

聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳和均一凝胶电泳在分离及鉴定植物 SOD 同工酶中的比较研究

程光宇¹, 王 峰², 陶明煊², 陆长梅¹, 吴国荣¹, 常福辰¹

(1. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210097)

(2. 南京师范大学金陵女子学院, 江苏 南京 210097)

[摘要] 比较了聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳(GPGE)和均一凝胶电泳(PAGE)在分离和鉴定 SOD 同工酶方面的应用. 在 GPGE 中根据 R_f 值大小可将 SOD 谱带分为 3 个区: A 区 R_f 值最小, 对 SDS 敏感, 为 MnSOD; C 区 R_f 值最大, 对 SDS 不敏感, 为 CuZnSOD; B 区谱带 R_f 值位于两者之间, 对 SDS 敏感, 为 FeSOD. 根据 GPGE 图谱上谱带 R_f 值大小和对 SDS 敏感性来判断 SOD 类型结果与用抑制剂判断结果一致, 它可作为一种 SOD 类型初步鉴定的简便可行的方法, 相同植物材料经 PAGE 分离后不具备这些特性. 在相同牛血 SOD 浓度下, GPGE 检测 SOD 灵敏度可达 10^{-15} mol , PAGE 为 10^{-13} mol . 在 $1.56 \times 10^{-12} \text{ mol}$ SOD 时, 在 GPGE 中可分辨出 4 条带, PAGE 仅为 2 条. 枸杞 FeSOD 在 7.5% 胶中 R_f 值最大, 在 10% 胶中与 CuZnSOD 重叠, 香橼 FeSOD、MnSOD 和朱桔 MnSOD、CuZnSOD 在 10% PAGE 中相互重叠, 在 GPGE 中它们都有规律地完全分离, 可根据 R_f 值大小鉴别 SOD 类型. 通过 2 次电泳阐明了 GPGE 分离和鉴定 SOD 的可靠性, 它能有效地分离和鉴定在 PAGE 上重叠的 3 种 SOD 类型.

[关键词] 聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳, 聚丙烯酰胺凝胶电泳, SOD, 分离, 鉴定

[中图分类号] Q 503 [文献标识码] A [文章编号] 1001-4616(2008)04-0097-07

Comparison of Gradient Polyacrylamide and Polyacrylamide Gel Electrophoresis in the Isolation and Identification of Plant SOD Isozyme

Cheng Guangyu¹, Wang Feng², Tao Mingxuan², Lu Changmei¹, Wu Gongrong¹, Chang Fuchen¹

(1. School of Life Science, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

(2. Jinling College, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract This paper compared the application of gradient polyacrylamide gelelectrophoresis(GPGE) and polyacrylamide gelelectrophoresis(PAGE) in isolation and identification of plant SOD isozyme. The results showed that SOD bands on GPGE were divided into three region of A, B, C according to its R_f . The R_f of A region SOD band was minimum, it was sensitive to 1% SDS and was MnSOD. The R_f of C region SOD band was the biggest, it was not sensitive to 1% SDS and was CuZnSOD. The R_f of B region SOD band was between A and C, it was sensitive to 1% SDS and was FeSOD. The three SOD isozymes were distinguished by its R_f and sensitivity to SDS on polyacrylamide gradient gel. This result was about the same as the result of judgement using inhibitor. The same plant sample was isolated by PAGE did not have the characteristic. 10^{-13} mol and 10^{-15} mol bovine SOD was detected in PAGE and GPGE, respectively. Four and two SOD activity bands were detected in GPGE and PAGE at $1.56 \times 10^{-12} \text{ mol}$ bovine SOD, respectively. The R_f of FeSOD from *Lycium chinense* was the biggest in 7.5% PAGE and it overlapped with CuZnSOD in 10% PAGE. The FeSOD and MnSOD of *Cinus wilsonii*, MnSOD and CuZnSOD of *Citrus erythrosa* were overlapped each other in 10% PAGE, but three types of SOD were completely isolated in 4% ~ 35% GPGE. The reliability of isolating and identify SOD using GPGE was expounded by two times gel concentration gradient electrophoresis TGCGE, the R_f and the number of SOD bands in GPGE were compatible with TGCGE, and it can completely isolate and identify the overlapped three SOD types on PAGE.

Key words GPGE, PAGE, SOD, Isolation, Identification

收稿日期: 2008-03-12

基金项目: 江苏省自然科学基金(1998SWX05Z001)资助项目.

