



大豆脂肪氧化酶缺失种质生化鉴定方法比较及其营养品质分析

马彩优^{1,2}, 张晟瑞², 李 斌², 李 静², 杜维俊¹, 孙君明²

(1. 山西农业大学 农学院, 山西 晋中 030801; 2. 中国农业科学院 作物科学研究所/作物分子育种国家工程研究中心/农业农村部北京大豆生物学重点实验室, 北京 100081)

摘 要:大豆脂肪氧化酶(LOX)是一种重要的豆腥味因子,为了筛选适宜的 LOX 鉴定方法和优异的 LOX 缺失育种亲本,本研究以大豆 LOX 缺失的近等基因系(Century 和 Suzuyutaka)和 6 个低豆腥味品种为材料,采用比色法、变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和等点聚焦聚丙烯酰胺凝胶电泳(IEF-PAGE)技术鉴定 LOX 缺失情况,比较 3 种鉴定方法的优缺点;同时,采用近红外光谱(NIRS)、超高压液相色谱(UPLC)、气相色谱(GC)和高效液相色谱(HPLC)等方法分析 LOX 缺失种质的主要营养品质组分(蛋白质、油分、可溶性糖、脂肪酸、异黄酮、维生素 E 和类胡萝卜素)含量差异。结果表明:比色法简便快捷,试剂需要现配现用;SDS-PAGE 方法简单且成本低,但分辨率较差;而 IEF-PAGE 方法检测准确性较高,但成本也较高。品质分析发现,Century 近等基因系的不同营养品质组分差异显著;而 Suzuyutaka 近等基因系的蛋白质、油分和类胡萝卜素组分差异显著。综上,针对大量种质材料筛选可先采用比色法进行快速初筛,然后结合 IEF-PAGE 法进行精准鉴定,既可加速低豆腥味大豆育种进程,同时可降低检测成本。筛选出具有不同营养品质组分的 LOX 缺失的优异种质,可为低豆腥味大豆品种选育提供可靠的育种和亲本材料。

关键词:大豆脂肪氧化酶;比色法;SDS-PAGE;IEF-PAGE;营养品质;低豆腥味

Comparison of Biochemical Identification Methods and Nutritional Quality Analysis for Lipoygenase Mutants in Soybean

MA Cai-you^{1,2}, ZHANG Sheng-rui², LI Bin², LI Jing², DU Wei-jun¹, SUN Jun-ming²

(1. College of Agriculture, Shanxi Agricultural University, Jinzhong 030801, China; 2. Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences/National Engineering Research Center of Crop Molecular Breeding/MARA Beijing Key Laboratory of Soybean Biology, Beijing 100081, China)

Abstract: Soybean lipoxygenase (LOX) is the important off-flavor factor in soybean. In order to screen suitable LOX identification methods and excellent parents of missing sports species, we selected two near-isogenic line populations (NIL, Century and Suzuyutaka) with LOX mutants and six cultivars with low beany flavor as materials, and determined the LOX mutants using colorimetry, sodiumdodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and isopoint focusing polyacrylamide gel electrophoresis (IEF-PAGE) biochemical technique, and compared their advantages and disadvantages among three methods in this study. Moreover, we also analyzed the main nutritional quality components, including protein, oil, soluble sugar, fatty acid, isoflavone, vitamin E and carotenoids in the LOX mutants using NIRS, UPLC, GC and HPLC methods. The results showed that the colorimetric method was a simple and fast technique, however, its reagents need to be prepared and used in time, the SDS-PAGE method was a simple and low-cost technique with poor resolution, and the IEF-PAGE had the highest detection accuracy with high cost. The quality analysis showed that the main nutritional quality components were significantly different in the NILs of Century, while the protein, oil and carotenoid contents were significantly different in the NILs of Suzuyutaka. It can conclude that in a large-scale of breeding lines, we can use the colorimetric method to rapidly screen LOX mutants firstly, and then employed the IEF-PAGE to validate the results, which can not only speed up the breeding progress of soybean cultivars with low beany flavor, but also reduce the detection cost. Otherwise, the cultivars with various elite quality traits selected can provide the key parents for low off-flavor soybean breeding in the future.

Keywords: soybean lipoxygenase; colorimetric method; SDS-PAGE; IEF-PAGE; nutritional quality; low off-flavor

大豆中含有脂肪氧化酶(Lipoxygenase, LOX), 占大豆总蛋白含量的 1% ~ 2%, 能够专一催化含有顺,顺-1,4-戊二烯结构多元不饱和脂肪酸的加氧反应,形成具有共轭双键脂肪酸氢过氧化物,使大豆产生豆腥味^[1-2]。成熟大豆种子主要含有 3 种脂肪

氧化酶同工酶,即 LOX1、LOX2 和 LOX3,分子量分别为 94 038,97 036 和 96 663 Da,最适 pH 分别为 9.0,6.5 和 7.0,等电点分别为 5.65,5.85 和 6.00 ~ 6.15^[3-5]。3 种酶对豆腥味影响程度大小为 LOX2 > LOX1 > LOX3^[1]。

收稿日期:2021-12-25

基金项目:中国农业科学院农业科技创新工程(2060302-2);山西农业大学省部共建有机旱作农业国家重点实验室自主研发项目(202105D121008-3-8);山西农业大学育种工程项目(YZGC096)。

第一作者:马彩优(1998—),女,硕士研究生,主要从事大豆分子育种研究。E-mail:1286837665@qq.com。

通讯作者:杜维俊(1968—),女,博士,教授,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail:duweijun68@126.com;

孙君明(1972—),男,博士,研究员,主要从事大豆高产优质分子育种工作。E-mail:sunjunming@caas.cn。

LOX 所催化产生的过氧化氢衍生物直接与大豆中的蛋白质和氨基酸结合,破坏了人体必需脂肪酸;而且脂肪氧化酶代谢产物经过不同的裂解酶分解,产生醇、酮、醛类等挥发性物质,是造成大豆不良风味的主要原因、降低了大豆的营养品质和豆制品加工品质,在一定程度上缩短了大豆的储藏期^[1-3]。通过烘烤、微波、发芽、热水漂烫、加热等方法可改变豆制品的理化性质从而控制大豆制品的异味,但这些加工方法成本高,容易破坏豆制品的营养成分,尤其是蛋白质组分,并且异味化合物与蛋白质的高亲和性增加了去除豆腥味的难度^[6-11]。因此,从基因水平上去除 LOX 酶活性,培育缺失脂肪氧化酶的大豆品种是最为行之有效的方法。

