

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

谢小群, 高山林

(中国药科大学, 江苏 南京 210038)

摘要: 对黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi)二倍体和同源四倍体过氧化物酶进行了同工酶电泳分析及抗坏血酸过氧化物酶活性测定。结果表明:黄芩二倍体与同源四倍体过氧化物酶同工酶谱一致,但后者的着色程度大于前者,二年生黄芩叶子在快速区 R_f 为0.494和0.512处出现新的谱带。不同发育阶段和不同组织器官的谱带存在明显差异;根和叶中谱带数最多,花其次,种子最少;试管苗谱带数先减少后增加,并在整个培养过程中出现特征性谱带C。各组织器官抗坏血酸过氧化物酶总活力差异明显,顶芽最高,叶子次之,花最低。黄芩一年生和二年生各个多倍体株系叶子抗坏血酸过氧化物酶总活力均高于二倍体叶子抗坏血酸过氧化物酶总活力。试管苗生长过程中抗坏血酸过氧化物酶总活力的变化与生长趋势一致,表明该酶与植株生长发育紧密相关。

关键词: 黄芩;同源四倍体;过氧化物酶同工酶;抗坏血酸过氧化物酶

中图分类号: S567.23⁺9; Q554⁺.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2002)01-0005-04

The analysis of peroxidase isoenzyme electrophoresis and activity of ascorbate peroxidase (ASP) in *Scutellaria baicalensis* Georgi XIE Xiao-qun, GAO Shan-lin (China Pharmaceutical University, Nanjing 210038, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2002, 11(1): 5-8

Abstract: In this paper, peroxidase isoenzymes in both diploid and autotetraploid lines of *Scutellaria baicalensis* Georgi were analyzed through electrophoresis, and the activity of ASP was also determined. The results indicated that: the peroxidase isoenzyme spectrums of diploid lines of *Scutellaria baicalensis* were as same as those of autotetraploid lines, but the color of the latter were darker than the former, new spectrums with the R_f value of 0.494 and 0.512 appeared in the rapidly-running zone in the leaves of *Scutellaria baicalensis* of two-year growth-phase. The peroxidase isoenzymes in different growth-phase tissues and organs varied obviously; the spectrum number was the most in roots and leaves, the second in flowers, the least in seeds; the spectrum number in tissue-cultured plantlets decreased firstly but increased during the later growth stage. A specific spectrum C existed throughout the whole period. The total activity of ASP in different tissues and organs varied remarkably with the highest in buds, the second in leaves, the least in flowers. The total activity of ASP in the leaves of *Scutellaria baicalensis* Georgi tetraploid lines of one-year and two-year growth-phase were higher than that of diploid lines at the same phases. During the tissue culture period, the activity curve of ASP corresponded to the growth curve of *Scutellaria baicalensis*, which indicated ASP was closely related to the growth of *Scutellaria baicalensis*.

Key words: *Scutellaria baicalensis* Georgi; autotetraploid; peroxidase isoenzyme; ascorbate peroxidase

中药黄芩是唇形科植物黄芩(*Scutellaria baicalensis* Georgi)的干燥根,具有清热燥湿,泻火解毒,安胎止血的功效。中国药科大学遗传育种教研室通过组织培养人工诱导获得30多个黄芩同源四倍体株系,并已生根移栽^[1],进入田间试验阶段。据报道,在黄芩体内过氧化物酶能够催化黄芩有效成分黄芩甙与过氧化氢反应生成黄芩素^[2,3],因而与黄芩次生代谢产物的生成积累密切相关。此外,过氧化物酶还可以清除脂类氢过氧化物,减轻有机氢过

氧化物对机体的损伤,防御活性氧等自由基对细胞膜的损伤,有一定的抗衰老作用^[4]。本文对黄芩二倍体和同源四倍体1~2年生试管苗各发育阶段的不同部位进行过氧化物酶同工酶谱分析及抗坏血酸过氧化物酶活性测定。以探讨过氧化物酶与生长

