

薛兴华, 司庆永, 龚 宁. 外源 Ca^{2+} 对金线兰抗氧化酶活性及其同工酶的影响[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(4): 229–232.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.04.064

外源 Ca^{2+} 对金线兰抗氧化酶活性及其同工酶的影响

薛兴华, 司庆永, 龚 宁

(贵州师范大学生命科学学院/贵州省植物生理发育调控重点实验室, 贵阳 550001)

摘要:以金线兰组培苗为材料, 采用分光光度法和同工酶电泳技术研究了外源 Ca^{2+} 对金线兰抗氧化酶活性及其同工酶的影响。结果表明: 不同浓度的 Ca^{2+} 处理能够使金线兰 SOD、CAT、POD、APX 活性呈现一定的升降变化, 其中 SOD 酶活呈“M”形的变化趋势, CAT 酶活呈先升后降的趋势, APX 酶活在较高浓度的 Ca^{2+} 处理下较其他酶慢, POD 变化范围较大; 同工酶分析发现, 不同浓度的 Ca^{2+} 处理, 在一定时间范围内可诱导产生新的 POD 和 APX 酶带表达, 而不诱导新的 SOD 和 CAT 酶带的表达。

关键词:金线兰; Ca^{2+} ; 抗氧化酶; 同工酶

中图分类号: S682.310.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)04-0229-04

金线兰 (*Anoectochilus roxburghii* (Wall.) Lindl.), 兰科开唇兰属的一种多年生草本植物, 具有极高的药用价值, 且株型小巧, 叶型优美, 叶脉金黄色, 呈网状排列, 是一种观赏价值极高珍品, 具有广阔的开发利用前景。但由于金线兰的自身抗性较差, 对环境要求极高, 以至于其资源的开发利用受到限制。 Ca^{2+} 不仅是植物必需的营养元素, 同时也是细胞信号转导过程中重要的第二信使, 与植物的抗氧化酶系统密切相关, 通过调节相关抗氧化酶活性提高植物对逆境的适应能力^[1-2]。关于金线兰的报道多集中在组培和胁迫相关的生理响应机制研究^[3-7], 而作为重要的信号转导物质, Ca^{2+} 对金线兰抗氧化酶活性及同工酶影响的研究未见报道。因此本试验对金线兰组培苗进行不同浓度的 Ca^{2+} 处理, 测定 SOD、POD、APX、CAT 的活性, 同时对同工酶进行研究, 探讨信号物质 Ca^{2+} 对抗氧化酶的活性及同工酶的影响, 为 Ca^{2+} 与抗氧化酶系统关系研究提供一定基础, 为金线兰抗逆机理研究提供参考。

1 材料与方法

1.1 材料的培养

试验材料金线兰组培苗由贵州师范大学金线兰课题组提供。将处于增殖期且生长时间一致的金线兰组培苗转接到生根培养基中, 培养 60 d 后, 选取长势一致的生根组培苗, 备用。培养条件: 光照 12 h/d, 光照度 2 000 lx, 温度 (21 ± 2) °C。

1.2 材料的处理

取已经生根的金线兰组培苗, 分别在添加 0.5、1.5、

2.5 mmol/L CaCl_2 的 MS 培养液中处理 6、12、24、48、72 h, 对照 (CK) 为 MS 培养液处理。

1.3 测定方法

1.3.1 粗酶液的制备 参照王爱国等的方法^[8] 制备粗酶液: 金线兰成熟鲜叶去掉主脉, 准确称取 1 g, 加入 5 mL 预冷的酶提取缓冲液, 冰浴充分研磨, 于低温离心机 12 000 r/min 离心 20 min, 上清液即粗酶液, 冷藏备用。

1.3.2 酶活测定 SOD 活性测定: 参考王爱国等的方法^[8] 稍作修改, 先加入 150 μL 粗酶液, 然后依次加入 2.7 mL 14.5 mmol/L 的 L-甲硫氨酸, 0.1 mL 3 mmol/L EDTA, 0.1 mL 2.25 mmol/L NBT 和 0.1 mL 60 $\mu\text{mol/L}$ 核黄素。混匀后倒入比色杯, 在 3 000 lx 下光照 10 min, 反应后立即避光, 将反应液颠倒几次混匀后立即测 $D_{560\text{ nm}}$ 值, 以不加粗酶液而加酶提取液为最大光还原管, 以 PBS 液代替 NBT 作为空白, 以能抑制 NBT 光化还原 50% 为 1 个酶活力单位 U, 酶活力按下式计算, 单位为: U/g。

