

•技术与方法•

一种微量、快速测定植物种子 β -淀粉酶活性的方法

凌腾芳 林锦山 刘辉 张博 李静 余闾 叶茂炳 沈文飏*

(南京农业大学生命科学学院 南京 210095)

摘要 针对3, 5-二硝基水杨酸(DNS)法的缺点, 以对硝基苯酚麦芽五糖(PNPG5)为底物, 建立并改进了植物种子 β -淀粉酶活性测定的方法。本方法具有微量和快速的特点; 进一步通过对4种植物材料种子的酶活性测定以及 α -淀粉酶的干扰评估实验, 证实了该法可以运用于植物种子 β -淀粉酶活性的专一性测定。

关键词 β -淀粉酶, 测活方法, 对硝基苯酚麦芽五糖, 植物种子

A Rapid Micro-volume Method for Determining β -amylase Activity in Plant Seeds

Tengfang Ling, Jinshan Lin, Hui Liu, Bo Zhang, Jing Li, Tian Yu,
Maobing Ye, Wenbiao Shen*

(College of Life Science, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095)

Abstract In view of the disadvantages of the 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS) method, we developed a rapid micro-volume procedure utilizing *p*-nitrophenyl- α -maltopentaoside (PNPG5) as a substrate for specific determination of β -amylase activity. The assay procedure was evaluated with seeds from 4 plant species, and the exact degree of interference by α -amylase was determined. This modified method could be applied to the selective measurement of β -amylase activity in different plant seeds.

Key words β -amylase, method for determining enzyme activity, PNPG5, plant seed

淀粉的降解代谢是禾谷类作物种子萌发过程的关键步骤(Zhang et al., 2005)。通常, α -淀粉酶(EC 3.2.1.1)首先直接水解完整的淀粉粒, 释放出糊精, 然后由 β -淀粉酶(EC 3.2.1.2)等将其进一步水解为麦芽糖和葡萄糖。已经知道, 植物种子 β -淀粉酶往往以游离态(free β -amylase)和结合态(bound β -amylase)2种形式存在(Ziegler, 1999)。

目前, 测定植物种子 β -淀粉酶活性最常用的方法是根据 α/β -淀粉酶的酶学特性采用选择

性失活的技术, 并结合3, 5-二硝基水杨酸(DNS)来进行定量测定淀粉酶降解产物还原糖的含量(以下简称DNS法)(巩普遍, 2000)。由于有时植物种子中 α/β -淀粉酶的生化特性差异并不十分明显, 使得 β -淀粉酶的活性测定受到严重的干扰。例如某些耐高温的 β -淀粉酶对于70°C处理的敏感性较低; 在大量 α -淀粉酶存在时, 低pH处理对 α -淀粉酶也往往无效(Ziegler, 1999)。另一方面, 目前在动物和微生物研究中已经建立了以对硝基苯酚麦芽五糖(*p*-

收稿日期: 2005-10-24; 接受日期: 2006-01-05

基金项目: 国家自然科学基金项目(30471049)、江苏省青年科技创新人才学术带头人项目(BK2004417)、南京农业大学SRT项目(0409B08和0506B03)和国家理科基础科学研究与教学人才培养生物学基地SRT开放基金项目

* 通讯作者 Author for correspondence. E-mail: wbsheh@njau.edu.cn

nitrophenyl- α -maltopentaoside, PNPG5)和对硝基苯酚麦芽六糖(*p*-nitrophenyl- α -maltohexaoside, PNPG6)作为人工底物,以微生物来源的 α -葡萄糖苷酶(α -glucosidase)为辅助酶的 β -淀粉酶活性测定新方法,且开发了相应的试剂盒(Megazyme International Ireland Ltd., Bray Business Park, Bray, Co. Wicklow, Ireland),并开始运用于植物种子 β -淀粉酶活性的测定(Mathewson and Seabourn, 1983; McCleary and Codd, 1989)。不过,由于PNPG5和PNPG6均为人工合成底物,价格昂贵,且在反应体系中用量较大,所以试剂盒的价格不菲(Sopanen and Laurière, 1989),因此在实际应用中存在着不小的难度。针对上述问题,通过优化和改进,我们建立了以PNPG5为底物的微量、快速测定 β -淀粉酶活性的方法。该法具有测定时间短、专一性强(与DNS法相比)和微量的优点(包括降低了PNPG5和 α -葡萄糖苷酶的用量以及反应总体积),因此在大批量检测植物种子 β -淀粉酶活性的研究中具有明显的优势。

