

浙贝母低温解除休眠过程中酯酶同工酶和可溶性蛋白质的电泳分析

中国医学科学院 药用植物研究所(北京 100094) 高文远* 李志亮 肖培根
中国协和医科大学

摘要 用电泳方法分析了浙贝母低温解除休眠过程中芽、鳞片近轴面表皮和鳞片内部组织的酯酶同工酶和可溶性蛋白质的变化。芽的酯酶同工酶谱带较多,变化明显。鳞片内部组织的酯酶同工酶谱带较少,变化较小。芽、鳞片近轴面表皮和鳞片内部组织可溶性蛋白质图谱的变化主要是颜色深浅的变化。结果说明浙贝母低温解除休眠的过程是由芽和鳞片共同完成的,鳞片近轴面表皮在芽和鳞片内部组织的相互关系中起着重要作用。

关键词 浙贝母 休眠 酯酶同工酶 可溶性蛋白质

浙贝母是一种多年生草本药用植物,有止咳化痰等多种功效。用 $8^{\circ}\text{C}\sim 10^{\circ}\text{C}$ 低温处理5d左右解除其夏季的休眠,可以使其在气温适宜的秋季再度出苗生长,达到一年生长两季的目的,从而缩短商品鳞茎的收获年限^[1]。我们在以前的研究中曾分析了浙贝母的芽和鳞片在低温解除休眠过程中过氧化物酶和酯酶的活性变化^[2]。后来的研究发现,在休眠解除后鳞片衰退时,鳞片上近轴面表皮附近的几层细胞首先衰退,形成一条清晰的破碎细胞带^[3]。进一步的研究发现,鳞片衰退时,近轴面表皮和内部贮备组织的过氧化物酶和可溶性蛋白质有所不同^[4]。为了深入探讨浙贝母低温解除休眠的机理,我们将鳞片近轴面表皮和内部组织分开取样,与芽一起用电泳方法分析其在低温解除休眠过程中酯酶同工酶和可溶性蛋白质的变化。

1 材料和方法

1.1 材料:浙贝母 *Fritillaria thunbergii* Miq 采自本所实验地。当浙贝母地上部分倒苗,地下部分进入休眠状态后,挑选无病、残鳞茎,清水洗净后放于石英砂上,在 $8^{\circ}\text{C}\sim 10^{\circ}\text{C}$ 条件下进行低温处理,定期取样,液氮速冻后存于低温冰箱中,统一进行电泳分析。

1.2 方法:采用聚丙烯酰胺垂直板凝胶电泳技术。点样量为 $50\mu\text{L}$,分离胶浓度10%,浓缩胶浓度4%。稳流电泳,起始电流强度20mA,前沿线进入分离胶后调至40mA,整个电泳过程约需3h,酯酶和蛋白质的染色按袁晓华等^[5]的方法进行。

电泳样品的制备:准确称取材料1g,加入 0.1mol/L 、 $\text{pH}8.5$ 的Tris-HCL缓冲液4mL,再加入少许石英砂后冰浴条件下充分研磨, 0°C ,8000r/min离心20min。取上清液与10%甘油1:1混合,加入少许溴酚蓝,充分混合后上样。

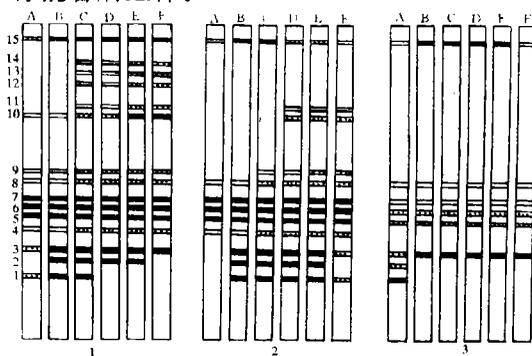


图1 浙贝母低温解除休眠过程中酯酶同工酶的变化

A、B、C、D、E、F 分别为低温处理 0、15、25、35、45、55 d 时的谱带;1、2、3 分别为芽,鳞片近轴面表皮和鳞片内部组织的图谱

* Address: Gao Wenyan, Institute of Medicinal Plant, Chinese Academy of Medical Sciences, Chinese Xiehe Medical University, Beijing

