

野生大豆植株中酰胺分布 和嘌呤降解酶活性*

朱长甫 苗以农 杨文杰 李雪梅 许守民 刘学军

(东北师范大学生物系)

郑惠玉 徐 豹 杨光宇

(吉林省农科院大豆所)

提 要

野生大豆植株中,合成酰胺的三种关键酶中的黄嘌呤脱氢酶,尿酸酶只存在于根瘤中,而尿囊素酶存在于所有器官。茎和荚皮中的尿囊素和尿囊酸含量较高,茎尿囊素和尿囊酸含量高峰在结荚后期。荚皮尿囊素和尿囊酸含量在结荚初期最高,以后迅速下降,根瘤尿囊素酶活性较其它器官高,在整个生育期中以结荚后期最高。荚皮中尿囊素和尿囊酸含量明显高于籽粒,而籽粒中尿囊素酶活性是荚皮1—3倍。

关键词 野生大豆;酰胺;黄嘌呤脱氢酶;尿酸酶;尿囊素酶

酰胺(尿囊素和尿囊酸)在栽培大豆氮代谢中起着重要作用,栽培大豆植株中酰胺分布及酰胺合成和水解酶都已有过研究^[1,6,7,9,10]。但野生大豆植株组织中酰胺分布及嘌呤降解酶活性尚未见报导。本文对野生大豆植株各部位酰胺含量和嘌呤降解酶活性进行了检测,对尿囊素酶活性分布进行了较细致研究。

材 料 与 方 法

试验材料为野生大豆[*Glycine soja* sieb. et Zucc.] GD5004-3,于1990年4月25日种

* 国家自然科学基金资助课题

本文于1991年12月9日收到。This paper was received on Dec. 9, 1991.

植在东北师大校园试验田内,在营养生长期、开花期、结荚初期、结荚中期、结荚后期和成熟始期采样,测各器官尿囊素和尿囊酸含量及尿囊素酶活性。结荚初期测各器官黄嘌呤脱氢酶、尿酸酶和尿囊素酶活性。

尿囊素和尿量酸含量测定按 Vogels 和 Van der Drift 法^[11]。

尿囊素酶活性(活体)测定同前文^[2]。

嘌呤降解酶的离体测定:

1. 酶提取液的制备样品置于预冷(4℃)的研钵中,加入样品重 1/2 倍的聚乙稀吡咯烷酮(PVP)和 5 倍(V/W)样品重量的、由含 0.05mol/L NaCl,7m mol/L β-巯基乙醇和 1m mol/L EDTA 的 0.05mol/L Tris-HCl(pH7.5)组成的匀浆介质研磨,四层纱布过滤,滤液用冰冻离心机 RS-20 Ⅲ 型(日本)20,000g 离心 20min(4℃),上清液即为酶提取液。

2. 酶活性测定所有酶分析均在 32℃条件下进行。黄嘌呤脱氢酸活性参照 Christensen 的方法^[5]测定。酶反应体系中含 75m mol/L Tris-HCl(pH8.6),0.5m mol/L NAD,0.25m mol/L 次黄嘌呤以及 0.1—0.2ml 酶液,对照不加次黄嘌呤。酶活性的表示以 0.001 光密度之增加值(ΔOD)·min⁻¹·mg⁻¹蛋白为一个活力单位。

尿酸酶活性是根据尿酸的氧化,测定 293nm 吸光值的减少^[5]。酶反应体系中含 85m mol/L 甘氨酸—NaOH(pH10.0),50n mol/L 尿酸以及 0.1—0.2ml 酶液。以 0—0.1m mol/L 尿酸溶液制作标准曲线,酶活性表示为 n mol 尿酸的氧化·min⁻¹·mg⁻¹蛋白。

尿囊素酶活性是以其产物尿囊酸形成为基础测定的^[5]。酶反应体系中含有 20m mol/L Tris-HCl(pH7.6),2.5m mol/L 尿囊素以及 0.1—0.2ml 酶提液。于 32℃保温,分别在 0,5 和 10min 时取样,按 Vogels 和 Van der Drift 法^[11]测定尿囊酸含量。酶活性表示为 n mol 尿囊酸·min⁻¹·mg⁻¹蛋白。

