

段中存在-S-S-键。我们用电镜细胞化学方法证明了胶原纤维中含有-SH基。

关于S-M法的特异性问题,是值得探讨的。在这一细胞化学反应中,究竟是-S-S-键起作用,还是-SH基起作用,或是二者都参与了反应,尚存在一些争议^[1-4,7-9]。我们认为,S-M染色中起作用的是-SH基。因为,S-M染液是一种含Ag⁺的碱性溶液,在避光和加温等条件下,具有还原性的-SH基把Ag⁺还原成金属银。切片上有银颗粒沉淀的部位,即是细胞内-SH基存在的部位,而-S-S-键没有这种还原性。但是,由于半胱氨酸中的-SH基很不稳定,极易氧化成胱氨酸中的-S-S-键;而-S-S-键在一定条件下,又会还原成-SH基,所以不能把二者严格分开。

本实验中,用1%醋酸配的2%丙酮抑制-CHO基之后,经S-M染色,在胶原纤维上仍呈现黑色银沉淀颗粒,说明该沉淀颗粒不是由-CHO基的还原作用形成的。先用20%*n*-丙醇配的0.3M苯甲醇还原-S-S-键,再用1.86%碘乙酸盐溶液烷化-SH基,把-SH基掩盖起来,尽可能使所有的-SH基不能参与还原Ag⁺的反

应,再经S-M染色,上述四种材料中的胶原纤维上的黑色银沉淀颗粒显著减少了。切片只用铀染色,胶原纤维上无黑色沉淀颗粒,也进一步证明实验组显示的阳性反应是S-M染色的作用,而不是材料中固有的,包埋过程中带入的,或铅污染造成的。用10%硫代硫酸钠处理切片是为了洗去浮在切片表面的螯合银。

参 考 文 献

- [1] P. R. Lewis., D. P. Knight., (1977) *Staining Methods for Sectioned Material.*, 93-96.
- [2] J. A. Swift., (1966) *Proc. 6th Int. Cong. Electron Microscope.*, 2:63-64.
- [3] J. A. Swift., (1968) *Jl. R. Microsc. Soc.*, 88:449-460.
- [4] J. A. Swift., (1969) *Histochemie.*, 19:88-98.
- [5] E. H. Epstein., (1974) *J. Biol. Chem.*, 249: 3225-3231.
- [6] P. H. Byers et al., (1975) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*, 72:3009-3013.
- [7] peter Böck., (1978) *Anatomy and Embryology.*, 153:157-166.
- [8] J. A. Swift., (1973) *Histochemistry.*, 35: 307-310.
- [9] H. Jessen., (1973) *Histochemie.*, 33:15-29.

圆盘电泳分析几种植物同工酶的重演性与清晰度

彭永康 阎炳宗

(天津师范大学生物系)

近几年来,国内外不少研究者以同工酶为“生化指标”来探讨高等植物中的许多理论和生产实践问题并取得了可喜的进展。许多工作表明^[1],把同工酶作为一项“生化指标”是正确的和合适的。关于同工酶的分析方法虽已有论述^[2],但目前还存在一定的技术问题,如凝胶上同工酶谱型的重演性问题,即同一样品,在同一实验方法下,不同人操作结果是否相同;每次分析间隔一定时期(如间隔一周)和数次分析结果是否相同;在分析条件基本一致的情况下,一次分析中数个重复间是否一致和凝胶上

酶带的清晰度,因为同工酶谱是否清楚往往给实验结果分析造成一定困难,有时甚至可能掩盖真相。几年来,我们对水稻、高粱和玉米的过氧化物酶、酯酶和淀粉酶的同工酶进行了较多次的分析,由于不断注意实验操作问题,如取材(黄化幼苗还是绿苗)、样品提取方法(现制备现用还是一次提取后冰箱内保存供几次分析用),以及电流电压、每管加入等量溴酚蓝和固定染色时间等问题,使上述三种作物的同工酶分析中谱带的重演性不断加强,清晰度也比以前的分析要好得多^[3,4],现将这方面积累

