

文章编号 :1003-8701(2014)01-0033-04

小麦种子中淀粉水解酶同工酶生化特性研究

李延红,陈晓燕,韩卓,孙汉巨

(合肥工业大学生物与食品工程学院,合肥 230009)

摘要:本文采用聚丙烯酰胺凝胶(PAGE)电泳技术,分别对萌发过程中小麦种子中胚芽、胚乳和胚根三大组织部位存在的淀粉酶同工酶生化特性研究。结果表明,淀粉酶同工酶的最适 pH 在 5.2 左右,pH 5.0~9.0 范围内均具有较好的稳定性,最适温度为 40℃,在 0~50℃大部分淀粉酶同工酶的活性基本上保持稳定;重金属离子 Hg²⁺ 对淀粉酶同工酶的抑制作用最为强烈,几乎将近 100%,其他金属离子 Cu²⁺, Pb²⁺, Zn²⁺, Ca²⁺ 也不同程度的抑制了淀粉酶的活性。

关键词:小麦;萌发;淀粉酶;水解;同工酶;电泳

中图分类号:S512.1

文献标识码:A

Studies on Biochemical Characteristics of Isoenzymes of Amylase in Wheat Seeds

LI Yan-hong, CHENG Xiao-yan, HAN Zhuo, SUN Han-ju

(College of Biology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract:The biochemical characteristics of isoenzymes of the amylase in three major parts i.e. embryo, endosperm and radicle of wheat seeds of during germination were investigated by the native PAGE. The results showed that the optimum pH value was approximately 5.2 and the enzymatic activity was relatively stable during pH 5.0~9.0. The optimum temperature was 40℃ while most of the amylase isoenzymes kept their activities during 0℃~50℃. Heavy metal Hg²⁺ showed the most serious inhibition on the activities of isoenzymes of amylase and their activities were almost totally inhibited. Other metal ions such as Cu²⁺, Pb²⁺, Zn²⁺, and Ca²⁺ also showed inhibition on the activities of isoenzymes of amylase to different extent.

Keywords:Wheat; Germination; Amylase; Hydrolysis; Isoenzyme; Electrophoresis

小麦作为一种重要的粮食作物,属淀粉型种子,种子中的贮存物质主要是淀粉,种子萌发过程中需要大量的淀粉酶参与^[1]。淀粉酶是水解淀粉和糖原酶类的统称,广泛存在于动植物和微生物中^[2]。按照水解淀粉方式的不同,主要的淀粉酶可以分为四类:α-淀粉酶、β-淀粉酶、葡萄糖淀粉酶

和解枝酶或异淀粉酶^[3]。植物中存在的淀粉酶,特别是萌发后的禾谷类种子,主要存在的是 α-和 β-淀粉酶^[4]。

有关小麦种子中的淀粉酶也纷纷见诸于报道,但定位于种子中的三大组织部位胚芽、胚乳、胚根在萌发过程中的淀粉酶同工酶变化图谱尚未见有详细报道^[5]。因此,本文主要对萌发过程中的胚芽、胚乳、胚根中淀粉酶同工酶进行了图谱分析研究,并对淀粉酶同工酶条带数较多的萌发了 4 d 的胚乳中的淀粉酶同工酶进行了生化特性研究。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料

以扬麦 158 (*Triticum aestivum* L.cv. Yangmai

收稿日期:2013-05-03

基金项目:2010 年度安徽省长三角科技联合攻关项目(10140702023);2012-2013 学年合肥工业大学 2012 年校级大学生创新训练计划项目(2012CXCY394);2011 年国家自然科学基金项目(31171787);2010 年安徽高校省级科学研究项目(010AJZR0899)

作者简介:李延红(1972-),女,硕士,高级实验师,研究方向:食品科学与工程。

158)为试验材料。

1.2 主要仪器设备

DYY-6B 型稳压稳流电泳仪(北京六一)、DY-CZ-28A 型电泳槽(北京六一)、HH-2 孔数显水浴锅(江苏金坛)、8KP-01B 电热恒温培养箱(湖北黄石恒丰医疗器械)、GHP-300 型智能光照培养箱(上海三发)、台式高速冷冻离心机(BECKMAN COULTER)、FA-N/JA-N 电子天平(上海民桥)、凝胶成像处理系统(Hema)、DELTA 320 pH 计。

