

· 研究简报 ·

氯化三丁基锡对泥蚶 SOD 的影响[△]

肖 湘, 韩雅莉, 袁惠香, 林克波

(汕头大学理学院 生物学系, 广东 汕头 515063)

摘 要:从泥蚶中提纯超氧化物歧化酶(SOD), 分析不同浓度氯化三丁基锡(TBTCl)在不同条件下对泥蚶 SOD 活性的影响。结果表明, TBTCl 在室温条件下对 SOD 活性的影响比在 4℃ 条件下大很多, 室温下 TBTCl 浓度达 $200\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ (以 Sn 含量计) 时与 SOD 作用 72h 酶活力只保留了 58.1%, 而在 4℃ 下酶活力还保留了 90.9%; 随着 TBTCl 浓度的增大及作用时间的延长, SOD 的活性逐渐降低; TBTCl 使 SOD 的耐热、耐酸碱能力降低; PAGE 显示, SOD 同工酶谱带随着 TBTCl 浓度的增大而逐渐消失。

关键词:泥蚶; 氯化三丁基锡; SOD

中图分类号:R12 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-3461(2004)03-0028-03

Effects of tributyltin chloride on superoxide dismutase from *Tegillarca granosa*

XIAO Xiang, HAN Ya-li, YUAN Hui-xiang, LIN Ke-bo

(Department of Biology, Science Faculty, Shantou University, Shantou 515063, China)

Abstract: Superoxide dismutase(SOD) was purified from *Tegillarca granosa* and the effects of tributyltin chloride(TBTCl) on the enzyme activity of the SOD were analyzed at different conditions. The results showed that the effects of TBTCl on SOD activity were more obvious at room temperature than at four degrees centigrade. 58.1% of the enzyme activity was reserved after SOD was incubated with $200\mu\text{g} \cdot \text{mL}^{-1}$ of TBTCl for 72 hours at room temperature, while 90.9% of the enzyme activity was reserved at four degrees centigrade. The enzyme activity of SOD was reduced with the increase of TBTCl concentration and interaction time. TBTCl could reduce heat-resisting, acid-resisting and alkali-resisting abilities of SOD. With TBTCl concentration increase, SOD isozyme bands in the graph of polyacrylamide gel electrophoresis were getting weaker.

Key words: *Tegillarca granosa* (Linnaeus); tributyltin chloride; superoxide dismutase (SOD)

超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)是生物体内重要的抗氧化酶, 能清除对生物体有毒害作用的超氧阴离子自由基, 具有抗衰老、抗肿瘤、抗辐射、抗炎症等功效^[1]。

有机锡化合物作为海洋有效的附着生物

防污涂料, 被广泛用作船体涂层的添加剂和渔网的保护剂, 但同时也对一些非目标生物构成威胁。水相中的有机锡会对敏感的非靶生物产生不良影响, 并且通过食物链的富集而影响人类健康。软体动物对于有机锡的毒害作用极为敏感, 对有机锡的富集系数高达

[△] 国家自然科学基金资助项目(项目编号:30271033)

50000 倍。有机锡在牡蛎中的积累会阻碍卵黄蛋白的合成,产生雌雄同体;干扰钙代谢,使贝壳畸形变厚;也能诱导螺类性畸变^[2~6]。泥蚶是有名的海产品,它具有健胃、温中、益血、润五脏、利关节等作用^[7]。本文主要分析了 TBTCI 对泥蚶 SOD 的体外作用,探讨了有机锡对海洋软体动物生化功能的影响。

1 材料与方法

1.1 实验材料

泥蚶 *Tegillarca granosa* (Linnaeus) 购于汕头市场,其生物品种由汕头大学生物学系韩雅莉教授鉴定。

1.2 主要仪器和试剂

J2-21M 高速冷冻离心机(美国 Beckman 公司),TB-600 梯度搅拌器(上海统一生化仪器社),HD-1 核酸蛋白检测仪(上海沪西仪器厂),751-GW 分光光度计(上海分析仪器厂),LGJ0.5-II 型冷冻干燥机(军事科学院实验仪器厂)。

