

野生大豆苯丙氨酸解氨酶(PAL)在不同诱导条件下变化规律

张必弦^{1,2}, 胡小梅¹, 朱延明¹, 来永才^{2,3}, 李 炜³, 肖佳磊³, 李 琬³, 毕影东³

(1. 东北农业大学 生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省农业科学院 博士后工作站, 黑龙江 哈尔滨 150086; 3. 黑龙江省农业科学院 耕作栽培研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086)

摘 要:以野生大豆(龙野 01-177)为材料,根据 PAL 酶活性的影响因素,选取 48 h 为一个周期,每 3 h 进行取样,研究低温(-4℃)诱导、机械损伤诱导、紫外线照射诱导、激素 BAP 诱导和正常对照组条件下的酶活性、蛋白含量、酶比活性的变化。结果表明:4 种诱导条件下野生大豆 PAL 的酶活性和蛋白质含量变化趋势均相同且表现出不同的变化规律;通过比较酶比活性,发现 4 种诱导条件中,低温诱导效果最好。

关键词:野生大豆;苯丙氨酸解氨酶;诱导条件

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2011)04-0703-03

Response of Phenylalanine Ammonia-lyase (PAL) to Different Inducing Conditions in Wild Soybean(*Glycine. soja*)

ZHANG Bi-xian^{1,2}, HU Xiao-mei¹, ZHU Yan-ming¹, LAI Yong-cai^{2,3}, LI Wei³, XIAO Jia-lei³, LI Wan³, BI Ying-dong³

(1. Life Sciences of Institute of Northeast Agricultural University, Harbin 150030; 2. Postdoctoral Station Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086; 3. Crop Tillage and Cultivation Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, Heilongjiang, China)

Abstract: Wild Soybean(*Glycine soja*) with more desired traits is the ancestor of the cultivated soybean(*Glycine max*), and phenylalanine ammonia-lyase(PAL)is the key enzyme in the synthesis of isoflavones. With wild soybean(longye 01-177) as material, according to the influencing factors of PAL activities, selecting each 48 h for a cycle and sampling for each 3 h, we studied the enzyme activity, protein content and the variation of enzyme activity under the conditions of low temperature(-4℃) (LT), mechanical damage(MD), ultraviolet ray(UV), hormone(BAP) and normal controls conditions. The results indicated that there was the same change trend of the enzyme activity and protein content of wild soybean PAL under different induction conditions and low temperature had the best induced effect.

Key words: Wild soybean(*Glycine soja*); Phenylalanine ammonia-lyase(PAL); Inducing conditions

野生大豆(*Glycine soja*)是栽培大豆(*Glycine max*)的近缘祖先种,在进化过程中,野生大豆通过基因突变的积累分化出多种类型,染色体的配置并没有变化,在人工选择下逐渐进化到现代栽培大豆^[1]。野生大豆具有多花、多荚、高蛋白及抗病虫、耐逆境等多种优良特性,是大豆种质改良中的重要基因来源^[2]。

苯丙氨酸解氨酶(Phenylalanine ammonia-lyase, PAL)是苯丙烷类代谢途径中研究最多的酶,连接初级代谢和苯丙烷类代谢、催化苯丙烷类次级代谢的第一步反应,是苯丙烷类代谢的限速酶和关键酶^[3]。PAL在植物的苯丙烷类次级代谢途径中和

在植保素、木质素等代谢产物形成过程中起到重要作用,对植物防紫外辐射、抵御病虫害、生长发育和构成植物支撑系统等方面均具有重要价值和意义^[4]。

我国有丰富的野生大豆资源,其多个抗逆特性与体内苯丙烷类次级代谢有关,特别是与 PAL 有关。2009 年张淑珍对野生大豆接种大豆疫霉根腐病菌,研究了其 PAL 活性的变化^[5]。该文研究了野生大豆 PAL 在低温(-4℃)诱导、机械损伤诱导、紫外线照射诱导、激素 BAP 诱导和正常对照组条件下的酶活性、蛋白含量、酶比活性的变化,旨在为深入野生大豆 PAL 及其基因的调控机制提供依据。

收稿日期:2011-05-13

基金项目:国家科技支撑计划资助项目(2006AB13B05);农业部转基因新品种培育科技重大专项资助项目(2008ZX08009-003);黑龙江省青年科学基金资助项目(QC2010053)。

