

转反义 *Trx s* 基因小麦灌浆期间籽粒和成熟后种子萌发期间的过氧化物酶和过氧化氢酶活性变化

郭红祥, 尹钧*

河南农业大学生命科学学院, 国家小麦工程技术研究中心, 郑州 450002

提要: 检测转反义 *Trx s* 基因小麦灌浆期间籽粒和萌发期种子中过氧化物酶(POD)和过氧化氢酶(CAT)活性及其同工酶变化的结果表明, 在籽粒成熟过程中, 转基因小麦籽粒中POD和CAT活性均低于非转基因小麦; 在小麦种子萌发过程中, 转基因小麦种子中的POD和CAT活性也均低于非转基因小麦。

关键词: 小麦; 反义 *Trx s* 基因; 过氧化物酶; 过氧化氢酶

Changes in Peroxidase and Catalase Activities during Filling Stage of Grains and Seed Germination of Transgenic Antisense *Trx s* Wheat (*Triticum aestivum* L.)

GUO Hong-Xiang, YIN Jun*

National Engineering Research Center for Wheat, College of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

Abstract: To clarify the biological mechanism of transgenic wheat seeds with antisense *Trx s* gene, the activities of peroxidase (POD) and catalase (CAT) in filling grains and germinating seeds of wheat were determined. The activities of POD and CAT in transgenic wheat seeds were lower than those in non-transgenic wheat during maturation. And the activities of POD and CAT in transgenic wheat seeds during germination were also lower than those in non-transgenic wheat.

Key words: wheat (*Triticum aestivum*); antisense *Trx s*; POD; CAT

硫氧还蛋白(thioredoxin, Trx)是生物体内调节氧化还原力平衡的一种多功能蛋白, 通过可逆的二硫键与巯基的变化来调节靶蛋白或酶的生物学活性, 已经证明转反义 *Trx s* 基因能使小麦成熟期提前和明显延缓小麦种子发芽进程(周苏玫等 2006a, b; Guo 等 2007; 郭红祥等 2007; 郭红祥和尹钧 2007)。在逆境情况下, 生物体内广泛存在活性氧爆发现象, 以致自由基增多, 细胞膜产生过氧化, 最终导致细胞膜的破坏和损伤。在生物体内, 过氧化物酶和过氧化氢酶等酶组成的清除活性氧自由基的防御体系, 可以保持生物体内活性氧自由基的平衡, 现已证明, 这些酶与生物体的成熟衰老密切相关(吴彩娥等 2002; 林植芳等 1998)。另外, 过氧化氢酶(catalase, CAT)和过氧化物酶(peroxidase, POD)还与种子萌发有关(陈刚等 2002; 杜兰芳等 2007)。本文从CAT和POD的活性以及同工酶变化入手, 探讨反义 *Trx s* 基因小麦籽粒发育成熟和种子萌发过程中的CAT和POD的活性变化, 从而为阐明转反义 *Trx s* 基因后小麦成熟期提前和明显延缓种子发

芽进程的生理机制提供参考。

材料与方法

以我们实验室得到的转反义 *Trx s* 基因‘豫麦18’(*Triticum aestivum* L.)和非转基因小麦‘豫麦18’为试验材料。分别于小麦开花后 10、15、20、25、30、35 d 取样, 测定酶活性。小麦成熟后, 收获的种子经消毒和浸泡处理后进行发芽试验, 分别于浸泡处理后 0、1、2、3 和 4 d 取样测定。

测定POD酶活性时, 取不同时期小麦籽粒, 液氮研磨后称重, 按1:5 (W/V)加入提取液, 匀浆提取。在 5 000×g 离心 5 min, 上清液即为酶提取液。POD酶活性的测定用 Rao 等(1996)文中的方法。

测定CAT酶活性时, 取不同时期小麦籽粒, 于

收稿 2008-03-17 修定 2008-06-18

资助 国家自然科学基金(30370877)和国家粮食丰产科技工程河南课题(2006BAD02A07)。

* 通讯作者(E-mail: xmzxyj@126.com; Tel: 0371-63558203)。

液氮中研磨后称重,按 1:15 (W/V)加入预冷的 pH 7.0 磷酸缓冲液,4 匀浆提取。以 $5\ 000\times g$ 离心 15 min,上清液即为酶提取液。CAT 酶活性测定用 Aebi (1984) 文中的方法。

