

苹果过氧化物酶活性及同工酶分析

张丽敏¹, 邓晨光¹, 齐兴田², 程海涛¹, 张宇³

(1. 佳木斯大学 生命科学学院, 黑龙江 佳木斯 154007; 2. 佳木斯大学 理学院, 黑龙江 佳木斯 154007; 3. 佳木斯大学 药学院, 黑龙江 佳木斯 154007)

摘要:为了给苹果生产中选种、育种和栽培提供生化依据,利用聚丙烯酰胺垂直板凝胶电泳技术对7种苹果的过氧化物酶同工酶进行分析,并采用愈创木酚法测定过氧化物酶活性。结果表明:不同品种苹果的过氧化物酶同工酶有一定差异,愈创木酚法测得的苹果过氧化物酶活性与过氧化物酶同工酶谱的表达活性基本一致;乔纳金和黄元帅 POD 同工酶谱型很相近,亲缘性相近;奶油富士、烟台富士、冰糖果和国光 POD 同工酶谱相近,遗传上接近。

关键词:苹果;过氧化物酶;同工酶;聚丙烯酰胺凝胶电泳;愈创木酚比色法

中图分类号:S661.1

文献标识码:A

文章编号:1002-2767(2014)11-0018-03

苹果为蔷薇科落叶乔木,叶椭圆形,有锯齿;果实球形,味甜,是普通的水果,也是最常见的水果,富含丰富的营养,是世界四大水果之冠。苹果是我国第一大水果,也是我国十一大优势农产品之一。目前苹果种植已经成为主产区农村经济的支柱产业,在推进农业结构调整、增加农民收入以及促进出口创汇等方面发挥着重要作用。同工酶是基因的直接产物,具有明显的种属、组织和发育阶段特异性。植物体内的许多生理过程及植物的不同发育时间、环境条件的变化常与 POD 同工酶的种类及活性有关^[1-2]。

该试验以苹果作为研究材料,测定不同品种苹果同工酶的表达和过氧化物酶活性,分析不同品种苹果之间的亲缘性,为生产中苹果的选种和分类以及品质鉴定提供生化依据。

1 材料与方法

1.1 材料

2014年4月下旬,从佳木斯市水果市场购买了7种苹果,分别为蛇果、奶油富士、乔纳金、烟台富士、冰糖果、国光和黄元帅,用于过氧化物酶活性及同工酶分析。

1.2 方法

1.2.1 同工酶提取 将苹果用清水洗净,蒸馏水

漂洗,滤纸吸干后称重,称取4g样品,加8mL样品提取液(pH7.2的蔗糖-磷酸缓冲液),冰浴下研磨至匀浆,4层纱布过滤,将滤液4℃下4000 r·min⁻¹离心15 min。取上清液即同工酶提取液(样品)置于-20℃冰箱保存备用,也可直接用于电泳^[3]。

1.2.2 电泳 采用聚丙烯酰胺凝胶电泳方法,分离胶浓度7.5%,浓缩胶浓度3.5%。4℃恒压(350 V)电泳,电极缓冲液为pH 8.3 Tris-Gly系统。样品点样量均为20 μL,电泳重复2次。

1.2.3 染色及迁移率(Rf)的测定 采用醋酸联苯胺法染 POD,待酶带显现清晰后,用流水漂洗后置蒸馏水中保存,Rf测定按照张相歧的方法^[4]。

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,以备考证。

1.2.5 过氧化物酶活性测定 采用愈创木酚法测定过氧化物酶活性^[5-6]。

$$\text{POD 活性} = V_1 \cdot \Delta OD / 0.01 V_2 W \cdot \Delta t$$

式中: ΔOD 为反应初速度阶段的吸光度差,比色波长470 nm; Δt 为 ΔOD 对应的时间(min); V_1 为提取酶液总体积(mL); V_2 为测定时取用的提取酶液体积(mL); W 为植物样品鲜重(g);0.01为以吸光度值(ΔOD)变化0.01为1个酶活性单位(U)。

收稿日期:2014-07-10

基金项目:黑龙江省卫生厅科研项目(2011-454)

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研究。E-mail:13104549106@163.com。

