

刺梨 SOD 活力测定研究

吴素玲, 张卫明, 孙晓明*, 金敬宏, 史劲松, 顾龚平
(南京野生植物综合利用研究院, 江苏 南京 210042)

摘 要: 本文建立了邻苯三酚自氧化对刺梨 SOD 测活方法的改进条件; 并对不同方法提取的刺梨 SOD 样液进行测试。结果表明: 刺梨果中含有丰富的 SOD, 但加工过程中温度对 SOD 活力影响很大。测得的 SOD 活力数据低的约 100U/g, 高的则约 5000U/g, 数值相差几十倍。为刺梨加工方法的选择提供参考。

关键词: 刺梨; 超氧化物歧化酶; 邻苯三酚; 提取方法

Studies on Determination of SOD Activity in *Rosa roxburghii* Tratt

WU Su-ling, ZHANG Wei-ming, SUN Xiao-ming*, JIN Jing-hong, SHI Jin-song, GU Gong-ping
(Nanjing Research Institute for the Comprehensive Utilization of Wild Plants, Nanjing 210042, China)

Abstract: The superoxide dismutase (SOD) assay in *Rosa roxburghii* Tratt by Pyrogallol Pyrogallol Acid self-oxidization method was studied. The SOD activities of *Rosa roxburghii* Tratt samples by using different extraction methods were determined. The results indicated the fruit of *Rosa roxburghii* Tratt contained rich SOD, but the process temperature could have much effect on the SOD activity. The minimum SOD activity measured was 100U/g and the maximum was 5000U/g. Lower temperature during storage and processing could preserve the activity. This paper could provide some reference to the choice of processing methods

收稿日期 2004-11-29

*通讯作者

基金项目: 国家农业科技成果转化基金课题(02EFN217201287)

作者简介: 吴素玲(1963-), 女, 副研究员, 研究方向为农副产品综合利用和食品分析。

基因杂合体和未转基因杂合体之间进行了检测, 结果显示并没有显著性差异。说明转基因棉花 15985 和 DPH37B 在作为食品和动物饲料方面与其他棉花和非转基因品种具有实质等同性。营养品质与传统的棉籽实际等同, 与常规棉籽一样, 可作为人类食品和畜禽饲料资源。

参考文献:

- [1] 贾士荣. 转基因植物食品中标记基因的安全性评价[J]. 中国农业科学, 1997, 30(2): 1-15.
- [2] Gideon Lack Clinical risk assessment of GM food [J]. Toxicology Letters, 2002, 127: 327-340.
- [3] Harry A. Kuiper comparative safety assessment for biotech crops [J]. Trends in Biotechnology, 2003, 21(10).
- [4] John R Holl, H Jaster. Feedstuffs, 1999. 12-13.
- [5] Park W, Waldrup. Nutrient composition of cottonseed meal surveyed[J]. Feedstuffs, 2002, (11): 11-12.
- [6] Lawhon, et al. Evaluation of the food use potential of sixteen varieties of cottonseed[J]. J Am Oil Chem Soc, 1977, 54:75-80.
- [7] Monsanto 2000, Safety, Compositional and nutritional aspects of bollgard II cotton event [S] 15985. U.S. FDA/CFSAN. BNF 74.
- [8] OECD 2004. Environment, health and safety publications series on the safety of novel foods and feeds. No. 11 Consensus document on compositional consideration for new varieties of cotton (*Gossypium hirsutum* and *Gossypium barbadense*) [C]: Key Food and Feed Nutrients and Antinutrients.
- [9] Xing C Z, et al. The spatial temporal distribution of Bt insecticidal protein in Bt transgenic cotton and its effect on Bt transgenic cotton resistance to bollworm [J]. Cotton Sci, 2001, 13(1): 11-15.
- [10] Cellini F, Chesson A, Colquhoun I, et al. Unintended effects and their detection in genetically modified crops [J]. Food and Chemical Toxicology, 2004, 42: 1089-1125.

of *Rosa roxburghii* Tratt assay.