收稿日期: 2001-11-13

作者简介: 谢小群(1977-),男,湖南衡阳人,在读硕士研究生,主要从事药用植物生物技术研究。

发育及次生代谢产物积累的关系,从生理机制角度探讨二倍体和四倍体生长代谢的差异,为黄芩的高效快速育种提供理论指导。

1 材料与方 法

1.1 材 料

黄芩种子购自河北省承德医药公司,经中国药科大学余伯阳教授鉴定为 *Scutellaria baicalensis* Georgi。种子经无菌萌发,愈伤组织诱导,秋水仙素处理得四倍体黄芩,所有四倍体株系均经二次以上根尖染色体鉴定^[1]。各个四倍体株系在繁殖培养基上获得试管苗,并生根移栽于苗床[V(珍珠岩):V(煤渣)=3:1],一个月后从苗床移出,栽于中国药科大学东大门试验田。各部位材料均取自田间栽培的二倍体和四倍体株系以及组培的试管苗,现采用。所用化学试剂均为分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 取样方法 黄芩田间苗各个株系:随机采集10株苗的成熟叶和主根备用。

二倍体黄芩试管苗:从5只培养瓶(每瓶试管苗20株)中随机取适量试管苗备用。

1.2.2 粗酶液的制备 称取1g新鲜材料,于冰箱中放置约1h,加5mL预先冷冻的酶提取液(65mmol/L PBS, pH 7.8),于冰浴中充分研磨,4℃下4000 r/min离心10 min,取上清液置冰箱中保存备用。

1.2.3 过氧化物酶同工酶电泳 采用聚丙烯酰胺垂直板凝胶电泳技术,凝胶制备按文献[5]方法。分离胶浓度为7.5%,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30 μ L,电泳初始电流为12 mA,待进入分离胶时为24 mA,此后恒流电泳至溴酚蓝指示剂距离底部1.5 cm处停止电泳,整个电泳过程约需2.5 h。染色液组成为:抗坏血酸70.4 mg,联苯胺母液(取2g联苯胺溶于文火加热的冰醋酸18 mL中,再加入蒸馏水定容为100 mL)20 mL,0.6%过氧化氢20 mL,蒸馏水60 mL。凝胶取出后用蒸馏水洗涤2~3次后在15 cm培养皿中加染色液染色5~10 min,弃去染色液,拍照后加7%冰醋酸固定保存。

1.2.4 抗坏血酸过氧化物酶活性测定 参照Mishra^[6]和沈文飏^[7]的方法并略加修改,3 mL反应

液中含50 mmol/L PBS(pH 7.8),0.1 mmol/L EDTA,0.1 mmol/L H₂O₂和0.5 mmol/L 抗坏血酸(AsA),最后加入适量粗酶液在室温下测定30 s内290 nm处吸收度的变化。以每分氧化1 μ mol AsA的酶量为一个酶活单位。

2 结果与分析

2.1 过氧化物酶同工酶

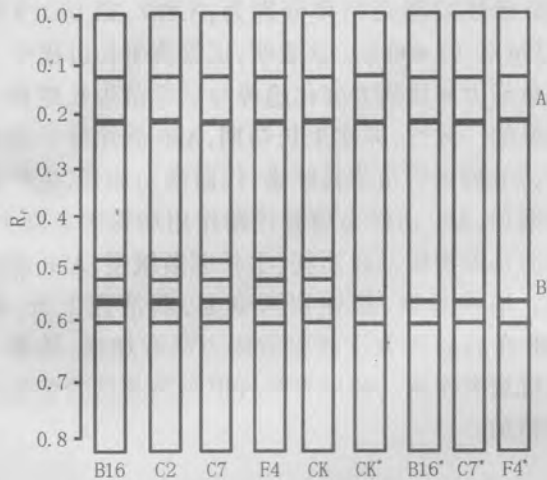
2.1.1 黄芩一年生和二年生植株叶中过氧化物酶同工酶比较 一年生和二年生植株叶过氧化物酶同工酶电泳分析结果见图1。可以看出,黄芩叶过氧化物酶大致可分为二大酶区:A区(慢速区)和B区(快速区)。一年生和二年生二倍体(对照株系CK)与同龄多倍体株系叶过氧化物酶(酶谱)谱带均相同,但是酶带着色程度不同,四倍体谱带着色程度大于二倍体,这可能是因为同源四倍体系二倍体经秋水仙素处理染色体加倍获得,染色体加倍后,基因得以增效,导致四倍体植株叶中过氧化物酶的活性也有所提高。从图1还可看到,一年生黄芩和二年生黄芩酶谱明显不同,二年生黄芩在B区R_f为0.494和0.512处出现新的谱带,说明二年生黄芩代谢比一年生旺盛,预示二年生黄芩有较高的化学成分产生和积累。