2 结果与分析

2.1 不同品种苹果过氧化物酶同工酶谱分析

植物体内具各种不同代谢功能的酶类是由遗传决定的。同工酶就是控制这些酶的等位基因的变异产物,过氧化物酶是最常被用作分析的同工酶。过氧化物酶在植物组织中广泛分布,参与多种生理活动,并且为生长发育提供了基因表达的灵敏指标,是一种重要的遗传标记^[7-8]。样品经聚丙烯酰胺凝胶电泳后,采用联苯胺-醋酸-过氧化氢染色法染色。由图 1 可知,7 个样品共显现 7 种酶带。依染色深浅区分为强带、次强带、弱带和痕迹带 4 个级别。蛇果显示 5 条酶带,Rf0.28 和 Rf0.32 为强带,Rf0.47 和 Rf0.59 为次强带,Rf0.60 为痕迹带;奶油富士显示 6 条酶带,Rf0.21、Rf0.60 和 Rf0.65 为弱带,Rf0.28 为强带,Rf0.47 和 Rf0.59 为次强带;乔纳金显示 3 条酶带,Rf0.28 为痕迹带,Rf0.32 为弱带,Rf0.59 为次强带;烟台富士显示 6 条酶带,Rf0.21 和 Rf0.65 为弱带,Rf0.28 为强带,Rf0.47、Rf0.59 和 Rf0.60 为次强带。冰糖果显示 6 条酶带,Rf0.21 为痕迹带,Rf0.28 为强带,Rf0.65 为弱带,Rf0.47、Rf0.59 和 Rf0.60 为次强带;国光显示 6 条酶带,Rf0.21 和 Rf0.28 为强带,Rf0.47 和 Rf0.65 为痕迹带,Rf0.59 为次强带,Rf0.60 为弱带;黄元帅显示 4 条酶带,Rf0.28 和 Rf0.60 为痕迹带,Rf0.32 为弱带,Rf0.59 为次强带。

从 POD 同工酶酶谱(图 1)中可以看出,奶油富士、烟台富士、冰糖果和国光均显现 6 条相同酶带,即 Rf0.21,0.28,0.47,0.59,0.60 和 0.65,且 Rf0.28 处 4 种苹果均为强带,Rf0.59 处均为次强带,另外 4 条酶带 POD 活性也相近,可以看出奶油富士、烟台富士、冰糖果和国光 4 种苹果遗传表达相近,外观相似口感相近,奶油富士、烟台富士和冰糖果同属富士系列,且富士最初也是由国光培育而成(富士苹果是日本农林水产省果树试验场盛冈分场于 1939 年以国光为母本,元帅为父本进行杂交,历经 20 余年,选育出的苹果优良品种,具有晚熟、质优、味美、耐贮等优点,于 1962 年正式命名,是世界上最著名的晚熟苹果品种),同工酶是基因表达的产物,所以这 4 种苹果在遗传上有较大的相似性;通过分析图谱还看出,乔纳金与黄元帅共显现 4 条酶带,3 条酶带均相同,即 Rf0.28 都为痕迹带、Rf0.32 都为弱带、Rf0.59 都为次强带,在外观上乔纳金和黄元帅也有相似之处,都有些黄色,有斑点,所以根据 POD 同工酶表达特点可知乔纳金和黄元帅在遗传表达上相近,可能在杂交育种过程中两者的杂交亲本有很大程度上相近;从 POD 同工酶表达酶谱中还可以看出,7 种苹果均表达 Rf0.59 酶带,且活性相同(均为次强带),可见此酶带的表达可能与苹果的共同特性有关,所以该酶带可以作为苹果属的特征性酶带;POD 同工酶酶谱中,蛇果 Rf0.32 酶带表达

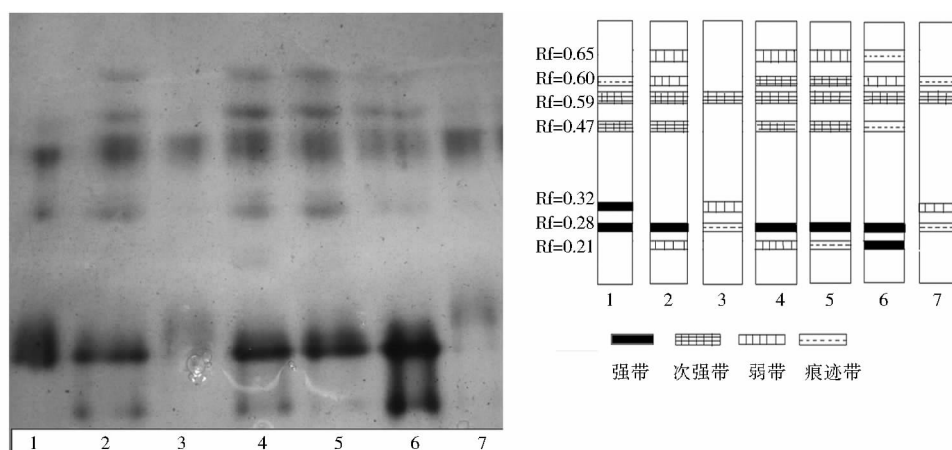


图 1 过氧化物酶同工酶谱

1. 蛇果;2. 奶油富士;3. 乔纳金;4. 烟台富士;5. 冰糖果;6. 国光;7. 黄元帅

Fig. 1 Zymogram of peroxidase isoenzyme

1. Red Delicious;2. Cream Fuji;3. Jonagold;4. Yantai Fuji;5. Bingtangguo;6. Ralls;7. Golden Delicious

活性很强(为强带),乔纳金和黄元帅有此带但活性很弱(弱带),其它苹果没有此酶带,所以 Rf 0.32 酶带可以作为蛇果特异表达的特征性酶带;Rf 0.21 酶带仅国光表达活性较强(为强带),其余 6 种表达很弱(弱带和痕迹带)或不表达,所以此酶带可以作为国光特异表达的特征性酶带;Rf 0.65 酶带只有奶油富士、烟台富士、冰糖果和国光表达,且这 4 种苹果遗传表达相近,所以 Rf 0.65 的条带可能是这一系列品种的特征酶带。

