

文章编号: 1000-0615(2007)04-0518-07

罗非鱼肝脏中超氧化物歧化酶的提取、纯化与分析

吴燕燕¹, 李来好¹, 郝志明², 岑剑伟¹,
陈胜军¹, 周婉君¹, 杨贤庆¹, 刁石强¹

(1. 中国水产科学研究院南海水产研究所, 广东 广州 510300,

2. 国家食品质量监督检验中心, 广东 广州 510110)

摘要:以奥尼罗非鱼肝脏为原料, 研究加热法提取超氧化物歧化酶(SOD)的工艺条件, 丙酮沉淀回收酶法和 Hitrap™ Q FF 阴离子柱纯化 Cu, Zn-SOD, 并对其酶学性质进行分析。结果表明加热法提取 SOD 时, 在缓冲液中加入 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CuCl}_2$, 调节 pH 为 5.6, $65 \text{ }^\circ\text{C}$ 进行加热处理, 可以提高 SOD 粗酶的稳定性和得率, 其得率为 57%, 粗酶比活为 $(2580 \pm 6) \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 。对酶的酶学性质研究表明纯化后 SOD 比活为 $(4895 \pm 2) \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$, SDS-PAGE 电泳为单一蛋白酶带, 分子量为 36 ku, 最大紫外吸收波长为 265 nm。该酶在 pH 6.0~9.0 具有较好的稳定性, 在 $75 \text{ }^\circ\text{C}$ 以下稳定, 具有较好的耐热性。氰化钾、脲素、 β -巯基乙醇、 H_2O_2 、对 Cu, Zn-SOD 具有明显的抑制作用; EDTA 浓度小于 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 对 Cu, Zn-SOD 活性有明显增强作用, EDTA 浓度大于 $3 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时, 对 Cu, Zn-SOD 活性有抑制作用; DTT 的修饰使 Cu, Zn-SOD 活性显著增加。为进一步研究和应用罗非鱼肝脏 SOD 提供了基础参数。

关键词: 奥尼罗非鱼; 肝脏; 超氧化物歧化酶; 加热法; 纯化

中图分类号: Q 814; S 986.2 **文献标识码:** A

Extraction, purification and analysis of superoxide dismutase from liver of hybrid tilapia

WU Yan-yan¹, LI Lai-hao¹, HAO Zhi-ming², CEN Jian-wei¹, CHEN Sheng-jun¹,
ZHOU Wan-jun¹, YANG Xian-qing¹, DIAO Shi-qiang¹

(1. South China Sea Fisheries Research Institute, Chinese Academy of Fishery Sciences, Guangzhou 510300, China;

2. National Centre for Quality Supervision and Test of Processed Food, Guangzhou 510110, China)

Abstract: In this paper, extracting conditions, purified and character analyzed superoxide dismutase (SOD) from hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* ♀ × *Oreochromis saurea* ♂) liver with heat treatment, followed by acetone precipitation and Hitrap™ Q FF anion chromatography were studied. The results showed that the fine SOD extracting conditions were: $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{CuCl}_2$ in the cushion fluid, pH 5.6, and heat treatment temperature $65 \text{ }^\circ\text{C}$. The yield of rough SOD is 57% and specific activity is $(2580 \pm 6) \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$. The purified SOD obtained from tilapia liver is pale blue-green in color and specific activity is $(4895 \pm 2) \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$. It is a sole proteinase

收稿日期: 2006-11-30

资助项目: 广东省重点项目(2005B33201002); 广东省重点项目(2003C32803)

作者简介: 吴燕燕(1969-), 女, 广东揭阳人, 副研究员, 博士研究生, 主要从事水产品加工与质量安全研究。Tel: 020-84195166,

E-mail: wuyy1028@yahoo.com.cn

belt and the molecular weight is 36 ku as determined with SDS-PAGE electrophoresis. There is a special ultraviolet absorption spectrum at 265 nm. It is stable below 75 °C and at pH 6.0 – 9.0. The effects of some inhibitors on the activity of Cu,Zn-SOD showed that the potassium cyanide, urea, β -mercaptoethanol, hydrogen peroxide and EDTA (which concentration is above 3 mmol·L⁻¹) can obviously inhibit the enzyme, and EDTA (whose concentration is below 3 mmol·L⁻¹) and DDT can activate the enzyme. Further work should be carried out on the sequences of the enzymes and their applications.

