

# 两种石蒜中酯酶和苹果酸脱氢酶酶谱分析

秦公伟<sup>1,2</sup>, 曹小勇<sup>1,2</sup>, 赵慧<sup>1</sup>, 王斌<sup>1</sup>

(1. 陕西理工学院 生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723000; 2. 陕西省资源生物重点实验室 陕西 汉中 723000)

**摘要:** 对2种石蒜用3种方法提取酶液, 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳进行酯酶和苹果酸脱氢酶同工酶酶谱分析, 同时对提取酶液在白色点滴板上显色。结果表明: 从酶谱分析可知, 石蒜酯酶有1条谱带, 相对迁移率( $R_f$ )为0.17; 苹果酸脱氢酶有2条谱带,  $R_f$ 值分别为0.51和0.69。忽地笑酯酶有1条谱带,  $R_f$ 值为0.17; 苹果酸脱氢酶有4条谱带,  $R_f$ 值分别为0.43, 0.47, 0.51和0.69。从显色试验可知, 3种提取方法对酶提取的充分性、活性有差异; 研磨后, 经60%超声的提取方法对酶能够充分提取, 而且能更好地保持酶的活性。

**关键词:** 石蒜; 酯酶; 苹果酸脱氢酶; 同工酶

**中图分类号:** S 682.2<sup>+</sup> 9; Q 946.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2009)02-0094-03

石蒜属(*Lycoris* Herb.)植物既是一种药用植物, 又是优良的观赏植物<sup>[1-3]</sup>。石蒜的鳞茎含有10多种生物碱, 具有祛风消肿、解毒抗癌等功效, 因此石蒜具有巨大的市场前景和社会效益。现今许多制药公司及园林部门大规模收购石蒜资源, 野生种质资源遗传多样性遭到一定程度破坏, 进行石蒜种质资源收集及保存工作显得日益迫切和重要<sup>[2]</sup>。

同工酶是生物体基因结构差异的外在表现, 在进化中有一定的保守性, 其分析可以为石蒜属的分类和进化提供分子水平佐证。试验通过对石蒜中酯酶和苹果酸脱氢酶同工酶的谱带分析, 研究酶液提取方法, 希望为

石蒜属的分类和进化及相关研究提供一些参考和依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

忽地笑(*Lycoris aurea*)和石蒜(*L. radiata*) 2种石蒜。

### 1.2 仪器与试剂

垂直板电泳仪 DYY-12 型、KQ5200DE 型数控超声波清洗机、冰冻离心机。

三羟甲基氨基甲烷(Tris), 聚乙二醇辛基苯基醚(TritonX-100), 乙二胺四乙酸二钠(EDTA), N-甲基吩嗪甲基硫酸盐(PMS), 氯化硝基四氮唑蓝(NBT), 辅酶I(NAD), 双蒸水。

### 1.3 方法

**1.3.1 酶液提取** 提取液: 0.05 mol/L Tris-HCl, 0.8% TritonX-100, pH 6.8。挖取石蒜鳞茎, 洗净去外鳞片后, 3种方法提取酶液。方法1, 称取1.5g石蒜鳞茎, 加

**第一作者简介:** 秦公伟(1980-), 男, 陕西蒲城人, 硕士, 讲师, 主要从事植物生理学及仪器分析教学科研工作。

收稿日期: 2008-10-20

## Research of Quick Cultivate Technology on Salt-tolerant *Asparagus Of ficinalis*

XU Hua-ling<sup>1</sup>, CHEN Ji-xiang<sup>2</sup>

(1. Agricultural Scientific Research Institute of Dongying City, Dongying, Shandong 257091, China; 2. Forestry Bureau of Dongying City, Dongying, Shandong 257091, China)

**Abstract:** Based on the Yellow River Delta reality, Dongying Agricultural Science Research Institute cultivated two *Asparagus of ficinalis* strains, with strongly Salt-tolerant ability, high output, superior quality, suits the general salt alkaloid regions to plant, extremely good prospect of the development. In order to accelerate its promotion to reproduce, and for technical reserve of further deepen breeding works, we studied the quick cultivate technology of the Salt-tolerant *Asparagus of ficinalis* and have obtained the success.

