

簡易澱粉膠體電泳裝置及其在同功異構酶上的應用¹

陳福旗 李弘文²

摘要 本試驗所設計一套簡易澱粉膠體電泳的設備，經試用於同功異構酶的分析，顯示效果良好，經濟可行。文中詳述電泳槽、膠體鑄模及膠體切割的零件及其組合，並討論澱粉膠之製作及電泳條件、染色方法。一些同功異構酶的偵測及其應用亦在本文提出。

同功異構酶 (isozymes) 為具有同樣催化活性但不同分子形式的酵素⁽⁴⁾，利用電泳的技術可以把植物萃取物中的酵素做快速分析，廣被應用於遺傳學、品種鑑定、染色體組鑑定、植物演化及育種等之研究^(4,6,7,8)。

利用澱粉膠體電泳的技術來分析同功異構酶，已有許多篇報告提出討論^(1,2,4,5,6,8)，且也有設計圖可供參考^(2,5)，但這些報告所提出的膠體，電泳槽的規格不十分詳細，甚至不知其規格，在利用上就必須經過嘗試錯誤，而使有意採用此技術的研究者帶來不便。

本文針對此點，加上第一作者曾在加州大學戴維斯分校Dr. Gottlieb 的實驗室研究經驗，介紹澱粉膠體、電泳槽、膠體鑄模 (gel model) 及膠體切割器 (gel slicer) 的配製方法，一些常用的同功異構酶染色方法亦將簡單介紹，以利於國內在遺傳及育種等的研究。

材料與方法

本報告所用的材料包括壓克力、玻璃及鋼絲，將分別於電泳槽、膠體鑄模及切割器中說明。供分析用的植物材料包括甜瓜、胡瓜、番茄、甜椒等蔬菜的發芽種子或幼苗葉片，及番木瓜、柑桔、芒果的嫩葉或成熟葉。各植物材料用緩衝液磨碎後，可放在 -17°C 冷凍保存約一星期。

一、電泳裝置及操作

1. 電泳槽：圖1是電泳槽及其他附件的實物照片，電泳槽的規格及組合見圖2之分解圖。各壓克力板均以矽膠填縫劑 (Silicone Glass Sealant) 或氯仿 (Chloroform) 密切連接，兩端的電泳槽裝約八分滿的緩衝液，槽內各有一白金絲電極，電泳時，將澱粉膠連鑄模平放於兩緩衝槽之間的平台，用纖維素海綿 (Cellulose Sponge, 購自超級市場) 當鹽橋，其步驟詳見電泳方法。
2. 澱粉膠體鑄模：圖3顯示膠體鑄模的構造，底盤可用0.5公分厚之玻璃或壓克力，槽四週的材料則用壓克力，高度為0.8公分或1公分，連接成內部 18×13.5 公分的空間，以便融化之澱粉溶液可在其內形成片狀膠體。
3. 膠體切割器：利用上述鑄模可做出厚0.8—1公分的澱粉膠，於電泳完畢染色前，可以水平分割成2—3片，分別供染不同的酵素系統。圖4A為切割器之構造，主要由一條鋼絲固定在一

1. 臺灣省農業試驗所 研究報告第 1387 號。

2. 本所園藝系助理研究員及技術助理。臺灣省 臺中縣 霧峰鄉。

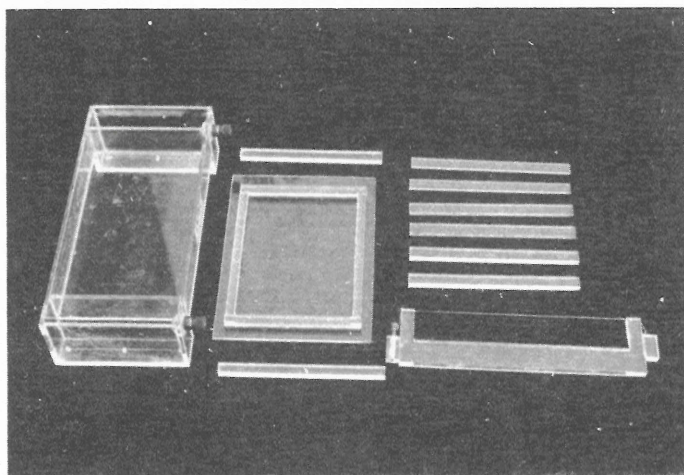


圖 1. 電泳槽及其他附件的實物照片。

Fig. 1. Picture of electrophoretic tank and other accessory parts.

