

林生山黧豆幼苗 2,4-二氨基丁酸的合成及其与胁迫条件的关系*

沈黎明 赵 革 吴显荣

(北京农业大学生物学院,北京 100094)

摘要 林生山黧豆幼苗用 ^3H -天门冬氨酸标记后,高丝氨酸在6 h内迅速增加。高丝氨酸合成速率降低后,2,4-二氨基丁酸的合成量上升,于18 h达到高峰。赖氨酸和苏氨酸与二氨基丁酸的合成表现有协同反馈机制。结果支持了天门冬半醛转氨生成二氨基丁酸的假说。盐胁迫、渗透胁迫和热激增加了二氨基丁酸的合成,可能是因为不同胁迫条件都造成了细胞脱水,从而促进了二氨基丁酸的合成。

关键词 林生山黧豆;2,4-二氨基丁酸;胁迫

Biosynthesis of 2,4-diaminobutyric acid and its relationship with stress in *Lathyrus sylvestris* L. seedlings Shen Li-Ming, Zhao Ge and Wu Xian-Rong (College of Biological Sciences, Beijing Agricultural University, Beijing 100094), *J. Plant Resour. & Environ.* 1996, 5(2): 15~18

Seedlings (3 wk old) of *Lathyrus sylvestris* L. were labelled with ^3H -aspartic acid for 3, 6, 9, 12, 15, 18, 21 and 24 h. Radio active free amino acids extracted with ethanol were separated by polyamide thin-layer two-dimensional chromatography and radio activities were measured by liquid scintillation. Results showed that synthesis of DABA (2,4-diaminobutyric acid) was the highest 18 h after labelling, following Hse peak value 6 h after labelling. Synthesis of Lys and Thr and that of DABA showed an inverse relationship, indicating a possible cooperative feedback mechanism. Results supported the hypothesis of biosynthesis of DABA by a transamino reaction from aspartic semialdehyde. Salt, osmotin and high temperature increased the biosynthesis of DABA. DABA probably played a role in overall protective responses of cells during dehydration caused by stress conditions.

Key words *Lathyrus sylvestris* L.; 2,4-diaminobutyric acid; stress

林生山黧豆(*Lathyrus sylvestris* L.)是一种生长在北美洲的野生豆科植物。它具有生产力高,抗逆性强和动物营养价值高等突出特点^[1]。我们引进试种的结果表明,这种植物在我国水土流失严重的地区和牧区,有着广泛的利用价值。林生山黧豆体内含有浓度很高(可达植物干重4%以上)的2,4-二氨基丁酸(2,4-Diaminobutyric acid, DABA),这种非蛋白质游离氨基酸和林生山黧豆在胁迫条件下所表现的强抵抗能力有密切的相关^[1,6,7]。目前尚不能确定二氨基丁酸在植物体内的代谢途径和代谢的关键酶。有人认为这种物质的代谢是和天门冬氨酸族氨基酸相联系的^[4]。了解二氨基丁酸在体内合成途径及调控规律,可以为利用林生山黧

豆及抗逆特性提供理论依据。本文报道了二氨基丁酸在植物体内的合成及其在胁迫条件下的变化。结果对进一步确定二氨基丁酸的合成途径与代谢关键酶有一定的指导意义。

1. 材料与 方法

1.1 植物材料

林生山黧豆(*Lathyrus sylvestris* L.)种子在黑暗条件下萌发。幼芽生长至2 cm时,移至日光灯下[300 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$]继续生长。萌发及生长温度为20 $^{\circ}\text{C}$,采集3周龄的幼苗作为实验材料。

1.2 [^3H]-天门冬氨酸处理林生山黧豆幼苗

每个处理切取3~4 cm长的林生山黧豆幼苗顶端180 mg,将切端浸入50 μL DL-[2,3- ^3H]-天门冬氨酸(1 $\mu\text{Ci}/\mu\text{L}$)中,2 h后放射性溶液全部吸收完毕。而后加入200 μL 蒸馏水继续反应。共设8个时间处理,分别于浸入放射性溶液后3, 6, 9, 12, 15, 18, 21, 24 h结束处理,取出幼苗,提取幼苗中的游离氨基酸。处理温度及光照强度与上述生长条件相同。

1.3 胁迫处理

将吸入标记液的幼苗放在不同处理条件下,继续标记反应6 h,而后提取幼苗中的游离氨基酸。处理条件包括:(1)盐溶液(NaCl 100和200 mmol/L, 20 $^{\circ}\text{C}$), (2) PEG 8000溶液(20%和40% W/V, 20 $^{\circ}\text{C}$), (3)热激(蒸馏水, 45 $^{\circ}\text{C}$), (4)对照(蒸馏水, 20 $^{\circ}\text{C}$)。

