

5 年生人参出苗期几种脱氢酶活力比较

刘宏, 赵雨*, 邢楠楠, 张惠, 刘海龙(长春中医药大学研发中心, 长春 130117)

摘要: 目的 对 5 年生人参出苗期参根和参苗中苹果酸脱氢酶(malate dehydrogenase, MDH)、乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)、乙醇脱氢酶(Alcohol dehydrogenase, ADH)、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PDH)、 α -磷酸甘油脱氢酶(α -glycerophosphate dehydrogenase, α -GPD)5 种脱氢酶的活力进行比较。方法 采用中性缓冲液提取粗酶液, 应用分光光度法测定 MDH, LDH, ADH, G6PDH, α -GPD 的活力。结果 在人参出苗期, 参根和参苗中的 5 种脱氢酶活力变化趋势有所不同, 并在不同时期出现峰值。结论 MDH, LDH, ADH, G6PDH, α -GPD 的活力可以作为人参生长过程中长势优劣的评价指标。

关键词: 人参; 脱氢酶; 出苗期

中图分类号: R284.2

文献标志码: B

文章编号: 1007-7693(2012)02-0122-05

Comparison of Dehydrogenase Activity in 5-year Ginseng during Seedling Stage

LIU Hong, ZHAO Yu*, XING Nannan, ZHANG Hui, LIU Hailong(Research and Development Center of Changchun University of Chinese Medicine, Changchun 130117, China)

ABSTRACT: OBJECTIVE To compare the activities of malate dehydrogenase (MDH), lactate dehydrogenase (LDH), alcohol dehydrogenase (ADH), glucose-6-phosphate dehydrogenase (G6PDH) and α -Glycerophosphate dehydrogenase (α -GPD) in 5-year Ginseng Radix in seedling stage. **METHODS** Adopt neutral buffer solution to extract the coarse enzyme. Use spectrophotometry to test the activities of MDH, LDH, ADH, G6PDH, α -GPD. **RESULTS** In seedling stage of Ginseng Radix, there were different changes trends of these five dehydrogenase in root and sprout. And there were peak values in different stages. **CONCLUSION** The activities of MDH, LDH, ADH, G6PDH, α -GPD can be used as the evaluation indicators of quality of Ginseng Radix.

KEY WORDS: Ginseng Radix; dehydrogenase; seedling stage

人参(*Panax ginseng* C. A. Meyer)是五加科多年生草本植物人参的干燥根, 是我国名贵中药材之一。人参具有大补元气、复脉固脱、补脾益肺、生津安神的功效^[1]。研究表明人参中主要含有人参皂苷、蛋白质、挥发油、有机酸、多糖、氨基酸等有效成分, 且对人参中各种酶的研究也有相关报道^[2-3]。

脱氢酶是一类催化物质进行氧化还原反应的酶, 属于六大酶类中的第一大酶类, 生物体中绝大多数氧化还原反应都是在脱氢酶及氧化酶的催化下进行。物质经脱氢酶催化, 最终通过氧化磷酸化生成腺苷三磷酸(ATP), 是异养生物体取得能量的主要途径。脱氢酶在植物中广泛存

在, 并在植物的生长发育过程中起着十分重要的作用。

人参1年中的生长共分为6个物候期: 出苗期、展叶期、开花期、绿果期、红果期和枯萎期。其中出苗期是人参生长最初阶段, 也是其生长发育较剧烈的时期。连续考察此时人参中各种氧化还原酶的活力变化, 可以作为人参长势优劣的评价指标, 对人参生长发育有更进一步的了解。

1 材料与试剂

1.1 材料

实验所用的新鲜人参采自吉林农业大学人参种植园, 经长春中医药大学研发中心姜大成教授

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30873371); 国家科技支撑计划资助项目(2007BAI38B02)

作者简介: 刘宏, 女, 硕士生 Tel: 15643062722
Tel: (0431)86172300 E-mail: cnzhaoyu@yahoo.com.cn

E-mail: hong70790@163.com

*通信作者: 赵雨, 男, 博士, 教授

鉴定,均为五加科植物 *Panax ginseng* C.A.Mey.,符合中国药典 2010 年版一部的规定。在 5 年生人参的出苗期,每隔 3 日采样 1 次,即自 2010 年 5 月 9 日起至 2010 年 5 月 24 日止。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器 DT100 电子天平(常熟市双杰测试仪器厂);TA1203N 电子天平(上海精密科学仪器有限公司);UV-2550 紫外分光光度计(日本岛津公司);电热恒温水浴锅(北京市永光明医疗仪器厂);TDL-5 型台式大容量离心机(上海安亭科学仪器厂);Mini 高速离心机(Eppendorf 公司);DS21 型高速组织捣碎机(上海标本模型厂);LL3000 型冷冻干燥机(德国 Heto 公司)。