目前,研究发现脂肪氧化酶缺失大豆品种的 DETBA(1,3-二乙基-2-硫代巴比妥酸)值和己醛积累水平较低^[12-14];11S 球蛋白亚基与脂肪氧化酶双缺失的大豆种质的蛋白含量、赖氨酸含量相对较高,而脂肪含量相对较低^[15]。贵州地方品种营养品质比较分析发现,脂肪氧化酶缺失的种质蛋白质、脂肪含量较低,其氨基酸组成与普通品种相当,缺失育成品种的蛋白质含量则高达 47% 以上^[16]。由此可见,解析不同大豆脂肪氧化酶缺失体种质的主要营养品质性状差异,对选育营养品质优异的低豆腥味大豆品种具有重要指导意义。

培育脂肪氧化酶缺失的低豆腥味大豆新品种不仅需要优异的亲本,还需要可靠的鉴定方法。在传统检测脂氧酶缺失的方法中,氧电极法和量压法存在仪器、密闭空间和温度要求比较苛刻等问题;分光光度法主要针对脱脂大豆的脂氧酶检测,无法用于种子鉴定;酶联免疫法(ELISA)分辨率高、特异性强,但技术难度较大,难以被掌握^[1,17-18]。

本研究以大豆脂肪氧化酶缺失近等基因系和低豆腥味育成品种为材料,采用比色法、变性聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和等电聚焦聚丙烯酰胺凝胶电泳(IEF-PAGE)3 种生化鉴定方法分析籽粒中脂肪氧化酶缺失情况,比较 3 种方法的优缺点,对比得出不同生化鉴定方法的适用范围,为培育低豆腥味大豆品种提供合理的方法建议。另一方面,针对脂肪氧化酶缺失的大豆种质开展主要品质性状(蛋白、脂肪、可溶性糖、脂肪酸、异黄酮、维生素 E 和类胡萝卜素)评价分析,以明确脂肪氧化酶基因缺失对大豆籽粒中主要营养品质组分的影响,为低豆腥味优质专用大豆品种育种提供理论指导。

1 材料与方法

1.1 材料

以大豆脂肪氧化酶缺失近等基因系 Century 和 Suzuyutaka,以及脂肪氧化酶缺失的育成品种为材料,包括近等基因系野生型材料 Century(C)、近等基因系缺失体材料 Century-1(C-1, *lox1*)、Century-2(C-2, *lox2*)、Century-3(C-3, *lox3*)、Suzuyutak-1.2(S-1.2, *lox1.2*)、Suzuyutaka-1.3(S-1.3, *lox1.3*)、Century-2.3(C-2.3, *lox2.3*)、Suzuyutaka-1.2.3(S-1.2.3, *lox1.2.3*),以及缺失 LOX2 基因(*lox2*)的大豆品种中黄 18、中黄 31、中黄 68、中黄 102、中黄 203 和缺失 LOX3 基因(*lox3*)的大豆品种中黄 78。上述所有大豆材料均来自于中国农业科学院作物科学研究所。

1.2 仪器与试剂

1.2.1 仪器与设备 Wile65 籽粒水分测定仪(芬兰 Farmcomp 公司)、旋风磨样机(德国 Rheinische 公司)、垂直电泳槽 DYCZ-24DN(北京六一生物科技有限公司)、高压电泳装置 MultipHor II(美国 GE 公司)、冷凝装置 MultipHor III(美国 GE 公司)、傅里叶变换近红外光谱仪(德国 Bruker 公司)、气相色谱仪 GC(日本岛津公司)、高效液相色谱仪 HPLC(美国 Agilent 公司)和超高效液相色谱仪 UPLC(美国 Waters 公司)。

1.2.2 主要试剂 亚甲基蓝、二硫代苏糖醇和考马斯亮蓝 R-250(北京 Solarbio 公司),亚油酸、 β -胡萝卜素和邻联茴香胺(美国 Sigma 公司),两性电解质和 TEMED(北京 OKA 公司),乙醇、乙腈和丙酮(色谱级)(美国 Thermo Fisher)。其他实验室常用试剂均为分析纯,全部购自国内的试剂公司。

1.3 试验设计

所有大豆材料于 2020 年 5 月分别种植在中国农业科学院南口中试基地,每个材料单行区,行长 3 m,行距 0.5 m,株距 10 cm,3 次重复,待植株完全成熟后统一收获脱粒,相同大豆品种籽粒混合收获晾干,采用 Wile65 籽粒水分测定仪(芬兰 Farmcomp 公司)确定籽粒含水量在 10% 以下,然后在同一条件下磨粉,并置于 -20 °C 冰箱保存待用。

采用比色法、SDS-PAGE 方法和 IEF-PAGE 方法 3 种生化检测方法检测不同 LOX 同工酶缺失情况,并比较 3 种方法的优缺点,每个样品重复检测 3 次。

以遗传背景一致的大豆脂肪氧化酶缺失近等

基因系 Century (Century、C-1、C-2、C-3、C-2.3) 和 Suzuyutaka (S-1.2、S-1.3、S-1.2.3), 以及 6 个遗传背景不同的低豆腥味大豆品种 (中黄 18、中黄 31、中黄 68、中黄 78、中黄 102 和中黄 203) 为材料, 采用 NIRS、UPLC、GC 和 HPLC 方法分析其主要营养品质组分 (蛋白质、油分、可溶性糖、脂肪酸、异黄酮、维生素 E 和类胡萝卜素) 含量, 蛋白质和油分含量重复测定 3 次, 其他品质性状每个样品重复测定 2 次, 以探究不同 LOX 同工酶缺失对大豆营养品质的影响。

1.4 大豆脂肪氧化酶生化鉴定方法

1.4.1 比色法 采用基于 3 种 LOX 同工酶对亚油酸的氧化还原能力不同的原理而开发的比色法鉴定技术^[19], 其中 LOX 野生型材料可发生褪色反应, 而 LOX 缺失体不发生褪色反应。具体操作步骤如下:

LOX1 检测: 2.5 mg 豆粉加 0.5 mL 蒸馏水, 摇匀静置 3~10 min, 然后加入 2.0 mL L-1 反应溶液 (0.2 mol·L⁻¹ 硼酸盐缓冲液、100 μmol·L⁻¹ 亚甲基蓝、10 μmol·L⁻¹ 亚油酸钠、蒸馏水) 反应 3 min, 观察颜色。

LOX2 检测: 10 mg 豆粉加 0.5 mL 蒸馏水, 摇匀静置 3~10 min, 然后加入 1 mL L-2 反应溶液 (二硫代苏糖醇、0.2 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液、100 μmol·L⁻¹ 亚甲基蓝、10 μmol·L⁻¹ 亚油酸钠、丙酮) 反应 3 min, 观察颜色。