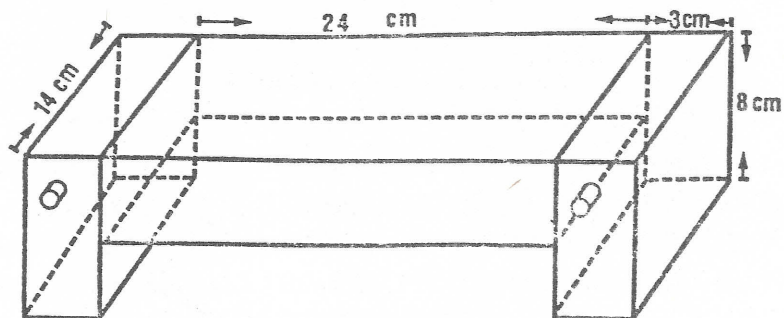


圖 2. 電泳槽解析圖

Fig. 2. Diagram of electrophoretic tank.

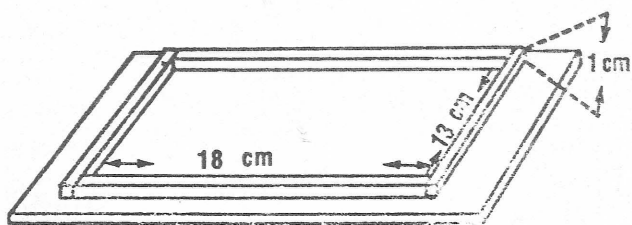


圖 3. 澱粉膠鑄模的解析圖

Fig. 3. Diagram of starch gel model.

條大的壓克力板，完成之切割器類似線鋸。因膠體必須水平切割，故另做 3 種不同高度之隔間壓克力板各 2 條（圖 4B），放在澱粉膠左右兩側，以便利切割。

二、澱粉膠之製做、緩衝液、電泳方法及染色

1. 澱粉膠體之製做：

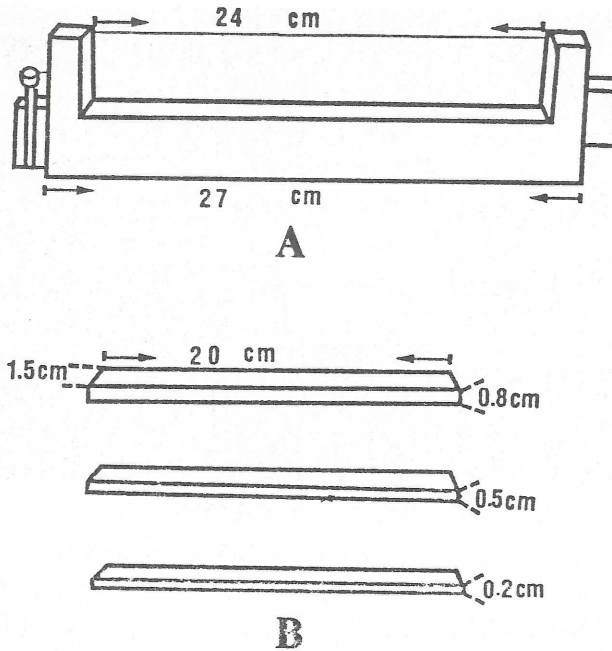


圖 4. 膠體切割器及隔間板的解析圖

Fig. 4. Diagram of gel slicer and spacers. A. Gel slicer, B. Spacers.

本報告所用之澱粉指Signa公司出售之水解馬鈴薯澱粉 (S-4501)，一般使用濃度為10—12%，以下用10%澱粉舉例說明。上述膠體鑄模容載體積約為 243立方公分，但考慮形成膠體係水分子和澱粉分子間的作用力，其體積會縮小，故實際使用330ml的緩衝液。將配好之緩衝液倒入1升的抽氣三角瓶，稱好33克的澱粉，倒入此三角瓶，並用手搖晃直至所有顆粒溶解成懸浮狀，再以瓦斯燈或酒精燈加熱，在加熱過程中，須用手抓住三角瓶的頸部搖晃，以避免澱粉燒焦，約5—6分鐘澱粉溶液會變成半透明狀，此時其粘滯性增加，約再經1—2分鐘，粘滯性突然降低，此時可見到沸騰的小泡，即可用間接水冷抽氣，亦即含澱粉溶液的三角瓶和抽氣機之間用冷卻的三角瓶（冰浴）當緩衝，以免因過熱而直接抽出澱粉溶液。抽氣完畢即刻倒入膠

