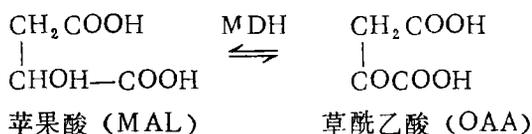


植物苹果酸脱氢酶同工酶的作用和分析方法

黄永芬 汪清胤

(哈尔滨师范大学 生物系)

目前已公认生物体的所有酶都存在酶的复分子形式即同工酶现象。Irwin P. Ting 等证明在高等植物细胞的不同部位存在苹果酸脱氢酶 (Malate Dehydrogenase 简称 MDH) 同工酶, 它们是: 线粒体苹果酸脱氢酶、胞液苹果酸脱氢酶、微体苹果酸脱氢酶。和叶绿体苹果酸脱氢酶。前三者是以 NAD(尼克酰胺腺嘌呤二核苷酸)为辅酶的苹果酸脱氢酶, 可以简写成 NAD-MDH, 后者是以 NADP(尼克酰胺腺嘌呤 = 核苷酸磷酸)为辅酶的苹果酸脱氢酶, 可简写成 NADP-MDH, 这些 MDH 同工酶都催化同一反应:



但由于这些同工酶结构不同, 关联的代谢途径不同, 因而它们在生活中作用也是不同的。

