

小麦生育前期 POD 同工酶的动态变化

姬生栋, 李金亭, 吉爱玲, 李吉学, 王 丹, 徐存拴

(河南师范大学生命科学学院, 河南新乡 453002)

摘 要: 利用复性电泳技术, 对 2 个小麦品种 (冬性品种、春性品种) 从出苗到拔节初期绿叶中的 POD 酶谱进行分析, 结果表明: (1) 小麦从出苗到拔节初期 POD 的分子量均在 35 kD 以上 (含 35 kD); (2) 三叶期以前叶片中 POD 活性比三叶期以后的弱; (3) 小麦叶片中 POD 酶带变化主要集中在 52~146 kD 间; (4) 从出苗到拔节初期小麦绿叶中始终含有 300、52、39、37 kD 4 条活性较强的过氧化物酶; (5) 在不同的生育阶段和环境条件下, 绿叶中 POD 的种类和活性均有显著变化。

关键词: 小麦; 过氧化物酶; 复性电泳

同工酶

中图分类号: Q949.71⁺4.206

文献标识码: A

The dynamic changes of peroxidase isoenzymes in growth earlier stage of wheat

JI Sheng-dong, LI Jin-ting, JI Ai-ling,
LI Ji-xue, WANG Dan, XU Cun-shuan

(College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453002, China)

Abstract: The peroxidases of green leaves in two kinds of wheat breeds (winter, spring variety) from sprout of seedling to the initial stage of jointing were analyzed with renaturation electrophoresis. The results show: (1) The MWs of peroxidases from sprout of seedling to the initial stage of jointing are all above 35 kD (including 35 kD). (2) The activity of peroxidase before the trefoil stage is weaker than later. (3) The MWs of peroxidases in wheat leaves are mainly between 52 kD to 146 kD. (4) The four kinds of stronger peroxidases of 300 kD, 52 kD, 39 kD and 37 kD always exist in the period of sprout of seedling to the initial stage of jointing. (5) The kinds and activity of peroxidase have changed greatly under different growth stages and environmental conditions.

Key words: Wheat; peroxidase; renaturation electrophoresis

小麦从出苗到拔节, 要经过多种复杂的生理、生化变化才能完成各发育阶段, 如异养阶段、自养阶段、幼穗分化、春化阶段、光照阶段等。小麦苗期各种代谢活动之所以能按一定

收稿日期: 1999-10-25

作者简介: 姬生栋 (1963-), 男, 实验师, 长期从事小麦分子生物学研究。

基金项目: 河南省自然科学基金资助项目 (974013100)

模式有序地进行,主要依赖于基因控制的一系列活性蛋白质——酶进行调控,过氧化物酶(POD)是一种重要的氧化还原酶。研究小麦生育前期 POD 的动态变化,将从一个侧面反映出小麦各阶段的生长发育特点,体内代谢状况,以及对外部环境的适应性^[3~6,10]。

80 年代初建立起来的复性电泳技术(G-PAGE),是一种电泳后仍可保持酶的生物活性、研究各类酶结构、性质和作用的较理想的方法^[1,5],其原理是 SDS 与酶结合而使酶发生可逆变性,电泳完毕后用非离子去垢剂(如 TritonX-100)洗去与酶结合的 SDS,从而使酶恢复活性,然后用联苯胺染色法对 POD 同工酶染色。用此方法可了解每条 POD 带的分子量大小。近来许多研究者用复性电泳技术研究蛋白水解酶^[7,9],但使用此方法研究 POD 还很少有报道。本文用复性电泳技术研究正常播种的大田小麦,从出苗到拔节初期小麦叶片中 POD 的变化情况。

1 材料和方法

1.1 材料

本研究供试小麦品种有 2 个,冬性品种为 PH85-16 (*Triticum aestivum* L. cv PH85-16),春性品种为黑引一号 (*T. aestivum* L. cv Heiyin 1)。材料于 1997 年 10 月 11 日种于河南师范大学小麦试验田,播种在肥力等条件一致的同一田块,田间管理按常规大田措施,采用小区条播种植,设 3 个重复,随机排列,每个重复小区面积 10 m²,品种间设保护行。

