

苦瓜过氧化物酶的提取分离及性质测定

The Extraction of Peroxidase from *Momordica charantia* and Its Property

刘金磊¹, 苏涛², 李典鹏¹, 卢凤来¹

LIU Jin-lei¹, SU Tao², LI Dian-peng¹, LU Feng-lai¹

(1. 广西植物研究所, 广西桂林 541006; 2. 桂林益佰漓江制药有限公司, 广西桂林 541006)

(1. Guangxi Institute of Botany, Guilin, Guangxi, 541006, China; 2. Guilin Yibai Lijiang Pharmaceutical Co. Ltd, Guilin, Guangxi, 541006, China)

摘要:从苦瓜 (*Momordica charantia* L.) 中分离和纯化过氧化物酶(POD), 分别测定其最适 pH 值、最适温度、热稳定性、底物浓度对酶活性的影响。结果表明: 苦瓜过氧化物酶以邻苯二胺为底物时 $\lambda_{\max} = 425\text{nm}$, $K_m = 4.6 \times 10^{-3}$, $V_{\max} = 0.137\text{unit/s}$, 最适 pH 值为 4.6, 最适温度是 50℃。在温度为 50℃ 时过氧化物酶的酶活力最大, 酶活性较高。在温度为 60℃ 以上时过氧化物酶的失活率升高, 在温度为 70℃ 以上时过氧化物酶基本失活。抗坏血酸和半胱氨酸对过氧化物酶有明显的抑制作用, 其失活率分别达到 94% 和 92%; Al^{3+} 的抑制作用稍弱, 过氧化物酶的失活率为 69%; EDTA 的抑制效果最不明显, 过氧化物酶的失活率仅为 13%。

关键词:过氧化物酶 性质 苦瓜

中图分类号: Q946.5 文献标识码: A 文章编号: 1005-9164(2007)04-0407-04

Abstract: Peroxidase was separated and purified from *Momordica charantia*. Its optimum pH value, optimum temperature, thermal stability and effect of substrate concentration on enzyme activity were determined. The results were showed as follows: With O-phenylenediamine as substrate, $\lambda_{\max} = 425\text{nm}$, $K_m = 4.6 \times 10^{-3}$, $V_{\max} = 0.137\text{unit/s}$, optimum pH value 4.6, optimum temperature at 50℃ with high enzyme activity. The inactivation rate of POD raised over 60℃, and the enzyme activity was almost lost above 70℃. Vitamin C and Cysteine had great inhabitation effect on POD activity, the inhibition rate reached 94% and 92% respectively. Al^{3+} was weaker, with inhibition rate of 69%. EDTA had no significant effect of inhibition, the inhibition rate was only 13%.

Key words: POD, property, *Momordica charantia*

苦瓜 (*Momordica charantia* L.) 系葫芦科苦瓜属植物^[1], 又称癞葡萄和锦荔枝, 属蔓性一年生蔬菜, 广泛分布于热带、亚热带和温带地区, 富含维生素 C、多种氨基酸和丰富的矿物质, 不仅营养丰富还具有很高的药用价值。苦瓜具有消暑涤热、明目解毒的功效^[1], 用于治疗肠胃炎、赤眼中暑, 还具有滋养强壮、降低血糖等功效^[2]。

过氧化物酶(POD)是广泛存在与各种动物、植物、微生物体内的一类氧化酶。过氧化物酶以西红素为辅基, 参与了许多重要的生理过程如: 细胞壁的合成, 应激反应, 生长调节等等^[3]。过氧化物酶在植物细

胞内主要分布在细胞壁, 液泡, 输导组织及膜结合核糖上。迄今过氧化物酶作为一种商品试剂也广泛用于免疫组织化学, 电镜技术, 酶联反应等生物学研究, 并成为重要的诊断试剂^[4]。

目前, 关于植物体内过氧化物酶的研究多数集中于它的理化过程, 对苦瓜氧化物酶的理化研究及动力特性研究的报道很少。本试验对苦瓜中的过氧化物酶进行提取、分离、纯化, 较为系统地对苦瓜 POD 的动力特性及常用抑制剂作用效果进行了研究, 给该酶的合理调控提供依据。