酶提取液中蛋白质含量按 Brandford 法测定^[4]。

结果与分析

一、不同器官嘌呤降解酶活性分布

表 1 结荚初期不同器官嘌呤降解酶活性

Table 1 Enzyme activity of purine catabolism in different organs of early pod stage

酶*	根 瘤	根	茎	叶	荚 皮	籽 粒
Enzymes	Nodules	Roots	Shoots	Leaves	Pod shells	Seeds
黄嘌呤脱氢酶 Xanthine dehydrogenase(XDH)	35	0	0	0	0	0
尿酸酶 Uricase	52.51	0	0	0	0	0
尿囊素酶 Allantoinase	804.39	379.16	436.65	307.78	122.40	350.58

* 酶活性单位,黄嘌呤脱氢酸(XDH)以光密度增加 0.001·min⁻¹·mg⁻¹蛋白为一个活力单位;尿酸酶为 n mol 尿酸的氧化·min⁻¹·mg⁻¹蛋白;尿囊素酶为 n mol 尿囊酸·min⁻¹·mg⁻¹蛋白。

The unit of enzymes activity, XDH, 0.001 OD in creased·min⁻¹·mg⁻¹protein; Uricase, n mol uric acid formed·min⁻¹·mg⁻¹ protein; Allantoinase, n mol allantoinic acid formed·min⁻¹·mg⁻¹ protein

Table 2 Partition of allantoin and allantoic acid in wild soybean during plant development. Unit: $\mu\text{mol} \cdot \text{g}^{-1}\text{FW}$

测定部位 Determined parts	营养生长期 Vegetative		花期 Flowering		结荚初期 Early pod		结荚中期 Mid pod		结荚后期 Late pod		成熟始期 Early maturing	
	尿囊素 Allantoin	尿囊酸 Allantoic acid	尿囊素 Allantoin	尿囊酸 Allantoic acid	尿囊素 Allantoin	尿囊酸 Allantoic acid	尿囊素 Allantoin	尿囊酸 Allantoic acid	尿囊素 Allantoin	尿囊酸 Allantoic acid	尿囊素 Allantoin	尿囊酸 Allantoic acid
幼叶 Young leaves	0.30	2.67	0.39	0.47	0.81	2.14	0.82	0.74	0.61	0.84	—	—
长成叶 Fully expanded leaves	0.30	1.24	0.48	0.29	0.70	0.97	0.52	0.59	0.57	1.23	0.02	0.56
上部茎 Upper stems	3.22	5.98	0.44	1.95	2.08	8.76	3.90	37.90	2.19	49.47	1.60	7.01
中部茎 Middle stems	1.61	2.27	0.69	0.93	3.22	10.69	5.10	5.96	5.81	30.47	1.30	3.66
下部茎 Lower stems	2.87	1.83	0.41	1.05	5.51	8.75	4.96	8.27	0.64	37.43	0.60	0.36
根 Roots	1.91	2.37	0.11	2.03	0.97	2.39	3.05	6.64	3.06	2.87	0.72	1.43
根瘤 Nodules	1.78	1.54	1.90	2.52	1.21	3.93	1.87	2.16	2.53	4.61	0.10	0.47
花 Flowers			1.18	3.04								
上部荚皮 Upper pod shells					15.47	18.29	4.51	3.31	3.22	2.24	0.47	2.60
上部籽粒 Upper seeds					2.76	2.63	0.81	1.06	0.69	0.74	0.74	0.71
中部荚皮 Middle pod shells					24.39	21.73	2.52	1.43	0.84	0.96	0.62	0.87
中部籽粒 Middle seeds					2.76	2.70	1.15	0.84	0.64	0.44	0.46	0.60
下部荚皮 Lower pod shells					9.68	18.34	4.93	3.64	2.30	2.02	—	—
下部籽粒 Lower seeds					2.83	2.80	1.06	0.69	0.77	0.46	—	—

