

聊红国槐谷胱甘肽过氧化物酶活性测定的研究

李道强¹, 邱艳昌¹, 段祖安²

(1. 聊城大学, 山东 聊城 252059; 2. 山东农业大学, 山东 泰安 271000)

摘要: 用直接测定法测定聊红国槐、国槐、龙爪槐、黄金槐样品谷胱甘肽过氧化物酶活性, 其中以聊红国槐最高、龙爪槐活性最低。同时探讨了不同条件下的聊红国槐谷胱甘肽过氧化物酶的活性高低, 这一结果为今后研究该酶在国槐上的应用奠定了试验基础, 为研究乔木树种中的 GSH-Px 活性情况提供理论依据。

关键词: 聊红国槐; 谷胱甘肽过氧化物酶; 活性; 测定

中图分类号: S 792. 6; Q 94-331 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)03-0186-03

谷胱甘肽过氧化物酶(Glutathione Peroxidase GSH-Px)即谷胱甘肽(GC. 1. 11. 1. 9)是 1957 年由 Mills 在牛红细胞中发现的。在红细胞中可使血红蛋白不受 H₂O₂ 氧化分解。GSH-Px 是细胞中抗过氧化酶系统中的一种酶, 该酶对细胞脂质过氧化伤害及抗衰老过程中起着重要作用。作为一种重要的保护性酶, 进一步研究证明该酶能清除人和动物体细胞内的脂质过氧化物和 H₂O₂。到目前为止, 人们对人与动物组织或细胞中 GSH-Px 研究较多, 而对植物中 GSH-Px 的研究还很少。GSH-Px 有防止畸变、延缓衰老、清除自由基等重要生理作用, 如果能够从自然界丰富的植物资源中纯化出该酶, 并把它应用到食品、医学、化妆品等行业中, 对 GSH-Px 资

源的开发和利用将有着重要的意义。由于植物谷胱甘肽过氧化物酶研究的起步较晚。甚至对高等植物中是否存在 GSH-Px 还有过争论。1985 年, Drotar^[1] 等报道在组织培养的菠菜、玉米、美国梧桐及水生藻类中检测到了该酶活性。1994 年我国学者薛泰麟、侯少范^[2] 等报道, 在外源硒诱导的小麦、玉米、油菜、大豆、大蒜中检测到了 GSH-Px 的活性。黄爱嫫^[3] 在稻苗中也检测到了 GSH-Px 的活性。朱继玲等^[4] 对葱中 GSH-Px 进行了硫酸铵盐析试验, 张景萍等^[5] 对几种植物中谷胱甘肽过氧化物酶活性进行测定。该试验在前人的基础上, 选取了 4 种国槐叶片样品进行 GSH-Px 活性测定, 其目的是进一步明确高等植物中是否有 GSH-Px 的分布, 为研究乔木树种植物中的 GSH-Px 活性情况提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料的选择

第一作者简介: 李道强(1973-), 男, 工程师, 硕士, 现从事园林工程管理工作。

收稿日期: 2007-10-12

[4] 杜小娟, 李斌. 白皮松的用途及育苗造林[J]. 林业实用技术, 2005, (5): 22-23.

[5] 周丽芳, 赵小刚. 小陇山林区珍稀树种白皮松的分布现状与保护和开发利用措施[J]. 中国林副特产, 2005(2): 59.

Characteristic and Landscape Application of *Pinus bungeana*

BO Nan-lin, PENG Chong-hua, CHONG Jie, WU yi

(School of Environmental Arts and Design, Central South University of Forest and Technology, Changsha 410004, China)

Abstract: *Pinus bungeana* is an endemic species of China, also the only three-needle pine of East Asian. *Pinus bungeana* is a famous urban greening tree in North China for its excellence appreciation and resistance. The paper introduced the excellent quality, ornamental characters and culture value of *Pinus bungeana* as landscaping tree species, discusses the application models and application scope of *Pinus bungeana* in urban greening, and point out that *Pinus bungeana* should be developed and utilized vigorously in land greening for its good appreciation prospects.

Key words: *Pinus bungeana*; Landscaping; Plant scenery; Development and application

于2006年6月分别取自于聊城大学试验基地上的聊红国槐、国槐、龙爪槐、黄金槐。取材部位分别是各自的当年生枝条上部幼嫩的叶片。

1.2 试验药品和仪器

试验药品为5,5'-二硫代对硝基苯甲酸(DTNB, 美国Fluka公司产品, 分析纯), 聚乙烯吡咯烷酮(PVP, 为上海化学试剂厂生产, 分析纯), 2分子结晶水磷酸二氢钠、12分子结晶水的磷酸氢二钠(武汉无机盐化工厂, 分析纯)TU-1810型紫外可见分光光度计(北京分析仪器厂)。