1 实验材料和方法

1.1 材料

新鲜苦瓜(购自桂林市屏风市场), 透析袋(北京索莱宝科技有限公司生产), 微孔滤膜(上海兴亚净化

收稿日期: 2007-06-08

修回日期: 2007-06-27

作者简介: 刘金磊(1980-), 男, 实习研究员, 主要从事植物资源的开发利用研究。

材料厂生产)。

1.2 仪器

TV-1800S 紫外可见分光光度计(北京瑞丽分析仪器公司生产), TGL-16C 高速离心机(北京普析通用仪器有限公司生产), BS-210S 电子天平(上海亚荣生化仪器公司生产), 90-3型恒温水浴箱(国华电器有限公司生产)。

1.3 试剂

H₂O₂, 邻苯二胺, 硫酸铵, Vc, EDTA, 硝酸铝, 半胱氨酸, 磷酸氢二钠, 柠檬酸等, 均为国产分析纯。

1.4 酶液的制备

1.4.1 POD 粗提

称取400g 苦瓜用水冲刷干净, 切成小块, 用研钵研成匀浆, 4层纱布过滤用高速离心机(4000r/min)离心15min, 取上清液。

1.4.2 分级纯化及精制^[5]

在不断搅拌下每升上清液中慢慢加入266g 硫酸铵粉末(0.4饱和度), 在1~2h内加完后置冰箱中过夜。次日将上清液用虹吸管移出, 下面浑浊液用3000r/min 离心15min, 弃沉淀合并上清液, 按每升上清液加256g 硫酸铵粉末(0.8饱和度)边加边搅拌, 大约在1h内加完。当硫酸铵全部溶解后置冰箱内于4℃下过夜, 次日用虹吸管吸出上清液, 沉淀部分4000r/min 离心20min, 保留沉淀, 悬浮于150ml 蒸馏水中(使沉淀全部溶解为止)分装于透析袋(规格: 分子量大于10000, 下同)内4℃下透析48h 以后有沉淀析出, 4000r/min 离心15min, 得上清液。将上清液倒入烧杯中冰浴, 加入-15℃的丙酮, 4000r/min 离心15min, 得上清液, 再加入0.8倍体积的-15℃的丙酮, 离心后收集沉淀并溶于少量蒸馏水中, 透析除去丙酮。将沉淀稀释, 滴加1mol/ml 的硫酸锌溶液, 离心后上清液透析除盐, 用微孔滤膜(孔径0.22μm 规格φ 25mm)过滤后, 经过真空冷冻干燥后得过氧化物酶干制品, 置干燥器低温保存。

2 结果与分析

2.1 POD 最大吸收波长的测定及反应进程曲线

室温下, 取1.5ml 酶液(取10mg 过氧化物酶干制品至100ml 容量瓶加蒸馏水溶解定容, 下同), 加入0.1mol/L pH 值4.6的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液2ml (取0.1mol/L 磷酸氢二钠和0.1mol/L 柠檬酸以体积比9.35:10.65配比, 下同), 加入0.02%邻苯二胺2ml (取0.02mg 邻苯二胺溶于100ml 水中, 下同)迅速加入0.2% H₂O₂2ml (取0.67ml 30% H₂O₂加水至100ml 水中, 临用前配制, 下同)摇匀, 1min 后进行光谱扫

描。经过光谱扫描最大吸收波长为425nm, 其反应进程曲线见图1。

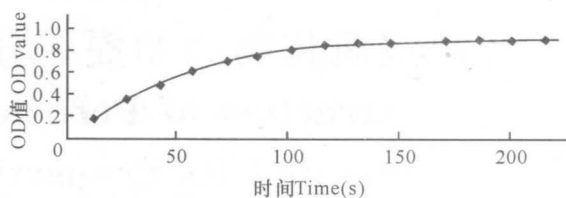


图1 POD 反应进程曲线

Fig. 1 Reaction process curve of POD

图1结果显示, POD 在反应过程中, 在0~100s 内速度保持恒定, 此后逐渐下降。本实验取15~60s 光密度变化值进行酶促反应计算。

2.2 测定 POD 的 K_m 值及 V_{max} 值

温度、pH 值及酶液的浓度保持固定、以不同浓度的邻苯二胺作为底物, 根据方程 $1/V = K_m/t \times 1/V_{max} + 1/V_{max}$ 得回归方程为 $y = 0.1747x + 7.3223$ ($r = 0.0986$), 计算得 K_m 值为 4.63×10^{-3} mol/L, V_{max} 值为0.137unit/s·gFW, 其数值表示见图2。

