

甜菜组织培养过程中同工酶及可溶性蛋白质的变化

段肖霞^{1,3}, 郝秀英^{2,3*}, 刘传军⁴, 曹玉锦⁴, 欧阳立恒^{2,3},王晓军⁴, 赵民安⁴, 王燕飞⁵, 石玉瑚^{1,3}

(1.新疆农业大学,新疆 乌鲁木齐 830052;2.南京工业大学,江苏 南京 210009;

3.新疆农业科学院微生物应用研究所,新疆 乌鲁木齐 830091;

4.中国科学院新疆理化技术研究所,新疆 乌鲁木齐 830011;

5.新疆农业科学院经济作物研究所,新疆 乌鲁木齐 830091)

摘 要:应用聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)垂直平板电泳对甜菜组织培养直接多芽发生和遗传转化过程中的过氧化物酶(POD)和酯酶(EST)同工酶动态及蛋白质含量的变化进行了研究。结果表明:甜菜在加入6-苄氨基嘌呤(6-BA)诱导直接多芽发生的过程中,POD、EST同工酶和可溶性蛋白出现了酶带条数和颜色深浅的变化,其变化可能与控制多芽发生的代谢活动有关;甜菜遗传转化后出现了明显的酶带颜色加深和新酶带的增加,这是由于外源基因的导入而使甜菜具有的标志,还是转基因的直接作用效果还有待于做进一步的研究。

关键词:甜菜遗传转化;过氧化物酶;酯酶;可溶性蛋白;聚丙烯酰胺凝胶电泳;

中图分类号:S566.3

文献标识码:A

文章编号:1002-0551(2007)04-0009-05

甜菜(sugar beet)是重要的糖料作物,提供世界食用糖量的约30%,在农业生产中占有重要地位。目前,甜菜又发展成为了可再生能源作物以及营养价值丰富的饲料作物,有着光明的前景。

同工酶(isoenzyme)是指催化特性相同而分子结构不同的酶蛋白,它反映了生物在蛋白质水平上的多样性^[1-3]。植物体内各种酶的同工酶谱随着细胞分化、组织器官及植株的生长、成熟而发生规律性的变化,这种变化在一定程度上反映了植物在发育过程中基因表达的时空顺序性,因而同工酶的酶谱特征可以作为植物生长发育和遗传转化的一种生化指标^[4,6]。过氧化物酶(POD)是植物不同生长阶段和细胞分化的代谢水平的参数,并在一些植物遗传转化后表现出高的活性;酯酶(EST)可作为胚性发生能力和胚发育的标记,还可作为种子鉴定的标准,与植物遗传转化密切相关^[7-10]。

本试验是建立在以甜菜子叶节、茎节为外植体诱导直接多芽发生再生植株技术的基础上,利用农

杆菌介导法对甜菜进行外源基因转化,选择过氧化物酶和酯酶两个特征性较强的同工酶,采用聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳对甜菜不同处理、不同组织的过氧化物酶和酯酶酶谱以及蛋白质含量进行分析,旨在探讨所选材料的过氧化物酶和酯酶同工酶与植物组织培养器官发生和遗传转化的关系。

1 材料和方法

1.1 供试材料

供试的甜菜材料为51134,由新疆农业科学院经济作物研究所甜菜育种课题组提供。

实验所用的基本培养基为Murashige & Skoog (MS)。

1.2 外植体制备、直接多芽诱导和遗传转化^[11,12]

1.2.1 无菌苗 将甜菜种球敲出种仁,在无菌条件下,先用70%乙醇消毒30sec,再用0.1%(w/v)升汞(HgCl₂)水溶液浸泡8~10min,最后用15%过氧化氢(H₂O₂)水溶液浸泡20min,灭菌水漂洗3~5次,然后接种于1/2MS培养基上待其长出无菌苗(见图1A)。

1.2.2 子叶节和茎节外植体 将生长7~10d的无菌苗,切下并弃去胚根和靠近胚根处的下胚轴部分,剩下的含子叶、子叶节和0.5~1.0cm下胚轴的

收稿日期:2007-05-21

基金项目:国家自然科学基金项目(30560080)

作者简介:段肖霞(1980-),女,河南籍,硕士研究生,主要从事甜菜转基因研究。

* 通讯作者:郝秀英(1964-),女,副研究员,河北籍,主要从事棉花和甜菜转基因研究。

无菌苗上部(见图 1B)。

将无菌苗上部转接于培养基(6-BA 0.2 ~ 1.2mg/L + NAA 0.2 ~ 1mg/L)上培养 7 ~ 10d,待第一对真叶长出后(见图 1C),在子叶节上部 0.5cm 处齐刀切去,留下部分即为子叶节外植体(见图 1D),备用。