Key words *Rosa roxburghii* Tratt; superoxide dismutase(SOD); pyrogallol pyrogalllic acid extracting methods

中图分类号 TS201.25

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2005)11-0058-05

超氧化物歧化酶(Superoxide dismutase), 简称 SOD, 是一种广泛存在于动、植物及微生物中的金属酶; 是机体内氧自由基的头号杀手, 是科学界证明、国内外公认的氧自由基的专一清除剂。自 1968 年发现 SOD 以来, 立即引起科学界的高度重视, 近 40 年来这方面的研究进展非常迅速, 发现 SOD 的存在可能与机体衰老、肿瘤发生、自身免疫性疾病和辐射防护等有关。目前, SOD 活性已成为抗衰老药物和抗衰老保健食品的一个重要指标^[1]。

刺梨(*Rosa roxburghii* Tratt), 异名缙丝花, 蔷薇科植物^[2]。其果实含有多种营养成分, 其中 VC 含量和 SOD 活性较高, 具有抗癌防癌生理活性^[3~5]。资料报道刺梨 SOD 活性高低悬殊太大, 低的只有 276.9U/g, 高的则达 10500U/g^{[4][6]}。SOD 测定方法很多, 条件不一, 测试结果很难比较。针对这种情况, 我们在刺梨 SOD 测定中, 选用 Marklund 建立的邻苯三酚(PR)自氧化法^[7]作为基本方法, 并参考许多该方法的相关改进资料, 摸索建立了自己的测定条件。对不同条件下提取的刺梨 SOD 进行活性测定, 为探索刺梨的合理加工方法提供依据。

邻苯三酚(PR)自氧化法测定 SOD 酶活力时测定条件的确定: 邻苯三酚(PR)自氧化法测定 SOD 酶活力的主要影响因素是 pH、温度、PR 浓度、测定波长及准确的测定时间。Marklund 初建的方法选用的测定波长为 420nm^[7], 而邹国林等报道自氧化产物的吸收峰在 325nm^[8,9], 为此, 我们也测定了自氧化产物吸收光谱。结果我们发现反应 4min 时测试溶液的吸收光谱如图 1 所示, 很显然, 此时产物吸收峰在 320nm、420nm 处没有明显的吸收峰, 与上述结果一致。并随着时间的延长, 峰往较长波长方向移动, 几小时后吸收峰移至 440nm 处。所以, 我们选择反应后 4min 时测定 320nm 处的吸收值。对反应系统中 pH、温度、PR 浓度等方面单项或多项的实验也有不少报道^[8~11]; 表明邻苯三酚自氧化速率随 pH 的上升而上升, 不过在酸性条件下非常稳定, 当 pH 大于 8.0 后, 自氧化速度急剧上升, 实验中按实际情况应严格控制 pH 值在 8.2 ± 0.01 ; PR 自氧化速率随时间变化的线性关系随温度上升而下降, 在 27℃以下线性关系较好; 孵育温度在 22.5~27.5℃时 30min 内同一 SOD 浓度对 PR 自氧化的抑制率基本不变; PR 自氧化速率随浓度的上升而上升; 同一浓度的 SOD 对不同浓度的 PR 的自氧化的抑制率只有 PR 浓度在 0.07~0.10mmol/L 时抑制率程度基本不变, 当 PR 的浓度大于 0.10mmol/L 时, 随

PR 浓度的上升 SOD 对其自氧化的抑制率不断下降; 当 PR 的终浓度为 0.1mmol/L 时, 其自氧化率落在最佳观察范围。根据以上结果, 我们确定孵育温度为 25℃; 系统 PR 的浓度为 0.10mmol/L; pH 为 8.2 ± 0.01 。

