

## 测定 $\alpha$ -淀粉酶活性的凝胶扩散法和组织印渍法

欧阳西荣\*

湖南农业大学农学院, 长沙 410128

## Gel Diffusion and Tissue Printing Methods for Determining $\alpha$ -Amylase Activity

OUYANG Xi-Rong\*

College of Agronomy, Hunan Agricultural University, Changsha 410128

**提要** 建立了改良凝胶扩散法和组织印渍法检测 $\alpha$ -淀粉酶活性的方法。此法的实验条件容易控制, 重复性好。组织印渍法在玉米种子吸水约5 h后即可检测到 $\alpha$ -淀粉酶活性。

**关键词**  $\alpha$ -淀粉酶; 种子发芽; 凝胶扩散法; 组织印渍法

$\alpha$ -淀粉酶 (EC 2.1.1.1) 的测定方法有多种, 一般是在提取酶液后, 将酶提取液加入到一定浓度的可溶性淀粉溶液中, 反应一段时间后, 测定所释放的还原糖如麦芽糖含量等, 以此确定其 $\alpha$ -淀粉酶的活性<sup>[1,2]</sup>; 或测定水解其他底物的能力等<sup>[3]</sup>。Masojć和Larsson-Raźnikiewicz<sup>[4]</sup>报道的测定 $\alpha$ -淀粉酶活性的凝胶扩散法是在直径约为10 cm的培养皿中进行的, 他们所采用的凝胶厚薄、染色、淋洗等操作均不易掌握。培养皿越大, 厚薄均匀度越难控制, 而且每个培养皿测定的样品数量极为有限, 不能同时加入系列标准对照, 培养皿之间也可能会出现较大差异, 因此难以用于大批样品的分析和不同时间测定结果之间的相互比较。Skadsen<sup>[5]</sup>报道的凝胶电泳测定 $\alpha$ -淀粉酶活性需要电泳槽设备, 要控制电泳电压和电流, 染色脱色方法也较为复杂。我们综合了凝胶扩散法和电泳法的优点, 按凝胶电泳的方法制作凝胶, 以置于优质平板玻璃上的透明胶片作凝胶载体, 并用玻璃框架将凝胶厚度精确控制在0.5 mm, 以避免用培养皿制作凝胶时难以均匀控制厚度。另外, 将凝胶板面积增加到300 cm<sup>2</sup>以上, 测定的样品数大大增加。因而用扩散法测定样品时, 每块凝胶板上都可以加入 $\alpha$ -淀粉酶系列标准液, 再根据标准曲线计算出样品 $\alpha$ -淀粉酶活性。这样, 不同样品或不同时间测定的结果之间即可进行比较。另外, 此法还可将凝胶与透明胶片一起进行染色和淋洗, 操作方便, 便于观察结果和直接精确测量染色面积。本文介绍的检测酶活性的改良凝胶扩散法和组织印渍法, 用于测定玉米种子 $\alpha$ -

淀粉酶活性的效果较好, 方法简便易行, 重复性好, 可用于大批量样品的分析。

### 材料与方 法

#### 1 试剂

$\alpha$ -淀粉酶提取缓冲液 20 mmol·L<sup>-1</sup>醋酸钠(2.7216 g·L<sup>-1</sup>)、1 mmol·L<sup>-1</sup>氯化钙(0.11099 g·L<sup>-1</sup>), pH 5.5。5% (V/V)碘-碘化钾溶液 1.95 g KI+0.65 g I<sub>2</sub>溶解在100 mL蒸馏水中。 $\alpha$ -淀粉酶标准液: 40 mg·mL<sup>-1</sup>  $\alpha$ -淀粉酶(Sigma, ca 40 mg·mL<sup>-1</sup>猪胰腺 $\alpha$ -淀粉酶)母液逐级稀释为10、2.5、0.625、0.15625、0.03906和0.009765 mg·mL<sup>-1</sup>系列标准液。20%冰乙酸、琼脂糖、Lintner's淀粉均为Sigma产品。

