

苹果叶片中吲哚乙酸氧化酶与过氧化物酶活性的相关性

刘魁英 赵宗芸 王同坤

(河北农业技术师范学院, 昌黎 066600)

摘 要 利用 PAGE 分离酶谱、考马斯亮蓝 R₂₅₀和醋酸-联苯胺分别染色的方法分析了不同苹果砧木叶片中不同迁移率过氧化物酶带的活性和比活性,用萨尔科夫斯基试剂分析了同一叶样酶液的吲哚乙酸氧化分解的量,将吲哚乙酸氧化分解的量与不同砧木不同迁移率的过氧化物酶活性和比活性通径分析,结果表明,迁移率在 0.49 和 0.70 的两条过氧化物酶带与吲哚乙酸氧化分解的量存在着一定的相关性,但相关不显著。吲哚乙酸氧化酶的活性的迁移率在 0.57 附近。

关键词 吲哚乙酸氧化酶活性 过氧化物酶活性 苹果 叶片 相关性

吲哚乙酸(IAA)氧化酶广泛存在于高等植物体内,其活性的大小与生长发育有着密切的相关性。早期研究发现,IAA 氧化酶具有过氧化物酶的性质^[1],而且提纯的过氧化物酶也能够使 IAA 氧化分解^[1]。因此有人认为 IAA 氧化酶可能是过氧化物酶中的一种^[2]。过氧化物酶是一类酶,将植物叶片提取液电泳分离可以获得几条或十几条同工酶谱^[1],唐秀芝等研究了一些短枝型苹果品种和砧木类型,认为乔化类型比矮化类型的过氧化物同工酶谱缺少第九条^[3]。那么,酶九带是不是 IAA 氧化酶?也可能酶九带与 IAA 氧化酶存在着某种连锁遗传?我们利用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)分离叶片中过氧化物同工酶谱、扫描定量分析的方法,测定了过氧化物酶活性,利用萨尔科夫斯基(Salkowski)试剂测定剩余 IAA 的方法测定 IAA 氧化酶的活性^[2],研究了过氧化物同工酶谱与 IAA 氧化酶的关系。

1 材料和方法

1.1 测定原理

首先用考马斯亮兰 G₂₅₀测定酶液的蛋白质含量^[4],并用醋酸钠-联苯胺测定过氧化物酶活性^[5]。然后用 PAGE 分离等量的酶液^[6],将分离好酶液的胶板分成三部分,其中一部分样品槽胶板于联苯胺染色液中染色^[6],另一部分样品槽胶板用考马斯亮兰 R₂₅₀染色^[6],第三部分样品槽胶板与联苯胺染色的胶板对应将未染色的胶板按酶谱切成酶带宽窄的胶条按顺序放入事先编号的试管中,每试管中加入等量的、已知浓度的 IAA 溶液,黑暗反应一定时间后,用萨氏试剂分析剩余的 IAA 浓度^[3],那么,原溶液中 IAA 浓度与剩余浓度之差即为氧化分解掉的 IAA。然后将醋酸-联苯胺染色胶板和考马斯亮兰染色胶板于酶谱扫描仪上扫描,用电泳前沿以外无酶区的胶板调零点,从前沿向起泳方向扫描。那么,联苯胺染色胶板的扫描面积可视为

过氧化物酶的总活性,考马斯亮兰 R_{250} 染色胶板扫描面积可视为酶液蛋白质含量,因为联苯胺染色 OD 值与过氧化物酶活性、考马斯亮兰 R_{250} 染色的 OD 值与蛋白质含量在一定范围内呈线性关系,所以,联苯胺染色胶板上每条酶带的扫描面积恰好是该酶的活性,而该酶在考马斯亮兰染色胶板上所对应的面积恰好是该酶蛋白含量。由于不同的酶带有不同的荷电核数,分子量的大小也不同,每条酶带的纯度可以达到相对电泳纯,其活性以酶谱扫描面积与蛋白质扫描面积的比值表示。

用这种方法测定不同类型苹果砧木过氧化物同工酶谱各条酶带的活性,同时测定不同类型苹果砧木 IAA 氧化酶的活性,通径分析每条过氧化物酶带与 IAA 氧化酶的相关性。

1.2 试材处理

1990 年 7 月我们取高接于山定子上的 M_7 成熟的叶片(不包括叶脉)1g 加蒸馏水 5ml 和少量蔗糖研磨成匀浆于 9000r/min 离心 10min 为供试酶液。翌年 6 月取高接于山定子上的 M 系砧木叶片 1g,加入 pH8.5 Tris-HCl 缓冲液 5ml 研磨成匀浆,于 9000r/min 离心 10min,取上清液为供试酶液。

