

橡胶树叶片转化酶提取方法的比较

蓝基贤^{1,2}, 何 慧^{1,2}, 戚继艳², 唐朝荣^{2*}

1 海南大学农学院, 海南儋州 571737

2 中国热带农业科学院橡胶研究所, 海南儋州 571737

摘 要 比较液氮研磨样品与蛋白抽提液研磨样品对 6 种提取橡胶树叶片转化酶方法的效果。结果表明: 液氮研磨法对转化酶活性影响很大, 特别是中性/碱性转化酶和细胞壁结合的酸性转化酶已基本失活, 而可溶性酸性转化酶活性丧失也比较严重。利用蛋白抽提液研磨样品, 用 HEPES-NaOH 法提取的可溶性转化酶的酶活性最高, 达 472.44 μmol(glucose)/[g(FW)·h]; 虽然磷酸-柠檬酸法获得的粗酶液的蛋白含量较低, 但其酶活性高达 441.61 μmol (glucose)/[g(FW)·h]; Tris-HCl 法提取的细胞壁结合酸性转化酶的酶活性最高, 达 35.83 μmol (glucose)/[g(FW)·h]。从转化酶的比活力看, 磷酸-柠檬酸法最佳, 所提取的可溶性转化酶比活力约为 HEPES-NaOH 法的 4 倍。本研究结果为进一步完善橡胶树叶片转化酶的提取方法提供重要的指导意义。

关键词 橡胶树叶片; 转化酶; 提取方法; 磷酸-柠檬酸法

中图分类号 Q946

文献标识码 A

Different Methods of Extracting Invertase from the Leaves of *Hevea brasiliensis* (Para Rubber Tree)

LAN Jixian^{1,2}, HE Hui^{1,2}, QI Jiyan², TANG Chaorong²

1 College of Agronomy, Hainan University, Danzhou, Hainan 571737, China

2 Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou, Hainan 571737, China

Abstract Six methods were investigated in extracting invertase from the leaves of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg) by two ways of grinding leaves: liquid nitrogen and extraction buffer. Grinding leaves in liquid nitrogen seriously destroyed the activities of invertases, especially those of neutral/alkaline invertase and cell wall-bound invertase which were totally inactivated. In comparison, the way of grinding leaves in extraction buffers was suitable for extracting various types of invertase. After the leaves were ground in extraction buffers, the activity of crude soluble invertase extracted by HEPES-NaOH method revealed to be the highest, being 472.44 μmol (glucose)/[g (FW) · h]. Despite low protein yields obtained by phosphate-citrate method, the resulting invertase activity was as high as 441.61 μmol (glucose)/[g (FW) · h]. Regarding the cell wall-bound invertase, Tris-HCl method was the most suitable, resulting in invertase activity of 35.83 μmol (glucose)/[g (FW) · h]. With regard to specific enzymatic activity, the phosphate-citrate method was the most appropriate, with specific activity of soluble invertases about four times as much as the HEPES-NaOH method. The results presented here would contribute to developing more effective extraction methods for various types of invertases from rubber leaves.

Key words *Hevea brasiliensis* leaves; Invertase; Extraction methods; Phosphate-citrate method

doi 10.3969/j.issn.1000-2561.2012.03.018

转化酶 (Invertase, Inv) (又称 β-D-呋喃果糖苷酶, β-D-fructofuranosidase EC 3.2.1.26) 广泛参与植物的韧皮部装载和卸载、生长发育、生物和非生物胁迫应答等, 在光合产物同化碳分配中起关键调控作用, 是决定作物经济产量的一种关键酶^[1-2]。

在橡胶树中, 蔗糖只有降解为单糖后才能进一步为橡胶生物的合成所利用, 已明确乳管蔗糖的降解能力是制约胶乳产量的一个关键因素^[3], 并证明胶乳转化酶是影响橡胶树胶乳产量的一个关键酶。在植物叶片中存在大量不同类型的转化酶, 按其溶解性、亚细胞定位和最适酶活 pH 值的不同, 将其

分为可溶性酸性转化酶 (Soluble acid invertase, SAI), 主要存在于液泡中, 最适酶活 pH 值为 4.5~5.0, 等电点 (pI) 约为 5.0; 细胞壁结合的酸性转化酶 (Cell wall-bound invertase, CWI), 酶活最适 pH 值为 4.5~5.5, 但 pI 较高为 9~10。在很多植物体中, CWI 和 SAI 都存在多种形式的同工酶, 分子量有相同的^[4], 也有差异较大的^[5]。可溶性中性/碱性转化酶 (Neutral or alkaline invertases, N/A-INV), 存在于细胞质中, pH 值为 7.0~8.0, pI 约为 4.5~5.0, 一般情况下, 该类转化酶的亚基分子量均集中在 54~65 ku。SAI 和 N/A-INV 均属于可溶

