

383339

稻谷同工酶研究的淀粉凝胶电泳技术

殷寿华 吴世斌

(中国科学院西双版纳热带植物园, 云南勐腊 666303)

摘要 同工酶(等位酶)是基因的直接产物,用它作为在蛋白质层 0 次上所体现的遗传标志可以很容易地研究植物特征特性遗传信息的多样性及其相互关系。因此同工酶研究不但在植物遗传育种上有较大的应用价值,同时在植物遗传多样性的研究上也具有广阔的应用前景。本文初步介绍了稻谷同工酶研究的淀粉凝胶电泳技术,在操作上将这一技术分为 7 个步骤,既准备缓冲液、准备淀粉凝胶块、植物材料准备、点样、电泳、染色和同工酶酶谱分析及有关计算等,并对每一个技术操作步骤都作了较详细的描述。

关键词 同工酶;技术步骤;稻谷(*Oryza sativa* L.)

同工酶(isoenzyme)可以说是一系列结构不同但催化反应相同的酶,是酶的多型性(polymorphism)的体现。同工酶可以在酶的二级、三级或四级结构中所产生的任何变化,即多肽结构的次生性改变中形成;基因重复和位点突变,以及改变辅酶分子数目或其他辅基数目等都可以形成同工酶。从同工酶的产生机制上来说,它们的形成主要有两种原因:

1. 由同一基因位点上的不同等位基因分别编码亚基并依不同方式组合而成,此类同工酶也称为等位酶(allozyme);
2. 由不同基因位点分别编码亚基组合而成的多种形式的酶。

同工酶的分离方法基本上类似于其他各种蛋白质或酶的分离方法。在同工酶的分析方法中,区间电泳是常用的有效方法之一。在一定强度的电场和一定 pH 值的介质中,分子量较大和带电量较多的粒子通常会更快地向阳极移动,这样,不同分子量和不同带电量的同工酶分子即可得到分离。

同工酶电泳虽然使用过很多种介质,但通常是在淀粉、乙酸纤维素、聚丙烯酰胺或者琼脂等介质中进行分离。本文着重于介绍稻谷同工酶研究的淀粉凝胶电泳技术。通过对同工酶的分析,这一技术可对稻谷(*Oryza sativa* L.)品种中位于 24 个基因位点上的 76 个等位基因进行鉴定研究^[1]。这一技术具有操作十分简单有效,能同时处理大量材料而每一材料的需要量却很少,以及淀粉凝胶介质的无毒无害等优点,是进行同工酶多型性研究的一种重要方法。具体操作可分为以下 7 个步骤:

- | | |
|-------------|---------|
| 1. 缓冲液制备 | 5. 电泳 |
| 2. 淀粉凝胶介质制备 | 6. 染色 |
| 3. 植物材料准备 | 7. 酶谱分析 |
| 4. 点样 | |

一、缓冲液制备

由于关系到电泳过程中溶液的 pH 值和离子浓度,缓冲液的制备必须与所研究的同工酶相适应。对稻谷胚芽(胚芽鞘)中同工酶的研究,根据多年的探索,在淀粉凝胶电泳中通常采用两套缓冲液系统(表 1)。

表 1 稻谷淀粉凝胶电泳缓冲液系统

Table 1 Buffer systems for starch gel electrophoresis

供分析的酶类	缓冲液系统		配 制 方 法		
			成 分	数 量	说 明
PGI SDH ADH ICD AMP EST CAT	系 统 I	凝胶缓冲液			稀释 10 倍使用
		Tris(0.009M)	Trizma base(Tris)	10.40g	
		Histidine(0.005M)	Histidine mono HCl	5.10g	
		Ph8.0	加水到:	500.00ml	
		电泳缓冲液			直接 使用
		Tris(0.400M)	Trizma base(Tris)	18.60g	
		Citrate(0.105M)	Citric acid	8.40g	
Ph 8.0	加水到:	1000.00ml			
GOT PGD MAL ACP POX PGI	系 统 II	凝胶缓冲液			稀释 2 倍使用
		Tris(0.076M)	Trizma base (Tris)	18.42g	
		Citrate(0.006M)	Citric acid	2.10g	
		Ph 8.7	加水到:	1000.00ml	
		电泳缓冲液			直接 使用
		Na—borate(0.30M)	NaOH	4.80g	
		Ph 8.2	Borid acid	37.10g	
	加水到:	2000.00ml			

