

# 杉木、德昌杉木的几种同工酶的初步研究\*

沈乃茹 方永鑫 王仿

## 摘 要

用垂直平板聚丙烯酰胺凝胶电泳,对我国不同地区杉木幼苗叶进行过氧化物酶同工酶,酯酶同工酶,苹果酸脱氢酶同工酶的比较研究。

实验结果表明:

- 1) 四川德昌杉木三种同工酶谱与其它地区杉木的酶谱有一定差异。
- 2) 除四川德昌杉木外,其它地区杉木的同工酶谱基本相同。

## 前 言

五十年代前即已发现同工酶,五十年代后期为人们所重视。近年来,同工酶的深入研究为系统分类学的发展开辟了新途径。随着分子生物学的蓬勃兴起已证明酶蛋白的多肽结构是由DNA分子上的核苷酸排列顺序决定的<sup>[1]</sup>。同工酶的结构差异反映了基因功能的差异。因此,同工酶的分析可以为种和品种的鉴定提供有力的工具。

杉木是我国特有的树种。据中国植物志记载,杉木属共有二种一个变种和一个栽培变种,除峦大杉产于台湾省外,国内杉木属仅杉木一种一个变种和一个栽培变种<sup>[2]</sup>。

近年来,对四川德昌杉木提出不同的观点。有人认为德昌杉木是杉木属的一个新种<sup>[3]</sup>,另一些人认为德昌杉木是杉木的一个新变种<sup>[4]</sup>。

为此,我们采用垂直平板聚丙烯酰胺凝胶电泳的方法<sup>[5]</sup>,对四川德昌杉木和其它地区杉木的过氧化物酶同工酶,酯酶同工酶以及苹果酸脱氢酶同工酶比较研究,从生化角度对杉木和四川德昌杉木作进一步的探讨。

在准备试验阶段,我们采用了杉木不同组织器官为实验材料,如子叶、茎尖、根尖、当年生叶、木质部、韧皮部、胚、胚乳等。实验结果表明,杉木的当年生叶子,特别是苗期为5个月以上的杉木叶子同工酶谱较为稳定。所以选择5个月以上的杉木叶作为分析对比材料。

本文报导用同工酶研究杉木和四川德昌杉木的初步结果。

本文于1982年3月20日收到

\* 四川,湖南,广西林科所,浙江龙泉,广东信宜林科所,安徽茅山林场等单位,提供种子,特此致谢。

承中科院生化所周光宇教授指教,谨此表示感谢。

参加本实验的有陆繁华,黄乃佳,何友爱,陆振鑫,施永明等同学,照片由黄潮中同志拍摄。

## 材料和 方法

### 1. 试材

供试材料由本院植物园温室内培养的杉木幼苗。它们的种子分别来自广东信宜, 广西融水, 浙江龙泉, 湖南会同, 安徽金寨和四川德昌县(以下除四川德昌外, 县名均省略)等六个不同地区。播种期为3月2日, 9月9日开始取样, 试验持续2个半月, 于11月25日结束, 故幼苗的苗龄期为3~8个月。

材料取自杉木幼苗上端部叶子, 称取一定重量, 在冰浴中研磨, 用电极缓冲液提取过滤, 滤液在16000转/分离心机内离心5分钟, 取上清液放入冰箱内保存, 供电泳分析时用。

### 2. 凝胶系统

采用垂直平板聚丙烯酰胺凝胶系统。凝胶板长12cm, 宽20cm。

过氧化物酶同工酶凝胶浓度为7.5%; 酯酶凝胶浓度为7.3%; 苹果酸脱氢酶同工酶凝胶为7.5%。

### 3. 点样和电泳

取制备好的样品50 $\mu$ l, 加入2滴20%蔗糖液混合后, 注入凝胶间隔内。再加入一滴溴酚兰作示踪染料。

电泳仪为SCR-3型

电压300V以下

电流50mA左右

温度10~15 $^{\circ}$ C 室温

电极缓冲系统为Tris-甘氨酸电极缓冲液, pH8.3。

### 4. 染色方法

过氧化物酶同工酶染色液:

抗坏血酸-联苯胺染色系统, (Vtac 50mg, 联苯胺储存液20ml, 0.6% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 20ml, 蒸馏水60ml)。

酯酶同工酶染色液:

酯酶-萘酯染色系统, (20mg 醋酸- $\alpha$ 萘酯, 20mg 醋酸- $\beta$ 萘酯, 溶于4ml 丙酮, 加入40ml 0.1M pH6.4 磷酸缓冲液, 再加40mg 坚牢兰)。

苹果酸脱氢酶同工酶染色液则按如下配方:

苹果酸(dL 或 L 型) 10ml (3.0g/25ml 用浓NaOH调至中性)。0.01M 氰化钾4ml, 0.01M 辅酶 II 2ml, 50mg/ml 氯化硝基四吡唑兰 1ml, 1.6mg/ml N-甲基吩嗪甲基硫酸盐 1ml, 0.1M pH8.0 Tris-HCl 缓冲液 63ml。

将电泳后的凝胶分别放入上述染色液中(注意不时晃动), 使呈现过氧化物酶(兰色), 酯酶(红色), 苹果酸脱氢(紫色)等不同同工酶谱带。显色后, 用蒸馏水漂洗数次, 然后置于蒸馏水或醋酸中1~2天, 即可制成干板保存。

## 结果和 分析

### 一、过氧化物酶同工酶

### 1. 谱带比较

如图1, 图2所示。

从图1, 图2中可以看到, 各地区杉木的过氧化物酶同工酶谱带基本上可划成三个区域, 定其为A区, B区和C区。

A区的谱带各地区杉木表现得较为一致, 均有第1, 2, 3, 4, 5谱带。

B区的谱带酶含量较低, 并且谱带的稳定性也较差, 较难比较。初步定其为6, 6'谱带。

C区的谱带明显地表现出了四川德昌杉木和其它地区杉木的差异, 即在第7谱带上增加一条谱带, 定其为第7'谱带。除此之外, 第8, 9, 10谱带表现得较为一致, 而第11, 12等谱带则由于酶含量较低, 谱带也不稳定, 暂不作比较。

关于德昌杉木7'带的出现, 我们作了初步的研究和比较, 发现早在去年采用园盘电泳时, 在阳极区发现德昌杉木比其它各地杉木多一条谱带, 这条谱带的Rf值与7'带的Rf值完全相同<sup>[2]</sup>, 可以确定德昌杉木在园盘电泳阳极区的那条带即7'带。二年来数十次的测定发现, 7'带在德昌杉木中的出现频率很高达83% (见表1), 虽然在湖南和浙江二地杉木中偶然也出现过7'带, 而其它地区均未见有7'带。对7'带的存在尚须作进一步的研究, 但可以认为杉木和德昌杉木的幼苗叶子过氧化物酶同工酶的差别主要表现在7'带的有无。

表1 各地区杉木过氧化物酶同工酶谱带出现频率(%)

地区		广西	广东	安徽	浙江	湖南	四川德昌
A区	1	71	71	71	64	64	75
	2	100	100	100	100	93	100
	3	100	79	79	86	79	75
	4	100	100	100	100	100	100
	4'	21	14	14	14	14	8
B区	5	100	100	100	100	100	92
	5'	36	21	43	43	50	50
C区	6	57	50	43	50	50	25
	6'		29		14	7	
C区	7'				7	7	83
	7	100	100	100	100	100	100
	8	64	100	71	71	79	75
	9	100	100	100	100	100	100
	10	79	64	71	57	79	92
	11	36	7	29		36	42
	12	20		7		14	8
	13	20				8	

### 2. Rf值比较

如表 2 所示。

表 2 说明了各地区杉木过氧化物酶同工酶分离谱带的  $R_f$  值,除了第 7 谱带外,其它各主要谱带基本一致。四川德昌杉木的第 7 谱带及第 7' 谱带与其它地区杉木的第 7 谱带的  $R_f$  值均不同。

