

芦荟超氧化物歧化酶稳定性研究*

许平

(重庆师范大学 生命科学学院, 重庆 400047)

摘要 本文研究了在不同 pH、温度条件下从芦荟中提取的超氧化物歧化酶的稳定性。结果表明, 芦荟超氧化物歧化酶具有较好的热稳定性和 pH 稳定性, 其作用的最适 pH 值为 8.2, 最适温度为 40~55℃。

关键词 芦荟; 超氧化物歧化酶; pH; 温度; 稳定性

中图分类号: Q949.71+8.23 Q554

文献标识码: A

文章编号: 1672-6693(2007)03-0057-03

A Research of Stability on Superoxide Dismutase from *A. Vera* L.

XU Ping

(College of Life Science, Chongqing Normal University, Chongqing 400047, China)

Abstract: This study discusses the stability of Superoxide dismutase from *A. vera* L at different pH on temperature. The results show that the SOD from *A. vera* L has better thermally stability and pH stability, the optimal pH is 8.2 and optimal temperature is from 40 to 55℃.

Key words: *A. vera* L, superoxide dismutase, pH, temperature, stability

超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD, EC1.15.1.1)是一类广泛存在于生物体内的氧化还原酶^[1]。植物在整个生长发育过程中受到大气污染、极端温度、水分胁迫、强光、盐渍和病原菌侵染,使细胞产生大量的活性氧,它们对细胞有明显的毒害作用,能与蛋白质、核酸和脂类发生作用,引起蛋白质失活、降解、DNA链断裂和脂质过氧化等现象,导致细胞结构和功能的破坏。植物抗氧化保护酶类有超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化氢酶(CAT)、抗坏血酸过氧化物酶(APX)等,其中SOD第一个参与活性氧的清除反应,在抗氧化酶类处于核心地位^[2-5]。芦荟(*Aloe vera*)为百合科植物,含有丰富的蒽醌类物质、粘多糖、多肽、氨基酸、维生素、矿物质、叶绿素、生物活性酶及蛋白质等多种抗氧化功能的活性成分,植物来源的SOD等抗氧化酶及其它抗氧化物质在医药和化妆品等的使用已越来越广泛^[6];本文通过对库拉索芦荟(*Aloe barbadensis* Miller)SOD的稳定性研究,为芦荟的开发利用提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

实验用库拉索芦荟,购于重庆市天星桥花卉市场;DEAE-52、Sephadex G 100为Watman公司产品;其余试剂均为国产分析纯。7550紫外可见分光光度计;2323 K高速冷冻离心机;FA1004A电子天平;BS2-100自动部分收集器厂;DYY-III 8A电泳仪;精密pH计等。

1.2 方法

1.2.1 酶的分离纯化 新鲜芦荟制备粗酶液;硫酸铵分段盐析;Sephadex G-100分子筛柱层析;DEAE-52柱层析冷冻干燥,浓缩得纯化的SOD酶蛋白。SOD活力测定采用改良的邻苯三酚自氧化法^[7-8],邻苯三酚自氧化速率325 nm 0.070 D/min左右,以1 mL反应液中每分钟抑制邻苯三酚的速率达到50%的酶量作为一个酶活力单位(U)。

1.2.2 芦荟SOD最适pH的研究 用磷酸氢二钠

* 收稿日期: 2006-11-10

资助项目: 重庆师范大学科研基金项目

作者简介: 许平(1956-),女,江苏宜兴人,副教授,研究方向为蛋白质分离与纯化。

-柠檬酸缓冲液配制 pH 范围为 2~8 的缓冲液,用甘氨酸-氢氧化钠配制 pH 范围为 9~10 的缓冲液,测定 SOD 活力。以 30℃ 时酶样最大光吸收值的酶活力为 100%,在其它条件下的酶活力为最大光吸收值的百分数,即为该酶在此温度条件下的相对活力。

1.2.3 芦荟 SOD 最适温度的研究 在最适 pH 条件下,设置不同的反应温度,并测定该条件下的 SOD 酶活力,以酶样最大光吸收值的酶活力为 100%,在其它温度下的酶活力为最大酶活力的百分数,即为该酶在其它温度下的相对活力。

