

# 石蒜不同器官酯酶和苹果酸脱氢酶同工酶酶谱分析

秦公伟<sup>1,2</sup>, 曹小勇<sup>1,2</sup>, 耿敬章<sup>1</sup>, 詹花<sup>1</sup>, 任文娟<sup>1</sup>

(1. 陕西理工学院 生物科学与工程学院, 陕西 汉中 723001; 2. 陕西省资源生物重点实验室 陕西 汉中 723001)

**摘 要:**以石蒜为材料, 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳分析其开花期不同器官(根、鳞茎、花茎、花梗、花瓣、雄蕊和雌蕊)酯酶和苹果酸脱氢酶同工酶酶谱差异。结果表明: 石蒜不同器官酯酶和苹果酸脱氢酶同工酶酶谱有较大的差异, 而位置相近的器官同工酶谱带呈现一定相似性。酯酶和苹果酸脱氢酶的染色顺序对结果有一定影响, 先染酯酶呈现较多酶谱条带。

**关键词:** 石蒜; 器官; 酯酶; 苹果酸脱氢酶; 同工酶

**中图分类号:** S 682.2<sup>+</sup>9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)11-0148-04

石蒜属(*Lycoris* Herb.)植物既是一种药用植物, 又是优良的观赏植物。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<sup>[1-4]</sup>。该属植物的分类鉴定, 学术界颇有争论, 尤其是种内的划分<sup>[5-20]</sup>。迄今为止, 国内外众多学者已对该属植物的形态学<sup>[6-9]</sup>、细胞学<sup>[10-11]</sup>、遗传学<sup>[12-19]</sup>、分子系统学<sup>[20]</sup>和化学亲缘关系学<sup>[21]</sup>方面进行了大量研究工作。同工酶是生物体基因结构差异的外在表现, 在进化过程中有一定的保守性, 其分析可对不同级分类群的植物间进行比较, 为分类和进化的研究提供分子水平的佐证。但有关石蒜同工酶的研究, 国内外仅有少量报道<sup>[12, 17-19]</sup>; 聂刘旺等对安徽产石蒜属 6 种植物 11 个居群的过氧化物酶、酯酶、苹果酸脱氢酶 3 种同工酶进行了分析, 但文中未指明采用何种植物器官<sup>[17-18]</sup>; 秦公伟曾以鳞茎为材料对石蒜和忽地笑的酶谱差异进行了研究<sup>[19]</sup>, 现进一步对石蒜不同器官中酯酶和苹果酸脱氢酶进行同工酶酶谱分析, 探讨同工酶的组织差异, 同时分析酯酶和苹果酸脱氢酶染色顺序对酶谱的影响, 希望为石蒜属植物分类鉴定及相关研究提供一些参考和依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 石蒜(*Lycoris radiata* (L' Herb.)), 汉中市西乡县采挖后种植在陕西理工学院校

园。2008 年 9 月采摘开花期石蒜的不同器官: 鳞茎、根、花瓣、雄蕊、雌蕊、花轴、花梗, 分装标记后贮藏于超低温冰箱。

1.1.2 仪器 KQ 5200DE 超声波清洗机(昆山市超声仪器有限公司)、垂直板电泳仪 DYY-12 型(北京君意东方电泳设备有限公司)、超低温冰箱 3K3D 型(日本 SANYO)、电子天平、冰冻离心机、数码相机。

### 1.2 试验方法

1.2.1 石蒜不同器官酶液提取 酶提取液: (0.05 mol/L Tris-HCl, pH 6.8, 0.8% Triton X-100)取开花期石蒜的不同器官鳞茎(洗净, 去除衰老鳞片), 根(清洗干净), 花瓣、雄蕊、雌蕊, 花茎和花梗, 以 1:5 比例加入酶提取液, 少量石英砂, 研磨后分别转入 7 支离心管内; 经 60% 超声处理 10 min 后, 超速冷冻离心机 4 000 r/min 下离心 10 min, 贴上标签, 放入冰箱-20℃冷冻保存。

1.2.2 电泳与染色 选用 35 齿加样梳, 隔孔加样, 每孔加样量为 25 μL。电泳、苹果酸脱氢酶(MDH)和酯酶(EST)染色<sup>[19, 22]</sup>。