1 材料和方法

1.1 实验材料和试剂

实验中的植物材料小麦扬麦158(*Triticum aestivum* ‘Yangmai 158’)、大麦西引2号(*Hordeum vulgare* ‘Xiyin 2’)和水稻武运粳7号(*Oryza sativa* ‘Wuyunjing 7’)均为江苏省农科院提供;绿豆明光(*Phaseolus radiatus* ‘Mingguang’)由安徽燕之坊食品有限公司销售。对硝基苯酚麦芽五糖(*p*-nitrophenyl- α -maltopentaoside, PNPG5)、 α -葡萄糖苷酶(α -glucosidase)以及木瓜蛋白酶(papain)购自Sigma公司, α -淀粉酶购自北京奥博星生物技术责任有限公司(来自枯草芽孢杆菌,酶活性单位 $>4\,000\text{ U}\cdot\text{g}^{-1}$),其他生化试剂均为国产分析纯。

1.2 游离态和结合态 β -淀粉酶的提取

植物干种子用研磨机磨至粉状后保存于4℃冰箱中待用。另选取大小均匀的各品种种

子进行黑暗条件下的萌发实验,其中小麦和大麦的萌发温度为25℃,水稻和绿豆则为30℃,上述材料均在萌发2天后制备样品。

游离态(free)和结合态(bound) β -淀粉酶的提取参考Sopanen和Laurière(1989)介绍的方法,略有修改。其中游离态 β -淀粉酶的制备过程如下:取上述样品1 g左右,加入4 mL的0.1 mol·L⁻¹ NaCl溶液(含1 mmol·L⁻¹ EDTA),混合均匀后在空气摇床中(25℃)以60 r·min⁻¹的转速提取10分钟,10 000 g离心15分钟后取上清液,重复上述操作2次,合并各上清液并定容至12 mL,4℃冰箱中保存。结合态 β -淀粉酶的制备过程如下:在游离态样品制备后剩余的沉淀中加入4 mL含0.5%木瓜蛋白酶的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(pH 6.5),37℃空气摇床中以60 r·min⁻¹的转速振荡30分钟,10 000 g离心15分钟,重复上述操作,合并各上清液,并用含1.0 mmol·L⁻¹ EDTA的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液(pH 6.5)定容至9 mL。如无特殊说明,各研究中的实验样品均为小麦干种子中的游离态 β -淀粉酶。

1.3 β -淀粉酶反应体系的优化

通过预实验,我们对前人采用的酶反应体系(Mathewson and Seabourn, 1983; McCleary and Codd, 1989)进行了相关调整和优化。其中底物PNPG5和辅助酶 α -葡萄糖苷酶的浓度分别调为1.7 mmol·L⁻¹和3.2 U·mL⁻¹,总反应体系由3.40 mL降至0.33 mL,而且不影响检测的灵敏度。开始的反应体系为30 μ L(10 μ L酶液+20 μ L底物, pH 6.5),保温处理后(如无特殊说明,反应条件为40℃反应4分钟,而McCleary和Codd(1989)建立的PNPG5法则为40℃反应10分钟),再用300 μ L的0.25 mol·L⁻¹的Na₂CO₃终止反应(反应体系的pH >10.0),并测定反应液在410 nm处的吸光值。已知对硝基苯酚(PNO)在pH >10.0 的摩尔消光系数为 1.78×10^4 (Mathewson and Seabourn, 1983; McCleary and Codd, 1989),因此定义每分钟水解产生1 μ mol·L⁻¹ PNO所需的酶量为一个酶活单位(U)。 α/β -淀粉酶

活性测定的DNS法按照巩普遍(2000)介绍的方法,以每分钟水解产生 $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 麦芽糖所需的酶量定义为一个活性单位(U)。

1.4 酶促反应产物的吸收光谱

将酶液分别稀释至原酶液的 2、3 和 4 倍,分别记作 2 $\times$ 、3 $\times$ 和 4 $\times$,原酶液记为 1 $\times$,分别加入反应体系。终止反应后,反应液用 Beckman Coulter DU[®] 800 分光光度计进行波长扫描,扫描速度为 $600 \text{ nm} \cdot \text{min}^{-1}$,波长范围为 230~500 nm。