1.3 总体试验流程

种子消毒→培养→研磨→离心→粗酶液→制胶→上样→电泳→染色→结果分析→讨论

1.4 材料处理

选饱满、均一的小麦种子,用 0.1% HgCl_2 溶液表面消毒 3 min,蒸馏水冲洗,晾干。选取 50 粒消毒过的小麦种子加上适量蒸馏水于培养皿中 28℃ 恒温培养,待培养长出嫩芽后转至 25℃ 的恒温光照培养箱中光照培养,每天给萌发中的种子更换蒸馏水。

1.5 粗酶液的制备

取不同萌发时间段的小麦,用手术刀分别分离出胚芽、胚乳、胚根三部分。各取(0.500±0.005)g 与等体积的缓冲溶液(5 mL,其中含 Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7.5)在研钵中冰浴研磨提取,10 000 r/min 4℃ 离心 25 min 后,取上清液转移到干净的离心管即制得粗酶液,可冷冻保藏在冰箱中备用。

1.6 PAGE 电泳及淀粉同工酶染色

按常规制备 T=10% 分离胶(pH=8.9)和 T=4% 浓缩胶(pH=6.7)的垂直板状不连续系统凝胶^[6]。以 0.05% 的溴酚蓝染料做染色前沿,取 20 μL 的粗酶液与甘油或 40% 的蔗糖溶液混合后上样进行电泳。将剥离下的凝胶置于 pH 5.2 的醋酸缓冲液 37℃ 恒温 1~2 h 后取出,然后分别置于 I2-KI 染色液中显色至出清晰的条带,染色后的凝胶块用蒸馏水冲洗数次^[7]。

1.7 pH 对淀粉酶同工酶的影响

将电泳结束后的凝胶块用手术刀划成小胶条,分别浸泡在 pH 分别为 3.0、5.2、6.5、8.3、9.0 的缓冲液中(含 1% 的可溶性淀粉),37℃ 恒温水浴 15 min 后,水洗 3 次,再在醋酸缓冲液(不含 1% 的可溶性淀粉)37℃ 温浴 5 min 后,碘染色。

1.8 淀粉酶同工酶的 pH 稳定性试验

将电泳结束后的凝胶块用手术刀划成小胶条,分别浸泡在 pH 分别为 1.0、3.0、5.0、7.0、9.0 的缓冲液中,室温下处理 30 min,水洗 3 次后,置于醋

酸缓冲液中(pH 5.2,含 1% 的可溶性淀粉),37℃ 恒温水浴 15 min 后,水洗 3 次,再置于 pH 5.2 的醋酸缓冲液中 37℃ 温浴 5 min 后,碘染色。

1.9 温度对淀粉酶同工酶的影响

将电泳结束后的凝胶块用手术刀划成小胶条,分别浸泡在温度为 0℃、20℃、40℃、60℃、80℃ 的醋酸缓冲液(pH 5.2,含 1% 的可溶性淀粉),恒温水浴 15 min 后,水快速冲洗 3 次,再置于相同温度的醋酸缓冲液(pH 5.2,不含 1% 的可溶性淀粉)中温浴 5 min 后,碘染色。

1.10 淀粉酶同工酶的热稳定性试验

将电泳结束后的凝胶块用手术刀划成小胶条,分别浸泡在温度为 0℃、20℃、40℃、50℃、60℃、70℃ 的醋酸缓冲液(pH 5.2)中预处理 30 min,水洗 3 次,然后置于醋酸缓冲液(pH 5.2,含 1% 的可溶性淀粉),37℃ 恒温水浴 15 min 后,水洗 3 次,置于 37℃ 的醋酸缓冲液(pH 5.2,不含 1% 的可溶性淀粉)中温浴 5 min 后,碘染色。

1.11 淀粉酶同工酶对金属离子敏感性试验

将电泳结束后的凝胶块用手术刀划成小胶条,分别浸泡在含不同抑制剂(CuSO_4 、 HgCl_2 、 PbSO_4 、 ZnSO_4 与 CaCl_2)的醋酸缓冲液(pH 5.2,含 1% 的可溶性淀粉),37℃ 恒温水浴 15 min 后,水洗 3 次,置于醋酸缓冲液(pH 5.2,含各抑制剂但不含 1% 的可溶性淀粉)中,37℃ 再恒温水浴 5 min 后,水洗,碘染色。

