

韭菜线粒体锰超氧化物歧化酶 纯化及性质研究*

杨 雄** 翟颐华 邹国林

(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、DEAE-Sephacel 层析和 Sephadex G-200 凝胶过滤, 将韭菜线粒体 SOD 纯化到均一程度。从 6 000 g 韭菜叶片线粒体中纯化得到 2.5 mg 酶, 酶比活力达 1 200 U/mg 蛋白。该酶对 KCN 和 H_2O_2 都不敏感, 热稳定性弱, 紫外光区吸收峰在 280 nm, 凝胶过滤法测得其分子量为 82 000 D, SDS-PAGE 法测得其亚基分子量为 22 000 D, DNS 法测得其 N-末端氨基酸为缬氨酸。上述结果表明该酶是由 4 个相同亚基组成的 Mn-SOD。

关键词 锰超氧化物歧化酶, 纯化, 性质, 韭菜线粒体

超氧化物歧化酶(SOD)催化 $2\text{O}_2^- + 2\text{H}^+ \longrightarrow \text{H}_2\text{O}_2 + \text{O}_2$ 反应, 在体内清除 O_2^- 中起重要作用。线粒体 SOD 的研究, 以及对其与胞质 SOD 和叶绿体 SOD 进行比较研究, 对解释线粒体自身防护氧自由基的损伤及线粒体的起源等均有重要意义。

国内外尚未见韭菜 SOD 的研究报道。作者对韭菜胞质 SOD 和叶绿体 SOD 进行过研究^(1,2)。现报道对韭菜线粒体 SOD 的研究结果。

1 材料与方法

1.1 材料和试剂

材料为韭菜(*Allium porrum*)品种——青格子。Sephadex G-200 (Pharmacia 产品)、DEAE-Sephacel (Whatman 产品)、标准蛋白质、标准氨基酸均为层析纯, 其它试剂均为国产分析纯或生化试剂。

1.2 方法

(1) 蛋白质浓度测定: 采用考马斯亮蓝 G-250 染色法⁽³⁾。

(2) 酶活力测定: 采用氯化硝基氮蓝四唑光还原法(NBT 法)⁽⁴⁾, 以抑制 NBT 光还原

收稿日: 1997-07-22, 修回日: 1997-11-21。第一作者: 男, 35 岁, 讲师, 从事生物化学教学与科研工作。

* 湖北省科委重点科技项目。

** 武汉教育学院工作, 在武汉大学酶学实验室进修。

率达50%的酶量定义为1个酶单位。

(3) 分离线粒体:韭菜叶片6000 g加5000 mL缓冲液A (pH7.8, 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液, 含1 mmol/L EDTA, 0.4 mol/L 蔗糖, 0.01% 巯基乙醇) 匀浆, 纱布过滤。滤液经1300 r/min 离心10 min, 取上清液, 上清液经3500 r/min 离心15 min 除去叶绿体, 再经11000 r/min 离心30 min 得到线粒体。线粒体用缓冲液A洗2遍, 洗净的线粒体加100 mL 缓冲液B (pH7.8, 2.5 mmol/L 磷酸钠缓冲液, 含0.01% 巯基乙醇) 置冰箱保存。

(4) 制备粗酶液:线粒体经冻融处理后用研钵研磨, 再经超声波处理, 最后经过13000 r/min 离心40 min 取上清液, 此即为粗酶液。

(5) 确定盐析条件:取相同体积的粗酶液5份, 分别加硫酸铵至饱和度为35%、50%、55%、60%、80%, 静置8 h 后经13000 r/min 离心30 min 取沉淀。沉淀溶解于缓冲液B, 并对缓冲液B透析过夜。将透析后的溶液调整到相同体积, 分别测酶活力和蛋白质浓度。分别以 $A_{595\text{ nm}}$ 值和 NBT 光还原抑制率为纵坐标, 硫酸铵饱和度为横坐标绘制盐析曲线, 确定盐析的硫酸铵饱和度为55%。

(6) 酶的纯化:粗酶液经饱和度为55%的硫酸铵盐析, 取沉淀并经缓冲液B溶解和透析后上 DEAE-Sephacel 柱(1.5 cm×30 cm)。用缓冲液B淋洗至 $A_{280\text{ nm}}$ 为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18 mL/h, 每管6 mL 部分收集。经活力测定合并酶活力峰, 并浓缩至5 mL 后上 Sephadex G-200 柱(1.5 cm×90 cm), 流速4 mL/L, 每管4 mL 部分收集。经活力测定合并酶活力峰, 置冰箱保存。

