

文章编号: 1000-3142(2000)01-0064-05

五种黄精属植物的蛋白水解酶谱研究 Q949.718.2 Q946.563

张为民¹, 张 钧¹, 邢智峰¹, 姬生栋², 胡轶红², 徐存拴²

(1. 焦作教育学院生物系, 河南焦作 483005; 2. 河南师范大学生物系, 河南新乡 453002)

摘 要: 用蛋白水解酶复性电泳方法(G-PAGE)分析了 5 种黄精属植物根状茎和叶的蛋白水解酶的种类和活性。结果表明:(1)它们的根状茎均含有 85 kD 和 55 kD 的蛋白水解酶;叶均含有 82 kD 的蛋白水解酶;(2)根状茎和叶的蛋白水解酶种类和活性有很大差异,叶的蛋白水解酶活性为根状茎的 10 倍,它们的活性均受 pH 影响,其最适 pH 为 7;(3)每种植物都含有自己特有蛋白水解酶;(4)蛋白水解酶在植物鉴定中有参考价值。

关键词: 黄精属植物; 蛋白水解酶; 蛋白水解酶复性电泳 **G-PAGE. 酶 分子生物学**
中图分类号: Q949.71⁺8.230.656 **文献标识码:** A

Investigation on the proteinase activities of five species in *Polygonatum*

ZHANG Wei-min¹, ZHANG Jun¹, XIN Zhi-feng¹,
JI Sheng-dong², HU Yi-hong², XU Cun-shuan²

(1. Department of Biology, Jiaozuo Educational College, Jiaozuo 483005, China)

(2. Department of Biology, Henan Normal University, Xinxiang 453002, China)

Abstract: The proteinase activities in rhizoma and leaves of five species in *Polygonatum* were analyzed by SDS-gelatin-polyacrylamid gel electrophoresis. The results show: (1) The rhizomas all contain 85 kD and 55 kD proteinases, and the leaves contain 82 kD proteinase; (2) There are large differences between rhizomas and leaves proteinase activity. The proteinase activity in leaves is 10 times higher than in rhizomas. Their activity are affected by a change of pH, and their highest activities are shown at pH7; (3) Each species in *Polygonatum* posses a unique proteinases; (4) The use of proteinases in the identification of plants was valuable.

Key Words: *Polygonatum*; proteinase; SDS-gelatin-polyacrylamid gel electrophoresis(G-PAGE)

很多黄精属植物的根状茎具有重要的药理作用。在世界的 40 多种黄精属植物中,中国有

收稿日期: 1999-07-12

作者简介: 张为民(1960-),女,副教授,从事植物学教学和科研工作。

基金项目: 河南省教育委员会自然科学基金资助项目(994013400)

30 多种^[1]。然而,黄精属植物的分类是一个十分困难的问题,因为,经典分类学所依据的性状(形态、结构等)在黄精属植物中很不稳定,地理环境对它们的影响很大,地理分布上往往有交错、重叠和替代的现象。尽管细胞遗传学和染色体分类学有助于解决黄精属的分类困难问题,但并不能解决全部问题,因为,有些黄精属植物,在细胞和染色体水平上是难以区别的。它们的区别可能仅表现在基因水平上。若真如此,黄精属植物的分类就得借助于分子分类学了。在分子分类学的诸多方法^[2]中,用蛋白质和同工酶作为分类的可行性已有一些探讨^[3,4]。用蛋白水解酶谱作为分类指标的可行性^[5]也有一些研究。理论上,蛋白质、酶(包括同工酶、蛋白水解酶等)都是基因的直接产物,是性状(从宏观到微观、从生长、发育、生殖、适应环境到新陈代谢)的直接体现者,借助于蛋白电泳、层析、微机分析系统等现代化分析测试手段还可对蛋白质和酶的种类、含量、活性进行定量分析^[6],所以,它们有可能成为从分子水平上研究生物遗传、变异、分类和亲缘关系的重要依据。近十几年研究表明,蛋白水解酶对生命是必不可少的,蛋白水解酶不仅在蛋白水解过程中起重要作用,而且与蛋白修饰、降解及生物的应急反应密切相关,在生物的生长、发育、抗逆和生殖过程中有重要作用^[7]。本文采用蛋白水解酶复性电泳技术分析了解五种黄精属植物的蛋白水解酶种类、分布、活性及 pH 值依赖性,以探寻它们的蛋白水解酶谱特点,为黄精属植物的分类学提供参考。现将结果报告如下。

