

豌豆种子超氧化物歧化酶的纯化及性质

郭振飞 卢少云 李明启
(华南农业大学农业生物系, 广州, 510642)

摘要 从豌豆种子提纯了超氧化物歧化酶(SOD), 纯酶比活性为 $7\,844 \times 10^3 \text{ U/g}$ 。该酶受 KCN 和 H_2O_2 的强烈抑制, 不受乙醇-氯仿混合液影响, 说明为 Cu、Zn-SOD。酶分子量和亚基分子量分别为 32 100 和 14 400, 表明该酶是由两个相同亚基组成。该酶在 70℃ 以下和 pH5.0~11.0 范围内较稳定, 紫外区最大吸收波长为 259 nm。

关键词 豌豆; 超氧化物歧化酶
中图分类号 Q 554

超氧化物歧化酶(SOD, EC1.15.1.1)广泛存在于需氧生物体内, 能清除超氧自由基对机体的伤害。近年医学研究表明, 许多疾病的发病机理与 SOD 水平密切相关(方允中等, 1989), 因此对 SOD 的应用研究也取得了较大进展(袁勤生, 1994)。已从动物、植物和微生物等多种生物体内分离了 SOD。SOD 的纯化、性质和结构研究在动物中研究较深入, 在植物中多侧重于生物功能, 尤其是与抗逆性的关系研究。豆科植物的 SOD 含量较高, 已从大豆(王爱国等, 1983)、菜豆叶片(Kono 等, 1979)和饭豆(程光宇等, 1994)等豆科植物中提纯了 Cu、Zn-SOD。Sawada 等(1972)、Giannopolitis 等(1977b)先后进行过提纯豌豆种子 SOD 的研究, 但未纯化到均一。本文报告豌豆种子 SOD 的提纯及性质。

1 材料与方法

1.1 材料

豌豆(*Pisum sativum*)种子经 HgCl_2 表面消毒后于室温浸泡 24 h, 用于提取 SOD。

1.2 方法

1.2.1 SOD 活性测定 参照 Giannopolitis 等(1977a)方法进行, 以抑制 NBT 光化学还原 50% 的酶量为 1 个活性单位*。

1.2.2 蛋白质含量测定 参照 Bradford (1976)方法进行, 以牛血清白蛋白为标准蛋白质。

1.2.3 分子量和亚基分子量测定 全酶分子量采用凝胶过滤法测定, 亚基分子量采用不连续系统 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳法, 分离胶浓度为 7.5%。

1.2.4 紫外吸收光谱 用 Beckman DU-7 型分光光度计测定 220~300 nm 的吸收。

2 结果与讨论

2.1 酶的纯化

称取充分吸胀的豌豆种子 1 000 g, 加入 2 倍体积的 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH7.8), 于

1995-09-07 收稿

*用该方法测定的酶活性单位是一个相对单位, 难以用 mol/s 表示。

组织捣碎机上捣碎。匀浆液经尼龙布过滤,滤液于 15 000 r/min 低温(4℃)离心 20 min,上清液即为粗酶液,向粗酶液加入 0.25 倍体积乙醇和 0.15 倍体积氯仿混合液(−20℃),搅拌 10 min,同前离心,弃沉淀。上清液加入 K₂HPO₄(20 g/L)离心,弃沉淀,向上清液加入丙酮(−20℃),收集 0.5~1.5 倍体积丙酮的蛋白沉淀,用 10 m mol/L 磷酸钾缓冲液(pH7.8)溶解,离心,除去不溶性杂质。上清液对 10 m mol/L 磷酸钾缓冲液(pH7.8)透析过夜,上 DEAE-纤维素柱(3.0 cm×33 cm),以含 0.0~0.6 mol/L KCl 的 10 m mol/L 磷酸钾缓冲液(pH7.8)进行离子强度线性梯度洗脱,出现 5 个蛋白峰,只有第 3 个峰呈 SOD 活性,收集该活性峰,共 174 mL,经 PEG 浓缩至 20 mL 后对 10 m mol/L 磷酸钾缓冲液(pH7.8)透析过夜,上 DEAE-Sephrose 柱(3 cm×10 cm),按与上述相同方法进行洗脱,出现 2 个蛋白峰,第 2 个峰呈酶活性,收集活性高的部分,共 30 mL,浓缩至 3 mL,上 Sepharose 6B 柱(3.0 cm×50.0cm),以 10 m mol/L 磷酸钾缓冲液(pH7.8)洗脱,收集酶活性峰(图 1),共 35.5 mL。该酶液比活性为 7 844×10³U/g。经过以上几个步骤,酶被纯化了 1 868 倍,回收率 32%(表 1)。