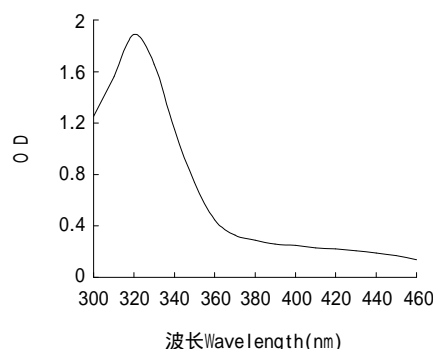


图1 邻苯三酚自氧化产物的吸收光谱图

Fig.1 Absorption spectrum of pyrogalllic acid self-oxidation productions

1 材料与方法

1.1 主要材料和仪器

1.1.1 刺梨果 南京野生植物研究院植物资源研究室鉴定为刺梨(*Rosa roxburghii* Tratt)成熟果实。

1.1.2 标准 SOD 上海华东理工大学生化工程系袁勤生教授提供, 由牛血细胞中提取。

1.1.3 其他试剂 市场购买, 分析纯。

1.1.4 主要仪器 JJ-2 型组织捣碎机; LXJ- II 型离心沉淀机; TU-1800 型紫外可见分光光度计; 20PR-520 型日立高速冷冻离心机。

1.2 方法

1.2.1 试剂的配制

1.2.1.1 0.2mol/L HCl: 用移液管量取 17.0ml 分析纯盐酸, 用重蒸水定容至 1000ml。

1.2.1.2 0.1mol/L 的 Tris-HCl 缓冲溶液(内含 2mmol/L EDTA): 称取 12.20g Tris(3-羟甲基氨基甲烷, 分子量=121.14, 纯度为 99%~99.5%)和 0.7482g EDTA(二乙三胺五乙酸, 分子量=372.24, 纯度 99.5%)用约 500ml 重蒸水溶解; 加 223.8ml 0.2mol/L 的 HCl; 最后用双蒸水定容至 1000ml。

1.2.1.3 10mmol/L HCl 用移液管量取 0.847ml 分析纯盐

酸,用重蒸水定容至1000ml。

1.2.1.4 20mmol/L PR 称取2.5222gPR(邻苯三酚,分子量126.11)用10mmol/L的HCl定容至1000ml。使用前配制,置4℃冰箱中备用。

1.2.1.5 标准SOD液(1U/5μl) 把酶活4000U/支的标准SOD用重蒸水定容至20ml,置4℃冰箱中备用。

1.2.1.6 50mmol/L的磷酸缓冲液(内含1mmol/L巯基乙醇):精确称取6.800gKH₂PO₄、1.808gNaOH、0.078g巯基乙醇,用重蒸水定容至1000ml。

1.2.2 刺梨SOD的提取

方法A:100g刺梨加少量水在组织捣碎机中高速破碎成匀浆,过滤;渣加适量水提取约8h再过滤;重复前面操作一次。合并三次过滤液,即为SOD粗酶液,置4℃冰箱尽早测定。

方法B:100g刺梨按1g:2~3ml的比例加50mmol/L的磷酸缓冲液,在组织捣碎机中高速破碎成匀浆(缓冲液预先未置4℃冰箱中冷藏),用LXJ-II型离心沉淀机4000r/min离心20min,收集上清液;沉淀物再加少量磷酸缓冲液搅拌后同样条件下离心,收集上清液。上清液合并即为SOD粗酶液,置4℃冰箱及时测定。

方法C:100g刺梨按1g:2~3ml的比例加50mmol/L的磷酸缓冲液,在组织捣碎机中高速破碎成匀浆(缓冲液预先置4℃冰箱中冷藏),用冷冻离心机15000r/min离心15min,上清液即为SOD粗酶液,置4℃冰箱及时测定。

1.2.3 样品的测定方法

我们在样品SOD活性的测定中严格以SOD标准试剂加以对照,为了反应系统pH值严格控制在 8.2 ± 0.01 ,我们采用微量进样法。通过制备标准SOD终浓度对PR自氧化抑制率的回归方程,再测得刺梨样液对PR自氧化的抑制率,根据标准回归方程及样液的稀释倍数计算刺梨SOD的活力。

另外,刺梨富含黄酮类化合物(我们实验测得含量约为1.4g/100g干计),该类化合物在紫外区有强吸收,会干扰PR法对SOD活性的测定结果,故在测定每一浓度的试液均需测本底的吸收值,以校正测定结果。本底的设置,用10mmol/L HCL代替PR。