1 材料和方法

1.1 材料

试验用的 20 多个标本均与 1997 年 5 月中旬随机从河南焦作境内的太行山余脉采集,样品采到后,一份制成腊叶标本备鉴定,鉴定结果表明,所采 20 余个标本含的 5 种植物是玉竹(*Polygonatum odoratum* (Mill) Druce)、轮叶黄精(*Polygonatum verticillatum* (L.) All.)、卷叶黄精(*Polygonatum cirrhifolium* (Wall) Royle)、湖北黄精(*Polygonatum zanlanscianense* Pamp.) 和黄精(*Polygonatum sibiricum* Delar. ex Redoute); 另一份放入冰壶带到实验室备作蛋白水解酶电泳分析,标本的常规鉴定与它们的蛋白水解酶谱分析按双盲法进行。

1.2 样品制备和蛋白质浓度测定

取根状茎用自来水洗净,双蒸水冲洗以后,横截 0.5~1.5 cm 根状茎备制样用;同时,取同一植株的 5 个叶片用自来水洗净,双蒸水冲洗 2 次后,横切下叶中部区域备制样用。每 g 样品加 10 mL、4℃生理盐水,冰浴匀浆,4℃离心(20 000 g、30 min),取上清分装于 Eppendoff 管, -85℃保存。按 Neuhauff 等方法^[8]测定蛋白质浓度。

1.3 蛋白水解酶复性电泳(G-PAGE)

G-PAGE 按 Neuhaus-Steinmetz 等方法^[9]进行。其基本原理是:聚丙烯酰胺凝胶里共聚有明胶,样品电泳后,与蛋白水解酶结合的 SDS 可为非离子去垢剂(如 Triton X-100)洗去,使蛋白水解酶复性,并把相应位置的明胶消化掉,成为不能为 coomassie Brilliant R250 染色区域(透亮区域)。本文的样品缓冲液不含 β-巯基乙醇、分离胶的丙烯酰胺浓度为 10%、每槽加 50 μg(根状茎)或 10 μg(叶片)蛋白质,胶板在 37℃保温液(0.1 mol/L 甘氨酸、5 mmol/L CaCl₂、调至实验结果所示的 pH)里保温 24 h,然后,固定、显色、分析。

电泳、显色后,根据标准蛋白(分子量分别为:97.4、66.2、43、31、20 和 14.4 kD)的相对迁移率绘制标准曲线,然后,从标准曲线上查找未知蛋白水解酶的分子量。

2 实验结果

2.1 根状茎的蛋白水解酶活性的 pH 依赖性

用 G-PAGE 分析 5 种黄精属植物根状茎蛋白水解酶在不同 pH 的活性表明, 它们的活性表现出强烈的 pH 依赖性。pH7 时, 酶活性最强, 当 pH 大于 7 或小于 7 时, 酶活性降低。pH3.5 时, 只有玉竹和轮叶黄精的 85 kD、湖北黄精的 85、74 和 55 kD、黄精的 110、85 和 74 kD 蛋白水解酶有微弱活性(图 1)。

2.2 根状茎蛋白水解酶种类和活性

表 1 列出了最适 pH(pH7) 时 5 种黄精属植物的蛋白水解酶种类和活性, 其中 85 和 55 kD 蛋白水解酶为受检植物所共有, 可作为该属的标记酶, 250 kD 蛋白水解酶为卷叶黄精所特有, 110 kD 蛋白水解酶在黄精中活性最强, 它们可作为相应植物的标记酶。

2.3 叶的蛋白水解酶活性的 pH 依赖性

用 G-PAGE 分析 5 种黄精属植物叶的蛋白水解酶在不同 pH 中的活性表明, 它们的活性表现出强烈的 pH 依赖性。pH7 时, 酶活性最强, 当 pH 大于 7 或小于 7 时, 酶活性降低, 这些情况相似于根状茎(图 2)。

2.4 叶的蛋白水解酶种类和活性

表 2 列出了在 pH3.5、7 和 8.5 时, 5 种黄精属植物叶的蛋白水解酶种类和活性。其中 150 kD

的蛋白水解酶(图 2 Bc) 为卷叶黄精特有, 62 kD 的蛋白水解酶(图 2 Ae) 为黄精所特有, 玉竹的 82 kD 蛋白水解酶(图 2 Ca) 对 pH 变化最敏感, 它们可作为相应植物的标记酶。但是, 仅在 pH7 时, 叶中才出现一个受检植物共有的蛋白水解酶(82 kD)。

2.5 根状茎和叶的蛋白水解酶活性比较

图 1、2 表明, 虽然根状茎和叶蛋白水解酶活性的最适 pH 均为 7, 但是, 根状茎和叶的蛋白水解酶谱有很大的不同, 叶的蛋白水解酶活性是根状茎的 10 多倍, 除每种植物根状茎和叶都含的特有蛋白水解酶外, pH7 时, 5 种黄精属植物根状茎均含有 85 kD 和 55 kD 的蛋白水解酶, 叶中均含有 82 kD 的蛋白水解酶。

