

烟叶超氧化物歧化酶的研究

穆虹 廖毅¹ 何平 徐凤彩

(华南农业大学农业生物系, 广州, 510642)

5572.01

摘要 从烟叶中提取的超氧化物歧化酶(SOD), 经 PAGE 垂直板电泳后, 用氮蓝四唑(NBT)法活性染色, 并经凝胶薄层扫描($\lambda = 595 \text{ nm}$), 结果显示粗酶液有 6 条同工酶谱带, 经纯化后的酶只有一条谱带。此纯酶液置冰箱 36 h 后, 可获得长方形结晶。结晶酶液用 Sephadex G-100 柱层析(1.5 cm × 100 cm)和 SDS-PAGE 测得其分子量分别为 24 830 和 28 900。用等电聚焦电泳测得该酶等电点为 6.80。该酶在 pH 5~9 范围内活性较稳定, 在 75 ℃ 保温 15 min 活性尚保留 54%。此酶对 KCN、氯仿-乙醇不敏感, 但受到 EDTA、 H_2O_2 的强烈抑制, 表明烟叶中分离纯化得到的 SOD 为酶分子中结合 Fe 的 Fe-SOD。

关键词 烟叶; 超氧化物歧化酶; Fe-SOD; 结晶

中图分类号 Q554.6

超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD, EC 1.15.1.1)是一种广泛存在于需氧生物体内的重要金属酶, 催化超氧化物阴离子自由基(O_2^-)或其质子化产物(HO_2^-)歧化为 H_2O_2 和 O_2 。SOD 在防御生物体免受超氧自由基的损伤, 在抗辐射、抗肿瘤、抗逆境及延缓机体衰老等方面起着重要作用。

烟草 SOD 的研究, 在国内未见研究报告, 在国外报告也不多(Furusawa et al, 1984; Montalbini et al, 1986; Bakardjieva et al, 1992)。我们从烟叶中分离出 SOD, 并获得结晶, 同时研究了其部分性质。烟叶 SOD 的研究, 对烟草的综合利用具有重要意义。

1 材料与方法

1.1 材料

烟草(*Nicotiana rustica*)成熟新鲜叶片。

1.2 方法

1.2.1 酶的提取与纯化 取新鲜成熟叶片 300 g, 加入 0.05 mol/L pH 7.5 磷酸钾缓冲液匀浆, 四层纱布过滤, 滤液中加固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至 25% 饱和度, 离心(9 000 r/min, 10 min, 室温), 收集上清液, 于上清液中再加入固体 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 至 75% 饱和度, 离心(同上), 收集沉淀, 沉淀溶于一定量上述缓冲液, 离心(同上), 弃去沉淀, 上清液对重蒸水透析, 透析液经 DEAE-纤维素离子交换柱层析(1.5 cm × 60 cm), 离子强度线性梯度洗脱, 收集酶活性峰洗脱液, 经超滤至原体积 1/3, 再 Sephadex G-100(1.5 cm × 60 cm), 收集酶活性峰洗脱液, 并超滤浓缩, 浓缩液(蛋白含量为 154 mg/L)置冰箱 36 h 后出现长方形结晶。

1.2.2 酶活力测定 按 Giannopolitis(1977) 和王爱国等(1983)方法, 利用 SOD 抑制氮蓝四唑(NBT)在荧光下的还原作用, 以抑制 NBT 光化还原 50% 的酶量为 1 个酶活力单位(U)。

1995-02-22 收稿

1.2.3 蛋白质含量测定 按 Bradford (1976) 方法, 并以牛血清白蛋白为标准蛋白。

1.2.4 同工酶凝胶电泳分离及其活性染色 按罗广华等(1983)方法。

1.2.5 酶蛋白等电点(PI)的测定 采用等电聚焦法(北京大学生化教研室编, 1979)。

1.2.6 酶分子量的测定 (1)Sephadex G-100 柱层析法。(2)SDS-PAGE 法。均以磷酸化酶 B (MW 94 000)、牛血清白蛋白 (MW 67 000)、肌动蛋白 (MW 43 000)、碳酸酐酶 (MW 30 000)、TMV 外壳蛋白 (MW 同 17 500) 为标准蛋白(上海申华公司产)。

2 实验结果

2.1 酶的纯化

提取液经 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 分部沉淀, 离子交换柱层析, 凝胶过滤等步骤, 酶被纯化了 26 倍, 比活力达 746, 活力回收达 16%, 酶的纯化结果如表 1。

