

## 利用 Native-PAGE 鉴定大豆 Lox 同工酶

胡明建, 郑文寅, 张文明, 王晓波, 姚大年

(安徽农业大学 农学院, 安徽 合肥 230036)

**摘要:**以 Lox 缺失体五星 1 号、3 号、4 号和非缺失类型大豆中黄 13 种子为材料, 采用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Native-PAGE), 通过改变分离胶浓度、电泳电压、样品浓度、电泳时间和染色方法等, 探索大豆 Lox 同工酶电泳最佳条件。结果表明: 浓缩胶浓度 5%, 分离胶浓度 13%, 浓缩胶电泳电压 90 V、分离胶电泳电压 190 V, 样品浓度 40%, 电泳时间 7 h, 采用 pH8.0、pH6.5 两种不同的酶染液结合热考马斯亮蓝染色, 4 种 Lox 同工酶 (Lox1、Lox2、Lox3a 和 Lox3b) 的分辨清晰度最高。该方法简便安全、经济有效, 可用于大豆种质资源 Lox 缺失体的筛选鉴定。

**关键词:**大豆; 脂肪氧化酶; 非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳; 鉴定

**中图分类号:** Q814.1      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-9841(2012)05-0813-04

## Identification of Soybean Lipoygenase Isozyme by Native-PAGE

HU Ming-jian, ZHENG Wen-yin, ZHANG Wen-ming, WANG Xiao-bo, YAO Da-nian

(College of Agronomy, Anhui Agricultural University, Hefei 230036, Anhui, China)

**Abstract:** There are some problems existed in the detection of soybean lipoygenase (Lox) isozymes such as complex procedures, poor resolution, higher cost and highly toxic reagents on the human, exploring an improved methods to identify Lox isozyme of soybean is necessary. In this study, Lox deletion mutants (Wuxing No. 1, Wuxing No. 3 and Wuxing No. 4) and non-deletion type (Zhonghuang No. 13) were used to survey the optimal experimental condition for Lox isozymes by changing the separation gel concentration, electrophoresis voltage, sample concentration, time and staining method with Native-PAGE. From the results we found that the four Lox isoenzyme of soybean (Lox1, Lox2, Lox3a and Lox3b) could be separated clearly when the concentration of stacking gel and separating gel were 5% and 13%, respectively; electrophoresis voltage in stacking gel and separation gel were 90 V and 190 V, respectively; sample concentration was 40%, and the electrophoresis time was 7 hours, dying with two different enzyme staining of pH8.0 and pH6.5 combined with heat Coomassie blue staining. In short, it is a simple, safe, economical and effective method that can be used for the identification and screening of lipoygenase deletion mutants of soybean germplasm.

**Key words:** Soybeans; Lipoygenase; Native-PAGE; Identification

脂肪氧化酶 (Lipoygenase, 简称 Lox) 是一种含非血红素铁的水溶性蛋白质, 在植物的生长发育、衰老、受伤反应及抗病原菌、抗虫等过程中起着重要作用<sup>[1-2]</sup>。自然界中不仅在植物、动物中存在 Lox, 而且在藻类<sup>[3]</sup>、面包酵母<sup>[4]</sup>、真菌以及氰细菌<sup>[5]</sup>中均发现有 Lox 的存在。Lox 在催化具有顺, 顺-1,4-戊二烯结构的多元不饱和脂肪酸的加氧反应中产生单线态氧, 单线态氧转变为基态氧的过程中出现超弱发光<sup>[6-7]</sup>, 催化过程中产生的过氧化物与大豆腥味有关<sup>[8]</sup>, 并直接影响大豆食品加工质量。通过各种育种手段选育大豆脂肪氧化酶缺失品系, 可有效解决大豆腥味问题。

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 ~ 97 kDa, 等电点范围 pH5.7 ~ 6.2。已知大豆种子中含有 3 种脂肪氧化酶同工酶 (Lox1、Lox2、Lox3), Theorell 等<sup>[9]</sup> 以及

