

## · 研究简报 ·

## 小麦种子萌发时盾片酸性磷酸酶的变化

徐是雄

(香港大学植物系)

傅家瑞\*

(中山大学生物系)

小麦种子萌发时, 胚内的盾片细胞不断形成和分泌出多种酶。究竟盾片细胞形成和分泌的是什么酶? 这些酶又起着什么作用? 我们应用了组织化学、等电聚焦电泳和定量分析等方法, 对小麦盾片细胞的酸性磷酸酶进行了观察和分析。现将结果报道如下。

## 1. 材料和方法

实验材料为冬小麦 (*Triticum aestivum*) 农大139号品种, 经Clorox灭菌3分钟, 冲洗干净, 在蒸馏水中浸泡4小时, 然后播于置有潮湿滤纸的培养皿中, 在 $22^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ 中萌发。种子分别经0、1、2、3、4、5、6、7天萌发后, 同时取样进行下列各项试验。

(1) 组织化学定位 组织化学定位依照徐是雄和陈庆让的方法<sup>[1]</sup>, 并采用以下处理作对照: 无底物反应的对照(图版3)和预先杀死酶的对照(图版9)。

(2) 定量分析 将盛有10个小麦盾片的容器放入冰浴中, 加入1ml浸出液(2mM醋酸钠+10mM  $\text{CaCl}_2$ , pH5.5), 在 $25^{\circ}\text{C}$ 中振荡25分钟。取出盾片后, 浸出液留作电泳和分析用。经浸提后的盾片放入已作冰冻预处理的研钵中研磨, 并加入2ml提取液(0.05M Tris-HCl, pH7.5和2mM EDTA), 离心(15,000rpm)20分钟。上清液留作电泳和分析用。

准确吸取0.2ml浸出液、蒸馏水0.8ml注入试管中, 然后分次加入1ml 0.1M pH5.0醋酸盐缓冲液及0.1ml 0.018M p-硝基酚磷酸, 在 $30^{\circ}\text{C}$ 温浴中振荡10分钟, 取出并加入1ml NaOH(0.5N), 充分振荡后在分光光度计400nm中比色。另取0.05ml提取液, 加水0.95ml, 同上法处理及比色。前者的数值表示盾片分泌的酶部分, 而后的数值表示细胞内的酶活性。实验方法参考Ching(1979)<sup>[2]</sup>。

(3) 等电聚焦电泳 依据LKB APPLICATION NOTE 75的方法, 先行制备聚丙烯酰胺凝胶: 29.1%丙烯酰胺10ml, 0.9%N,N'-亚甲基双丙烯酰胺10ml, 7.5克蔗糖溶于36ml蒸馏水中, 加入两性电解质, 调pH为3.5—9.5, 最后再加0.004%核黄素。

胶液制成平板, 用3张 $5 \times 10\text{mm}$  Whatman 3MM滤纸吸收60 $\mu\text{l}$ 的样品, 贴附于胶板上, 在阴极处注入1M NaOH, 在阳极处注入1M  $\text{H}_2\text{PO}_4$ , 电泳结束后, 将胶板

本文1985年4月收到

\*部分工作是傅家瑞访问香港大学植物系时完成的。

放入反应液中, 在30—37°C中显色15分钟, 水洗后照相。

## 2. 结果和讨论

在小麦干种子中, 酸性磷酸酶活性主要集中在盾片的上表皮细胞和薄壁细胞的蛋白体及细胞壁内(图版1)。存在于蛋白体内的酶的活性, 在种子萌发的第1天变化不大(图版2), 第2天则迅速下降(图版4)。在种子萌发3—4天时, 盾片细胞内形成大液泡, 在这些大液泡内, 酸性磷酸酶的活性不断增加(图版5、6)。萌发5—6天时, 在液泡内的酶活性达到高峰(图版7、8)。到第7天, 液泡内的酶活性下降(图版10)。从1至7天的萌发过程中, 细胞壁和液泡内的酶活性保持颇高的活性, 而在细胞质内的酶活性却很低, 因而应用组织化学法观察不出后者的变化。

鉴于组织化学方法的灵敏度不高<sup>(3)</sup>, 加上这种方法只能用来定位, 而不能定量, 因此为了进一步研究酸性磷酸酶在盾片细胞内和分泌出细胞外的消长情况, 我们对盾片细胞内(提取)和分泌出细胞外(浸出)的酸性磷酸酶做了定量分析(见图1)。

从图1中我们可以看到小麦干种子盾片细胞内酸性磷酸酶的存在, 但其活性却较萌发后期的为低。种子萌发后, 从第2天开始, 酶活性便迅速增高, 到3—4天时达高峰, 其后下降。这一结果与我们从组织化学定位中所观察到的略有差别。在组织化学定位中, 酶活性的高峰期是在萌发5

