

# 杉木过氧化物酶同工酶的初步分析

沈乃茹 方永鑫 夏晓敏\*

## 摘 要

应用聚丙烯酰胺凝胶电泳法,对我国杉木不同组织,器官及不同地区杉木幼叶的过氧化物酶同工酶进行了测定分析,初步实验结果表明:

1. 杉木不同组织、器官的过氧化物酶的同工酶谱带有二个区域,负极一般为3条谱带,正极区域差异较大。

2. 不同地理起源的杉木,其过氧化物酶的同工酶谱带不相同,但也具有二个相同谱带区域,负极为3条谱带,正极为4条谱带,个别地区为5条谱带。

同工酶主要指来源相同,催化性质相同而结构不相同的酶类。本实验的目的是为研究杉木的种内遗传差异及其起源提供一定的依据。

## 材 料 与 方 法

试材取自浙江省龙泉县林科所杉木不同地理起源的苗木田,它们的种子分别来自安徽金寨,江苏句容,浙江龙泉,四川德昌,广西融水等地。苗龄为7个月,取样时间于80年9月24日。每一产地各取杉木苗5株,取回后放入低温冰箱备用。

取自浙江龙泉的苗木分别进行叶,韧皮部,木质部,茎尖,子叶等过氧化物酶同工酶测定,幼根及子叶材料取自种子萌发。不同产地杉木种子在25°C恒温条件培养10天后,按幼根和子叶分别取材。

试验前将材料放入低温冰箱中,冷冻固定30分钟,称取一定重量,在冰浴中研磨。用pH8.3 Tris—甘氨酸电极缓冲液提取过滤;滤液在4000转/分的台式离心机中离心10分钟,取上清液再放入冰箱中15分钟,仍以4000转/分离心10分钟,该上清液供电泳分析时用。

### 操作过程:

1. 制备凝胶:采用聚丙烯酰胺凝胶圆盘状电泳法,测定过氧化物酶同工酶,凝胶浓度7.5%, pH8.9,分离胶浓度为2.5%, pH6.7。凝胶管长8cm,直径0.48cm。制胶时注意不要在直射光下,防止产生气泡。

2. 加样品液:安装凝胶柱管于电泳槽后,取出待测提取液,用微量注射器吸入100 $\mu$ l,轻轻加入每只凝胶管中,每次加样品要求精确。然后每管加入50 $\mu$ l 20%蔗糖,再加入0.1%溴酚蓝2滴。

