

文章编号: 1000-5862(2013)06-0617-04

木通属植物的同工酶研究

黄佩蓓, 陈世华*, 王 飞

(江西中医药大学基础医学院, 江西 南昌 330004)

摘要: 以3种药用木通属植物为研究对象, 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术, 对其进行同工酶的比较研究。结果表明: 3种木通的POD以及SOD同工酶酶谱分别具有一些共有带, 但酶带数量与活性强度有差异; 木通与三叶木通及白木通酶谱差异较大, 亲缘关系较远; 三叶木通与白木通酶谱差异较小, 亲缘关系较近。此与形态方面的分类相一致。

关键词: 木通属; 同工酶; 相似系数

中图分类号: S 567.19

文献标志码: A

0 引言

木通属(*Akebia*)是木通科(*Lardizabalaceae*)的落叶或半常绿藤本植物, 全世界共有4种, 我国有3种和2个变种^[1], 其中3种: 木通(*Akebia quinata* (Thunb.) Decne.)、三叶木通(*Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz.)及其变种白木通(*Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz. var. *Australis* (Diels))为《中华人民共和国药典》2005版规定的正品“木通”来源, 是“龙胆泻肝丸”等30余种经典中成药的主要原料。现代药理学研究证明其不仅具有清热利尿、活血通脉、理气止痛、舒肝益肾、抗菌消炎的药用价值, 还有降压、抗肿瘤、抗衰老等作用^[2-3]。

同工酶是基因表达的产物, 同工酶酶谱差异主要来源于基因差异。同工酶酶谱差异大小可以确定物种间的亲缘关系, 酶谱差异越小, 亲缘关系越近, 反之越远^[4]。同工酶与植物体内许多生理代谢活动有关, 进行植物的同工酶分析不仅可以了解其遗传差异, 还可以很好地了解其生理活动状态。同时, 同工酶分析方法简便快速, 结果准确, 并具有良好的重现性和稳定性, 实验成本低廉, 应用性强^[5-7]。目前, 木通属植物的同工酶研究报道不多^[8], 木通、三叶木通和白木通3种药用木通属植物的同工酶比较研究未见报道。本文以木通、三叶木通和白木通为材料, 对其过氧化物同工酶(POD)、超氧化物歧化酶同工酶(SOD)进行比较研究, 探讨其酶谱特征及亲

缘关系, 以期为生理生化研究和资源开发利用提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

木通、三叶木通、白木通新鲜叶片, 同时采集于江西中医学院神农园, 均由江西中医学院赖学文教授鉴定。

1.2 方法

1.2.1 POD同工酶电泳 (i) 样品制备 分别称取木通、三叶木通、白木通3种样品的新鲜叶片0.5 g, 除叶柄剪碎置于研钵中, 加入1 mL 4℃预冷的电极缓冲液(pH值为8.3), 在冰浴上研磨成匀浆, 再加缓冲液2 mL, 冰浴中放置30 min后, 在高速冷冻离心机下以10 000 r/min离心10 min, 取上清液, 分别加入等体积的40%蔗糖溶液, 摇匀, 置冰箱冷藏备用。

(ii) 电泳与染色 采用4.0%浓缩胶与7.5%分离胶制备凝胶板。采用抗坏血酸-联苯胺染色法4 mL联苯胺贮液+18 mL H₂O+2滴H₂O₂染色, 常温下染色3 min左右, 水冲洗后照相。结果见图1和图2。

1.2.2 SOD同工酶电泳 (i) 样品制备 分别称取木通、三叶木通、白木通3种样品的新鲜叶片0.5 g, 除叶柄剪碎置于研钵中, 加入1 mL 4℃预冷的磷酸缓冲液(pH值为7.8), 在冰浴上研磨成匀

收稿日期: 2013-09-16

基金项目: 江西省科技厅科技计划(2009BSB0940)资助项目。

通信作者: 陈世华(1964-), 男, 江西南昌人, 副教授, 主要从事运动生化研究。

浆,再加缓冲液 4 mL,冰浴中放置 30 min 后,在高速冷冻离心机下以 8 000 r/min 离心 10 min,取上清液,分别加入等体积的 40% 蔗糖溶液,摇匀,置冰箱冷藏备用.