2.1.2 黄芩一年生和二年生植株根部过氧化物酶同工酶比较 黄芩一年生和二年生植株根部过氧化物酶同工酶的分析结果见图2。可以看出,一年生和二年生多倍体黄芩根部过氧化物酶酶谱与二倍体根部酶谱基本一致。黄芩二年生植株根过氧化物酶谱带与叶的谱带相比较,B区R_f为0.494和0.512处二条谱带均消失,表明该同工酶仅在二年生植株叶中表现出酶活性。推测该同工酶在促进二年生植株生长和次生代谢产物的合成过程中有重要作用,然后将次生代谢产物运输到根部贮藏,而不是在根部合成,因此根部并不显示该同工酶活性。

2.1.3 黄芩不同部位过氧化物酶同工酶比较 二倍体黄芩不同组织器官过氧化物酶同工酶的分析结果见图3。可以看出,黄芩不同部位过氧化物酶的谱带不同,种子和花的谱带最少,顶芽较多,根部最多且着色也最深,可见过氧化物酶存在着明显的组织器官特异性。种子此时处于休眠阶段,各种代谢活动基本处于停止状态,过氧化物酶活性低,大部分

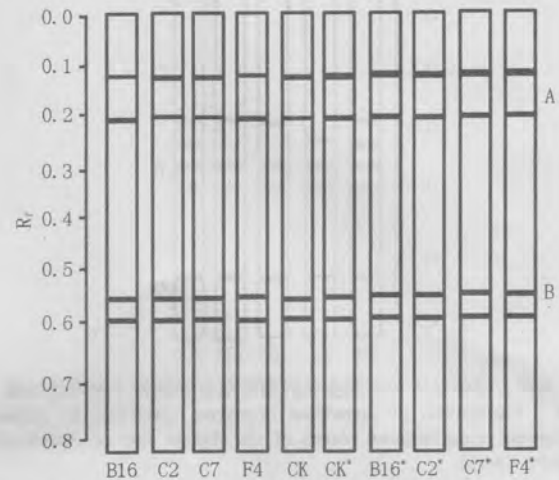
过氧化物酶的同工酶基因都不表达,因而过氧化物酶的谱带最少。花中谱带很少可能与过氧化物酶很少参与花的发育调控有关。叶和根分别是产物合成

和贮藏的主要器官,代谢活动相对比较活跃,因而谱带数目也比较多。



加*为一年生植株,未加*为二年生植株,CK为二倍体株系;B16, C2, C7, F4均为四倍体株系,线条粗细表示着色深浅
“*” indicate 1-yr-old plants, others without “*” are 2-yr-old plants, CK is the diploid line; B16, C2, C7 and F4 are autotetraploid lines, The darkness of each ladder indicates the dying extent

图 1 黄芩一年生和二年生植株叶过氧化物酶同工酶谱模式图
Fig. 1 Peroxidase isoenzyme spectrums in leaves of 1-yr-old and 2-yr-old *Scutellaria baicalensis* Georgi plants



加*为一年生植株,未加*为二年生植株,CK为二倍体株系;B16, C2, C7, F4均为四倍体株系,线条粗细表示着色深浅
“*” indicate 1-yr-old plants, others without “*” are 2-yr-old plants, CK is the diploid line; B16, C2, C7 and F4 are autotetraploid lines, The darkness of each ladder indicates the dying extent