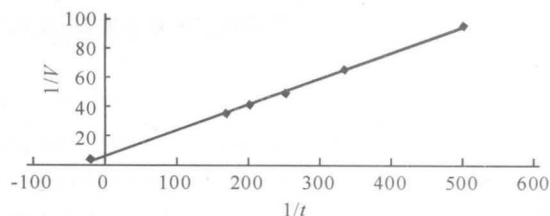


图2 POD 酶促反应双倒数曲线

Fig. 2 Double reciprocal plot of POD enzymatic reaction

2.3 pH 值对 POD 活力的影响

配制磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液, 以每隔0.5个 pH 值为单位梯度进行测定。取1.5ml 酶液, 分别加入2ml 相应 pH 值的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液, 2ml 0.02%邻苯二胺, 迅速加入2ml 0.2% H₂O₂ 摇匀, 在425nm 处, 测其吸光度的改变值, 每15s 间隔测1次。每组数据重复测量5次, 所测数据进行 SPSS 方差数理分析 ($P < 0.01$) 后计算酶活性, 其 pH 值与 POD 活性关系见图3。

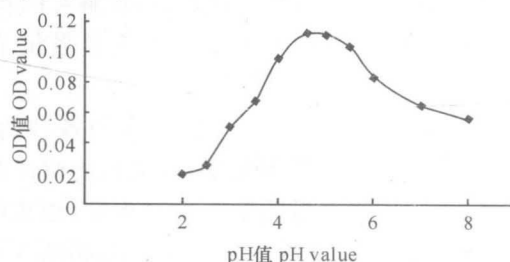


图3 pH 值对 POD 活性的影响

Fig. 3 Effects of pH on POD activity

由图3可以看出, 苦瓜过氧化物酶活性与温度的关系曲线为典型的钟罩曲线, 该酶在 pH 值为4.6时

活性最高,之后随着 pH 值升高活性有降低的趋势。所以说过氧化物酶的最适酸度值应是4.5~5.0。

2.4 温度对 POD 活力的影响

取1.5ml 酶液至试管中,设定温度在25℃、30℃、40℃、45℃、50℃、55℃、60℃、70℃、80℃的水浴箱中水浴。5min 后取出试管,加入2ml pH 4.6的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液,0.02%邻苯二胺2ml之后,迅速加入0.2% H₂O₂2ml 摇匀,在425nm 处测定吸光度的变化值,每15s 间隔测1次,每组数据重复测量5次,所测数据进行 SPSS 方差数理分析($P < 0.05$)后计算酶活性,温度变化与 POD 活性的关系见图4。

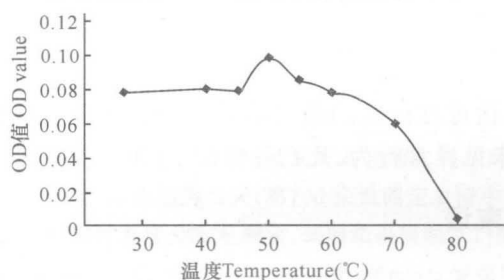


图4 温度变化对 POD 活性的影响

Fig. 4 Effects of temperature on POD activity

图4结果显示,在 50℃时 苦瓜过氧化物酶活性较高,过了70℃之后活性下降。

2.5 POD 的热稳定性实验

取1.5ml 酶液于试管中在50℃时水浴保温2min 后,分别将4支试管移到100℃沸水中,计时间分别在30s,1min,2min,3min 后把试管从沸水中取出立即用冰水冷却,加入2ml pH 值4.6的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液,加入0.02%邻苯二胺2ml 之后,迅速加入0.2% H₂O₂2ml 摇匀。在425nm 处测定吸光度的变化值,每15s 间隔测1次,每组数据重复测量5次,所测数据进行 SPSS 方差数理分析($P < 0.05$)后计算酶活性,热稳定性与 POD 活性关系见图5。

