

大豆种子脂肪氧化酶同工酶 缺失体的超弱发光研究^{*}

苏 震 徐文英^① 张仲纶 马玉琴
傅翠真^② 郑雁珍 刘成祥

(中国科学院生物物理所 100101 ① 北京植物细胞生物
工程实验室 100081 ② 中国农业科学院品种资源所 100081)

摘 要

利用超弱发光方法对具有不同脂肪氧化酶同工酶缺失体的大豆种子进行整体水平上的测试,跟踪测量了在种子吸涨到萌动以及发芽的全过程中大豆种子超弱发光的变化,并且测定了它们的发光谱线。探索用发光强度鉴别是否有缺失Lox3异型材料的可能性和有效性;同时通过超弱发光发射光谱的差异来进一步研究不同大豆种子Lox缺失体的差异;试图开辟一条研究Lox生理意义的新途径。

关键词 超弱发光;发射光谱;大豆种子;脂肪氧化酶;同工酶缺失体

引 言

脂类物质在空气中有氧存在时,均有超弱发光现象(又称低水平化学发光,Low-level Luminescence,简称CL),这是由于脂类物质自由基氧化的结果。脂肪氧化酶(Lipoxygenase,简称Lox,在大豆种子中有Lox1,Lox2,Lox3三种同工酶)与脂肪酸反应时有氧自由基和单线态氧($^1\text{O}_2$)的出现。Boveris等人已证明实了Lox对亚油酸的催化反应是超弱发光的重要来源。对每个共轭双键,CL产率为 $2.5\sim 3.3\times 10^{-14}$ 光子/秒,并且必须在有氧条件下^[1]。Kanofsky和Axelrod利用红外化学发光证实了Lox反应过程中可以产生单线态氧^[2]。目前国外有不少报道利用CL来测定Lox活性,如日本的Yasuo Kondo等人用CL-HPLC系统来检测被真菌侵染后大豆苗期Lox活性变化^[3]。

目前利用超弱发光来进行Lox同工酶缺失体材料分析以及测定特征的发射光谱还未见报道。本实验在以前工作的基础上^[4],利用超弱发光方法对具有不同Lox同工酶缺

^{*} 本文于1996年11月8日收到。

This paper was received on Nov. 8, 1996.

失体的大豆种子进行整体水平上的测试,进一步探索用发光强度鉴别是否有缺失 $Lox3$ 异型材料的可能性和有效性。同时跟踪测量了在种子吸涨到萌动以及发芽的全过程中大豆种子超弱发光的变化,并且测定了它们的发光谱线,试图开辟一条研究 Lox 生理意义的新途径。

材料与方法

1 材料

引进美国 Century 品种及与该品种等位基因系缺失 $Lox1(-Lox1)$ 、缺失 $Lox2(-Lox2)$ 、缺失 $Lox3(-Lox3)$ 、缺失 $Lox1.3(-Lox1.3)$ 、缺失 $Lox2.3(-Lox2.3)$,均由中国农科院作物所提供。

2 智能化微弱发光测量仪

由中国科学院生物物理所与科龙公司联合研制,灵敏度为 10^{-12} A,标准差小于 0.8%。

3 光谱分析

用 16 片干涉滤光片,波长 400–800nm,间隔 15–20nm,对透光率、光电倍增管探测效率和半宽度进行校正。

4 种子培养方法

取 10–15 粒大豆种子,先用 40°C 温水浸泡,放入 25°C 恒温箱中(黑暗条件) 8 小时。继而出取种子,放入铺有湿润滤纸的培养皿中,此时为测量零点。继续放入 25°C 恒温箱中培养。