第一作者简介:张必弦(1981-),男,在读博士,助理研究员,研究方向为大豆分子育种与基因工程。E-mail:zg_2008@163.com。

通讯作者:胡小梅(1982-),女,博士,讲师,研究方向为植物化学。E-mail:huxiaomei1982@163.com。

1 材料与方法

1.1 供试材料

野生大豆(龙野 01-177)由黑龙江省农业科学院作物育种研究所提供。

1.2 试验方法

1.2.1 材料处理 温水泡发野生大豆种子 12 h, 放置于铺有潮湿滤纸的培养皿中, 人工气候箱避光培养 48 ~ 72 h, 期间适当补充水分, 待长出胚轴后, 移入土中进行盆栽。待长出第 3 片复叶后, 分别进行不同条件诱导: 冷害诱导(LT); 机械损伤诱导(MD); 消毒后的剪刀在叶片上进行适当剪割; 紫外线照射诱导(UV): 超净台的紫外灯管进行照射; 激素诱导(BAP): 土壤中每 24 h 浇灌 2 mL $1 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ 的 BAP; 对照组(CK)。以 48 h 为周期, 每 3 h 取 1 次叶片, 液氮速冻, -80°C 保存。

1.2.2 测定项目与方法 粗酶液的提取: 取样品 1 g 液氮中研碎; 加 5 mL 的 $0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的硼酸硼砂缓冲液(pH 8.8, 内含 $1 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 EDTA、 $5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的巯基乙醇, 1% 的 PVP, 1% 的甘油), 研磨成匀浆; $12\,000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$, 4°C 离心 20 min; 取上清液(即为粗酶液)立即使用或者 -80°C 保存备用。

酶活性的测定: 按照 L-苯丙氨酸($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、硼酸提取缓冲液的体积比为 1:14 混合, 作为空白对照; 按照酶粗提液、L-苯丙氨酸($0.1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$)、硼酸提取缓冲液的体积比为 4:1:11 混合, 作为待测样品; 将混合好的溶液用紫外分光光度计测定 OD_{290} 值, 并记录; 将待测样品在 30°C 保温 1 h, 用 0.2 mL 的 15% 的 HCl 终止反应; 再次用紫外分光光度计测定反应后的 OD_{290} 值, 并记录; 按照每 h 每 mL 酶液在 290 nm 处光密度改变 0.01 为 1 个酶活单位, 换算野生大豆不同处理组的酶活性。

蛋白含量的测定: 采用考马斯亮蓝(G-250)法测定野生大豆 PAL 蛋白含量。绘制标准曲线: 向各管加入 5 mL 考马斯亮蓝 G-250, 漩涡混匀, 室温放置 5 min, 紫外分光光度计测定 OD_{595} 值。蛋白质浓度为横坐标, 吸光度为纵坐标, 绘制标准曲线($y = 104.19x - 0.0989$, $R^2 = 0.998$)。样品蛋白含量测定: 将 0.2 mL 的 PAL 粗酶液, 0.8 mL 的蒸馏水, 5.0 mL 的考马斯亮蓝充分混匀, 室温放置 5 min, 紫外分光光度计测定 OD_{595} 值。每个样品重复 3 次, 利用平均值为 OD_{595} 光密度, 并通过标准曲线查出蛋白含量。

