

doi: 10.3969/j.issn.0490-6756.2018.01.032

甘薯贮藏期间淀粉酶种类变化及其部分性质分析

张勇为¹, 张义正¹, 谭文芳², 杨松涛²

(1. 四川大学生命科学学院, 四川省分子生物学及生物技术重点实验室, 成都 610064;

2. 四川省农业科学院作物研究所, 成都 610066)

摘要: 本文就甘薯收获后, 自然储藏期间淀粉酶种类变化和部分性质进行研究. 从收获开始, 每间隔2周取样1次, 按3 mL/g加入缓冲液, 提取可溶性总蛋白, 经8%连续聚丙烯酰胺凝胶电泳(PAGE)及淀粉酶活性染色, 结果显示: 在贮藏期间, 有新的淀粉酶活性带出现, 在性质上与原有淀粉酶活性带存在差异. 主要表现在, 对 β -巯基乙醇和EDTA均非常敏感, 而原有淀粉酶活性带不敏感; 在热稳定性方面新出现的淀粉酶也更为敏感. 说明甘薯块根在贮藏期间, 新陈代谢旺盛, 有新的淀粉酶表达, 是需要二硫键的金属酶.

关键词: 甘薯; 块根; 淀粉酶; 敏感性

中图分类号: Q51

文献标识码: A

文章编号: 0490-6756(2018)01-0197-04

Analysis of the part characteristics and the difference of amylase in tuberous roots of sweet potato during storage period

ZHANG Yong-Wei¹, ZHANG Yi-Zheng¹, TAN Wen-Fang², YANG Song-Tao²

(1. Sichuan Key Laboratory of Molecular Biology and Biotechnology, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China;

2. Crops Research Institute, Sichuan Academy of Agricultural Science, Chengdu 610066, China)

Abstract: The part characteristics and the difference of amylase were investigated in tuberous root of sweet potato, during storage period. The total soluble protein were extracted with 3 mL/g buffer, it harvests between 2 weeks in the storage time. Difference amylases were found in isozyme composition in tuberous roots of sweet potato during storage period, by electrophoresis on 8% native polyacrylamide gel and active stain by using soluble starch as substrate. New amylase responds differently to inhibitors, it is sensitive to EDTA or thiol-group reagent, and it is more sensitive to temperature than β -amylase. New amylase can be metalloenzyme with disulfide bond.

Keywords: Sweet potato (*Ipomoea batatas* Lam.); Tuberous root; Amylase; Sensitivity

1 引言

甘薯适应能力极强, 经常种植于干旱、贫瘠的土壤, 被认为是天然抗性作物和最有前途的生物能源作物, 吴燕等^[1]利用转录组学方法, 对国内3个栽培甘薯品种的转录组数据进行了耐旱和耐盐相关的研究. 甘薯也是我国第四大农作物, 具有超高

产能力, 且非常适合用作表达具有生物活性物质的生物反应器^[2-4]. 要实现甘薯的有效、合理利用, 对其各种生理活动规律有必要充分认识与了解.

淀粉酶广泛存在于植物^[5]、动物和微生物中. 根据淀粉酶水解淀粉方式的差异, 可分为 α -淀粉酶和 β -淀粉酶. α -淀粉酶可随机切割淀粉中的1,4-糖苷键, 而 β -淀粉酶则只能从淀粉的非还原性末

收稿日期: 2017-02-11

基金项目: 四川省科技厅项目(2012JY0074)

作者简介: 张勇为(1964-), 男, 讲师, 主要从事植物分子生物学相关研究. E-mail: yongw0906@163.com

端,以麦芽糖为单位切割 1,4-糖苷键,产生麦芽糖和限制性糊精^[6], β -淀粉酶只存在于植物和少数微生物中^[7].

淀粉是植物贮藏器官如种子、块茎及块根的主要营养成分之一.当这些器官进入萌发期,贮藏的淀粉可为其生长提供碳源和能源.淀粉被植物利用主要是通过将其分解为单糖或寡糖,作为合成有机大分子的基本单位实现.植物中既有 α -淀粉酶又有 β -淀粉酶表达,它们表达调节的方式因植物种类不同而存在差异.在水稻^[8,9]、玉米、小麦等粮食作物中均发现,种子萌发时,淀粉酶活性或活性带有不同程度的变化.