#### 2 凝胶板的制作

取一块125 mm×260 mm干净的优质玻璃板, 上面放1片与玻璃长宽相同的透明胶片(GelBond PAG film, Pharmacia Biotech)。该胶片一面亲水一面疏水, 将疏水一面紧贴玻璃, 防止气泡产生, 胶片上面长边的两侧各放置1条宽5 mm、厚0.5 mm的塑料条, 宽边不放塑料条, 再在上面盖一块同样大小的玻璃, 两块玻璃两侧用夹子固定, 放入温箱中预热至50~60℃。取一个三角烧瓶, 加入30 mL  $\alpha$ -淀粉酶提取缓冲液, 再加入0.36 g琼脂糖和0.30 g Lintner's淀粉(作为反应底物), 在微波炉中加热, 每隔约5 s摇

收稿 2003-01-10 修定 2003-08-25

\* E-mail:oyxrong@hunau.net, Tel:0731-4618154

动1次,煮沸直至透明后,冷却至70℃左右。将预热的玻璃胶片框架斜放在桌面上成30°左右(不可太斜以防凝胶漏出),用预热(50~60℃)的移液管吸取凝胶液,从玻璃架较高一端的空隙中匀速注入到玻璃框架中间的胶片上面,让其流动遍及整个胶片表面,不能有气泡产生。凝胶温度要适宜(60~70℃),温度过高或过低时,凝胶容易漏出或难以流动遍及整个胶片。注入凝胶直到流遍胶片时即停,用量约为25 mL。由于胶片和玻璃对凝胶有吸附作用,可保证凝胶不漏出。冷却后即形成附着在胶片上厚度为0.5 mm均匀的凝胶片。贮存在4℃低温箱中备用,贮存时间不宜超过7 d。

### 3 种子处理与发芽

玉米(*Zea mays*)种子以1% Chloor-AL (Bleek)溶液消毒5 min,再以蒸馏水冲洗约30 s,洗去消毒液。将种子置于带盖的塑料盘(15 cm × 25 cm)中的湿润滤纸之间,加20 mL蒸馏水,分别置于温度为25℃和10℃的恒温培养箱中发芽。发芽过程中滤纸保持湿润。在预定的发芽时间取样测定 $\alpha$ -淀粉酶活性。组织印渍法所用种子按预定发芽时间先后在不同时间开始发芽。

### 4 $\alpha$ -淀粉酶量和活性的测定

**4.1 组织印渍法** 取各处理不同发芽时间的种子,用锋利刀片将种子分别以纵向(沿胚芽中部纵向切开)和横向(沿胚芽中部)切成两半。取出预先制作冷藏的凝胶板,揭开上面一块玻璃。每个处理各取5个半粒种子置于凝胶片上,种子切面朝下紧贴在凝胶片上。在25℃黑暗条件下培养2 h。从凝胶片上取出种子,将凝胶片(连同下

层玻璃)浸入碘-碘化钾溶液中染色5 min,加相当于染色液体积7%的冰乙酸进行酸化,终止反应,在蒸馏水下淋洗约3 min,洗净染色液。然后测量不染色区域的面积或用数码相机摄影。