LOX3 检测: 2.5 mg 豆粉加 0.5 mL LOX2 溶液匀浆, 摇匀静置 3~10 min, 然后加入 2.0 mL L-3 反应溶液 (0.2 mol·L⁻¹ 磷酸盐缓冲液、10 μmol·L⁻¹ 亚油酸钠、蒸馏水、50% β-胡萝卜素/丙酮) 反应 10 min, 观察颜色。

1.4.2 SDS-PAGE 方法 采用基于 3 种 LOX 同工酶蛋白质的分子量大小不同所产生的不同迁移率将蛋白质分离成不同条带的原理研发的变性聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 鉴定技术^[20]。其具体操作步骤如下:

蛋白提取: 取豆粉 8 mg 放入 1.5 mL 离心管中, 加入 0.5 mL 蛋白质提取液 (Tris-HCl、β-巯基乙醇), 0.5 mL 样品缓冲液 (Tris-HCl、蔗糖、十二烷基硫酸钠 SDS、尿素、β-巯基乙醇、溴酚蓝), 用涡流震荡器搅拌均匀, 超声波萃取 5~6 min, 室温下放置 20~30 min, 涡流震荡器搅拌均匀后, 5 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取上清备用。

制备凝胶: 组装玻璃板, 制备分离胶和浓缩胶。先加分离胶, 后加纯水至满, 使分离胶水平, 静置至凝固, 倒掉纯水, 吸干多余水分, 再加浓缩胶。将适量配好的电泳缓冲液 (SDS、Tris、甘氨酸) 倒入垂直电泳槽内。

分离胶: 30% 丙烯酰胺、1.0 mol·L⁻¹ Tris-HCl (pH6.8)、10% SDS、蒸馏水、10% 过硫酸铵 (AP)、四甲基乙二胺 (TEMED)。

浓缩胶: 30% 丙烯酰胺、1.5 mol·L⁻¹ Tris-HCl (pH8.8)、10% SDS、蒸馏水、10% AP、TEMED。

电泳条件: 电压 100 V, 电泳时间 1 h 左右, 待溴酚蓝指示剂通过浓缩胶后, 将电压升至 150 V, 电泳时间 2 h 左右, 溴酚蓝指示剂即将通过胶体底端时停止电泳, 取下胶体。

染色脱色: 凝胶放入染色液, 轻摇染色 1 h, 取出放入脱色液, 轻摇脱色 4 h 以上, 在普通荧光玻璃灯箱上, 鉴定脂肪氧化酶是否缺失。

染色液: 2.5 g 考马斯亮蓝、454 mL 甲醇、92 mL 乙酸、454 mL 蒸馏水。

脱色液: 50 mL 甲醇、75 mL 乙酸、875 mL 蒸馏水。

1.4.3 IEF-PAGE 方法 基于不同 LOX 同工酶的等电点的最适 pH 差异原理而研发的等电聚焦聚丙烯酰胺凝胶电泳 (IEF-PAGE) 鉴定技术^[21]。其具体操作步骤如下:

蛋白提取: 15 mg 豆粉加入 200 μL 蛋白提取缓冲液 (0.092 mol·L⁻¹ Tris-HCl), 震荡均匀, 放置 4 ℃ 提取 1~2 h, 4 ℃ 12 000 r·min⁻¹ 离心 15 min, 取上清备用。

制备凝胶: 制胶前两块玻璃板分别涂上疏水硅烷和亲和硅烷, 厚玻璃涂疏水硅烷, 静置 10 min。制胶 (40% 丙烯酰胺和 2% 甲叉双丙烯酰胺、蒸馏水、两性电解质 pH5~7、TEMED、10% AP) 沿灌胶口注入, 用夹子固定, 静置 1 h 备用。

预电泳: 配置好的凝胶放在电泳装置 MultipHor II 上, 凝胶两端加电极条 (正极缓冲液 0.5 mol·L⁻¹ H₃PO₄, 负极缓冲液 0.5 mol·L⁻¹ NaOH), 预电泳 30 min (1 500 V, 50 mA, 4 W); 冷凝装置 MultipHor III 4 ℃ 冷却。

点样: 取 3 μL 样品加在凝胶上, 电泳 10 min (200 V, 50 mA, 4 W) 重调, 之后电泳 (1 500 V, 50 mA, 4 W) 1 h 45 min。

酶液固定: 电泳结束后用 0.1 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲

液(pH7.5)缓冲 5 min,然后放入酶液中(亚油酸、吐温、邻联茴香胺、无水乙醇、0.1 mol·L⁻¹磷酸盐缓冲液)37 ℃恒温培养箱中固定 1 h。

染色脱色:0.1 mol·L⁻¹磷酸缓冲液(pH7.5)再次冲洗 5 min 后,清洗液(甲醇、乙酸、蒸馏水)冲洗 3 min,考马斯亮蓝 60~70 ℃染色 15 min,清洗液冲洗脱色。晾干后在普通荧光玻璃灯箱上鉴定 3 种脂肪氧化酶缺失情况。

1.5 大豆籽粒营养品质组分提取与检测方法

1.5.1 蛋白质和油分含量 采用傅立叶变换近红外光谱仪(德国 Bruker-Fourier)测定每个样品的粗蛋白质和粗脂肪含量,每个样品取 50 g 大豆种子进行 3 次光谱扫描,光谱吸收范围为 4 000~8 000 cm⁻¹,然后使用 Bruker OPUS 4.2 软件的 Quant 2 方法将收集的光谱转换为蛋白质和油分含量^[22],最后取 3 次重复的平均值为测定值。

1.5.2 可溶性糖含量 100 mg 豆粉经过 1 mL 50% 乙腈溶剂提取后过夜震荡,12 000 r·min⁻¹冷冻离心 10 min 后,取上清液 500 μL 加入 200 μL 乙腈静置,再次离心取上清液过滤,使用超高效液相色谱仪(UPLC-RID, Waters)的折光指数检测器和 Acquity BEH 酰胺色谱柱定量测定可溶性糖各个组分含量^[22]。

1.5.3 脂肪酸含量 采用加热甲酯化提取脂肪酸,利用气相色谱仪 GC(火焰离子检测器 FID)进行检测,并使用面积归一法量化 5 种脂肪酸的百分比^[23]。

1.5.4 异黄酮含量 异黄酮提取和检测方法采用 Sun 等^[24]的研究方法。100 mg 豆粉加入 5 mL 提取液(含 0.1% 乙酸、70% 乙醇的水溶液),过夜震荡,6 000 r·min⁻¹冷冻离心 10 min 后取上清液过滤,在安捷伦 1260 系列 HPLC 仪上利用 YMC ODS AM-303 色谱柱进行检测,使用紫外检测器在 260 nm 波长下监测异黄酮各组分含量^[24]。

