

三种分析水稻 F₁ 代幼苗生长过程中酯酶同工酶变化的电泳方法比较

彭元成^{1,3,*}, 宋春霞², 严敏^{3,4}

曲阜师范大学¹生命科学学院,²化学学院, 山东曲阜 273165;³华南农业大学生命科学学院, 广州 510642;⁴青岛农业大学植物科技学院, 山东青岛 266109

Comparison of Three Electrophoresis Methods Used in Analyzing Changes of Esterase Isoenzymes in Seedling Growth of F₁ Hybrid Rice (*Oryza sativa* L.)

PENG Yuan-Cheng^{1,3,*}, SONG Chun-Xia², YAN Min^{3,4}

¹College of Life Sciences, ²College of Chemistry Sciences, Qufu Normal University, Qufu, Shandong 273165, China; ³College of Life Sciences, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China; ⁴College of Plant Science and Technology, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China

摘要: 利用聚酯胶片作为凝胶支持物的超薄等电聚焦电泳(UTLIEF)研究水稻F₁种子萌发过程中的酯酶同工酶多态性变化的结果表明, UTLIEF相比非变性不连续聚丙烯酰胺电泳(native-PAGE)和常规等电聚焦电泳(IEF)得到的酯酶同工酶图谱更清晰, 酶带数目和强弱的多态性变化更高, 用pH 2~9的两性电解质时等电聚焦的电泳效果较好。

关键词: 水稻; 酯酶同工酶; 非变性不连续聚丙烯酰胺电泳; 等电聚焦; 超薄等电聚焦

酯酶(esterase, EST)是一类能催化酯类化合物水解的酶, 多为单体酶, 以单链蛋白或二聚体蛋白的形式在植物体中广泛存在(Arulsekar 等 1986; Tabaeizaeh 等 1986)。同工酶是指能催化相同的化学反应, 但酶蛋白分子结构, 理化性质甚至免疫学性质都不同的一组酶。目前发现的酯酶同工酶约有20余种, 在植物的不同种属和同一植物的不同组织中, 酯酶同工酶的组成也是不同的, 它具有较高的组织特异性(Collet 等 2005; 丁玲等 2007)。同工酶是基因表达的产物, Pretová 等(2001)的研究表明, 亚麻中酯酶同工酶的组成具有时间特异性, 即不同时间段内酯酶的组成也是不同的。而目前水稻中相关的报道较少, 因此研究水稻种子萌发过程中酯酶同工酶带的数目和活性变化, 进而揭示水稻中酯酶的时间特异性, 将会有助于研究水稻的生长发育过程。

酯酶同工酶的检测方法主要有非变性不连续聚丙烯酰胺电泳(native polyacrylamide gel electrophoresis, native-PAGE)和等电聚焦电泳(isoelectric focusing electrophoresis, IEF)两种方法。native-PAGE电泳是根据分子量的不同分离酯酶的, 但电泳时间较长, 电泳时电极发热导致有些酶带模糊, 以致分辨率降低(Brown 等 1995)。IEF电泳是利用酶蛋白的等电点差异来分离酯酶的, IEF电泳所用电压较高, 但凝胶在电泳过程中易出现散热不

充分, 对活性较弱的酶带影响较大(Wouters和Booy 2000)。水稻种子萌发过程中酯酶同工酶的变化可能比较细微, 因而选择合适的电泳方法比较关键。本文尝试用超薄等电聚焦电泳(ultrathin-layer isoelectric focusing electrophoresis, UTLIEF)来分离水稻种子发育过程中的酯酶同工酶, 并与native-PAGE电泳和IEF电泳进行比较, 以期能找到一种更准确、更快速的酯酶同工酶电泳分离方法。

材料与方 法

实验材料为水稻(*Oryza sativa* L.)品种‘培矮64S’×‘EP431’的F₁种子和‘培矮64S’×‘G67’的F₁种子, 两性电解质为LKB公司产品, 聚酯胶片为Pharmacia公司产品, 聚丙烯酰胺为上海伯奥公司分装, 坚牢蓝、 α -萘乙酸和 β -萘乙酸为国产分析纯。取以上种子于25℃恒温下在干净的培养皿中培养, 从种子萌发第1天, 即当胚芽长度约等于种子长度一半时, 开始取材, 每天取水稻种粒和幼苗置于-20℃低温冰箱中保存, 直到萌发第6天。分别取保存材料, 加适量石英砂在冰浴上快速研磨, 为尽可能降低温度对酶活的影响, 研钵和研锤在使用

收稿 2008-07-14 修定 2008-07-24
资助 广东省自然科学基金(000590)、广东省教育厅自然科学基金(200068)和曲阜师范大学科研启动基金。