Key words: hybrid tilapia (*Oreochromis niloticus* ♀ × *Oreochromis aurea* ♂); liver; superoxide dismutase (SOD); heat treatment; purification

超氧化物歧化酶(SOD)是生物体内一类重要的自由基清除剂,它催化超氧阴离子自由基 O₂⁻· 与 H⁺ 发生歧化反应,生成 H₂O₂ 和 O₂。SOD 作为体内自由基的有效清除剂,能使自由基的形成和清除处于动态平衡,从而可抵御 O₂⁻· 的毒害作用。近年来,国内外不断报道 SOD 可作为药用酶治疗人体的多种疾病,如炎症、肺水肿、自身免疫性疾病等,而且还具有抗肿瘤、抗衰老等作用,因此,SOD 的研究和应用已受到广泛的重视^[1-4]。

不同动物,其 SOD 的含量不同,即使同一种动物,其不同组织的 SOD 含量也各不相同。通常,以肝脏中的 SOD 的含量最为丰富。陆生动植物 SOD 的研究报道较多,海洋生物方面仅有少数品种如贝类的 SOD 被研究,鱼类特别是淡水鱼类的 SOD 酶研究甚少,本文以罗非鱼肝脏为原料,研究其 SOD 酶的提取、纯化及相关性质,为其合理开发应用提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

奥尼罗非鱼 (*Oreochromis niloticus* ♀ × *Oreochromis aurea* ♂) 肝脏由广东省中山食品水产进出口集团有限公司提供。

1.2 主要试剂、仪器

考马斯亮兰 G250,考马斯亮兰 R250,标准分子量蛋白 Mark (北京鼎国生化试剂),牛血清蛋白(广州粤申公司提供生化试剂),三氯乙酸,邻苯三酚,丙酮,(NH₄)₂SO₄ (广州新粤盛公司提供分析纯试剂)。

电子控温水浴锅,紫外分光光度计 GENESYS5, SIGMA 冷冻离心机, SANYO 贮酶冰箱, CHRIST 冷冻干燥机, Hitrap™ Q FF 阴离子交换柱 (Amersham Biosciences 公司),微量进样器,垂直板电泳仪等。

1.3 方法

罗非鱼肝脏中 SOD 的提取方法 参考文献[5-8],分别采用 Weisiger 法、氯仿-乙醇法、加热法,对罗非鱼肝脏中 SOD 进行提取,并以 SOD 总酶活和酶比活进行综合比较,确定 SOD 的最佳提取方法。

罗非鱼肝脏中 SOD 的提取工艺 采用加热法的方法^[5-8],略加改进,取冰冻罗非鱼肝脏,按 1:5(w/v)加入 0.9% NaCl 溶液,匀浆破碎,在提取缓冲液中加入不同浓度的 Cu²⁺ 或 Zn²⁺,考查其对 Cu,Zn-SOD 酶提取效果的影响。在 4 °C 抽提 1 h,离心取上清液。在一定的温度下进行第一次水浴 10 min,水浴离心去沉淀,上清液调整 pH,收集 50% ~ 70% 饱和度 (NH₄)₂SO₄ 沉淀,用水溶解后对 1.4 mmol·L⁻¹ CuCl₂ 透析 24 h,离心去沉淀,在一定的温度下进行第二次水浴,离心取上清液,加入 1:1.5(v/v)的冷丙酮,冰箱 4 °C 静置 30 min, 10 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,沉淀物用 0.005 mol·L⁻¹、pH 7.80 磷酸钠缓冲液溶解,即得 SOD 粗酶。

罗非鱼肝脏中 SOD 的纯化 将上述 SOD 粗酶液放于透析袋,用聚乙二醇 20 000 吸水浓缩,收集浓缩液,加入 Hitrap™ Q FF 阴离子交换柱中进行纯化^[2],柱体积 5 mL,用 pH 7.80 (0.005 ~ 0.25 mol·L⁻¹) 磷酸钠缓冲液梯度洗脱,流速 2.5 mL·min⁻¹,2 min 收集 1 管,紫外检测波长为 280 nm。测定各管的蛋白酶活性和蛋白质含量,收集蛋白酶活性峰,置于透析袋中用聚乙二醇 20 000 浓缩,冻干。