通讯联系人: 程光宇, 高级实验师, 研究方向: 生物活性物质及保健功能因子. E-mail: mwx_cgy@yahoo.com.cn

超氧化物歧化酶 (EC1. 15. 1. 1, 简称 SOD) 是广泛存在于生物体内的一类金属酶, 根据金属辅基的不同可分为 Mn-SOD、Fe-SOD 和 CuZn-SOD 3 种类型, 近年来还从链霉菌属中发现了 Ni-SOD^[1], 从日本沼虾中纯化 66. 1 ku 的 EC-SOD, 发现了仓鼠和人胞质中的 240~ 260 ku 及 135 和 270 ku 的 EC-SOD^[2], 它们都具有催化超氧阴离子自由基形成过氧化氢和水的反应能力, 在防御活性氧对生物体的伤害、在植物的逆境生理、在预防和治疗由自由基诱发的一系列疾病, 如肿瘤、辐射损伤、心脑血管疾病等方面都起到了很重要的作用. 对 3 种类型 SOD 同工酶的分离和鉴定是生物学和医学中会遇到的实际问题, 通常都是采用聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE) 的定位染色法^[3], 我们在实际应用中发现样品点样量少时, SOD 弱带难以显示, 点样量大时植物次生物质对酶带显示有干扰, 且谱带清晰度和重复性都不理想, 时有谱带重叠现象出现, 谱带分离的 R_f 值与酶类型间无特定规律可寻, 在改用聚丙烯酰胺凝胶梯度电泳 (GPGE) 后得到了较满意的效果. 本文将通过 GPGE 和 PAGE 的比较, 旨在建立用 GPGE 分离和鉴定 SOD 同工酶的新方法.

1 材料和方法

1. 1 材料、主要试剂及仪器

新鲜的植物材料采自南京地区和本院温室, 当天采集后, 用蒸馏水洗净后备用.

枸杞 Fe-SOD、牛血 SOD 及花生 CuZn-SOD 分别按其文献^[4-6]纯化至电泳纯. 丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、SDS、甲硫氨酸 (Sigma), NBT(南京卓尔生化有限公司), 其它试剂为国产分析纯或生化试剂. 主要仪器为岛津 CS-9000 双波长薄层扫描仪, CSR-4 高压电泳仪, 梯度凝胶电泳灌胶装置.

1. 2 方法

1. 2. 1 SOD 粗酶液的制备

将实验材料剪碎, 按每克鲜重加入 3 mL 的 50 mmol/L 磷酸缓冲液 (pH 7. 8) 进行研磨匀浆, 匀浆液 10 000 r/min 离心 15 min 后, 上清液即为粗酶液, 用于实验或分装于小离心管内, -25℃ 保存备用.

1. 2. 2 SOD 同工酶的电泳分离和染色定位

PAGE 按罗广华等^[3]方法, 在 7. 5% 或 10% 的分离胶上进行; GPGE 按程光宇等^[7]及张龙翔^[8]方法, 在 4% ~ 35% 梯度胶上进行, 加样前以 100 V 稳压预电泳 30 min, 加样后在 4℃ 电泳, 先以 150 V 稳压电泳 1 h 后, 将电压逐步提高到 300 V 稳压电泳 15 h (电泳持续 4 500 V · h 以上); 二次电泳按程光宇等^[9]方法进行, 第一向为 10% 的 PAGE, 在电泳结束后切取具有 SOD 活性且未经染色的区带, 放在已预电泳过的 4% ~ 35% 梯度胶上端, 加入 PAGE 中 3. 5% 的浓缩胶液, 采用光照聚合将其固定后进行第二向 GPGE, 同时以相同酶液量在梯度胶上点样. 电泳结束后进行酶活性染色, 采用拍照或扫描方法记录 SOD 同工酶图谱.

1. 2. 3 SOD 同工酶类型的鉴定

(1) 参照 Bridges 和 Salin 的方法^[10], 以 KCN 和 H₂O₂ 两种抑制剂鉴定 SOD 类型.

(2) 利用梯度胶具有分子筛效应^[8]及其 R_f 值与 3 种 SOD 相对分子质量存在差异^[11]的特点, 由 R_f 值初步判断 SOD 类型.

(3) 利用 CuZn-SOD 对 SDS 不敏感、Mn-SOD 和 Fe-SOD 对 SDS 敏感的特性^[11, 12, 19], 向粗酶液中加入 SDS 溶液使其终浓度达 1% 后, 于 37℃ 保温 1 h 分别进行 SOD 同工酶的 GPGE 和 PAGE 并进行酶活性染色. CuZn-SOD 对 SDS 不敏感, 谱带留存, Mn-SOD 和 Fe-SOD 对 SDS 敏感, 谱带消失.

