

# 天麻种内变异不同类型的过氧化物酶同工酶及可溶性蛋白的电泳研究

中国医学科学院 药用植物研究所(北京 100094) 潘瑞乐\* 徐景堂  
中国协和医科大学

**摘 要** 对天麻种内变异不同类型在不同发育阶段的过氧化物酶同工酶及可溶性蛋白进行了聚丙烯酰胺凝胶电泳研究,探讨了天麻在不同发育阶段生理生化相关性和差异性,结果发现天麻种内表型变异尚未在遗传上固定下来。本文的研究为天麻的种下分类提供了科学的证据。

**关键词** 天麻 过氧化物酶 可溶性蛋白 凝胶电泳

天麻 *Gastrodia elata* Bl. 是主产于我国的名贵常用中药,入药已有两千余年的历史,历代本草列为上品。主治头痛眩晕、半身不遂、小儿惊风等。近代药理实验也证明其有止眩晕、抗惊厥、镇静等功效,用途广,需求量大、无副作用,深受患者欢迎。天麻在我国广泛分布,野生及栽培遍及西南至东北各地,由于遗传、生态及人工栽培等因素长期复杂的相互作用,使天麻物种成为多变的群体类型,即由多个在形态和生理等方面具有一定变异的类型组成,其最突出的变异是植物体的茎秆和花出现不同颜色,球茎的含水量存在差异。我国学者<sup>[1]</sup>据此变异在植物分类学上将其定名为天麻的五个变型。本文作者在进行天麻种内杂交和调查天麻野生资源过程中,发现天麻种内变异性状很不稳定。为了搞清天麻表型变异是否由遗传因素决定,并探讨天麻种下分类的合理性,本文对天麻种内变异不同类型在不同发育阶段(白麻期、箭麻期、抽苔开花期)的过氧化物酶同工酶及可溶性蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳研究,为天麻种下分类提供了科学的依据。

## 1 材料

白麻:均采集于北京西北旺药用植物研究所天麻栽培基地(表1)。

表1 白麻样品

样品号	变异类型
1~3号	红杆天麻
4~5号	绿杆天麻
6~8号	乌杆天麻
9~10号	东北天麻

箭麻和花序:1~7号样品采集于陕西宁强县山地(野生),8~15号样品采集于北京西北旺药用植物研究所天麻栽培基地(表2)。

表2 箭麻和花序样品的来源及主要特点

样品号	变异类型	来源	主要特点
1~2	红杆天麻	野生	花茎红色,花橙红色
3	绿杆天麻	野生	花茎绿色,花蓝绿色
4~7	乌杆天麻	野生	花茎深灰色,花灰黄色
8~9	乌杆天麻	栽培	花茎深灰色,花灰黄色
10	绿杆天麻	栽培	花茎绿色,花蓝绿色
11	乌红杆天麻	栽培	花茎乌红色,花淡灰色
12*	红杆天麻	栽培	花茎红色,花橙红色
13*	淡红杆天麻	栽培	花茎淡红色,花黄绿色
14*	兰杆天麻	栽培	花茎深蓝色,花淡绿色
15*	淡绿杆天麻	栽培	花茎淡绿色,花黄绿色

\*12~15号样品为天麻种内杂交后F<sub>1</sub>代表型

## 2 方法

### 2.1 样品制备

2.1.1 白麻样品的制备:取洗净削去表皮的黑白麻约1g,放入冰冻的盛有1ml稀释4倍的浓缩胶缓冲液的研钵中,先将其研磨成糊状,

\* Address: Pan Ruile, Institute of Medicinal Plant, Chinese Academy of Medical Sciences, Chinese Xiehe Medical University, Beijing