标准SOD对PR自氧化的抑制率公式:

$$\text{抑制率} = (A_0 - A_s) / A_0 \times 100\% \quad (1)$$

刺梨样液对PR自氧化的抑制率公式:

$$\text{抑制率} = (A_0 - A_s + A_b) / A_0 \times 100\% \quad (2)$$

$$\text{样品SOD活性(U/g)} = Y \times 4 \times V_0 / V_s / 100 \quad (3)$$

公式(1,2)中, A_0 :为在pH8.2条件下PR自氧化至4min时反应液在320nm处的吸收值;

A_s :为在pH8.2条件下SOD抑制PR自氧化至4min时反应液在320nm处吸收值;

A_a :为在pH8.2条件下刺梨SOD样液抑制PR自氧化至4min时反应液在320nm处的吸收值;

A_b :为在pH8.2条件下刺梨SOD样液在320nm处的吸收值(即本底)。

公式(3)中,Y:为由标准方程计算出的样品在反应系统的SOD的浓度(U/ml);

4:为反应系统总体积(ml);

V_0 :为样品SOD提取液体积(ml);

V_s :为测定用SOD提取液体积(ml);

100:为试验用刺梨质量的g数。

2 结果与分析

2.1 标准SOD终浓度对PR自氧化抑制率之间的回归方程

表1 试剂用量
Table 1 Dosage of reagent

试剂	试管号							
	空白对照	0	1	2	3	4	5	6
0.1mol/L Tris-HCl buffer					2ml			
H ₂ O(双蒸水)					2ml			
SOD标准溶液(μl)	0	0	5	10	15	20	25	30
SOD终浓度(U/ml)	0	0.00	0.25	0.50	0.75	1.00	1.25	1.50
20mmol/L PR	0				20μl			
系统PR浓度	0				0.10mmol/L			
系统pH					8.2±0.01			

按表1依次在各试管中加试剂,在同一试管中加完SOD后置25℃水浴保温10min,然后加入同样温度孵育的PR,立即进行计时和吸收值的测定。“0”号管记录在320nm处不同反应时间的吸收值,并算出PR的自氧化速率,结果见下表2;其他管记录反应4min时在320nm处的吸收值,按公式(1)计算抑制率,制得回归方程,结果见下表3,标准曲线如图2。

表2 PR的自氧化速率
Table 2 The velocity of PR self-oxidation

PR自氧化时间(min)	1	2	3	4	5	6
OD ₃₂₀	0.133	0.225	0.314	0.392	0.462	0.525
自氧化速率ΔA(min)	0.078					

2.2 刺梨SOD活性测定

刺梨SOD提取液替代标准SOD用上述方法测定样品对PR自氧化的抑制率(加测本底吸收值),根据数据尽量调整其抑制率接近50%,按公式(3)计算样品SOD活性。不同提取方法的刺梨SOD测定结果见下表4。

3 结论

实验可知刺梨确实含有丰富的SOD,但不同的刺梨

表3 标准SOD终浓度对PR自氧化抑制率之间的关系

Table 3 The relationship between the end concentration of standard SOD and restrain rate of PR self-oxidization

SOD 终浓度(U/ml)	0.00	0.25	0.50	0.75	1.00	1.25	1.50
OD ₃₂₀	0.392	0.340	0.297	0.255	0.205	0.168	0.145
抑制率(%)	/	13.26	24.23	35.00	47.70	57.14	65.87
标准方程	$Y=0.0226X-0.0349$ $R=0.9984$						

表4 刺梨SOD测定结果

Table 4 Determination results of SOD activity in Rosa roxburghii Tratt

样品	鲜果 A	冷冻果 A	鲜果 B	冷冻果 B	鲜果 C	冷藏果 C	冷冻果 C
SOD 酶液总量(ml)	300	270	2550	2650	3470	3350	2850
SOD 酶液测定取样量(μl)	50	50	30	40	30	30	30
本底吸收值(OD ₃₂₀)	0.183	0.195	0.088	0.087	0.064	0.067	0.070
反应液吸光度(OD ₃₂₀)	0.464	0.489	0.319	0.336		0.257	0.251
抑制率(%, 二次平均值)	28.24	24.90	41.15	36.57		51.58	53.82
反应液 SOD 浓度(U/ml)	0.59	0.51	0.90	0.79	0.255	1.15	1.20
果实 SOD 测定值(U/g.Fw)	140	111	3051	2092	51.16	5096	4530