**4.2 凝胶扩散法** 取10粒发芽时间不同的种子(除去幼根和胚芽鞘),置于预先冷却的石英研钵中,加液态氮用研槌精细研磨,研成细粉,随即放入4℃低温箱中保存。用移液管取200 mL  $\alpha$ -淀粉酶提取缓冲液加入到一离心管中,加入样品100 mg。重复3次。在4℃恒温室内摇动培养1.5 h后,以10 000 × *g*离心10 min,取上清液测定 $\alpha$ -淀粉酶活性。取出预制冷藏的凝胶板,揭开上面一块玻璃,用塑料打孔器在凝胶板上每隔20 mm打一个直径2 mm的孔,用微量移液管向每孔注入 $\alpha$ -淀粉酶提取液2 mL。同时,在每块凝胶板孔中加入 $\alpha$ -淀粉酶系列标准液。重复2次。以制作标准曲线。将凝胶板置于保湿容器中,再在10℃恒温培养箱中反应24 h后,将凝胶板用上述方法进行染色和淋洗。由于加入 $\alpha$ -淀粉酶的孔周围的淀粉被 $\alpha$ -淀粉酶分解,因而在染色后凝胶片上出现一个未能染色的圆,未与 $\alpha$ -淀粉酶反应的部分染成红色。在本方法设定的条件下,无色圆的直径与 $\alpha$ -淀粉酶含量或活性呈直线相关。用直径测量仪测量该圆的直径,根据标准曲线计算出样品 $\alpha$ -淀粉酶的含量或活性。

## 结果与讨论

### 1 组织印渍法

图1显示种子开始吸水后约5 h即可检测到 $\alpha$ -淀粉酶活性。种子发芽期间的前3 d,  $\alpha$ -淀粉酶活

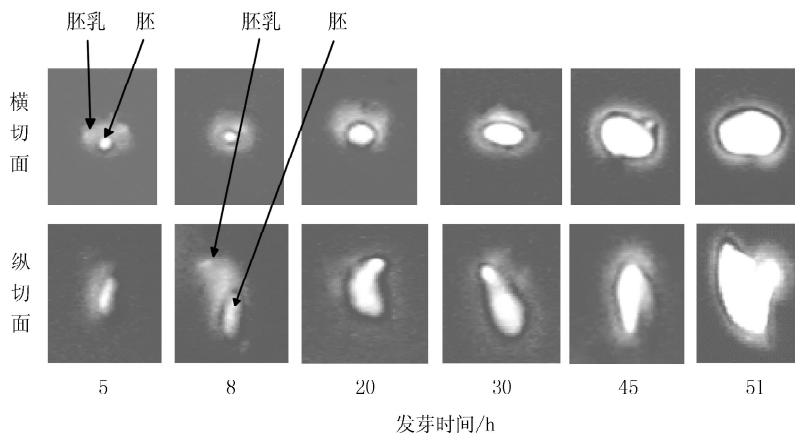


图1 组织印渍法测定玉米种子 $\alpha$ -淀粉酶的活性

性持续增加。酶活性开始于胚部, 然后向周围组织扩散, 发芽3 d时遍及整粒种子。

## 2 凝胶扩散法

从图2可见, 凝胶板加入酶经保温后, 凝胶板染色的程度反映出不同处理 $\alpha$ -淀粉酶活性的明显差异。25℃下发芽的 $\alpha$ -淀粉酶活性显著高于10℃发芽的(图3)。

我们还用此法测定不同活力玉米种子的 $\alpha$ -淀粉酶活性。25℃下发芽时, 不同活力种子的 $\alpha$ -淀粉酶活性差异很小; 而在10℃下发芽时, 高活力与低活力种子的 $\alpha$ -淀粉酶活性差异极显著(资料略)。这可能是不同活力种子抗低温的能力差异所致。

一般来说,  $\alpha$ -淀粉酶活性开始于种子发芽的

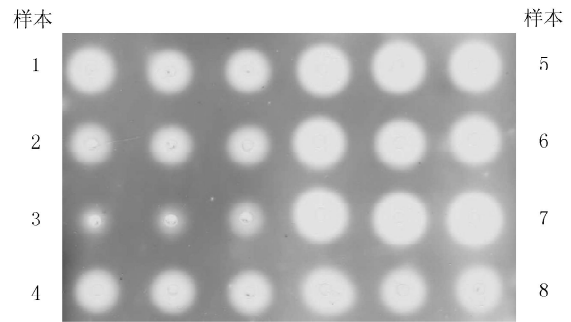


图2 凝胶扩散法测定玉米种子 $\alpha$ -淀粉酶活性

第2~3天<sup>[6~8]</sup>。因此人们常从第2天开始测定 $\alpha$ -淀粉酶活性<sup>[9]</sup>。组织印渍法的结果表明, 在种子开始吸水不久(5 h)即可检测到 $\alpha$ -淀粉酶活性,

