

大豆超氧化物歧化酶同工酶的剖析*

罗广华 王爱国

(中国科学院华南植物研究所, 广州 510650)

摘 要

大豆超氧化物歧化酶(Superoxide Dismutase 简称SOD)的同工酶带有7条, 迁移率(Rf)分别为: 0.25、0.42、0.46、0.50、0.57、0.62、0.67。迁移率最低的一条是对氯仿-乙醇敏感的Mn-SOD; 其余6条是对氯仿-乙醇不敏感, 而对KCN敏感的Cu·Zn-SOD。大豆各组织(须根、根瘤、茎、花、叶、籽、荚壳、愈伤组织等)的SOD同工酶谱带数目基本上一致, 但是, 不同组织的酶带活性强弱有差异。大豆细胞中各细胞器的SOD同工酶分布不同, 线粒体中主要为低迁移率的Mn-SOD; 叶绿体中主要为高迁移率的3条Cu-Zn-SOD; 中等迁移率的3条Cu·Zn-SOD主要分布在细胞溶质。不同节位叶片的SOD同工酶谱基本相同, 但是, 幼叶和老叶的SOD总活性较低, 成熟叶片的酶活性较高。

酶是基因编码的产物, 酶的遗传和表达遵循着孟德尔定律。同工酶既携带着遗传信息, 又可以通过特有的生化活性, 方便地检出, 因此, 同工酶作为基因的标志, 反映机体的某些遗传信息是很适合的^[1]。SOD是专一性很强和比较保守的一种酶。近年, 不少学者打破传统的生物学科界限, 争先将SOD同工酶的研究引进自己的学科, 生理学家研究衰老和各种逆境下SOD同工酶的变化, 窥伺植物生命活动的规律^[2]; 分类学家进行种间SOD同工酶的比较或类聚分析, 企图解决他们在系统学和进化研究中的疑难问题^[3]; 遗传学家研究SOD同工酶探测物种中隐藏的变异性^[4]。目前, SOD同工酶分析法已成为多学科进入分子水平的研究手段。本文着重研究大豆SOD同工酶谱, 酶的类型, 组织分布, 细胞定位以及发育中叶片的SOD活性变化, 以作为上述研究的重要依据。

材料与方法

大豆(瑞豆选, *Glycine max*)田间种植, 常规管理, 50天后采集各种组织和不同节位的叶片。(黄化)幼苗用蛭石, 实验室遮光培养, 5天后采收。愈伤组织用B₅培养基培养。按前法制备提取液, 测SOD活性^[5]及显示SOD同工酶^[6]。叶绿素含量按Aronon的方法。

* 本文于1994年11月1日收到。

This paper was received on Nov. 9, 1994.

试验结果

一、大豆 SOD 同工酶的类型

大豆幼苗粗提取液置于聚丙烯酰胺凝胶的同一跑线上,经电泳,SOD 活性染色,显示出 7 条异质性的 SOD 同工酶带,迁移率分别为:0.25(此条为 a 组)、0.42,0.46,0.50(此 3 条为 b 组)、0.57,0.62,0.67(此 3 条定为 c 组)(图 1.1)。

根据高等植物的 SOD 主要有 $\text{Cu} \cdot \text{Zn-SOD}$ 和 Mn-SOD ,前者对 KCN 敏感,后者对氯仿-乙醇敏感^[7]。在大豆粗提取液中加入 0.15V 或 0.29V 的氯仿-乙醇(3:5v/v),30℃温育 0.5h,然后电泳,显示 SOD 同工酶,结果迁移率慢的一条(a)部份或全部消失,其余 6 条 SOD 同工酶(b, c),基本不受影响(图 1. 2. 3);如果以 1mmol/L 或 3mmol/L KCN 温育粗提取液,则慢迁移率的一条(a)基本上不受影响,其余 6 条(b, c)部分或全部消失(图 1. 4. 5)。表明:大豆 SOD 同工酶有 7 条,慢迁移率的一条(a)为 Mn-SOD ,其余 6 条(b, c)为 $\text{Cu} \cdot \text{Zn-SOD}$ 。

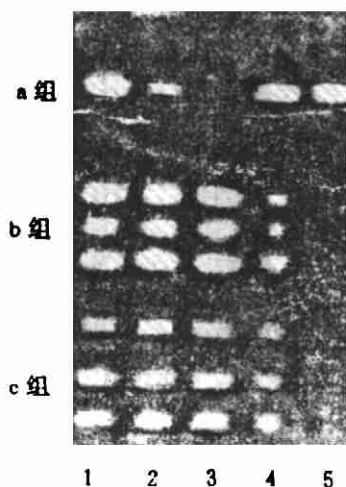


图 1 大豆 SOD 同工酶的类型

Fig 1 Type of SOD isoenzyme in soybean plant

1. Crude extract of soybean seedling
2. Same as above 1, but added 0.15V chloroform-ethanol incubating for 0.5h
3. Same as above 1, but added 0.29V chloroform-ethanol incubating for 0.5h
4. Same as above 1, but added 1 mmol/L KCN incubating for 0.5h
5. Same as above 1, but added 4 mmol/L KCN incubating for 0.5h