表 1 烟叶 SOD 分离纯化结果(材料 300 g)

步 骤	总体积 /mL	总蛋白 /mg	总活力 /U	比活力	回收率 /%	纯化倍数
抽提液	890	4 490	130 830	29	100	—
25% ~ 75% $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ (透析液)	96	264	48 480	184	37	6.3
DEAE-纤维素	92	179	31 093	174	24	6
Sephadex G-100	70	28	20 888	746	16	26

此酶液浓缩至蛋白浓度为 154 mg/L 以上, 置冰箱 36 h 后出现长方形结晶(图 1)。



图 1 烟叶 SOD 结晶(100×)

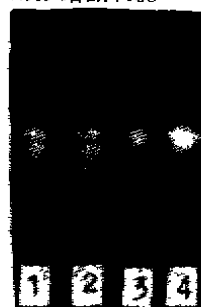


图 2 烟叶 SOD 凝胶电泳图谱

(1~2 烟叶粗提取液;

3~4 烟叶纯化酶液

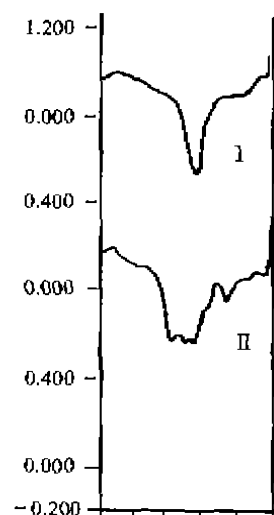


图 3 烟草 SOD 同工酶谱带薄层扫描图谱($\lambda=595 \text{ nm}$)

(I: 烟叶纯化酶液; II: 烟叶粗提取液)

2.2 酶纯度的检测

粗提酶液经 PAGE 垂直板电泳,并以 NBT 法活性染色,结果表明烟叶提取液中含 6 种 SOD 同工酶(图 2 中 1~2),纯化酶液中仅一条酶带(图 2 中 3~4),用凝胶薄层扫描($\lambda=595$ nm),结果(图 3)与上述一致。

2.3 酶分子量的测定

采用等电聚焦法测得酶蛋白的 PI 值为 6.80(图 4)。

2.4 酶分子量的测定

用 Sephadex G-100 柱层析法测得酶的分子量为 24 830(图 5);用 SDS-PAGE 法测得磷酸化酶 B 的迁移率(Rf)为 0.54,牛血清白蛋白的 Rf 为 0.607,肌动蛋白的 Rf 为 0.801,烟叶 SOD 的 Rf 为 0.77,上述标准蛋白的 Rf 对其分子量的对数作图,根据烟草 SOD 的 Rf 求得其分子量为 28 900。

