

华山松大小蠹和红脂大小蠹过氧化氢同工酶酶谱的比较^①

谢寿安¹，吕淑杰¹，袁 锋²，滕华容¹

(1.西北农林科技大学 林学院 陕西 杨陵 712100 2.西北农林科技大学 植保学院 陕西 杨陵 712100)

摘 要 利用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术,对华山松大小蠹和红脂大小蠹的过氧化氢同工酶进行了分析。研究结果表明,华山松大小蠹和红脂大小蠹成虫的过氧化氢同工酶具有明显的差异,2种大小蠹过氧化氢同工酶种间差异主要表现在酶带带数、迁移率、酶带染色深浅、酶带宽窄等方面。而同种个体之间几乎没有差异。

关键词 华山松大小蠹;红脂大小蠹;聚丙烯酰胺凝胶电泳;过氧化氢酶

中图分类号 S763.38 文献标识码 A 文章编号 1001-7461(2003)02-0061-02

A Study on Hydrogen Peroxidase Isoenzymes of *Dendroctonus armandi* and *D. valens*

XIE Shou-an¹, LV Shu-jie¹, YUAN Feng², TENG Hua-rong¹

(1. College of Forestry, NW Sci-Tech Univ. of Agr. and For., Yangling, Shaanxi, 712100, China;
2. College of Plant Protection, NW Sci-Tech Univ. of Agr. and For., Yangling, Shaanxi, 712100, China)

Abstract: By using PAGE techniques, hydrogen peroxidase isoenzymes of *Dendroctonus armandi* and *D. valens* were studied. The results showed that some differences of peroxidase isoenzymes appeared in the band number, relative mobility and staining intensity among the two bark beetles. However, the differences among individuals of the same species were not significant.

Key words: *Dendroctonus armandi*; *D. valens*; PAGE techniques; hydrogen peroxidase isoenzymes

华山松大小蠹(*Dendroctonus armandi*)和红脂大小蠹(*D. valens*)是鞘翅目小蠹科的毁灭性森林蛀干害虫。关于这两种大小蠹的区别,学者主要从外部形态结构上进行过研究^[1],而在生物化学上研究的非常少。本文用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)技术,对两种小蠹过氧化氢同工酶进行了比较分析,为进一步准确区分两种大小蠹和研究其种间亲缘关系提供生化依据^[2,3]。

1 材料与方法

1.1 材料

华山松大小蠹成虫采自陕西长安县沣峪林场大坝沟工区,红脂大小蠹成虫采自陕西韩城雷寺庄林场。活虫用蒸馏水冲洗干净,置于冰箱中低温保存备用。

1.2 方法

1.2.1 样品处理 从冰箱中取出虫体,用蒸馏水洗净后放入指形管(0.5 mL),置于冰浴中,加 5 μ L 提

取液,用玻璃棒将虫体彻底捣碎,置于冰箱冷藏室(不超过 3 h,否则放入冷冻室)。

1.2.2 制胶 经预备实验确定分离胶的浓度为 7%,浓缩胶的浓度为 3%。操作:将配好的分离胶摇匀后,沿胶室的板壁倒入胶室,然后注入 2 mL 蒸馏水,待胶面重新出现折射率不同的亮带时,说明聚合结束(20~30 min),用 5 mL 注射器吸出蒸馏水,并用滤纸吸干残余的水分,倒入浓缩胶,立即推入与玻板配套的干净样品梳子,约 1 h 后进行下一步操作。在浓缩胶聚合期间,从冰箱中取出研磨好的样品,放入台式高速离心机中,以 7 000 r/min 的转速离心 10 min,离心完后将样品放入冰箱待用。

1.2.3 点样 浓缩胶聚合后,轻轻拔出样品梳子,去掉胶室底部的塑料玻槽,并用滤纸擦干净底部附着的琼脂,安装于电泳仪上后,倒入稀释过的电极缓冲液,应注意不使上部液体下流,缓冲液的高度应高于电泳槽顶部 1 cm,底端淹没样品槽底部。用弯曲的针头排干净气泡,从冰箱中取出样品,用微量进样

① 收稿日期 2002-06-27
基金项目 陕西省自然科学基金(2001sm17) 西北农林科技大学青年科研专项基金(63075)
作者简介 谢寿安(1970-)男,甘肃武威人,在职博士,讲师,主要从事森林昆虫学教学和研究。

器吸取 10 μ L 的样品上清液,按顺序加入样品槽。点样时,两虫种之间应隔 1 或 2 个样品点。样品点完后,在相隔点处用微量进样器点入少量的溴酚蓝指示剂。

1.2.4 电泳 将电泳仪放入冰箱中,对应插好电极线,开始时稳流 15 mA,大约半小时以后电流调为 25 mA,当溴酚蓝指示线移至距胶底 1 cm 时,关掉电源,停止电泳。