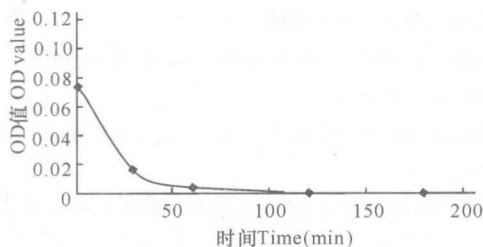


图5 热稳定性对 POD 的影响

Fig. 5 Effects of blanching time on relatively residual enzyme activity

由图5可知100℃沸水加热1.5min 后过氧化物酶开始失活,3min 之后才完全失活(失活率>99.5%)。

2.6 POD 的抑制性反应

取0.1mg/ml 的过氧化物酶液1.5ml,分别加入

20mmol/L 的 EDTA、Vc、Al(NO₃)₃以及半胱氨酸溶液1ml 反应30min 后,在温度为50℃、pH 值为4.6 条件下,加入0.02%邻苯二胺2ml 之后,迅速加入0.2% H₂O₂2ml 摇匀。在425nm 处测定吸光度的变化值,每15s 间隔测1次每组实验数据重复测定5次。以处理过的 POD 吸光度值(V)与对照 POD 的吸光度值(V₀)比较,把对照酶活性作为100%,从而计算各种抑制剂对酶活性的影响。抑制程度公式为(1 - V/V₀) × 100,所测数据经过 SPSS 方差分析得的结果见表1。

表1 POD 的抑制性反应

Table 1 The inhibitory reaction of POD

处理 Treatment	POD 的吸光度 The absorption of POD	POD 的失活率 The lost of POD activity
酶 Enzyme	0.526 ± 0.011	0
酶+EDTA Enzyme+ EDTA	0.461 ± 0.019*	13
酶+Al ³⁺ Enzyme+Al ³⁺	0.216 ± 0.010*	69
酶+半胱氨酸 Enzyme+ cystein	0.048 ± 0.005**	92
酶+抗坏血酸 Enzyme+Vc	0.046 ± 0.004**	94

*: $P < 0.01$, **: $P < 0.05$, $n = 5$ 。

从表2可以看出,不同抑制剂对过氧化物酶抑制作用差别很大,半胱氨酸和 Vc 对酶活性有明显抑制作用,金属离子 Al³⁺对酶活性的抑制作用也比较强,EDTA 对酶活性抑制作用较小。

3 结束语

姜远良^[6]对辣根过氧化物酶,何平^[7]对甘蔗苗过氧化物酶分别进行相关研究。本文对苦瓜过氧化物酶进行了提取、纯化,较为系统地研究了该酶的动力学特征及相关特性。本实验以邻苯二胺做为底物的结果表明:苦瓜过氧化物酶的最适 pH 值为4.6,最适温度为50℃,在较高温度下有较强的耐热性。苦瓜过氧化物酶的动力学参数 K_m 为 4.63×10^{-3} mol/L, $V_{max} = 0.137$ unit/s·gFW,至于邻苯二胺是否是该酶的最适底物还需要进一步的研究。

4种常用过氧化物酶抑制剂的作用效果有明显差别,抗坏血酸和半胱氨酸对酶的抑制程度较高,POD 的失活率分别达到了94%和92%;Al³⁺的抑制作用稍弱,POD 的失活率为69%,EDTA 的抑制效果最不明显,POD 的失活率仅为13%。

致谢:

本实验得到了桂林工学院董新红老师的悉心指导与大力帮助,谨此表示衷心的感谢。

参考文献:

[1] 江苏新医学院. 中国中药大词典[M]. 上海:上海科学技术出版社,1975:1281.
 [2] 雒宇晓. 苦瓜的综合利用研究进展[J]. 中国果菜,2004(5):603-604.
 [3] 田国忠,李环方. 植物过氧化物酶的研究进展[J]. 武汉植物学研究,2001,19(4):332-344.
 [4] 朱忠勇. 过氧化物酶与过氧化氢酶[J]. 临床检验杂志,1998,16(1):356-358.

