

LDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳分析植物过氧化物酶同工酶

王爽 陈卫良*

浙江大学生物技术研究所, 杭州 310029

Analysis of Plant Peroxidase Isoenzymes by LDS-polyacrylamide Gel Electrophoresis (LDS-PAGE)

WANG Shuang, CHEN Wei-Liang*

Institute of Biotechnology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China

摘要 以高粱和甘蓝型油菜叶片为材料, 用十二烷基磺酸锂不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳(LDS-PAGE)检测过氧化物酶同工酶的结果表明, LDS-PAGE的酶带条数比非变性不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳(native PAGE)明显增加, 分辨率大大提高, 上样量少, 胶片易保存; 比复性电泳(G-PAGE)的步骤简单, 电泳后无需除去LDS即可直接按常规活性染色方法染色。

关键词 LDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(LDS-PAGE); 过氧化物酶(POD); 同工酶

过氧化物酶(peroxidase, POD)是一族能利用 H_2O_2 氧化供氢体的酶, 由1个糖蛋白和1个氯正铁血红素IX的铁卟啉辅基缀合而成(胡能书和万贤国1985)。它在高等植物中广泛而大量存在, 是植物中最重要的氧化还原酶类之一。它具有多种同工酶, 在植物不同的生长发育时期和不同的组织器官中, POD同工酶的数量和活性都有很大变化, 因此, 研究POD同工酶可以更好地用以了解和调控植物生长发育过程。

目前, 研究POD同工酶通常用非变性不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳(native PAGE)(宋晓轩等1995), 其特点是在电泳过程中可以保持酶的活性, 但这种电泳方法分辨率低, 条带分离较模糊。姬生栋等(2000)用Neuhaus-Steinmetz等(1994)的复性电泳技术(sodiumdodecylsulfate-gelatin-polyacrylamide gel electrophoresis, G-PAGE)研究小麦POD同工酶, 此法在染色前需要复性即除去SDS, 染色较繁琐, 实验操作技术要求也较高。本文以高粱(*Sorghum bicolor* L.)和甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)叶片为材料, 采用变性作用比SDS低的十二烷基磺酸锂(LDS)进行不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳(LDS-PAGE)分析POD同工酶并与native PAGE进行比较, 以期能找到一种更好、更简便的检测植物POD同工酶的方法。

材料与方法

1 实验材料

苗高3~5 cm的高粱(*Sorghum bicolor* L.)品种‘辽杂10号’叶片和甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)品种‘浙双758’的叶片。

2 试验方法

2.1 样品的制备 称取高粱和油菜叶片各1.0 g, 洗净, 用纱布吸干后, 放入液氮中, 在预冷的研钵中加1 mL提取缓冲液($0.1 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl, pH 8.5)和0.1 g聚乙烯吡咯烷酮(PVP)研磨, 匀浆以4 000×g离心10 min, 取上清液为粗酶液, 分装后贮存于-70℃冰箱中备用。以上操作均在0~4℃条件下进行。

2.2 蛋白质测定 参照Bradford (1976)检测法。

2.3 电泳

2.3.1 native PAGE 参照Bollag和Edelstein (1992)的方法, 用非变性不连续聚丙烯酰胺垂直平板电泳, 浓缩胶为5%, 分离胶为7.5%。样品蛋白在上样缓冲液中的终浓度为 $1 \text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, 每孔上样量分别为5、10和20 μL , 在稳压55 V、4℃条件下电泳6~7 h。

2.3.2 G-PAGE 参照Bollag和Edelstein (1992)的方

收稿 2006-02-15 修定 2006-06-02

*通讯作者(E-mail: chenwl@zju.edu.cn, Tel: 0571-86971184)。

法, 略作改动: 浓缩胶为5%, 分离胶为9.5%, 样品缓冲液中不加巯基乙醇, 不加热, $12\ 000\times g$ 离心5 min后, 直接上样, 每孔上样量5 μL 。电泳完毕后, 参照姬生栋等(2000)的方法进行复性, 即胶片用洗涤液(Triton X-100 2.4 mL、Tris-base 0.6 g、双重蒸水100 mL, pH 7.0)洗涤30 min, 再用双重蒸水洗涤2~3次, 每次10 min, 以除去SDS。