表 1 pH7 时, 根状茎的蛋白水解酶种类及活性
Table 1 The proteinases of rhizomas and their activity at pH7

植物名称 (Species)	分子量 Molecular weight(kD)							
	250	110	85	74	65	57	55	54
玉竹(<i>P. odoratum</i>)			2+	+	+		+	
轮叶黄精(<i>P. verticillatum</i>)			4+	+	+	+	2+	
卷叶黄精(<i>P. cirrhifolium</i>)	3+		+	2+	+		+	
湖北黄精(<i>P. zaidanshanense</i>)			3+	3+		+	4+	3+
黄精(<i>P. sibiricum</i>)			4+	5+	4+		3+	+

表 2 在不同 pH 时, 叶的蛋白水解酶种类与活性
Table 2 The proteinases of leave and their activity at different pH

pH	植物名称 (Species)	分子量 Molecular weight(kD)						
		150	95	82	69	62	52	43
3.5	玉竹(<i>P. odoratum</i>)							+
	轮叶黄精(<i>P. verticillatum</i>)				+			
	卷叶黄精(<i>P. cirrhifolium</i>)			+	3+			
	湖北黄精(<i>P. zaidanshanense</i>)			2+				+
	黄精(<i>P. sibiricum</i>)			+		2+		
7.0	玉竹(<i>P. odoratum</i>)	+	3+				5+	5+
	轮叶黄精(<i>P. verticillatum</i>)			2+	3+	+		
	卷叶黄精(<i>P. cirrhifolium</i>)	+	3+	4+	5+	4+	3+	
	湖北黄精(<i>P. zaidanshanense</i>)		+	4+	5+	5+	+	5+
	黄精(<i>P. sibiricum</i>)		+	4+	5+	5+		5+
8.5	玉竹(<i>P. odoratum</i>)	+	+				3+	
	轮叶黄精(<i>P. verticillatum</i>)				3+			
	卷叶黄精(<i>P. cirrhifolium</i>)	+	2+	3+	4+	3+		
	湖北黄精(<i>P. zaidanshanense</i>)		4+	3+	2+			2+
	黄精(<i>P. sibiricum</i>)		4+	3+	3+	3+	2+	

3 讨 论

分析 5 种黄精属植物蛋白水解酶谱表明,它们的蛋白水解酶活性有明显的 pH 依赖性,其最适 pH 值为 7。在最适 pH 条件下,5 种植物的根状茎含有 85 和 55 kD 的蛋白水解酶;它们的叶均含有 82 kD 的蛋白水解酶,这些蛋白水解酶的活性在不同植物中有较大差异(图 1)。通过分析 20 余个标本的蛋白水解酶活性发现,根状茎的蛋白水解酶谱比叶更稳定,这可能是由于根状茎生长在地下,不易受环境、气候、昼夜变化、生理代谢等因素影响。叶则不然,随时随地都受到各种环境因素影响,即是用同一植株不同位置叶片或同一叶片的不同部分,蛋白水解酶的种类和含量也有差异(未出示照片)。由此可见,将蛋白水解酶种类、含量和活性作为鉴定植物和研究不同植物亲缘关系的参考指标时,选用生理和代谢相对稳定、不易受环境影响的器官作材料是必要的。

分子分类学是一门新的学科,在分子分类学的诸多方法中,应用同工酶进行生物亲缘关系与分类学研究的报道很多^[30],曾樵等报道过用植物叶蛋白质双向电泳结合微机分析系统研究椴木属(*Aralia*)植物的系统演化^[4],王莹等报道过以蛋白水解酶进行经济海藻分类学研究^[5]。理论上,被选择的对象所含的可选择参数越多,越易作为分类依据,与同工酶相比,蛋白水解酶的种类、功能、生理作用要比同工酶多许多,而它们的种类上又比蛋白质少和易分析,因此,用蛋白水解酶作分类的参考指标,将有助于鉴定物种亲缘关系和分析物种系统演化。例如,本研究采集到的黄精属 20 多个标本中,有 4 个标本依据形态和结构特征既可归并到这个种,又可归并到那个种的标本,若参考它们的蛋白水解酶谱,有助于上述问题的解决。

应当指出,本文只是以花期植物根状茎和叶为材料,数量上也只是黄精属植物 5 个种、20 余个标本的研究结果,尚未对其它种(中国的 30 多种、世界的 40 多种)、不同生活期、不同器官和不同地域材料作系统分析与比较。只有系统的完成这些工作后,才能准确评价蛋白水解酶谱在植物分类学方面的参考价值。

参考文献:

[1] 中国科学院植物研究所. 中国植物志[M]. 北京: 科学出版社, 1978. 15: 52~81

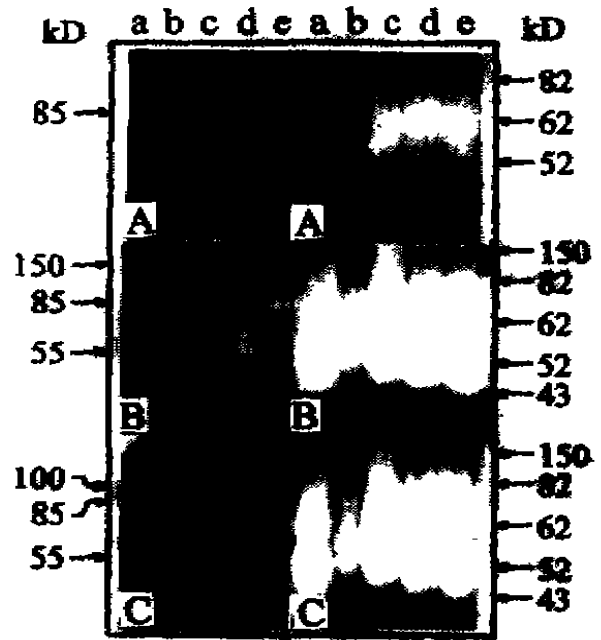


图 1 用 G-PAGE 分析五种黄精属植物根状茎的蛋白水解酶活性
A. pH3.5; B. pH7; C. pH8.5; n. 玉竹; b. 轮叶黄精;
c. 卷叶黄精; d. 湖北黄精; e. 黄精。

图 2 用 G-PAGE 分析五种黄精属植物叶的蛋白水解酶活性
A. pH3.5; B. pH7; C. pH8.5; a. 玉竹; b. 轮叶黄精;
c. 卷叶黄精; d. 湖北黄精; e. 黄精。

Fig. 1 Using G-PAGE to analyze the proteinase activities in rhizome of five species in *Polygonatum*
A. pH3.5; B. pH7; C. pH8.5; n. *Polygonatum odoratum*;
b. *Polygonatum verticillatum*; c. *Polygonatum cirrhifolium*;
d. *Polygonatum zanzlanianense*; e. *Polygonatum sibiricum*.

Fig. 2 Using G-PAGE to analyze the proteinase activities in leaves of five species in *Polygonatum*
A. pH3.5; B. pH7; C. pH8.5; a. *Polygonatum odoratum*;
b. *Polygonatum verticillatum*; c. *Polygonatum cirrhifolium*;
d. *Polygonatum zanzlanianense*; e. *Polygonatum sibiricum*.

- [2] 张君增,方起程,梁晓天等.从化学成分探讨白豆杉属的系统位置[J].植物分类学报,1996,34(3):282~287
- [3] 唐延林,方宗熙.过氧化物同工酶在海带和裙带菜各部分分布的初步研究[J].山东海洋学研究学报,1982,12(2):47~50
- [4] 增 樵,文 军,Hedges K L *et al.* Computer-based profile analysis in *Aralia* (Araliaceae)[J]. *Cathaya*, 1993, 17(5):69~79
- [5] 王 莹,李效宇,徐存拴等.海带、裙带菜和紫菜蛋白酶谱的研究[J].植物学报(97年4月接受)
- [6] Cuoshuan Xu, Fracella F, Landsberg C R *et al.* Stress Response of Lysosomal Cysteine Proteinases in Rat C6 Glioma Cells. *Comp. Biochem. Physiol.*, 1997, 117B(2):169~178
- [7] Hüt W, Wolf D H. Stress-induced proteolysis in yeast[J]. *Mol. Microbiol.*, 1992, 6:2437~2442
- [8] Neuhoff V, Philipp K, Zimmer H G. A Simple, versatile, sensitive and volume-independent method for quantitative protein determination which is independent of other external influences[J]. *Hoppe-Seylan's Z. Physiol. Chem.*, 1979, 360:1657~1670
- [9] Neuhaus-Steinmetz U, Xu C S, Fracella F *et al.* Heat shock response and cytotoxicity in C6 rat glioma Cells: structure-activity relationship of different alcohols[J]. *Mol. Pharmacology*, 1994, 45:36~41
- [10] Cheney D P, Babbel G R. Biosystematic Studies of the Red Algal Genus *Eucheuma* I. Electrophoretic Variation Among florida Populations[J]. *Marine Biology*, 1978, 47:251~264

声 明

为适应我国信息化建设需要,扩大作者学术交流渠道,本刊已加入《中国学术期刊(光盘版)》和“中国期刊网”。作者著作权使用费与本刊稿酬一次性给付。如作者不同意将文章编入该数据库,请在来稿时声明,本刊将做适当处理。