2.5 抑制剂对 SOD 活性的影响

2.5.1 EDTA 对酶的抑制作用 EDTA 对酶活性有较明显的抑制作用,且抑制作用随 EDTA 浓度的增大而增强(表 2)。

2.5.2 H_2O_2 对酶活性的影响 H_2O_2 对酶活性的抑制作用较明显,1.5% H_2O_2 可抑制酶活性 83%(表 2)。

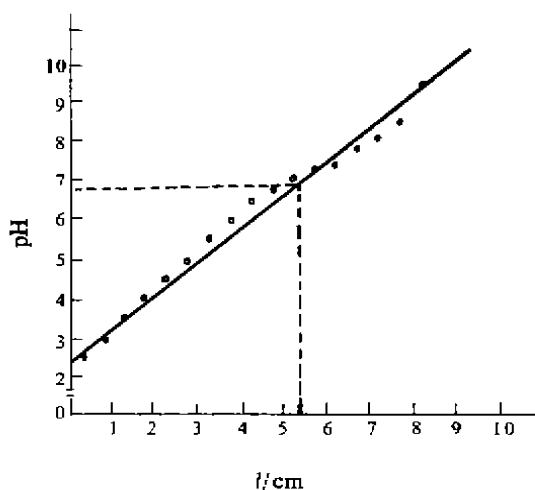


图 4 SOD 酶蛋白的 PI 值

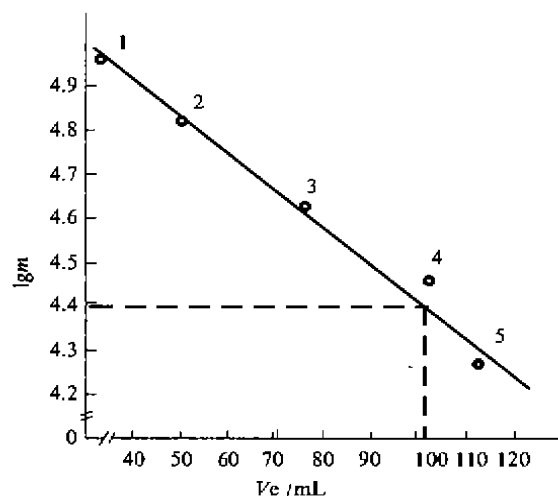


图 5 Sephadex G-100 测定 SOD 分子量

(1.磷酸化酶 B 94 000 2.牛血清白蛋白 6 7000 3.肌动蛋白 43 000 4.碳酸酐酶 30 000 5.TMV 外壳蛋白 17 500)

2.5.3 KCN、氯仿-乙醇对酶活性的影响 KCN、氯仿-乙醇对酶活性的影响不明显,0.2 mmol/L 的 KCN 仅抑制酶活性的 4%、氯仿-乙醇(2:3 v/v)对酶活性的抑制也仅 2%(表 2)。

2.6 酶的酸碱稳定性和热稳定性

2.6.1 温度对酶活性的影响 等量的酶液于不同温度下保温 15 min,流水冷却后测定酶活性,结果(表 3)表明酶随着温度上升活性下降,在 26~65℃ 范围内活性较稳定,75℃ 保温 15 min,仍可保留 54% 的活性。

表2 EDTA、H₂O₂、KCN和氯仿-乙醇对烟叶SOD酶活性的影响 (84 mg/L 蛋白)

抑制剂	浓度	酶活性/ U·L ⁻¹	抑制程度/%
EDTA	0.0/mmol·L ⁻¹	1.56 × 10 ⁵	0.0
	0.1	1.37 × 10 ⁵	12.0
	0.5	1.14 × 10 ⁵	27.0
	1.0	9.2 × 10 ⁴	41.0
	1.5	6.7 × 10 ⁴	57.0
H ₂ O ₂	0.0/%	1.41 × 10 ⁵	0.0
	7.5 × 10 ⁻⁴	1.40 × 10 ⁵	0.4
	1.5	2.4 × 10 ⁴	83.0
	3.0	2.1 × 10 ⁴	85.0
KCN	0.0/mmol·L ⁻¹	1.56 × 10 ⁵	0.0
	0.2	1.50 × 10 ⁵	4.0
Chloroform-ethanol	2:3 v/v	1.53 × 10 ⁵	2.0

表3 温度及pH对烟叶SOD活性的影响 (84 mg/L 蛋白)

温度 ℃	酶活性		pH	酶活性 U·L ⁻¹
	U·L ⁻¹	%		
CK	1.51 × 10 ⁵	100.0	4.0	4.37 × 10 ⁴
26	1.43 × 10 ⁵	95.0	5.0	1.23 × 10 ⁵
36	1.38 × 10 ⁵	91.6	6.0	1.43 × 10 ⁵
45	1.32 × 10 ⁵	87.7	7.0	1.31 × 10 ⁵
55	1.20 × 10 ⁵	79.6	7.5	1.14 × 10 ⁵
65	1.10 × 10 ⁵	72.6	8.0	1.09 × 10 ⁵
75	8.15 × 10 ⁴	54.0	9.0	9.37 × 10 ⁴
85	4.14 × 10 ⁴	27.4		

2.6.2 pH对酶活性的影响 将等量酶液于等量不同pH缓冲液(pH<6.0为0.05 mol/L磷酸钾缓冲液, pH≥7.0为0.05 mol/L Tris-HCl缓冲液)中室温放置4 h后,调pH至7.5测定酶活性,结果(表3)表明酶活性在pH5~9范围内较稳定,在pH4时活力较低,在pH6时活力最高。

