



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 106771118 A

(43)申请公布日 2017.05.31

(21)申请号 201710069526.9

(22)申请日 2017.02.08

(71)申请人 河北中医学院

地址 050200 河北省石家庄市鹿泉区杏苑
路3号

(72)发明人 韩晓伟 郑玉光 冯红 康立英

(74)专利代理机构 石家庄国为知识产权事务所
13120

代理人 林艳艳

(51)Int.Cl.

G01N 33/531(2006.01)

G01N 33/573(2006.01)

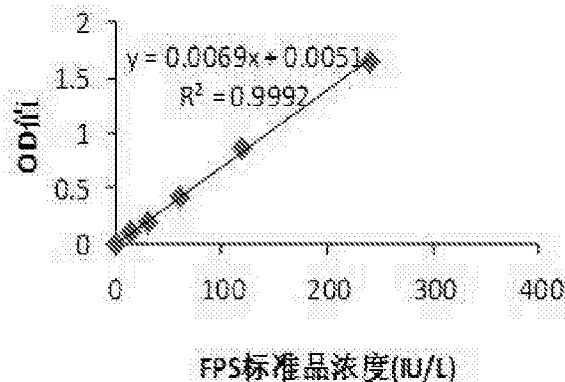
权利要求书2页 说明书6页 附图3页

(54)发明名称

柴胡粗酶的提取及酶活性检测方法

(57)摘要

本发明公开了一种柴胡粗酶的提取及酶活性检测方法,涉及植物生物技术领域。提取方法,包括以下步骤:(1)准确称量每棵柴胡种苗根部的重量;(2)向柴胡种苗根部加入PBS,冰浴研磨成匀浆;(3)将匀浆放置冰箱中,浸提;(4)在0-4℃下离心,去除沉淀取上清液;(5)重复步骤(4),上清液离心后取上部清液,即得到柴胡粗酶液。检测方法:利用酶联免疫法ELISA对柴胡粗酶液中的HMGR、IPPI、FPS和β-AS进行酶活性检测。本发明提取方法操作简单,成本低;该酶活性检测方法能够灵敏、简便、快速、准确地检测样本中HMGR、IPPI、FPS和β-AS酶的浓度,检测这四个酶类可以反映柴胡皂苷合成的速度和数量。



1. 一种柴胡粗酶的提取方法,其特征在于,包括以下步骤:

- (1) 准确称量每棵柴胡种苗根部的重量;
- (2) 向柴胡种苗根部加入PBS,冰浴研磨成匀浆;
- (3) 将匀浆放置冰箱中,浸提;
- (4) 在0-4℃下离心,去除沉淀取上清液;
- (5) 重复步骤(4),上清液离心后取上部清液,即得到柴胡粗酶液。

2. 根据权利要求1所述的柴胡粗酶的提取方法,其特征在于,步骤(2)中,PBS的浓度为0.01mol/L,PBS的pH值为7.15。

3. 根据权利要求1所述的柴胡粗酶的提取方法,其特征在于,步骤(2)中,柴胡种苗根部的克数与PBS的毫升数之比为1:18。

4. 根据权利要求1所述的柴胡粗酶的提取方法,其特征在于,步骤(3)中,浸提时间为2小时;步骤(4)中,离心转速为10000 rpm/min,离心时间为20 min;步骤(5)中,得到的柴胡粗酶液保存于-20℃,分装,避免反复冻融。

5. 一种柴胡粗酶的酶活性检测方法,其特征在于,包括以下步骤:

- (1) 根据权利要求1-4任一项所述的提取方法得到柴胡粗酶液;
- (2) 利用酶联免疫法ELISA对所述柴胡粗酶液中的HMGR、1PP1、FPS和/或β-AS进行酶活性检测。

6. 根据权利要求5所述的柴胡粗酶的酶活性检测方法,其特征在于,所述酶联免疫法ELISA的检测步骤如下:

①标准品的稀释:标准品加入标准品稀释液进行稀释;

其中,标准品为HMGR、1PP1、FPS或β-AS的提纯品;标准品稀释液为ELISA底物液;

②加样:在酶标仪包被板上分别设空白孔、标准孔、待测样品孔;