1.2.3 EST 与 MDH 染色顺序对酶谱结果的影响 先将凝胶放置酯酶(EST)染色液中染色 15 ~ 20 min, 蒸馏水冲洗后再转移到苹果酸脱氢酶(MDH)染色液中染色 25 ~ 30 min。然后按照相反的顺序(先染 MDH)重复以上步骤, 考查染色顺序对酶谱结果的影响。

## 2 结果与分析

### 2.1 石蒜不同器官酯酶和苹果酸脱氢酶同工酶酶谱

由图 1 可知, 石蒜鳞茎酯酶有 6 条谱带,  $R_f$  分别为 0.20、0.25、0.31、0.35、0.91、0.95; 苹果酸脱氢酶有 3 条谱带,  $R_f$  分别为 0.40、0.43、0.47。石蒜根酯酶有 7 条谱带,  $R_f$  分别为 0.20、0.25、0.31、0.35、0.68、0.74、0.78; 苹果酸脱氢酶有 3 条谱带,  $R_f$  分别为 0.40、0.43、0.47。石

第一作者简介: 秦公伟(1980-), 男, 硕士, 讲师, 现主要从事植物保护与开发利用工作。

基金项目: 陕西省教育厅科技计划资助项目(07JK206); 陕西理工学院科研资助项目(SLG0629)。

收稿日期: 2010-02-10



蒜花瓣酯酶有 7 条谱带,  $R_f$  分别为 0.20、0.25、0.31、0.35、0.91、0.95、0.99; 苹果酸脱氢酶无谱带。石蒜雄蕊酯酶有 7 条谱带,  $R_f$  分别为 0.20、0.25、0.31、0.35、0.91、0.95、0.99; 苹果酸脱氢酶无谱带。石蒜雌蕊酯酶有 6 条谱带,  $R_f$  分别为 0.20、0.25、0.31、0.35、0.91、0.95; 苹

果酸脱氢酶有 5 条谱带,  $R_f$  分别为 0.40、0.43、0.47、0.56、0.57。石蒜花茎酯酶有 4 条谱带,  $R_f$  分别为 0.20、0.25、0.31、0.35; 苹果酸脱氢酶无谱带。石蒜花梗酯酶有 4 条谱带 0.20、0.25、0.91、0.95; 苹果酸脱氢酶无谱带。

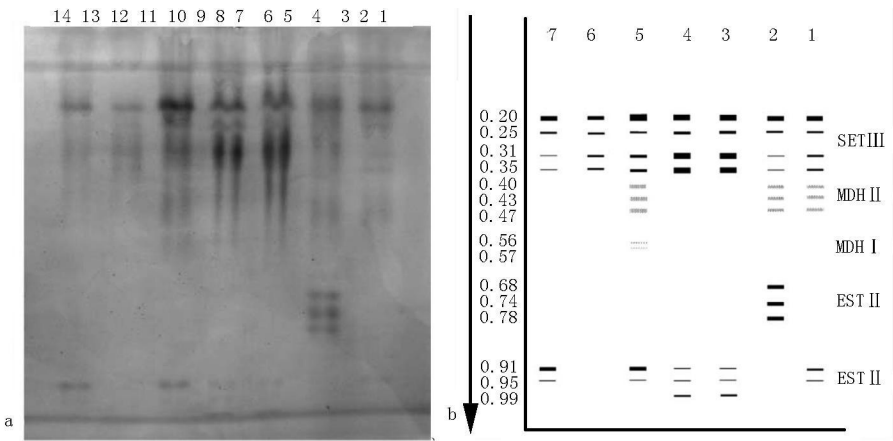


图 1 先染 EST 的石蒜不同器官酯酶和苹果酸脱氢同工酶酶谱(a. 酶谱图; b. 酶谱模式图)

