

## 新聚丙烯酰胺凝胶电泳快速检测大豆脂氧酶缺失方法

王绍东<sup>1</sup>, 姜妍<sup>1</sup>, 王浩<sup>1</sup>, 刘伟<sup>1</sup>, 李远明<sup>1</sup>, 李宏伟<sup>1</sup>, 李文滨<sup>2</sup>

(1. 东北农业大学 国家大豆工程技术研究中心, 黑龙江 哈尔滨 150030; 2. 东北农业大学 大豆生物学教育部重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030)

**摘要:**通过对传统 SDS-PAGE 电泳技术中样品前处理及制胶技术的改进, 开发出了一种能够清晰鉴别 Lox-1 与 Lox-2 同工酶的 SDS-PAGE 电泳快速检测新技术。利用新改进的方法, 在 289 个 CS8000(♀) × FJ307(♂) F<sub>2</sub> 杂交后代中, 选拔出 Lox-1, -2, -3 同工酶完全缺失的个体 27 株, 以及 Lox-1, -3 和 Lox-2, -3 缺失中间材料若干株。证明新改进方法可以缩短杂交后代脂氧酶缺失个体筛选进程, 提高筛选精度, 降低筛选成本。

**关键词:**脂氧酶缺失; 聚丙烯酰胺凝胶电泳; 杂交后代的筛选; 大豆

**中图分类号:** S565.1      **文献标识码:** A      **文章编号:** 1000-9841(2011)03-0484-04

## A Fast Detection Method for Screening of Lipoygenase Null Individual Using Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis in Soybean

WANG Shao-dong<sup>1</sup>, JIANG Yan<sup>1</sup>, WANG Hao<sup>1</sup>, LIU Wei<sup>1</sup>, LI Yuan-ming<sup>1</sup>, LI Hong-wei<sup>1</sup>, LI Wen-bin<sup>2</sup>

(1. National Research Center of Soybean Engineering and Technology (NRCSET), Northeast Agricultural University, Harbin 150030; 2. Key Laboratory of Soybean Biology of Chinese Education Ministry, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

**Abstract:** In this research, through the improvement of the sample pretreatment and confection of the gel, a fast detection method were developed for screening of lipoygenase (Lox) null individual using sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) in soybean. By this method, we have screened 27 strains of the Lox-1, -2, -3 null, and some Lox-1, -3 or Lox-2, -3 incompleteness lacking individuals from 289 individuals in the F<sub>2</sub> (CS8000(♀) × FJ307(♂)) generations. The results proved that the method was better in precision, velocity and less costs of the screening. It is significant for selecting the lipoygenase null individual in quality improvement breeding of soybean.

**Key words:** Lipoygenase null; Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis; Screening of filial generation; Soybean

大豆脂氧酶(Lipoygenase), 主要有 3 种同工酶 (Lox-1、Lox-2 和 Lox-3)<sup>[1]</sup>。大豆种子在破碎等有氧条件下, 脂氧酶催化亚油酸等具有顺, 顺-1, 4-戊二烯结构的多元不饱和脂肪酸, 生成过氧化氢的衍生物, 最终被分解成易挥发的有豆腥味的醛、醇、酮等小分子物质<sup>[2-3]</sup>。通过人工杂交、诱变育种等非转基因遗传改良手段, 可以去除大豆种子中的腥味, 还可以节省工业去腥成本, 扩大豆制品的适用范围, 提高大豆附加值<sup>[4-5]</sup>。在当今大豆全产业链利益受到国外转基因大豆冲击的大环境下, 提高国产大豆的竞争力, 培育适于大豆深加工企业需求的完全无腥味大豆新品种意义重大。

脂氧酶分子量大约在 94~97 kDa 之间, 在大豆种子中含量约占蛋白质总量的 1%~2%。Lox 同工酶在酶活性的最适 pH 值、等电点、热稳定性及底物专一性等方面, 均有差异。根据这些特性, 可对其

进行分离和鉴定<sup>[6]</sup>。早在十几年前, 日本等发达国家已经实现了完全无腥味大豆新品种的商业化种植<sup>[7]</sup>。在国内虽有中国农业科学院、河北农林科学院等单位在开展无腥味大豆新品种的选育, 并且已有如“中黄 16”(Lox-2, -3 null)、“五星 1”(Lox-2, -3 null)、“五星 2”(Lox-2 null) 等脂氧酶部分缺失的夏大豆新品种育成。但是, 在我国东北大豆主产区, 至今尚无脂氧酶完全缺失的春大豆新品种大面积推广。因此, 开展脂氧酶完全缺失大豆新品种的培育, 应成为大豆育种家不容忽视的重要育种目标。开展此项研究的关键在于便捷、快速、准确的脂氧酶缺失检测方法的确立。

