

热冲击对 Soja 亚属萌芽 大豆种子下胚轴酯酶的影响*

周玉平

(长春市特殊教育师范学校)

尹田夫 刘丽君

(黑龙江省农业科学院大豆研究所)

摘 要

为探索热冲击(Heat Shock,简称HS下同)对 *soja* 亚属野生大豆(*G. Soja*)、半野生大豆(*G. gracilis*)、栽培大豆(*G. max*)三个不同进化类型大豆萌芽种子下胚轴酯酶同工酶的影响。本试验采用了6个不连续的渐变温度HS处理。研究结果表明:1)在45℃(2h)、40℃(1h)→45℃(2h)、40℃(2h)→26℃(2h)→45℃(2h)三种HS处理条件下,酶谱C区主谱带半野生大豆第5带、栽培大豆第6带均消失;野生大豆的酶谱C区的主谱带第6带幅明显变窄,色度明显减弱;三种大豆酶谱C区其它谱带有不同条数的消失;三种大豆酶谱C区在其主谱带上方均出现一条新谱带。2)三种大豆酶谱A区和B区谱带对所有HS反应均不敏感。3)在26℃(对照)、35℃(2h)、40℃(2h)三种HS处理条件下,酶谱C区野生大豆主谱带第6带的色度从低温HS处理到高温HS处理逐渐减弱,而半野生大豆主谱带第5带则相反,栽培大豆C区主谱带第6带的变化没有明确的规律。

关键词 热冲击; *Soja* 亚属; 大豆; 酯酶; 下胚轴

随着大气层“温室效应”的日趋加剧,世界越来越多的地区不时受到热浪冲击,使各种生物的生长发育受到抑制以致危害生命,严重地威胁着人类及人类赖以生存的自然界的动植物等。从六十年代起,HS对各种生物的作用的研究成了极有吸引力的崭新的研究领

* 国家自然科学基金资助项目。

本文于1990年11月28日收到。

This paper was received on Nov. 28, 1991.

域。七十年代,研究进展异常迅速,对高等植物 HS 的研究始于八十年代,前人的工作着眼于:①HS 反应;②HS 蛋白质的功能;③HS 的细胞定位;④HS 遗传学诸方面的研究,并且取得了很大的进展。在这些方面对大豆的研究更是方兴未艾。有关大豆酯酶同工酶在正常温度下的研究已有报道,但据目前所知,对 *Soja* 亚属大豆于 HS 条件下酯酶同工酶的研究尚未见报道。本试验以萌芽 *Soja* 亚属大豆种子下胚轴为材料,探讨 HS 条件下酯酶同工酶的变化,为 *Soja* 亚属大豆 HS 酶学研究提供基础资料。

材料与方法

一、材料:

栽培大豆 (*G. max*) — “东农 38”, 半野生大豆 (*G. gracilis*) — “龙 01 — 112”, 野生大豆 (*G. Soja*) — “龙 01 — 89”。此三种不同进化类型大豆种子均由黑龙江省农业科学院大豆所提供。

二、方法:

1. 种子处理:野生大豆发芽前划破种皮。用 50℃ 温水同时浸泡三种材料 5 小时左右,吸胀后用自来水冲洗数次,按 50 粒/皿装于培养皿中,置于 26℃ 恒温箱中培养 60 小时,每隔 12 小时换水一次。

2. HS 处理:种芽培养完成后,分别对三种材料同时进行 HS 处理(表 1)。

表 1 *Soja* 亚属大豆热击温度与时间

Table 1 The temperature and time of heat shock

| 热击处理号 No. of tr. | 正常温度(℃) Normal tem (℃) | 处理温度(℃) Tr. tem (℃) | 处理时间(小时) Tr. time (h) |
|---------------------|---------------------------|------------------------|--------------------------|
| 1) | 26 | 26(control) | — — — |
| 2) | 26 | 35 | 2h |
| 3) | 26 | 40 | 2h |
| 4) | 26 | 45 | 2h |
| 5) | 26 | 40—45 | 1h—2h |
| 6) | 26 | 40—26—45 | 2h—2h—2h |

3. 酶液的制备:

(一)取样:每一 HS 处理完成后立即取长为 1~2cm 的正常下胚轴,洗净,吸干。

(二)研磨及离心:称样 1g,加 4ml 提取液(0.3M 蔗糖—0.01M 氯化钾—0.05M 磷酸缓冲液),于冰浴条件下研成匀浆,用八层纱布过滤,滤液 3,500~4,000rpm 离心 10 分钟,取上清液,分置小瓶中,置冰箱(-10℃左右)中备用。