收稿日期: 2012-02-03

修回日期: 2012-03-02

基金项目: 中国热带农业科学院橡胶研究所专项资金 (No. YWFZX2010-4); 海南省自然科学基金 (No. 310094)。

作者简介: 蓝基贤 (1985 年一), 男, 在读硕士。研究方向: 橡胶树蛋白组学与分离纯化。* 通讯作者: 唐朝荣, E-mail: chaorongtang@126.com。

性转化酶(Soluble invertase, SI), 而 SAI 和 CWI 属于酸性转化酶^[1, 6-7]。

N/A-INV 活性极不稳定, 极易丧失酶活性^[8]。研究发现, N/A-INV 不仅存在于细胞质的胞液(cytosol)中, 且广泛存在于细胞质的细胞器(如线粒体、叶绿体和其它类型的质体)中。虽然尚不清楚这些细胞器中 N/A-INV 的确切生理功能, 但推测它们可能参与细胞内碳源的转运和代谢调控^[9]。选择合适的方法提取转化酶粗酶液, 是进行相关酶种类与活性测定的第一步。关于转化酶提取的方法很多, 如 Hepes-NaOH 法^[9]、Tris-HCl 法^[10]、磷酸-柠檬酸法^[11]、磷酸二氢钾法^[12]、磷酸钠法^[13]和水溶液法^[14]等, 其中 Hepes-NaOH 法是国内外广泛应用于植物转化酶的提取, 并已在莲花^[9]等多种植物上应用; 磷酸-柠檬酸法的应用也比较多, 在大豆叶片等材料转化酶提取上得到应用^[11]; 磷酸钠法已用于橡胶树叶片及树皮^[13]的 SI 的提取; 其它提取方法也有应用, 如 Tris-HCl 法用于苹果果实 SAI 及 CWI 的提取^[10], Lingle 等^[12]利用 KH₂PO₄ 提取甜瓜果实的可溶性转化酶。但尚未见比较不同提取方法对不同种类转化酶提取效率与活性影响的研究报道。基于对转化酶生理生化特性研究的需要, 本研究以橡胶树新鲜叶片为材料, 比较分析了这 6 种常用提取方法对转化酶提取效果和活性的影响, 为进一步完善橡胶树叶片转化酶的提取方法提供重要的指导意义。

1 材料与方 法

1.1 材 料

巴西橡胶树 (*Hevea brasiliensis* Müll. Arg) ‘热研 7-33-97’ 叶片采自中国热带农业科学院试验场三队。橡胶树于 2001 年定植, 2008 年开割, 割制为二分之一树围、3 d 一刀(S/2, d3), 未施乙烯利刺激。采集橡胶树枝条带回实验室, 置于冰上, 选取成熟叶片用去离子水清洗干净, 滤纸吸干水迹, 用剪刀将完整叶片剪成 1 cm×1 cm 小片, 用于下步的研磨与粗酶提取。

1.2 方 法

1.2.1 蛋白抽提液的配制 在本研究中, 笔者对转化酶提取液稍作修改, 添加蛋白酶抑制剂 PMSF 和盐酸苯甲醚, 而这两者都可防止蛋白降解, 终浓度均为 1 mmol/L; 同时, 考虑到非离子去污剂 Triton X-100 可提高蛋白的抽提效率, β-巯基乙醇可保护许多酶的活性^[15]; 用 PVPP 去除叶片中的多酚物质及减少褐变; 根据相关文献^[1], 将磷酸-柠