甘薯块根贮藏期间会发生一系列的生理、生化变化.如何有利于块根的贮藏和为块根萌发准备必需的营养成分,这些变化在生理上可能与小麦、水稻萌发时的情况存在类似之处,如淀粉酶的表达等,也可能还有新的淀粉酶出现.本文就甘薯贮藏期间淀粉酶活性带变化,以及活性带对金属离子螯合剂和巯基试剂的敏感性测定结果进行报道.

2 材料和方法

2.1 材料

川薯 217 为四川省农业科学院作物研究所,从冀薯 98 \times 力源一号杂交后代中,通过反复选育获得.

2.2 方法

2.2.1 取样 从收获之日起,每隔 2 周取样 1 次.挑取中等大小薯块,去皮后在接近薯块中部处称取 20g.

2.2.2 淀粉酶提取、电泳活性带检测 在张勇为等^[10]所述方法基础上加以改进:用于制备总蛋白的样品,按 3.0 mL/g 加入 50 mmol/L Tris-HCl pH7.0 缓冲液,搅拌约 1 min, Ependoph 5840R 型离心机,4 $^{\circ}$ C, 10,000 r/min, 10 min. 取出上清液,分装为 50 μ L/份,置-20 $^{\circ}$ C 待用.电泳使用 8% 聚丙烯酰胺凝胶.在 6 $^{\circ}$ C, 40~50 mA 恒流条件下,让指示剂溴酚蓝移动至正极玻板边缘,结束电泳.凝胶用蒸馏水洗涤 2 次,转至约 42 $^{\circ}$ C 含 2% 可溶性淀粉的 50 mmol/L Tris-HCl pH7.0 缓冲液中,37 $^{\circ}$ C 温育约 20 min, 倒掉缓冲液,蒸馏水洗 3 次,碘液染色,凝胶扫描.

2.2.3 淀粉酶对 EDTA、 β -巯基乙醇及温度的敏感性 取储藏 4 周的蛋白质样品按张勇为等^[10]所述方法进行.

2.2.4 SDS 对淀粉酶活性的影响 取储藏 4 周的

蛋白质样品中加入 SDS 至所需浓度后,进行聚丙烯酰胺凝胶电泳和淀粉酶活性染色,凝胶扫描等.

3 结果与分析

3.1 不同贮藏期块根淀粉酶活性带数目变化

块根贮藏不同时间可溶性蛋白质,经凝胶电泳和淀粉酶活性染色,发现淀粉酶活性带存在差异(如图 1 所示),从贮藏的第 4 周开始,每一样品均出现 1 条在贮藏 0 周时几乎看不见的淀粉酶活性带 A1,这与我们在研究甘薯愈伤组织淀粉酶的情况类似,而且该活性带在贮藏期保持相对稳定.从贮藏的第 4 周开始,在靠近块根 β -淀粉酶带 B1 的前方出现 1 条较弱淀粉酶活性带 B2.除此之外,在 6 至 10 周还有 1 条新的淀粉酶带 A2 形成,迁移最远,而块根中的 β -淀粉酶带 B1 几乎没有变化.