—6天时才出现, 但在定量分析中, 酶活性的高峰则较早出现(萌发后3—4天)。这一区别我们认为主要原因可能是在组织化学定位中, 我们只看到液泡内的酶活性的变化, 而在壁或胞质内的变化则由于受到组织化学定位灵敏度的限制, 观察不出。在定量分析中, 测定的结果是盾片细胞内总酶量的变化, 因而反映了盾片细胞内的“全部”酸性磷酸酶的消长变化。应用两种方法可以反映两个不同的方面, 即: (1) 蛋白体和液泡内酶活性的变化; (2) 整个细胞(或整个盾片)酶活性的变化。两方面的结果可以相互补充。上述结果还可以看出, 在整个细胞的酶活性高峰出现后, 才出现液泡内酶活性的高峰。

通过定量分析, 我们测出盾片浸出液内的酸性磷酸酶活性, 表明该酶能从盾片向外分泌。可是浸出液中的酶活性远比提取液内的酶活性低, 可见盾片的酶只是部分地分泌到细胞外。虽然酶的分泌部分活性小于提取部分, 但它们高峰期的出现和消长变化是一致的。

植物细胞内的酸性磷酸酶是由多种同工酶组成, 为了了解在种子萌发时盾片细胞内

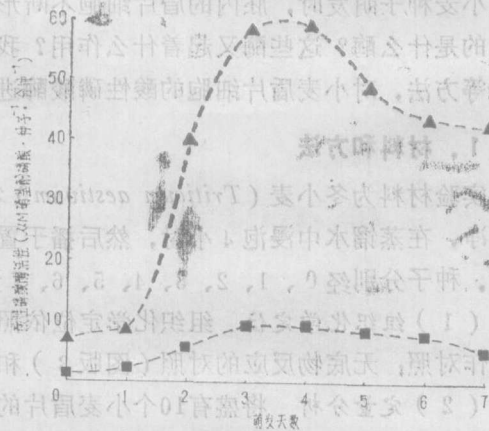


图1 小麦不同萌发时期盾片内和分泌出盾片外的酸性磷酸酶活性的变化。▲—曲线为盾片提取液酶活性; ■—为分泌出来的(即浸出液内)酶活性。

酸性磷酸酶部分和分泌出细胞外的酶部分是否相同，我们应用等电聚焦法把盾片细胞内和分泌出细胞外的酸性磷酸酶进行同工酶分析（见图2）。从图中我们可以看到0天和萌发后1天，由于盾片分泌的酶量少，带谱尚未显现。当种子萌发2天后，酶的分必增多，酶带明显。从这些同工酶带中我们可以看到，在不同萌发时期中，盾片所分泌的同工酶的带谱相同。