### 3. 扫描曲线图比较:

如图 3 所示。

用凝胶干板在波长为 550mm 的分光光度计下扫描,记录仪的量程为 10,纸速为 30mm/分,得到如图 3 的扫描曲线。

图 3 说明扫描曲线上出现的波峰和谱带模式图基本吻合。

表 2 各地区杉木过氧化物酶同工酶  $R_f$  值

		广南	广东	安徽	浙江	湖南	四川德昌
A 区	1	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16	0.16
	2	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22	0.22
	3	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24	0.24
	4	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27	0.27
	4'	0.29					
B 区	5	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32	0.32
	5'					0.39	
C 区	6'		0.46			0.46	
	6	0.49	0.49	0.49	0.49	0.49	0.49
D 区	7'						0.56
	7	0.58	0.58	0.58	0.58	0.58	0.59
	8	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63	0.63
	9	0.69	0.69	0.69	0.69	0.69	0.69
	10	0.73				0.73	
	11	0.75		0.75		0.75	
	12	0.77					0.76
	13	0.80					

### 二酯酶同工酶

#### 1. 谱带比较:

其它地区的杉木酯酶同工酶谱带相似,而四川德昌杉木与其比较,差异较大。四川德昌杉木有 3~4 条酯酶同工酶谱带,而其它地区杉木酯酶同工酶谱带只有一条。

#### 2. $R_f$ 值比较:见表 3。

表3 各地区杉木酯酶同工酶 Rf 值

谱带 \ 地区	广 东	安 徽	湖 南	四川德昌
1	0.52	0.53	0.54	0.54
2				0.56
3				0.9
4				0.61

## 3. 扫描曲线的比较:

如图4所示,扫描记录的方法和过氧化物酶同工酶相同。

扫描曲线图和模式图亦相吻合。

## 三、苹果酸脱氢酶同工酶

## 1. 谱带比较:

如图5所示。

## 2. Rf 值比较

## 3. 扫描曲线图的比较:

如图6所示,曲线和模式图相符合。

表4 各地区杉木苹果酸脱氢酶同工酶 Rf 值

谱带 \ 地区	广 东	四川德昌
1	0.33	
2	0.51	0.51
3	0.57	

从上述三种结果中可以看到:广东杉木和四川德昌杉木幼叶的苹果酸脱氢酶同工酶谱有显著的差异。广东杉木的同工酶谱带有三条,而四川德昌杉木只有一条谱带。它们都具有 Rf 值为 0.51 的 2 号酶带,扫描曲线的波峰也为 2 号酶带最高。由于苹果酸脱氢酶同工酶重复次数不多,以上仅是初步结果,今后将作进一步的研究。

## 结 论

杉木和四川德昌杉木在过氧化物酶,酯酶及苹果酸脱氢酶的同工酶谱上存在明显差异。

## 讨 论

1. 聚丙烯酰胺凝胶电泳的实验条件及方法对同工酶谱带呈现的清晰度有较大的影响。

采用 Tris-柠檬酸, Tris-甘氨酸和 Tris-盐酸等不同的缓冲系统进行对比试验, 结果表明 Tris-甘氨酸的效果最好。

在提取样品时, 如果材料中含色素较多, 则可用吐温提取液提取样品。

酯酶的凝胶系统曾用 7.3% 浓度和 7.5% 浓度对比, 结果是 7.3% 浓度效果较好。

离心速度曾用 4000 转/分, 14000 转/分, 16000 转/分, 对比结果是高速离心后的样品得到谱带更为清楚。但谱带数基本一致。

苹果酸脱氢酶参予植物的呼吸过程, 受气候条件的影响较大。气温降低时, 谱带出现的情况明显受抑。

## 2. 同工酶具有阶段特异性。

本试验过程中, 杉木幼苗叶的同工酶谱有一定的变化。这是因为幼苗期是生长发育旺盛时期, 生理生化指标的变化幅度较大。

幼苗出土后, 不同生长时间的幼苗叶酶谱不同。取 7 天的子叶时, 过氧化物酶同工酶谱带只有 3 条, 14 天后则为 6~7 条, 而 21 天后则增加到 8 条。苗令期为 5~8 个月时, 叶子的酶谱基本上稳定, 酶谱在 10 条左右。可见, 同工酶是具有其阶段特异性。