3. 电泳:用SCR—3稳压稳流电泳仪,开始时每管电流1mA,5分钟后每管2mA,电压220—300V,电泳在4°C冰箱中进行,电泳时间60—80分钟。

本文于81年3月6日收到。

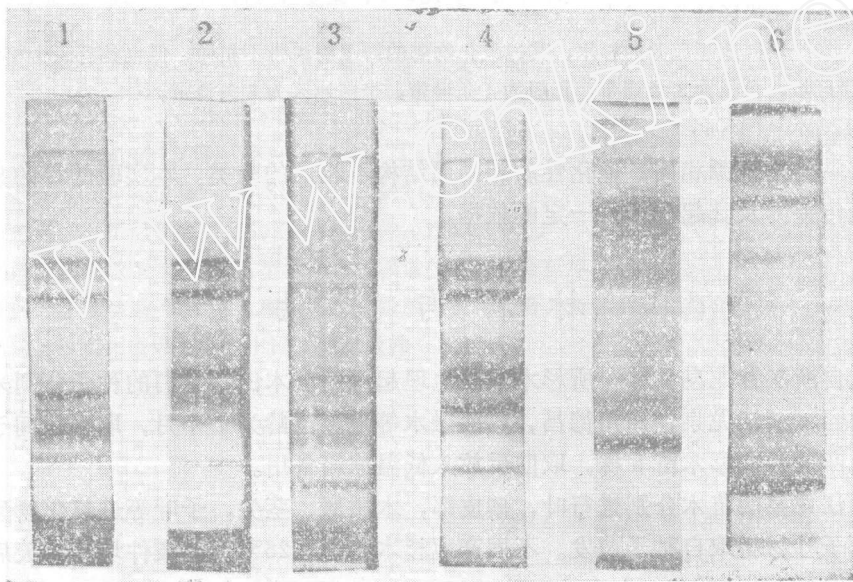
\* 湖南林科所进修生。

4. 染色固定：过氧化物酶的染色以抗坏血酸—联苯胺染色液染色。(抗坏血酸 50mg, 联苯胺储存液 20ml, 0.6%过氧化氢 20ml, 蒸馏水 60 ml) 取出凝胶, 用蒸馏水漂洗后, 放入染色液, 立即有蓝色谱带出现, 大约 5 分钟后, 出现全部谱带, 停止染色, 半小时后谱带呈褐色, 用水漂洗后, 再用 3% 醋酸固定保存。

5. 将染色固定的凝胶放在试管中, 立即拍照记录结果, 应及时进行凝胶柱的光密度计扫描以测定其相对百分比含量。

## 结果与分析

### 一、杉木不同组织器官过氧化物酶同工酶谱带的比较(如图一)：



图一

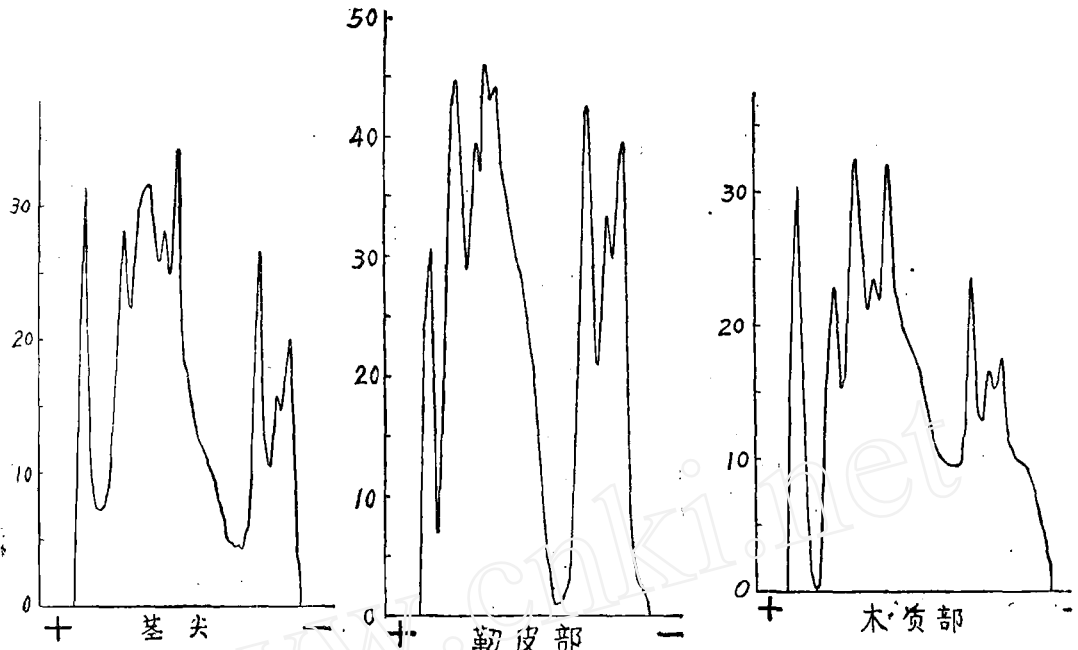
1. 茎尖 2. 幼叶 3. 木质部 4. 韧皮部 5. 根尖 6. 子叶

从照片可以看出, 各组织器官的过氧化物酶的同工酶, 谱带基本上是 7 条, 负极为 3 条, 正极为 4 条的二个区域, 其中子叶, 幼根谱带较多, 差异也显著, 主要与其生长迅速需要养料多, 代谢旺盛有关。