的一些经验整理如下,供参考。

一、关于凝胶上同工酶谱型的重演性问题

同工酶在凝胶上的重演性是同工酶分析的关键。数次实验或不同人操作谱型结果不一致是同工酶分析中常碰到的问题,要避免这一问题,如注意下面几个问题,可能结果会好一些。

(一)分析样品宜新鲜提取

以前我们曾采取集中提取方法,即在0℃(冰浴中)条件下迅速提取,提取液经冷冻离心机离心后放入冰箱内保存;一次提取样品供几次分析用。结果发现几次分析结果谱型很不一致。我们分析可能是因为点样时需将酶液解冻,然后再放入冰箱内,再次点样时再解冻,这样连续几次解冻有可能导致酶的活性降低,致使结果不一致。因此,要防止这一问题,可采用每次点样前提取酶液,一次提取供一次点样用,这样每次电泳样品都是新鲜的,情况就好得多。

(二)电流、电压和电泳时间

控制电流一致对同工酶分析影响也是很大的。电流加大时往往电泳时间缩短,这样不仅造成谱带间的扩散和拖尾现象,更重要的是往往造成一些着色较浅的谱带不易显现或着色较浅的谱带虽已显色但不易观察的现象。在我们的实验中,凝胶柱采用 $\phi 5\text{ mm} \times 90\text{ mm}$,凝胶浓度酯酶和淀粉酶为7.5%,过氧化物酶同工酶为7.7%。三种植物均采用经温箱(23℃—25℃)内培养一周的黄化幼苗叶子,样品浓度为每克鲜重材料加2毫升0.1 M磷酸缓冲液(pH 7.0),置冰浴中迅速研磨至匀浆,然后置K₂₄型高速冷冻离心机4,000转/分离心15分钟,取上清液,每管点样量100微升。一般采用在220伏电压下(用稳压器控制)每管2 mA的电流,电泳时间一般以溴酚蓝前沿泳动至距凝胶管0.5 cm时停止电泳为宜,这样大约需要80分钟左右。每次电泳时如果温度和电流控制一致的话,那么,每次电泳时间相差不会很大。据有关资料报道,电泳时温度最好保持在4℃以下。对于这一要求,我们采用

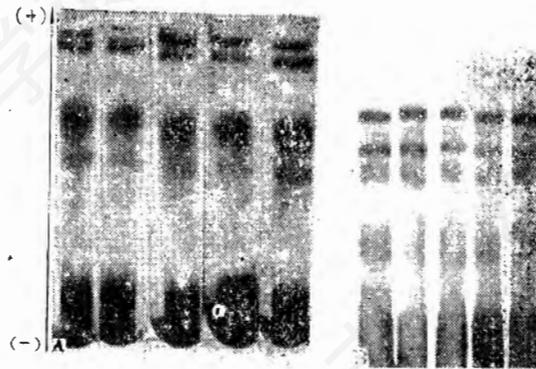


图1 玉米、高粱的过氧化物酶同工酶谱

左. 玉米华农2 B(示5个重复)

右. 高粱京农2 B(示5个重复)

将电泳槽放入冰箱内进行电泳,这样温度基本上能保持在4℃以下。

(三)每管等量加入溴酚蓝和固定染色时间

关于凝胶上同工酶谱型重演性的问题还有两小点必须指出,一是加入的溴酚蓝数量。有的资料报道将溴酚蓝加入上相电泳液中,虽然省事、方便,但有时往往一些小分子量的同工酶泳动得比前沿还要快,以致等溴酚蓝泳动至凝胶管下端0.5 cm时,个别同工酶谱带已泳动进入电极缓冲液中。所以最好每管分别加入等量的溴酚蓝。每管加样量应一致,如多少不一,往往造成各管间泳动速度不一致从而影响重复试样间同工酶谱带迁移率的一致性,给结果分析造成困难;二是凝胶染色时间应保持一致,当然还应该考虑到温度的问题。如温度基本保持一致,那么染色时间长短不一,致使同工酶谱带着色上造成差异,这样在分析酶活性上往往会得出不正确的结果。

在我们的分析工作中,因为注意了上述三个问题,所以,无论是过氧化物酶还是酯酶同工酶,每次分析结果基本一致,即实验的重演性较好(见图1、图2),故增加了实验结果的可靠性。