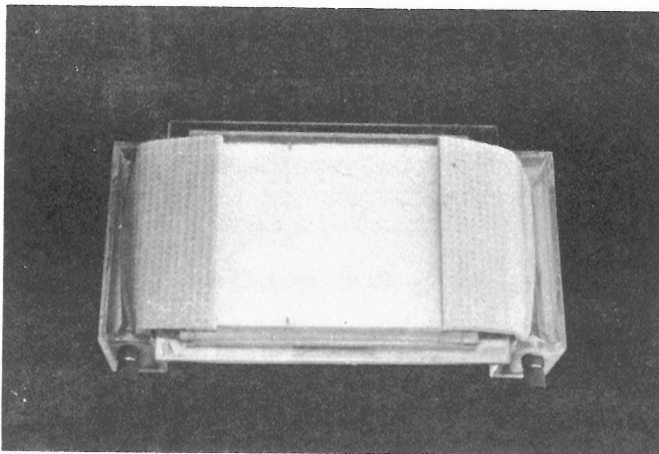


圖 5. 澱粉膠及鑄模放在電泳槽上

Fig. 5. Starch gel and model is put on electrophoretic tank.

體鑄模，須平均倒於四周，並略為高出其水平面，再以一塊乾淨的玻璃片（和鑄模底盤同大）小心蓋上，避免產生氣泡。第一天下午做好，於室溫下放置一夜，第二天早晨即可使用（圖5）。

2. 緩衝液

電極槽的緩衝液為 Li-Borate pH8.3 (0.19M Boric acid, 0.04M LiOH)，澱粉膠體的緩衝液為 1 份 Li-Borate 加上 9 份 Tris-Citrate pH8.3 (0.05M tris, 0.007M citric acid)。

3. 電泳方法及染色

澱粉膠於前一天做好，第二天使用前約 10 分鐘，將整個電泳裝置放入 4~5°C 冰箱預冷，電泳槽內充滿電極液後，也要預冷。將植物材料如葉片、種子等，置於冰浴上的小稱藥盤，加上少量含有 tris 或磷酸的緩衝液及少量（約 10~20mg）PVP-40，再以壓克力棒（橫切面約 1.5 × 1.5 公分）磨碎，以 0.4 × 1 公分的 Whatman #3 濾紙片吸收其中的成份，插入澱粉膠之前，先在面紙或 Kimwipe 拭紙上吸掉過多的溶液。濾紙插入澱粉膠的位置為在膠體的三分之一處以解剖刀或薄的刀片垂直切開，再用兩手撥開，濾紙片就很容易插到切面，每一片膠體最多可放入 18 個樣品，濾紙片全部放好之後，再把澱粉膠密合（圖 5），兩端用沾有追蹤染料 Bromophenol Blue 的濾紙，以便電泳時，可以判斷樣品移動的程度。

將澱粉膠連鑄模平行放在電泳槽上，用鹽橋（纖維素海綿）連接電極液和膠體，連接膠體的上方以長條壓克力板壓著，接著將電線插入電力設備，負極為偏植物樣品的膠體端。設定 35mA（定電流），開始通電，電泳時係在 2~4°C 的冰箱進行，等到追蹤染料跑到另一端靠近海綿之處（距原點約 9 公分），停掉電力，以圖 4 所示的工具，將膠體水平切割成四片，最上面一片丟棄，其餘三片可染三種不同酵素。

多次試驗的結果顯示，Peroxidase 在本系統有很好的解析力（表 1），柑桔類 Phosphoglucosomerase (PGI) 用 25~35mA 時，解析力也很好（圖 8），因此本文只列出該兩種酵素的染色法。

表 1. 可利用澱粉膠體分析的作物及同功異構酶

Table 1. Crops and isozymes analysed by starch gel in this study

Crops	Isozymes*
Melon 甜瓜	PRX
Cucumber 胡瓜	PRX
Tomato 番茄	PRX
Sweet pepper 甜椒	PRX
<i>Carica</i> spp. 番木瓜	PRX, PGI
Citrus 柑桔	PRX, PGI
Mango 芒果	PRX, PGI

*PRX=peroxidase, PGI=phosphoglucosomerase.