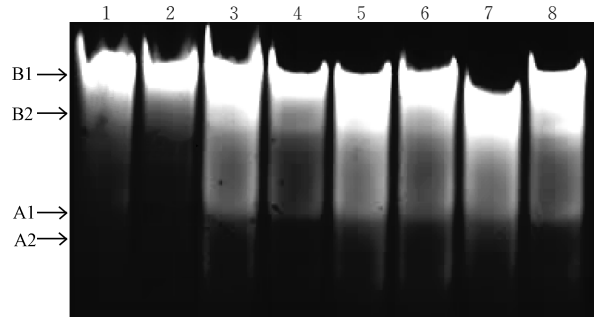


图 1 块根不同贮藏时间淀粉酶活性带变化

1~8 道:分别为:0、2、4、6、8、10、12、14 周样品

Fig. 1 Amylase activity in different storage periods

Lanes 1~8: Samples of 0, 2, 4, 6, 8, 10, 12, 14 weeks

3.2 块根淀粉酶活性带对巯基试剂的敏感性

从图 2 可以发现:新出现的淀粉酶活性带 A2 对 β -巯基乙醇最为敏感,在 10mM 时活性带完全消失,新出现的淀粉酶活性带 A1 对 β -巯基乙醇的敏感性相对于 A2 而言存在差异,在 50mM 时仍有部分活性(图 2, 第 4 道),即使 β -巯基乙醇的浓度更高仍然保持部分活性;在原有的 β -淀粉酶活性带 B1 处,仍有 1 条强度约 2/3 的活性带,即使 β -巯基乙醇的浓度达到 200mM 亦无明显变化.这表明新出现的淀粉酶 A2 极有可能需要二硫键才能表现出活性,二硫键一旦被破坏其活性即丧失,而新出现的淀粉酶 A1,可能二硫键位于分子内部,尽管受到 β -巯基乙醇影响,但并未破坏,因此仍然维持部分活性.原 β -淀粉酶活性带 B1 位置处可能不止 1 条淀粉酶活性带,非常可能是 2 条在性质上存在差异的淀粉酶活性带,由于迁移率非常接近,而无法将它们(B1 和 B2)有效地分开.

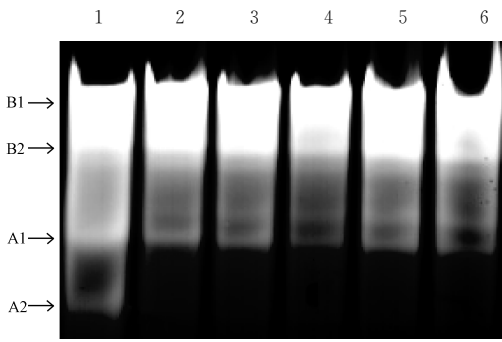


图 2 贮藏 4 周块根淀粉酶对 β -巯基乙醇的敏感性
1~6 道: β -巯基乙醇的浓度分别为: 0、10、20、50、100、200mM

Fig. 2 Amylase sensitivity to β -mercaptoethanol
Lanes 1~6: Extracts of tuberous roots with β -mercaptoethanol 0, 10, 20, 50, 100 and 200 mmol/L in 4 weeks;

图 2 与图 1 在活性带显示方面略有差异, 可能与图 1 中不同的样品, 其活性带强弱差异明显, 不容易同时显示不同强弱的淀粉酶活性带, 而图 2 则是同一样品, 更容易通过控制淀粉酶与碘液作用的时间, 尽可能将略有差异的淀粉酶活性带显示出来, 并且 β -巯基乙醇容易扩散, 在电泳时也可能对旁边泳道的样品产生影响。

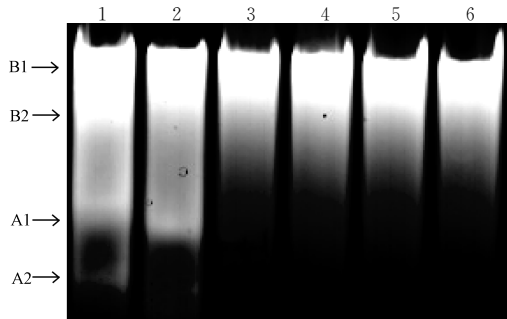


图 3 贮藏 4 周块根淀粉酶对 EDTA 的敏感性
1~6 道: EDTA 的浓度分别为: 0、1、2、5、10、20mM

Fig. 3 Sensitivity of amylase to EDTA
Lanes 1~6: Extracts of tuberous roots with EDTA 0, 1, 2, 5, 10 and 20 mmol/L in 4 weeks.

3.3 块根淀粉酶活性带对 EDTA 的敏感性

从图 3 可以清楚地看到, 新出现的淀粉酶活性带(A1 和 A2), 对金属离子整合剂 EDTA 非常敏感, A2 在 1 mM、A1 在 2 mM 时活性带完全消失, 而原有的 β -淀粉酶活性带依然有 1 条强度约 2/3 的活性带, 即使 EDTA 的浓度达到 20 mM 亦无明显变化. 这表明新出现的淀粉酶非常可能是一种金属酶, 一旦金属离子被整合剂整合, 其活性即丧失. 原 β -淀粉酶活性带(B1 和 B2)位置处, 正如在巯基试剂敏感性时所指出的那样, 可能不止 1 条淀粉酶活性带, 而是 2 条性质存在差异的淀粉酶活性带, 其中 1 条活性带对 β -巯基乙醇和 EDTA 敏感而失

活, 导致原有活性带强度减弱.