1.5.5 维生素 E 含量 50 mg 豆粉经过 1 mL 100% 乙醇提取,超声破碎 20 min,13 000 r·min⁻¹冷冻离心 20 min 后取上清液过滤,并在安捷伦 1200 系列 HPLC 仪上利用 C18 反相柱进行检测,使用紫外检测器在 295 nm 波长下检测各个生育酚组分含量^[25]。

1.5.6 类胡萝卜素含量 100 mg 豆粉经过 1 mL 乙

醇-丙酮(1:1)溶剂提取,超声破碎 20 min,13 000 r·min⁻¹冷冻离心 20 min 后取上清液,再次离心 5 min 后取上清过滤,利用反向高效液相色谱(RP-HPLC)方法,在安捷伦 1100 型 HPLC 紫外可见检测器的 450 nm 波长下检测类胡萝卜素各个组分含量^[26]。

1.6 数据分析

采用微软 Excel 2019 和 R3.4.5 软件进行数据的统计分析。

2 结果与分析

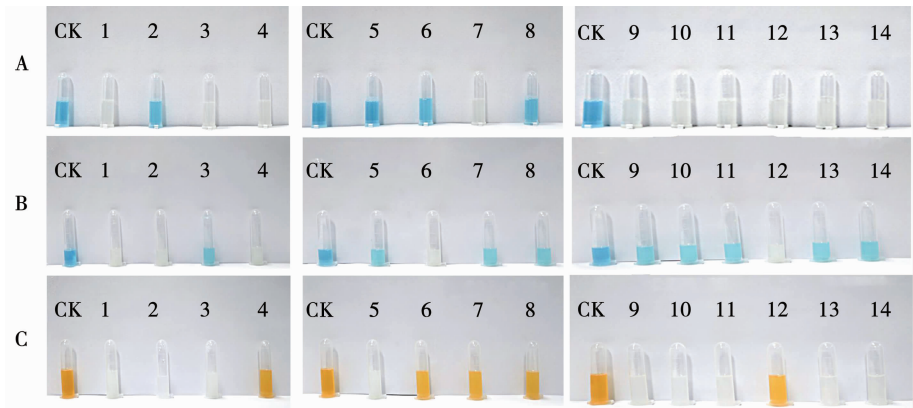
2.1 脂肪氧化酶缺失大豆种质生化鉴定方法比较

2.1.1 比色法 LOX1 的检测结果如图 1A 所示,以蒸馏水为对照,LOX1 不缺失材料(C、C-2、C-3、C-2.3、中黄 18、中黄 31、中黄 68、中黄 78、中黄 102 和中黄 203)的亚油酸被氧化,亚甲基蓝被还原,检测溶液被漂白至澄清;LOX1 缺失的材料(C-1、S-1.2、S-1.3、S-1.2.3)不发生反应,检测溶液不变色,据此可以判定 LOX1 缺失情况。

LOX2 的检测结果如图 1B 所示,以蒸馏水为对照,LOX2 不缺失材料(C、C-1、C-3、S-1.3 和中黄 78)的亚油酸被氧化,亚甲基蓝被还原,检测溶液被漂白至澄清;LOX2 缺失材料(C-2、S-12、C-2.3、S-1.2.3、中黄 18、中黄 31、中黄 68、中黄 102 和中黄 203)不发生反应,检测溶液不变色,据此可以判定 LOX2 缺失情况。

LOX3 的检测结果如图 1C 所示,以蒸馏水为对照,LOX3 不缺失材料(C、C-1、C-2、S-1.2、中黄 18、中黄 31、中黄 68、中黄 102 和中黄 203)的亚油酸被氧化,β-胡萝卜素溶液被漂白至澄清;LOX3 缺失材料(C-3、S-1.3、C-2.3、S-1.2.3 和中黄 78)不发生反应,检测溶液不变色,据此可以判定 LOX3 缺失情况。

2.1.2 SDS-PAGE 方法 如图 2A 所示,LOX 位置条带深浅不一。第 1 泳道为野生型 Century,有一条颜色较深较粗的条带;第 8 泳道为 LOX 同工酶全缺失材料,则没有条带显示;第 2 和 3 泳道为单缺失 LOX1 或 LOX2 材料,条带颜色较野生型浅;第 4 泳道为单缺失 LOX3 材料,条带位置偏低,颜色较浅。双缺失材料电泳条带颜色比单缺失材料的条带更浅。



注:A. LOX1 鉴定;B. LOX2 鉴定;C. LOX3 鉴定。CK. 蒸馏水;1. C;2. C-1;3. C-2;4. C-3;5. S-1. 2;6. S-1. 3;7. C-2. 3;8. S-1. 2. 3;9. 中黄 18;10. 中黄 31;11. 中黄 68;12. 中黄 78;13. 中黄 102;14. 中黄 203。

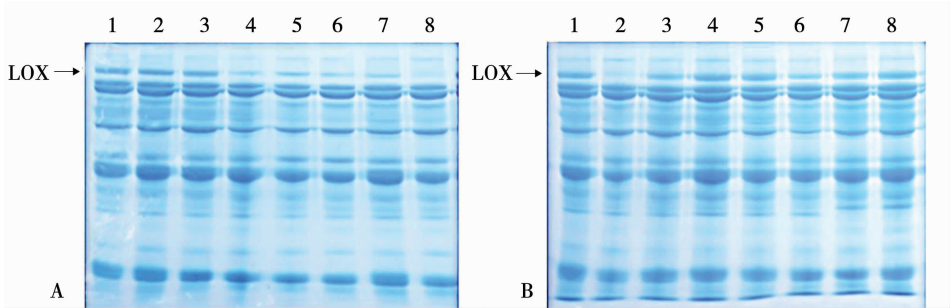
Note:A. LOX1 identification; B. LOX2 identification; C. LOX3 identification. CK. Distilled water; 1. C; 2. C-1; 3. C-2; 4. C-3; 5. S-1. 2; 6. S-1. 3; 7. C-2. 3; 8. S-1. 2. 3; 9. Zhonghuang 18; 10. Zhonghuang 31; 11. Zhonghuang 68; 12. Zhonghuang 78; 13. Zhonghuang 102; 14. Zhonghuang 203.