2.2 不同品种苹果的过氧化物酶活性分析

将苹果过氧化物酶同工酶活性测定结果代入 POD 活性公式,得到蛇果 POD 活性为 1.68 U,奶油富士 POD 活性为 4.56 U,乔纳金 POD 活性为 0.822 U,烟台富士 POD 活性为 0.468 U,冰糖果 POD 活性为 1.03 U,国光 POD 活性为 3.08 U,黄元帅 POD 活性为 1.17 U。奶油富士 POD 活性最高,之后活性由高到低依次为国光、蛇果、黄元帅、冰糖果和乔纳金,烟台富士 POD 活性最低。

从 POD 活性方面看,乔纳金和黄元帅 POD 活性相近。奶油富士和国光的 POD 活性较高,与其在 POD 同工酶酶谱中的表达程度一致,黄元帅和乔纳金的 POD 活性与其在 POD 同工酶酶谱中的表达程度也基本一致,但是冰糖果和烟台富士的 POD 活性与其在 POD 同工酶酶谱中的表达量不一致,原因可能是在测定 POD 活性时受到温度、酸碱度、重金属和材料储存等因素影响。通过比较 POD 活性可以看出苹果 POD 活性与 POD 同工酶的表达量基本上一致。

3 结论与讨论

3.1 苹果 POD 酶带的共有性和不同品种的差异

7 个苹果样品电泳图谱中均表达 Rf 0.59 酶

带,可能此酶带与苹果的共同特性有关,或者说该酶带可能是苹果属的特征性酶带。该试验所选 7 个苹果品种,可大致划分为 4 类,奶油富士、烟台富士、冰糖果和国光为一类,与乔纳金、黄元帅、蛇果 4 个类型品种,从图谱中可见到不论从酶谱带数目还是特有酶带上来看,不同品种 POD 同工酶表现出一定的差异性。

3.2 不同产地苹果 POD 同工酶酶谱稳定性分析

奶油富士、烟台富士和冰糖果同属富士系列,富士最初由国光培育而成,所以这 4 种苹果在遗传上有较大的相似性。4 种苹果产地不同,但同工酶谱型非常相似,均显现 6 条相同酶带,且酶带活性也相近,说明苹果中 POD 同工酶的表达比较稳定,可以作为参考指标。

参考文献:

- [1] 孟学平,宋彩琴,石秀玲,等. 14 个品种冬小麦过氧化物酶(POD)同工酶研究[J]. 哲里木畜牧学院学报,1988,9(3):15-18.
- [2] 程华,李琳玲,袁红慧,等. 福白菊与八种药用菊花 POD 同工酶比较分析[J]. 北方园艺,2012(22):99-103.
- [3] 徐秀芳,张丽敏,丁海燕. 遗传学实验指导[M]. 武汉:华中科技大学出版社,2013:153-158.
- [4] 张相歧,王海廷,黄永芬,等. 番茄属四个种的过氧化物同工酶的分析[J]. 植物研究,1987,7(4):131-136.
- [5] 李忠光,龚明. 愈创木酚法测定植物过氧化物酶活性的改进[J]. 植物生理学通讯,2008,44(2):323-324.
- [6] 王伟玲,王展,王晶英. 植物过氧化物酶活性测定方法优化[J]. 实验室研究与探索,2010,29(4):21-23.
- [7] 郭秀林,刘子会,王云,等. 张杂谷苹果酸脱氢酶和过氧化物酶同工酶研究[J]. 西北植物学报,2012(9):1768-1773.
- [8] 张艳馥,沙伟,任艳波,等. 水胁迫对大豆幼苗 POD 同工酶的影响[J]. 种子,2014(1):157-162,170.

Analysis on POD Activity and Isozyme of Apple

ZHANG Li-min¹, DENG Chen-guang¹, QI Xing-tian², CHENG Hai-tao¹, ZHANG Yu³

(1. College of Life Science, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154077; 2. College of Science, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154077; 3. College of Pharmacy, Jiamusi University, Jiamusi, Heilongjiang 154077)

Abstract: In order to provide biochemical basis for seed selection, breeding and cultivation in apple production, peroxidase isozyme of apple was analyzed by PAGE and peroxidase activity was measured. The results showed that there were some differences of peroxidase isozyme in different apple varieties. The peroxidase activity measured by guaiacol colorimetric method were consistent with peroxidase isozyme patterns of apple; the POD isozyme patterns of Jonagold was similar to Golden Delicious, their affinity was similar; POD isozyme patterns of Cream Fuji apple, Yantai Fuji apple, Bingtangguo and Ralls apple were similar and their genetic characteristics were similar.

Key words: apple; POD; isozyme; PAGE; guaiacol colorimetric method