4. 电泳,采用垂直平板不连续聚丙烯酰胺凝胶电泳法。

(一)制胶板[浓缩胶 2.8%](分离胶 7.5%)]与点样,点样量 60μl。

(二)电泳,电极缓冲液为 pH8.3 的 Tris—甘氨酸。电流为 2mA 每条带,电压为 27v~300v,电泳时间 4 至 5 小时。

5. 染色,采用萘酯—坚牢兰染色剂染色到显色完全为止,用流水冲洗半小时。(α—乙酸萘酯和 β—乙酸萘酯各 2g,溶于 100ml 乙醇中,每板染色时取其 4ml,加坚牢兰 120mg 溶于其中,再加 150ml 磷酸缓冲液即成染色液)。

6. 扫描,采用日本岛津 CS—930 扫描仪湿板扫描。

结果与分析

一、最终 HS 温度为 45℃ (2h)处理的酯酶同工酶变化:

从图 1 酶谱可见:栽培大豆、半野生大豆和野生大豆三种不同进化类型大豆对最终 HS 温度 45℃ (2h)处理的反应在酶谱 C 区酶谱带变化最显著:半野生大豆的 4)、5)和 6)三个处理的谱带在第 2 带和第 3 带之间同对照相比较均增加 1 条新谱带;而它们的第 4、5、6 和 7 四条谱带均消失。野生大豆的 4)、5)和 6)三个处理的酶谱同对照相比较在第 5 和第 6 谱带之间发现一条新谱带;而它们的第 7 和第 8 两条带消失;第 6 带即主谱带带幅减小,色度减弱;只有 6)处理的第 3、第 4 和第 5 谱带消失。栽培大豆 4)、5)和 6)三个处理的酶谱同对照相比较酶活性明显减弱,唯 6)处理的第 5 带消失;4)、5)和 6)三个处理的第 6 带和第 7 带两带均消失。

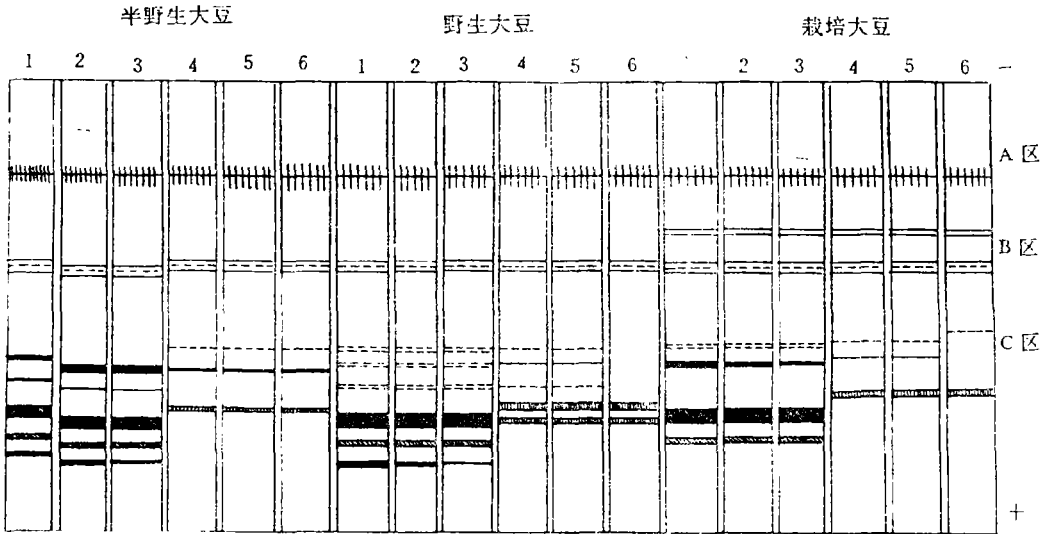


图 1 三种大豆不同 HS 温度下酯酶同工酶酶谱

(1)、2)…6)为处理号;带的顺序为从“—”到“+”数第 1 到第 7 带

Fig. 1 The zymogram of esterase of *Soja* — subgenus soybean under differnt heat shock temperature 1), 2), 3), 4), 5), 6) are No. of treatment of HS

以上结果说明:最末温度为 45℃ (2h)的处理,使相当数量的正常酯酶同工酶的活性

被抑制或使其控制基因关闭,抑或使 MRNA 不能翻译。同时均有新的酶谱带出现,可以推测有新的基因—HS 基因被启动并诱导合成 HS 酯酶蛋白。关于 6)处理,野生大豆和栽培大豆酶谱带变化与其同种 4)和 5)两个处理相比较变化是很大的,并且不同种间存在着差异,而半野生大豆 6)处理酶谱带与其同种 4)和 5)两个处理的谱带相对比未见变化,可能不同进化类型大豆对 40℃(2h)→45℃(2h)HS 温度骤变反应及应答能力方面有异,有关该方面的研究正在进行中。