2.3.3 LDS-PAGE 将G-PAGE中的SDS替换为LDS, 每孔上样量3 μL 。除无需复性步骤外其余同2.3.2小节。

2.4 考马斯亮兰染色 参照Bollag和Edelstein(1992)的方法。

2.5 同工酶染色 参照胡能书和万贤国(1985)的方法, 用醋酸联苯胺染色。

实验结果

1 POD 同工酶酶谱图

从native PAGE的高粱POD同工酶谱可见, 上样量5和10 μL 时, 只有1条酶带; 上样量增加到20 μL 时, 显示出5条酶带, 有2条染色较深, 为主带, 其余3条模糊(图1)。G-PAGE上样量5 μL 时, 显示出4条较清晰的主带, 另有3条较浅的酶带(图3)。而LDS-PAGE上样量3 μL 时, 就显示出8条较清晰的酶带, 比G-PAGE多了1条酶带(图4)。native PAGE的油菜POD同工酶谱, 上样量5 μL 的只有1条染色很浅的酶带; 10 μL 的有2条酶带, 染色均较浅; 20 μL 的有4条酶带, 其中前3条为主带, 最后1条很浅(图2)。G-PAGE上样量5 μL 的显示出5条较清晰的酶带(图3)。而LDS-PAGE上样量为3 μL 的, 除显示出5条清晰的主带外, 比G-PAGE多2条酶带(图4)。

从酶带数目上来说, 无论高粱和油菜, LDS-PAGE均多于native PAGE和G-PAGE。我们认为, 可能是后者的分辨率较低, 以致有些同源性较高的同工酶无法在凝胶中清晰地分开, 因此酶带宽而模糊; 也有可能是SDS变性作用强于LDS, 即使采用复性技术也不能完全恢复某些POD同工酶的活性, 从而导致凝胶上一些含量较低的酶带无法显示出来。

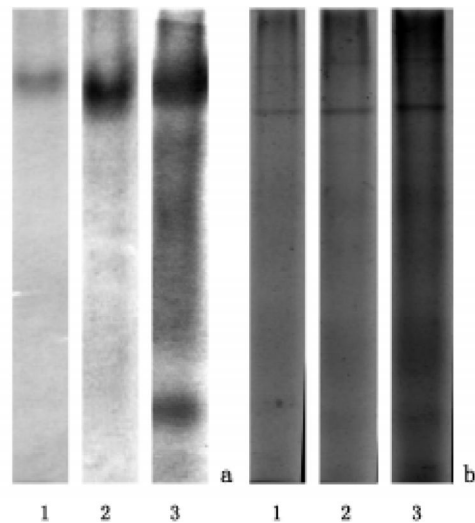


图1 高粱叶片POD同工酶native PAGE电泳图
a: 醋酸联苯胺染色; b: 考马斯亮蓝染色。1、2、3上样量分别为5、10、20 μL 。

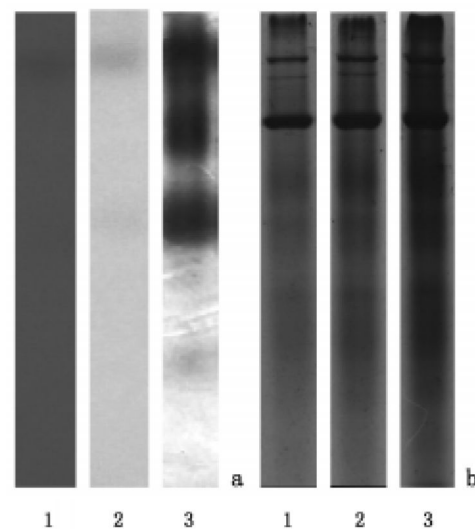


图2 油菜叶片POD同工酶native PAGE电泳图
a: 醋酸联苯胺染色; b: 考马斯亮蓝染色。1、2、3上样量分别为5、10、20 μL 。

此外, $1\ \text{mg}\cdot\text{mL}^{-1}$ 浓度的蛋白样品在LDS-PAGE中只需3 μL 上样量就可以得到更多、更清晰的酶谱图, 这极大地节省了样品用量, 对于一些不容易制备的样品来说, 无疑是一个优点。