檬酸提取液的 pH 值调为 5.0, 其它类型提取液的 pH 值调为 7.0-8.0。

Hepes-NaOH 缓冲液参照 Welham 等^[9]的方法, 稍作修改, 配方为 50 mmol/L Hepes-NaOH、20 mmol/L 氯化镁、20% 甘油, pH 值 7.5。Tris-HCl 缓冲液参照 Pan 等^[10]的方法, 稍作修改, 配方为 150 mmol/L Tris-HCl、10 mmol/L 氯化镁、10% 抗坏血酸, pH 值 8.0。磷酸-柠檬酸缓冲液参照张振清等^[11]的方法, 稍作修改, 配方为 100 mmol/L 磷酸-柠檬酸缓冲液, pH 值 5.0; 磷酸二氢钾缓冲液参照 Lingle 等^[12]的方法, 稍作修改, 配方为 50 mmol/L 磷酸二氢钾、5 mmol/L 氯化镁, pH 值 7.5。磷酸钠缓冲液参照 de Oliveira 等^[13]的方法, 稍作修改, 配方为 50 mmol/L 磷酸二氢钠-磷酸氢二钠、20 mmol/L 氯化镁、20% 甘油, pH 值 7.0。水溶液参照王镜岩等^[14]的方法, 稍作修改, 配方为 20 mmol/L 氯化钠, pH 值 7.0。所有蛋白抽提液统一添加 2 mmol/L EDTA-Na₂、0.05% TritonX-100、1% β-巯基乙醇、1 mmol/L PMSF、1 mmol/L 盐酸苯甲醚; 上述试剂均为分析纯, 购自广州化学试剂厂和加拿大 BBI 公司。

1.2.2 液氮研磨 采取新鲜橡胶树叶片, 将其剪成约 1 cm×1 cm 小片, 称取 20 g, 放置在已经预冷的研钵中, 加液氮充分研磨, 按 4 mL/g(叶片)的比例加蛋白抽提液(含 2% PVPP), 并放置冰上磁力搅拌 2 h。用 4 层纱布进行过滤去除残渣, 于 4 ℃, 39 000×g 离心 20 min。上清液则为 SI 粗酶液, 沉淀物用蛋白抽提液洗涤 2 次后, 用于提取 CWI。对上清液用 MW 10 000 u 超滤管于 4 ℃, 3 000×g 离心 10 min, 浓缩后的 SI 粗酶液进行饱和硫酸铵(Saturated ammonium sulfate, SAS)分级沉淀, 先进行 30% SAS 沉淀蛋白, 将沉淀溶解于适量蛋白抽提液中; 上清液则用 80% SAS 沉淀, 此步骤在冰浴中搅拌过夜, 将沉淀溶解于蛋白抽提液中, 上清液在用 80%-95% SAS 沉淀, 将沉淀溶解于蛋白抽提液中。蛋白溶液进行透析(用蛋白抽提液作透析液)去除多余的盐离子, 则为 SI 酶液; 全部试验均在冰浴中进行。

由于 CWI 带正电荷, 以离子键形式紧密的结合于带负电的细胞壁上, 通常需要较高浓度的盐溶液(0.5~2.0 mol/L 氯化钠)才能将它浸提出来^[16]。在 CWI 提取中, 在上述的沉淀物中加入蛋白抽提液(含 1 mol/L 氯化钠和 0.1% TritonX-100)4 ℃抽提过夜, 抽提重复 2~3 次, 合并抽提液进行超滤浓缩。浓缩后样品进行 SAS 分级沉淀, 步骤同上。

1.2.3 提取液研磨 采取新鲜橡胶树叶片，将其剪成约 1 cm×1 cm 小片，称取 20 g，放置在已经预冷的研钵中，按 4 mL/g(叶片)的比例加蛋白抽提液(预冷)、2% PVPP 和石英砂在冰上研磨 30 min 后，放置冰上磁力搅拌 2 h。用 4 层纱布进行过滤去除残渣，39 000 ×g(4 ℃)离心 20 min。上清则为 SI 粗酶液，沉淀物则用于提取 CWI，实验步骤同“1.2.2”。

1.2.4 蛋白含量和酶活性测定 用改良的 Bradford 法测定蛋白含量^[9]，以牛血清蛋白为标准样品，取适量粗酶液及 SAS 沉淀后酶液测定。

SAI 和 CWI 活性的测定参照 Miron 等^[6]的方法，略有改动。测定反应液为 5~20 μL 抽提粗酶液或 SAS 沉淀后酶液、25 μL 蔗糖(0.4 mol/L)-氟化钠(0.24 mol/L)混合液和 55~70 μL 0.1 mol/L 磷酸-柠檬酸缓冲液，反应体系总体积为 100 μL，pH 值 4.8，然后用 3,5-二硝基水杨酸(DNS)法^[17]测定形成的还原糖量。

N/A-INV 酶促反应体系及反应条件参照 Tupy^[18]的方法，略有改动。取 5~20 μL 抽提粗酶液或 SAS 沉淀后酶液、25 μL 蔗糖(0.4 mol/L)-氟化钠(0.24 mol/L)混合液和 55~70 μL 磷酸-柠檬酸缓冲液，反应体系总体积为 100 μL，pH 值 7.2；还原