计算公式:

$$\text{反应抑制率} = \frac{(\text{对照 } D_{560\text{ nm}} - \text{对照空白 } D_{560\text{ nm}}) - (\text{样品 } D_{560\text{ nm}} - \text{样品空白 } D_{560\text{ nm}})}{(\text{对照 } D_{560\text{ nm}} - \text{对照空白 } D_{560\text{ nm}})} \times 100\%;$$

$$\text{酶活力 (U/g)} = \frac{\text{反应抑制率}}{50\% \times 3\text{ mL 反应混合液中加入的样量}}。$$

POD 活性测定采用愈创木酚法^[9]。3 mL 反应混合液 (500 mL 50 mmol/L PBS pH 值 7.8 + 0.28 mL 愈创木酚 + 0.19 mL 30% H_2O_2) 中加入 50 μL 酶液, 迅速摇匀立即测 $D_{470\text{ nm}}$, 每 30 s 读数 1 次, 以 1 min $D_{470\text{ nm}}$ 升高 0.1 的 D 值为 1 个酶活力单位 U, 单位为 U/(min · g)。

APX 活性测定参照 Dalton 等的方法^[10], 略作改进。3 mL 反应混合液 (50 mmol/L PBS pH 值 7.0 + 0.1 mmol/L EDTA - Na_2 + 0.5 mmol/L LAAsA , 10 mmol/L H_2O_2) 加入 100 μL 粗酶液启动反应, 连续记录 $D_{290\text{ nm}}$, 10 s 读数 1 次, 以 1 min $D_{290\text{ nm}}$ 降低 0.1 的 D 值为 1 个酶活力单位 U, 单位为 U/(min · g)。

CAT 活性测定参照程鲁京等的钼酸铵显色法^[11], 略作改进。所有药品在室温下恒温, 然后在空白管 (B2) 加 1 mL

收稿日期: 2015-09-02

基金项目: 贵州省中药材现代产业技术体系建设专项 (编号: GZCYTX-02); 贵州省科学技术基金 [编号: 黔科合 J 字 (2008) 2097]。

作者简介: 薛兴华 (1991—), 女, 山西运城人, 硕士研究生, 研究方向为药用植物资源开发与利用。E-mail: 798913863@qq.com。

通信作者: 龚 宁, 教授, 从事药用植物资源开发与利用方向。E-mail: gn2033@126.com。

65 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 基质液,空白管(B3)中加入 1 mL 60 mmol/L PBS 缓冲液(pH 值为 7.4),空白管(B1)中加 1 mL 65 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 基质液,样品管(U)中加 0.2 mL 粗酶液和 1 mL 65 $\mu\text{mol/L}$ H_2O_2 基质液,37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴保温 1 min 后加入 1 mL 32.4 mmol/L 钼酸铵溶液,混匀后在 B2 管和 B3 管分别加入 0.2 mL 60 mmol/L 钠-钾磷酸盐缓冲液(pH 值 7.4);在 B1 管加入 0.2 mL 粗酶液。5 min 后于 405 nm 处以蒸馏水调零比色,记录吸光度(D)。酶活力以清除 H_2O_2 的 mg 数表示,按下式计算,单位为 $\text{mg}/(\text{min} \cdot \text{g})$ 。

$$\text{酶活力}[\text{mg}/(\text{min} \cdot \text{g})] = \frac{D_{\text{B1}} - D_{\text{U}}}{D_{\text{B2}} - D_{\text{B3}}} \times \frac{65 \times 1 \times 34}{0.2 \times 0.2 \times 1000}。$$

1.3.3 同工酶分析 分离胶浓度为 7.5%,浓缩胶浓度为 2.5%,pH 值为 8.3 的 Tris - Gly 电极缓冲液。上样量为 40 μL 。电泳开始时,电流设为 10 mA,当指示剂溴酚蓝进入分离胶后,调电流至 15 mA。电泳时间视酶分子量而定,一般至指示剂距凝胶前沿 1 cm 为停止时间。

