

PEG 对甘薯愈伤组织淀粉酶活性的影响

龚子端, 童 晋, 张勇为, 吕玉华, 纳海燕*

(四川大学生命科学学院, 四川 成都 610064)

摘要: 用聚乙二醇 (PEG) 6000 对甘薯愈伤组织进行处理后观察到其所含淀粉酶的活性变化。这些变化随 PEG 的浓度不同, 处理时间长度不同而有显著差异。低浓度的 PEG (0.5%、1%) 处理愈伤组织其淀粉酶活性变化的幅度较小; 而高浓度 (8%) 的 PEG 处理所引起的淀粉酶活性变化幅度较大; 这一结果显示了 PEG 对甘薯愈伤组织淀粉酶的调节作用。

关键词: 甘薯; 愈伤组织; 淀粉酶; PEG

中图分类号: Q 945

文献标识码: A

文章编号: 0253-2700(2005)01-0066-05

PEG Regulation about Expression of Amylase in Calli of Sweet Potato

GONG Zi-Duan, TONG Jin, ZHANG Yong-Wei, LU Yu-Hua, NA Hai-Yan*

(College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China)

Abstract: The alteration of amylase ' activity was found distinctly when calli were treated with different concentration PEG6000. Under the low concentration PEG (0.5%、1%), the scope of amylase ' activity was changed a little. On the contrary, when calli were treated with higher concentration PEG the activity of amylase was altered in wide scope. This consequence reveals the PEG regulation about expression of amylase in calli of sweet potato.

Key words: Sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam); Calli; Amylase; PEG

甘薯是一种广泛栽种的重要粮食作物, 其藤叶主要用作饲料, 块根既可作饲料, 也可直接食用或用作食品工业原料。 β -淀粉酶是块根中仅次于甘薯贮藏蛋白的一种蛋白质成分, 约占块根可溶蛋白的 5% (Li and Oba, 1985; Yoshida and Nakamura, 1991)。在自然栽培条件下, 只有块根有淀粉酶 (β -淀粉酶), 其余器官中几乎检测不到淀粉酶存在, Nakamura (1991) 用切下的新鲜甘薯叶柄 (带完整叶片) 研究发现, 蔗糖溶液促使 β -淀粉酶活性的高表达, 光照也可诱导叶柄 β -淀粉酶的少量表达, 甘薯的 β -淀粉酶正是来源于光合作用合成的内源蔗糖的诱导产生的; 对甘薯块根 β -淀粉酶基因表达的研究表明, 该基因的表达受蔗糖 (Hattori 等, 1991)、多聚半乳糖醛酸、机械损伤和脱落酸 (ABA) (Ohto 等, 1992) 等的诱导。Ohto 等 (1992) 用 100 μ mol/L 的 ABA 处理甘薯叶柄能够诱导 β -淀粉酶 mRNA 的大量表达。

* 通讯联系人 author for correspondence. E-mail: hayana@scu.edu.cn

收稿日期: 2004-01-19, 2004-11-26 接受发表

作者简介: 龚子端 (1969-) 男, 重庆人, 在读硕士研究生, 主要从事植物分子遗传学研究。

甘薯 β -淀粉酶是甘薯块根特异表达的淀粉酶, 有关环境因素对甘薯 β -淀粉酶表达的影响还没见相关报道, 这可能是因为在自然栽培条件下, 环境因素难以控制, 因此很难研究环境因素对淀粉酶表达的影响。与自然栽培的甘薯相比, 甘薯愈伤组织的生长和繁殖快, 各种条件易于控制。从以前的研究中发现, 甘薯愈伤组织中表达有两种 α -淀粉酶的同工酶和两种 β -淀粉酶的同工酶, 这些淀粉酶与已报道的 α -淀粉酶和甘薯块根的 β -淀粉酶在性质上都存在差异 (张勇为等, 2002)。在其他植物材料中, 环境因素对淀粉酶有明显的调节作用, 如水胁迫提高大麦叶片 α -淀粉酶基因的表达 (Jacobsen 等, 1986) 和黄瓜幼苗 β -淀粉酶活性 (Daisuke 等, 2000), 水和盐胁迫提高珍珠米 (pearl millet) 和玉米 β -淀粉酶活性 (Datta 等, 1999)。甘薯愈伤组织的这几种淀粉酶, 与甘薯块根中表达的淀粉酶, 在种类和性质上存在明显差异, 其表达调节的方式与已报道的淀粉酶是否相同? 由于甘薯的 β -淀粉酶是块根特异表达, 而 α -淀粉酶在块根中的表达量很少, 因此几乎未见环境因素对它们表达调节作用的报道。PEG6000 对植物的影响类似于人工设置的干旱条件, 本文就 PEG6000 在不同浓度和不同时间段对甘薯愈伤组织淀粉酶表达的调节作用进行报道。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 甘薯 川薯 101 (*Ipomoea batatas* Lam cv. chuan No. 101), 四川省农业科学院作物研究所育成。