1.3 测定方法

1.3.1 酶谱分离^[7]:分别取 100 μ l 酶液(1990 年为 M_7 一种叶片酶液,1991 年为多种砧木叶片酶液)于预先灌制好的 7%PAGE 凝胶板的样品槽内(每种酶液占 3 或 6 个样品槽),加入电极缓冲液和前沿指示剂,先用小电流使前沿通过隔层胶,然后加大电流通过分离胶。待前沿距底 4cm 左右(大约 6h)停止电泳,取下胶板于无离子水中漂洗,每种叶样中有一个样品槽胶板用于醋酸-联苯胺染色 5min,取出漂洗后用 5%醋酸固定、扫描;另一个样品槽胶板用于考马斯亮蓝 R_{250} 染色 3h 后,于醋酸-乙醇脱色液中脱色 48h 后扫描,扫描时从前沿向起泳方向扫描,以前沿以外无酶区调整零点基线;第三个样品槽胶板与醋酸-联苯胺染色胶板对应,将胶板按酶序切成 3~5mm 宽的胶条,并编号记录,然后将每根胶条放入盛有 1ml 228×10^{-6} MIAA、1ml 10^{-3} M 苯酚、1ml 10^{-3} M $MnCl_2$ 和 7ml pH6.1 的磷酸缓冲液的试管中,避光反应 30min 终止反应,取 2ml 反应液加入萨氏试剂 2ml 45 $^{\circ}$ C 避光显色 15min 于 530nm 下比色,测定其 OD 值,并从事先制作好的标准曲线回归方程算得反应液中剩余的 IAA 含量,从而换算出氧化分解的 IAA 量。

1.3.2 蛋白质的测定:依据文献[4]。

1.3.3 IAA 氧化酶活性的测定^[7]:取酶液 0.2ml 加入 10^{-3} M 苯酚、 10^{-3} M $MnCl_2$ 、0.2ml 228×10^{-6} MIAA 0.4ml 和 pH6.1 磷酸缓冲液 1ml,避光反应 30min,加入萨氏试剂 2ml 于 530nm 下测定 OD 值,另取 228×10^{-6} MIAA 0.06, 0.1, 0.2, 0.3, 0.4, 0.5ml 于试管中,补充水至 2ml,加入萨氏试剂 2ml,40 $^{\circ}$ C 避光反应 30min 于 530nm 下测其 OD 值,并将 OD 值与 IAA 含量用最小二乘法计算标准曲线回归方程,将酶液的 OD 值代入标准曲线回归方程得 IAA 氧化分解剩余的 IAA,那么,原浓度与剩余浓度之差即为氧化所消耗的 IAA 量。

1.3.4 过氧化物酶活性的测定:依据文献[5]。

1.4 结果计算

1.4.1 过氧化物酶活性:采用符号 $A_{\text{底物}}^{Rf}$ 表示酶活性; $A_{\text{底物}}^{Rf}$ = 该迁移率酶扫描面积 \times (过氧化物酶活性 \div 过氧化物酶扫描总面积)。

1.4.2 过氧化物酶比活性:

$$\alpha_{H_{202}}^{RI} = \frac{A_{\text{底物}}^{RI}}{\text{该酶对应的 } R_{250} \text{ 扫描面积} \times (\text{酶液蛋白质含量} \div R_{250} \text{ 扫描总面积})}.$$

1.4.3 IAA 氧化酶活性:

$$A_{IAA} = 228 \times 10^{-5} - \text{OD 值对应的 IAA 含量} / 30\text{min}.$$

2 结果与分析

表 1 不同砧木 IAA 氧化酶和过氧化物酶的活性

(1991 年 8 月)

2.1 IAA 氧化酶与过氧化物酶活性的相关性

苹果砧木叶片中 IAA 氧化酶活性和过氧化物酶的活性分析结果见表 1。相关分析表明,IAA 氧化酶活性与过氧化物酶活性存在着一定的相关性,但未达显著水平。

2.2 不同迁移率过氧化物酶带活性与 IAA 氧化酶活性的相关性

我们于 1991 年 8 月利用 PAGE 分离酶谱、考马斯亮蓝 R_{250} 和醋酸-联苯胺分别染色的方法,分析了苹果砧木过氧化物同工酶不同迁移率酶带的活性及与 IAA 氧化酶的关系(见表 2)。

表 2 不同砧木过氧化物酶带的活性

(×1000)