1.2 样品的采集与处理

小麦出苗后第 6 d (10 月 23 日)上午第 1 次取样,随机取样,以后每隔 10 d 取 1 次样,翌年 3 月 12 日为第 15 次取样,此时黑引一号下部节间长 2.3 cm, PH85-16 下部节间长 1 cm。每次取整株迅速放入液氮中,带回实验室,4℃环境中洗净,取整株绿叶用 0.9% NaCl 提取,冰浴匀浆,4℃离心(20 000 g, 5 min),取上清液分装于 Eppendoff 管中,放入-85℃冰箱中保存备用。

1.3 蛋白质浓度测定和复性电泳

按 Neuhoff 等^[11]的方法测定制备液的蛋白质浓度。电泳前在样品制备液中加入样品缓冲液(3 倍样品缓冲液:78%甘油 10 mL+0.5 mol/L Tris-HCl, pH6.8, 3.5 mL+SDS 10 g,加水至 100 mL)。电泳时每槽所加样品蛋白质总量相同,按 Neuhaus-Steinmetz 等^[9]的复性电泳(G-PAGE)方法进行,分离胶浓度 10%,浓缩胶浓度 5%,每槽加样品总蛋白量 50 μg,电泳在 4℃环境中,恒压进行,样品在浓缩胶里时,电压≤50 V,每板初始电流≤10 mA;样品进入分离胶后,电压≤100 V,每板电流≤10 mA。待前沿指示剂(1%溴酚兰)到分离胶下缘 1~2 cm 时停止电泳,取出分离胶板,切除溴酚兰以下部分,将胶板放入 250 mL 洗涤液中(TritonX-100 12 mL, Tris-base 3.03 g,加双蒸水 500 mL,调 pH7.0)洗涤 30 min,后再用单蒸水洗 2 次,双蒸水洗 1 次,每次 5 min,洗涤完毕,用联苯胺染色法对 POD 染色(0.1 g 联苯胺+5 mL 无水乙醇+10 mL 1.5 M 乙酸钠+10 mL 1.5 M 乙酸+50 mL 双蒸水+2 mL 3% H₂O₂),显色后随即用水冲洗保存于 7%乙酸中。同一板中加入 2 种标准蛋白(M1:M.W. 97.4、66.2、42.7、31、14.4 kD, Shanghai Promega 和 M2:M.W. 212、116、97.4、66.2、57.5、40 kD, Promega),电泳完毕洗胶前将带标准蛋白的胶切去,固定、染色、脱色参照 Laemmli 方法^[12]。

1.4 酶活性测定

将显色后保存于 7%乙酸中的胶板进行扫描处理,然后将扫描的图像信息用 ScanPacK 软件系统进行活性分析。

1.5 主要试剂

Acrylamide (USB)、Bisacrylamide (Fluka)、Gelatin (Sigma)、TEMED (Bio-Rad)、SDS (Gibco)、Tris-base (Gibco)、TritonX-100 (FARCO) 等。所用试剂均为分析纯。

