

# 大蒜蒜氨酸酶基因克隆与序列分析及毕赤酵母表达质粒的构建\*

吴晓莉<sup>1\*\*</sup>, 许健<sup>1</sup>, 张婷<sup>1</sup>, 贾平<sup>2</sup>, 周云凯<sup>1</sup>

1. 浙江中医药大学生命科学学院, 杭州 310053; 2. 浙江省人民医院, 杭州 310014

**摘要:** 根据 GenBank 登录的蒜氨酸酶序列(S73324)设计上下游引物,利用 RT-PCR 技术从浙江大蒜鳞茎中扩增蒜氨酸酶基因,获得了长度为 1 523 bp 的 cDNA 序列,提交 GenBank(登录号: FJ786257,命名为浙江蒜氨酸酶)。利用生物信息学相关软件对该序列进行同源性比较、进化分析、蛋白质的结构和酶活性中心预测,引用 pPICZaC 载体构建蒜氨酸酶毕赤酵母真核表达重组质粒。结果表明:浙江蒜氨酸酶与其他葱属植物如大蒜、洋葱、冬葱、火葱和细香葱蒜氨酸酶具有高度同源性,进化关系比较接近,目的基因可以成功构建到毕赤酵母表达载体。浙江蒜氨酸酶三维结构呈树枝状,蛋白质分子的 N 端含有一个类似表皮生长因子结构域,酶的中心含一个天冬氨酸氨基转移酶超家族结构域;蛋白质结构中 Lys-277 可能是磷酸吡哆醛的结合位点,Lys-277 周围区域可能是酶活性中心部位。重组质粒经鉴定构建正确。

**关键词:** 蒜氨酸酶;大蒜;克隆;序列分析;毕赤酵母

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-5684(2010)03-0258-06

## Cloning and Sequence Analysis of Alliinase Gene from Garlic and Construction of *Pichia pastoris* Expression Plasmid

WU Xiao-li<sup>1</sup>, XU Jian<sup>1</sup>, ZHANG Ting<sup>1</sup>, JIA Ping<sup>2</sup>, ZHOU Yun-kai<sup>1</sup>

1. College of Life Science, Zhejiang Chinese Medical University, Hangzhou 310053, China; 2. Zhejiang Provincial People's Hospital, Hangzhou 310014, China

**Abstract:** Primers were designed based on the reported sequences of alliinase (S73324) in GenBank. The cDNA gene encoding alliinase protein was extracted from Zhejiang garlic bulb by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR). PCR product was about 1 523 bp DNA segment. The sequence was submitted to GenBank (accession number: FJ786257), named Zhejiang alliinase (ZJ alliinase). ZJ alliinase was compared with the other alliinases reported in aspect of homology and evolution, the protein structure and the enzyme active center were also predicted by bioinformatics softwares. The Alliinase gene was cloned to the pPICZaC vector to construct the *Pichia pastoris* expression plasmid. The results showed the high similarity and approximation to those sequences of alliinase such as garlic, onion, scallion, *Allium ascalonicum* and chive, the target gene was successfully inserted to the pPICZaC vector. The three dimensional structure of ZJ alliinase was arborization. A EGF-like domain was in the ZJ alliinase N-terminal, and an aspartate aminotransferase (AAT) superfamily domain was in its center. The amino acid residue Lys-277 could be the combining site of pyridoxal phosphate, and the sequence around it could be the potential enzyme active center. The pPICZaC-alliinase recombination plasmid was completely accurate by using restriction enzyme assay, plasmid PCR identification and recombinant plasmid sequence analy-

\* 基金项目: 浙江省教育厅资助项目(Y200805242), 浙江中医药大学校级重点资助项目(2009ZZ05)

作者简介: 吴晓莉,女,硕士,讲师,主要从事中西医结合抗肿瘤研究。

收稿日期: 2009-09-04 修回日期: 2010-03-22

\*\* 通讯作者

sis.

Key words: alliinase; garlic; cloning; sequence analysis; *Pichia pastoris*

大蒜素(Allicin)是百合科葱属植物大蒜的主要功效成分,其杀菌力强、抗菌谱广,且具有抗肿瘤、降胆固醇、抗血小板聚集、预防心血管疾病、降血压等药理学功能<sup>[1]</sup>。但是大蒜素并不是大蒜中天然存在的活性成分,它是由大蒜中的蒜氨酸酶(Alliinase)催化底物蒜氨酸而形成。由于蒜氨酸酶在大蒜中含量低,而且对环境较敏感,活性不稳定,加之目前的生产条件常导致该酶活性被破坏,使得蒜类产品的药理作用不显著<sup>[2]</sup>。因此,对蒜氨酸酶进行深入细致的研究是开发蒜类产品的有效途径。本研究克隆了大蒜蒜氨酸酶基因,旨在为利用基因工程技术表达重组蒜氨酸酶奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