无菌苗上部转接于培养基(6-BA 0.2 ~ 1.2mg/L + NAA 0.2 ~ 1mg/L)上培养 20 ~ 25d,待长出多对真叶后(见图 1F),在子叶节上部 0.5cm 处齐刀切去,留下部分即为茎节外植体(见图 1G),备用。

1.2.3 外植体直接多芽诱导 子叶节、茎节继续接种于培养基(6-BA 0.2 ~ 1.2mg/L + NAA 0.2 ~ 1mg/L)上,培养 20 ~ 30d,在子叶节、茎节外植体上

直接形成了多个芽(见图 1E、I),再切成单芽(见图 1J),此时的叶片和叶柄将作为激素处理后 POD 和 EST 同工酶及蛋白质含量变化的试验材料。

1.2.4 遗传转化 将甜菜坏死黄脉病毒外壳蛋白(BNYVV CP)基因和黑色焦枯病毒外壳蛋白(BB-SV CP)基因构建植物表达载体后,转入农杆菌菌株 EHI01 或 EH 105 中,用活化的、适当浓度的此农杆菌菌液浸染茎节外植体,共培养 2 ~ 3d(见图 1H),置于加卡那霉素(Kan)和羧苄青霉素(Cb)的筛选培养基(6-BA 0.2 ~ 1.2mg/L + NAA 0.2 ~ 1mg/L + Kan 100 ~ 200mg/L + Cb 500 ~ 1 000mg/L)上,20 ~ 30d 后可诱导出多芽(同图 1E、I),此时叶片和叶柄将作为遗传转化后 POD 和 EST 同工酶及蛋白质含量变化的试验材料。

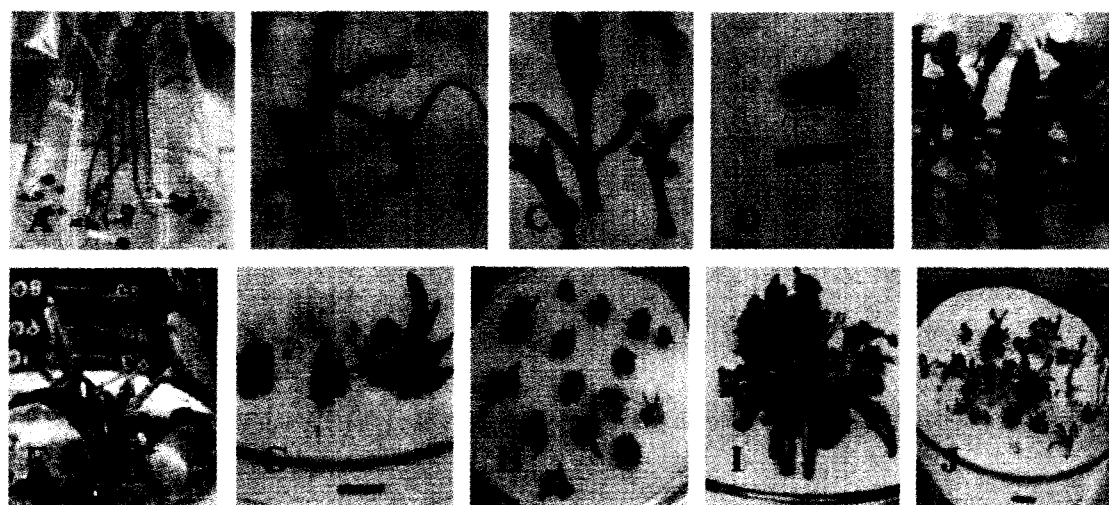


图1 从甜菜无菌苗制备子叶节和茎节外植体到诱导多芽发生的过程

A: 7 ~ 10d 无菌苗; B: 切去无菌苗胚根和靠近胚根的下胚轴后剩下的上部; C: 上部转接培养 7 ~ 10d 后长出第一对真叶; D: 子叶节外植体; E: 子叶节外植体直接诱导出芽; F: 切去无菌苗胚根和靠近胚根的下胚轴后剩下的上部转接培养 20 ~ 25d 后长出多对真叶; G: 茎节外植体; H: 茎节外植体与农杆菌共培养; I: 茎节外植体直接诱导出芽; J: 一个茎节外植体上切出的单芽。