1.5 酶促反应的时间进程曲线

将酶液分别稀释至原酶液的 2、4、6 和 8 倍,记为 2 $\times$ 、4 $\times$ 、6 $\times$ 和 8 $\times$,原酶液则为 1 $\times$ 。分别加入底物后反应 1、2、3、4 和 5 分钟,再加入 Na_2CO_3 终止反应,测定各自的吸光值。

1.6 酶促反应的最适 pH 和温度

将酶液和底物用 pH 为 5.0、5.5、6.0、6.5、7.0 和 7.5 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液配制,分别在 30、40 和 50 $^{\circ}\text{C}$ 下进行反应, Na_2CO_3 终止反应后分别测定各吸光值。

1.7 α -淀粉酶干扰评估实验

将购来的 α -淀粉酶进行初步纯化。首先是硫酸铵分部沉淀,收集 30%~70% 饱和度的沉淀溶解于 pH 6.5 的磷酸氢二钠-柠檬酸缓冲液中,过 Sephadex-G25 柱,收集酶液于 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存待用,纯化倍数为 5.2 倍。将纯化后的酶液分别稀释至纯化酶液的 75%、50%、25%、17% 和 12.5%,各稀释液的活性范围为 6~50 U(DNS 法测定)。取上述不同浓度的 α -淀粉酶液,分别加入相同活性的小麦干种子游离态 β -淀粉酶(以不加 α -淀粉酶的为对照),分别采用 DNS 法和 PNPG5 法测定酶活来完成干扰评估实验。

1.8 数据分析

各实验均至少重复处理 3 次,采用 Microsoft Excel 2003 软件统计分析所得数据。

2 结果与讨论

2.1 酶促反应产物的吸收光谱

利用对硝基苯酚麦芽五糖(PNPG5)作为底物测定 β -淀粉酶活性大小的原理是:人工合成底物 PNPG5 能够专一性地被 β -淀粉酶水解成小分子的寡糖苷,寡糖苷再经 α -葡萄糖苷酶水解释放出生色基团对硝基苯酚(PNO),最后通过监测 405 或 410 nm 下的 PNO 产生量作为 β -淀粉酶活性大小的判定标准。因此,产物发色基团 PNO 的检测是十分重要的。

如图 1 所示,从小麦干种子中提取的游离态 β -淀粉酶的酶促反应产物在 230~500 nm 范围内有 2 个吸收峰,分别位于 303 和 398 nm 处,前者可能是蛋白质以及游离氨基酸等物质的吸收所导致,而后者则是发色基团 PNO 的吸收峰。尽管 405/410 nm 均不是本实验中 PNO 最大吸光值的吸收波长,但通过计算发现,在 380~415 nm 之间吸光值与酶促反应产物之间均呈非常好的线性关系(R^2 达到 0.99),因此在本实验中我们选取 410 nm 作为测定波长(McCleary and Codd, 1989)。

2.2 小麦 β -淀粉酶酶促反应的时间进程曲线

由图 2 可知,不同稀释度的小麦种子 β -淀

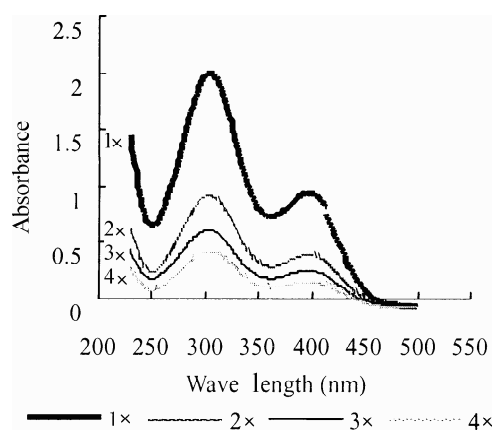


图 1 不同浓度的小麦种子 β -淀粉酶的反应产物在不同波长下的吸光值

Fig. 1 Absorbance of the reaction products of different concentrations of wheat seed β -amylase extract scanned by Beckman Coulter DU[®] 800