糖定量采用 DNS 法^[17]。

1.2.5 SDS-PAGE 电泳 聚丙烯酰胺凝胶电泳参照郭尧君^[9]的方法，5% 浓缩胶，10% SDS-PAGE 分离胶，取粗酶液 10 μL 上样，凝胶进行考马斯亮蓝染色。

2 结果与分析

2.1 液氮研磨样品后不同提取橡胶树叶片转化酶方法的比较

橡胶树叶片经液氮研磨后，采用不同方法提取转化酶粗酶液的结果见表 1。由表 1 可知，在 6 种提取方法中，磷酸-柠檬酸缓冲液法提取的 SAI 活性最高，达 110.00 μmol(glucose)/[g(FW)·h]，比活力亦为最高，达 25.52 μmol(glucose)/mg；Hepes-NaOH 法和磷酸钠提取的酶活性也较高，而其它 2 种方法(磷酸二氢钾和水溶液)提取的酶活力较低，尤其是磷酸二氢钾法，用该法提取的酶活性显著低于其它的提取方法，仅为 10.33 μmol(glucose)/[g(FW)·h]；Tris-HCl 法提取的蛋白含量最高，磷酸-柠檬酸法提取的蛋白含量最低，但其 SAI 比活力最高，达 25.52 μmol(glucose)/mg。但叶片经液氮研磨后，采用不同提取方法提取的粗酶液中均未检测到 N/A-INV 和 CWI 活性。

表 1 液氮研磨叶片后不同提取方法获得的转化酶粗酶液蛋白含量与酶活性比较

方法	SI 蛋白含量/[mg/g(FW)]	SAI 活性/μmol(glucose)/[g(FW)·h]	SAI 比活力/[μmol(glucose)/mg]
Hepes-NaOH	(22.40±0.14)	(83.72±0.50) c	3.73 d
Tris-HCl	(31.90±0.50)	(70.67±1.11) d	2.22 e
Phosphate-citrate	(4.31±0.08)	(110.00±2.00) a	25.52 a
KH ₂ PO ₄	(4.38±0.07)	(10.33±0.17) f	2.36 e
Phosphate-Na	(10.95±0.07)	(87.67±0.56) b	8.02 b
Water buffer	(5.92±0.13)	(24.67±0.56) e	4.17 c

说明：蛋白含量及酶活性相对标准偏差(RSD)均小于 25%；同列不同酶活数据后标注不同字母表示其在 5% 水平上差异显著。下同。

2.2 提取液研磨后不同提取橡胶树叶片转化酶方法的比较

橡胶树叶片经提取液研磨后，采用不同提取液提取转化酶粗酶液的结果见图 1。SDS-PAGE 电泳检测显示：不同提取方法获得的粗酶液蛋白条带存在明显差别，Tris-HCl 法和 Hepes-NaOH 法提取粗酶液的蛋白条带最多，而磷酸-柠檬酸法提取的这 2 种转化酶粗酶液的蛋白条带最少。

蛋白抽提液研磨后，Tris-HCl 法、Hepes-NaOH 法和磷酸钠法提取 SI 的效率较高，蛋白含量均在 23 mg/g(FW) 以上；磷酸二氢钾法次之，但

蛋白含量仅为 10.80 mg/g(FW)；水溶液法和磷酸-柠檬酸法较差，蛋白含量在 10 mg/g(FW) 以下；尤其是磷酸-柠檬酸法的蛋白含量不足 5 mg/g(FW) (见表 2)。不同提取方法获得的粗酶液蛋白含量与酶活性之间无明显的相关性，但对 SAI 和 N/A-INV 的酶活性影响很大。对 SAI 而言，Hepes-NaOH 法和磷酸钠法提取的酶活性显著高于其它 4 种方法，分别达 261.28 和 250.11 μmol(glucose)/[g(FW)·h]，磷酸-柠檬酸法和水溶液法次之，Tris-HCl 法提取的酶活性最低，不足 Hepes-NaOH 法和磷酸钠法的一半。对 N/A-INV 而言，磷酸-柠檬酸法提取的酶