5 发光测量方法

取 10 粒培养大豆种子,在完全避光的条件下,随机铺满测量窗,测量时间 10 秒。

结果与讨论

1 大豆种子发芽前后超弱发光强度变化

从大豆种子发芽前后种子超弱发光强度随时间变化过程(见图 1)可看出, Century 系列各品系的发光变化趋势具有一致性,即在吸涨到充分吸胀过程中(约前 5 小时),超弱发光强度呈上升趋势,完全吸胀后,发光强度随时间延长开始下降, 24 小时左右降至最低点,然后开始上升。这一过程与文献中报导的脂肪氧化酶活性变化曲线相一致,表明在发芽过程中有新的 Lox 产生。目前有关大豆发芽后新的 Lox 同工酶产生的研究已很深入, Tomohiko Kato 等人(1992)报道,在种子发芽后,子叶中产生新的 Lox ,他们从发芽大豆子叶的基因文库中分离出三种不同的 cDNA,它们在核酸序列与编码大豆种子 $L-1$, $L-2$, $L-3$ 的基因有同源性,但并非一致,称为 $L-4$, $L-5$ 和 $L-6$ 并且他们还研究了由大豆种子萌动到发芽过程中 Lox 活性的变化,在 24 小时内,两个品种的种子 Lox 活性都下降, 24 小时后,它们的活性逐渐升高^[5],这与我们跟踪测定大豆发芽前后超弱发光变化曲线非常奇妙地吻合(图 1)。跟踪测定大豆发芽过程中超弱发光强度的变化,可以使我们有意识

地选择种子萌动最激烈,发光强度最高的时间测定不同 Lox 缺失体品系的发光强度,用来鉴别不同基因型的 Lox 缺失体。

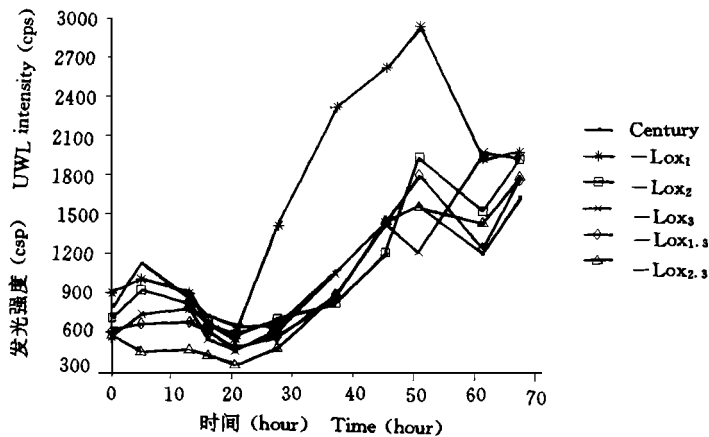


图 1 大豆种子发芽过程中超弱发光强度变化

Fig. 1 Changes of UWL intensity of soybean seeds during germination

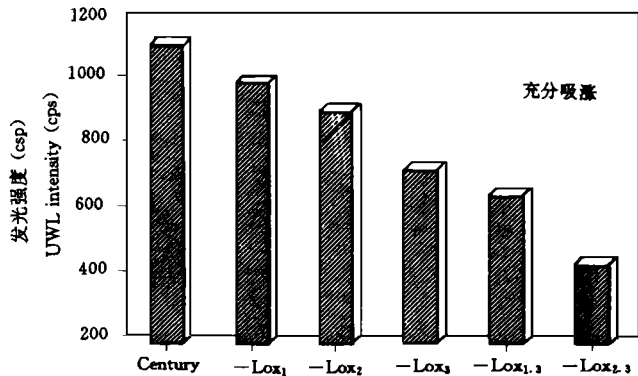


图 2 同一时间不同大豆种子 Lox 缺失体的超弱发光强度

Fig. 2 UWL intensity of different cultivars in 5th hour of germination

在未发芽种子中, Century 品种比其 Lox 缺失体的超弱发光强度高,尤其是 $-Lox_3$ 的材料(包括 $-Lox_{1.3}$ $-Lox_{2.3}$)发光强度最低(见图 2)。但随时间变化,种子发芽后,不管是 Lox 缺失体还是非缺失品系,它们的发光强度都增加,到最后达到同一水平(见图 1)。Tomohiko Kato. 等人也报道在未发芽种子中,通常栽培种中 Lox 活性比 $-Lox_{2.3}$ 的高^[5]。脂肪氧化酶与多元不饱和脂肪酸(如亚油酸)反应产生 13- 氢过氧化脂肪酸的过程中,有一个产生单线态氧的附加反应, Lox_3 在任何条件下都可形成单线态氧, Lox 在低氧浓度条件下产生单线态氧。 Lox_2 对此反应不敏感。所以 Lox_3 对种子产生的超弱发光影响最大,这也可能是 $-Lox_3$ 材料的发光强度最低的原因之所在。

2 Century 各品系种子萌动期超弱发光发射光谱的差异

图 3 是 Century 系列种子在培养后 17 小时所测的超弱发光发射光谱图,此时发光强度接近最低点(见图 1)。由图可见, Century 品种在 575, 620, 710nm 处有三条发射谱带,最大光峰位于 710nm 处。各品系的发射光谱存在很大的差异性,但不无规律可循, Century -

