

南瓜种子超氧化物歧化酶某些性质的研究

区炳庆, 何丽烂, 任吉君

(佛山科学技术学院, 广东南海 528231)

摘要: 采用 NBT 光化还原法, 分别研究了不同缓冲溶液、pH 值、温度及抑制剂等因素对南瓜种子 SOD 活性的影响, 并对其类型进行了鉴定, 结果表明: 南瓜种子萌芽过程中 SOD 的合成以 Mn-SOD 为主, 其热稳定性很高, 在酸性条件下活性完全丧失, 在 pH8.0 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 缓冲溶液下酶活性最高; 酶活性容易被 β -巯基乙醇抑制, 对脲及 DMSO 有一定的耐受性。

关键词: 南瓜; 超氧化物歧化酶

中图分类号: Q946.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2004)05-0463-03

Study on some properties of superoxide dismutase of pumpkin seeds

OU Bing-qing, HE Li-lan, REN Ji-jun

(Foshan University, Nanhai 528231, China)

Abstract: The activities of superoxide dismutase (SOD) of *Cucurbita* sp. seeds were studied with the method of the photochemical reduction of nitro blue tetrazolium (NBT) in different cushioning liquer, pH, temperature and inhibitor. The form of SOD were also studied. The results showed that: Mn-SOD was composed mainly in the seed process and the heat stability was very high. The activity was the highest in pH8.0 of cushioning liquer of $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ and losed completely in acid condition. The activity was inhibited easily by β -mercaptoethanol and able to bear urea and DMSO in a certain extent.

Key words: Pumpkin; Superoxide dismutase(SOD)

超氧化物歧化酶(EC 1.15.1.1 简称 SOD)能催化超氧阴离子自由基($\cdot\text{O}_2^-$)的歧化作用而成为 O_2 和 H_2O_2 。McCord 和 Fridovich(1969 年)发现酶活性以来, 已证明它在生物体中普遍存在, 并作为一种防御活性氧或其它超氧自由基对细胞质膜伤害的酶来研究。一直以来, 人们对大豆种子(王爱国等, 1983; 罗广华等, 1984)、花生种子(罗广华等, 1984)、豌豆种子(Giannopolitis *et al.*, 1977)、小麦籽粒(Beauchamp 等, 1973)及玉米(任大明等, 2001)中的 SOD 研究较多。有关南瓜种子中 SOD 的研究尚未见报导, 本文对南瓜种子 SOD 的一些基本性质进行了探讨, 为进一步研究 SOD 在南瓜生长

发育过程中的变化及分离纯化、开发南瓜 SOD 保健食品提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

南瓜(*Cucurbita* sp.)种子(哈本南瓜)购自广州市蔬菜种子分公司。

1.2 培育

种子经表面消毒后, 用蒸馏水浸泡 8 h, 于 25 °C 下萌芽 3 d。

1.3 酶液制备

取萌芽后的种子去种皮, 称取 0.50 g, 加入少量

收稿日期: 2003-08-07 修订日期: 2003-12-24

作者简介: 区炳庆(1966-), 男, 广东云浮市人, 讲师, 主要从事生物化学的教学与研究工作。

预冷的蒸馏水,冰浴中研磨匀浆,最后定容为 5 mL,匀浆于 4 °C、10 000 rpm 离心 15 min,吸取上清液作酶液,-20 °C 冰箱保存备用。

1.4 酶活性测定

SOD 活性测定参照王爱国等(1983),酶量为 50 μ L,酶活性单位采用抑制 NBT 光化还原 50% 为一个酶活性单位表示。

2 结果与分析

2.1 不同缓冲系统对南瓜 SOD 活性的影响

本实验分别试验了不同缓冲系统对南瓜种子 SOD 活性的影响,结果见表 1。由表 1 可知,缓冲溶液(1)至(7)均可用于南瓜种子 SOD 活性的测定,但(1)至(5)效果较好,说明南瓜种子 SOD 的构象在这些缓冲溶液中较稳定,能保持较高的活性,其中以缓冲溶液 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$ 最好,而在缓冲溶液(8)和(9)中 SOD 活性为 0, SOD 结构完全受到破坏。