POD 与 CAT 同工酶电泳时,取不同时期小麦籽粒,于液氮中研磨后称重,按 1:3 (W/V)加入提取液,匀浆后提取 10 h。以 $5\ 000\times g$ 离心 20 min,上清液即为酶提取液。分离胶为 7%,浓缩胶为 4% 进行恒压下电泳(浓缩胶 80 V,分离胶 100 V)。POD 和 CAT 同工酶活性染色参见陈毓荃(2002)书中方法,酶蛋白染色参见 Bradford (1976)方法。

结果与讨论

1 转反义 *Trx s* 基因小麦籽粒灌浆和种子萌发期间的 POD 活性变化

从图1~3中可以看出:(1)在小麦籽粒成熟过程

中,POD 活性呈现先升后降的变化趋势,花后 15 d 时 POD 活性达到高值。非转基因小麦 POD 酶活性高于转基因小麦,在花后 10~25 d 时达到极显著水平($P<0.01$)。POD 是一种保护酶,因此转基因小麦籽粒 POD 活性低于非转基因小麦可能是转基因小麦成熟期提前的原因之一。在小麦种子萌发过程中,POD 活性同样呈现先升后降的趋势,非转基因小麦种子在萌发 1 d 时达到高值,转基因小麦在萌发 2 d 后接近于高值。POD 活性在萌发进程中表现出上升趋势,表明其作用不仅仅是参与活性氧代谢,还可能参与萌发时的其它物质代谢。非转基因小麦种子 POD 活性明显高于转基因小麦,在萌发 1~4 d 均达到极显著水平($P<0.01$),这与非转基因小麦种子萌发代谢强于转基因小麦相一致。实验结果表明,反义 *Trx s* 基因导入降低了小麦籽粒成熟和种子萌发过程中 POD 的活性(图 1)。