线粒体类型的苹果酸脱氢酶是催化三羧酸循环中一个步骤的酶, 而三羧酸循环是生命组成物质糖、脂类、蛋白质等彻底氧化分解并提供能量的共同途径。

胞液类型的苹果酸脱氢酶参与丙酮酸羧化支路代谢, 与非自氧性的 CO₂ 固定有关。

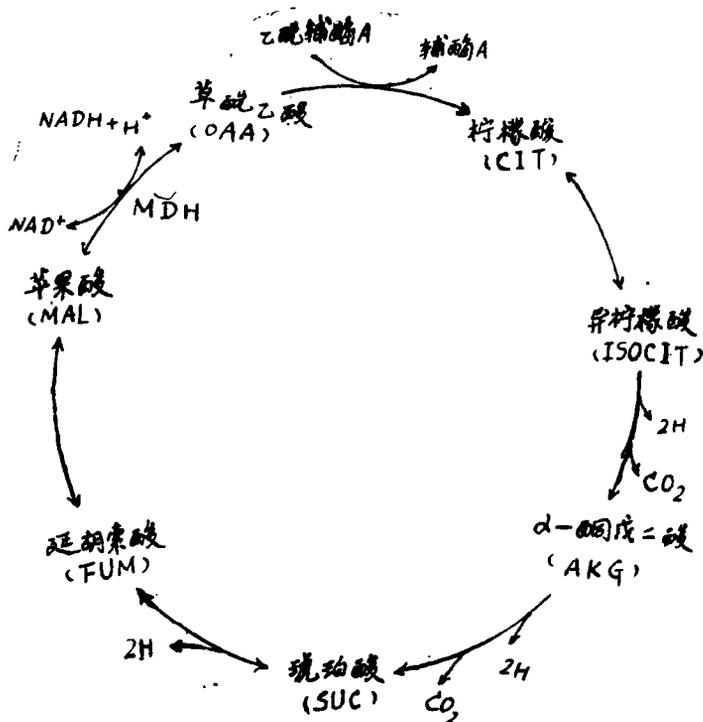


图1 线粒体 MDH 的作用: 参与三羧酸循环

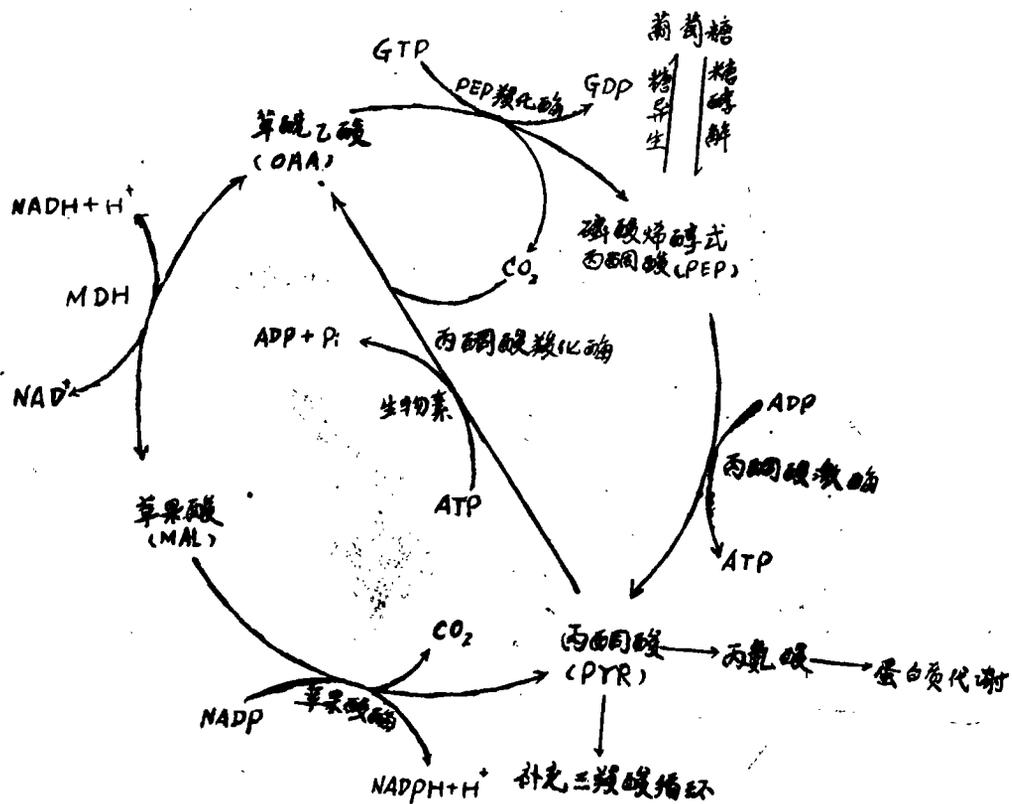


图2 胞液MDH的作用：参与丙酮酸羧化支路

微体主要是指过氧化物酶体和乙醛酸循环体而言。微体中的苹果酸脱氢酶可能和光呼吸及乙醛酸循环有关。光呼吸指的是在光照下，随着光合作用进行而发生的氧化某些基质并释放 CO_2 的过程，它可能对保证叶绿体内 $\text{NADPH} + \text{H}^+ / \text{NADP}^+$ 的比率正常有重要意义。

