

小麦种子中主要水解酶同工酶特性研究

李延红, 韩卓, 陈晓燕, 孙汉巨* (合肥工业大学生物与食品工程学院, 安徽合肥 230009)

摘要 [目的]研究小麦种子中主要水解酶同工酶的特性。[方法]采用聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)技术,分别对小麦种子萌发过程中胚芽、胚乳和胚根3个部位的淀粉酶、酯酶、蛋白水解酶的同工酶谱进行研究。[结果]在小麦种子胚乳中的淀粉酶、酯酶同工酶变化较为明显,而蛋白水解酶变化较大的则是在胚芽和胚根当中。[结论]该研究为今后有效提高作物种子的萌发率提供了基础资料。

关键词 小麦;萌发;淀粉酶;酯酶;蛋白水解酶

中图分类号 S512.1 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2013)10-04236-02

Study on Characteristics of Major Hydrolase Isozymes in Wheat Seeds

LI Yan-hong et al (College of Biology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei, Anhui 230009)

Abstract [Objective] The paper was to study the characteristics of major hydrolase isozymes in wheat seeds. [Method] The isozymes of amylase, esterase, proteolytic enzyme of the germ, endosperm and radicle three parts in the process of wheat seeds germination were analysed respectively by using polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) technique. [Result] The isozymes of amylase, esterase in the endosperm of wheat seeds changed significantly, while the isozymes of proteolytic enzyme exhibited a significant variation in the germ and radicle. [Conclusion] The study provided basic information for the future improvement of crop seed germination rate effectively.

Key words Wheat; Germination; Amylase; Esterase; Proteolytic enzyme

同工酶是指能催化同一化学反应,但其酶蛋白本身的分子结构、组成却有所不同的一组酶,是由不同基因或等位基因编码的多肽链,或是由同一基因转录生成不同 mRNA 翻译的不同多肽链组成的蛋白质^[1-3]。

小麦是一种重要的粮食作物,其种子中的贮存物质主要为淀粉,属淀粉型种子,种子萌发过程中需大量淀粉酶参与^[4]。有关于小麦种子中淀粉酶的研究也较多^[5-6],但定位于种子中的3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较多详细地报到。因此,笔者采用分辨率较高的聚丙烯酰胺凝胶电泳将酶蛋白进行分离,然后用相应的染色方法将其显示,对植物种子中的主要3种水解酶类淀粉酶、酯酶、蛋白水解酶进行同工酶谱分析,从而深入了解了植物种子中3大组织在种子萌发过程产生同工酶的特性,为今后进行下一步的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料。供试小麦品种为扬麦158 (*Triticum aestivum* L. cv. Yangmai 158),市售。

1.1.2 主要仪器。DYY-6B型稳压稳流电泳仪(北京六一);DYCZ-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。

1.2 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。

1.3 材料处理 选饱满、均一的小麦种子,用0.1% HgCl₂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℃恒温光照培养箱中光照培养,每天给萌发中的种子更换1次蒸馏水。

1.4 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3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,可冷冻保存在冰箱里备用。

1.5 PAGE电泳及同工酶染色 按常规制备T=10%的分离胶(pH 8.9)和T=4%的浓缩胶(pH 6.7)的垂直板状不连续系统凝胶^[7]。以0.05%的溴酚蓝染料做染色前沿,取20 μl粗酶液与甘油或40%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的醋酸缓冲液中37℃恒温放置1~2 h后取出,分别置于I₂-KI染色液、酯酶染色液、0.1%氨基黑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^[8]。

2 结果与分析

2.1 小麦中的淀粉酶同工酶谱分析 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,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,表明此时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同工酶条带逐渐增加。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

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基金项目(010AJZR0899)。

作者简介 李延红(1972-),女,陕西西安人,高级实验师,硕士,从事食品科学与工程研究,E-mail: yhl719@126.com。*通讯作者,教授,硕士生导师,博士,从事农产品加工与贮藏研究,E-mail: sunhanjv@163.com。