注: 图 1a 中, 1~2 泳道 3~4 泳道 5~6 泳道 7~8 泳道, 9~10 泳道, 11~12 泳道 13~14 泳道 依次分别为石蒜鳞茎提取酶液, 石蒜根提取酶液, 石蒜花瓣提取酶液, 石蒜雄蕊提取酶液, 石蒜雌蕊提取酶液, 石蒜花茎提取酶液, 石蒜花梗提取酶液。图 1b 中, 泳道 1、2、3、4、5、6、7 依次分别为图 2a 中 1~2 泳道 3~4 泳道, 5~6 泳道, 7~8 泳道 9~10 泳道 11~12 泳道 13~14 泳道谱带模式图。

依据同工酶相对迁移率快慢, 将酯酶和苹果酸脱氢酶依次命名为 ESTI、ESTII、ESTIII 和 MDHI、MDHII。ESTIII 即  $R_f$  值为 0.20~0.35 的 4 条谱带, 为石蒜 7 种器官的基本谱带, 只是染色深浅有差异, 反应了共同种的遗传基础。ESTI、ESTII 和 MDHI、MDHII 则只在部分器官表达, 同样存在表达活性的差异。

2.2 石蒜不同器官酯酶和苹果酸脱氢酶同工酶酶谱距离分析

为了对结果进行定量分析, 酶谱的比较采用酶谱距离<sup>[23,25]</sup>作为不同器官差异的数量标准。酶谱距离越小, 说明 2 种器官酯酶基因表达的种类数量越相近。酶谱距离=2 种器官不同酶带数量/2 种器官酶带总数量。从表 1 可知, 7 种器官按酯酶酶谱距离可以分为 4 组: A 组为雄蕊和花瓣, B 组为花梗、雌蕊和鳞茎; C 组为花茎; D 组为根。A 组雄蕊和花瓣之间酶谱距离为 0, 酯酶基因表达种类和数量完全相同; 与 B 组花梗、雌蕊和鳞茎的遗传距离为 0.14, 酯酶基因表达的种类数量相近; 与 C 组和 D 组的遗传距离分别为 0.43、0.60, 酯酶基因表达的种类数量差异较大。B 组花梗、雌蕊和鳞茎之间酶谱距离为 0, 酯酶基因表达种类和数量完全相同; 与 C 组和 D 组的遗传距离分别为 0.33、0.56, 酯酶基因表达的种类数量差异较大。C 组和 D 组的遗传距离为 0.43, 酯酶基因表达的种类数量差异较大。

表 1 石蒜不同器官酯酶酶谱距离

器官	酶谱距离						
	雄蕊	花瓣	花梗	雌蕊	鳞茎	花茎	根
雄蕊	0	0	0.14	0.14	0.14	0.43	0.60
花瓣		0	0.14	0.14	0.14	0.43	0.60
花梗			0	0	0	0.33	0.56
雌蕊				0	0	0.33	0.56
鳞茎					0	0.33	0.56
花茎						0	0.43
根							0

表 2 石蒜不同器官苹果酸脱氢酶酶谱距离

器官	酶谱距离						
	雄蕊	花瓣	花梗	花茎	鳞茎	根	雌蕊
雄蕊	—	—	—	—	1	1	1
花瓣		—	—	—	1	1	1
花梗			—	—	1	1	1
花茎				—	1	1	1
鳞茎					0	0	0.4
根						0	0.4
雌蕊							0

从表 2 可知, 7 种器官按苹果酸脱氢酶酶谱距离可以分为 3 组: A 组为雄蕊、花瓣、花梗和花茎; B 组为鳞茎和根; C 组为雌蕊。A 组雄蕊、花瓣、花梗和花茎 4 种器官无苹果酸脱氢酶谱带, 苹果酸脱氢酶基因无表达; 与 B 组鳞茎和根、C 组雌蕊的遗传距离均为 1, 苹果酸脱氢酶基因表达完全不同。B 组鳞茎和根之间酶谱距离为 0, 苹果酸脱氢酶基因表达种类和数量完全相同; 与 C 组雌蕊的遗传距离为 0.4, 苹果酸脱氢酶基因表达的种类数