(ii) 电泳与染色 采用 4.0% 浓缩胶与 10.0% 分离胶制备凝胶板.采用负染色法,胶板避光浸泡于 50 mL 0.05 mol · L⁻¹ pH 值为 7.8 的磷酸缓冲液(含氯化硝基四氮唑蓝 25 mg) 中 20 min 后转入磷酸缓冲液(含 0.01% 核黄素) 中继续避光浸泡 15 min,转入磷酸缓冲液(含 1 mmol · L⁻¹ 乙二醇四乙酸二钠) 中光照 5 min,至蓝色背景上出现透明条带.结果见图 3 和图 4.

1.2.3 数据处理 相对迁移率 R_f = 酶带迁移距离/溴酚蓝迁移距离.酶谱间的相似系数 $c = 2w/(a+b)$,其中 a 、 b 、 w 分别代表种 a 酶谱的酶带数、种 b 酶谱的酶带数和 a 、 b 2 个种相同的酶带数.

2 结果与分析

2.1 POD 同工酶

从图 1 及表 1 可以看出 3 种木通的 POD 同工

酶酶带数量、酶带强弱和迁移距离有差异.木通出现 10 条酶带,其迁移率为 0.09 ~ 0.39,其中 R_f 值为 0.25、0.30、0.32 的谱带活性最强,色深、稳定,染色时最先出现,其次为 R_f 值为 0.17、0.18、0.23 的谱带;三叶木通出现 8 条谱带,其迁移率为 0.17 ~ 0.39,其中 R_f 值为 0.23 的谱带活性最强,色深,染色时最早出现,其次为 R_f 值为 0.22、0.25、0.30、0.32 的谱带;白木通出现 9 条谱带,其迁移率为 0.17 ~ 0.39,其中 R_f 值为 0.25、0.30、0.32 的谱带活性最强,色较深,其次为 R_f 值为 0.22、0.23 的谱带;木通、三叶木通与白木通有 6 条共有谱带, R_f 值为 0.17、0.23、0.25、0.30、0.32、0.39;三叶木通和白木通有 8 条共有谱带, R_f 值为 0.17、0.22、0.23、0.25、0.30、0.32、0.37、0.39.由表 2 可以看出 3 种木通的相似系数为 0.631 6 ~ 0.941 2,木通和白木通的相似系数最小为 0.631 6,其次是三叶木通为 0.666 7,最大的是三叶木通和白木通为 0.941 0.此结果表明,木通与三叶木通的酶谱差异较大,说明其亲缘关系较远;三叶木通及白木通酶谱差异很小,说明其亲缘关系非常近.

