不同生长时期人参根中 3 种氧化还原同工酶分析

张　惠，赵　雨*，杨　菲，李晓华，陈　雨
长春中医药大学，吉林 长春　130117

摘　要：目的　研究不同生长时期人参根中 3 种氧化还原同工酶的变化规律。**方法**　以 5 年生人参根为供试材料，采用聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）法得到人参根超氧化物歧化酶（SOD）同工酶、过氧化氢酶（CAT）同工酶和细胞色素氧化酶（CYT）同工酶的电泳胶片，并生成指纹图谱叠加图，对不同生长时期人参根中上述 3 种氧化还原同工酶图谱进行分析。**结果**　不同生长时期人参根中 SOD 同工酶和 CYT 同工酶的酶带条数存在明显差别，而 CAT 同工酶的酶带条数无明显变化，3 种同工酶均具有各自的主要特征酶带。**结论**　SOD 同工酶和 CYT 同工酶在人参果后参根生长期和枯萎期活性升高，CAT 同工酶在人参生长发育的各个时期活性相对稳定。

关键词：人参根；不同生长时期；超氧化物歧化酶；过氧化氢酶；细胞色素氧化酶
中图分类号：R284.1　　**文献标志码：**A　　**文章编号：**0253 - 2670(2012)12 - 2494 - 05

Analysis on three kinds of oxidoreductase isozymes in ginseng root at different growth periods

ZHANG Hui, ZHAO Yu, YANG Fei, LI Xiao-hua, CHEN Yu
Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China

Abstract: Objective　To study the variation rules of the three kinds of oxidoreductase isozymes in ginseng root at different growth periods. **Methods**　Taking five-year old ginseng roots as materials, the electrophoresis films of superoxide dismutase (SOD) isozyme, catalase (CAT) isozyme, and cytochrome oxidase (CYT) isozyme were obtained by using the polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) method. The overlapped fingerprint was generated and the three redox isoenzymes of ginseng roots at different growth periods were analyzed. **Results** The enzyme band number of SOD isozyme and CYT isozyme in ginseng root at different growth periods showed obvious differences, but the enzyme bands numberof CAT isozyme demonstrated no significant change. All the three isozymes had main characteristic bands of its own. **Conclusion**　Activities of SOD isozyme and CYT isozyme are increased in ginseng root growing after fruit stage and withering stage, while the activity of CAT isozyme is relatively stable in each period of ginseng during the growth and development.

Key words: ginseng root; different growth periods; superoxide dismutase (SOD); catalase (CAT); cytochrome oxidase (CYT)

人参 *Panax ginseng* C. A. Mey. 为五加科多年生草本植物，是具有数千年药用历史的名贵中药材，具有大补元气、复脉固脱、补脾益肺、生津安神等功效[1]。同工酶是指催化反应相同而结构及理化性质不同的一组酶[2]。随着现代生物技术的发展，对同工酶的研究日益成为分子生物学和植物生理学的重要内容[3]。根据酶催化反应性质的不同，可将酶分为 6 大类[4]，氧化还原酶是其中之一，在植物呼吸、光合体系、次生代谢等方面都起着重要的催化作用。本实验采用聚丙烯酰胺凝胶电泳（PAGE）法，针对超氧化物歧化酶（SOD）、过氧化氢酶（CAT）和细胞色素氧化酶（CYT）3 种氧化还原酶系中的关键酶进行研究，以期揭示不同生长时期人参根中上述 3 种氧化还原同工酶的变化规律。

1　材料与仪器

1.1　材料

实验用五年生人参根采自吉林农业大学人参种植试验田。采样时间为 2010 年 5 月中旬至 9 月下旬，分别于人参出苗期、展叶期、开花期、结果期、果后参根生长期和枯萎期 6 个不同生长时期采集样品，共采样 23 批，见表 1。

收稿日期：2012-05-12
基金项目：国家自然科学基金资助项目（30873371）；“十二五”国家科技支撑计划项目（2011BAIO3B01）
作者简介：张　惠（1985—），女，吉林长春人，硕士研究生，研究方向为中药学。
Tel: (0431)86172300　Fax: (0431)86172300　E-mail: zh114193536@sina.cn
***通讯作者**　赵　雨　Tel: (0431)86172300　E-mail: cnzhaoyu@yahoo.com.cn
网络出版时间：2012-11-26　网络出版地址：http://www.cnki.net/kcms/detail/12.1108.R.20121126.1749.002.html