常用的大豆脂氧酶检测方法, 主要有薄层等电电泳检测技术 (IEF-PAGE)、β-胡萝卜素褪色反应以及聚丙烯酰胺凝胶电泳技术 (SDS-PAGE) 等<sup>[8]</sup>。前二者虽具有分辨率高的优点, 但也具有样品前处

收稿日期: 2011-03-30

基金项目: 黑龙江省留学回国基金资助项目 (LC2009C25); 哈尔滨市科技创新人才研究专项资金资助项目 (2010RFLYN016)。

第一作者简介: 王绍东 (1966-), 男, 副研究员, 博士, 从事大豆遗传育种研究。E-mail: wsdhjl@yahoo.com.cn。

理和制胶程序复杂,检测成本高、不易被基层的育种单位工作人员掌握的缺点;后者虽然在样品前处理和制胶方面简便易行,但各同工酶条带的分辨率差、误判率较高。为此,该研究通过对现有的 SDS-PAGE 电泳技术的样品前处理制胶技术的改进,开发出了一套便捷、快速、准确检测脂氧酶缺失的改良 SDS-PAGE 鉴定方法,利用此方法已筛选出若干大豆杂交育种后代脂氧酶完全缺失个体。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

1.1.1 参试样品 父本-FJ307(Lox 完全缺失基因型),母本-CS8000(Lox-3 缺失基因型)及其部分杂交后代( $F_2$ )个体。

1.1.2 主要试剂与仪器 主要试剂:分析纯级 Tris (Sigma), Acrylamide (Amresco), Bisacrylamide (Amresco)等。主要仪器:普通垂直电泳仪(Nihon Eido. Corp.),温控离心机,数字显示酸度计,振荡器,数控超声波清洗器(KQ-3000DE, 昆山)等。

### 1.2 试验方法

1.2.1 样品的前处理 取 CS8000(♀) × FJ307(♂)的杂交后代  $F_2$  种子 1 粒,在其胚轴的相反侧,用裁纸刀片切取种子细粉 6~8 mg,放入 1.5 mL 的离心管,加入 1 mL 提取缓冲液( $0.05 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris-HCl, pH 7.2, 内含 2% 的巯基乙醇,溴酚蓝指示剂适量),用振荡器搅拌均匀,超声波萃取 5~6 min,室温下放置 20~30 min,再度搅拌后,  $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min,取上清液 10 mL 用于 SDS-PAGE 电泳解析。

1.2.2 聚丙烯酰胺凝胶的配制 A 液:SDS 2.0 g, Tris 181.2 g,用  $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  HCl 将 pH 值调至 8.8,最后加蒸馏水定容至 500 mL。C 液: Acrylamide 30 g,加 Bisacrylamide 0.8 g,加蒸馏水定容至 100 mL。P 液:过硫酸铵 1.5 g,加蒸馏水至 100 mL。B 液: $1 \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$  HCl 240 mL 加蒸馏水 200 mL 充分混匀后,用 Tris 调整 pH 至 7.0,最后加蒸馏水定容至 500 mL。E 液:核黄素 4 mg,加蒸馏水 100 mL 混匀。

1.2.3 反应溶液的配制 甘氨酸 Glycine 14.4 g, Tris 3.0 g, SDS 1.25 g,加蒸馏水 1000 mL 混匀配制成电泳缓冲液。考马丝亮蓝 G-250 1.5 g,加 440 mL 乙醇(分析醇),60 mL 乙酸,加蒸馏水至 1000 mL 混匀配制成染色液。量筒量取 200 mL 甲醇,50 mL 乙酸,加蒸馏水至 1000 mL 混匀配制成脱色液。

1.2.4 玻璃板的组装 准备胶厚为 1 mm 的普通 SDS-PAGE 用玻璃板,用 70% 乙醇将玻璃板的内表

面擦拭干净凉干,放置防漏胶用密封硅胶条(或硅胶管),1 块板用 4 个大号长尾铗,左右两侧各 2 个,固定在玻璃板上(以不漏胶为准),垂直放置于水平实验台上。

1.2.5 分离胶的制备 以制作玻璃板规格为  $16 \text{ cm} \times 14 \text{ cm} \times 1 \text{ mm}$  厚的胶 2 枚为例,6.75% 的聚丙烯酰胺凝胶液:按 A 液 9.0 mL, C 液 8.1 mL, P 液 1.8 mL, 蒸馏水 17.1 mL 的先后顺序加入到 100 mL 的三角烧瓶中,充分混合均匀后,加入 TEMED 24 mL,再度混匀后,平均倒入到两套玻璃板的缝隙中,胶面的上部轻轻滴入蒸馏水适量,防止胶面干燥,室温放置 20~30 min 胶液凝固后,倒掉上部蒸馏水,将其倒立于桌面,除去残余水分备用。