1.3 过氧化物酶和酯酶同工酶的提取与电泳

1.3.1 同工酶提取 取新鲜的甜菜叶,用蒸馏水清洗干净并用滤纸吸干水分,分别称取 1g 叶片放入预冷的研钵中,加入 0.1mol/L 的磷酸缓冲液(pH 7.8) 5ml,置于冰浴中研磨成匀浆,再置于 4℃ 冰箱中抽提 2h,取其上层液体于 4℃ 下在离心机上 10 000rpm 离心 10min,上清液即为酶的粗提液,立即放入 -20℃ 冰箱中冷冻备用。

1.3.2 同工酶聚丙烯酰胺凝胶电泳 采用浓缩胶浓度为 5%,分离胶浓度为 7.5% 的聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)进行垂直平板电泳,电泳缓冲液采用高

离子强度的 Tris-甘氨酸(pH 8.3)溶液^[14],每孔加样 20μl,开始电压 120V,当样品进入分离胶时,调节电压恒定在 220V,电泳至溴酚蓝移动到离底部 1cm 处停止。

1.3.3 同工酶凝胶染色 电泳结束后,剥取胶板。

过氧化物酶采用改良的联苯胺法^[15]进行染色,染色 10min 左右,凝胶出现清晰的蓝色条带,倒掉染色液,用蒸馏水冲洗 1 ~ 2 次,马上记录结果,照相。

酯酶采用 α-醋酸萘酯、β-醋酸萘酯和坚牢蓝 RR 染色法^[15]进行染色,室温下显色约 20min,

可看到酯酶同工酶谱带,蒸馏水洗胶板 1~2 次,记录结果,照相。

1.4 可溶蛋白 SDS-PAGE 电泳

1.4.1 样品提取 称取 0.5g 样品,放入研钵,置于冰上研磨。加入 50mmol/L Tris - Cl (pH 9.5, 4℃) 3mL, 研磨成匀浆, 静置 30min, 转移至离心管中, 于 4℃ 下在离心机上 12 000rpm 离心 20min, 取上清液加入粒状活性炭吸附色素, 并将上清液浓缩至 1ml。取上清液按 4:1 的比例加入 5× SDS-PAGE 上样缓冲液, 置沸水中煮 3~5min, 用于 SDS-PAGE 电泳分析。

1.4.2 电泳 参照文献^[16]进行。上样量 20μl, 初始电压 100V, 待溴酚蓝指示剂到达分离胶位置时, 加大电压至 170V。当溴酚蓝指示剂迁移到距凝胶前沿 1cm 时, 停止电泳, 取出凝胶。用考马斯亮兰 R250 进行染色, 多次脱色至蛋白带清晰, 然后拍照, 凝胶可保存于双蒸水中或 7% 乙酸溶液中。

2 结果与分析

2.1 POD 同工酶酶谱的变化

从图 2 可见, 第 1 条带、第 2 条带、第 3 条带、第 7 条带和第 12 条带分别是正常生长的叶片和叶柄、添加外源激素直接诱导产生的叶片和叶柄、遗传转化后的叶片和叶柄所共有的酶带, 表明过氧化物酶同工酶在甜菜作物中有五条酶带稳定性极高。尤其是甜菜遗传转化后, 无论是叶片还是叶柄的过氧化物酶同工酶酶带颜色均普遍加深, 显示酶活性大大增强, 还出现了第 9, 第 10 两条特征性酶带。与此同时, 随着外源激素的加入, 明显有酶带的增减和不同程度的深浅变化, 加入激素后第 8 条带完全消失; 并且叶片减少了第 6 条带, 出现了第 11 条带, 以及叶柄减少了第 4 条带、第 6 两条带, 出现了第 5 条带。上述结果表明, 在甜菜组织培养和遗传转化的过程中, 过氧化物酶活性呈上升趋势, 这与 Tang Wei^[17]的结果一致。

2.2 EST 同工酶酶谱的变化

由图 3 可见, 第 1 条带、第 2 条带和第 6 条带分别为正常生长的叶片和叶柄、遗传转化后的叶片和叶柄所共有的酶带, 其中第 2 条带清晰、颜色较深, 为主酶带, 第 1、第 6 两条带颜色较浅, 为次酶带。第 5 条带为遗传转化后的叶片和叶柄所产生的特有酶带。EST 同工酶的变化或者是新谱带的增加, 或者是原有谱带颜色的加深, 说明 mRNA 的

