

三叶木通可溶性蛋白及同工酶分析

★ 黄佩蓓* 曹岚 彭海琳 欧阳永伟 (江西中医学院 南昌 330006)

摘要:采用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术对三叶木通可溶性蛋白及同工酶进行初步研究。结果表明,各样品的蛋白质、同工酶酶谱有共有带,但酶带数量与活性强度有差异;POD同工酶差异明显,可作为品种鉴定的生化指标。

关键词:聚丙烯酰胺凝胶电泳;三叶木通;可溶性蛋白;同工酶

中图分类号:R 927.2 文献标识码:A

Soluble Protein and Isoenzyme Analysis of *Akebia trifoliata* Koidz.

HANG Pei-bei, CAO Lan, PENG Hai-ling, OUYANG Yong-wei

Jiangxi University of Traditional Chinese Medicine, Jiangxi Nanchang 330004

Abstract: Polyacrylamide gel electrophoresis were used to analyze the soluble protein and isoenzyme of *Akebia trifoliata* Koidz. The results showed that the soluble proteins and isoenzymes, there are same band with, but the quantity of band and activity of enzymes with different intensity; POD isozyme differences, can be used as biochemical indicators of species identification.

Key words: Polyacrylamide gel electrophoresis; *Akebia trifoliata* Koidz.; soluble protein; isoenzyme

三叶木通(*Akebia trifoliata* Koidz.)为木通科木通属落叶木质藤本植物,是《中华人民共和国药典》收录的珍稀濒危中药材原植物^[1],广泛分布于江西、浙江、湖南、四川、贵州、湖北等省^[2]。其根、茎有清热利尿、通经活络、止血止带作用;果实、果皮有疏肝补肾及理气止痛功效。中药上配伍很广,能治疗多种疾病。但长期野生,作为濒危、紧缺中药材,为扩大药源,近年逐渐由野生转变为人工栽培^[3]。本研究采用聚丙烯酰胺凝胶电泳,对其可溶性蛋白、POD、SOD同工酶进行了初步研究,以其为引种驯化栽培提供理论依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

栽培三叶木通新鲜叶片采自江西南昌市抚生路江西中医学院科技学院植物园,2008年4月采集的新叶片记为“抚新”;2008年11月采集的老叶片记为“抚老”;野生三叶木通新鲜叶片采自江西南昌市梅岭风景区,共3个样品,2009年4月采集的新叶片记为“梅1新”、“梅2新”、“梅3新”,2008年11月采集的老叶片记为“梅1老”;“梅1新”和“梅1老”为同一植株叶片。叶片冷冻保鲜。究植物基因

表达调控与生。

1.2 蛋 白 质 电 泳^[3]

1.2.1 样品制备 取新鲜叶片0.5g,除叶柄剪碎置于研钵中,加1ml pH 8.8的电极缓冲液研磨成匀浆,再加缓冲液2ml,室温下放置半小时后,3000 r/min离心15 min,取上清液,加入等体积的40%蔗糖溶液,再加入1/5体积的溴酚蓝指示液,摇匀放入冰箱中保存待用。

1.2.2 电泳与染色^[3] 采用4%浓缩胶与14%分离胶制备凝胶板。吸取样品提取液30 μl,缓缓注入样品槽底部,电泳开始时稳压150 V,样品进入分离胶后,稳压250 V,待示踪指示剂行至距琼脂层约1 cm时,停止电泳。胶板浸于考马斯亮蓝染色液中,37℃染色1~2 h,至谱带清晰。

1.3 POD同工酶电泳^[4]

1.3.1 样品制备 取新鲜叶片0.5g,除叶柄剪碎置于研钵中,加1ml预冷的电极缓冲液(pH 8.3),在冰浴上研磨成匀浆,再加缓冲液2ml,冰浴中放置半小时后,在0℃条件下10 000 r/min冷冻离心15 min,取上清液,分别加入等体积的40%蔗糖溶液,再加入1/5体积的溴酚蓝指示液,摇匀放入冰箱中

* 作者简介:黄佩蓓(1964-),女,副教授,硕士,Tel:13870659981,E-mail:hphpei@tom.com。

保存待用。

1.3.2 电泳与染色 4%浓缩胶与8.5%分离胶制备凝胶板。电泳方法同上。采用抗坏血酸-联苯胺染色法,先出现清晰的蓝色谱带,随时间延长,过氧化物酶谱变为红褐色。

1.4 SOD同工酶电泳

1.4.1 样品制备 称取新鲜叶片0.5g,除叶柄剪碎置于研钵中,加1ml预冷的0.05mol/L磷酸缓冲液(pH7.8),在冰浴上研磨成匀浆,然后再加缓冲液使终体积为5ml,在0℃条件下10000r/min冷冻离心20min,取上清液,分别加入等体积的40%蔗糖溶液,再加入1/5体积的溴酚蓝指示液,摇匀放入冰箱中保存待用。

