

拟南芥和大蒜中超氧化物歧化酶提取方法的比较

吴嘉¹, 张美丽², 杨红玉^{2*}

(1. 昆明医科大学 基础医学院, 云南 昆明 650500; 2. 昆明学院 生命科学与技术系, 云南 昆明 650214)

摘要: 用热变性法或磷酸缓冲液法从拟南芥植物中粗提取超氧化物歧化酶(SOD), 再用丙酮法或硫酸铵分级盐析法纯化 SOD. 比较发现, 热变性法粗提取的 SOD 回收率较高, 而 2 种纯化方法的差异却无统计学意义; 同时, 还比较了用同一种方法所提取的拟南芥和大蒜之间的 SOD 活性, 大蒜的 SOD 活性高于拟南芥.

关键词: 拟南芥; 大蒜; 超氧化物歧化酶; 分离纯化

中图分类号: Q55; Q946.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1674-5639(2012)06-0055-02

Comparison of Extraction Method in *Arabidopsis Thaliana* and Garlic Superoxide Dismutase

WU Jia¹, ZHANG Mei-li², YANG Hong-yu^{2*}

(1. Elementary Medical College, Kunming Medical University, Yunnan Kunming 650500, China;

2. Department of Life Sciences and Technology, Kunming University, Yunnan Kunming 650214, China)

Abstract: Thermal denaturation and phosphate buffer methods were applied to initial extraction of superoxide dismutase (SOD) from *Arabidopsis thaliana* plants, garnish with acetone method and ammonium sulfate classification salting out method were conducted to purify SOD. In result, the thermal denaturation method showed higher SOD recovery rate in extracting SOD comparing to the phosphate buffer method. SOD extracted using the two methods showed no difference in purification process. The conducted experiment concludes a SOD separation method of higher activity and higher purity.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; garlic; SOD; separation and purification

超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase, SOD)是生物体内清除超氧阴离子自由基的清除剂, 有抗衰老, 提高抵抗力, 增强生物体对外界环境适应力的作用^[1]. SOD 酶活性的变化在一定程度上反应了生物体抵抗外界胁迫的能力, 也是研究植物生理生化的常用指标之一. 本试验以拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)为材料, 采用不同方法提取其 SOD, 希能找到一种更为快速准确提取拟南芥中 SOD 的方法, 旨在为有关试验研究提供参考.

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料: 拟南芥 Columbia 生态型, 购自美国 Lehle seeds 公司; 新鲜大蒜购买于农贸市场.

1.2 方法

1.2.1 植物栽培

用无菌水浸泡拟南芥种子约 30 min, 去除水后用 95% (体积分数) 酒精消毒 5 min, 再用 0.1% (质量分数) HgCl 消毒 5 min, 无菌水冲洗 5 次. 播种于

含有 MS 培养基的培养皿上, 春化处理 2~3 d. 将培养皿置于光照培养箱中, 培养箱条件为 22 ℃, 相对湿度 90%, 每天光照 12 h, 黑暗 12 h. 当有 2 片真叶长出时, 将幼苗移栽到小花盆中. 小花盆的底部铺有珍珠岩, 上面覆盖腐殖土. 移苗后再将花盆放在托盘中, 托盘内盛有水. 用保鲜膜覆盖小花盆, 3~4 d 后揭膜. 从苗期至开花期, 温度控制在 22~23 ℃, 光照时间 10 h/d, 湿度保持在 70%.

1.2.2 提取拟南芥 SOD 粗酶液的方法

1) 磷酸缓冲液法(PBS)^[2]. 称取 6 g 拟南芥叶片或大蒜根茎置于研钵中研磨, 过滤测体积, 加入 2 倍体积的 50 mmol/L PBS 放入 4 ℃ 下 4 h, 然后 4 ℃ 10 000 r/min 离心 20 min, 取上清液备用.

2) 热变性法^[2]. 称取 6 g 拟南芥叶片(或大蒜)置于研钵中研磨, 过滤测体积, 滤液放入 60 ℃ 下水浴 20 min, 4 ℃ 10 000 r/min 离心 20 min, 取上清液备用.

1.2.3 SOD 纯化方法

1) 丙酮沉淀法^[2]. 将粗提的酶液用 HCl 调

收稿日期: 2012-10-19

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31260062); 昆明学院大学生创新性实验资助项目(X1008)

作者简介: 吴嘉(1982—), 女, 云南昆明人, 硕士, 主要从事植物生理与分子生物学研究.

*通讯作者: 杨红玉(1960—), 女, 云南昆明人, 教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事植物生理与分子生物学研究. E-mail: Yanghongyukm@126.com.

pH = 5.0,加入 0.6 倍的丙酮 4 ℃ 10 000 r/min 离心 20 min,取上清液用 HCl 调 pH = 4.0,加入 0.2 倍的丙酮 10 000 r/min 4 ℃ 离心 20 min,收集沉淀,沉淀用磷酸缓冲液溶解,备用.