1.3.3.1 加样 浓缩胶聚合完成后,缓慢拔出样品梳,注入预冷已稀释 10 倍的电极缓冲液。用微量进样器吸取 40 μL 处理后的酶液(10 μL 酶液、20 μL 40% 的蔗糖溶液、10 μL 2% 的溴酚蓝指示剂),依次加入加样槽中。

1.3.3.2 酶活性染色 SOD 活性染色:参照文献[12]的方法,略作改进。电泳结束后,将胶浸泡于染色液 2.45 mmol/L NBT 中,避光浸泡 20 min,并不时摇动,蒸馏水漂洗,再放入 0.036 mol/L (pH 值 7.8) 磷酸缓冲液(含 0.028 mol/L TMEDA,28 $\mu\text{mol/L}$ 核黄素),避光浸泡 15 min,并不时摇动,蒸馏水漂洗,放入 0.05 mol/L PBS (含 0.1 mmol/L $\text{Na}_2\text{-EDTA}$)(pH 值 7.8),4 \times 8 W 日光灯下照光 20 ~ 30 min,直至出现无色谱带,蒸馏水漂洗 2 ~ 3 次,拍照。

POD 活性染色:参照 Rahnamal 等的方法^[13],稍作改动。染色液:0.1 g 联苯胺、5 mL 无水乙醇、10 mL 1.5 mol/L 乙酸钠、10 mL 1.5 mmol/L 乙酸、75 mL 的蒸馏水溶解并过滤待用。胶片用蒸馏水冲洗 3 次后,在染液中加入 0.14 mL 30% H_2O_2 ,迅速摇匀后将胶片放入,待酶带完全出现后(约 20 min),用自来水冲洗 2 ~ 3 次,拍照。

APX 活性染色:采用抗坏血酸—联苯胺染色法。染色液成分:AsA 70.4 mg,联苯胺溶液(2 g 联苯胺溶于 18 mL 温热冰醋酸中,再加入蒸馏水 72 mL)20 mL、1.2% H_2O_2 溶液 20 mL、蒸馏水 60 mL。蒸馏水润洗胶片 2 次,再加入 40 ~ 50 mL 的染色液,直到清晰的 APX 带显现为止,将染色液倒掉,并用自来水冲洗几次,照相。

CAT 活性染色:参照 Woodbury 等的方法^[14],电泳结束后,用蒸馏水清洗胶片,0.05% H_2O_2 溶液浸泡 20 min 后用蒸馏水冲洗几次,再加入染色液(含有 0.5% 的氯化铁,0.5% 的铁氰化钾),直到显带为止,照相,整个过程注意避光。

2 结果与分析

2.1 外源 Ca^{2+} 对金线兰抗氧化酶活性的影响

2.1.1 Ca^{2+} 对金线兰 SOD 活性的影响 3 种浓度的 Ca^{2+} 处理对金线兰 SOD 酶活性的影响见图 1,可以看出 SOD 酶活性呈现“M”形的变化趋势,即先升高后降低再升高,最后趋于稳定。其中,1.5 mmol/L 和 2.5 mmol/L Ca^{2+} 处理下 SOD 酶活

性都在 24 h 达到最大值,而 0.5 mmol/L Ca^{2+} 处理下在 48 h 时达到最高值。由此可知,外源钙处理能提高 SOD 酶活性。

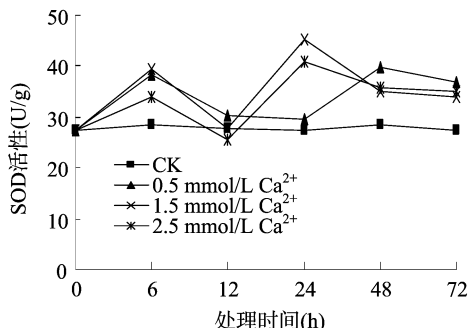


图1 Ca^{2+} 对金线兰 SOD 活性的影响

2.1.2 Ca^{2+} 对金线兰 POD 活性的影响 3 种浓度的 Ca^{2+} 处理下金线兰 POD 酶活性的变化情况见图 2,0.5 mmol/L 和 1.5 mmol/L Ca^{2+} 处理下,POD 酶活性变化呈现先升高后下降再升高的趋势,在 2.5 mmol/L Ca^{2+} 处理下,呈现先下降后升高的趋势,可能是高浓度的 Ca^{2+} 抑制了 POD 活性,一段时间适应后出现上升的变化。可知, Ca^{2+} 处理对 POD 酶活性影响较为明显。