然后移至离心管;低温离心(9000r/min) 18min,取上清液 0.5ml,再加入等体积 10% 甘油溶液,即为样品液。

2.1.2 箭麻样品的制备:取洗净的削去表皮的箭麻约 1g,其它方法同白麻。

2.1.3 花序样品的制备:取抽苔开花期的花序顶部大约 1g,其它方法同白麻。

2.2 聚丙烯酰胺凝胶板制备;凝胶制备参考袁晓华<sup>[2]</sup>《植物生理生化》一书有关内容,分离胶浓度为 7.5%,浓缩胶浓度为 3%。

2.3 电泳:每个样品点样 40 $\mu$ l,开始电流强度为 10mA,5min 以后,增大到 20mA,整个过程维持电流强度不变,当前沿指示剂迁移到距离凝胶底部约 1cm 处,停止电泳。整个电泳过程在 4 $^{\circ}$ C 冰箱中进行,约需 2.5h。

2.3.1 过氧化物酶同工酶的显色:将电泳后的凝胶板浸入 0.1% 联苯胺溶液中,滴加少量过氧化氢,迅速混匀,进行显色,显色完后,漂去染色液,将凝胶板放水中保存。

2.3.2 可溶性蛋白的显色:将电泳后凝胶板浸入 0.1% 考马斯亮兰甲醇醋酸水溶液中,于 37 $^{\circ}$ C 水浴中染色约 1h,然后用 20% 甲醇 + 7% 醋酸水溶液脱色 2~3d,不断更换脱色液,至背景清晰,放入 7% 醋酸水溶液中保存。

### 3 结果

3.1 天麻白麻阶段酶活性很低,过氧化物酶同工酶在显色液中至少显色 1h,才隐约可见酶带出现,而且很不清晰。此阶段可溶性蛋白的染色较好。根据比移率和染色深浅绘电泳图谱(图 1)。

3.2 天麻在箭麻阶段,其酶活性仍然较低,但比白麻阶段的酶活性略高。过氧化物酶同工酶在显色液中大约显色 30min 便可见酶带出现,但酶谱仍不清晰。可溶性蛋白谱带较白麻阶段多。

3.3 正在抽苔开花的花序,酶活性较高,过氧化物酶同工酶大约需要 15min,酶带便清晰可见(图 2),不同样品过氧化物酶同工酶的迁移率和酶带数(表 3)。该阶段的可溶性

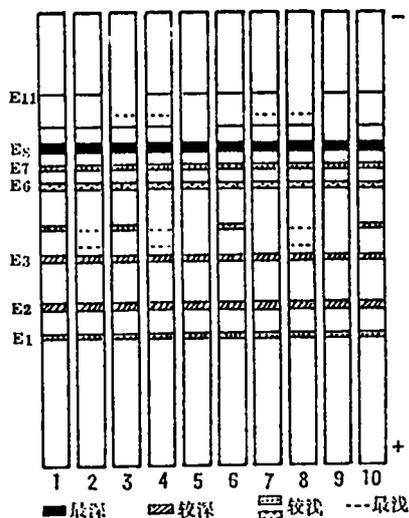


图 1 天麻白麻期可溶性蛋白电泳图谱

1~3-红杆天订 4~5-绿杆天麻

6~8-乌杆天麻 9~10-东北天麻

蛋白的谱带数也较清晰(图 3)。

表 3 不同样品过氧化物酶同工酶的迁移率和酶带数

	1	2	3	4	5	6	总酶带数
1	—	—	0.39	0.34	—	—	2
2	—	0.44	0.39	—	0.33	—	3
3	—	—	0.39	—	—	0.31	2
4	0.49	—	—	0.34	—	—	2
5	0.49	—	—	0.34	—	—	2
6	0.49	—	—	0.34	—	—	2
7	0.49	—	0.39	0.34	—	—	3
8	0.49	0.44	0.39	0.34	—	—	4
9	—	0.44	0.39	0.34	—	—	3
10	0.49	—	0.39	0.34	—	—	3
11	—	0.44	—	0.34	—	—	2
12	0.49	0.44	—	0.34	—	—	3
13	0.49	0.44	—	0.34	—	—	3
14	0.49	—	—	0.34	—	—	2
15	0.49	—	—	0.34	—	—	2