1.2.2 试剂 NADH、NAD⁺、NADP(美国 Genview 公司);草酰乙酸(Johnson Matthey 公司);丙酮酸、双甘肽(北京鼎国生物技术有限责任公司);葡萄糖-6-磷酸(上海晶纯试剂有限公司);MgCl₂(北京化工厂); α -磷酸甘油钠(美国 Sigma 公司),所用试剂均为分析纯。

2 方法

2.1 取样

每隔 3 日,在上午 8:00—9:00,随机取样约 10 株,立即带回实验室,用水洗净,用滤纸吸干表面水分,称重。

2.2 样品的制备

随机取人参 3 支,将参根与参苗分离,分别分装于两支试管,以 1:4 的料液比加入一定体积预冷的 pH 7.4 0.05 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液,匀浆,置 4℃ 下浸提 20 min,过滤,于 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,吸取上清液,即得测定用粗酶液。

2.3 苹果酸脱氢酶(malate dehydrogenase, MDH)活力测定^[4-5]

用 0.2 mol·L⁻¹(pH 7.5)磷酸盐缓冲液 2.9 mL,在 340 nm 处将吸光度值调节至 0;比色杯中依次加入 0.006 mol·L⁻¹ 草酰乙酸溶液 0.1 mL,0.003 75 mol·L⁻¹ NADH 溶液 0.2 mL,加缓冲液至 2.9 mL,加入酶液 0.1 mL,立即计时,连续测定,计算 $A_{340\text{ nm}}$ 每分钟减少值。以 1 min 内 $A_{340\text{ nm}}$ 下降 1.0 为 1 g 鲜参中 MDH 的 1 个酶活力单位(U)。

2.4 乳酸脱氢酶(lactate dehydrogenase, LDH)活力测定^[6]

配制 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液(pH 7.5)。

NADH 溶液:称 3.5 mg NADH,加磷酸缓冲液 1 mL 溶解。丙酮酸溶液:称 2.5 mg 丙酮酸钠,加磷酸缓冲液 29 mL 溶解。用磷酸缓冲液 3 mL 在 340 nm 处将光吸收调节至 0;比色杯中依次加入丙酮酸钠溶液 2.9 mL, NADH 溶液 0.1 mL,酶液 0.1 mL,立即计时,连续测定,计算 $A_{340\text{ nm}}$ 每分钟减少值。以 1 min 内 $A_{340\text{ nm}}$ 下降 0.01 为 1 g 鲜参中 LDH 的 1 个酶活力单位(U)。

2.5 乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase, ADH)活力测定^[7]

取 1.0 mol·L⁻¹ 的 Tris-HCl(pH 8.0)15 mL,0.01 mol·L⁻¹ NAD⁺ 3 mL,82 mL 蒸馏水配制成 100 mL 反应液。比色杯中加入蒸馏水 3 mL,在 340 nm 处将光吸收调节至 0;比色杯中依次加入反应溶液 2.85 mL,酶液 0.1 mL,0.03 mL 95%乙醇,立即计时,连续测定,计算 $A_{340\text{ nm}}$ 每分钟减少值。以 1 min 内 $A_{340\text{ nm}}$ 下降 0.001 为 1 g 鲜参中 ADH 的 1 个酶活力单位(U)。

2.6 葡萄糖-6-磷酸脱氢酶(glucose-6-phosphate dehydrogenase, G6PDH)活力测定^[8]

向试管中依次加入 0.05 mol·L⁻¹ 双甘肽缓冲液(pH 8.0)0.5 mL,0.02 mol·L⁻¹ MgCl₂ 溶液 1.0 mL,0.000 6 mol·L⁻¹ NADP 溶液 0.5 mL,酶液 0.5 mL,将试管置于 38℃ 水浴中,反应 10 min 后取出,将此反应液转入比色杯中,再加入 0.005 mol·L⁻¹ 葡萄糖-6-磷酸二钠盐溶液 1.0 mL,立即计时,连续测定,计算 $A_{340\text{ nm}}$ 每分钟减少值。以 1 min 内 $A_{340\text{ nm}}$ 下降 0.01 为 1 g 鲜参中 G6PDH 的 1 个酶活力单位(U)。