Christopher 等<sup>[10-11]</sup> 先后从大豆种子中提取了 3 种脂肪氧化酶结晶体, 分别定名为 Lox1, Lox2 和 Lox3。随着层析法的不断改进, Lox3 又可分离成 3a、3b 两种, 不过由于二者在许多性质上的相似, 仍被认为是一种同工酶<sup>[12]</sup>。4 种 Lox 同工酶在酶活性的最适 pH、热稳定性、等电点、底物专一性及其他生化性质上均有差异。理论上, 蛋白质只要分子质量、等电点等存在差异, 就可以利用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳来进行分离。

脂肪氧化酶同工酶鉴定有多种方法, 如变性聚丙烯酰胺凝胶电泳、显色法、等电聚焦、离子交换等, 随着研究的深入, 这些方法不断得到改进并趋于成熟, 但是也存在检测费用高、程序复杂、操作要求严格、分辨率不高等问题。关于非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳鉴定大豆 Lox 同工酶的研究甚少<sup>[13]</sup>, 且未能鉴定出 Lox3a 和 Lox3b。本试验以 Lox 缺失体

收稿日期: 2012-06-12

基金项目: 国家农业科技成果转化项目 (2011GB2C300011)。

第一作者简介: 胡明建 (1986-), 男, 在读硕士, 研究方向为种子科学与技术。E-mail: humingjian0724@126.com。

通讯作者: 张文明 (1965-), 男, 副教授, 硕士生导师, 主要从事种子科学与技术研究。E-mail: zhangwenming\_520@163.com。

五星1号、3号、4号和非缺失类型大豆中黄13为材料,采用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(Native-PAGE),通过改变胶浓度、上样量、电泳时间和染色方法等,探索大豆Lox同工酶电泳最佳条件,为大豆种质资源Lox同工酶电泳以及Lox缺失体的筛选鉴定,提供简便安全、经济有效的方法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 试验材料 脂肪氧化酶缺失大豆材料五星1号(缺失Lox2、Lox3)、五星3号(缺失Lox2)、五星4号(缺失Lox1、Lox2、Lox3)和非缺失类型大豆中黄13,种子均由安徽农业大学农学院种子教研室提供。

1.1.2 主要仪器设备 垂直电泳槽、冷冻离心机、数显酸度计、振荡器、恒温摇床。

### 1.2 方法

1.2.1 样品液制备 取2粒大豆,磨成豆粉,过60目筛,乙醚萃取脂肪,干燥后称取0.5g,加入1mL 0.05 mol·L<sup>-1</sup>的磷酸缓冲液(pH7.5),震荡均匀,在4℃条件下,提取2h,其间多次震荡,4℃,12 000 r·min<sup>-1</sup>冷冻离心25 min,取上清液备用。

1.2.2 溶液配制 凝胶溶液(29.1% Acr + 0.9% Bis);分离胶缓冲液储存液:1.5 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH8.9;浓缩胶缓冲液储存液:0.5 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl, pH6.8;APS:10%过硫酸铵<sup>[14-15]</sup>。酶液配制:参考傅翠真<sup>[16]</sup>的方法,略有改动。45~50 mg邻联茴香胺(2,3'-二甲氨基联苯胺)用15 mL无水乙醇溶解;200 μL亚油酸(底物)用0.8 mL无水乙醇溶解,再加1.2 mL吐温20;两种溶液混合后,再用0.1 mol·L<sup>-1</sup>磷酸盐缓冲液定容至200 mL(27~29℃)。蛋白质染色液的配制:称取0.35 g考马斯亮蓝R250,加入300 mL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。所有溶液均在使用前新鲜配制。

