

西瓜不定芽分化过程中同工酶的变化研究

张丽珍¹, 杨冬业², 秦新民³

(1. 桂林师范高等专科学校, 广西 桂林 541001; 2. 桂林医学院 广西 桂林 541001; 3. 广西师范大学 生命科学院, 广西 桂林 541004)

摘要: 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)结合同工酶染色的方法对华玲西瓜不定芽分化过程中过氧化物酶(POD)同工酶、酯酶(EST)同工酶进行分析。结果表明: 在不定芽分化过程中, 过氧化物酶同工酶变化较大, 第 20 天的酶含量达到峰值, 总体上分化后期比前期出现的酶带多且含量大, 酶活力高; 酯酶同工酶变化不大, 酶带数后期比前期较多, 但酶带的含量后期比前期少。

关键词: 西瓜; 酯酶; 过氧化物酶; 同工酶

中图分类号: S 651 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2011)14-0108-03

同工酶(Isozyme)是基因的直接表达者, 很多学者^[1-3]对利用同工酶作为植物育种的一种筛选工具或鉴定标志及抗病性进行了大量的研究。随着生化技术的迅速发展, 特别是聚丙烯酰胺凝胶电泳分析法的进一步发展及其与特殊的组织化学染色技术的配合应用, 使同工酶的研究逐步深入且有了很大的进步。同工酶的研究不仅是代谢调节、个体发育、细胞分化、分子遗传等方面的有力工具, 也是研究蛋白质结构和功能的好方法。同工酶分析是一种有效的生化分析手段, 在作物及蔬菜的杂种纯度鉴定方面已有广泛的应用^[4]。同工酶谱具有相对的稳定性, 不易受外界条件的影响, 但是同工酶稳定性只限于一个器官或组织及细胞在一定生长阶段的同工酶谱型。国内外不少学者试图通过测定杂种及其亲本的同工酶来识别亲本和杂种, 并取得一定的进展^[5-9]。目前对西瓜的过氧化物酶(POD)、酯酶(EST)、淀粉酶(Amyl)同工酶的研究较少, 且多数只在于西瓜杂种纯度鉴定或品种鉴定及抗病性的研究, 而对于西瓜的组织培养、快速繁殖以及同工酶的变化与植物分化之间的关系研究甚少, 因此, 现通过对西瓜不定芽分化过程中过氧化物酶、酯酶、淀粉酶同工酶变化的研究, 为进一步研究西瓜的组织培养、快速繁殖以及同工酶的变化与植物分化之间的关系提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

药品试剂: MS 培养基^[7]、细胞分裂素(BA)、丙烯

酰胺、甲叉双丙烯酰胺、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、联苯胺、过硫酸铵、N, N, N', N'-四甲基乙二胺(TEMED)均购自国药集团化学试剂有限公司。

仪器设备: YJ-1450 超净工作台, 苏州工业园区三兴净化科技有限公司; TGL-16G 型高速冷冻离心机, 上海安亭科学仪器厂; DYY-6B 型稳压稳流电泳仪, 北京市六一仪器厂; UV-1600 型紫外-可见分光光度计, 北京瑞利厂。

植物材料: 华玲西瓜种子, 由广西果蔬研究所提供。

1.2 试验方法

1.2.1 西瓜不定芽分化 在超净工作台中, 将去壳的华玲西瓜种子放入升汞中浸泡 10 min, 取出后无菌水清洗 4 次, 接种于 MS0 培养基, 在 26℃条件下暗培养。第 4 天取出, 沿生长点切下子叶, 接种于 MS + BA 0.5 mg/L 培养基中; 从接种之日起, 收集分化了 0、2、4、6、8、10、12、14、17、20、23、26 d 的叶片(整个过程均在无菌状态下操作)。保存在 -70℃冰箱中, 作为提取过氧化物酶、酯酶、淀粉酶 3 种同工酶的材料。

1.2.2 酶液的提取 过氧化物酶同工酶酶液的制备: 收集好的样品按比例为 1 g 鲜重加入 10 mL 预冷的 0.02 mol/L KH₂PO₄ 提取溶液^[8]。提取步骤如下: 在冰浴条件下, 用预冷的研磨将其匀浆。匀浆液于 4℃冰箱浸提 10 min, 然后于 4℃的条件下, 8 000 r/min 离心 10 min, 弃去沉淀, 上清液保存在 -20℃的冰箱中, 用于过氧化物酶同工酶分析; 酯酶同工酶酶液的制备: 样品按比例为 1 g 鲜重加入 5 mL 预冷的 0.5M Tris-HCl(pH 6.8)缓冲液, 提取步骤同过氧化物酶同工酶酶液的制备; 淀粉酶同工酶酶液的制备: 样品按比例为 1 g 鲜重加入 2 mL 双蒸水, 提取步骤同过氧化物酶同工酶酶液的制备。