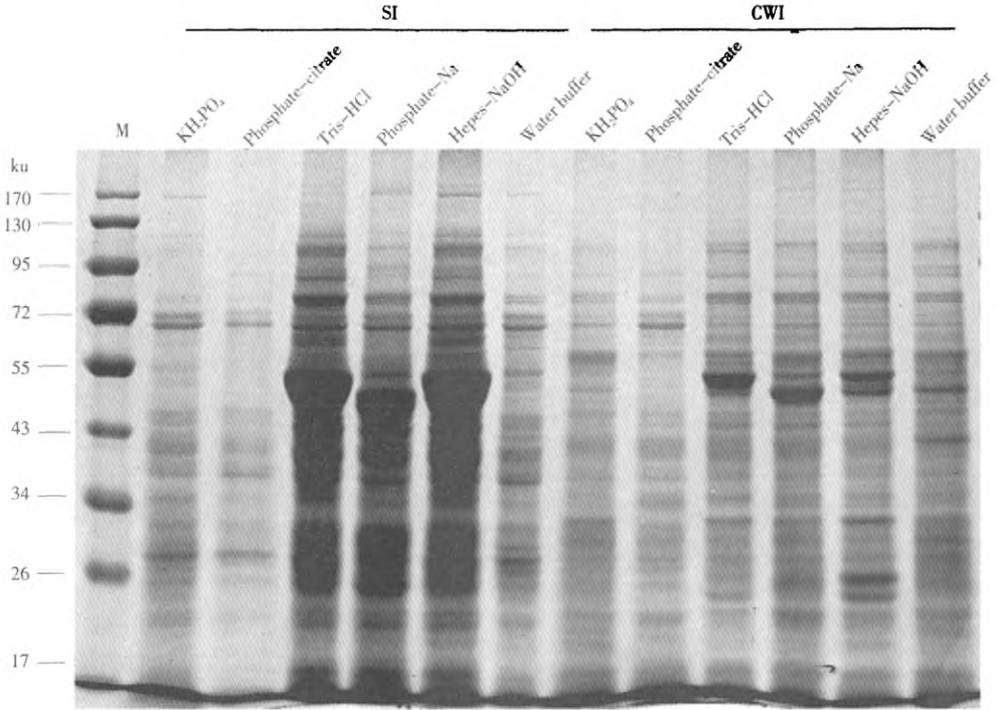


图 1 提取液研磨叶片后不同提取方法获得的转化酶粗酶液的 SDS-PAGE 电泳图谱

表 2 提取液研磨叶片后不同提取方法获得的转化酶粗酶液蛋白含量与酶活性比较

方法	蛋白含量/[mg/g (FW)]		酶活性/[$\mu\text{mol}(\text{glucose})/[\text{g}(\text{FW})\cdot\text{h}]$]				比活力/[$\mu\text{mol}(\text{glucose})/\text{mg}$]			
	SI	CWI	SAI	N/A-INV	SI	CWI	SAI	N/A-INV	SI	CWI
Hepes- NaOH	(23.32±0.15)	(2.65±0.02)	(261.28±1.67)a	(211.33±1.50)b	(472.61±2.39)a	(22.28±0.05)c	11.21d	8.99c	20.26c	8.41d
Tris-HCl	(23.59±0.37)	(1.98±0.05)	(113.61±1.78)f	(187.11±4.89)c	(300.72±5.90)d	(35.83±0.32)a	4.78e	7.93cd	12.75d	18.10b
Phosphate- citrate	(4.85±0.09)	(0.48±0.01)	(210.11±3.83)c	(231.50±4.11)a	(441.61±2.85)b	(24.17±0.14)b	42.70a	47.73a	91.26a	50.35a
KH ₂ PO ₄	(10.80±0.18)	(3.00±0.05)	(164.44±2.72)e	(55.28±0.56)f	(219.72±3.21)e	(19.44±0.06)e	15.23c	5.48e	20.57c	6.48f
Phosphate- Na	(23.06±0.15)	(1.64±0.02)	(250.11±1.67)b	(158.39±1.39)d	(408.5±2.04)c	(21.61±0.08)d	10.85d	6.87de	17.71c	13.18c
Water buffer	(6.97±0.15)	(2.98±0.04)	(196.67±4.22)d	(93.06±1.83)e	(289.73±4.83)d	(21.61±0.06)d	28.22b	13.23b	40.85b	7.25e

活性最高，达 231.50 $\mu\text{mol}(\text{glucose})/[\text{g}(\text{FW})\cdot\text{h}]$ ，Hepes-NaOH法提取的酶活性次之，达到211.33 $\mu\text{mol}(\text{glucose})/[\text{g}(\text{FW})\cdot\text{h}]$ ，磷酸二氢钾法最差，酶活力不足55 $\mu\text{mol}(\text{glucose})/[\text{g}(\text{FW})\cdot\text{h}]$ 。而从SI分析，Hepes-NaOH法提取橡胶树叶片可溶性转化酶的效果最好，总活性高达472.44 $\mu\text{mol}(\text{glucose})/[\text{g}(\text{FW})\cdot\text{h}]$ ，磷酸-柠檬酸法次之。