1.3 谷胱甘肽过氧化酶的提取和测定

1.3.1 谷胱甘肽过氧化酶的提取方法 采用DTNB(5,5'-二硫代对二硝基苯甲酸)染色法, 具体步骤如下: 称取新鲜国槐叶片材料加入5倍体积的0.1 mol/L pH为7.4磷酸缓冲液[1 mmol/L EDTA-2Na, 1%的水溶性PVP(聚乙烯吡咯烷酮)], 研磨成匀浆, 温度4℃、10 000 r/min离心10 min, 取上清液用于GSH-Px活性测定。按照黄爱纓^[3]测定方法, 取上述酶液各0.4 mL分别注入酶管和非酶管, 加热非酶管使酶失活, 分别注入1 mL 1 mmol/L GSH 0.4 mL和37℃预热的1.5 mmol/L H₂O₂ 0.2 mL, 摇匀后立即于37℃水浴中反应3 min, 重新于2支试管中加入2.0 mL 1.67%偏磷酸沉淀液, 5 000 r/min离心20 min, 保留上清液, 另取3支试管分别标号1、2、3。取上清液2.0 mL分别加入1、2号试管中, 向3号试管加入0.4 mL的蒸馏水和1.67%的偏磷酸沉淀液1.6 mL作为空白管。在3支试管中分别加入0.32 mol/L的Na₂HPO₄ 0.5 mL和DTNB 0.5 mL, 反应3 min后分光光度计比色测定。

1.3.2 谷胱甘肽过氧化酶的测定 酶活力定义: 37℃、pH 7.4条件下, 1 mL反应液中, 每分钟催化1 μmol GSH氧化的酶量为1个酶活力单位。根据侯少范, 薛泰麟^[2]、Flohe^[4]等的直接测定法, 即测定该酶的作用底物GSH在单位时间内的减少量。按同样的步骤以H₂O代替酶液测定非酶反应GSH的消耗量。必要时也要测定样品本身的GSH(及其他-SH)的值。酶活性单位以单位鲜重(g)的植物样品, 在37℃下, 每分钟使GSH的改变为

总量的0.001时为1个酶活性单位(扣除非酶反应的GSH)。

1.4 统计处理

试验数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示。采用t检验。

2 结果与分析

2.1 不同品种国槐的谷胱甘肽过氧化酶测定结果

表1 不同国槐品种之间的GSH-Px活性测定结果

国槐品种	聊红	国槐	龙爪槐	黄金槐
活性	689.6	642.3	632.9	617.6

由表1可以看出, 不同国槐品种之间的谷胱甘肽过氧化酶的酶活性有一定程度的差异, 其中聊红国槐的酶活性最高, 黄金槐的酶活性最低。聊红国槐的谷胱甘肽过氧化酶活性高, 则抗病力提高。

2.2 提取物质的成分和不同的pH值对聊红国槐酶活性的影响

分别用不同pH的0.4 mol/L磷酸缓冲液(物质1)和不同pH含2 mmol/L EDTA和1% PVP的0.3 mol/L磷酸缓冲液(物质2)作为提取介质, 反应10 min, 以偏磷酸作为沉淀剂, 在412 nm波长下测定GSH-Px的活性(见表1)。pH 5.90~6.69, GSH-Px活性较高, 适于提取GSH-Px。pH 6.24时活性达到最高, 之后随着pH的升高, GSH-Px的活性逐渐下降。含EDTA和PVP的提取介质在不同pH的变化趋势与不含EDTA和PVP的提取介质是一致的, 但是加入EDTA和PVP, GSH-Px的活性明显高于不加EDTA和PVP的提取介质, 且差异。

表2 不同提取物质和pH值对聊红国槐

GSH-Px活性的影响

pH值	GSH-Px活性的影响	
	物质1	物质2
5.90	683±0.12	745±0.16
6.20	685±0.15	769±0.19
6.45	689±0.09	788±0.23
6.69	695±0.10	812±0.32
6.89	674±0.12	773±0.26
6.92	663±0.13	756±0.18
7.20	563±0.09	712±0.13

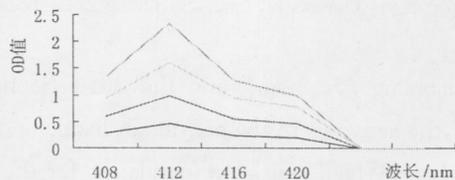


图1 时间和波长对酶管OD的影响

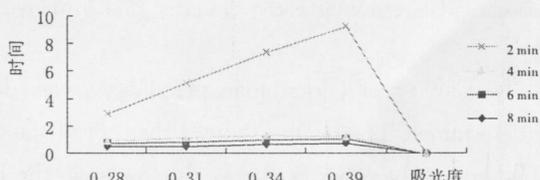


图2 时间和波长对非酶管OD的影响

2.3 测定波长和显色时间的选择

取样品上清液, 于408 nm、412 nm、416 nm、420 nm、

418 nm 波长下比色, 分别在 2 min、4 min、6 min、8 min 时测定非酶管和酶管的吸光值(OD 值), 见图 1 和图 2。酶管和非酶管的 OD 值随时间和波长的变化趋势是一致的, 410~422 nm 均适宜测定 GSH-Px 的活性, 其中 412 nm 波长时, 其 OD 值最高, 随着波长的增加, OD 值逐渐降低。随着时间的增加, OD 值逐渐降低(408 nm、412 nm、416 nm、420 nm, 酶管有部分 OD 值相同)。在时间测试范围内, 均是 2 min 时最大。

