

正交法优选乌莓过氧化物酶活性的测定条件

黄国文 (湖南科技学院生命科学和化学工程系, 湖南永州 425100)

摘要 [目的] 优选乌莓过氧化物酶活性的测定条件。[方法] 以酶活力为考察指标, 通过正交试验, 研究酶体积、底物体积、反应体系的酸碱度和反应温度等不同条件对乌莓过氧化物酶活性的影响。[结果] 影响乌莓过氧化物酶活性测定的因素大小顺序依次是: 底物体积 > 温度 > 酶体积 > pH。乌莓过氧化物酶活性测定的最佳条件为: 0.5 ml 浓度 2% 的 H_2O_2 , 温度为 35 $^{\circ}C$, 酶体积为 0.1 ml, pH 值为 5.5。[结论] 底物体积和温度是影响过氧化物酶活性的主要因素。

关键词 乌莓 [*Cayratia japonica* (Thunb) Gagne]; 过氧化物酶; 活性; 正交试验

中图分类号 S567 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2013)22-09228-01

Optimum Conditions for Measuring Peroxidase Activity in *Cayratia japonica* (Thunb) Gagne by Means of Orthogonal Experiment
HUANG Guo-wen (Department of Biological Sciences and Chemical Engineering, Hunan University of Science and Technology, Yongzhou, Huzhou 425100)

Abstract [Objective] To optimize conditions for measuring peroxidase activity of *Cayratia japonica* (Thunb) Gagne. [Method] With enzyme activity as investigation index, through orthogonal test, effects of enzyme volume, substrate volume, pH value of reaction system and reaction temperature on peroxidase activity of *C. japonica* were studied. [Result] The order of influencing factors is substrate volume > temperature > enzyme volume > pH. The optimal determining conditions are 0.5 ml 2% H_2O_2 , temperature 35 $^{\circ}C$, enzyme volume 0.1 ml, pH value 5.5. [Conclusion] The substrate concentrations and temperature are the main factors affecting the POD activity.

Key words *Cayratia japonica* (Thunb) Gagne; Peroxidase; Activity; Orthogonal experiment

乌莓 [*Cayratia japonica* (Thunb) Gagne] 是葡萄科 (Vitaceae) 的多年生蔓生草本植物, 又名五叶藤、五爪龙, 生于旷野、山谷、林下、路旁, 生长茂盛, 繁殖力高。全草含色素、硝酸钾及黏液质、甾醇类、氨基酸、黄酮类、酚性物质; 根含生物碱和鞣质等。其主要作用是清热解毒, 主治蛇虫咬伤和疮痈肿毒等症^[1]。过氧化物酶在植物体内广泛存在, 参与细胞生长和分化、种子萌发、果实和蔬菜的色泽变化及植物抗性等生理活动^[2]。笔者采用正交试验研究测定乌莓的过氧化物酶活性的最佳条件, 以期对乌莓过氧化物酶活性的测定方法提供依据, 并为理解乌莓的生命特征打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象。 乌莓成熟叶片, 于上午 8:30 在校园空地上采集, 经鉴定为葡萄科 (Vitaceae) 植物乌莓 [*Cayratia japonica* (Thunb) Gagne]。

1.1.2 主要仪器。 恒温水浴锅, 购自天津比朗实验仪器制造有限公司; 722B 型分光光度计, 购自上海析谱仪器有限公司; 磁力搅拌器, 购自上海梅颖浦仪器; 精密酸度计和电子天平, 购自梅特勒-托利多国际贸易 (上海) 有限公司。

1.1.3 主要试剂。 所用试剂均为国产分析纯, 市售。

1.2 方法

1.2.1 酶液的制备。 取 2.000 g 干净乌莓成熟叶片, 剪碎, 放于研钵中, 加 2.0 ml 磷酸缓冲液, 研磨匀浆, 用 23 ml 磷酸缓冲液将匀浆液转入离心管中, 于 4 000 r/min, 离心 10 min, 上清液即为酶提取液, 低温保存待用。