SOD 酶活性测定方法 微量邻苯三酚自氧化法^[9]。

蛋白质测定方法 考马斯亮兰 G250 比色法,所做标准曲线为牛血清蛋白^[10]。

酶纯度和分子量的测定 采用 SDS-PAGE 电泳测定^[11]。

SOD 紫外光扫描分析 紫外分光光度计

GENESYS 5 扫描分析 SOD 酶的最大吸收波长。

抑制剂对 SOD 活性的影响分析 将一定浓度的氰化钾、脲素、 β -巯基乙醇、 H_2O_2 、EDTA、DDT 分别加入 SOD 酶中,作用 5 min,测定 SOD 酶活性变化,分析其对 SOD 酶活性的影响。

SOD 酶稳定性分析 分别用不同的温度和 pH 缓冲溶液处理 SOD 酶,分析温度和 pH 对其稳定性的影响。

1.4 数据处理方法

酶的提取、纯化工艺的确定和性质测定分析都均 3 次以上重复实验,所有试验数据用 SAS (V8.0)、Excel 软件进行处理,数据以平均值 \pm 标准差 (\pm SD) 表示。

2 结果与分析

2.1 罗非鱼肝脏中 SOD 的提取方法

以 SOD 总酶活和酶比活综合比较不同方法提取 SOD(表 1)。

表 1 不同方法提取 SOD 结果比较
Tab.1 Comparison of SOD extracting results by different methods

提取方法 extracting methods	总蛋白(mg) total protein	总酶活(U) total protease activity	酶比活 ($U \cdot mg^{-1}$) specific activity
Weisiger 法	16.6	51000	3072
加热法 heat treatment	5.79	29170	5038
氯仿-乙醇法 chloroform-ethanol	6.0	15625	2604

由表 1 可以看到总酶活由高到低分别为 Weisiger 法、加热法、氯仿-乙醇法,但酶的比活由高到低加热法、Weisiger 法、氯仿-乙醇法。这主要是 Weisiger 法提取过程简单,SOD 失活少,所

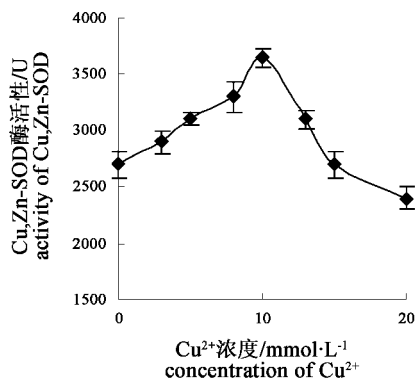


图 1 Cu^{2+} 对 Cu,Zn-SOD 提取的影响

Fig.1 Effect of Cu^{2+} on extracting of Cu,Zn-SOD

以总酶活高,但杂蛋白含量高,酶的比活率就低,该法将使进一步的纯化过程复杂化,不适合工业生产。加热法中对 SOD 提取液进行了二次加热处理,一次饱和 $(NH_4)_2SO_4$ 分级层析去除了大部分的杂蛋白,故酶的比活最高。氯仿-乙醇作为萃取剂从罗非鱼肝脏中萃取出 SOD,表 1 表明氯仿-乙醇法得到的 SOD 总酶活与酶比活都不高,且在生产过程中需要考虑有机溶剂的回收,增加成本。综上所述,选用加热法从罗非鱼肝脏提取 SOD,本方法简单,成本低,而且通过工艺的改进,可以有效提高 SOD 的活性。

2.2 罗非鱼肝脏中 Cu,Zn-SOD 提取的工艺条件

Cu^{2+} 对 Cu,Zn-SOD 提取酶活的影响 当加入的 Cu^{2+} 浓度低于 $10 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$,提取的 Cu,Zn-SOD 酶活会随着加入 Cu^{2+} 浓度增加而增高。但是 Cu^{2+} 浓度高于 $10 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 时,提取的 Cu,Zn-SOD 酶活会下降(图 1)。这可能是由于在提取、加热过程中部分的 Cu^{2+} 离子从 Cu,Zn-SOD 中脱落,适当的补充 Cu^{2+} 离子有助于 Cu,Zn-SOD 活性的稳定。但由于 Cu^{2+} 是重金属离子,其本身也是一种蛋白质变性剂。所以高浓度时则会有一定的变性作用而导致 Cu,Zn-SOD 的提取率下降。因此提取罗非鱼肝脏中的 Cu,Zn-SOD 时,在缓冲液中加入 $10 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$ 的 $CuCl_2$,可以增强酶的稳定性及提高回收率。