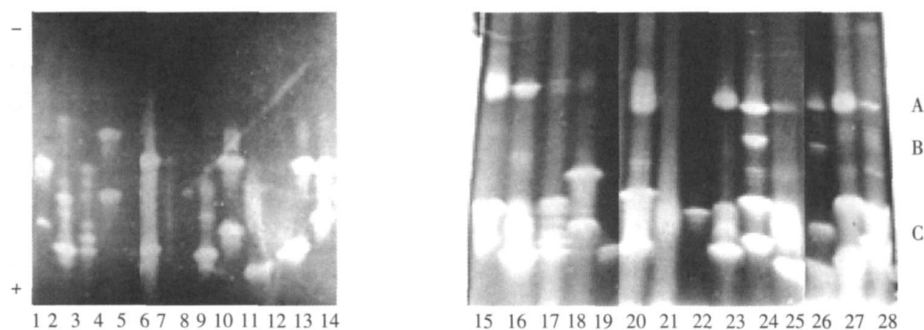
2 结果与分析

2. 1 GPGE 和 PAGE 对分离 SOD 同工酶的影响

结果见图 1. 14 种植物的 3 种类型 SOD 在 4% ~ 35% 的梯度胶中都得到较好的分离, 谱带清晰, 未见有干扰现象, 根据 R_f 值可分为 A、B、C 3 个区域: A 区的 R_f 值最小 (< 3. 6), 谱带都为 1 条; C 区的 R_f 值最大 (> 5. 0), 其中谱带数目因植物种类不同而异, 如羊蹄、拔契仅有 1~ 2 条, 而鸭趾草、马兜铃等则多于 4 条; B 区 R_f 值位于 A、B 区之间, 如有谱带一般都为 1 条, 但许多植物缺乏这种类型谱带. 同时, 从其 R_f 值大小, 还可初步判定各同工酶的相对分子质量和类型, R_f 值最小的 A 区同工酶相对分子质量最大, 应为 Mn-SOD; R_f 最大的 C 区同工酶相对分子质量最小, 应是 CuZn-SOD, 而介于两者之间 B 区的同工酶可认为是 Fe-SOD, 如南苜蓿、金荞麦的 Fe-SOD. 在 SOD 类型的筛选中, 利用梯度胶这一分离特性为初步判断

SOD 类型提供了一条快捷途径.

同一样品在相同加样量下进行 10% PAGE, SOD 谱带分离效果远不如 GPGE, 谱带分布及 R_f 值与 SOD 类型之间无特定规律可寻, 其中紫花地丁中的次生物质对 SOD 显示干扰并影响到周围的谱带 (图 1 的 11). 可见, 在 PAGE 中 SOD 的 R_f 值因受电荷、胶浓度、pH 值等多种因素影响, 不能作为 SOD 类型鉴定的依据, 在 GPGE 中的 R_f 值排除了电荷等因素的影响, 与分子大小有相关性, 故它可用于测定天然酶和蛋白质的相对分子质量^[8].



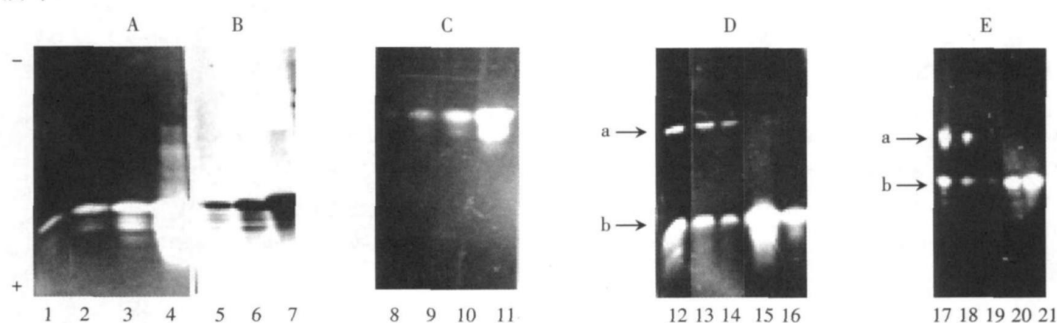
1,15: 紫贝天葵, 2,16: 半夏, 3,17: 鸭趾草, 4,18: 还亮草, 5,19: 羊蹄, 6,20: 马兜铃, 7,21: 夏枯草, 8,22: 拔契, 9,23: 野花椒, 10,24: 南苜蓿, 11,25: 紫花地丁, 12,26: 金荞麦, 13,27: 三叶草, 14,28: 无花果

图 1 SOD 的 10%PAGE(1-14)和 4%~35%GPGE(15-28)凝胶电泳图谱(加样量为 25 μ L 粗酶液)

Fig.1 Electrophoretic pattern of SOD on 10% PAGE(1-14) and 4%~35% GPGE(15-28), each lane contained 25 μ L of crude extract

2.2 GPGE 和 PAGE 检测 SOD 的灵敏度和分辨率比较

以牛血 SOD 为标准, 比较 GPGE 和 PAGE 检测 SOD 的灵敏度和分辨率 (见图 2). 当以相同加样量分别进行 GPGE 和 PAGE 时, 在 PAGE 图谱上 SOD 的检测浓度为 1.56×10^{-13} mol, 在 GPGE 图谱上, SOD 浓度为 1.56×10^{-14} mol 时谱带清晰, 当再稀释 10 倍后仍能见到 SOD 谱带 (图片未列出), 说明 PAGE 和 GPGE 检测 SOD 的灵敏度分别为 1.56×10^{-13} mol 和 1.56×10^{-15} mol. 在 GPGE 图谱中牛血 SOD 活性染色与蛋白染色带边缘清晰, 呈扁平状, 在 1.56×10^{-12} mol SOD 时活性染色带可分辨出 1 条主带和 2 条次带及 1 条弱带 (图 2 中 A3), 与 6.24×10^{-9} mol SOD 时的蛋白带相互对应 (图 2 中 B5); 而在同样加样量下的 PAGE 图谱中谱带边缘模糊, 只能分辨出 1 条主带和 1 条次带 (图 2 中 C10). 说明 GPGE 比 PAGE 有更高的分辨率.