二、淀粉凝胶介质制备

系统 I 和系统 II 所使用的淀粉凝胶介质的制备方法基本相同(图 1)。将水解淀粉与凝胶缓冲液(13%)在烧瓶中均匀混合,充分震荡使溶液中的淀粉颗粒和团块全部溶解后,置于温度调为 300℃ 的磁力搅拌器上加热,直到溶液强烈沸腾并呈透明状时,迅速取下接入自来水抽滤系统中将气泡完全抽净,此时溶液变得十分均匀而明亮。乘热将溶液倒入事先准备好并已搁平的电泳板中(电泳板两头的电泳通道需事先用胶带封闭),在倾倒过程中发现的固体颗粒或气泡需迅速用尖镊夹除。凝胶溶液在室温下静置 30 分钟左右得到冷却和凝固,然后用一层薄膜胶纸覆盖凝胶表面以免过度失水,将凝胶放入 4℃ 环境中,20 分钟后即可作为电泳的凝胶介质使用。

在淀粉凝胶介质制备过程中,需注意以下事项:

1. 凝胶溶液加热沸腾时的状态关系到凝胶介质的质量。如溶液太浓酶带在电泳不易跑开;而太稀则凝胶介质过软,所制成的凝胶片易损坏,不利于保存和观察。由于溶液沸腾与各

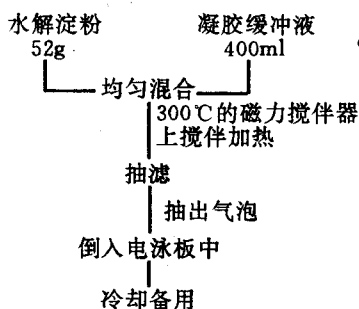


图 1 淀粉凝胶介质的制备

Fig. 1 Preparation of starch gel

地的大气压力有关,在制备凝胶介质时应根据地点的特性不断摸索,以保证凝胶介质的质量。

2. 凝胶溶液应在最短的时间内充分抽净溶液中的气泡,时间过长将使溶液凝固而无法

均匀倒入电泳板中。

三、植物材料准备

本技术用稻谷种子萌发时的胚芽或胚芽鞘作材料。

1. 种子萌发 每个品种取 10 粒左右种子, 分别布于已充分吸水后的萌发基质上, 在 30~35℃ 的黑暗环境中萌发。一般 3—6 天内即可有可供取样用的胚芽出现。

2. 取样 当胚芽或胚芽鞘长至 1—4cm 时, 即可取样。用清洁的尖嘴镊和解剖刀将每颗发芽种子露出外壳部分的胚芽或胚芽鞘取下, 分别放入置于冰块上的研钵中, 并立即滴入约 1ml 冰水(用蒸馏水), 用适当的玻棒将材料研碎。由于高温易使酶遭到破坏, 因而整个过程都应在低温下进行。同时处理多个材料时, 应特别注意使用工具的清洁, 以免酶在不同材料或样品间混杂, 出现错误结果。

在滴入的冰水中加少量抗氧化剂, 会有助于提高过氧化物酶和乙醇脱氢酶酶谱显示的质量, 但大多数酶仅用纯水提取即可。

四、点样

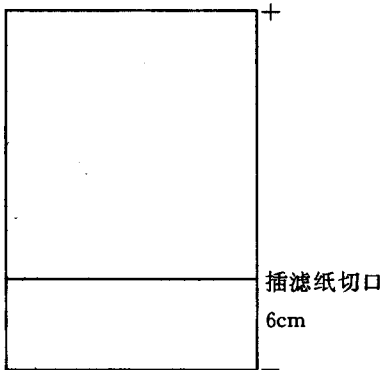


图2 凝胶片上点样
Fig. 2 Sampling on gel

用滤纸吸取酶的提取液。将滤纸剪成 0.7cm × 1.0cm 的小块, 放入研碎的材料中充分吸湿, 供电泳用。滤纸的大小可根据实验要求进行剪裁。

将冷藏的凝胶板取出, 在负极一边(可任意选定)把薄膜胶纸掀开, 再用不锈钢小刀在离边沿 6cm 处切开(图 2)。用镊子蘸取少量 0.1% 的溴酚蓝溶液(Bromophenol blue)轻涂于该切口上, 作为电泳时酶移动的标记。然后将已充分吸取植物样液后的滤纸片用镊子取出, 逐片垂直插入该切口中。滤纸片须充分吸湿以免插入后酶液相互交流。