2 结 果

2.1 同一品种各生育阶段 POD 的变化

由图 1 可以看出,春性小麦品种黑引一号从出苗到拔节初期,各生育阶段叶片中 POD 酶带有明显变化。其中有 4 条酶带贯穿于各生育期,分别为 300、52、39、37 kD。此外,47 kD 酶带仅 a_9 、 a_{12} 这 2 个时期不存在。出苗后第 6 d (图 1 中 a_1 , 此时小麦为一叶一心),叶片的电泳图谱中,除上述 5 条酶带外,还有 106 kD、146 kD 活性较弱。到第 16 d (图 1 中 a_2),仍可见到 6 条酶带,但 146 kD 和 106 kD 消失,出现一条 90 kD 新带,此时正是三叶一心,是小麦幼苗由异养阶段转变为自养阶段的时期。小麦生长到 26 d 和 36 d (图 1 中 a_3 和 a_4) 以后,与 a_1 、 a_2 对应的 5 条酶带活性显著加强,同时出现一条活性极强的新带—74 kD 和一条较弱的酶带—98 kD。小麦生长到 46 d (图 1 中 a_5),此时小麦已是五叶一心,74 kD 活性很弱,出现 90 kD 一条强带,此后小麦幼穗分化开始进入二棱期,气温开始下降,90 kD 酶带减弱,85 kD 酶带具极强的活性 (见图 1 中 a_6)。小麦生长到 66 d (图 1 中 a_7),叶片 POD 带型与 a_1 、 a_2 相同,只是 300 kD 酶带活性比前边几个时期的都强,此时春性品种出现轻度冻害。小麦生长到 76 d (图 1 中 a_8),已进入翌年元月 2 日,从酶谱看,74 kD 活性基本消失,90 kD 酶带又重新出现,且活性较弱,此时小麦已进入越冬期。随着越冬期的进一步深入,春性品种冻害达到中度,POD 酶谱又有新的变化 (图 1 中 a_9),总 POD 活性达到拔节以前各生育期的最高值,出现 249、146、106 kD 3 条活性较强的新带,47 kD 酶带消失。小麦生长到 96 d (图 1 中 a_{10}),146、106 kD 酶带基本消失,90、47 kD 酶带又出现。小麦生长到第 106 d (图 1 中 a_{11}),249、98、90 kD 酶带消失,85 kD 酶带出现。随着气温回升,越冬期将结束,小麦生长到 116 d (图 1 中 a_{12}),47 kD 酶带消失,出现 2 条较弱的酶带 45 kD 和 98 kD,而 300、52、39、37 kD 这 4 条带的活性均较强。小麦生长到第 126 d (图 1 中 a_{13} , 2 月 22 日),98 kD 活性加强,85 kD 活性消失,146 kD 活性较弱,47 kD 酶带又重新出现。小麦生长到第 136 和 146 d (图 1 中 a_{14} 和 a_{15}),POD 酶带与 a_{13} 基本一致,300、52、39、37 kD 活性渐有减弱。总之,纵观春性小麦黑引一号从出苗到拔节初期整个 POD 酶谱,可以清楚地看出,300、52、39、37 kD 这 4 条酶带在整个小麦生育前期都存在,其活性强弱随着生育阶段的不同及环境条件的变化而变化,各生育阶段变化最活跃的酶带主要在 146~74 kD 之间,47 kD 酶带在小麦生长到第 86、116 d 时消失,并且 POD 同工酶的分子量均大于 35 kD。

PH85-16 小麦属于冬性品种,从出苗到拔节初期叶片中过氧化物酶酶谱变化情况见图 2,其中 300、52、39、37 kD 4 条酶带存在于每个时期,且活性较强。出苗后第 6 d (图 2 中 b_1),POD 主要有 8 条酶带,除上述 4 条外,还有 146 kD (活性弱)、106 kD (活性较强)、47 kD (活性最强)、36 kD (活性弱)。小麦长到三叶期 (图 2 中 b_2),146 kD 活性减弱,106 kD 消失,出现一条 98 kD 酶带,36 kD 活性比 b_1 强,249 kD 也清晰可见。小麦生长到 26、36 d (图 2 中 b_3 、 b_4),出现一条活性很强的酶带—74 kD,52、47、37、36、300 kD 活性加强,98 kD 活性减弱,146 kD 基本消失。小麦生长到 46 d (图 2 中 b_5),74 kD 活性很弱,249、37 kD 活性增强,此时出现一条活性很强的酶带—90 kD,本次取样前一天开始降温。随后到第 56 d