图 1 比色法鉴定大豆脂肪氧化酶缺失情况

Fig. 1 The profile of colorimetric method for soybean lipoxigenase

LOX 缺失大豆品种的验证如图 2B 所示,泳道 1 和 2 分别为野生型 Century 和全缺失体 S-1. 2. 3, LOX 条带位置有明显差异。泳道 3、4、5、7 和 8 分别为中黄 18、中黄 31、中黄 68、中黄 102 和中黄 203, 均为缺失 LOX2 品种,条带颜色较野生型浅;中黄 78

缺失 LOX3,条带颜色比缺失 LOX2 的材料更浅。如图 2B 所示,位于泳道 4 的中黄 31(*lox2*)的 LOX 条带较其它品种深,说明该品种的脂肪氧化酶整体活性较高,而无法分辨出 LOX2 的缺失情况。



注:A 图中,1. Century;2. C-1;3. C-2;4. C-3;5. S-1. 2;6. S-1. 3;7. C-2. 3;8. S-1. 2. 3。B 图中,1. Century;2. S-1. 2. 3;3. 中黄 18;4. 中黄 31;5. 中黄 68;6. 中黄 78;7. 中黄 102;8. 中黄 203。

Note:In figure A, 1. Century; 2. C-1; 3. C-2; 4. C-3; 5. S-1. 2; 6. S-1. 3; 7. C-2. 3; 8. S-1. 2. 3. In figure B, 1. Century; 2. S-1. 2. 3; 3. Zhonghuang 18; 4. Zhonghuang 31; 5. Zhonghuang 68; 6. Zhonghuang 78; 7. Zhonghuang 102; 8. Zhonghuang 203.

图 2 大豆脂肪氧化酶 SDS-PAGE 电泳图谱

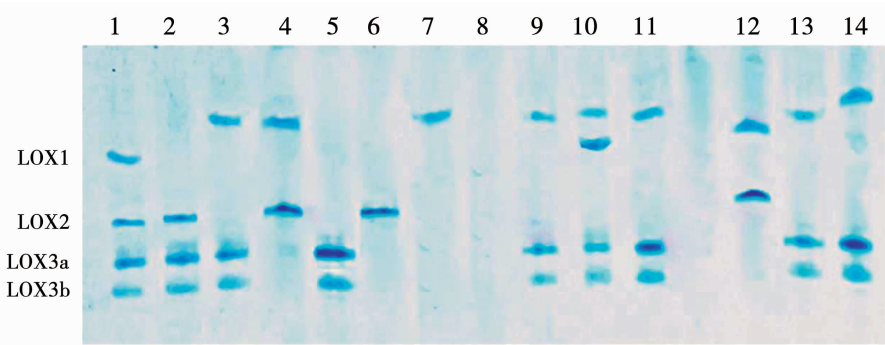
Fig. 2 The electrophoretogram of SDS-PAGE for soybean lipoxigenase

2.1.3 IEF-PAGE 方法 如图 3 所示,脂肪氧化酶有 4 种类型的同工酶条带。根据等电点的不同,从上到下依次为 LOX1、LOX2、LOX3a 和 LOX3b。泳道 1 为野生型 Century,含有 4 种类型同工酶条带;泳道 2 为缺失 LOX1 同工酶的 C-1,显示存在 LOX2、LOX3a 和 LOX3b 条带;泳道 3 为缺失 LOX2 同工酶的 C-2,显示存在 LOX1、LOX3a 和 LOX3b 条带;泳道 4 为缺失 LOX3 同工酶的 C-3,显示存在 LOX1 和 LOX2 条带;泳道 5 为缺失 LOX1.2 的 S-1. 2,显示存

在 LOX3a 和 LOX3b 条带;泳道 6 为缺失 LOX1.3 的 S-1. 3,显示存在 LOX2 条带;泳道 7 为缺失 LOX2.3 的 C-2. 3,显示存在 LOX1 条带;泳道 8 为 LOX 全缺失体 S-1. 2. 3,表现为无 LOX 同工酶条带。泳道 9、10、11、13 和 14 均为缺失 LOX2 的大豆品种,均显示存在 LOX1、LOX3a 和 LOX3b 3 种同工酶谱带,特别是泳道 10 为中黄 31,其 LOX1 存在两条谱带。泳道 12 为缺失 LOX3 的品种中黄 78,显示存在 LOX1 和 LOX2 两种同工酶谱带。整体来看,如果鉴定的大

豆种质为缺失体材料,则 LOX1 的谱带较野生型 Century 会发生向上迁移现象,这种现象在一定程度上可以区分大豆种子是否存在杂合情况。如第 10

泳道的中黄 31 为 LOX2 缺失品种,但 LOX1 却存在两条谱带,表明该种子可能存在杂合情况。



注:1. Century;2. C-1;3. C-2;4. C-3;5. S-1. 2;6. S-1. 3;7. C-2. 3;8. S-1. 2. 3;9. 中黄 18;
10. 中黄 31;11. 中黄 68;12. 中黄 78;13. 中黄 102;14. 中黄 203。
Note:1. Century; 2. C-1; 3. C-2; 4. C-3; 5. S-1.2; 6. S-1.3; 7. C-2.3; 8. S-1.2.3; 9. Zhonghuang 18;
10. Zhonghuang 31; 11. Zhonghuang 68; 12. Zhonghuang 78; 13. Zhonghuang 102; 14. Zhonghuang 203.

图 3 大豆脂肪氧化酶 IEF-PAGE 电泳图谱

Fig. 3 The electrophoretogram of IEF-PAGE for soybean lipoxigenase

2.2 脂肪氧化酶缺失大豆种质营养品质评价

2.2.1 脂肪氧化酶缺失大豆近等基因系营养品质分析 大豆脂肪氧化酶缺失近等基因系 (Century) 的营养品质分析结果如表 1 所示,除亚麻酸含量外,其他主要营养品质组分在不同 LOX 缺失材料间均存在显著差异。其蛋白质含量变化范围为 43.12% ~ 46.36%,平均值为 44.45%,变异系数为 3%,其中 C-2.3 的蛋白质含量最高(46.36%);脂肪含量变化范围为 18.34% ~ 20.50%,平均值为 19.41%,变异系数为 4%,其中 C-1 的脂肪含量最高(20.5%);5 种脂肪酸组分含量的变异系数范围为 2% ~ 6%,其中 C-2 的油酸和硬脂酸占比最高,分别为 27.71% 和 5.31%,C-2.3 的棕榈酸和亚麻酸的相对含量最高,分别为