### 4 小结与讨论

4.1 酶谱变化与天麻生长过程存在一定的相关性。天麻在白麻和未抽苔的箭麻阶段生长缓慢,生理生化代谢低下,许多酶基因和蛋白基因处于休眠和半休眠状态,故表现为酶带数少,酶活性低;而抽苔开花的花序,生长快,代谢旺盛,酶基因处于高度活化状态,表

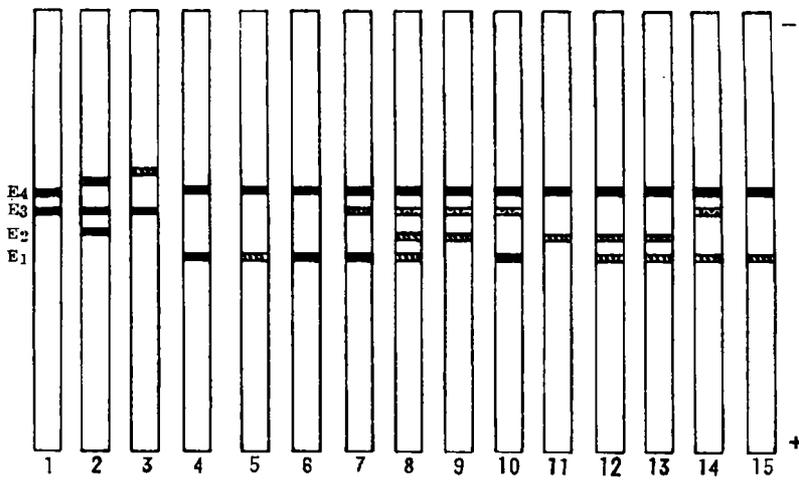


图2 天麻不同变异类型过氧化物酶同工酶电泳图谱

1~2-红杆天麻 3、10-绿杆天麻 4~9-乌杆天麻 11-乌红杆天麻 12-红杆天麻 13-淡红杆天麻 14-蓝杆天麻 15-淡绿杆天麻  
颜色:同图1

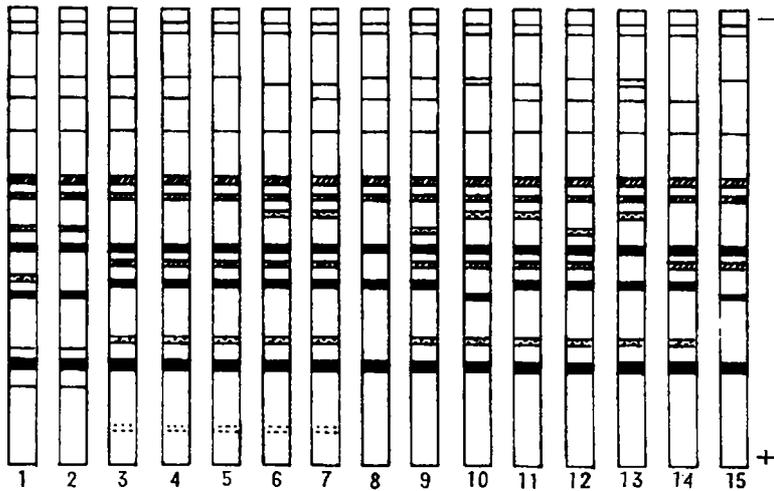


图3 天麻不同变异类型可溶性蛋白电泳图谱

1~2-红杆天麻 3、10-绿杆天麻 4~9-乌杆天麻 11-乌红杆天麻 12-红杆天麻 13-淡红杆天麻 14-蓝杆天麻 15-淡绿杆天麻 颜色:同图1

现为酶带数多,酶活性高。文献报道<sup>[3]</sup>,天麻完成一代生活史的24个月中,从抽茎到开花结果约2个月左右,而平均花期仅13d左右,其余时间都在土壤中渡过,说明天麻在抽苔开花期生长是很迅速的。同时也说明生物的

发育过程是遗传信息在时间、空间顺序表达的过程。

4.2 从图1可以看出:天麻白麻期不同个体的蛋白电泳图谱是不完全相同的,但是主要的6条带E<sub>1</sub>、E<sub>2</sub>、E<sub>3</sub>、E<sub>6</sub>、E<sub>7</sub>、E<sub>8</sub>是完全一样

