

三种芦荟超氧化物歧化酶的活性测定

董长颖, 张 巧

(吉林农业科技学院 生物工程学院, 吉林 吉林 132101)

摘 要: 通过从库拉索芦荟、中华芦荟、树芦荟 3 种芦荟叶中提取超氧化物歧化酶(SOD), 并用连苯三酚自氧化法测定 SOD 酶的活性, 双缩脲法测定 SOD 蛋白含量, 比较 3 种芦荟中 SOD 酶的比活力。结果表明: 库拉索芦荟的比活力为 32.9, 中华芦荟次之比活力为 25.9, 树芦荟最低为 15.6。若以树芦荟 SOD 比活力为 1 作参比值, 中华芦荟 SOD 比活力是它的 1.66 倍, 库拉索芦荟 SOD 比活力是它的 2.10 倍。

关键词: 芦荟; 超氧化物歧化酶; 酶活性; 比活力

中图分类号: S 682.33; Q 94-331 **文献标识码:** B **文章编号:** 1001-0009(2009)05-0097-03

芦荟属百合科多年生长绿多肉草本植物, 原产非洲热带沙漠干旱地区。据目前考证世界野生芦荟品种 300 多种, 自然变异和人工杂交品种有 200 多个。芦荟具有杀菌、抗炎、保湿美容、免疫与再生、抗肿瘤等生理与药理作用。对芦荟研究的许多资料显示, 芦荟中含 SOD。其超氧化物歧化酶能抑制粉刺、青春痘等发生, 在医学、护肤美容、保健饮食与观赏方面有重要价值。据不完全统计, 仅添加了芦荟的化妆品在全世界已超过 1 500 余种。SOD 普遍存在于动物、植物及微生物中, 是一种超氧化物歧化酶, 是生物体防御氧毒性的关键性酶。

SOD 是一种广泛存在于生物体内的金属酶, 按所含金属离子分为 Cu、Zn-SOD、Mn-SOD、Fe-SOD。它是生物体内特异清除超氧阴离子自由基的抗氧化酶, 能催化超氧阴离子自由基歧化成分子氧和过氧化氢, 从而减轻自由基对机体的危害。它可对抗与阻断因氧自由基对细胞造成的损害, 并及时修复受损细胞, 复原因自由基造成的对细胞伤害。由于现代生活压力, 环境污染, 各种辐射和超量运动都会造成氧自由基大量形成, 因此, 生物抗氧化机制中 SOD 的地位越来越重要。

SOD 作为一种药用酶, 引起国内外生化界和医药届的极大关注。SOD 应用于医学临床上可以治疗多种疾病, 类风湿性关节炎、心肌梗塞等, 在防辐射、抗衰老、抗肿瘤等方面也有积极的作用, 而且广泛用于化妆品和食品添加剂的行列。

随着 SOD 应用领域的不断扩大, 产品风靡全球, 其销售价格攀升, 现已成为国内生产和出口创汇紧俏产

品, 市场前景十分看好。因此, 选用了吉林农业科技学院植物园的库拉索芦荟、中华芦荟、树芦荟, 比较其酶活性大小。

1 材料与方法

1.1 材料与仪器

1.1.1 材料 库拉索芦荟、中华芦荟、树芦荟 3 种芦荟的新鲜叶片, 取自吉林农业科技学院植物园。

1.1.2 试剂 pH 8.30 的 50 mmol/L $K_2HPO_4-KH_2PO_4$ 缓冲液、0.05 mol/L 磷酸缓冲液(pH 7.8 含 1 mmol/L EDTA)、5 mmol/L pH 7.8 的磷酸缓冲液、0.05 mol/L 连苯三酚溶液、10 mmol/L 盐酸、硫酸铵、干酪素标准蛋白溶液、双缩脲试剂。

1.1.3 主要仪器 紫外分光光度计(745 PC 型)、高速冷冻离心机(GI-20G-II)、电子天平、电热恒温水浴锅(DK-S22 型)、组织捣碎机、移液枪。