**Key words:** *Asparagus of ficinalis*; Tissue culture; Fast reproduction; Salt alkaloid

15 mL 冰箱预冷酶提取液, 少量石英砂, 研磨后转入离心管内。方法 2 按方法 1 提取酶液转入离心管后, 再用 100% 能量的超声波提取。方法 3, 按方法 1 提取酶液转入离心管后, 再用 60% 能量的超声波提取。2 种石蒜依次按照 3 种方法提取好后, 放入超速冷冻离心机 6 000 r/min, 离心 10 min, 后取上清液<sup>[4]</sup>, 贴上标签, 放入冰箱 4℃ 冷藏保存。提取酶液采用聚丙烯酰胺凝胶进行电泳分析, 同时在白色点滴板上进行酶活显色。

1.3.2 电泳 选用 35 齿加样梳, 隔孔加样, 每孔加样量为 25 μL。胶板 1~9 泳道为石蒜酶液, 10~18 泳道为忽地笑酶液, 其中 1~3 和 10~12 为方法 1 提取酶液, 4~6 和 13~15 为方法 2 提取酶液, 7~9 和 16~18 为方法 3 提取酶液。采用不连续垂直板聚丙烯酰胺凝胶电泳。分离胶浓度为 7%, pH 8.9; 浓缩胶浓度为 3%, pH 6.7; 电极缓冲液为 pH 8.3 的 Tris-Gly 缓冲液; 在 4℃ 的条件下进行电泳, 稳压, 最初电压 80 V, 溴酚蓝带进入分离胶后电压加大到 200 V, 当溴酚蓝带至凝胶底部 1 cm 时停

止电泳。

1.3.3 染色 苹果酸脱氢酶(MDH)染色液: A 为 1 mol/L 的碳酸钠和 0.1 mol/L 的 L-苹果酸缓冲液, B 为 0.5 mol/L 的 Tris-HCl 缓冲液(pH 7.1); 将 5 mL A 缓冲液, 7.5 mL B 缓冲液, 25 mg NAD, 15 mg NBT, 2 mg PMS 加入 37.5 mL 双蒸水, 混匀即可<sup>[4]</sup>。酯酶(EST)染色液: 100 mL 浓度为 0.1 mol/L 的 pH 7.2 磷酸盐缓冲液中加入 30 mg EDTA, 60 mg 固蓝 RR 盐, 溶解后将溶于 2 mL 丙酮的 40 mg α-乙酸萘酯逐滴加入。显色前 0.5 h 配制, 过滤后避光保存。取出凝胶, 暗橱内 37℃ 下, 置苹果酸脱氢酶染色液中染色 5~8 min。蒸馏水冲洗后, 再转移至酯酶染色液中染色 25~30 min, 至出现清晰条带为止。

1.3.4 酶活显色 在白色滴定板凹坑内依次加入 2 种石蒜 3 种不同方法提取的酶液各 400 μL, 加两板。一板用于苹果酸脱氢酶显色, 一板用于酯酶显色, 2 种染色液加入量均为 75 μL。

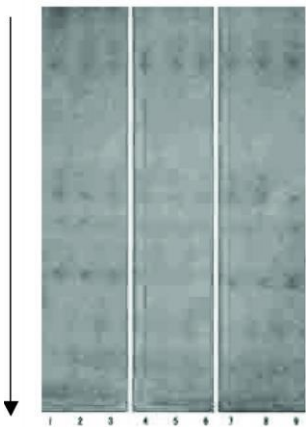


图 1 忽地笑酯酶和苹果酸脱氢酶同工酶谱

注: 图 1 中 1~3 泳道为研磨后以 60% 超声提取酶液电泳谱带; 4~6 泳道为研磨后以 100% 超声提取酶液的谱带; 7~9 泳道为研磨提取酶液的谱带。

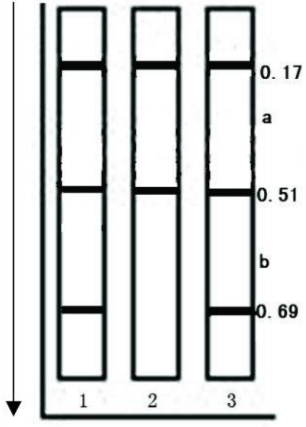


图 2 忽地笑酯酶和苹果酸脱氢酶同工酶谱模式图

注: 图 2 中 a 区为酯酶谱带, b 区为苹果酸脱氢酶谱带; 1 为图 1 中 1~3 泳道谱带模式图; 2 为图 1 中 4~6 泳道谱带模式图; 3 为图 1 中 7~9 泳道谱带模式图。