## 3. 同工酶作为植物体内重要的调节系统, 其谱带数有一定的变化幅度, 受外界的影响。

在本实验阶段发现, 冰冻材料和新鲜材料的谱带数不同, 前者较少, 后者较多。但如果将材料置于水中冰冻, 则谱带又有增多。

但是, 无论怎样, 总有一些谱带是保持相对稳定的, 这些谱带往往表现为同工酶含量较高或活性较强。在进行同工酶分析时, 这些酶带可作为主要酶带(标记酶带)。如过氧化物酶的第 2、4、5、7、9 而 7' 谱带则又是四川德昌杉木的特有酶带。

## 参 考 文 献

- [1] 吴志昂: 杨属植物的同工酶过氧化物酶 植物分类学报 1981. 8月
- [2] 中国植物志第二卷
- [3] 王德银 刘和林: 杉木属新种及新变种 四川林业科技 1980. 1
- [4] 阙再灵 李景熹: 杉木属——新变种 西南师范学院学报(自然科学版) 1981. 1
- [5] 吴少伯: 植物组织中且白质及同工酶的聚丙烯酰胺凝胶电泳 植物生理学通讯 1979. 1期
- [6] M. L. Siciano 和 C. R. Shaw: 凝胶上酶的分离和显现 植物生理学通讯 1980 第 4 期
- [7] 黄寿松 翁坚: 几种植物中的过氧化物酶同工酶分析 遗传 1980. 2(3)
- [8] 周光宇, 龚葵葵等: 远缘杂交的分子基础——DNA 片段杂交假设的一个论证 遗传学报 1979. 12月 第 6 卷 第 4 期
- [9] 周光宇: 遗传育种的生化指标—同工酶的分析 上海农业科技—1979. 3
- [10] 王秀珍: 苹果矮化砧与乔化砧过氧化物酶同工酶的比较研究 植物学报 1981. 1月
- [11] 童哲: 小麦幼根和幼苗中几种同工酶的初步研究 植物学报 1981. 6月 22 卷 2 期
- [12] 沈乃茹等 杉木过氧化物酶同工酶的初步分析 上海师范学院学报 1981.
- [13] Muhs, Hans-J., Distinction of Douglas-fir Provenances Using Peroxidase-Isoenzyme-Patterns of Needles, *Silvae Genetica* 23, 1—3 (1974)
- [14] Yang, I.-Ch., T. M. Ching and K. K. Ching, Isoenzyme Variation of Coatal Douglas-fir I. A Study of Geographic Variation in Three Enzyme Systems. *Silvae Genetica* 26, 1(1977)
- [15] 長戸かおる, カイソザム變異に基づく我が国のツバキ属植物の種間および種内関系, 育種学雑誌, 1979. 1

**ISOZYMIC STUDIES OF CUNNINGHAMIA  
LANCEOLATA AND CUNNINGHAMIA  
LANCEOLATA DECHANG**

Shen Nairu Fang Yongxin Wang Fang

**ABSTRACT**

Isoenzyme patterns of peroxidase (POD), esterase and malate dehydrogenase (MDH) were measure in the leaves of young trees by means of polyacrylamide gel slab electrophoresis, which interoduced from 5 provinces of China. These provinces are Guangxi, Guangdong, Anhui, Zhejiang, Hunan and Dechang Sichuan.

Experimental evidences indicate:

(1) The POD, esterase and MDH isoenzyme patterns of the variety from Dechang Sichuan were different from those of the others, including all of 5 provinces.

(2) These isoenzyme patterns of the varieties of provinces were same, except Dechang Sichuan.