1.1.2 培养基成分 无菌苗培养基为: MS + 3% 蔗糖; 愈伤组织诱导和继代培养基为: MS + 1 mg/L 2, 4D + 0.1 mg/L 6-BA + 3% 蔗糖。

1.2 实验方法

1.2.1 愈伤组织诱导及继代培养 取甘薯块根在温室中发芽, 长至 5~6 片叶时, 取其芽经消毒后接种到无菌苗培养基上。待长出无菌苗后, 取其茎段接种至上述诱导培养基上, 在暗室中诱导愈伤组织。将诱导出的愈伤组织继代两次培养, 每次间隔 15 d。

1.2.2 PEG6000 处理愈伤组织 在上述愈伤组织培养基中加入 PEG6000 使其终浓度分别为 0.5%、1%、5% 和 8%。将生长旺盛的愈伤组织各 5 g 置于带有不同浓度 PEG 的培养基中, 对照为愈伤组织培养基。各种处理均每隔 12 h 取样, 每次取一瓶, 直至 96 h。

1.2.3 淀粉酶提取 在 Douglas 和 Stanley (1983) 所述方法的基础上加以改进, 取处理过的愈伤组织各 5 g, 在液氮中研磨至粉末状, 加入 3 ml/g 提取缓冲液 (磷酸缓冲液 50 mmol/L, pH 7.2), 混匀后, 在 4℃、8 228 $\times g$ 离心 10 min, 取上清液装入透析袋中, 用 PEG20000 浓缩至 1 ml 后, 分装为 40 μ l/份, 置 -20℃ 待用。

1.2.4 淀粉酶活性检测 在 Rammesmayer 和 Praznik (1992) 所述方法的基础上加以改进, 将同一浓度的 PEG 不同时间段处理的样品 40 μ l 经非变性 5% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳后 (电泳液为 pH 8.8 的 Tris-甘氨酸, 稳流 15 mA), 将凝胶用蒸馏水洗 2~3 次, 在含有 2% 的可溶性淀粉、Tris-HCl 100 mmol/L (pH 7.0)、抗坏血酸 2 mmol/L 溶液中 37℃ 孵化 15 min, 用蒸馏水至少洗 3 次, I_2 6.5 mmol/L-KI 20 mmol/L 染色。背景为蓝色, 淀粉酶所在位置因淀粉被水解而呈无色透明。

1.2.5 淀粉酶活性强度检测 所有电泳图用 Totalab2.01 分析软件检测淀粉酶的相对活性强度, 并把获得的数据制成坐标图。

2 结果

所有处理样品经过非变性 5% 的聚丙烯酰胺凝胶电泳并染色以后可以见到有 4 条带, 其中第 4 条带十分微弱, 图中只标出了两条 α -淀粉酶带 (A_1 、 A_2) 和一条 β -淀粉酶带

(B_1) (张勇为等, 2002)。将电泳图用生物软件 Totallab2.01 进行分析得出数据并把所得数据制成坐标图。

2.1 0.5%、1% PEG 处理愈伤组织对淀粉酶表达的调节作用

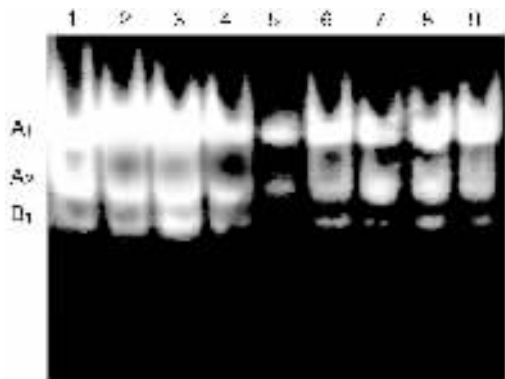


图 1-1 经不同时间段 0.5% 的 PEG 处理的愈伤组织淀粉酶活性的变化

1—9 道: 愈伤组织经 0.5% PEG 处理 0、12、24、36、48、60、72、84、96 h

Fig. 1-1 The alteration of amylase ' activity with 0.5% PEG disposed at the different time