量差异较大。

同时,从表1和表2可知,依酯酶酶谱距离、苹果酸脱氢酶酶谱距离,7种器官被划分在不同组群。

### 2.3 酯酶和苹果酸脱氢酶染色顺序对酶谱结果的影响

由图2可知,石蒜鳞茎酯酶有1条谱带, $R_f$ 为0.20;苹果酸脱氢酶有3条谱带, $R_f$ 分别为0.40、0.43、0.47。石蒜根酯酶有4条谱带, $R_f$ 分别为0.20、0.68、0.74、0.78;苹果酸脱氢酶有3条谱带, $R_f$ 分别为0.40、0.43、0.47。石蒜花瓣酯酶有5条谱带, $R_f$ 分别为0.20、0.25、

0.31、0.35、0.99;苹果酸脱氢酶无谱带。石蒜雄蕊酯酶有5条谱带, $R_f$ 分别为0.20、0.25、0.31、0.35、0.99;苹果酸脱氢酶无谱带。石蒜雌蕊酯酶有4条谱带, $R_f$ 分别为0.20、0.25、0.31、0.35;苹果酸脱氢酶有3条谱带, $R_f$ 分别为0.40、0.43、0.47。石蒜花茎酯酶有3条谱带, $R_f$ 分别为0.20、0.31、0.35;苹果酸脱氢酶无谱带。石蒜花梗酯酶有4条谱带0.20、0.40、0.43、0.47;苹果酸脱氢酶无谱带。

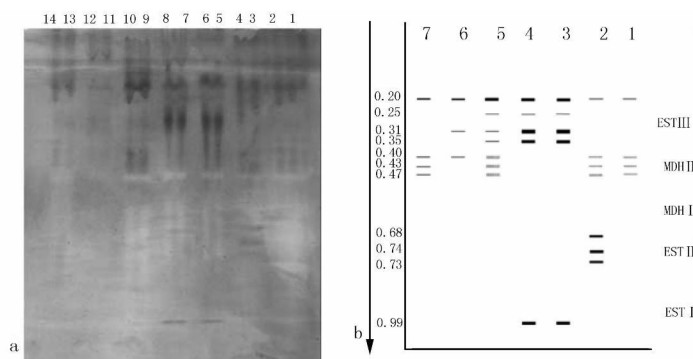


图2 先染MDH的石蒜不同器官酯酶和苹果酸脱氢同工酶酶谱(a.酶谱图,b.酶谱模式图)

从图1和图2中可以看出:石蒜的不同器官同工酶酶谱电泳结果有显著的差异,先染EST的酶谱染色结果中,酯酶和苹果酸脱氢酶的谱带都较清晰,说明酯酶染色对苹果酸脱氢酶的染色基无抑制作用;具体原因尚不清楚,有待进一步研究。

相比较先染EST的酶谱染色结果,先染MDH酯酶的谱带数减少(主要表现在 $R_f$  0.91和 $R_f$  0.95的谱带),且大部分不清晰(石蒜花瓣 $R_f$  0.99的谱带,雄蕊 $R_f$  0.99的谱带例外),所以认为苹果酸脱氢酶染色对酯酶的染色可能有抑制作用。

先染MDH的酶谱染色结果中,MDH谱带不多且不清楚,可能是由于染色时间较短。

### 3 小结与讨论

EST II即 $R_f$ 值为0.20~0.35的4条谱带,为石蒜7种器官基本谱带,反应共同种的遗传基础。EST I、EST II和MDH I、MDH II则只在部分器官表达。石蒜不同器官中酯酶和苹果酸脱氢酶同工酶谱带存在差异,而生命活动中共同完成一段生命过程、位置相近的器官同工酶谱带呈现一定相似性。例如石蒜花瓣和雄蕊的酶谱相同,且活性相同,原因可能是开花期石蒜这2种器官的代谢基本相近,酯酶基因表达的种类和强度相同。如何利用这种关系去调控生长发育进程还有待进一步研究<sup>[26]</sup>。同时在开花期各种花器官(花瓣、雄蕊和雌蕊)酯酶活性较

强,可能是酯酶在这一生命过程中有着重要的作用。苹果酸脱氢酶则只在雌蕊、鳞茎和根中表达,这可能与开花期3种器官中快速的物质能量转变、苹果酸脱氢酶在呼吸作用中的重要作用有关。