收稿日期 2013-03-08

后阶段(4~5 d)检测到有1~2条同工酶条带的增加。通过比较得出,萌发过程中存在于小麦种子胚芽、胚乳、胚根中的淀粉酶同工酶变化差异较大。这是因为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,胚乳中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^[9]。另外,为满足种子萌发代谢的需要,作为2个代谢活动比较活跃的部位胚芽和胚根,其合成和分泌的各种水解酶类往胚乳中运送的较多,这也可能是致使在胚芽和胚根中检测到的淀粉酶同工酶量不如胚乳中的原因。

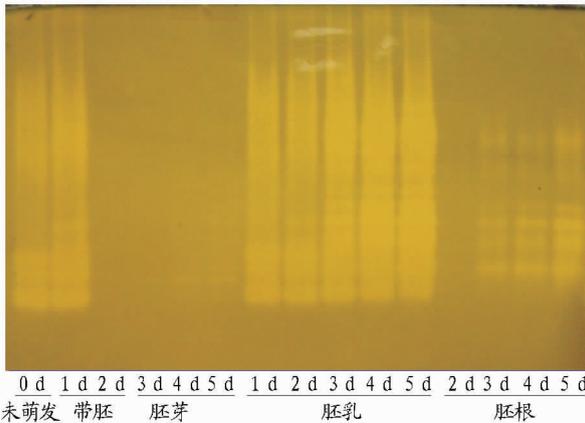


图1 小麦种子中萌发初期不同部位的淀粉酶同工酶谱带

2.2 小麦中的酯酶同工酶酶谱分析 小麦种子萌发过程中,除主要的淀粉代谢外,酯类代谢也是其关键的一环,其中酯酶一般可被作为研究发育时期基因表达和调控差异的一种标志酶^[10]。小麦种子萌发初期不同部位的酯酶同工酶图谱如图2所示,结果表明,酯酶活性最高的部位也是在胚乳中,在萌发的过程中(1~5 d)能明显看到酯酶同工酶条带的增加或缺失,并且同工酶的活性也有所增强或减弱,这说明在胚乳中,萌发过程中的酯类代谢调控发生了改变。相比胚乳,胚芽和胚根中的酯酶同工酶条带则很少,只在萌发初期(1~5 d)的后期阶段检测到有酯酶同工酶的出现。未萌发的干种子与萌发1 d后的带胚半粒种子和未带胚半粒种子(胚乳)的进一步比较(图3)显示,带胚的半粒种子在萌发1 d后有新的酯酶同工酶出现,而未带胚的半粒种子却未有新的酯酶同工酶出现,这提示了胚在酯酶的代谢调控上也起了很重要的作用。

2.3 小麦中的蛋白水解酶同工酶酶谱分析 蛋白质水解是生物体内蛋白质自然更新的一个重要代谢过程,在这一代谢中蛋白水解酶起着重要的作用^[11]。小麦种子中萌发初期不同部位的蛋白水解酶同工酶谱带如图4所示,结果表明,在萌发的小麦种子胚芽和胚根中能观测到蛋白水解酶条带,其中在胚芽中的蛋白水解酶条带最清晰,活性也最强,随着萌发的进行(1~5 d)蛋白水解酶活性有增强的趋势,证明蛋白质代谢最旺盛的部位是胚芽;在胚根中也观测到了几条蛋白水解酶同工酶谱带,但条带较模糊,活性不是很高;而在胚乳中则未观测到清晰的蛋白质水解酶同工酶条带。