12.54% 和 7.74%,C-3 的亚油酸含量最高(51.93%);异黄酮含量变异范围为 1 209.80 ~ 2 086.61 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,平均值为 1 626.85 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,变异系数为 26%,其中 C-1 的异黄酮含量最高(2 086.61 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$);维生素 E 含量变化范围为 222.22 ~ 233.19 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,平均值为 226.41 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,变异系数为 2%,其中 C-3 的维生素 E 含量最高(233.19 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$);可溶性糖含量变化范围为 8.19 ~ 9.43 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,平均值为 8.93 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$,变异系数为 5%,其中 Century 的可溶性糖含量最高(9.43 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$);类胡萝卜素含量范围为 1.38 ~ 2.20 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,平均值为 1.87 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$,变异系数为 17%,其中 C-2.3 的类胡萝卜素含量最高(2.20 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)。

表 1 大豆脂肪氧化酶缺失近等基因系 (Century) 的营养组分含量分析

Table 1 The evaluation of nutritional quality component content in soybean lipoxigenase-deficient near-isogenic lines (Century)

材料 Material	蛋白 Protein /%	脂肪 Oil /%	棕榈酸 Palmitic acid/%	硬脂酸 Stearic acid/%	油酸 Oleic acid/%	亚油酸 Linoleic acid/%	亚麻酸 Linolenic acid/%	异黄酮 Isoflavones /($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	维生素 E Vitamin E /($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	可溶性糖 Soluble sugar /($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	类胡萝卜素 Carotenoids /($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
C	44.20 bc	19.78 b	12.02 bc	5.00 b	25.02 b	50.89 b	7.08 a	2058.28 a	222.22 b	9.43 a	1.80 ab
C-1	43.12 c	20.50 a	11.82 cd	4.90 b	25.23 b	50.95 b	7.10 a	2086.61 a	225.04 b	8.98 b	1.38 b
C-2	44.44 b	19.38 bc	11.70 d	5.31 a	27.71 a	48.56 d	6.73 a	1267.05 b	227.56 ab	9.04 b	2.09 a
C-3	44.13 bc	18.34 d	12.16 b	4.89 b	23.57 c	51.93 a	7.45 a	1209.80 b	233.19 a	8.19 c	1.90 a
C-2.3	46.36 a	19.03 c	12.54 a	4.92 b	24.74 b	50.06 c	7.74 a	1512.54 b	224.05 b	9.01 b	2.20 a

注:同列不同小写字母表示差异在 0.05 水平显著。下同。
Note: Different lowercase in the same column indicate significant differences at the 0.05 level. The same below.

大豆脂肪氧化酶缺失近等基因系 (Suzuyutaka) 的营养品质分析结果如表 2 所示,蛋白质、脂肪、亚麻酸和类胡萝卜素含量均存在显著性差异。其蛋白质含量范围为 35.64% ~ 38.35%, 平均值为 37.12%, 变异系数为 4%, 其中 S-1.3 的蛋白质含量最高 (38.35%); 脂肪含量范围为 20.44% ~ 21.84%, 平均值为 20.95%, 变异系数为 4%, 其中 S-1.2.3 的脂肪含量最高 (21.84%); 5 种脂肪酸组分中仅亚麻酸含量差异显著, 其中 S-1.2 的亚麻酸

含量最高 (10.6%); 异黄酮含量变异不显著, 平均含量为 4 173.10 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$; 维生素 E 含量范围为 274.58 ~ 439.91 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 平均值为 332.93 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 变异系数为 28%, 其中 S-1.3 的维生素 E 含量最高 (439.91 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$); 可溶性糖含量变化不显著, 平均含量为 12.87 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$; 类胡萝卜素含量范围为 0.61 ~ 1.27 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 平均值为 0.85 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 变异系数为 44%, 其中 S-1.2 的类胡萝卜素含量最高 (1.27 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)。

表 2 大豆脂肪氧化酶缺失近等基因系 (Suzuyutaka) 的营养组分含量分析

Table 2 The evaluation of nutritional quality component content in soybean lipoxxygenase-deficient near-isogenic lines (Suzuyutaka)

材料 Material	蛋白 Protein /%	脂肪 Oil /%	棕榈酸 Palmitic acid/%	硬脂酸 Stearic acid/%	油酸 Oleic acid/%	亚油酸 Linoleic acid/%	亚麻酸 Linolenic acid/%	异黄酮 Isoflavones /($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	维生素 E Vitamin E /($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	可溶性糖 Soluble sugar /($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	类胡萝卜素 Carotenoids /($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
S-1.2	37.38 b	20.58 b	12.64 a	5.10 a	22.50 a	49.16 a	10.60 a	4167.21 a	274.58 a	12.94 a	1.27 a
S-1.3	38.35 a	20.44 b	13.02 a	5.20 a	22.67 a	48.71 a	10.40 a	4103.40 a	439.91 a	12.74 ab	0.61 c
S-1.2.3	35.64 c	21.84 a	13.04 a	4.75 a	23.02 a	49.74 a	9.44 b	4248.69 a	284.31 a	12.94 ab	0.66 b

2.2.2 低豆腥味大豆品种的营养品质组分评价
由表 3 可知,针对 6 个不同遗传背景的低豆腥味大豆品种的营养品质分析发现,不同品种间营养品质组分均存在显著差异 ($P<0.05$)。其蛋白质含量范围为 38.38% ~ 46.35%, 平均值为 41.68%, 变异系数为 7%, 其中中黄 18 的蛋白质含量最高 (46.35%); 脂肪含量范围为 18.45% ~ 21.64%, 平均值为 20.45%, 变异系数为 5%, 其中中黄 78 的脂肪含量最高 (21.64%)。在 5 种脂肪酸组分中,中黄 203 的棕榈酸、硬脂酸、亚麻酸含量最高, 分别达到 12.78%、5.03% 和 10.43%; 而中黄 102 的亚油酸含量最高 (57.25%); 中黄 78 的油酸含量最高 (24.92%);

异黄酮含量范围为 2 529.72 ~ 5 240.84 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 平均值为 3 665.49 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 变异系数为 32%, 其中中黄 68 的异黄酮含量最高 (5 240.84 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$); 维生素 E 含量范围为 202.14 ~ 292.78 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 平均值为 248.01 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 变异系数为 14%, 其中中黄 68 维生素 E 含量最高 (292.78 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$); 可溶性糖含量范围为 8.92 ~ 11.17 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 平均值为 10.65 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$, 变异系数为 8%, 其中中黄 102 的可溶性糖含量最高 (11.17 $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$); 类胡萝卜素含量范围为 0.62 ~ 2.66 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 平均值为 1.74 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$, 变异系数为 42%, 其中中黄 78 的类胡萝卜素含量最高 (2.66 $\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)。