表 1 豌豆 SOD 的纯化

纯化步骤	总蛋白/mg	总活性/U	比活性	产率/%
粗酶液	45 036.0	189 453	4.2	100
乙醇-氯仿处理	3 538.5	166 718	47.1	88
丙酮沉淀	500.6	109 056	217.9	57.6
DEAE-纤维素层析	75.7	75 360	995.5	39.8
DEAE-Sephrose 层析	12.2	59 492	4 876	31.4
Sephrose 6B	7.81	61 259	7 844	32.3

2.2 酶纯度鉴定

将纯化的酶液以 PEG 浓缩至 1 g/L,经聚丙烯酰胺凝胶圆盘电泳后染色,出现一条蛋白带(图 2)。说明该酶已纯化到电泳均一。

2.3 对抑制剂敏感性

根据对金属的依赖性不同,可将 SOD 同工酶分成三种类型:Cu, Zn-SOD、Mn-SOD 和 Fe-SOD。Cu, Zn-SOD 受 KCN 和 H₂O₂ 的抑制,但不受乙醇-氯仿混合液影响;Mn-SOD 则与之相反。而 Fe-SOD 受 H₂O₂ 抑制,不受 KCN 和乙醇-氯仿影响,可根据这种特性区分 SOD 同工酶类型(王爱国等,1983)。纯化的豌豆 SOD 活性分别受 1% H₂O₂ 和 3 mmol/L KCN

抑制 74% 和 90%,在提纯过程中不受乙醇-氯仿混合液的影响,说明本文提纯的酶属 Cu, Zn-SOD。我们曾观察到 0.1% H₂O₂ 抑制蚕豆 SOD 活性 91%(另文发表),但仅抑制豌豆

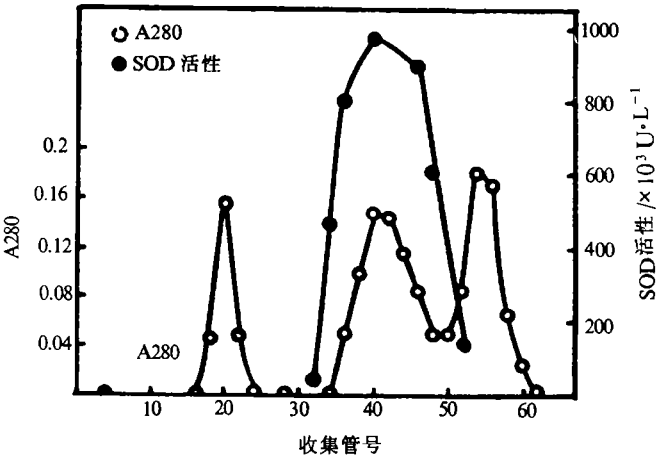
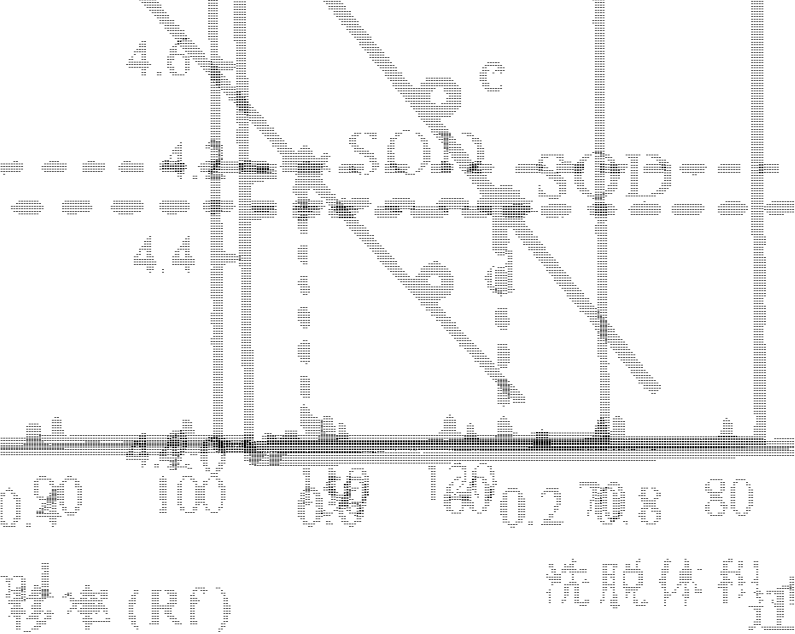