3.4 块根淀粉酶活性带对温度的敏感性

考虑到贮藏期间块根淀粉酶活性带发生比较大的变化, 这些变化是否会导致淀粉酶在热稳定性方面发生改变, 我们进行了淀粉酶热稳定性实验. 从图 4 中可以清楚地发现, 在 60 °C 时新出现的淀粉酶活性带(A1 和 A2)有明显的减弱, 而块根 β -淀粉酶活性带(B1 和 B2)位置未见明显减弱; 在 70 °C 时新出现的淀粉酶和原 β -淀粉酶, 活性带几乎丧失殆尽; 当温度达到 80 °C 时所有淀粉酶活性带完全丧失.

3.5 SDS 对块根淀粉酶活性带的影响

离子型去垢剂 SDS 通常会改变蛋白质表面电荷的分布, 从而影响蛋白质在电场中的迁移率等性质, 即 SDS 通常会改变蛋白质的某些性质. 从图 5 我们可以发现, SDS 对淀粉酶活性的影响非常有限, 在浓度为 0.5% 以下时, 几乎看不见明显的影响; 即使在 1% 时, 淀粉酶活性也只是部分丧失, 因此甘薯块根中的淀粉酶对离子型去垢剂 SDS 具有相当程度的耐受性.

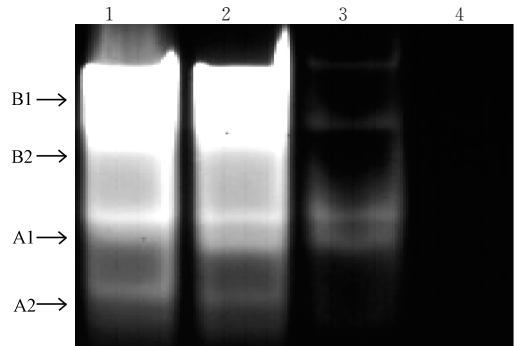


图 4 贮藏 4 周块根淀粉酶对温度的敏感性
1~4 道: 对照、60°C、70°C、80°C

Fig. 4 Stability of amylase at different temperature
Lanes 1~4: extracts of tuberous roots at 0, 60, 70 and 80°C in 4 week

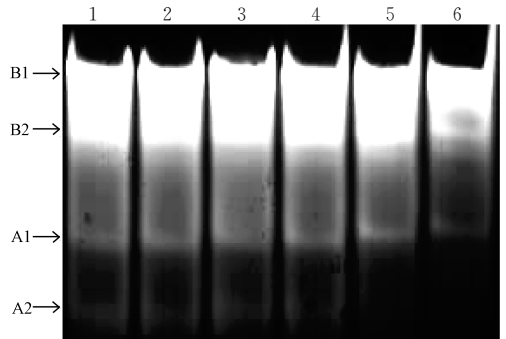


图 5 SDS 对贮藏 4 周块根淀粉酶活性的影响
1~6 道: SDS 的浓度分别为: 0、0.05、0.1、0.2、0.5、1%
Fig. 5 Effect of sodium dodecylsulphate to amylase
Lanes 1~6: extracts of tuberous roots with sodium dodecylsulphate 0, 0.05, 0.1, 0.2, 0.5, 1%, in 4 weeks.

4 讨 论

甘薯块根中的 β -淀粉酶很早就被分离纯化,并对其晶体结构进行了较为深入的研究^[11,12],然而对于块根中的其它淀粉酶,尽管有所提及,却未见更多的叙述和报道,有关性质的研究几乎未见.过去在淀粉酶纯化的研究中,多数缓冲液都包含有巯基试剂^[13]或螯合剂 EDTA^[14],而这些试剂在我们的结果中,都能有效地抑制非原有的 β -淀粉酶活性,这或许是过去几十年的研究,只有甘薯 β -淀粉酶的深入研究而没有任何其它淀粉酶的资料.这也说明,如果想分离、纯化甘薯块根中的非原有 β -淀粉酶,提取缓冲液中就不应含有巯基试剂和螯合剂(如 EDTA).另外,在淀粉酶检测方面也有需要注意之处,这主要表现在,凝胶的浓度和凝胶的长度以及电泳时缓冲液的温度,这是因为:如果凝胶的浓度较高而长度又较短,则不能将迁移率接近的淀粉酶有效分离开,再加上缓冲液温度较高,淀粉酶活性带的扩散,将使迁移率接近的淀粉酶带融为一体,也不能将它们有效地分开.除此之外,淀粉酶与淀粉溶液作用的时间和温度也很重要,只有在确定了它们之间的最佳条件时,才能获取到比较符合要求的结果.本文仅就甘薯贮藏过程中新出现的淀粉酶,在一些常见敏感性试剂方面进行了部分实验,更深入的分离纯化及性质研究正在进行中.

