

胡桃楸叶片 POD 同工酶表达特点的研究

张丽敏, 刘 欢, 张超群, 封彦杰, 李秀霞

(佳木斯大学 生命科学学院, 黑龙江 佳木斯 154007)

摘要:为探究胡桃楸生长发育特点,促进其引种栽培和食药两用开发,利用聚丙烯酰胺凝胶电泳检测其5~9月整个生长期叶片中 POD 同工酶的表达情况,通过迁移率绘制表达图谱并进行分析。结果表明:5~9月胡桃楸叶片整个生长期共 14 种 POD 同工酶表达,具有阶段特异性;其中 8 月叶片中同工酶表达数量多且表达量高,为叶片成熟期;叶片中 POD 同工酶的表达能够反映生长期生理代谢活动的变化。

关键词:胡桃楸叶片;POD;同工酶

中图分类号:S664.1

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2013)09-0014-03

胡桃楸(*Juglans mandshurica* Maxim)又名核桃楸、山核桃,为胡桃科胡桃属落叶乔木,东北地区著名的“三大硬阔树种”之一,为珍贵用材,也是著名的药用植物。胡桃楸叶片中的过氧化物酶(POD)同工酶一方面与其正常的形态发生和形成有关,另一方面与其抗逆性有关^[1],POD 同工酶广泛存在于高等植物的组织中,参与各种生理活动,具有多种分子形式的阶段特异性,其变化与植物组织器官的分化、形成和生理状态等密切

相关,且酶谱变化先于形态分化^[2-4]。目前,有关胡桃楸研究的报道较多,但对胡桃楸 POD 同工酶的研究较少^[5-6]。该试验通过对胡桃楸叶片的 POD 同工酶进行生长期测定、比较和分析,旨在揭示胡桃楸同工酶谱带及酶活性的变化规律,以探究胡桃楸的生长特性与 POD 同工酶及酶活性的联系,为促进胡桃楸食药两用开发利用、引种栽培提供生化水平的参考。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料胡桃楸取自黑龙江省佳木斯市四丰山生长结实较好的成片山核桃林,于 2012 年 5~9 月,每月中旬取样,均采集胡桃楸当年生枝条的相同部位且发育一致的功能叶片,冷冻保存,备用。

收稿日期:2013-06-01

基金项目:佳木斯大学科学技术研究资助项目(S2011-048)

第一作者简介:张丽敏(1972-),女,黑龙江省佳木斯市人,硕士,副教授,从事遗传学及植物同工酶的研究。E-mail:13104549106@163.com。

Study on Regeneration System and Transgenic Impact Factors of Chinese Cabbage

HE Xi-qiang, XU Heng-jian

(Shandong University of Technology, Zibo, Shandong 255049)

Abstract: In order to develop drought-resistant varieties of cabbage, taking Chinese cabbage Erbaotou as test material and cotyledon petioles as transformation receptor, the establishment of genetic transformation system of Chinese cabbage drought-resistant were studied by Agrobacterium-mediated. The results showed that seed disinfection method was soaking with 75% ethanol for 30 s first; and then soaking with 0.1% mercuric chloride for 10 minutes, the budding rate could be higher and sterile. The best differential medium was MS + 6-BA $2.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ + NAA $0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, differentiation rate of adventitious bud was 30%. The best rooting medium was MS + NAA $0.4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, the roots were thick and strong. Leaf disc transformation method was used to establish genetic transformation of Chinese cabbage by Agrobacterium-mediated, which transferred T-DNA containing drought-resistant gene T59 into explants, resistance seedlings were acquired by Hyg screening. Effect of several factors on Agrobacterium-mediated transformation was studied through transgenic test, the following conclusions could be reached: the best *Agrobacterium* dilution was 8 and 16 times, the best common cultivation time was 2 d, the optimal antibiotic combination was $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cb + $200 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cef.

Key words: Chinese cabbage; *in vitro* regeneration; *Agrobacterium tumefaciens*; drought-resistant

1.2 方法

1.2.1 样品制备 将胡桃楸叶片用清水洗净,蒸馏水漂洗,滤纸吸干后称重,每克鲜重加 4 mL 提取液(pH7.2 的蔗糖-磷酸缓冲液),冰浴下研磨呈匀浆状,4 层纱布过滤,将滤液 $3\,800\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 离心 15 min,上清液(样品)置于冰箱(-20°C)备用。

1.2.2 电泳检测 采用聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳方法进行检测,分离胶浓度为 7.5%,浓缩胶浓度为 3.5%。 4°C 恒压(350 V)电泳,电极缓冲液为 Tris-Gly 系统(pH8.3),样品点样量均为 15 μL ,电泳检测重复 2 次。