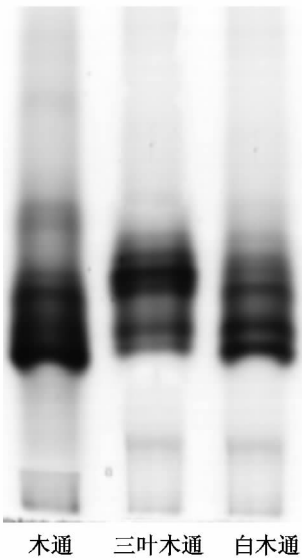


图1 POD 同工酶电泳图谱

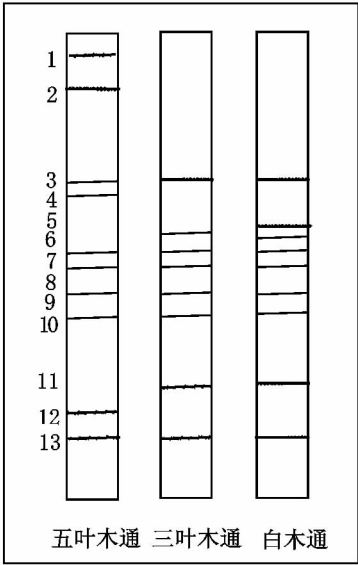


图2 POD 同工酶电泳模式图

表 1 3 种木通 POD 同工酶谱带的相对迁移率

物种	部位	谱带的相对迁移率 R_f												
		1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13
木通	叶	0.09	0.11	0.17	0.18	-	-	0.23	0.25	0.30	0.32	-	0.38	0.39
三叶木通	叶	-	-	0.17	-	-	0.22	0.23	0.25	0.30	0.32	0.37	-	0.39
白木通	叶	-	-	0.17	-	0.21	0.22	0.23	0.25	0.30	0.32	0.37		0.39

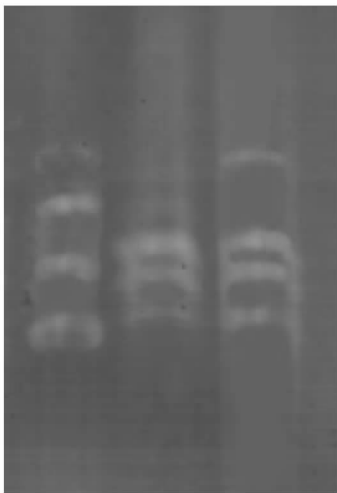
表 2 3 种木通的 POD 同工酶酶谱相似系数

品种	木通	三叶木通	白木通
木通	1.000 0		
三叶木通	0.666 7	1.000 0	
白木通	0.631 6	0.941 2	1.000 0

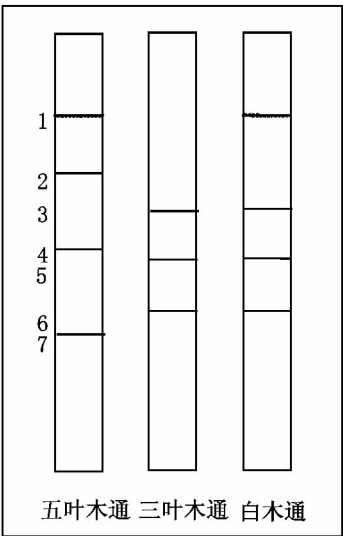
2.2 SOD 同工酶

从图 3 及表 3 可以看出 3 种木通的 SOD 同工酶酶带数量、酶带强弱和迁移距离有一定差异. 木通出现 4 条酶带,其迁移率为 0.39 ~ 0.61,其中 R_f 值为 0.43、0.50、0.61 的谱带活性强,色深、带宽;三叶木通出现 3 条谱带,其迁移率为 0.47 ~ 0.56,其中 R_f 值为 0.47、0.52、0.56 的谱带活性强,色深、带宽;

白木通出现 4 条谱带,其迁移率为 0.39 ~ 0.56,其中 R_f 值为 0.47、0.52、0.56 的谱带活性强,色深、带宽; R_f 值为 0.39 的谱带为木通与白木通的共有谱带,且活性较弱,色浅; R_f 值为 0.47、0.52、0.56 的谱带为三叶木通及白木通的共有谱带;木通与三叶木通无共有谱带. 由表 4 可以看出 3 种木通的相似系数为 0 ~ 0.857 0,木通和三叶木通的相似系数最小为 0,其次是白木通为 0.250 0,最大的是三叶木通和白木通为 0.857 1. 此结果表明,木通与三叶木通的遗传差异较大,说明其亲缘关系较远;三叶木通及白木通遗传差异很小,说明其亲缘关系很近.



