

黄芩过氧化物酶同工酶几种酶液提取方法的比较

张东向, 张磊, 王蕊

(齐齐哈尔大学 生命科学与工程学院 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘要: 利用聚丙烯酰胺凝胶电泳对黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi)萌发的种子, 愈伤组织, 悬浮细胞及幼苗过氧化物酶几种酶液提取方法进行比较。结果表明: 各种酶液提取方法对不同部位的同工酶提取效果不同。同工酶是研究植物多样性的有力工具, 过氧化物酶则是广泛存在于植物体内的一种重要的同工酶, 能反映植物生长发育特点、体内代谢状况及对外界环境的适应。

关键词: 黄芩; 过氧化物同工酶; 电泳

中图分类号: S 567.9; Q 946.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)06-0033-03

中药黄芩为唇形科植物黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi)的干燥根, 具有清热燥湿、泻火解毒、止血安胎等功效^[1]。其主要成分黄芩甙(baicalin, Bai)具有抗菌、抗病毒、抗炎、抗变态反应、抗氧化、清除氧自由基、抗癌、抗肿瘤、抗凝、抗血栓形成和保护肝脏、心脑血管、神经元等作用^[2]。现对黄芩萌发种子, 幼苗、固体愈伤组织及悬浮细胞进行过氧化物酶同工酶电泳, 对几种酶提取缓冲液进行比较。为探讨过氧化物酶与植物形态培养的关系及次生代谢产物积累的关系提供试验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

黄芩种子(河北省安国市药材市场), 种子萌发后移

栽至室内花盆中, 用外植体进行愈伤组织诱导, 诱导生成的愈伤组织进行细胞悬浮培养。化学试剂均为分析纯。

1.1.1 幼苗的获得 选取籽粒饱满的黄芩种子, 经常规消毒后, 均匀播种于温室育苗盆中。(25±1)℃培养。待苗长到 8~10 cm 时, 取下作为试验材料。

1.1.2 稳定悬浮细胞系的建立 无菌称取一定量生长良好的继代 3~4 次的疏松的淡黄色的愈伤组织转入 100 mL 三角瓶中(含 30 mL MS 培养基)制作种子瓶。MS 培养基的成分同固体培养基。传代 3~4 次, 使细胞适应液体培养的环境并稳定生长。

1.1.3 愈伤组织的诱导及继代培养 选取籽粒饱满的黄芩种子, 经常规消毒后, 均匀播种于温室育苗盆中。(25±1)℃培养。待苗长到 5~7 cm 时, 选取根为外植体, 将无菌外植体接种于附加 0.2 mg/L 2, 4-D 和 2.0 mg/L 6-BA 的 MS 培养基中(蔗糖 3%, 琼脂 1%, pH 5.8), (25±1)℃暗培养诱导愈伤组织。选取疏松的淡黄色的愈伤组织作为继代培养的材料。每 3 周继代 1 次。

第一作者简介: 张东向(1963-), 男, 硕士, 教授, 现从事植物生理及植物细胞工程方面的研究。E-mail: zhanglei120273860@163.com。
基金项目: 黑龙江省普通高等学校骨干教师创新能力计划资助项目(No. 1054G066)。
收稿日期: 2008-01-30

Study of the Affecting Factors on Purifying Domestic Sewage by Two Hydrophytes

HU Yan-chun, WEI Zheng, HONG Jian-ming

(College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100037, China)

Abstract: By artificial imitation of the different condition, such as treatment time, temperature and illumination, two hydrophytes(*Najas minor* All. and *Myriophyllum spicatum* L.), were used to investigated the effects on decontaminating nitrogen and phosphor. It studied on the influence of these factors on total nitrogen, total phosphorus by the arrangement of the orthogonal. The purpose was to find which factor was principal and which was subordinate. The results indicated that the optimum condition was resting time 48 h, temperature 20℃, illumination indensity 66%.