* E-mail: yuanchengp@163.com; Tel: 0537-4456415

前预先冷却。将研磨后的溶液转移至离心管中,于0~4℃低温下保存5 h,充分提取酶液后于4℃下15 200×g离心20 min,所得上清液即为酯酶提取液。

Native-PAGE电泳参照Brown等(1995)文中的方法并稍加改进,电泳所用分离胶浓度为10%,浓缩胶浓度为3%,电极缓冲液为pH 8.3的Tris-Glycine溶液。每孔上样量20 μL,电泳于4℃低温下进行,浓缩胶电压200 V,电泳约1 h;分离胶电压300 V,电泳约3 h。IEF电泳凝胶的配制参照胡群宝等(2004)文中的方法并稍加改进,取30%丙烯酰胺贮备液2.5 mL、蒸馏水6.5 mL、两性电解质600 μL、TEMED 20 μL和10%过硫酸铵100 μL,搅匀后转入玻璃板空隙内,丙烯酰胺聚合完成后将凝胶平铺于冷却系统的平板上。凝胶两端分别加上电极条,样品点在靠近阴极处的滤纸条上。IEF电泳过程参照Wouters和Booy(2000)文中的方法,从25 mA、300 V开始恒流电泳,待电压升至1 000 V时,进行恒压电泳,当电流达到最低值时停止电泳,整个电泳过程约3 h。UTLIEF电泳参照Zhao等(2005)文中的蛋白质电泳方法,取Gel-Fix聚酯胶片放在下层玻璃板上,将配好的凝胶溶液滴到胶片中央,将上盖玻璃板缓慢放下并防止气泡出现,使凝胶溶液均匀分布到上下玻璃板之间的间隙中。凝胶聚合后,用小刀将下层玻璃板撬开,将带有凝胶的聚酯胶片从上盖玻璃板上取下。UTLIEF电泳时,将带有凝胶的聚酯胶片放到电泳槽的冷却板上,电泳温度设定为10℃,电压在70 min内由200 V上升至1 000 V,整个电泳过程约70 min。上述3种电泳方法使用的均是同一酯酶提取液,每孔点样量均为25 μL。

酯酶同工酶染色液的配制参照Wouters和Booy(2000)文中的方法,取100 mg固蓝、50 mg α-醋酸萘酯和50 mg β-醋酸萘酯用10 mL丙酮溶解,再加入90 mL 0.1 mol·L⁻¹ pH 6.5的磷酸缓冲溶液混匀,待溶液变为砖红色时即可用于染色,染色液现配现用。电泳后的胶片在染色液中染色,褐色酶带清晰后停止染色,约需30 min。

实验结果

1 酯酶同工酶电泳图谱

从用native-PAGE电泳分离水稻种子‘EP431’

得到的酯酶同工酶图谱(图1)可以看到,在水稻种子萌发1~6 d的过程中,各泳道的图谱没有出现大的差异。B带是一条弱带,在种子萌发的过程中并没有观察到明显变化。A带是一条强带,但随着种子萌发时间的延长,可以看到A带下方的拖尾发生一定程度的变化,这些变化可能反映了种子萌发过程中酯酶同工酶种类和数目的相应变化。从图1可以发现native-PAGE电泳对变化最显著的A带附近的一些可能条带上并没有有效分离。

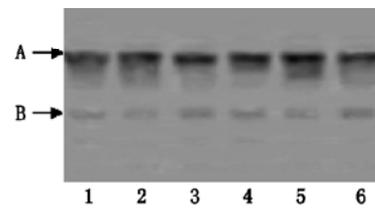


图1 水稻‘培矮64S’×‘EP431’的F₁种子萌发过程中酯酶同工酶 native-PAGE 电泳图谱
1~6号泳道分别对应萌发1~6 d的水稻种子。

图2为利用IEF电泳得到的酯酶同工酶图谱,从中可以观察到,在水稻种子萌发过程中,存在3条酶带,其中2条酶带较明显,1条酶带不够明显。从图2还可以看出,在种子萌发的过程中A带和B带的强弱变化不大,而C带在第3天和第4天较为明显,在其他萌发时间内却较弱或观察不到。