3 讨论

3.1 试验结果表明: 在测定的 4 种不同品种的国槐样品中都含有 GSH-Px 酶, 其含量高低在同一种的不同品种国槐中差异较小。其中聊红国槐活性较高, 且容易获得, 可作为进一步研究的材料。同时发现, 聊红国槐其测定管的 OD 值总是略大于对照管, 据分析可能是由于聊红国槐中的 GSH 含量或该酶的-SH 含量高, 也可能是聊红国槐中存在的 GSH-Px 同工酶对测定造成的影响。因此聊红国槐的 GSH-Px 活性测定还有待进一步确定。同一种的不同品种之间的酶活性的差异, 说明其抗病性的差异, 在选育品种上, 可以以此作为指标。

3.2 该试验是以测定底物 GSH 的消耗量来反映酶活性。底物浓度影响酶促反应的速度, 因此要求反应物的精确度高, 0.001 mg 天平很难达到反应物的准确度, 采用消耗百分率来表示酶活力, 更加简便准确。

3.3 在试验中, 观察到加入显色剂 DTNB 4 min 后, 对照管的 OD 值随着显色时间的延长呈下降趋势, 20 min 内平均每分钟下降 0.004; 而测定管在 10 min 内则呈上升趋势, 10~20 min 时达到稳定, 故选择 10 min 后立即比色。在测定植物材料时, 为了排除叶绿素及其它蛋白质等因素的干扰, 选择延长离心时间, 或者加入偏磷酸沉淀剂后, 摇匀静置 10 min 后再离心。

3.4 GSH-Px 的测定, 采用较多的是直接法, 但不同的生物体其测定方法略有不同^[1]。该结果显示在 pH 5.90~6.69 范围内, 聊红国槐的酶活性较高。说明, 该酶在弱酸的环境中活性较大。

3.5 含 EDTA 和 PVP 的提取物质与不含 EDTA 和 PVP 的提取物质中, GSH-Px 的活性随 pH 值的变化趋势是一致的。提示缓冲液的 pH 对 GSH-Px 的影响较大, 且不受其中溶解成分的影响。

3.6 测定 GSH-Px 的适宜波长是 410~422 nm。其中 412 nm 波长测定的 GSH-Px 活性较高。

参考文献

- [1] Drotar A, Phelps P, Fall R. Evidence for glutathione peroxidase activities in cultured plant cells[J]. *Plant Science*, 1985(42): 35-40.
- [2] 侯少范, 薛泰麟, 谭见安. 高等植物中的谷胱甘肽过氧化物酶及其功能[J]. *科学通报*, 1994, 39(6): 553-556.
- [3] 黄爱缙, 吴珍龄. 水稻谷胱甘肽过氧化物酶的测定法[J]. *西南农业大学学报*, 1999, 21(4): 324-327.
- [4] 朱继玲, 吴珍龄. 葱谷胱甘肽过氧化物酶(NH₄)₂SO₄ 盐析范围的选取[J]. *贵州农业科学*, 2005, 33(6): 21-22.
- [5] 张景萍, 吴珍龄. 几种植物中谷胱甘肽过氧化物酶活性测定[J]. *广西农业科学*, 2004, 35(3): 177-178.
- [6] 邓修惠, 黄学梅, 李伟道, 等. 改良 DTNB 比色法测定血清 GSH-Px 活力[J]. *重庆医学*, 2000, 29(5): 445.
- [7] Flohe L. Assay of Glutathione Peroxidase. *Methods in Enzymology*[J]. Academic Press, New York, 1984, 104: 114-117.

(背景介绍: 2006 年 8 月 3 日, “聊红槐”新品种选育科研成果通过山东省科技厅省级鉴定。鉴定委员会认为“聊红槐”是具有自主知识产权的新品种, 创新性和应用性明显。该课题组已向国家林业局植物新品种保护办公室提交植物新品种权请求书, 并于 2007 年 2 月 28 日通过初审。)

Determination of Glutathione Peroxidase Activity in Liaohong

LI Dao-qiang¹, QIU Yan-chang¹, DUAN Zu-an²

(1. Liaocheng University Liaocheng Shandong 252059, China; 2. Shandong Agricultural University, Taian, Shandong 271000, China)

Abstract: The activity of Glutathione peroxidases was detected in Liaohong (Sophora) and the other Sophora with directly-determined. The results showed that out of the four Sophora, the activities of the enzyme in liaohong (Sophora) was the higher the the other Sophora, the lowest in the Huangjin Sophora, Which will lay a foundation for the research of the enzyme in future and provide a academic basis in researching the activity of the GSH-Px for the arbor trees.

Key words: Liaohong (Sophora); Glutathione peroxidases; Activity; Detect