图 2 黄芩一年生和二年生植株根部过氧化物酶同工酶比较
Fig. 2 Comparison of peroxidase isoenzyme spectrums of roots of 1-yr-old and 2-yr-old *Scutellaria baicalensis* Georgi plants

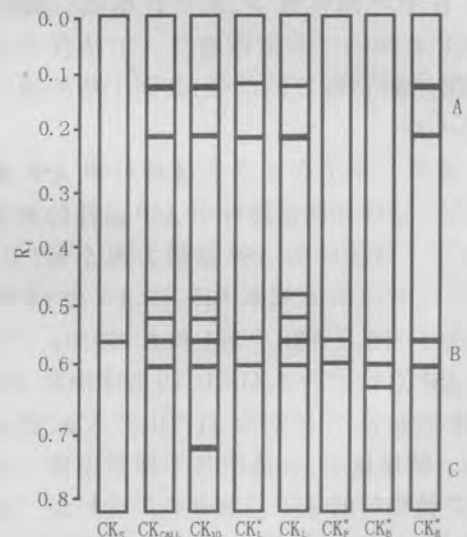
2.1.4 黄芩试管苗不同生长时期过氧化物酶同工酶比较 黄芩二倍体试管苗不同时期过氧化物酶同工酶的分析结果见图 4。可以看出,培养初期继代培养材料仍保持原有材料的大部分酶带,随即少数酶带消失,至生长旺盛期(7~15 d)酶谱带数逐渐增多,在生长后期,各谱带数目基本不变,但是着色加深,活性上升,说明生长旺盛期后期各种代谢渐趋加强。从整个酶谱来看,试管苗在快速区出现一条特征性谱带 C,该谱带在其他各组织器官或大田植株的各个部位过氧化物酶酶谱中均未出现,这可能因为在繁殖培养基中外源激素诱导或激活某些过氧化物酶活性引起的。

2.2 抗坏血酸过氧化物酶(ASP)的活性

黄芩不同年龄、不同部位及试管苗 ASP 活性测定结果如下:

2.2.1 一年生黄芩不同组织器官 ASP 活性比较

黄芩一年生植株种子、花瓣、顶芽、叶和根中 ASP 活性的测定结果表明,不同部位、不同组织 ASP 活性差异显著,总活力分别为:1.758、1.660、6.996、5.937 和 2.907 U。总活力顺序依次为:顶芽 > 叶 > 根 > 种子



CK_S、CK_{CALL}、CK₁₀、CK_L*、CK_L、CK_F*、CK_B* 和 CK_R* 分别表示黄芩种子、30 d 生长期的愈伤组织、10 d 的试管苗、一年生黄芩叶、二年生黄芩叶、一年生黄芩的花瓣、一年生黄芩的顶芽和一年生黄芩的根
CK_S, CK_{CALL}, CK₁₀, CK_L*, CK_L, CK_F*, CK_B* and CK_R* respectively denote the seeds, callus of 30-day growth-phase, shoots of 10-day growth-phase, leaves of one-year growth-phase, leaves of two-year growth-phase, flowers of one-year growth-phase, buds of one-year growth-phase, roots of one-year growth-phase

图 3 黄芩二倍体不同组织器官过氧化物酶同工酶谱的比较
Fig. 3 Comparison of peroxidase isoenzyme spectrums in different tissues and organs of the diploid line of *Scutellaria baicalensis* Georgi

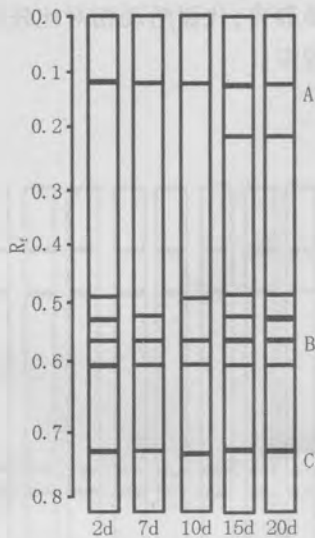


图4 黄芩二倍体试管苗不同生长期过氧化物酶同工酶谱比较
Fig. 4 Comparison of peroxidase isoenzyme spectrums in various growth-phase tissue-cultured shoots of the diploid line of *Scutellaria baicalensis* Georgi