当凝胶块上的切口中插满滤纸片后, 即可拉上薄膜胶片, 重新盖好, 准备电泳。

五、电泳

电泳用电压强度进行调节。具体操作方法如下:

1. 将封闭电泳板两头电泳通道的胶带撕去;
2. 准备两个电泳槽(分别接电源阳极和阴极), 检查电泳槽中的铂金丝导线及电源插孔的质量, 如有问题, 及早更换;
3. 将电泳板横放在电泳槽上, 两头的电泳通道分别插入两个电泳槽中。然后在电泳槽中加入电泳缓冲液到完全淹没两头的电泳通道为止。由于本技术使用两套缓冲液系统, 故配套的凝胶缓冲液与电泳缓冲液不能相互混淆;
4. 在凝胶块的薄膜胶纸上压上一块面积稍大的玻璃, 玻璃上放一块面积能完全覆盖凝胶板的冰块, 以降低电泳时由于凝胶介质电阻增大引起的高温。然后将整个系统置于 4℃ 环境中;
5. 由于电泳的方向是从阴极向阳极泳动, 故电泳板上点样的滤纸一端接到电源的阴极上, 另一端与阳极相连。注意千万不能接反;
6. 检查以上操作一切正常后, 再接通电源, 通过电泳的电源装置迅速将电流强度调至

35mA。电泳 1 小时后,再将电流强度调至 40—45mA,继续电泳 2 到 3 小时。此时通过溴酚蓝的指示,所分离的同工酶已泳动至接近阳极处,即可切断电源,停止电泳。

六、染色

1. 制凝胶片电泳结束后,从 4℃ 环境中取出电泳板,将凝胶块从电泳板上仔细分开,放到一块特制的有机玻璃板上,该有机玻璃板的两边边缘准确地高出其他部位 1.0mm。用小刀在凝胶块一头斜切一角,以标记极性和正反面。再用另一块平整的有机玻璃板压盖于凝胶块上,此板上可再压一适当重量的方形物体,以避免切割时凝胶块移动。切割可以用细钢丝之类的物体,沿有机玻璃板两边将凝胶块平均切割成厚 1.0mm 的薄片,一张凝胶块大约可切出 6—7 片凝胶片。

2. 将切出的凝胶片按切割顺序逐片放入染色盒中,染色盒的体积以容纳 50ml 的染色液即可浸没整片凝胶片为准。染色液根据各种酶作用底物的特性分别配制而成(附录二)。当凝胶片浸入染色液中后,各种酶的活性区即可显示出来。有些酶的显示需要特殊的环境条件,如黑暗条件,40℃ 加温,投入染色液中后立即记录酶谱,而有的则需染色一整夜等。

3. 本技术的系统 I 可按切割顺序对 EST、LAP、CAT、ALAP、SDH、ICD、ARAP、ADH、PGI 等酶的同工酶进行染色,系统 II 则可对 ACP、PGD、MAL、GOT、POX 以及 PGI 等酶的同工酶进行染色。切片的顺序和每一片所能显示的酶谱见图 3。

