

## 樟树过氧化物酶同工酶的初步研究

孙鸿有 袁文海 金爱武 任孝蓉

(浙江林学院, 临安 311300)

**摘 要** 9年生樟树过氧化物酶同工酶基本酶谱有  $A_1$ ,  $A_2$ , B,  $C_1$ ,  $C_2$ ,  $C_3$  6条酶带; 以树冠中部的幼叶分析最好; 在树冠阳面与阴面采样, 酶谱无差别; 在4月10日至5月15日期间采样酶谱分离无影响; 不同种源、不同家系的酶谱基本无差异。

**关键词** 樟树; 过氧化物酶; 同工酶; 聚丙烯酰胺; 凝胶电泳

**中图分类号** S792.22

过氧化物酶同工酶是受一定基因控制的一种遗传标志。这种标志对于揭示植物的亲缘关系、遗传变异等方面, 从分子水平提供了有关依据。

本试验采用垂直平板聚丙烯酰胺凝胶电泳分析樟树过氧化物酶同工酶, 以探讨樟树过氧化物酶同工酶的分析方法和变异规律, 为研究樟树遗传提供基础。

### 1 试验材料和方法

#### 1.1 材料

取自临安县武隆乡朱穴村八角坪和严家湾的樟树种源试验林, 9年生。种源来自湖南、湖北、浙江、安徽、福建、广东、广西、贵州等省, 分布范围  $24^{\circ}03' \sim 30^{\circ}06' N$ ,  $104^{\circ}50' \sim 121^{\circ}25' E$ 。

#### 1.2 方法

1.2.1 样品液提取 取试样 2 g, 加入 0.9% NaCl(含 20% 蔗糖)溶液 10 ml, 在冰浴中研磨成匀浆, 6 000 r/min 离心 10 min, 取上清液贮于 4 °C 的冰箱中备用, 保存期不超过 3 d。

1.2.2 电泳 垂直平板聚丙烯酰胺凝胶电泳, 以溴酚兰作前沿指示剂。

1.2.3 过氧化物酶同工酶染色 用醋酸联苯胺活性染色法。染色后用 7.0% 的乙酸溶液固定。

1.2.4 测定迁移率( $R_f$ ), 绘制酶谱示意图, 拍照, 然后将胶板制成干板保存。整个试验分析了 20 个种源 5 个家系的 225 个单株 325 个样品。样品除不同取样材料试验外, 大多采用嫩梢幼叶。

---

收稿日期: 1991-10-21

## 2 试验结果分析

### 2.1 分离胶浓度的选择

分离胶浓度对同工酶的分离效果有重要影响。为了选择合适的分离胶浓度,取得较理想的分离效果,用4种不同浓度的分离胶进行试验(表1),以幼叶样品液为材料。

表1 不同浓度的分离胶配方

Table 1 Formulation of separatory gel in different concentrations

试剂	分离胶制备用量 (ml)			
丙烯酰胺 (30:0.8)	10.0	7.5	6.0	5.0
分离胶	3.75	3.75	3.75	3.75
过硫酸铵 (1.5%)	1.5	1.5	1.5	1.5
TEMED	0.015	0.015	0.015	0.015
水	14.45	16.95	18.45	19.45

结果表明,以7.5%的分离胶浓度分离效果最好,其分离出的同工酶谱带较清晰,而浓度为5.0%和6.0%的分离胶,酶带扩散严重,无法确定各酶带的确切位置;浓度为10.0%的分离胶,酶带 $R_f$ 太小,谱带过于密集,不适合分析。故本试验采用7.5%分离胶浓度。

### 2.2 椴树过氧化物酶同工酶基本酶谱分析

从大量的酶谱分析来看,椴树过氧化物酶同工酶是比较稳定的。其基本酶谱为6条,在最适分离胶浓度7.5%的条件下,根据酶带 $R_f$ 值,大体可分成A, B, C 3个区(图1a)。A区包括 $A_1$ ,  $A_2$  2条酶带,其中 $A_1$ 带活性较强,显色较深, $A_2$ 活性较弱,显色较浅;B区只有1条酶带,带较宽,显色浅,活性较弱;C区有3条酶带,带较宽,以 $C_3$ 活性最强,染色也较深。