1.2.4 芦荟 SOD 的 pH 稳定性研究 取酶液加入

上述不同的 pH 缓冲液,在 30℃ 依次保温 1 h、2 h、3 h,以 0 h 下酶活力为 100%,测定各 pH 在不同时间下的相对酶活力。

1.2.5 芦荟 SOD 温度稳定性的研究 取酶液分别在 20℃、40℃、50℃、60℃、70℃ 下保温,分别检测 20 min、40 min、60 min、80 min、100 min、120 min、140 min 时的酶活力变化,以 0 min 时酶样的活力为 100%,测定各时间作用下的相对酶活力。

2 结果与讨论

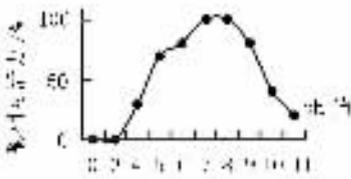


图1 pH对酶活性的影响

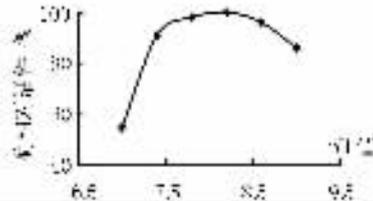


图2 pH对酶活性的影响

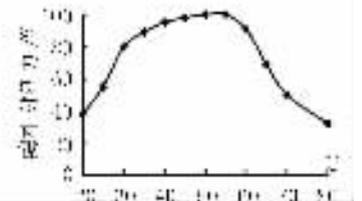


图3 温度对酶活性的影响

2.1 芦荟 SOD 最适 pH 的研究

根据不同 pH 下的 SOD 活力绘制图 1、图 2,在 pH 5~8.5 范围内,芦荟 SOD 活力呈上升趋势,pH 达 8.2 时酶活力达最大,以后随 pH 的增高,其酶活力呈下降趋势,当 pH 为 8.6 时,酶活力为 96%,pH 为 9 时,酶活力为 86%,最适 pH 在 8.2 左右,这表明芦荟 SOD 是一种对 pH 值变化比较稳定的酶,这种高稳定性与该酶分子中的金属辅基有关。

2.2 芦荟 SOD 最适温度的研究

如图 3 所示,温度在 20~40℃ 时,酶活力呈上升趋,50~55℃ 达最大,60℃ 后酶活力逐渐下降,70℃ 后酶活力明显下降,最适温度在 40~55℃ 之间,80℃ 时其活力还剩 32%。芦荟 SOD 有较高的耐热性,原因在于金属辅基的存在^[9],去除金属辅基其热稳定性大大降低,这也是芦荟能适应干旱炎热环境的原因。

2.3 芦荟 SOD pH 稳定性的研究

由表 1 和图 4 可知,芦荟 SOD 在 pH 5 随时间的延长酶活力明显减弱,在其它不同的 pH(6~9)值的缓冲液中随着时间的延长其相对活力都在 85% 以上,25℃ pH9 保温 3 h 相对活力还剩 92。SOD 是酸性蛋白,在 pH 7.0~9.0 时性质最稳定,热稳定性好^[10]。芦荟 SOD 对 pH 的变化不敏感并有较强的耐受性,这种高稳定性与该酶分子中的金属辅基有关,在较低的 pH 值条件下,酶分子中绝大部分锌从结合位点解离,而在很高的 pH 条件下,可能是酶分子中的 2 个金属位点被铜占据,从而使酶分子的

表 1 芦荟 SOD 的 pH 稳定性

pH 值	相对酶活力(1h)/%	相对酶活力(2h)/%	相对酶活力(3h)/%
5	80.3	73.1	58.4
6	95.1	91.9	84.9
7	98.0	95.4	90.3
8	99.6	99.0	98.4
9	96.8	92.5	91.9