1.2 试验方法

1.2.1 粗酶液的提取流程 取新鲜的芦荟的叶子, 用自来水洗净→双蒸馏水冲洗后擦干, 称 50 g, 切成小块→芦荟与 0.05 mol/L 磷酸缓冲液 1:3 的体积加入组织捣碎机中捣碎匀浆(2 min, 10 000 r/min)→过滤, 滤液静置浸提 1 h→量取滤液的体积, 查表按滤液体积加入硫酸铵至 45%饱和度→4℃静置 3 h 取出 6 000 r/min 高速冷冻离心 30 min→吸取上清并记录体积, 再查表按滤液体积加入硫酸铵至 85%饱和度→4℃静置过夜取出 8 000 r/min 高速冷冻离心弃上清, 沉淀用 2 mL 的 5 mmol/L pH 7.8 的磷酸缓冲液溶解沉淀透析(在 5 mmol/L pH 7.8 的磷酸缓冲液中透析过夜)得粗酶液^[1-3]。

1.2.2 连苯三酚自氧化法测定 SOD 的活性 连苯三酚自氧化法: 采用连苯三酚自氧化法测定酶活力。连苯三酚自氧化反应中不断产生 O_2^- , O_2^- 又可进一步促进自氧化反应, 进而形成带色的中间产物, 在这一过程中产生

第一作者简介: 董长颖(1975-), 女, 吉林省吉林市人, 讲师, 现从事生物技术制药教学与研究工作。E-mail: dongchangying@163.com。

收稿日期: 2008-12-13

一系列的带色产物,在 325 nm 处有吸收峰,在反应的最初 30~45 s 内中间产物的积累与时间成线形关系。在 SOD 存在下,由于它能催化 O_2^- 与 H^+ 生成 H_2O_2 和 O_2 ,因而抑制了此中间物的积累。通过测定连苯三酚的自氧化反应速度 ($\Delta A_{325} \text{ nm/min}$) 和 SOD 抑制下的自氧化速度 ($\Delta B_{325} \text{ nm/min}$),便可算出 SOD 活力来。连苯三酚自氧化速率控制在 0.070 D/min。酶活力单位定义为:在 1 mL 反应液中,1 min 抑制连苯三酚自氧化速率达 5 0% 的酶量定为 1 个活力单位 (U)^[4]。单位体积中的酶活力 (U/mL)按下式计算:

$$\text{单位体积中的酶活力 (U/mL)} = \frac{\frac{\Delta A_{325} - \Delta A'_{325}}{\Delta A_{325}} \times 100\%}{50\%} \times \frac{V'}{V} \times D$$

U/mL: SOD 酶活力

单位: ΔA_{325} :连苯三酚自氧化速率, $\Delta A'_{325}$:样液抑制连苯三酚自氧化速率; V' :反应液总体积, mL; V :所加样液体积, mL; D :样液稀释倍数。芦荟 SOD 活性测定:加入各种试剂使反应体积在 3 mL 计时,自氧化速率变化在 4 min 内有效。控制连苯三酚自氧化速率为 0.070 D/min 左右。测 SOD 活性时,加入约 140 μL SOD 溶液,缓冲液相应减至 2.854 mL,并控制 SOD 浓度,使连苯三酚自氧化速率降至 0.035 D/min 附近。

表 1 SOD 活性测定体系		
试剂	空白管/mL	自氧化管/mL
50 mmol/L K_2HPO_4 - KH_2PO_4 缓冲液	2.994	2.854
10 mmol/L 盐酸	0.006	—
0.05 mol/L 联苯三酚溶液	—	0.006
SOD 样液	—	0.140

1.2.3 双缩脲法测定 SOD 蛋白含量 双缩脲法:双缩脲是 2 个分子脲经 180 $^{\circ}\text{C}$ 左右加热,放出 1 个分子氨后得到的产物,在强碱溶液中双缩脲与 CuSO_4 形成紫色络合物,称为双缩脲反应。凡具有 2 个酰胺基或 2 个直接连接的肽键,或能通过 1 个中间碳原子相连的肽键,这类化合物都有双缩脲反应。紫色络合物颜色的深浅与蛋白质浓度成正比,而与蛋白质分子量及氨基酸成分无关,故可用来测定蛋白质含量。标准曲线的制作:取 6 支干净的试管,按 0~5 编号,依表 2 数据在各个试管中加入试剂,充分混匀,在室温下放置 0.5 h,以 0 号管为空白,在 550 nm 下测定吸光值 (OD),以各管蛋白质含量 (mg) 为横坐标,OD 值为纵坐标,画出标准曲线。待测样品中蛋白质含量测定:取样品 0.9 mL,依照标准曲线的制作方法,测其 OD 值,对照标准曲线求得未知溶液蛋白质浓度。