### 1.3 Native-PAGE电泳条件优化

1.3.1 分离胶浓度的确定 正确装配电泳仪,首先灌入分离胶,设置5个分离胶浓度分别为10%、11%、12%、13%和14%。然后在分离胶界面上加一薄层水,以防止胶体氧化,分离胶应在30~60 min内聚合,聚合后灌入5%浓缩胶,插上梳子,插梳子时要防止气泡进入。总上样量为40 μL/孔,样品浓度(样品提取液与上样总体积的比)为30%,浓缩胶90 V恒压电泳,待溴酚蓝进入分离胶时,分离胶电压150 V,电泳6 h,酶染时pH7.7,室温条件下考马斯亮蓝染色。电泳在4℃冰箱中进行。

1.3.2 电泳电压的确定 浓缩胶90 V恒压电泳,待溴酚蓝进入分离胶时,改用150~210 V以20 V为梯度分别进行电泳,分离胶浓度13%,其它条件同1.3.1。

1.3.3 样品浓度的确定 总上样量为40 μL/孔,样品浓度(样品提取液与上样总体积的比)设置3个,分别为30%、40%和50%。分离胶浓度为13%,分离胶电压190 V,其他条件同1.3.1。

1.3.4 电泳时间的确定 电泳时间从5~8 h以1 h为梯度分别进行电泳。分离胶浓度13%、分离胶电压190 V,样品浓度40%,其他条件同1.3.1。

1.3.5 染色条件的确定 分别用pH7.7、pH8.0和pH6.5的磷酸缓冲液,配制成3种酶染液。凝胶在30~32℃下酶染1 h,并分别在室温和30~32℃条件下进行8~10 min考马斯亮蓝染色,再用脱色液洗脱凝胶数次,使酶带清晰显色。分离胶浓度为13%,分离胶电压190 V,样品浓度40%,电泳时间7 h,其他条件同1.3.1。

## 2 结果与分析

### 2.1 Native-PAGE电泳条件的优化

2.2.1 分离胶浓度的确定 根据凝胶孔径与蛋白质分子量大小,理论上分离胶浓度10%较为合适。但本试验表明,在其他条件不变的情况下,胶浓度为10%时,大豆Lox同工酶的分离效果并不理想,分辨不出Lox3a与Lox3b,且Lox2亦不易辨认。当胶浓度提高为11%或12%时,Lox3a与Lox3b仍不能被分开,只能看出是一条Lox3酶带。当胶浓度为13%时,Lox3a和Lox3b能被分离,且分辨清晰度最高。胶浓度为14%时,Lox3a与Lox3b分辨清晰度下降。说明大豆Lox同工酶电泳的适宜分离胶浓度为13%。

2.2.2 电泳电压的选择 电压的选择是根据凝胶厚度、蛋白质的性质以及电泳时间等确定的。分离胶的电压过小,酶带分不开,即使延长效果也不好,若电压过高,电泳过程中将产生大量的热,使凝胶温度不均,导致条带歪曲,甚至使酶蛋白变性。本试验表明,浓缩胶电压90 V,分离胶电压190 V时电泳分离效果较好。

2.2.3 样品浓度的确定 样品浓度过高,不但会使酶带产生拖尾,而且使Lox3a与Lox3b不能分开,浓度过低,Lox2条带清晰度下降。本试验表明,样品浓度(样品提取液与上样总体积的比)为40%时,电泳效果最佳。

2.2.4 电泳时间的确定 电泳时间太短,条带分不开,时间太长会使酶带清晰度下降。本试验表

明,电泳时间 7 h,酶带分辨清晰度最高。

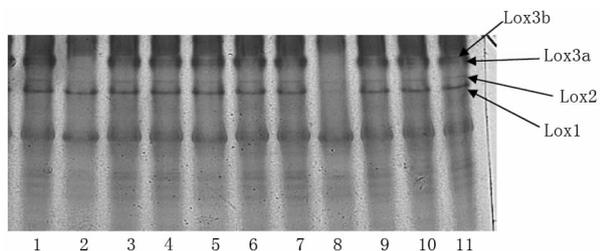
**2.2.5 染色脱色方法** 4 种 Lox 同工酶的最适 pH 不同,Lox1 pH9.0,Lox2 pH6.8,Lox3 pH7.0。缓冲液 pH 超过 8.0 时,Lox2、Lox3 的活性迅速降低,而 Lox1 在 pH7.0 时活性最低<sup>[17]</sup>。本试验采用酶染和考马斯亮蓝染色相结合,以确定 Lox 同工酶酶带位置。试验结果表明,在同一 pH 条件下难以使所有同工酶清晰显色,采用不同 pH 的磷酸缓冲液(pH 分别为 8.0 和 6.5)分别进行酶染,效果较好。