1.2.3 聚丙烯酰胺凝胶电泳及同工酶染色按常规制备 T=7.5% 分离胶和 T=4% 浓缩胶的垂直板状不连续系统凝胶, 凝胶大小 13 cm×11 cm×0.15 cm, 电泳

第一作者简介: 张丽珍(1979-), 女, 广西贵港人, 硕士, 讲师, 现主要从事生物学教学与生物工程研究工作。E-mail: xiaozhang446@163.com.

基金项目: 广西壮族自治区“药用植物学概论”精品课程资助项目。

收稿日期: 2011-04-28

时3种同工酶上样量分别为:过氧化物酶 20 μ L、酯酶 35 μ L、淀粉酶 40 μ L,电极缓冲液为 Tris-甘氨酸(pH 8.3),浓缩胶电压为 80 V,电泳 1.17 h,分离胶电压为 180 V,电泳 1.33 h 左右,电泳结束,取出凝胶板进行同工酶染色。过氧化物酶同工酶染色:取醋酸联苯胺溶液 2 mL,3%过氧化氢 0.4 mL,加双蒸水 20 mL 配成染色液(临用现配),将胶板置于上述染色液中,37℃保温 10 min;酯酶同工酶染色:取 0.06 g α -醋酸苯酯,0.06 g β -醋酸苯酯,0.06 g 固蓝盐 B,少许丙酮溶解,加 0.067 mol/L 磷酸缓冲液(pH 6.5)至体积 40 mL,配成酯酶染色液(临用现配),将胶板置于上述染色液中,37℃保温 10 min;淀粉酶同工酶染色:将胶板置于 1% 淀粉溶液中,37℃保温 1 h,蒸馏水洗去多余淀粉,7% 醋酸浸泡 5 min,然后置于 I-KI 染液,37℃保温 10 min。以上染色后的胶板用蒸馏水冲洗,置于 7% 醋酸中保存。生物电泳图象分析系统拍照分析。分析时依次测量各酶带的泳动距离,记录各酶带的活性度并计算出迁移率 Rf 值。(Rf=同工酶带迁移距离/溴酚蓝指示剂迁移距离),活度按酶带显示程度分为 5 级:最强带、次强带、较强带、强带和弱带。

2 结果与分析

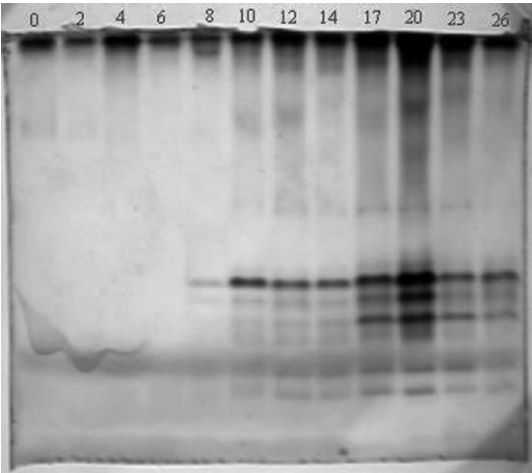
2.1 过氧化物酶同工酶酶谱分析

西瓜不定芽分化 0~26 d 过程中,过氧化物酶同工酶酶谱的变化结果见图 1。由图 1 可知,0、2 d 的条带最少,没有显示出条带,随着分化时间的增加,酶带数目逐渐增加,条带最多的为第 20 天样品酶谱,可分出 9 条较明显的条带。根据 Rf 值从小到大依次将其编号为 S₁(慢带区),M₁、M₂、M₃、M₄、M₅、M₆(中带区),F₁、F₂(快带区)。分化至第 4 天时,开始出现 Rf 值为 0.78 和 0.84 的弱带 F₁、F₂;分化至第 8 天时,条带突增至 5 条,出现了 Rf 值为 0.57、0.62 和 0.66 的次强带 M₃ 和较强带 M₄、M₅。第 10 天起,开始出现 S₁ 和 M₆,此后这些出现的酶带一直存在,含量不同程度的增加,到第 20 天达到峰值。可能是由于分化后期细胞分化受控制,植物生长速度较慢。到第 14 天时开始出现 Rf 值为 0.54 的弱带 M₂,到第 20 天变为较强带。值得一提的是,第 20 天时出现 Rf 值为 0.52 的特异带 M₁,并且 M₃、M₄、M₅ 变为强带,其它的酶带均变得明显,整个酶谱呈现出以第 20 天为峰的波峰状。第 26 天时, M₆ 带消失。

