

① 59-63

广西植物 (Guthua) 20 (1): 59-63

2000年2月

文章编号: 1000-3142(2000)01-0059-05

## 萝卜贮藏期过氧化物酶活性及同工酶谱研究

S631.109.3  
Q554.6

李金亭, 王林嵩, 马剑敏, 王琳, 徐存拴

(河南师范大学生物系, 河南新乡 453002)

**摘要:** 为了研究萝卜贮藏期过氧化物酶的活性变化和作用, 利用愈创木酚法和聚丙烯酰胺凝胶电泳方法检测在贮藏期萝卜过氧化物酶的活性及同工酶谱, 实验结果表明: 不同品种的萝卜在不同贮藏时期其过氧化物酶活性及同工酶谱存在差异, 贮藏时间越长过氧化物酶活性越高, 同工酶谱酶带增多。萝卜色素含量越高, POD 活性也越高, 因此, 在萝卜贮藏期有可能过氧化物酶在清除细胞内  $H_2O_2$  方面起主要作用。

**关键词:** 过氧化物酶; 萝卜; 冬贮藏期; 同工酶谱

**中图分类号:** S631.109.3 **文献标识码:** A

## The study of peroxidase activity and isoenzyme of radish in storage

LI Jin-ting, WANG Lin-song, MA Jian-min,  
WANG Lin, XU Cun-shuan

(Department of Biology, Henan Normal University, Xinxiang 453002, China)

**Abstract:** By PAGE and guaiacol methods the change of POD of radish in storage was observed. The experimental results showed that there were differences in POD activity and PAGE POD isoenzyme for different breeds of radish storage. The longer the storese time lasted, the higher the enzyme activity and the more the isoenzyme band were. The activity of POD was raised with the increase of pigment contents. These suggest that POD takes a role in decreasing  $H_2O_2$  during radish stored.

**Key words:** Peroxidase; radish; stored stage; isoenzyme

过氧化物酶(Peroxidase, EC1.11.1.7;POD)是植物中普遍存在的一种氧化还原酶,参与植物的许多生理过程。如植物对低温<sup>[1]</sup>及病虫害<sup>[2]</sup>的抵抗,植物细胞壁木质素<sup>[3]</sup>合成及细胞内自由基的清除<sup>[4]</sup>等等,有些植物如苹果、马铃薯、萝卜等,其果实、块茎、肉质直根等要经历贮藏期,以供食用或来年作种用等。但这些植物在贮藏期植物体内酶活性及同工酶谱变化研究甚

收稿日期 1998-12-07

作者简介:李金亭(1962-),女,实验师,在中心实验室从事生物科研工作。

基金项目:河南省科技攻关项目资助(编号:971150111)

少,其机理尚不清,尤其是萝卜贮藏期的 POD 活性及同工酶谱变化尚未见报道。为此,我们对四个品种萝卜在贮藏期的 POD 进行研究,以期对贮藏植物体内生理生化变化作一探讨。

## 1 材料与方 法

### 1.1 材料处理

实验材料为河南师范大学生物系生物园种植的萝卜,品种为地黄英、丰光、短叶青和心里美,种子购自新乡市蔬菜公司,11 月份收获后,贮藏于地窖内,每隔 30 d 进行采样检测,从 12 月到次年 4 月共检测 5 次。将萝卜用粉碎机初步粉碎,准确称取 10 g,加石英砂充分研磨后,4℃离心 30 min,4 000 r/min,取上清液分别测定 POD 活性及同工酶谱。

### 1.2 POD 活性检测

参照张龙翔等方法<sup>[1]</sup>,将样品稀释至蛋白浓度为 1 mg/mL,加样 10  $\mu$ L,470 nm 处检测光吸收值变化,以  $\Delta 0.001$  OD/min 表示 1 U 酶活单位,反应体积为 3 mL,含 pH 7.0,0.01 M PBS,0.13 mM  $H_2O_2$ ,1 mM 愈创木酚。