DE-52(英国 Whatman 公司),Sephadex G-75(Pharmacia 公司),TBTCI(美国 Acros 公司),考马斯亮蓝 R250(美国 Fluka 公司),其余试剂为国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 泥蚶 SOD 的分离纯化^[8,9] 新鲜泥蚶,洗净,去壳取肉称重,加入等体积(w/v)预冷 1.15% 氯化钾匀浆,4.5kr·min⁻¹ 离心 10min;上清液置于 60℃ 水浴 10min,8kr·min⁻¹ 离心 10min;上清液加入固体硫酸铵达 60% 饱和度,4℃ 静置 3h,10kr·min⁻¹ 离心 10min;上清液加入固体硫酸铵达 90% 饱和度,4℃ 静置过夜,离心;沉淀用少量 5mmol·L⁻¹、pH7.8 磷酸缓冲液溶解,4℃ 双蒸水透析过夜后换用 pH7.8 的磷酸缓冲液透析,离心除沉淀。通过 DE-52 层析柱(2.6cm×18cm),用 0~0.2mol·L⁻¹ 的氯化钠溶液连续梯度洗脱,收集合并 SOD 活力峰;透析后浓缩至小体积,再通过 Sephadex G-75 层析柱,用 5mmol·L⁻¹、pH7.8 的磷酸缓冲液洗脱,收集 SOD 活力峰,双蒸水透析后冷冻干燥。

1.3.2 蛋白质浓度测定 采用 Bradford 试剂法^[10]。

1.3.3 SOD 活力测定 采用改良邻苯三酚自氧化法^[11]。

1.3.4 TBTCI 对泥蚶 SOD 活力的影响 分室温和 4℃ 2 种条件,每隔 24h 测 1 次,观察 6d。以不加 TBTCI 的 SOD 为对照,结果以酶活力保留率表示。4℃ 下,TBTCI 浓度为 200~1000mg·L⁻¹;室温条件下,TBTCI 浓度为 100~500mg·L⁻¹。

1.3.5 TBTCI 对泥蚶 SOD 热稳定性的影响 泥蚶 SOD 经 TBTCI(200mg·L⁻¹)作用 30h 后,从 45~70℃,每隔 5℃ 保温 10min,测定 SOD 活性,以不加 TBTCI 的 SOD 作对照。

1.3.6 TBTCI 对泥蚶 SOD 耐酸碱能力的影响 泥蚶 SOD 经 TBTCI(200mg·L⁻¹)作用 30h 后,以 9:1(v/v)加入不同的 pH 溶液(pH3~13)作用 4h 后测定 SOD 活性,以不加 TBTCI 的 SOD 作对照。

1.3.7 TBTCI 对泥蚶 SOD 同工酶谱带的影响 泥蚶 SOD 在 4℃ 下经不同浓度 TBTCI(200~1000mg·L⁻¹)作用 48h 后进行 PAGE 活性染色^[12]。

2 结果与讨论

2.1 TBTCI 对泥蚶 SOD 活力的影响

由图 1(4℃)和图 2(室温)可见,随着 TBTCI 浓度的增大 SOD 活性逐渐降低。在 4℃ 下,当 TBTCI 浓度为 200mg·L⁻¹ 时,120h 后酶活力还保留 72.7%;而 TBTCI 浓度达 1000mg·L⁻¹ 时酶完全失活。在室温下,TBTCI 存在时酶活性丧失很快。同样的 TBTCI 浓度(400mg·L⁻¹),在室温下 72h 后酶完全失活,但在 4℃ 时酶活力还保留了 72.7%。这表明 TBTCI 在室温下对 SOD 活力的影响比在 4℃ 下要大很多。

2.2 TBTCI 对泥蚶 SOD 热稳定性的影响

从图 3 可见,在 45~60℃ 范围内,泥蚶 SOD 保持了较高的活性。在 60℃ 时 SOD 活力还保留了 88.5%,由此可见,泥蚶 SOD 具有较高的热稳定性。但 TBTCI 的存在使 SOD 的耐热程度大大降低,在 50℃ 时酶活力仅保留 5.4%,55℃ 已完全失活。

2.3 TBTCI 对泥蚶 SOD 酸碱稳定性的影响

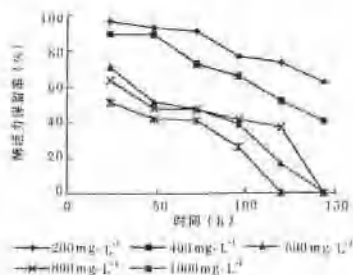


图 1 TBTCI 对泥蚶 SOD 活性的影响(4℃)

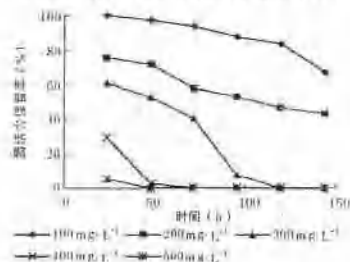


图 2 TBTCI 对泥蚶 SOD 活性的影响(室温)