C, E: 10%的 PAGE, A, B, D: 4%~35%的 GPGE, 5~7 为蛋白染色, 其余为活性染色. a: Mn-SOD, b: CuZn-SOD. 1, 8: 1.56×10^{-14} mol SOD, 2, 9: 1.56×10^{-13} mol SOD, 3, 10: 1.56×10^{-12} mol SOD, 4, 5, 11: 6.24×10^{-9} mol SOD (2 μ g), 6: 10 μ g SOD, 7: 30 μ g SOD, 12~14 加样量为 2.5 μ L, 1.0 μ L, 0.5 μ L, 17~19 加样量为 10 μ L, 5 μ L, 1 μ L, 15~16 加样量为 0.128 μ g SOD, 0.016 μ g SOD, 20~21 加样量为 0.032 μ g SOD, 0.32 μ g SOD

图 2 牛血 CuZn-SOD(1-11)、花生 CuZn-SOD(15-16, 20, 21)及花生粗酶液(12-14, 17-19)的凝胶电泳图谱

Fig.2 Bovine CuZn-SOD(1-11), peanut CuZn-SOD(15-16, 20-21) and the crude extract of peanut(12-14, 17-19) of polyacrylamide gel electrophoresis

花生 SOD 粗酶液 (125 U/mL) 分别以 1 μ L 进行 GPGE 和 PAGE 时, 在 GPGE 图谱上 Mn-SOD 和 CuZn-SOD 谱带非常清晰 (图 2 的 13), 但在 PAGE 图谱上已无明显的谱带 (图 2 的 19). 花生 CuZn-SOD 在 GPGE 中分别加样 0.016 μ g 和 0.128 μ g 在 PAGE 中分别加样 0.032 μ g 和 0.32 μ g 时, 低、高浓度 SOD 谱带扫描

后峰面积之比分别为 1: 3. 37 和 1: 1. 54 从图 1 和图 4 还能看出南苜蓿、番茄、金荞麦等在梯度胶上显示出 4~ 5 条带, 但 PAGE 图谱上显示 2~ 3 条. 纯化的枸杞 Fe-SOD 有 3 条带, 但在 GPGE 上的灵敏度和分辨率明显高于 PAGE(图 3 的 4 9). 可见, 对于植物的粗酶液和纯酶, GPGE 同样比 PAGE 有较高的灵敏度和分辨率.

2. 3 不同胶浓度对 3 种 SOD 类型分离和鉴定的影响

枸杞和香橼都含有 3 种类型 SOD, 它们在不同胶浓度下的分离结果见图 3 枸杞在 7. 5% PAGE 中有 3 条 Fe-SOD, 它们的 R_f 最大, CuZn-SOD 也有 3 条, 它们的 R_f 居中, Mn-SOD 不成条带, 很难确定. 在 10% 的 PAGE 中 3 条 Fe-SOD 带上移已与第三条 CuZn-SOD 相重叠, Mn-SOD 带已能基本分清. 同时可见在 7. 5% 和 10% 的 PAGE 中还存在 CuZn-SOD 抑制不完全的现象, 经 KCN 和 H₂O₂ 处理后在负极处的一些谱带性质也很难判断; 在 4% ~ 35% 的梯度胶中 3 种类型 SOD 谱带完全分离, Fe-SOD 带上移至 Mn-SOD 和 CuZn-SOD 间, 与纯化的 Fe-SOD 有相同的 R_f 值. 香橼 SOD 在 10% 的 PAGE 中, 有 1 条对 KCN 和 H₂O₂ 都敏感的 CuZn-SOD 谱带, 它的 R_f 值最小, Mn-SOD 和 Fe-SOD 即使以抑制剂处理, 也因未分离和分辨率差无法判断. 在 4% ~ 35% 的梯度胶中 3 种 SOD 同工酶都有规律地完全分开, R_f 值最小的 1 条为 Mn-SOD, R_f 值较大的 2 条为 CuZn-SOD, R_f 值位于两者之间的为 Fe-SOD.