从目前我们获得的这些结果可以发现,甘薯块根在贮藏过程中,并非我们最初所认为的没有新的淀粉酶表达,而新出现的淀粉酶是原有 β -淀粉酶基因表达产物(RNA 和蛋白质)经过不同加工所形成,或者是新的淀粉酶基因从头合成的,还有待进一步的研究.但无论是新淀粉酶基因从头合成的产物,还是原 β -淀粉酶基因的表达产物经过加工而来,新出现的淀粉酶在已检测的性质方面都与原 β -淀粉酶存在差异.从粗酶性质看,可能是需要二硫键的金属酶,而这些与甘薯愈伤组织中的淀粉酶^[10]就已检测的一些敏感性试剂而言,它们在性质上更为接近.另外,我们的结果也说明,甘薯在贮藏过程中所经历的生理过程在一定程度上与水稻、玉米等粮食作物在贮藏及萌发过程所经历的过程存在相似性.

参考文献:

[1] 吴燕,颜朗,李雪丹,等.甘薯耐旱和耐盐基因的挖掘和表达分析[J].四川大学学报:自然科学版,

2016, 53: 1147.

- [2] Wang H, Yang J, Zhang M, *et al.* Altered Phenylpropanoid Metabolism in the Maize Lc-Expressed Sweet Potato (*Ipomoea batatas*) Affects Storage Root Development [J]. *Sci Rep*, 2016, 6: 18645.
- [3] Muramoto N, Tanaka T, Shimamura T, *et al.* Transgenic sweet potato expressing thionin from barley gives resistance to black rot disease caused by *Ceratocystis fimbriata* in leaves and storage roots [J]. *Plant Cell Rep*, 2012, 31: 987.
- [4] Santa-Maria M C, Yencho C G, Haigler C H, *et al.* Starch self-processing in transgenic sweet potato roots expressing a hyperthermophilic α -amylase [J]. *Biotechnol Prog*, 2011, 27: 351.
- [5] Delatte T, Umhang M, Trevisan M, *et al.* Evidence for distinct mechanisms of starch granule breakdown in plants [J]. *Biol Chem*, 2006, 281: 12050.
- [6] Toda H, Nitta Y, Asanami S, *et al.* Sweet potato β -amylase: primary structure and identification of the active-site glutamyl residue [J]. *Eur J Biochem*, 1993, 216: 25.
- [7] Nakamura K, Ohto M A, Yoshida N, *et al.* Sucrose-induced accumulation of β -amylase occurs concomitant with the accumulation of starch and sporamin in leaf-petiole cuttings of sweet potato [J]. *Plant Physiol*, 1991, 96: 902.
- [8] 赵玉锦,王台.水稻种子萌发过程中 α -淀粉酶与萌发速率关系的分析[J].植物学通报,2001,18:226.
- [9] 杨煜峰,施天生,陆定.杂交水稻萌发种子淀粉酶活性和 GA₃ 的调节[J].中国农业科学,1990,23:27.
- [10] 张勇为,纳海燕,王大一,等.甘薯愈伤组织中的淀粉酶[J].植物生理与分子生物学学报,2002,28:375.
- [11] Cudney R, McPherson A. Preliminary crystallographic analysis of sweet potato beta amylase [J]. *J Mol Biol*, 1993, 229: 253.
- [12] Cheong C G, Eom S H, Chang C, *et al.* Crystallization, molecular replacement solution, and refinement of tetrameric beta-amylase from sweet potato [J]. *Proteins*, 1995, 21: 105.
- [13] Wang S M, Lue W L, Wu S Y, *et al.* Characterization of a maize β -amylase cDNA clone and its expression during seed germination [J]. *Plant Physiol*, 1997, 113: 403.
- [14] Okamoto K, Akazawa T. Enzymeic mechanism of starch breakdown in germinating rice seeds [J]. *Plant Physiol*, 1980, 65: 81.