其中,酶标仪包被板用纯化的HMGR、1PP1、FPS或β-AS的抗体包被;在标准孔中加入稀释后的标准品,待测样品孔中先加样品稀释液,然后再加待测样品;待测样品为柴胡粗酶液;样品稀释液为ELISA底物液;

③温育:用封板膜封板后,放置于37℃温箱中,温育30-60 分钟;

④洗涤:揭掉封板膜,弃去液体,甩干,每孔加满洗涤液,洗涤,拍干;

⑤加酶:每孔加入酶标试剂,空白孔除外;

其中,酶标试剂为HRP标记的纯化的HMGR、1PP1、FPS或β-AS的抗体;

⑥温育:用封板膜封板后,放置于37℃温箱中,温育30-45 分钟;

⑦洗涤:揭去封板膜,按照操作④再次进行洗涤;

⑧显色:每孔先加入显色剂A,再加入显色剂B,混匀,37℃避光显色10-15分钟;

其中,显色剂A为TMB-过氧化氢尿素应用液;显色剂B为HRP;

⑨终止:每孔加终止液,终止反应;

⑩测定:以空白孔调零,450nm 波长测量各孔的OD值;

⑪计算:以稀释后的标准品的浓度为横坐标,OD 值为纵坐标,绘出标准曲线,用稀释后的标准品的浓度与OD 值计算出标准曲线的直线回归方程式,将待测样品的OD 值代入方程式,计算出待测样品中相应酶的浓度,再乘以待测样品稀释倍数,即为待测样品中相应酶的实际浓度。

7. 根据权利要求6所述的柴胡粗酶的酶活性检测方法, 其特征在于, 步骤①和②中, ELISA底物液为磷酸-柠檬酸缓冲液pH 5.0, 其中, 0.1mol/L柠檬酸, 24.3ml; 0.2mol/L $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 25.7ml; 加 H_2O , 50ml; 4℃存放备用。

8. 根据权利要求6所述的柴胡粗酶的酶活性检测方法, 其特征在于, 步骤④中, 洗涤液: NaCl 2.0g, KH_2PO_4 0.2g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 2.9g, KCl 0.2g, 氟化钠 0.2g, H_2O 至1000ml, 吐温 20 0.5ml; 4℃保存备用。

9. 根据权利要求6所述的柴胡粗酶的酶活性检测方法, 其特征在于, 步骤⑨中, 终止液为2M H_2SO_4 。

10. 根据权利要求6所述的柴胡粗酶的酶活性检测方法, 其特征在于,

步骤①中, 标准品的稀释: 原倍标准品一支, 按照下列方式进行稀释:

5 号标准品 150 μl 的原倍标准品加入150 μl 标准品稀释液;

4 号标准品 150 μl 的5 号标准品加入150 μl 标准品稀释液;

3 号标准品 150 μl 的4 号标准品加入150 μl 标准品稀释液;

2 号标准品 150 μl 的3 号标准品加入150 μl 标准品稀释液;

1 号标准品 150 μl 的2 号标准品加入150 μl 标准品稀释液;

步骤②中, 在标准孔中加入稀释后的标准品50 μl , 待测样品孔中先加样品稀释液40 μl , 然后再加待测样品10 μl ;

步骤⑧中, 每孔先加入显色剂A 50 μl , 再加入显色剂B 50 μl ;

步骤⑨中, 每孔加终止液50 μl , 终止反应。

柴胡粗酶的提取及酶活性检测方法

技术领域

[0001] 本发明涉及植物生物技术领域。

背景技术

[0002] 柴胡,中药名。为《中国药典》收录的草药,药用部位为伞形科植物柴胡或狭叶柴胡的干燥根。春、秋二季采挖,除去茎叶及泥沙,干燥。柴胡是常用解表药。别名地熏、山菜、菇草、柴草,性味苦、微寒,归肝、胆经。有和解表里,疏肝升阳之功效。用于感冒发热、寒热往来、疟疾、肝郁气滞、胸胁胀痛、脱肛、子宫脱垂、月经不调。现有文献中没有柴胡粗酶提取的方法,也没有关于柴胡HMGR、IPP1、FPS和 β -AS的酶活性检测的报告。

