

技术与方法

鉴别超氧化物歧化酶类型的定位染色法*

罗广华 王爱国 付爱根

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

摘要 介绍一种鉴别 SOD 类型的方法——聚丙烯酰胺凝胶电泳的定位染色法。由于不同类型的 SOD 对抑制剂的表现各异, 电泳后的凝胶经不同的抑制剂处理, 染色, 结果展示在凝胶上, CuZn-SOD 酶带在 H_2O_2 或 CN^- 的作用下消失, Mn-SOD 在 $CHCl_3-CH_3CH_2OH$ 作用下消失, Fe-SOD 在 H_2O_2 或 $CHCl_3-CH_3CH_2OH$ 作用下失活, 从酶带消失或存活的情况, 可以判断 SOD 的类型。

关键词 SOD, SOD 类型, 聚丙烯酰胺凝胶电泳

超氧化物歧化酶 (SOD) 是植物体内防御氧毒害的关键酶, 由于酶的活性中心所含的金属不同, 主要有 CuZn-、Mn-和 Fe-SOD 三种类型同工酶^[1]。它们共同的生物学作用都是催化超氧化物阴离子自由基 (O_2^-) 歧化为 H_2O_2 和 O_2 。因此, 不管用什么方法测定 SOD 活性, 得到的结果都是三种同工酶活性的总和, 而不能辨别是哪一种金属类型 SOD 的作用。CuZn-、Mn-和 Fe-SOD 的某些理化性质和酶的稳定性有差异^[2], 而且在真核、原核生物以及细胞器中的分布不同^[3]。CuZn-和 Mn-SOD 在人体中的器官趋向也不同^[4], 区分 CuZn-、Mn-和 Fe-SOD 是生物学和医学中可能遇到的实际问题。

1 材料和方法

1.1 试剂

CuZn-SOD、Mn-SOD、Fe-SOD 和氯代硝基四唑氮蓝 (NBT) 为 Sigma 公司产品, 其余为国产分析纯。

1.2 植物材料

菜心 (*Brassica parachinensis* Bailey, 四九心) 在本所菜园新鲜采集。

1.3 SOD 活性测定和 SOD 同工酶显示

方法见文献 [5, 6]。

1.4 鉴别 SOD 类型的染色定位法

相同的样液 4 份, 分别点样在平板凝胶的 4 个齿中, 电泳毕, 纵切胶板, 分开每个样相对的胶条, 分别在 PBS (磷酸缓冲液 50 mmol/L, pH 7.8)、 $CHCl_3-CH_3CH_2OH$ (体积比 0.15:0.25, 现配)、 H_2O_2 (5 mmol/L, 现配) 和 KCN (5 mmol/L, 现配) 中浸摇 1 h, 清水洗净, 先在 NBT 染色 20 min, 然后在含核黄素和四甲基乙二胺的 PBS 中浸泡 15 min, 最后在光照下 PBS 中显示 SOD 同工酶, 根据 SOD 同工酶对不同抑制剂特有的敏感性, 在 $CHCl_3-CH_3CH_2OH$ 作用下只有 CuZn-SOD 留存, H_2O_2 作用下仅 Mn-SOD 存活, CN^- 处理有 Mn-SOD 和 Fe-SOD 残存, 从凝胶特定位置上酶带消失和存活的情况, 可以判断是何种类型的 SOD。

2 实验结果

2.1 氯仿-乙醇对 Mn-和 Fe-SOD 的抑制

$CHCl_3-CH_3CH_2OH$ (体积比 0.15:0.25) 分别加到相同酶单位的 CuZn-、Mn-和 Fe-SOD 中, 放置不同时间后测定它们的活性。实验结

*国家自然科学基金资助。

收稿日期: 1995-09-05, 修回日期: 1995-12-05

果(图1)表明: Mn-和 Fe-SOD 在 $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 的作用下迅速失去活性, 而且前者的敏感性高于后者; CuZn-SOD 在 $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 作用 24 h 后, 活性没有明显的变化. 三种 SOD 同工酶对 $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 敏感性排列顺序为: Mn->Fe->CuZn-SOD.