2.7 α -磷酸甘油脱氢酶(α -glycerophosphate dehydrogenase, α -GPD)活力测定^[9]

配制含有 α -磷酸甘油钠 1.02 g, NAD⁺ 30 mg 的 0.025 mol·L⁻¹ pH 10.0 甘氨酸-NaOH 缓冲液 60 mL,即为反应液。取反应液 3 mL,于 25℃ 保温 3 min,加入酶液 0.3 mL,立即计时,连续测定,计算 $A_{340\text{ nm}}$ 每分钟减少值。以 1 min 内 $A_{340\text{ nm}}$ 下降 0.01 为 1 g 鲜参中 α -GPD 的 1 个酶活力单位(U)。

3 结果

3.1 人参鲜重变化

人参参根在出苗期前期生长迅速,而从第 6 天开始参根重有所下降,之后增长缓慢。参苗重量一直呈上升趋势。结果见表 1。

表 1 人参出苗期参根和参苗的鲜重变化($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

Tab 1 The weight changes of the ginseng root and sprout in seedling stage($\bar{x} \pm s$, $n=3$)

人参部位	时间					
	第 1 天	第 3 天	第 6 天	第 9 天	第 12 天	第 15 天
参根/g	5.78±1.64	10.15±1.83	18.83±5.02	18.19±3.53	18.82±4.28	25.11±1.92
参苗/g		0.55±0.25	3.36±0.76	6.78±1.18	10.92±1.87	20.11±5.21

3.2 MDH 活力测定

出苗期开始阶段, 参根中 MDH 活力增长缓慢, 出苗期的第 9 天, 酶活力出现峰值, 为 $57.65 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ 。参苗在刚出土时 MDH 活力最高, 为 $85.25 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$, 随后逐渐下降。结果见图 1。

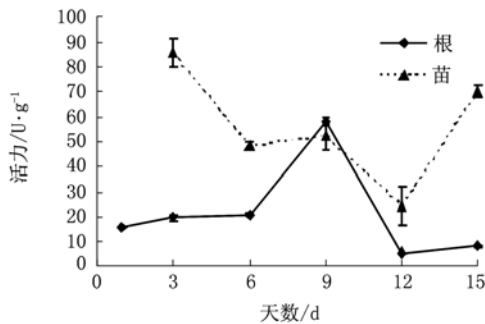


图 1 MDH 活力

Fig 1 The activity of MDH

3.3 LDH 活力测定

参根中 LDH 活力总体呈缓慢上升趋势, 并在出苗期第 9 天出现峰值, 为 $28.60 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ 。在参苗中 LDH 活力在第 9 天后下降。结果见图 2。

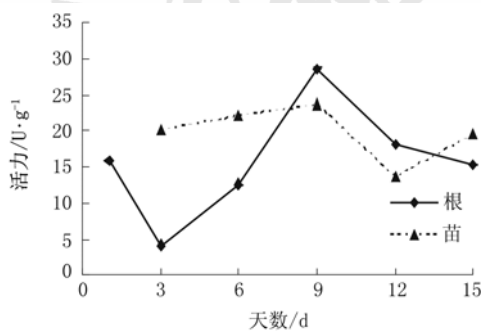


图 2 LDH 活力

Fig 2 The activity of LDH

3.4 ADH 活力测定

参根中 ADH 活力变化不大。参苗中 ADH 活力在第 6 天出现峰值, 为 $629.55 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$, 是参根中活力的 5~6 倍, 随后参根中活力与参苗中活力基本相同。结果见图 3。