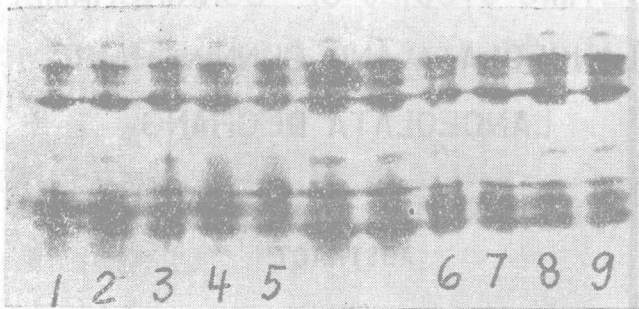
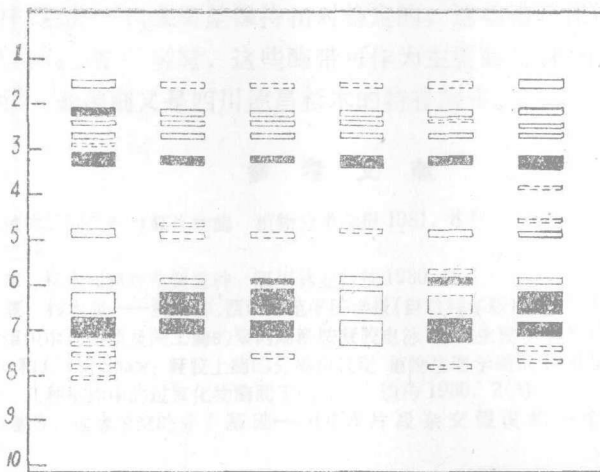


图 1.

1. 湖南 3. 浙江 4. 安徽 5. 四川德昌 6. 广东 8. 广西  
 2. 湖南 3. 浙江 4. 安徽 5. 四川德昌 6. 广东 7. 广东 8. 广西 9. 广西



不同地区杉木过氧化物同工酶谱带

图 2.