发明内容

[0003] 本发明要解决的技术问题是提供一种柴胡粗酶的提取及酶活性检测方法,该提取方法操作简单,成本低;该酶活性检测方法能够灵敏、简便、快速、准确地检测样本中的HMGR、IPP1、FPS和 β -AS的浓度,检测这四个酶类可以反映柴胡皂苷合成的速度和数量,为寻找能够使柴胡皂苷合成最大化的柴胡栽培条件奠定理论的基础。

[0004] 为解决上述技术问题,本发明所采取的技术方案是:一种柴胡粗酶的提取方法,包括以下步骤:

- (1)准确称量每棵柴胡种苗根部的重量;
- (2)向柴胡种苗根部加入PBS,冰浴研磨成匀浆;
- (3)将匀浆放置冰箱中,浸提;
- (4)在0-4℃下离心,去除沉淀取上清液;
- (5)重复步骤(4),上清液离心后取上部清液,即得到柴胡粗酶液。

[0005] 优选的,步骤(2)中,PBS的浓度为0.01mol/L,PBS的pH值为7.15。

[0006] 优选的,步骤(2)中,柴胡种苗根部的克数与PBS的毫升数之比为1:18。

[0007] 优选的,步骤(3)中,浸提时间为2小时;步骤(4)中,离心转速为10000 rpm/min,离心时间为20 min;步骤(5)中,得到的柴胡粗酶液保存于-20℃,分装,避免反复冻融。

[0008] 一种柴胡粗酶的酶活性检测方法,包括以下步骤:

- (1)根据上述提取方法得到柴胡粗酶液;
- (2)利用酶联免疫法ELISA对柴胡粗酶液中的HMGR、IPP1、FPS和/或 β -AS进行酶活性检测。

[0009] 优选的,酶联免疫法ELISA的检测步骤如下:

①标准品的稀释:标准品加入标准品稀释液进行稀释;

其中,标准品为HMGR、IPP1、FPS或 β -AS的提纯品;标准品稀释液为ELISA底物液;

②加样:在酶标仪包被板上分别设空白孔、标准孔、待测样品孔;

其中,酶标仪包被板用纯化的HMGR、IPP1、FPS或 β -AS的抗体包被;在标准孔中加入稀释后的标准品,待测样品孔中先加样品稀释液,然后再加待测样品;待测样品为柴胡粗酶液;

样品稀释液为ELISA底物液；

③温育：用封板膜封板后，放置于37℃温箱中，温育30-60 分钟；

④洗涤：揭掉封板膜，弃去液体，甩干，每孔加满洗涤液，洗涤，拍干；

⑤加酶：每孔加入酶标试剂，空白孔除外；

其中，酶标试剂为HRP标记的纯化的HMGR、1PP1、FPS或β-AS的抗体；

⑥温育：用封板膜封板后，放置于37℃温箱中，温育30-45 分钟；

⑦洗涤：揭去封板膜，按照操作④再次进行洗涤；

⑧显色：每孔先加入显色剂A，再加入显色剂B，混匀，37℃避光显色10-15分钟；

其中，显色剂A为TMB-过氧化氢尿素应用液；显色剂B为HRP；

⑨终止：每孔加终止液，终止反应；

⑩测定：以空白孔调零，450nm 波长测量各孔的OD值；

⑪计算：以稀释后的标准品的浓度为横坐标，OD 值为纵坐标，绘出标准曲线，用稀释后的标准品的浓度与OD 值计算出标准曲线的直线回归方程式，将待测样品的OD 值代入方程式，计算出待测样品中相应酶的浓度，再乘以待测样品稀释倍数，即为待测样品中相应酶的实际浓度。

[0010] 进一步优选的，步骤①和②中，ELISA底物液为磷酸-柠檬酸缓冲液pH 5.0，其中，0.1mol/L柠檬酸，24.3ml；0.2mol/L Na₂HPO₄ · 12H₂O，25.7ml；加H₂O，50ml；4℃存放备用。

[0011] 进一步优选的，步骤④中，洗涤液：NaCl 2.0g，KH₂PO₄ 0.2g，Na₂HPO₄ · 12H₂O 2.9g，KCl 0.2g，氟化钠 0.2g，H₂O至1000ml，吐温20 0.5ml；4℃保存备用。