的。仅几条染色浅的带和细带如： $E_4$ 、 $E_5$ 、 $E_{10}$ 、 $E_{11}$ 存在差异。同一表型的植株如：1~3号（红杆）、4~5（绿杆）、6~8（乌杆）、9~10（东北产，表型红杆），其蛋白电泳图谱也不相同，但不同表型的植株，如：5号（绿杆）和9号（东北）及6号（乌杆）和10号（东北）等却是一样的。

4.3 从图2可以看出：天麻种内变异不同类型的过氧化物酶同工酶谱是比较相似的。 $E_1$ 和 $E_4$ 带普遍存在于天麻物种中； $E_2$ 和 $E_3$ 随机出现在不同的植株，且频率较高； $E_5$ 和 $E_6$ 两条带出现的频率较小，仅个别植株中存在。同一表型的植株，如：1、2、12号三样品都为红杆天麻，但其酶谱是不同的；3、10都为绿杆天麻，其酶谱也不相同。不同表型的植株如：7（乌杆）、10（绿杆）酶谱都是一样的，5（乌杆）、15（淡绿杆）酶谱也是一样的。

4.4 从图3可以看出，天麻种内各个变异类型1~15号样品之花序可溶性蛋白电泳图谱也很相似，仅一些弱带和窄带存在差异。谱带的差异与表型差异也是没有必然联系的。

4.5 根据上述结果可知，天麻物种的过氧化物酶同工酶存在较丰富的多样性，且表型变异和酶谱差异是不一致的，相同的表型不一

定表现相同的酶谱，而不同的表型有时则出现相同的酶谱。同工酶是基因的直接产物，能较准确地反应基因的存在状况和表达规律，说明天麻物种在表型和遗传中都存在一定的可塑性。同一种基因型在不同环境条件下发育出不同的形态表型；相同的形态可能包括不同的基因型。

4.6 在分类学上，对于种内的多样性在多大程度上才能加以确认，目前尚没有明确的标准。但是，可根据的生物对某种特定环境条件的影响的反应，并且以某种方式在表型上和遗传上固定下来，才能在种内某一级将分类群加以肯定<sup>[4,5]</sup>。本文实验结果表明天麻种内的表型变异尚未在遗传上固定下来，因此，前人对天麻种内变异所进行的变型分类等级肯定是否成立有待于进一步研究。

#### 参考文献

- 1 周 弦,等. 云南植物研究,1983,5(4):361
- 2 袁晓华. 植物生理生化实验. 北京:高等教育出版社,1983
- 3 徐锦堂,等. 中国医学科学院学报,1989,11(4):237
- 4 肖小河. 中草药,1989,20(8):42
- 5 H. E. 斯特里特编,石铸等译. 植物分类学概论. 北京:科学出版社,1986. 1

(1995-07-14 收稿)

## Studies on the Peroxide Isoenzyme and the Soluble Protein of Various Types of Tall *Gastrodia* (*Gastrodia elata*)

Pan Ruile, Xu Jingtang

By means of polyacrylamide gel slab electrophoresis, the peroxide isoenzyme and the soluble protein of various types of *Gastrodia elata* in different growing periods were studied. The results revealed that the apparent varieties of *G. elata* are not stable in heredity.

### 《中国生化药物杂志》征订启事

《中国生化药物杂志》(原名《生化药物杂志》)为全国生化制药情报中心站编辑出版的技术性刊物,主要内容有:新生化药物(动物、植物、微生物及海洋生物等来源);动物资源的利用;生化药物剂型研究;新工艺、新技术、新材料的应用及工艺改革;先进生化制药设备和仪器的推广和应用;开发生化制品的新途径;生化药物的理化分析、药理学和临床医学;生化制药工业管理等。

国内统一刊号为CM32-1355/B,双月刊,16开本54页,国内外公开发行,双月20日出版,并可刊登广告。每期定价6.00元,可在全国各地邮局订阅,邮发代号28-233。国外发行代号BM4561。