新鲜浙江白蒜鳞茎购买于杭州当地市场。

### 1.2 质粒与菌种

大肠杆菌 DH5、pPICZaC 载体由浙江中医药大学生命科学院临床检验实验室保存,pGEMPT Easy 载体购自 Invitrogen 公司。

### 1.3 主要试剂

Trizol 试剂、PCR 纯化试剂盒、凝胶回收试剂盒、质粒小量提取试剂盒购自 Invitrogen 公司。Reverse Transcriptase XL 反转录酶、PrimeStar HS DNA 聚合酶、限制性内切酶、T<sub>4</sub> 连接酶购自 TakaRa 公司。DNA 测序由 TakaRa 公司完成。

### 1.4 方 法

1.4.1 引物设计 根据 GenBank 登录的蒜氨酸酶序列设计 1 对引物。上游引物 5'-GGTATAAATGATCTGCCTAGTGATT-3', 下游引物 5'-CATACAAA GATACTCTTACTGCC-3', 由 Invitrogen 公司合成。

1.4.2 大蒜鳞茎总 RNA 的提取及 RT-PCR 取新鲜大蒜鳞茎于液氮中研碎,加入 Trizol 试剂,按照 Trizol 试剂说明书进行总 RNA 的提取。参照反转录酶说明书,以下游引物为反转录引物进行反转录。以合成的 cDNA 第一链为模板,扩增蒜氨酸酶序列。PCR 参数为 94 5 min;98 10 min,55 10 min,72 3 min,30 个循环;72 延伸

5 min。1%琼脂糖电泳检测 PCR 产物。

1.4.3 pGEMPT 蒜氨酸酶质粒的构建、转化、鉴定 PCR 产物纯化后与 PGEMPT Easy 载体连接,构建 pGEMPT 蒜氨酸酶重组质粒。将重组质粒转化至大肠杆菌 DH5,挑取阳性克隆于 37 过夜振荡培养,按照质粒提取试剂盒说明书提取重组质粒,1%琼脂糖电泳检测。重组质粒经 EcoR 单酶切鉴定,送 TakaRa 公司测序。

### 1.5 登录 GenBank 及生物信息学分析

将克隆的大蒜鳞茎蒜氨酸酶序列登录 GenBank,命名为浙江蒜氨酸酶(Zhejiang alliinase, ZI alliinase)。利用 DNASTAR、DNASYS 等软件进行序列拼接、同源性分析、蛋白质序列分析、酶活性位点和分子进化分析。蛋白质二级结构、超二级结构和三级结构预测由杭州宝派生物科技公司完成。

### 1.6 蒜氨酸酶毕赤酵母真核表达载体的构建

以 pGEMPT 蒜氨酸酶重组质粒为底物,重新设计引物。上游引物 5'-CCCTCGAAGAGAGAGATGATCTGCCTAGTG-3', 下游引物 5'-ATAAGAAATCCGCCCCCAATGAAA GGACGAC-3'。在上下游引物内分别引入 Xho 和 Not 酶切位点,进行 PCR。PCR 产物和 pPICZaC 载体分别进行双酶切后经 T<sub>4</sub>DNA 连接酶进行连接,构建 pPICZaC-Alliinase 真核表达质粒。重组质粒经酶切、PCR,测序鉴定正确后保存。

## 2 结果与分析

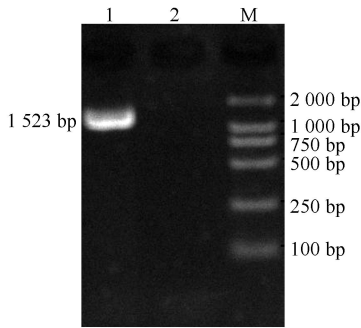
### 2.1 RT-PCR 扩增结果及 pGEMPT 蒜氨酸酶重组质粒酶切鉴定结果

RT-PCR 产物经 1%琼脂糖电泳检测,在 1 500 bp 左右可见与预期大小一致的特异性条带(图 1)。pGEMPT 蒜氨酸酶重组质粒大小约为 4 500 bp,经 EcoR 单酶切后,出现 3 015 bp 和 1 523 bp 的特异性条带(图 2),与预期大小基本一致。