从 CWI 粗酶液的蛋白含量来看，磷酸二氢钾法>水溶液法>Hepes-NaOH法>Tris-HCl法>磷酸钠法>磷酸-柠檬酸法。磷酸二氢钾法提取蛋白含量最高，为3.0mg/g(FW)，磷酸-柠檬酸法仅有0.48mg/g(FW)。从酶活性分析，Tris-HCl法酶活力最高达35.83 $\mu\text{mol}(\text{glucose})/[\text{g}(\text{FW})\cdot\text{h}]$ ，磷酸二氢钾法仅有19.44 $\mu\text{mol}(\text{glucose})/[\text{g}(\text{FW})\cdot\text{h}]$ 。

(glucose)/[g(FW)·h]。由表2可知，比较上述6种方法发现：橡胶树叶片转化酶提取方法中提取 SAI 用 Hepes-NaOH 法提取最佳，提取 N/A-INA 则以磷酸-柠檬酸法最佳，而 CWI 的提取以 Tris-HCl 法最佳。综上所述，橡胶树叶片转化酶提取的 SI 酶活性为 Hepes-NaOH 法，其次为磷酸-柠檬酸法。

从比活力来看，磷酸-柠檬酸法的 SAI、N/A-INV、SI、CWI 比活力最高分别为 42.70、47.73、91.26、50.35 $\mu\text{mol}(\text{glucose})/\text{mg}$ ，与其它 5 种方法相比呈显著差异。

2.3 粗酶液硫酸铵的分级沉淀

粗酶液通常需进一步纯化才可用来研究其酶学特性，笔者发现 6 种不同方法用 30% SAS 沉淀

时, 只有少量蛋白沉淀, 酶活性也很低, 即使最高总可溶性转化酶活性也仅为 $5.22 \mu\text{mol}(\text{glucose})/[\text{g}(\text{FW})\cdot\text{h}]$; 而进一步用80% SAS沉淀时, 有大量沉淀, 其酶活性也较高 (Hepes-NaOH法酶活为 $201.77 \mu\text{mol}(\text{glucose})/[\text{g}(\text{FW})\cdot\text{h}]$; 80%~95% SAS沉淀时, 有蛋白沉淀, 其酶活性亦也很低 (Hepes-NaOH法酶活也仅为 $10.69 \mu\text{mol}(\text{glucose})/[\text{g}(\text{FW})\cdot\text{h}]$)。说明橡胶树叶片的转化酶主要存在于30%~80% SAS沉淀, 因此对其它方法所获得粗酶液进行SAS分级沉淀时, 仅测定其30%~80% SAS分级沉淀的蛋白含量及可溶性转化酶活性。结果显示: SAS分级沉淀对不同类型转化

酶的分离纯化效果不同, 对N/A-INV类型酶的效果较好, 纯化后多数样品酶的比活力有所提高, 但对SAI类型酶的纯化效果较差, 多数样品酶的比活力有所下降(表2和表3)。SAS分级沉淀后, 用Hepes-NaOH法提取的SI粗酶液的酶活性得率较高, 酶活性达 $201.77 \mu\text{mol}(\text{glucose})/[\text{g}(\text{FW})\cdot\text{h}]$, 其次为磷酸-柠檬酸法, SI酶活达 $182.06 \mu\text{mol}(\text{glucose})/[\text{g}(\text{FW})\cdot\text{h}]$ 。综上所述, 提取液研磨叶片的Hepes-NaOH法和磷酸-柠檬酸法提取橡胶树叶片转化酶的效果最好, 但从比活力来看, 磷酸-柠檬酸法更佳, 比活力比Hepes-NaOH法高约4倍。

表3 不同方法可溶性转化酶的30%~80%硫酸铵(SAS)沉淀蛋白含量及其酶活性比较

方法	SI蛋白含量 [mg/g(FW)]	酶活性/[$\mu\text{mol}(\text{glucose})/[\text{g}(\text{FW})\cdot\text{h}]$]			比活力/[$\mu\text{mol}(\text{glucose})/\text{mg}$]		
		SAI	N/A-INV	SI	SAI	N/A-INV	SI
Hepes-NaOH	(9.51±0.02)	(115.33±0.28) a	(86.44±0.11) b	201.77 a	12.09 c	9.09 e	21.18 c
Tris-HCl	(5.13±0.06)	(19.94±0.22) e	(72.50±0.17) c	92.44 e	3.89 f	14.12 b	18.01 d
Phosphate-citrate	(1.93±0.03)	(90.39±0.78) c	(91.67±0.61) a	182.06 b	46.63 a	47.50 a	94.13 a
KH ₂ PO ₄	(2.11±0.07)	(20.33±0.11) f	(15.33±0.06) f	35.66 f	9.48 d	7.11 f	16.59 f
Phosphate-Na	(4.80±0.07)	(95.89±1.28) b	(59.50±0.17) d	155.39 c	19.79 b	12.41 c	29.47 b
Water buffer	(5.64±0.09)	(44.11±0.50) d	(55.22±0.17) e	99.33 d	7.82 e	9.79 d	17.61 e