可见, 枸杞和香橼的 3 种 SOD 类型, 它们在 7. 5% 和 10% 的 PAGE 中分离难有规律可循, 如香橼 CuZn-SOD 的 R_f 值在同工酶中最小(图 3D), 同为 Fe-SOD, 在枸杞中的 R_f 值最大(图 3A), 在朱桔中 R_f 值却最小(图 5A). 当用 KCN 和 H₂O₂ 鉴定 SOD 类型时, 常有抑制不完全的现象, 有的因谱带重叠, 即使采用抑制剂也很难有结果, 如香橼的 Fe-SOD, Mn-SOD(图 3D)和朱桔的 Mn-SOD, CuZn-SOD(图 5A). 但在 4% ~ 35% 梯度胶上, 如存在 Fe-SOD 时, 其 R_f 值总是位于 Mn-SOD 和 CuZn-SOD 之间, 枸杞、香橼和朱桔 3 种类型 SOD 在梯度胶上均有此规律可寻. 在梯度胶中以其 R_f 值大小判断 SOD 的类型的结果与用抑制剂处理的结果完全一致, 利用这一特点我们发现了许多高等植物含有 Fe-SOD^[4 9 14].

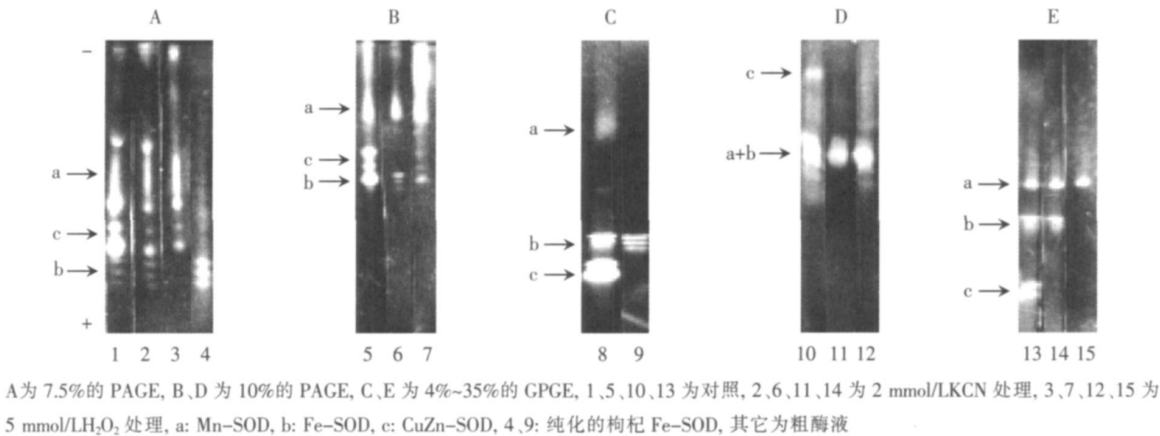


图 3 枸杞(1-9)和香橼(10-15)SOD 同工酶在不同凝胶浓度上的分离及鉴定
Fig.3 Isolation and identification of SOD isozymes from *Lycium chinense*(1-9) and *Citrus wilsonii*(10-15) in the different concentration gels

2. 4 SDS处理对在 GPGE和 PAGE 中 SOD 类型鉴定的影响

样品经 1% SDS 处理后, 以相同量分别进行 GPGE 和 PAGE, 结果见图 4 在梯度胶中, 7 种植物在 A 区的 SOD 谱带活性都被 SDS 抑制, 无一例外, 表明它们都是 Mn-SOD, C 区的 SOD 谱带对 SDS 不敏感, 为 CuZn-SOD, 其中金荞麦和还亮草都含有 1 条对 SDS 敏感的谱带, 但它们经 KCN 和 H₂O₂ 处理谱带消失, 具有 CuZn-SOD 的典型特征, 这些谱带的 R_f 值在经 SDS 处理前后一致. B 区带中被 SDS 抑制的为 Fe-SOD, 其中代代花和南苜蓿的 Fe-SOD 的含量大于 30%, 金荞麦、马兜铃、无花果、三叶草都含有对 SDS 敏感的 Fe-SOD(结果待发表). 经 SDS 处理后留存的为 CuZn-SOD, 而 Mn-SOD 和 Fe-SOD 谱带消失, Mn-SOD 和 Fe-SOD 的区分则可根据它们在 GPGE 图谱上的 R_f 值确定. 由此可见, GPGE 结合 SDS 处理是 SOD 类型鉴定的有效途径之一.

在 PAGE 图谱上经 SDS 处理后, 有的谱带活性基本不变, 如 2 6 和 12 有的出现了一些新谱带, 如 3

7, 9, 13, 15 可能是 CuZn-SOD 与 Mn-SOD、Fe-SOD 重叠所致或是经 SDS 处理改变了 SOD 电荷性质. 番茄在梯度胶 B 区有 2 条对 SDS 敏感的 SOD 谱带(图 4 中 17), 证实了它存在 Fe-SOD^[15], 但在 PAGE 上经 SDS 处理后未发现 Fe-SOD, 显然在 PAGE 中经 SDS 处理不适合于植物粗提液中 SOD 类型判定.

