

# 大豆脂肪氧化酶缺失体检测方法研究<sup>\*</sup>

傅翠真

(中国农业科学院作物品种资源研究所, 北京 100081)

**摘要** 薄层等电聚焦电泳技术(IEF)具有准确、快速、分辨率高的特点。作者对 IEF—PAGE 电泳制胶及酶染技术进行改进, 应用于大豆脂肪氧化酶同工酶类型鉴定, 获得很好效果, 大大降低实验成本, 为此, 作者研究制定了一套准确、简便的大豆脂肪氧化酶缺失体检测方法。

**关键词** 大豆; IEF—PAGE; 脂肪氧化酶缺失体

**中图分类号** S 565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000—9841(2004)02—0111—03

大豆脂肪氧化酶(Lipoxygenase, 简称 Lox)亦称脂氧合酶, 是一种非血红素铁的蛋白质。它催化具有顺, 顺—1,4—戊二烯结构的多元不饱和脂肪酸的加氧反应, 形成过氧化氢衍生物, 最后分解成小分子的醛、醇、酮等挥发性物质, 产生豆腥味和苦涩味。选育脂肪氧化酶同工酶缺失的大豆种质, 可有效地解决豆腥味难题。

大豆种子中存在约占蛋白含量 1%—2% 的脂肪氧化酶, 其分子量为 94—97KDa, 等电点范围 pH5.7—6.2。目前已知大豆种子中 Lox 存在三种同工酶(Lox—1、Lox—2、Lox—3a 和 Lox—3b), 几种同工酶在酶活性的最适 pH、热稳定性、等电点、底物专一性及其它生化性质上均有差异。Lox—1 酶活性最适 pH 值为 9.0, Lox—2 为 pH6.8, Lox—3 为 pH7.0; Lox—1 等电点为 pH5.65, Lox—2 等电点为 pH5.85, Lox—3a 为 pH6.0, Lox—3b 为 pH6.15。利用改进的薄层等电聚焦电泳方法(IEF—PAGE)鉴定 Lox 同工酶缺失类型, 具有分辨率高, 特异性强, 成本低等优点。本研究可为国内选育 Lox 缺失体提供识别技术。该鉴定方法已应用于大豆品质育种杂交后代的筛选、新型大豆食品专用加工原料的鉴别。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 参比样和样品: 美国品种 Century Lox 缺失近等基因系及日本 Lox 缺失品系为 Lox 缺失体对照; 科丰 6 号为正常大豆对照, 征集国内选育的五星 1 号、中黄 18 等大豆品种资源为鉴定样品。

1.1.2 主要仪器设备: 水平电泳仪(瑞典 LKB Eps3500 型)、冰冻离心机、数字显示酸度计、样品混合器、振荡器。

### 1.2 方法

1.2.1 样品液制备: 20mg 豆粉(40 目)加入 0.2ml 0.05mol/L Tris—CaCl<sub>2</sub> 提取液(0.05mol/L Tris—20mmol/L CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 溶液, 用浓 HCl 调至 pH7.9—8.0, 4℃下保存)。振荡均匀, 放置 4℃下提取 2h (其间振荡一次), 冷冻离心 20min(12000r/min), 取上清液备用。

### 1.2.2 凝胶制备

1.2.2.1 凝胶溶液: 13.6%聚丙烯酰胺凝胶液(29.1%Acr+0.9%Bis), 4.0% Ampholine(pH4—8), 2% Aps 和 0.073% TEMED。

1.2.2.2 灌胶: 用普通玻璃板(26cm×8cm×0.2cm)代替进口支持膜制胶板, 称为玻璃胶板(上层板), 为使凝胶粘贴在上层板上, 预先在板上涂布约 2ml 0.15% Bind—silane 氯仿试剂; 下层板厚 5mm, 两边分别贴有隔条(宽 9mm, 厚 0.5mm), 为不使凝胶附着在下层板上, 预先均匀涂布约 2ml 4% Repe—silane 氯仿试剂; 凝胶溶液倒在上下玻璃板之间的空隙中, 室温放置 1h 后胶溶液凝固, 取下凝胶玻璃板备用, 凝胶规格为 25cm×6cm×0.5cm。

<sup>\*</sup> 收稿日期: 2003—11—21

基金项目: 农业部“948”项目: 大豆近等基因系的引进研究与利用(编号 991001—10, 1999—2002 年)

作者简介: 傅翠真(1939—), 女, 研究员, 主要研究领域为谷物化学、农产品品质鉴定与评价。

### 1.2.3 IEF 电泳

一块凝胶板电泳参数为 1600V、50mA、4W；两块凝胶板同时电泳时，参数为 2600V、50mA、8W。凝胶板在电泳槽冷却板上预电泳 25min，再将样品提取液直接加在凝胶上，加样量以 4—5 $\mu$ l 为宜，一块板加样 45 个左右。电泳时间约 1h50min。