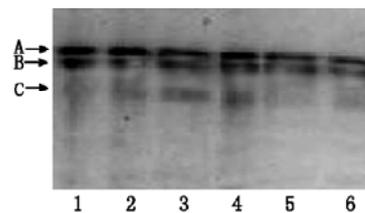


图2 水稻‘培矮64S’×‘EP431’的F₁种子萌发过程中酯酶同工酶等电聚焦电泳图谱
1~6号泳道分别对应萌发1~6 d的水稻种子。

图3是用UTLIEF电泳得到的酯酶同工酶图谱,从该图能观察到,在水稻种子1~6 d的萌发过程中利用该法共分离出4条酶带,且酯酶同工酶存在较大的多态性变化。A带和B带在水稻种子萌发的6天内没有发生明显的变化;C带在萌发的1~3 d内逐步增强,第3天和第4天的强度相当,在第5天和第6天又减弱;D带在种子萌发的第1~2天内不

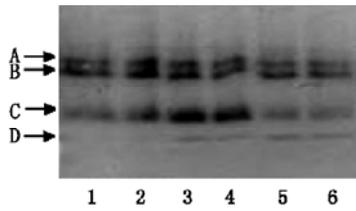


图3 水稻‘培矮64S’×‘EP431’的 F_1 种子萌发过程中酯酶同工酶超薄等电聚焦电泳图谱
1~6号泳道分别对应萌发1~6 d的水稻种子。

存在,而在第3天以后出现,且条带的强度保持稳定。另外,我们又利用UTLIEF电泳分析了水稻‘培矮64S’×‘G67’的 F_1 种子萌发时的酯酶同工酶变化情况,结果如图4所示。可以看出该品种在萌发第1天时最少,有4条带;而第6天最多,有8条带;从该图还可发现酯酶同工酶除数目发生变化外,其酶带的强弱也在发生着变化。

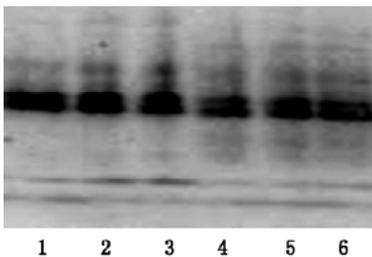


图4 水稻‘培矮64S’×‘G67’的 F_1 种子萌发过程中酯酶同工酶超薄等电聚焦电泳图谱
1~6号泳道分别对应萌发1~6 d的水稻种子。

2 不同pH范围内两性电解质对酯酶同工酶超薄等电聚焦电泳的影响

电泳时两性电解质在凝胶中形成稳定和线性的pH梯度,因而不同等电点的同工酶可在凝胶中形成不同的酶带。以萌发第9天的水稻种子‘培矮64S’×‘EP431’的 F_1 种子为材料,研究不同pH范围(2~11、2~9、4~7、6~9)对超薄等电聚焦的影响,得到的电泳图谱如图5所示。从该图可以看出,当两性电解质的pH范围为2~11和pH 4~7时,能找到的同工酶标记带较少;而pH范围6~9的电泳图谱中,同工酶带又不清晰;比较而言,当两性电解质的pH范围为2~9时,同工酶标记带较明显和丰富,且条带清晰,可以作为适宜的两性电解质。

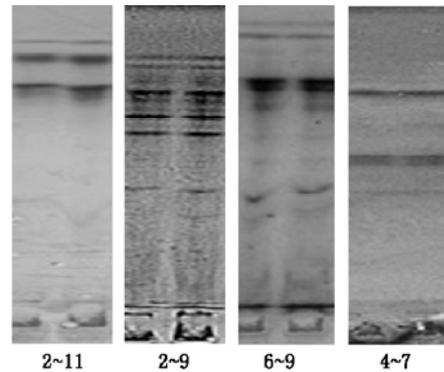


图5 不同pH范围下酯酶同工酶超薄等电聚焦电泳图谱

讨 论

植物生长发育过程中同工酶电泳图谱的变化反映了其特定时期的生理活动特点,因而准确和深入地研究水稻种子萌发时酯酶同工酶的变化,对于进一步揭示水稻种子的生命活动规律是有意义的。目前用于同工酶检测的电泳方法较多,主要用同工酶分子量或等电点的差异进行分离,如native-PAGE电泳、等电聚焦电泳、复性电泳(G-PAGE)和十二烷基磺酸锂电泳(LDS-PAGE)等(王爽和陈卫良2006)。