3.5 G6PDH 活力测定

参根中 G6PDH 活力在第 1 次测定出现峰值后活力下降, 变化不大。参苗中 G6PDH 活力明显高

于参根中活力($P>0.05$), 达到参根中活力的 10 倍之多, 参苗中 G6PDH 活力有一定的波动, 总体趋势上升。结果见图 4。

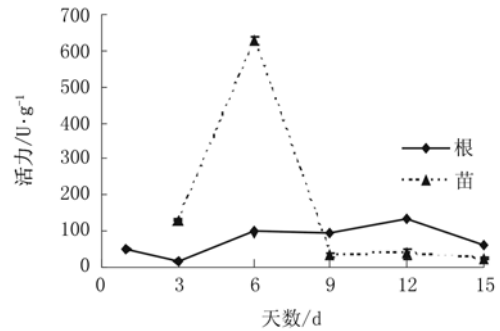


图 3 ADH 活力

Fig 3 The activity of ADH

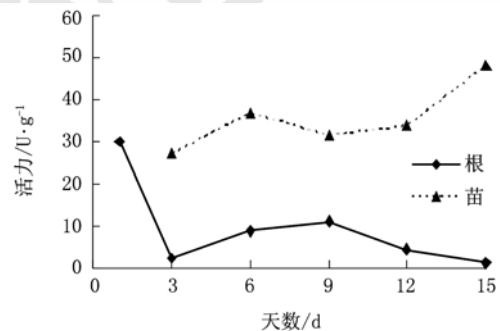


图 4 G6PDH 活力

Fig 4 The activity of G6PDH

3.6 α -GPD 活力测定

参根中 α -GPD 活力波动较小, 在第 15 天出现最大值。其活力在参苗中自第 9 天起迅速上升, 并在出苗期最后一天达到峰值, 为 $82.97 \text{ U} \cdot \text{g}^{-1}$ 。结果见图 5。

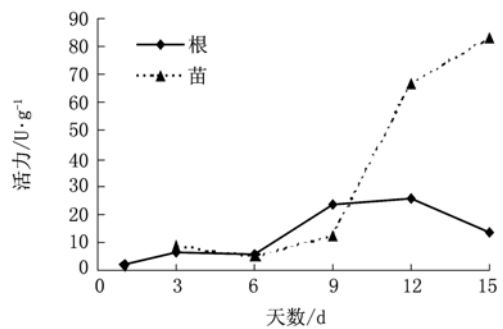


图 5 α -GPD 活力

Fig 5 The activity of α -GPD

4 讨论

4.1 人参鲜重变化

由人参鲜重变化趋势可知, 人参刚刚萌芽时, 参根吸收土壤中的大量养分和水分, 处于迅速生长的阶段。从第 6 天开始, 参苗长出地面之后, 由于叶片没有完全长成, 光合作用不够强, 而地上部分的生长需要大量营养, 所以参根的养分向上运输给参苗, 用以生长茎叶, 所以人参出苗期中后期, 参根生长变缓。

4.2 MDH

MDH 普遍存在于动物、植物、细菌等各种生物体中, 是生物糖代谢的关键酶之一, 它可催化草酰乙酸盐转化为苹果酸盐, 增加植物体内苹果酸的含量, 从而显著提高植物体的耐酸性、耐铝性^[10-11]。人参参苗出土之前, 参苗中 MDH 活力很高, 可能是为了抵抗酸性土壤中铝毒的影响, 而出土之后, 参苗离开酸性环境, 所以 MDH 水平趋于平缓。而随着人参的生长, 土壤的酸性会逐渐增强, 参根 MDH 活力也随之缓慢升高。测量 MDH 在人参中的活力, 可以了解土壤中铝的含量, 从而通过控制铝的含量使人参免受铝毒的影响。

4.3 LDH

LDH 是催化乳酸和丙酮酸相互转换的酶, 是糖代谢过程的关键酶^[5]。LDH 活力在第 9 天之后下降, 可能是由于第 9 日之前, 参苗还未破土, LDH 能够使糖酵解途径在无氧或缺氧条件下得以持续, 并且参苗中 LDH 活力高于参根中活力, 为参苗的生长提供大量的能量。

4.4 ADH

ADH 可以催化乙醇脱氢产生 NADH, 保护植物, 减少乙醇对植物体的侵害, 它也一定程度地反应了植物对渍水胁迫的耐受性^[12]。ADH 活力在第 6 天突然升高, 可能与当日是阴雨天气有关, 人参受水淹情况严重。由于参根与参苗组织结构不同, 参苗受环境影响比参根大, 故其活力升高很明显。通过测量 ADH 可以了解土壤的渍水情况, 改善人参水淹环境, 从而减少人参患病几率。

4.5 G6PDH

G6PDH 是磷酸戊糖途径的关键酶, 它可以为脂肪酸合成、氮还原和谷胱甘肽等生物分子合成提供还原能力 NADPH, 也为核酸合成提供戊糖, 参加非生物逆境胁迫应答反应^[13]。人参刚发芽时, G6PDH 为脂肪酸合成和氮还原提供