### 2.2 浙江蒜氨酸酶基因测序分析及蛋白质序列

根据测序结果,用 DNASTAR 软件对所得的核苷酸序列进行序列拼接,获得长为 1 523 bp 的基因编码序列,包含完整的 ORF 框,最大 ORF 框为

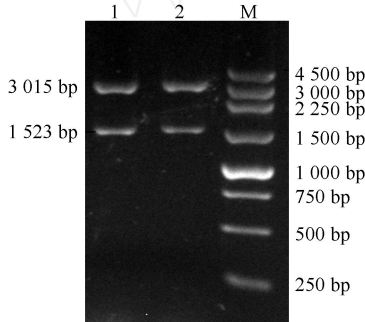
6~1 430 bp,全长为 1 425 bp,包含起始密码子 ATG和终止密码子 TAA。本次浙江蒜氨酸酶登陆 GenBank(登陆号: FJ786257)。该蛋白质分子量为 54.3 kD,等电点为 7.72,共包括 474 个氨基酸,其中包括 55 个碱性氨基酸(如赖氨酸和精氨酸)、53 个酸性氨基酸(如天冬氨酸和谷氨酸)、150 个疏水氨基酸和 145 个极性氨基酸。从氨基酸的组成看,蒜氨酸酶的碱性氨基酸比例较高,占 11.6%,碱性氨基酸中又以 Lys 占优势,可达 61.8%,高于李瑜<sup>[3]</sup>等报导的 24.50%。



1. RT-PCR 产物 RT-PCR product; 2. 阴性对照 Negative control; M. DL 2000 Marker

图 1 蒜氨酸酶 RT-PCR 结果

Fig. 1. RT-PCR products of alliinase



1~2. pGEM-T-Alliinase 重组质粒 EcoR 酶切产物 Products of pGEM-T-Alliinase recombinant plasmid digested with EcoR; M. 250 bp DNA Ladder Marker

图 2 pGEM-T-蒜氨酸酶重组质粒 EcoR 酶切鉴定结果

Fig. 2. Analysis of pGEM-T-Alliinase recombinant plasmid digested with EcoR

### 2.3 蒜氨酸酶二级结构和功能位点

根据同源建模比较,模板序列(2HOX.D)与浙江蒜氨酸酶的同源性为 99.53%。浙江蒜氨酸酶蛋白质的二级结构预测如图 3,其中  $\alpha$ -螺旋占 33.33%,高于苟萍<sup>[2]</sup>等报道的 27%~30%;折叠占 18.57%,含有 5 个糖基化位点(Asn19,45,

172,217,354),高于 Aaron Rabinkov<sup>[4]</sup>等报道的 4 个糖基化位点,而且糖基化位点也显著不同,分别位于 Asn19、Asn146、Asn191、Asn328。浙江蒜氨酸酶序列含有 1 个依赖于 cGMP 的蛋白激酶位点(Lys 451)、11 个蛋白激酶 c 位点(Thr31,134,311,332,336;Ser62,77,319,362,422,469)、8 个酪蛋白激酶磷酸化位点(Thr72,134,311,336,433;Ser219,248,366)、2 个酪氨酸激酶磷酸化位点(Lys199,247)和 4 个 N-豆蔻酰化位点(Gly61,143,155,164),这些功能位点可能参与了蒜氨酸酶的信号转导通路调控。



图 3 蒜氨酸酶的二级结构预测

Fig. 3. Secondary structure prediction of alliinase

### 2.4 浙江蒜氨酸酶超二级结构和三维结构预测

经杭州宝派生物科技有限公司生物信息学分析后,蒜氨酸酶蛋白三维结构预测如图 4。

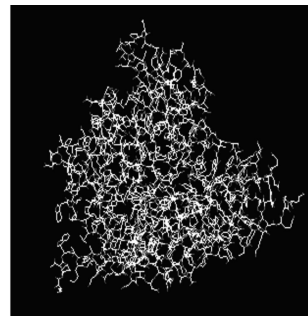


图 4 三维结构图

Fig. 4. Three dimensional structure

大蒜鳞茎蒜氨酸酶三维结构如树枝状,在蛋白质分子的 N 端含有 1 个类似表皮生长因子结构(图 5),位于氨基酸序列 27~116,含有独特半胱氨酸排列方式 C-X<sub>18-19</sub>-C-X-C-X<sub>2</sub>-C-X<sub>5</sub>-C-X<sub>6</sub>-C。该结构域存在于所有蒜氨酸酶结构内,是蒜氨酸酶序列内高度保守序列,是磷酸吡哆醛依赖酶中唯一的。目前,该结构域的功能还不清楚,推测可能与蒜氨酸酶在液泡中的定位有关<sup>[5]</sup>。在蒜氨酸酶的中心含有一个天冬氨酸氨