在分离提取各组织器官中过氧化物酶的过程, 我们曾用 4000 转/分离心与 14000 转/分离心作对比实验, 所得谱带清晰度无明显差异, 因此认为, 杉木过氧化物酶同工酶的提取分离, 可以采用 4000 转/分台式离心机进行离心, 能达到较好的效果。

二、杉木不同组织器官过氧化物酶同工酶, 相对百分比含量的测定。如扫描记录:(图二)

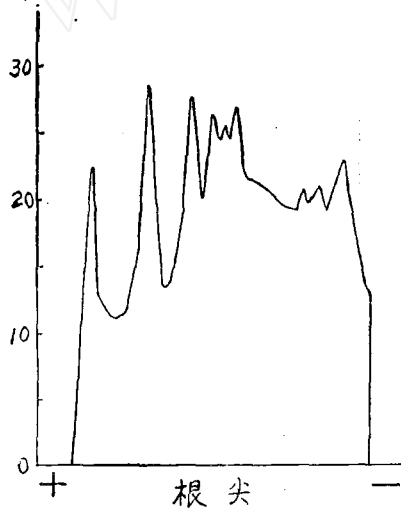
用 721 分光光度计凝胶柱扫描计扫描, 并初步计算各谱带的相对百分比含量如表 1:



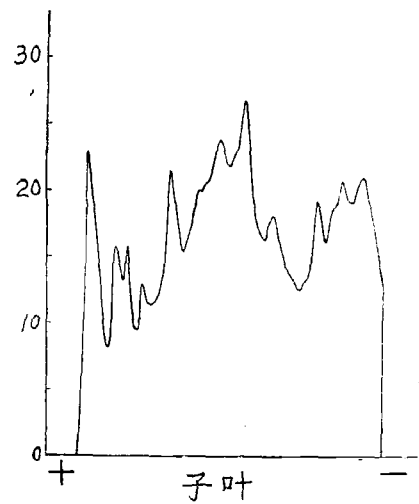
图二(1)

图二(2)

图二(3)



图二(4)



图二(5)

表 1 杉木不同组织器官过氧化物酶同工酶各谱带的相对百分比含量

谱带	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
茎尖	8	5	12	28	10	22	15			
幼叶	9	5	9	32	6	22	17			
木质部	13	6	11	34	7	18	11			
韧皮部	12	8	13	32	6	10	19			
子叶	13	11	9	11	15	21	11	3	3	3
根尖	15	7	6	26	5	10	15	16		

谱带顺序是依据负极向正极移动的先后次序而排列。(以下同)

从上表可以看出各组织器官的过氧化物酶同工酶各谱带的相对百分比, 分别在第4条或第6条带含量最高。

实验过程看出, 子叶幼根各谱带的相对百分比含量, 随不同萌发时期也有所不同, 这点还需进一步深入工作。

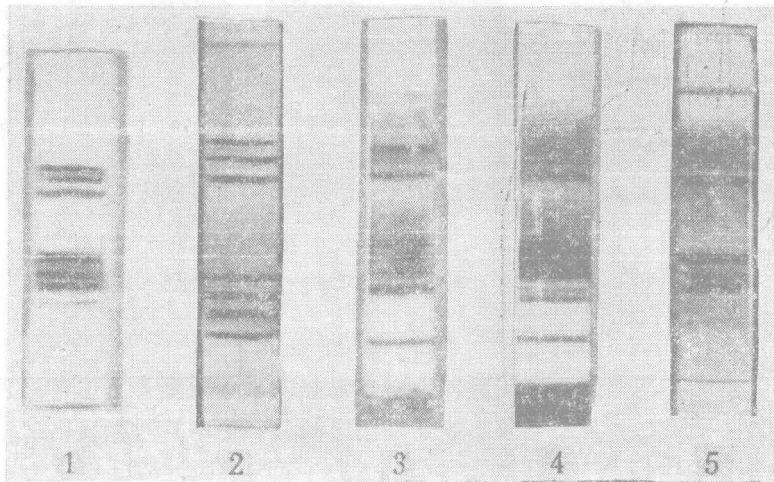
三、杉木不同组织器官过氧化物酶同工酶, 各谱带的相对泳动率  $R_m$  值的实验结果如表2。