2 结果与分析

2.1 小麦中的淀粉酶同工酶酶谱分析

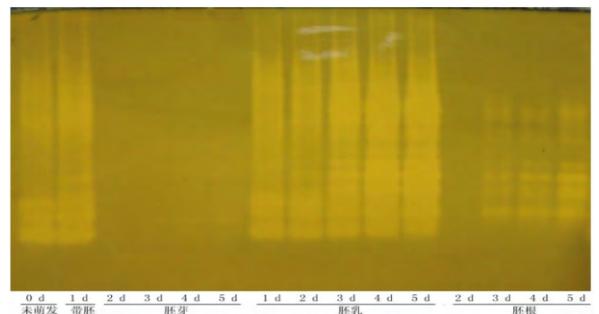


图 1 小麦种子中萌发初期不同部位的淀粉酶同工酶谱带

小麦种子中萌发初期不同部位的淀粉酶同工酶图谱如图 1 所示。试验结果显示,在小麦种子萌发初期(1~5 d)胚乳中的淀粉酶同工酶条带最多也最亮,这表明在胚乳中的淀粉酶同工酶活性最高,数量也最多。随着萌发的进行,能够清晰地看到胚乳中逐渐有不少同工酶条带的增加。小麦作

为淀粉型种子,胚乳是其主要的物质和能量储藏器官^[6],在胚乳中的淀粉酶同工酶活性的升高和数量的增多证明了在萌发过程中淀粉的水解代谢活动的增强,淀粉酶水解淀粉为种子萌发过程中提供物质和能量的需求。而在胚根中,淀粉酶同工酶的谱带变化则不如胚乳中的变化明显,萌发过程中除了酶活性的增强外,也能看到 1~2 条同工酶带的增加。胚芽中,只在萌发初期的后阶段(4~5 d)检测到有 1~2 条同工酶条带的增加。通过萌发过程中胚芽、胚乳、胚根中淀粉酶同工酶三者之间的比较可以看出,萌发过程中存在于小麦种子中三大组织部位的淀粉酶同工酶变化差异较大,这说明这种差异与胚芽、胚乳、胚根三大组织在小麦萌发过程中所执行的生理功能有关。

2.2 pH 对小麦种子中淀粉酶同工酶的影响

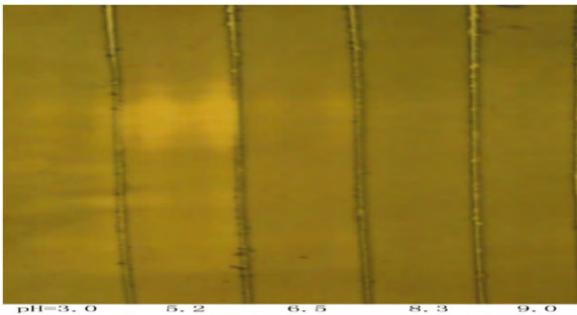


图 2 pH 对小麦种子中淀粉酶同工酶的影响

以萌发了 4 d 的小麦种子的胚乳为研究对象,pH 取 3.0,5.2,6.5,8.3,9.0 来研究 pH 对小麦种子中淀粉酶同工酶的影响。试验结果如图 2 所示,小麦种子中大部分的淀粉酶同工酶在 pH 5.2 左右具有较高的活性,pH 在 3.0 和 9.0 以外淀粉酶同工酶活性已基本丧失。

2.3 小麦种子中的淀粉酶同工酶的 pH 稳定性试验

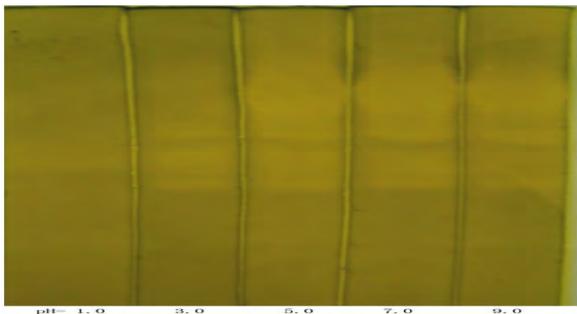


图 3 小麦种子中淀粉酶同工酶的 pH 稳定性

以萌发了 4 d 的小麦种子的胚乳为研究对象,pH 取 1.0,3.0,5.0,7.0,9.0 来研究小麦种子中的淀粉酶同工酶对 pH 的稳定性。如图 3 所示,