### 1.3 POD 同工酶谱检测

用垂直板聚丙烯酰胺不连续凝胶电泳,浓缩胶浓度为 3%,分离胶浓度为 7%,样品缓冲液为 pH 7.0 的甘油磷酸缓冲液,加入样品后使甘油终浓度为 10%,样品蛋白加样量为 7  $\mu$ g,电泳凝胶缓冲系统为 Tris-HCl 缓冲系统,浓缩胶 pH 6.7,分离胶为 pH 8.9,电极缓冲液为 Tris-甘氨酸 pH 8.3,恒压电泳至溴酚蓝指示剂达凝胶前沿 1 cm 处,电泳完毕参照胡能书<sup>[5]</sup>等方法进行联苯胺 POD 染色,照像后凝胶进行 470 nm 薄层扫描。

### 1.4 试剂与仪器

722 型分光光度计上海第三分析仪器厂产,300/600 电泳仪 Bio-Rad 公司产,CS-930 二维波长色谱扫描仪 shimadzu 公司产,高速离心机日立公司产。

所用试剂愈创木酚为化学纯,Tris、甘氨酸为生化试剂,其它均为分析纯。

## 2 结 果

### 2.1 贮藏期 POD 活性变化

不同品种间 POD 活性有较大差异,地黄英酶活最低 2.7 U/ $\mu$ g pro,心里美酶活性最高 6.4 U/ $\mu$ g pro,同一品种在不同贮藏时期 POD 活性也有差异。呈现一个逐渐升高达峰值趋势(图 1)。

### 2.2 POD 同工酶谱变化

从电泳同工酶谱上可以清楚地看到,在萝卜贮藏过程中,不同萝卜品种及同一萝卜品种不同贮藏时期同工酶谱带明显差异,贯穿整个贮藏期的 C 和 D 带是所有品种共有,B 带在不同品种间有一个从弱到强,或消失的特征性变化,A 带仅在个别品种,个别时期出现,薄层扫描也显示在萝卜贮藏过程中 POD 同工酶谱有明显差异(详见图 2、3、4、5)。

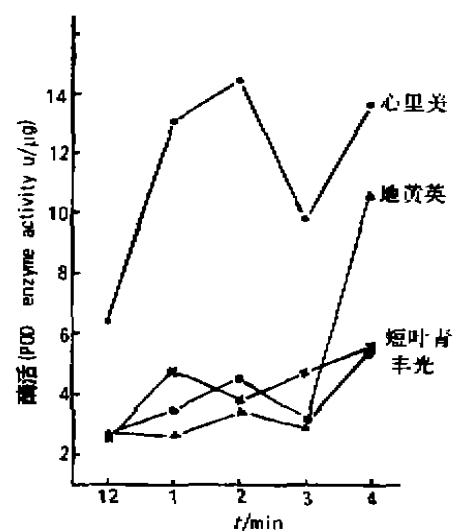


图 1 萝卜贮藏期 POD 活性变化  
Fig. 1 Change of POD activity of radish during winter stored stage