2 染色时间

由表1可以看出, 高粱和油菜的POD同工酶的native PAGE在染色3 min开始有酶带出现, 6 min时所有酶带完全显出, 以后酶带条数不再增

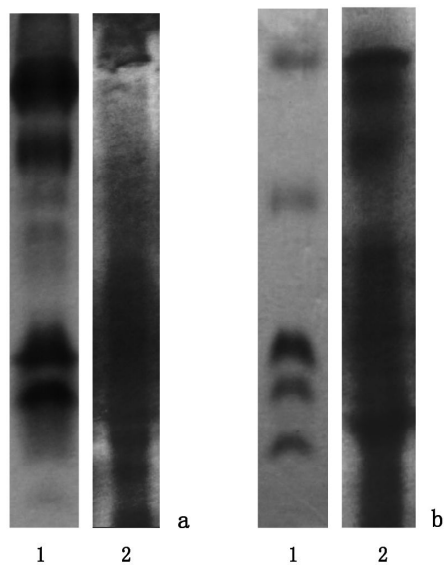


图3 高粱和油菜叶片 POD 同工酶 G-PAGE 图
a: 高粱叶片; b: 油菜叶片。1: 醋酸联苯胺染色; 2: 考马斯亮蓝染色。上样量均为 5 μL 。

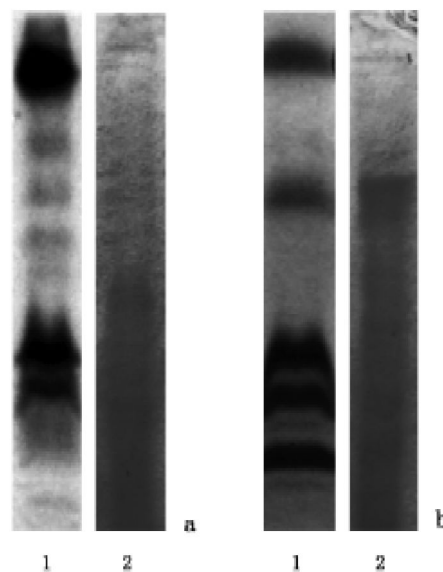


图4 高粱和油菜叶片 POD 同工酶 LDS-PAGE 图
a: 高粱叶片; b: 油菜叶片。1: 醋酸联苯胺染色; 2: 考马斯亮蓝染色。上样量均为 3 μL 。

表1 染色时间对 POD 同工酶酶带的影响

染色时间	native PAGE 酶带条数		G-PAGE 酶带条数		LDS-PAGE 酶带条数	
	高粱	油菜	高粱	油菜	高粱	油菜
3 min	3	3	3	4	3	5
6 min	5	4	4	5	4	5
10 min	5	4	5	5	5	7
15 min	5	4	6	5	5	7
30 min	5	4	7	5	8	7
24 h	2 (条带淡)	2 (条带淡)	7	5	8	7

native PAGE 上样量为 20 μL , G-PAGE 上样量为 5 μL , LDS-PAGE 上样量为 3 μL 。

加。G-PAGE 和 LDS-PAGE 在染色 3 min 也开始有酶带出现, 但油菜所有酶带在 10 min 都完全显现, 而高粱的在随后 30 min 内, 又会逐渐显出新的酶带, 以后酶带条数不再增加。

实验中还看到, native PAGE 显色 6 min 后, 若继续染色至 30 min, 则随着时间的延长, 酶带迅速扩散, 颜色也将逐渐变浅, 由蓝色变为浅棕色, 甚至有的原本着色浅的酶带会消失, 而且胶在去离子水中不能保存, 否则酶带将逐渐褪去; 所以应在 6 min 显色完全时立即拍照, 并制成干板保存。而 G-PAGE 与 LDS-PAGE 则没有这些现象, 且酶带始终为蓝色; 若用去离子水浸泡 1~2 d 后酶带会更加清晰, 并且可以长时间保存在去

离子水中。

讨 论

分离和鉴定蛋白质的电泳技术有多种, SDS-PAGE 是一种变性条件下的凝胶电泳, 其中 SDS 能断裂蛋白质分子内和分子间的氢键, 使分子去折叠, 破坏蛋白质的分子二级和三级结构。如果再加入如巯基乙醇和二硫苏糖醇 (DTT) 等强还原剂, 则半胱氨酸残基间的二硫键即断裂, 蛋白质完全解聚成各亚基, 根据亚基分子质量的大小, 多肽链在凝胶中即可分离。因此 SDS-PAGE 对样品已经造成变性, 蛋白失活或其活性大大降低。实验证明, 如果电泳后除去所有与蛋白质分子结