### 2.3 不同采样材料和部位的分析

据报道,在植物不同的生长发育时期和不同的组织器官中,过氧化物酶同工酶酶带数目和活性有很大变化。为此,对椴树进行了取样材料、部位试验。

从同一植株分别取幼叶、成型叶、1年生幼茎,在相同实验条件下分析,共取5个单株,即5个重复,试验结果见图1(b)。可以看出,3种取材,其酶带数完全一样,只是活性有所差异。以幼叶的活性最强,酶谱带最清晰,成型叶与幼茎的酶活性稍弱。这与幼叶的旺盛生活力和生长势相符合。故本试验都是采用幼叶。

在同一植株上,按树冠上、中、下3个部位及树冠中部的向阳、背阳面取幼叶对比试验,共取5个单株。结果表明,无论向阳或背阳面的幼叶,酶带及酶活性的表达一致;而树冠上、中、下3个部位以树冠中部的酶活性最强。因此,以树冠中部幼叶为椴树过氧化物酶同工酶的分析材料能典型地反映其酶谱。

### 2.4 不同采样时间的分析

自4月10日第1次采样,在同一植株同一树冠部位,每隔10d左右采样1次,最后1次

采样为 5 月 26 日，每次采样 10 株。试验结果见图 2。

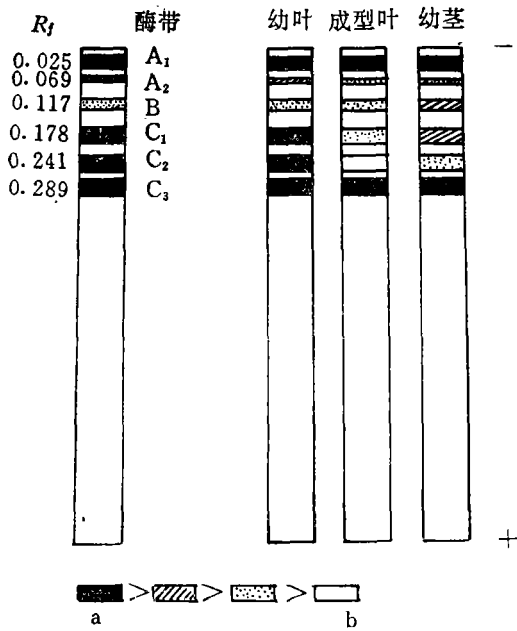


图 1 椴树过氧化物酶同工酶谱(a) 不同取样材料的酶谱(b)

Fig. 1 (a) The basic zymogram of peroxidase isoenzymes from Chinese sassafras. (b) The zymograms of differennr samples

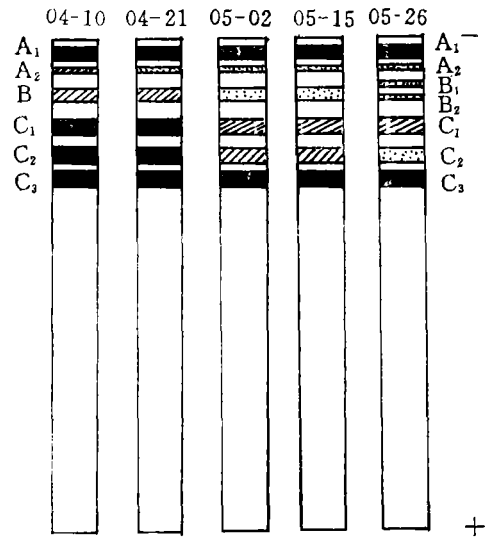


图 2 不同采样时间的酶谱

Fig. 2 The zymograms of samples taken at the different time

结果表明，4 月 10 日至 5 月 15 日的 4 次采样，其酶带数完全相同，但前两次酶活性较后 2 次强，表明椴树在萌芽长叶初期代谢更旺盛；最后 1 次采样(5 月 26 日)酶谱发生了差异，B 带由原来的 1 条宽型带明显地分离成 2 条窄型带，即 B<sub>1</sub>，B<sub>2</sub> 带，这可能预示着椴树在年发育周期中，自 5 月下旬进入了一个新的阶段。这一阶段酶的差异有待今后作进一步分析。