野生大豆嘌呤降解的三种酶都存在于根瘤中,其它器官则无黄嘌呤脱氢酶和尿酸酶活性(表 1),表明酰胺合成是在根瘤中进行的,然后运至地上部位。所有器官都有尿囊素酶活性,表明从根瘤运至各器官的尿囊素在所有器官中都可以被降解。

二、不同器官中的尿囊素和尿囊酸含量

不同器官中尿囊素和尿囊酸含量明显不同(表 2)。幼叶尿囊素和尿囊酸含量高于长成叶,叶片中尿囊素和尿囊酸含量在整个生育期中无明显规律性变化。根和茎尿囊素和尿囊酸含量在营养生长时期较高,开花期降低,以后逐渐增加至结荚后期最高,成熟始期迅速下降。结荚后期尿囊素和尿囊酸含量的降低可能是尿囊素和尿囊酸从茎运出(此期荚果是主要库)或降解和同化为其它含氮化合物所致。这与栽培大豆研究结果相似^[3]。不同节位茎中尿囊素和尿囊酸含量明显不同。花器官中也含有酰胺,而以尿囊酸居多,占酰胺总量的 72%。

三、不同器官中的尿囊素酶活性

由表 3 可见,根瘤中尿素酶活性较其它器官高。根瘤、根、茎和叶尿囊素酶活性在营养生长时期较高,以后逐渐下降,结荚初期后迅速增加,至结荚后期最高,成熟始期迅速下降。

四、生殖生长时期荚皮和籽粒中尿囊素和尿囊酸含量及尿囊素酶活性

表 3 野生大豆生育期间尿囊素酶活性的分布 单位:μmol 尿囊酸·min⁻¹·g⁻¹Fw

Table 3 Partition of allantoinase activity in wild soybean during plant development

Unit:μmol allantoinic acid·min⁻¹·g⁻¹Fw

测定部位 Determined parts	营养生长期 Vegetative	花 期 Flowering	结荚初期 Early pod	结荚中期 Mid pod	结荚后期 Late pod	成熟始期 Early maturing
幼 叶 Young leaves	8.31	6.10	3.14	9.03	17.53	-
长成叶 Fully expanded leaves	5.70	3.85	3.58	11.08	15.72	3.24
上部茎 Upper stems	6.83	2.97	4.16	12.27	23.28	4.02
中部茎 Middle stems	5.17	4.94	4.61	15.13	30.24	3.50
下部茎 Lower stems	9.24	9.48	3.87	19.61	30.70	2.01
根 Roots	7.61	3.16	4.12	12.42	13.52	6.60
根 瘤 Nodules	24.74	13.48	10.55	25.17	35.10	5.52
花 Flowers		5.83				
上部荚皮 Upper pod shells			6.93	13.04	19.22	4.83
上部籽粒 Upper seeds			8.92	32.46	25.95	10.12
中部荚皮 Middle pod shells			6.04	14.73	12.97	0.92
中部籽粒 Middle seeds			8.09	28.57	28.27	28.65
下部荚皮 Lower pod shells			5.91	13.31	15.67	-
下部籽粒 Lower seeds			7.39	21.24	22.49	-

如表 2 所示,同一节位荚皮和籽粒中尿囊素和尿囊酸含量在结荚初期较高,以后迅速

下降。荚皮和籽粒中尿囊素酶活性在结荚后期最高(表 3)。荚皮中尿囊素和尿囊酸含量明显高于籽粒,而籽粒中尿囊素酶活性高于荚皮 1—3 倍(表 3)。

讨 论

嘌呤降解酶在不同器官中分布是不同的,仅在根瘤中有黄嘌呤脱氢酶和尿酸酶活性,在其它器官中没有发现有黄嘌呤脱氢酶和尿酸酶活性,所有器官都有尿囊素酶活性。这些酶分布表明,酰胺的形成是首先合成嘌呤,然后这些新合成的物质发生降解,最后产生酰胺,而根瘤是嘌呤降解产生酰胺的主要器官。而在根瘤中产生的酰胺一部分被运至地上部,经尿囊素酶降解。野生大豆酰胺合成途径与栽培大豆一致^[6,9]。