1.2.2 过氧化物酶活性的测定。 测定酶活性的反应体积为 4 ml, 如果体积不足用磷酸缓冲液补足。逐步加入适量

浓度 0.05 mol/L 磷酸缓冲液, 适量的浓度 2% 的 H_2O_2 溶液和 1.0 ml 浓度 0.05 mol/L 的愈创木酚。用加热煮沸 5 min 的酶液为对照, 反应体系在一定温度的水浴中保温 3 min 后加入酶液, 混匀后立即在 470 nm 波长下比色, 每隔 1 min 记录 1 次吸光度 A_{470} , 共记录 5 次, 计算每分钟吸光度变化值 ($\square A_{470}$)。以每分钟内 A_{470} 变化 0.01 为 1 个酶活性单位 (U), 计算酶活力^[3]。

1.2.3 正交试验设计。 试验以酶体积、底物体积、反应体系的酸碱度和反应温度等为影响因素, 采用 $L_{16}(4^5)$ 正交试验 (表 1) 研究过氧化物酶活性的最佳测定条件。每个试验进行 3 次重复, 对试验结果进行极差分析。

表 1 正交试验因素水平设计

水平	因素			
	酶体积/ml	底物体积/ml	温度/ $^{\circ}C$	pH
1	0.5	0.1	30	5.5
2	1.0	0.2	35	6.0
3	1.5	0.3	40	6.5
4	2.0	0.4	45	7.0

表 2 乌莓过氧化物酶在不同处理组合下测定的酶活力和极差分析

试验号	A	B	C	D	酶活力//U/g·min
1	0.5	0.1	30	5.5	409.38
2	0.5	0.2	35	6.0	404.69
3	0.5	0.3	40	6.5	124.48
4	0.5	0.4	45	7.0	136.72
5	1.0	0.1	35	6.5	220.31
6	1.0	0.2	30	7.0	201.56
7	1.0	0.3	45	5.5	175.00
8	1.0	0.4	40	6.0	123.06
9	1.5	0.1	40	7.0	125.00
10	1.5	0.2	45	6.5	135.94
11	1.5	0.3	30	6.0	90.34

作者简介 黄国文 (1965 -), 男, 湖南郴州人, 讲师, 博士, 从事生物学领域的教学和科研工作, E-mail: Huanggdax@163.com。

收稿日期 2013-06-14

接下表

(下转第 9244 页)

燥磨成粉后,分析生理活性成分含量。7月中旬采集的北缬草不同采集部位的缬草烯酸类成分含量和缬草三酯类成分含量测定结果显示(见表1~2),根及根茎的含量最高,分别为:总缬草烯酸类7.577 mg/g,缬草三酯类0.174 mg/g,叶中较少,地上茎中含量较低均不足根的1%。

表1 不同采集部位中缬草烯酸类成分含量比较(7月)

部位	缬草烯酸类//mg/g			
	羟基缬草烯酸	乙酰基缬草烯酸	缬草烯酸	总含量
根及根茎	1.633 ± 0.032	5.805 ± 0.154	0.139 ± 0.016	7.577
地上茎	0.027 ± 0.005	0.041 ± 0.006	0.006 ± 0.003	0.074
叶	0.032 ± 0	0.063 ± 0.016	0.007 ± 0.003	0.102

9月中旬采集的北缬草不同部位的缬草烯酸类成分含量和缬草三酯类成分含量测定结果显示(见表3~4),根及根茎的总缬草烯酸类成分和缬草三酯类成分含量均最高,分别为13.125和0.371 mg/g,叶中较少,地上茎中含量较低。而且,9月采集的各成分含量均高于7月采集的样品含量。

表2 不同采部位中缬草三酯类成分含量比较(7月)

部位	缬草三酯类//mg/g			
	缬草素	乙酰缬草素	异缬草三酯	总含量
根及根茎	0.102 ± 0.015	0.026 ± 0.002	0.046 ± 0.008	0.174
地上茎	0.004 ± 0	0.002 ± 0.001	0.010 ± 0.002	0.016
叶	0.014 ± 0	0.003 ± 0	0.012 ± 0.001	0.029

3 结论与讨论

试验结果表明,不管是7月中旬还是9月中旬采集的北

(上接第9228页)