较高的温度可加快考马斯亮蓝与蛋白质的结合速度。本试验表明,采用 30~32℃ 的考马斯亮蓝震荡条件下热染色 8~10 min,同工酶即可完全染色。

脱色同样采用热脱色法,首先将染色后的凝胶用双蒸馏水冲洗 2 遍,然后在 30~32℃ 条件下震荡 40~60 min,可见清晰酶带。

## 2.2 大豆 Lox 同工酶电泳结果分析

最佳电泳及染色条件下大豆 Lox 同工酶电泳谱带见图 1,通过中黄 13 和 Lox 缺失材料的谱带对比,并结合酶染结果,可以看出,中黄 13 具有 4 条 Lox 同工酶酶带,五星 1 号缺少 3 条酶带,五星 3 号缺少 1 条酶带,五星 4 号缺少 4 条酶带。研究表明,大豆 Lox 同工酶存在电荷差异:Lox1 > Lox2 > Lox3,Lox3a 与 Lox3b 性质相似,主要区别是等电点不同,Lox3a 为 5.95,Lox3b 为 6.20<sup>[18]</sup>。在电极缓冲液中(pH8.3),Lox3a 与 Lox3b 由于存在电荷差异,致使 Lox3a 的迁移率大于 Lox3b。因此,认为 4 种同工酶的酶带位置由下而上依次为 Lox1、Lox2、Lox3a、Lox3b。从图中还可以看出,Lox1、Lox3 的含量较



1,3,4,6,7,9,10,11. 中黄 13;2. 五星 1 号(缺失 Lox2、Lox3);5. 五星 3 号(缺失 Lox2);8. 五星 4 号(缺失 Lox1、Lox2、Lox3)

1,3,4,6,7,9,10,11. Zhonghuang No. 13;2. Wuxing No. 1;5. Wuxing No. 3;8. Wuxing No. 4

图 1 大豆脂肪氧化酶缺失材料五星 1 号、3 号、4 号和非缺失材料中黄 13 Native-PAGE 电泳图谱

Fig. 1 Native-PAGE of extracts from seeds that lack specific lipoxygenase isozymes Wuxing No. 1, Wuxing No. 3, Wuxing No. 4 and normal type Zhonghuang No. 13

高,Lox2 的含量较低。Lox2 缺失是由于其结构基因发生 T-A 错义突变,使得 Glu 替换了 His,但并未打破 Lox2 的蛋白合成,只是导致 Lox2 酶活性丧失,稳定性降低<sup>[19]</sup>,因此,在电泳条带上仍能观察到 Lox2 带痕。

## 3 讨论

本试验结果表明,采用非变性聚丙烯酰胺凝胶电泳,能够鉴定出大豆的 4 种脂肪氧化酶同工酶,与傅翠真<sup>[16]</sup>和丁安林等<sup>[20]</sup>的等电聚焦法鉴定结果一致。该方法具有简便安全、经济有效等优点。Native-PAGE 还可以保持酶的生物活性,可通过凝胶扩散、电泳洗脱等方法收集,用于对蛋白质的后续研究。

变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)中,Lox 的迁移率主要与蛋白质分子量有关,而 Native-PAGE 中,Lox 的迁移率不仅与分子量有关,而且与蛋白质的形状、大小、电荷等因素有关。以往报道的 SDS-PAGE 和 Native-PAGE 只能鉴定出 Lox1、Lox2 和 Lox3 三条酶带<sup>[13]</sup>。本试验通过改进大豆 Lox 同工酶 Native-PAGE 条件,可将 Lox3 进一步分离为 Lox3a 和 Lox3b,鉴定出 4 种大豆脂肪氧化酶同工酶,且酶带分辨清晰度较高。