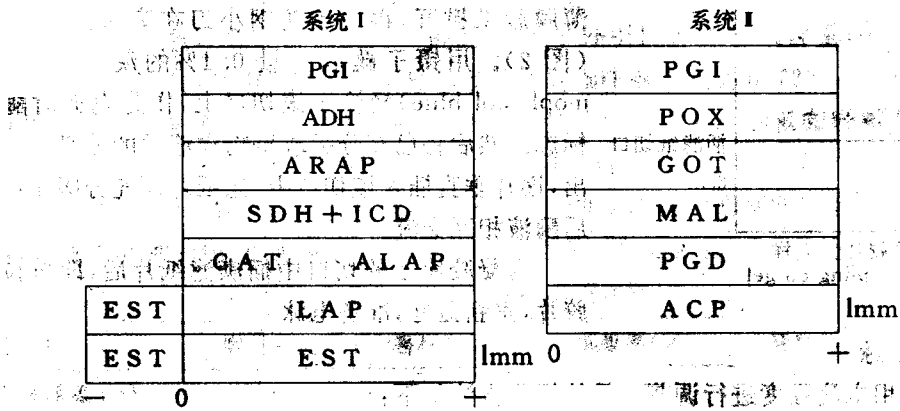


图 3 切割顺序及显示酶带

Fig. 3 Gel cutting sequence

七、酶谱分析

通过电泳和染色后,各同工酶(等位酶)被分离,并以有色谱带的形式在凝胶片上呈现出来,这就是同工酶的酶谱。酶谱能用坐标予以绘制(图 4)。同工酶的酶谱是十分复杂的,这是因为它既可由同一位点上的不同等位基因编码酶蛋白亚基,也可由不同位点上的不同等位基因编码酶蛋白亚基;其分子形式既可由单个亚基构成(单聚体),也可由多个亚基构成(多聚体)。但由于同工酶是基因的直接产物,能完全表达基因,其氨基酸组分的变化也是 DNA 序列变化的结果,这为观察基因的表达提供了直接的方法,因此它仍然是一个很方便而有用的遗传标志。目前已在 100 多个属中报道了植物同工酶的研究成果^[2]。通过对同工酶的研究,在稻谷胚芽(胚芽鞘)中报道了位于 24 个基因位点上的 76 个等位基因(表 2),由这些不同位点和不同等位基因控制的同工酶在不同稻谷品种以及不同地理来源的品种间有较大的

差异,据此就能探讨稻谷样品的来源及其分类^[4]。

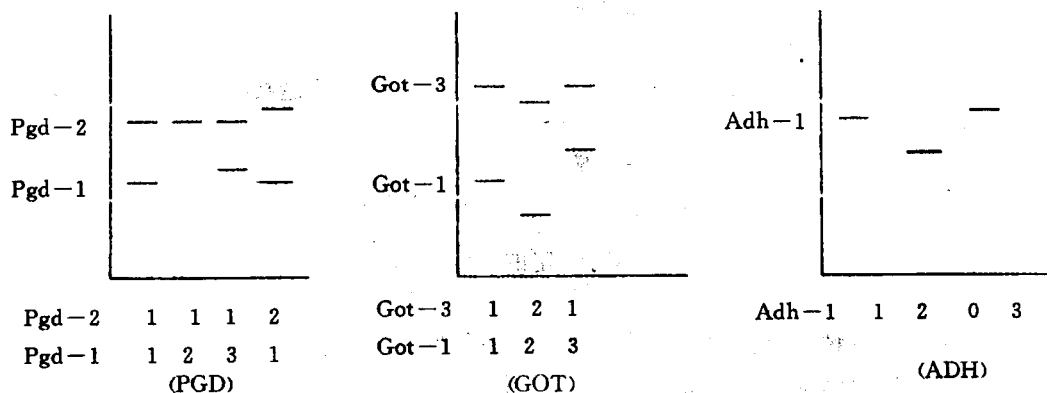


图 4 同工酶谱图解^[1]

Fig. 4 Diagrammatic interpretation of isozymes

表 2 稻谷胚芽(胚芽鞘)同工酶的变异(据 Glaszmann 改^[1])

Table 2 Enzyme variation in plumules and coleoptiles

酶类	基因位点数	等位基因数	总计	酶类	基因位点数	等位基因数	总计
PGI	2	各 4	8	SDH	1	4	4
GOT	2	GOT-1 有 3 个 GOT-3 有 2 个	5	ENP	1	2	2
ADH	1	4	4	EST	4	EST-1 有 2 个 EST-2 有 3 个 EST-5 有 3 个 EST-9 有 2 个	10
ICD	1	3	3	ACP	3	ACP-1 有 3 个 ACP-2 有 2 个 ACP-4 有 2 个	7
PGD	2	PGD-1 有 3 个 PGD-2 有 2 个	5	CAT	1	3	3
MAL	1	2	2	POX	1	2	2
AMP	4	AMP-1 有 7 个 AMP-2 有 4 个 AMP-3 有 7 个 AMP-4 有 3 个	21				
合计	13		48		11		28