Native-PAGE电泳时间较长,且酶活性会有一定程度的丧失,如图1所示,染色后酶带常出现拖尾现象,而且染色后胶片常有较深的背景,对于较弱的酶带这种影响较严重。此外此法对于分子量相近或分子量相同但等电点不同的酶蛋白,则不能有效分离,上述这些因素都限制了其在水稻种子萌发时的酯酶动态变化研究中的应用。Native-PAGE电泳不破坏酶蛋白的结构,并在一定程度上可以保证同工酶的生物学活性,因而该法目前仍用于鉴定一些物种的亲缘关系和植物的抗逆生理研究,如豌豆和玉米等(Pošvec和Griga 2000; Mohamed 2005)。常规IEF电泳由于在制胶和电泳操作中的局限性,得到的结果可能不很理想,如图2所示,整个电泳图谱中共显示出3条酶带,且不同萌发时间的酶带未表现出差异,这可能是由于某些酶带没有分离出来,这种分辨率上的局限性也影响了常规IEF在水稻种子萌发时酯酶同工酶研究中的应用。UTLIEF电泳是对常规IEF的一种改进,它使用聚酯胶片做为薄层聚丙烯酰胺凝胶的载体,凝胶质量更好些,聚焦电泳时致冷效果更好,电泳时间也更短,因而能

得到更好的电泳图谱。采用与 IEF 电泳相同 pH 范围的两性电解质, UTLIEF 电泳能够分离出 4 条酶带。从图 3 可以观察到, 在水稻种子萌发的 1~6 d 内, 酯酶同工酶的数目变化较明显, 同一酶带在不同萌发天数里的有无和活性强弱也较常规 IEF 更为明显, 酯酶的这些变化可以间接地反映种子萌发时相关基因表达的差异。另一品种‘培矮 64S’×‘G67’的杂种 F₁ 研究表明, 不同品种间酯酶同工酶的数目和活性强弱的差异也很大, 从图 4 可以观察到‘培矮 64S’×‘G67’的杂种 F₁ 酶带数萌发第 1 天有 5 条, 而第 6 天有 8 条, 这进一步说明水稻种子萌发时酯酶同工酶具有较高的多态性。

目前用上述方法分离同工酶用以鉴定植物亲缘关系和检测品种纯度的研究较多, 而分析植物种子发育过程的研究较少。本文用这 3 种方法研究了水稻种子发育过程中酯酶同工酶的变化, 根据电泳结果和操作过程的比较, 认为 UTLIEF 电泳分辨率更高、更快速, 是研究水稻种子萌发时酯酶同工酶变化中比较好的方法。

参考文献

- 丁玲, 陈发棣, 滕年军, 房伟民(2007). 菊花不同生长阶段不同器官 POD 和 EST 同工酶比较. 西北植物学报, 27 (10): 2029~2034
- 胡群宝, 夏清华, 陈森(2004). 用等电聚焦技术鉴定杂交稻华优桂 99 的种子纯度. 植物生理学通讯, 40 (5): 597~598
- 王爽, 陈卫良(2006). LDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析植物过氧化物酶同工酶. 植物生理学通讯, 42 (4): 713~716
- Arulsekar S, McGranahan GH, Parfitt DE (1986). Inheritance of phosphoglucomutase and esterase isozymes in persian walnut. J Hered, 77 (3): 220~221
- Brown JK, Coats SA, Bedford ID, Markham PG, Bird J, Frohlich DR (1995). Characterization and distribution of esterase electromorphs in the whitefly, *Bemisia tabaci* (Genn.) (Homoptera: Aleyrodidae). Biochem Genet, 33 (7): 205~214
- Collet S, Collet M, Machado M (2005). Differential gene expression for isozymes in somatic mutants of *Vitis vinifera* L. (Vitaceae). Biochem Syst Ecol, 33 (2): 691~703
- Mohamed AA (2005). Two-dimensional electrophoresis of soluble proteins and profile of some isozymes isolated from maize plant in response to NaCl. Res J Agr Biol Sci, 1 (1): 38~44
- Pošvec Z, Griga M (2000). Utilization of isozyme polymorphism for cultivar identification of 45 commercial peas (*Pisum sativum* L.). Euphytica, 113 (3): 249~256
- Pretová A, Obert B, Hajdúch M, Gregová E (2001). Total protein and isozyme characterization in the flax zygotic embryo during development. Sexual Plant Rep, 13 (6): 329~334
- Tabaeizadeh Z, Ferl RJ, Vasil IK (1986). Somatic hybridization in the gramineae: *Saccharum officinarum* L. (sugarcane) and *Pennisetum americanum* (L.) K. Schum. (pearl millet). Proc Natl Acad Sci USA, 83 (15): 5616~5619
- Wouters TCAE, Booy G (2000). Stability of esterases and total proteins during seed storage of perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) and their use for cultivar discrimination. Euphytica, 111 (3): 161~168
- Zhao T, Yan M, Lu YP, Yang F, Huang J, Wang XF (2005). Genetic purity testing of two-line hybrid rice seeds by ultrathin-layer isoelectric focusing of proteins. Seed Sci Technol, 33 (1): 45~52