石蒜雌蕊、根和鳞茎2种同工酶总条带数依次为11(EST 6条,MDH 5条)、10(EST 7条,MDH 3条)和9(EST 6条,MDH 3条),考虑材料采集难易和材料中同工酶活性,石蒜属植物种类鉴定时可优先选择鳞茎作为试验材料,但其可行性有待进一步研究。

7种器官按酯酶酶谱距离可以分为4组:A组为雄蕊和花瓣、B组为花梗、雌蕊和鳞茎、C组为花茎、D组为根。7种器官按苹果酸脱氢酶酶谱距离可以分为3组:A组为雄蕊、花瓣、花梗和花茎、B组为鳞茎和根、C组为雌蕊。Vaughan J G等、胡志昂等(1983年)、王慧娟(2007年)用酶谱距离分析二类群亲缘关系<sup>[23-25]</sup>,作者用其分析同一植物不同器官基因表达(酶谱)差异,认为是可行的。依酯酶酶谱距离、苹果酸脱氢酶酶谱距离,7种器官被划分在不同组群,分析原因可能是因为各种器官在石蒜开花期这所生成的酯酶和苹果酸脱氢酶的生理作用不同有关。

酯酶染色对苹果酸脱氢酶的染色基本无抑制作用,苹果酸脱氢酶染色对酯酶的染色有较强的抑制作用。该研究结果提示同一张胶片上进行2种以上酶分析染



色顺序可能造成结果差异, 在相关研究中应予以注意。该试验现象在其它植物体是否具有普遍性, 尚不清楚。同工酶分析多是在 1 张胶片上分析 1 种酶<sup>[17,18,27]</sup>, 该试验利用酯酶染色后呈棕色而苹果酸脱氢酶染色后呈蓝色的色泽不同, 在同一胶片上进行 2 种酶的分析节约了试验成本和时间。石蒜属其它种类不同器官的酶谱差异及其各自在分类鉴定中的作用有待进一步研究。

参考文献

[ 1 ] 鲍海鸥, 陈波红. 石蒜属植物资源的开发利用[ J ]. 中国野生植物资源, 2000, 19( 5 ): 31- 32.

[ 2 ] 秦卫华, 周守标, 汪恒英. 等. 石蒜属植物的研究进展[ J ]. 安徽师范大学学报( 自然科学版 ), 2003, 26( 4 ): 385- 389.

[ 3 ] 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.

[ 4 ] 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.

[ 5 ] 谢峻, 谈锋, 冯巍. 等. 石蒜属植物分类鉴别、药用成分及生物技术应用研究进展[ J ]. 中草药, 2007, 38( 12 ): 1902- 1905.

[ 6 ] 任秀芳, 周守标, 郑艳, 等. 中国石蒜属植物花粉形态的研究[ J ]. 云南植物研究, 1995, 17( 2 ): 182- 186.

[ 7 ] 周守标, 余本祺, 罗琦, 等. 石蒜属植物花粉形态及分类研究[ J ]. 园艺学报, 2005, 32( 5 ): 914- 917.

[ 8 ] 罗琦, 余本祺, 秦卫华, 等. 三种黄花石蒜植物的花粉形态比较[ J ]. 生物学杂志, 2006, 23( 6 ): 24- 27.

[ 9 ] 周守标, 罗琦, 李金花. 等. 石蒜属 12 种植物叶片比较解剖学研究[ J ]. 云南植物研究, 2006, 28( 5 ): 473- 480.

[ 10 ] 孙叶根, 郑艳, 张定成. 等. 安徽石蒜属 4 种植物核型研究[ J ]. 广西植物, 1998, 18( 4 ): 363- 367.

[ 11 ] 余本祺, 王影, 周守标, 等. 安徽省中国石蒜的核型研究[ J ]. 皖西学院学报, 2004, 20( 2 ): 30- 32.

[ 12 ] Lee N S, Kim M, Lee B S, et al. Isozyme evidence for the allotriploid origin of *Lycoris of lavesœns*( Amaryllidaceae)[ J ]. Plant Syst Evol, 2001, 227: 227- 234.