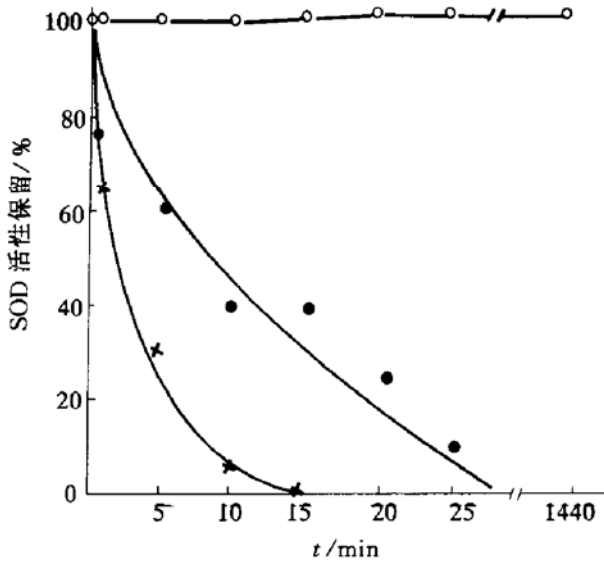


图1 氯仿-乙醇对 CuZn-, Mn-和 Fe-SOD 活性的影响
x—x: Mn-SOD; ●—●: Fe-SOD; ○—○: CuZn-SOD; t: $\text{CHCl}_3\text{-CH}_3\text{CH}_2\text{OH}$ 处理时间.

2.2 过氧化氢对 CuZn-和 Fe-SOD 的抑制

H_2O_2 5 mmol/L 分别处理相同酶单位的

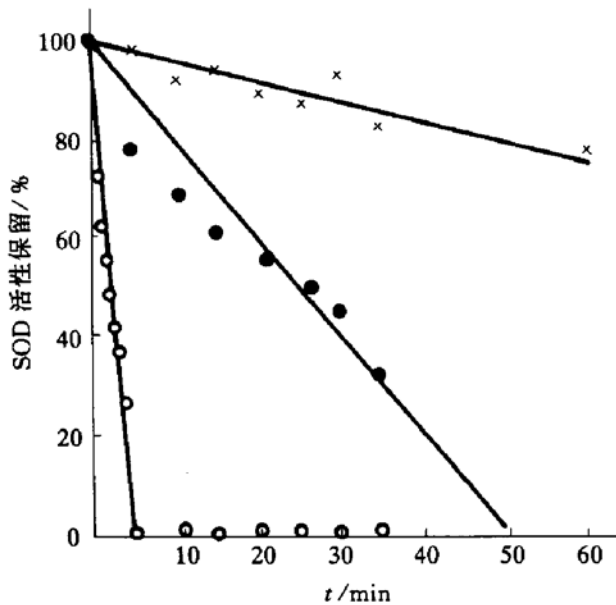


图2 过氧化氢对 CuZn-, Mn-和 Fe-SOD 活性的影响
x—x: Mn-SOD; ●—●: Fe-SOD; ○—○: CuZn-SOD; t: H_2O_2 处理时间.

CuZn-, Mn-和 Fe-SOD, 在不同时间测定它们的活性. 结果表明(图2): CuZn-SOD 在 H_2O_2 作用 5 min 内急剧失活, Fe-SOD 失活较快, 而 Mn-SOD 比较稳定, 三种同工酶对 H_2O_2 的敏感性为: CuZn->Fe->Mn-SOD.

2.3 氰化物对 CuZn-SOD 的抑制作用

KCN 5 mmol/L 分别处理相同酶单位的 CuZn-, Mn-和 Fe-SOD, 在不同时间测定它们的活性, 结果表明(图3a): Mn-SOD 在 70 min

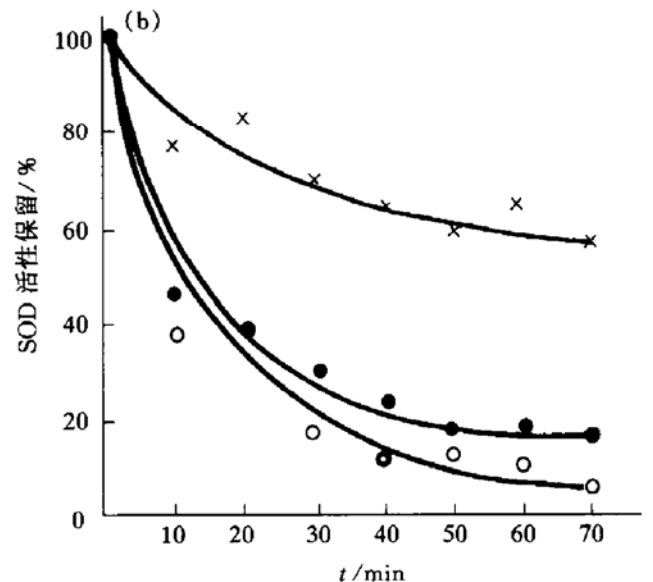
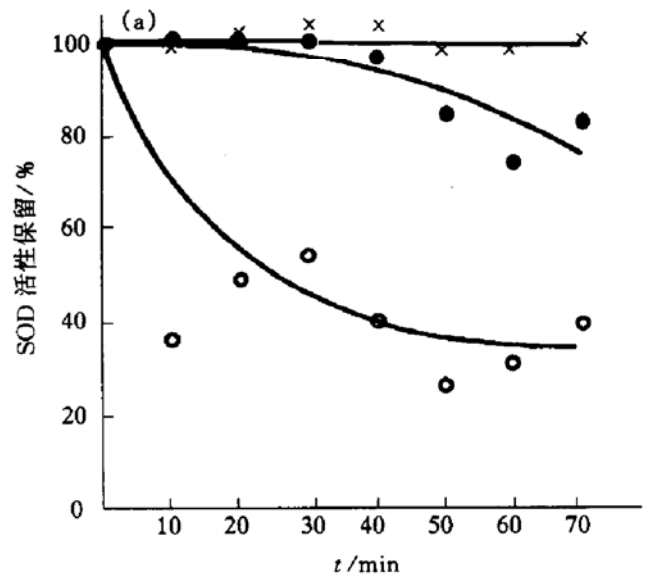