Lanes 1—9 Extracts of calli with 0.5% PEG at the time of 0、12、24、36、48、60、72、84、96 h

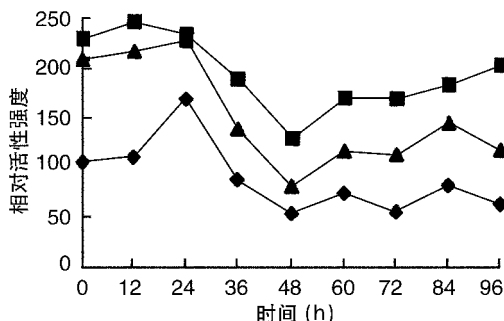


图 1-2 0.5% PEG 处理愈伤组织淀粉酶活性变化曲线

■ : A₁ ▲ : A₂ ◆ : B₁

Fig. 1-2 The alteration of amylase ' activity with 0.5% PEG disposed the calli

2.3 8% PEG 处理愈伤组织对淀粉酶表达的调节作用

图 3-1 及其坐标图 3-2 表明 8% PEG 处理愈伤组织后淀粉酶的活性变化完全不同于 0.5%、1%、5% PEG 处理的结果。处理 12 h, α -淀粉酶活性就明显降低 (A_1 相对活性强度从 173.56 下降到 12 h 处的 96.65、 A_2 从 132.78 降到 94.03), 然后缓慢升高, 但总的趋势比较平稳, 活性强度变化幅度不大; β -淀粉酶 (B_1) 的活性变化相对较明显, 在 12 h、24 h 处酶活性降低到十分微弱的程度 (12 h 处的活性强度只有 2.54, 24 h 处为 2.49), 接

从图 1-1 及坐标图 1-2 可以看出, 0.5% 的 PEG 引起 α -淀粉酶 (A_1 、 A_2) 和 β -淀粉酶 (B_1) 活性变化的趋势基本一致, α -淀粉酶 (A_1 、 A_2) 活性在 12 h、24 h 处比未经处理的愈伤组织淀粉酶活性略有升高 (A_1 相对活性强度从 229.12 升高到 248.16, A_2 从 209.30 升高到 229.99) 但升高幅度不大, 在 36 h 活性开始降低, 在 48 h 处酶活性达到最低 (A_1 相对活性强度为 131.72, A_2 为 82.32), 然后又逐步趋于平稳。 β -淀粉酶活性在 12 h 处也开始升高, 到 24 h 处酶活性达最高 (B_1 相对活性强度由 105.47 升高到 168.82), 其升高幅度大于 α -淀粉酶活性的升高幅度, 然后开始降低, 48 h 达最低相对酶活性强度 56.92, 然后趋于平稳。1% PEG 处理的结果和图 1-1 的变化情况基本相似。

2.2 5% PEG 处理愈伤组织对淀粉酶表达的调节作用

图 2-1 及坐标图 2-2 的结果显示, 5% 的 PEG 处理愈伤组织后其淀粉酶的表达情况, α -淀粉酶 (A_1 、 A_2) 和 β -淀粉酶 (B_1) 的相对活性强度变化趋势基本一致。 A_1 在 12 h 处酶活性达到最高相对强度 204.65, A_2 在 24 h 处酶活性达最高相对强度 191.73, 接着酶活性开始降低, 至 48 h 处酶活性达到最低, 然后又略有上升。这一结果显示 5% PEG 对甘薯愈伤组织淀粉酶的调节作用强于低浓度 (0.5%、1%) PEG 对该酶的调节作用。但是, 它们对酶的作用趋势却是基本一致的。