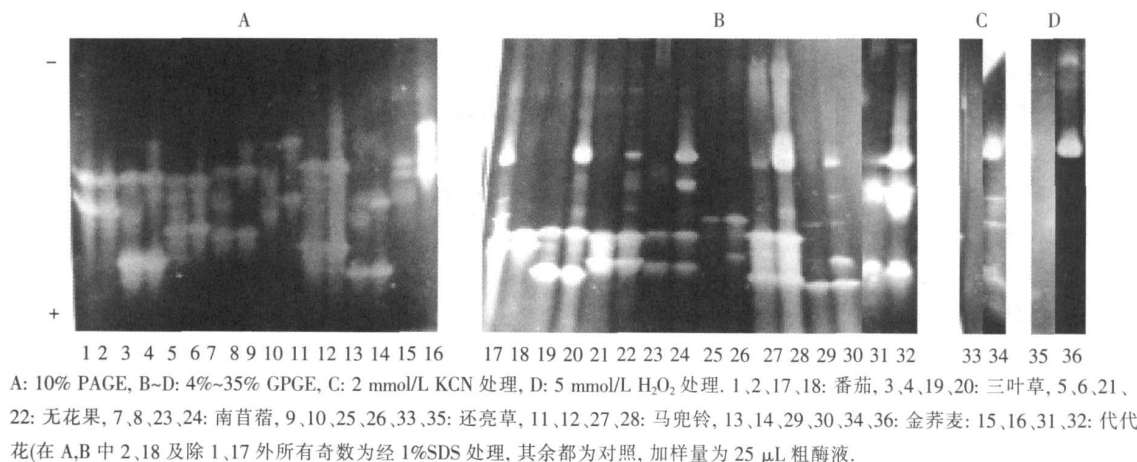


图 4 SDS 和抑制剂处理对 SOD 活性显示的影响

Fig.4 Effect of SDS and inhibitor treatment on SOD activity

2.5 SOD 谱带在 GPGE 和 PAGE 中的相互关系

结果见图 5 朱桔在二次电泳(图 5C)中的 a b 带对应于 GPGE 图谱上的 a b 带(图 5B)和 PAGE 图谱上的 a b 带(图 5A), 分别为 Mn-SOD 和 Fe-SOD, 但在 PAGE 图谱上 a 带 R_f 值大于 b 带; c 带有 2 条为 CuZn-SOD, 在二次电泳和梯度胶中是相互对应, 但在 PAGE 图谱上 a c 带混杂, 从纯化的 Mn-SOD 和 CuZn-SOD 的 PAGE 图谱上可看出 a c 是重叠带^[9]. 在二次电泳中新、老叶中 Fe-SOD 活性都约占 SOD 总活性的 30%, 与 GPGE 中的结果相当, 但在 PAGE 中老叶这一比例约 30%, 新叶低于 5%.

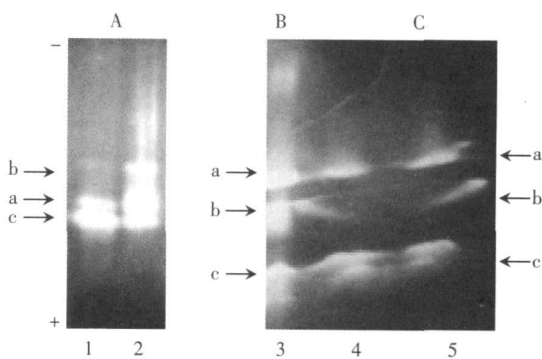
从二次电泳中 SOD 谱带在 PAGE 和 GPGE 中的对应关系可看出, 朱桔 3 种 SOD 类型在 GPGE 中能按照分子大小有效地分离和鉴别, 但在 PAGE 中 SOD 谱带有重叠现象, 分离不彻底, 新叶中的植物次生物质干扰了 SOD 活性显示, 甚至无谱带.

3 讨论

目前国内外在 SOD 同工酶的分离和鉴定研究中都是采用 10% 左右的 PAGE, 但分离效果和图谱都不很理想. 我们在枸杞果实 SOD 研究中采用了 GPGE, 并首次报道了枸杞含有 Fe-SOD^[4], 在随后的研究中陆续发现了何首乌、香橼等十几种高等植物存在 Fe-SOD^[14]. 迄今为止国内外报道含 Fe-SOD 的高等植物仅番茄、银杏、睡莲、芸苔、樟树等十几种^[10-15-19], SOD 同工酶的分离也都是采用 PAGE, 我们的发现与用 GPGE 替代 PAGE 研究 SOD 电泳技术改进密切相关, 但对 GPGE 分离和鉴定 SOD 类型和 SOD 谱带在 GPGE 与 PAGE 中相互对应关系的研究国内外尚未见报道, 本文对此进行了初步探讨.