基转移酶超家族结构域(图 6),该结构域是 型磷酸吡哆醛依赖酶的主要成员,位于 147 ~ 310, 336 ~ 474。葱属植物中蒜氨酸酶都含有 5-磷酸吡哆醛辅酶因子 (PLP),该结构域对酶的活性和底物的选择起关键作用。

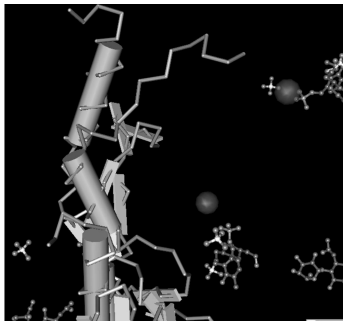


图 5 类表皮生长因子结构域

Fig. 5. Alliinase EGF-like domain

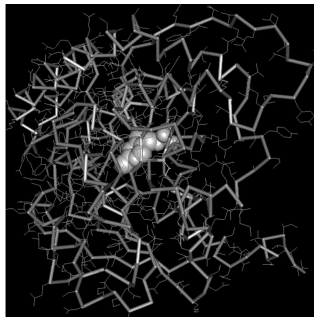


图 6 天冬氨酸转移酶超家族结构域

Fig. 6. Aspartate aminotransferase superfamily domain

	10	↓	20	
(273) 洋葱	1 DADEDIMLFT	MSKYTGHS	RFGWAL	---- --
(268) 韭菜	1 KADEDIMLFT	MSKYTGHS	RFGWAI	---- --
(265) 浙江大蒜	1 KADEDILLFT	MSKFTGHS	RFGWAL	---- --
(277) 大蒜	1 KADEDILLFT	MSKFTGHS	RFGWAL	---- --
(264) 大蒜鳞茎	1 KADEDILLFT	MSKFTGHS	RFGWALIKDE	SV
(266) 拟南芥胱硫醚-β-裂解酶	1 ELGADIVMHS	ATKFIAGHS	---- VMAGV	LA
(367) 拟南芥胱硫醚-γ-合成酶	1 ALGADLVVHS	ATKYIGGHND	---- VLAGC	IC
(191) 酿酒酵母胱硫醚-γ-裂解酶	1 NFGADIVVHS	ATKYINGHS	---- VVLGV	LA
(196) 酿酒酵母胱硫醚-γ-合成酶	1 KYGADIVTHS	ATKWIGGHGT	---- TIGGI	IV
(186) 酿酒酵母胱硫醚-β-裂解酶	1 ALGADLVVHS	CTKYLGGHS	---- VVAGV	VI
(207) 绿脓杆菌O-乙酰高丝氨酸裂解酶	1 KLGADVVIHS	ATKYIDGQGR	---- GMGGV	V-

注:括号内的数字表示第 1 个氨基酸在整个序列中的位置;箭头指示的赖氨酸残基表示磷酸吡哆醛的结合位点 The numbers in parentheses indicate the location of the first amino acid of the region in the respective complete sequence, the K residue indicated by an arrow is the binding site of Pxy-P

图 7 蒜氨酸酶活性中心预测

Fig. 7. Prediction of alliinase active center

2.6 浙江蒜氨酸酶同源性比较和进化分析结果  
利用 DNASYS 软件分析对浙江蒜氨酸酶序列与 GenBank 登陆的大蒜鳞茎蒜氨酸酶核苷酸序列 (gi: S73324) 进行比较分析。结果表明:浙江蒜氨酸酶序列多了 3 个碱基 GTA,有 9 个位点发生了

### 2.5 酶活性中心预测

5-磷酸吡哆醛辅酶因子 (PLP) 在酶上的位置为酶的活性配置位点,它在洋葱蒜氨酸酶的结合位点位于该酶氨基酸序列第 285 位的赖氨酸<sup>[6]</sup>上,韭菜蒜氨酸酶定点突变试验证明 Lys-280 是磷酸吡哆醛的结合位点。Lys-280 周围的序列在所有 C-S 裂解酶中是高度保守的,280 ~ 285 区域的 Lys 对酶的活性非常重要<sup>[7]</sup>。本研究比较了浙江蒜氨酸酶和 Manabe T<sup>[7]</sup>等人报道的 C-S 裂解酶,如洋葱 (*Allium cepa* L.)、韭菜 (*Allium tuberosum* L.)、浙江大蒜 (*Allium sativum* L.) 鳞茎、大蒜 (*A. sativum*)、大蒜 (*A. sativum*) 鳞茎、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 胱硫醚-裂解酶、拟南芥 (*A. thaliana*) 胱硫醚-合成酶、酿酒酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 胱硫醚-裂解酶、酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 胱硫醚-裂解酶、酿酒酵母 (*S. cerevisiae*) 胱硫醚-合成酶和绿脓杆菌 (*Pseudomonas aeruginosa*) O-乙酰高丝氨酸裂解酶共 11 种氨基酸序列中 Lys-280 周围保守序列(图 7)。浙江蒜氨酸酶的 Lys-277 在进化上与其他 C-S 裂解酶完全一致,推测浙江蒜氨酸酶 Lys-277 可能是磷酸吡哆醛的结合位点, Lys-277 周围区域可能是酶活性中心存在部位,与王伟<sup>[8]</sup>等人报道的蒜氨酸酶的活性中心可能含有赖氨酸一致,还需要进一步通过定点突变技术证明。