砧木 型号	不同过氧化物酶带的迁移率										
	0.06	0.15	0.21	0.33	0.41	0.49	0.56	0.64	0.70	0.75	0.80
M ₁	3.272	0	31.831	55.222	0	92.090	0	131.170	36.272	13.030	0
M ₂	19.697	28.260	19.919	133.170	38.110	237.656	199.110	102.770	0	0	41.960
M ₃	0	13.340	29.350	104.060	37.350	109.400	152.100	80.850	45.360	0	24.010
M ₄	0	0	48.000	57.000	81.000	204.000	189.000	99.000	51.000	0	30.000
M ₅	0	29.258	0	166.770	0	158.000	269.170	0	87.770	0	43.880
M ₂₇	35.00	0	40.000	78.000	74.000	28.000	118.000	44.000	22.000	10.000	10.000
山定子	4.157	4.157	15.798	49.056	0	30.760	97.280	0	10.810	0	14.135
相关系数	-0.242	0.199	0.283	0.375	0.412	0.540	0.391	0.454	0.594	-0.085	0.363
直接通径	-2.599	-4.000	-4.237	4.626	5.756	0.638	-9.274	-1.536	0.805	0.522	4.608
直接相关	-0.135	0.100	0.137	0.189	0.205	0.351	0.196	0.190	0.535	0.061	0.161
间接通径	2.056	3.940	4.540	-4.527	-5.782	-0.344	9.183	2.134	-0.088	-0.210	-4.680
间接相关	-0.107	0.099	0.146	0.185	0.206	0.189	0.193	0.264	0.085	0.024	0.162

分析表明,迁移率不同的过氧化物酶带活性不同,对 IAA 的氧化能力也不同,虽然大都对 IAA 有氧化作用,但相关系数在 0.5 以上的仅有迁移率在 0.49 和 0.70 的两条过氧化物酶带,且直接相关系数也大,说明这两条过氧化物酶带对 IAA 氧化能力较强。

2.3 不同迁移率的过氧化物酶带比活性与 IAA 氧化酶活性相关性

不同迁移率的过氧化物酶带比活性及其与 IAA 氧化酶活性通径分析结果见表 3。通径分析表明,不同迁移率过氧化物酶带比活性不同,与 IAA 氧化酶活性相关性不同,其中,迁移率

在 0.49 和 0.70 左右的过氧化物酶带与 IAA 氧化酶活性存在较大的相关性,但直接相关小于酶活性,说明这种相关性不是由于酶的比活性引起,而是由于这种酶的含量较大所致。

表 3 不同迁移率的过氧化物酶带比活性

($\times 1000$)

砧木 型号	不同过氧化物酶带的迁移率										
	0.06	0.15	0.21	0.33	0.41	0.49	0.56	0.64	0.70	0.75	0.89
M ₁	0.914	0.000	8.445	14.652	0.000	16.290	0.000	16.978	4.185	1.172	0.000
M ₄	3.055	4.153	20.347	21.242	5.599	31.593	23.633	10.246	0.000	0.000	2.928
M ₇	0.000	1.418	4.565	14.423	4.764	13.160	17.013	8.799	4.902	0.000	1.988
M ₉	0.000	0.000	7.355	7.785	11.308	26.698	23.747	10.365	5.339	0.000	2.244
M ₂₈	0.000	7.675	0.000	36.460	0.000	27.273	40.127	0.000	10.280	0.000	4.429
M ₂₇	9.678	0.000	6.547	18.237	13.093	4.583	17.557	5.435	2.667	1.190	0.082
山定子	0.760	0.419	2.342	8.378	0.000	5.142	14.152	0.000	1.439	0.000	1.708
相关系数	-0.202	0.209	0.053	0.249	0.329	0.513	0.299	0.408	0.544	-0.096	0.248
直接途径	0.891	-0.162	-0.242	-1.588	-1.315	-2.379	-1.055	0.173	2.290	0.096	-0.248
直接相关	-0.052	0.133	0.038	0.121	0.256	0.334	0.175	0.057	0.384	0.057	0.083
间接途径	-2.564	0.333	-0.092	1.667	-0.375	-1.274	0.747	1.060	-0.958	-0.067	0.495
间接相关	-0.150	0.076	0.015	0.128	0.073	0.179	0.124	0.351	0.160	0.039	0.165

2.4 IAA 氧化酶

我们利用 PAGE 分离酶谱、考马斯亮蓝 R₂₅₀和醋酸-联苯胺染色、分割胶条分别测定 IAA 氧化分解量的方法,测定了 M₇的过氧化物酶活性、酶蛋白分布和 IAA 氧化分解量,并绘制成曲线图。从附图中可以看出,迁移率在 0.50~0.70 之间存在一条 IAA 氧化分解活性较高的酶区,而活性最高区域的迁移率在 0.57 左右,这与前面的分析基本相符。在酶活性和比活性的途径分析中,迁移率在 0.50 和 0.70 两条酶带与 IAA 氧化分解相关性较大,而分区测定表明 IAA 的氧化分解较高活性也是在这一区域内,说明 IAA 氧化酶就在这一区域内。