表 1 不同缓冲系统对南瓜种子 SOD 活性的影响

Table Effects of cushioning system on SOD activities in *Cucurbita* sp. seeds

缓冲液类型 (0.1 mol/L)	SOD 活性 (U)	对 NBT 光 化还原 抑制 (%)
(1) pH8.0 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-NaH}_2\text{PO}_4$	933.0 \pm 38.0	93.3
(2) pH8.0 $\text{KH}_2\text{PO}_4\text{-NaOH}$	760.9 \pm 33.3	76.5
(3) pH8.2 Tris-HCl	622.5 \pm 30.5	62.3
(4) pH8.0 $\text{Na}_2\text{HPO}_4\text{-柠檬酸}$	478.3 \pm 28.2	47.8
(5) pH8.2 甘氨酸-NaOH	686.56 \pm 34.5	68.7
(6) pH8.2 巴比妥酸-HCl	260.4 \pm 20.7	26.0
(7) pH8.2 硼砂-硼酸	181.8 \pm 15.8	18.2
(8) pH8.0 氯化铵-NH ₃	0.0 \pm 0.0	0.0
(9) pH8.0 邻苯二甲酸氢钾-NaOH	0.0 \pm 0.0	0.0

注:活性值表示为平均值士标准差,重复三次,下表同。

Note: Average \pm MS express activity and repeat three. Next table same.

2.2 pH 值对南瓜 SOD 活性的影响

pH 值对南瓜种子 SOD 活性的影响见图 1。由图 1 可知,pH 值为 1.0~7.0 时,SOD 活性为 0,不能抑制 NBT 光化还原反应,说明南瓜种子 SOD 在酸性条件下酶分子结构受到破坏而失去活性;碱性缓冲溶液中,南瓜种子 SOD 活性随着 pH 值升高酶活性升高,当 pH8.0 时 SOD 活性最高,之后,SOD 活性反而下降。因此,由试验可知,南瓜种子 SOD 构象在酸性条件下极不稳定,在弱碱条件下能保持较好的空间结构,其中以 pH8.0 时酶活性最高。因此,在提纯和测定南瓜种子 SOD 活性时必须控制体系中的 pH 值。