注:表中“鲜果A”指刺梨鲜果经“方法A”提取SOD,其他类推;“冷藏果”为4℃条件放置三个月后的刺梨;“冷冻果”为-18℃冷冻一年后的刺梨。

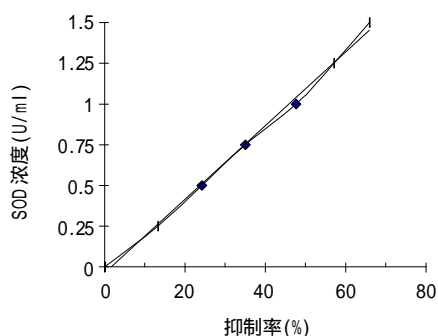


图2 标准SOD浓度与PR自氧化抑制率间的回归曲线

Fig.2 The recovery curve of the end concentration of standard SOD and restrain rate of PR self-oxidization

SOD 提取方法对其活性影响很大,测定值相差几十倍。实验表明,刺梨在加工过程中温度对SOD活力影响很大,常温下较长时间的处理破坏了SOD的活性(如方法A提取的刺梨SOD测定结果只剩100U/g左右);而低温则能很好地保护其SOD的活性(如方法C提取的刺梨SOD测定结果则高达5000U/g以上,长时间冷藏冷冻后的果实SOD活性也接近5000U/g)。在高等植物中,植物体内源SOD类型主要为Cu、Zn-SOD和Mn-SOD;有资料报告Mn-SOD对温度比较敏感,而CuZn-SOD则对温度比较稳定^[12~14]。据此,我们初步分析刺梨SOD类型很可能主要为Mn-SOD。这与史肖白等测得刺梨SOD主要是Mn-SOD^[6]的结果一致,而与吴立认为刺梨SOD主要是Cu、Zn-SOD^[15]的结果不同,其SOD类型的确定我们将在后续的实验中通过PAGE活性电泳方法进一步进行研究和分析。根据本实验对刺梨不同贮藏条件SOD活性的测定结果,我们建议在刺梨加工利用时,为

了保护SOD的活性,原料应在低温条件下贮藏,加工过程也应该尽量在低温下进行。另有资料表明,SOD在酶复合体系中的稳定性比纯化SOD活性更高,在实际加工中,采用刺梨榨汁液经冷冻干燥制成冻干粉,尽可能保持刺梨中有效营养成分,其开发利用的前景将更为广阔。

参考文献:

- [1] 王钢. 自由基与中医中药[M]. 南京: 南京大学出版社, 1993. 42-492.
- [2] 江苏省植物研究所,等. 新华本草纲目(第三册)[M]. 上海: 上海科学技术出版社, 1990, 121.
- [3] 袁勤生. 超氧化物歧化酶的研究进展[J]. 中国医学杂志, 1989, 24(7): 387-391.
- [4] 蔡金腾, 朱庆刚. 火棘果实刺梨果实的特性及营养成分的研究[J]. 食品工业科技, 1996, (4): 19-23.
- [5] 宋圃菊, 林东昕, 李寅. 刺梨的防癌作用[J]. 北京医科大学学报, 1987, 19(5): 305.
- [6] 史肖白, 顾姻, 庄一义, 等. 刺梨超氧化物歧化酶含量分析[J]. 中国野生植物资源, 1998, 17(4): 49-50.
- [7] Marklund S, et al. Involvement of the superoxide anion radical in the autoxidation of pyrogallol and a convenient assay for superoxide dismutase[J]. Eur J Biol Chem, 1974, 47: 469-475.
- [8] 宋金耀. 超氧化物歧化酶—邻苯三酚自氧化测活方法的改进[J]. 河北农业技术师范学院学报, 1992, 6(2): 30-35.
- [9] 邹国林, 桂兴芬, 钟晓凌. 一种SOD的测定方法—邻苯三酚自氧化法的改进[J]. 生物化学与生物物理进展, 1986, (4): 71-73.
- [10] 张英. 竹叶提取物类SOD活性的邻苯三酚法测定[J]. 食品科学, 1991, 18(5): 47-49.