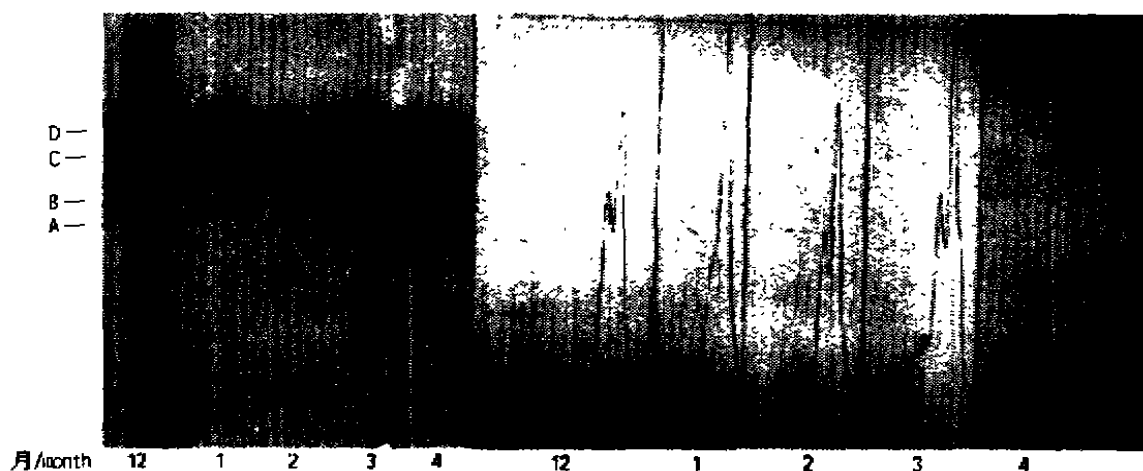


图2 地黄英萝卜贮藏期 POD 同工酶凝胶电泳图谱及薄层扫描  
Fig.2 POD isoenzyme PAGE and dual wavelength chromatogram of  
Dihuangying radish during winter stored stage

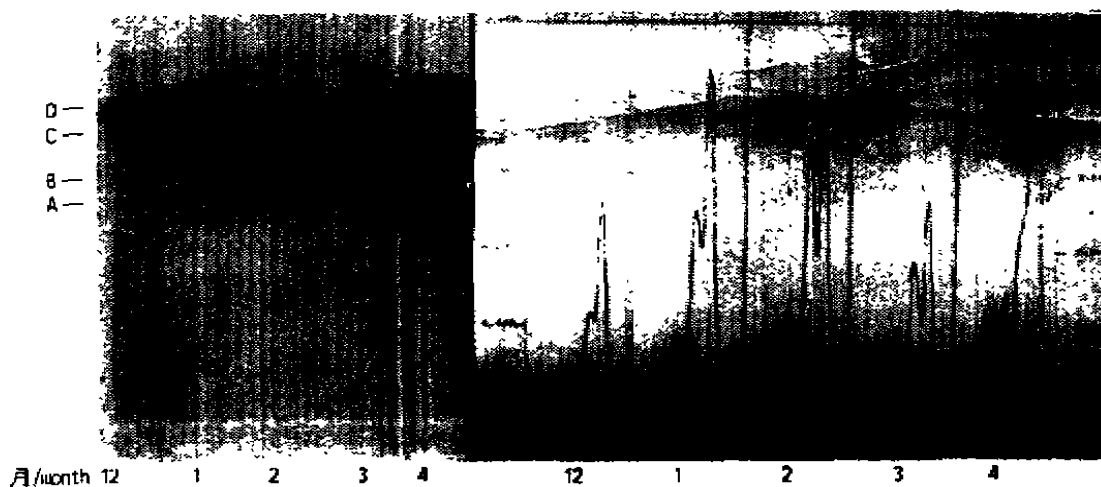


图3 丰光萝卜贮藏期 POD 同工酶凝胶电泳图谱及薄层扫描  
Fig.3 POD isoenzyme PAGE and dual wavelength chromatogram of  
Fengguang radish during winter stored stage

### 3 讨 论

植物进入贮藏期后,其与环境之间的物质交换过程减弱,尤其是营养物质的获得几乎停止。而植物在贮藏过程中,细胞内仍进行着一系列生化反应,其中进行最剧烈地应属氧化还原反应,低温贮藏条件下,马铃薯<sup>(6)</sup>块茎和苹果<sup>(7)</sup>、蕃木瓜<sup>(8)</sup>等植物的果实中 POD 活性增加,在与成熟有关的软化过程的中点呈峰值,并且有 POD 同工酶带的消失与新生。POD 的活性变化在萝卜冬贮期也存在类似现象,所不同的是萝卜 POD 活性是随贮藏时间延长逐渐增高,高峰期位于 4 月份。正值萝卜春化作用结束,繁殖器官开始形成时期,而不是地温最低时期 1 月份。这表明,不仅低温可导致过氧化物酶活性增加,而春化有可能与 POD 活性有关。POD 在萝卜