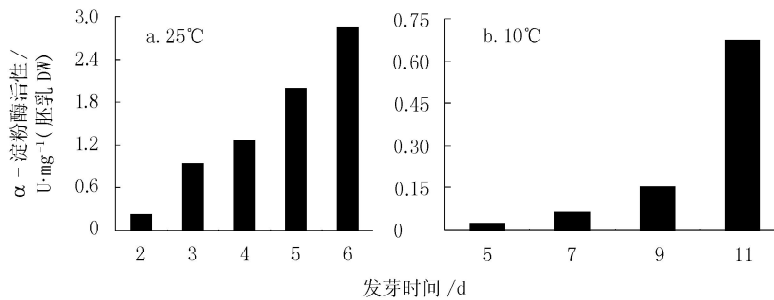


图3 凝胶扩散法测定玉米种子在不同温度下发芽的 $\alpha$ -淀粉酶活性

这比以往报道中的 $\alpha$ -淀粉酶活性开始出现的时间提早了2~3 d。由于组织印渍法不需要经过酶的提取等操作, 所以种子发芽过程中即使 $\alpha$ -淀粉酶很少也可检测出来。这与其它生化方法需要在 $\alpha$ -淀粉酶活性达到一个较高值以后才能检测到的结果不同。我们用凝胶扩散法也没有检测到发芽第1天玉米种子中的 $\alpha$ -淀粉酶活性, 第2天检测到的 $\alpha$ -淀粉酶活性也很低。据此我们认为, 组织印渍法可用于 $\alpha$ -淀粉酶开始合成阶段的活性测定, 也可用于 $\alpha$ -淀粉酶合成部位的定位检测。

## 参考文献

- Loreti E, Guglielminetti L, Yamaguchi J et al. Effect of anoxia on gibberellic acid-induced protease and  $\beta$ -amylase processing in barley seeds. *J Plant Physiol*, 1998, 52:44~505
- Warner DA, Grove MJ, Lnutson CA. Isolation and characterization of  $\alpha$ -amylases from endosperm of germinating maize. *Cereal Chem*, 1991, 68(4):383~390
- Lynnette MAD, Alexander RK, Dick V et al. Galactomannan, soluble sugar and starch mobilization following germination of *Trigonella foenum-graecum* seeds. *Plant Physiol Biochem*, 1999, 37(1): 41~50
- Masojć P, Larsson-Raźnikiewicz M. Genetic variation of  $\alpha$ -amylase levels among rye (*Secale cereale* L.) kernels, tested by gel diffusion technique. *Swedis J Agr Res*, 1991, 21:141~145
- Skadsen RW. Aleurone from a barley with low  $\alpha$ -amylase activity become highly responsive to gibberellin when detached from the starchy endosperm. *Plant Physiol*, 1993, 102:195~203
- Dure LS. Site of origin and extent of activity of amylases in maize germination. *Plant Physiol*, 1960, 35:925~934
- Sanwo M, DeMason DA. Characteristics of  $\alpha$ -amylase during germination of two high-sugar sweet corn cultivars of *Zea mays* L. *Plant Physiol*, 1992, 99:1184~1192
- Goldstein LD, Jennings PH. The occurrence and development of amylase enzymes in incubated, de-embryonated maize kernels. *Plant Physiol*, 1975, 55:893~898
- Chao SE, Scandalios JG. Developmentally dependent expression of tissue specific amylases in maize. *Mol Gen Genet*, 1972, 115:1~9