(7) 聚丙烯酰胺凝胶电泳:采用不连续垂直板状电泳^[5]。电泳后胶板从中间切开, 分别进行蛋白染色和酶活性染色^[6]。

(8) 抑制剂敏感性实验:用 KCN 和 H_2O_2 为抑制剂, 测定酶对这两种抑制剂的敏感性。

(9) 热稳定性研究:酶样品分别在10℃、20℃、25℃、40℃、50℃保温, 30 min、60 min、90 min、120 min 后测定酶活力。

(10) 分子量和亚基分子量测定:分别采用 Sephadex G-200 凝胶过滤法^[7] 和 SDS-PAGE 法^[5] 测定。

(11) N-末端氨基酸测定:采用 DNS 法^[5]。

2 结果与讨论

2.1 盐析曲线

结果见图1, 根据图1 选择55%饱和度硫酸铵一次性盐析。

2.2 酶纯化结果

结果见表1。从6000 g 叶片的线粒体中纯化得到2.5 mg 酶。酶样品电泳后进行蛋白染色和酶活性染色, 蛋白带与酶活性带相对应(图2), 表明酶已纯化到均一程度。

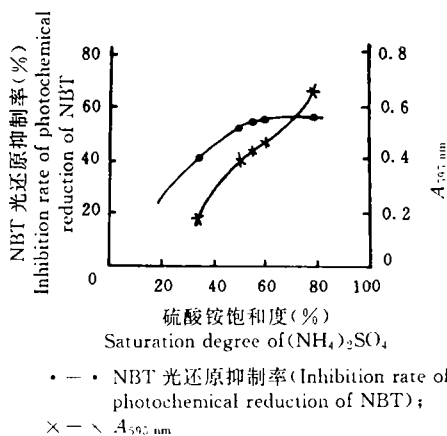


图1 韭菜线粒体粗酶液硫酸铵分级盐析曲线
Fig. 1 Ammonium sulfate fraction curve of leek mitochondria crude extract

2.3 酶理化性质及种类鉴定

2.3.1 对抑制剂的敏感性

一般说, $\text{Cu} \cdot$

Zn-SOD 对氰化物
和 H_2O_2 均敏感;
 Mn-SOD 对这两种
抑制剂都不敏感;
而 Fe-SOD 对氰化
物不敏感, 但对
 H_2O_2 敏感。因此可

根据对这两种抑制剂的敏感程度来鉴定酶种类。由韭菜线粒体 SOD 对 KCN 和 H_2O_2 均不敏感(表 2), 可知它是 Mn-SOD 。

表 2 韭菜线粒体 SOD 对 KCN 和 H_2O_2 的敏感性

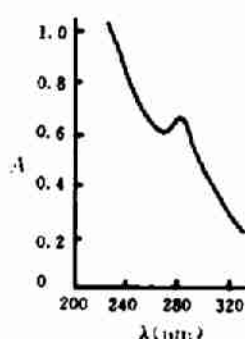
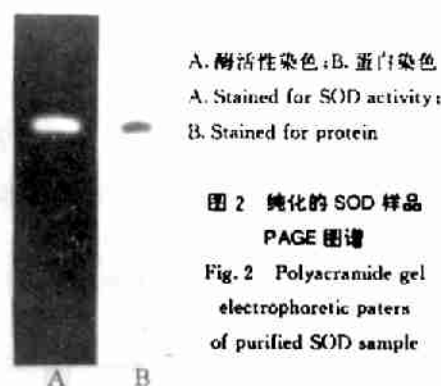
Table 2 Sensitivity of mitochondria SOD
from leek to KCN and H_2O_2

KCN 浓度 Concentration of KCN (mmol/L)	抑制活力 Inhibition of activity (%)	H_2O_2 浓度 Concentration of H_2O_2 (mmol/L)	抑制活力 Inhibition of activity (%)
0	0	0	0
0.5	2.0	0.5	4.0
1.0	3.4	1.0	5.2
1.5	5.0	2.5	5.5
2.0	5.1	5.0	6.0

2.3.2 吸收光谱

该酶在紫外光区的最大
吸收峰在 280 nm(图 3)。

一般 $\text{Cu} \cdot \text{Zn-SOD}$ 由于不含色
氨酸且酪氨酸含量亦少, 其
紫外吸收峰一般在 260 nm
附近^[8,9], 而 Mn-SOD 和 Fe-SOD 紫外吸收峰均在 280 nm
附近^[10]。



2.3.3 热稳定性

结果如图 4, 可见该酶对温度较敏感。例如在 50℃ 保温 1 h, 其活力丧失 92%。一般 $\text{Cu} \cdot \text{Zn-SOD}$ 热稳定性良好。例如韭菜细胞溶质和叶绿体的 $\text{Cu} \cdot \text{Zn-SOD}$ 在 55℃ 下保温 1 h, 活力仅丧失 13% 和 16%^[11,12]。