表 3 脂肪氧化酶缺失大豆品种营养品质组分含量评价

Table 3 The evaluation of nutritional quality components content in lipoxxygenase-deficient soybean varieties

品种 Variety	蛋白 Protein /%	脂肪 Oil /%	棕榈酸 Palmitic acid/%	硬脂酸 Stearic acid/%	油酸 Oleic acid/%	亚油酸 Linoleic acid/%	亚麻酸 Linolenic acid/%	异黄酮 Isoflavones /($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	维生素 E Vitamin E /($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)	可溶性糖 Soluble sugar /($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$)	类胡萝卜素 Carotenoids /($\mu\text{g}\cdot\text{g}^{-1}$)
ZH18	46.35 a	18.45 d	11.50 d	3.90 c	23.60 bc	53.99 b	7.01 c	2529.72 d	261.54 b	8.92 d	0.62 d
ZH31	41.94 bc	20.68 bc	12.68 a	5.02 a	23.30 c	49.10 d	9.89 ab	4159.81 c	248.13 c	10.81 c	1.46 c
ZH68	38.38 e	20.56 bc	12.43 b	5.03 a	23.58 bc	49.26 d	9.70 ab	5240.84 a	292.78 a	10.88 bc	1.43 c
ZH78	39.76 de	21.64 a	11.86 c	4.90 a	24.92 a	50.86 c	7.46 c	2727.02 d	267.38 b	11.10 ab	2.66 a
ZH102	40.92 cd	20.95 b	12.09 c	4.16 b	17.36 d	57.25 a	9.13 b	2719.46 d	216.10 d	11.17 a	2.02 bc
ZH203	42.72 b	20.42 c	12.78 a	5.03 a	24.00 b	47.76 e	10.43 a	4616.08 b	202.14 e	10.98 abc	2.26 ab

注:ZH18. 中黄 18;ZH31. 中黄 31;ZH68. 中黄 68;ZH78. 中黄 78;ZH102. 中黄 102;ZH203. 中黄 203。
Note:ZH18. Zhonghuang 18;ZH31. Zhonghuang 31;ZH68. Zhonghuang 68;ZH78. Zhonghuang 78;ZH102. Zhonghuang 102;ZH203. Zhonghuang 203.

3 讨论

3.1 大豆籽粒脂肪氧化酶缺失鉴定方法的优缺点

大豆籽粒中 LOX 生化鉴定方法主要包括比色法、SDS-PAGE、Native-PAGE 和 IEF-PAGE 等方法。比色法需要 3 个检测实验来分别鉴定 3 种同工酶,适合快速检测,样本量少的群体,操作方便快捷,成本低;但是需要选择新鲜的、保存良好的种子进行检测来保证 LOX 的酶活性。检测所需试剂不易保存,需现用现配。

SDS-PAGE 方法鉴定 LOX 成本不高且操作流程简单,能够鉴定是否为 LOX 全缺失体。但由于不同 LOX 分子量的差异较小,无法准确区分 3 种 LOX 的具体缺失情况,分辨率低;不同品种间酶活性存在的差异会导致条带深浅不一致的情况。

IEF-PAGE 方法能根据 LOX 同工酶等电点的不同准确区分 3 种 LOX 同工酶,并且能清晰地分离出 4 条酶带 LOX1、LOX2、LOX3a 和 LOX3b,从而鉴定出 LOX 缺失情况。表明 IEF-PAGE 法具有很高的分辨率、准确性和特异性;但整体上也存在实验操作难度较大,耗时较长,仪器设备昂贵和实验耗材成本高等问题。

3.2 大豆脂肪氧化酶缺失材料对籽粒中主要营养品质组分的影响

从 LOX 缺失近等基因系 Century 的主要营养品质分析发现,不同缺失体材料的主要营养品质组分差异十分显著;而 Suzuyutaka 近等基因系材料主要在蛋白质、脂肪和类胡萝卜素含量方面差异显著,表明 LOX 可能主要影响蛋白质、脂肪和维生素积累,特别是 LOX 全缺失的材料的蛋白质含量显著低于其他材料,而脂肪含量显著高于其他材料。

对于选育出的 6 个低豆腥味大豆品种的主要营养品质组分的比较分析发现,所有检测品质组分在不同品种间均存在显著差异,表明上述选育的大豆品种虽然缺失了相同的 LOX 基因,但由于遗传背景不同,其主要营养品质组分仍存在明显差异;另一方面也说明了 LOX 基因缺失对大豆主要营养品质组分的影响不大,因此可以选育出具有不同特用营养品质且低豆腥味的大豆品种。本研究所选育的低豆腥味大豆品种中,中黄 18 为高蛋白品种,中黄 78 为高油和高类胡萝卜素品种,中黄 68 为高异黄酮和高维生素 E 品种,中黄 203 为高异黄酮和高类胡萝卜素品种,中黄 31 为高异黄酮品种,中黄 102 为高可溶性糖品种,可以满足不同食品加工和营养强化需求。

4 结论

本研究对已有的 3 种大豆籽粒 LOX 缺失生化鉴定方法进行系统性分析,发现 3 种不同方法均存在各自的优缺点。在今后的研究中可视具体情况选择适宜的鉴定方法。比色法可快速鉴定新鲜且酶活性较稳定的材料,适用于对大规模大豆种质资源和育种材料进行高通量鉴定。SDS-PAGE 方法可以用来鉴定脂肪氧化酶是否全缺失,也可通过条带颜色深浅来判断酶蛋白含量。在仪器设备允许的情况下,IEF-PAGE 方法为最优鉴定方法,可以同时分辨 3 种不同类型 LOX 同工酶的缺失情况,可应用于大豆种质资源脂肪氧化酶缺失的精准鉴定和低豆腥味大豆育种中。本研究通过对脂肪氧化酶缺失大豆种质和品种的营养品质组分进行综合评价,筛选出豆腥味低且营养品质优异的大豆品种,如中黄 18(*lox2*)为高蛋白品种,中黄 78(*lox3*)为高油和高类胡萝卜素品种,中黄 68(*lox2*)为高异黄酮和高维生素 E 品种,中黄 203(*lox2*)为高异黄酮和高类胡萝卜素品种,中黄 31(*lox2*)为高异黄酮品种,中黄 102(*lox2*)为高可溶性糖品种,这些大豆品种可作为优异育种亲本和加工原料,应用于低豆腥味大豆品种改良和豆制品加工业,以提升我国大豆产业综合竞争力。

参考文献

[1] 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. Research progress of lipoxygenase in soybean [J]. Soybean Science, 1995, 14(1): 67-73.)