傅翠真<sup>[16]</sup>研究认为,大部分 Lox3 缺失只表现 Lox3b 缺失,而 Lox3a 表现正常,而本试验五星 1 号则表现 Lox3 完全缺失,其原因有待于进一步研究。本试验中发现,Lox2、Lox3 酶染效果不够理想,这可能是电泳过程中产生的热和多种 pH 环境相互作用,使 Lox 酶活性降低的缘故。

## 参考文献

- [1] Suzuki Y, Yasui T, Matsukura U, et al. Oxidative stability of bran lipids from rice variety [*Oryza sativa* (L.)] lacking lipoxygenase-3 in seeds[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1996, 44 (11): 3479-3483.
- [2] 徐文英,傅翠真,苏震. 大豆脂肪氧化酶的研究动态[J]. 植物生理学通讯, 1996, 32(4): 308-313. (Xu W Y, Fu C Z, Su Z. Research of development soybean lipoxygenase[J]. Plant Physiology Communications, 1996, 44: 3479-3483.)
- [3] Zimmerman D C, Vick B A. Lipoxygenase in *Chlorella pyrenoidosa* [J]. Lipids, 1973, 8(5): 264-266.
- [4] Hamberg M. Isolation and structure of lipoxygenase from *Saprolegnia parasitica* [J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1986, 876: 688-692.
- [5] Beneytout J L, Andrianarison R H, Rakotoarisoa Z, et al. Properties of a lipoxygenase in green algae (*Oscillatoria* sp.) [J]. Plant Physiology, 1989, 91(1): 367-372.
- [6] 方允中,郑荣梁,沈文梅. 自由基生命科学进展[M]. 北京:原

- 子能出版社,1993. ( Fang Y Z, Zheng R L, Shen W M. The progress of radicals life sciences [ M ]. Beijing: Atomic Energy Press, 1993. )
- [ 7 ] 徐文英,傅翠真,苏震,等.大豆脂肪氧化酶同工酶缺失体的苗期叶片超弱发光研究[J].大豆科学,1995,14(3):209-213. ( Xu W Y, Fu C Z, Su Z, et al. Study of chemiluminescence of soybean lipoxxygenase isoenzyme mutants on seedling leaves [ J ]. Soybean Science, 1995, 14 ( 3 ) : 209-213. )
- [ 8 ] Eskin N A M. Biochemistry of lipoxxygenase Ec-1, 13, 11, 12 in relation to food quality [ J ]. Critical Reviews in Food Science and Nutrition, 1977, 9: 1-41.
- [ 9 ] Theorell H, Holman R T, Akesson A. Crystalline lipoxidase [ J ]. Acta Chemica Scanddinavica, 1947, 1 ( 6 ) : 571-576.
- [ 10 ] Christopher J, Pistorius E, Axelrod B. Isolation of an isozyme of soybean lipoxxygenase [ J ]. Biochimica et Biophysica Acta, 1970, 198: 12-19.
- [ 11 ] Christopher J, Pistorius E, Axelrod B. Isolation of a third isozyme of soybean lipoxxygenase [ J ]. Biochimica et Biophysica Acta, 1972, 284: 54-62.
- [ 12 ] Axelord B, Cheesbrough T M, Laakso S. Lipoxxygenase from soybeans [ J ]. Methods in Enzymology, 1981, 71: 441-451.
- [ 13 ] 马志民,蒋春志,杨春燕,等.非变性 PAGE 在鉴定大豆脂肪氧化酶类型中的应用[J].华北农学报,2007,22(3):5-8. ( Ma Z M, Jiang C Z, Yang C Y, et al. Application of PAGE in identification of the heterogeneity of soybean lipoxxygenases [ J ]. Acta Agricultrae Boreali-Sinica, 2007, 22 ( 3 ) : 5-8. )
- [ 14 ] 郭尧君.蛋白质电泳实验技术[M].北京:科学出版社,2003. ( Guo R J. Protein electrophoresis experiment technology [ M ]. Beijing: Science Press, 2003. )
- [ 15 ] 汪家政,范明.蛋白质技术手册[M].北京:科学出版社,2000. ( Wang J Z, Fan M. Protein technical manual [ M ]. Beijing: Science Press, 2000. )
- [ 16 ] 傅翠真.大豆脂肪氧化酶缺失体检测方法研究[J].大豆科学,2004,23(2):111-113. ( Fu C Z. The identification technique of soybean lipoxxygenase [ J ]. Soybean Science, 2004, 23 ( 2 ) : 111-113. )
- [ 17 ] 田其英,尹贵中,华欲飞.大豆脂肪氧化酶同工酶活性的影响因素研究[J].食品工业科技,2008(1):156-159. ( Tian Q Y, Yin G Z, Hua Y F. Influencing factors on activity of soy lipoxxygenase isozymes [ J ]. Science and Technology of Food Industry, 2008 ( 1 ) : 156-159. )
- [ 18 ] 丁安林,张艳,常汝镇,等.大豆脂肪氧化酶研究进展[J].大豆科学,1995,14(1):67-73. ( Ding A L, Zhang Y, Chang R Z, et al. Advances in research of soybean lipoxxygenase [ J ]. Soybean Science, 1995, 14 ( 1 ) : 67-73. )
- [ 19 ] Wang W H, Tetsuo Takano, Daisuke shibata, et al. Molecular basis of a null mutation in soybean lipoxxygenase 2; Substitution of glutamine for an iron - ligS and histidine [ J ]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1994, 91: 5828-5832.
- [ 20 ] 丁安林,傅翠真,常汝镇,等.大豆中脂肪氧化酶同工酶的鉴定研究[J].作物学报,1994,20(3):373-374. ( Ding A L, Fu C Z, Chang R Z, et al. A study for identification of soybean lox isozymes [ J ]. Acta Agronomica Sinica, 1994, 20 ( 3 ) : 373-374. )