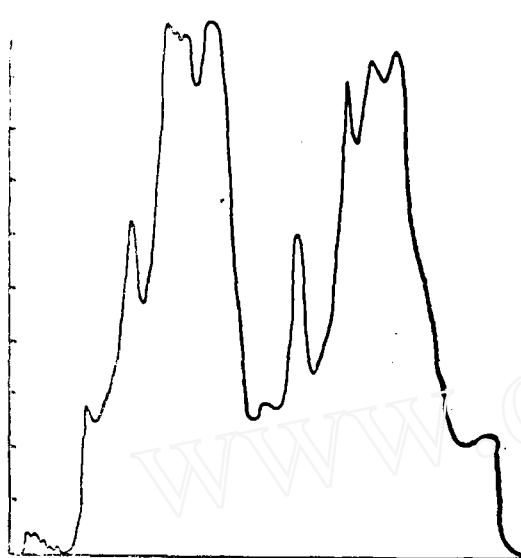


图3.1 广西幼叶

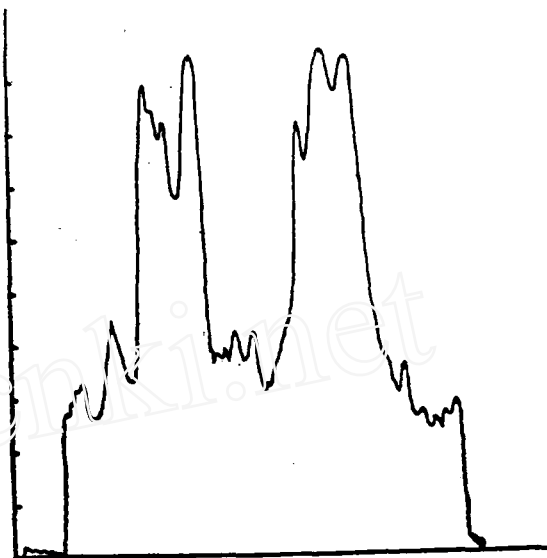


图3.2 广东幼叶

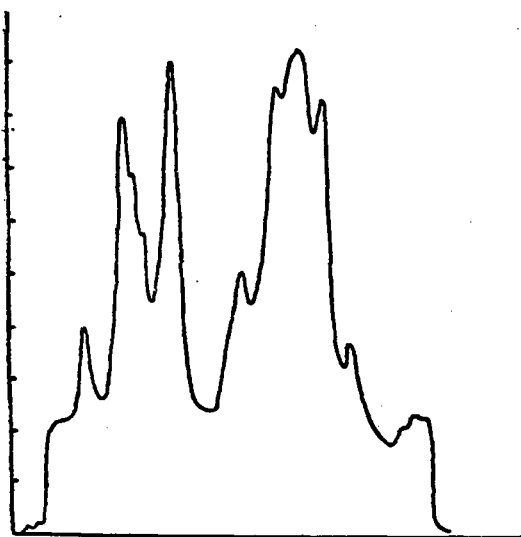


图3.3 安徽幼叶

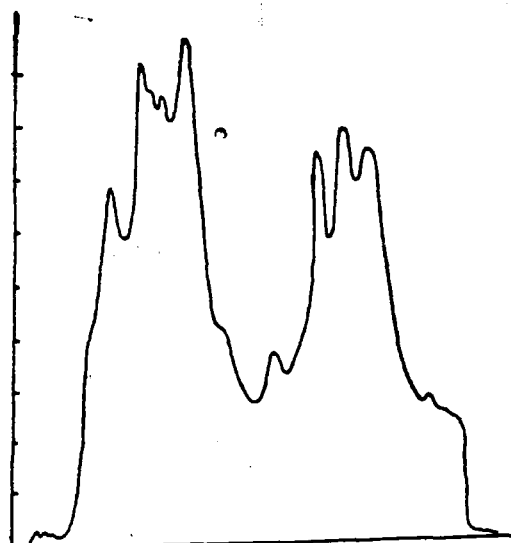


图3.4 浙江幼叶