表 1 23 批人参根样品

Table 1 Twenty-three batches of ginseng root samples

样品号	采样时间	生长时期	样品号	采样时间	生长时期
1	2010-05-12	出苗期	13	2010-07-12	结果期
2	2010-05-15	出苗期	14	2010-07-19	结果期
3	2010-05-18	出苗期	15	2010-07-26	结果期
4	2010-05-21	出苗期	16	2010-08-02	结果末期，果后参根生长初期
5	2010-05-24	出苗期	17	2010-08-09	果后参根生长期
6	2010-05-29	出苗末期，展叶初期	18	2010-08-16	果后参根生长期
7	2010-06-03	展叶期	19	2010-08-23	果后参根生长期
8	2010-06-08	展叶期	20	2010-08-30	果后参根生长期
9	2010-06-13	展叶末期，开花初期	21	2010-09-06	果后参根生长期
10	2010-06-21	开花期	22	2010-09-13	果后参根生长末期，枯萎初期
11	2010-06-28	开花末期，结果初期	23	2010-09-20	枯萎期
12	2010-07-05	结果期			

1.2 仪器与试剂

EPS301 电泳仪及 SE260 垂直板电泳槽、Quixstand 中空纤维过滤系统（美国 GE 公司），Jeda801 凝胶图像分析系统（江苏捷达科技有限公司），AL204 电子天平（上海梅特勒-托利多仪器有限公司），GS—6R 台式大容量冷冻离心机（德国 Beckman 公司），Minispin 高速离心机（德国 Eppendorf 公司），LL3000 冷冻干燥机（德国 Heto 公司）。Tris、丙烯酰胺、甲叉双丙烯酰胺、甘氨酸、过硫酸铵、溴酚蓝（美国 Amresaco 公司），SDS、甘油、TEMED、核黄素（美国 Sigma 公司），EDTA（美国 Genview 公司），其他试剂均为国产分析纯。

2 方法

2.1 样品制备

将采集的人参根洗净，用滤纸吸干其表面水分，称质量（每批样品至少取 3 根人参），匀浆，按料液比 1∶10 加入 10 mmol/L pH 7.4 的 Tris-HCl 缓冲液 4 ℃浸提 20 h，浸提液 4 000 r/min 低温离心 30 min，收集上清液，用膜孔径为 0.45 μm 的中空纤维膜过滤系统进行微滤，滤过液用膜相对分子质量为 1.0×10^4 的中空纤维膜滤过系统进行超滤、浓缩，将内滤液冷冻干燥，冻干品贮于−20 ℃冰箱备用。

2.2 电泳

采用垂直板 PAGE 法，SOD 和 CYT 的分离胶浓度为 10%，CAT 的分离胶浓度为 7.5%，浓缩胶浓度均为 3%，电极缓冲液为 Tris-甘氨酸，23 批样品均按同样鲜质量称取冻干品后等体积溶解，以溴酚蓝作指示剂，每孔加样 20 μL，低温电泳，起始电压为 160 V，样品进入分离胶后调节电压至 280 V，待溴酚蓝标志到达凝胶前沿停止电泳。

2.3 染色

2.3.1 SOD 同工酶染色[4] 电泳结束后，将凝胶浸入 50 mL NBT 溶液中，浸泡 20 min 后，换 0.01% 核黄素溶液浸泡 20 min，然后将凝胶放入含有 1 mmol/L EDTA 的磷酸缓冲液（pH 7.8）中，用日光灯照射胶面，直至在蓝色背景上出现透明条带为止。

2.3.2 CAT 同工酶染色[5] 取 3% H_2O_2 的溶液 25 mL、0.1 mol/L pH7.0 的磷酸缓冲液 5 mL、0.1 mol/L $Na_2S_2O_3\cdot5H_2O$ 溶液 3.5 mL、配成染色液 A。取 0.09 mol/L 的 KI 溶液 25 mL，加蒸馏水 25 mL，配成染色液 B。电泳结束后，取适量 1%可溶性淀粉溶液均匀地倒在胶面上，静置 1 h，然后将凝胶浸入 A 液中，15 min 后换 B 液，酶活性区带为蓝色背景上的透明条带。