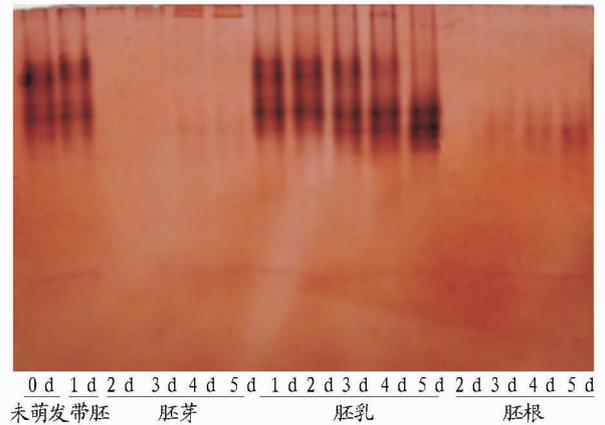


图2 小麦种子中萌发初期不同部位的酯酶同工酶谱带

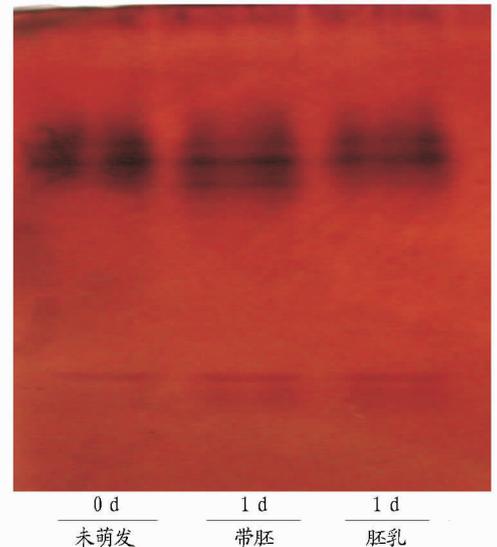


图3 小麦种子中萌发1 d后不同部位的酯酶同工酶谱带

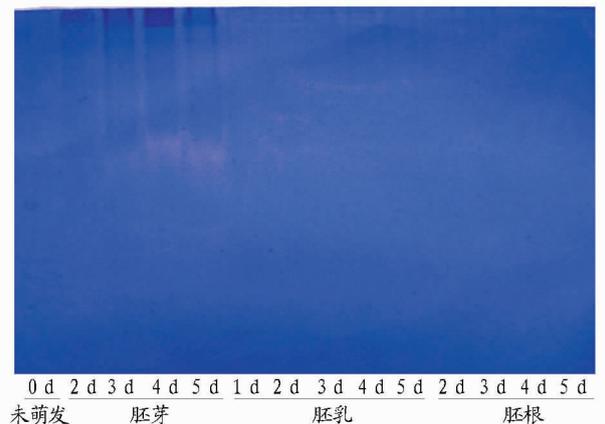
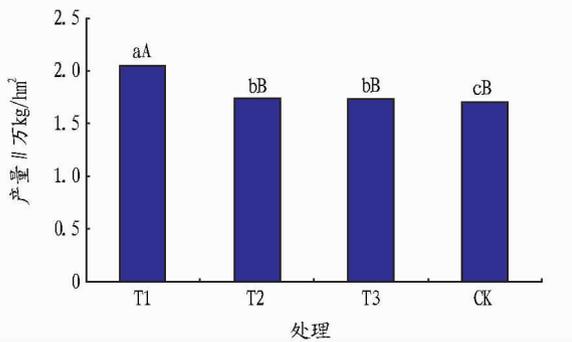


图4 小麦种子中萌发初期不同部位的蛋白水解酶同工酶谱带

3 结语

该研究对种子中3大组织部位胚芽、胚乳、胚根在萌发过程中的同工酶变化图谱进行了详细的分析,结果表明,在小麦种子胚乳中,淀粉酶、酯酶同工酶条带清晰可见,变化较明显,表明在胚乳中的淀粉酶、酯酶同工酶活性最高,数量也最多;在小麦种子胚芽中的蛋白水解酶条带最清晰,表明蛋白水解酶同工酶在胚芽中活性最强,蛋白质代谢最旺盛。

(下转第4298页)