二、大豆组织的 SOD 同工酶

新鲜采集大豆各种组织,显示 SOD 同工酶(图 2),结果各组织 SOD 同工酶谱的迁移率和谱带数目与幼苗的基本上一致,不同的是各谱带活性强弱的差异。a 组酶,在黄化幼苗中活性最强;根中较弱。c 组酶,在发育完全的叶片中最强,根、茎、花、籽、荚壳以及愈伤

组织中较弱,而b组酶在各组织中普遍地活性都较强。植物各组织都有自己特异的体征和代谢特点,但它们都是由单细胞受精卵产生,分化形成,SOD是由单细胞阶段的一个前体酶谱产生,只要基因不变,作为基因的表现型一同工酶谱是不变的,各酶谱强弱之间的差异,是在一系列复杂的发育和分化中因组织功能不同而产生的^[10]。

三、大豆 SOD 同工酶的细胞分布

制备大豆粗提取液^[6],粗叶绿体,叶绿体^[8]。粗线粒体,纯化线粒体^[9]以及细胞溶质等,电泳,显示 SOD 同工酶(图 3),表明:迁移率最快的 3 条(c),主要分布在叶绿体(图 3. 1. 2);迁移率最慢的一条(a)主要分布在线粒体(图 3. 3. 4);中等迁移率的 3 条(b),主要分布在细胞溶质(图 3. 5)。对照图 1 可知:在线粒体的 SOD 主要为 Mn-SOD,叶绿体和细胞溶质中的 SOD 主要为 Cu·Zn-SOD。细胞中基因的表达是存在着空间的分隔,酶可以因为细胞器负担代谢功能的需要,受到某种机理的调控,在其活化型和纯化型之间相互转换^[10]。

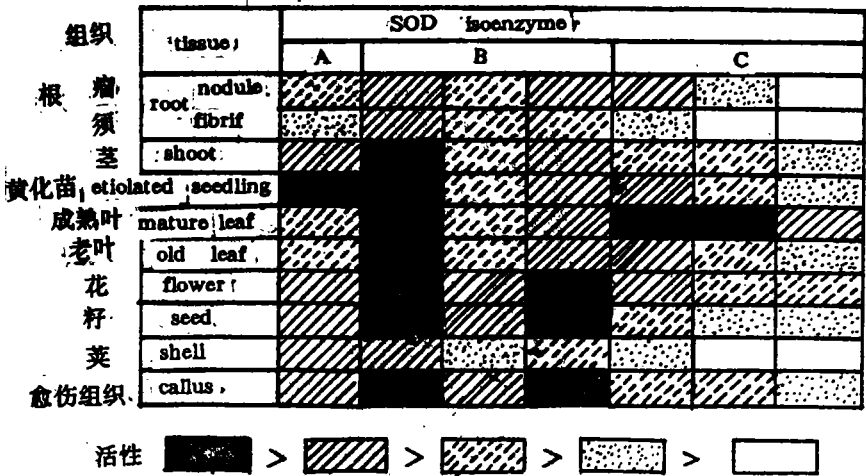


图 2 SOD 同工酶在大豆组织中的分布
Fig. 2 Distribution of SOD isoenzyme in soybean tissues

四、发育中叶片的 SOD 同工酶

摘取大豆主茎上叶片,按节位从上至下编号:1-12。制取叶片匀浆后电泳,显示 SOD 同工酶。无论叶片的老嫩,一致地显示为 7 条酶带,不同的是中部以及中部附近的叶片的 SOD 总活性稍高,上部未充分展开的幼叶和下端略带黄绿色的老叶 SOD 总活性稍低(表 1),与叶片中叶绿素含量的规律基本上一致,但是,老叶中叶绿素含量下降的速度比 SOD 总活性的下降速度要快得多。同工酶活性是生化能力的指标,老叶中酶活性降低与酶的老化和降解有关,嫩叶中 SOD 活性稍低可能与叶绿体的发育及光合作用的功能未健全有关。