对酶谱及其图解的分析方法很多,这些分析结果已在研究植物分类、进化、地理起源、植物生长发育习性、植物形态建成、种子纯度检验以及研究同工酶与植物的生物学特性、抗性、产量、品质等的相关关系方面发挥了重要的作用。

1. 等位基因频率的计算

同工酶位点的基因频率是研究植物种、种内单位分类及其亲缘关系的一个重要参数,它是根据不同等位基因在一批个体中所表达出来的纯合子和杂合子基因型的个体数来进行计算的:

$$\text{等位基因频率 } P = \frac{2h + H}{2N}$$

式中: h—纯合子 AA, BB 基因型的个体数

H—杂合子 AB 基因型的个体数

N—总个体数

2. 遗传相似系数的计算

通过计算种群内基因的多型性,种群间的不同基因频率及每个位点上不同基因的总数来计算遗传相似性系数^[2],遗传相似系数可用来研究植物群体间的亲缘关系。

$$\text{遗传相似系数 } I = \frac{\sum_{i=1}^n X_i Y_i}{\sqrt{\sum X_i^2 \sum Y_i^2}}$$

式中, X_i, Y_i 分别为 X, Y 种群第 i 个等位基因频率。当 I 值越接近 1 时, X, Y 种群的亲缘关系就越接近。这种亲缘关系可用 t 分布检验:

$$t = \sqrt{\frac{(n-2)I}{1-I^2}} \quad (\text{自由度} = n-2)$$

当 t 值显著不为零时, 则二个群体有一定的亲缘关系。

3. 聚类分析

把一系列种或种内单位间的遗传相似系数进行聚类分析并作聚类图后, 可以很容易地看出这些种或种内单位之间亲缘关系的远近, 并可为植物或品种分类提供进一步的证据。如在 A、B、C、D、E 五个种的同工酶谱上, 首先求出 AB、AC、AD、AE、BC、BD、BE、CD、CE、DE 等两两之间的遗传相似系数, 然后按相似系数的大小依次合并, 最后根据合并后的数据在相似系数的标尺上绘制聚类图(图 5)。亲缘关系越近的种在聚类图上越靠近 1, 反之则靠近 0。

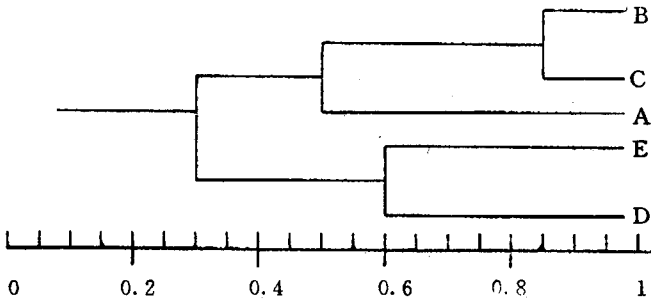


图 5 聚类分析图

Fig. 5 Group analysis clustering

致谢 本文的英文稿承法国 AGETROP, CIRAD-CA 的 Dr. J. C. Glaszmann 和 Dr. J. L. Noyer 等审阅修改。

参考文献

- [1] J. C. Glaszmann, B. G. de los Reyes, and G. S. Khush, Electrophoretic variation of isozymes in plumules of rice (*Oryza sativa* L.) — a key to the identification of 76 alleles at 24 loci. IRRIRI SEARCH PAPER SERIES 1988:134
- [2] 张维 等. 同工酶与植物遗传育种. 北京: 北京农业大学出版社 1993
- [3] Leslie, James F. and Hugh Dingle, 1983. Genetic distances in Milkweed bugs (Hemiptera: Lygaeidae). Isozyme Bulletin: 16
- [4] J. C. Glaszmann, Isozymes and classification of Asian rice varieties. Theor. Appl. Genet. 1987; 4: 21—

二、稻谷同工酶淀粉凝胶电泳染色液的配制表

[illegible]