1.4 游离氨基酸提取

将180 mg林生山黧豆幼苗在3 ml乙醇(80%, W/V)中研磨匀浆,转移至蒸发皿中,80 $^{\circ}\text{C}$ 水浴提取,待乙醇蒸干后,再加入等量乙醇,反复提取3次。加入磺基水杨酸(4%, W/V)和盐酸(1 mmol/L)各200 μL 溶解提取物,离心(18 000 g)除去沉淀后,取100 μL 上清液为游离氨基酸。

1.5 氨基酸薄膜层析

游离氨基酸在碳酸缓冲液(1 mol/L, pH 9.0)中于37 $^{\circ}\text{C}$ 恒温条件下与丹磺酰氯-丙酮反应1 h生成丹磺酰氯-氨基酸。将丹磺酰氯-氨基酸样品点在聚酰胺薄膜的一角,分三步层析成双向图谱。各层析步骤的方向、行程及流动相分别为:(1)水平方向,全程,甲酸:水=1.5:100 (V/V); (2)垂直方向,全程,苯:冰乙酸=9:1 (V/V); (3)垂直方向,半程,乙酸乙脂:甲醇:丙乙酸=20:1:1 (V/V/V)。

1.6 放射性强度测定

剪下聚酰胺薄膜中放射性标记的氨基酸样点,放入1 ml液闪液内[甲苯70% (V/V), Triton X-100 30% (V/V), POPOP 0.005% (W/V), PPO 0.5% (W/V)]。用MINAXI β 液闪测定仪测定氨基酸的放射性强度。

2. 结果与 讨论

2.1 林生山黧豆幼苗中二氨基丁酸的合成

用(^3H)天门冬氨酸标记后,林生山黧豆幼苗中可以形成二氨基丁酸(图1)。这个结果与

前人提出的天门冬氨酸与二氨基丁酸之间的底物与产物假说⁽⁵⁾相符。而在我们的结果中,首次观察到与二氨基丁酸合成过程中有关的氨基酸之间的消长关系。实验结果显示标记的幼苗中,一些天门冬氨酸族氨基酸代谢中间产物和终产物〔包括高丝氨酸(Hse)、赖氨酸(Lys)和苏氨酸(Thr)〕也迅速合成,在标记 3~6 h 之内达到高峰。而二氨基丁酸的合成量是在其他氨基酸合成速率降低后,在标记 18 h 才形成高峰(图 1、图 2)。

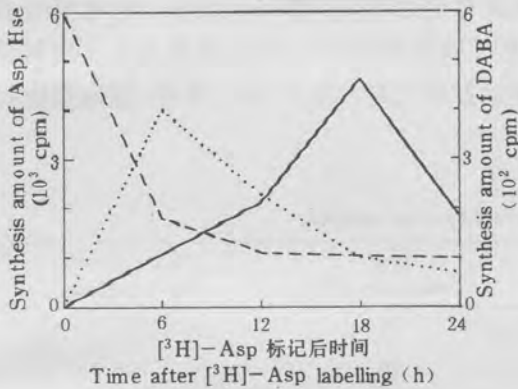


图 1 $[^3\text{H}]$ -天门冬氨酸标记的林生山豆幼苗氨基酸的合成

Fig 1 Synthesis of amino acids in the seedlings of *Lathyrus sylvestris* L. labelled with $[^3\text{H}]$ -Asp

..... 高丝氨酸 Hse, —— 二氨基丁酸 DABA, —— 天门冬氨酸 Asp

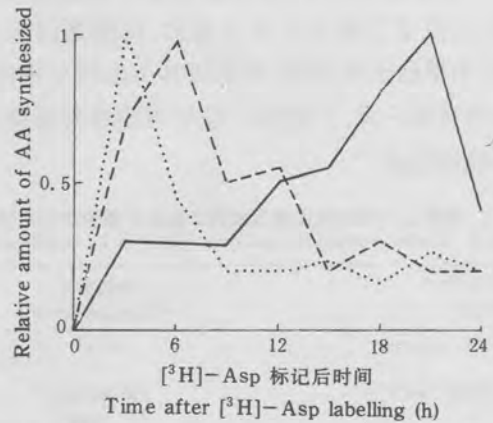


图 2 $[^3\text{H}]$ -天门冬氨酸标记的林生山豆幼苗氨基酸合成的相对变化

Fig 2 Relative variance of amino acid synthesis in the seedlings of *Lathyrus sylvestris* L. labelled with $[^3\text{H}]$ -Asp.