二、关于凝胶上同工酶谱带的清晰度问题

在同工酶分析过程中,酶谱带的清晰度是同工酶分析中得出正确结果的重要保证。我们刚开始从事植物同工酶分析时,酶谱带的清晰

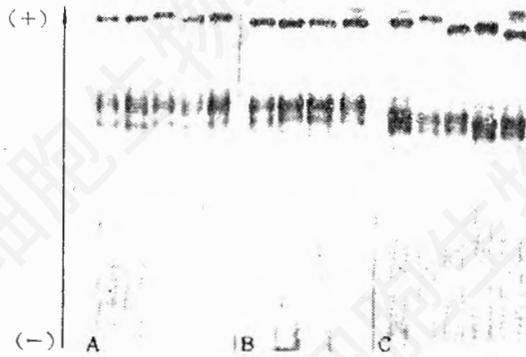


图2 野生稻的酯酶同工酶

- A 羊栏野生稻(示5个重复)
B 滕桥野生稻(示4个重复)
C 合浦野生稻(示5个重复)

度总是不够理想。有些谱带肉眼能隐约可见，但背景不清，有的谱带拖尾现象严重，故不易照相、分析。在以后的分析中，我们不断改进实验操作，注意了下面几个问题，收到了较好的效果(见图3)。

(一) 预电泳:

凝胶中的过硫酸胺是促进凝胶聚合的催化剂，但由于过硫酸胺可以和同工酶中的某些基团起反应，因此影响同工酶的分选。解决这一问题的方法是预电泳，即在未点样以前先进行一次电泳，除去凝胶中的一些过硫酸胺。预电泳可以在常温下进行。

(二) 同工酶样品的离心问题

每次提取的同工酶样品应该在冷冻离心机上离心，这样可以减少蛋白酶的水解作用，因为某些蛋白质存在于凝胶中时可以影响同工酶的分选。如果提取同工酶的材料选取黄化幼苗的话，结果可能比绿苗的更为清晰。虽然作者以往的分析结果表明，用黄化幼苗与绿苗两者在同工酶谱型上看不出差异，如我们对籼稻三个杂交组合(珍汕97 A、IR₂₆、珍汕97 A × IR₂₆；军协 A、IR₂₀₉、军协 A × IR₂₀₉；V₂₀A、杭8203、V₂₀A × 杭8203；)二叶一心期黄化幼苗(23℃—25℃下培养一周)的叶子酯酶同工酶与绿苗(对照)叶子的酯酶同工酶、高粱(京农2 A、京农2 B、京恢1号、京杂201)二叶一心期黄化幼

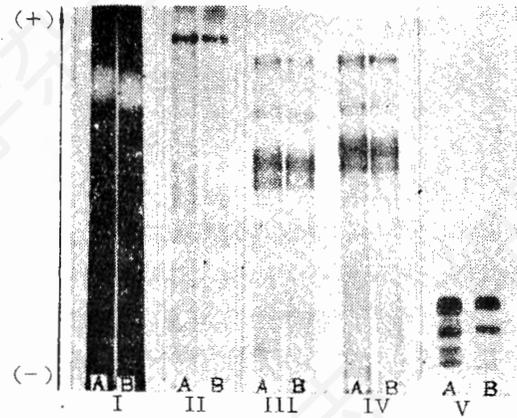


图3 高粱、水稻雄性不育系及相应保持系中的淀粉酶、酯酶和过氧化物酶同工酶

- I. 高粱京农2号不育系及相应保持系淀粉酶同工酶；
II. 高粱京农2号不育系及相应保持系酯酶同工酶；
III. 水稻29南1号不育系及相应保持系酯酶同工酶；
IV. 水稻V₄₁不育系及相应保持系酯酶同工酶；
V. 水稻珍汕97不育系及相应保持系负极向过氧化物酶同工酶。

A. 不育系；B. 保持系。

苗(23℃—25℃下培养一周)与绿苗(对照)叶子的淀粉酶同工酶、以及玉米(华农2 A、华农2 B)一叶一心期黄化幼苗(23℃—25℃下培养一周)与绿苗(对照)叶子的过氧化物酶同工酶比较分析中所得出的结果表明两者在同工酶谱型上没有看到差异(待发表)。但叶绿素的存在既可能影响同工酶的分选，也可能影响同工酶的着色。在植物同工酶的分析工作中，如能注意上述实验操作细节，那么，得出的结果肯定要可靠得多。

参 考 文 献

- [1] 彭永康，阎炳宗。1984。植物学通报，2(1):8—13。
[2] 吴少伯。1979。植物生理学通讯，(1)，30—33。
[3] 阎炳宗，彭永康，王威，洪仁远。1983。上海农业科技，(4) 18—19。
[4] 阎炳宗，彭永康，王威。1983。实验生物学报，(16)，2，113—118。