

修饰 SOD 及未修饰 SOD 的稳定性比较研究

铁翠娟 张 怀** 张博润* 王少华

(中国科学院微生物研究所 北京 100080) (青岛三生生物有限公司 青岛 266500)

摘要 测定了分子修饰 SOD 的酶活力及其在不同温度下的稳定性, 与未修饰的 SOD 进行了比较, 对在不同温度下测定的结果进行数据处理, 经推算得出分子修饰 SOD 在 25℃ 条件下, 保存 95% 的酶活力达 3.5 年, 保存 90% 的酶活力达 7.2 年, 未修饰 SOD 在 25℃ 条件下, 保存 95% 的酶活力为 103d, 保存 90% 的酶活力为 213d.

关键词 SOD, 分子修饰 SOD, 稳定性

分类号 Q554 **文献标识码** A **文章编号** 0253-2654(1999)-02-0096-98

THE COMPARATION OF THE STABILITY OF MOLECULAR MODIFIED AND UNMODIFIED SUPEROXIDE DISMUTASES

Tie Cuijuan, Zhang Huai, Zhang Borun

(Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080)

Wang Shaohua

(Qingdao SanSheng Biology Limited Company, Qingdao 266500)

Abstract The activity and the stability of molecular modified superoxide dismutase in different temperature were determined, and compared with unmodified superoxide dismutase. The results indicate: molecular modified superoxide dismutase's storage period $t_{0.95}$ is 3.5 years, $t_{0.9}$ is 7.2 years at 25℃; unmodified superoxide dismutase's storage period $t_{0.95}$ is 103 days, $t_{0.9}$ is 213 days at 25℃.

Key words Superoxide diumutase, Molecular modified superoxide dismutase, Stability

超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, 简称 SOD)是的一种非常重要和有效的自由基清除剂, 同人体的疾病和衰老有密切的关系, 是一种重要的生物酶药物。但天然 SOD 在体内的半衰期只有 5~8min, 在常温下亦不稳定, 从而限制了 SOD 的应用和产品的质量。如何解决其稳定性, 是 SOD 能否广泛应用的先决条件, 也是国内外有关研究人员和有关厂家关注的热点问题^[1~4]。关于 SOD 分子修饰的方法主要有以下几种: (1)对 SOD 氨基酸残基进行化学修饰; (2)用水溶性大分子(如聚乙二醇、聚蔗

糖、右旋糖苷、聚烯属烃基氧化物等)对 SOD 进行共价修饰; (3)对 SOD 进行酶切修饰^[5~6]。本文报道了一种分子修饰 SOD 及未修饰 SOD 的稳定性比较研究。

1 材料和方法

1.1 试剂和仪器

1.1.1 邻苯三酚: 贵州遵义化工厂生产, 用

*通讯联系作者

**北京化工大学生物化工系94届学生

1998-05-27收稿, 1998-08-21修回

10mmol/L HCl 配制成 45mmol/L 的溶液。

1.1.2 pH8.2, 50mmol/L 的 Tris-HCl 缓冲液。

1.1.3 分子修饰 SOD(青岛三生生物有限公司), 未修饰 SOD(兰州大学), SOD 标准品 (Sigma 公司)。

1.1.4 UV-754紫外可见分光光度计和 pH 数字显示计(上海第三分析仪器厂)。

1.2 测试方法

1.2.1 邻苯三酚自氧化法测定 SOD 活力: 参照文献 [2] 的方法, 稍加改进, 具体操作如下。

(1) 邻苯三酚自氧化速率的测定: 在 25℃, 4.5mL 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液 (pH8.2) 中加入适量 45mmol/L 邻苯三酚, 迅速摇匀倒入光径 1cm 比色杯, 对照用 10mmol/L HCl 代替, 在 325nm 波长下每隔 30s 测一次 A 值, 计算线性范围内每分钟 A 的增值, 即为邻苯三酚的自氧化速率。要求自氧化速率控制在 0.070 OD / min 左右。

(2) SOD 酶活的测定: 测定方法与测邻苯三酚自氧化速率相同, 在加入邻苯三酚前加入待测的 SOD 样液, 同时测定 Sigma 公司的标准品, 对所测样品 SOD 酶活力进行校正, 测得数据按文献 [2] 的公式计算酶活力。

1.2.2 温度对 SOD 活性的影响: 将待测酶样的水溶液置于不同温度的恒温水浴中, 每隔一段时间测一次酶活。

2 结果和讨论

2.1 分子修饰 SOD 和未修饰 SOD 活力的测定及校正

根据改良的邻苯三酚自氧化法测定样品的酶活力, 同时测定 Sigma 公司的 SOD 标准品, 对所测样品 SOD 酶活力进行校正, 按文献 [2] 的公式计算, 测得分子修饰 SOD 的酶活力为 1540u / mL, 未修饰 SOD 的酶活力为 1652u / mL。