3.1 GPGE 比 PAGE 能更有效地分离和鉴定 SOD 同工酶类型

本研究表明, 在 GPGE 图谱上的 SOD 谱带可明显分为 A、B、C 3 个区, A 区 R_f 值最小, 对 SDS 敏感, 为分子量最大的 Mn-SOD; C 区 R_f 值最大, 对 SDS 不敏感, 为相对分子质量较小的 CuZn-SOD; B 区的谱带 R_f 值位于二者之间, 经 SDS 处理后消失, 为 Fe-SOD. 由于 GPGE 是根据孔径大小分离酶和蛋白质, 其 R_f 值与



1, 4: 当年新叶, 2, 5: 隔年老叶, a: Mn-SOD, b: Fe-SOD, c: CuZn-SOD, 加样量为 25 μ L

图 5 朱桔 SOD 的 PAGE(A)、GPGE(B) 及二次电泳(C)图谱

Fig.5 10% PAGE(A), 4%~35% GPGE(B) and TGCGE (C) of SOD from *Citrus erythrosa*

SOD 分子大小有相关性^[8], 使酶的分离和鉴定变得相对容易和简单化, 当结合 SDS 处理时能将 CuZn-SOD 和 Mn-SOD、Fe-SOD 区分开, 由于 Fe-SOD 的 R_f 值通常位于 Mn-SOD 和 CuZn-SOD 间, 故可确定 SOD 类型. 本文中枸杞、朱桔、香橼存在的 3 种 SOD 类型符合这一规律, 当采用 KCN 和 H_2O_2 对枸杞、香橼、金荞麦和还亮草等 SOD 类型进行鉴定时, 结果与 GPGE 中各谱带 R_f 值与 SDS 处理相结合来确定酶类型的结果一致, 说明了将 GPGE 中各谱带 R_f 值与 SDS 处理的结果相结合是分离和鉴定 SOD 类型的一种简便有效的新方法. 在传统的 PAGE 中 SOD 谱带受其所带电荷、分子大小、胶浓度等多种因素影响, 分离的 R_f 值变化较大, 如本文中 Fe-SOD 的 R_f 值在枸杞中最大, 在朱桔中最小, R_f 值与 SOD 类型及分子大小间无特定规律可寻, 鉴定 SOD 类型要采用 KCN 和 H_2O_2 等抑制剂, 由于 KCN 为剧毒品, 使 SOD 类型的研究受到了限制, 当酶带相互重叠时甚至无法有结果 (如香橼、朱桔等). 可见, 在 SOD 分离和类型鉴定方面 GPGE 比 PAGE 有更大的优势和应用前景.

3.2 GPGE 分离 SOD 的灵敏度和分辨率

本文对 GPGE 和 PAGE 检测 SOD 的灵敏度和分辨率进行了比较, 结果表明, PAGE 检测牛血 SOD 灵敏度为 10^{-13} mol, GPGE 检测牛血 SOD 灵敏度可达 10^{-15} mol. 由于 GPGE 的灵敏度比 PAGE 高 2 个数量级, 可检测到在 PAGE 图谱上因含量很低难以显示或活性低于 5% 的 Fe-SOD 谱带 (如马兜铃、无花果三叶草等), 它们的 R_f 值都位于 Mn-SOD 和 CuZn-SOD 的 B 区之间. 在 GPGE 图谱中 SOD 谱带清晰, 点样量适中时为扁平形, 边缘明显, 有较高的分辨率, 牛血 SOD 可清晰辨认出 4 条带, 番茄和朱桔粗酶液可分辨出 4~5 条带, 在 PAGE 图谱中因干扰的存在大大影响了谱带的分辨, 它们的谱带较模糊只有 2~3 条. 纯化的枸杞 Fe-SOD 在 GPGE 和 PAGE 中都有 3 条带, 但前者的灵敏度和分辨率明显高于后者. 高的灵敏度和分辨率使实验结果更准确可靠, 可见, GPGE 分离 SOD 特别是 Fe-SOD 是比 PAGE 更好的方法.

3.3 GPGE 分离和鉴定 SOD 的可靠性

本文发现在 C 区对 SDS 敏感的谱带 (金荞麦和还亮草) 也能被 KCN 和 H_2O_2 抑制为 CuZn-SOD, 说明了以 R_f 值来判断 SOD 类型是可靠的. 植物材料中的次生物质丰富, 它们会与 SOD 结合影响酶显示^[20], 朱桔 Fe-SOD (新叶) 和何首乌 Mn-SOD (图片未列出) 在 PAGE 中几乎无带, 在 GPGE 中含量都达 30% 左右, 与二次电泳结果一致, 提示在 GPGE 中经长时间电泳后干扰物可能与 SOD 分离泳出凝胶, 能真实反映出全部 SOD 谱带, 而 PAGE 会造成一些 SOD 的漏检. SOD 谱带在 GPGE 和 PAGE 中对应关系由二次电泳反映出来, GPGE 中的 SOD 谱带通过二次电泳都能和 PAGE 的相互对应, 说明了 GPGE 分离和鉴定 SOD 的结果是可靠的, 但 PAGE 中 3 种 SOD 类型的 R_f 值变化很大, 与酶类型间无相关性, 同时, 通过二次电泳还可以看出, GPGE 对在 PAGE 上重叠和有干扰的 SOD 谱带的分离和鉴定是有效的.

