

胁迫处理对林生山黧豆蛋白质多肽 及其含量的影响

王 舰 沈黎明

(中国农业大学生物学院, 北京 100094)

摘要 应用二维电泳技术, 分析了经水分胁迫(PEG)、盐分胁迫(NaCl)和热激(40℃)处理后林生山黧豆(*Lathyrus sylvestris* L.)体内蛋白质多肽及其含量的变化。有些蛋白质经PEG、NaCl和热激处理后可以产生相同的变化。两种不同的胁迫因子对某些蛋白质的影响有一定的共同性。特定的胁迫条件可以造成特定的影响。不同胁迫因子对同一蛋白质多肽可以造成不同的影响。胁迫下蛋白质的变化可能与林生山黧豆抵抗和适应胁迫条件的能力以及体内非蛋白质氨基酸的代谢有关。

关键词 林生山黧豆; 胁迫; 蛋白质

Influence of stress conditions on the protein polypeptide contents in *Lathyrus sylvestris* L. Wang Jian and Shen Li-Ming (College of Biological Sciences, China Agricultural University, Beijing 100094), *J. Plant Resour. & Environ.* 1996, 5(4): 15-20
Protein polypeptide contents in *Lathyrus sylvestris* L. treated with water stress (PEG), salt stress (NaCl) and high temperature (40℃) were analyzed with two-dimensional electrophoresis. The results showed that: 1) identical changes in some protein polypeptide contents were detected when plants were treated with PEG, NaCl and high temperature; 2) similar effects on some proteins by two different factors were found; 3) specific change was related to specific stress factor; 4) different stress factors could cause different responses by same protein polypeptide. The changes in protein polypeptide contents are probably related to the stress tolerance or resistance and the metabolism of non-protein amino acid in *Lathyrus sylvestris* L.

Key words *Lathyrus sylvestris* L.; stress; protein

胁迫条件下植物体内蛋白质多肽的含量会发生很大变化, 以适应和抵抗不利环境的危害^[11]。植物受到水分胁迫、盐分胁迫和热激以后, 体内许多蛋白质的合成受到抑制, 并可以形成一些新的蛋白质, 同时不少蛋白质的含量大大改变^[5, 6, 11]。不同的胁迫条件会对植物体内蛋白质多肽的含量造成相似的影响, 这也许表明不同逆境条件下植物体内的信号感受和传递过程有某种相似性^[8, 9]。对逆境下产生的蛋白质结构和生物化学特性的分析表明^[4, 15], 逆境蛋白响应可能在提高植物对逆境条件的抵抗和忍耐能力方面有重要意义。

林生山黧豆(*Lathyrus sylvestris* L.)是原产于欧洲的野生豆科植物。它具有抗逆力强和动物营养价值高等许多特点^[1], 在水土保持和牧草生产中有广泛的利用前景。林生山黧豆可

以在多种逆境条件下良好生长^[7]。研究发现,林生山黧豆体内含有浓度很高的非蛋白质氨基酸(包括2,4-二氨基丁酸、 γ -氨基丁酸和高丝氨酸,含量分别可达干重的2%以上)^[2]。这些非蛋白质氨基酸和林生山黧豆在逆境条件下的反应有着密切的相关^[13]。研究林生山黧豆体内逆境蛋白的形成,对揭示林生山黧豆特殊的含氮次生物质代谢在抗逆中的作用有重要的意义。本文报道不同逆境条件下林生山黧豆蛋白质多肽含量的变化,以期探讨林生山黧豆抗逆性的蛋白质基础。

1. 材料与方法

1.1 发芽处理

用浓硫酸浸泡林生山黧豆种子(由美国 Big Flat 种子公司提供)8 min,清水冲洗 12 h。将处理后的种子放入铺有 4 层纱布的白瓷盘内,20℃ 暗中发芽。幼芽伸长至 10~15 cm 时进行胁迫处理。