PRX : 0.2M acetate buffer, pH5.0, 100ml ; O-dianisidine 0.1g (溶於 10ml 的 95% 酒精) ; 2 滴的 35% H₂O₂ (於染色之前才加)。將膠體取出後，在 acetate buffer 中 4°C 浸 15 分鐘，倒掉後，再以上述溶液染色。

PGI : 0.1M Tris, pH7.5, 100ml ; 1M MgCl₂, 1ml ; Fructose-6-phosphate 30mg ; NADP⁺ 5mg ; MTT 8mg ; PMS 2mg ; Glucose-6-phosphate dehydrogenase 40 units

將澱粉膠在上述溶液中，於30°C黑暗靜置30—60分鐘，或等條帶出現為止。

染色以後，倒掉反應液，用自來水或蒸餾水洗三次，再以 50% 甘油固定，隔夜後，可用透明 PE 塑膠布包妥，置於冰箱，在 1—2 個月內均可以取出供讀條帶比較之用。通常染色完、清洗過後，可在光箱上以彩色幻燈軟片或黑白軟片拍照記錄，以供永久保存。

結果及討論

利用上述電泳設備，可以將數種作物的peroxidase同功異構酶在澱粉膠顯現清楚的條帶（表 1），將甜瓜子葉在緩衝液磨碎後，若直接以電泳法分析，則主要條帶均表現非常清楚，圖 6 為F₂之甜瓜新玉×PMR的peroxidase分離情形。其上顯示具有兩個親本及F₁（標示為P₁、P₂及 F₁，為靠近正極

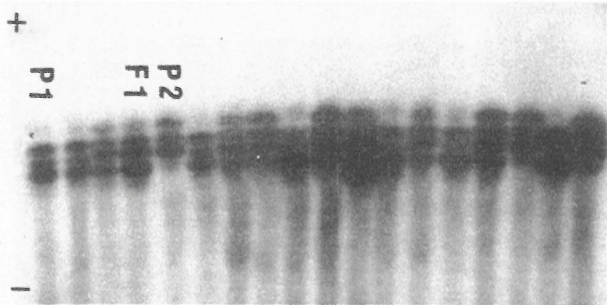


圖 6. 甜瓜F₂的peroxidase (PRX) 同功異構酶分離的情形，圖中表示的 P₁、P₂及F₁係F₂樣品中具有與兩親本及F₁相同的條帶分佈方式。

Fig. 6. Segregation of peroxidase isozymes in an F₂ population of melon. P₁, P₂ and F₁ in the figure indicate F₂ samples have the same banding patterns as both parents and F₁.

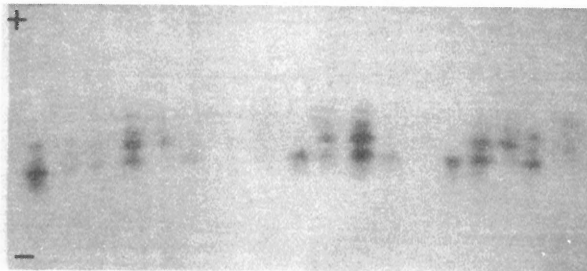


圖 7. 甜瓜的F₂的peroxidase (PRX) 分離的情形，分析的樣品和圖 6 相同，但經過 1500rpm 的離心。

Fig. 7. Segregation of peroxidase isozymes in an F₂ population of melon. The samples analysed were the same as in Fig. 6 but centrifuged at 1500rpm.