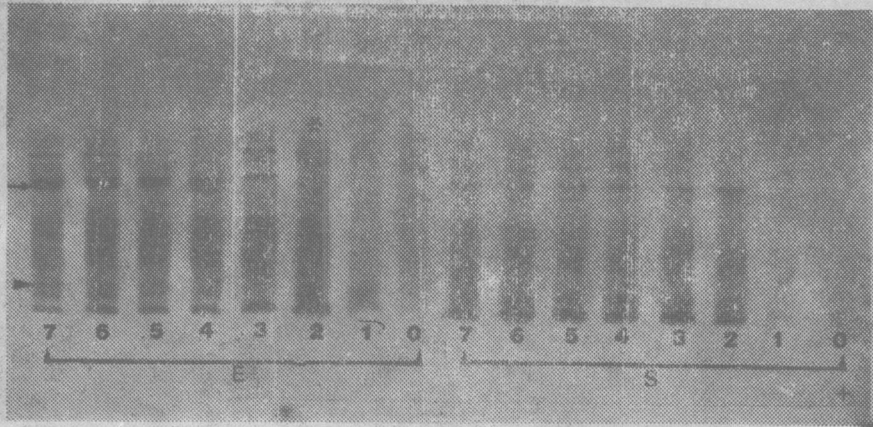


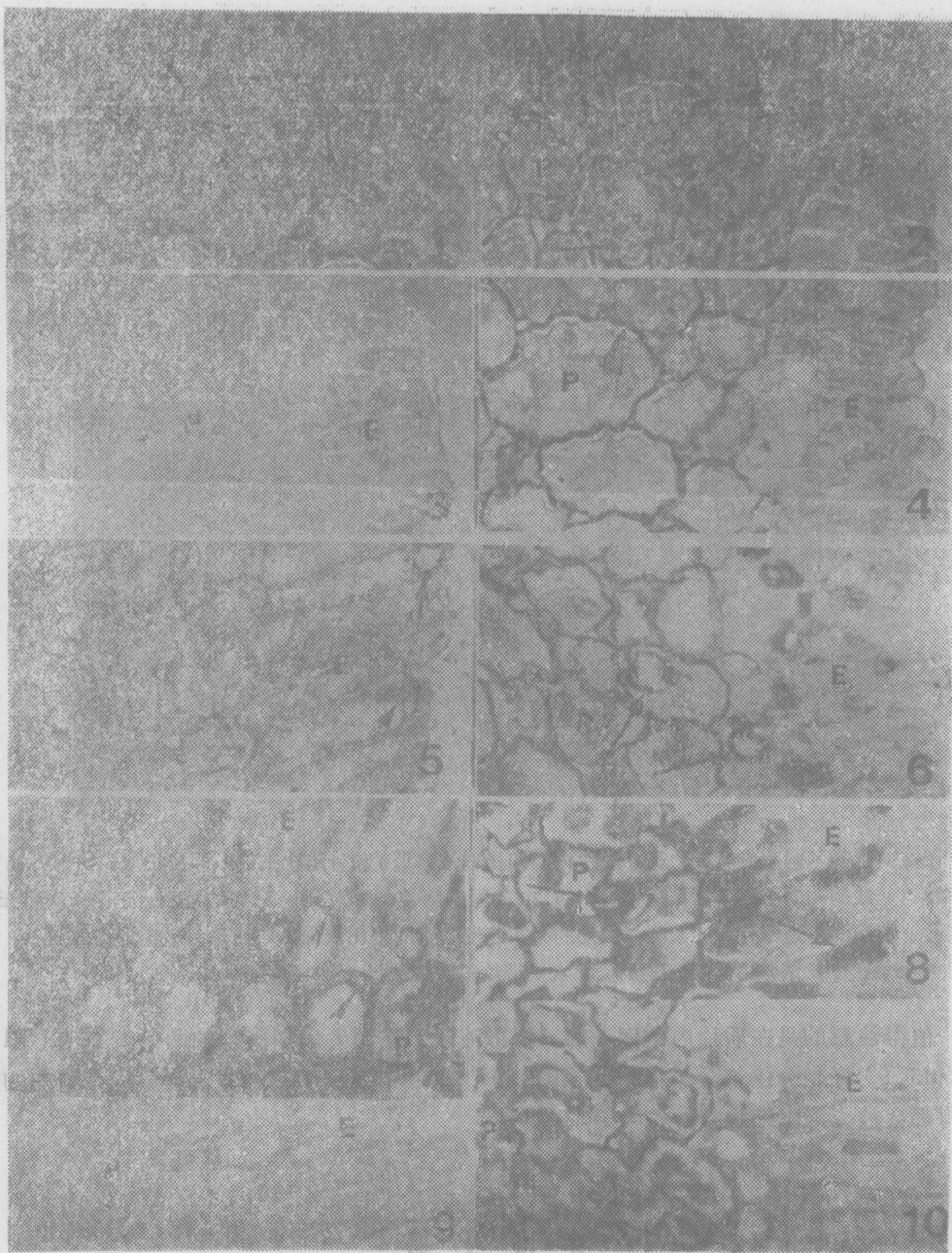
图2 小麦不同萌发时期(天)盾片内(即提取液, E)和分泌出来的(即浸出液, S)酸性磷酸酶的同工酶带谱。→为PI=6.20的同工酶带; ▲为PI=5.10的酶带。这两条酶带在浸出液中是不存在的(唯一例外的是在萌发7天的浸出液内, PI=5.10的酶带也出现)

●表示在重复试验中出现一些干扰因素使带纹不清楚

值得注意的是在盾片内的同工酶(提取液), 在萌发后期出现的两条新酶带(PI=6.2和5.1), 是分泌部分不存在的(图2)。这一事实表明, 并非所有盾片细胞内的同工酶都会被分泌出细胞外。

参 考 文 献

[1] 徐是雄、陈庆让, 实验生物学报, 17(1984), 161-169.  
 [2] Ching, T.M., 1979, Seed Physiology—Laboratory Work, ACS 519, Oregon State University.  
 [3] Pearse, A.G.E., Histochemistry, 1(1968), 3rd Edition, Williams and Wilkins Co.



**图版说明 酸性磷酸酶定位切片 (×320)**

图中的E = 盾片上表皮细胞; P = 盾片薄壁细胞。切片取自胚的中间部位。

1. 小麦干种子的部分盾片细胞。→示存于蛋白体内的酸性磷酸酶; ▴示存于壁内的酶, 显示颇高的酶活性。
2. 萌发1天。在蛋白体(→)和壁内(▴)的酶活性。3. 为2的无底物对照。
4. 萌发2天。上表皮细胞明显增长, 薄壁细胞也在扩大。蛋白体内已无酶活性, 但在壁内还有颇高的酶活性。
5. 萌发3天。在一些液泡内(→)酶活性开始出现。
6. 萌发4天。液泡内的酶活性不断增高(→)。
7. 萌发5天。液泡内的酶活性仍然保持很高(▴)。
8. 萌发6天。与萌发5天相似, 液泡内酶活性仍很高(→)。
9. 为8的对照。切片经热处理(即沸水煮5分钟), 酶已被杀死, 结果为负反应。
10. 萌发7天。在液泡内的酶活性明显降低。