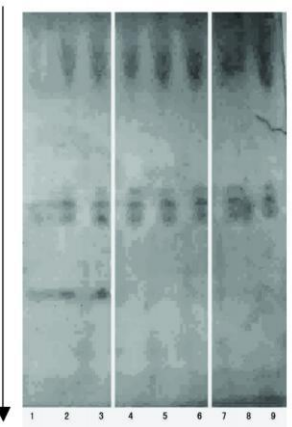


图 3 石蒜酯酶和苹果酸脱氢酶同工酶谱

注: 图 3 中, 1~3 泳道为研磨后以 60% 超声提取酶液电泳谱带; 4~6 泳道为研磨后以 100% 超声提取酶液的谱带; 7~9 泳道为研磨提取酶液的谱带。

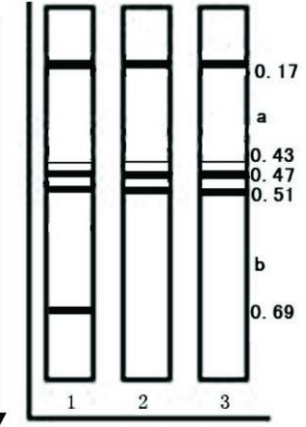


图 4 石蒜酯酶和苹果酸脱氢酶同工酶谱模式图

注: 图 4 中, a 区为酯酶谱带, b 区为苹果酸脱氢酶谱带; 1 为图 3 中 1~3 泳道谱带模式图; 2 为图 3 中 4~6 泳道谱带模式图; 3 为图 3 中 7~9 泳道谱带模式图。

2 结果与分析

2.1 2 种石蒜酯酶和苹果酸脱氢酶同工酶谱

从 2 种石蒜酶谱电泳结果可知, 忽地笑酯酶有 1 条谱带, Rf 为 0.17; 苹果酸脱氢酶有 2 条谱带, Rf 分别为 0.51 和 0.69; 石蒜酯酶有 1 条谱带, Rf 为 0.17; 苹果酸脱氢酶有 4 条谱带, Rf 分别为 0.43、0.47、0.51 和 0.69。综上所述, 石蒜的酶谱谱带较多, 说明在石蒜属内石蒜比忽地笑较进化, 遗传多样性复杂; 谱带染色深, 可能说明在休眠季节(试验于 4~6 月进行)石蒜比忽地笑的

活性强。

同时, 从石蒜酶谱电泳结果可知, 3 种不同的提取方法对酶提取的充分性、活性都有影响: 研磨后经 60% 的超声提取的酶液谱带有 5 条, 但是只经过研磨提取的酶液谱带只有 4 条, 而研磨后经 100% 的超声提取的酶液也没有第 4 条苹果酸脱氢酶酶带。上述结果表明, 研磨后 60% 的超声提取方法能够充分提取酶液并保持酶的活性; 只研磨的提取方法不能充分提取酶液; 而研磨后经 100% 超声的提取方法使部分酶失活。综上所述: 研

磨后,再经 60% 的超声的提取方法对酶能够充分提取,

而且能更好地保持酶的活性。

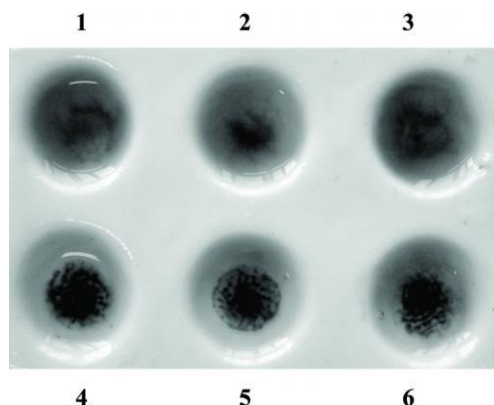


图 5 2 种石蒜苹果酸脱氢酶酶活显色结果

注:图 5、6 中的 1~3 是石蒜的酶液,4~6 是忽地笑的酶液;其中 1 和 4 是研磨提取的酶液,2 和 5 是研磨后经过 100% 超声提取的酶液,3 和 6 是研磨后经过 60% 超声提取的酶液。