2 结果和讨论

图 1 为酯酶的电泳结果,图 2 为可溶性蛋白质的电泳结果。可以看出,酯酶同工酶的谱带主要由 15 条组成,可溶性蛋白质的谱带主要由 25 条组成。

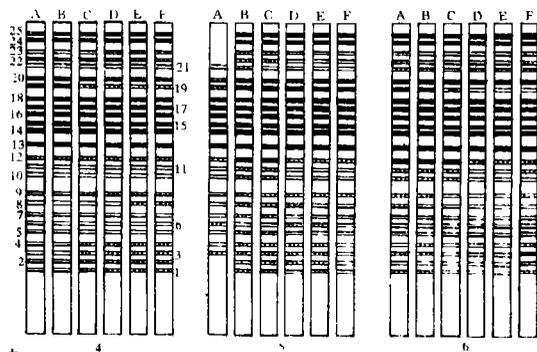


图 2 浙贝母低温解除休眠过程中可溶性蛋白质的变化

A、B、C、D、E、F 分别为低温处理 0、15、25、35、45、55 d 的谱带;1、2、3 分别为芽、鳞片近轴面表皮和鳞片内部组织的谱图

图 1 表明,各部位酯酶同工酶的 5~7 号谱带比较稳定,其它谱带均有变化。芽的酯酶同工酶谱带最多,变化最明显。其次为鳞片近轴面表皮的酯酶同工酶,与芽的酶谱相比,少 12~14 号谱带。鳞片内部组织的酯酶同工酶谱带颜色最浅,谱带最少,变化较小。与芽相比,少 4 号和 9~14 号谱带,从图 1,4~6 和从图 2 可以看出,各部位可溶性蛋白质的 13~18 号谱带颜色最深,比较稳定。芽和鳞片内部组织不同时期可溶性蛋白质的谱带变化主要是颜色深浅的变化。鳞片近轴面表皮在休眠状态时的可溶性蛋白质图谱较其它时期

少 1,2 和 22~25 号谱带,低温处理 15 d 后谱带的变化主要是颜色的变化。还可以看出,在浙贝母低温解除休眠过程中,各谱带在芽、鳞片近轴面表皮和鳞片内部组织 3 个部位的变化不一致,表现了各部位内在代谢的复杂性。

酯酶同工酶在植物体内广泛存在,参与若干酶类的修饰、激活或钝化^[6]。与植物体内的酯代谢和内膜系统的发育有关^[7]。浙贝母低温解除休眠过程,是一个复杂的代谢过程,其中有许多酯酶参与的反应。蛋白质是基因表达的产物^[8]。其谱带的活跃变化表明了低温解除休眠过程中各部位核酸、酶和蛋白质代谢的活跃。芽的酯酶同工酶图谱变化最大,表明其代谢最活跃,另外两个部位电泳图谱的变化表明鳞片也参与了低温解除休眠的过程。浙贝母的休眠解除一方面是使芽“苏醒”,另一方面也使鳞片内部组织做好准备,为芽的生长降解并输出贮备物质。鳞片近轴面表皮酯酶同工酶和可溶性蛋白质图谱的活跃变化表明它在芽和鳞片内部贮备组织的相互关系中起着重要的作用。

参考文献

- 李志亮,等.中草药,1985,16(1):17
- 高文远,等.植物学报,1994,36(增刊):215
- 高文远,等.植物学报,1995,37:885
- 高文远,等.中国中药杂志,1996,21:272
- 袁晓华,等.植物生理生化实验.北京:高等教育出版社,1983.233
- Shannon L. M. Ann Rev Plant Physiol,1968,19:187
- Sanders T H,et al. Lipids,1975,10:50
- Delrallee I,et al. J Plant Physiol,1988,132:210

(1996-10-15 收稿)

Esterase Isozyme and Soluble Protein Assay Over the Course of Dormancy Relieving with Low Temperature by Electrophoresis in Thunbergia Fritillary (*Fritillaria thunbergii*)