1.2 胁迫处理

将 20 株林生山黧豆幼芽直立于装有 8 ml 处理溶液的 25 ml 烧杯中,于暗中进行胁迫处理,包括利用聚乙二醇(PEG)的水分胁迫处理、NaCl 盐分处理和热激(HS)处理,实验重复 3 次,具体处理条件见表 1。

表 1 林生山黧豆幼芽胁迫处理

Tab 1 Stress treatments for *Lathyrus sylvestris* L. seedlings

胁迫因子 Stress factor	溶液及浓度 Solution & concentration	温度(℃) Temperature	处理时间(h) Time
对照(CK) Control	蒸馏水 Water	20	56
水分(PGE) Water	聚乙二醇,20% (w/v) PEG 8000	20	56
盐分(NaCl) Salt	NaCl, 200 mmol/L	20	56
热激(HS) Heat Shock	蒸馏水 Water	40	8

1.3 蛋白质提取

切取 5 g 胁迫处理后的林生山黧豆幼芽,加入 5 ml 50 mmol/L Tris-Cl (pH 7.8), 4℃ 下匀浆,37 500 g 离心 15 min。取上清液,加入等体积冷(-20℃)三氯乙酸-丙酮[15% (w/v)]溶液,-20℃ 条件下沉淀蛋白质 2 h。20 000 g 离心 15 min,用 -20℃ 丙酮将沉淀洗 3 次,每次均用 20 000 g 离心 15 min 收取沉淀。将蛋白质沉淀在研钵内风干,-70℃ 保存备用。

1.4 蛋白质电泳分析

1.4.1 等电点聚焦 将 1 mg 蛋白质样品溶于 200 μ l 样品缓冲液[9.5 mol/L 尿素,2% (v/v) NP-40,1.6% (v/v) ampholine (Pharmalyte, Pharmacia, 下同) pH 5~7,0.8% (v/v) ampholine pH 3~9.5,5% (v/v) β -巯基乙醇]中,12 000 g 离心 10 min,取上清液作为电泳样品。将 20 μ l 电泳样品加在等电点聚焦胶条[9.0 mol/L 尿素,4% (w/v) 丙烯酰胺,2% (v/v) NP-40,1.6% (v/v) ampholine pH 5~7,0.8% (v/v) ampholine pH 3~9.5]上,400 V 条件下电泳 24 h,600 V 条件下电泳 2 h。电泳后将胶条放入平衡溶液[80 mmol/L Tris-Cl, pH 6.8,4% (w/v) SDS,10% (v/v) 甘油,0.01% (w/v) 溴酚兰]中 30 min,中间更换 1 次平衡溶液。

1.4.2 SDS-PAGE 依 Laemmli^[10]法,配制浓缩胶(4%)和分离胶(12.5%),将平衡后的等电点聚焦胶条放在浓缩胶上,琼脂封胶。15 mA 条件下电泳 6 h。电泳后按 Rabilloed^[12]的方法进行硝酸银染色。

2. 实验结果

对照和经水分胁迫处理、盐分胁迫处理以及热激处理后林生山黧豆幼芽中蛋白质电泳析图谱见图 1、图 2、图 3 和图 4。图 1 中的编号是一些蛋白质多肽在二维电泳图谱上的位点,是实验中不同胁迫条件处理后,与对照相比含量发生明显变化(包括新出现、含量增加或减少以及消失)的蛋白质多肽所处的位置。这样编号,可以建立一个参照系统,便于进行不同处理间的比较。图 2、图 3 和图 4 中编号的斑点分别为经过水分胁迫、盐分胁迫和热激后含量发生变化的蛋白质多肽,这些图中未标号的斑点,是与对照相比含量无明显变化的蛋白质多肽。这些结果归纳为表 2 的内容。

表 2 胁迫处理后林生山黧豆幼芽体内蛋白质多肽及其含量的变化*
Tab 2 Protein polypeptide contents in *Lathyrus sylvestris* L. seedlings under stress