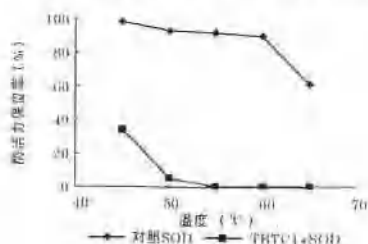


图 3 TBTCI 对泥蚶 SOD 热稳定性的影响

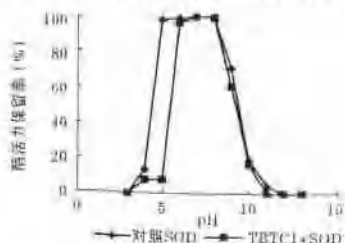
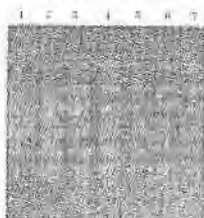


图 4 TBTCI 对泥蚶 SOD 酸碱稳定性的影响

SOD 是酸性蛋白质,较稳定,对环境 pH、温度适应范围广^[13]。从图 4 可知,泥蚶 SOD 在 pH5~8 之间稳定性好,活力高。pH5 时对照样酶活力保留 98.2%,而经 TBTCI 作用后酶活力仅剩 8.0%;pH9 时对照样酶活力保留 70.8%,而经 TBTCI 作用后酶活力保留 60.7%。由此可见,TBTCI 使 SOD 的耐酸碱能力有所下降,特别在酸性条件下酶活力下降得更明显。



1 为标准牛血 SOD,2 为泥蚶 SOD 对照样,3~7:TBTCI 浓度依次为 200,400,600,800,1000 mg · L⁻¹。

图 5 泥蚶 SOD 的 PAGE 活性染色图谱

2.4 TBTCI 对泥蚶 SOD 同工酶谱带的影响

从图 5 我们可清楚看到泥蚶 SOD 同工酶谱带随着 TBTCI 浓度的增大而逐渐消失。表明各种 SOD 同工酶对 TBTCI 的敏感度不同。

以上实验结果表明,TBTCI 不仅会使泥蚶 SOD 活性降低,而且还降低了 SOD 的耐热和耐酸碱能力,对 SOD 的稳定性产生不利影响。

参考文献:

- [1] 方允中,李文杰.自由基与酶[M].北京:科学出版社,1989:232.
- [2] 周名江,李正炎,颜天,等.海洋环境中的有机锡及其对海洋生物的影响[J].环境科学进展,1994,2(4):67.
- [3] 李琪,尾定诚,森胜义,等.三丁基氧化锡(TBTO)对太平洋牡蛎性成熟的影响[J].青岛海洋大学学报,2002,31(5):701.
- [4] 陈硕,薛大明,赵雅芝,等.有机锡污染物在海洋沉积物中的迁移和转化[J].海洋环境科学,1995,14(4):24.
- [5] 徐晓白,戴树桂,黄玉珊.典型化学污染物在环境中的变化及生态效应[M].北京:科学出版社,1998:99.
- [6] Widdows J, Page DS. Effects of tributyltin and dibutyltin on the physiological energetics of the mussel, *Mytilus edulis*[J]. Mar Environ Res, 1993, 35: 233.
- [7] 谢观.中国医学大辞典[M].北京:中国中医药出版社,1994:1453.
- [8] 肖湘,黄智璇,张尔登,等.缢蛏超氧化物歧化酶的分离纯化和性质研究[J].台湾海峡,2002,21(2):172.
- [9] 肖湘,高文丽,俞丽君,等.毛蚶超氧化物歧化酶的纯化、部分性质与修饰[J].中国海洋药物,2001,20(3):43.
- [10] 李建武,肖能庚,余瑞元,等.生物化学实验原理和方法[M].北京:北京大学出版社,1994:174.
- [11] 邹国林,桂兴芬,钟晓凌,等.一种 SOD 的测定方法-邻苯三酚自氧化法的改进[J].生物化学与生物物理进展,1986,(4):71.
- [12] 罗广华,王爱国.植物 SOD 的凝胶电泳及活性的显示[J].植物生理学通讯,1983,(6):44.
- [13] 张龙翔,张庭芳,李令媛.生化实验方法和技术[M].北京:北京高等教育出版社,1997:217.

(收稿日期:2003-08-28)