1.2.3 染色及迁移率(R_f)的测定 将电泳后的凝胶通过醋酸联苯胺法染色,待蛋白带经染色后显现,用流水漂洗,蛋白带清晰后置蒸馏水中保存,测定各酶带 R_f , $R_f = \text{POD 同工酶带迁移距离} / \text{指示剂迁移距离}^{[7]}$ 。

1.2.4 凝胶板的保存 用 10%甘油浸泡玻璃纸 8 h 以上,然后在玻璃板上先放 1 张玻璃纸铺平,其上放凝胶,凝胶上再放 1 张玻璃纸,排除玻璃纸与凝胶间的气泡,阴干、保存。

2 结果与分析

2.1 POD 同工酶电泳检测结果

根据供试胡桃楸 5 个样品的电泳图谱,拍照并测定各酶带迁移率绘制模式图(见图 1)。从电泳图谱可知,5~9 月,5 个样品共显现 14 条酶带。依染色深浅区分为强带、次强带、弱带和痕迹带 4 个级别。为了分析方便,从负极到正极划分为 A、B、C3 个区,A 区 $R_f = 0 \sim 0.40$,显现 1 条酶带 A1($R_f = 0.33$);B 区 $R_f = 0.40 \sim 0.70$,共显现 7 条酶带 B1~B7, R_f 分别为 B1=0.41、B2=0.42、B3=0.44、B4=0.47、B5=0.50、B6=0.52、B7=0.56;C 区 $R_f = 0.70 \sim 1.00$,共显现 6 条酶带 C1~C6, R_f 分别是 C1=0.73、C2=0.76、C3=0.78、C4=0.81、C5=0.83、C6=0.85。从酶带显示数目看,5 月显示 7 条酶带,6 月显示 11 条酶带,7 月显示 12 条酶带,8 月显示 14 条酶带,9 月显示 11 条酶带。可见胡桃楸 5~9 月,各生长时期叶片中 POD 同工酶带有明显变化;其中有 5 条酶带贯穿于各生长期,分别为 B2、B5、B6、B7、C1,但活性有所变化;此外,A1、B1 两条酶带 9 月不表达,B4、C2、C3 酶带 5 月不表达,6 月开始出现,B4 酶带 6 月出现并渐强,C2、C3 酶带 6~9 月表现出弱-强-弱的变化;B3 酶带 5、9 月不表达,C4、

C6 酶带 8、9 月特异表达,C5 酶带 7 月出现并减弱。总体上,叶片中的同工酶表达 5 月酶带数量最少,而 6、7、9 月表达数量较多,8 月表达数量最多,7、8 月蛋白表达量高。

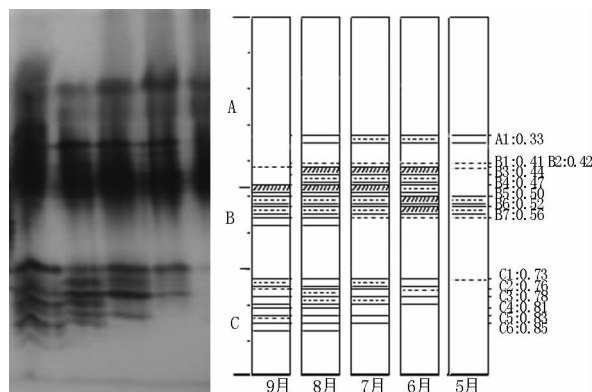


图 1 叶片 POD 同工酶聚丙烯酰胺凝胶电泳图谱

Fig. 1 Polyacrylamide gel electrophoresis map of POD isozymes in leaves

2.2 POD 同工酶表达与叶片生长发育的关系

2.2.1 POD 同工酶的表达数量与胡桃楸叶片生长发育的关系 胡桃楸叶片的生长发育过程分为嫩叶→成熟叶→衰老叶片 3 个阶段。5~9 月,胡桃楸叶中 POD 同工酶随生长时期的不同而不同。从酶带显示数目看,POD 酶种类经历了由少增多再减少的周期性变化。8 月显示的酶带数最多,共有 14 条,既有嫩叶出现的酶带又有衰老叶出现的酶带,可见 8 月是嫩叶和衰老叶酶带类型的分界线,所以从酶带数目特点看,8 月叶片为成熟叶,这也与样品处理研磨时叶片的状态一致:5 月叶片嫩绿,易研磨;6、7 月叶片深绿色,较易研磨;8 月叶片深绿色,不易研磨;9 月叶片黄绿色,不易研磨。