表2 杉木不同组织器官过氧化物酶同工酶各谱带的相对泳动率 ( $R_m$ )

谱带	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
茎尖	0.25	0.30	0.37	0.68	0.74	0.82	0.90			
幼叶	0.24	0.30	0.37	0.68	0.73	0.78	0.86			
木质部	0.23	0.28	0.34	0.65	0.70	0.77	0.85			
韧皮部	0.24	0.29	0.35	0.65	0.70	0.77	0.86			
子叶	0.16	0.25	0.30	0.36	0.55	0.63	0.76	0.80	0.86	0.91
根尖	0.15	0.25	0.34	0.63	0.65	0.68	0.73	0.83		

表中各组织器官的过氧化物酶分离的谱带相对泳动率, 有相同或相近的泳动率, 但也有差异较大的, 这方面的实验还需进一步测定其相同或不同谱带泳动率。

四、不同地区杉木幼叶过氧化物酶同工酶的比较见图3。

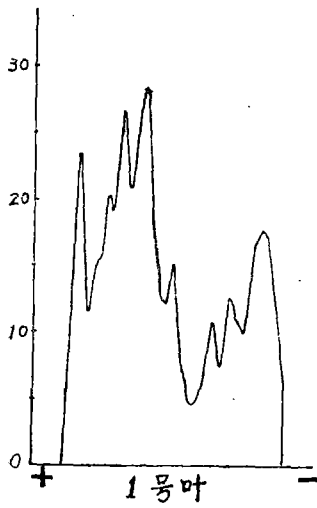


图三

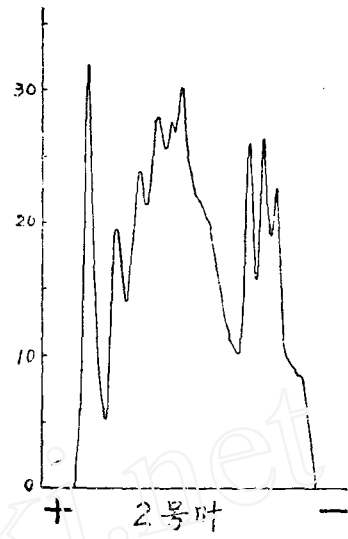
1. 安徽金寨 2. 四川德昌 3. 浙江龙泉 4. 广西融水 5. 江苏句容

不同地区杉木幼叶过氧化物酶同工酶各谱带有显著差异, 但它们具有共同点, 即明显地分为二个区域, 在负极端是3条谱带, 而在正极端除四川德昌为5条谱带之外, 均为4条谱带。因此初步测知, 杉木幼叶的过氧化物酶同工酶的差异是在正极端区域, 而四川德昌谱带的特殊性, 尚需进一步测定研究。

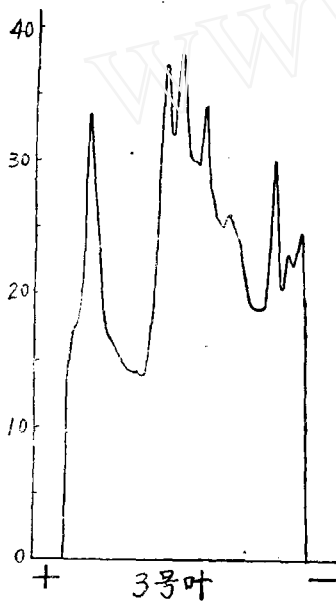
五、各地区杉木幼叶过氧化物酶同工酶, 各谱带相对百分比与相对泳动率  $R_m$  值测定结果见表3、表4及扫描记录如图四(扫描方法同前)。



