

大豆叶片异黄酮含量与 PAL 基因相对表达量的关系

张大勇,李文滨,李冬梅,李永光

(东北农业大学大豆所,黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:苯丙氨酸解氨酶(PAL)是苯丙氨酸代谢途径的进入点酶,也是异黄酮合成的关键酶之一。为了分析大豆叶片中异黄酮含量与苯丙氨酸解氨酶(PAL)基因表达量的关系,采用砂培试验,测定了不同生育时期大豆叶片总异黄酮及大豆黄素、黄豆黄素、染料木素的含量,同时测定了相应各生育时期大豆叶片中苯丙氨酸解氨酶(PAL)基因的相对表达量。结果表明:大豆叶片中大豆异黄酮总含量及3种苷元组份含量与叶片中苯丙氨酸解氨酶(PAL)基因的相对表达量有一个协同增减的趋势;在初花期(R1)大豆叶片中的异黄酮总含量和三种苷元组份含量及苯丙氨酸解氨酶(PAL)基因相对表达量均出现一个峰值。

关键词:大豆异黄酮;苯丙氨酸解氨酶;相对表达量

中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-9841(2009)04-0670-04

Relationship between the Contents of Soybean Isoflavanones and Relative Expression Quantity of PAL Gene

ZHANG Da-yong, LI Wen-bin, LI Dong-mei, LI Yong-guang

(Soybean Institute, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

Abstract: The phenylalanine ammonialyase(PAL) is an access point enzyme and also one of isoflavone synthesis key enzyme in the phenylalanine pathways. In order to study the relationship between the contents of soybean isoflavanones and relative expression quantity of PAL gene, a sand culture experiment was conducted. Soybean leaves at different growth stage were sampled, and the isoflavone content were measured and the relative expression quantity of alanin ammonialyase(PAL) gene were determined by RQ-PCR. There was a coordination fluctuation tendency between phenylalanin ammonialyase(PAL) gene relative expression quantity and isoflavone content in soybean leaf. Soybean isoflavones content and relative expression quantity of phenylalanin ammonialyase(PAL) gene appeared a peak value at R1 stage.

Key words: Isoflavones; PAL; Relative expression quantity

大豆异黄酮具有特定的生理保健功能^[1],所以被日益广泛的关注。影响大豆中异黄酮含量的因素很多,总体上可分为大豆遗传代谢方面的内因和生长环境方面的外因两方面因素。从代谢角度探讨大豆中异黄酮含量的影响因素意义重大。大豆异黄酮合成于苯丙氨酸次生代谢途径,对于苯丙氨酸次生代谢途径的认识已经相对较为透彻。异黄酮类物质的合成前体是苯丙氨酸和丙二酰辅酶A,经苯丙氨酸解氨酶(PAL),香豆酸辅酶A连接酶(4CL),查尔酮合成酶(CHS),查尔酮异构酶(CHI),异黄酮还原酶(IFR)等酶催化,经过羟基化,甲氧基化和烷基化过程形成不同的异黄酮类化合物^[2-6]。但是,在这

一系列酶中,哪种酶为真正意义上的异黄酮合成的限速酶还没有定论,前人普遍认为底物浓度决定异黄酮合成量。那么,作为苯丙氨酸代谢途径的进入点酶(PAL)对于影响底物浓度应该较为关键。

实时定量PCR(Real-time Quantitative Polymerase Chain Reaction, RQ-PCR)是快速、准确测定基因相对表达量的有效手段^[7-8]。利用实时定量PCR手段分析苯丙氨酸解氨酶(PAL)基因的相对表达量与大豆异黄酮含量的关系,对于有针对性的定向改变异黄酮含量将会提供有价值的理论参考。

收稿日期:2009-05-12

基金项目:国家科技支撑计划资助项目(2006BAD01A04);黑龙江“十一五”科技攻关资助项目(GA06B101-1-3)。

作者简介:张大勇(1976-),男,博士,助理研究员,研究方向大豆遗传育种。E-mail:zhangdayong03@yahoo.com.cn。

1 材料与方 法

1.1 供试品种

高异黄酮含量品种东农 51 与异黄酮含量中等类型品种垦鉴 27。

1.2 试验设计

试验于 2008 年在东北农业大学试验实习基地内的遮雨棚内进行。采用砂培试验,设置均衡营养液与空白对照两处理。均衡营养液处理的大量元素营养液配方为普良尼什克夫(Прянишников)营养液配方,微量元素配方为阿农(Arnon)营养液配方^[9]。