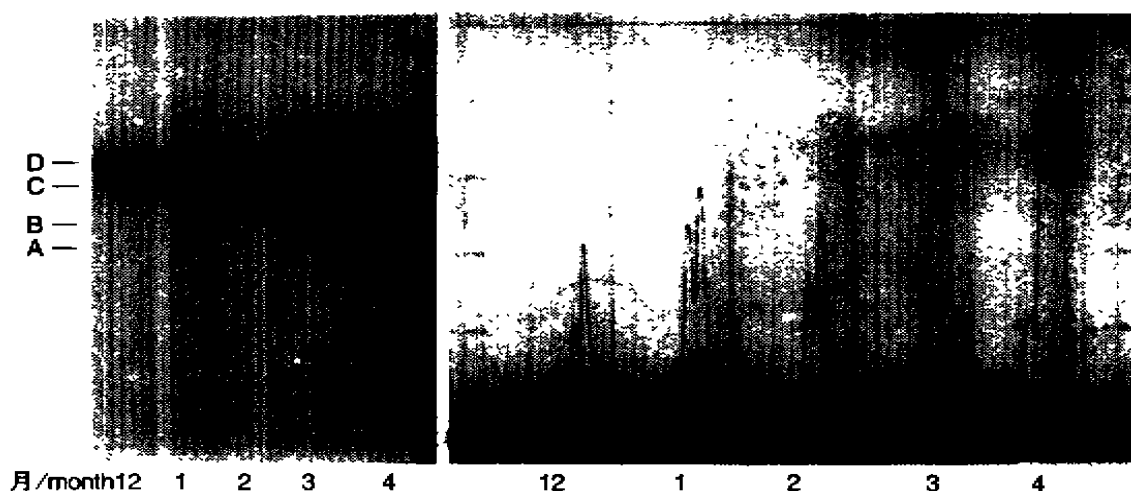


图 4 短叶青萝卜贮藏期 POD 同工酶凝胶电泳图谱及薄层扫描  
Fig. 4 POD isoenzyme PAGE and dual wavelength chromatography screen of  
Duanyeqing radish during winter storage stage

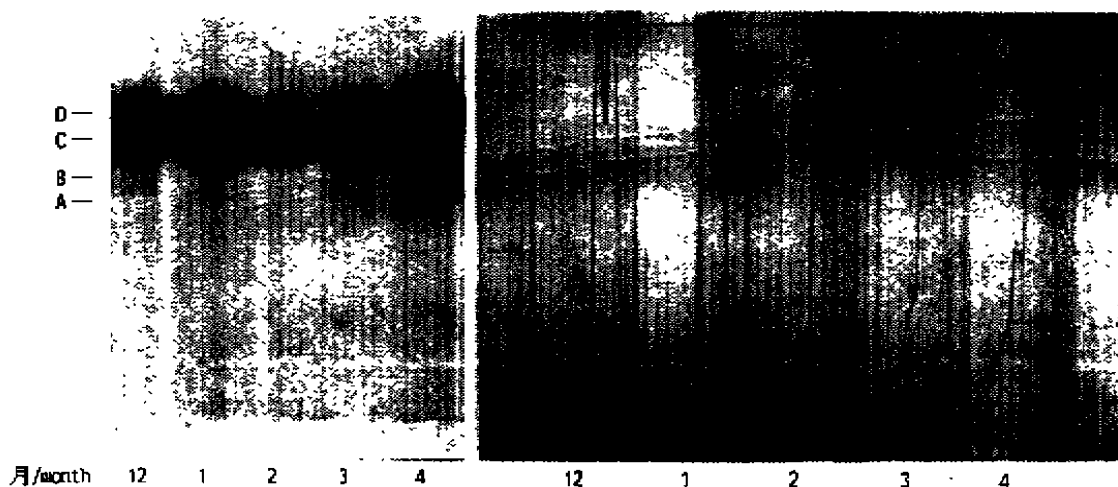


图 5 心里美萝卜贮藏期 POD 同工酶凝胶电泳图谱及薄层扫描  
Fig. 5 POD isoenzyme PAGE and dual wavelength chromatography screen of  
Xinlimei radish during winter storage stage