Gao Wenyuan, Li Zhiliang and Xian Peigen

Changes of esterase isozyme and soluble protein in bud, adaxial cortex and inner tissue in scale were assayed by electrophoresis over the course of dormancy relieving in *Fritillaria thunbergii*. Esterase isozyme pattern of bud had more bands than the others, and these bands changed significantly as compared to the adaxial cortex and inner tissue in scale. The bands in esterase isozyme pattern of inner tissue in scale were few and changed little than the others. Changes of soluble protein patterns in bud, adaxial cortex and inner tissue in

scale were mainly on color. These results indicated that both the bud and the scale joined the course of dormancy relieving of *Fritillaria thunbergii*, and the adaxial cortex presented an important role in the relation between the bud and the inner tissue in scale.

香砂养胃胶囊中厚朴酚的含量测定方法研究

国家医药管理局天津药物研究院(300193) 戴广训* 唐永华

摘要 采用反相高效液相色谱法,测定中成药香砂养胃胶囊和香砂养胃丸中厚朴酚的含量。以联苯做内标,样品采用热回流甲醇提取,滤膜净化。香砂养胃丸中厚朴酚的含量为 0.26%,香砂养胃胶囊中厚朴酚的含量标准为 3.22%以上。

关键词 含量测定 高效液相色谱 香砂养胃胶囊 厚朴酚

香砂养胃丸为 1995 年版中国药典收载,温中和胃,用于不思饮食,呕吐酸水,胃脘满闷,四肢倦怠。处方由木香、砂仁、陈皮、厚朴等组成,采用药粉泛丸,服用量大。我们拟将其改变剂型,制成胶囊剂,以提高疗效,方便服用。处方中含有厚朴,厚朴酚对照品为中国药典收载,考虑可以通过厚朴酚的含量来控制制剂的质量。文献报道了用高效液相色谱法测定一些中成药中厚朴酚的含量^[1~3],多数用的是外标法。我们参照吕归宝等测定藿香正气水中厚朴酚的方法^[4],用联苯为内标,进行了方法考查,测定了香砂养胃丸和香砂养胃胶囊样品中厚朴酚的含量,表明本方法提高了准确度,操作简便、快速。

1 实验材料

仪器: Waters 高效液相色谱仪,510 泵, V6K 手动进样器,441 型紫外检测器,岛津 CR6A 数据处理机。

试剂: 分析纯甲醇,优级纯联苯,超纯水。

对照品: 厚朴酚购自中国药品生物制品检定所(归一化检查纯度为 98%以上)。

2 色谱条件

色谱柱: 4.6 mm×250 mm 不锈钢柱,填

料为十八烷基硅烷键合硅胶。

流动相: 甲醇-水(78:22),流速 0.6 mL/min,检测波长 254 nm,灵敏度 0.1 AUFS,ATTEN=1,纸速 2 mm/min。经测定,柱效为 7 000 以上,厚朴酚和杂质峰的分度度为 2.68。厚朴酚的保留时间为 13.343 min,联苯的保留时间为 17.458 min。

3 实验方法

3.1 对照品溶液的制备: 称取五氧化二磷真空干燥至恒重的厚朴酚对照品 9.90 mg 置 100 mL 量瓶中,加甲醇溶解至刻度,摇匀,作为对照品溶液。

3.2 内标溶液的制备: 称取恒重的联苯 1.98 mg,置 100 mL 量瓶中,加甲醇溶解至刻度,摇匀,作为内标溶液。

3.3 校正因子测定溶液: 精密量取对照品溶液 0.8 mL,内标溶液 1 mL 置 10 mL 量瓶中,加甲醇至刻度,摇匀,备用。

3.4 供试品溶液的制备: 取香砂养胃胶囊 10 粒,倾出内容物,研成细粉,精密称取 0.1 g,置 100 mL 圆底烧瓶中,加甲醇 50 mL,置水浴中回流 3 h,取下,冷却。精密量取上清液 1 mL,内标溶液 1 mL,置 10 mL 量瓶中,

* Address: Dai Guangxun, Tianjin Institute of Pharmaceutical Research, State Pharmaceutical Administration of China, Tianjin