翻译有所增加, 进而导致了植物内在生理代谢的活跃。甜菜随着外源激素和遗传转化的作用, 形成遗传转化的多芽, 这一过程中酯酶同工酶的条带增加, 表明了细胞内在代谢体系活跃。

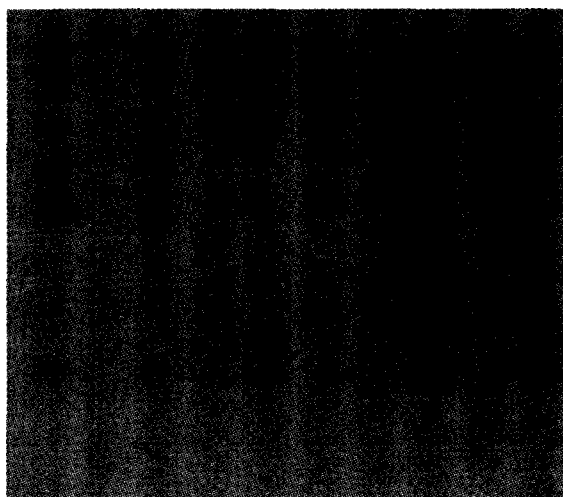


图 2 不同处理、不同组织甜菜过氧化物酶同工酶酶谱

A: 叶片; B: 叶柄; C: 加 6-BA 后的叶片;

D: 加 6-BA 后的叶柄; E: 转化后的叶片; F: 转化后的叶柄

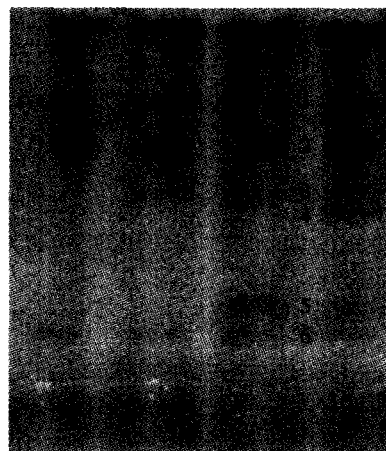


图 3 不同处理、不同组织甜菜酯酶同工酶酶谱

A: 叶片; B: 叶柄; C: 转化后的叶片; D: 转化后的叶柄

2.3 可溶性蛋白的变化

从图 4 可看, 甜菜正常生长的叶片、添加外源激素直接诱导产生多芽的叶片和叶柄、遗传转化后的叶片和叶柄的可溶性蛋白经 SDS-PAGE 得到了较好的分离效果。在这三种处理中, 第 2、3 条带为共有带, 第 1、4 条带为特有带。正常生长芽叶片的条带颜色较浅, 表明这一时期蛋白含量较少; 加激素处理和遗传转化后蛋白条带数量增多、变宽的同时颜色也加深, 显示蛋白含量增加, 并且叶片的可溶蛋白含量均高于叶柄。实验结果表明, 甜菜遗传转化后的可溶性蛋白 SDS-PAGE 有新带增加, 与

正常生长的相比差异明显。

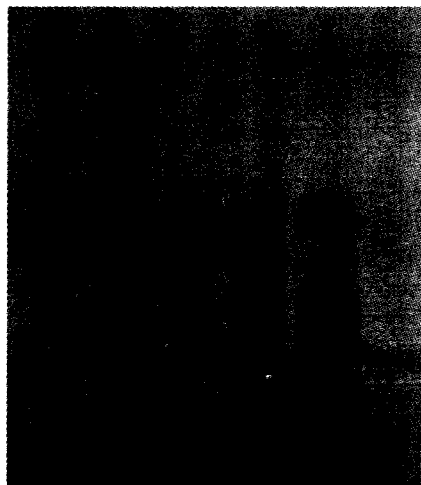


图4 甜菜可溶蛋白的带谱

A:叶;B:加6-BA后的叶片;C:加6-BA后的叶柄;
D:转化后的叶;E:转化后的叶柄

3 讨论

植物细胞分裂素6-BA是许多植物用来直接诱导多芽发生及再生植株的激素^[19-22]。由实验分析可知,甜菜在加入6-BA诱导多芽发生的过程中,POD、EST同工酶和可溶性蛋白出现了酶带条数和颜色深浅的变化,还有一定的器官特异性,其变化可能与控制多芽发生的代谢活动增强有关。