Lox 1 - Lox 2 - Lox 3 - Lox 2. 3在 620nm 处有一个发光峰,只有 - Lox 1. 3在此处为谷;而且 - Lox 1. 3与 - Lox 2的发射光谱有很好的互补性,二者谱线的合成与 Century 发射光谱很相近;- Lox 和 - Lox 2. 3也有互补效应,在 710nm 处 - L2. 3有一个高峰,而 - Lox 1恰好是一个低谷. 发光峰所在位置 575, 620, 710nm 都是单线态氧的发射谱线. $^1\text{O}_2$ 可以与双键分子反应生成激发态羰自由基 ($\dot{\text{C}} = \text{O}$),当 $\dot{\text{C}} = \text{O}$ 退激时有光子发射 (475-490nm),这一现象在光谱中也有所反映 所以可以通过超弱发光发射光谱的差异来进一步研究不同大豆种子 Lox 缺失体的差异

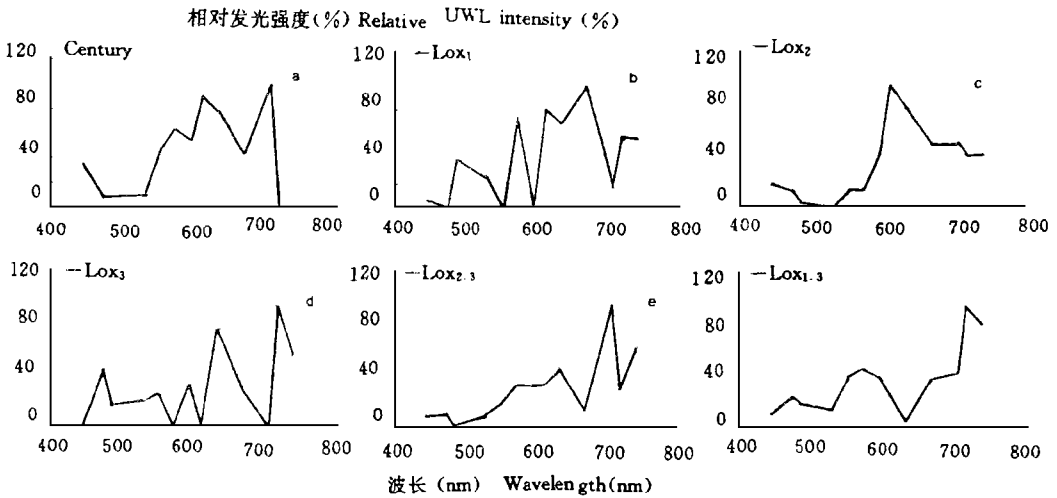


图 3 Century 系列种子培养 17 小时的超弱发光发射光谱

Fig. 3 UWL spectra of century line seeds after germination 17 hr

3 发芽后 Century 品系超弱发光发射光谱的变化

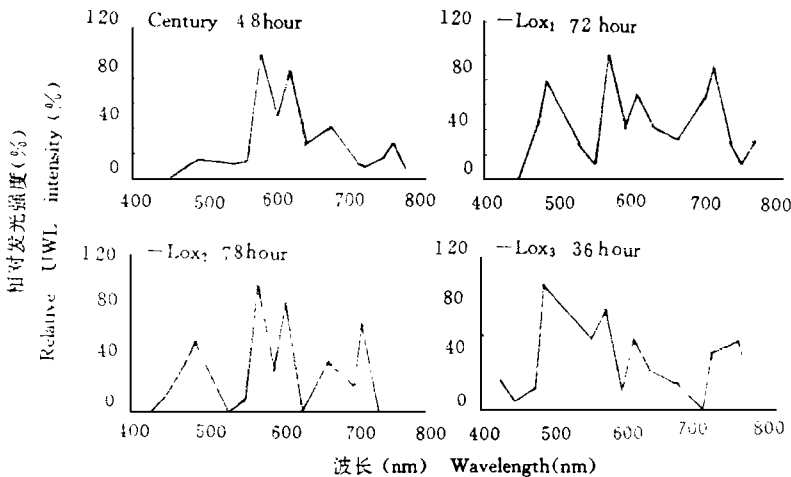


图 4 Century 品系种子发芽后超弱发光光谱

Fig. 4 UWL spectrum of century line after sprouting

发芽后 Century 品系超弱发光光谱发生了根本性的变化,最为明显的是在某一时期 Century 品系的发射光谱都出现了一个“双峰”结构,即在 575nm 和 620nm 处各有一个发光峰,且 575nm 的发光值比 620nm 的高(见图 4),这也许是新 Lox 出现的标志或特征。在发芽过程中也可以发现类似种子萌动期对应缺失体的发射光谱互补现象,如图 5 所示, - $Lox1.3$ 在 575nm 处有一高峰,而 - $Lox2$ 在此处是一个低谷。这也反映了不同 Lox 缺失体的差异,说明新 Lox 的出现也受到缺失体基因型的影响。

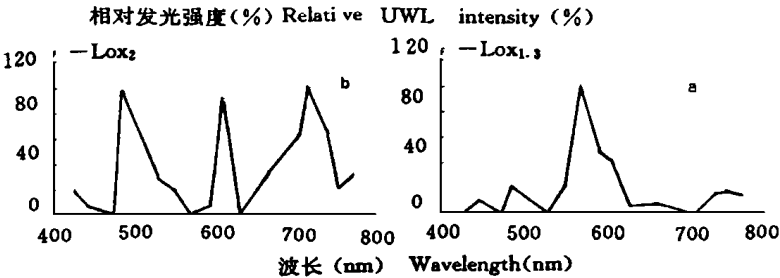