NADPH, 从而提高脂肪酸合成效率, 为机体提供大量能量, 用于参苗的生长。通过测定 G6PDH 的活力, 可监测人参中的供能情况。

4.6 α -GPD

α -GPD 是甘油代谢和磷脂合成途径中起重要作用的酶; 同时, 其活性又与细胞对环境渗透压的耐受性有关^[14]。在人参出苗期后期由于气温的升高(气温由前次取样时的 25 °C 上升为 30 °C)导致细胞处于高渗环境, 故其 α -GPD 活力有所升高。 α -GPD 活力反应了人参生长环境的渗透压高低, 可以通过测量其活力, 改善高渗或低渗环境, 以保持人参细胞内外渗透压平衡, 提高人参质量。

人参中存在多种脱氢酶, 通过测定各种脱氢酶的活力可以得知人参生长环境中铝盐含量、渍水情况、渗透压高低以及代谢、供能情况等, 从而了解人参的生长环境, 作为人参长势优劣的评价指标。

REFERENCES

- [1] YAO B J, ZHAO Y, YANG S H, et al. Ginseng extraction of total proteins [J]. J Chin Med Mater(中药材), 2009, 32(2): 293-295.
- [2] XING N N, ZHAO Y, LIU H. Comparison of activities of amylase, esterase, acid phosphatase in Ginseng Radix et Rhizoma from different origins and different growth periods [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2010, 27(1): 44-47.
- [3] XING N N, ZHAO Y, LIU H, et al. Changes of several hydrolase activities in the period of emergence in Ginseng Radix et Rhizoma [J]. Chin J Mod Appl Pharm(中国现代应用药理学), 2011, 28(5): 429-432.
- [4] WANG S Y, YE X Y, RAO P F. Research malate dehydrogenase of mung bean in the nature and evolution [J]. J Chin Ins Food Sci Technol(中国食品学报), 2006, 6(1): 262-265.
- [5] LIU G Q. Studies on malate dehydrogenase activity of rabbits and mice in different tissues [J]. Acta Sci Nat Univ Nankaiensis(Nat Sci Ed)(南开大学学报: 自然科学版), 2005, 38(5): 44-47.
- [6] ZHOU J. Studies on purification and properties of lactate dehydrogenase [J]. J Chifeng Univ(Nat Sci Ed)(赤峰学院学报: 自然科学版), 2009, 25(9): 111-113.
- [7] Shanghai Institute of Plant Physiology, Chinese Academy of Sciences. Experimental Guide of Modern Plant Physiology(现代植物生理学实验指南) [M]. Vol 5. Beijing: Science Press, 2004: 312-312.
- [8] CHEN Y P, LIU H L. Study brassica rape seed oil accumulation and relationship between physiological changes [J]. J Wuhan Bot Res(武汉植物学研究), 1995, 13(3): 240-246.
- [9] BIAN Z N, XU J D, ZHOU J Y, et al. Study purification and properties of α -glycerophosphate dehydrogenase [J]. Chin J

- Pharm(中国医药工业杂志), 1990, 21(6): 241-244.
- [10] WANG X Y, BI Y F. Progress of plant malate dehydrogenase [J]. Biotechnol Bull(生物技术通报), 2006(4): 44-50.
- [11] WANG X Y, WANG B, HOU S T, et al. Structure and function of malate dehydrogenase [J]. J Bio(生物学杂志), 2009, 26(4): 69-72.
- [12] LIU X Z, WANG Z L, GAO Y Z. Maize roots under waterlogging stress alcohol dehydrogenase activity and the relationship between waterlogging tolerance [J]. Jiangsu J Agr Sci(江苏农业学报), 1991, 7(4): 1-7.
- [13] LIN Y Z, ZHANG Z Y, GUO H. Isolation and analysis of glucose-6-phosphate dehydrogenase(G6PDH) promoter from poplar [J]. Gen Appl Bio(基因组学与应用生物学), 2009, 28(3): 445-449.
- [14] LUO Y P, LI Y S, CHEN S Y. Characterization of α -glycerophosphate dehydrogenase (α -GPD) variant and genetic analysis of its osmotic sensitivity in yeast *saccharomyces cerevisiae* [J]. Acta Bio Exp Sin(实验生物学报), 1991, 24(4): 377-384.

收稿日期: 2011-05-09