2.2 酯酶同工酶酶谱分析

由图 2 可知,酯酶同工酶酶谱可分出 10 条明显的条带,根据 Rf 值可分为 S₁、S₂(慢带区),M₁、M₂、M₃、M₄、M₅(中带区),F₁、F₂、F₃(快带区)。其中 Rf 值分别为 0.42、0.47、0.70、0.73 的 M₂、M₃、F₁、F₂ 为共有带,随着分化时间的推移,酶带 F₁、F₂ 的含量有所减少,其它的不变。特别地,第 0 天和第 2 天出现 Rf 值为 0.04 和 0.39 的 S₁ 和 M₁,在第 4 天时消失,继而出现 Rf 值为 0.08、0.49 和 0.78 的酶带 S₂、M₄ 和 F₃,到第 14 天

时又增加了弱带 M₅。酯酶同工酶变化不大,酶带数后期比前期较多,但共有酶带的含量后期比前期少,表明植物酯类物质种类逐渐增多,磷酸代谢加强。



(a)

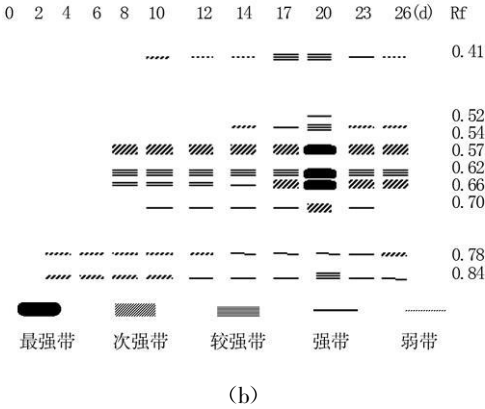


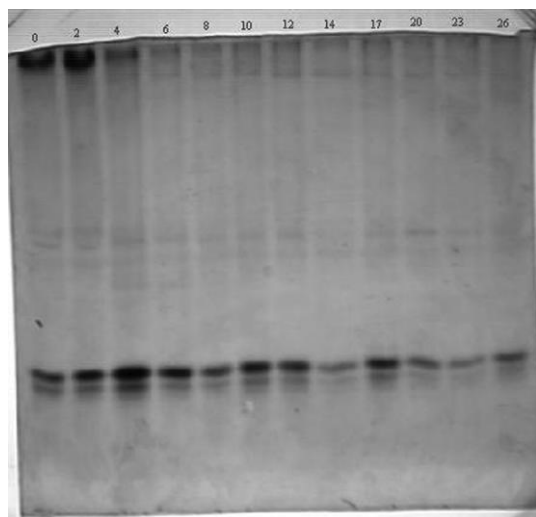
图 1 子叶过氧化物酶同工酶酶谱

2.3 淀粉酶同工酶酶谱分析

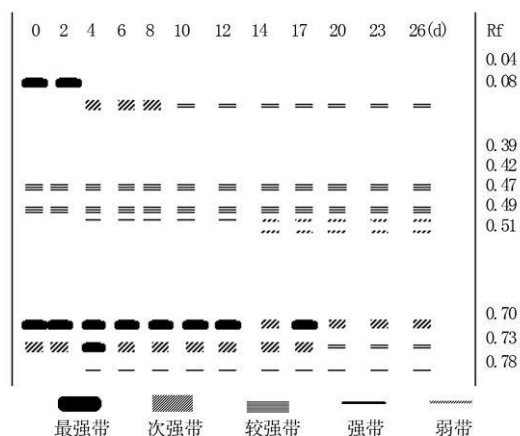
经过多次试验,淀粉酶同工酶条带都未显示,可能是选择的样品淀粉酶含量过少;也可能是由于时间关系试验摸索不够清楚而得不出结果。曹宛虹等^[4]对西瓜种子萌发 7 d 中淀粉酶同工酶的分析,只在阴极处发现一条弱带。而该试验的样品是分化中的子叶,极有可能因含量过少,同工酶酶谱不明显,有待进一步研究。