图 5 - $Lox2$ 、- $Lox1.3$ 品系种子 48 小时(发芽后超弱发光光谱)

Fig. 5 UWL spectrum of - $L2$, - $L1.3$ after germination 48 hr

4 受伤后大豆种子发光强度及光谱的变化

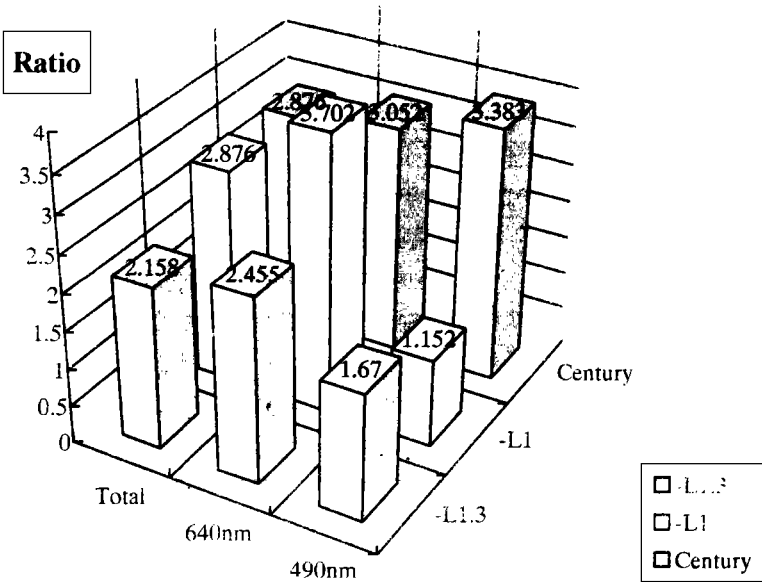


图 6 损伤前后大豆种子发光强度变化

Fig. 6 Changes of UWL intensity and spectra of soybean seed after wounded

已发芽的大豆种子,去除芽前后的发光变化列于表 1,可以看到,无论是发光总值还是在特定波长上,损伤后大豆种子的发光大大高于损伤前。从总发光强度上看,损伤后大豆种子的发光强度是损伤前的两倍以上, - $Lox1.3$ 增加略低一些,差别不大(见图 6)。但从不同波长来比较,不同缺失体在不同波长差异较大, Century 品种在红光区(640nm)和蓝光区(490nm)都增加较高,490nm 处略高一些,而 - Lox 在红光区(640nm)增加最大,在

蓝光区 (490nm)却增加最小; - Lox 1. 3在两个波长处也有不同的变化;可以预见受伤后大豆种子的发射光谱将会发生一定的变化,且不同缺失体的变化也不尽相同

表 1 大豆种子受伤前后发光强度的变化

Table 1 Change of UWL intensity of soybean seed after wound

	Certury	- Lox1	Lox 1. 3		Cer tury	- Lox 1	Lox 1. 3
总值 (受伤前)	2744	2445	3843	640nm(受伤后)	412	174	275
总值 (受伤后)	7892	7031	8293	490nm(受伤前)	256	270	370
640nm(受伤前)	135	47	112	490nm(受伤后)	866	311	618

结 论

从种子萌动但未发芽前的超弱发光强度可以看出,常规品种的发光强度比缺失材料的高,尤其是 - Lox 的材料,从而有利于我们用发光强度鉴别是否有 - Lox 3异型材料成为可能.另外从大豆种子超弱发光光谱来看,不同缺失体间的差异较大,有可能作为对大豆种子脂肪氧化酶同工酶缺失体进行研究的新指标.