Key words: Removal efficiency; Domestic sewage; Orthogonal

1.2 方法

1.2.1 粗酶液的制备 称取新鲜的材料 0.5 g, 加入酶提取液。酶提取液分别采用以下 4 种提取液: 浓缩胶缓冲液^[4]; pH 为 7.0 的磷酸缓冲液; 含 50 mmol/L PBS (pH 7.8), 0.1 mmol/L EDTA, 0.1 mmol/L H_2O_2 和 0.5 mmol/L 抗坏血酸(AsA)^[9]; pH 为 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液(内含 0.5 mol/L 的蔗糖、0.06 mol/L 的抗坏血酸、0.006 mol/L 的 β -巯基乙醇)^[3]。放于冰浴中充分研磨 4℃下 8 000 rpm 离心 10 min, 取上清液置冰箱中保存备用。

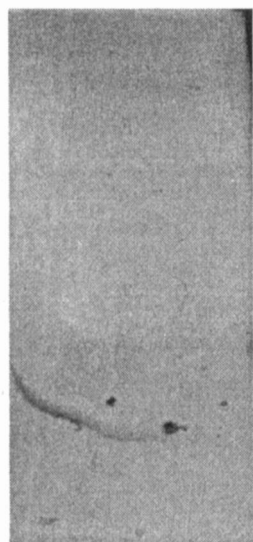


图 1 萌发种子的过氧化物酶同工酶电泳图

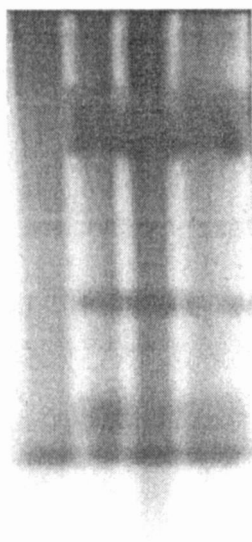


图 2 固体愈伤组织的过氧化物酶同工酶电泳图

注:所使用的酶提取缓冲液分别为 A:浓缩胶缓冲液;B:pH 为 7.0 的磷酸缓冲液;C:含 50 mmol/L PBS (pH 7.8), 0.1 mmol/L EDTA, 0.1 mmol/L H_2O_2 和 0.5 mmol/L 抗坏血酸(AsA);D:pH 为 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液(内含 0.5 mol/L 的蔗糖、0.06 mol/L 的抗坏血酸、0.006 mol/L 的 β -巯基乙醇)。以下同。

1.2.2 过氧化物酶同工酶电泳 采用聚丙烯酰胺垂直板凝胶电泳, 凝胶制备按文献^[6]的。分离胶浓度为 7%, pH 8.9; 浓缩胶为 2.5%, pH 6.7。电极缓冲液为 Tris-甘氨酸系统(pH 8.3)。点样量为 25 μ L, 电泳初始电压为 80 V, 待进入分离胶时为 160 V, 此后恒压电泳至溴酚兰指示剂距底部 1.5 cm 处停止电泳, 整个电泳过程约需 4.5 h。染色液组成为: 联苯胺溶液(称取 0.8 g 联苯胺, 加 6 mL 冰醋酸, 然后 60℃恒温溶解后, 加 34 mL 蒸馏水, 现配现用)。加入 4% 的氯化铵溶液, 5% EDTA-Na 溶液(pH 6.0), 0.3% H_2O_2 溶液。4 种溶液以 1:1:1:1 的比例配制, 然后加入 8 倍的蒸馏水, 可染 4~6 块胶板。凝胶取出后用蒸馏水洗涤 2~3 次后在 15 cm 培养皿中加染色液 10~15 min, 弃去染色液, 拍照后加 7% 冰醋酸

固定保存。

2 结果与分析

从图 1 中可以看出用 4 种提取缓冲液提取萌发种子中的酶均未出带, 是因为种子处于休眠阶段, 各种代谢活动基本处于停止状态, 大部分过氧化物酶的同工酶基因都不表达, 因而会出现几乎没有谱带的情况。