春化作用过程中究竟起什么作用尚有待进一步研究。

从贮藏期萝卜聚丙烯酰胺凝胶电泳同工酶谱及薄层扫描分析观察。萝卜过氧化物酶同工酶分子量比较接近,电泳谱带比较集中地处于负极区域,可以推测,其氨基酸组成上以中性氨基酸和碱性氨基酸为主,分子量较大两条酶带 C、D 两条谱带存在于不同品种萝卜及整个贮藏期,并且 D 谱带含量相对稳定,C 带在不同品种间及贮藏期的不同时间内含量变化较大。此外,尚有新的酶带出现表现在 B 带及 A 带的差异,POD 同工酶谱带多少与酶比活性之间无相关性,或许与酶最适 pH 不同有关。由于萝卜贮藏期较长且均处于温度较低时期,POD 活性及

酶谱变化可能与植物对低温抗性有关。当植物不再从外界摄取营养,也不能利用光合作用自身产生营养成分,只有靠贮存能量的消耗,物质分解结果会相伴产生大量  $H_2O_2$ <sup>[1]</sup>,POD 用于消除代谢中产生的  $H_2O_2$ ,防止过氧化物对细胞膜系统的伤害作用,保持细胞结构的完整性,提高细胞对衰老及不良环境的抗性。处于生长停滞期的萝卜体内 POD 活性增加,可使 IAA 降解加速<sup>[9]</sup>,使植物个体激素水平与代谢相适应。当春化结束后植物个体新的组织形成,POD 活性增加有利于木质素的合成。因此,在整个贮藏期 POD 同工酶谱变化有可能与 POD 所起作用不同有关,虽都是分解过氧化物,但底物不同,所产生效应也不同。POD 底物的专一性相对较低,或许也使分布在不同部位,出现在不同时期 POD 具有其相对独特作用。

### 参考文献:

- [1] 曾纪晴,刘鸿先,王以柔等.黄瓜幼苗子叶在低温下的光抑制及其恢复[J].植物生理学报,1997,23(1):15~20
- [2] 刘曼西.病原激发子对番茄阴离子过氧化物酶表达与反应性氧迸发的诱导[J].植物生理学报,1997,23(3):220~226
- [3] Sanchu Maria A, Forchetti S M, Phego F et al. Peroxidase activity and isoenzymes in the culture mdeium of NaCl adapted tomato suspension cells. *Plant cell[J], Tissue and Organ Culture*, 1996, 44:161~167
- [4] 张龙翔,张庭芳,李令媛.生化实验方法和技术(第二版)[M].高等教育出版社,北京:1997. 163
- [5] 胡能书,万贤国.同工酶技术及其应用[M].长沙:湖南科学出版社,1985. 74
- [6] Mizuno M, Kamei M, Tsuchida H. Ascorbate peroxidase and catalase cooperate for protection against hydrogen peroxide generated in potato tubers during low-temperature storage[J]. *Biochem Mol Biol Int*, 1998, 44(4), 717~726
- [7] Ingham LM, Parker ML, Waldron KW. Peroxidase:changes in soluble and bound forms during maturation and ripening of apples[J]. *Physiol Plant*, 1998, 102(1):93~100
- [8] Cano MP, Lobo MG, and De Ancos B. Peroxidase and polyphenol oxidase in long-term frozen stored papaya slices. Differences among hermaphrodite and femala papaya fruits[J]. *J Sci Food Agric*, 1998, 76(1), 135~141
- [9] 崔克明,罗海龙,李举怀等.构树形成层的恢复活动及其过氧化物酶同工酶的变化[J].植物学报,1993, 35:580~587