

经验交流

一种简单、快速筛选水稻种胚脂氧合酶 3 缺失体的新方法*

沈文飏¹⁾ 周 彤¹⁾ 王益华¹⁾ 俞伟伟¹⁾ 郑天清¹⁾ 翟虎渠²⁾ 万建民^{1)**}¹⁾ 南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏省植物基因工程研究中心, 南京 210095;²⁾ 中国农业科学院, 北京 100081)

摘要 根据水稻种胚脂氧合酶-3 (LOX-3) 催化产物的氧化特性, 结合脂氧合酶的专一性抑制剂——去甲二氢愈创木酸, 建立了筛选水稻种胚脂氧合酶-3 缺失体的 I₂-KI 比色法, 并探讨其最佳实验条件. 与常用的单克隆抗体筛选技术相比, 该方法具有准确、简单且成本低的特点, 可以进一步用于耐储藏水稻的育种研究.

关键词 水稻种胚, 脂氧合酶-3, 缺失, 筛选方法

学科分类号 Q55

据统计, 我国常年仅稻谷的贮藏损失就占其总产量的 3%, 而大量建造高标准的低温库和气调库是非常不经济的, 因此从贮藏粮食本身来解决陈化变质问题无疑是一条经济有效的途径. 已知水稻种胚中含有三种脂氧合酶 (lipoxygenase, LOX, EC 1.13.11.12) 同工酶^[1,2], 其中 LOX-1 和 LOX-2 的最适 pH 分别为 4.5 和 5.5, LOX-1 功能不明, 后者则与水稻的萌发有关; 而最适 pH 为 7.0 并约占总活性 80%~90% 的 LOX-3 则与耐储性密切相关. Suzuki 等^[3,4]首次发现泰国水稻品种 Daw Dam 是一种 LOX-3 的缺失体材料, LOX-3 的失活可以明显降低贮藏期间稻谷不饱和脂肪酸的过氧化水平, 减少包括醛、酮和醇类等令人不快的陈化气味累积, 耐贮性也明显好于含有 LOX-3 正常活性的越光和秋光等水稻品种.

由于 LOX-3 的缺失是受单隐性基因控制^[5], 因此通过常规和分子遗传育种手段培育不含或低含量 LOX 的耐贮藏水稻新品种将成为可能. 但是通常进行 LOX-3 缺失体鉴定和筛选的单克隆抗体技术价格昂贵且步骤复杂, 在进行大量的种质资源筛选和新品种选育中利用将是非常困难和不经济的. 本文首次报道了一种低成本的筛选水稻种胚 LOX-3 缺失体的 I₂-KI 比色方法, 并探讨其最佳实验条件.

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

供试材料为含有正常 LOX-3 活性的水稻品种

越光和 LOX-3 缺失体材料 Daw Dam, 脱壳切单胚待用; 同时根据文献 [2] 纯化了越光种胚 LOX-3, 与初酶液中 LOX 比较, 10 μ l 的活性单位为 5.6 U (每个活性单位 (U) 定义为 25 $^{\circ}$ C 下每分钟生成 1 μ mol 共轭双键产物的酶量)^[6]. 亚油酸由 Amersco 公司进口, LOX 专一性抑制剂去甲二氢愈创木酸为 Sigma 公司产品.

1.2 I₂-KI 比色测定法

溶液 A 的配制参见文献 [7], 略有修改. 其中加入不同浓度和 pH 的硼酸缓冲溶液, 并用 6 mol/L HCl 将 pH 调至 7.0. 取上述材料的单胚和纯化越光种胚 LOX-3 分别加入各试管中, 吸取 1 ml 溶液 A, 室温下放置 10 min 后再分别加入 200 μ l 溶液 B (15% 醋酸溶液) 和溶液 C (1% 可溶性淀粉), 其中每 100 ml 溶液 B 中含 5 ml 饱和碘化钾溶液, 以蒸馏水为参比, 保温 (25 $^{\circ}$ C) 不同时间比色测定 A₄₁₀ (橙红色的吸收峰, 蓝紫色吸收峰的峰肩), 同时以一定浓度的去甲二氢愈创木酸预保温 (25 $^{\circ}$ C) 作为对照, 上述试验均重复 5 次.

2 结果与讨论

2.1 保温时间、缓冲液 pH、浓度与 ΔA_{410} 的关系

大豆脂氧合酶-1 催化亚油酸氧化反应的主要

* 科技部转基因专项资助项目 (J00-A006-1).