着缓慢升高，在 72 h 处达到最高酶活性（活性强度值达 142.00）。从坐标图看出，8% PEG 对 3 种淀粉酶作用的趋势仍然是基本一致的。

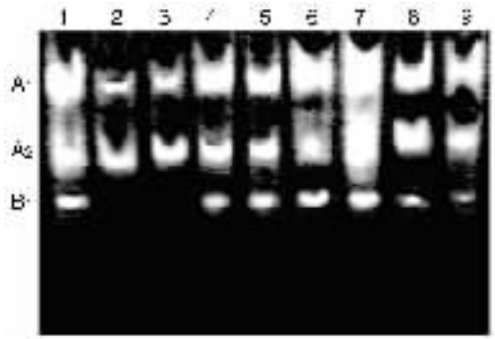
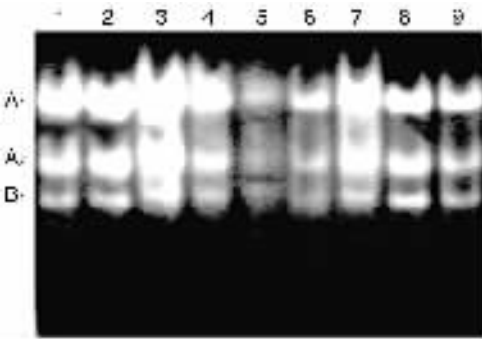


图 2-1 经不同时间 5% 的 PEG 处理的愈伤组织淀粉酶活性的变化

图 3-1 经不同时间段 8% 的 PEG 处理的愈伤组织淀粉酶活性的变化

1—9 道：愈伤组织经 5% PEG 处理 0、12、24、36、48、60、72、84、96 h

1—9 道：愈伤组织经 8% PEG 处理 0、12、24、36、48、60、72、84、96 h

Fig. 2-1 The alteration of amylase ' activity with 5% PEG disposed at the different time

Fig. 3-1 The alteration of amylase ' activity with 8% PEG disposed at the different time

Lanes 1—9 Extracts of calli with 5% PEG at the time of 0、12、24、36、48、60、72、84、96 h

Lanes 1—9 Extracts of calli with 8% PEG at the time of 0、12、24、36、48、60、72、84、96 h

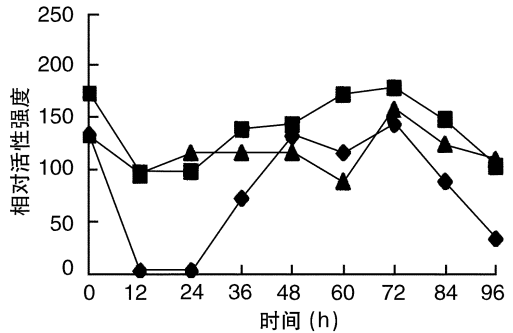
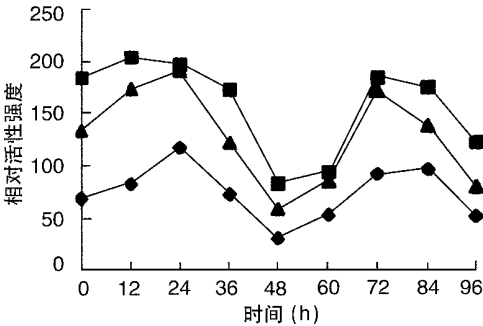


图 2-2 5% PEG 处理愈伤组织淀粉酶活性变化曲线

图 3-2 8% PEG 处理愈伤组织淀粉酶活性变化曲线

■ : A₁ ▲ : A₂ ◆ : B₁

■ : A₁ ▲ : A₂ ◆ : B₁

Fig. 2-2 The alteration of amylase ' activity with 5% PEG disposed the calli

Fig. 3-2 The alteration of amylase ' activity with 8% PEG disposed the calli

3 讨论

淀粉酶是水解淀粉的酶类，在植物、动物和微生物中都有表达。由于淀粉酶水解淀粉的差异，可分为 α-淀粉酶和 β-淀粉酶。α-淀粉酶在植物、动物和微生物中普遍存在，而 β-淀粉酶却只存在于植物和少数微生物中（Nakamura 等，1991）。甘薯愈伤组织中的淀粉酶又不同于块根中的淀粉酶（张勇为等，2002）。甘薯块根 β-淀粉酶基因表达受蔗糖（Hattori 等，1991）、多聚半乳糖醛酸、机械损伤和 ABA（Ohto 等，1992）等的诱导。