加工鳗鱼制品中单增李斯特氏菌的 基因探针鉴定及分析

陈 彬, 黄晓蓉, 汤敏英, 邵碧英, 郑 晶
(福建出入境检验检疫局, 福建 福州 350003)

摘 要 从10份鳗鱼制品中分离到4株单增李斯特氏菌(*Listeria monocytogenes*)的可疑菌株, 应用Accuprobe基因探针方法进行快速鉴定, 鉴定结果与 API *Listeria* 方法的鉴定结果进行比较。结果表明, 基因探针鉴定方法更简便、快速、准确, 缩短了检验鉴定周期。检测鉴定结果也表明, 加工过的鳗鱼产品仍然存在被单增李斯特氏菌污染的可能, 应引起生产及监管部门的高度重视, 防止食物中毒的爆发流行。

关键词 基因探针; 鳗鱼制品; 单增李斯特氏菌

Identification and Analysis of *Listeria monocytogenes* with Gene Probe Method in Eel Products

CHEN Bin, HUANG Xiao-rong, TANG Min-ying, SHAO Bi-ying, ZHENG Jing
(Fujian Entry-Exit Inspection and Quarantine Bureau, Fuzhou 350003, China)

Abstract: Four strains of *Listeria monocytogenes* were isolated from 10 eel product samples and identified quickly with gene probe method. The identification result was compared with that of API *Listeria* method. The gene probe method was simpler, quicker and more accurate. The results of detection and identification also showed that even processed eel products could still be contaminated by *Listeria monocytogenes*, so the producer and supervising division should pay enough attention to prevent the outbreak of food poisoning.

Key words gene probe method; eel product; *Listeria monocytogenes*

中图分类号 TS207.4

文献标识码 A

文章编号 1002-6630(2005)11-0062-04

单核细胞增生李斯特氏菌简称单增李斯特氏菌, 是李斯特氏菌属中唯一能引起人畜共患病的病原菌, 致死率很高, 可达30%~70%, 是目前最重要的人类食源性病原菌之一^[1]。我国和其他许多国家将单增李斯特氏菌列为进出口食品的必检项目。传统的单增李斯特氏菌的检测方法, 检测工作程序复杂、周期长, 费时费力,

不能适应快速检测的要求。近年来随着检测技术不断完善, 核酸探针、PCR等有着高特异性和敏感性的快速检测方法被应用于食源性病原的检测。本文在2004年6月至9月, 分别从2批共10份鳗鱼制品中各检出2株共4株单增李斯特氏菌的可疑菌, 应用Accuprobe基因探针法^[2]进行了快速鉴定, 并对照API *Listeria*方法的鉴定

收稿日期: 2004-11-17

作者简介: 陈彬(1969-), 女, 工程师, 主要从事食品微生物和毒理的检测与研究。

- [11] 谢卫华, 姚菊芳, 袁勤生. 连苯三酚自氧化法测定超氧化物歧化酶活性的改进[J]. 医药工业, 1988, 19(5): 217-219.
- [12] 赵保路. 氧自由基和天然抗氧化剂[M]. 北京: 科学出版社, 1999. 52-56.
- [13] Clare D A, Blum J, Fridowich I. A hybrid superoxide dismutase containing both functional iron and manganese[J].

J Biol Chem, 1984, 259: 5932-5940.

- [14] Martin M E. A streptococcus mutans superoxide dismutase that is active with either manganese or iron as a cofactor[J]. J Biol Chem, 1986, 261: 9361-9370.

- [15] 吴立. 刺梨超氧化物歧化酶的定性检测[J]. 贵州农学院学报, 1987, (2): 33-36.