2) 硫酸铵分级盐析法^[2].0 ℃ 下 50% 饱和度体积的硫酸铵加入到粗酶液中,放在 4 ℃ 下 30 min,然后 4 ℃ 10 000 r/min 离心 20 min,收集沉淀,沉淀用磷酸缓冲液溶解.

1.2.4 SOD 活性的测定^[3]

加入 SOD 粗酶液 20 μL,置于 25 ℃ 水浴中保温 10 min,然后加入 3.98 mL 50 mmol/L 的邻苯三酚,迅速摇匀,倒入 1 cm 比色皿内,在 320 nm 波长下测定光密度值,每 30 s 观测 1 次,共测 4 min.

酶活性/U = {[(0.07 - ΔA)/0.07] × 100%} / 50% × [反应液总体积 × (样液稀释倍数/样液体积)].

2 结果与分析

2.1 SOD 粗提法的比较

称取 6 g 的拟南芥叶片 2 份,研磨后分别用热变性法和磷酸缓冲液提取法进行粗提.测定 SOD 粗酶液活性,结果见表 1.

由表 1 可以看出,热变性法测得的 SOD 酶活性显著高于磷酸缓冲液提取法 ($P < 0.01$),热变性法 SOD 粗酶液的回收率较高.

表 1 2 种提取方法的 SOD 活性比较

项目	酶活性/U	回收率/%
原酶液	263.10 ± 14.41	—
磷酸缓冲液提取法	134.49 ± 1.53	51.11
热变性法	167.76 ± 4.54	63.76

2.2 SOD 纯化方法的比较

将粗提的 SOD 酶液平均分为 2 份,分别用硫酸铵分级盐析法与丙酮沉淀法进行提纯,测定 SOD 活性,结果见表 2.

表 2 拟南芥丙酮法和硫酸铵法的比较

项目	酶活性/U	回收率/%
热变性	167.76 ± 4.54	—
丙酮法	80.95 ± 4.07	48.25
硫酸铵法	92.26 ± 1.73	55.00

由表 2 可以看出,硫酸铵分级盐析法 SOD 的回收率较高,但硫酸铵分级盐析法与丙酮沉淀法测得的 SOD 酶活性差异无统计学意义.

2.3 大蒜丙酮沉淀法和硫酸铵分级盐析法的比较

称取大蒜 6 g,研磨后用热变性法进行粗提.粗提后将将粗提的 SOD 酶液平均分为 2 份,分别用硫酸铵分级盐析法与丙酮沉淀法进行提纯,测定 SOD

活性,结果见表 3.

表 3 大蒜丙酮法和硫酸铵法的比较

项目	酶活性/U
丙酮法	162.29 ± 1.72
硫酸铵法	151.43 ± 2.18

由表 3 可知,丙酮沉淀法提取的 SOD 酶活性略高于硫酸铵分级盐析法,但测得的 SOD 酶活性差异无统计学意义.

2.4 拟南芥和大蒜 SOD 活性比较

由图 1 可以看出,拟南芥 SOD 活性显著低于大蒜 ($P < 0.01$),大蒜中 SOD 活性是拟南芥的近 1 倍.

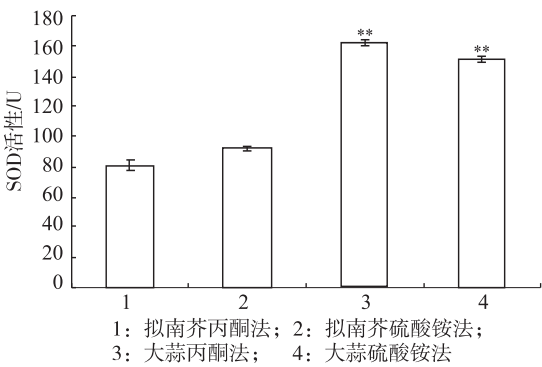


图1 拟南芥和大蒜SOD活性比较

3 小结与讨论

SOD 是含金属辅基的酶,其活性与生物体内超氧歧化物分解或脂肪氧化损伤相关. SOD 具有抗逆境、抗衰老、免疫调节、抑制肿瘤、调节血脂、抗辐射、消炎和美容等功效^[4-6]. 本试验以模式植物拟南芥为材料比较了 2 种 SOD 粗提法,结果表明热变性提取法 SOD 的回收率较高,且热变性法提取的 SOD 活性比磷酸缓冲液提取法高. 而热变性法提取 SOD 酶的优点在于所用时间较短,这就减少了外界环境对 SOD 的影响;SOD 的纯化对于拟南芥中是硫酸铵分级盐析法的回收率高于丙酮酸沉淀法,但两者相比 SOD 活性差异无统计学意义.