蛋白质多肽位点编号及分子量 Polypeptide site number & MW		胁迫因子 Stress factor			蛋白质多肽位点编号及分子量 Polypeptide site number & MW		胁迫因子 Stress factor		
编号 Number	分子量(KD) MW	PEG	NaCl	热激 HS	编号 Number	分子量(KD) MW	PEG	NaCl	热激 HS
1	84.0	●	●	●	22	33.0	↓		↓
2	85.0		↑	↑	23	31.0	↑	↑	↑
3	78.0	↑	↑	↑	24	32.5		↑	
4	68.0			↑	25	32.0		●	
5	56.0	↑			26	31.5	↑	↑	
6	61.0			↑	27	30.0	↓	↑	○
7	55.0			↑	28	29.0		↑	
8	45.0	↓			29	27.0		↑	
9	44.0	↓	↑		30	28.0			○
10	44.5		↑	↑	31	23.0	↓		↓
11	43.0		↑		32	21.0		↓	
12	42.0			↓	33	19.0			↑
13	41.5	↑	↑		34	17.5	●		
14	40.5		↑		35	18.5			●
15	39.0		↑		36	18.0	↓	↓	
16	38.0			↑	37	15.5	↓	↓	↓
17	37.0			↓	38	16.5	↓		↓
18	36.0	↓	↓	↓	39	14.5	↓	↓	↓
19	35.5	●	●	●	40	15.0	↓		↓
20	35.0			↓	41	16.0	●		
21	34.5			↓					

* 表中符号表示经胁迫处理后林生山黧豆幼芽中新出现(●)和消失(○)的蛋白质多肽,以及含量上升(↑)和下降(↓)的蛋白质多肽。蛋白质多肽位点的编号和图 1 相同。 Symbols in Table 2 represent new protein polypeptides (●) and protein polypeptides disappeared (○) and increase (↑) and decrease (↓) in protein polypeptide contents in *Lathyrus sylvestris* L. seedlings under stress conditions.

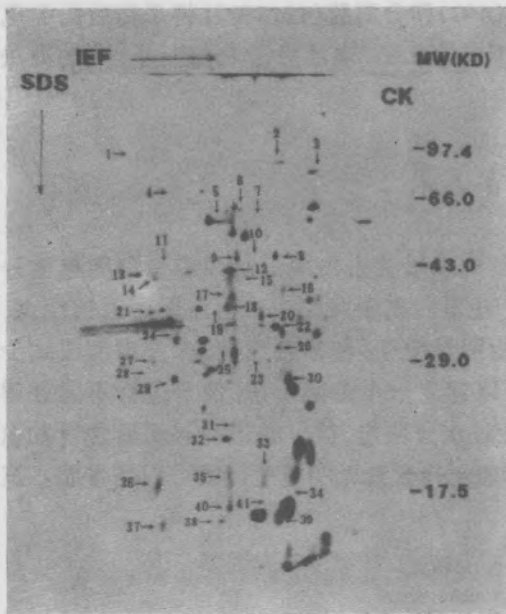


图1 林生山黧豆幼芽(CK)蛋白质二维电泳图谱
Fig 1 Two-dimensional electrophoretogram of proteins from *Lathyrus sylvestris* L. seedlings