二、35℃(2h)和 40℃(2h)HS 处理酯酶同工酶的分析:

对于 26℃(ck)、35℃(2h)和 40℃(2h)三个处理由图 1 及图 2 和图 3 可知:(1)野生大豆主谱带无论峰面积大小及峰面积值百分比,由低 HS 温度到高 HS 温度骤变 HS 温度处理使该带位的酯酶同工酶活性降低。(表 2 及图 2)。如此骤变升温 HS 处理对野生大豆耐热能力的形成是不利的。(2)半野生大豆主谱带即第 5 带变化有一定趋势,峰面积由小到大,酶活性增强。(表 3 及图 3)。由此说明该带酶活性增加,此乃进一步说明 *Soja* 亚属中半野生大豆在耐热能力上有一定的快速反应能力,对是否是此谱带同工酶蛋白合成加强或有热击基因开始工作而产生热击蛋白,抑或两种原因兼有,对此进一步探讨是很有意义

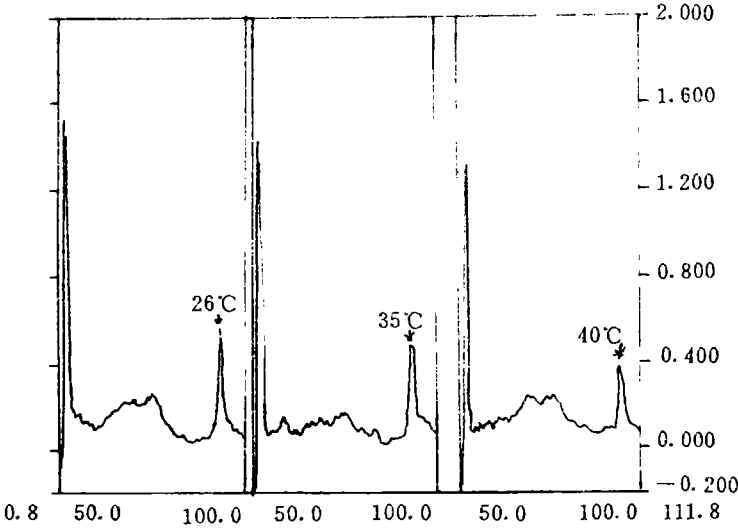


图 2 箭头所指为野生大豆在相应温度下第 6 带峰

Fig. 2 The sixth band of area C of esterase zymogram of wild soybean under different HS temperature

表 2 热击下野生大豆酯酶谱 C 区第 6 谱带

Table 2 The sixth band of zymogram in wild soybean under HS

| 热 击 温 度 Tem. HS | 峰 面 积 Peak area | 峰面积百分比 Peak area % | 谱 带 色 度 Band colour |
|--------------------|--------------------|-----------------------|------------------------|
| 26℃(cont.) | 66150.9 | 11.6 | 深 dense |
| 35℃(2h) | 57157.8 | 10.7 | 较深 middle dense |
| 40℃(2h) | 56984.7 | 9.5 | 浅 weaker |

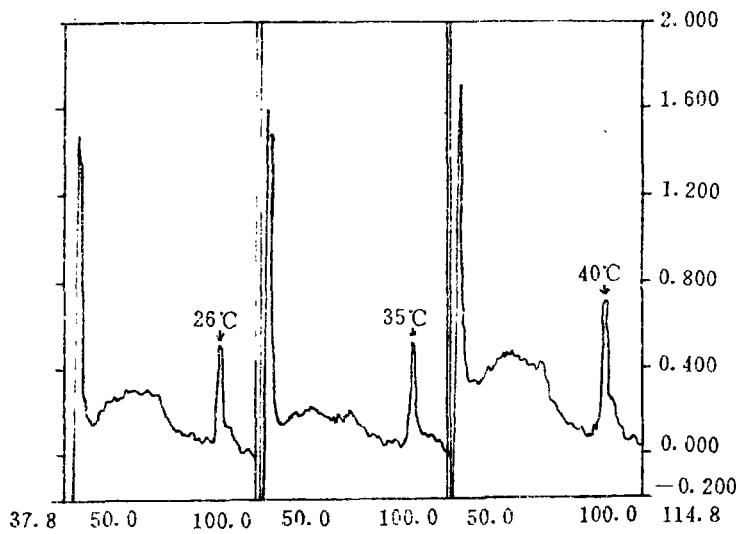


图 3 箭头所指为半野生大豆在相应温度下第 5 带峰

Fig. 3 The fifth band of area C of esterase zymogram of semi-wild soybean under different HS temperature 的。(3)栽培大豆在 1)、2)和 3)三个 HS 处理条件下,其变化没有规律。总之,三种不同类型大豆在 1)、2)和 3)三个 HS 处理条件下其酯酶同工酶变化不尽相同,说明 35℃(2h)和 40℃(2h)对 *Soja* 亚属大豆耐热能力的产生的影响是不同的。