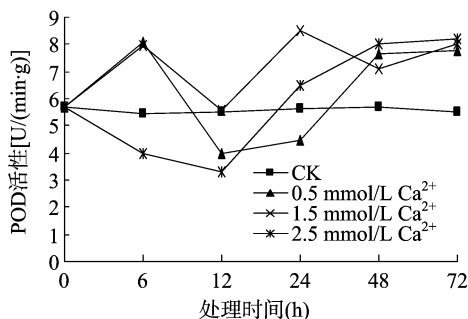


图2 Ca^{2+} 对金线兰 POD 活性的影响

2.1.3 Ca^{2+} 对金线兰 APX 活性的影响 3 种浓度的 Ca^{2+} 处理下金线兰 APX 酶活性变化情况见图 3,可以看出 0.5 mmol/L Ca^{2+} 处理下 APX 酶活性呈现先升高后下降的变化趋势,变化不明显;1.5 mmol/L 和 2.5 mmol/L Ca^{2+} 处理下,在 12 h 内 APX 酶活性变化不明显,而处理时间在 24 ~ 72 h 时,变化较显著,呈现先下降后升高的趋势,可能是金线兰 APX 需要一定时间来适应较高浓度 Ca^{2+} 的变化并作出相应的生理响应。

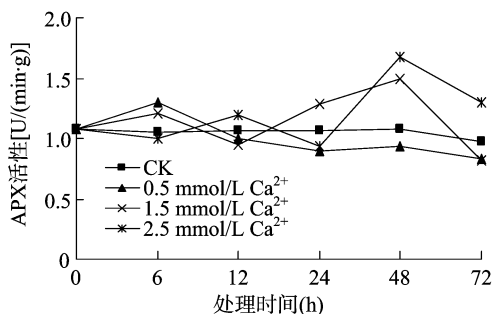


图3 Ca^{2+} 对金线兰 APX 活性的影响

2.1.4 Ca^{2+} 对金线兰 CAT 活性的影响 3 种浓度 Ca^{2+} 处理下金线兰 CAT 酶活性变化情况见图 4,0.5 mmol/L 和

1.5 mmol/L Ca^{2+} 处理下 CAT 酶活性先升高后下降最后趋于稳定,且活性不同程度高于对照,2.5 mmol/L Ca^{2+} 处理下,在 12 h 内 CAT 酶活性变化较小,12 h 以后变化较显著,呈现先上升后下降的趋势。说明在适宜的浓度范围内, Ca^{2+} 处理能有效提高 CAT 酶活性。

综上所述,SOD、POD 酶活性都产生了较大的升降变化,且随着处理时间的延长趋于稳定,说明植物对外界的影响有一个紊乱调整过程;APX 酶活性,在较高浓度的 Ca^{2+} 处理下响应较其他酶慢;CAT 活性不同程度高于对照,适当 Ca^{2+} 处理能够明显提高金线兰 CAT 的活性且维持较高活性。其中 1.5 mmol/L 和 2.5 mmol/L Ca^{2+} 处理对酶活的影响较大,0.5 mmol/L Ca^{2+} 处理的作用较小,其中 1.5 mmol/L Ca^{2+} 处理 24 h 时金线兰抗氧化酶活性达到最高值,2.5 mmol/L Ca^{2+} 处理 48 h 次之。