试验结果表明,pH 在 5.0~9.0 淀粉酶同工酶均具有较强的稳定性,大部分的淀粉酶同工酶在适合条件下都能恢复到原来的活性,其中 pH 5.0 的处理稳定性最好,这与淀粉酶同工酶的最适 pH 接近。淀粉酶同工酶在较酸性的条件下(pH 1.0 左右)酶的结构已经被较严重的破坏,在适合的条件也不能恢复其酶活,丧失了其稳定性。

2.4 温度对小麦种子中淀粉酶同工酶的影响

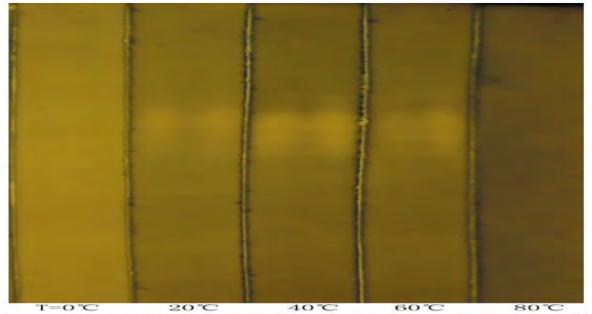


图 4 温度对小麦种子中淀粉酶同工酶的影响

以萌发了 4 d 的小麦种子的胚乳为研究对象,取温度为 0°C,20°C,40°C,60°C,80°C 来做温度对小麦种子中淀粉酶同工酶的影响。如图 4 所示,结果表明,在 40°C 左右时,淀粉酶同工酶具有较高的活性,在 20°C,60°C 时还保持了一定的活性,在 0°C,80°C 时活性则已基本丧失。

2.5 小麦种子中淀粉酶同工酶的热稳定性试验

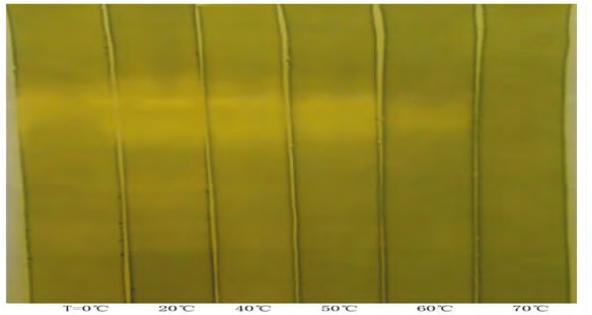


图 5 小麦种子中淀粉酶同工酶的热稳定性

以萌发了 4 d 的小麦种子的胚乳为研究对象,取温度为 0°C,20°C,40°C,50°C,60°C,70°C 研究小麦种子中淀粉酶同工酶对热的稳定性。如图 5 所示,试验结果表明,温度在 0~50°C,大部分淀粉酶同工酶能够保持其稳定性,但在温度的上升过程中,也有部分同工酶丧失了活性。在 70°C 以上时,则淀粉酶同工酶基本上已经被灭活了。

2.6 小麦种子中淀粉酶同工酶对金属离子敏感性试验

以萌发了 4 d 的小麦种子的胚乳为研究对象,取 Cu²⁺,Hg²⁺,Pb²⁺,Zn²⁺ 的浓度为 200 μmol/L,

Ca²⁺ 浓度为 2 mmol/L 研究小麦种子中淀粉酶同工酶对金属离子的敏感性。如图 6 所示,通过与对照相比,试验结果表明小麦种子中的淀粉酶同工酶对重金属离子 Hg²⁺ 具有较大的敏感性,Hg²⁺ 对淀粉酶同工酶的活性抑制作用几乎将近 100%,较高的 Ca²⁺ 浓度对淀粉酶同工酶的活性也有不利的影响,抑制作用也比较明显,其他的重金属离子也不同程度的对淀粉酶同工酶具有抑制作用。

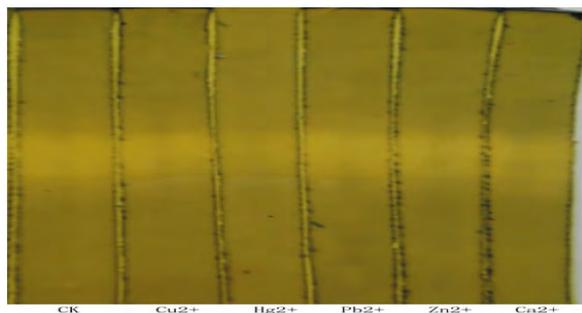


图 6 小麦种子中淀粉酶同工酶对金属离子的敏感性

3 结 论

小麦作为一种重要的粮食作物,属淀粉型种子,种子中的贮存物质主要是淀粉,种子萌发过程中需要大量淀粉酶参与。本文主要对萌发过程中的胚芽、胚乳、胚根中淀粉酶同工酶进行了图谱分析研究,并对淀粉酶同工酶条带数较多的萌发了 4 d 的胚乳中的淀粉酶同工酶进行了生化特性研

