

转 *TrxS* 基因啤酒大麦种子中硫氧还蛋白 h 与淀粉酶活性变化

尹钧* 卫丽 姜玉梅 孔维威 任江萍 李磊

河南农业大学, 国家小麦工程技术研究中心, 郑州 450002

摘要 导入 *TrxS* 基因后, 转基因大麦籽粒的硫氧还蛋白 h 活性明显提高; 淀粉酶活性也明显提高, 其中 α -淀粉酶活性在开花后 30 d 提高了 3 倍以上, 随着籽粒的发育, 转基因对 α -淀粉酶活性影响作用减少, 对 β -淀粉酶活性的影响有同样的趋势; 转基因大麦种子发芽势明显提高。说明 *TrxS* 基因有望改善啤酒大麦的制麦特性和品质特性。

关键词 转基因大麦; 硫氧还蛋白 h; 淀粉酶活性

Changes in Thioredoxin h and Amylase Activities in Malting Barley (*Hordeum vulgare* L.) Seeds with Transforming *TrxS* Gene

YIN Jun*, WEI Li, JIANG Yu-Mei, KONG Wei-Wei, REN Jiang-Ping, LI Lei

National Engineering Research Center for Wheat, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

Abstract The results indicated that the induction of *TrxS* gene into the malting barley (*Hordeum vulgare* L.) plants increased the activity of amylase and thioredoxin h (Trxh) content in transgenic barley seeds, suggesting over-expression of the *TrxS* gene in the transgenic barley. The activity of α -amylase was trip lication more than that of control after anthesis for 30 d and its effect became weaker with seed development. There was the same trend for β -amylase. The germination energy of transgenic barley seeds was obviously increased. These results suggested that transgene could improve the quality of malting barley.

Key words transgenic barley (*Hordeum vulgare* L.); thioredoxin h; amylase activity

影响我国啤酒大麦生产发展的主要因素之一是国内啤酒大麦品质较差(张五九 2002), 因此, 改善啤酒大麦的品质性状显得很迫切。而基因工程技术可能是解决此问题的有效途径。

硫氧还蛋白(thioredoxin, Trx)是一类广泛存在于生物体内的多功能活性蛋白, 分子量约为 12 kDa, 含有一个氧化还原活性的二硫键, 可通过还原靶蛋白中的二硫键参与细胞包括酶活性的调节(Holmgren 1989; Arnér 和 Holmgren 2000)、转录因子的调控(Schenk 等 1994; Hirota 等 1999; Chae 等 1994)等在内的一系列生化反应。据报道, Trx 也能还原种子中一些蛋白质分子的二硫键, 如小麦 α -淀粉酶抑制蛋白, 大麦 α -淀粉酶抑制蛋白等, 从而削弱这些抑制蛋白对淀粉酶的抑制作用, 进而提高淀粉酶的活性(Chae 等 1994; 魏凌基等 2004)。而大麦的主要品质指标如糖化力、浸出率和库而巴哈值等均与淀粉酶的活性有关, 如果能提高种子的淀粉酶活性, 则种子的发芽势将会提高, 种子的碳、氮代谢增强, 从而改善大

麦的品质。

为此, 我们用基因枪转化方法将蓝色黑鸭草(*Phalaris coerulea* L.)中的硫氧还蛋白 S 基因(*TrxS*, 与硫氧还蛋白 h 基因有 94% 的同源性, 蛋白质表达产物与之有相同的生物活性)(Li 等 1995)导入啤酒大麦, 获得了可稳定遗传并能正常表达的转基因大麦(任江萍等 2004; Wei 等 2005)。

材料与方法

以转 *TrxS* 基因大麦(*Hordeum vulgare* L.) 和未转化的大麦品种‘晋引 6 号’(对照)为材料, 于 2003~2005 年播种于河南农业大学试验农场。

参照 Cho 等(1999)的方法制备 Trxh。将转基因大麦籽粒的胚除去, 研磨粉碎后取 0.5 g 加入 2.5 mL 提取液(50 mmol·L⁻¹ Tris-HCl 缓冲液, pH 8.0,