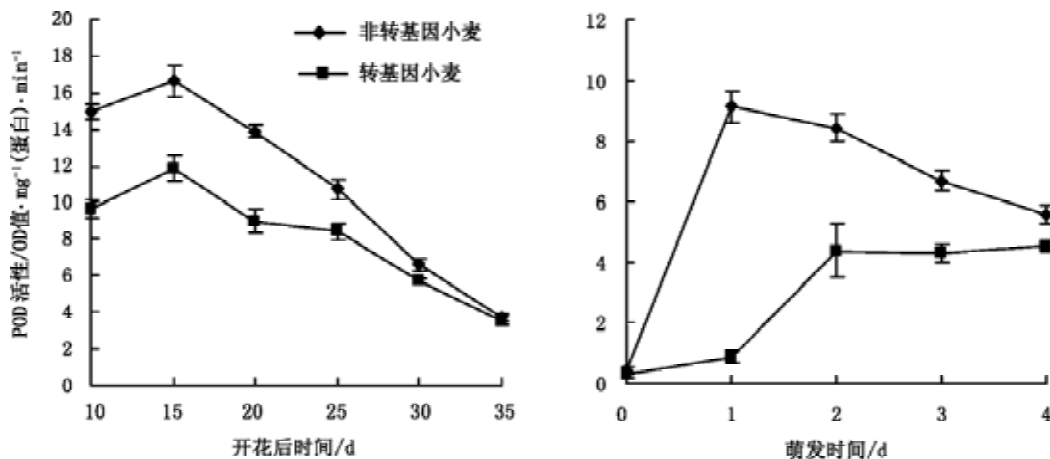


图 1 小麦籽粒灌浆期和种子萌发中 POD 活性的变化

Fig.1 Changes in POD activity of wheat seeds during filling and germination

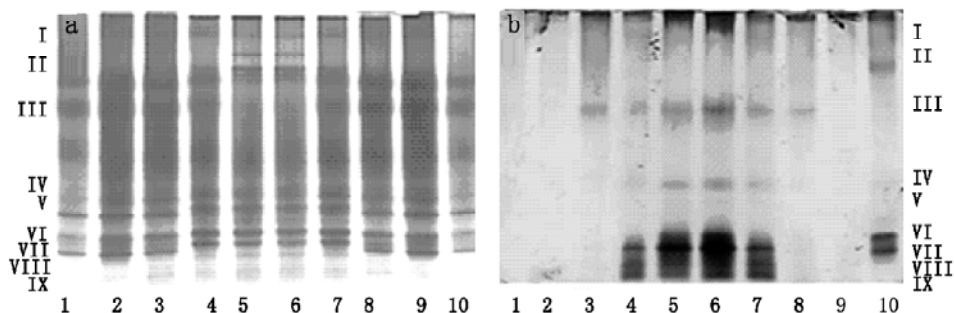


图 2 小麦籽粒成熟过程中 POD 同工酶电泳图谱

Fig.2 Electrophoregram of POD isoenzyme in wheat seeds during maturation

a: 考马斯亮蓝染色; b: POD 活性染色。1~5 分别为转基因小麦种子萌发 1、0 d 以及花后 35、25、15 d 籽粒的 POD; 6~10 分别为非转基因小麦花后 15、25、35 d 籽粒以及种子萌发 0、1 d 的 POD。罗马数字表示同工酶条带,下同同此。

(2)在籽粒成熟过程中, POD 同工酶活性逐渐减小, 非转基因小麦籽粒的POD活性高于转基因小麦, 籽粒成熟后 POD 同工酶带消失。图2的左右两图对比可知, 转基因和非转基因小麦的酶蛋白含量基本一致, 而酶活性却差异较大, 表明转基因和非转基因小麦籽粒酶活性的差异不是由酶蛋白含量的差异引起的, 而与酶的激活与抑制有关。

(3)在种子萌发过程中, 种子中出现10种POD同工酶(图3)。转基因小麦种子在萌发2 d后出现, 而非转基因小麦在萌发1 d时即出现, 转基因种子POD活性低于非转基因种子。同工酶III、V、VIII仅在非转基因小麦中出现, 而其酶蛋白在转基因和非转基因小麦中均有(图3), 表明在转基因小麦中, 这三种同工酶受到了抑制。

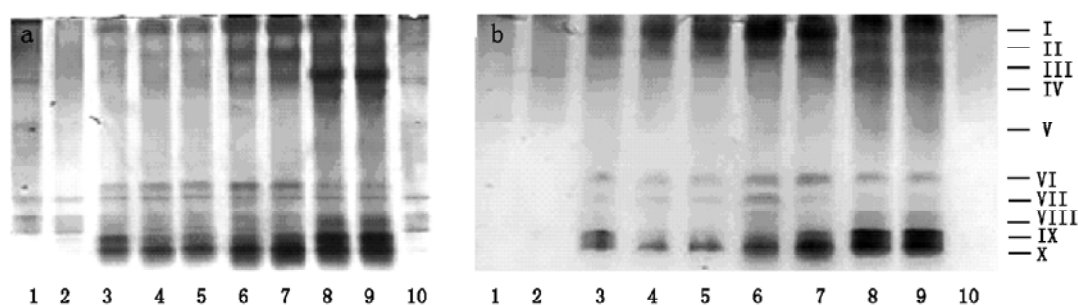


图3 小麦种子萌发过程中POD同工酶电泳图谱

Fig.3 Electrophoregram of POD isoenzyme in wheat seeds during germination

a: 考马斯亮蓝染色; b: POD活性染色。1~5分别为转基因小麦种子萌发0、1、2、3、4 d的POD; 6~10分别为非转基因小麦种子萌发0、1、2、3、4 d的POD。

2 转反义*Trx s*基因小麦籽粒灌浆和种子萌发期间过氧化氢酶活性的变化

图4~6显示: (1)在小麦籽粒成熟过程中, 籽粒CAT的活性逐渐降低; 在小麦种子萌发过程中, CAT的活性逐渐增高, 在萌发2 d后, 酶活性增加的幅度较大。无论在籽粒成熟过程, 还是在种子萌发过程中, 转基因小麦CAT的活性始终低于非转基因小麦。在萌发3~4 d CAT活性差异达到显著水平; 在籽粒成熟期间, 花后15 d时差异显著, 其它时间差