2.2 不同温度对 SOD 酶活的影响

采用常规方法, 分别测定分子修饰 SOD 及未修饰 SOD 在不同温度条件下酶活力和时间的关系, 结果见图 1 和图 2。

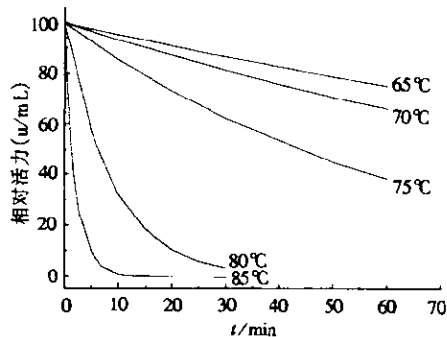


图1 修饰SOD在不同温度下酶活力和时间的关系

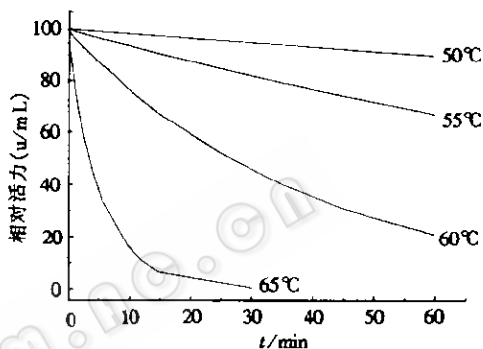


图2 未修饰SOD在不同温度下酶活力和时间的关系

令 SOD 在 t 时刻的相对活力 $Cr(\%) = C / Co \times 100$ (Co 为在不同温度下 SOD 的初始酶活)。根据在水溶液中 SOD 的失活为假一级反应^[7], 得 $\ln Cr = 4.606 - kt$, 以 $\ln Cr$ 对 t 进行线性回归分析, 可求得相应温度下的 k 值, 又根据

表1 分子修饰SOD在不同温度下的失活速率常数

$t(^{\circ}C)$	$1/T \times 10^3 (1/K)$	$k(\text{min}^{-1})$	$\ln k$	相关系数 r
65	2.9573	4.6727×10^{-3}	-5.3660	-0.9826
70	2.9142	6.8402×10^{-3}	-4.9849	-0.9841
75	2.8723	1.5828×10^{-2}	-4.1460	-0.9950
80	2.8317	0.1107	-2.2009	-0.9940
85	2.7921	0.4662	-0.7631	-0.9784

将 $1/T$ 与 $\ln k$ 线性回归得如下公式: $\ln k = 79.6421 - 28931.3/T$
 $r = -0.9661$

表2 未修饰SOD在不同温度下的失活速率常数

$t(^{\circ}C)$	$1/T \times 10^3 (1/K)$	$k(\text{min}^{-1})$	$\ln k$	相关系数 r
50	3.0945	1.9363×10^{-3}	-6.2470	-0.9920
55	3.0474	6.8252×10^{-3}	-4.9871	-0.9658
60	3.0017	2.6379×10^{-2}	-3.6352	-0.9778
65	2.9573	0.1807	-1.7109	-0.9655

将 $1/T$ 与 $\ln k$ 线性回归得如下公式: $\ln k = 94.6367 - 32652.9/T$
 $r = -0.9933$

表3 分子修饰SOD和未修饰SOD在常温下的保存期比较

样品名称	SOD活性(u/mL)	$t_{0.95}$ (d)	$t_{0.9}$ (d)
分子修饰SOD	1540	1273	2621
未修饰SOD	1652	103	213

注： $t_{0.95}$ 表示在25℃条件下保存95%的酶活力，其余类推。

$k = Ae^{-E/RT}$ ，其对数形式为 $\ln k = -E/RT + \ln A$ ，以 $\ln k$ 对 $1/T$ 进行线性回归分析，得到回归方程，结果列于表1和表2。

由一级反应公式 $t_{0.9} = 0.1054 / K$ ， $t_{0.95} = 0.0512 / K$ 可推算得出 SOD 在常温下的有效贮存期，结果见表3。本实验结果表明，分子修饰 SOD 在常温下保存 90%、95% 的酶活力分别是

未修饰 SOD 的 12 倍左右。

参 考 文 献

- [1] 张博润, 谭华荣. 微生物学通报, 1992, 19(6): 352~357.
- [2] 张博润, 刁爱坡, 欧阳京. 微生物学通报, 1997, 24: (3): 178~180.
- [3] 马安德, 崔铭玉, 李毓琦等. 第一军医大学学报, 1995, 15(1): 51~52.
- [4] 赵晓斌, 钱红. 日用化学工业, 1995, 225(5): 6~8.
- [5] Luigi L, Jeans Z P, Andrea C. Arch, Biochem, Biophys, 1992, 293(10): 153~157.
- [6] 邹国林, 朱彤, 裘名宜. 生物学通报, 1992, (5): 10~11.
- [7] 丁绪亮, 徐景达, 杨晟等. 基础化学. 北京: 人民卫生出版社, 1983, 103~105.