粉酶酶促反应速度至少在1~5分钟内都具有良好的线形关系(R^2 值在0.95~0.99之间), 而5~10分钟后只有低浓度酶液的酶促反应产物生成速度与时间才有较好的线形关系, 而高浓度的线形关系则较差(数据未列)。为了保证线形关系和加快测定速度, 在本法中我们选择反应4分钟作为酶促反应的测定时间。

2.3 小麦 β -淀粉酶酶促反应最适pH和温度

进一步将不同 pH(5.0、5.5、6.0、6.5、7.0 和 7.5)的 $3\times$ 酶液与相同 pH 的底物混合后, 在不同温度(30、40 和 50°C)下进行反应。如图3所示, 在 pH6.5 和 40°C 的反应条件下, 小麦种子 β -淀粉酶的催化能力最大(Mathewson and Seabourn, 1983)。

2.4 a- 淀粉酶的干扰评估实验

DNS 法是目前常用的测定 β -淀粉酶活性的方法。由于淀粉廉价易得, 因此DNS法在植物种子的研究中得到了广泛使用。我们进一步采用同一稀释度的酶液, 分别用2种方法进行检测, 发现PNPG5法比DNS法省时(如DNS法需40分钟, PNPG5法则最多只需5分钟)。同时, 在抗 α -淀粉酶干扰方面, PNPG5法更具有明显的优势。例如不同浓度的 α -淀粉酶液对DNS

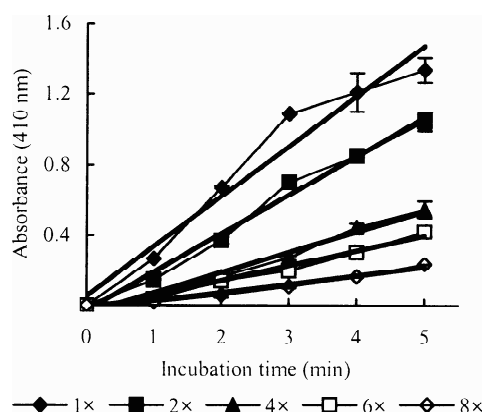


图2 不同酶浓度和反应时间与PNPG5法测定 β -淀粉酶活性的线形关系

Fig. 2 Linearity of the PNPG5 β -amylase assay with different enzyme concentrations and incubation time

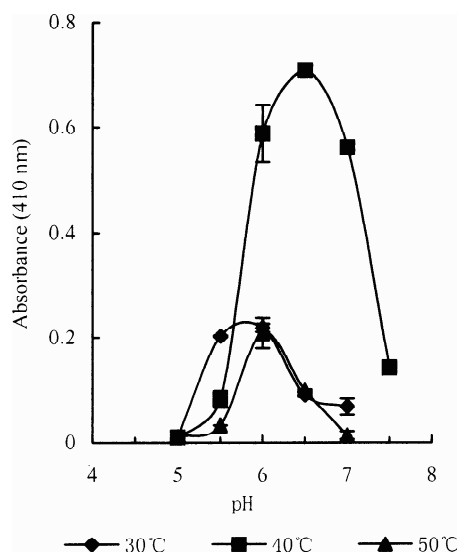


图3 pH和温度对PNPG5法测定 β -淀粉酶活性的影响

Fig. 3 Effects of pH and incubation temperature on the PNPG5 β -amylase assay

法测定 β -淀粉酶有着明显的干扰作用, 而对PNPG5法则基本无影响(图4)。

2.5 不同植物材料的 β -淀粉酶活性

按照植物的种类不同, 种子 β -淀粉酶分为2大类(Sopanen and Laurière, 1989; Yamaguchi et al., 1999; Ziegler, 1999): 一类是小麦属作物(小麦和大麦等)种子籽粒发育和成熟过程中形成的胚乳专一型 β -淀粉酶(endosperm-specific β -amylase), 另一类是非小麦属作物(水稻和玉米等)种子萌发时糊粉层细胞从头合成的普遍型 β -淀粉酶(ubiquitous β -amylase), 例如水稻种子在萌发4~8天时的胚乳中合成的 β -淀粉酶(Yamaguchi et al., 1999)。进一步采用上述改良的方法对不同植物来源的种子 β -淀粉酶活性进行检测, 发现小麦和大麦的干种子以及在其萌发后2天均能检测到较高的 β -淀粉酶活性, 而水稻和绿豆种子中则基本检测不到 β -淀粉酶活性(绿豆只有在萌发后第2天时检测到微弱的活性); 同时2种麦属作物种子在萌发过程中不同形式的 β -淀粉酶活性变化也是不同的, 其中小