1.2.6 浓缩胶制备 按下列顺序逐次加入 B 液 3.2 mL, C 液 2.0 mL, E 液 2.6 mL, P 液 0.4 mL, 蒸馏水 3.8 mL 充分混匀后,再加入 TEMED 12 mL 混匀,平均倒入到分离胶的上层,插入梳子,室温放置 20~30 min。凝缩胶凝固后撤下固定铗,用蒸馏水轻轻冲洗掉凝固不完全的残胶,用保鲜膜包好,4℃ 倒置冷藏备用。

1.2.7 SDS-PAGE 电泳 将配好的电泳缓冲液适量,倒入垂直电泳槽内(以没过胶体底面为准),安装玻璃板于垂直电泳槽上,注意胶的底面不要进入气泡;上槽倒入电泳缓冲液,使液面没过玻璃板缺口。用微量注射器或多道微量移液器抽取试样 10 mL,慢慢注入进各泳道。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 4 h 左右,溴酚蓝指示剂即将通过胶体底端的时候,停止电泳,取下胶体,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,确认 Lox 同工酶的缺失状态,随后可将胶体干燥后,扫描保存。

## 2 结果与分析

### 2.1 样品前处理的改进

在样品前处理上,新改进的技术与传统技术的区别,在原来均质振荡后,全蛋白静置抽提之前,进行了 5~8 min 超声波处理,然后,在室温下静置抽提 20~30 min,再度搅拌,并于  $5000 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$  离心 5 min,取上清液 8~10 mL 用于 SDS-PAGE 电泳解析。通过超声波处理,可以增加蛋白质的溶解度,从而不容易产生沉淀,而传统技术电泳时由于蛋白容易沉积在胶体中难以移动,导致 Lox-1, Lox-2 及 Lox-3 同工酶分离和鉴别困难。如图 1A 所示,某单一同工酶缺失与否,传统 SDS-PAGE 电泳技术就难以鉴别<sup>[9]</sup>。