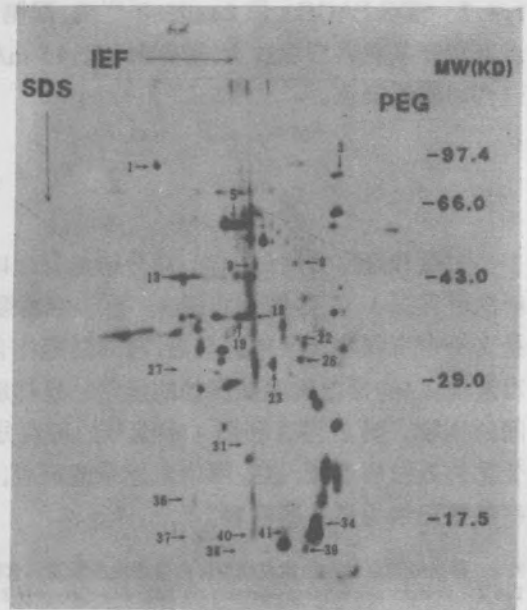


图2 20% (w/v) PEG 8000 处理 56 h 后林生山黧豆幼芽 (PEG) 蛋白质二维电泳图谱
Fig 2 Two-dimensional electrophoretogram of proteins from *Lathyrus sylvestris* L. seedlings treated with 20% (w/v) PEG 8000 for 56 h

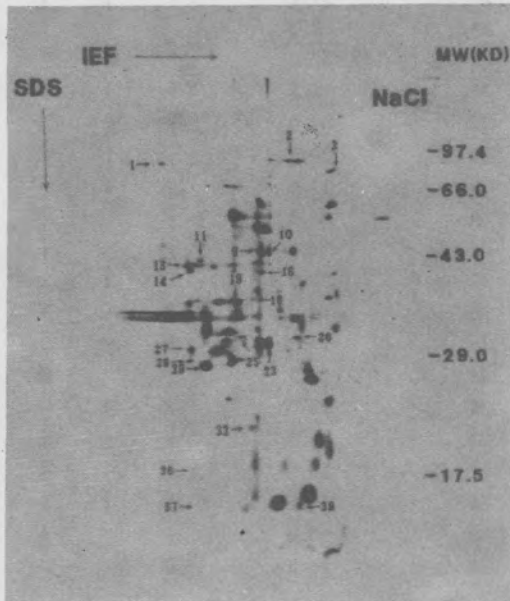


图3 200 mmol/L NaCl 处理 56 h 后林生山黧豆幼芽 (NaCl) 蛋白质二维电泳图谱
Fig 3 Two-dimensional electrophoretogram of proteins from *Lathyrus sylvestris* L. seedlings treated with 200 mmol/L NaCl for 56 h

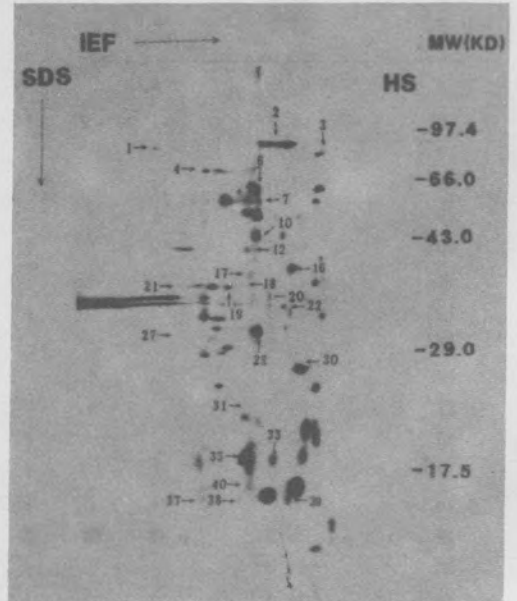


图4 40°C 热激 8 h 后林生山黧豆幼芽 (HS) 蛋白质二维电泳图谱
Fig 4 Two-dimensional electrophoretogram of proteins from *Lathyrus sylvestris* L. seedlings treated at 40°C for 8 h