由于POD、EST同工酶在植物体内普遍存在,通过对植物POD、EST同工酶的研究,可以探讨同工酶谱变化与植物生长发育的关系,为生长发育的调控提供参考。

同工酶的差异主要是基因表达的差异造成的,同一个体不同组织及处理后同工酶谱发生变化,能反映植物生长发育的特点,体内代谢状况及对外界环境变化的反应。对同工酶的分析可以鉴别许多外部形态上难以区分的遗传变异,实验表明:甜菜遗传转化后的POD、EST同工酶和可溶性蛋白发生变化,最明显的是酶带颜色加深和新酶带的增加,这是由于外源基因的导入而使甜菜具有的标志,还是转基因的直接作用效果还有待于做进一步的研究。

参考文献:

- [1]赖德 CC,泰勒 C B.同工酶[M].范培昌译.北京:科学技术出版社,1987.
- [2]雷泞非,苏智先,陈劲松.同工酶技术在植物研究中的应用[J].四川师范学院学报(自然科学版),2000,21(4):321-324.
- [3]程家胜.同工酶分析在果树种质资源分类遗传研究中的应用[J].中国果树,1986,(3):19-22.
- [4]Tacchini P, Fink A, Xue G. Xing, Gaspar T. Analysis of proteins of a fullyhabituated nonorganogenic sugarbeet callus and a hormone - dependent one byhigh - performance 2 - D gel electrophoresis[J]. Plant Physiol. Biochem., 1995, 33:361-366.
- [5]Sandra Aparecida de Oliveira Collet, Marcos Andre' Collet, Maria de Fa' timaP . S. Machado. Differential gene expression for isozymes in somatic mutants of *Vitisvinifera* L. (Vitaceae)[J]. Biochemical Systematics and Ecology, 2005, 33:691-703.
- [6]Rasol Marijana Krsnik, Cipic Hana, Hagege Daniel. Isoesterases related to cell differentiation in plant tissue culture[J]. Chemico - Biological Interactions, 1999, 119~120:587~592.
- [7]Balén Biljana, Krsnik - Rasoll Marijana, Simeon - Rudolf Vera. Isoenzymes of peroxidase and esterase related to morphogenesis im Mammillaria gracillis pfeiff. tissue culture[J]. J. Plant Physiol., 2003, 160:1401~1406.
- [8]樊守金,赵遵田.中国苋属植物酯酶同工酶研究[J].植物研究, 1999, 19(2):148~152.
- [9]Chibbar R N, Schyluk J, Georges F, Mallard C S, Constabel F. Esterase isozymes as markers of somatic embryogenesis in cultured carrot cells [J]. J. Plant physiol., 1988, 133:367~370.
- [10]Tchorbadjieva M, Odjakova M K. An acidic esterase as a biochemical marker for somatic embryogenesis in orchardgrass (*Dactylis glomerata* L.) suspension cultures[J]. Plant Cell Reports, 2001, 20:28~33.
- [11]Griffith S M, Banowetz G M. Differentiation of *Lolium perrene* L. and *L. multiflorum* Lam. seeds by two esterase isoforms[J]. Seed Sci. Technol., 1992, 20:343~348.
- [12]郝秀英,于嘉林,王燕飞,等.新疆主栽甜菜品种(系)的基因转化和再生体系的建立[J].中国甜菜,2002,(4):5~7.
- [13]郝秀英,周勃,王燕飞,等.甜菜组织培养直接器官发生和植株再生[J].中国甜菜糖业,2006,(1):19~21.
- [14]胡能书,万贤国编.同工酶技术及其应用[M].长沙:湖南科学技术出版社,1985,3~105.
- [15]汪家政.范明.蛋白质技术手册[M].北京:科学出版社,2000, 77.
- [16]何忠效,张树政主编.电泳(第二版)[M].北京:科学出版社, 1999.
- [17]Tang Wei, Newton Ronald J. Peroxidase and catalase activities are involved in direct adventitious shoot formation induced by thidiazuron in eastern white pine (*Pinus strobus* L.) zygotic embryos[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2005, 43:760~769.
- [18]周光宇.有关同工酶分析的几个问题[J].植物生理学通讯, 1983,(1):1~4.
- [19]McClean, P., Grafton, K. F. Regeneration of dry bean (*phaseolus vulgaris* L.) via organogenesis[J]. Plant Sci., 1989, 60, 117~122.
- [20]Franklin, C I, Trieu, T N, Gonzales, R A, Dixon, R A. Plant regeneration from seedling explants of green bean (*phaseolus vulgaris* L.) via organogenesis[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1991, 24, 199~206.
- [21]Malik K A, Saxena P K. Regeneration in phaseolus vulgaris L. Promotive role of N⁶ - benzylaminopurine in cultures from juvenile leaves [J]. Planta, 1991, 184, 148~150.
- [22]Sudarshana M S, Shanthamma C. In vitro regeneration from excised leaves of *Flaveria trinervia* (Sprengel) C. Mohr [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 1991, 27:297~302.