生物活体的超弱发光是与机体的能量代谢,氧化代谢和毒性效应有关,是一项很灵敏的生物物理指标.通过这种方法,可以在整体水平上来了解 Lox对大豆生长发育的影响,并且也可以跟踪不同阶段,新 Lox 的出现情况.发芽到一定程度后,即根超出种子长度 2 - 3倍时,超弱发光强度又到另一个高峰(见图 1),这很可能是由于新的 Lox 的作用而产生的.发芽后新 Lox 产生的生理意义是目前研究的一个“热点”,比较一致的看法是:植物中生长调节物质茉莉酮酸(JA)的生物合成只有靠 Lox, Lox催化亚麻酸产生 13- 氢过氧化亚麻酸,再经过一系列反应合成茉莉酮酸. JA在植物生长发育过程中起很重要的作用,还是一种对受伤和病原菌侵入的防御反应的中介物质.这也可能与大豆子叶受伤后超弱发光急剧上升有关(见表 1 图 7). Lox 具有如此重要的生理意义,为了保证正常生长发育,大豆在苗期势必需要 Lox 存在.大豆种子 Lox 缺失体能正常生长,且农艺性状未受影响,这从另一个侧面反应了大豆苗期有新的 Lox 产生.当前对 Lox 和 CL 关系的研究渗透到各个领域,需要从生物物理学,生理生化,植物遗传育种多个角度来研究.

参 考 文 献

[1] Abeles, F. B., Ann. Rev. Plant Physiol., 1986, 3: 49- 72
[2] Kanofsky, J. R. et al., J. Biol. Chem., 1986, 261: 1099- 1104
[3] Yasuo Kondo et al., Biochimica et Biophysica Acta, 1992, 1127: 227- 232
[4] 徐文英等,大豆科学,1995, 14(3): 209- 213
[5] Tomohika Kato et al., Plant Physiol., 1992, 98: 324- 330

STUDY ON ULTRAWEAK BIOLUMINESCENCE OF SOYBEAN SEEDS LACKING ONE OR MORE LIPOXYGENASE ISOZYMES

Su Zhen Xu Wenying¹ Zhang Zhonglun
Ma Yuqin Fu Cuizhen² Zheng Yanzhen Liu Chengxing

(*Institute of Biophysics, The Chinese Academy of Science, Beijing 100101, P. R. China¹, Beijing Plant Cell Bioengineering Lab. Beijing 100081, P. R. China, and² Institute of Crop Germplasm Resources, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, P. R. China*)

Abstract

We used ultraweak bioluminescence (UWL) to analyze the soybean seeds lacking lipoxygenase (Lox) isozymes and detect their ultraweak light emission spectrum. The changes in ultraweak bioluminescence intensity and spectrum during germination of soybean seeds were studied. UWL intensity and emission spectrum reflected the relationship between UWL and Lox. It is possible to detect soybean seed lacking L-3 by UWL intensity. Moreover, discussion is shown here on the physiological change during germination. This work may help us to research the physiology role of lipoxygenase.

Key words Ultraweak bioluminescence spectrum; Soybean seed; Lipoxygenase
Lipoxygenase- lacking cultivar

欢迎订阅 1998年《中国油料》

《中国油料》是中国农科院油料作物研究所主办的油料作物专业科技刊物。公开发行, 季刊。主要刊登油菜、大豆、花生、芝麻、向日葵、胡麻、红花及其它油料作物有关品种资源、遗传育种、耕作栽培、生理生化、综合加工利用以及品质测试技术方面的论文、研究报告、应用技术、综述、动态等文稿。可供农业科研、教学和生产部门的技术人员参考。

每期定价 3.00元, 全年 12.00元。国内代号: 38-13, 全国各地邮局均可订阅。漏订者可直接寄款本刊编辑部订购。

地址: 湖北 武汉市 武昌保集安 油料所 邮编: 430062