[0012] 进一步优选的，步骤⑨中，终止液为2M H₂SO₄。

[0013] 进一步优选的，步骤①中，标准品的稀释：原倍标准品一支，按照下列方式进行稀释：

5 号标准品 150μl 的原倍标准品加入150μl 标准品稀释液；

4 号标准品 150μl 的5 号标准品加入150μl 标准品稀释液；

3 号标准品 150μl 的4 号标准品加入150μl 标准品稀释液；

2 号标准品 150μl 的3 号标准品加入150μl 标准品稀释液；

1 号标准品 150μl 的2 号标准品加入150μl 标准品稀释液；

步骤②中，在标准孔中加入稀释后的标准品50μl，待测样品孔中先加样品稀释液40μl，然后再加待测样品10μl；

步骤⑧中，每孔先加入显色剂A 50μl，再加入显色剂B 50μl；

步骤⑨中，每孔加终止液50μl，终止反应。

[0014] PBS，英文全称Phosphate Buffered Saline。在医学词汇中表示磷酸盐缓冲液，主要成分为磷酸二氢钾、磷酸氢二钠、氯化钠以及氯化钾。

[0015] HMGR，英文全称3-hydroxy-3-methyl glutaryl coenzyme A reductase。中文名称：HMG-CoA还原酶，即：3-羟基-3-甲基戊二酸单酰辅酶A还原酶。

[0016] 1PP1，英文全称isopentenyl diphosphate isomerase。中文名称：异戊烯焦磷酸异构酶。

[0017] FPS，英文全称Farnesyl Diphosphate Synthase。中文名称：法呢基焦磷酸合酶。

[0018] β-AS，英文全称β-amyrinsynthase。中文名称：β-香树脂醇合成酶。

[0019] HRP,英文全称Horseradish Peroxidase。中文名称:辣根过氧化物酶。

[0020] TMB,英文全称3,3',5,5'-Tetramethylbenzidine。中文名称:3,3',5,5'-四甲基联苯胺。

[0021] 采用上述技术方案所产生的有益效果在于:

(1) 本发明提取方法操作简单,成本低;该酶活性检测方法能够灵敏、简便、快速、准确地检测样本中的HMGR、1PP1、FPS和 β -AS酶的浓度;

(2) HMGR、1PP1、FPS和 β -AS酶是柴胡皂苷合成途径的关键限速酶类,可催化柴胡皂苷的合成。检测这四个酶类可以反映柴胡皂苷合成的速度和数量;

(3) 本发明实验结果表明在干旱胁迫下6月龄苗和1年生柴胡苗的HMGR、1PP1、FPS和 β -AS的酶活性的表达趋势一致,即在中度干旱情况下,HMGR、1PP1、FPS和 β -AS的酶活性要高于对照组和重度干旱组,从而从侧面说明适度干旱胁迫能够提高柴胡皂苷的合成,为寻找能够使柴胡皂苷合成最大化的柴胡栽培条件奠定理论的基础。

附图说明

[0022] 下面结合附图和具体实施方式对本发明作进一步详细的说明;

图1是本发明实施例1中6月龄柴胡苗FPS酶活标准曲线图;

图2是本发明实施例2中6月龄柴胡苗 β -AS酶活标准曲线图;

图3是本发明实施例3中6月龄柴胡苗HMGR酶活标准曲线图;

图4是本发明实施例4中6月龄柴胡苗1PP1酶活标准曲线图;

图5是本发明实施例1中1年生柴胡苗FPS酶活标准曲线图;

图6是本发明实施例2中1年生柴胡苗 β -AS酶活标准曲线图;

图7是本发明实施例3中1年生柴胡苗HMGR酶活标准曲线图;

图8是本发明实施例4中1年生柴胡苗1PP1酶活标准曲线图。

具体实施方式

[0023] 实施例1-4

柴胡粗酶的提取方法,包括以下步骤:

(1) 使用电子天平准确称量每棵柴胡种苗根部的重量;

(2) 按质量体积比为1:18的比例向柴胡种苗根部加入0.01Mol/L的PBS (PH=7.15),冰浴研磨成匀浆;

(3) 将匀浆放置冰箱中,浸提2小时;

(4) 在4℃下以10000 rpm/min离心20 min,,去除沉淀取上清液;