收稿 2005-07-11 修定 2005-11-21

资助 国家自然科学基金(30370877)和国家转基因植物研究与产业化专项(JY03-B-19)。

* E-mail: xmzxyj@126.com, Tel: 0371-63558203

1 mmol·L⁻¹ EDTA, 0.5 mmol·L⁻¹ PMSF)振荡浸提2 h, 于4℃下以25 000×g离心20 min, 取上清液。重复提取1次, 合并上清液, 用HCl调到中性, 加入(NH₄)₂SO₄盐析, 离心去除30%~90%相对饱和度时析出蛋白质后, 取上清液。上清液经蔗糖溶液透析除盐后, 透析袋埋在干燥的交联葡聚糖凝胶G-50 (Sephadex G-50)中吸水浓缩(4℃下), 定期更换Sephadex G-50。浓缩后的提取液于65℃水浴中处理15 min, 于4℃下以25 000×g离心, 收集上清液作为Trxh样品, 于-20℃下保存。在反应缓冲液(100 mmol·L⁻¹ Tris-HCl缓冲液, pH 7.0, 含2 mmol·L⁻¹ EDTA)中依次加入20~40 μL样品、牛胰岛素(终浓度为0.13 mmol·L⁻¹)、DTT(终浓度为0.33 mmol·L⁻¹)后混匀, 于25℃下反应10 min, 用UV-2000紫外分光光度计测定650 nm吸光值(OD₆₅₀), 每5 min记录1次, 在相同时间内OD值的高低代表Trxh的活性大小。

淀粉酶活性的测定是开花后30 d取未成熟的大麦籽粒, 每5 d 1次, 共5次, 以浸种1 d未发芽的籽粒和发芽3 d的籽粒为材料(包括转基因种子和非转基因种子)。取0.5 g不同处理的种子置于研钵中, 加少量蒸馏水和石英砂, 研磨成匀浆后加蒸馏水5 mL·g⁻¹, 继续研磨5 min, 常温下静置60 min后, 于4℃下以15 000×g离心10 min, 取上清液作为总淀粉酶提取物。用DNS (3,5-二硝基水杨酸)法测定α-淀粉酶活性(Cui等2002), 取20 μL总淀粉酶提取物于70℃中加热15 min后与80 μL 1%的淀粉溶液混合, 于37℃下反应5 min后迅速加入DNS溶液, 置于沸水浴中5 min显色, 再以水稀释至10 mL, 用UV-2000紫外分光光度计在波长520 nm处比色, 求出还原糖含量, 并计算出α-淀粉酶活性。活性单位(mg·g⁻¹·min⁻¹)按1 g植物材料于1 min内水解淀粉产生的麦芽糖量(mg)计算。另取20 μL总淀粉酶提取物加入2 μL 0.5 mol·L⁻¹的EDTA溶液混匀使α-淀粉酶失活(Tuomas和Christiane 1989), 其它步骤同α-淀粉酶活性的测定, 求出β-淀粉酶活性。以不加酶提取物的反应为对照。

测定发芽势时, 先将种子进行表面消毒, 用70%的酒精浸泡1 min后以无菌水冲洗3次, 再

用0.1%的HgCl₂浸泡5 min, 以无菌水冲洗3次。经表面消毒和浸种处理后的种子置于24℃培养箱中发芽, 连续3 d的观察记录发芽情况。

实验结果

1 转基因大麦种子中Trxh活性变化

测定结果表明(图1), 虽然转基因与未转基因种子都表现Trxh活性, 但Trxh催化活性出现的时间和强度上明显不同。转基因种子在10 min后表现出活性, 未转基因的则在25 min以后才出现; 转基因种子Trxh的活性明显高于未转基因种子的活性。说明由于TrxS基因编码蛋白具有Trxh活性, TrxS基因的导入与表达可显著增强Trxh的活性。

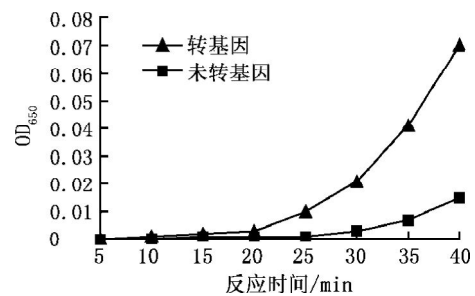


图1 转基因与未转基因大麦种子中Trxh活性比较
Fig. 1 Comparison on Trxh activities in transgenic and non-transgenic barley seeds

