

# 中药红曲基原真菌的酯酶同工酶分析\*

邢旺兴<sup>1</sup> 宓鹤鸣<sup>1</sup> 陈士景<sup>2</sup> 程荣珍<sup>3</sup>

(第二军医大学药学院药物分析教研室 上海 200433)<sup>1</sup> (解放军117医院药剂科 杭州 310013)<sup>2</sup>

(杭州尖峰德康药业有限公司 杭州 310023)<sup>3</sup>

**摘要:** 探讨中药红曲基原真菌的同工酶分析方法。用凝胶电泳法分析7种红曲霉菌的胞内和胞外酯酶同工酶,模糊聚类法分析供试菌间的亲缘关系。红曲霉的酯酶同工酶胞内酶明显多于胞外酶,种间存在明显差异。同工酶分析可以作为红曲霉菌传统分类的重要辅助手段。

**关键词:** 红曲,红曲霉菌,同工酶,分类

**中图分类号:** Q93.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0253-2654(2000)06-0437-04

## ANALYSIS OF ESTERASE ISOENZYME OF THE ORIGIN FUNGI OF THE CHINESE TRADITIONAL MEDICINE HONGQU

XING Wang-Xing<sup>1</sup> MI He-Ming<sup>1</sup> CHEN Shi-Jing<sup>2</sup> CHENG Rong-Zhen<sup>3</sup>

(Department of Analysis, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433)<sup>1</sup>

(The 117th Hospital of PLA, Hangzhou 310013)<sup>2</sup>

(Hangzhou Jianfeng Dekang Pharmaceutic Limited Company, Hangzhou 310023)<sup>3</sup>

**Abstract:** Establish a analysis method of isoenzyme to classification of origin fungi of the Chinese traditional medicine, *Hongqu*. Established a gel electrophoresis method to analysis of esterase isoenzyme of 7 ordinary species *Monascus* and analyses the phylogenetic relationship by clustering analysis. The number of bands of intracellular isoenzyme of *Monascus* are more than that of extracellular isoenzyme. There exist obviously differences between species. The analysis of isoenzyme is a important secondary technique being able to using to classify and identify of *Monascus* fungi.

**Key words:** *Hongqu*, *Monascus*, Isoenzyme, Classification

结构差异而性质相同的同工酶是基因表达的产物,可作为遗传学上的一个生化指标<sup>[1]</sup>。同工酶电泳图谱作为化学分类方法之一已广泛应用于酯酶、过氧化氢酶、细胞色素氧化酶等,众多文献报道都证实了同工酶分析可应用于真菌的分类研究<sup>[2~8]</sup>。红曲是一种食疗兼备的传统中药,具有活血化痰、健脾消食等功效,近年来的研究发现,红曲具有降脂、降压、降糖和抑制

肿瘤生长等作用,成为国内外研究的热点之一<sup>[9]</sup>。长期以来,对中药红曲基原真菌的分类一直根据形态特征来进行,由于红曲霉属下分类的所有形态指标均受培养基质、温度等环境条件的影响,表现出较大的变异性,有些种的界

\* 解放军95'重点课题基金(No.96-Z-059)

收稿日期: 1999-07-05, 修回日期: 1999-09-20

限不明确,因此迫切需要建立更为客观、明确的分类方法,以弥补传统分类方法之不足。迄今尚未见国内外有关用酶谱技术进行红曲霉属真菌分类鉴定的报告,为此,我们用聚丙烯酰胺凝胶电泳对国内常见的7种红曲霉菌的胞内和胞外酯酶同工酶进行了比较研究,并用模糊聚类

分析了各供试红曲霉菌间的亲缘关系。

## 1 材料与方法

### 1.1 菌种

红曲霉菌标准株7种及同目的土曲霉1种,见表1。

表1 试验用红曲霉菌株及对照株

序号	菌株	种名	来源
1	橙色红曲霉5015	<i>Monascus aurantiacus</i> Lee	由汾酒酒曲分离
2	变红红曲霉5016	<i>M. serorubescens</i> Sato	由古田红曲米中分离
3	发白红曲霉5017	<i>M. albidus</i> Sato	大连科学研究所M171
4	巴克红曲霉5021	<i>M. barkeri</i> Dangerd	由广州酒曲分离M146
5	红色红曲霉5029	<i>M. ruber</i> van Tieghem	四川食品工业研究所3.530
6	紫红红曲霉5032	<i>M. purpureus</i> Went	上海工业微生物研究所M212
7	烟色红曲霉5035	<i>M. fuliginosus</i> Sato	由茅台酒厂分离
8	土曲霉9001	<i>Aspergillus terreus</i>	轻工业部食品微生物研究所