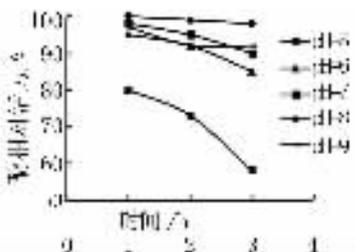


图4 不同 pH 下作用时间对酶活性的影响

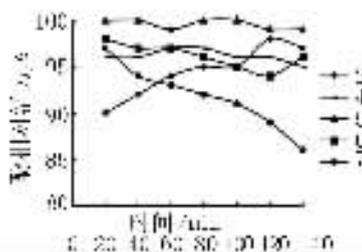


图5 不同温度下作用时间对酶活性的影响

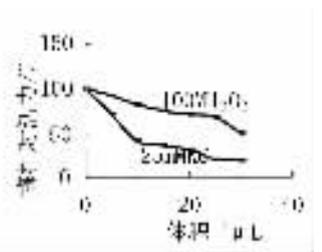


图6 芦荟 SOD 对化学试剂敏感

构型发生不可逆的转变并丧失其活性^[9]。

2.4 芦荟 SOD 热稳定性的研究

由图5可见,芦荟SOD在50℃、140 min酶活性稳定,60℃、100 min后酶活性下降5%,20℃随着时间的延长酶活力增加,70℃、100 min相对酶活力保持90%,70℃、140 min相对酶活力还保持85%,这表明芦荟SOD对温度有较高的耐受性,酶分子的构象决定其活性,而构象又受环境的影响,在一定的温度和时间范围内酶分子的构象发生某些变化可提高酶的活性,但温度过高时间过长酶反而会变性失活。

2.5 酶的种类鉴定

根据有关文献^[11],Mn-SOD对氰化物和过氧化氢均不敏感,Cu,Zn-SOD对氰化物和过氧化氢均敏感,Fe-SOD对氰化物不敏感,用这两种抑制剂实验将3种SOD分开。H₂O₂、KCN溶液作用30 min(30℃)后,相对活力为13.6%和25.1%,从图6可见KCN和H₂O₂对芦荟SOD的抑制作用明显,是SOD的抑制剂,芦荟SOD为Cu,Zn-SOD。

3 结论

SOD是生物体内的催化剂,其活性和催化效率的高低与其含量的多少有关,也与环境理化因素的影响直接有关^[12],为了最大限度地发挥催化反应的高效率,寻找最有利的反应条件,本文研究了温度、pH对芦荟SOD活力的影响,结果表明芦荟SOD对pH和温度有较高的稳定性和耐受性,使其在应用时允许有较大的pH值及温度变化范围,从而使芦荟SOD有更好的开发应用前景。

参考文献:

- [1] 许平. 温度对提取芦荟超氧化物歧化酶的影响[J]. 重庆师范大学学报(自然科学版) 2007 24(增刊) 61-63.
- [2] HASS H M, MASSARO D. Differences in Cu,Zn-SOD Induction in Lungs of Neonatal and Adult Rats [J]. Am J Physiol, 1987 253 :C66-72.
- [3] NATVING D O. Human Cu,Zn-SOD Complements Superoxide Dismutase Deficient E. Coli [J]. J Biol Chem, 1987, 262(14) :697-707.
- [4] 孙存普, 张建中, 段绍瑾. 自由基生物学导论[M]. 合肥: 中国科技大学出版社, 1999.
- [5] 黄叶梅, 黎霞, 张丽. 苦荞黄酮对大鼠脑缺血再灌注损伤的保护作用[J]. 四川师范大学学报(自然科学版), 2006 29(4) 99-101.
- [6] 廖志华. 芦荟的药理作用[J]. 国外医药(植物药分册), 1999, 14(4) :148-149.
- [7] 李建武, 肖能应, 余瑞元. 生物化学实验原理和方法[M]. 北京: 北京大学出版社, 1994.
- [8] 李如亮. 生物化学实验[M]. 武汉: 武汉大学出版社, 1998.
- [9] STELLWGEN E, WILGUE H. Biochemistry of Thermophily [M]. New York: Academic Press, 1978.
- [10] 宫霞. 小白菜中超氧化物歧化酶的提取及稳定性[J]. 曲阜师范大学学报(自然科学版), 1997 23(1) 97-99.
- [11] 方允中, 李文杰. 自由基与酶[M]. 北京: 科学出版社, 1993. 75-76.
- [12] 范曾丽, 王三根. 不同基因型玉米自交系在低磷胁迫下的生理生化特性比较初探[J]. 西华师范大学学报(自然科学版) 2005 26(3) 57-61.

(责任编辑 李若溪)