3 讨论

利用 PAGE 分离酶谱、考马斯亮蓝 R₂₅₀和醋酸-联苯胺分别染色、分区测定酶带 IAA 氧化活性的方法可以研究不同迁移率

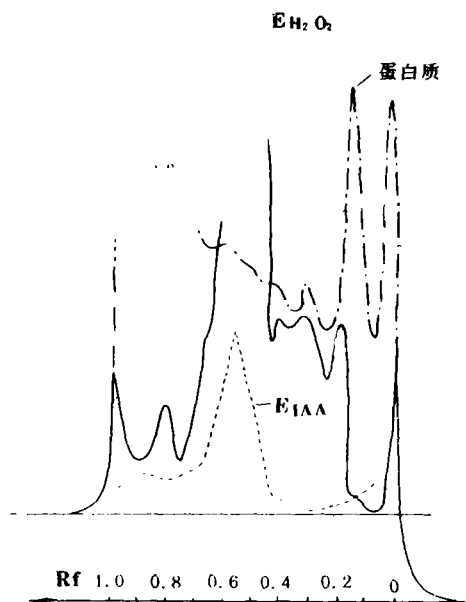


图 M7 过氧化物酶活性,酶蛋白分布和 IAA 氧化分解量曲线

酶带的活性,但从附图中可以看出,分离的效果并不理想,如果采用等电点聚焦可能得到比较好的分离效果。

从以上的分析还不能肯定 IAA 氧化酶与过氧化物酶有较大的相关性或存在着某种连锁遗传,酶活性和比活性的通径分析表明,迁移率在 0.49 和 0.70 的确存在着两条与 IAA 氧化分解的相关系数比较大的过氧化物同工酶谱,说明这两条过氧化物酶带参与了 IAA 氧化分解,具有一定的 IAA 氧化能力。唐秀芝等^[3]认为矮化比乔化的过氧化物酶谱缺少酶九带也可能在这一区域,但相关未达显著水平,说明这两条过氧化物酶带不是 IAA 氧化酶。从图中可以看出,IAA 氧化活性较高区域的迁移率在 0.57 左右,而且是单峰,但迁移率在 0.57 的过氧化物酶带活性、比活性与 IAA 氧化酶的相关系数仅为 0.39 和 0.29,也说明了这条过氧化物酶带不是 IAA 氧化酶,这与 Sequiera(1966)的结论相同,但 IAA 氧化酶还需作进一步的研究。

4 结论

不同苹果砧木过氧化物同工酶谱中迁移率在 0.49 和 0.70 的酶带虽然与 IAA 的氧化有一定的相关性,但不是 IAA 氧化酶,具有一定的 IAA 氧化能力。迁移率在 0.57 左右有一 IAA 氧化分解的活性高峰的酶区,IAA 氧化酶可能分布在这一区域。

参 考 文 献

- 1 Leopold AC (颜季琼等译). 植物的生长与发育. 北京:科学出版社,1984,95~115
- 2 增田芳雄等,铁岭农学院译. 植物激素. 北京:科学出版社,1976,32~33;114~115
- 3 唐秀芝. 苹果实生苗过氧化物同工酶酶九带的遗传研究简报. 北京农业大学学报,1987,13(1):8
- 4 汪沛洪等. 基础生物化学实验指导. 西安:陕西科学技术出版社,1986,66~68
- 5 孙文全. 联苯胺比色法测定果树过氧化物酶活性的研究. 果树科学,1988,5(3):105~108
- 6 张龙翔. 生化实验方法和技术. 北京:人民教育出版社,1981,101~102
- 7 张志良. 植物生理实验指导. 北京:高等教育出版社,1990 210~212;183~184;305~313

Correlation Between IAA Oxidase Activity and Peroxidase Activity in the Leaves of Apple Stock

Liu Kuiyin Zhao Zongyun Wang Tongkun

(Hebei Agrotechnical Teachers' College, Changli 066600)

Abstract The activity and the ratio activity of peroxidase with different Rf in different apple stock leaves were analysed using the PAGE and stained with Coomassie brilliant blue R-250 and acetic acid-benzidine. The oxidation quantity of IAA in the same sample leaf was determined by use of Salkowski reagent. The oxidation quantity, and the peroxidase activity and its ratio activity with different Rf in these leaves were analysed with path analyses. The results showed that there was certain correlation between the IAA oxidation quantity and the activity of two peroxidase bands when their Rfs were 0.49 and 0.70 respectively, but the correlation was not significant. The Rf of the IAA oxidase activity was about 0.57.

Key words: IAA oxidase activity; Peroxidase activity; Apple; Correlation