### 1.2.4 染色

1.2.4.1 酶染液的配置：染料和反应底物在混合前分别溶解。34—38mg 邻联茴香胺(2,3'-二甲氧基联苯胺)用 15ml 无水乙醇溶解；200 $\mu$ l 亚油酸(底物)用 0.8ml 无水乙醇溶解，再加 1.2ml 吐温 20；两溶液混合后，再用 0.1mol/L 磷酸盐缓冲液(pH7.6—7.7)定容至 200ml。

1.2.4.2 蛋白质染色液的配置：称取 0.35g 考马斯亮蓝 R250，加入 300ml 脱色液(甲醇：冰醋酸：水=3：1：6)，边搅拌边水浴加热至 50℃—60℃，使其充分溶解，过滤后使用。

1.2.4.3 凝胶板在 27℃—29℃下酶染 1h，再进行 15min 考马斯亮蓝蛋白质染色，最后用脱色液洗脱凝胶板数次，使酶带清晰显色。在室温下将凝胶晾干，用硫酸纸包装，防止凝胶干裂。

## 2 结果与讨论

### 2.1 大豆脂肪氧化酶电泳图谱分析

本实验条件下，大豆种子有 4 种电泳类型。Lox—1、Lox—2、Lox—3a 和 Lox—3b(图 1)，这与 Hildebrand(1991)等的报道相符。在电泳图谱上可以看出，缺失 Lox—2 及缺失 Lox—2.3 时，出现 Lox—1 带向正极方向迁移的现象；缺失 Lox—3 材料的电泳图谱在 Lox—3b 酶带位置上完全空白，而缺失 Lox—2 材料的电泳图谱在 Lox—2 酶带位置上，往往出现颜色较淡的带痕，这可能是因为它们的缺失机制不同造成的，只导致 Lox—2 活性的丧失，但未打破 Lox—2 的合成，所以图谱中仍留有 Lox—2 的带痕，而缺失 Lox—3 可能是因为编码该缺失体的基因的 5' 端调控区域的几处点突变，阻断其 mRNA 的转录，导致 Lox—3b 酶的缺失。大豆中 Lox 缺失的分子基础尚需研究。图谱鉴定表明：国内大豆品种中黄 18 缺失 Lox—2；五星 1 号缺失 Lox—2.3；其它品种资源缺失 Lox—3 和缺失 Lox—1.2.3。

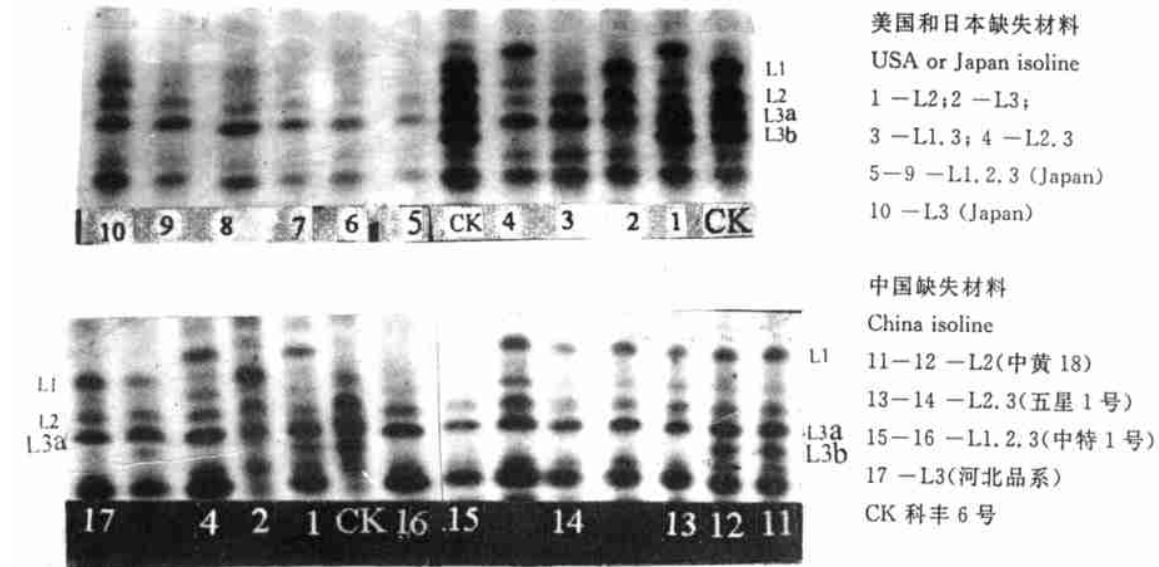


图 1 IEF—PAGE 图谱(阳极在上，阴极在下)