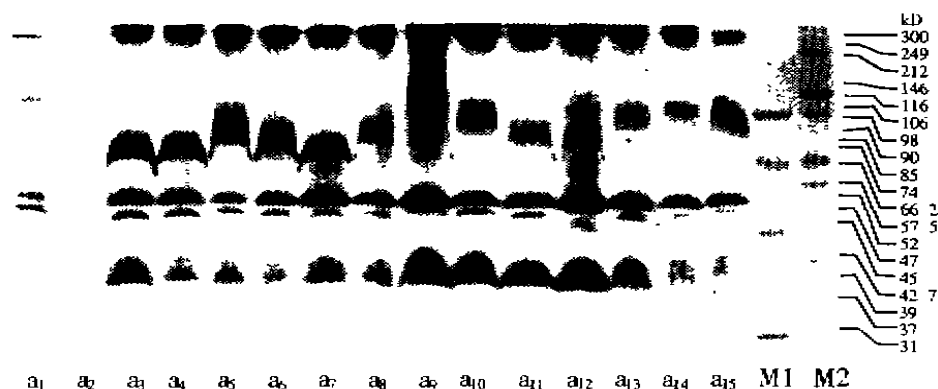


图 1 黑引一号小麦 POD 酶谱 Fig. 1 The peroxidases of Heiyin 1 wheat

a. 黑引一号 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17 分别表示出前后第 5、16、26、36、46、56、66、76、86、96、106、116、126、136、146 d. M1: 中分子量标准蛋白; M2: 高分子量标准蛋白。



图 2 PH85-16 小麦 POD 酶谱 Fig. 2 The peroxidases of PH-85 wheat

b. PH 85-16, 其他说明同图 1. b. PH 85-16. The others are as those of 1.

(图 2 中 b_6)，总酶活比各时期都强，出现一条活性强的酶带—85 kD，并且 52、47、37 kD 均比其它时期活性强，此时 PH85-16 已达五叶一心，幼穗分化为单棱期。小麦生长到 66、76 d (图 2 中 b_7 、 b_8)，90、85、47 kD 酶带消失，98 kD 活性较弱，出现 43 kD 一条新带，74 kD 活性加强。小麦生长到 86 d (图 2 中 b_9)，106 kD 活性增强，74、43、36 kD 基本消失，17 kD 又重新出现，但活性极弱。小麦生长到第 96 d (图 2 中 b_{10})，74、47 kD 活性增强，36 kD 重新出现，98 kD 活性减弱。小麦生长到第 106 d、116 d、126 d (图 2 中 b_{11} 、 b_{12} 、 b_{13})，带型与 b_{10} 基本一致，只有 47 kD 消失，出现一条 42 kD 新的酶带，74 kD 活性变化依次为强—弱—强。随着越冬期结束，进入起身、拔节初期 (图 2 中 b_{14} 、 b_{15})，74 kD 极弱，85 kD 活性增强，42 kD 酶带消失，45 kD 以较强活性出现。总之，冬性小麦 PH85-16 从出苗到拔节初期，绿叶中 POD 酶带以 300、52、39、37 kD 较稳定，分子量介于 116~74 kD 和 47~42 kD 之间的酶带变化较大，249 kD 活性在小麦生长到 56 d 以后渐渐消失，过氧化物同工酶分子量均大于等于 35 kD。

2.2 品种间 POD 酶谱的变化

从 2 个品种复性电泳图谱可以看出, 300、52、39、37 kD 这 4 条 POD 带存在于所研究的 2 个品种每个时期。2 个品种的过氧化物酶分子量均在 35 kD 以上(含 35 kD)。2 个品种酶谱的变化趋势基本一致, POD 酶带的消失、出现主要集中在 146~74 kD 及 47~42 kD 之间。冬性品种 PH85-16 在 47~42 kD 之间的酶带变化比春性品种黑引一号活跃。PH85-16 小麦的 36 kD 基本上一直保持较强的活性(生长到 86 d 除外), 而春性品种电泳酶谱未发现此带。2 种小麦品种从出苗到 26 d 以前, POD 的活性较低, 生长到 26 d POD 活性显著提高, 以后仍一直保持较强的活性。小麦生长到 86 d (图 1、2 中 a_5 、 b_4), 2 个品种 300、106 kD 的活性明显加强, 特别是 106 kD 活性显著增加, 而 47 kD 活性显著减弱, 与前后 2 个生长时期的 POD 酶带形成显著差异。