注:不同处理间比较,无相同小写字母表示差异显著($P < 0.05$),无相同大写字母表示差异极显著($P < 0.01$)。

图5 不同处理的番茄产量

3 结论

以农业废弃物作为有机的基质栽培代替草炭土用于无土栽培的研究很多,增产效果也有很多报道^[14-15]。孙治强等研究表明:草炭也有与玉米秸秆相同的作用,但草炭需要开挖运输,成本高,而玉米秸秆则可就地取材,因此可以把腐熟的玉米秸秆代替草炭作为营养土基质^[16-17]。张志斌等研究表明,有机土壤栽培可促进大棚番茄生长,提高番茄产量和改善产品品质^[18]。陈双臣等研究表明:有机基质栽培有利于促进番茄的植株生长,改善根际理化结构,提高肥料利用率^[19-20]。该试验表明,采用人工营养土具有改善土壤理化性状,改善果实品质和提高番茄产量的效果。而采用秸秆含量比例最高的有机土配比对于促进增产和改善品质的效果最为显著。从产量来看,T1处理(秸秆:园土3:1)的产量最高,可作为有机营养土的基质栽培。同时,番茄果实的品质指标中的糖酸比和维生素C含量也是最高的,并且均与CK呈极显著差异。从长势来看,施入秸秆量最多的处理也是长得最好的。

参考文献

- [1] 杜社妮,程智慧. 种植模式对日光温室黄瓜、番茄生长发育及土壤生物特性的影响[D]. 杨凌:西北农林科技大学,2005.
- [2] 蔡晓布,钱成,张元. 西藏中部地区退化土壤秸秆还田的微生物变化特征及其影响[J]. 应用生态学报,2004,15(3):463-468.

(上接第4237页)

同工酶谱在基础研究和农、林、牧、副、渔、医、药、食品分析中应用十分广泛,分析同工酶谱是认识基因存在和表达的一种工具,在植物种群、发育及杂交遗传的研究中都有一定的重要性。今后结合该研究结果可开发环境友好型的生长调节剂或活性物质,从而有效提高作物种子萌发。

参考文献

- [1] BELIGNI M V, 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 P C, BADGER M R, JONEV R L. Apoplastic synthesis of nitric oxide by plant tissues[J]. *Plant Cell*, 2004, 16: 332-341.
- [3] YUAN D Y, SUN Z Z, TAN Y N, et al. Analysis of Gene Expression of Seven Isoforms of ADP-glucose Pyrophosphorylase in Rice Endosperm under Different Temperature Conditions[J]. *Agricultural Science & Technology*, 2012, 13(6): 1226-1229, 1233.
- [4] 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