2.2.2 POD 同工酶表达量与胡桃楸叶片生长发育的关系 不同生长时期稳定表达的酶带有表达强弱的不同,生长期呈现曲线变化。B2、B5、B6、B7、C1 五条酶带的表达贯穿于整个生长期。其中 B2 酶带在 5 月嫩叶和 9 月(痕迹带)衰老叶中酶表达量少,6~8 月表达量多,为先弱后强再弱型,B2 的表达贯穿生长期,推测可能与成熟叶的旺盛生长关系密切,因此在胡桃楸叶的旺盛生长阶段需要此类同工酶的参与;B5、B6 酶带能稳定、高效表达,为稳定表达型^[8],酶带(次强带)颜色较深,表达量较多,推测编码这 2 条酶带的基因较稳定,基本不受叶片生长发育调控;B7、C1 酶带合

成量较少,而后颜色渐变深,表达量逐渐增加,为先弱后强型^[8],推测这 2 种同工酶的表达受基因、激素或离子调控,表达量随叶片的生长而增加。

2.2.3 POD 同工酶的特异表达与胡桃楸叶片生长发育的关系 特定时期某些酶带特异表达或消失,反映了代谢活动的不同。A1、B1 两条酶带 9 月不表达,即嫩叶、成熟叶中有,衰老叶中消失,为先有后无型^[8],随着叶片从成熟向衰老过程的转变,这 2 条酶带的表达量也减少甚至不表达,推测这类酶与叶的旺盛生长有关;B4、C2、C3 酶带 5 月不表达,即嫩叶中没有而在叶片逐渐成熟至衰老叶片中出现,为先无后有型^[8],其中 B4 酶带 6 月出现并渐强,推测这类同工酶可能与叶片衰老所需的有关物质的处理有关;C2、C3 酶带从 6~9 月出现弱-强-弱的变化趋势,同工酶表达与成熟叶片旺盛生长密切相关;B3 酶带 5、9 月不表达,6~8 月表达量多,与成熟叶的旺盛生长关系密切;C4、C6 酶带 8、9 月特异表达,C5 酶带 7~9 月表达,即在成熟叶和衰老叶中出现,推测这类同工酶与叶片衰老所需物质的处理有关。

3 结论

叶片中的同工酶表达 5 月数量最少,活性较弱,6~9 月同工酶表达数量及表达量均较多,8 月同工酶表达量最高。综合酶带数目的表达特点和

具体表达特点,8 月同工酶的表达表现出嫩叶与衰老叶分界线的特点,也就是说 8 月胡桃楸叶片为成熟叶片。综上所述,POD 同工酶可以作为一种重要酶类来反映胡桃楸不同生长时期的代谢活动,为胡桃楸的引种栽培提供参考,为促进胡桃楸食药利用开发奠定生化水平的基础。

参考文献:

- [1] 蒋选利,李振歧.过氧化物酶与植物抗病性研究进展[J].西北农林科技大学学报,2001,29(6):125-129.
- [2] 林植芳,李双顺,林桂林,等.水稻叶片的衰老与超氧化物歧化酶活性及脂质过氧化作用的关系[J].植物学报,1984,26(6):605-615.
- [3] 王海廷,黄永芳,王清胤.番茄不同生育期和不同部位过氧化物酶同工酶分析[J].园艺学报,1981,8(4):29-35.
- [4] 梁艳荣,胡晓红,张颖力.植物过氧化物酶生理功能研究进展[J].内蒙古农业大学学报:自然科学版,2003,24(2):110-113.
- [5] 崔哲.胡桃楸的研究进展[J].现代医药卫生,2008,24(20):3061-3062.
- [6] 姚焕英,唐静成,张毅灵,等.核桃属植物化学成分及生物活性研究[J].西北植物学报,2003,23(9):1650-1655.
- [7] 张相歧.番茄属四个种的 POD 同工酶的分析[J].植物研究,1987,7(4):131-136.
- [8] 陈燕珍,胡丽莲,陶毅明,等.不同生育期菊芋叶片过氧化物酶同工酶表达特点的研究[J].生物学杂志,2007,24(1):25-27.

Study on Expression Characteristics of Peroxidase Isozymes in the Leaves of *Juglans mandshurica* Maxim

ZHANG Li-min, LIU Huan, ZHANG Chao-qun, FENG Yan-jie, LI Xiu-xia

(College of Life Science, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154007)

Abstract: For further development of *Juglans mandshurica* Maxim on edible and medicinal, as well as introduction and cultivation, the growth characteristics of *Juglans mandshurica* Maxim were discussed by using polyacrylamide gel electrophoresis to detect the expression of POD isozymes in leaves from May to September, and the mobility expression map was drawn and analyzed. The results showed that a total of 14 kinds of POD isozymes were expressed in the whole leaf growing period from May to September with stage specificity; Isozyme expression in August was the highest, this time was maturation stage of *Juglans mandshurica* Maxim; Expression of POD isozymes in leaves reflected the change of physiological metabolic activity in growth period.

Key words: leaves of *Juglans mandshurica* Maxim; peroxide; isozyme