1.4.2 电泳及染色 4%浓缩胶与10%分离胶制备凝胶板。电泳方法同上。采用负染色法。

2 结果与分析

三叶木通叶片可溶性蛋白出现14条谱带,谱带的迁移率处于0.019~0.925之间。不同种源和不同发育时期各样品叶片可溶性蛋白电泳谱带基本相似,但存在谱带数量和蛋白质质量上的差异。(见图1,表1)

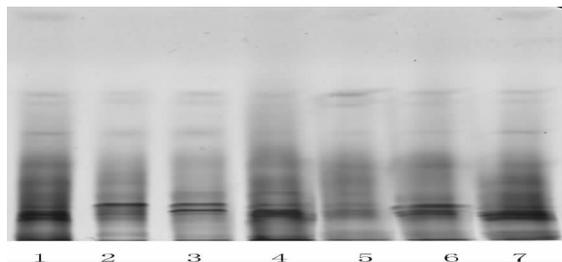


图1 蛋白质电泳图谱

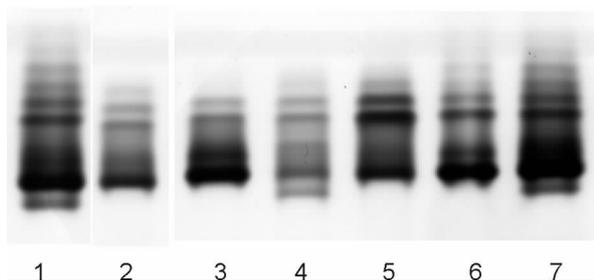


图2 POD同工酶电泳图谱

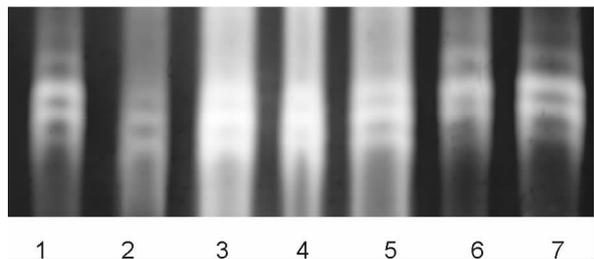


图3 SOD同工酶电泳图谱

1“抚老”2“抚新”3“梅3新”4“梅2新”5“梅1新”6“梅老”7“抚老”

三叶木通叶片POD同工酶出现10条酶带,谱带的迁移率处于0.151~0.344之间,其中R_f值分别为0.151、0.172、0.237和0.258的带活性强,色深、较稳定,染色时最先出现,R_f值为0.323和0.344酶带活性较弱。老叶片出现9条酶带,栽培老叶片比野生老叶片少一条R_f值为0.151的酶带;新叶片酶带数明显比老叶片的少,普遍只出现5~6条活性相对强的酶带,而活性相对弱的酶带在老叶中出现在新叶中则没有出现;并且不同种源除栽培“抚新”与野生“梅3新”酶谱相同外,其余种源新鲜叶片“梅1新”、“梅2新”、“梅3新”POD酶谱特征各不相同,相互可以区别开来。(见图2,表1)

三叶木通叶片SOD同工酶出现4条酶带,其迁移率处于0.306~0.400之间,其中R_f值分别为0.334和0.367的带活性强,色深、带宽。R_f值为0.334、0.367、0.400的三条酶带为所有种源共有,栽培老叶片与野生老叶片酶谱特征相同,栽培新叶片与野生新叶片酶谱特征相同,但所有老叶片都比新叶片多一条R_f值为0.400的酶带。(见图3,表1)

表1 三叶木通各样品叶片可溶性蛋白、POD、SODR_f值比较

类型	酶带编号	R _f 值	种源						
			抚老	梅1老	梅1新	梅2新	梅3新	抚新	抚老
可溶性蛋白	1	0.019	+	+	+	+	+	+	+
	2	0.033	+	+	+	+	+	+	+
	3	0.090	+	-	-	+	-	+	+
	4	0.108	+	+	+	+	+	+	+
	5	0.123	+	-	+	+	+	+	+
	6	0.142	+	+	+	+	+	+	+
	7	0.170	+	+	-	+	+	+	+
	8	0.189	+	-	+	+	-	-	+
	9	0.241	+	-	+	-	-	-	+
	10	0.311	+	+	+	+	+	+	+
	11	0.443	+	+	+	+	+	+	+
	12	0.566	+	+	+	+	+	+	+
	13	0.604	+	+	+	+	+	+	+
	14	0.925	+	-	+	+	-	-	+
POD	1	0.151	+	-	-	+	+	+	+
	2	0.172	+	+	+	+	+	+	+
	3	0.204	+	+	-	-	-	-	+
	4	0.235	-	-	-	+	-	-	-
	5	0.237	+	+	-	+	+	+	+
	6	0.258	+	+	+	+	+	+	+
	7	0.280	+	+	+	+	+	+	+
	8	0.301	+	+	+	-	-	-	+
	9	0.323	+	+	+	-	-	-	+
	10	0.344	+	+	-	-	-	-	+
SOD	1	0.306	+	+	-	-	-	-	+
	2	0.344	+	+	+	+	+	+	+
	3	0.367	+	+	+	+	+	+	+
	4	0.400	+	+	+	+	+	+	+