[ 13 ] 邓传良, 周坚. 长筒石蒜花被片 DNA 的及 ISSR 体系的建立[ J ]. 江西农业大学学报, 2005, 27( 2 ): 257- 261.

[ 14 ] 邓传良, 周坚, 卢龙斗, 等. 长筒石蒜种质资源的 RAPD 及 ISSR 研究[ J ]. 云南植物研究, 2006, 28( 3 ): 300- 304.

[ 15 ] 邓传良, 李存胜, 周坚, 等. 长筒石蒜种质资源的 ISSR 研究[ J ]. 河南师范大学学报( 自然科学版 ), 2006, 34( 1 ): 98- 101.

[ 16 ] 左慧, 杨志玲, 杨旭, 等. 红花石蒜遗传多样性的 ISSR 分析[ J ]. 林业科学研究, 2008, 21( 6 ): 768- 772.

[ 17 ] 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.

[ 18 ] 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, 2003, 20( 2 ): 27- 29.

[ 19 ] 秦公伟, 曹小勇, 赵慧, 等. 两种石蒜中酯酶和苹果酸脱氢酶酶谱分析[ J ]. 北方园艺, 2009, 197( 2 ): 94- 96.

[ 20 ] 邓传良. 石蒜属植物分支系统学分析[ J ]. 植物研究, 2006, 25( 4 ): 393- 399.

[ 21 ] 袁菊红. 应用 HPLC 图谱进行石蒜属种间关系与分类研究[ J ]. 西北植物学报, 2007, 27( 11 ): 2195- 2201.

[ 22 ] Esbenshade P R, Triantaphyllou A C. Isozyme Phenotypes for the Identification of Meloidogyne Species [ J ]. The Society of Nematologists, 1990, 22( 1 ): 10- 15.

[ 23 ] Vaughan J G. A multidisciplinary study of taxonomy and origin of Brassica crops [ J ]. Bioscience, 1977, 27: 35- 40.

[ 24 ] 胡志昂, 王洪新, 阎龙飞. 裸子植物的生化系统学( 一 ) — 松科植物的过氧化物酶[ J ]. 植物分类学报, 1983, 21( 4 ): 423- 432.

[ 25 ] 王慧娟, 孟月娥, 赵秀山, 等. 碱树过氧化物酶同工酶分析[ J ]. 中国农学通报, 2007, 23( 6 ): 137- 140.

[ 26 ] 曾明, 杨柏云. 同工酶技术在柑桔研究中的应用[ J ]. 江西科学, 2006, 24( 1 ): 100- 104.

[ 27 ] 丁玲, 陈发棣, 房伟民. 菊属 8 个种 27 份材料遗传多样性的同工酶分析[ J ]. 西北植物学报, 2007, 27( 2 ): 249- 256.

[ 28 ] 刘连妹, 王洪涛, 屈海泳. 砵山酥梨果实发育过程中几种酶的谱带和活性变化[ J ]. 植物生理学通讯, 2008, 44( 3 ): 441- 444.

Zymogram of Esterase and Malate Dehydrogenase  
in Different Organs of *Lycoris radiata* (L' Her)Herb.

QIN Gong-wei<sup>1,2</sup>, CAO Xiao-yong<sup>1,2</sup>, GENG Jing-zhang<sup>1</sup>, ZHAN Hua<sup>1</sup>, REN Wen-juan<sup>1</sup>

( 1. School of Biological Science and Engineering Shaanxi University of Technology, Hanzhong Shaanxi 723000; 2. Bioresources Key Laboratory of Shaanxi Province, Hanzhong, Shaanxi 723000)

**Abstract:** When *L. radiata* were flowering, the differences of Esterase(EST)and Malate dehydrogenase(MDH)in its organs (roots, bulbs, scape, pedicel, petals, stamens and pistils)were analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The results showed that the Zymogram of EST and MDH of *L. radiata* had a greater difference in different organs, and which were similarly with each other in adjacent organs. The dyeing sequences of EST and MDH had certain effect on the results; the EST dyed first showed more bands.

**Key words:** *Lycoris radiata* (L' Her)Herb; organs, ; esterase; malate dehydrogenase; isozym