(5) 重复步骤(4),上清液离心后取上部清液,即得到柴胡粗酶液;

(6) 柴胡粗酶液保存于-20℃,分装,避免反复冻融。

[0024] 柴胡粗酶的酶活性检测方法中:

所用酶标仪为EPOCH酶标仪,购自美国伯腾仪器公司;

酶标仪包被板用纯化的HMGR、1PP1、FPS或 β -AS的抗体包被;纯化的HMGR、1PP1、FPS或 β -AS的抗体购自上海艾博抗贸易有限公司;

标准品为HMGR、1PP1、FPS或 β -AS的提纯品;HMGR、1PP1、FPS、 β -AS的提纯品购自上海酶

联生物科技有限公司。

[0025] ELISA相关试剂的配制：

1、洗涤液pH7.4

NaCl	2.0g
KH ₂ PO ₄	0.2g
Na ₂ HPO ₄ • 12H ₂ O	2.9g
KCl	0.2g
氟化钠	0.2g
H ₂ O 至	1000ml
吐温 (Tween) 20	0.5ml

4℃保存备用。

[0026] 洗涤液中氟化钠的使用,可防止酶的失活。

[0027] 2、标准品稀释液和样品稀释液为ELISA底物液(可溶性底物)

磷酸-柠檬酸缓冲液pH5.0

A 0.1mol/L柠檬酸(2.1克/100ml)	24.3ml
B 0.2mol/L Na ₂ HPO ₄ ·12H ₂ O(7.17克/100ml)	25.7ml
加 H ₂ O	50ml

4℃存放备用。

[0028] 3、显色液

显色剂A的配方：

(1)底物液1:TMB 200mg,DMSO 100ml,加双蒸水至1000ml;

(2)底物2缓冲液:Na₂HPO₄ 14.60g,柠檬酸9.33g,0.75%过氧化氢尿素6.4ml,加三蒸水至1000ml,调至pH5.0-5.4;

(3)将底物液1和底物2按体积比1:1混合即成TMB-过氧化氢尿素应用液。其中,TMB为3,3',5,5'-四甲基联苯胺,购自Solarbio公司;

显色剂B为HRP(辣根过氧化物酶)。

[0029] 4、终止液为2M H₂SO₄: 10mL浓硫酸 加80ml水。

[0030] 5、酶标试剂为HRP标记的纯化的HMGR、1PP1、FPS或β-AS的抗体;

柴胡酶活性检测:(利用酶联免疫法ELISA)

酶联免疫法检测柴胡酶活性的方法:

(1)柴胡粗酶提取

(2)酶活的检测过程。

[0031] ①标准品的稀释:原倍标准品一支,按照下列方式进行稀释。

[0032]

5 号标准品	240U/L	150μl	的原倍标准品加入150μl	标准品稀释液
4 号标准品		150μl	的5 号标准品加入150μl	标准品稀释液
3 号标准品		150μl	的4 号标准品加入150μl	标准品稀释液
2 号标准品		150μl	的3 号标准品加入150μl	标准品稀释液
1 号标准品		150μl	的2 号标准品加入150μl	标准品稀释液。

[0033] ②加样：在酶标仪包被板上分别设空白孔（空白孔不加样品及酶标试剂，其余各步操作相同）、标准孔、待测样品孔。在酶标包被板上标准品准确加样50 μ l，待测样品孔中先加样品稀释液40 μ l，然后再加待测样品10 μ l（样品最终稀释度为5 倍）。加样将样品加于酶标板孔底部，尽量不触及孔壁，轻轻晃动混匀。待测样品为上述提取方法得到的柴胡粗酶液。