异不显著(图4)。CAT是最早发现的与种子活力有关的氧化酶类之一, 其活性可间接反映种子活力的大小(陈刚等2002), 因此反义*Trx s*导入引起的CAT活性降低是转基因小麦种子萌发缓慢的一个原因。CAT还参与活性氧代谢过程, 可以使 H_2O_2 生成水和氧分子(Van Breusegen等2001), 因此CAT活性降低可能是转基因小麦籽粒成熟期提前的一個原因。

(2)随着小麦种子的萌发, CAT的活性逐渐增加, 主要出现2条同工酶带, 非转基因小麦种子CAT

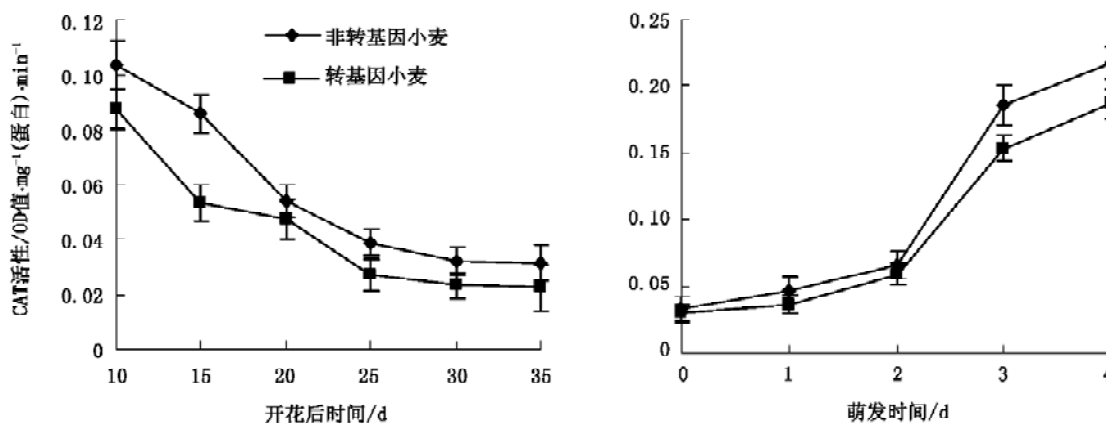


图4 小麦籽粒灌浆期和种子萌发中CAT活性的变化

Fig.4 Changes in CAT activity in wheat seeds during filling and germination

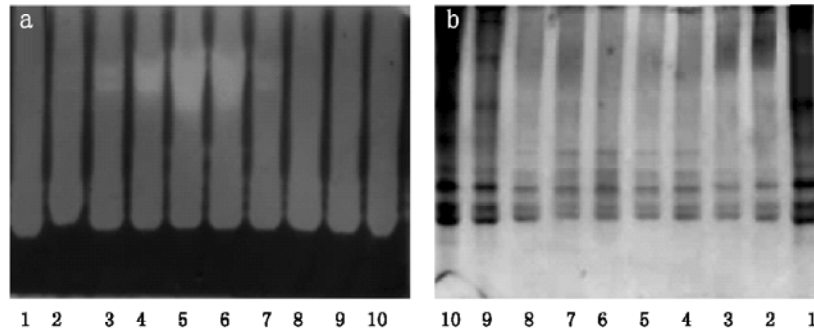


图5 小麦种子萌发过程中CAT同工酶电泳图谱

Fig.5 Electrophoregram of CAT isoenzyme of wheat seeds during germination

a: CAT 活性染色; b: 考马斯亮蓝染色。1~5 分别为非转基因小麦种子萌发 0、1、2、3、4 d 的 CAT; 6~10 分别为转基因小麦种子萌发 4、3、2、1、0 d 的 CAT。