1.3 取样方法

在不同生育时期选取大豆叶片。东农 51 叶片从 V3 期浇营养液之前开始第一次取样,浇营养液 1 天后第二次取样,V4 期第三次取样,V5 期第四次取样,R1 期第五次取样,之后每隔 6 d 取样一次,直至叶片泛黄有老化迹象,每次取顶部叶缘完全展开的第一片复叶;垦鉴 27 叶片从 V3 期浇营养液之前开始第一次取样,浇营养液 1 天后第二次取样,V4 期第三次取样,R1 期第四次取样,之后每隔 6 d 取样一次,直至花后 24 d 最后一次取样,每次取顶部叶缘完全展开的第一片复叶。取样后放于自封袋内,冷冻在 -80℃ 超低温冰箱内待测异黄酮含量。

1.4 异黄酮含量测定

采用美国戴安高效液相色谱仪系统定量测定样品中的异黄酮含量。

色谱分析条件:色谱柱:150 mm × 4.9 mm C18HICROM316A - LOK (UK);流动相:去离子水:色谱级甲醇 = 50:50;流速:1 mL · min;检测波长:254 nm;柱温:50℃;进样量:10 μL;分析时间:每 25 min。

异黄酮标准样品购自美国 Sigma 公司,样品根据标样的保留时间定性,根据标准样品峰面积定量。

线性回归方程分别为:大豆黄素: $y = 1.158x - 0.0702$, $R^2 = 0.9986$,出峰时间为 11 min;大豆染料木素: $y = 0.806x + 0.1860$, $R^2 = 0.9994$,出峰时间为 17 min;黄豆黄素: $y = 2.4013x + 0.0061$, $R^2 = 0.9970$,出峰时间为 13 min。

采用张晓波等^[10]的方法进行样品的前处理。准确称取大豆粉样品 0.100 g 加入 25 mL 容量瓶中,加入 2.0 mol · L⁻¹的盐酸 7mL,在旋混仪上充分

混匀后,在水浴锅水解,水解温度为 90℃,水解时间 90 min。冷却至室温后,加入氢氧化钠溶液调 pH 值至 7 之后,加入无水乙醇定容至 25 mL。用 0.45 μm 滤膜过滤,加入液谱专用小瓶中封口,4℃ 下保存待测。

参照鞠兴荣等^[11]提供的大豆黄素、黄豆黄素、染料木素三种苷元与其相应葡萄糖化合物的换算系数(分别为 1.64、1.54 和 1.60)进行换算。

1.5 植物总 RNA 的提取

按照 Trizol 试剂盒的方法提取大豆总 RNA。

1.6 实时定量 RT - PCR 分析

大豆 PAL 的序列和 GenBank 上登陆的大豆看家基因 *Actin4* (作为内参)分别设计引物。采用 Fermentas 公司 M-MLV 反转录酶合成 cDNA 第一链,按照 TOYOBO 公司 SYBR Green Realtime PCR Master Mix- Plus- 的程序进行荧光定量 PCR 反应。

PCR 引物如下:

pal-s:5' ATTATGGATTCAAGGGAGCT 3'

pal-a:5' AATGAGGAAAGTGGAGGACA 3'

actin4-s:5'GTGTCAGCCATACTGTCCCCATTT3'

actin4-a:5'GTTTCAAGCTCTTGCTCGTAATCA 3'

引物合成由上海生工生物工程技术有限公司合成。

荧光定量试剂盒购自东洋坊(TOYABO, QPK-212)。

2 结果与分析

2.1 大豆黄素含量与苯丙氨酸解氨酶基因相对表达量关系

将同时期取样的大豆黄素含量除以 100,与苯丙氨酸解氨酶基因相对表达量进行作图比较分析。

由图 1 可见,垦鉴 27 与东农 51 两品种的大豆黄素含量与苯丙氨酸解氨酶基因相对表达量有协同增减的趋势。如在初花期(R1),两品种的大豆黄素含量与苯丙氨酸解氨酶基因相对表达量同时出现一个峰值。