种研究室羽鹿牧太主任研究员的指导,在此表示诚挚的感谢。

## 参考文献

- [1] Andre E, Hou K W. The presence of a lipid oxidase in soybean, *Glycine soya* [J]. *Comptes Rendus Biologies*, 1932, 194: 645-647.
- [2] Sessa D J, Rackis J J. Lipid-derive flavors of legume protein products[J]. *Journal of the American oil Chemists Society*, 1977, 54: 468-473.
- [3] Moreira M A, Tavares S R, Ramos V, et al. Hexanal production and TBA number are reduced in soybean seeds lacking lipoxigenase isoenzymes 2 and 3 [J]. *Journal of Agriculture and Food Chemistry*, 1993, 41(1):103-106.
- [4] 张瑛, 张磊, 吴敬德, 等. 植物脂氧酶同工酶快速检测技术在无腥味大豆育种上的应用研究[J]. *大豆科学*, 2003, 22(1): 50-53. (Zhang Y, Zhang L, Wu J D, et al. Study on the technique of analyzing lipoxigenase isozymes for absence of beany flavor mutants in soybean breeding [J]. *Soybean Science*, 2003, 22(1): 50-53.)
- [5] 刘渊, 张孟臣, 张彩英, 等. 大豆脂氧酶分析鉴定技术的研究进展及在育种中的应用[J]. *中国农学通报*, 2007, 23(7): 101-105. (Liu Y, Zhang M C, Zhang C Y, et al. Progress of analysis and detection methods for soybean lipoxigenase and application in genetics breeding[J]. *Chinese Agricultural Science Bulletin*, 2007, 23(7): 101-105.)
- [6] 傅翠真. 大豆脂氧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 lipoxigenase [J]. *Soybean Science*, 2004, 23(2): 111-113.)
- [7] 羽鹿牧太, 高桥将一, 巽儀田和典, 等. *ダイズ新品種「いちひめ」の育成とその特性*[J]. *九州沖縄農業研究センター報告*, 2002, 40: 79-94. (Hajika M, Takahashi S, Igita K, et al. Breeding and characteristics of a new soybean variety (cv. Ichihime)[J]. *Bulletin of the National Agricultural Research Center for Kyushu Okinawa Region*, 2002, 40: 79-94.)
- [8] 丁安林, 张艳, 常汝镇, 等. 大豆脂氧酶研究进展[J]. *大豆科学*, 1995, 14(1): 67-72. (Ding A L, Zhang Y, Chang R Z, et al. Advances in research of soybean lipoxigenase[J]. *Soybean Science*, 1995, 14(1): 67-72.)
- [9] Kitamura K. Biochemical characterization of lipoxigenase lacking mutants, L-1-less, L-2-less, and L-3-less soybean [J]. *Agricultural and Biological Chemistry*, 1984, 48: 2339-2346.
- [10] Kitamura K, Kumagai T, Kikuchi A. Inheritance of lipoxigenase-2 and genetic relationship among genes for lipoxigenase-1, -2 and -3 isozymes in soybean seeds [J]. *Japanese Journal of Breeding*, 1985, 35: 413-420.
- (上接第 483 页)
- [2] 胡明燕, 徐顺明, 刘新征. 延长鲜豆浆(豆乳)保质期的研究[J]. *食品与发酵工业*, 2005(11):122-125. (Hu M Y, et al. Study on the preservation of soymilk with pasteurization[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2005(11): 122-125.)
- [3] 谢军, 孙晓红, 潘迎捷, 等. 电解水和有机酸对虾的杀菌效果及感官品质影响[J]. *食品与发酵工业*, 2010, 36(5):57-62. (Xie J, Sun X H, Pan Y J, et al. The effect of electrolyzed water and organic acid on the quality of raw shrimp[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2010, 36(5): 57-62.)
- [4] Venkitanarayanan K S, Ezeike G O, Hung Y C, et al. Efficacy of electrolyzed oxidizing water for inactivating *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella enteritidis* and *Listeria monocytogenes* [J]. *Applied and Environmental Microbiology*, 1999, 65(9): 4276-4279.
- [5] 中华人民共和国卫生部. GB 4789. 2-2010. 食品安全国家标准 食品微生物学检验 菌落总数测定[S]. 2010. (Ministry of Health of People's Republic China. GB 4789. 2-2010. National food safety standard. Food microbiological examination: Aerobic plate count[S]. 2010.)
- [6] 赵斌, 何绍红. 微生物学实验[M]. 北京:科学出版社, 2002: 38-40, 42-43. (Zhao B, He S H. Experiment of microbiology [M]. Beijing: Science Press, 2002:38-40, 42-43.)
- [7] 杨丽, 赵宇华, 张炳欣, 等. 一株毒死蜱降解细菌的分离鉴定及其在土壤修复中的应用[J]. *微生物学报*, 2005, 45(6): 905-909. (Yang L, Zhao Y H, Zhang B X, et al. Isolation and characterization of a chlorpyrifos degrading bacteria and its bioremediation application in the soil[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2005, 45(6): 905-909.)
- [8] 汪立平, 张庆华, 赵勇, 等. 变质豆浆中腐败微生物的分离及其灭杀条件研究[J]. *微生物学通报*, 2007, 34(3):621-624. (Wang L P, Zhang Q H, Zhao Y, et al. Separation and preliminary identification of spoilage organisms in transmutative soy milk [J]. *Microbiology*, 2007, 34(3): 621-624.)
- [9] 中华人民共和国卫生部. GB16332-2003. 植物蛋白饮料卫生标准[S]. 2003. (Ministry of Health of People's Republic China. GB16332-2003. Hygienic standard for vegetable protein beverage[S]. 2003.)
- [10] 周春晖, 黄惠华. 大豆原料胰蛋白酶抑制剂失活方法探讨[J]. *食品与发酵工业*, 2001, 27(6):57-61. (Zhao X H, Huang H H. A review on the advance in the methods of soybean trypsin inhibitor inactivation[J]. *Food and Fermentation Industries*, 2001, 27(6): 57-61.)
- [11] 汤凤霞, 蔡慧农. 微生物防腐剂 Nisin 的研究与应用[J]. *食品科技*, 2002(11):46-48. (Tang F X, Cai H N. Study and application of microbial preservative nisin [J]. *Food Science and Technology*, 2002(11): 46-48.)
- [12] 初晓东, 林宇恒, 孙志增, 等. 乳链菌肽(nisin)抗性机制的研究进展[J]. *微生物学报*, 2010, 50(9):1129-1134. (Chu X D, Lin Y H, Sun Z Z, et al. Advances in the study of nisin resistance-A review[J]. *Acta Microbiologica Sinica*, 2010, 50(9): 1129-1134.)
- [13] 贺松, 龚芳红, 张德纯, 等. 乳酸链球菌素对乳酸菌抑菌作用的研究[J]. *食品科学*, 2009, 30(23):352-355. (He S, Xi F H, Zhang D C, et al. Antimicrobial activity of nisin against lactic acid bacteria[J]. *Food Science*, 2009, 30(23): 352-355.)