图3 氰化物对 CuZn-, Mn-和 Fe-SOD 的作用
(a) 5 mmol/L CN^- 处理; (b) 10 mmol/L CN^- 处理.
x—x: Mn-SOD; ●—●: Fe-SOD; ○—○: CuZn-SOD; t: KCN 处理时间.

内稳定; 而 Fe-SOD 活性在 40 min 后开始下降; CuZn-SOD 10 min 失活约 40%. 三种同

工酶对 KCN 的敏感度是 CuZn->Fe->Mn-SOD. 然而, 这种敏感与稳定是有相对性的, 如果将 KCN 的浓度增至 10 mmol/L 处理 SOD, 那么得到的是另一种结果: CuZn-、Mn-和 Fe-SOD 三种同工酶对 KCN 都是敏感的, 处理 70 min 后, CuZn-SOD 活性丧失 92%, Fe-SOD 丧失 80%, Mn-SOD 亦失活 38% (图 3b), 但对 KCN 敏感性的排列不变, 仍然是 CuZn->Fe->Mn-SOD.

2.4 SOD 同工酶定位染色

2.4.1 CuZn-、Mn-和 Fe-SOD 的定位染色: 相同量的标准 Mn-SOD (2U)、CuZn-SOD (2U) 和 Fe-SOD (2U) 分别点样在凝胶的三个齿中, 电泳后在 PBS 中浸摇 1 h, 然后用 NBT 染色, 显示 SOD 同工酶, 结果表明 (图 4):

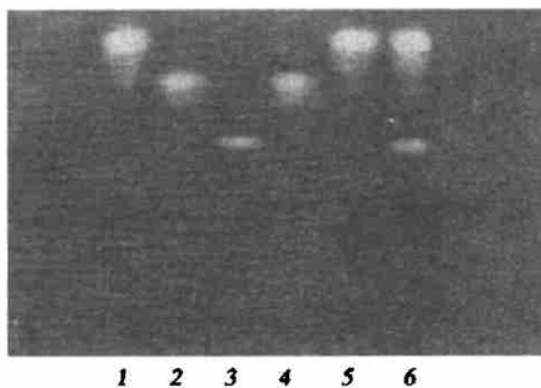


图 4 抑制剂对 CuZn-、Mn-和 Fe-SOD 的影响

1: 纯化 Mn-SOD; 2: 纯化 CuZn-SOD; 3: 纯化 Fe-SOD; 4: 三种类型 SOD 混合液经 CHCl₃-CH₃CH₂OH 处理; 5: 三种类型 SOD 混合液经 H₂O₂ 处理; 6: 三种类型 SOD 混合液经 KCN 处理.

Mn-、CuZn-和 Fe-SOD 都分别只有一条酶带, 各自的迁移率为: 0.11、0.23 和 0.42, 以此迁移率 (R_f) 作为各类型 SOD 的标记. 另外, 与上述操作同时平行进行的是: 三种类型 SOD 的混合液 (2U Mn-SOD + 2U CuZn-SOD + 2U Fe-SOD) 点样在三个齿中, 电泳后纵切凝胶, 分开每齿相对的胶条, 各自在不同的抑制剂中浸摇 1 h, 然后显色, 结果表明: CHCl₃-CH₃CH₂OH 处理的只有 R_f 为 0.23 带

保存, 对照标准 SOD 的 R_f , 可知残存的酶带为 CuZn-SOD, 其结果可与图 1 互相引证. 同理, 用 H₂O₂ 5 mmol/L 处理 SOD 混合液, 只剩 R_f 为 0.11 的 Mn-SOD, 结果可与图 2 引证. KCN 5 mmol/L 处理的, 有 R_f 为 0.11 和 0.42 的 Mn-SOD 和 Fe-SOD 酶带保留, 结果可与图 3 引证. 抑制剂对 SOD 活性 (图 1、2 和 3) 和染色定位 (图 4) 的影响是一致的, 即 CuZn-SOD 对 CHCl₃-CH₃CH₂OH 不敏感, Mn-SOD 对 H₂O₂ 和 CN⁻ 不敏感, Fe-SOD 对 CN⁻ 不敏感.