[0034] ③温育：用封板膜封板后放置37℃温箱温育30 分钟。

[0035] ④配液：将30倍浓缩洗涤液用蒸馏水30倍稀释后备用。

[0036] ⑤洗涤：小心揭掉封板膜，弃去液体，甩干，每孔加满洗涤液，静置30 秒后弃去，如此重复5 次，拍干。

[0037] ⑥加酶：每孔加入酶标试剂50 μ l，空白孔除外。

[0038] ⑦温育：用封板膜封板后放置于37℃ 30分钟。

[0039] ⑧洗涤：揭去封板膜，按照操作⑤再次进行洗涤。

[0040] ⑨显色：每孔先加入显色剂A 50 μ l，再加入显色剂B 50 μ l，轻轻震荡混匀，37℃避光显色10 分钟。

[0041] ⑩终止：每孔加终止液50 μ l，终止反应（此时蓝色立转黄色）。

[0042] ⑪测定：以空白空调零，450nm 波长依序测量各孔的OD 值。测定应在加终止液后15分钟以内进行。

[0043] ⑫计算：以稀释后的标准品的浓度为横坐标，OD值为纵坐标，绘出标准曲线，用稀释后的标准品的浓度与OD值计算出标准曲线的直线回归方程式，将待测样品的OD值代入方程式，计算出待测样品中相应酶的浓度，再乘以待测样品稀释倍数，即为待测样品中相应酶的实际浓度。

[0044] 实施例1、2、3和4的详细步骤完全相同，区别在于：

	实施例 1	实施例 2	实施例 3	实施例 4
标准品	FPS 的提纯品	β -AS 的提纯品	HMGR 的提纯品	IPPI 的提纯品
酶标仪包被板	用纯化的 FPS 的抗体包被	用纯化的 β -AS 的抗体包被	用纯化的 HMGR 的抗体包被	用纯化的 IPPI 的抗体包被
酶标试剂	HRP 标记的纯化的 FPS 的抗体	HRP 标记的纯化的 β -AS 的抗体	HRP 标记的纯化的 HMGR 的抗体	HRP 标记的纯化的 IPPI 的抗体
酶活性测定	测定待测样品中 FPS 的浓度	测定待测样品中 β -AS 的浓度	测定待测样品中 HMGR 的浓度	测定待测样品中 IPPI 的浓度

实验所用柴胡苗的栽培条件和分组：

盆栽控水实验设置土壤饱和含水量的70%-80%、40%-50%和20%-30% 3个水平来栽培柴胡，其中土壤饱和含水量为70%-80%时为正常培养的对照组，土壤饱和含水量为40%-50%时为中度干旱组，土壤饱和含水量为20%-30%时为重度干旱组。采用称重法进行水分控制，控水期间每天下午 17:00 称取盆重，补充失去的水分，使各处理保持设定的相对含水量。

[0045] 实施例1、2、3和4中6月龄柴胡苗FPS、 β -AS、HMGR或IPPI酶活标准曲线和回归方程分别见图1-4所示。

[0046] 实施例1、2、3和4中1年生柴胡苗FPS、 β -AS、HMGR或1PP1酶活标准曲线和回归方程分别见图5-8所示。

[0047] 实施例1、2、3和4中酶活的检测结果见下表：

酶活性测定	6月龄柴胡苗			1年生柴胡苗		
	中度干旱	重度干旱	对照组	中度干旱	重度干旱	对照组
实施例1 FPS (U/Kg)	5588.1	2141.1	4043.0	23649.0	14050.7	13406.5
实施例2 β -AS (IU/Kg)	21580.8	15768.7	18849.6	19126.7	10848.5	16039.2
实施例3 HMGR (IU/Kg)	1174.1	637.0	805.3	4260.2	2723.6	2574.0
实施例4 1PP1 (IU/g)	229.8	182.0	200.4	1136.1	415.4	360.9

此表格的数值结果表明在干旱胁迫下6月龄苗和1年生柴胡苗的HMGR、1PP1、FPS和 β -AS的酶活性的表达趋势一致,即在中度干旱情况下,HMGR、1PP1、FPS和 β -AS的酶活性要高于对照组和重度干旱组,从而从侧面说明适度干旱胁迫能够提高柴胡皂苷的合成,为寻找能够使柴胡皂苷合成最大化的栽培条件奠定理论的基础。