3 讨论与结论

尽管目前提取植物转化酶的方法繁多, 但尚未见系统比较不同方法对转化酶提取效率与酶活性影响的报道。提取转化酶的方法中通常是用液氮直接研磨样品, 由于其研磨时间较短, 通常为10~20 min, 但研磨需频繁添加液氮会造成温度骤变; 蛋白抽提液冰上研磨样品比较费时, 但温度变化不明显, 而敏感性的酶比较忌讳反复冻融, 因此更有利于保护转化酶活性。本试验结果表明: 在橡胶树叶片蛋白含量的提取效果上, 液氮研磨样品与蛋白抽提液研磨相差较小, 但液氮研磨使转化酶的酶活损失严重, 在粗酶提取液中已检测不到N/A-INV和CWI的活性, SAI的活性也降低很多, 即使最高可溶性酸性转化酶活性也仅为蛋白抽提液研磨时的52%。因此, 在提取橡胶树叶片转化酶时, 适宜用预冷的蛋白抽提液在冰浴条件下研磨的样品优于液氮研磨, 此结果应该也适于其它种类植物叶片转化酶的提取。

蛋白抽提液研磨样品, 添加PVPP去除植物细胞研磨时释放的次生物质, 以避免对酶活性的影响; 笔者在粗酶液中检测到不同类型转化酶(SAI, N/A-INV和CWI)的活性。Hepes-NaOH法提取橡

胶树叶片的SI蛋白含量和活性都较好, 但SAI和N/A-INV比活力均较低; Tris-HCl法也可较好的抽提橡胶树的叶片蛋白, 但SI(SAI和N/A-INV)的活性却较低; 磷酸-柠檬酸法抽提蛋白含量的较低, 但其提取的3类酶的比活力却为最高; 磷酸二氢钾法抽提橡胶叶片的蛋白含量低, 其酶活性亦低; 磷酸钠法抽提橡胶叶片蛋白含量也较好, 其酶活性也较高, 其3类酶的比活力仅次于磷酸-柠檬酸法; 水溶液抽提橡胶叶片SI的蛋白含量低, 活性也不高。同SI的活性相比, 橡胶树叶片的CWI活性很低, 其中Tris-HCl法抽提CWI粗酶液的效果较好, 蛋白含量及酶活性均最高。Hepes-NaOH法、Tris-HCl法和磷酸钠法提取蛋白测定时含量比较高, 再30%~80% SAS时白色沉淀也较多, 但酚类及色素也较多, SI的比活力没有磷酸-柠檬酸法高; 磷酸-柠檬酸法抽提蛋白含量较低及30%~80% SAS沉淀也较少, 但基本上无色素干扰; 30%~80% SAS时, 为了更好的让SI沉淀而搅拌过夜, 但也因此损失一部分酶活性, 尤其是磷酸二氢钾及水溶液。

在橡胶树中, de Oliveira等^[3]利用磷酸钠缓冲液提取叶片和树皮的可溶性转化酶(SAI和N/A-

INV), 成熟叶片转化酶提取物的SAI和N/A-INV的活性约为80 μmol(glucose)/[g(FW)·h], 低于本研究中多数方法所提取SAI和N/A-INV的酶活性。造成这种差异的原因可能有以下几个方面: 材料处理方法用液氮冻存材料, 提取缓冲液为50 mmol/L磷酸钠、5 mmol/L硫酸锰、1 mmol/L β-巯基乙醇, pH 值7.5; 所用的橡胶树品系为RRIM 600 和 GT-1。

根据以上对这 6 种方法的应用研究, Hepes-NaOH 法、Tris-HCl 法和磷酸钠法比较适合提取植物的全蛋白, 磷酸-柠檬酸法较适合提取转化酶类, 而磷酸二氢钾及水溶液较适合提取稳定性较好的蛋白。

参考文献

[1] Sturm A. Invertases. primary structures, functions, and roles in plant development and sucrose partitioning[J]. *Plant Physiol*, 1999, 121(1): 1-7.