### 1.2 培养方法

1.2.1 培养基: 斜面: 麦芽汁琼脂培养基(pH5.5); 液体: 麦芽汁培养液(pH5.5)。

1.2.2 培养条件: 斜面菌种培养5d后,在菌落边缘处切取直径约0.5cm的菌丝块,每瓶移入一块,32℃下振荡培养7d。

### 1.3 样品制备<sup>[10]</sup>

抽滤收集菌丝。滤液低温浓缩后,测 $OD_{280}$ ,调节各样品蛋白质含量使成50mg/mL,低温保存,用于测定胞外酯酶。菌丝取出后,用蒸馏水冲洗3遍,再用真空泵抽滤除水,称湿重,在冰箱中冷冻过夜(-20℃),取300mg菌体,加1.5mL样品缓冲液(0.012mol/L Tris-Citric acid, pH8.3,用时加0.5mol/L蔗糖),再加100mg石英砂,冰浴研磨15min,10000r/min离心(4℃)15min,取上清液测 $OD_{280}$ ,调节各样品蛋白质含量一致,低温保存,用于测定胞内酯酶。

### 1.4 电泳

采用吴少伯介绍的方法进行<sup>[11]</sup>。分离胶浓度7.5%,pH8.9;浓缩胶浓度2.5%,pH6.7;加样量为80μL,电流强度在浓缩胶内为10mA/板,进入分离胶后增加到20mA/板。上槽中加1滴

0.01%溴酚蓝做前沿指示剂,电泳在0℃~4℃下进行,当溴酚蓝前沿接近胶底1~2cm时终止电泳,电泳时间约需5~6h。

### 1.5 染色

电泳完毕后,对剥离下的凝胶片按特异染色法进行染色<sup>[12,13]</sup>,显出谱带后立即照像和描绘图谱,若想长期保留,可用凝胶干燥器将胶制成透明的干板。

#### 1.5.1 可溶性蛋白染色<sup>[12]</sup>:

染色液: 考马斯亮蓝 R250 0.25g  
水-甲醇-乙酸(45:45:10, V) 100mL

脱色液: 水-甲醇-乙酸(60:30:10, V)

将凝胶片置染色液中室温下染色12h,取出用蒸馏水漂洗干净,置脱色液中室温脱色至少4h。

#### 1.5.2 酯酶染色<sup>[13]</sup>:

溶液 I: 固蓝盐 155mg  
pH7.2 0.1mol/L 磷酸缓冲液 200mL

溶液 II: 醋酸-α-萘酯 37.5mg

醋酸-β-萘酯 37.5mg

丙酮 6mL

使用前将溶液 I 与 II 混和成染色液。37℃下染色30min。待酶带清楚后,以7%醋酸脱色

直至谱带清晰为止。

## 2 结果与分析

### 2.1 可溶性蛋白电泳图谱

供试菌的可溶性蛋白电泳图谱中可辨别谱

带数为10~13条,其谱带数及位置基本一致。

### 2.2 酯酶同工酶图谱

(1) 供试菌的胞内和胞外酯酶同工酶可辨别谱带数为1~8条,谱带数及位置均有一定差异,各谱带的  $R_f$  值见表2。

表2 红曲霉菌酯酶同工酶比较

菌号	胞内酶谱带 $R_f$ 值						胞外酶谱带 $R_f$ 值			酶带总数	
5015	0.39	0.60	0.68	0.71	0.74	0.84	0.87	0.47	0.58	0.71	11
	0.93										
5016	0.60	0.84	0.87	0.89				0.50	0.53		6
5017	0.49	0.52	0.60	0.76	0.84			0.47	0.53	0.67	8
5021	0.52	0.64	0.71	0.76				0.43			5
5029	0.52	0.57	0.64	0.71	0.77	0.84		0.50			7
5032	0.49	0.57	0.71	0.87				0.43	0.50		6
5035	0.49	9.60	0.76	0.87				0.56			5
9001	0.33	0.53	0.62	0.74	0.77	0.82	0.86	0.57	0.65	0.71	11
	0.89										

(2) 红曲霉的胞内酶谱带数明显多于胞外酶的谱带,土曲霉菌也有8条谱带,谱带数及位置与红曲霉菌有明显差异,相同的谱带仅有1条,其余均不同。

### 2.3 结果计算与分析

由表2中的谱带特征,根据 Nei 等<sup>[14]</sup>人的相似率分析公式进行数据分析,计算红曲霉酯酶同工酶的相似性系数,相似率  $(Fab) = (2 * Nab) / (Na + Nb) * 100%$ ,其中,  $Nab$  为菌株 a 和 b 之间共有的谱带,  $Na$  为菌株 a 具有的谱带,  $Nb$  为菌株 b 具有的谱带,得到表3。由于表中对角线两侧数据分布是对称相等的,故只列出了对角线下方的半表数据,用于聚类分析。

