

## 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\*

邹国林 罗时文\*\*

(武汉大学生物系)

超氧化物歧化酶(SOD)是生物体内重要的金属酶。有关植物SOD同工酶的研究文献报道较多,但对酶的纯化及性质研究报道较少。本文简要报道一种小白菜叶细胞溶质Cu·Zn-SOD的纯化及其性质。

材料为小白菜(*Brassica chinensis* L.),品种上海青。酶活力测定用本室改良的邻苯三酚自氧化法<sup>[1]</sup>。蛋白质测定按文献[2]进行。酶纯化方法参照文献[3]。酶活性染色参照文献[4]。分子量测定用Sephadex G-200凝胶过滤法,亚基分子量测定用SDS-PAGE法。N-末端氨基酸分析用DNS法。氨基酸组成用日立835-50型氨基酸自动分析仪分析。色氨酸测定用DAB法。

### 一、酶的纯化

纯化结果见Table 1。因粗酶液含多酚氧化酶等,对邻苯三酚自氧化法测活有严重干扰,所以只测了粗酶液中蛋白量。从1900克叶片得5.7毫克纯酶。纯化的SOD经聚丙烯酰胺凝胶电泳后进行蛋白染色和活性染色,均呈现为一条带且位置对应(Fig.1),说明纯化酶已达电泳纯。

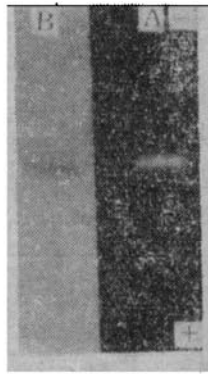
Table 1. Purification of a cytosolic Cu·Zn-SOD from Chinese cabbage leaves.

Step	Volume (ml)	Total protein (mg)	Total activity (U)	Specific activity (U/mg)
Crude extract	1760	2220		
55-90% (NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	78	158.0	17333	109.7
Sephadex G-75	39	57.7	9250	160.3
DEAE-cellulose	40	5.7	3390	594.7

\* 本文在《全国首届SOD学术会议》(宁波,1988年1月)上宣读。

\*\* 江西省宜春医专生化教研室进修教师。

1987年9月28日收到初稿,1988年5月30日收到修改稿。



**Fig.1.** Disc gel electrophoretic patterns of purified SOD sample.  
A. Stained for SOD activity.  
B. Stained for protein.



**Fig.2.** Zymogram of Chinese cabbage leaf SOD. Obtained by polyacrylamide gel disc electrophoresis and staining for SOD activity.  
A. Crude extract.  
B. Purified enzyme.

## 二、酶的鉴定

1. 酶类型鉴定: Cu·Zn-SOD 对氰化物很敏感, Mn 或 Fe-SOD 对氰化物不敏感, 可用氰化物将它们区分开。1mmol/L KCN 抑制所纯化的酶活力达 89.8%, 该酶在紫外与可见光区有 Cu·Zn-SOD 特征吸收光谱, 其分子量也与 Cu·Zn-SOD 分子量相吻合。这些结果表明所纯化的酶是 Cu·Zn-SOD。

2. 同工酶鉴定: 另制小白菜叶全细胞抽提液, 此抽提液与纯化的 SOD 的 PAGE 图谱见 Fig.2。抽提液呈 5 条 SOD 活性带。纯化的 SOD 呈 1 条活性带, 此带与抽提液第 3 条带对应。10mmol/L 的 KCN 完全抑制 Fig.2 A 第 2 至第 5 条活性带和 B 活性带, 说明这些是 Cu·Zn-SOD。Fig.2 A 第 1 条带对 KCN 和 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 都不敏感, 表明是 Mn-SOD。

## 三、酶的性质

1. 特征吸收光谱: 该酶紫外光区吸收峰在 254nm, 而不在 280nm。不同来源的 Cu·Zn-SOD 紫外区吸收峰均在 260nm 附近, 而 Mn 或 Fe-SOD 吸收峰均在 280nm 左右。该酶可见光区吸收峰在 680nm, 而 Mn 或 Fe-SOD 无此特征峰。

2. 亚基分子量与分子量: 该酶在 SDS-PAGE 中呈现一条带, 其亚基分子量 15900 道尔顿, 测量 3 次, 相对误差 ±3%。凝胶过滤法测其分子量 31600 道尔顿。不同来源的 Cu·Zn-SOD 亚基分子量均在 16000 道尔顿左右, 其分子由两个相同亚基组成。Mn 或 Fe-SOD 亚基分子量均在 20000 左右。

3. 等电聚焦分析: 该酶等电聚焦电泳中呈现 3 条酶蛋白带, 其 pH 值分别为 5.13, 5.53 和 6.18。文献报道纯化的小鸡肝、牛视网膜和牛红细胞 Cu·Zn-SOD 等电聚焦电泳均呈现为多条带<sup>[5, 6]</sup>。

4. N-末端氨基酸: 测得该酶 N-末端氨基酸是丙氨酸。样品经聚酰胺薄膜单向或双向层析, 只出现 DNS-丙氨酸荧光斑点, 未出现其它 DNS-氨基酸斑点, 表明酶已纯化到均一

程度。

5. 氨基酸组成: 测定该酶不含色氨酸。分析该酶亚基由151个氨基酸残基组成 (Table 2)。

Table 2. Amino acid composition of a cytosolic Chinese cabbage leaf Cu·Zn-SOD.

	Amino Acid Content* (moles/mole subunit)	Residues per mole of subunit (nearest integer)		Amino Acid Content (moles/mole subunit)	Residues per mole of subunit (nearest integer)
P-Ser	0.9	1	Ile	6.9	7
Asp	11.3	11	Leu	12.8	13
Thr	7.3	7	Tyr	2.7	3
Ser	12.3	12	Phe	7.2	7
Glu	14.5	15	Lys	14.2	14
Gly	17.2	17	1-Me His	2.9	3
Ala	13.5	14	Arg	5.0	5
Val	9.5	10	Pro	8.8	9
Cys	1.5	2	Trp	0	0
Met	1.4	1	Total		151

\* All calculations based on subunit molecular weight of 15900.

### 参 考 文 献

- [1] 邹国林等 (1986), 《生物化学与生物物理进展》, (4), 71—73.
- [2] Bradford, M.M. (1976), *Anal. Biochem.*, 72, 248—254.
- [3] 邹国林等 (1989), 《生物化学与生物物理学报》, 21(1), 57—63.
- [4] Beauchamp, C. and Fridovich, I. (1971), *Anal. Biochem.*, 44, 276—287.
- [5] Weisiger, R.A. and Fridovich, I. (1973), *J. Biol. Chem.*, 248, 3582—3592.
- [6] Bensinger, R.E. et al. (1982), *Exp. Eye Res.*, 34, 623—634.

## Purification and Properties of A Cytosolic Cu · Zn-SOD from Chinese Cabbage (*Brassica chinensis* L.) Leaves

Zou, Guo-lin      Luo, Shi-wen

(Department of Biology, Wuhan University)