

韭菜细胞溶质超氧化物歧化酶的纯化和性质^{*}

翟颐华 邹国林^{**} 杨 雄^{***}

(武汉大学生物化学与生物物理学系 武汉 430072)

提 要 经硫酸铵沉淀、Sephadex G-200 凝胶过滤和 DEAE-Sephacel 层析 3 个步骤, 将韭菜细胞溶质 SOD 纯化到均一程度。从 500 g 叶片中得到 2.4 mg 酶, 酶比活力达 13 000 U/mg 蛋白。鉴定该酶是 Cu·Zn-SOD。测得酶分子量约为 30 900 道尔顿, 亚基分子量约为 15 900 道尔顿, N-末端氨基酸为丙氨酸。该酶在紫外与可见光区吸收峰分别在 260 nm 和 680 nm。实验表明该酶热稳定性良好。

关键词 超氧化物歧化酶, 纯化, 性质, 韭菜细胞溶质

超氧化物歧化酶(SOD)是一种以 O_2^- 自由基为底物的酶, 对它的研究可以丰富酶学和自由基生物学的内容。邹国林等曾对小白菜 SOD 进行过系统研究^[1~3]。韭菜是一种生长广泛的蔬菜, 与小白菜分属不同的科。韭菜 SOD 的纯化和性质研究国内外未见报道。本文报道韭菜细胞溶质 Cu·Zn-SOD 的纯化及其性质, 旨在为高等植物 SOD 的比较研究提供素材。

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

新鲜韭菜 (*Allium porrum*), Sephadex G-200 (Pharmacia 产品), DEAE-Sephacel (Whatman 产品), 氯化硝基氮蓝四唑(NBT)(上海前进试剂厂产品), 标准蛋白质、标准氨基酸均为层析纯, 其它试剂均为分析纯或生化试剂。

1.2 方法

酶活力测定采用 NBT 光还原法^[4], 以抑制 NBT 光还原达 50% 的酶量作为 1 个酶单

收稿日: 1996-11-19, 修回日: 1997-01-22。第一作者: 女, 25 岁, 硕士生, 从事生物化学方面的研究。

* 湖北省科委重点科技项目。

** 通讯联系人。

*** 进修教师, 工作单位为武汉教育学院生物系。

位。蛋白质浓度测定采用考马斯亮蓝 G-250 染色法^[5]。酶分离纯化按以下步骤进行。

(1) 粗酶液的制备:取韭菜叶片 500 g 加 500 mL 缓冲液 A(50 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH7.8, 含 1 mmol/L EDTA, 0.4 mol/L 蔗糖, 0.01% 疏基乙醇)匀浆, 纱布过滤。滤液经 1300 r/min 离心 5 min 取上清液, 上清液再经 11000 r/min 离心 10 min 取上清液, 此即为细胞溶质粗酶液。

(2) 盐析条件摸索:取粗酶液 7 份, 每份 20 mL, 分别加硫酸铵至 20%、35%、50%、55%、60%、75%、90% 饱和度, 静置过夜, 经 13000 r/min 离心 30 min 取沉淀。沉淀用缓冲液 B(2.5 mmol/L 磷酸钠缓冲液, pH7.8, 含 0.01% 疏基乙醇)溶解后, 对缓冲液 B 透析。将透析液调整到相同体积, 分别测酶活力和蛋白浓度。以硫酸铵饱和度为横坐标, NBT 光还原抑制率和 A_{595} 值为纵坐标, 作盐析曲线。根据该曲线确定合适的盐析饱和度为 55%。

(3) 酶的纯化:粗酶液加硫酸铵至 55% 饱和度, 静置过夜, 经 13000 r/min 离心 30 min 弃上清液, 沉淀用缓冲液 B 溶解后对缓冲液 B 透析, 再浓缩至 10 mL 上 Sephadex G-200 柱(1.5 cm × 90 cm)。用缓冲液 B 洗脱, 流速 12 mL/h, 每管 4 mL 部分收集。经测活, 合并酶活力峰, 上 DEAE-Sephadex 柱(1.5 cm × 30 cm)。经缓冲液 B 淋洗至 A_{280} 值低于 0.02 后, 再用 pH7.8, 2.5~300 mmol/L 磷酸钠缓冲液(100 mL × 2)进行线性梯度洗脱。流速 12 mL/h, 每管 4 mL 部分收集。经测活, 合并酶活力峰, 存冰箱备用。