2.2 黄豆黄素含量与苯丙氨酸解氨酶基因相对表达量关系

将同时期取样的黄豆黄素含量除以 30,与苯丙氨酸解氨酶基因相对表达量进行作图比较分析。

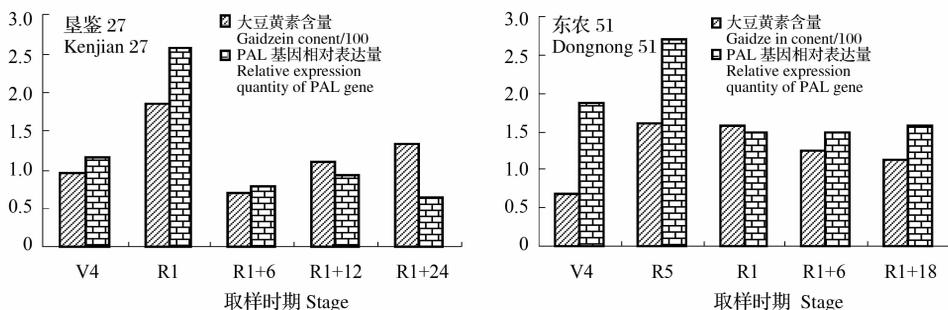


图1 大豆黄酮含量与 PAL 基因相对表达量关系

Fig. 1 Relation between daidzein content and ammoniylase gene expression

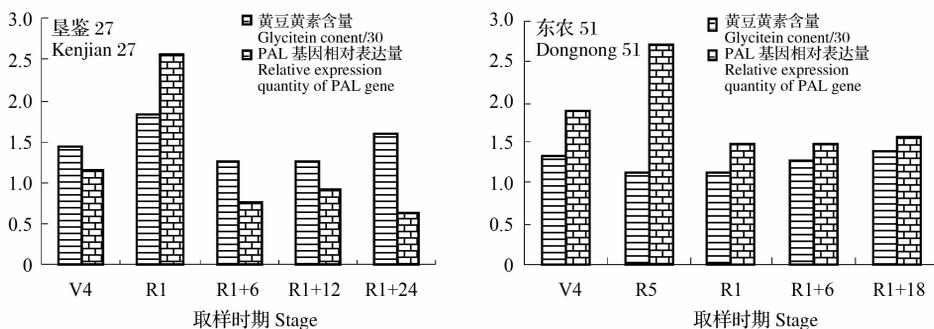


图2 黄豆黄酮含量与 PAL 基因相对表达量关系

Fig. 2 Relation between glycitein content and ammoniylase gene expression

由图2可见, 垦鉴27的黄豆黄酮含量与苯丙氨酸解氨酶基因相对表达量有协同增减的趋势。如在初花期(R1), 垦鉴27的黄豆黄酮含量与苯丙氨酸解氨酶基因相对表达量同时出现一个峰值。东农51的苯丙氨酸解氨酶基因相对表达量在初花期(R1)出现一个峰值, 而黄豆黄酮含量在该时期没有

峰值。

2.3 染料木素含量与苯丙氨酸解氨酶基因相对表达量关系

将同时期取样的染料木素含量除以100, 与苯丙氨酸解氨酶基因相对表达量进行作图比较分析。

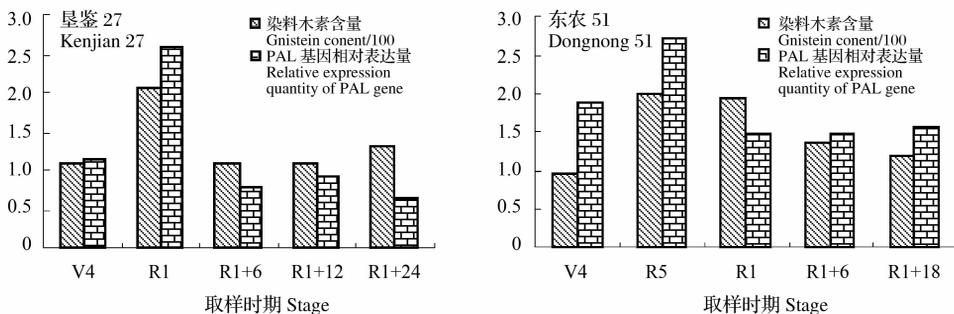


图3 染料木素含量与 PAL 基因相对表达量关系

Fig. 3 Relation between genistein content and ammoniylase gene expression

由图3可见, 垦鉴27与东农51两品种的染料木素含量与苯丙氨酸解氨酶基因相对表达量有协同增减的趋势。如在初花期(R1), 两品种的染料木素含量与苯丙氨酸解氨酶基因相对表达量同时出现一个峰值。

2.4 异黄酮总含量与苯丙氨酸解氨酶基因相对表达量关系

将同时期取样叶片的大豆异黄酮总含量除以300, 与苯丙氨酸解氨酶基因相对表达量进行作图比较分析。

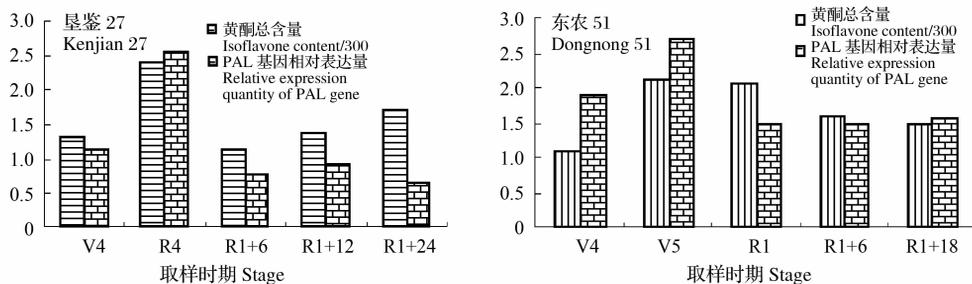


图4 东农 51 大豆异黄酮含量与 PAL 基因相对表达量关系

Fig. 4 Relation between isoflavone content and ammonialyase gene expression

由图 4 可见,垦鉴 27 与东农 51 两品种的大豆异黄酮总含量与苯丙氨酸解氨酶基因相对表达量有协同增减的趋势。如在初花期(R1),两品种的大豆异黄酮总含量与苯丙氨酸解氨酶基因相对表达量同时出现一个峰值。