2.3.3 CYT 同工酶染色[6-7] 取 1%二甲基对苯二胺溶液 3 mL、1% α-萘酚溶液 3 mL、0.1 mol/L pH 7.4 的磷酸盐缓冲液 75 mL，充分混匀即为 CYT 同工酶染色液。电泳结束后，将凝胶浸入上述染色液中，37 ℃保温，直至出现清晰的天蓝色条带。

2.4 数据处理

将染色后的电泳胶片拍照保存，经过凝胶图像分析系统对电泳图片扫描，生成直观的图谱形式，并导出重要的技术参数进行对比分析。

3　结果与分析

3.1　SOD 同工酶

不同生长时期人参根 SOD 同工酶 PAGE 电泳图见图 1，指纹图谱叠加图见图 2。由结果可知，不同生长时期人参根中 SOD 同工酶酶带条数有明显差别，1～4 号、8～17 号样品分离出 6 条酶带，5～7 号样品分离出 5 条酶带，18～23 号样品分离出 7 条酶带。根据相对迁移率（Rf）可将图谱分为 3 个区段，I 区：Rf 值在 0～0.30，可见 S1、S2 同工酶带峰；Ⅱ区：Rf 值在 0.30～0.58，可见 S3、S4 同工酶带峰；III 区：Rf 值在 0.58～1.00，可见 S5、S6、S7 同工酶带峰。S1 酶带在 5～7 号样品中无显示；S3 酶带为 18～23 号样品的特有带；S2、S4、S5、S6、S7 酶带为所有样品的共有带，且酶带峰值较高，可作为人参生长过程中的 SOD 同工酶特征酶带。

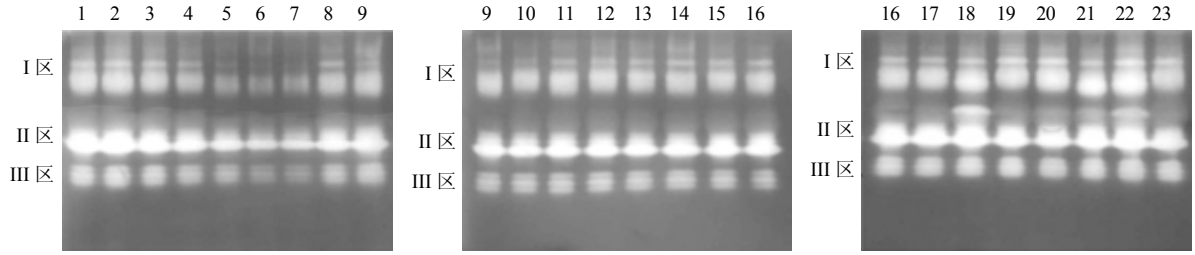

图 1　不同生长时期人参 SOD 同工酶 PAGE 电泳图

Fig. 1　PAGE electrophoretogram of ginseng SOD isozymes at different growth periods