酶比活性的测定: 根据前面两步得出的 PAL 酶活性值和蛋白含量, 利用公式: 酶的比活力 = 酶的活力单位 \div 粗酶液蛋白质含量, 计算出野生大豆

PAL 酶比活性。

1.3 数据分析

利用 Excel 2003 进行数据整理、分析和绘图。

2 结果与分析

2.1 不同诱导条件下野生大豆 PAL 酶活性

如图 1 所示, 在低温诱导条件下, 0 ~ 9 h 内 PAL 酶活性快速增加, 9 ~ 48 h 内 PAL 酶活性缓慢降低, 最终恢复到初始状态。在机械损伤诱导条件下, 0 ~ 15 h 内 PAL 酶活性快速增加, 15 ~ 21 h 内 PAL 酶活性急剧下降, 21 ~ 48 h 内 PAL 酶活性缓慢下降, 最终酶活性比初始状态要略高。在紫外线照射诱导条件下, 48 h 内分为 2 个峰值动态变化, 第 1 个峰值动态变化是 0 ~ 21 h, 其中 0 ~ 12 h 内 PAL 酶活性快速增加, 12 ~ 21 h 内 PAL 酶活性急剧下降; 第 2 个峰值动态变化是 21 ~ 48 h, 其中 21 ~ 36 h 内 PAL 酶活性缓慢增加, 36 ~ 48 h 内 PAL 酶活性缓慢下降。在激素(BPA)诱导条件下, 0 ~ 24 h 内 PAL 酶活性缓慢增加, 24 ~ 48 h 内 PAL 酶活性缓慢下降, 最终酶活性比初始状态要略高。正常对照组的酶活性一直处于缓慢下降的状态。

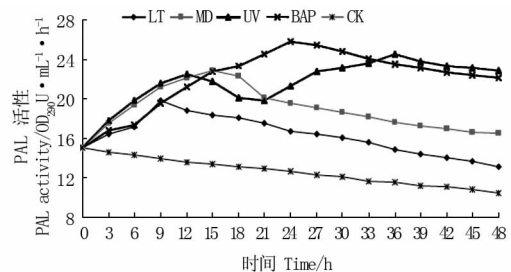


图 1 不同诱导条件下 PAL 酶活性变化

Fig. 1 Changes of PAL activity under different conditions

2.2 不同诱导条件下野生大豆 PAL 蛋白含量

如图 2 所示, 不同诱导条件下野生大豆 PAL 蛋白含量与 PAL 酶活性变化趋势均相同且表现出不同的变化规律。

2.3 不同诱导条件下野生大豆 PAL 酶比活性

如图 3 所示, 不同诱导条件下野生大豆 PAL 酶

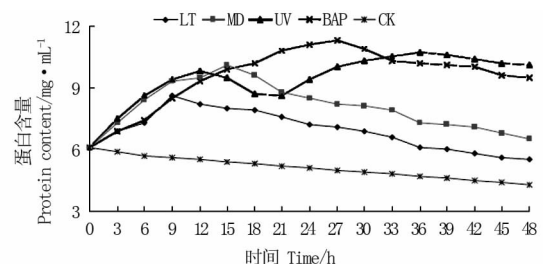


图 2 不同诱导条件下蛋白含量变化

Fig. 2 Changes of PAL protein content under different conditions

比活性结果显示:4 个处理组与正常对照组在 0 ~ 6 h 内酶活性缓慢下降;9 ~ 30 h 内酶活性的变化比较平稳;33 ~ 48 h 内低温、机械损伤和激素诱导下

酶活性缓慢上升,紫外线诱导下酶活性与前一个峰值变化动态保持相同数值;在 $2.2 \sim 2.3 \text{ U} \cdot \text{mg}^{-1}$ 范围内成相同的变化趋势。

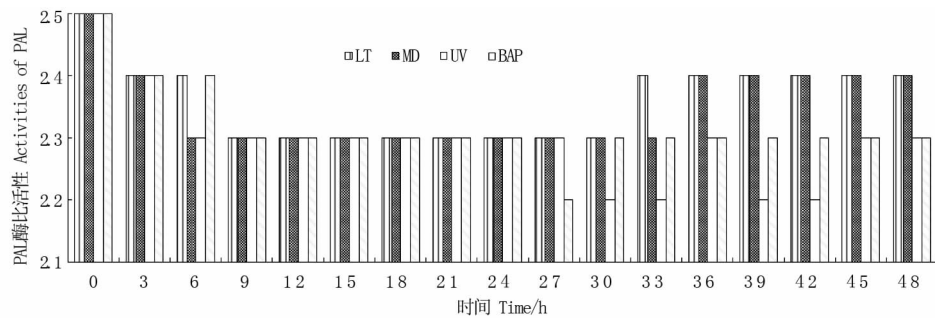


图3 不同诱导条件下的酶比活性变化

Fig. 3 The relative activity of PAL changes under different conditions

3 讨 论

PAL 只存在于植物和微生物的细胞中,可定位于一些膜细胞器^[6]和细胞质^[7]。PAL 活性及其基因表达受到多因素影响, PAL 表达模式因此而异^[8]。研究表明在不同诱导处理(紫外、机械损伤、冷害、激素浇灌)下, PAL 的多肽链合成是特异的,说明 PAL 的基因受到复杂调控而选择性表达,例如影响苯丙烷代谢途径的环境因子和与发育有关的因子调控影响^[8]。