酶种类鉴定采用抑制剂敏感性实验。KCN 的终浓度分别为 0、0.5、1.0、1.5、2.0 mmol/L, H_2O_2 的终浓度分别为 0、0.5、1.0、2.5、5.0 mmol/L, 测定 SOD 在这些不同浓度的抑制剂存在下的活力。

聚丙烯酰胺凝胶电泳采用非解离系统不连续的聚丙烯酰胺凝胶垂直板状电泳。浓缩胶浓度为 3%, 分离胶浓度为 10%, 电极缓冲液为 pH8.3, Tris-甘氨酸缓冲液。蛋白染色用考马斯亮蓝 R-250, 酶活性染色参照文献[6]。

分子量测定采用 Sephadex G-200 凝胶过滤法^[7]。亚基分子量测定采用 SDS-PAGE 法^[8], 胶浓度为 10%。N-末端氨基酸测定采用 5-二甲氨基萘磺酰氯法(DNS 法)^[9]。热稳定性研究方法是将酶样品分别在 45 C、55 C、65 C、75 C、85 C 下保温 15、30、60、90、120 min 后测定酶活力。

2 结果与讨论

2.1 盐析曲线

结果如图 1, 根据图 1 选择 55% 的饱和度一次性沉淀。许多文献报道 SOD 的盐析为分级沉淀, 一般都是采用 50%~90% 硫酸铵饱和度的沉淀部分。而实际上这种分级沉淀并非对所有的材料都适用。文献[10]报道从乌梅果中制备 SOD, 分级沉淀后酶活力只回

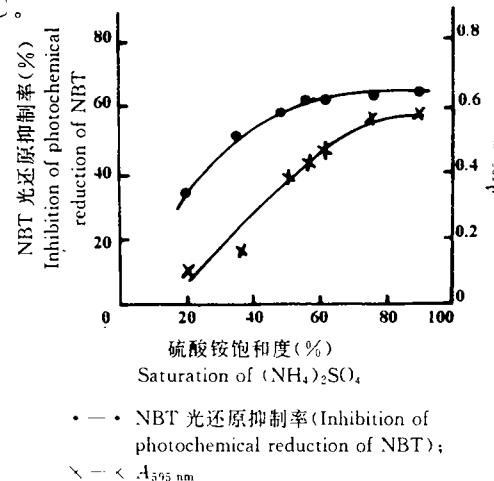


图 1 韭菜细胞溶质粗酶液的盐析曲线
Fig. 1 Ammonium sulfate fractionation curve of leek plasma crude extract

收到 15%。因此,作者做了韭菜细胞溶质粗酶液的盐析曲线,找出了最佳盐析饱和度。

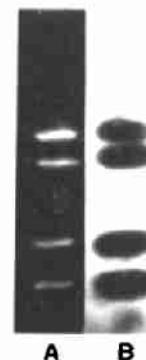
2.2 酶纯化结果

结果见表 1。从 500 g 叶片得到 2.4 mg 酶,酶活力达 13 000 U/mg 蛋白。酶样品经聚丙烯酰胺凝胶电泳后进行蛋白染色和活性染色,蛋白带和酶活性带一一对应(图 2),表明该酶已纯化到均一程度^[11]。

表 1 韭菜细胞溶质 SOD 纯化结果

Table 1 Purification of plasma SOD from leek

项目 Item	活力体积 Active volume (mL)	总活力 Total activity (U)	总蛋白 Total protein (mg)	比活力 Specific activity (U/mg)	纯化倍数 Purifica- tion fold
粗酶液 Crude extract	800	58 300	894.9	65.1	1
硫酸铵沉淀 Ammonium sulfate fractionation	87	43 500	42.8	1 016.4	15.6
Sephadex G-200凝胶过滤 Sephadex G-200 gel filtration	50	37 200	10.7	3 475.6	53.4
DEAE-Sephadex 柱层析 DEAE Sephadex chromatography	30	31 000	2.4	12 916.7	198.4



A. 活性染色;B. 蛋白染色

A. Stained for SOD activity;

B. Stained for protein

图 2 聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱
Fig. 2 Polyacrylamide gel electrophoretic patterns of purified SOD sample

2.3 酶种类鉴定结果

由于 Cu-Zn-SOD 对氰化物和 H₂O₂ 均敏感;Fe-SOD 对氰化物不敏感,而对 H₂O₂ 敏感;Mn-SOD 对氰化物和 H₂O₂ 均不敏感;因此可用这 2 种抑制剂实验将 3 种