3 讨 论

小麦从出苗到拔节初要经过几个重要的生育阶段, 纵观各时间段小麦绿叶中 POD 同工酶的变化, 可清楚地看出, 无论是冬性(PH85-16)还是春性(黑引一号)小麦出苗后 26 d (图 1、2 中 a_3 、 b_3) POD 总活性显著加强, 并出现一条新的活性极强的酶带—74 kD。小麦生长到 16 d 时 2 个品种的叶龄为三叶期(黑引一号三叶一心; PH85-16 三叶一心, 1 个小蘖), 此时异养阶段即将结束, 转向自养阶段。到出苗后 26 d, 小麦完全以自养为主, 这时分蘖已开始, 幼穗分化刚进入单棱初期。由此可见, 74 kD 的出现(图 1、2 中 a_2 - a_3 、 b_2 - b_3)和总 POD 活性加强的现象可能与幼穗分化开始或小麦异养阶段结束转向自养阶段有关, 或是二者共同作用所致, 或与其它别的因素有关。看来, POD 是反映小麦代谢活动的一个重要酶类。

以前研究 POD 酶谱多以小麦样品鲜重为基础^[3-6], 本电泳每个处理的蛋白质总量均相同, 避免了处理间制样过程中发生误差, 更准确地反映了 POD 的变化。POD 酶谱中 2 种小麦品种变化总趋势基本一致, 74 kD 在春性小麦生长到 76 d 时, 活性突然降低, 此时幼穗分化已是单棱末期; 冬性小麦 PH85-16 生长到 136 d 时 74 kD 活性也突然减弱, 这时 PH85-16 也处于单棱末期。从这一点看, 74 kD 活性强弱, 可能与苞原始体分化或穗轴分化有关, 是小麦生理变化过程中一个重要的氧化还原酶。

2 个品种在生长到 46 d 时(图 1、2 中 a_5 、 b_5)酶带发生显著变化, 恰好在这次取样的前一天发生气温突然降低, 所以 74 kD 酶活减弱, 出现一条活性很强的 90 kD 酶带, 可能是由于冷刺激引起小麦体内发生正常的生理反应, 以后随着温度的平稳, POD 酶带有如下变化过程: 90 kD 减弱, 85 kD 出现, 85 kD 活性减弱, 74 kD 活性又重新加强。在小麦生长到 86 d 时, 取样前一天也有一次降雪和气温骤降, 这时冬性品种 74 kD 活性减弱, 43 kD 消失, 106 kD 活性加强; 春性小麦黑引一号 90 kD 活性减弱, 47 kD 消失, 146、106、52 kD 活性突然加强。这两次降温 POD 酶带变化十分相似, 这说明 POD 对冷刺激特别敏感。关于 2 次降温, 同一品种间激活的 POD 酶带不一致, 这可能是由于第二次降温伴有降雪或是因为生育期不同所致。从总的 POD 活性来看, 第一次降温, 冬性品种总酶活与前边相邻时期相比变化不大, 而后边相邻时期 POD 活性显著增大, 这可能是冬性品种受到低温刺激后, 需要一个恢复期才能使酶活加强。春性品种受到冷刺激后, POD 活性短时间内增加, 这可能是因为其对低温较敏感, 不需要长时间恢复, 就可以使 POD 活性加强。这一现象还有待于进一步探讨。春性品种第二次降温酶活性加强, 可能与春性品种完成春化阶段, 对环境比较敏感, 或其它生理现象