的條帶)的條帶分佈。假如在種子吸水期分析，則表現出的peroxidase分佈於靠近原點的清楚條帶(圖片未顯示)，這些條帶在幼苗期的子葉中較不清楚，因此不同發育階段所表現的peroxidase同功異構酶會有不同。粗萃取液若用低速離心(1500rpm, 4°C 分, Hitachi SCR20BA高速離心機)，再取上澄液進行電泳分析，則某些條帶看不清楚(圖 7)，這種結果就很難判斷。本實驗另外如果用 histidine 緩衝液(膠體 0.007M histidine pH7.0, 電泳槽: 0.135M Tris, 0.043M citric acid pH7.0) 電泳的結果雖亦可分離 peroxidase 的同功異構酶，但解析力比 Li-Borate 系統差。因此不同發育階段，萃取離心步驟及不同緩衝液會影響 peroxidase 的表現或分佈，在分析其他作物時，必須注意這些因素。

PGI 的解析力依作物種類而有差異(表 1)，圖 8 為柑桔類葉片萃取液電泳的結果，顯示大部份

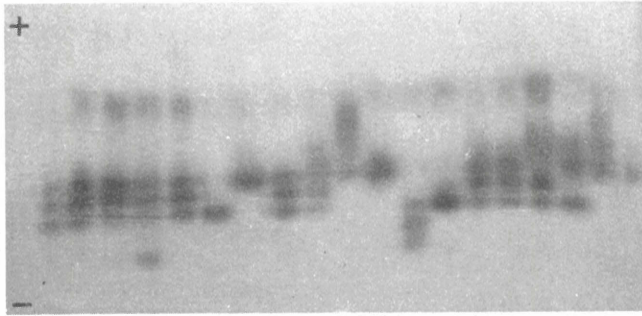


圖 8. 柑桔類的 PGI isozymes。每一樣品代表一個種或品種。

Fig. 8. PGI isozymes in citrus. Each sample represents a species or variety.

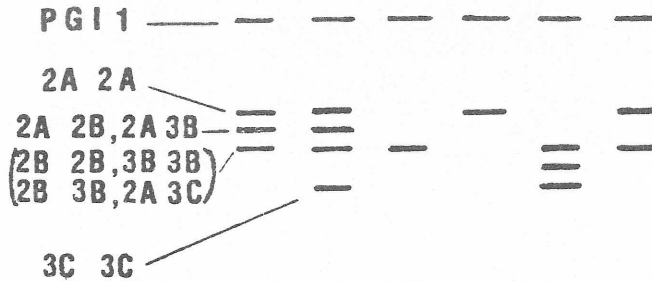


圖 9. 柑桔類細胞質 PGI 同功異構酶代表樣品的圖解及其基因型命名之模式。設有 2 個基因座，3 個對偶基因，則基因型為 $Pgi-2$ 及 $Pgi-3$ 由於 PGI 是雙價體 (dimer)，故由圖可看出同質雙價 (homodimer) 條帶及異質雙價條帶 (heterodimer)。例如樣品 1 的基因型可能為 -2^{AB} ， $-2^{AA}-3^{BB}$ 或 $-2^{AB}-3^{BB}$ ；樣品 2 的基因型可能為 $-2^{AB}-3^{CC}$ 或 $-2^{AB}-3^{BB}-3^{CC}$ ；樣品 3 可能為 -2^{BB} 或 -3^{BB} 。

Fig. 9. Diagram of isozymes of citrus cytosolic PGI and their possible genotypes. PGI 1=plastid PGI.

柑桔均具有兩羣同功異構酶，其一為移動性最快的 plastid PGI，其次為移動性次之的細胞質 PGI (cytosolic PGI)，而且細胞質 PGI 可見到一條、二、三及四條等不同條帶分佈，因此若以 Weeden 和 Gottlieb⁽⁸⁾ 的遺傳模式，則可將參試材料區分出 6 種不同表現型，其可能基因型如圖 9 所示。

柑桔類葉片一般均較具韌性，除了用緩衝液研磨外，亦可將葉片冷凍後，用平口鉗直接壓出汁液分析，所得結果差異不大。

關於澱粉膠體電泳的實驗技術上，Shields 等⁽⁵⁾ 及 Arulsekar & Parfitt⁽²⁾ 均有詳細的報告，但前者對於膠體鑄模並沒有列出規格，而後者雖有列出規格，但不盡詳細，且一片膠體只能同時分析兩種同功異構酶，而本報告的膠體可水平切割成 4 塊（最上面一塊不能分析），因此可同時分析三種同功異構酶，這在樣品的準備分析上，可節省時間及材料。