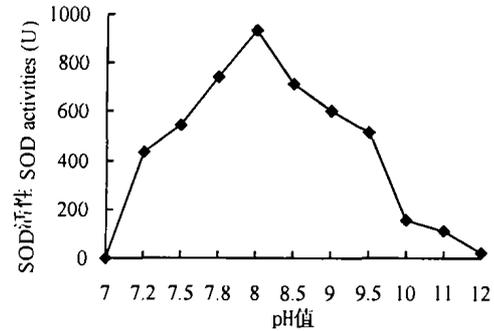


图 1 pH 值对南瓜种子 SOD 活性的影响

Fig. 1 Effects of pH on SOD activities in *Cucurbita* sp. seeds

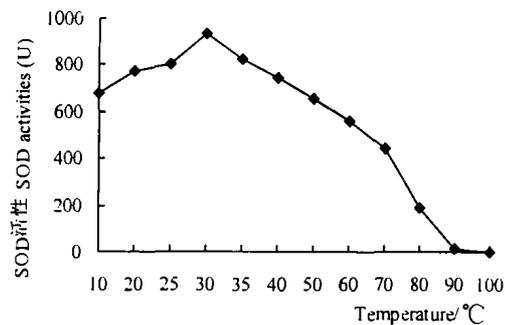


图 2 温度对南瓜种子 SOD 活性的影响

Fig. 2 Effects of temperature on SOD activities in *Cucurbita* sp. seeds

2.3 南瓜种子 SOD 活性的热稳定性

将酶粗提液于不同温度水浴下保温 10 min 后测定酶活性。由图 2 可知,南瓜种子 SOD 活性随着温度的升高而升高,当温度为 30 °C 时,SOD 活性达到最大值,随后,酶活性呈下降趋势,于 70 °C 条件下尚保持 47% 的活性,80 °C 时迅速下降,但还保持 20% 的活性,于 90 °C 保温 10 min 时才明显失活,说明南瓜种子 SOD 对热是较稳定的,与大豆 Cu, Zn-SOD 于 70 °C (王爱国等,1983)、枸杞 Cu, Zn-SOD 于 60 °C (程光宇等,1991)、韭菜 Mn-SOD 于 50 °C (杨雄等,1998) 几乎完全失活相比,南瓜种子 SOD 的耐热性要强得多,这为提取纯化南瓜 SOD 提供了更广阔的温度范围。

2.4 变性剂对南瓜 SOD 活性的抑制作用

人们常借助变性剂来研究酶的结构。本试验用 0.5 mL 的 1% β -巯基乙醇、8 mol/L 脲和 40% 二甲亚砜(DMSO)与酶液于 30 °C 下保温 10 min 或 24 h 来观察南瓜种子 SOD 的稳定性, β -巯基乙醇主要破坏蛋白质中的次级键,脲和 DMSO 主要使酶蛋白肽链伸展并显露内部的疏水键。由表 2 可知, β -巯基乙醇使其催化活性完全丧失,这说明南瓜种子

SOD 中的二硫键极容易受到还原剂的破坏;脲对南瓜 SOD 也有明显的抑制作用,保温 10 min 时,酶活性被抑制 47.0%,而保温 24 h 时酶活性才完全丧失;40% DMSO 对南瓜 SOD 的抑制率为 5.6%。

表 2 变性剂、抑制剂对南瓜种子 SOD 活性的影响

Table 2 Effects of denaturants and inhibitors on SOD activities in *Cucurbita* sp. seeds

变性剂、抑制剂	SOD 活性 (U)	抑制率 (%)
粗提液(对照)	783.0±34.5	0.0
1%β-巯基乙醇,保温 10 min	0.0±0.0	100.0
8 mol/L 脲,保温 10 min	415.0±25.8	47.0
8 mol/L 脲,保温 24 h	0.0±0.0	100.0
40% DMSO,保温 10 min	739.0±31.5	5.6
1 mmol/L H ₂ O ₂ ,保温 10 min	762.5±36.2	2.6
5 mmol/L H ₂ O ₂ ,保温 10 min	746.0±30.7	4.7
氯仿-乙醇(2:3 v/v),保温 10 min	32.3±4.3	95.9
1 mmol/L H ₂ O ₂ : 氯仿-乙醇(1:2:3 v/v),保温 10 min	0.0±0.0	100.0

2.5 南瓜 SOD 的类型

生物体内的 SOD 有 3 类(Fridovich, 1975): 包括 Cu, Zn-SOD、Mn-SOD 和 Fe-SOD, 其中, Cu, Zn-SOD 对 H₂O₂ 敏感, 当 H₂O₂ 浓度在 5 mmol/L H₂O₂ 以上时活性完全丧失; Fe-SOD 对 H₂O₂ 和氯仿-乙醇敏感, 而 Mn-SOD 则为氯仿-乙醇所抑制。由表 2 可知, 南瓜种子 SOD 在 1 mmol/L H₂O₂ 下活性为 762.5 U, 抑制率为 2.6%, 在 5 mmol/L H₂O₂ 下活性为 746.0 U, 抑制率为 4.7%, 而只有 Mn-SOD 不受 5 mmol/L H₂O₂ 的抑制, 即 Mn-SOD 活性为 746.0 U; 在氯仿-乙醇(2:3 v/v)下测得的 SOD 活性为 32.3 U, 即抑制率为 95.9%, 即 Cu, Zn-SOD 活性为 32.3 U, 而在 5 mmol/L H₂O₂: 氯仿-乙醇(1:2:3 v/v)下抑制率为 100.0%。因此南瓜种子萌芽时所合成的 SOD 以 Mn-SOD 为主, 其次为 Cu, Zn-SOD, 而无 Fe-SOD。