比较经过不同胁迫处理后林生山黧豆体内蛋白质多肽的变化,可以发现以下几个特点(见表 2):(1)有些蛋白质多肽经 PEG, NaCl 和热激处理后可以产生相同的变化。如经过这些胁迫处理后,林生山黧豆中新产生了 84 KD 和 35.5 KD 两个蛋白质多肽;78 KD 和 31 KD 两个蛋白质多肽含量增加;36 KD, 15.5 KD 和 14.5 KD 蛋白质多肽含量减少。(2)两种不同的胁迫因子对林生山黧豆中蛋白质多肽含量的影响有一定的共同性。如经 PEG 和 NaCl 处理后,出现一些相同的变化:41.5 KD 和 31.5 KD 蛋白质多肽含量增加,而 18 KD 蛋白质多肽的含量减少。PEG 和热激处理后也出现了一些相同的变化:23 KD, 16.5 KD 和 15 KD 蛋白质多肽的含量减少。NaCl 和热激影响的共同特点是 85 KD 和 44.5 KD 蛋白质多肽的含量均增加。(3)特定的胁迫条件可以对林生山黧豆中蛋白质多肽造成特定的影响。PEG 处理后新出现了两个蛋白质多肽(17.5 KD 和 16 KD), 3 个蛋白质多肽含量增加(56 KD, 41.5 KD 和 31.5 KD), 8 个蛋白质多肽的含量下降(45 KD, 44 KD, 33 KD, 30 KD, 23 KD, 18 KD, 16.5 KD 和 15 KD)。NaCl 处理后新出现了 1 个蛋白质多肽(32 KD), 12 个蛋白质多肽的含量增加(85 KD, 44.5 KD, 44 KD, 43 KD, 41.5 KD, 40.5 KD, 39 KD, 32.5 KD, 31.5 KD, 30 KD, 29 KD 和 27 KD), 21 KD 和 18 KD 蛋白质多肽的含量减少。热激处理后新出现了 1 个蛋白质多肽(18.5 KD), 7 个蛋白质多肽的含量增加(85 KD, 68 KD, 61 KD, 55 KD, 44.5 KD, 38 KD 和 19 KD), 8 个蛋白质多肽的含量减少(42 KD, 37 KD, 35 KD, 34.5 KD, 33 KD, 23 KD, 16.5 KD 和 15 KD), 28 KD 和 30 KD 蛋白质多肽消失。(4)不同胁迫因子对同一蛋白质多肽可以造成不同影响。如 30 KD 蛋白质多肽的含量在 PEG 处理后上升,在 NaCl 处理后下降,而热激后完全消失。44 KD 蛋白质多肽也在 PEG 和 NaCl 处理后表现出不同反应。

3. 讨 论

水分胁迫、盐分胁迫和热激处理可以对林生山黧豆体内蛋白质多肽的含量造成很大的影响(图 2~4, 表 2)。有些变化在三种或两种不同胁迫因子影响下是相同或相似的,而有些变化则是与特定的胁迫因子相联系的。相同的或相似的蛋白质多肽含量的变化,可能反映了植物在异常条件下,蛋白质代谢水平上一种普遍的适应或抵抗机制。与特定的胁迫因子相联系而发生变化的蛋白质,则可能参与了植物对特定胁迫因子的适应与抵抗反应。Hurkman^[9]和 Harrington^[8]也报道了不同胁迫因子对植物蛋白质代谢可以造成相同或相似的影响。结果表明,植物体内可能存在着两类胁迫反应蛋白:普遍胁迫反应蛋白(如本研究中各种胁迫条件下均出现的 85 KD 和 35.5 KD 蛋白质多肽)和特殊胁迫反应蛋白(如本研究中特定胁迫条件下出现的蛋白质多肽)。在具体的胁迫响应过程中,两类胁迫反应蛋白协同作用,共同控制和调节着一系列分子和生理水平的变化。深入研究这两类胁迫反应蛋白质,对解释植物抗逆性的分子基础具有重要的意义。

林生山黧豆体内以 2, 4-二氨基丁酸、 γ -氨基丁酸和高丝氨酸为代表的非蛋白质氨基酸与胁迫反应密切相关^[2]。以前所报道的胁迫条件下林生山黧豆体内非蛋白质氨基酸的含量和合成的变化^[3, 13, 14],可能是与本文中蛋白质的变化相联系的。不同胁迫条件下含量大量增加的蛋白质(如 78 KD 和 31 KD 蛋白质多肽),很可能作为代谢酶参与了林生山黧豆体内非蛋白质氨基酸的代谢。林生山黧豆受到胁迫时,这些蛋白质含量的增加可能促进了非蛋白质氨基