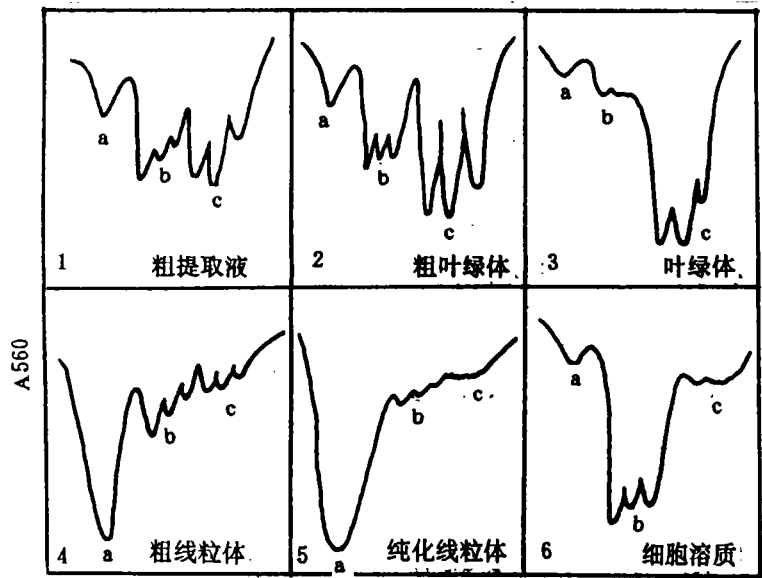


图 3 大豆的叶绿体、线粒体以及细胞溶质的 SOD 同工酶

Fig. 3 SOD isoenzyme of chloroplast, mitochondrion and cytosol in soybean

表 1 不同节位叶片 SOD 活性和叶绿素含量的变化

Table 1 The change in SOD activity and chlorophyll content in the leaves at different position on shoot

| Leaves | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | 6 | 7 | 8 | 9 | 10 | 11 | 12 |
|-----------------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| SOD activity(v/g. FW) | 531 | 512 | 575 | 556 | 589 | 613 | 594 | 605 | 597 | 583 | 502 | 495 |
| Chlorophyll(mg/g. FW) | 1.2 | 1.4 | 1.5 | 1.4 | 1.4 | 1.3 | 1.3 | 1.3 | 1.3 | 0.8 | 0.6 | 0.2 |

讨 论

大豆 SOD 同工酶取材和样品制备简单易行(大豆中 SOD 的干扰成份少,操作时用粗制的组织匀浆液即可,无须提纯,材料用量少,仅 0.1g 或<0.1g 即可)。结果一目了然,是比较容易观察的遗传标记,并且还可以将 SOD 同工酶的异同输入电脑,进行类聚分析,使遗传上的同与不同有了量的指标以及类群间的亲缘关系量化,这是形态解剖学,组织细胞学所不能的。大豆 SOD 同工酶分析法是一种新的大豆生化遗传学的研究,将为研究大豆的基因突变,种质的起源和演变,远缘杂交,筛选、鉴定等提供一种新的分子水平的证据。

参考文献

[1] 王中仁,1994,《生物多样性》,(2)91—95
[2] Lee, E. H. and J. H. Bennett, 1994, Plant Physiol, (69)1444—1449

- [3] 徐豹等,1990,《植物学报》,(7)540—543
- [4] Griffin, J. D. and R. G. Palmer, 1989, Crop Science, (29)968—971
- [5] 王爱国等,1983,《植物生理学报》,(9)77—84
- [6] 罗广华等,1983,《植物生理学通讯》,(6)44—45
- [7] Beauchamp, C. O. and I. Fridovich, 1973, Biochim. Biophys. Acta. (317)50—64
- [8] 上海植物生理学会,1985,《植物生理学实验手册》,上海科学技术出版社,10—13
- [9] 罗广华等,1985,《植物生理学报》,(2)163—170
- [10] C. C. Rider and C. B. Taylor, 范培昌译,1987,《同工酶》,北京,科学出版社,16—28

ANALYSIS ON SUPEROXIDE DISMUTASE ISOENZYME IN SOYBEAN PLANT

Luo Guanghua Wang Aiguo

(South China Institute of Botany, Academia Sinica, Guangzhou 510650)

Analysis on the results of gel electrophoresis indicated that there were 7 bands of SOD isoenzyme in soybean plant. The relative electrophoretic mobility of these SOD isoenzymes were 0.25, 0.42, 0.46, 0.50, 0.57, 0.62 and 0.67 respectively. One of them with lowest mobility was Mn—SOD inhibited by chloroform—ethanal, the rest were Cu • Zn—SOD, which were not inhibited by chloroform—ethanol, but were sensitive to potassium cyanide.

The number of SOD isoenzyme bands in various tissues of soybean plant, including root fibril, root nodule, shoot, flower, leaf, seed, shell and callus etc. was same, but with different activity in different tissues. Different distribution of SOD isoenzyme existed in various organelles, for example, one band of Mn—SOD with lowest mobility in mitochondria, 3 bands of Cu • Zn—SOD with high mobility in chloroplast, and other 3 bands of Cu • Zn—SOD with moderate mobility in cytron. SOD isoenzyme in different leaves on the shoot had similar bands, however, with lower activity in the old and young leaves and higher activity in mature leaves.

Key words Soybean; SOD; Isoenzyme