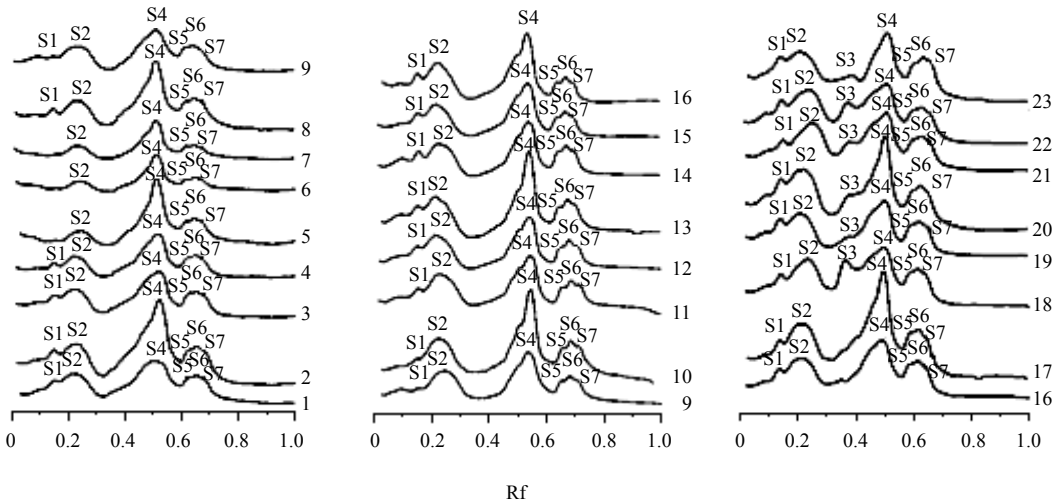

图 2　不同生长时期人参 SOD 同工酶指纹图谱叠加图

Fig. 2　Overlapped fingerprint of ginseng SOD isozymes at different growth periods

3.2　CAT 同工酶

不同生长时期人参根 CAT 同工酶 PAGE 电泳图见图 3，指纹图谱叠加图见图 4。由结果可知，不同生长时期人参根中 CAT 同工酶酶带条数有明显差别，1～15 号样品分离出 2 条酶带，16～23 号样品分离出 3 条酶带。根据 Rf 可将图谱分为 2 个区段，I 区：Rf 值在 0～0.40，可见 T1、T2 同工酶带峰，且为极弱峰；Ⅱ区：Rf 值在 0.40～1.00，可见 T3 同工酶带峰，且为强峰。T2 酶带为 16～23 号样品的特有带；T1、T3 酶带为所有样品的共有带，由于 T1 酶带峰值极低，不易辨别，而 T3 酶带峰值较高，具有代表性，因此 T3 酶带可作为人参生长过程中 CAT 同工酶特征酶带。

3.3　CYT 同工酶

不同生长时期人参根 CYT 同工酶 PAGE 电泳图见图 5，指纹图谱叠加图见图 6。由结果可知，不同生长时期人参根中 CYT 同工酶酶带条数有明显差别，1～15 号样品分离出 1 条酶带，16～23 号样品分离出 2 条酶带。根据 Rf 可将图谱分为 2 个区段，I 区：Rf 值在 0～0.25，可见 Y1 同工酶带峰，且为

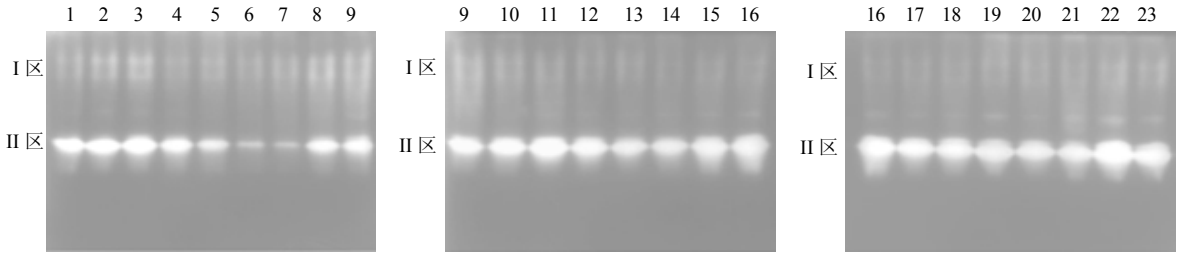

图 3 不同生长时期人参 CAT 同工酶 PAGE 电泳图

Fig. 3 PAGE electrophoretogram of ginseng CAT isozymes at different growth periods