Zn^{2+} 对 Cu,Zn-SOD 提取酶活的影响

Zn^{2+} 对 Cu,Zn-SOD 提取酶活的影响不如 Cu^{2+} 明显(图 2)。 Zn^{2+} 浓度在 $0 \sim 20 \text{ mmol} \cdot L^{-1}$,提取的 Cu,Zn-SOD 酶活变化不明显,可能是 Cu,Zn-SOD 中 Zn^{2+} 结合的比 Cu^{2+} 牢固,不易从 Cu,Zn-SOD 脱落下来的原故,故在提取液中不需加入 Zn^{2+} 。

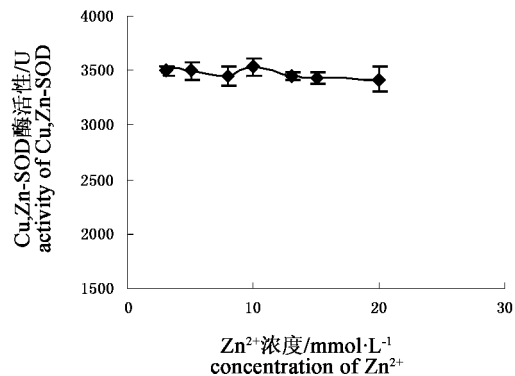


图 2 Zn^{2+} 对 Cu,Zn-SOD 提取的影响

Fig.2 Effect of Zn^{2+} on extracting of Cu,Zn-SOD

热处理温度的选择 SOD 在 0 ~ 35 °C 范围时酶活性随温度的升高而下降;在 35 ~ 50 °C 范围活性随温度的升高而上升;在 50 ~ 70 °C 范围活性趋于稳定;大于 70 °C 时酶活开始下降(图 3)。结果表明,0 ~ 35 °C 是 SOD 酶失活的敏感温度范围,其原因是粗 SOD 酶中含有较多的杂蛋白,其中也有较多的蛋白酶。在 35 °C 左右蛋白酶活性较高,使 SOD 水解失去活性;50 ~ 70 °C 活性较高且稳定;70 °C 以后 SOD 因热变性而下降。因在 65 °C 时 SOD 保持有较高的活性,该温度下其它杂蛋白都变性沉淀了,故两次水浴加热处理除去杂蛋白均选择 65 °C 下进行。

热处理 pH 的选择 在 pH 4.50 ~ 7.50 条件下,65 °C 水浴后 SOD 酶活性仍比较高。在 pH

5.50 ~ 6.00, Cu, Zn-SOD 残留酶活性最高,稳定性较好(图 4)。因此,热处理前将 Cu, Zn-SOD 粗液的 pH 值调为 5.60 可以减少 Cu, Zn-SOD 损失。

2.3 罗非鱼肝脏中 Cu, Zn-SOD 的纯化

罗非鱼肝脏中 Cu, Zn-SOD 各分离、纯化步骤的结果如表 2, Hitrap™ Q FF 阴离子交换柱洗脱曲线见图 5。图 5 中有 3 个蛋白峰,峰 I 是未被吸附的组分,已测得它含有少量酶活性,可能为少量未被吸附的 SOD 和大量杂蛋白等物质所组成;Cu, Zn-SOD 在峰 II 中被大量洗脱出来收集该峰为样品峰,此时磷酸缓冲液的浓度为 0.15 ~ 0.20 mol·L⁻¹;III 为一杂蛋白峰无酶活性。所得 Cu, Zn-SOD 样品比未经纯化前粗酶液提纯了 110.9 倍。