究。研究结果表明,在胚乳中的淀粉酶同工酶活性最高,数量也最多。萌发的小麦种子中淀粉酶同工酶最适 pH 为 5.2 左右,最适温度为 40℃左右,pH 在 5.0~9.0 范围内均具有较好的稳定性,0~50℃大部分淀粉酶同工酶基本上保持稳定;重金属离子 Hg²⁺ 对淀粉酶同工酶的抑制作用最为强烈,其他重金属离子在同等浓度下也不同程度的对淀粉酶起了抑制作用。

参考文献:

- [1] Beligni MV, Lamattina L. Nitric oxide stimulates seed germination and de-etiolation, and inhibits hypocotyls elongation, three light-inducible responses in plants[J]. *Planta*, 2000(210): 215-221.
- [2] Bethke PC, Badger MR, Jonew RL. Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues[J]. *Plant Cell*, 2004(16): 332-341.
- [3] 张华,孙永刚,张帆,等.外源一氧化氮供体对渗透胁迫下小麦种子萌发和水解酶活性的影响[J]. *植物生理与分子生物学学报*, 2005, 31(3): 241-246.
- [4] Simontacchi M, Jasid S, Puntarulo S. Nitric oxide generation during early germination of sorghum seeds [J]. *Plant Sci*, 2004, 167(4): 839-847.
- [5] 许开杰,史丽丽,刘曙东,等.农杆菌共培养条件对小麦种子萌发和幼苗生理生化特性的影响[J]. *西北植物学报*, 2011, 31(4): 697-706.
- [6] 金江玉,宋子明,史海莹,等. SDS-PAGE 凝胶电泳在鉴别水解蛋白掺假液态乳中的应用[J]. *中国乳品工业*, 2012, 40(7): 25-27.
- [7] 袁晓华,杨中汉,主编. *植物生理生化实验*[M]. 北京:高等教育出版社,1983: 233-246.
- [8] 胡晓倩,牛耀虎.赤霉素和钙离子浸种对小麦种子萌发及淀粉酶活力的影响[J]. *黄山学院学报*, 2009(5): 38-41.

(上接第 32 页)

- [1] Jane E F. Analysis of endosperm sugary in a sweet corn inbred (Illinois 667a) which contains the sugary enhancer (se) gene and comparison of se with other corn genotypes [J]. *Plant Physiology*, 1979(63): 416-420.
- [2] 韩俊.国内外甜玉米生产的现状与发展趋势[J]. *海南大学学报*, 1989, 7(3): 1-6.
- [3] 刘纪麟. *玉米育种学*[M]. 北京:农业出版社,1991.
- [4] 周淑梅,李小琴.甜玉米果皮厚度研究的综述[J]. *作物杂志*, 2003(5): 44-45.
- [5] 王振华.甜玉米品质性状与部分农艺性状的相关分析[J]. *玉米科学*, 1998, 6(2): 22-25.
- [6] 罗高玲,吴子恺.多隐纯合体甜玉米主要品质性状分析[J]. *种子*, 2005, 24(2): 7-12.

- [7] 谢大森,何晓明.超甜玉米农艺性状的遗传分析[J]. *西南农业学报*, 2003, 16(2): 117-119.
- [8] 王玉兰,乔春贵,王庆钰.甜玉米主要农艺性状的遗传参数研究[J]. *作物杂志*, 1994(1): 9-11.
- [9] 王玉兰,乔春贵,李楠,等.甜玉米籽实含糖量遗传研究初探[J]. *吉林农业科学*, 1993(4): 77-78.
- [10] 赵仁贵,牟琪,张健.加强型甜玉米含糖量性状的遗传研究[J]. *吉林农业大学学报*, 2000, 22(4): 32-35.
- [11] 杜茂林,苟才明,杨荣志,等.高原玉米杂交种主要农艺性状的相关与通径分析[J]. *西北农林科技大学学报*, 2004(增刊): 15-18.
- [12] 唐启义,冯明光. *实用统计分析及其 DPS 数据处理系统*[M]. 北京:科学出版社,2002.