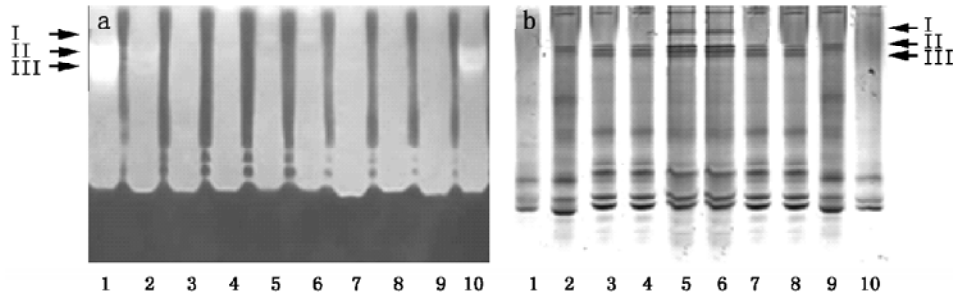


图6 小麦籽粒成熟过程中CAT同工酶电泳图谱

Fig.6 Electrophoregram of CAT isoenzyme of wheat seeds during maturation

a: CAT 活性染色; b: 考马斯亮蓝染色。1~5 分别为非转基因小麦种子萌发 4、0 d 以及花后 35、25、15 d 籽粒的 CAT; 6~10 分别为转基因小麦花后 15、25、35 d 籽粒以及种子萌发 0、4 d 的 CAT。

的活性高于转基因小麦(图 5-a)。从图 5-b 中可以看出,随着小麦种子的萌发,非转基因和转基因小麦种子 CAT 同工酶蛋白量均在逐渐减小。由此可知,种子萌发过程中 CAT 的活性的增加是由于 CAT 自身被激活引起的,而与其酶蛋白含量无关。非转基因小麦种子中 CAT 受激活的程度大于转基因小麦(图 5)。

(3)在籽粒成熟过程中 CAT 活性逐渐降低;花后 15 d 的籽粒中存在 3 种同工酶,到 25 d 以后则只有 2 种同工酶,这 2 种同工酶与小麦种子萌发过程中出现的同工酶相同。在成熟的籽粒中,非转基因小麦籽粒 CAT 活性高于转基因小麦。从图 6-b 中可以看出,在小麦花后 15~25 d 期间, CAT 同工酶蛋白量有较大的变化,其中有一个同工酶带消失,其它的酶蛋白含量在逐渐减少。花后 25 d 以后,酶蛋白含量没有明显的变化(图 6)。

参考文献

- 陈刚, 王广志, 刘秀丽, 招启柏, 宋平, 王忠(2002). 不同处理对烟草种子萌发及过氧化氢酶活性的影响. 烟草科技, 2: 11~15
- 陈毓莹(2002). 生物化学实验方法与技术. 北京: 科学出版社, 239~241
- 杜兰芳, 沈宗根, 王立新, 赵志英, 何天华(2007). CdCl₂ 对豌豆种子萌发和幼苗生长的影响. 西北植物学报, 27 (7): 1411~1416
- 郭红祥, 尹钧(2007). 转反义 *TRX s* 基因对小麦萌发过程中储藏蛋白降解的影响. 作物学报, 33 (6): 885~890
- 郭红祥, 尹钧, 任江萍, 王振云(2007). 转反义 *trxs* 基因对小麦种子萌发过程中淀粉水解酶的影响. 植物生理学通讯, 43 (2): 273~276
- 林植芳, 李双顺, 张东林, 刘淑娴, 李月标, 林桂珠, 陈绵达(1998). 采后荔枝果实中氧化和过氧化作用的变化. 植物学报, 30 (4): 382~387
- 吴彩娥, 寇晓虹, 王文生(2002). 果实成熟衰老与保护酶系统的关系. 中国果菜, 6: 23~24

- 周苏玫, 尹钧, 任江萍, 李永春, 李磊, 张冉(2006a). 转反义 *Trxs* 基因小麦 00TY5 后代株系的抗穗发芽特性研究. 麦类作物学报, 26 (3): 46~50
- 周苏玫, 尹钧, 任江萍, 张冉(2006b). 转反义 *Trx s* 基因小麦株系 00T89 分子鉴定及抗穗发芽特性研究. 生物工程学报, 22 (3): 438~444
- Aebi H (1984). Catalase *in vitro*. Methods Enzymol, 105: 121~126
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 72: 248~254
- Guo HX, Yin J, Ren JP, Wang ZY, Chen HL (2007). Changes in proteins within germinating seeds of transgenic wheat with an antisense construct directed against the thioredoxin. J Plant Physiol and Mol Bio, 33 (1): 18~24
- Rao MV, Paliyath G, Ormrod DP (1996). Ultraviolet-B- and ozone-induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*. Plant Physiol, 110: 125~136