3 讨论与结论

自 1959 年 Markert 首次用电泳法发现了动物的乳酸脱氢酶同工酶以来,大量的研究工作证明,无论是微生物,还是动物和植物,在其同一物种的不同个体,或者同一个体的不同器官、细胞,或者同一细胞的不同部位,如细胞膜、细胞质和各种细胞器,以及生物在生长发育的不同时期和不同代谢条件下,都有不同的同工酶分布,同工酶作为生物存在的一种普遍现象受到了广泛的研究。



(a)



(b)

图2 子叶酯酶同工酶谱

过氧化物酶(POD)广泛参与生物体内的物质代谢,同时作为一类重要的细胞壁酶而受到密切的关注。它参与了细胞壁中许多结构成分的聚合作用,在形成复杂的细胞壁结构中起着十分关键的作用。另外,细胞壁内的结构蛋白、半纤维素和果胶等在过氧化物酶催化下发生交联反应,可能在很大程度上降低了细胞

壁的延伸性,使得细胞壁硬化,从而控制细胞的生长速度。从该试验结果得出,西瓜的过氧化物酶同工酶可分为3个区:S、M、F区。子叶分化到第8天时过氧化物酶活力开始显著增加,从过氧化物酶作用看来此时的细胞分化速度开始受到控制,所以在西瓜组织培养和快速繁殖时应该注意到这一变化,把握其最佳繁殖时间。

酯酶(Est)同工酶存在于植物各部位和不同发育时期的细胞中,是多种碳酸酯的水解酶,底物特异性不强,为一复杂酶系,一般为单体酶,图谱中每一条带即代表一个基因产物。业已证明,酯酶只参与植物异化作用,是与磷酸代谢密切相关的酶,酯酶含量的增加意味着磷酸代谢的加强。而且由于它的遗传学较为复杂,所以,酯酶一般被作为研究发育时期基因表达和调控差异的一种标志酶。该试验结果表明,在芽分化过程中酯酶的变化没有过氧化物酶的明显,但是从第4天起酶带也渐渐增加,说明随着时间的推移,酯类物质增多磷酸代谢也逐步加强,促进植物的发育。

淀粉酶(Amyl)在植物体内主要参与了植物细胞的糖代谢,也与植物细胞的分化有关。该试验未显示淀粉酶条带,植物细胞的分化与淀粉酶的关系有待进一步研究。

参考文献

- [1] 朱彦涛,张新,刘湛,等. 2个油菜CMS系统的酯酶和过氧化物酶同工酶分析[J]. 西北植物学报, 2009, 29(4): 711-716.
- [2] 张新中,纪瑛,苦参和苦豆子的过氧化物酶同工酶谱分析和比较[J]. 植物生理学通讯, 2009, 45(7): 681-683.
- [3] 李鑫. 油松过氧化物酶季节变化动态[J]. 生态环境, 2008, 17(5): 1996-1998.
- [4] 曹宛虹,赵艳茹. 西瓜同工酶及可溶性蛋白分析[J]. 华北农学院学报, 1994, 9(2): 64-71.
- [5] Biles C L, Martyn R D, Wilson H D. Isozymes and general proteins from various watermelon cultivars and tissue types[J]. Hort Science, 1989, 24(5): 810-812.
- [6] 张敏,何熙璞,王崑. 花生不同品种(系)过氧化物酶、酯酶同工酶与品质、产量的关系[J]. 西南农业学报, 2006, 19(4): 663-668.
- [7] 李浚明. 植物组织培养教程[M]. 北京: 中国农业出版社, 2001.
- [8] 李惠敏,秦新民. 沙田柚花粉萌发前后同工酶分析[J]. 广西师范大学学报(自然科学版), 2004, 22(3): 85-90.

Change of Isoenzymes During Adventitious Bud Differentiation of Watermelon

ZHANG Li-zhen¹, YANG Dong-ye², QIN Xin-min³

(1. Guilin Normal College, Guilin, Guangxi 541004; 2. Guilin Medical University, Guilin, Guangxi 541004; 3. College of Life Science, Guangxi Normal University, Guilin, Guangxi 541004)

Abstract: Peroxidase isoenzymes and esterase isoenzymes during adventitious bud differentiation of hua-ling watermelon were analyzed by using polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) and staining with benzidine reagent. The results showed that while the adventitious bud splits up, peroxidase isoenzymes changed greatly, enzyme content for 20 days reach peak value, and late differentiation appear many bands and heavy content than earlier stage generally. Esterase isoenzymes little change. The bands was more in later stage than earlier stage. But own content little than the previous stage.

Key words: watermelon; esterase; peroxidase; isoenzymes