3 讨论

超氧化物歧化酶(SOD)按其结合的金属辅基不同分为Cu、Zn-SOD、Mn-SOD和Fe-SOD 3种类型,其中Cu、Zn-SOD对KCN、H₂O₂敏感,对氯仿-乙醇不敏感,Mn-SOD对KCN、H₂O₂不敏感,对氯仿-乙醇敏感,Fe-SOD只对H₂O₂敏感。原核生物及大部分真核藻类只有Mn-SOD和Fe-SOD,无Cu、Zn-SOD存在。高等真核生物3种类型的SOD都有,Cu、Zn-SOD主要存在于细胞质中,在叶绿体中也有;Mn-SOD主要存在于线粒体中;Fe-SOD主要存在于叶绿体中(Weisinger et al, 1973; Bowler et al, 1992) SOD的类型、同工酶数目及每种酶的相对含量,不同的生物,不同的营养条件,不同的生长环境,其变化较大(Foster et al, 1980; Nelson et al, 1992; Scandalios, 1993; Tsang et al, 1991),即使同种类型的Fe-SOD,来自不同的生物体,其性质也不同(Duke et al, 1985; Kirby et al, 1981; Salin et al, 1980; Yost et al, 1973)。在植物体中,Cu、Zn-SOD, Mn-SOD的研究报告较多(王爱国等, 1983; 陈宗道等, 1989; 陈贵等, 1989; Burke et al, 1992; Sevilla et al, 1982), Fe-SOD的报告相对较少(Bakardjieva et al, 1992; Duke et al, 1985; Salin et al, 1980)。我们发现新鲜烟叶的粗酶液中含6种SOD同工酶,我们纯化得到了其中主要的一种(图2),该酶对KCN、氯仿-乙醇均不敏感,而受到H₂O₂的抑制作用明显(表2),抑制试验表明,从烟叶中纯化得到的SOD为Fe-SOD。Bakardjieva等(1992)在对烟草的绿色组织与黄化组织的比较中发现,绿色烟草组织SOD活性高,同工酶数目多,且主要是

Mn-SOD 和 Fe-SOD, Cu, Zn-SOD 的活性近乎零。我们纯化了新鲜烟叶 6 种同工酶中的一种, 并通过抑制试验证明其为 Fe-SOD, 至于该种酶在细胞中的定位, 及其余 5 种同工酶分属何种 SOD 的类型, 有待进一步研究。

在睡莲(Water lily)中分离得到的 Fe-SOD, 其分子量为 46 200 的二聚体, 其等电点为 4.8(Salin et al. 1980); 在银杏(*Ginkgo biloba*)中分离得到 Fe-SOD 的二种同工酶, 其分子量为 47 000 的乙聚体, 等电点分别为 5.25 和 5.15(Duke et al. 1985); 在甲烷杆菌(*Methanobacterium bryantii*)和大肠杆菌中分离得到的 Fe-SOD, 分别为分子量为 91 000 $\pm$ 2 000 的四聚体及分子量为 38 700 的二聚体(Kirby et al. 1981; Yost et al. 1973), 我们从烟叶中分离得到的 Fe-SOD, 用凝胶过滤和 SDS-PAGE 测得的分子量分别为 24 830 和 28 900(图 5), 可能为单亚基酶, 且测得其等电点为 6.8(图 4), 高于上述睡莲和银杏中 Fe-SOD 的等电点。

Cu, Zn-SOD 在 pH 5.5~10.0 范围内稳定, Mn-SOD 对 pH 敏感, pH > 7.0 稳定性降低(Frkdovich. 1975), 我们从烟叶中纯化得到的 Fe-SOD 在 pH 5.0~9.0 范围内活性较稳定(表 3)。陈宗道等(1989)报道茶叶中有 3 个 SOD 同工酶, 2 个为 Cu, Zn-SOD, 1 个为 Zn-SOD 并测得茶叶 SOD 的最适温度为 10℃ 时, 最适 pH 为 8.0。Burke 等(1992)报告豌豆细胞质、叶绿体中的 Cu, Zn-SOD 及线粒体中的 Mn-SOD, 在 10℃ 时活性最高, 在 10~45℃ 范围内 Cu, Zn-SOD 活性下降较快, Mn-SOD 活性下降平稳。我们分离得到的烟叶中的 Fe-SOD, 在 26~65℃ 范围内活性下降也较平稳, 至于其最适温度, 从实验结果来看, 应小于或等于 26℃。

关于 SOD 的研究报告较多, 可以看到不同的 SOD, 来源不同, 类型不同, 其性质也不同。同一类型的 SOD, 来源不同, 其性质也有较大差异。我们对烟草 SOD 的分离研究, 旨在为烟草的综合利用开辟一条新的途径, 对其部分性质的研究, 旨在为烟草 SOD 的生产和应用提供一定的理论依据。