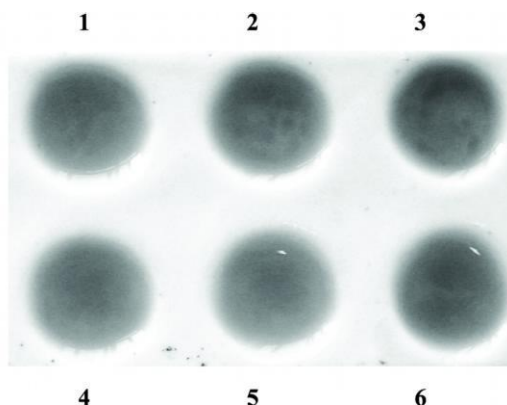


图 6 2 种石蒜酯酶酶活显色结果

## 2.2 白色点滴板酶活显色

从酶活显色结果可知酯酶方法 3 提取的酶液活性最强,此结果和酶谱分析结果一致,共同证实了研磨后再经 60% 的超声对酶能够充分提取,而且能更好地保持酶的活性。苹果酸脱氢酶显示结果无明显差异。

## 3 讨论

该试验中,在对石蒜进行研磨提取时,提取液进行了预冷,由于没有在冰浴下研磨,可能影响了酶的活性;其次由于石蒜正处于休眠期,酶的活性较弱;这两个方面可能是导致酶谱带不很清楚的原因。

试验需注意的事项有以下几点:一是在酶液提取时,研磨一定要充分;二是在分离胶和浓缩胶配置时,注意组分添加顺序;三是在灌胶时一定要缓慢倒入,避免出现气泡;水封时也要缓慢,避免出现坑窝;四是提加样

梳要小心,以免胶隔偏斜,扭曲,断裂。

该试验证实 2 种石蒜中酯酶和苹果酸脱氢酶同工酶谱带存在差异,获得了一种能充分提取酶液保持酶活性的酶液提取方法,希望能为石蒜属的分类和进化及相关研究提供一些参考和依据。

## 参考文献

- [1] 聂刘旺,张定成,张海军,等.安徽产石蒜属植物三种酶同工酶的分析[J].生物学杂志,2000,17(3):19-22.
- [2] 余本祺,周守标,罗琦,等.石蒜属植物的药用和观赏利用前景[J].中国野生植物资源,2006,25(2):29-32.
- [3] 李玉萍,杨军,贡明军,等.石蒜属植物研究进展[J].金陵科技学院学报,2007,23(2):84-86.
- [4] Esbenshade P R, Triantaphyllou A C. Isozyme Phenotypes for the Identification of Meloidogyne Species[J]. The Society of Nematologists, 1990, 22(1): 10-15.

## Analysis of Esterase and Malate Dehydrogenase on Two Different Amaryllis

QIN Gong-wei<sup>1,2</sup>, CAO Xiao-yong<sup>1,2</sup>, ZHAO Hui<sup>1</sup>, WANG Bin<sup>1</sup>

(1. Biological Science and Engineering Dept., Shaanxi University of Technology, Hanzhong, Shanxi 723000, China; 2. Bio-resources Key Lab. of Shaanxi Province, Hanzhong, Shanxi 723000, China)

**Abstract:** In this paper, two kinds of Amaryllis were analyzed based on EST and MDH by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and enzyme reaction color test. The results indicated that the *L. aurea* had one EST band, the relative mobility rates (*R<sub>f</sub>*) was 0.17, two MDH bands, *R<sub>f</sub>* 0.51 and 0.69 respectively. The *L. radidita* had a same EST band, four MDH bands, *R<sub>f</sub>* 0.43, 0.47, 0.51 and 0.69 respectively. Color test showed that three extraction methods had differences; the extraction method of 60% ultrasound after rubbing was the best for extracting the enzyme adequately and activity preferably.

**Key words:** *Lycoris* Herb.; Esterase; Malate dehydrogenase; Isozyme