## 《核农学报》简介及征稿启事

《核农学报》1987年创刊,由中国农业部主管,中国原子能农学会与中国农业科学院农产品加工所联合主办,是国内核技术和生物物理技术在农业和生物学研究应用领域唯一的学术期刊,属“中文核心期刊”、“中国科技论文统计源期刊”和“中国科学引文数据库统计期刊”。学报作为985高校、国家级科研机构评审认定的一级学报,目前影响因子0.977,在46种农学类核心期刊中名列第七位,在10种核科学技术类期刊中排名第一。

目前我刊为双月刊,栏目主要包括:1.植物诱变育种·农业生物技术:诱变类收录诱变育种和诱变生理等与诱变相关的研究论文及综述。农业生物技术类主要收录基因克隆、功能表达、分子标记、蛋白分析、遗传分析及细胞学等涉及生物学手段的研究论文和综述。2.农产品辐照研究·食品科学:收录辐照加工,农产品贮藏保鲜,食品科学包括食品加工、功能性成分分析、食品微生物,食品安全包括农产品产地溯源、单克隆抗体、生物毒素降解等方面论述成果。3.同位素示踪·资源环境·动植物生理:收录同位素在农业、环境中的应用及动植物生理动态示踪方面研究成果;农业与土壤生态、环境效应等方向具有创造性的研究成果;不同环境因子对动植物生理生化指标影响方面的成果。

2012年我刊将扩大“农产品辐照研究·食品科学”栏目收稿范畴及刊载量。主要包括:生物工程技术、杀菌技术、物性修饰技术、农产品贮藏保鲜物流技术、农产品循环利用技术、农产品加工全程质量控制技术等方面研究成果。详情请登录官网:www.hnxb.org。

欢迎广大学者、从业人士热切关注,具体投稿要求详见官网。来稿请登录官网投稿系统,或致电编辑垂询:01062815961。