Isozymes and change of soluble protein content in the process of direct organogenesis

Duan Xiao-xia^{1,3}, HAO Xiu-ying^{2,3*}, LIU Chuan-jun⁴, Cao Yu-jin⁴, Ouyang-liheng^{2,3}

WANG Xiao-jun⁴, ZHAO Min-an⁴, WANG Yan-fei⁵, SHI Yu-hu^{1,3}

- (1. Xinjiang agriculture university, urumuqi 830052 China; 2. Nanjing university of technology, Nanjing 210009 China; 3. Xinjiang academy of agriculture sciences, institute of microbiology, urumuqi 830091 China; 4. Chinese academy of sciences, Xinjiang technology institute of physics and chemistry, urumuqi 830011 China; 5. Xinjiang academy of agriculture sciences, institute of economical crops, urumuqi 830091 China)

Abstract: The paper dealt with the study on the peroxidase and esterase isozymes as well as change of soluble protein content in the process of direct shoots organogenesis and genetic transformation of sugarbeet in vitro by polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE). The results showed that peroxidase (POD), isoesterase (EST) isoenzyme and soluble protein content appeared the changes of enzyme zymogram number and colour shade by adding benzylaminopurine (6-BA) to the medium, which related with increase of metabolizing activity. And after genetic transformation, bands of the peroxidase and esterase isozymes and soluble protein came forth obviously colour darken and number increase, which do further research to identify the reasons that resistance to stress was enhanced or natural transgene.

Key words: sugarbeet genetic transformation; peroxidase; esterase; soluble protein; PAGE

(上接4页)

膨大生长,最终形成较高的块根产量;糖分积累期,随着施钾量的增加直接运往根部的¹⁴C同化产物增加,为糖分的积累提供物质和能量。

参考文献:

- [1] R. D 芝森主编. 农业中的钾, [M]. 北京: 科学出版社, 1995.
[2] 轻工业部甜菜糖业研究所. 甜菜对 N、P、K 的吸收和需要 [J]. 甜菜糖业—甜菜分册, 1979, (3): 10-23.
[3] 曲文章, 高妙真, 白祥和. 施肥量对甜菜产量和生理指标的影响 [J]. 中国甜菜, 1993, (2): 25-29.

- [4] 曲文章, 崔杰, 李滨胜, 施氮量与甜菜产量的形成 [J]. 中国甜菜, 1992, (4): 29-34.
[5] 林克惠. 不同施钾量对冬小麦几个光合特性和产量的影响 [J]. 云南农业大学学报, 1994, 9(3): 129-136.
[6] 饶立华. 钾营养对番茄光合作用和产量形成的效应 [J]. 浙江农业大学学报, 1989, 15(4): 341-348.
[7] 李秧秧. 施钾与玉米的光合作用 [J]. 植物营养与肥料学报, 1995, 1(2): 95.
[8] 蒋德安. 钾对水稻产量形成的一些生理效应 [J]. 浙江农业大学学报, 1987, 13(4): 411-444.
[9] 卜玉山. 钾对甜菜产量与质量的影响 [J]. 山西农业大学学报, 1993, 13(2): 122-123.

Affection of potassium to sugarbeet photosynthesis

QU Yang¹, DING Wei², QU Weng-zhang²

- (1. Heilongjiang provincial tourism technical college, Heilongjiang Harbin 150086, China; 2. Northeast agricultural university, Heilongjiang Harbin 150030, China)

Abstract: This paper showed that potassium can increase LAI (Leaf area index) of sugarbeet, there is a positive correlation between potassium amount and LAI, $r = 0.9729^{**}$. Potassium can increase chlorophyll content, as also improve photosynthetic efficiency. There is a positive correlation between potassium amount and photosynthetic efficiency of simple leaf, as well as photosynthetic efficiency of leaves correlation coefficient showed $r = 0.982^{**}$ and $r = 0.9077^{**}$ respectively. Potassium can promote transposition of assimilation products, increasing potassium amount can increase translocation rate of assimilation products, and that is a positive correlation between potassium amount and translocation rate of assimilation products, $r = 0.9068^{**}$.

Key words: sugarbeet; LAI; chlorophyll; photosynthetic efficiency; assimilation products.