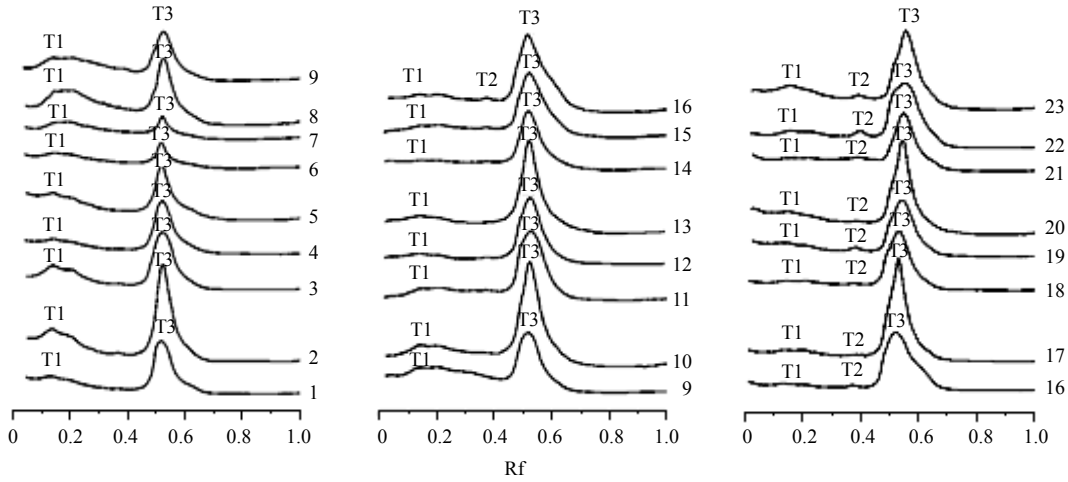

图 4 不同生长时期人参 CAT 同工酶指纹图谱叠加图

Fig. 4 Overlapped fingerprint of ginseng CAT isozymes at different growth periods

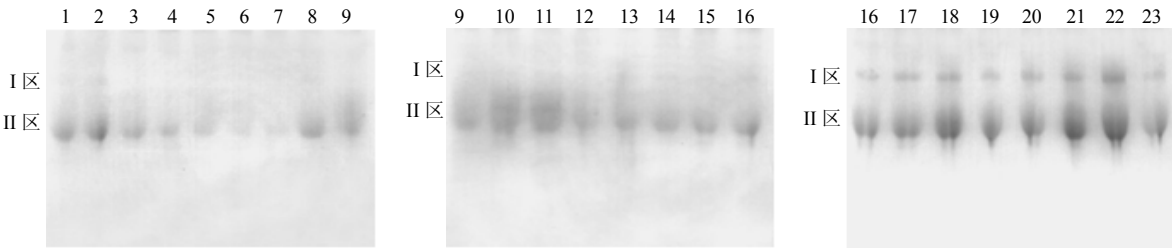

图 5 不同生长时期人参 CYT 同工酶 PAGE 电泳图

Fig. 5 PAGE electrophoretogram of ginseng CYT isozymes at different growth periods

弱峰；Ⅱ区：Rf 值在 0.25～1.00，可见 Y2 同工酶带峰，且为强峰。Y1 酶带为 16～23 号样品的特有带；Y2 酶带为所有样品的共有带，可作为人参生长过程中 CYT 同工酶特征酶带。

4 讨论

SOD 能够特异性地清除生物体内具有细胞毒性的超氧化物阴离子自由基，从而减轻或消除超氧化物阴离子自由基对机体的损害[8-9]。通过对 SOD 同工酶的电泳分析可知，人参根中 SOD 同工酶在出苗后期和展叶初期酶带数减少，在果后参根生长中期和枯萎期酶带数增多。这可能是由于在参苗形态基本建成、叶片刚刚展出时，人参活性氧代谢缓慢，SOD 同工酶活性处于较低水平，则表现为酶带数减少；而在参根生长发育旺盛、参根基本长成时，人参活性氧代谢较快，SOD 同工酶活性处于较高水平，则表现为酶带数增多。

CAT 能够催化细胞内的过氧化氢分解，从而使细胞免受过氧化氢的毒害[10-11]。通过对 CAT 同工酶的电泳分析可知，CAT 同工酶的酶带在人参生长发育过程中变化不明显，这表明 CAT 同工酶的活性在