改变,二者核苷酸的同源性为 98.5%。与洋葱 (M98267) 的同源性为 87.6%,与冬葱 (AF409947) 的同源性为 90.3%,与火葱 (AF409950) 的同源性为 89.8%,与细香葱 (AF409951) 的同源性为 90.2%,说明这几种植物中的蒜氨酸酶很可能是

由同一基因家族的相关基因编码产生的,具有高度同源性。与韭菜的同源性为 62.4%,与拟南芥属的同源性为 40.2%。但是与大蒜根部的蒜氨酸酶同源性为 55.4%,推测大蒜鳞茎和根部的蒜氨酸酶可能不是同一种形式,这与 Rabinkov 等<sup>[9]</sup>报道一致。进化分析(图 8)表明,大蒜蒜氨酸酶

与其他葱属植物分离成为单独的一群,其中浙江白蒜与其他产地大蒜亲缘关系最近,而大蒜根的蒜氨酸酶基因与大蒜鳞茎蒜氨酸酶基因的关系最远,葱、洋葱和韭菜与浙江蒜氨酸酶进化关系接近,进化分析与同源性分析结果基本一致。

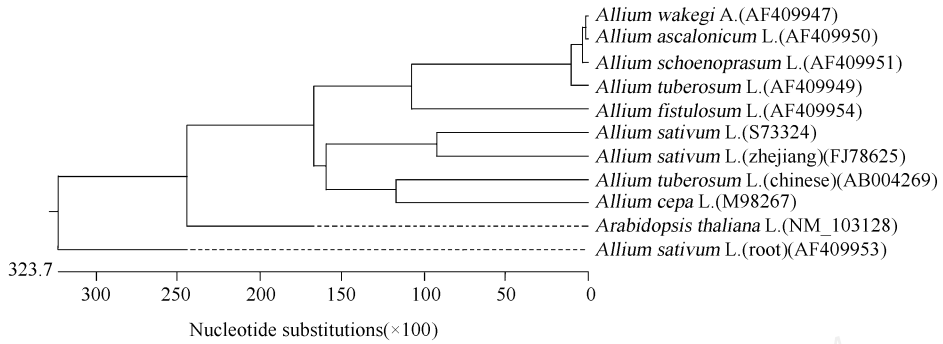
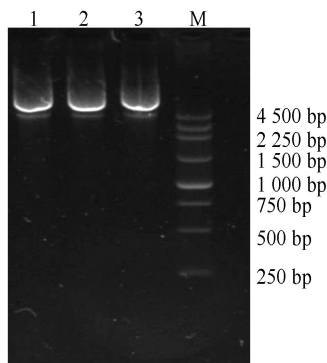


图 8 蒜氨酸酶进化分析

Fig. 8. Evolution analysis of alliinase

2.7 毕赤酵母真核表达载体构建

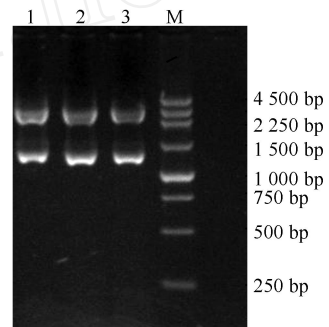
pPICZaC 载体大小为 3 598 bp,蒜氨酸酶 PCR 产物大小为 1 450 bp,pPICZaC-alliinase 重组质粒大小约为 5 000 bp(图 9)。重组质粒经 Xho 和 Not 双酶切后在大约 3 000 bp 和 1 500 bp 处分别出现 2 条特异性条带(图 10)。以重组质粒为底物进行 PCR,在 1 500 bp 处出现特异性条带(图 11),与预期结果基本一致。测序结果证实目的基因已被成功连接到载体中,毕赤酵母真核表达载体构建成功。



1~3. pPICZaC-Alliinase 重组质粒 pPICZaC-Alliinase recombinant plasmid;M. 250 bp DNA Ladder Marker