续表2

试验号	A	B	C	D	酶活力//U/g·min
12	1.5	0.4	35	5.5	119.14
13	2.0	0.1	45	6.0	53.65
14	2.0	0.2	40	5.5	64.84
15	2.0	0.3	35	7.0	169.79
16	2.0	0.4	30	6.5	80.47
k_1	268.82	202.09	195.44	192.09	
k_2	179.98	201.76	228.48	167.94	
k_3	117.61	139.9	109.35	140.3	
k_4	92.19	114.85	125.33	158.27	
R	176.63	87.24	119.14	51.79	
最佳水平	A ₁ B ₁ C ₂ D ₁				

2 结果和分析

2.1 正交试验 由表2可知,4个因素对乌菘莓过氧化物酶活性测定的影响顺序依次是:底物浓度 > 温度 > 酶体积 > pH。优化水平组合为 A₁B₁C₂D₁,即反应体系中底物为0.5

表3 不同采集部位中缬草烯酸类成分含量比较(9月)

部位	缬草烯酸类//mg/g			
	羟基缬草烯酸	乙酰基缬草烯酸	缬草烯酸	总含量
根及根茎	1.160 ± 0.220	11.702 ± 0.082	0.263 ± 0.036	13.125
地上茎	0.010 ± 0.008	0.083 ± 0.041	0.003 ± 0.001	0.096
叶	0.019 ± 0.042	0.120 ± 0.028	0.004 ± 0.002	0.143

表4 不同采集部位中缬草三酯类成分含量比较(9月)

部位	缬草三酯类//mg/g			
	缬草素	乙酰缬草素	异缬草三酯	总含量
根及根茎	0.196 ± 0.012	0.095 ± 0.013	0.080 ± 0.008	0.371
地上茎	0.006 ± 0	0.003 ± 0.001	0.023 ± 0.002	0.032
叶	0.006 ± 0	0.005 ± 0	0.030 ± 0	0.041

缬草不同部位中生理活性成分含量差异明显,根及根茎中生理活性成分含量均最高,叶和地上茎中含有少量生理活性成分,这与倪兰等的研究结果相似^[4]。而且,9月中旬采集的各部位活性成分含量均高于7月中旬采集的样品,表明民间使用缬草以地下根及根茎入药是合理的,并以9月采集为最佳时期,为北缬草的合理利用提供科学依据。

参考文献

- [1] 李美阳. HPLC法测定不同采集时期的北缬草中生理活性成分含量[J]. 安徽农业科学, 2013, 41(2): 604-605.
- [2] 李时珍. 本草纲目(草部). 第14卷[M]. 北京: 人民卫生出版社, 1991: 854.
- [3] 黄仁泉, 张立, 杨建丽, 等. 不同种缬草中缬草三酯和缬草烯酸类成分的HPLC分析和比较[J]. 中草药, 2002, 33(11): 1000-1001.
- [4] 倪兰, 陈磊. 不同产地、部位和采收期的缬草属植物中缬草素成分含量比较[J]. 海峡药学, 2010, 22(8): 44-46.

ml浓度2%的H₂O₂溶液,温度为35℃,酶体积为0.1ml,浓度0.05 mol/L磷酸缓冲液的pH为5.5。

3 结论与讨论

试验测定酶活性的基础是酶促反应动力学,在测定温度对POD酶活性的影响时,要使酶促反应体系在设定的温度下保温一定时间再加入酶液,并且酶液浓度要低,才能保证在酶促反应初速度阶段测定吸光度。

试验结果表明,底物体积、酶体积、温度和pH值等4个因素对乌菘莓过氧化物酶活性都有影响,其影响大小顺序是底物浓度 > 温度 > 酶体积 > pH,并且以底物体积和温度的影响较大。最佳测定条件为:浓度2%的H₂O₂,体积0.5ml,温度为35℃,酶体积为0.1ml,pH值为5.5。

参考文献

- [1] 李京民,毛整生,袁立朋. 乌菘莓化学成份的研究[J]. 中医药学报, 1995(2): 52-53.
- [2] 吴明江,于萍. 植物过氧化物酶的生理作用[J]. 生物学杂志, 1994, 62(6): 14-16.
- [3] 萧浪涛,王三根. 植物生理学实验技术[M]. 北京: 中国农业出版社, 2005: 103.