由图 2 中可以看出 4 种提取缓冲液对固体愈伤组织中过氧化物酶进行提取, 用浓缩胶缓冲液提取的酶液比其他 3 种酶液提取的条带少, 而且颜色也要淡。用 pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液提取的酶液条带清晰并且着色深, 效果最好。pH 7.0 的磷酸缓冲液与含 50 mmol/L PBS (pH 7.8), 0.1 mmol/L EDTA, 0.1 mmol/L H_2O_2 和 0.5 mmol/L 抗坏血酸(AsA)提取酶液做过氧化物酶同工酶电泳的效果差不多。

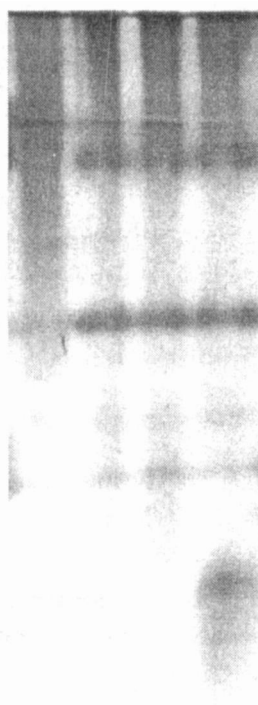


图 3 悬浮细胞的过氧化物酶同工酶电泳图

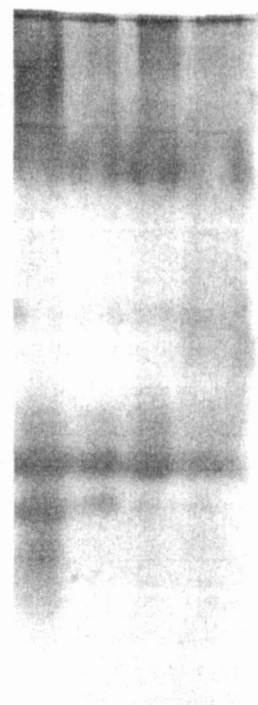


图 4 黄芩幼苗的过氧化物酶同工酶电泳图

4 种方法对悬浮细胞进行提取, 从图 3 可以看出 pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液的效果最好, 而且还多出一条谱带, 而浓缩胶缓冲液的效果不如其他 3 种提取液。含 50 mmol/L PBS (pH 7.8), 0.1 mmol/L EDTA, 0.1 mmol/L H_2O_2 和 0.5 mmol/L 抗坏血酸(AsA)比 pH 7.0 磷酸缓冲液效果要好一些, 谱带比较清晰, 只是比 pH 8.0 的 Tris-HCl 缓冲液少一条谱带。

4 种方法对幼苗进行提取,从图 4 上可以看出,用提取缓冲液采取浓缩胶缓冲液的效果最好,其他 3 种处理效果类似。

3 讨论

同工酶是一种与生物的遗传、生长发育、代谢调节及抗性等都有直接关系的酶。对同工酶的分析是从基因产物的角度来认识基因的存在与表达,由生化表现型反映基因型。酶的差异主要反映基因的差异。过氧化物酶是单基因控制的,广泛存在于各种动物、植物和微生物体内的一类氧化酶,催化由过氧化氢参与的各种还原剂的氧化反应,广泛参与生物体内的物质代谢,与植物的抗逆生理和植物次生代谢产物的合成密切相关,在一定程度上能反映品种间的遗传差异。植物在生长过程中遇到外界条件变化不利时,会产生一些新的同功酶或抑制某些酶的产生,以适应外界环境。各种胁迫(干旱、盐碱、温度变化等)、生长环境变化及病菌侵染等因子都可作用于过氧化物酶同工酶基因的表达^[3]。近些年来已经广泛应用于鱼腥草^[7]、灵芝^[8]、天麻^[9]、月季^[10]、欧李^[11]及葡萄^[12]等植物的研究。