图 9 pPICZaC-Alliinase 重组质粒

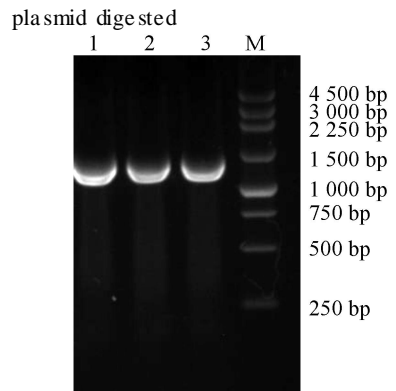
Fig. 9. pPICZaC-Alliinase recombinant plasmid



1~3. pPICZaC-Alliinase 重组质粒 Xho / EcoR 双酶切产物 Products of pPICZaC-Alliinase recombinant plasmid digested with Xho / EcoR ; M. 250 bp DNA Ladder Marker

图 10 pPICZaC-Alliinase 重组质粒双酶切分析结果

Fig. 10. Analysis of pPICZaC-Alliinase recombinant



1~3. PCR 产物 PCR products; M. 250 bp DNA Ladder Marker

图 11 pPICZaC-Alliinase 重组质粒 PCR 结果

Fig. 11. PCR products of pPICZaC-Alliinase recombinant plasmid

### 3 讨论

蒜氨酸酶是存在于大蒜中的一种内源酶(全称为 S-烷基-L-半胱氨酸亚砷酶, EC 4.4.1.4), 大约占蒜中可溶性蛋白质的 10%~12%<sup>[10]</sup>。其分子质量约为 10.2~10.4 万 D, 含 2 个分子质量约为 5.15 万 D 的亚基<sup>[11]</sup>。正常情况下, 蒜氨酸酶存在于大蒜细胞的液泡中, 而蒜氨酸存在于细胞质中, 当大蒜完整细胞受损时, 二者相遇发生酶解反应产生大蒜素<sup>[12]</sup>。

由于大蒜素极不稳定, 易降解, 分离提取十分困难, 国内外的研究思路是从鲜蒜中提取化学性质相对稳定的蒜氨酸及蒜酶, 然后科学组方, 制成蒜氨酸-蒜酶复合制剂, 让其在受体内释放大蒜辣素充分发挥疗效。该研究思路减少了大蒜素在外界环境中的滞留时间, 对于发挥大蒜素的药理作用很有意义, 在这一过程中选择高活性、高稳定性的蒜氨酸酶尤其重要。目前, 国内仍然采用传统的溶液提取方法获得蒜氨酸酶。新疆医科大学药学院和新疆医科大学在蒜氨酸酶的提取纯化方面做了大量的工作, 已经成功从鲜蒜和蒜粉中分离出纯度和活性较高的蒜氨酸酶, 建立了完整有效的提取程序<sup>[13-14]</sup>。但是溶液提取获得的蒜氨酸酶含量较低, 且由于蒜氨酸酶不稳定, 以现有的加工生产方法不稳定的蒜氨酸酶活性几乎完全丧失, 药物有效成分也会大大降低<sup>[15]</sup>。

鉴于蒜氨酸酶在大蒜素生成过程中的重要作用, 学者们期望用基因工程方法表达蒜氨酸酶, 并利用分子生物学方法提高酶的活性和稳定性。迄今为止, 国外学者已经从大蒜、洋葱、韭菜、葱等葱属植物中分离纯化出蒜氨酸酶, 但是国内未见相关报道。本研究根据 GenBank 登录的蒜氨酸酶序列设计引物, 通过 RT-PCR 技术在国内首次克隆登录了我国浙江大蒜鳞茎蒜氨酸酶基因。浙江蒜氨酸酶比 GenBank 登录的大蒜蒜氨酸酶序列多了 3 个碱基, 有 9 个位点发生突变。本试验在 RT-PCR 过程中使用的 DNA 聚合酶为 PrimeStar HS DNA 聚合酶, 该酶兼具有高保真性和高扩增效率, 可以实现对目的基因高保真性、高灵敏度、高特异性、高成功率的扩增, 是迄今为止扩增效率最好的 DNA 聚合酶。同源比较和进化分析表明浙江蒜氨酸酶与 GenBank 登录的大蒜蒜氨酸酶在进化过程中属于同一种群, 同源性达 98.5%, 且含