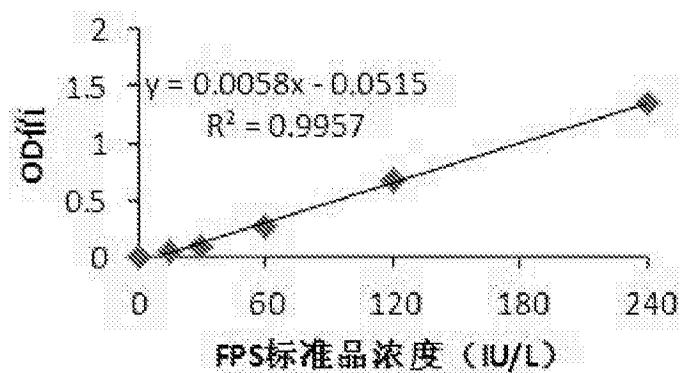


图1

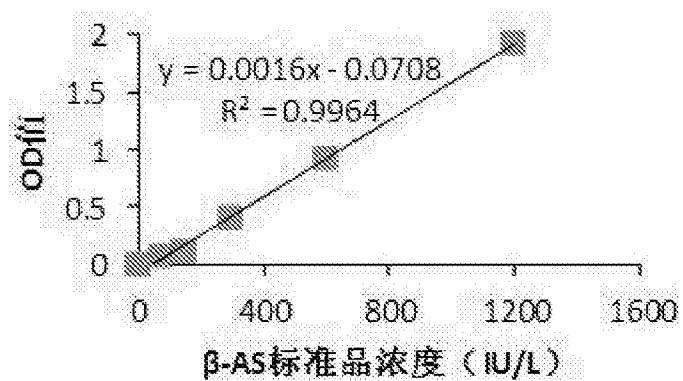


图2

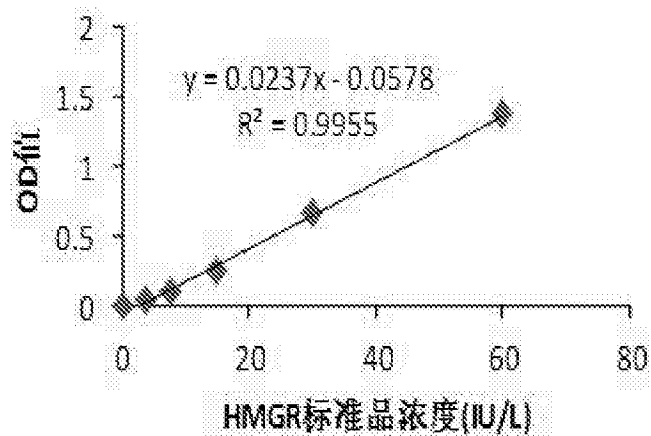


图3

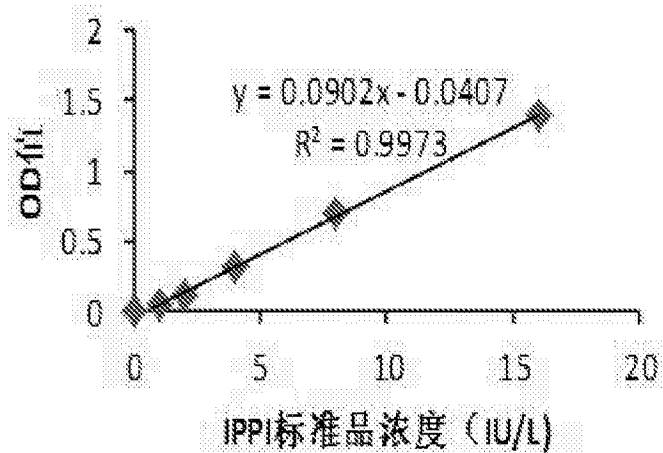


图4

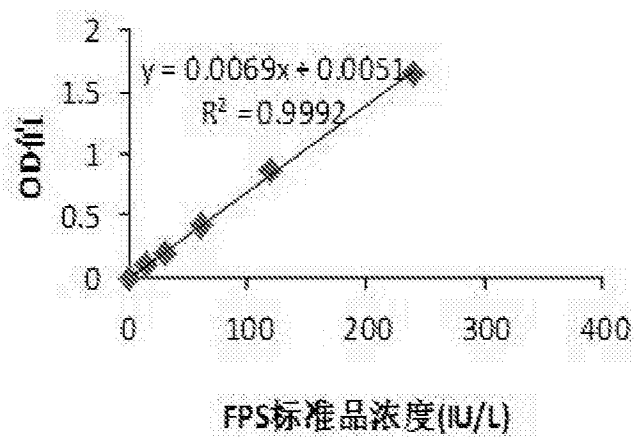


图5

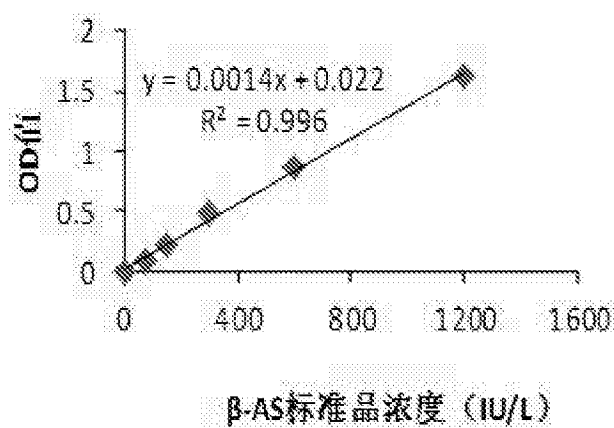


图6

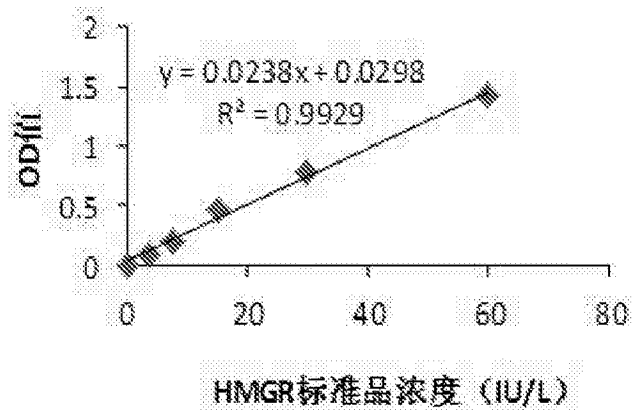


图7

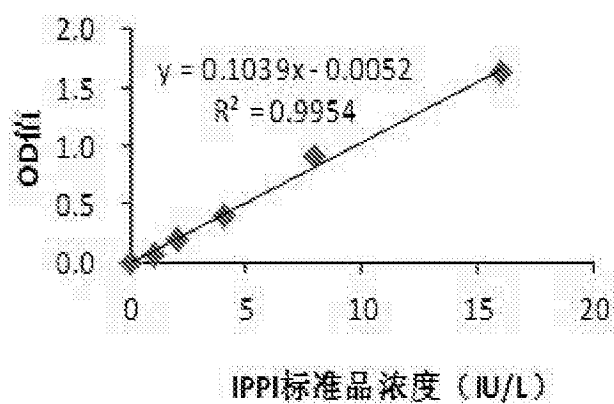


图8

专利名称(译)	柴胡粗酶的提取及酶活性检测方法		
公开(公告)号	CN106771118A	公开(公告)日	2017-05-31
申请号	CN201710069526.9	申请日	2017-02-08
[标]申请(专利权)人(译)	河北中医学院		
申请(专利权)人(译)	河北中医学院		
当前申请(专利权)人(译)	河北中医学院		
[标]发明人	韩晓伟 郑玉光 冯红 康立英		
发明人	韩晓伟 郑玉光 冯红 康立英		
IPC分类号	G01N33/531 G01N33/573		
CPC分类号	G01N33/531 G01N33/573		
代理人(译)	林艳艳		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

本发明公开了一种柴胡粗酶的提取及酶活性检测方法，涉及植物生物技术领域。提取方法，包括以下步骤：（1）准确称量每棵柴胡种苗根部的重量；（2）向柴胡种苗根部加入PBS，冰浴研磨成匀浆；（3）将匀浆放置冰箱中，浸提；（4）在0-4℃下离心，去除沉淀取上清液；（5）重复步骤（4），上清液离心后取上部清液，即得到柴胡粗酶液。检测方法：利用酶联免疫法ELISA对柴胡粗酶液中的HMGR、IPPI、FPS和β-AS进行酶活性检测。本发明提取方法操作简单，成本低；该酶活性检测方法能够灵敏、简便、快速、准确地检测样本中HMGR、IPPI、FPS和β-AS酶的浓度，检测这四个酶类可以反映柴胡皂苷合成的速度和数量。