3 结论与讨论

苯丙氨酸解氨酶(PAL)是进入该途径的第一个酶,也是关键酶^[3-6]。研究发现大豆叶片中苯丙氨酸解氨酶(PAL)基因的相对表达量在品种间存在差异。同一品种不同发育时期也有差异,并且同异黄酮总含量及 3 种苷元组份含量有协同增减的趋势。结果发现东农 51 所检测的各时期苯丙氨酸解氨酶(PAL)基因的相对表达量均高于垦鉴 27,而两品种同时期叶片中异黄酮总含量及 3 种苷元组份含量并未见明显差异。

大豆异黄酮含量和苯丙氨酸解氨酶(PAL)基因的相对表达量在 R1 期均出现一个峰值。这可能是进入 R1 期,大豆开花时花青素等的合成增加,该途径代谢活跃。进而,异黄酮合成的底物含量增加,使得异黄酮含量在这一时期出现相应的峰值。

大豆叶片中异黄酮总含量及 3 种苷元组份含量与同期叶片中苯丙氨酸解氨酶(PAL)基因的相对表达量有协同增减的趋势。苯丙氨酸解氨酶(PAL)基因的相对表达量在初花期(R1)有一个峰值。

参考文献

[1] 王汝兴,刘翠哲,刘喜纲.大豆异黄酮的药理学研究进展[J].承德医学院学报,2004,21(1):65-67. (Wang R X,Liu C Z,Liu X G. Progress on isoflavone in pharmacology[J]. Journal of Chengde Medical College,2004,21(1):65-67.)

[2] 孙君明,丁安林.大豆异黄酮含量及影响因素的评价[J].中国粮油学报,1998,13:10-13. (Sun J M,Ding A L. Evaluation of

factors affecting isoflavone content in soybean[J]. Journal of the Chinese Cereals and Oils Association,1998,13(2):10-16.)

- [3] Yu O,Shi J,Hession A O, et al. Metabolic engineering to increase isoflavone biosynthesis in soybean seed[J]. Phytochemistry,2003,63(7):753-763
- [4] 孙君明,韩粉霞.植物次生代谢产物异黄酮的调控机理[J].西南农业学报,2005,18(5):663-667. (Sun J M,Han F X. Manipulating mechanism of secondary metabolites- isoflavone in plant [J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences,2005,18(5):663-667.)
- [5] 谢灵玲,赵武玲,沈黎明.光照对大豆叶片苯丙氨酸裂解酶(PAL)基因表达及异黄酮合成的调节[J].植物学通报,2000,17(5):443-449. (Xie L L,Zhao W L,Shen L M. Light regulation of the expression of PAL gene in soybean leaves and isoflavone synthesis[J]. Chinese Bulletin of Botany,2000,17(5):443-44.)
- [6] 欧阳光察,薛应龙.植物苯丙烷类代谢的生理意义及其调控[J].植物生理学通讯,1988,24(3):9-16. (Ou Y G C,Xue Y L. Physiological role and regulation of phenylpropanoid metabolism in plant [J]. Plant Physiology Communications,1988,24(3):9-16.)
- [7] Freeman W M,Walker S J,Vrana K E. Quantitative RT-PCR: pitfall and potential[J]. Biotechniques,1999,26(1):112-125.
- [8] Wall S J,Edward D R. Quantitative reverse transcription polymerase chain reaction (TR-PCR): A comparison of primer_dropping, competitive, and real-time RT-PCR[J]. Analytical Biochemistry,2002,300(2):269-273
- [9] 李合生.现代植物生理学[M].北京:高等教育出版社,2002. (Li H S. Modern plant physiology[M]. Beijing: Higher Education Press,2002.)
- [10] 张晓波,吴岩,林红.高效液相色谱测定水解大豆中异黄酮方法研究[J].粮食与油脂,2006(4):19-21. (Zhang X B,Wu Y, Lin H. Study on method of hydrolyze isoflavone in soybean by HPLC[J]. Cereals & Oils,2006(4):19-21.)
- [11] 鞠兴荣,袁建,汪海峰.高效液相色谱法测定大豆提取物中大豆异黄酮的含量[J].中国粮油学报,2000,15(4):26-29. (Ju X R,Yuan J,Wang H F. Determination of isoflavone in extract of soybean by HPLC[J]. Journal of The Chinese Cereals and Oils Association,2000,15(4):26-29.)