2 转基因大麦籽粒中淀粉酶活性变化

表1表明, 在开花后30 d到种子成熟过程中, α-淀粉酶活性的变化为先升后降, 开花后40 d时α-淀粉酶活性达到最高; 而β-淀粉酶活性的变化趋势是随着种子成熟的进程不断提高, 成熟期达到最高。转基因与未转基因大麦种子中淀粉酶活性变化趋势完全一致。各个时期转基因大麦种子淀粉酶活性明显地高于未转基因的, 表明转TrxS基因对提高α-淀粉酶和β-淀粉酶活性都有明显的促进作用。由表2还可以看出, 种子完全成熟后转TrxS基因的淀粉酶活性仍有提高, 在未发芽种子中α-淀粉酶活性提高12.5%, β-淀粉酶活性提高9.4%; 发芽3 d的种子中α-淀粉酶活性提高11.6%, β-淀粉酶活性提高13.7%。这对提高种子发芽势和改善麦芽品质特性是有利的。

表1 转基因与未转基因的大麦开花后种子中淀粉酶活性变化的比较

Table 1 Comparison on changes in transgenic and non-transgenic barley seeds after anthesis

开花后 时间/d	α -淀粉酶活性 / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW) $\cdot\text{min}^{-1}$			β -淀粉酶活性 / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW) $\cdot\text{min}^{-1}$		
	未转基因大麦	转基因大麦	活性增加/%	未转基因大麦	转基因大麦	活性增加/%
30	3.8	15.4	305.3	2.1	3.7	76.2
35	15.1	53.5	254.3	3.2	4.3	34.4
40	42.4	63.0	32.7	4.0	5.2	30.0
45	11.0	12.6	14.5	4.8	6.3	31.2
50	5.4	6.2	14.8	11.6	17.0	46.6

表2 转基因与未转基因大麦成熟种子中淀粉酶活性比较

Table 2 Comparison on amylase activities of transgenic and non-transgenic seeds in ripening barley

种子类别	α -淀粉酶活性 / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW) $\cdot\text{min}^{-1}$			β -淀粉酶活性 / $\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ (FW) $\cdot\text{min}^{-1}$		
	未转基因大麦	转基因大麦	活性增加/%	未转基因大麦	转基因大麦	活性增加/%
成熟种子	4.8	5.4	12.5	32.0	35.0	9.4
发芽种子	11.2	12.5	11.6	78.7	89.5	13.7

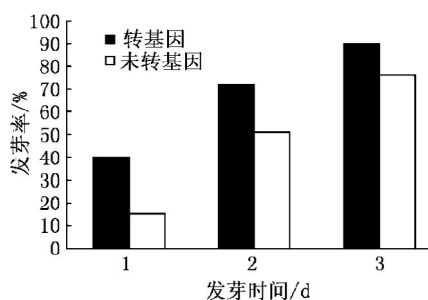


图2 转基因与未转基因大麦种子的发芽率比较
Fig.2 Comparison on seed germination rate of transgenic and non-transgenic barley

3 转基因大麦种子的发芽率变化

由图2可以看出,转基因大麦籽粒在发芽的第1、2、3天中发芽率分别为40%、72%、90%,分别为未转基因大麦籽粒的267%、141%和119%。表明转*TrxS*基因种子的发芽启动快、发芽率高。

讨 论

本文中所用的*TrxS*基因与*Trxh*基因同属*Trx*家族,与小麦的*Trxh*基因有94%的同源性,其表达产物也有*Trxh*的生物活性(Li等1995)。因

此,*TrxS*基因的导入将会产生*Trxh*基因的过表达效应,从而导致转基因大麦籽粒的*Trxh*活性提高。我们所用的转*TrxS*基因大麦籽粒的*Trxh*活性明显提高,这与Cho等(1999)将小麦*Trxh*基因导入大麦后产生*Trxh*基因过表达的结果相似。