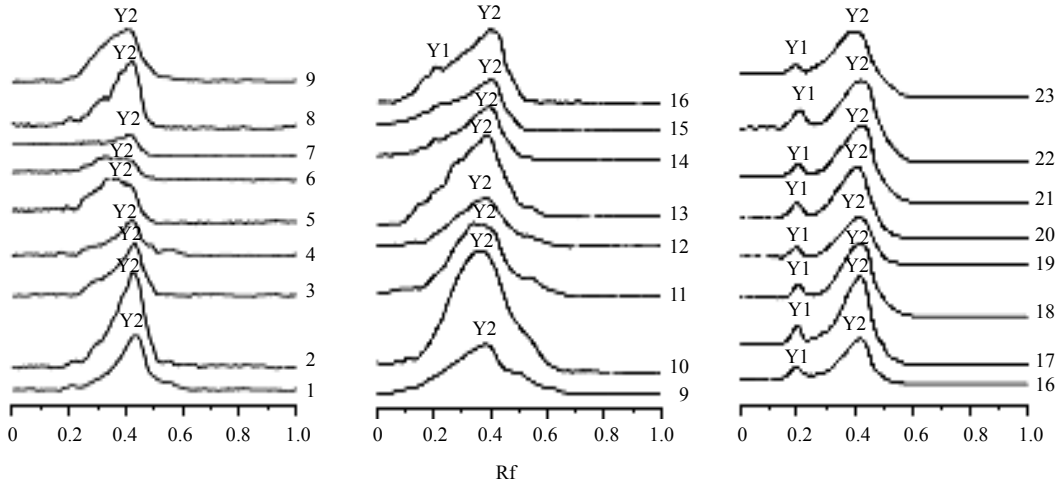

图 6　不同生长时期人参 CYT 同工酶指纹图谱叠加图

Fig. 6　Overlapped fingerprint of ginseng CYT isozymes at different growth periods

人参的各个生长时期相对稳定。CAT 同工酶和 SOD 同工酶均具有各自的主要特征酶带，并存在于人参生长的各个时期，这表明两种同工酶的特征酶带是人参生长过程中的必需酶带，以保证人参体内的活性氧维持在一个正常的动态水平。

CYT 是植物体呼吸链中的末端氧化酶，位于线粒体膜内，是能量代谢中的一种重要的酶，直接影响能量的形成[12-13]。通过对 CYT 同工酶的电泳分析可知，CYT 同工酶在果后参根生长期和枯萎期酶带数增多，这可能是由于在人参生长过程中，能量绝大部分由光合作用提供，线粒体供能作用相对较小，其 CYT 同工酶活性不高，但是进入果后参根生长期和枯萎期以后，人参地上部分逐渐衰老并开始枯萎，此时维持参根生长的能量来源主要依赖于线粒体呼吸，其 CYT 同工酶活性较高，故表现为酶带数增多，说明此时作为供能主要途径的 CYT 同工酶途径在参根生长过程中占有重要的地位。

参考文献

[1] 张贵君. 中药鉴定学 [M]. 北京: 科学出版社, 2002.

[2] 王继峰. 生物化学 [M]. 北京: 中国中医药出版社, 2003.

[3] 孙君社, 江正强, 刘　萍. 酶与酶工程及其应用 [M]. 北京: 化学工业出版社, 2006.

[4] 唐　丽, 刘友全, 钟秋平. 南天竹超氧化物歧化酶同工酶的研究 [J]. 中南林业科技大学学报, 2008, 28(3): 55-59.

[5] 陈毓荃. 生物化学实验方法和技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2002.

[6] 杨　靖, 张改生, 牛　娜, 等. 小麦粘类雄性不育系生化标记及小孢子细胞色素氧化酶同工酶研究 [J]. 西北植物学报, 2005, 25(8): 1547-1552.

[7] 赵晓平, 荣威恒, 王福喜, 等. 不同枣树品种的同工酶分析 [J]. 河南农业科学, 2008(6): 85-88.

[8] 李红艳, 赵　雨, 杨士慧, 等. 人参不同部位超氧化物歧化酶活力比较 [J]. 时珍国医国药, 2010, 21(3): 513-514.

[9] 陈　勉, 朱希强. 超氧化物歧化酶在医药临床上的研究和应用 [J]. 食品与药品, 2009, 11(9): 44-47.

[10] 南芝润, 范月仙. 植物过氧化氢酶的研究进展 [J]. 安徽农学通报, 2008, 14(5): 27-29.

[11] 杨兰芳, 庞　静, 彭小兰, 等. 紫外分光光度法测定植物过氧化氢酶活性 [J]. 现代农业科技, 2009(20): 364-366.

[12] 李金海, 舒孝顺, 陈良碧. 对高温不育水稻育性敏感期细胞色素氧化酶活性变化的研究 [J]. 惠州大学学报: 自然科学版, 2000, 20(4): 46-49.

[13] 夏　涛, 刘纪麟. 玉米雄性不育细胞质细胞色素氧化酶活性及 ATP 含量的研究 [J]. 华北农学报, 1994, 9(4): 33-37.