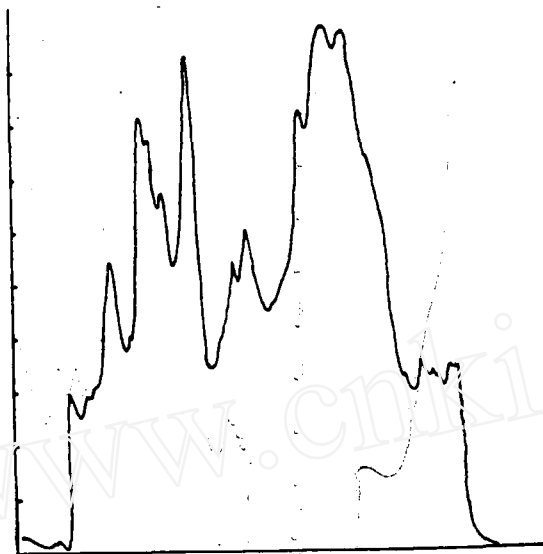


图 3.5 湖南幼叶

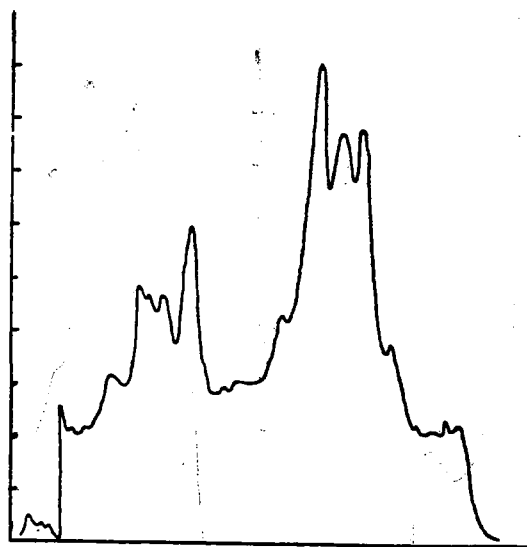


图 3.6 四川德昌幼叶

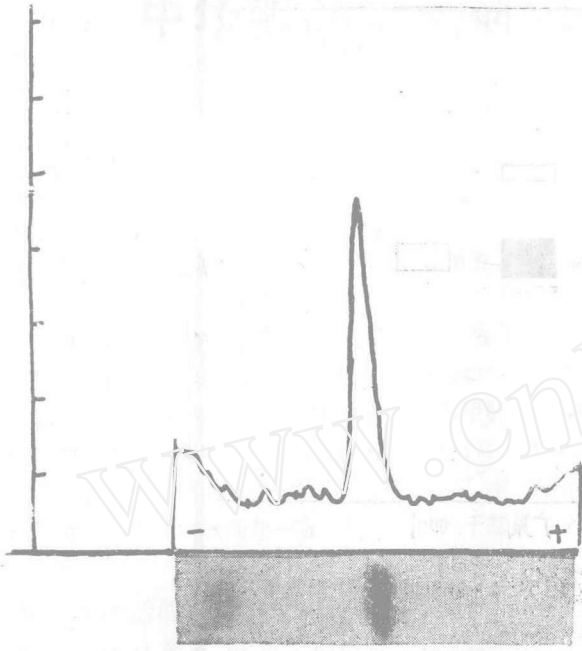


图 4.1 广东

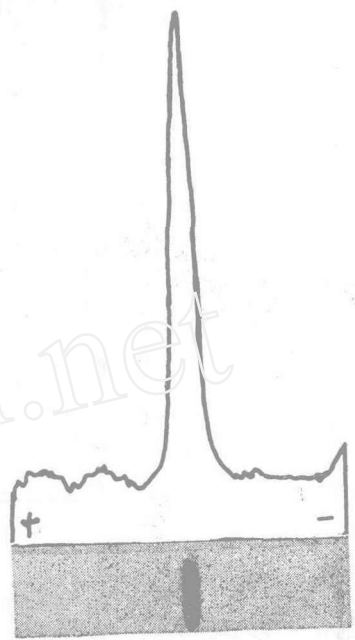