1.2.5 染色 将分离胶部分移入盛有过氧化氢溶液(用微量进液器将 450 μ L30%的过氧化氢加入到 200 mL 的蒸馏水中)的瓷盘中,轻摇 10 min 后,用水冲洗凝胶 2~3 次,再倒入配制好的染色液,轻轻摇动待酶带清晰出现后,倒掉染色液,用蒸馏水冲洗干净,再盛清水将凝胶淹没,放于瓷盘中。

1.2.6 照相、制干板 为了长期保存或防止凝胶的破损,将效果好的凝胶置于暗室中自然风干,制成干板,并照相^[4,5]。

1.2.7 同工酶带迁移率计算 对华山松大小蠹成虫的过氧化氢同工酶聚丙烯酰胺凝胶电泳经过 3 次重复,在获得稳定酶谱的基础上,统计酶带条数和各酶带的迁移率 R_f 值。 R_f = 分离胶界面与酶带中心的距离(cm) / 分离胶界面与溴酚蓝指示线之间的距离(cm)。

2 结果与分析

从表 1 可以看出,华山松大小蠹不同成虫的过氧化氢酶酶带数均为 9 条,迁移率在 0.04~0.57 之间,个体之间相差不大;红脂大小蠹不同成虫的过氧

表 1 华山松大小蠹成虫过氧化氢同工酶酶带迁移率

Table 1 Move rate of peroxide isoenzyme bands of *Dendroctonus armandi*

| 酶带序号 | 样 点 号 | | |
|------|-------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 |
| 1 | 0.05 | 0.04 | 0.05 |
| 2 | 0.15 | 0.15 | 0.14 |
| 3 | 0.24 | 0.25 | 0.25 |
| 4 | 0.33 | 0.33 | 0.33 |
| 5 | 0.40 | 0.44 | 0.41 |
| 6 | 0.44 | 0.44 | 0.44 |
| 7 | 0.50 | 0.50 | 0.51 |
| 8 | 0.53 | 0.52 | 0.52 |
| 9 | 0.55 | 0.55 | 0.57 |

化氢酶酶带数都是 7 条(表 2),迁移率在 0.05~0.46 之间,个体之间相差也不大。而在华山松大小蠹和红脂大小蠹不同成虫个体之间差别较大。华山

松大小蠹成虫的过氧化氢酶酶带数比红脂大小蠹的多 2 条,迁移率差别也很大。另外,在反映酶活性的酶带宽度和颜色深浅方面也有差异,虽然华山松大小蠹成虫的过氧化氢酶酶带数均为 9 条,但各酶带着色较浅,活性较弱,酶含量较少,酶带均较窄。红脂大小蠹成虫的过氧化氢酶酶带活性均较强,酶含量较多,酶带相对较宽且着色较深。

表 2 红脂大小蠹成虫过氧化氢同工酶酶带迁移率

Table 2 Move rate of peroxide isoenzyme bands of *Dendroctonus valens*

| 酶带序号 | 样 点 号 | | |
|------|-------|------|------|
| | 1 | 2 | 3 |
| 1 | 0.06 | 0.05 | 0.06 |
| 2 | 0.23 | 0.19 | 0.21 |
| 3 | 0.30 | 0.28 | 0.29 |
| 4 | 0.33 | 0.34 | 0.33 |
| 5 | 0.40 | 0.41 | 0.41 |
| 6 | 0.43 | 0.42 | 0.43 |
| 7 | 0.45 | 0.45 | 0.46 |

3 结论与讨论

2 种大小蠹的过氧化氢同工酶在酶带数、迁移率、酶带宽窄、酶带染色深浅等方面均有差异,这与它们的形态特征、食性差别较大相一致。而同种成虫个体间的过氧化氢酶同工酶种类、含量、酶活性基本一致。华山松大小蠹成虫的过氧化氢酶酶带数比红脂大小蠹的多 2 条,可能是由于华山松大小蠹分布区和遗传变异较大,从而导致其基因型变异也较大。由于酶谱上看到的酶带是酶基因的表现型,而不是酶基因本身,因而泳道上显示的同工酶未必代表给定同工酶全部变异形式,且酶带在不同时期酶位点的表达有时可能不同。有些酶位点只在特定的器官、特定的发育阶段表达,显示其活性。相关研究有待进一步深入。

参考文献:

[1] 吕淑杰,谢寿安,张军灵,等.红脂大小蠹、华山松大小蠹和云杉大小蠹形态学比较[J].西北林学院学报,2002,17(2):58-59.

[2] 胡能书,万国贤.同工酶技术及其应用[M].长沙:湖南科学技术出版社,1985.41-47.

[3] 李绍文.膜翅目昆虫酯酶同工酶的比较研究[J].昆虫学报,1987,30(3):266-269.

[4] 薛增召.同工酶在昆虫学研究中的应用及新进展[J].陕西农业科学,1995(5):37-39.

[5] 张迎春,郑哲民,杨建雄.五种瓢虫酯酶同工酶的比较研究及其在分类上的应用[J].昆虫分类学报,1999,21(2):123-127.