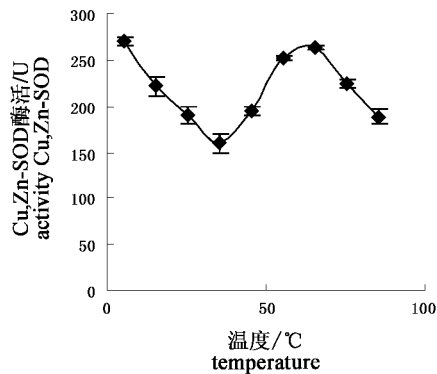


图 3 加热处理温度的选择
Fig.3 Heat temperature option

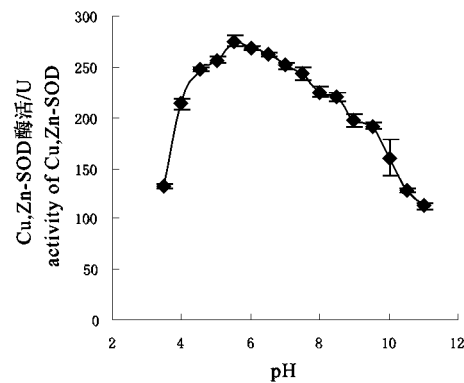


图 4 加热处理 pH 的选择
Fig.4 Heat pH option

表 2 罗非鱼肝脏 Cu, Zn-SOD 提取纯化结果

Tab.2 Purification results of Cu, Zn-SOD from hybrid tilapia liver

步骤 step	总体积(mL) total volume	蛋白浓度 (mg·mL ⁻¹) protein concentration	酶活力 (U·mL ⁻¹) total enzyme activity	比活力 (U·mg ⁻¹) specific activity	得率(%) yield	纯化倍数 purification fold
匀浆提取液 extract liquid	150	8.87 ± 0.041	391 ± 10	44 ± 2	100.0	1
一次加热 first heat treatment	145	0.46 ± 0.002	353 ± 10	765 ± 1	87.2	17.3
硫酸铵层析 (NH ₄) ₂ SO ₄ precipitation	30	0.89 ± 0.001	1369 ± 50	1530 ± 3	70.0	34.7
二次加热 second heat treatment	30	0.43 ± 0.001	1116 ± 10	2580 ± 6	57.0	58.3
丙酮沉淀 acetone deposition	15	0.44 ± 0.001	1600 ± 70	3611 ± 4	40.9	81.8
Hitrap™ Q FF 纯化 Hitrap™ Q FF chromatography	25	0.15 ± 0.002	769 ± 100	4895 ± 2	31.8	110.9

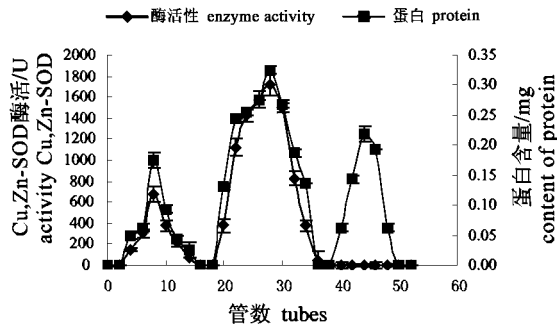


图5 Hitrap™ Q FF 阴离子交换层析纯化 Cu,Zn-SOD
 Fig.5 Purification Cu,Zn-SOD
 by Hitrap™ Q FF chromatography

2.4 Cu,Zn-SOD 的纯度鉴定及分子量的测定

将上述纯化的样品经 SDS-PAGE 电泳、染色后为一条电泳带(图 6),说明纯化后的 SOD 酶为高度均一性蛋白质。根据标准蛋白 marker SDS-PAGE 电泳结果作对数分子量 - 相对迁移率曲线如图 7。用直尺量得样品蛋白的相对迁移率为 $R_f = 0.70$,根据以上的函数计算得该 Cu,Zn-SOD 酶的对数分子量为 36 ku。

2.5 罗非鱼肝脏中 SOD 酶性质分析

SOD 酶紫外光扫描分析 在波长 220 ~ 350 nm 对实验提取纯化的 SOD 样品进行紫外光全扫描(图 8),图谱中 SOD 的最大吸收波长为 265 nm,而不是一般蛋白的 280 nm,这表明该酶确