合与否的 SDS, 则一些失活的蛋白即可恢复活性, 但这种恢复活性往往受多种因素影响(Hager和Burgess 1980; Manrow和Dottin 1982; Dottin等 1979), 因此常常不能复性。G-PAGE就是在此基础上建立起来的一种电泳后蛋白或酶可以恢复活性的复性电泳技术, 但它也有其局限性, 如Dutta和Henry (1990)报道G-PAGE容易导致血红素蛋白中血红素丢失, 而丢失血红素的蛋白质分子在随后的复性过程中也无法恢复活性。此外, 只有单体蛋白和有相同亚基组成的蛋白才可用这种技术, 而且方法相对较繁琐, 实验中的技术要求也较高。

native PAGE 不像G-PAGE那样易使蛋白质变性, 因此又称天然状态生物大分子聚丙烯酰胺凝胶电泳。它能保持蛋白质的天然构象、亚基间的相互作用及其生物活性(Gabriel和Gersten 1992), 所以可用于分离欲保持天然蛋白质活性的物质如酶、激素、抗原等, 但其分辨率远不如G-PAGE, 酶带宽而模糊, 因而在分离同源性较高的同工酶中显得无能为力。

LDS 的变性作用比 SDS 低, 有些研究者(Vargas等1993; Sinclair等1981; Kim等 1996; Zelck等1995)将LDS-PAGE用于分离动物或细菌血红素蛋白中, 都取得较好的结果, 但在植物POD同工酶酶谱研究中的应用未见报道。本文用LDS-PAGE电泳技术对高粱和油菜叶片中的POD同工酶进行分析的结果表明, LDS-PAGE比G-PAGE可更好地保证POD同工酶的活性, 无需复性步骤; 且分辨率高, native PAGE下不能分离的同工酶用此技术可以得到分离。此法对分析研究其它酶和同工酶酶谱也可能有参考价值, 不过其中的具体操作技术还待进一步研究。

参考文献

胡能书, 万贤国(1985). 同工酶技术及其应用. 长沙: 湖南科学技术出版社, 74, 104

- 姬生栋, 李金亭, 吉爱玲, 李吉学, 王丹, 徐存拴(2000). 小麦生育前期POD同工酶的动态变化. 广西植物, 20 (4): 361~366
- 宋晓轩, 朱荷琴, 邢金松(1995). 棉花叶片过氧化物同工酶等电聚焦电泳分析. 植物生理学通讯, 31 (1): 45~48
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 72: 248~254
- Bollag DM, Edelstein SJ (1992). Protein Methods. New York: J Wiley & Sons Inc, 95~139, 143~160
- Dottin RP, Manrow RE, Fishel BR, Aukerman SI, Culetton JL (1979). Localization of enzymes in denaturing polyacrylamide gels. Method Enzymol, 68: 513~527
- Dutta C, Henry HL (1990). Detection of hemoprotein peroxidase activity on polyvinylidene difluoride membrane. Anal Biochem, 184: 96~99
- Gabriel O, Gersten DM (1992). Staining for enzymic activity after gel electrophoresis, I. Anal Biochem, 203: 1~21
- Hager DA, Burgess RR (1980). Elution of proteins from sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels, removal of sodium dodecyl sulfate, and renaturation of enzymatic activity: results with sigma subunit of *Escherichia coli* RNA polymerase, wheat germ DNA topoisomerase, and other enzymes. Anal Biochem, 109: 76~86
- Kim SJ, Chu L, Holt SC (1996). Isolation and characterization of a heme-binding cell envelope protein from *Porphyromonas gingivalis*. Microb Pathog, 21: 65~70
- Manrow RE, Dottin RP (1982). Demonstration, by renaturation in O'Farrell gels, of heterogeneity in *Dictyostelium* uridine diphosphoglucose pyrophosphorylase. Anal Biochem, 120: 181~188
- Neuhaus-Steinmetz U, Xu C, Fracella F, Oberheitmann B, Richter-Landsberg C, Rensing L (1994). Heat shock response and cytotoxicity in C6 rat glioma cell: structure-activity relationship of different alcohols. Mol Pharmacol, 45: 36~41
- Sinclair JF, Healey JF, McAllister R, Bonkowsky HL, Sinclair PR (1981). Improved retention of heme with increased resolution of microsomal protein in polyacrylamide gel electrophoresis. Anal Biochem, 114: 316~321
- Vargas C, McEwan AG, Downie JA (1993). Detection of c-type cytochromes using enhanced chemiluminescence. Anal Biochem, 209: 323~326
- Zelck UE, Becker W, Bayne CJ (1995). The plasma protein of *Biomphalaria glabrata* in the presence and absence of *Schistosoma mansoni*. Dev Comp Immunol, 19 (3): 181~194