2 结果与讨论

2.1 3 种芦荟 SOD 酶的活性

3 种芦荟中 SOD 单位体积酶液的酶活性没有明显差别。由于酶只是初步纯化,酶液纯度不高,单位体积

表 2 标准曲线的制作

试剂	0	1	2	3	4	5
蛋白质标准液/mL	0	0.2	0.4	0.6	0.8	1.0
蒸馏水/mL	1.0	0.8	0.6	0.4	0.2	0
双缩脲试剂/mL	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0	4.0

表 3 SOD 活性的测定

不同芦荟品种	单位体积 SOD 的活性/ $U \cdot \text{mL}^{-1}$
库拉索芦荟	19.74
中华芦荟	20.72
树芦荟	23.41

活力较低。

2.2 3 种芦荟 SOD 蛋白含量

由表 4 可知,树芦荟 SOD 蛋白含量最高,中华芦荟 SOD 蛋白含量次之,库拉索芦荟 SOD 蛋白含量最低。可通过这些数据计算出各种芦荟 SOD 的比活力。

表 4 3 种芦荟单位体积酶液中 SOD 蛋白的含量

不同的芦荟品种	SOD 蛋白含量/ $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$
树芦荟	1.5
中华芦荟	0.8
库拉索芦荟	0.6

2.3 3 种芦荟 SOD 活性的分析与比较

由表 5 可知,活力最高的是库拉索芦荟,中华芦荟稍低,树芦荟比活力最低。

表 5 3 种芦荟中 SOD 活性的比较

项目	树芦荟	中华芦荟	库拉索芦荟
酶活力	23.41	20.72	19.74
蛋白含量	1.50	0.80	0.60
比活力	15.60	25.9	32.9
比值	1.00	1.66	2.10

3 结论

3 种芦荟中 SOD 单位体积的酶活性没有明显差别,但单位体积的蛋白含量不同,所以 3 种芦荟中 SOD 的比活力不同,库拉索的比活力最高,中华芦荟次之,树芦荟最低。若以树芦荟 SOD 比活力为 1 作参比值,中华芦荟 SOD 比活力是它的 1.66 倍,库拉索芦荟 SOD 比活力是它的 2.10 倍。从而为芦荟进一步开发利用提供重要的理论依据。

参考文献

- [1] 肖湘,孔祥强,徐婉芬.橄榄超氧化物歧化酶的分离纯化与性质研究[J].天然产物研究与开发,2007(2):28-29.
- [2] 王宜林,杨鹏.不同芦荟 SOD 复合酶的研究[J].食品科学,2006(10):13-14.
- [3] 李春娟,孙长华,李东刚,等.微量联苯三酚自氧化法测定蔬菜和花卉中 SOD 的活性[J].化学工程师,2006(9):32-33.
- [4] 国占生.超氧化物歧化酶样活性测定方法[J].衡水师专学报,2001(2):20-21.
- [5] 黎瑞珍,杨庆建,陈锐悦.超氧化物歧化酶活性的测定及其应用[J].琼州大学学报,2004(5):34-35.
- [6] 王雪峰,沈颂东.大蒜超氧化物歧化酶的分离纯化及机器性质的研究[J].安徽农业科学,2004,29(3):408-409.
- [7] 余旭亚,陈朝银.仙人掌超氧化物歧化酶的分离纯化及鉴定[J].云南化工,2000,27(3):17-19.