图 1 豌豆 SOD 的 Sepharose 6B 柱层析洗脱图



2.5 酶稳定性

将纯酶在不同温度的水浴中保温 10 min, 然后于冰浴中冷却, 测定酶活性。结果表明, 豌豆 SOD 在 70 ℃ 条件下较稳定, 80 ℃ 尚能保持近 50% 活性(图 5)。据报告, 动物血液的 Cu, Zn-SOD 对热很稳定, 一般在 75 ℃ 以下不失活(王亦根等, 1994; 袁勤生, 1989); 植物组织的 SOD 热稳定性则表现出一定差异。大豆种子 Cu, Zn-SOD 对热较稳定, 60 ℃ 时不失活(王爱国等, 1983)、饭豆种子 Cu, Zn-SOD 在 75 ℃ 以下稳定(程光宇等, 1994), 而枸杞果实的 Cu, Zn-SOD 在 60 ℃ 时几乎完全失活(程光宇等, 1991)。

吸取 0.1 mL 的纯酶, 加入 3.9 mL 不同 pH 缓冲液(柠檬酸-硼酸-巴比妥- K_2HPO_4 -NaOH, pH3.0~11.0) 24 h 后测定酶活性。结果表明, 酶在 pH 7.0~11.0 范围活性较稳定(图 6)。Cu, Zn-SOD 在酸性条件下的失活被认为是由于其辅基 Zn 的脱落引起的(袁勤生, 1989)。

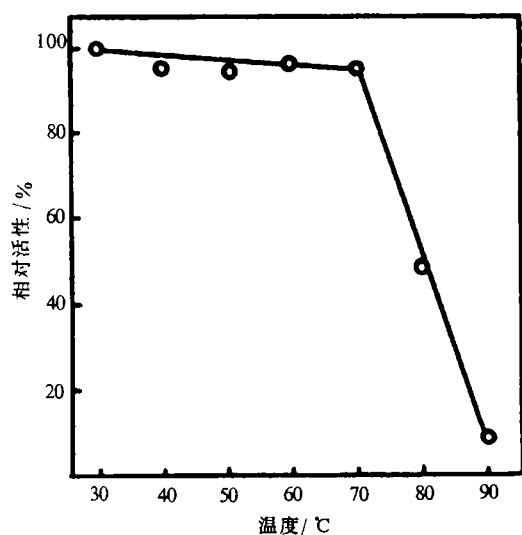


图 5 温度对豌豆 SOD 活性的影响

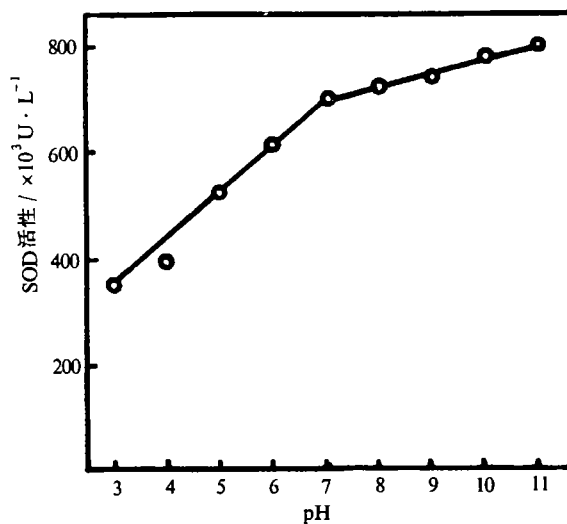


图 6 pH 对豌豆 SOD 活性的影响

2.6 紫外吸收光谱

豌豆 SOD 在紫外光区的吸收峰为 259 nm。这与其它动物、植物来源为 Cu, Zn-SOD 的紫外吸收峰均在 260 nm 附近(王亦根等, 1994; 王转花等, 1994; 邹国林等, 1989; 袁勤生, 1989; 程光宇等, 1991; 1994)是一致的。一般认为这是由于 Cu, Zn-SOD 分子中酪氨酸和色氨酸残基含量低, 使得吸收峰低于 280 nm。