植物在受到低温冷害的初始阶段,机体的防御系统被激活,促使 PAL 基因大量表达,产生大量的 PAL。但随着时间推移,植物体已经适应低温环境,使机体达到一种平衡状态,而且 PAL 作为黄酮类代谢途径的起始关键酶,而被消耗掉一部分。因此,在低温诱导条件下 9 h 是一个峰值动态变化的拐点,峰值动态变化的周期可能为 48 h。

机械损伤直接刺激叶片细胞,较其它方式更快启动苯丙烷类代谢途径,促进生成大量的 PAL,产生较多的植保素等来减少植物所受的伤害。当合成较多次生物物质后,也会反馈抑制 PAL 活性,防止次生物物质过度积累产生毒害。因此,在机械损伤诱导条件下,15 h 是一个峰值动态变化的拐点,峰值动态变化的周期可能大于 48 h。

紫外线不仅对 PAL 活性有促进作用,也能使 PAL 活性受到抑制。其原因可能是:紫外线照射能启动已有 PAL 的活性,因此在开始阶段, PAL 活性升高;另一方面,光也能促进 PAL 钝化系统的合成,随时间的推移, PAL 钝化系统不断增加这就导致 PAL 活性开始下降。随 PAL 活性下降,它催化 L-苯丙氨酸产生的肉桂酸也在减少。这样 PAL 活性又开始上升,从而表现出很强的周期性。因此,在紫外线照射诱导条件下,峰值动态变化的周期可能大

于 48 h,但是变化有一定复杂性,需要和植物体的光系统紧密联系。

激素 BPA 被植物的根系吸收,通过运输系统传递到叶片,又通过细胞间的信号传递将刺激信号传递给细胞,促进叶片 PAL 活性的增加。但是因为需要通过运输系统长距离传递,所以周期较长,增加和降低较为缓慢。因此,在激素(BPA)诱导条件下,24 h 是一个峰值动态变化的拐点,峰值动态变化的周期大约为 48 h。

正常对照组的酶活性,由于没有外界因素的刺激,诱导型的 PAL 基因不表达或者表达量减少,因此 PAL 活性一直处于缓慢下降的状态。

经过分析不同诱导条件下野生大豆 PAL 酶的酶活性和蛋白质含量变化,发现二者具有相似的变化趋势。这可能是因为绘制的蛋白曲线为直线型的,二者为正比关系,也可能是因为酶本身就是蛋白质,其活性大小与蛋白质含量多少成正相关。同时,通过比较酶比活性发现,低温诱导野生大豆 PAL 酶比活性效果最好。上述结果证明了 PAL 表达水平受到外界环境的多因素调控,如温度、机械损伤、紫外线照射、激素刺激等,并具有一定周期变化,而且效果不相同。

致谢:哈尔滨师范大学生命科学与技术学院徐香玲教授,黑龙江省农业科学院作物育种所齐宁研究员、林红研究员、刘广阳副研究员、杨雪峰助理研究员、黑龙江省农业科学院生物技术研究所刘丽艳研究员对试验给予一定的指导和帮助,在此表示由衷感谢。

参考文献

- [1] 李福山. 大豆起源及其演化研究[J]. 大豆科学, 1994, 13(1): 61-66. (Li F S. Study on origin and evolution of soybean[J]. Soybean Science, 1994, 13(1): 61-66.)

(下转第 709 页)