GPGE 在分离和鉴定 SOD 方面有诸多优势, 但对研究带有不同电荷的同一类型 SOD 同工酶, 则 PAGE 会更好地反映出同工酶间的差异, 可见, 将 GPGE 和 PAGE 相结合研究植物 SOD 同工酶是更科学的方法.

[参考文献]

- [1] In-Kwon K in, Yang-In Y in, Young M in-K in, et al. CbK-homologous protein (CbKhp), a metal-binding protein, from streptomyces scoulenensis is involved in expression of nickel containing superoxide dismutase [J]. FEMS Microbiology Letters, 2003, 228 (1): 21-26.
- [2] Yao C L, Wang A L, Wang Z Y, et al. Purification and partial characterization of Cu-Zn superoxide dismutase from haemolymph of oriental river prawn macrobrachium nipponense [J]. Aquaculture, 2007 (270): 559-565.
- [3] 罗广华, 王爱国. 植物 SOD 的凝胶电泳及活性显示 [J]. 植物生理学通讯, 1983 (6): 44-45.
- [4] 程光宇, 魏锦城, 吴国荣, 等. 枸杞果实铁型超氧化物歧化酶的纯化及性质 [J]. 植物生理学报, 1994, 20 (2): 128-136.
- [5] 王亦根, 程光宇, 吴国荣, 等. 牛血红细胞铜锌超氧化物歧化酶的纯化及性质 [J]. 南京师大学报: 自然科学版, 1994, 17 (2): 108-112.
- [6] 程光宇, 高兴, 沈志清, 等. 花生种子铜锌超氧化物歧化酶的纯化及理化性质研究 [J]. 食品工业科技, 2007, 28 (2): 82-85.
- [7] 程光宇, 魏锦城, 吴国荣. SOD 的聚丙烯酰胺梯度凝胶电泳分离和酶活性显示 [J]. 植物生理学通讯, 1994, 30 (4): 248.
- [8] 张龙翔. 生化实验方法和技术 [M]. 北京: 人民教育出版社, 1982, 119-123.

- [9] 程光宇, 吴国荣, 储慧君. 朱桔 Mn-SOD 的纯化、鉴定及浓度梯度胶电泳在其中的应用 [J]. 植物研究, 2004, 24(2): 240-244
- [10] Bridges SM, Salin M L. Distribution of iron-containing superoxide dismutase in vascular plants[J]. Plant Physiol 1981 (68): 275-278
- [11] 方允中, 郑荣梁. 自由基生物学的理论与应用 [M]. 北京: 科学出版社, 2002 162-178
- [12] 赵厚安, 方允中. 锰—超氧化物歧化酶活力测定的五种方法比较研究 [J]. 生物化学杂志, 1988, 4(1): 29-35
- [13] 罗广华, 王爱国, 付爱根. 鉴别超氧化物歧化酶类型的定位染色法 [J]. 生物化学与生物物理进展, 1996, 23(4): 356-359
- [14] 吴国荣, 程光宇, 陆长梅, 等. Fe 型超氧化物歧化酶在高等维管植物中分布的研究 [J]. 中国野生植物资源, 2001, 19 (3): 14-16
- [15] Kwiatowski J, Safianowska A, Kaniga Z. Isolation and characterization of an iron-containing superoxide dismutase from tomato leaves *Lycoersicon scalentun* [J]. Eur J Biochem, 1985, 146: 459-466
- [16] Salin M L, Bridges SM. Isolation and characterization of an iron-containing superoxide dismutase from water lily, *Nuphar luteum* [J]. Plant Physiol 1982(69): 161-165
- [17] Salin M L, Bridges SM. Isolation and characterization of an iron-containing superoxide dismutase from a eucaryote, *Brassica campestris* [J]. Arch Biochem Biophys 1980, 201(2): 369-374
- [18] Salin M L, Duke M V. Purification and characterization of an iron-containing superoxide dismutase from a eucaryote, *Ginkgo biloba* [J]. Arch Biochem Biophys 1985, 243(1): 305-314
- [19] Chen Hua yang, Hu Rong gu i, Wang Baozhong et al. Structural studies of an eukaryotic cambialistic superoxide dismutase purified from the mature seeds of camphor tree [J]. Arch Biochem Biophys 2002, 404(2): 218-226
- [20] 罗广华, 王爱国. 植物 SOD 同工酶活性显示的某些干扰 [J]. 植物生理学通讯, 1993, 29(2): 119-122

[责任编辑: 孙德泉]