有关,此时春性品种已发生严重冻害。2个品种在春化阶段总 POD 活性强,与(杨肇骅)^[14]报道一致,并且 POD 酶带也发生十分显著变化,74 kD 可能也与春化作用有关。冬性品种第 2 次降雪降温后(图 2 中 b₉)总酶活降低,这是否由于地表气温降至 0℃ 以下,小麦地上部分生长缓慢,机体内部代谢活动降低引起?而春性品种的 POD 活性加强是因为发生了严重冻害所致?看来,POD 可能是连接环境与代谢的一种重要酶类。

以上结果可以看出,POD 是小麦体内最重要的氧化还原酶类之一,它具有多种同工酶,对外界环境和小麦机体内部生理变化十分敏感。POD 活性的强弱以及 POD 某种同工酶的活化或抑制,直接反映着小麦机体内部某个生育时期的代谢状况,同时,还反映出外部环境因素变化情况。上述提到的几种在小麦各生育阶段变化比较活跃的 POD 同工酶,将进一步研究小麦机体内部调控机制提供依据。在逆境条件下,POD 的活性及同工酶谱均发生变化,这是机体进行正常代谢活动的一种重要生理调节功能。

总之,为了确保实验结果的可靠性,本试验于 1997~1998、1998~1999 年度做了 2 次重复,实验结果基本一致。同时,每年度各品种均设 3 个重复,随机排列,随机取样,从而降低试验误差,使实验的精确性提高,更真实地反映大田小麦叶片 POD 的变化情况,电泳结果表明重复间的 POD 同工酶谱相同。本文仅就 1997~1998 年度 1 个重复结果进行分析。但是,由于本研究对象生长在大田环境中,受到各种外界环境因素的影响,加上小麦机体内部各种代谢活动时刻变化,所以,对 POD 酶谱的分析很难针对某种环境因素或生理指标,有时很可能是几种因素综合作用的结果。因此,有些结论还有待于进一步研究。

参考文献:

- [1] 徐存拴,吉爱玲,夏 民等.用复性电泳技术研究溶酶体蛋白水解酶的性质和活性[J].河南科学,1998,16(2),184~191
- [2] 孙景信,王玉琦,徐 元等.小麦 POD 同工酶谱蛋白条带中硒的中子活化分析[J].科学通报,1997,42(16):1770~1773
- [3] 习 岗,傅志东等.外磁场对小麦萌发期过氧化物酶合成的影响及其激活效应[J].植物生理学报,1993,19(2):155~161
- [4] 杨肇骅,王文宏,谭克辉等.冬小麦幼苗春化期间过氧化物酶的变化[J].植物生理学报,1981,7(4):311~316
- [5] 慎 玫,王彩莲,徐 刚等.辐射对大麦过氧化物酶同工酶谱影响的初步研究[J].遗传,1991,13(1):7~9
- [6] 董 哲,崔郁英,王健菊等.小麦幼根和幼苗中几种同工酶的研究[J].植物学报,1980,22(2):147~150
- [7] 王 莹,李效宇,徐存拴等.海带、裙带菜和紫菜蛋白酶谱的研究[J].植物学报,1998,40(10):939~946
- [8] Heussen C, Dowdle E B. Electrophoretic Analysis of Plasminogen Activators in Polyacrylamide Gels Containing Sodium Dodecylsulfate and Copolymerized Substrate [J]. *Anal Biochem*, 1980, 102: 196~202
- [9] Neuhaus-Steinmetz U, Xu C-S, Fracella F et al. Heat Shock Response and Cytotoxicity in C6 Rat Glioma Cells: Structure-activity Relationship of Different Alcohols [J]. *Mol Pharmacology*, 1994, 45: 36~41
- [10] Scandalios, J G. Isozyme in Development and Differentiation [J]. *Ann Rev Plant Physiol*, 1974, 25: 225~258
- [11] Neuhoff V, Philipp K, Zimmer H G. A Simple, Versatile, Sensitive and Volume Independent Method for Quantitative Protein Determination Which is Independent of Other External Influences [J]. *Z Physiol Chem*, 1979, 360: 1657~1670
- [12] Laemmli UK. Cleavage of Structural Proteins During the Assembly of the Head of Bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227: 680~685