig. 5　pH stability of fusion proteins

3 结论

作者设计并原核表达了AcSOD11和FeCAT的3种融合蛋白，它们的SOD和CAT酶活力均较高。稳定性检测结果表明，FeCAT-G3-AcSOD11融合蛋白中，SOD的热稳定性和pH稳定性最强：80 ℃高温加热120 min内，其SOD相对酶活力仍可达80%左右；当pH为3~10时，其SOD相对酶活力保持稳定，当pH为9时达到最高。此外，FeCAT-G3-AcSOD11融合蛋白中CAT的热稳定性和pH稳定性也较强。综合考虑3种融合蛋白的热稳定性和pH稳定性，FeCAT-G3-AcSOD11是一种兼具SOD和CAT双酶活性的高稳定性融合蛋白。

本研究设计的SOD和CAT酶活力较高且高稳定性的融合蛋白FeCAT-G3-AcSOD11，为SOD和CAT的联合应用提供了新途径，可广泛应用于食品、美容和生物医药等行业。该融合蛋白具备作为抗氧化剂的潜力，可延长食品的保质期，防止油脂氧化和食品变质，也可将其用于功能性食品的生产。此外，由于抗氧化酶具有清除自由基的作用，该融合蛋白在美容产品中也有相关应用潜力。在医药领域，SOD和CAT的融合蛋白可用于抗氧化治疗和抗衰老，如用于治疗因氧化应激引起的心血管疾病、糖尿病、炎症性疾病等。

参考文献

[1] CALVANI N E D, DE MARCO VERISSIMO C, JEWHURST H L, et al. Two distinct superoxidase dismutases (SOD) secreted by the helminth parasite *Fasciola hepatica* play roles in defence against metabolic and host immune cell-derived reactive oxygen species (ROS) during growth and development[J]. Antioxidants, 2022, 11(10): 1968.

[2] 陈巍文，朱建津，黄建平，等. γ-谷维素和半胱胺对应激小鼠氧化还原状态及免疫功能的影响[J]. 食品与生物技术学报，2022，41(4)：1-11.
CHEN W W, ZHU J J, HUANG J P, et al. Effects of γ-oryzanol and cysteamine on redox status and immunity of stressed mice [J]. Journal of Food Science and Biotechnology, 2022, 41(4): 1-11.(in Chinese)

[3] 张延进，马雅鸽，杨雄超，等. 葛根发酵产物延缓衰老小鼠器官功能衰退的作用机制[J]. 食品与机械，2024，40(12)：109-117.
ZHANG Y J, MA Y G, YANG X C, et al. Mechanism of fermentation products of *Puerariae lobatae* Radix in delaying organ function decline in aging mice[J]. Food & Machinery, 2024, 40(12): 109-117.(in Chinese)

[4] ZELKO I N, MARIANI T J, FOLZ R J. Superoxide dismutase multigene family: a comparison of the *CuZn-SOD* (*SOD1*), *Mn-SOD* (*SOD2*), and *EC-SOD* (*SOD3*) gene structures, evolution, and expression [J]. Free Radical Biology & Medicine, 2002, 33(3): 337-349.

[5] 陈卫华，石鹏君，黎育颖，等. 超氧化物歧化酶在动物生产中的研究进展[J]. 饲料研究，2024，47(14)：151-155.
CHEN W H, SHI P J, LI Y Y, et al. Research progress of superoxide dismutase in animal production [J]. Feed Research, 2024, 47(14): 151-155.(in Chinese)

[6] 吴少峰. 耐高温铁超氧化物歧化酶的表达纯化及其结构研究[D]. 杭州：浙江理工大学，2012.

[7] VALENTI R, JABŁOŃSKA J, TAWFIK D S. Characterization of ancestral Fe/Mn superoxide dismutases indicates their cambialistic origin [J]. Protein Science, 2022, 31(10): e4423.

[8] 俄世瑾. 嗜热子囊菌光孢变种热稳定超氧化物歧化酶的纯化及基因克隆和表达[D]. 泰安：山东农业大学，2007.

[9] ELVITIGALA D A S, PRIYATHILAKA T T, WHANG I, et al. A teleostan homolog of catalase from black rockfish (*Sebastes schlegelii*): insights into functional roles in host antioxidant defense and expressional responses to septic conditions [J]. Fish & Shellfish Immunology, 2015, 44(1): 321-331.

[10] ANWAR S, ALRUMAIHI F, SARWAR T, et al. Exploring therapeutic potential of catalase: strategies in disease prevention and management[J]. Biomolecules, 2024, 14(6): 697.

[11] HO Y S, XIONG Y, MA W C, et al. Mice lacking catalase develop normally but show differential sensitivity to oxidant tissue injury [J]. Journal of Biological Chemistry, 2004, 279(31): 32804-32812.

[12] 王慧，崔云风，刘岩，等. MntH与含锰过氧化氢酶共表达基因工程菌的构建与发酵优化[J]. 生物技术通报，2015，31(9)：183-189.
WANG H, CUI Y F, LIU Y, et al. Construction of co-expressed MntH and Mn-catalase gene in *Escherichia coli* and optimization of fermentation conditions [J]. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(9): 183-189.(in Chinese)

[13] EBARA S, SHIGEMORI Y. Alkali-tolerant high-activity catalase from a thermophilic bacterium and its overexpression in *Escherichia coli* [J]. Protein Expression and Purification, 2008, 57(2): 255-260.

[14] KWON K, JUNG J, SAHU A, et al. Nanoreactor for cascade reaction between SOD and CAT and its tissue regeneration effect [J]. Journal of Controlled Release, 2022, 344: 160-172.

[15] FU X C, JIANG Z, BI W H, et al. Expression, purification, and anti-UV irradiation effect of RsSOD on HCE-T human corneal epithelial cells[J]. Genes, 2024, 15(9): 1147.

（责任编辑：闫林红）