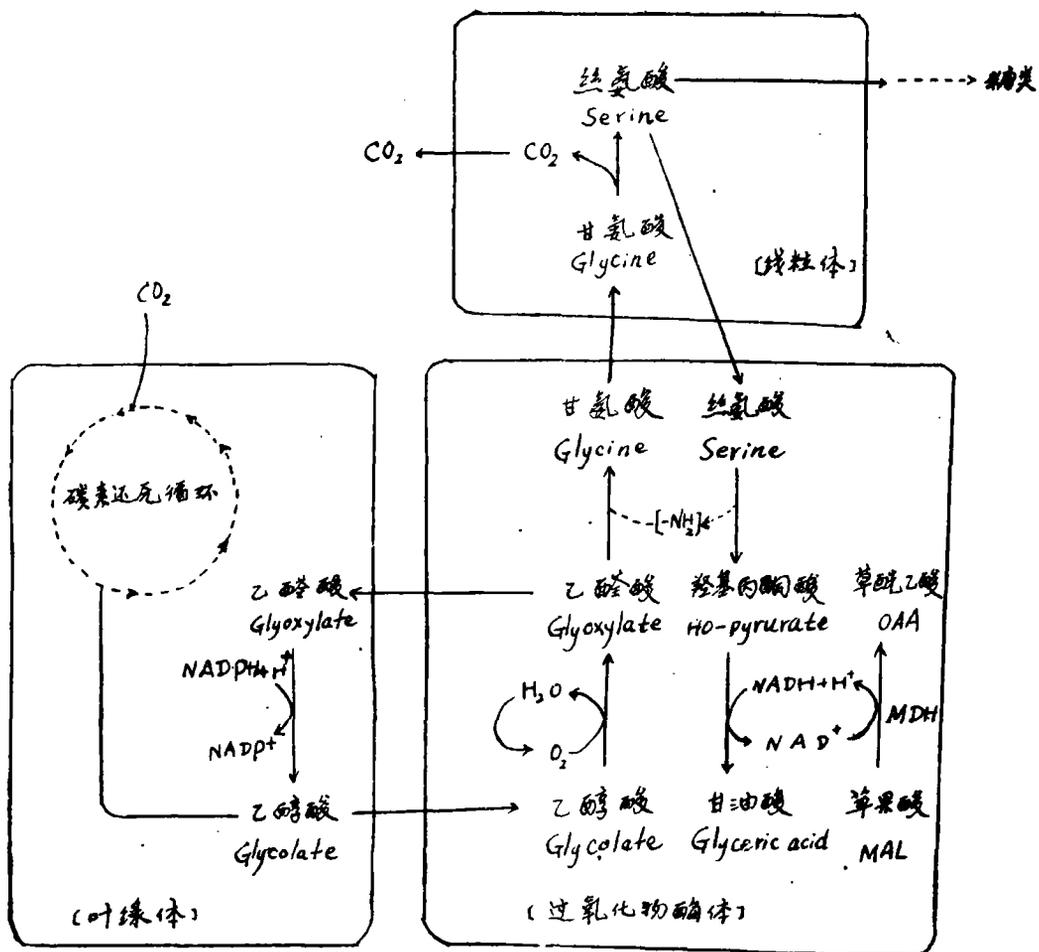


图3 微体MDH的作用I: 参与光呼吸作用

乙醛酸循环只存在于植物和微生物中，它提供了脂肪酸氧化生成的乙酰辅酶A，利用合成糖的可能途径，也是补充三羧酸循环中间产物的一种重要手段。

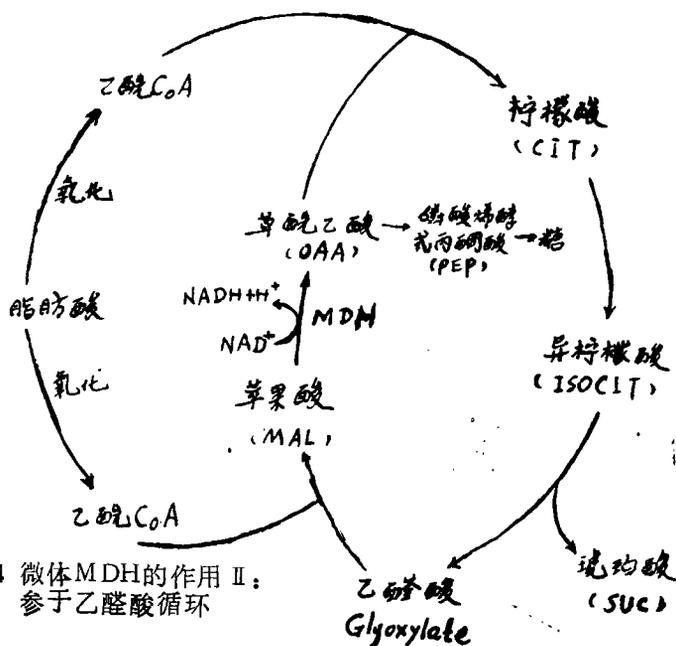


图4 微体MDH的作用II: 参与乙醛酸循环

在C₄型植物中,叶绿体的MDH是以NADP(尼克酰胺腺嘌呤 = 核苷酸磷酸)为辅酶脱参于C₄——二羧酸循环,对固定CO₂,提高光合作用产率具有重要意义。

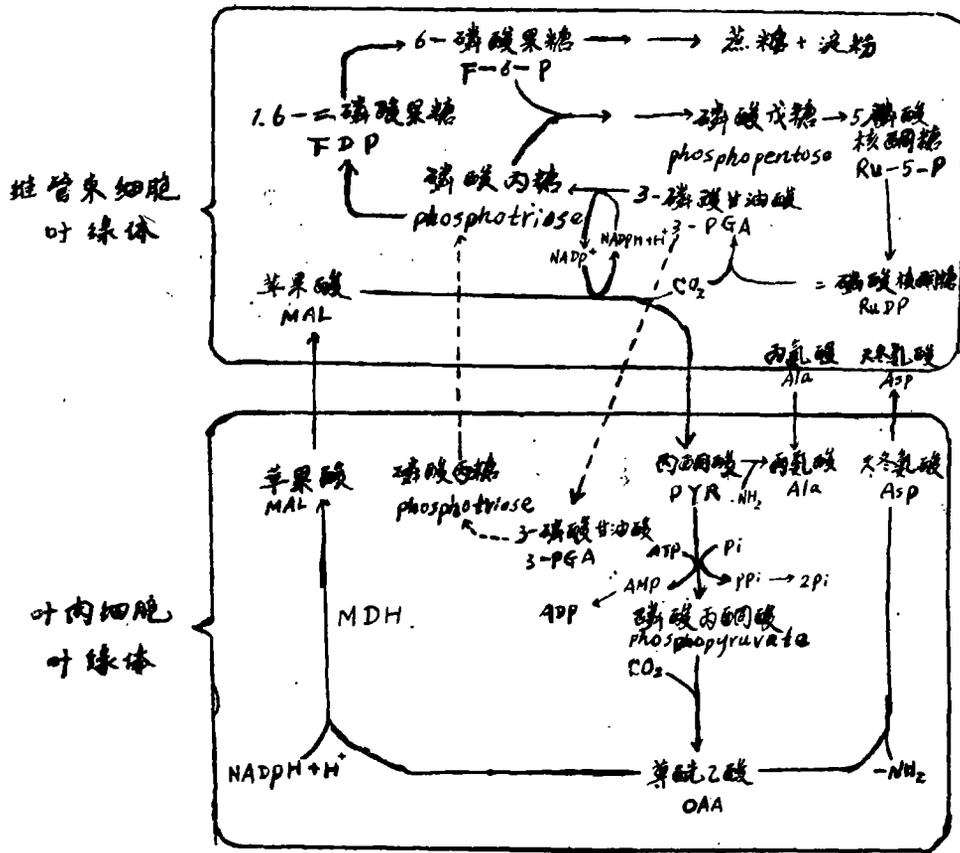


图5 叶绿体MDH的作用:参于光合作用CO₂的固定

局限于不同的亚细胞区域的各种MDH同工酶的存在,还可能在离子和氧化还原调节方面起重要作用。这依靠近些年发现的苹果酸穿梭作用来实现。

我们知道线粒体是生物氧化进行的场所,各种代谢物氧化生成的NADH + H⁺或FADH + H⁺可通过呼吸链生成水并产生ATP,供细胞生命活动需要,胞液中也可产生NADH + H⁺,然而胞液中的NADH + H⁺并不能通过正常的线粒体内膜彻底氧化并产生ATP,但可经苹果酸脱氢酶和草酰乙酸生成苹果酸,后者可透入线粒体,再受苹果酸脱氢酶作用重新生成NADH + H⁺进入呼吸链,同时生成的草酰乙酸并不能逸出线粒体,一般认为,可经谷——草转氨酶(GOT)作用生成天冬氨酸,然后逸出线粒体,再经线粒体新的