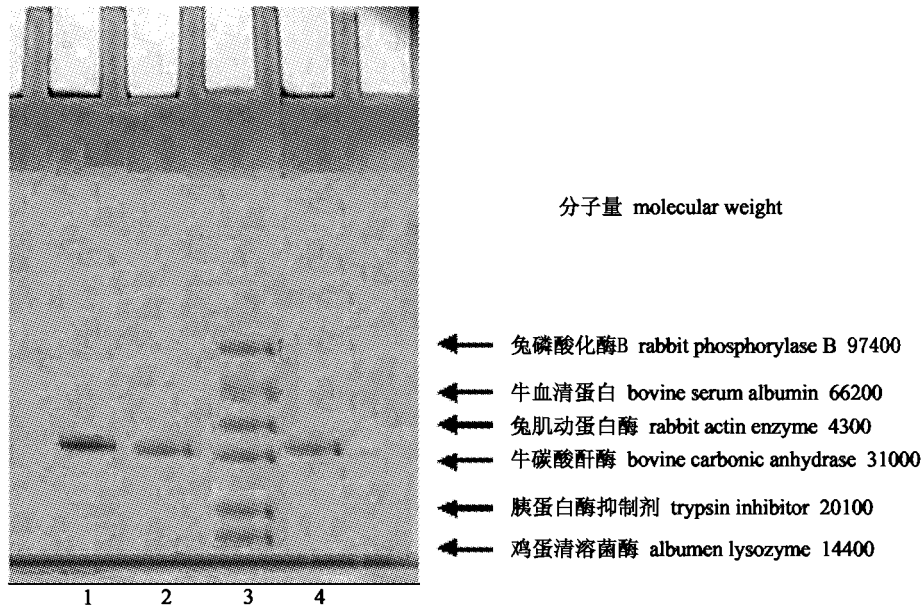


图6 Cu,Zn-SOD 的 SDS-PAGE 电泳
 Fig.6 SDS-PAGE electrophoresis of Cu,Zn-SOD from hybrid tilapia liver
 1,2,4 为 Hitrap™ Q FF 阴离子交换柱纯化出来的 Cu,Zn-SOD 样品液;3 为低分子量标准蛋白质
 1,2,4: active compositions of purification Cu,Zn-SOD by Hitrap™ Q FF chromatography
 3: SDS-PAGE Molecular weight markers for proteins

实为 Cu,Zn-SOD,因为 Cu,Zn-SOD 的明显特征是最大紫外吸收波长在 250 ~ 270 nm 范围内,这与文献报导的茶叶、鸭血中的 Cu,Zn-SOD 最大紫外吸收波长在 265.4 nm 和 258 nm 相符^[12-14]。

Cu,Zn-SOD 热稳定性 取 8 支试管,内装有等量的样品 Cu,Zn-SOD 于 40 ~ 75 °C,热处理 15 min,迅速冷却,离心,测上清液残留 SOD 酶活,结果如图 9。

从实验结果可见,75 °C 水浴中热处理 15 min 后其剩余酶活尚有 77%。说明 Cu,Zn-SOD 具有较好的耐热性质。

pH 对 Cu,Zn-SOD 稳定性的影响 将样品 Cu,Zn-SOD 于不同 pH 的缓冲液中,于 20 °C 处理 15 min 后测定 Cu,Zn-SOD 残留酶活,结果如图 10。

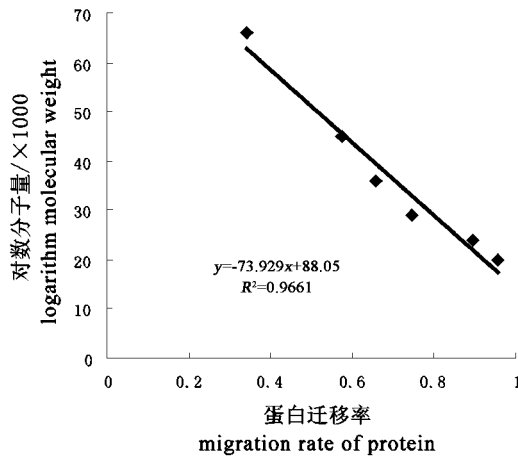


图 7 对数分子量 - 相对迁移率曲线
Fig.7 The curve of logarithm molecular weight-relative migration rate of protein

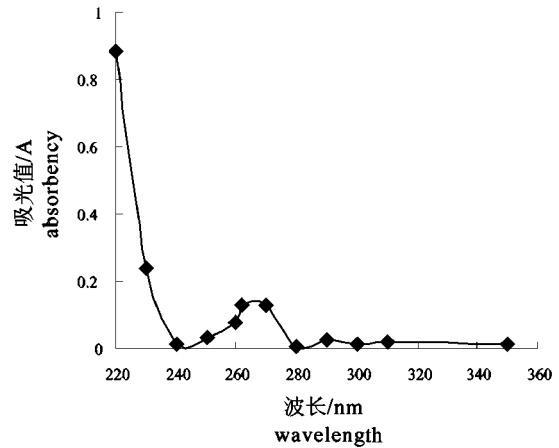


图 8 罗非鱼肝脏 SOD 紫外光吸收扫描图
Fig.8 Ultraviolet absorbency scan of SOD from hybrid tilapia liver