表1 不同植物种子在萌发期间的 β -淀粉酶活性($\text{U}\cdot\text{g}^{-1}$)

Plant materials	0 d		2 d	
	Free	Bound	Free	Bound
<i>Triticum aestivum</i>	30.63±2.74	26.00±0.61	65.05±0.26	34.80±1.70
<i>Hordeum vulgare</i>	26.75±1.68	26.95±0.35	38.10±0.12	14.95±0.71
<i>Oryza sativa</i>	-	-	-	-
<i>Phaseolus radiatus</i>	-	-	0.08±0.00	-

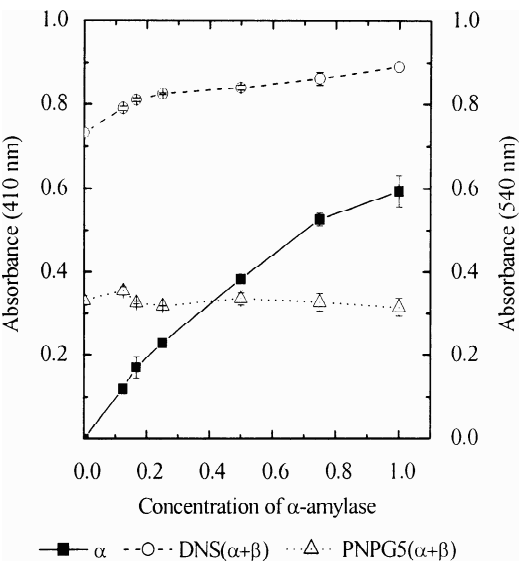


图4 α -淀粉酶对PNPG5法和DNS法测定 β -淀粉酶活性的影响
Fig. 4 Effects of α -amylase on the determination of wheat seed β -amylase by using DNS and PNPG5 methods

麦结合态 β -淀粉酶活性在萌发2天时比干种子提高了约33.8%,大麦则降低了44.5%;而且在萌发过程中无论是小麦还是大麦中的游离态 β -淀粉酶活性均呈上升趋势(表1)(Sopanen and Laurière, 1989),上述结果进一步验证了本方法的可靠性。

2.6 小结

通过优化和改进,我们建立了一种微量和快速的专一性测定植物种子 β -淀粉酶活性的方

法,该测定体系的最佳反应条件为:底物PNPG5和辅助酶 α -葡萄糖苷酶的浓度分别为 $1.7\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 和 $3.2\text{ U}\cdot\text{mL}^{-1}$,最适反应pH为6.5,温度为 40°C (小麦和大麦种子),每分钟酶促产物吸光值的变化不宜超过0.25,酶促反应的测定时间为4分钟。本方法尤其适用于含有大量 α -淀粉酶活性的植物种子材料。

参考文献

巩普遍 (2000). 淀粉酶活性的测定. 见: 植物生理生化实验原理和技术,李合生主编 (北京:高等教育出版社), pp.169-172.

Mathewson, P.R., and Seabourn, B.W. (1983). A new procedure for specific determination of β -amylase in cereals. J. Agric. Food Chem. **31**, 1322-1326.

McCleary, B.V., and Codd, R. (1989). Measurement of β -amylase in cereal flours and commercial enzyme preparations. J. Cereal Sci. **9**, 17-33.

Sopanen, T., and Laurière, C. (1989). Release and activity of bound β -amylase in a germinating barley grain. Plant Physiol. **89**, 244-249.

Yamaguchi, J., Itoh, S., Saitoh, T., Ikeda, A., Tashiro, T., and Nagato, Y. (1999). Characterization of β -amylase and its deficiency in various rice cultivars. Theor. Appl. Genet. **98**, 32-38.

Ziegler, P. (1999). Cereal β -amylases. J. Cereal Sci. **29**, 195-204.

Zhang, H., Shen, W.B., Zhang, W., and Xu, L.L. (2005). A rapid response of β -amylase to nitric oxide but not gibberellin in wheat seeds during the early stage of germination. Planta **220**, 708-716.

(责任编辑: 孙冬花)