>花瓣。ASP是清除叶绿体胞浆中过氧化氢的关键酶^[8],顶芽中DNA及蛋白质合成十分旺盛,各种代谢活动非常活跃,因而活性最高,叶中叶绿体功能完备,是光合作用的主要场所,代谢活动也很活跃,故ASP活性很高。种子由于本身代谢活动较弱,ASP活性很低,花中叶绿体极少,故活性最低。同时还发现,过氧化物酶同工酶谱带数与ASP活性有着较好的一致性:ASP活性高的部位,其同工酶的数目也较多,反之亦然。

2.2.2 黄芩一年生和二年生植株叶中ASP活性比较 黄芩二倍体和四倍体叶中ASP活性的测定结果为:一年生二倍体叶的ASP总活力为5.937 U,而同期随机挑选的四倍体株系B16、C2、C7和F4的总活力分别为5.883、7.538、7.313和6.297 U;二年生二倍体叶ASP总活力为4.110 U,四倍体株系B16、C2、C7和F4的总活力分别为11.710、7.576、12.650和5.216 U。结果显示,多倍体各个株系无论一年生还是二年生植株叶的ASP总活性均高于同龄二倍体叶的ASP总活性,说明四倍体植株生长代谢比二倍体

植株旺盛。此结果与作者田间试验得出的结果十分吻合。

2.2.3 黄芩试管苗不同生长时期ASP活性比较

第2天、第7天、第10天、第15天和第20天试管苗ASP活性的测定结果分别为:3.867、33.010、3.989、4.574和13.630 U。这表明,试管苗生长过程中,ASP的总活力和比活力变化趋势与试管苗生长趋势呈现较好的一致性,即在生长初期,ASP活性处于较低水平,7 d后试管苗生长旺盛,代谢活动加强,生物量迅速增加,ASP活性也随着代谢作用加强而急剧上升,此后营养物质不断消耗,生长逐渐缓慢,ASP活性下降。培养后期,植株逐渐衰老,其活性上升,说明ASP在后期清除过氧化氢能力略有加强,具备一定的抗衰老作用。结果表明ASP与黄芩试管苗生长紧密相关。

参考文献:

- [1] 陈柏君,高山林,卞云云. 黄芩组织培养同源四倍体的诱导[J]. 植物资源与环境学报,2000,9(1):9-11.
- [2] 森元聪. 黄芩培养细胞的类黄酮代谢的研究[J]. 国外医学 中医中药分册,1999,21(5):56-57.
- [3] Morimoto S, Tateishi N, Matsuda T, et al. Novel hydrogen peroxidase metabolism in suspension cells of *Scutellaria baicalensis* Georgi [J]. J Biol Chem, 1998, 273: 12606-12611.
- [4] 方允中,李文杰. 自由基与酶——基础理论及其在生物学和医学中的应用(第一版)[M]. 北京:科学出版社,1994. 138-139.
- [5] 中国科学院上海植物生理研究所. 现代植物生理学实验指南(第一版)[M]. 北京:科学出版社,1999. 263-265.
- [6] Mishra N P, Mishra R K, Singhal G S. Changes in the activities of anti-oxidant enzymes during exposure of intact wheat leaves to strong visible light at different temperatures in the presence of protein synthesis inhibitors [J]. Plant Physiol, 1993, 102: 903-910.
- [7] 沈文彪,徐朗莱,徐茂炳,等. 抗坏血酸过氧化物酶活性测定的探讨[J]. 植物生理学通讯,1996,32(3):203-205.
- [8] Miyake C, Asada K. Thylakoid-bound ascorbate peroxidase in spinach chloroplasts and photoreduction of its primary oxidation product monodehydroascorbate radicals in thylakoids [J]. Plant Cell Physiol, 1992, 33(5): 541-546.

(责任编辑:宗世贤)