不同节位荚皮和籽粒中尿囊素和尿囊酸含量明显不同(表 2),荚皮中尿囊素和尿囊酸含量明显高于籽粒,而籽粒中尿囊素酶活性高于荚皮 1—3 倍(表 3),与栽培大豆荚皮和籽粒中的酰胺分布及尿囊素酶活性分布一致^[2]。籽粒中尿囊素和尿囊酸含量较低可能是由于籽粒中较高的尿囊素酶活性将从荚皮转运来的尿囊素迅速地降解同化或荚皮中的尿囊素和尿囊酸先降解转化为氨基酸,然后转运至籽粒的结果。

参 考 文 献

- [1] 杜维广,1987,大豆生育期间尿囊素和尿囊酸的分配和运输,大豆科学 6(3):197—202
- [2] 朱长甫,苗以农,李国文,1990,大豆植株中酰胺分布和尿囊素酶活力,植物生理学通讯(6):27—29
- [3] 朱长甫,苗以农,梁秀英,1990,大豆不同品种的酰胺和酰胺相对丰度比较,大豆科学 9(4):309—315
- [4] Bradford M. M. 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the protein-dye binding. Anal Biochem. 72:248-254
- [5] Christensen T. N. and Jochimsen B. U. 1983, Enzymes of ureide synthesis in pea and soybean. Plant Physiol. 72: 56-59
- [6] Fujihara S. and Yamaguchi M. 1978, Effects of allopurinol (4-hydroxypyrazolo (3, 4d) pyrimidine) on the metabolism of allantoin in soybean plants. Plant Physiol. 62:134-138
- [7] Matsumoto T., Yamazawa M. and Yamamoto Y. 1978, Allantoin metabolism in soybean plants as influenced by grafts, a delayed inoculation with *Rhizobium*, and a late supply of nitrogen-compounds. Plant Cell Physiol. 19:1161-1168
- [8] Patterson T. G. and LaRue T. A. 1983, N₂ fixation(C₂H₂) and ureide content of soybeans; Ureides as an index of fixation. Crop Sci. 23:825-831
- [9] Tajima S. and Yamamoto Y. 1975, Enzymes of purine catabolism in soybean plants. Plant Cell Physiol. 16:271-282
- [10] Tajima S. and Yamamoto Y. 1977, Regulation of uricase activity in developing roots of *Glycine max*, non-nodulating variety A₆₂-2. Plant Cell Physiol. 18:247-253
- [11] Vogels G. D. and C. Van der Drift. 1970, Differential analyses of glyoxylate derivatives. Anal Biochem. 33:143-157.

PARTITION OF UREIDE CONTENT AND ENZYMES OF PURINE CATABOLISM IN WILD SOYBEAN PLANTS

Zhu Changfu

Miao Yinong

Yang Wenjie

Li Xuemei

Xu Shoumin

Liu Xuejun

(Biology Department, Northeast Normal University)

Zheng Huiyu

Xu Bao

Yang Guangyu

(Soybean Institute, Jilin Academy of Agricultural Science)

Abstract

Remarkable formation and utilization of allantoin and allantoic acid were observed in wild soybean (*Glycine soja*). To study this, various enzymes involved in purine catabolism (i. e. xanthine dehydrogenase(XDH), uricase and allantoinase) were measured in different organs of wild soybean in early pod stage. XDH and uricase only exist in root nodules while allantoinase exists in all organs measured. Allantoin and allantoic acid contents are higher in shoots and pod shells than those in other measured organs. Allantoin and allantoic acid contents in shoots peaked during late pod stage while the peak of allantoin and allantoic acid contents in pod shells was in early pod stage. Although the contents of allantoin and allantoic acid in pod shells were higher than those of seeds, allantoinase activity had been shown to be greater in the seeds than that in pod shells. Allantoinase activity in the seeds was as 1 to 3 times as that in the pod shells.

Key words Wild soybean; Ureides; Xanthine dehydrogenase(XDH); Uricase; Allantoinase