SOD 区分开。从表 2 可见,该酶对 KCN 和 H₂O₂ 都很敏感,1 mmol/L KCN 可抑制其活力达 93%,5 mmol/L H₂O₂ 可抑制其活力达 91%,因此可判断该酶是 Cu-Zn-SOD^[12]。据文献报道,一般高等植物细胞溶质中的 SOD 均是 Cu-Zn-SOD。

2.4 吸收光谱

该酶紫外光区吸收峰在 260 nm(图 3:a),而在 280 nm。不同来源的 Cu-Zn-SOD 紫外光区吸收峰均在 260 nm 附近,这是因为它缺少色氨酸,酪氨酸的含量亦低。该酶可见光区吸收峰在 680 nm(图 3:b),这是由于它含有 Cu²⁺ 的缘故。

2.5 分子量和亚基分子量

凝胶过滤法测出该酶的分子量约为 30 900 D(图 4),SDS-PAGE 法测出该酶亚基分子量约为 15 900 D(图 5),表明该酶是由 2 个相同亚基组成。酶样品在 SDS-PAGE 中呈现 1 条带,这进一步表明酶已达到均一程度。不同来源的 Cu-Zn-SOD 分子量一般均在 32 000 D 左右,且由 2 个相同亚基组成^[12]。

表 2 韭菜细胞溶质 SOD 对抑制剂的敏感性

Table 2 Sensitivity of plasma SOD
from leek to inhibitor

KCN 浓度 Concen- tra- tion of KCN (mmol/L)	抑制活力 Inhibition of the activity (%)	H ₂ O ₂ 浓度 Concen- tra- tion of H ₂ O ₂ (mmol/L)	抑制活力 Inhibition of the activity (%)
0	0	0	0
0.5	73	0.5	47
1.0	93	1.0	65
1.5	97	2.5	83
2.0	100	5.0	91

2.6 N-末端氨基酸

测得该酶 N-末端氨基酸是丙氨酸。酶样品经聚酰胺薄膜单向和双向层析,均只出现 DNS-丙氨酸荧光斑点,未出现其它 DNS-氨基酸斑点,这也为该酶已纯化到某一程度提供了证据。小白菜细胞溶质和叶绿体 Cu·Zn-SOD 的 N-末端氨基酸亦是丙氨酸^[1,2],而线粒体 Mn-SOD 的 N-末端氨基酸是缬氨酸^[3]。

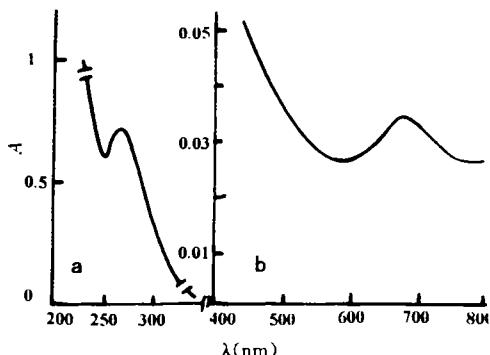
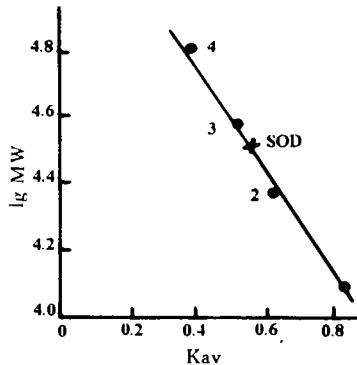


图 3 韭菜细胞溶质 SOD 的吸收光谱
Fig. 3 Absorption spectrum of plasma SOD from leek



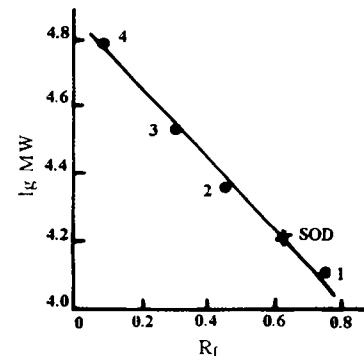
1. 细胞色素 C (12 500 D); 2. 胰蛋白酶 (23 300 D);
3. 胃蛋白酶 (35 000 D); 4. 牛血清白蛋白 (67 000 D)
1. Cytochrome C (12 500 D); 2. Trypsin (23 300 D);
3. Pepsin (35 000 D); 4. Bovin serum albumin (67 000 D)