Fig. 1 Isoelectric focusing patterns (anode  $\uparrow$ , Cathode  $\downarrow$ )

### 2.2 实验条件和测定参数的研究确定

#### 2.2.1 提取条件的确定

样品提取液 pH 值的确定原则是将三种同工酶同时提取出来呈现酶带，如提取液 pH 值偏中性，Lox—1(最适 pH9)酶带显色淡或不出现酶带，相反提取液 pH 过碱，Lox—2 和 Lox—3 酶带显色浅或不

显酶带，经实验表明，样品提取液 pH7.9—8.0 为宜。

#### 2.2.2 凝胶两性电解质的确定

两性电解质(Ampholine)的选择是本实验的关键因素之一，制胶时，两性电解质 pH 范围宜略大于 Lox 同工酶等电点范围(pH5—7)，如 pH 范围扩大，

会出现过多的其它蛋白酶带, 影响 Lox 酶的识别, 经实验表明, Ampholine pH4—8 为宜。

### 2.2.3 酶染条件的确定

本实验选择的 Lox 酶促反应底物为亚油酸, 先将亚油酸溶解在无水酒精中, 配置酶染液时, 如果磷酸盐缓冲液 pH 值偏酸性, 亚油酸析出, 使酶染液呈浑浊状, 染色效果差, 因此, 溶解在无水酒精中的亚油酸, 需再添加助溶剂吐温 20, 使酶染液清澈、透明。实验表明, 磷酸盐缓冲液 pH7.6—7.7 配置酶染液效果较好。

酶染温度低于 20℃, 酶带显色浅, 延长染色时间效果也不佳; 实验表明, 酶染温度 27℃—29℃, 振荡条件下, 染色 20min 后, 凝胶板上呈显淡褐色酶带, 染色 1h 后染色液变成淡褐色, 胶板上出现多条酶带。

## 3 方法的检验与应用

引进美国大豆 Century 品种等位基因系及日本 Lox 缺失材料为参比样, 在本实验条件下, 电泳酶谱分析出 Lox 四条同工酶带, 与国外文献报道相符。

该检验方法已应用于 4000 余份中国大豆资源和品质育种杂交后代的鉴定, 筛选出一批 Lox 同工酶缺失体, 为新品种选育和优质大豆加工原料提供鉴别方法。

### 参考文献

- 1 傅翠真, 丁安林, 刘立军, 等. 大豆脂肪氧化酶凝胶电泳分析研究 [J]. 中国粮油学报, 1993, 8(4): 36—40.
- 2 傅翠真, 徐文英, 苏震. 中国大豆脂肪氧化酶缺失种质多样性鉴定研究 [J]. 中国农业科学, 1997, 30(1): 44—51.
- 3 Hildebrand D F, Versluys R T, Collins G B. Changes in lipoxygenase isozyme levels during soybean embryo development [J]. Plant Science. 1991, 75: 1—8.
- 4 Wang Wanheng, Tetsuo Takano, Daisuke Shibata et al. Molecular basis of a null mutation in soybean lipoxygenase 2: Substitution of glutamine for an iron—ligand histidine [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA., 1994, 91: 5828—5832.
- 5 Wang Wanheng, Tomohiko Kato, Tetsuo Takano et al. Two single—base substitutions involved in altering in a paired—box of AAAT-AC in the promoter region of soybean lipoxygenase L—3 gene impair the promoter function in tobacco cells [J]. Plant Science. 1995, 109: 67—73.

## THE IDENTIFICATION TECHNIQUE OF SOYBEAN LIPOXYGENASE

Fu Cuizhen

(Institute of Crop Germplasm Resources, CAAS, Beijing 100081)

**Abstract** The grass—bean flavor of soybean food stuff is related to lipoxygenase (Lox). In processing, the physical or chemical methods are used to remove the undesirable flavor and odor of soybean food stuff, but these methods often lead to some insolubility of soybean proteins, and decrease the quality of protein.

So it is necessary and urgent to select and develop mutant soybean by genetic study. Lipoxygenase lacking mutants (triple—null or double—null) soybean could improve nutritional quality and functionality of soybean products.

There are four known electrophoresis types of soybean seed lipoxygenase (Lox). The Lox isozymes have their own biochemistry characteristic. IEF—PAGE helps us to identify Lox isozyme type and mutants. We modified the techniques about making gel and staining the gel for improving the resolution and reducing the experiment cost. The GelBond PAG sheet was replaced by normal glass plate. Use suitable enzyme staining solution. The tests attained remarkably results and reduced cost. Thus, a technique for identifying Lox lacking mutants was developed, that was rapid and more accuracy.

**Key words** Soybean; Lipoxygenase; IEF—PAGE