酸的合成;而胁迫下大量合成的非蛋白质氨基酸可能在细胞水平具有某种保护功能,如加强细胞的渗透调节能力和解除有毒物质的危害^[14],同时也许在胁迫信号传递和基因调控方面有特殊意义^[4]。本文的结果和对纯化的非蛋白质氨基酸代谢酶性质的研究结果结合起来分析,可以为阐明林生山黧豆非蛋白质氨基酸在胁迫反应中的意义和林生山黧豆抗逆性的蛋白质和生物化学基础提供依据。

应该指出,胁迫条件下蛋白质方面的某些变化并不一定与植物抵抗和适应胁迫条件相联系,许多变化仅是胁迫因子对植物造成危害的一种结果。所以关于蛋白质含量变化的结果,应在研究具体胁迫响应蛋白质在分子和细胞水平上的生理功能(如作为代谢途径中的关键酶)的基础上进一步分析。另外,应在本研究的基础上,进一步研究各种胁迫因子处理时间效应及处理后植物在正常条件下的恢复问题。

参 考 文 献

- 1 沈黎明,吴显荣,侯修身. 1992:北京农业大学学报 18(1):9~11.
- 2 沈黎明,吴显荣. 1992:北京农业大学学报 18(4):347~352.
- 3 沈黎明,赵 革,吴显荣. 1996:植物资源与环境 5(1):15~18.
- 4 Bray E A. 1993: *Plant Physiol.* 103(3): 1035~1040.
- 5 Chandler P M. 1994: *Ann. Rev. Plant Physiol.* 45: 113~141.
- 6 Dure L III. 1993: *Plant J.* 3(2): 363~369.
- 7 Foster J G. 1990: *Adv. Agrono.* 63(2): 427~438.
- 8 Harrington H M. 1988: *Plant Physiol.* 88(2): 618~625.
- 9 Hurkman W J. 1988: *Electrophoresis* 9(3): 781~787.
- 10 Laemmli U K. 1970: *Nature* 227(2): 680~685.
- 11 Olsen F L, K Skriver, F Muller-Uri *et al.* 1992: Stress inducible protein. In: J L Wray (ed.), *Inducible Plant Proteins.* Cambridge University Press, London, UK, 139~153.
- 12 Rabilloved T. 1992: *Electrophoresis* 13(2): 429~439.
- 13 Shen L, J G Foster, D M Orcutt. 1989: *J. Expt. Bot.* 40(1): 71~79.
- 14 Shen L, J G Foster, D M Orcutt. 1990: *Plant Cell Environ.* 13(3): 833~838.
- 15 Skriver K, J Mundy. 1990: *Plant Cell* 2(6): 503~512.

(责任编辑:惠 红)

全国中药资源学教学研讨会召开

中国自然资源学会天然药物资源专业委员会举办的第二届全国中药资源学教学研讨会于1996年8月20~25日在张家界市召开。

会议收到论文56篇,包括专题论述10篇,教学研讨15篇,资源开发利用31篇。会议就中药资源学的专业设置与培养目标,师资、教材、教学、科研与生产相结合等问题进行了深入研讨;就中药资源的开发利用、保护管理等方面做了广泛交流。主要报告有自然资源科学与天然药物资源学,天然药物化

学在资源开发中的应用,国家药用植物种质资源库的建设和在资源保护、开发利用中的应用,中国药用生物多样性的保护,中药资源开发的药剂学途径,中药资源专业教育中存在的问题及展望等。会议还就杜仲、银杏、红豆杉、桑叶、茶叶、益母草等一些种类的资源、化学和开发利用的进展作了介绍。

会议代表认为这次会议将对促进中药资源学的教学、科研和中药资源的开发利用产生积极作用

(袁昌齐)