

人参细胞培养物中过氧化氢酶活力的测定

生化教研室(南京 210009) 胡卓逸* 史建勋
中国药科大学 组织培养室 丁家宜

摘 要 测定了不同生长期的人参细胞培养物中过氧化氢酶的活力,结果表明此酶活力随人参细胞的培养时间而异。酶的单位鲜重活力从 10 d 到 21 d 内较快升高,在抽样测定中以 21 d 时为最高,约为 188 u/mg 人参细胞培养物。

关键词 人参细胞培养物 过氧化氢酶

人参 *Panax ginseng*, C. A. Meyer 是一种名贵的中药材,具有多方面的疗效。野生药材资源缺乏,人工栽培又有一定的困难和限制。希望人参细胞培养能为人参的开发利用提供新途径,为抗衰老药物研制提供新材料。根据衰老原因与机制学说^[1],认为生物大分子交联和体细胞突变等因素对机体造成了不可逆损伤,长此积累导致衰老。而自由基和过氧化物是造成上述损伤的直接原因。抗氧化酶在防止此种损伤中起着重要作用,已有报道从多种药用植物中检测到了抗氧化酶的活性^[2]。过氧化氢酶是一种抗氧化酶,它能特异地清除 H_2O_2 ^[3], H_2O_2 与氧自由基的产生有密切关系^[1]。我们试图检测人参细胞培养物(CMGC)中的过氧化氢酶(CAT)活性,以 CAT 为目标产物,检测不同培养时间的 CMGC 中的 CAT 活力,可能为人参细胞培养时间的确定提供依据。

1 仪器与试剂

GL20A 型全自动高速冷冻离心机(湘西仪器仪表总厂);BH-2 型显微镜(OLYMPUS);牛血清白蛋白(BSA,生化试剂,上海生物制品研究所);考马斯亮兰(CBB)G-250(Fluka);过氧化氢酶(CAT,中科院上海生

化研究所);其它试剂均为 AR 级,实验用水均为重蒸馏水。

2 供试样品

CMGC 及空白培养基(不含琼脂)由本校组织培养研究室提供。CMGC 培养时间分别为 10、20、29、37、57 d。CMGC 培养基为固体 MS 培养基^[4]。

3 方法与结果

3.1 粗酶提取液的制备:扭力天平称取新鲜 CMGC 2.500 g,加入 pH 7.38 磷酸盐缓冲液 5.00 mL,于冰浴中匀浆 3 min,取匀浆于 0℃,8 000 r/min 离心 10 min,得上清液(即粗酶提取液)待测。

3.2 细胞破碎率的检测:取上述处理过程中的匀浆,直接装片,于显微镜(10×40 倍)下观察细胞破碎情况,测得细胞破碎率大于 95%。

3.3 蛋白质含量测定:用 CBB G-250 法^[5]测定粗酶提取液中的蛋白质含量,以 BSA 为标准。

3.4 过氧化氢酶活力测定:采用改进的铝酸铵显色法测定 CMGC 粗提液中 CAT 活力^[6]。基于底物 H_2O_2 能与显色剂铝酸铵反应生成稳定的黄色复合物,可在 405 nm 处测

* Address: Hu Zhuoyi, Department of Biochemistry, China Pharmaceutical University, Nanjing

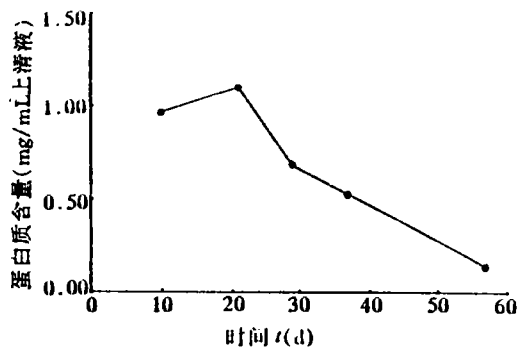


图1 不同培养时间 CMGC 粗提液中蛋白质的含量

定其吸收值。CAT 催化 H_2O_2 分解成 H_2O 和 O_2 , 从而降低底物量, 使黄色复合物生成的量减少。以 CAT 标准品建立了扣除空白培养基对该酶活力影响的标准曲线。

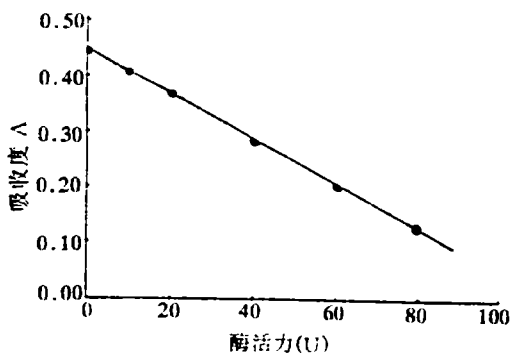


图2 CAT 活力测定标准曲线

样品中 CAT 活力测定: 取粗酶提取液 200 μ L 同制作标准曲线条件, 测定其 CAT 活力。粗酶提取液与底物反应后, 加显色剂测 $A_{405\text{ nm}}$, 再查标准曲线得出相应的 CAT 活力单位 (U)。进而求出酶的比活力 (CAT 单位/

表1 不同培养时间的 CMGC 中的 CAT 活力 ($n=4$) ($\bar{x} \pm s$)