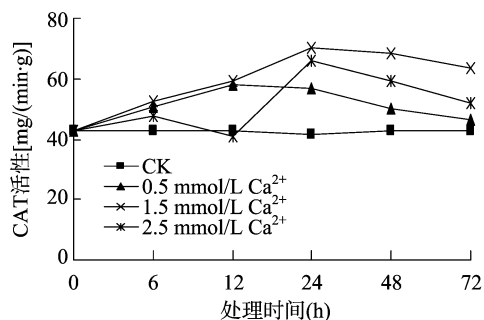


图4 Ca^{2+} 对金线兰 CAT 活性的影响

2.2 外源 Ca^{2+} 对金线兰抗氧化酶同工酶的影响

2.2.1 Ca^{2+} 对金线兰 SOD 同工酶谱的影响 金线兰经过 3 种浓度的 Ca^{2+} 处理后,组培苗 SOD 同工酶分析结果见图 5,随着处理浓度和时间不同,酶带呈现一定的强弱差异,但各处

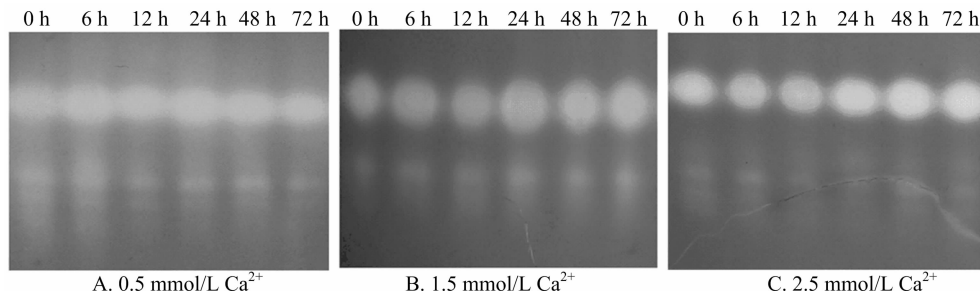


图5 不同浓度 Ca^{2+} 对金线兰 SOD 同工酶的影响

理和对照相比,都是共有 5 条带,处理后并未产生新的酶带,即没有 SOD 同工酶产生。

2.2.2 Ca^{2+} 对金线兰 POD 同工酶谱的影响 金线兰经过 3 种浓度的 Ca^{2+} 处理后,组培苗 POD 同工酶分析结果见图 6,处理浓度和时间的不同,酶带呈现一定的强弱差异。其中,

0.5 mmol/L Ca^{2+} 处理 12 h 和 48 h 时有新的酶带产生,12 h 时出现 1 条 R_f 为 0.137 的酶带,48 h 时出现 2 条 R_f 分别为 0.137 和 0.199 的酶带;1.5 mmol/L 和 2.5 mmol/L Ca^{2+} 处理后并未产生新的酶带,没有 POD 同工酶产生。

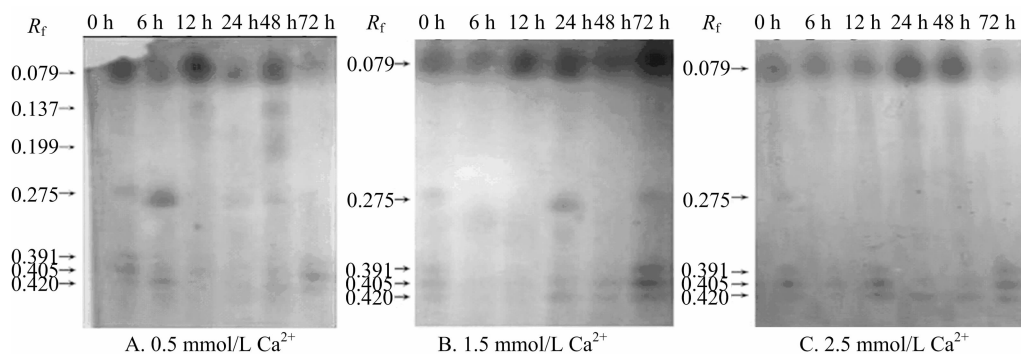


图6 不同浓度 Ca^{2+} 对金线兰 POD 同工酶的影响

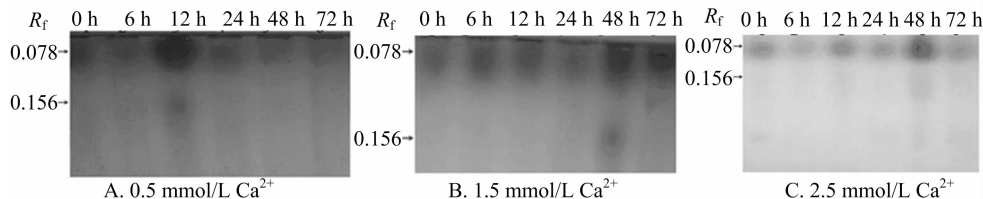
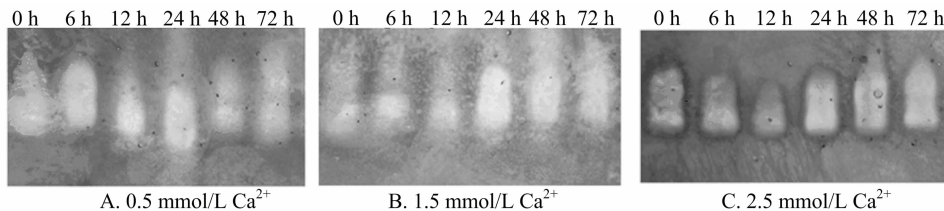
2.2.3 Ca^{2+} 对金线兰 APX 同工酶谱的影响 金线兰经过 3 种浓度的 Ca^{2+} 处理后,组培苗 APX 同工酶分析结果见图 7,处理浓度和时间不同,酶带呈现一定的强弱差异。其中 0.5 mmol/L Ca^{2+} 处理 12 h 时有 1 条 R_f 为 0.156 的酶带产生,1.5 mmol/L 和 2.5 mmol/L Ca^{2+} 处理 48 h 时有 1 条 R_f 为 0.156 的酶带产生。