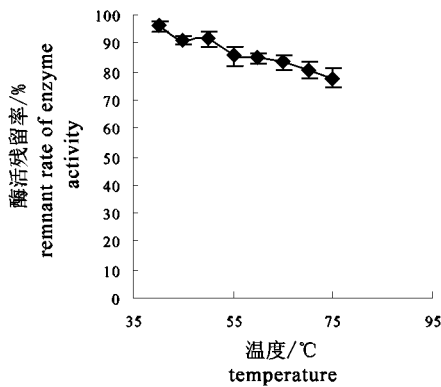


图 9 温度对 Cu,Zn-SOD 活性的影响
Fig.9 Effect of temperature on activity of Cu,Zn-SOD

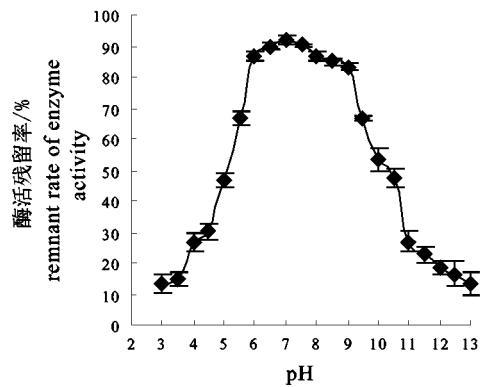


图 10 pH 对 Cu,Zn-SOD 活性的影响
Fig.10 Effect of pH on activity of Cu,Zn-SOD

该样品 Cu,Zn-SOD 在 pH 6 ~ 9 范围内,其稳定性好,对 pH 不甚敏感。在 pH < 6 时 SOD 失活的原因可能是 SOD 中 Cu²⁺ 结合位置结合点发生了移动,pH < 3.6 时 SOD 中大数目的 Zn²⁺ 离子要脱落。pH > 11.0 酶失活的原因可能是酶构象发生了变化^[15]。

抑制剂对 SOD 活性的影响 分别用不同的抑制剂对 SOD 进行处理,测定 SOD 的酶活,各生化试剂对 SOD 影响见表 3。

从罗非鱼肝脏中提取的 Cu,Zn-SOD 对氰化物比较敏感,只有 0.5 mmol·L⁻¹时就可以让酶活性降低到原来的 11%,当浓度为 1 mmol·L⁻¹时就可以完全抑制 SOD 的活性。H₂O₂ 能使 Cu,Zn-SOD 酶活性显著降低。3% H₂O₂ 可让 SOD 酶活性降低到原来的 26.5%。脲素的加入使 Cu,Zn-

SOD 酶活性显著降低。当脲素浓度为 1 mol·L⁻¹时,Cu,Zn-SOD 酶的活力几乎全丧失。原因是脲素可破坏蛋白内的氢键,Cu,Zn-SOD 失活严重。

表 3 抑制剂对 Cu,Zn-SOD 活性的影响

Tab.3 Effect of inhibitor on activity of Cu,Zn-SOD

试剂 reagent	浓度 concentration	残留酶活率(%) remnant rate of enzyme activity
空白 blank	/	100
KCN	0.5 (mmol·L ⁻¹)	11
	1.0 (mmol·L ⁻¹)	0
H ₂ O ₂	3(%)	26.5
脲素 urea	0.5(mol·L ⁻¹)	26.7
	1(mol·L ⁻¹)	3.7
β-巯基乙醇 β-mercaptoethanol	0.5(%)	15.0
EDTA·2Na	1(mmol·L ⁻¹)	151.9
	3(mmol·L ⁻¹)	107.6
	10(mmol·L ⁻¹)	51.9
DTT	5(mmol·L ⁻¹)	265.8

β -巯基乙醇可以将二硫键还原成巯基,破坏二硫键,导致 Cu,Zn-SOD 酶活性结构被破坏,因此 0.5% β -巯基乙醇存在下,Cu,Zn-SOD 活性显著下降,只有原来的 15.0%。

EDTA 是金属螯合剂,当其浓度小于 3 mmol·L⁻¹时,它可以螯合溶液中的其它金属离子以减少它们对酶活性的干扰,从而使 Cu,Zn-SOD 活性明显增强。当浓度大于 3 mmol·L⁻¹时,EDTA 易与 Cu,Zn-SOD 中的金属离子结合,使酶失活,所以在提取过程中适量添加 Cu²⁺,有助于增强 SOD 酶的稳定性。

DTT 的修饰使 Cu,Zn-SOD 活性显著增加,这与 DTT 具有强还原性质,可以将 Cu,Zn-SOD 的活性基团还原有关。

3 结论

SOD 能够有效地催化超氧阴离子 O₂⁻ 的歧化反应,对氧自由基引起的许多疾病都有较好的疗效,并可减慢机体衰老,所以将 SOD 开发应用为药物具有积极的意义。罗非鱼是目前养殖加工量最大的鱼类,加工过程产生大量内脏等下脚料,本研究针对罗非鱼肝脏 SOD,这将为罗非鱼加工下脚料的开发提供一条新的途径。