培养时间(d)	10	21	29	37	57
CAT 活力, (U/mg 蛋白质)	58.22 $\pm$ 7.14	85.26 $\pm$ 4.08	106.79 $\pm$ 10.55	128.51 $\pm$ 17.25	563.07 $\pm$ 62.86
CAT 单位鲜重活力 (U/mgCMGC)	95.08 $\pm$ 10.48	188.11 $\pm$ 6.75	136.15 $\pm$ 5.13	134.86 $\pm$ 2.56	156.04 $\pm$ 3.23

mg 蛋白质) 及单位鲜重酶活力 (单位鲜重酶活力 = CAT 活力单位 / 对应的新鲜 CMGC 重量, g)。

4 讨论

4.1 在低温情况下手动匀浆器破碎 CMGC, 经显微镜检查破碎效果良好, 细胞破碎率在 95% 以上, 使酶的释放较为完全, 因而测得粗提液中的酶活力单位较为可靠。

4.2 由于培养条件、成分及细胞生长、代谢成分的复杂性, 操作中特别注意保持被测酶活力免受其它因素的影响, 如保持在 $0^{\circ}\text{C} \sim 4^{\circ}\text{C}$ 操作及样品液的低温贮存, 提取溶剂的低温处理, 割除文献^[7]上用有机溶剂、EDTA 等处理的过程等等。

4.3 用钼酸铵显色后的比色法比之高锰酸钾滴定法测 CAT 活力, 前者快速、简便、专一性强, 本实验已扣除培养基对酶活力的影

响, 提高了实验的准确性。

4.4 如果能测定不同生长期的栽培人参中的 CAT 活力, 比较 CMGC 细胞和栽培人参细胞生长过程中 CAT 酶活力和蛋白质含量变化, 将有助于优选人参细胞的培养条件, 或许可以作为判断人参细胞培养物的诸多质量指标中的一个指标。

参考文献

- 1 冯新为. 病理生理学 (第三版). 北京: 人民卫生出版社, 1993. 18, 220
- 2 吴国荣. 南京师范大学学报, 1991, 14(2): 93
- 3 莫 简. 生物化学与生物物理学进展, 1981, (2): 23
- 4 江苏省植物组织培养研究会编. 经济植物组织培养实用技术. 南京: 江苏科学技术出版社, 1988. 237
- 5 Bradford M M. Anal Biochem, 1976, 72: 248
- 6 Goth L. Clinica Chimica Acta, 1991, 196: 143
- 7 陆 玲. 南京师范大学学报, 1990, 13(2): 93

(1996-09-03 收稿)

Determination of Catalase Activity in Culture Medium of Ginseng Cells

Hu Zhuoyi, Ding Jiayi, et al

Catalase activity in culture medium of Ginseng cells (CMGC) at different cultural time was assayed. Re-

sults showed that the enzyme activity varied with cultural time of CMGC. The enzyme activity per gram of fresh CMGC increased rapidly from day of 10 to day 21, to reach a maximum value of 188 U/mg CMGC at day 21.

木香挥发油的超临界 CO₂ 萃取及质量研究

四川轻化工学院化工系(自贡 643033) 陈 虹*
华东理工大学化学工程研究所 邓 修

摘 要 用超临界 CO₂ 流体萃取法代替传统水蒸汽蒸馏法对木香挥发油的提取及其中主要活性成分之一去氢木香内酯的相对含量进行了研究。结果表明超临界萃取法不仅挥发油的收率高,而且活性成分含量也高。
关键词 木香 去氢木香内酯 超临界萃取

木香系菊科植物木香 *Aucklandia lappa* Decne. 的干燥根,具有行气止痛、消食健脾之功效。木香主含挥发油,其活性成分主要为倍半萜内酯^[1],其中主要成分之一去氢木香内酯(dehydrocostuslactone)具有松弛平滑肌、解痉、抑制由 KCl 诱导的主动脉收缩作用^[2,3]及中度降低血压作用^[1]。

超临界流体萃取是近年来广泛应用的一种新型分离、提取技术^[4]。超临界流体具有和液体相近的密度,其粘度虽高于气体但明显低于液体,扩散系数为液体的 10~100 倍。因此,对物料有较好的渗透性和较强的溶解能力。CO₂ 由于临界温度较低(T_c=31.3℃)、无毒、不易燃、化学惰性、价廉等优点而成为药用有效成分超临界提取的首选介质。我们对木香挥发油的超临界 CO₂ 萃取进行了研究,并用 GC 分析了其中主要活性成分去氢木香内酯的相对含量。结果表明,无论是挥发油的收率还是去氢木香内酯的含量均优于水蒸汽蒸馏法。超临界流体萃取可成为药用有效成分提取及质量研究的有效方法。

1 实验部分

1.1 材料:木香:云南省宜良县 1994 年产云木香切片,购于四川省自贡市药材公司,粉碎后过 20 目筛备用。CO₂ 上海市西比欧气体有限公司产 CO₂ 气。去氢木香内酯:将木香挥发油用重结晶方法提取其中去氢木香内酯晶体,熔点(59℃~60℃);MS、¹HNMR 与文献值一致^[5,6]。所用试剂均为分析纯。

1.2 仪器:超临界萃取装置为瑞士 NOVA 公司小型超临界萃取装置。气相色谱为日本岛津 GC-3A 型气相色谱,C-R3A 数据处理机。

1.3 实验方法:超临界萃取:称取 100 g 木香粉于萃取器中,用 CO₂ 排除萃取器中空气,调节萃取器、分离器压力、温度、CO₂ 流量至实验值。连续萃取 2 h 后从分离器中取出产物,除去其中水分,称量得木香挥发油,收率按下式计算。

$$\text{挥发油收率 } \eta = \frac{\text{木香油质量}}{\text{木香粉质量}} \times 100\%$$

水蒸汽蒸馏:称取木香粉 100 g 于圆底

* Address: Chenhong, Sichuan Institute of Light Industry and Chemical Technology, Zigong
陈虹,1983 年 7 月毕业于成都科技大学化学工程系化学工程专业,现在化学工程系化工原理教研室从事教学工作,讲师。研究方向:传质与分离。