3 小 结

本试验采用 NBT 光化还原法, 分别研究了不同缓冲溶液、pH 值、温度及抑制剂等因素对南瓜种子 SOD 的影响, 并对其类型进行了鉴定, 结果表明:

(1) 在测定南瓜种子 SOD 时, 宜采用缓冲溶液(1)~(5), 其中缓冲溶液 Na₂HPO₄-NaH₂PO₄ 效果最好, 能使 SOD 保持较高的活性, 而氯化铵-NH₃ 及邻苯二甲酸氢钾-NaOH 缓冲溶液不能用于南瓜种子 SOD 活性的测定; 同时, 南瓜种子 SOD 在酸性

条件下酶结构极不稳定, 容易受到破坏, 活性完全丧失, 而在弱碱性条件下能保持较高的活性, 以 pH8.0 时活性最高。因此, 在提纯和测定南瓜种子 SOD 活性时必须严格选择好缓冲体系。

(2) 南瓜种子在 25 °C 萌芽 3 d, 在此过程中南瓜种子主要合成了 Mn-SOD, 其次合成了少量的 Cu, Zn-SOD。

(3) 南瓜种子 SOD 活性随着温度的升高而升高, 在 30 °C 后活性呈下降趋势, 80 °C 下保温 10 min 还具有 18.9% 的活性, 90 °C 后才明显失活, 这说明南瓜种子 Mn-SOD 有较强的耐热性; 同时, 南瓜种子 Mn-SOD 结构容易受还原剂 β-巯基乙醇的破坏, 活性丧失, 而对脲和 DMSO 有一定的耐受性。

(4) 南瓜种子在萌芽中大量合成了 Mn-SOD, 且具有较强的耐热性等特点, 在对其分离纯化时, 先经过热处理(60~80 °C)以除去遇热变性的杂蛋白, 可简化分离步骤、缩短时间及提高酶的收率, 这对于利用南瓜种子分离纯化及开发利用 Mn-SOD 有重要的理论及实际意义。

参考文献:

- 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[J]. *Acta Phytophysiological Sinica* (植物生理学报), 9(1): 77-84.
- 任大明, 迟乃玉, 刘少霞. 2001. 玉米超氧化物歧化酶的同工酶研究[J]. *Journal of maize Science* (玉米科学), 9(1): 78-79.
- 罗广华, 邵从本, 王爱国等. 1984. 大豆和花生种子超氧化物歧化酶的同工酶研究[J]. *Acta Phytophysiological Sinica* (植物生理学报), 10(2): 175-179.
- Beauchamp CO, Fridovich I. 1973. Isozymes of superoxide dismutase from wheat germ and *Biochim*[J]. *Biophys Acta*, 317: 50-64.
- Fridovich I. 1975. Superoxide dismutase[J]. *Ann Rev Biochem*, 44: 147-155.
- Cheng GY(程光宇), Wei JC(魏锦城), Zou YZ(邹玉珍), et al. 1991. Purification and properties of copper/zinc superoxide dismutase in lycium chinense fruit(枸杞果实铜锌超氧化物歧化酶的纯化及其性质的研究)[J]. *Journal of Nanjing Normal University (Natural Science)* (南京师范大学学报自然科学版), 20(2): 128-136.
- Giannopolitis CN, Ries SK. 1977. Superoxide dismutase I. Occurrence in higher plants[J]. *Plant Physiol*, 59: 309-314.
- Giannopolitis CN, Ries SK. 1977. Superoxide dismutase II. Occurrence in higher plants[J]. *Plant Physiol*, 59: 315-318.
- Yang X(杨 雄), Zhai YH(翟颐华), Zou GL(邹国林). 1998. Purification and properties of manganese superoxide dismutase in leek mitochondria(韭菜线粒体锰超氧化物歧化酶纯化及性质研究)[J]. *Journal of Wuhan Botanical Research* (武汉植物学研究), 16(4): 305-309.