木通 三叶木通 白木通



五叶木通 三叶木通 白木通

图 3 SOD 同工酶电泳图谱

图 4 SOD 同工酶电泳模式图

表 3 3 种木通 SOD 同工酶谱带的相对迁移率

物种	部位	谱带的相对迁移率 R_f						
		1	2	3	4	5	6	7
木通	叶	0.39	0.43	—	0.50	—	—	0.61
三叶木通	叶	—	—	0.47	—	0.52	0.56	—
白木通	叶	0.39	—	0.47	—	0.52	0.56	—

表 4 3 种木通 SOD 同工酶酶谱相似系数

品种	木通	三叶木通	白木通
木通	1.000 0		
三叶木通	0	1.000 0	
白木通	0.250 0	0.857 1	1.000 0

以及 SOD 同工酶酶谱分别具有一些共有带,但酶带数量与活性强度有差异,此可作为 3 种木通种源鉴定的生化指标之一. 另外,从 2 种同工酶酶谱比较分析可以看出:木通与三叶木通及白木通的酶谱差异大,亲缘关系较远;三叶木通与白木通酶谱差异小,亲缘关系很近,此与基于传统形态方面的分类相一致.

3 小结

从同工酶酶谱结果可以看出:3 种木通的 POD

4 参考文献

- [1] 中国植物志编辑委员会. 中国植物志 [M]. 拍卷. 北京: 科学出版社 2001.
- [2] 中国医学科学院药物研究所. 中药志(Ⅲ) [M]. 北京: 人民卫生出版社 1984.
- [3] 高黎明, 何仰清, 魏小梅, 等. 木通属植物化学成分及药理活性研究进展 [J]. 西北师范大学学报: 自然科学版 2004 40(1): 108-114.
- [4] 章丽平, 周自玮. 同工酶与植物亲缘关系 [J]. 云南农业大学学报 2006 21(4): 531-533.
- [5] 李学强, 李秀珍, 王祥. 5 种樱桃属植物的 POD、CAT 和 SOD 同工酶分析 [J]. 生物学通报 2010 45(2): 46-49.
- [6] 袁带秀, 袁志忠, 刘世彪, 等. 绞股蓝属 3 种植物的 POD、EST 和 SOD 同工酶研究 [J]. 中国野生植物资源 2012 31(1): 39-40.
- [7] 姜山, 余治锦, 兰世超. 小立碗蕨-灰霉菌互作过程中活性氧代谢及病程相关蛋白 1 转录表达的变化 [J]. 江西师范大学学报: 自然科学版 2013 37(4): 351-354.
- [8] 黄佩蓓, 曹岚, 彭海琳, 等. 三叶木通可溶性蛋白及同工酶分析 [J]. 江西中医学院学报 2009 21(5): 45-46.

The Study on Isozyme Analysis of Three *Akebia Decne* Species

HUANG Pei-bei, CHEN Shi-hua*, WANG Fei

(School of Basic Medical Sciences, Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Jiangxi Nanchang 330004, China)

Abstract: A comparative study on isoenzymes of peroxidase (POD) and superoxide dismutase (SOD) among three species of *Akebia quinata* (Thunb.) Decne., *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz., *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz. var. *Australis* (Diels) Rehd. was made by means of polyacrylamide gel electrophoresis. The results showed that the POD and SOD isozyme zymogram of the three *Akebia Decne* species presented some common enzyme bands respectively, but there were differences between the enzyme band number and activity intensity. The difference in enzyme zymogram between *Akebia quinata* (Thunb.) Koidz. and *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz. was big. *Akebia quinata* (Thunb.) Koidz. had a distant relationship to *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz. The difference in enzyme zymogram between *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz. and *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz. var. *Australis* (Diels) Rehd. was small. *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz. had closer relationship to *Akebia trifoliata* (Thunb.) Koidz. var. *Australis* (Diels) Rehd. This is consistent with the traditional morphological classification.

Key words: *Akebia Decne*; isozyme; similarity coefficient

(责任编辑: 刘显亮)