

大蒜细胞溶质中超氧化物歧化酶的性质研究

谢岩黎¹ 李元瑞¹ 张广彬² 谷瑞芳² 魏国祥²

1(西北农林科技大学食品科学与工程学院 杨凌 712100)

2(河南职业技术师范学院食品科学与工程系 新乡 453003)

摘 要 利用热变性、等电点沉淀和 DEAE-纤维素柱层析分离纯化大蒜细胞溶质中的超氧化物歧化酶,并对其性质进行了研究。结果表明,温度 40~60℃、pH4~9 范围内酶的活性稳定,对 KCN 和 H₂O₂ 敏感,紫外光区的吸收峰在 258 nm,可见光区的吸收峰在 680 nm,表明酶的类型为 Cu·Zn-SOD。

关键词 大蒜细胞溶质 超氧化物歧化酶 性质

1969 年 McCord 和 Fridovich 从牛血红细胞中发现了 1 种专一清除超氧阴离子(O₂⁻)的关键酶,并命名为超氧化物歧化酶(superoxide dismutase, SOD, E. C. 1.15.1.1)^[1]。此后,关于 SOD 的性质、结构及纯化的研究及应用开发日益深入,同时也促进了自由基生物学的发展。

大蒜为百合科葱属植物蒜(*Allium sativum*)的鳞茎,具有保护心血管系统,抗肿瘤,保护肝脏,调节血糖水平,提高免疫功能,清除自由基,抗炎等功能,还含丰富的 SOD。而 SOD 具有清除 O₂⁻,有效地预防 O₂⁻ 对机体的毒害作用,从而具有抗衰老、抗炎、抗肿瘤及抗辐射等功能,在保健品、医药和化妆品中具有重要的应用价值^[2]。

90 年代以后, SOD 的研究深入发展,其性质和分离纯化进入了新的阶段。可以预测,在未来发展中,除了临床应用研究, SOD 在保健品、化妆品中的应用将成为趋势。

1 材料、药品、设备和分离纯化方法

1.1 材料和主要试剂

大蒜(市售)、联苯三酚(遵义化工厂生产)、磷酸钾缓冲液(分析纯)、巯基乙醇(化学纯)、DEAE-纤维素(Whatman 产品)。

1.2 主要设备

UV-1100 紫外-可见分光光度计(北京瑞利分析仪器公司紫外生化部)、高速冷冻离心机(Du Pont RC-5C)、恒温水浴(江苏国华仪器厂)、酸度计、多功能加工机。

1.3 酶活力测定方法

改良的联苯三酚自氧化法。酶活性单位采用 1 mL 反应液中,每分钟抑制联苯三酚自氧化速度达 50% 时的酶定量为 1 个活力单位^[3]。

1.4 大蒜细胞溶质中 SOD 的分离和纯化

1.4.1 粗酶液的制备

取 500 g 大蒜鳞茎加 750 mL pH7.8 50 mmol 磷酸钾缓冲液(含 1 mmol EDTA, 0.01% 巯基乙醇)匀浆,浸提 1 h,纱布过滤。滤液经 12 000 r/min 离心 20 min,上清液即为大蒜细胞溶质 SOD 粗酶液。

1.4.2 热变性除杂蛋白

将粗酶液在 45~85℃ 进行热变性除杂蛋白,同时以酶活力和上清液蛋白质的总量作为评价指标。

1.4.3 等电点沉淀除杂蛋白

热变性除杂蛋白后,酶液用磷酸缓冲液调整 pH,在室温下测酶活力。同时以酶活力和上清液中蛋白质的总量作为评价指标。研究发现,大部分蛋白质在 pH3~4 之间沉淀,而 SOD 活性良好。因此用磷酸调整 pH 至

第一作者:硕士研究生,讲师。

收稿时间:2002-04-20

3.5 后,12 000 r/min 离心 20 min 可除去大部分杂蛋白。

1.4.4 用离子交换进行纯化

将上清液 pH 值调整 7.8 后过 DEAE-纤维素离子交换柱,用 2.5 ~ 250 mmol/L pH7.8 磷酸钾缓冲液梯度洗脱,收集活性部分^[4]。

1.4.5 酶的类型鉴定

采用 KCN 和 H_2O_2 敏感性试验^[5]。

1.4.6 吸收光谱测定

利用紫外-可见分光光度计扫描在 200 ~ 800 nm 波长段的吸收光谱。^[6]

2 结果与讨论

2.1 SOD 对温度的稳定性

将粗酶液于不同温度保温后,在室温下测酶活力,结果见图 1。SOD 是 1 种热稳定性很好的酶,60 °C,30 min 活性仅下降 19.1%,而大部分杂蛋白的变性温度是 55 °C,但 70 °C 以后,随保温时间的延长,SOD 的活性损失较大。

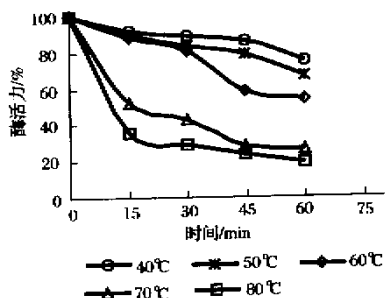


图 1 温度对大蒜细胞溶质 SOD 酶活力的影响

2.2 SOD 对 pH 的稳定性

用磷酸缓冲液调整 pH 值,在室温下测酶活力,结果见图 2。可知在 pH4 ~ 9 范围内,SOD 的酶活力较好,显示 1 个较宽的峰,且 pH6 ~ 8 之间,其活力最大。而大部分杂蛋白的等电点在 pH3 ~ 4 之间,而此时上清液中 SOD 的活力很好。因此,可以通过等电点的差异把杂蛋白与 SOD 分离。