图 4 凝胶过滤法测 SOD 分子量

Fig. 4 Molecular weight determination of plasma SOD from leek on Sephadex G-200

2.7 热稳定性

结果如图 6,可见该酶热稳定性强。例如,在 65℃下保温 1 h,只丧失 18% 的活力。Cu·Zn-SOD 一般热稳定性较强,而 Fe-SOD 和 Mn-SOD 热稳定性较差^[12]。



1. 细胞色素 C (12 500 D); 2. 胰蛋白酶 (23 300 D);
3. 胃蛋白酶 (35 000 D); 4. 牛血清白蛋白 (67 000 D)
1. Cytochrome C (12 500 D); 2. Trypsin (23 300 D);
3. Pepsin (35 000 D); 4. Bovin serum albumin (67 000 D)

图 5 SDS-PAGE 法测 SOD 亚基分子量

Fig. 5 Molecular weight determination of the subunit of plasma SOD from leek by SDS-PAGE

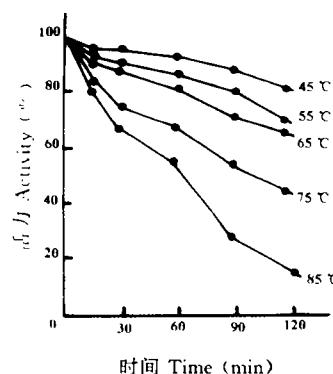


图 6 韭菜细胞溶质 SOD 的热稳定性
Fig. 6 Heat stability of plasma SOD from leek

参 考 文 献

- 1 邹国林,罗时文.一种小白菜叶细胞溶质铜锌超氧化物歧化酶的纯化和性质研究.生物化学杂志,1989,**5**(2):182~184
- 2 邹国林,罗时文,荣俊等.小白菜叶绿体铜锌超氧化物歧化酶的纯化和某些性质研究.生物化学与生物物理学报,1989,**21**(1):51~55
- 3 邹国林,罗时文,裘名宜等.小白菜线粒体锰超氧化物歧化酶的纯化和性质研究.生物化学与生物物理学报,1992,**24**(2):180~183
- 4 Stewart R C, Bewley J D. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiol.*, 1980, **65**:245~248
- 5 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, **72**:248~254
- 6 Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels. *Anal Biochem*, 1971, **44**:276~287
- 7 Andrews P. Estimation of the molecular weight of protein by Sephadex gel-filtration. *Biochem J*, 1964, **91**:222~233
- 8 赵永芳.生物化学技术原理及其应用.武汉:武汉大学出版社,1988. 343~346
- 9 赵永芳.生物化学技术原理及其应用.武汉:武汉大学出版社,1988. 65~69
- 10 张尔贤,陈杰,顾伟文等.乌梅果超氧化物歧化酶的纯化和部分性质研究.中国药学杂志,1991,**26**(7):404~406
- 11 邹国林.对SOD研究中若干问题的看法.中国生化药物杂志,1995,**16**(4):186~189
- 12 邹国林,裘名宜,朱彤.超氧化物歧化酶研究的历史、现状及应用前景.氨基酸杂志,1991,**13**(3):28~32

PURIFICATION AND PROPERTIES OF SUPEROXIDE DISMUTASE IN LEEK PLASMA

Zhai Yihua Zou Guolin Yang Xiong

(Department of Biochemistry and Biophysics, Wuhan University Wuhan 430072)

Abstract A superoxide dismutase from leek plasma has been purified to homogeneity by ammonium sulfate fractionation, Sephadex G-200 gel filtration and DEAE-Sephadex chromatography. 2.4 mg purified enzyme was obtained from 500 g leaves. The specific activity of the purified enzyme is 13 000 U/mg protein. The enzyme is copper/zinc superoxide dismutase as assayed by its sensitivity to inhibitors: KCN and H₂O₂. The molecular weight of the enzyme is about 30 900 daltons as assayed by Sephadex G-200 gel filtration, that of the enzyme subunit is about 15 900 daltons as tested by sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis. The N-terminal of the enzyme is alanine as tested by dansyl chloride. The enzyme exhibits one absorption maximum in the ultraviolet at 260 nm and another in the visible region at 680 nm. The result of experiments shows that the enzyme has good heat stability.

Key words Superoxide dismutase, Purification, Properties, Leek plasma