澱粉膠體電泳的優點為：分析所需時間短，所須材料費較聚丙烯醯胺膠 (polyacrylamide gel) 為低，且一次同一羣樣品可分析三種酵素的同功異構酶；而後者可以解析的同功異構酶較多，但某些作物的一些同功異構酶則較難解析，例如柑桔和玉米的 peroxidase 用聚丙烯醯胺膠體電泳分析時，條帶的分佈比較模糊，難以判斷（未發表的結果），此時用澱粉膠體電泳，將有利於研究的進行。

本報告指出，許多作物的 peroxidase (表 1) 利用此系統可得到較佳解析力，phosphoglucose isomerase 則只有在柑桔、芒果及木瓜的解析力較好，因此未來必須探討開發不同的緩衝系統及電力設定方式 (25mA, 35mA, 50mA 或其他定電流，或定電壓)，以求能夠增加分析同功異構酶的種類。

在應用方面，商業種子的純度鑑定，育種材料的遺傳分析（同功異構酶基因座上對偶基因的分離

比，參考圖 6；控制同功異構酶的基因座數目，圖 9），均可以用此系統來進行，有數種作物已經以同功異構酶來鑑定純度、品種的分類及育種上的連鎖分析^(1,3,4,6,7,8,9)，因此澱粉膠體電泳法配合育種家的育種計畫，將可加速其進行；對商業種子公司的種子純度，將可提出確切的保證。

誌 謝

本文承臺大園藝系許圳塗教授、本所蕭主任吉雄及張清安博士益正及提供意見，謹此誌謝。

參考文獻

1. Arus, P., S. D. Tanksley, T. J. Orton and R. A. Jones. 1982. Electrophoretic variation as a tool for determining seed purity and for breeding hybrid varieties of *Brassica oleracea*. *Euphytica* 31 : 417-428.
2. Arulsekhar, S. and D. E. Parfitt. 1986. Isozyme analysis procedures for stone fruits, almond, grape, walnut, pistachio, and fig. *Hort-Science* 21 : 928-933.
3. Chaparro, J. X., R. E. Durham, G. A. Moore and W. B. Sherman. 1987. Use of isozyme techniques to identify peach × Nonpareil' almond hybrids. *HortScience* 22 : 300-302.
4. Peirce, L. C. and J. L. Brewbacker. 1973. Applications of isozyme analysis in horticultural science. *HortScience* 8 : 17-22.
5. Shields, C. R., T. J. Orton and C. W. Stuber. 1983. An outline of general resource needs and procedures for the electrophoretic separation of active enzymes from plant tissue. In: Tanksley, S. D. and T. J. Orton (eds) *Isozymes in Plant Genetics and Breeding, Part A*, pp. 443-458.
6. Tanksley, S. D. and C. M. Rick. 1980. Isozymic gene linkage map of the tomato: Applications in genetics and breeding. *Theor. Appl. Genet.* 57 : 161-170.
7. Weeden, N. F. 1983. Evolution of plant isozymes. In: Tanksley, S. D. and T. J. Orton (eds) *Isozymes in plant Genetics and Breeding, Part A*, pp. 177-205, Elsevier, Amsterdam.
8. Weeden, N. F. and L. D. Gottlieb. 1979. Distinguishing allozymes and isozymes of phosphoglucosomerase by electrophoretic comparisons of pollen and somatic tissues. *Biochem. Genet.* 17 : 287-296.
9. Wills, A. B. and E. M. Wiseman. 1980. Acid phosphatase isoenzymes of *Brassica oleracea* seedlings and their application to sib testing in F1 hybrids. *Ann. Appl. Biol.* 94 : 137-142.

A Simple Apparatus for Starch Gel Electrophoresis and its Application in Isozyme Study

Fure-Chyi Chen, Hung-Wen Li

Summary

A simple starch gel electrophoretic apparatus has been designed for isozyme analysis. After testing some isozymes, it showed good resolution and economic applicability. Methods of assembling electrophoretic tank, gel model and gel slicer were presented in detail. Starch gel making, electrophoretic condition as well as activity staining were also described. The results of detecting some isozyme systems and aspects of their application were mentioned.

1. Contribution No. 1387 from Taiwan Agricultural Research Institute.

2. Assistant Horticulturist and Technician assistant, respectively, Department of Horticulture, TARI, Wu-feng, Taichung, Taiwan 41301, R. O. C.