- [3] 陈恩凤,周礼恺,邱凤琼. 土壤肥力实质的研究Ⅲ. 棕壤[J]. *土壤学报*, 1985, 22(2): 113-119.
- [4] 葛均青,于贤昌. 限根程度对黄瓜生长及光合特征的影响[J]. *西北农业学报*, 2004, 13(4): 174-178.
- [5] 张聿柏,李勤奋. 香蕉茎秆堆肥化处理腐熟度评价研究[J]. *中国农学通报*, 2009, 25(9): 268-272.
- [6] LAN S L, CAO X Z, DAI X Y, et al. The changes of nutrition elements during the composting chicken manure and rape straw under higher temperature[J]. *Journal of Agro-Environment Science*, 2009, 28(3): 564-569.
- [7] 黄懿梅,安韶山,白红英. 鸡粪与不同秸秆高温堆肥中氮素的变化特征[J]. *西北农林科技大学学报*, 2004, 32(11): 53-57.
- [8] 周礼恺. 土壤酶学[M]. 北京:科学出版社,1987:228,135-241.
- [9] 许光辉,郑元洪. 土壤微生物分析方法手册[M]. 北京:农业出版社,1986:255.
- [10] 关松荫. 土壤酶及其研究法[M]. 北京:农业出版社,1986:274-196, 266-288.
- [11] ALBIACH R, CANET R, POMANES F, et al. Microbial biomass content and enzymatic activities after the application of organic amendments to a horticultural soil[J]. *Bioresource Technology*, 2000, 75: 43-48.
- [12] MARCOTE I, HERNANDEZ T, GARCINDEZ T, et al. Influence of one or two successive annual applications of organic fertilizers on the enzyme activities of a soil under barley cultivation[J]. *Bioresource Technology*, 2001, 79: 147-154.
- [13] de CAIRE G Z, DE CANO M S, PALMA R M, et al. Changes in soil enzyme activities following additions of cyan bacteria biomass and exopolysaccharide[J]. *Soil Biol Biochem*, 2000, 32: 1985-1987.
- [14] 程斐,孙朝晖,赵玉国. 芦苇末有机栽培基质的基本理化性能分析[J]. *南京农业大学学报*, 2001, 24(3): 19-22.
- [15] 蒋卫杰,郑光华. 几种农业废弃物作为草炭替代物在无土栽培中的应用[J]. *农业工程学报*, 1998, 12(S1): 177-180.
- [16] 孙治强,李胜利. 几种无土栽培技术甜椒基质的比较[J]. *华中农业大学学报*, 2003, 22(3): 266-269.
- [17] 王红梅,黄光. 有机生态型基质对大棚甜椒生长的影响[J]. *安徽农业科学*, 2002, 30(4): 590-591, 597.
- [18] 张志斌,贺超兴,陈双臣. 不同基质对大棚番茄生长及产量品质的作用[J]. *西北园艺*, 2003(7): 10-13.
- [19] 陈双臣,刘爱荣,郑继亮. 不同有机基质对番茄生长的影响[J]. *北方园艺*, 2008(8): 1-3.
- [20] 李培军,蒋卫杰,余宏军. 有机肥营养元素释放的研究进展[J]. *中国蔬菜*, 2008(6): 39-42.
- [21] 赵征宇,孙永红,赵明,等. 有机无机肥配施对土壤氮素转化和番茄产量品质的影响[J]. *华北农学报*, 2013(1): 208-212.
- [22] 姜伟,王勇,曹继龙,等. 日光温室番茄需肥特点及其科学施肥技术研究[J]. *内蒙古农业科技*, 2012(5): 56-58.
- [23] 张丽菊. 葫芦岛市日光温室春茬番茄高产栽培探讨[J]. *园艺与种苗*, 2011(2): 11-12.
- [24] 廖军华,损尚忠,李强,等. 日光温室番茄调控技术[J]. *宁夏农林科技*, 2011, 52(12): 143-144.
- [25] 发和水解酶活性的影响[J]. *植物生理与分子生物学报*, 2005, 31(3): 241-246.
- [5] SIMONTACCHI M, JASID S, PUNTARULO S. Nitric oxide generation during early germination of sorghum seeds[J]. *Plant Sci*, 2004, 167(4): 839-847.
- [6] MEHMET DEMIR KAYA, GAMZE OKÇU, MEHMET ATAÇ, et al. Seed treatments to overcome salt and drought stress during germination in sunflower (*Helianthus annuus* L.). *European Journal of Agronomy*, 2008, 24(4): 291-295.
- [7] 金江玉,宋子明,海海莹,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.
- [8] 袁晓华,杨中汉. 植物生理生化实验[M]. 北京:高等教育出版社,1983: 233-246.
- [9] 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性的影响[J]. *黄山学院学报*, 2009(5): 38-41.
- [10] 王丹,郭萌萌,杜金华. 小麦与小麦芽阿魏酸酯酶活性的测定及其酶学性质研究[J]. *食品与发酵工业*, 2011, 37(5): 181-184.
- [11] 焦焱,谷运红,李景原,等. 离子束诱导大豆DNA转化小麦后代高蛋白株的RAPD标记分析[J]. *西北植物学报*, 2006, 26(9): 1878-1882.