2.4.2 SOD 定位染色法的应用: 菜心叶片粗提取液的适当量加在凝胶中, 电泳, 纵切胶板, 分别以 PBS 和不同抑制剂处理, 显示 SOD 同工酶带, 结果表明 (图 5): 菜心有三



图 5 菜心 SOD 同工酶的类型

1: 菜心叶片粗提取液; 2: 经 CHCl₃-CH₃CH₂OH 处理; 3: 经 H₂O₂ 处理; 4: 经 KCN 处理.

条 SOD 同工酶带, R_f 分别为 0.21, 0.29 和 0.38. 经 CHCl₃-CH₃CH₂OH 处理后, 只有 R_f 0.38 带存活, H₂O₂ 处理有 R_f 0.21 带残存, 而 KCN 处理有 R_f 0.21 和 0.29 两条酶带存

留. 根据各类型 SOD 对抑制剂敏感性和耐性的差异, 可以判断: 菜心中含有三条 SOD 同工酶带, 它们分别是 Mn- (R_f 0.21), Fe- (R_f 0.29) 和 CuZn-SOD (R_f 0.38), 与 Bridges 等^[7]的结果一致.

3 讨 论

上述实验用 Sigma 公司生产的纯 SOD (CuZn-SOD 从牛血中提取, Mn-SOD 和 Fe-SOD 从大肠杆菌中纯化) 作为各类 SOD 的标准酶, 所谓 CuZn-SOD 是指酶活性中心的金属为铜和锌, 它们的某些理化性质相似, 但并不意味着凡是 CuZn-SOD 都有相同的 R_f , 同一植物, 甚至同一植物的器官, 可以有多条不同 R_f 的 CuZn-SOD^[2], 也可以一条也没有. Mn- 和 Fe-SOD 亦然.

参 考 文 献

- 1 方允中, 李文杰. 自由基与酶. 北京: 科学出版社, 1989: 71~75
- 2 Steinman H M. In: Oberley L W ed. Superoxide dismutase. Boca Raton: CRC Press, 1982; I: 11
- 3 罗广华, 王爱国, 邵从本等. 植物生理学报, 1985; 11 (2): 163
- 4 Gorecki M, Beck Y. Fifth conference on superoxide and superoxide dismutase (program and abstracts). Jerusalem: Israel, 1989: 50

- 5 王爱国, 罗广华, 邵从本等. 植物生理学报, 1983; 9 (1): 77
- 6 罗广华, 王爱国. 植物生理学通讯, 1983; (6): 44
- 7 Bridges S M, Salin M L. Plant Physiol, 1981; 68: 275

The Location Staining Method for Distinguishing Different Types of SOD. Luo Guanghua, Wang Aiguo, Fu Aigen (South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650, China).

Abstract A simple method, the location staining method, for distinguishing different SOD types was introduced. Due to the different performances of the different types of SOD against inhibitors, e.g. Cu, Zn-SOD band disappeared in the presence of H_2O_2 or CN^- , Mn-SOD disappeared in the presence of $CHCl_3-CH_3CH_2OH$, and Fe-SOD lost in the presence of H_2O_2 or $CHCl_3-CH_3CH_2OH$ on the electrophoresis gels, the gels after electrophoresis were treated with the different inhibitors and then stained. According to the loss or presence of these bands, different SOD types can be identified.

Key words SOD, type of SOD, polyacrylamide gel electrophoresis

阳极电泳和阴极电泳的快速半干新技术

郭尧君 余 添¹⁾

(中国科学院生物物理研究所, 北京 100101)

摘要 滤纸条半干技术在保证分辨率的前提下, 将凝胶电泳的电泳时间从原来的 2~4 h 缩短到 40~50 min, 并简化了操作, 节省了实验费用, 不需配制大量的缓冲液. pH 4.8 较 pH 8.9 阳极电泳提高了酸性蛋白质的电泳分辨率. pH 5.5 阴极电泳用于分离碱性样品可以得到很好的效果.

关键词 阳极电泳, 阴极电泳, 半干技术

¹⁾中国科技大学生物系 90 级本科生. 收稿日期: 1995-09-13, 修回日期: 1995-10-23