表3 红曲霉酯酶同工酶的相似性系数

	5015	5016	5017	5021	5029	5032	5035	9001
5015	1.0000							
5016	0.3529	1.0000						
5017	0.3158	0.4286	1.0000					
5021	0.1250	0.1000	0.3077	1.0000				
5029	0.2222	0.3077	0.2667	0.5000	1.0000			
5032	0.2353	0.3333	0.2875	0.3636	0.4615	1.0000		
5035	0.2500	0.5455	0.6154	0.2000	0.1667	0.5455	1.0000	
9001	0.1818	0.1176	0.0000	0.0000	0.1111	0.0000	0.0000	1.0000

在不同的  $\lambda$  水平进行聚类,具有不同的类的划分,当  $\lambda$  值由 0.1 渐增加到 0.6 时,分类由粗变细,即从  $\lambda 0.1$  时的 2 类变成  $\lambda 0.6$  时的 7 类。如图 1 为  $\lambda 0.5$  水平时的聚类。由图可见,在酶产生方面,5017 与 5035 最为相近,而土曲霉 9001

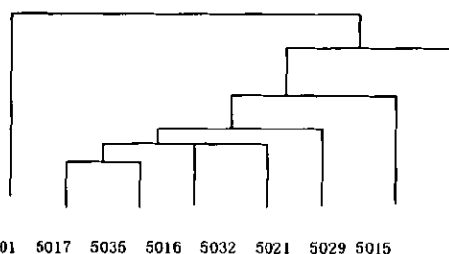


图1  $\lambda=0.5$  水平的聚类图

与其它几种红曲霉明显不同,这与传统的形态学分类结果相一致。

### 3 结果与讨论

(1) 曾对红曲霉的酯酶、过氧化物酶、过氧化氢酶、超氧化物歧化酶、细胞色素氧化酶及 $\alpha$ 淀粉酶等进行了研究,发现酯酶同工酶谱较为稳定,过氧化氢酶、超氧化物歧化酶和 $\alpha$ 淀粉酶等的谱带差异有限,而过氧化物酶和细胞色素氧化酶等则未出现谱带,是否因菌丝中酶含量甚低所致,还有待于进一步考察,故用酯酶同工酶进行分类学研究。经过可溶性蛋白电泳及同工酶电泳图谱的比较研究得知,虽然细胞内蛋白质种类繁多,但经多次重复试验,表明供试红曲霉属真菌菌株的电泳图谱的特征在一定实验条件下是稳定的。红曲霉种间的酯酶同工酶谱有一定差异,这与其形态学研究结果是一致的。

(2) 试剂生产厂家的不同,外界环境及实验条件的不一致,均可导致酶谱的变化;同一菌株而不同的发育阶段的菌龄,其同工酶谱可有所不同,因此,在进行对比研究时,应注意保持各项条件的完全一致,使具有可比性。(3) 应用模糊聚类方法进行真菌同工酶谱分析,其突出优点是可在不同的水平上,动态地分析与观察分类状况,发掘和应用较全面的谱带信息。同时可克服人

为主观因素的影响,使分类结果与客观实际相符合。

总之,利用同工酶电泳数据的聚类分析可以作为红曲霉菌传统分类的重要辅助手段。

### 参 考 文 献

- [1] 弓明钦, 陈应龙, 仲崇禄. 菌根研究及应用. 北京: 中国林业出版社, 1997, 158.
- [2] 张羽航, 江汉潮, 董明盛等. 微生物学通报, 1998, 25(5): 265.
- [3] 徐丽华. 微生物学通报, 1998, 25(6): 314.
- [4] 潘瑞乐, 徐锦堂. 中国中药杂志, 1996, 21(2): 84.
- [5] 赵 剑, 朱蔚华. 中草药, 1998, 29(6): 402.
- [6] 魏艳敏, 周与良. 菌物系统, 1998, 17(1): 63.
- [7] 向 洋, 朱泽瑞, 龚 岁. 高技术通讯, 1997, 3(1): 12.
- [8] 徐敬友, 陆家云. 真菌学报, 1993, 12(1): 54.
- [9] 李钟庆. 微生物学报, 1982, 22(2): 118.
- [10] 白玉明, 樊凌雯, 褚西宁等. 微生物学通报, 1995, 22(3): 188.
- [11] 吴少伯. 植物生理学通讯, 1979, (1): 30.
- [12] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. (金冬雁等译). 分子克隆实验指南. 北京: 科学出版社, 1992, 672~880.
- [13] 周本正. 实用电泳与免疫电泳技术. 武汉: 湖北科学技术出版社, 1988. 77.
- [14] 郭春沅, 计 新. 植物学报, 1994, 11(增刊): 78.