根据以上分析，可以发现它们的酶谱差异很少，尤其是 A<sub>1</sub> 和 C<sub>3</sub> 谱带完全相同。这两酶带分别在慢带区和快带区，带型稳定，染色较深。

### 2.5 不同种源、不同家系的过氧化物酶同工酶分析

同一种植物不同类群间遗传特征的差异有可能在同工酶酶谱上得到反映，酶谱的异同往往可以反映植物类群间遗传组成的差异及亲缘关系。

2.5.1 不同种源同工酶的分析结果 每种源取样 10 株，共测定 20 个种源，结果表明，椴树的过氧化物酶酶谱是稳定的，种源间差异很小。在 20 个种源中，除贵州水城种源外，其他种源的过氧化物酶同工酶均表现相同酶谱，即 A<sub>1</sub>，A<sub>2</sub>，B，C<sub>1</sub>，C<sub>2</sub>，C<sub>3</sub> 6 条酶带；贵州水城种源 50% 的植株增加了 1 条 A<sub>0</sub> 带。这表明，贵州水城种源的群体遗传基础与其他种源有明显不同。该种源分布于贵州高原海拔 1 800m 处，生长条件与其他种源存在明显差异。同工酶的差异可能与此有关。

2.5.2 不同家系同工酶的分析结果 通过对临安种源5个家系,每家系10个单株的分析,发现家系间的过氧化物酶同工酶酶谱基本无差异。这表明,亲缘关系愈近的个体,它们的谱带表达愈相似,活性也更接近。

### 3 结论

分析椴树过氧化物酶同工酶采用7.5%的分离胶浓度能获得较好的分离效果。椴树幼叶、成型叶、嫩梢及从树冠不同部位取样分析,过氧化物酶同工酶谱无差异,只是酶的活性有所不同。

椴树过氧化物酶同工酶基本酶带有6条,分A, B, C3区。4月10日至5月15日间取样,酶谱分离没有差异,5月26日取样时,B带分离成B<sub>1</sub>, B<sub>2</sub>两条酶带。

20个种源在过氧化物酶同工酶谱上差异很小,仅贵州水城种源有50%个体A区增加1条A<sub>0</sub>带。临安种源5个家系之间的酶谱也无差异。

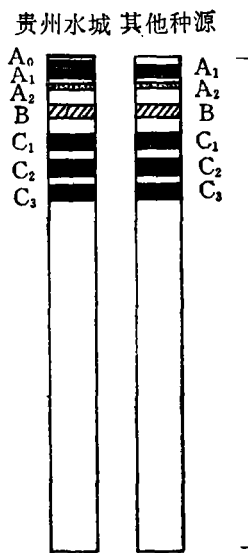


图3 椴树过氧化物酶同工酶两种酶谱  
Fig. 3 Two zymograms of peroxidase isoenzymes

Sun Hongyou (Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, PRC), Yuan Wenhai,

Jin Aiwu, Ren Xiaorong. Study on Peroxidase Isoenzymes of Chinese Sassafras.

J. Zhejiang For. Coll., 1993, 10(1): 93~96

**Abstract:** The basic zymogram of peroxidase isoenzymes of Chinese sassafras at the age of 9 years consists of A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B, C<sub>1</sub>, C<sub>2</sub> and C<sub>3</sub> enzyme bands. Young leaves in a middle section of the crown are most favorable for sampling. The zymogram of samples taken from a crown's sunny side and a crown's dake side has no difference. The samples taken from April 10th to May 26th have no effect on zymogram. There is no significant difference about zymogram of samples from different provenance and families.

**Key words:** Chinese sassafras (*Sassafras tzumu* Hemsl.); peroxidase; isoenzymes; polyacrylamide; gel electrophoresis