从鱼类中提取 SOD 的研究较少,以往多是从动、植物的细胞中提取,本文参照前人这些研究,确定了提取罗非鱼肝脏 SOD 的最佳工艺条件,即采用改进加热法,在提取缓冲液中加入 10 mmol·L⁻¹的 CuCl₂,pH 调节为 5.6,热处理温度为 65 ℃,可以大大提高 SOD 粗酶的得率和比活。

在酶学性质研究方面,纯化后的 SOD 比活为 (4895 ± 2) U·mg⁻¹,经 SDS-PAGE 电泳为单一蛋白酶带,其分子量为 36 ku,最大紫外吸收波长为 265 nm。该酶在 pH 6.0 ~ 9.0 具有较好的稳定性,在 75 ℃ 以下稳定,具有较好的耐热性。王跃军等^[16]曾研究扇贝内脏团中 SOD,其在 pH 5.0 ~ 11.0,70 ℃ 以下具有较好的稳定性,与本研究结果相近。而动物来源的如猪血中 SOD 的热稳定性则较差。这表明水生生物中的 SOD 具有更好的耐热稳定性,在应用范围上将可更广。纯化后的 Cu,Zn-SOD 经 DDT 修饰作用,活性显著增加。而 EDTA 浓度在低于 3 mmol·L⁻¹时,对 Cu,Zn-SOD 活性有明显增强作用,EDTA 浓度大于 3

mmol·L⁻¹时,对 Cu,Zn-SOD 活性有抑制作用;氰化钾、脲素、 β -巯基乙醇、H₂O₂、对 Cu,Zn-SOD 具有明显的抑制作用。这将为下一步深入研究罗非鱼肝脏中 Cu,Zn-SOD 的其它性能,Cu,Zn-SOD 在罗非鱼体内的代谢动力学及其工业应用奠定了基础。

参考文献:

- [1] 张立新,杭 瑚,王宗花,等.某些常见蔬菜抗氧化活性的研究[J].食品科学,1999(11):21-23.
- [2] 郭振飞.照光对玉米黄幼苗超氧化物酶活性的影响[J].植物生理学报,1997,23(3):279-282.
- [3] 吴思芳.啤酒废酵母提取 SOD 研究[J].食品科学,2000,(3):22-24.
- [4] 郑荣梁.自由基生物学[M].北京:高等教育出版社,1989:236-300.
- [5] 王富军,袁勤生.动物肝脏中超氧化物歧化酶的分离纯化方法[J].中国生化药物杂志,1992,66(3):11-14.
- [6] MCord J M, Fridovich I. Superoxide dismutase an enzymic function for erythrocyte hemocuprein [J]. J Biolchem, 1969,244:6049-6052.
- [7] Stellwen E, Wilgue H. Biochemistry of thermophily [M]. New York: Academic Press, 1978.
- [8] Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to, accrylamidegels[J]. Anal Biochem, 1971,140:276-280.
- [9] 范 晓,严小军,房国明,等.高分子量褐藻多酚抗氧化性质研究[J].水生生物学报,1999,23(5):494-499.
- [10] 赵亚华,高向阳,罗素萍,等.生物化学与分子生物学实验技术教程[M].北京:高等教育出版社,2005:95-96.
- [11] 郭尧君.蛋白质电泳实验技术[M].北京:科学出版社,2005:100-106.
- [12] 李 梅,饶丽娟.超氧化物歧化酶的研究现状[J].塔里木农垦大学学报,1998,6(10):72-76.
- [13] 李书宽,邹玉珍.茶叶铜锌超氧化物歧化酶的纯化及其性质研究[J].生物化学杂志,1991,7(4):401-406.
- [14] 余瑞元,王 楠,徐长法.北京鸭红细胞超氧化物歧化酶——分离纯化和性质[J].北京大学学报(自然科学版),1990,26(4):475-481.
- [15] 李泽浩.应用生物化学[M].乌鲁木齐:新疆大学出版社,1996:66-70.
- [16] 王跃军,孙 溢,李 民,等.扇贝超氧化物歧化酶的纯化与性质研究[J].海洋水产研究,1998,19(2):69-75.