研究通过对不同的酶液提取方法研究发现,不同的酶提取缓冲液对过氧化物同工酶电泳是有影响的。同一种植物的不同取材方式应选用不同的酶提取缓冲液。不能一概而论。对于不同发育时期的材料采用的提取缓冲液也应有所区别。通过对本科实验教材和大量参考文献上出现的 4 种提取缓冲液进行了对比,发现不同的材料应选不同的酶提取缓冲液,才能得到最理想的效果。同时要选取正确的材料来进行试验,试验中发现对浸泡的刚萌发的黄芩种子进行过氧化物酶同工酶试验,胶版经染色后没有条带出现。所以进行过氧化物酶同

工酶电泳时,应根据选材对应不同的酶提取缓冲液,才能使试验得到更加理想的效果。

另外,黄芩的有效成分主要为生黄芩苷和其他黄酮类化合物,均为体内的次生代谢产物,与过氧化物酶密切相关。因此探讨过氧化物酶同工酶的酶液提取方法不仅对于黄芩过氧化物酶的深入研究有着重要的意义,而且对于探讨该酶与黄芩的有效成分之间的关系有着一定的意义。

参考文献

[1] 中华人民共和国卫生部药典委员会. 中国药典一部[M]. 北京: 化学工业出版社, 2005.
[2] 许文杰, 丁启龙. 黄芩素的药理学研究进展[J]. 江苏药学与临床研究, 2006, 14(2): 35-39.
[3] 王强. 川贝母多倍体诱导及其过氧化物酶同工酶分析[D]. 四川大学学位论文, 2003: 15-19.
[4] 张芳. 金银花种质资源初步研究[D]. 山东中医药大学学位论文, 2005: 49-56.
[5] 谢小群, 高山林. 黄芩过氧化物酶同工酶电泳和抗坏血酸过氧化物酶活性分析[J]. 植物资源与环境学报, 2002, 11(1): 5-8.
[6] 何忠孝, 张树政. 电泳[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 1999.
[7] 吴卫, 郑有良, 陈黎, 等. 川产鱼腥草种质资源的同工酶分析[J]. 中药材, 2002, 25(10): 695-698.
[8] 兰进, 徐锦堂. 灵芝过氧化物同工酶和酯酶同工酶的研究[J]. 中国药杂志, 1998, 23(12): 714.
[9] 陈文强, 邓百万, 丁锐, 等. 天麻 3 种变型过氧化物酶的同工酶研究[J]. 西北植物学报, 2005, 25(8): 1665-1666.
[10] 贾元义, 赵兰勇, 王文丽, 等. 月季品种过氧化物酶同工酶类分研究[J]. 山东农业大学学报, 2005, 36(2): 172-174.
[11] 张立彬, 陈丽珍, 郭密成. 欧李种质资源过氧化物酶同工酶研究[J]. 园艺学报, 1994, 21(1): 94-96.
[12] 吕秀兰, 张光伦, 龚荣高, 等. 22 个葡萄品种过氧化物同工酶研究[J]. 四川农业大学学报, 2005, 23(2): 182-185.

Comparison on Several Extraction Methods of Enzyme Solution of Peroxidase and Isoenzyme of *Scutellaria baicalensis* Georgi

ZHANG Dong-xiang ZHANG Lei WANG Rui

(College of Life Science and Technology, Qiqihaer University, Qiqihaer, Heilongjiang 161006, China)

Abstract: In this paper, some methods of extracting peroxidase isoenzymes in germinating seeds, callus tissue, suspension cells and seedlings of *Scutellaria baicalensis* Georgi were analyzed through electrophoresis. The results indicated that every method of extracting peroxidase isoenzymes in different sites has different effect. Isoenzyme was a effective tool in reseaching plant variety. Peroxidase isoenzyme was a important isoenzyme distributing widely in the plant, could responds the characters of plant growing and development, the internal metabolism situation and the adaptation to external envirement.

Key words: *Scutellaria baicalensis* Georgi; Peroxidase isoenzyme; Electrophoresis