[5] 张龙翔,张庭芳. 生化实验方法和技术[M]. 北京:高等教育出版社,1997.
 [6] 姜远良,冯春良. 辣根过氧化物酶催化过氧化氢(H₂O₂)及氧化邻苯二胺反应动力学研究[J]. 光谱学与光谱分析,2002(6):400-436.
 [7] 何平,施伟平. 甘蔗苗过氧化物酶的分离、纯化及性质测定[J]. 上海交通大学学报,2003,21(2):131-134.

(责任编辑:邓大玉)

(上接第406页 Continue from page 406)

噬指数,高剂量组也能明显的提高吞噬指数。提示泡桐甲素可促进单核巨噬细胞的吞噬功能,具有非特异性免疫增强作用。

表3 泡桐甲素对单核巨噬细胞吞噬功能的影响($\bar{X} \pm SD, n=10$)

Table 3 Effect of paulownin on the phagocytic funtion of mononu clear phagocyte($\bar{X} \pm SD, n=10$)

组别 Group	剂量 Doses(g/kg)	吞噬指数 K Phagocytic index K
对照组 Control	—	0.0062±0.0027
左旋咪唑 Levamisole	0.05	0.0024±0.0012***
泡桐甲素 Paulownin	0.45	0.0032±0.0021*
泡桐甲素 Paulownin	0.23	0.0020±0.0012***

与对照组比较 Compare with control; *P<0.05 **P<0.0001.

表4结果显示,泡桐甲素高剂量在0.5h、1h、2h时对葡萄糖引起的血糖升高有显著的抑制作用,低剂量抑制作用不明显,说明泡桐甲素具有降血糖作用。

表4 泡桐甲素对葡萄糖引起高血糖小鼠血糖的影响($\bar{X} \pm SD, n=10$)

Table 4 Effect of paulownin on blood glucose of hyperglycemia induced by glucose in mice ($\bar{X} \pm SD, n=10$)

组别 Group	剂量 Doses (g/kg)	血糖 Blood glucose(mmol·L ⁻¹)		
		0.5h	1h	2h
对照组 Control	—	3.77±1.44	4.29±2.26	8.98±4.69
模型组 Model	—	4.63±1.43	7.48±2.29	7.91±1.13
优降糖 Glybenzyc- lamide	0.25	3.12±1.47**	3.98±1.85**	4.21±2.47***
泡桐甲素 Paulownin	0.45	3.25±1.85*	3.36±1.24**	4.02±2.08***
泡桐甲素 Paulownin	0.23	3.42±1.85	6.26±2.51	6.42±1.73

与模型组比较 Compare with model; *P<0.05; **P<0.01; ***P<0.001.

急性毒性试验的最大给药量为4.5g/kg。观察动物7d,未见异常行为、死亡等情况,体重增长正常。

3 结束语

近年来泡桐的研究集中于生物碱、黄酮类、有机酸化学成分的提取分离和药理作用研究,对泡桐甲素药理作用的研究报道较少。为了探讨和开发泡桐甲素的药用价值,本文采用多种动物模型及实验方法,对其进行了抗炎、镇痛、免疫、降血糖等药效作用和毒性的初步研究。发现其对小鼠早期炎症有抑制作用;提高化学物质所致小鼠扭体反应次数;增强非特异性免疫功能;降低高血糖小鼠的血糖;且毒性很小。因此有必要对泡桐甲素进行深入药理活性研究,进一步弄清泡桐甲素药理作用机制及其构效关系,以期有效的利用泡桐甲素,为开拓广西植物药在疾病治疗中的新优势成为可能。

参考文献:

[1] 广西中医药研究所. 广西药用植物名录[M]. 南宁:广西人民出版社,1984:565.
 [2] 江苏新医学院. 中药大词典[M]. 上海:上海科学技术出版社,1986:1456.
 [3] 徐叔云. 药理学实验方法[M]. 北京:人民卫生出版社,1982:506.
 [4] 陈奇. 中药药理实验[M]. 贵阳:贵州人民出版社,1988:120.
 [5] 李仪奎. 中药药理实验方法学[M]. 上海:上海科学技术出版社,1991:157.
 [6] 钟正贤,覃洁萍,周桂芬,等. 广西藤茶总黄酮降血糖的实验研究[J]. 中国中药杂志,2002,27(9):687.

(责任编辑:邓大玉)