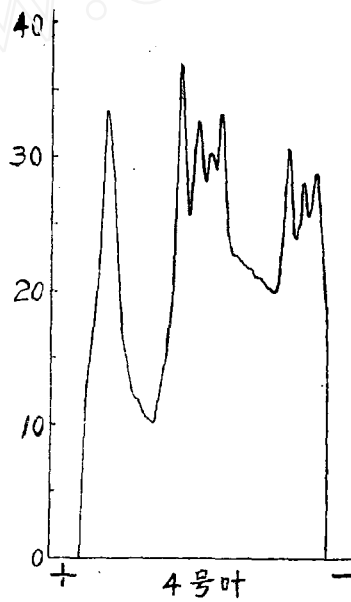
图四(1)



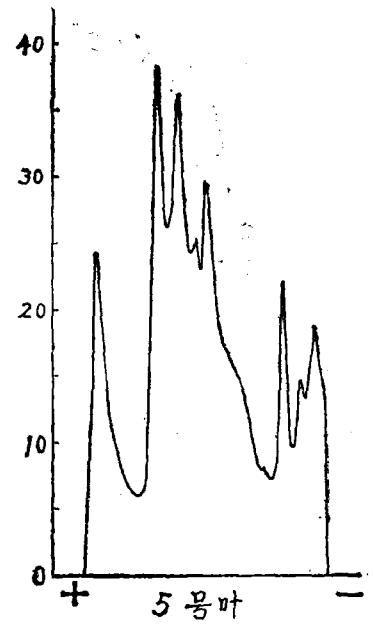
图四(2)



图四(3)



图四(4)



图四(5)

图 四

表 3 不同地区杉木幼叶过氧化物酶同工酶各谱带相对百分比含量

谱 带	1	2	3	4	5	6	7	8	9
1. 安徽金寨	20	9	7	11	24	16	13		
2. 四川德昌	7	9	10	32	9	13	12	8	
3. 浙江龙泉	7	6	14	21	16	18	18		
4. 广西融水	11	7	13	33	8	13	15		
5. 江苏句容	9	5	9	32	6	22	17		

初步测定结果,不同地区杉木过氧化物酶同工酶各谱带的相对百分比含量不尽相同。多数在第4条,第6条带的含量较高。

表4 不同地区杉木幼叶过氧化物酶同工酶各谱带相对泳动率( $R_m$ 值)

谱带	1	2	3	4	5	6	7	8
1. 安徽金寨	0.21	0.27	0.31	0.61	0.65	0.72	0.79	
2. 四川德昌	0.23	0.28	0.34	0.64	0.69	0.74	0.78	0.82
3. 浙江龙泉	0.21	0.23	0.31	0.59	0.64	0.70	0.77	
4. 广西融水	0.23	0.28	0.34	0.61	0.66	0.72	0.80	
5. 江苏句容	0.24	0.30	0.37	0.67	0.73	0.78	0.86	

不同地区杉木幼叶过氧化物酶同工酶谱带相对泳动率( $R_m$ 值)基本上是相近。

## 问题讨论

### 1. 提取液离心分离:

杉木各组织器官的过氧化物酶同工酶的提取液,用14000转/分冰冻离心与4000转/离心相对比,所得酶谱带无明显差异。

### 2. 抗坏血酸—联苯胺染色,取50mg抗坏血酸,较70.4mg的抗坏血酸效果好。

### 3. 杉木过氧化物酶同工酶的分离,采用间隔胶效果好。

根据我们的初步实验结果,认为对杉木的过氧化物酶同工酶的测定分析,可以为研究我国杉木的种内遗传差异,杉木的起源等工作,提供依据。

## 参 考 文 献

- [1] 莽克强: 聚丙烯酰胺电泳, 科学出版社 1975
- [2] 应启龙: 蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶电泳法, 科学出版社 1978
- [3] 吴少伯: 植物组织中蛋白质及同工酶的聚丙烯酰胺凝胶电泳, 植物生理通讯, 1979.1期
- [4] 童哲: 小麦幼根和幼苗中几种同工酶的初步研究, 植物学报22卷2期
- [5] 黄寿松等: 几种植物中的过氧化物酶同工酶分析, 遗传, 1980.3期
- [6] 长户かおる: カイソザイ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係, 育種学杂志79.1期