有葱属植物蒜氨酸酶特有的结构域——类表皮生长因子结构域和 5-磷酸吡哆醛依赖酶的天冬氨酸氨基转移酶超家族结构域, 说明本次从浙江大蒜鳞茎克隆的基因序列确实属于蒜氨酸酶基因, 其序列内的碱基改变属于浙江蒜氨酸酶基因的特点, 排除试验操作本身引起的突变。蛋白质结构分析表明浙江蒜氨酸酶碱性氨基酸比例、 $\alpha$ -螺旋和糖基化位点数目与相关文献报道不一致, 可能是试验中使用的大蒜品种不同引起的。本研究对酶的功能位点进行初步分析, 预测了酶的活性中心, 构建了毕赤酵母重组表达质粒。毕赤酵母表达系统是目前研究最多、应用最广泛的真核表达系统之一, 该系统可对表达的蛋白进行翻译后的加工与修饰, 从而使表达出的蛋白具有生物活性。此外, 该酵母菌营养要求低、生长快、培养基廉价, 易于进行操作和培养; 其高密度发酵技术业已成熟, 便于工业化生产; 表达量高, 许多蛋白可达到每升克级以上水平; 表达的外源蛋白可分泌到胞外, 分泌的内源蛋白少, 外源蛋白分离纯化简便<sup>[16]</sup>。本研究为利用毕赤酵母表达重组蒜氨酸酶以及利用定点突变提高酶活性和稳定性, 从而为蒜类药品和保健品的开发与应用奠定了实验基础。

### 参考文献:

- [1] 林青, 乔竟原. 大蒜素的药理与临床应用[J]. 首都医药, 2004, 11(6): 38-39.
- [2] 苟萍, 李艳, 王荣, 等. 蒜粉中蒜氨酸酶的分离纯化及性质测定[J]. 植物生理学通讯, 2004, 40(3): 356.
- [3] 李瑜, 许时婴. 大蒜中蒜氨酸酶的氨基酸组成分析和热力学研究[J]. 食品科学, 2006, 27(10): 65-67.
- [4] Rabinkov A, Wilchek M, Mirelmand D. Alliinase (alliin lyase) from garlic (*Allium sativum*) is glycosylated at ASN 146 and forms a complex with a garlic mannose-specific lectin [J]. Glycoconjugate Journal, 1995 (12): 690-698.
- [5] Kuettnner E B, Rolf H, Manfred S W. Purification, characterization, and crystallization of alliinase from garlic [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2002 (402): 192-200.
- [6] Lancaster J E, Shaw M L, Randle W M. Differential hydrolysis of Alk(en)ly cysteine sulphoxides by alliinase in onion macerates: Flavour implications [J]. J Sci Food Agric, 1998, 78: 367-372.
- [7] Manabe T, Hasumi A, Sugiyama M, et al. Alliinase [S-alk(en)yl-L-cysteine sulfoxide lyase] from *Allium tuberosum* (Chinese chive) Purification, localization, cDNA cloning and heterologous functional expression [J]. Eur J Biochem, 1998, 257: 21-30.

(下转第 283 页)

再生的过程中,发现 TDZ 只能诱导生成不定根,这可能是由于不同的外源激素影响内源激素的分配、代谢从而影响外植体再生。随着培养时间的延长,NAA 诱导的外植体褐化严重,导致不定芽分化率降低,这是因为不适宜的培养基可能诱导外植体分泌某些容易引起褐化的物质或外植体不能进行正常的新陈代谢而导致褐化<sup>[2-3]</sup>。只有外源激素与内源激素达成某种平衡才能启动外植体不定芽的再生<sup>[4]</sup>。在培养基中添加活性炭后,外植体褐化现象没有被遏制,反而对不定芽的分化有抑制作用。活性炭吸收培养基中的激素,使得激素的有效成分降低,不足以诱导不定芽的再生<sup>[5]</sup>。关于有效抑制不定芽褐化的机理还有待进一步研究。本试验采用 6-BA 与 IBA 配合对美女樱叶片诱导成苗的效果较好。

本试验还发现在培养基中添加不同质量浓度的蔗糖对外植体愈伤组织的诱导和分化有一定程度的影响。蔗糖浓度为 30 g/L 时,外植体的诱导率和分化率较高,蔗糖质量浓度较低(20 g/L)或较高(40 g/L)均抑制外植体分化成苗,这与邢桂梅<sup>[6]</sup>的试验结果一致。培养基中添加较低或较高质量浓度的蔗糖,其诱导的愈伤组织呈淡黄色水渍状,结构疏松,易褐化死亡,不利于分化成苗。

AgNO<sub>3</sub> 作为一种乙烯作用抑制剂,对苹果、白

菜等的不定芽再生起促进作用<sup>[7-8]</sup>。本试验在培养基中附加 2 mg/L AgNO<sub>3</sub> 对不定芽再生有促进作用。

本试验结果:美女樱叶片离体培育适宜培养基为 MS + 6-BA 4.0 mg/L + IBA 0.15 mg/L + 蔗糖 30 g/L,暗培养有利于促进美女樱不定芽的分化,最佳暗培养时间为 5 d。