[2] IASSONOVA D R, JOHNSON L A, HAMMOND E G, et al. Evidence of an enzymatic source of off flavors in “Lipoxygenase-Null” soybeans [J]. Journal of the American Oil Chemists’ Society, 2009, 86(1): 59-64.

[3] SIEDOW J N. Plant lipoxygenase: Structure and function [J]. Annual Review of Plant Biology, 1991, 42(1): 145-188.

[4] SUN J M, WU S M, TAO W J, et al. Detection of RAPD makers linked to gene *lxl* in soybeans [J]. Agricultural Sciences in China, 2004, 3(1): 8-13.

[5] 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 lipoxygenase [J]. Soybean Science, 2004, 23(2): 111-113.)

[6] IWUOHA C I, UMUNNAKWE K E. Chemical, physical and sensory characteristics of soymilk as affected by processing method, temperature and duration of storage [J]. Food Chemistry, 1997, 59(3): 373-379.

[7] JIANG S S, CAI W X, XU B J. Food quality improvement of soy milk made from short-time germinated soybeans [J]. Foods,

- 2013, 2(2): 198-212.
- [8] MA L, LI B, HAN F X, et al. Evaluation of the chemical quality traits of soybean seeds, as related to sensory attributes of soymilk [J]. Food Chemistry, 2015, 173: 694-701.
- [9] 邢竺静, 李笑梅, 赵廉诚, 等. 大豆萌发期脂肪氧化酶与脲酶活性变化及钝化方法效果评价[J]. 食品研究与开发, 2020, 41(1): 14-19. (XING Z J, LI X M, ZHAO L C, et al. The effect evaluation of lipoxygenase and urease activities and passivation method in soybean germination [J]. Food Research and Development, 2020, 41(1): 14-19.)
- [10] 韩健飞, 单长松, 王少刚, 等. 通电加热条件对豆浆中脂肪氧化酶活性的影响[J]. 粮油食品科技, 2016, 24(3): 49-54. (HAN J F, SHAN C S, WANG S G, et al. Effect of ohmic heating on the activity of lipoxygenase in soybean milk [J]. Science and Technology of Cereals, Oils and Foods, 2016, 24(3): 49-54.)
- [11] NELSON A I, STEINBERG M I, WEI L S. Illinois process for preparation of soymilk [J]. Journal of Food Science, 1976, 41(1): 57-61.
- [12] NISHIBA Y, FURUTA S, HAJILA M, et al. Hexanal accumulation and DETBA value in homogenate of soybean seeds lacking two or three lipoxygenase isoenzymes [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995, 43(3): 738-741.
- [13] NISHIBA Y, SUDA I. Degradation of vitamin E, vitamin C, and lutein in soybean homogenate; A comparison of normal soybean and lipoxygenase-lacking (triple-null) soybean [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1998, 46(9): 3708-3712.
- [14] YANG A J, SMYTH H, CHALIHA M, et al. Sensory quality of soymilk and tofu from soybeans lacking lipoxygenases [J]. Food Science & Nutrition, 2016, 4(2): 207-215.
- [15] 王磊. 脂氧酶与11S球蛋白双缺失检测方法及时种质资源品质评价[D]. 哈尔滨: 东北农业大学, 2019. (WANG L. Detection method for double deletion of lipoxygenase and 11S globulin and quality evaluation of germplasm resources[D]. Harbin: Northeast Agricultural University, 2019.)
- [16] 张太平, 朱星陶, 王军, 等. 贵州大豆脂肪氧化酶缺失体的农艺和品质性状分析[J]. 大豆科学, 2000, 19(2): 131-139. (ZHANG T F, ZHU X T, WANG J, et al. Agronomy and quality character analysis of Guizhou soybean varieties lacking lipoxygenase[J]. Soybean Science, 2000, 19(2): 131-139.)
- [17] 张大勇, 徐江, 姚昕东, 等. 品种间大豆脂肪氧化酶活性差异及 β -胡萝卜素漂白性研究[J]. 东北农业大学学报, 2019, 50(6): 10-18. (ZHANG D Y, XU J, YAO X D, et al. Differential identification of soybean lipoxygenase activity among varieties and β -carotene bleaching study [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2019, 50(6): 10-18.)
- [18] 麻浩, 张雪丹, 王显生, 等. 具不同大豆脂肪氧化酶同工酶的大豆种子提取液漂白 β -胡萝卜素能力差异[J]. 大豆科学, 2010, 29(4): 681-687. (MA H, ZHANG X D, WANG X S, et al. Difference of β -carotene bleaching of lipoxygenases extract from soybean with various seed lipoxygenase isoenzymes [J]. Soybean Science, 2010, 29(4): 681-687.)
- [19] SUDA I, HAJIKA M, NISHIBA Y, et al. Simple and rapid method for the selective detection of individual lipoxygenase isoenzymes in soybean seeds [J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1995, 43(3): 742-747.
- [20] 王绍东, 姜妍, 王浩, 等. 新聚丙烯酰胺凝胶电泳快速检测大豆脂氧酶缺失方法[J]. 大豆科学, 2011, 30(3): 484-487. (WANG S D, JIANG Y, WANG H, et al. A fast detection method for screening of lipoxygenase null individual using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis in soybean [J]. Soybean Science, 2011, 30(3): 484-487.)
- [21] 丁安林, 傅翠真, 常汝镇, 等. 大豆脂肪氧化酶同工酶鉴定研究[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.)
- [22] AZAM M, ZHANG S, QI J, et al. Profiling and associations of seed nutritional characteristics in Chinese and USA soybean cultivars [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2021, 98: 103803.
- [23] FAN S, LI B, YU F, et al. Analysis of additive and epistatic quantitative trait loci (QTLs) underlying fatty acid components in soybean seeds across multiple environments [J]. Euphytica, 2015, 206(3): 689-700.
- [24] SUN J M, SUN B L, HAN F X, et al. Rapid HPLC method for determination of 12 isoflavone components in soybean seeds [J]. Agricultural Sciences in China, 2011, 10(1): 101-105.
- [25] GHOSH S, ZHANG S, AZAM M, et al. Seed tocopherol assessment and geographical distribution of 1151 Chinese soybean accessions from diverse ecoregions [J]. Journal of Food Composition and Analysis, 2021, 100: 103932.
- [26] GEBREGZIABHER B S, ZHANG S, QI J, et al. Simultaneous determination of carotenoids and chlorophylls by the HPLC-UV-VIS method in soybean seeds [J]. Agronomy, 2021, 11(4): 758.