2.2.4 Ca^{2+} 对金线兰 CAT 同工酶谱的影响 金线兰经过 3 种浓度的 Ca^{2+} 处理后,组培苗 CAT 同工酶分析结果见图 8,处理浓度和时间的不同,酶带呈现一定的强弱差异,但 CAT 同工酶带始终只有 2 条,各处理与对照的条带基本一致,即 Ca^{2+} 处理对金线兰的 CAT 同工酶的表达没有明显影响。

3 讨论

关于植物抗性机理的研究已有大量报道,但由于金线兰分布范围较窄,人们多关注于金线兰的药效、组培、人工栽培等的研究^[15-17],对于其抗性研究较少。本试验就 Ca^{2+} 对金线兰抗氧化酶活性及同工酶的影响进行研究,探讨信号物质 Ca^{2+} 对金线兰抗氧化酶的活性及表达的影响。

Ca^{2+} 作为第二信使,在植物的信号传递中起重要作用。关于植物逆境胁迫下钙信使和抗氧化酶系统关联的研究报道有很多^[18-22],表明外源钙处理对植株 SOD、CAT、POD、APX 酶活都有一个紊乱调整过程,有助于缓解胁迫的危害,这与本

图7 不同浓度 Ca^{2+} 对金线兰 APX 同工酶的影响图8 不同浓度 Ca^{2+} 对金线兰 CAT 同工酶的影响

试验结果类似。

低浓度 Ca^{2+} 处理时, POD 同工酶有新增酶带, 高浓度时没有新增酶带, 但谷俊涛等、翁笑艳等的研究结果表明 Ca^{2+} 浓度越大, POD 同工酶组分越复杂^[1-2], 本试验结果与之有差异; 同工酶电泳发现不同浓度 Ca^{2+} 处理下未产生新 SOD 同工酶和 CAT 同工酶, 这与王长义等的研究结果^[23] 不同, 可能不同植物对 Ca^{2+} 的响应和调节能力存在差异, 这有待进一步探讨。

本试验结果显示, 外源 Ca^{2+} 可以影响金线兰抗氧化酶活性, 对 APX 和 POD 的同工酶表达有调控作用, 参与了金线兰消除体内自由基的过程, 推测 Ca^{2+} 能够使金线兰某些特定抗氧化酶同工酶表达, 从而能够激活相应保护机制, 减少和缓解逆境对自身的伤害。

结合抗氧化酶活性与同工酶谱的分析, 可以推测低浓度的 Ca^{2+} 短时间(6 h)处理对同工酶的诱导作用较为明显, 而较高浓度的 Ca^{2+} (1.5 ~ 2.5 mmol/L) 长时间(24 ~ 48 h)处理对酶活性变化作用较大。此外同工酶的产生与酶活性变化没有明显的相关性, Ca^{2+} 不只是通过诱导新同工酶产生调节酶的活性, 同时可能存在其他调节途径。

参考文献:

- [1] 谷俊涛, 郭秀林, 李广敏, 等. 水分胁迫下钙、钙调素对小麦幼苗生长及过氧化物酶同工酶的影响[J]. 华北农学报, 2001, 16(3): 62 - 67.
- [2] 翁笑艳, 张木清, 阮妙鸿, 等. 水分胁迫下钙对甘蔗幼苗抗氧化酶活性的影响[J]. 中国农学通报, 2007, 23(7): 273 - 279.
- [3] 李光, 龚宁, 周伟香, 等. 外源生长物质对金线兰增殖培养的影响[J]. 贵州师范大学学报: 自然科学版, 2006, 24(4): 9 - 10, 108.
- [4] 周伟香, 龚宁, 李光, 等. 花叶开唇兰种子非共生萌发的研究[J]. 中草药, 2007, 38(4): 610 - 613.
- [5] 周伟香, 龚宁, 李凯, 等. 高温胁迫对金线兰生理特性影响的研究[J]. 贵州师范大学学报: 自然科学版, 2007, 25(3): 25 - 28.
- [6] 李亚军, 周伟香, 龚宁, 等. 低温胁迫对金线兰抗氧化酶活性的影响[J]. 贵州农业科学, 2011, 36(6): 43 - 45.
- [7] 王定景, 司庆永, 龚宁, 等. 高温胁迫下外源水杨酸对金线兰抗氧化酶活性的影响[J]. 贵州农业科学, 2012, 40(5): 39 - 42.
- [8] 王爱国, 罗广华, 邵从本, 等. 大豆种子超氧化物歧化酶的研究[J]. 植物生理学报, 1983, 9(1): 77 - 84.

- [9] 张志良. 植物生理学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 1990: 88 - 91.
- [10] Dalton D A, Hanus F J, Russell S A, et al. Purification, properties, and distribution of ascorbate peroxidase in legume root nodules[J]. Plant Physiology, 1987, 83(4): 789 - 794.
- [11] 程鲁京, 孟泽. 钼酸铵显色法测定血清过氧化氢酶[J]. 临床检验杂志, 1994, 12(1): 6 - 8.
- [12] Beauchamp C, Fridovich I. Superoxide dismutase: improved assays and an assay applicable to acrylamide gels[J]. Analytical Biochemistry, 1971, 44(1): 276 - 287.
- [13] Rahnamai H, Ebrahimpzdeh H. antioxidant isozymes activities in potato plants (*Solanum tuberosum* L.) under salt stress[J]. Journal of Sciences, 2006, 17(3): 225 - 230.
- [14] Woodbury W, Spencer A K, Stahman M A. An improved procedure using ferricyanide for detecting catalase isozymes[J]. Analytical Biochemistry, 1971, 44(1): 301 - 305.
- [15] 王常青, 严成其, 王勇, 等. 台湾金线莲多糖的分离纯化及其体外抑瘤活性研究[J]. 中国生化药物杂志, 2008, 29(2): 93 - 96.
- [16] 王建国, 王松良, 詹巧杰, 等. 金线莲组织培养的条件优化研究[J]. 中国现代中药, 2013, 15(1): 45 - 49.
- [17] 邵清松, 周爱存, 黄瑜秋, 等. 不同移栽条件对金线莲组培苗成活率及生长的影响[J]. 中国中药杂志, 2014, 39(6): 955 - 958.
- [18] 邹亚丽, 王廷璞, 呼丽萍, 等. 喷施不同钙肥对苹果贮藏期间抗氧化酶活性的影响[J]. 干旱地区农业研究, 2013, 31(2): 186 - 190.
- [19] 张春平, 何平, 喻泽莉, 等. 外源 Ca^{2+} 、ALA、SA 和 Spd 对盐胁迫下紫苏种子萌发及幼苗生理特性的影响[J]. 中国中药杂志, 2010, 35(24): 3260 - 3265.
- [20] 李天来, 张亢亢, 余朝阁, 等. 外源钙和茉莉酸甲酯诱导番茄植株抗灰霉病研究[J]. 西北植物学报, 2012, 32(3): 505 - 510.
- [21] 胡泽友, 邓小波, 彭喜旭, 等. 外源钙对镍胁迫下水稻幼苗抗氧化酶活性及膜脂过氧化的影响[J]. 中国水稻科学, 2007, 21(4): 367 - 371.
- [22] 丁能飞, 傅庆林, 刘琛, 等. 外源氯化钙对盐胁迫下西兰花抗氧化酶系统及离子吸收的影响[J]. 中国农学通报, 2010, 26(6): 133 - 137.
- [23] 王长义, 郭世荣, 刘超杰. 钙对根际低氧胁迫下黄瓜幼苗根系保护酶同工酶表达的影响[J]. 西北植物学报, 2009, 29(9): 1874 - 1880.