无论成熟种子或未成熟种子,*TrxS*基因都能提高大麦籽粒淀粉酶活性(包括 α -淀粉酶和 β -淀粉酶活性)。这与Wong等(2002)的*Trxh*活性上升的大麦种子中 α -淀粉酶活性提高的结果似乎是一致的。成熟的大麦籽粒中 β -淀粉酶活性高于 α -淀粉酶活性,这又与徐绍英和徐新宇(1999)认为 β -淀粉酶是大麦中最为丰富的淀粉水解酶的看法一致。

还有,本文中转基因大麦种子的发芽率比未转基因的高,这既是基因导入效应的一个印证,也说明采用转*TrxS*基因技术可能有助于改善啤酒大麦的制麦特性。另外,根据林亚康和俞志隆(1990)的大麦籽粒中碳氮代谢直接影响大麦品质特性,以及糖化力高低主要取决于 β -淀粉酶的活性的结果,可以认为采用转基因技术获得转基因大麦新品系改善啤酒大麦品质是有可能的。

参考文献

- 林亚康, 俞志隆(1990). 大麦成熟籽粒中 β -淀粉酶水平与麦芽糖化力的相关分析. 遗传, 12 (4): 12~14
- 任江萍, 刘雷, 尹钧, 王新国, 李磊(2004). 大麦转化体系的改进及 *Trx-S* 基因的转化. 西北植物学报, 24 (9): 1662~1668
- 魏凌基, 阎洁, 李英枫(2004). 大麦胚乳细胞增殖动态及其与粒重的关系. 植物生理学通讯, 40 (3): 300~302
- 徐绍英, 徐新宇(1999). 啤酒大麦糖化力及有关酿造品质性状的胚和胚乳遗传效应分析. 作物学报, 25 (1): 25~31
- 张五九(2002). 国产啤酒大麦存在的问题. 中国啤酒上行网, 2 (5): 11~15
- Arnér ESJ, Holmgren A (2000). Physiological functions of thioredoxin and thioredoxin reductase. Eur J Biol Chem, 267: 6102~6109
- Chae HZ, Robison K, Poole LB, Church G, Storz G, Rhee SG (1994). Cloning and sequencing of a thiol-specific antioxidant from mammalian brain: alkyl hydroperoxide reductase and thiol-specific antioxidant define a large family of antioxidant enzymes. Proc Natl Acad Sci USA, 91: 7017~7021
- Cho MJ, Wong JH, Marx C, Jiang W, Lemaux PG, Buchanan BB (1999). Overexpression of thioredoxin h leads to enhanced activity of starch debranching enzyme (pullulanase) in barley grain. Proc Natl Acad Sci USA, 96: 14641~14646
- Cui H, Peng B, Xing Z, Xu G, Yu B, Zhang Q (2002). Molecular dissection of seedling-vigor and associated physiological traits in rice. Theore Appl Genet, 105: 745~753
- Hirota K, Murata M, Sachi Y, Nakamura H, Takeuchi J, Mori K, Yodoi J (1999). Distinct roles of thioredoxin in the cytoplasm and in the nucleus—a two-step mechanism of redox regulation of transcription factor NF- κ B. Biol Chem, 274: 27891~27897
- Holmgren A (1989). Thioredoxin and glutaredoxin systems. Biol Chem, 264: 13963~13966
- Li XM, Nield J, Hayman D, Langridge P (1995). Thioredoxin activity in the C terminus of Phalaris S protein. Plant J, 8 (1): 133~138
- Schenk H, Klein M, Erdbrugger W, Droge W, Schulze-Osthoff K (1994). Distinct effects of thioredoxin and antioxidants on the activation of transcription factors NF- κ B and AP-1. Proc Natl Acad Sci USA, 91: 1672~1676
- Tuomas S, Christiane L (1989). Release and activity of bound β amylase in germinating barley grain. Plant Physiol, 89: 244~249
- Wei L, Yin J, Kong W, Ren J, Li L, Liu L (2005). Transformation of *TrxS* gene into barley by particle bombardment. Agr Sci China, 4 (8): 574~578
- Wong JH, Kim YB, Ren PH, Cai N, Cho MJ, Hedden P, Lemaux PG, Buchanan BB (2002). Transgenic barley grain overexpressing thioredoxin shows evidence that the starchy endosperm communicates with the embryo and the aleuron. Proc Natl Acad Sci USA, 99 (25): 16325~16330