3 小结

从结果可以看出:不同种源和不同发育时期各样品叶片可溶性蛋白电泳谱带基本相似,但存在谱带数量和蛋白质质量上的差异;三叶木通叶片POD同工酶活性比SOD同工酶的强;不同发育时期同一生

黄芩苷纳米粒制备方法的初步研究*

★ 卢燕香^{1**} 张海燕¹ 郭兆荣^{1,2} 付丽娜¹ 陈晓燕¹ 张明令¹ 杨明^{1***} (1. 江西中医学院现代中药制剂教育部重点实验室 南昌 330004; 2. 赣南医学院 赣州 341000)

摘要:目的:建立乳化溶剂挥发法制备黄芩苷纳米粒的方法。方法:以聚乳酸-羟基乙酸(PLGA)为材料,采用乳化溶剂挥发法,对黄芩苷原料药进行包合制备纳米粒并对制备工艺进行了初步的研究。结果:以浓度为10 mg/ml的聚合物,pH值7.0的磷酸盐缓冲液作为内水相,油相中加入丙酮制成的纳米粒粒径可控、包封率可达50%以上。结论:该方法制成的纳米粒较稳定,重复性好,可作为制备黄芩苷纳米粒的一项新工艺。

关键词:黄芩苷纳米粒;乳化溶剂挥发法;制备工艺

中图分类号:R 944.1 文献标识码:A

Preliminary Study on Preparation Method of Baicalin Nanoparticles

LU Yan-xiang¹, ZHANG Hai-yan¹, GUO Zhao-rong^{1,2}, FU Li-na¹, CHEN Xiao-yan¹, ZHANG Ming-ling¹, YANG Ming¹

1. Key Laboratory of Modern Preparation of Traditional Chinese Medicine, Nanchang 330004;

2. Gannan Medical College, Ganzhou 341000

Abstract: Objective: To develop an emulsion solvent evaporation technique for the preparation of Baicalin nanoparticles. Methods: Baicalin nanoparticle was prepared by emulsion solvent evaporation method using Poly lactic acid - glycolic acid (PLGA) for the material. Results: The nanoparticles prepared by emulsion solvent evaporation technique were round and uniform in size with Polymer concentration of 10mg/ml and pH7.0 (PBS) solution as the inner water phase and the oil phase by adding acetone. The drug encapsulation efficiency of most preparations were more than 50%, and there particle size could be controlled. Conclusions: The Baicalin nanoparticle thus prepared is stable. The method is a new technology for preparing the Baicalin nanoparticles.

Key word: Baicalin nanoparticle; emulsion solvent evaporation technique; Preparation technology

境三叶木通各样品叶片的POD同工酶差异明显,酶谱带数先少后多,充分体现了同工酶具有阶段特异性;同一发育时期不同生境下三叶木通各样品叶片POD同工酶也有明显差异,反映其对不同生态环境的适应性,POD可作为品种鉴定的生化指标;同一发育时期不同生境三叶木通各样品叶片的SOD同工酶酶谱表现一致,不同发育时期同一生境下三叶木通各样品叶片SOD同工酶酶谱有些微差异,也即三叶木通各样品叶片的SOD同工酶较稳定。

聚丙烯酰胺凝胶电泳技术操作简便,重现性好,

电泳谱带稳定可靠,可应用于三叶木通的种质分析。

参考文献

- [1] 刘占朝. 三叶木通研究进展综述[J]. 河南林业, 2005, 25(1): 20-22.
- [2] 庞发虎, 赵旗峰, 张俊民, 等. 一种值得开发的野生果树——三叶木通[J]. 山西果树, 2002, 7(3): 25.
- [3] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册[M]. 北京: 科学出版社, 2000.
- [4] 胡能书, 万国贤. 同工酶技术及其应用[M]. 长沙: 湖南科学技术出版社, 1985.

(收稿日期: 2009-08-03)

* 基金项目: 江西省卫生厅中医科研计划(赣卫中字[2007]20号); 江西省教育厅科学技术研究项目(GJJ08335)

** 作者简介: 卢燕香, 女, 汉族, 硕士研究生, 研究方向为中药新剂型。

*** 通讯作者: 杨明, 男, 教授, 博士生导师, 从事中药新剂型与新制剂的研究。Tel: 0791-7118658, E-mail: yangming16@126.com。