参 考 文 献

- 北京大学生物系生化教研室. 1979. 生物化学实验指导, 北京: 高等教育出版社, 69
- 陈 贵, 胡文玉, 李晓萍. 1989. 芹菜叶片 SOD 谱带和活性测定. 辽宁农业科学, (3): 36~38
- 陈宗道, 宋 玮. 1989. 茶叶 SOD 的研究. 西南农业大学学报, 11(3): 302~306
- 王爱国, 罗广华, 邵从本, 等. 1983. 大豆种子超氧化物歧化酶的研究. 植物生理学报, 9(1): 77~84
- 罗广华, 王爱国. 1983. 植物 SOD 的凝胶电泳及活性显示. 植物生理学通讯, (6): 44~45
- Bakardjieva N, Hristov K. 1992. Comparative characterization of peroxidase and SOD secretion from green and chlorophyll-free tobacco callus tissues. Frziol Rast, 18(2): 23~30
- Bradford M. 1976. A rapid sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 72: 248
- Bowler C, Van Montagu M, Inze D. 1992. Superoxide dismutase and stress tolerance Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 43: 83~116
- Burke J J, Oliver M J. 1992. Different temperature sensitivity of pea SOD. Plant Physiol, 100(3): 1595~1603
- Duke M U, Salin M L. 1985. Purification and characterization of an iron-containing SOD from an eucaryote, *Ginkgo biloba*. Arch Biochem Biophys, 243: 305~314
- Foster J G, Edwards G E. 1980. Localization of SOD in leaves of C₃ and C₄ plants. Plant Cell Physiol, 21: 896~906

- Fridovich I. 1975. Superoxide dismutase. *Ann Rev Biochem*, 44: 147~155
- Furusawa I, Tanaka K, Thanutong P, et al. 1984. Paraquat resistant tobacco calluses with enhanced SOD activity. *Plant Cell Physiol*, 25: 1247~1254
- Giannopolitis C N, Ries S K. 1977. Superoxide dismutase I: Occurrence in higher plants. *Plant Physiol*, 59: 309~314
- Kitby T W, Lancaster J R, Fridovich I. 1981. Isolation and characterization of the iron-containing SOD of *Methanobacterium bryantii*. *Arch Biochem Biophys*, 210: 140~148
- Montalbini P, Buonauro R. 1986. Effect of tobacco mosaic virus infection on levels of soluble SOD in *Nicotiana tabacum* and *Nicotiana glutinosa* leaves. *Plant Sci*, 47: 135~139
- Nelson S K, Huang C J, Mathias M M, Allen K G D. 1992. Copper-marginal and copper-deficient diets decrease aortic lipid prostacyclin production and copper-dependent SOD activity, and increase aortic lipid peroxidation. *J Nutr*, 122(11): 2101~2109
- Salin M L, Bridges S M. 1980. Isolation and characterization of an iron-containing SOD from water lily, *Nuphar luteum*. *Plant Physiol*, 69: 161~165
- Scandalios J G. 1993. Oxygen stress and SOD. *Plant Physiol*, 101(1): 7~12
- Sevilla F, Julio L G, Luis A Del R. 1982. Characterization of a manganese SOD from the higher plant *Pisum sativum* L. *Plant Physiol*, 70(5): 1321~1326
- Tsang E W T, Bowler C, Herouant D et al. 1991. Differential expression of SOD in plant exposed to environmental stress. *Plant Cell*, 3: 783~792
- Weisinger R A, Fridovich I. 1973. Superoxide dismutase: Organelle specificity. *J Biol Chem*, 248: 3582~3592
- Yost F J, Fridovich I. 1973. An iron-containing SOD from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, 248: 4905~4913

STUDIES ON CHARACTERISTICS OF SOD FROM TOBACCO LEAVES

Mu Hong Liao Yi He Ping Xu Fengcai
(Dept. of Agr. Biology, South China Agr. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract

Polyacrylamide gel electrophoresis of crude superoxide dismutase(SOD) extracts and purified SOD from tobacco leaves were performed. Six bands were found in the crude SOD extracts, and one of them corresponded to that for the purified sample. Rectangular crystals were yielded after the solution of purified SOD was stored in 4℃ refrigerator for 36 hours. The molecular weight of the purified SOD was 24 830 and 28 900 as measured by gel chromatography column and SDS-PAGE respectively. The isoelectric point of the purified SOD was 6.8 measured by ampholine electrophoresis. The purified SOD was stable at pH 5.0~9.0. Fifty-four percent of its activity remained after the purified SOD was kept at 74℃ for 15 minutes. The purified SOD was insensitive to KCN and chloroform-ethanol treatments, but it was strongly inhibited by EDTA and H₂O₂. The results indicated that the purified SOD from tobacco leaves was a Fe-SOD.

Key words tobacco; superoxide dismutase; Fe-SOD