[2] Ruhlmann J M, Kram B W, Carter C J. Cell wall invertase 4 is required for nectar production in *Arabidopsis* [J]. *J Exp Bot*, 2010, 61(2): 395-404.

[3] Tupy J. Sucrose supply and utilization for latex production[M]// d'Auzac J, Jacob J L, Chrestin H eds. In *Physiology of Rubber Tree Latex*. Boca Raton: C. R. C. Press, 1989: 179-199.

[4] Yelle S, Chtelate R T, Dorasis M. Sink metabolism in tomato fruit IV: genetic and biochemical analysis of sucrose accumulation[J]. *Plant Physiol*, 1991, 95(4): 1026-1035.

[5] Tang X W, Ruffner H P, Scholes J D. Purification and characterization of soluble invertases from leaves of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Planta*, 1996, 198(1): 17-23.

[6] Vargas W, Pontis H G, Salerno G L. New insights on sucrose metabolism: evidence for an active A/N Inv in chloroplasts uncovers a novel component of the intracellular carbon trafficking[J]. *Planta*, 2008, 227(4): 795-807.

[7] Lee H S, Sturm A. Purification and characterization of neutral and alkaline invertase from carrot[J]. *Plant Physiol*, 1996, 112(4): 1513-1522.

[8] Roitsch T, Gonzalez M C. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations[J]. *Trends Plant Sci*, 2004, 9(2): 606-613.

[9] Welham T, Pike J, Horst I, et al. A cytosolic invertase is required for normal growth and cell development in the model legume, *Lotus japonicus* [J]. *J Exp Bot*, 2009, 60(12): 3353-3365.

[10] Pan Q H, Zou K Q, Peng C C, et al. Purification biochemical and immunological characterization of acid invertases from apple fruit[J]. *J Integr Plant Biol*, 2005, 47(1): 50-59.

[11] 张振清, 夏叔芳. 大豆叶片蔗糖酶的分纯化及其特性[J]. *植物生理学报*, 1984, 10(1): 19-27.

[12] Lingle S E, Dunlap J R. Sucrose metabolism in netted muskmelon fruit during development[J]. *Plant Physiol*, 1987, 84(2): 386-389.

[13] de Oliveira D P, de Oliveira L E M, Filho e N D. Optimization of invertase assay conditions in rubber tree plants (*Hevea brasiliensis* Müell. Arg) [J]. *Revista Arvore*, 2006, 30(4): 687-692.

[14] 王镜岩, 朱圣庚, 徐长法. 生物化学 [M]. 3版. 北京: 高等教育出版社, 2002: 290-381.

[15] Bollag D M, Edelstein S J. Protein concentration determination [M]// Bollag D M, Edelstein S J eds. *Protein Methods*. New York: John Wiley & Sons, INC, 1991: 49-55.

[16] Miron D, Schaffer A A. Sucrose phosphate synthase, sucrose synthase, and invertase activities in developing fruit of *Lycopersicon esculentum* mill and the sucrose accumulating *Lycopersicon hirsutum* humb. and bonpl [J]. *Plant Physiol*, 1991, 95(4): 623-627.

[17] Miller G L. Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugars[J]. *Anal Chem*, 1959, 31(3): 426-428.

[18] Tupy J. Stimulatory effects of 2, 4-dichlorophenoxyacetic acid and of 1-naphthylacetic acid on sucrose level, invertase activity and sucrose utilization in the latex of *Hevea brasiliensis* [J]. *Planta*, 1969, 88(2): 144-153.

[19] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 123-156.

责任编辑: 黄东杰

橡胶树叶片转化酶提取方法的比较

作者: [蓝基贤](#), [何慧](#), [戚继艳](#), [唐朝荣](#), [LAN Jixian](#), [HE Hui](#), [QI Jiyan](#), [TANG Chaorong](#)
作者单位: [蓝基贤, 何慧, LAN Jixian, HE Hui \(海南大学农学院, 海南儋州571737; 中国热带农业科学院橡胶研究所, 海南儋州571737\)](#), [戚继艳, 唐朝荣, QI Jiyan, TANG Chaorong \(中国热带农业科学院橡胶研究所, 海南儋州, 571737\)](#)
刊名: [热带作物学报](#) **ISTIC**
英文刊名: [Chinese Journal of Tropical Crops](#)
年, 卷(期): 2012, 33 (3)

本文链接: http://d.g.wanfangdata.com.cn/Periodical_rdzwx201203018.aspx