大蒜是一种质优价廉的食品,且大蒜中 SOD 的含量比其它植物相对较高^[7]. 从试验结果也可以看出,相同的质量下,大蒜中 SOD 活性比拟南芥高 1 倍左右. 在提取大蒜的 SOD 时采用热变性法,纯化用硫酸铵分级盐析法和丙酮酸沉淀法,2 种方法相比较 SOD 活性差异无统计学意义. 大蒜是一种在平时饮食中经常涉及到的食物,在食用过程中大蒜富含的 SOD 就可以通过饮食被摄入. 由于目前市场上对 SOD 的需求量很大,而大蒜来源广泛,生产成本

(下转第 59 页)

2.3 生根培养效果

将高 3.0 cm 以上的继代苗切下置于 7 号培养基培养. 10 d 后开始生根, 15 d 后调查, 生根率 100%, 单株根数 4~6 根, 根长 0.2~0.3 cm, 且苗生长健壮.

2.4 过渡移栽

移栽后 1 周内保持膜内空气湿度在 90% 以上, 并注意控制基质的水分含量, 防止水分过多烂苗, 成活率可达 95% 以上, 过渡移栽 1 月后即可定植盆栽.

3 小结

研究结果表明, 以叶片为外植体的组织培养是规模化快速繁殖丽格海棠种苗的一种可行途径. 诱导丽格海棠巴科斯品系叶片分化芽苗的最佳培养基为 MS + BA 1.0 mg/L + NAA 0.2 mg/L + 0.6% 琼脂 + 3% 蔗糖; 增殖培养基阶段选用 MS + BA 0.1 mg/L + NAA 0.01 mg/L + 0.6% 琼脂 + 3% 蔗糖的培养基效果较好, 增殖系数高, 且苗长势强健; 采用 1/2 MS + NAA 0.2 mg/L + 0.6% 琼脂 + 1.5% 蔗糖培养基, 试管苗生根较为容易, 生根率可达 100%. 本试验在生根培养阶段没有采用常规的生根培养基, 而是只加入 NAA 不加入 6-BA, 同样能够很好地诱导不定根的形成. 说明对于激素的使用并非种类越多、质量浓度越高效果越好, 而是只要质量浓度适宜同样可取得很好的生根效果. 潘梅等^[6]的

研究表明, 根的粗壮程度与激素质量浓度的增加并没有规律性的变化; 而生根数和生根率与激素质量浓度呈现出不均匀的变化; 当激素质量浓度超过一定范围, 会形成大量的愈伤组织, 而且根的数量相对稀少, 根的分化效果也不理想, 这一结果与本试验结果有相似之处, 说明生长素的最适质量浓度选择对生根效果的影响非常大^[7]. 试管苗移栽入盛有 m (腐叶土): m (珍珠岩) = 3:1 的基质上, 前期保持 90% 以上的空气湿度, 重点控制好基质的含水量, 避免水分过多引起烂苗, 是提高移栽成活率的关键.

[参考文献]

[1]李春秀,石大兴,王米力. 丽格海棠组织培养外植体再生体系建立关键技术的研究[J]. 四川农业大学学报,2002,20(4):330-333.

[2]司马诺. 让丽格海棠扮靓佳节[J]. 花木盆景,2007(1):10-12.

[3]葛红. 丽格海棠繁殖及种苗繁殖技术[J]. 温室园艺,2005(8):17-27.

[4]李玉英,段鹏慧,张先平. 丽格海棠叶片的组织培养研究[J]. 山西林业科技,2010,39(1):14-15.

[5]熊丽,吴丽芳. 观赏花卉的组织培养与大规模生产[M]. 北京:化学工业出版社,2003:64-65.

[6]潘梅,陈一龙,张生,等. 丽格海棠组织培养的优化[J]. 南方农业,2007,4(1):23-26.

[7]胡燕梅,喻捷,余群娣,等. 丽格海棠叶片离体培养技术研究[J]. 武汉生物工程学院学报,2008,12(4):198-200.



(上接第 56 页)

低, 是否可以将其作为大规模生产 SOD 的原料植物值得进一步探索. 此外, 热变性法试验所用温度 (60 ℃) 已逼近植物中 SOD 活性适宜温度的最高值, 但仍显现其较大活性, 原因何在, 尚需进一步探究.

[参考文献]

[1]廖春丽,王福梅,陈兰英,等. 大蒜 SOD 最佳提取条件确定及其生长过程中 SOD 活力变化研究[J]. 中国调味品,2011,2(36):51-53.

[2]孙永君. 大蒜中 SOD 的提取研究[J]. 化学与生物工程,2005(10):23-25.

[3]李永利,张焱. 邻苯三酚自氧化法测定 SOD 活性[J]. 中国卫生检验杂志,2000,10(6):673.

[4]常守宁. 紫草种子 SOD 的分离及部分性质研究[J]. 药物生物技术,1996,3(4):218-220.

[5]王爱国. 大豆种子 SOD 的研究[J]. 植物生理学报,1993,9(1):77-83.

[6]SFAXI I H, FERRARO D, FASANO E, et al. Inhibitory effects of a manganese superoxide dismutase Isolated from garlic (*Allium sativum* L.) on in vitro tumoral cell growth[J]. Biotechnol Prog, 2009, 25(1):257-264.

[7]甘耀坤,黎建玲,黄海婵,等. 几种经济食品超氧化物歧化酶活力的测定[J]. 玉林师范学院学报:自然科学版,2005,26(5):57-59.