..... 赖氨酸 Lys, —— 苏氨酸 Thr, —— 二氨基丁酸 DABA
Values are the ratio between incorporation at time points and the highest incorporation

与 Nigam 和 Ressler⁽⁴⁾的结果相比,本实验中放射性在二氨基丁酸的掺入率较低(分别为 0.9% 与 0.12%)。这可能主要是因为采用了不同的同位素标记底物的结果。Nigam 和 Ressler 是用 ^{14}C -氨基酸作为标记底物的,而我们采用的 ^3H 标记底物的放射性能量低,并且稳定性差。

本研究中不同氨基酸合成的差异,可以用氨基酸在体内需求的不同来解释。赖氨酸和苏氨酸是蛋白质氨基酸,很少以游离态存在,标记以后合成速度快,合成量多。而在体内以高浓度(2%~4%, W/W)⁽¹⁾游离态存在的二氨基丁酸的合成则比较慢,合成量也小。

本项研究的结果可以从两个方面支持天门冬半醛转氨生成二氨基丁酸的假说。首先,按照这个假说,高丝氨酸是与二氨基丁酸的合成密切相连的^(4,5)。在我们的结果中,高丝氨酸的合成与积累,早于二氨基丁酸,支持了原假说中天门冬氨酸与高丝氨酸均可以作为二氨基丁酸合成的底物的理论。另外,已经知道天门冬氨酸族代谢终产物如赖氨酸、苏氨酸和异亮氨酸的生物合成具有协同反馈抑制关系,每一种终产物都可以抑制共同反应的第一步天门冬氨酸转变为天门冬酰磷酸的反应。在我们的实验中,天门冬氨酸族氨基酸两个代谢终产物(赖氨酸和苏氨酸)的合成与二氨基丁酸的合成高峰相互错开(图 2),成反比例相关。结果表明了在林生

山豆体内, 赖氨酸和苏氨酸这两种蛋白质氨基酸优先合成, 以满足幼苗生长中蛋白质迅速合成的需要。而当两种蛋白质氨基酸的合成达到高峰后, 它们的生物合成开始下降, 天门冬氨酸开始大量转化为林生山豆体内主要游离氨基酸-二氨基丁酸。实验似乎显示, 二氨基丁酸和其他天门冬氨酸族氨基酸代谢终产物一样, 参与了某种协同反馈机制。这个推论, 需要通过研究赖氨酸和苏氨酸对二氨基丁酸合成的直接影响来加以证实。

2.2 胁迫条件对林生山豆幼苗二氨基丁酸合成的影响

在胁迫条件下, 林生山豆幼苗二氨基丁酸的合成大幅度增长(表 1)。当胁迫强度加大时, 二氨基丁酸合成较少增加, 可能是因为重胁迫条件使幼苗受到损伤的结果。已有报道表明, 干旱胁迫和 NH_4^+ 可提高林生山豆体内二氨基丁酸的含量^[6,7]。和其他游离氨基酸和多胺类物质一样, 二氨基丁酸有可能参与渗透调节和缓解胁迫时产生的 NH_4^+ 毒害, 促进植物对胁迫的抵抗^[7]。

表 1 胁迫条件对林生山豆幼苗二氨基丁酸合成的影响*

Tab 1 DABA synthesis in *Lathyrus sylvestris* L. seedlings as influenced by stress conditions

胁迫因子 Factor	处理溶液 Incubation solution	温度 Temperature (°C)	二氨基丁酸合成 DABA synthesis
对照 Control	H ₂ O	20	100
盐溶液 NaCl	100 mmol/L	20	419
	200 mmol/L	20	154
聚乙二醇 PEG 8000	20% (W/V)	20	240
	40% (W/V)	20	187
热激 Heat shock	H ₂ O	45	237

* 用 [³H]-天门冬氨酸标记后 6 h 测定, 测定值为对照相比的百分数。

Values were measured 6 h after [³H]-aspartic acid labelling and are expressed as percentage of control.

不同胁迫条件对林生山豆幼苗中二氨基丁酸的合成造成了相似的影响, 可能是因为细胞在不同胁迫条件下, 均有不同程度的脱水及细胞变形, 这些变化进而促进了二氨基丁酸的合成。这一点可能类似于植物胁迫条件下 ABA 响应蛋白的形成^[2]。所以二氨基丁酸合成能力的提高, 可能是林生山豆在不同逆境条件下形成的一种共同的响应方式之一。

参 考 文 献

- 1 沈黎明, 吴显荣, 侯修身. 1992: 北京农业大学学报 18:9~11.
- 2 Close T J, R D Fenton, A Yang. 1993: Dehydrin; the protein. In: T J Close, E A Bray (eds), Plant Responses to Cellular Dehydration During Environmental Stress. American Society of Plant Physiologists, Maryland, 104~110.
- 3 Foster J G. 1990: *Adv. Agron.* 63: 427~458.
- 4 Nigam S N, C Ressler. 1966: *Biochemistry* 5: 3426~3429.
- 5 Ressler C. 1964: *Federation Proc.* 23: 1350~1353.
- 6 Shen L, J G Foster, D M Orcutt. 1989: *J. Expt. Bot.* 40: 71~79.
- 7 Shen L, J G Foster, D M Orcutt. 1990: *Plant Cell Environ.* 13: 833~838.

(责任编辑: 盛国英)