(*Le2*) 导入到烟草的基因组中, 获得了转基因烟草, 为进一步鉴定 *Le2* 基因功能提供了试验基础。

参考文献

- [1] 高燕会, 李润植, 毛雪, 等. 植物凝集素的防卫功能及其研究进展[J]. 世界农业, 2000(2): 33-35. (Gao Y H, Li R Z, Mao X, et al. Plant lectin defence function and its research progress [J]. World Agriculture, 2000(2): 33-35.)
 - [2] 潘洪彬, 秦贵信, 孙泽威. 大豆凝集素抗营养的研究进展[J]. 大豆科学, 2005, 24(3): 210-215. (Pan H B, Qin G X, Sun Z W. Soybean lectin antioxidant nutrients research progress[J]. Soybean Science, 2005, 24(3): 210-215.)
 - [3] 李凤玲, 徐培洲, 肖祎, 等. 植物凝集素及其在抗虫基因工程中的应用[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(3): 430-432, 439. (Li F L, Xu P Z, Xiao W. Plant lectin and insect-resistant genes engineering application [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2006, 34(3): 430-432, 439.)
 - [4] 张柏林, 秦贵信, 刘宁, 等. 大豆凝集素结构及其活性测定方法的研究进展[J]. 大豆科学, 2009, 28(1): 160-163. (Zhang B L, Qin G X, Liu N. Advances of research on structure and activity detecting method of soybean agglutinin [J]. Soybean Science, 2009, 28(1): 160-163.)
 - [5] Lotan R, Siegelman H W, Lis H, et al. Subunit structure of soybean agglutinin [J]. Journal of Biological Chemistry, 1974, 249: 1219-1224.
 - [6] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]//方宏筠. 抗植物虫害基因及其应用. 北京: 科学出版社, 2005: 532. (Wang G L, Fang H J. Plant gene engineering [M]// Fang H J. Resistance to plant pest gene and its application. Beijing: Science Press, 2005: 532.)
 - [7] Hofen R, Willmitzer L. Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation [J]. Nucleic Acids Research, 1988, 16: 9877.
 - [8] 刘辰, 谢柳, 张文飞. 新型 Bt 杀虫蛋白: VIP 杀虫的机理与植物转基因应用[J]. 分子植物育种, 2008, 6(6): 1031-1037. (Liu C, Xie L, Zhang W F. Insecticidal mechanism of Bt vegetative insecticidal proteins and their application in GM crops [J]. Molecular Plant Breeding, 2008, 6(6): 1031-1037.)
 - [9] 武小霞, 李文滨. 大豆抗虫基因工程研究进展及发展趋势[J]. 东北农业大学学报, 2005, 36(4): 502-506. (Wu X X, Li W B. Research progress and development direction of soybean pest-resistance gene engineering [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2005, 36(4): 502-506.)
 - [10] 郭红. 抗病、抗虫转基因植物的研究与应用[J]. 现代农业科技, 2010(10): 85-87. (Guo H. Disease resistance, resistance to insects the research and application of transgenic plants [J]. Modern Agricultural Sciences and Technology, 2010(10): 85-87.)
-
- (上接第 705 页)
- [2] 田清震, 盖钧镒. 野生大豆种质资源的研究与利用[J]. 植物遗传资源科学, 2000, 1(4): 61-66. (Tian Q Z, Gai J Y. A review on the research and utilization of wild germplasm in soybean [J]. Plant Genetic Resources Science, 2000, 1(4): 61-66.)
 - [3] 江昌俊, 余有本. 苯丙氨酸解氨酶的研究进展[J]. 安徽农业大学学报, 2001, 28(4): 425-430. (Jiang C J, Yu Y B. Advances of studies on phenylalanine ammonia-lyase [J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2001, 28(4): 425-430.)
 - [4] 贺立红, 张进标, 宾金华. 苯丙氨酸解氨酶的研究进展[J]. 食品科技, 2006, 731-34. (He L H, Zhang J B, Bin J H. Research progress of phenylalanine ammonia-lyase [J]. Food Science and Technology, 2006, 731-34.)
 - [5] 张淑珍, 靳立梅, 徐鹏飞. 野生大豆接种大豆疫霉根腐病后苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 活性的变化[J]. 大豆科学, 2009, 28(6): 1044-1048. (Zhang S Z, Ji L H, Xu P F. Response of PAL activity *Phytophthora sojae* inoculation in *Glycine soja* [J]. Soybean Science, 2009, 28(6): 1044-1048.)
 - [6] Hanson R R, Havir E A. Secondary plant products [C]. New York: Academic Press, 1981, 577-625.
 - [7] Jones D H. Review article number 3: phenylalanine ammonia-lyase. Regulation of its induction and its role in plant development [J]. Phytochemistry, 1984, 23(7): 1349-1359.
 - [8] 张必弦, 李炜, 来永才. 大豆苯丙氨酸解氨酶及其基因的研究进展[J]. 大豆科学, 2008, 27(6): 1058-1061. (Zhang B C, Li W, Lai Y C. Advances of studies on soybean phenylalanine ammonia-lyase and its gene [J]. Soybean Science, 2008, 27(6): 1058-1061.)