#### 参考文献:

- [1] 赵志强,李瑞英.美女樱的组织培养技术研究[J].内蒙古农业科技,2006(3):25-26.
- [2] 吴雪梅,汤浩茹.不同培养条件对“丰香”草莓离体叶片再生的影响[J].园艺学报,2004,31(5):657-659.
- [3] 朴日子,曹后男.无刺红树莓组织培养快速繁殖技术研究[J].吉林农业大学学报,2006,28(4):411-414.
- [4] 吕晋慧,张启翔.菊花叶片不定芽再生体系的研究[J].北京林业大学学报,2005,27(4):97-99.
- [5] BU X X, CHEN W L. The effect of activated charcoal on the absorption of plant growth regulators in culture medium [J]. Acta Phytophysiologica Sinica, 1988, 14(4):401-403.
- [6] 邢桂梅,毕晓颖,雷家军.君子兰花器官离体培养[J].园艺学报,2007,34(6):1563-1568.
- [7] 陈喜文,范晖,裘立群. AgNO<sub>3</sub> 对苹果叶片培养的影响及其与乙烯产生的关系[J].核农学报,1997,11(1):39-44.
- [8] 侯喜林,史永红.不结球白菜苏州青子叶离体分化[J].南京农业大学学报,2002,25(3):113-115.
- [9] 王伟,乔旭光,秦晓春.金属离子对蒜氨酸酶活性的影响[J].食品工业科技,2004(9):118-120.
- [10] Rabinkov A, Zhu X Z, Graf G, et al. Alliinase (Alliinase) from garlic (*Allium sativum*) Biochemical characterization and cDNA cloning [J]. Appl Biochem Biotechnol, 1994, 48(3):149-171.
- [11] 李瑜,许时婴.大蒜中蒜氨酸酶的分离纯化及纯度测定[J].食品科学,2007,28(5):63-66.
- [12] 杨凤娟,刘世琦.大蒜素研究进展[J].安徽农业科学,2003,31(6):1034-1037,1051.
- [13] Kuettner E B, Hilgenfeld R, Weiss M S. Purification, characterization, and crystallization of alliinase from garlic [J]. Arch Biochem Biophys, 2002, 402:192-200.
- [14] 曹红,陈坚.大蒜蒜酶提取纯化及临床应用研究[J].临床医药实践杂志,2008,17(2):83-86.
- [15] 李燕,王荣,李冠,等.新鲜大蒜中蒜氨酸酶的分离纯化及性质[J].植物学通报,2005,22(5):579-583.
- [16] 苟萍.蒜氨酸酶的研究[J].生物学通报,2004,39(8):9-10.
- [17] 王清路,李俏俏,薛金艳,等.巴斯德毕赤酵母表达系统的特点及应用[J].生物技术通讯,2006,17(4):640-643.
- [18] 江迪,肖雯,丁品,等.14种耐荫植物对兰州市特殊空间的适应性研究[J].西北林学院学报,2007,22(2):28-32.
- [19] Godwin T W. The biochemistry of Carotenoids[J]. Plant, Chapman and Hall, 1980(1):529.
- [20] 任步钧,曹玉峰.优良观赏树种——兴安桧[J].生命世界,1992(3):19.
- [21] 李亚坤,华东,庞勇士.兴安桧引种繁育的研究[J].园林科技信息,1997(1):6-8.
- [22] 郭英超,赵亚民,赖玉洁,等.兴安圆柏种子繁殖和扦插育苗技术研究[J].河北林果研究,2007(1):4-6.
- [23] 张治安,陈展宇.植物生理学实验技术[M].长春:吉林大学出版社,2008.
- [24] 李合生.植物生理生化实验原理与技术[M].北京:高等教育出版社,2000.
- [25] 李英丽,果秀敏,张建光,等.高温胁迫对苹果果皮组织抗氧化特性的影响[J].河北农业大学学报,2005,28(1):18-20.
- [26] 王代军,温洋.温度胁迫下几种冷季型草坪草抗性机制的研究[J].草业学报,1998,7(3):75-80.
- [27] 周兴元,曹福亮.遮荫对假俭草抗氧化酶系统及光合作用的影响[J].南京林业大学学报,2006,30(3):33-34.
- [28] 徐召丹.花叶玉簪“甜心”等6种百合科地被植物耐荫性研究[D].杭州:浙江林学院,2009:29-30.