

北马兜铃营养生长期过氧化物酶同工酶分析

孙 睿¹, 邵 红¹, 刘 娟², 王红康¹, 于 洋¹

(1. 佳木斯大学 生命科学学院, 黑龙江 佳木斯 154007; 2. 佳木斯大学 药学院, 黑龙江 佳木斯 154007)

摘 要:用聚丙烯酰胺垂直板凝胶电泳技术对北马兜铃营养生长期根、幼茎、老茎、叶柄、未展开幼叶、展开幼叶和成熟叶的过氧化物酶(POD)同工酶进行了分析。结果表明:北马兜铃营养生长期 7 个组织器官共有 10 条 POD 酶带,其 POD 同工酶具有组织特异性,其中未展开幼叶的 POD 同工酶酶带丰富、活性较强、含量较高,是 POD 同工酶分析最好的材料,而成熟叶片由于 POD 酶种类太少,最不适合作 POD 同工酶分析。

关键词:北马兜铃;营养生长期;过氧化物酶;同工酶

中图分类号:S 567.23;Q 946.5 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2012)16-0088-02

北马兜铃(*Aristolochia contorta* Bunge)为马兜铃科(Aristolochiaceae)多年生攀援、缠绕草质藤本植物^[1-2],主要分布在东北三省、山东、河北、内蒙古、陕西、甘肃等地^[3]。它是我国传统的全草入药植物,药用时果实可用于治疗咳嗽和慢性支气管炎等症;茎和叶入药具有活血、止痛、利尿等奇效;根入药主要用于治疗风湿性关节炎、高血压、咽喉肿痛、牙痛等症^[4-5]。

同工酶分析技术可用于植物生理生态学、遗传学、分类及亲缘关系等方面研究^[6]。其中,过氧化物酶(Peroxidase isozyme, POD)是植物细胞生长和植物体生物发育的重要生化标志。现通过对 POD 同工酶酶谱的分析,以期找出北马兜铃营养生长期过氧化物酶同工酶丰富的器官,为进一步进行北马兜铃生化分类、遗传研究和驯化栽培提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料于 2011 年 6 月取自佳木斯市四丰山,为北马兜铃营养生长期的根、幼茎(茎顶端 1 cm 处)、老茎(茎基 1 cm 处)、叶柄(幼叶叶基 0.5 cm 处)、未展开幼叶、展开幼叶和成熟叶,每个组织器官均从 20 个植株上混合取样,按上述顺序依次标记为 1~7。

1.2 试验方法

将材料洗净后称取 1 g,用 2 mL pH 7.2 的蔗糖磷

酸缓冲液于冰浴下研磨成匀浆,3 800 r/min 离心 15 min,上清液即过氧化物酶同工酶提取液。采用聚丙烯酰胺垂直板凝胶电泳技术,进行过氧化物酶同工酶电泳,浓缩胶浓度 3.5%、pH 6.7,分离胶浓度 7.5%、pH 8.9,电泳液为 pH 8.3 的 Tris-甘氨酸缓冲液,点样量 25 μ L,4 $^{\circ}$ C 恒温、300 V 恒压电泳 1.5~2 h。取出分离胶,采用醋酸-联苯胺染色法,染至酶带清晰后,用流水漂洗数次。测量各酶带的迁移距离,并计算迁移率 Rf 值, Rf 值=过氧化物酶同工酶带迁移距离/溴酚蓝迁移距离^[7-8]。

2 结果与分析

根据酶带染色深浅,将营养生长期北马兜铃的根、茎、叶等各器官 POD 同工酶图谱分为强带、次强带、弱带和痕迹带 4 个级别。由图 1 可知,7 个样品共显现 10 条酶带,为便于分析,从负极到正极分成 A、B、C 三区^[9], A 区 Rf=0~0.30,共显现 4 条酶带,Rf 值分别为 A₁=

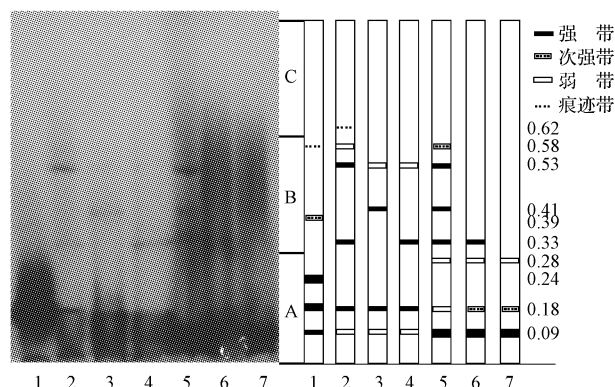


图 1 北马兜铃营养生长期 POD 同工酶谱

Fig. 1 POD isozyme patterns of *Aristolochia contorta* Bunge at vegetative growth phase

第一作者简介:孙睿(1978-),男,在读硕士,讲师,研究方向为植物遗传育种学与植物生物技术。E-mail:sr_sh@163.com.

责任作者:刘娟(1949-),女,本科,教授,硕士生导师,研究方向为生药鉴定及品质评价。E-mail:liujuan1949@163.com.