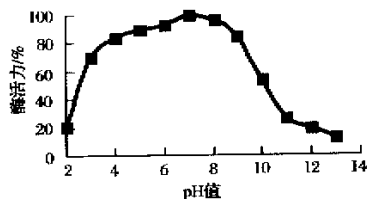


图 2 pH 对酶活力的影响

2.3 酶的类型鉴定

将经 DEAE-纤维素离子交换柱分离纯化后的酶液进行酶的类型鉴定。由于 $Cu \cdot Zn$ -SOD 对氰化物和 H_2O_2 均敏感; Fe -SOD 对氰化物不敏感,而对 H_2O_2 敏感; Mn -SOD 对氰化物和 H_2O_2 均不敏感,因此可用这 2 种抑制剂鉴定大蒜细胞溶质中 SOD 的类型。从表 1 可知,1.5 mmol/L KCN 可抑制其活性的 93%,4 mmol/L H_2O_2 可抑制其活性的 89%,因此可判断该酶类型是 $Cu \cdot Zn$ -SOD。

表 1 大蒜细胞溶质中 SOD 对抑制剂的敏感性

KCN 浓度 /mmol·L ⁻¹	抑制活力 /%	H_2O_2 浓度 /mmol·L ⁻¹	抑制活力 /%
0	0	0	0
0.5	65	1	59
1.0	87	2	76
1.5	93	4	89
2.0	100	8	100

2.4 紫外-可见光吸收光谱

将经 DEAE-纤维素离子交换柱分离纯化后的酶进行紫外-可见光吸收光谱测定,结果见图 3、图 4。该酶紫外光区吸收峰是 258 nm,这是因为它缺乏色氨酸,酪氨酸的含量亦低。可见光区的吸收峰在 680 nm 附近,这是因为它含有 Cu^{2+} 的原因。

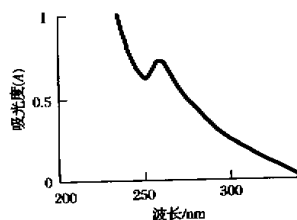


图 3 大蒜细胞溶质 SOD 在紫外光区的吸收光谱

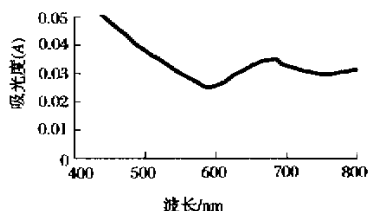


图4 大蒜细胞溶质 SOD 在可见光区的吸收光谱

3 结 论

通过对大蒜细胞溶质中 SOD 的研究,得知 SOD 是 1 种热稳定较好的酶,60℃,30 min 酶活力损失较小,70℃,15 min 以后,随加热时间的延长,其活性损失较大;SOD 的酸碱稳定性亦好,在 pH4.0~9.0 之间酶活

力变化不大,且 pH6~8 之间,其活性最大;酶对 KCN 和 H₂O₂ 敏感,紫外光区吸收峰是 258 nm,可见光区的吸收峰在 680 nm,证明其酶的类型是 Cu·Zn-SOD 型。

参 考 文 献

- 1 McCord J M, Fridovich I. J. Biol. Chem., 1969, 244: 6049~6055
- 2 梁毅,汪寸信,屈松生等.湖北化工,1995(3): 20~22
- 3 邓碧玉,袁勤生,李文杰.生物化学与生物物理学进展,1991,18(2):163
- 4 马安德,李毓琦,何俊等.第一军医大学学报,1994,14(1):48~50
- 5 翟颐华,邹国林,杨熊.武汉植物学研究,1998,16(1):18~22
- 6 孙庆林,常梅秀,周书勤等.内蒙古农牧学院学报,1998,19(4):34~36

Study on the Properties of Superoxide Dismutase from *Allium sativum* Plasma

Xie Yanli¹ Li Yuanrui¹ Zhang Guangbin²
Gu Ruifang² Wei Guoxiang²

¹ College of Food Science and Engineering, Northwest Sci.-tech. University of Agriculture and Forestry, Yanglin, 712100)

² Department of Food Science and Engineering, Henan Vocational and Technical Teachers' College, Xinxiang, 453003)

ABSTRACT A superoxide dismutase from *Allium sativum* plasma has been isolated and purified by the heat treatment, sedimentation with isoelectric point and chromatograph on DEAE-cellulose, and its property was studied. The study shows that the enzymatic activity is stable within the temperature 40~60℃ and pH 4~9, and the enzyme is sensitive to KCN and H₂O₂, the absorption apex exhibits at 258 nm in ultraviolet spectrum and at 680 nm in visible spectra, the facts indicate that the enzyme is copper/zinc SOD.

Key words *Allium sativum* plasma, superoxide dismutase, property

首个富硒食品标签标准在湖北出台

日前,从有关部门获悉,由湖北恩施硒开发研究所历时2年时间编制完成的富硒食品标签标准,新近在富硒食品标签标准评审会上通过了专家鉴定。据悉这是我国出台的第1个富硒食品标签标准。

在有“世界硒都”美誉的恩施召开的这次评审会上,中国预防医学科学院、中国农业科学研究院、国家质检总局等单位的11名专家对该标准进行了严格评审。这一标准确定了富硒食品的定义,规定了多种富硒食品的最低硒含量指标,为质检部门认定富硒食品提供了科学依据。

2001年,恩施市绿色富硒食品产业实现营销收入达8亿元,开发富硒食品潜力巨大。新标准出台后,将有助于进一步推动富硒食品的健康发展。