参考文献

- 方允中, 李文杰. 1989. 自由基与酶. 北京: 科学出版社. 193 ~ 231
- 王亦根, 程光宇, 吴国荣, 等. 1994. 牛血红细胞铜锌超氧化物歧化酶的纯化及性质. 南京师大学报(自然科学版), 17(2): 108 ~ 112
- 王转花, 张政, 林汝法, 等. 1994. 苦荞叶片超氧化物歧化酶的纯化及性质研究. 生物化学杂志, 10(5): 539 ~ 543

- 王爱国, 罗广华, 邵从本. 1983. 大豆种子超氧化物歧化酶的研究. 植物生理学报, 9(1): 77 ~ 83
- 邹国林, 罗时文, 荣俊, 等. 1989. 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, 21(1): 51 ~ 57
- 袁勤生. 1989. 超氧化物歧化酶的研究进展. 中国药理学杂志, 24: 387 ~ 391
- 袁勤生. 1994. SOD在医药、食品和日化工业上的应用. 中国生化药物杂志, 15(4): 289 ~ 293
- 程光宇, 魏锦城, 邹玉珍, 等. 1991. 枸杞果实铜、锌超氧化物歧化酶的纯化及其性质的研究. 南京师大学报(自然科学版), 14(2): 82 ~ 92
- 程光宇, 呈国荣, 魏锦城, 等. 1994. 饭豆铜锌超氧化物歧化酶的纯化及性质. 南京师大学报(自然科学版), 17(2): 121 ~ 126
- Baum J A, Scandalios J G. 1981. Isolation and characterization of the cytosolic and mitochondrial superoxide dismutase of maize. Arch Biochem Biophys, 206(2): 249 ~ 253
- Baum J A, Chandlee J M, Scandalios J G. 1983. Purification and partial characterization of a genetically-defined superoxide dismutase (SOD-1) associated with maize chloroplasts. Plant Physiol, 73(1): 31 ~ 35
- Bradford M M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 72: 248 ~ 254
- Giannopolitis C N, Ries S K. 1977a. Superoxide dismutase: I. Occurrence in higher plants. Plant Physiol, 59(2): 309 ~ 314
- Giannopolitis C N, Ries S K. 1977d. Superoxide dismutase: II. Purification and quantitative relationship with water-soluble protein in seedlings. Plant Physiol, 59(2): 315 ~ 318
- Kono Y, Takahashi M, Asada K. 1979. Superoxide dismutase from kidney bean leaves. Plant Cell Physiol, 20(7): 1229 ~ 1235
- Sawada Y, Ohyama T, Yamazaki I. 1972. Preparation and physicochemical properties of green pea superoxide dismutase. Biochim Biophys Acta, 268: 305 ~ 312

PURIFICATION AND CHARACTERIZATION OF SUPEROXIDE DISMUTASE FROM PEA SEEDS

Guo Zhenfei Lu Shaoyun Li Mingqi

(Dept. of Agr. Biology, South China Agr. Univ., Guangzhou, 510642)

Abstract

Copper and zinc-containing superoxide dismutase was purified from pea seeds to homogeneity by the steps of crude extract, chloroform-ethanol treatment, acetone precipitation, and chromatography with DEAE-cellulose, DEAE-Sephadex and Sephadex 6B columns. The homogenous enzyme had a specific activity of 7 844 U/mg protein, and exhibited maximum ultraviolet absorption at 259 nm. Its activity was strongly inhibited by KCN and H₂O₂. Its molecular weight and subunit molecular weight were 32 100 and 14 400 respectively, which indicated that the enzyme was composed of two identical subunits. The purified enzyme was stable to heat below 70 °C and at pH 5 ~ 11.

Key words pea; superoxide dismutase