基金项目:佳木斯大学大学生科技创新资助项目(Dz2011-002)。

收稿日期:2012-04-23

0.09、 $A_2=0.18$ 、 $A_3=0.24$ 、 $A_4=0.28$ ；B区 $R_f=0.30\sim 0.60$ ，共显现5条酶带， R_f 值分别为 $B_1=0.33$ 、 $B_2=0.39$ 、 $B_3=0.41$ 、 $B_4=0.53$ 、 $B_5=0.58$ ；C区 $R_f=0.60\sim 0.90$ ，仅显现1条酶带， R_f 值为 $C=0.62$ 。

从酶带数目和强弱级别综合来看，5号酶带数量最多，共有7条酶带，4条强带，1条次强带，2条弱带。2号酶带数量较多，共6条，3条强带，2条弱带，1条痕迹带。1号酶带数量为5条，3条强带，1条次强带，1条痕迹带。3、4、6号酶带数量一致，均为4条，但POD酶种类和酶带级别各有不同，其中3号和4号均有2条强带，2条弱带；6号有2条强带，1条次强带，1条弱带。7号酶带数量最少，仅有3条，强带、次强带和弱带各1条。

3 结论

在植物细胞内，POD酶充当了活性氧的防御屏障，能有效地清除活性氧，减弱甚至消除活性氧对植物的危害^[10]。7个样品的电泳图谱中均含有 A_1 和 A_2 2条酶带，它们在多数组织器官中活性强，一定是北马兜铃营养生长过程中必不可少的酶，或者说是北马兜铃营养生长的特征性酶带，尤其是 A_1 酶带在5号未展开幼叶、6号展开幼叶和7号成熟叶的酶谱中酶带较宽，表明这种POD酶在这叶片中含量较高。1号根的酶谱中有 A_3 和 B_2 两种酶是该器官中特有的酶，5号未展开幼叶、6号展开幼叶和7号成熟叶的酶谱中有 A_4 酶带是叶中特有的酶，而2号幼茎、3号老茎和4号幼叶叶柄的酶谱很相似，尤其是2号幼茎和4号幼叶叶柄的酶谱更接近，这表明形态、结构、生理功能不同的器官，POD同工酶种类和含量也明显不同，具有组织特异性。在叶片中，随着成熟度的提高，酶带数量呈现递减趋势， B_3 、 B_4 和 B_5 这几条酶带在6号展开幼叶和7号成熟叶中均不存在，它们的颜色深、活性强，在5号未展开幼叶中出现具有重要

意义。

该研究对北马兜铃营养生长期多种组织器官POD同工酶分析发现，不同组织器官的POD同工酶酶带数目、活性强弱、含量多少均有较大差别，表现出明显的组织特异性。仅从酶带数目上来看，未展开幼叶>幼茎>根>老茎、幼叶叶柄、展开幼叶>成熟叶片，这与丁玲等^[11]对菊花酶带数目的研究结果基本一致。

该试验表明，在北马兜铃营养生长期，未展开幼叶的POD同工酶酶带丰富、活性较强、含量较高，是POD同工酶分析最好的材料，而成熟叶片由于POD酶种类太少，最不适合POD同工酶分析的材料。

参考文献

- [1] 冯毓秀,林寿全,张秀琴. 国产马兜铃属的植物和生药研究:资源利用[J]. 药学学报,1983,18(4):291-298.
- [2] 中国科学院植物研究所. 中国高等植物图鉴(第一册)[M]. 北京:科学出版社,1972:548.
- [3] 李俊. 国产马兜铃科(Aristolochiaceae)植物比较形态学研究[D]. 西安:陕西师范大学,2008.
- [4] 程汝凤. 青木香及其混淆品的鉴别[J]. 基层中药杂志,1996,10(3):12.
- [5] 王智民. 现代中药的化学研究方法[J]. 中国中药杂志,2000,25(2):70.
- [6] 张海平,房伟民,陈发棣,等. 睡莲不同器官和不同生长阶段的过氧化物酶和酯酶同工酶比较[J]. 浙江林学院学报,2010,27(2):246-250.
- [7] 徐秀芳,张海洋,张丽敏. 不同榛树叶中过氧化物酶同工酶的研究[J]. 林业科技,2005,30(2):1-3.
- [8] 刘金龙,孙东发. “恩五叶蜜”绞股蓝过氧化氢同工酶研究[J]. 时珍国医国药,2006,17(10):7891-7891.
- [9] 邵红,李秀霞,李修平,等. 杂交榛抗寒变异愈伤组织的选择[J]. 林业科技,2011,36(4):8-10.
- [10] 徐金星,刘忠民,刘翠明. 大豆品种接种SMV叶片POD同工酶的研究[J]. 东北农业大学学报,2000,31(1):20-25.
- [11] 丁玲,陈发棣,滕年军,等. 菊花不同生长阶段不同器官POD和EST同工酶比较[J]. 西北植物学报,2007,27(10):2029-2034.

Study on POD Isoenzymes of *Aristolochia contorta* Bunge at Vegetative Growth Phase

SUN Rui¹, SHAO Hong¹, LIU Juan², WANG Hong-kang¹, YU Yang¹

(1. College of Life Science, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154007; 2. College of Pharmacy, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154007)

Abstract: The POD enzymes from root, tender stem, old stem, petiole, unexpanded tender leaf, expanded tender leaf and mature leaf of *Aristolochia contorta* Bunge at vegetative growth phase were analyzed by vertical polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The results showed that 10 bands of POD isoenzymes from 7 different tissues and organs of *Aristolochia contorta* Bunge at vegetative growth phase were expressed and POD isoenzymes had a tissue specificity. Unexpanded tender leaf which had abundant enzyme bands, stronger activity and higher content were the good materials for analysis on POD isoenzyme. There were the fewest enzyme bands in mature leaf, so it was not fit for analysis on POD isoenzyme.

Key words: *Aristolochia contorta* Bunge; vegetative growth phase; POD; isoenzyme