PEG 对植物的处理类似于人工条件下的干旱胁迫，从本实验分析的数据及其坐标图可

以看出：① 同一浓度 PEG 处理愈伤组织引起的淀粉酶活性变化趋势都十分接近，只是酶活性变化的幅度有差异，其中低浓度的 PEG (0.5%) 所引起酶活性变化的幅度较小 (图 1-2 坐标图)，而 PEG 浓度越高，淀粉酶活性变化的幅度就更大 (图 2-1、图 3-1 及其坐标图)，这说明 PEG 的处理的确影响了甘薯愈伤组织三种淀粉酶活性的变化而且其变化的趋势基本一致；② PEG 处理愈伤组织所引起的 β -淀粉酶活性强度变化相对于 α -淀粉酶更为显著。8% PEG 处理的结果是在 12 h、24 h 处淀粉酶的活性强度接近失活，尔后活性强度开始恢复，在 72 h 处达最高强度值 (图 3-2)；0.5%、5% 的 PEG 处理的结果同样引起 β -淀粉酶活性强度变化的幅度大于 α -淀粉酶 (图 1-1、图 2-1 及其坐标图)。

β -淀粉酶能从淀粉的非还原性末端分解每两个葡萄糖单位的 α -1, 4 糖苷键生成麦芽糖而被广泛运用于饴糖、啤酒和高麦芽糖的生产 (吕俊年, 1984)，由于 0.5%、5% 的 PEG 处理甘薯愈伤组织在 24 h 处都引起 β -淀粉酶活性的升高，而且处理后的酶活性比未经 PEG 处理的酶活性更高。除 PEG 影响甘薯愈伤组织 β -淀粉酶活性以外，蔗糖、光照、ABA 也同样引起 β -淀粉酶活性的变化 (Nakamura 等, 1991)。因此我们可以通过 PEG6000、蔗糖、适当的光照对甘薯愈伤组织的处理来提取制备具有更高活性的 β -淀粉酶制剂寻求一条有效的途径。关于各种激素、蔗糖、光照对甘薯愈伤组织淀粉酶的调节作用的研究是本课题今后所做的重点。

〔参 考 文 献〕

- Daisuke T, Hisashi M, Yukio M, 2000. Water stress enhances beta-amylase activity in cucumber cotyledons [J]. *Experimental Botany*, **51** (345): 739—745
- Datta R, Selvi MT, Seetharama N, et al, 1999. Stress-mediated enhancement beta-amylase activity in pearl millet and maize leaves is dependent on light [J]. *Plant Physiol*, **154** (5-6): 657—664
- Douglas CD, Stanley HD, 1983. Specific determination of α -amylase activity in crude plant extracts containing β -amylase [J]. *Plant Physiol*, **71**: 229—234
- Hattori T, Fukumoto H, Nakagawa S, et al, 1991. Sucrose-induced expression of genes coding for the tuberous root storage protein, sporamin, of sweet potato in leaves and petioles [J]. *Plant Cell Physiol*, **32**: 79—86
- Jacobsen JV, Hanson AD, Chandler PC, 1986. Water stress enhances expression of an α -amylase gene in barley leaves [J]. *Plant Physiol*, **80**: 350—359
- Li HS, Oba K, Major, 1985. Soluble protein of sweet potato roots and changes in proteins after cutting, infection Or storage [J]. *Agric Biol Chem*, **49** (3): 734—744
- Lu JN (吕俊年), 1984. The enzyme preparation need exploiting— β -amylase [J]. *Tianjin Microorganism* (天津微生物), (1): 14—17
- Nakamura K, Ohto MA, Yoshida N, et al, 1991. Sucrose-induced accumulation of β -amylase occurs concomitant with the accumulation of starch and sporamin in leaves-petiole cuttings of sweet potato [J]. *Plant Physiol*, **96**: 902—909
- Ohto MA, Nakamura KK, Nakamura K, 1992. Induction of expression of genes coding for sporamin and β -amylase by polygalacturonic acid in leaf-petiole cuttings of sweet potato [J]. *Plant physiol*, **99**: 422—427
- Rammesmayr G, Praznik W, 1992. Fast and sensitive simultaneous staining method of Q-enzyme, α -amylase, R-enzyme, phosphorylase and soluble starch synthase separated by starch-polyacrylamide gel electrophoresis [J]. *Chromatogr*, **623**: 399—402
- Yoshida N, Nakamura K, 1991. Molecular cloning and expression in Escherichia coli of cDNA encoding the subunit of sweet potato β -amylase [J]. *Biochem*, **110**: 196—201
- Zhang YW (张勇为), Na HY (纳海燕), Wang DY (王大一), et al, 2002. Amylase in calli of sweetpotato [J]. *J Plant Physiol Mol Biol* (植物生理与分子生物学学报), **28** (5): 375—378