图 4.2 安徽

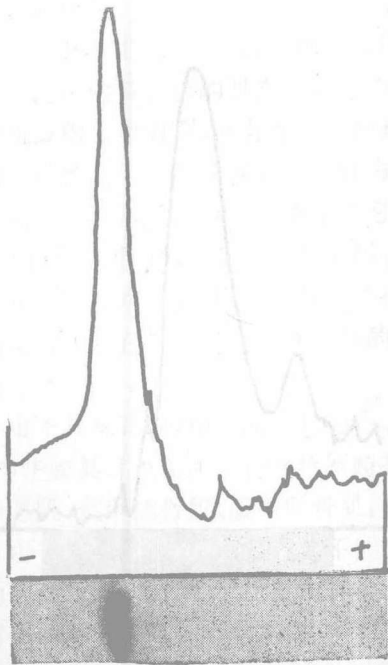


图 4.3 湖南

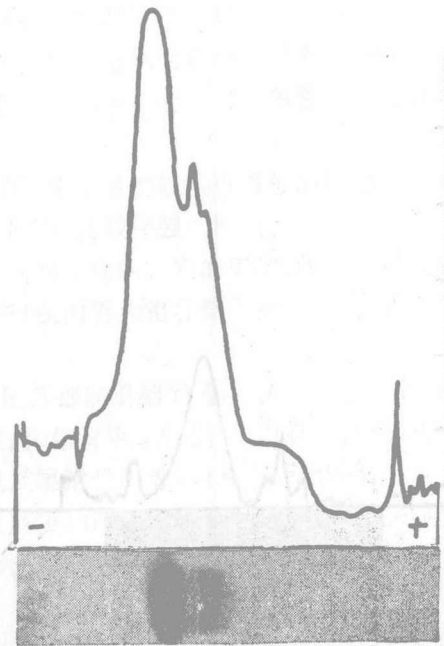


图 4.4 四川德昌

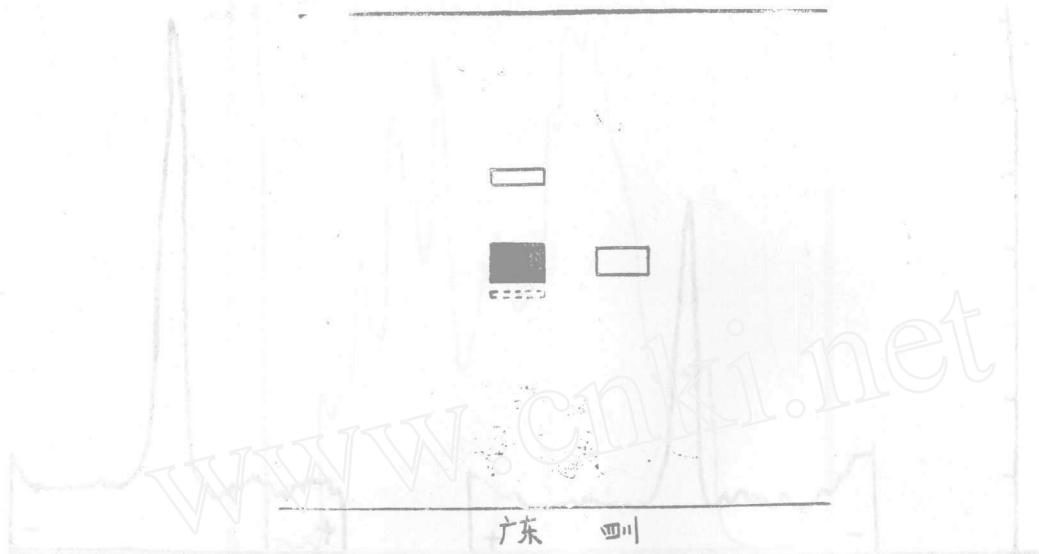


图5 苹果酸脱氢酶

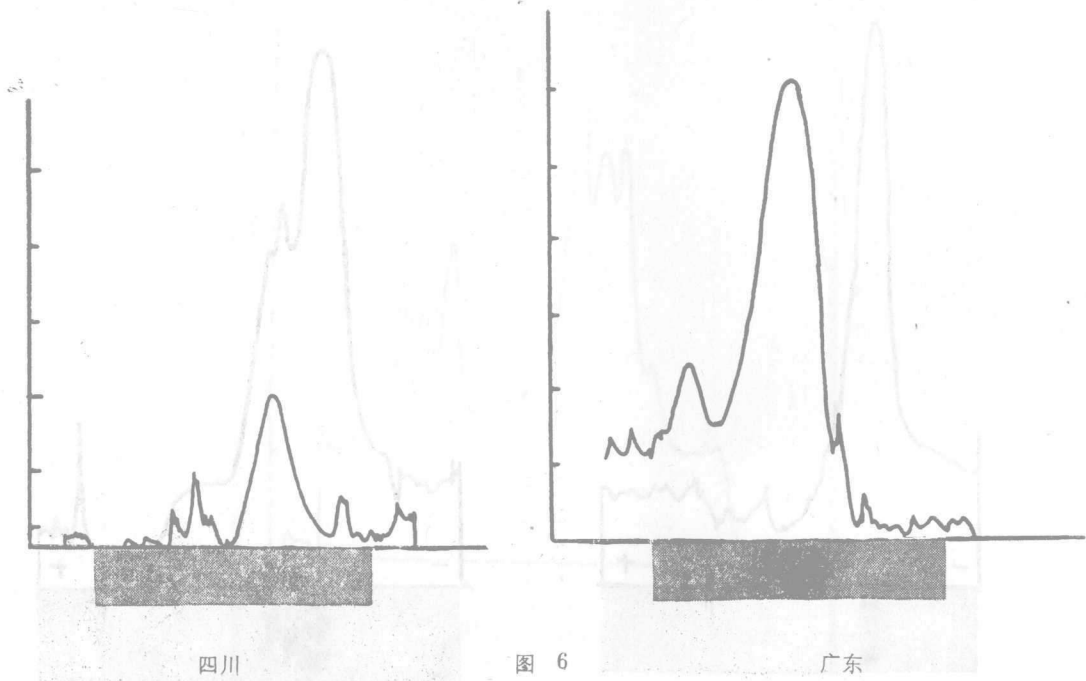


图6