2.3.4 分子量和亚基分子量

凝胶过滤法测得该酶分子量为 82 000 D。SDS-PAGE 法测其亚基分子量为 22 000 D (图 5)。表明该酶由 4 个相同亚基组成。一般 Cu·Zn-SOD 由 2 个相同亚基组成^[1,2,8,9]而线粒体 Mn-SOD 由 4 个相同亚基组成^[10]。

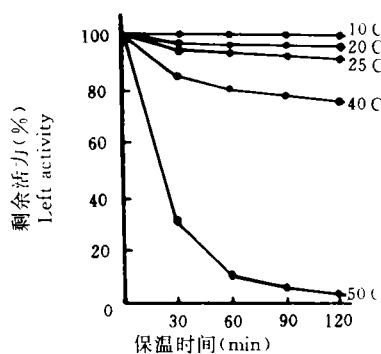
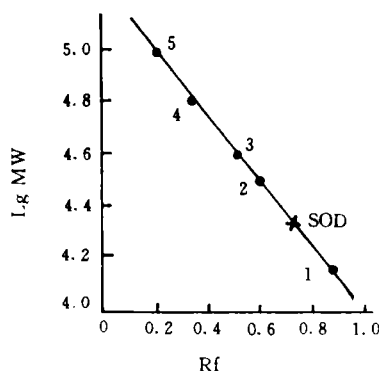


图 4 韭菜线粒体 SOD 的热稳定性

Fig. 4 Heat stability of
mitochondria
SOD from leek



1. 溶菌酶 Lysozyme (14 400 D); 2. 碳酸酐酶 Carbonic anhydrase (31 000 D); 3. 卵清蛋白 Ovalbumin (42 700 D); 4. 牛血清蛋白 Bovine serum albumin (6 6200 D); 5. 磷酸化酶 b Phosphorylase b (97 400 D)

图 5 SDS-PAGE 法测韭菜线粒体 SOD 的亚基分子量
Fig. 5 Molecular weight determination of the subunit
of mitochondria SOD from leek by SDS-PAGE

2.3.5 N-末端氨基酸

DNS 法测得酶 N-末端氨基酸为缬氨酸。它与小白菜线粒体 Mn-SOD 的 N-末端氨基酸相同^[10]。实验中,聚酰胺薄膜层析只出现 DNS-Val 荧光斑点,未出现其它 DNS-氨基酸荧光斑点。这也为该酶已达均一程度提供了旁证。

参 考 文 献

- 1 翟颐华,邹国林,杨雄. 韭菜胞质铜锌超氧化物歧化酶的纯化及性质研究. 武汉植物学研究, 1998, 16(1): 18~22
- 2 翟颐华. 韭菜的三种 SOD 研究及 SOD 电泳多带现象初步探讨. [武汉大学硕士学位论文]. 武汉: 武汉大学, 1997.
- 3 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
- 4 Stewart R C, Bewley J D. Lipid peroxidation associated with accelerated aging of soybean axes. *Plant Physiol*, 1980, 65: 245~248
- 5 赵永芳. 生物化学技术原理及其应用 (第 2 版). 武汉: 武汉大学出版社, 1991. 68~76, 287~321, 324~327
- 6 Beauchamp C, Fridouich 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*, 1961, 91: 222~233
- 8 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
- 9 邹国林, 罗时文. 一种小白菜叶细胞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

- 10 邹国林, 罗时文, 袁名宜等. 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

PURIFICATION AND PROPERTIES OF MANGANESE SUPEROXIDE DISMUTASE IN LEEK MITOCHONDRIA

Yang Xiong Zhai Yihua Zou Guolin

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

Abstract A superoxide dismutase from leek mitochondria has been purified to homogeneity by ammonium sulfate fraction, DEAE-Sephacel chromatography and Sephadex G-200 gel filtration. 2.5 mg purified enzyme was obtained from 6 000 g leaves. The specific activity of the purified enzyme is 1 200 U/mg protein. The enzyme is not sensitive to inhibitors; KCN and H_2O_2 . It has good heat stability. The largest amount of ultraviolet absorption is at 280 nm. The molecular weight of the enzyme is about 82 000 D as assayed by Sephadex G-200 gel filtration, that of the enzyme subunit is about 22 000 D as tested by SDS-polyacrylamide gel electrophoresis. The N-terminal amino acid of the enzyme is valine as tested by DNS-Cl. These results show the enzyme is a manganese superoxide.

Key words Manganese superoxide dismutase, Purification, Properties, Leek mitochondria