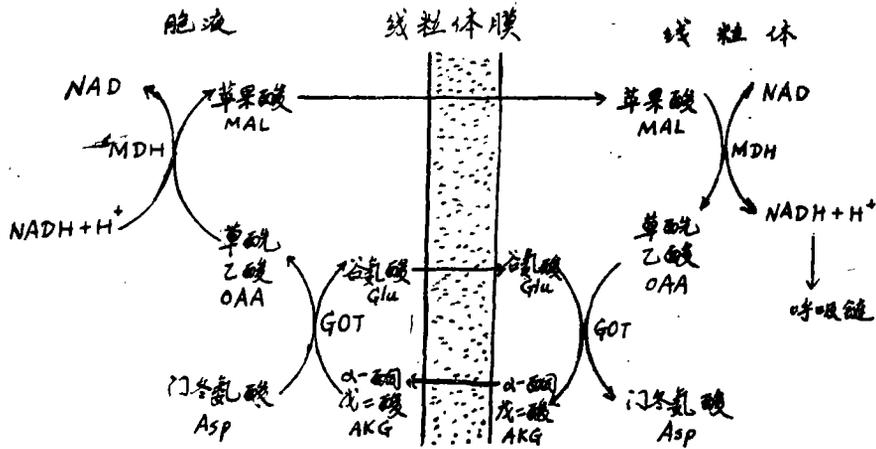


图6 苹果酸穿梭作用

谷——草转氨酶(GOT)恢复成草酰乙酸,这样通过苹果酸穿梭作用可使胞液中的NADH + H⁺进入线粒体氧化,也可使线粒体内的有机物质到线粒体外,参于有关的代谢途径。

由些可见,苹果酸脱氢酶与植物生理代谢的多条重要途径密切相关,因此分析苹果酸脱氢酶同工酶对于探讨植物的正常生理和病理是必要的。1981年我们用聚丙烯酰胺凝胶电泳法对番茄的15个品系、6个一代杂种进行了不同生育期、不同部位的二百多个样品的MDH同工酶分析,发现番茄不同器官和不同生育期的MDH同工酶酶谱及酶活性存在明显差异,叶、生长点、花和鲜种子中的MDH同工酶酶活性高,根和茎中酶活性低,谱带数也少;同一植株幼嫩部位MDH同工酶谱带数和酶活性高于衰老组织;不同生育期MDH同工酶变化也很大,其中以芽期差异较明显。另外对真善美、201等5个品种或一代杂种的患病毒病植株的发病部位与正常植株相应部位取样作对照进行了病株与正常株的MDH同工酶比较,发现病株的MDH酶活性及谱带数大大低于正常植株,可以认为,苹果酸脱氢酶同工酶活性的高低与番茄病毒病抗性有一定相关性,用MDH同工酶分析方法探讨番茄病毒的病理和抗病育种是有意义的。

苹果酸脱氢酶同工酶分析方法如下:

1. 材料处理及聚丙烯酰胺凝胶电泳可按上期报道的过氧化物酶同工酶分析方法进行。只是点样量应改为10—20微升。

2. 染色液的配制:称取Na₂CO₃10.385克,溶于50毫升水中,冰浴中搅拌加入DL—苹果酸13.4克,加入水至100毫升,PH7.0,然后加入:NAD(辅酶I)0.5克NBT(氯化硝基四氮唑兰)0.3克,PMS(吩萘二甲酯硫酸盐)0.02克,0.2M Tris—HCl缓冲液(PH8.0)200毫升,用水定容至1000毫升,置棕色瓶中于冰箱中避光保存备用。

3. 染色:把染色液倒入解剖盘中,放在恒温箱中,待温度平衡在37℃后放入凝胶,黑暗中继续保温至酶谱带呈深兰色。染色液可使用三次。

4. 固定:染色后的凝胶经水漂洗,用甘油:乙醇:乙酸:水=1:5:2:4的固定液固定。凝胶板在固定液中可保留三个月左右,也可制成干板长期保存。