卡姆罗莎草莓离体培养快繁技术

朱艳艳¹, 韩志程¹, 陈天华², 侯显奇³, 刘海军³

(1. 黑龙江省园艺示范场, 黑龙江 阿城 150302 2 尚志市农业技术推广中心
黑龙江 尚志 150600 3 黑龙江省经济作物技术指导站 黑龙江 哈尔滨 150090)

摘 要:卡姆罗莎组培繁殖最佳诱导丛生芽配方应为 MS+6-BA 1.0 mg/L, 其次为 MS+6-BA 1.0 mg/L+NAA 0.1 mg/L。选取最佳增殖培养基的配方为: MS+6-BA 0.5 mg/L, 继代培养基的配方为 MS+6-BA 0.25 mg/L。生根培养基不需加任何激素, 只需将生根苗接到 1/2MS 培养基上即可。当试管苗长到 4 cm 左右, 根系长 2~3 cm 时, 把培养瓶移出培养室。

关键词:草莓; 卡姆罗莎; 离体培养

中图分类号: S 668.403.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2009)05—0099—02

卡姆罗莎(Camarosa)是美国加利福尼亚弗罗里达大学 20 世纪 90 年代育成品种, 近年引入我国。该品种长势旺健, 株态半开张, 匍匐茎抽生能力强, 根系发达, 抗白粉病和灰霉病, 休眠浅, 叶片中大, 近圆形, 色浓绿有光泽。果实长圆锥或楔形, 果面光滑平整, 种子略凹陷果面, 果色鲜红并具蜡质光泽, 果肉红色, 质地细密, 硬度好, 耐运贮。口味甜酸, 可溶性固形物 9%以上, 晚熟, 丰产性强, 一级序果平均重 24.4 g, 最大果重 89 g, 可连续结果采收 3~5 个月, 667 m² 产 1.5~3 t, 为鲜食和深加工兼用品种, 近年来已逐步成为黑龙江省生产上主推的草莓新品种之一。

目前, 黑龙江省草莓生产主要以匍匐茎方式扩繁种

苗, 长期无性繁殖造成品种种性退化, 病毒病严重, 生长势衰退, 果实品质下降, 产量降低, 推广应用脱毒原种苗繁殖原种一代匍匐茎苗是草莓优质化生产的必由之路。为此, 2005 年开始, 黑龙江省果树学科研究人员在其浆果试验园开展当前草莓主栽品种之一卡姆罗莎离体快繁技术研究与应用, 目的是培育出健壮无病毒的卡姆罗莎草莓品种种苗, 充分发挥出该品种高产、优质、抗病、耐运等优良品种特性。

1 材料与方法

1.1 外植体

取自浆果试验园。于晴天下午 2~3 时取无病、虫害且生长健壮的匍匐茎苗。

1.2 消毒

剪去外部叶片, 用自来水冲洗 1 h, 放入烧杯中, 在超净工作台上用 75%的酒精消毒 30 s, 然后用无菌水冲洗 4~5 次, 再用 0.1%升汞消毒 7 min, 然后用无菌水冲

第一作者简介: 朱艳艳(1979-), 女, 本科, 助理农艺师, 现主要从事草莓组织培养技术研究工作。E-mail: xiaov1999@163.com。
收稿日期: 2009-01-20

[8] 张尊听. 芦荟抗氧化作用的测定[J]. 天然产物研究与开发, 2001 (13): 45-47.

[9] 张立新, 抗瑚, 王宗花 等. 21 种植物抗氧化活性的研究[J]. 中医药, 2000, 31(8): 610-611.

[10] 张厚锋, 张淑萍. 双缩脲法和凯氏定氮法测定饲料中蛋白质含量的比较研究[J]. 中国饲料, 2008(7): 40-41.

Determination of Superoxide Dismutase Activity in Three Species of Aloe

DONG Chang-ying, ZHANG Qiao

(College of Bio-engineering, University of Agricultural Science and Technology of Jilin, Jilin, Jilin 132101, China)

Abstract: Through extract superoxide dismutase form three species Aloe: *Aloe barbadensis* Miller, *Aloe vera* and *Aloe arborescens* Müller, and using method of pyrogallol autoxidation to detect SOD activity, using method of biuret law to detect SOD Protein content, the results were that the activity of *Aloe barbadensis* Miller was the highest. *Aloe vera* was the second. *Aloe arborescens* Müller was the third.

Key words: Aloe; Superoxide dismutase; Activity; Specific activity