** 通讯联系人.

Tel: 025-4396516, E-mail: wanjm@mail.njau.edu.cn

收稿日期: 2002-03-27, 接受日期: 2002-05-28

产物是具有高度氧化活性的 13-氢过氧化亚油酸, KI 被其氧化后游离出碘, 后者遇可溶性淀粉呈紫红色或橙红色, Hammond 等^[7]利用这种现象已经建立了筛选大豆脂氧合酶-1 缺失体的方法. 本实验以 A_{410} LOX-3 平均值与 A_{410} LOX-3+ 抑制剂 平均值的差值 (ΔA_{410}) 作为水稻种胚 LOX-3 催化产物 9-氢过氧化亚油酸氧化 KI 的能力. 由图 1 可以看出, 10 μ l 纯化的水稻种胚 LOX-3 (5.6 U) 催化产物也具有明显的氧化 KI 能力. 随着缓冲液 pH 值和浓度的提高, 各处理后的 ΔA_{410} 变化基本上呈减小的趋势; 在不同的保温时间内, 0.1 mol/L pH 8.2 的硼酸缓冲液处理下均具有最强的氧化 KI 能力. 另一方面, 不同硼酸缓冲液处理下的水稻种胚 LOX-3 反应 3 h 后均呈蓝紫偏红色, 而结合 LOX 专一性抑制剂的处理则基本为无色.

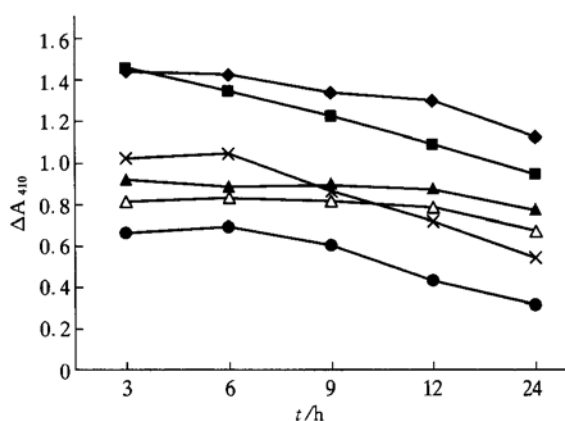


Fig. 1 Effects of incubation time and different boric buffer treatment on the capability of catalytic product of purified lipoxygenase 3 (5.6U) in rice embryos for oxidizing potassium iodide

◆—◆: pH 8.2, 0.1 mol/L; ■—■: pH 8.2, 0.2 mol/L; ▲—▲: pH 8.2, 0.4 mol/L; ×—×: pH 9.0, 0.1 mol/L; △—△: pH 9.0, 0.2 mol/L; ●—●: pH 9.0, 0.4 mol/L.

2.2 水稻种胚 LOX-3 活性与 ΔA_{410} 的关系

在等体积反应体系中加入不同体积 LOX-3, 再与 KI 和可溶性淀粉保温反应 3~6 h, 发现不同浓度的水稻种胚 LOX-3 活性与 ΔA_{410} 呈正比关系. 图 2 显示, 在 0.1 mol/L pH 8.2 硼酸缓冲液处理下保温 6 h 时, ΔA_{410} 与水稻种胚 LOX-3 活性有较好的线性关系且灵敏度也较好 (数值较大). 结合图 1 的结果, 表明水稻种胚 LOX-3 的催化产物 9-氢过氧化亚油酸具有氧化 KI 的能力, 且同反应所用的缓冲溶液和保温时间有关.

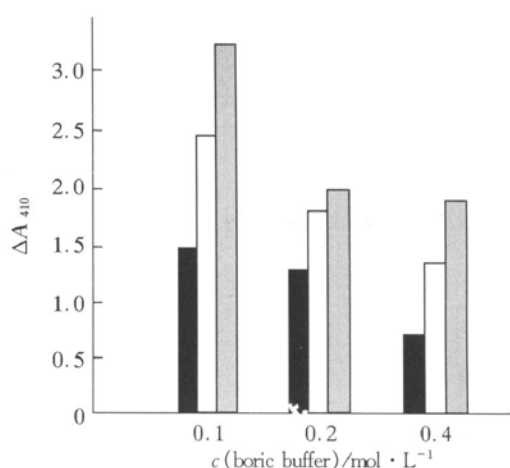


Fig. 2 The relationship of volume of purified lipoxygenase-3 in rice embryos and ΔA_{410} under the different concentrations of pH 8.2 boric buffer treatment for 6 h

■: 10 μ l; □: 20 μ l; ▒: 40 μ l.

2.3 I₂-KI 比色法筛选水稻种胚 LOX-3 缺失体条件的探讨

单粒水稻种胚的情况要相对复杂. 由于 LOX-1、LOX-2 和 LOX-3 在 pH 7.0~9.0 也具有一定的活性^[1,2], 因此采用 pH 9.0 硼酸缓冲液来尽量抑制 LOX-1 和 LOX-2 的活性. 结果研究发现, 采用 0.4 mol/L pH 9.0 的不同浓度硼酸缓冲溶液作为 A 液, 越光单粒种胚反应 9~40 h 时均呈略带紫色的橙红色, 相应的 Daw Dam 颜色偏淡, 以 LOX 专一性抑制剂处理的各管颜色则基本为无色; 继续延长反应时间, 各处理中的橙红色和紫色则开始逐渐褪色. 由于纯化的 LOX-3 和单粒水稻种胚 LOX-3 催化产物所具有的氧化 KI 能力是有差异的, 而前者能力较强, 因此需采用较长的反应时间 (9~40 h) 来比色筛选 LOX-3 的缺失表型. 已知直链淀粉遇碘变蓝, 支链淀粉则变紫色或紫红色, 但市售的可溶性淀粉一般是在 55~65 °C 提取的能溶于水的那部分淀粉, 因此也包括含侧链较少的支链淀粉, 也不排除其中还含有具有碘值的微量油脂, 从而导致反应 40 h 后的褪色效应, 所以必须选择质量稳定的可溶性淀粉. 考虑到显色反应也会受到水稻种胚中其他氧化还原因素的干扰, 还应外加 LOX 的专一性抑制剂来作为对照. 此外, 我们还发现, 在采用单克隆抗体技术验证过的含有正常 LOX-3 蛋白的水稻品种中^[8], 包括南京 11、珍珠矮、原丰早、特青、二九青、桂朝二号等籼稻和武育梗、热研 2 号、日本晴、秋光、镇稻 88 和武农早等粳稻单粒种胚氧化 KI 的能力也具有一定的

差异, 其中粳稻氧化 KI 的能力更强, 表明它们含有较高的 LOX-3 活性, 这也初步解释了粳稻品种相对不耐贮藏的原因。

总之, 与常用的 LOX-3 单克隆抗体筛选技术相比, I₂-KI 比色法具有准确、简单且成本低的特点, 适用于耐储藏水稻的育种改良研究。

参 考 文 献

- 1 Ida S, Masaki Y, Morita Y. The isolation of multiple forms and product specificity of rice lipoxygenase. *Agric Biol Chem*, 1983, **47** (3): 637~ 641
- 2 Ohta H, Ida S, Mikami B *et al.* Purification and characterization of rice lipoxygenase component 3 from embryos. *Agric Biol Chem*, 1986, **50** (12): 3165~ 3171
- 3 Suzuki Y, Nagamine T, Kobayashi A *et al.* Detection of a new rice variety lacking lipoxygenase 3 by monoclonal antibodies. *Japan J Breed*, 1993, **43**: 405~ 409
- 4 Suzuki Y, Yasui T, Matsukura U, *et al.* Oxidative stability of bran lipids from rice [*Oryza sativa* (L.)] lacking lipoxygenase 3 in seeds. *J Agric Food Chem*, 1996, **44**: 3479~ 3483
- 5 Suzuki Y, Yasui T, Okuno K. Genetic analysis of null allele for lipoxygenase 3 in rice seeds. *Euphytica*, 1996, **91**: 99~ 101
- 6 Suzuki Y, Matsukura U. Lipoxygenase activity in maturing and germination rice seeds with and without lipoxygenase 3 in mature seeds. *Plant Sci*, 1997, **125**: 119~ 126
- 7 Hammond E G, Duvick D N, Fehr W R, *et al.* Rapid screening techniques for lipoxygenases in soybean seeds. *Crop Sci*, 1992, **32**: 820~ 821
- 8 Suzuki Y, Ise K, Nagamine T. Geographical variation of the gene, (*lox3* (t)), causing lipoxygenase 3 deficiency in Asian rice varieties. *Rice Genet Newsl*, 2000, **17**: 13~ 14

One Simple and Rapid Spectrophotometric Method for Screening Lipoxygenase 3 null in Rice Embryos^{*}

SHEN Wen-Biao¹⁾, ZHOU Tong¹⁾, WANG Yi-Hua¹⁾, YU Wei-Wei¹⁾,

ZHENG Tian-Qing¹⁾, ZHAI Hu-Qu²⁾, WAN Jian-Min^{1)**}

(¹⁾State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Jiangsu Plant Gene Engineering Research Center, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China;

(²⁾Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract One rapid and inexpensive spectrophotometric method was developed to screen rice embryos for lipoxygenase 3-null, based on the oxidative ability of 9-hydroperoxide, the catalytic product of lipoxygenase 3, combined with the specific inhibitor of lipoxygenase, namely nordihydroguaiaretic acid, when purified lipoxygenase 3 or the surface of cut rice single embryo was exposed to emulsions containing linoleate. The 9-hydroperoxides were detected by one color test based on the oxidation of iodide-starch. The optimal experimental conditions for above method had also been surveyed. Compared with the normal monoclonal antibodies method, this new method is more reliable, simple, costs less reagent, which could also be used as the useful tools for breeding storable rice.

Key words rice embryos, lipoxygenase 3, null, screening method

^{*} This work was supported by a grant from The Transgenic Project of The Ministry of Science and Technology (J00-A006-1).

^{**} Corresponding author. Tel: 86-25-4395516, E-mail: wanjm@mail.njau.edu.cn

Received: March 27, 2002 Accepted: May 28, 2002