表 3 热击下半野生大豆酯酶谱 C 区第 5 谱带

Table 3 The fifth band of zymogram in semi-wild soybean under HS

| 热 击 温 度 Tem. HS | 峰 面 积 Peak area | 峰面积百分比 Peak area % | 谱 带 色 度 Band colour |
|--------------------|--------------------|-----------------------|------------------------|
| 26℃(cont.) | 52333.45 | 8.7 | 浅 weaker |
| 35℃(2h) | 60247.64 | 10.4 | 较深 middle dense |
| 40℃(2h) | 68388.60 | 8.7 | 深 dense |

三、不同 HS 温度处理对酶谱 A 区和 B 区酯酶同工酶的作用分析:

野生大豆、半野生大豆和栽培大豆,在本试验研究中的任何处理条件下,在酶带的 A 区和 B 区未见变化,揭示了不同进化类型 *Soja* 亚属大豆的某些基因是具有同源性的,并且此同源性基因控制合成的酯酶同工酶具有耐 HS 温度的能力,对此类酶的生物化学和遗传学方面的分子水平研究,为人工培育耐 HS 温度的大豆新品种方面有一定意义。

四、总览 A、B 和 C 三区谱带分析:

从图 1 可见,半野生大豆、野生大豆和栽培大豆在 26℃(2h)、35℃(2h)和 40℃(2h)处理条件的酯酶谱带均未见显著的变化,说明 26℃、35℃、40℃为正常条件下的温度,酯酶对它们已经适应了,在这种条件下,酯酶仍保持其特性并具有生理活性,然而当有 45℃处理存在,不论是 40℃(1h)→45℃(2h)还是 40℃(2h)→26℃(2h)→45℃(2h),同 45℃(2h)处理的结果没有显著的区别,可以推知,45℃是使酯酶发生质变的临界温度。这对产生抗 HS 的大豆新品种具有重要意义。

参 考 文 献

- [1] 尹田夫, 1989, 热冲击蛋白的生物化学, 农业通讯, 11(1): 10~13
- [2] 邢成, 1989, 热休克蛋白的产生、分布及功能, 生物化学与生物物理进展, 15(6): 406~410
- [3] 杨申之等, 1986, 高等植物中的热刺激蛋白质, 植物生理学通讯, 4(1~2): 5~9
- [4] 梅尚筠、梅元星, 1988, 热休克蛋白的分子生物学, 生物化学与生物物理进展, 15(1): 11~15
- [5] 岩崎文雄, 1985, 同工酶在育种上的应用, 国外农业科技, (6): 8~10
- [6] 赵丽哲等, 1989, 大豆种间杂交亲本及 F_2 酯酶同工酶谱的研究, 华北农学报, 4(2): 44~49
- [7] 郝恩虎等, 1986, 大豆酯酶同工酶的研究, 中国油料, (2): 41~46
- [8] 梅尚筠等, 1988, 水稻的热休克蛋白, 华中师范大学学报《自然科学报》, 专辑第一期, 169~173
- [9] 钱永常等, 1989, 植物中的逆境蛋白, 植物生理学通讯, (5): 5~11
- [10] 王瑞先, 1989, 温室效应与 21 世纪全球气候, 灾害学, (3): 94~96
- [11] 1989, 大气中 CO_2 等微量物质对全球变暖的影响, 世界环境, (2): 9~10
- [12] H. E. Landsberg, 1989, 全球的气候趋势, 世界科学, 11(5): 10~12
- [13] 许忠仁等主编, 1989, 《大豆生理与育种》, 349~357
- [14] 虞京藏, 1983, 《大豆科学》, 2(2): 104~108

EFFECT OF HEAT SHOCK ON LIPASEIN HYPOCOTYL OF SEEDLINGS OF *Soja* —SUBGENUS SOYBEAN

Zhou Yuping

(Changchun Specil Education Normal School)

Yin Tianfu Liu Lijun

(Soybean Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences)

Abstract

The results showed that under ot 45°C (2h), 40°C (2h)—45°C (2h) and 40°C (2h)—26°C (2h)—45°C (2h) HS treatment, the fifth band of semi—wild soybean and the sixth band of cultivated soybean in area C of esterase zymogram were disappeared, size of the sixth band in area C of esterase zymogram of wild soybean became narrow, its colour became weaker, the new band on top of the main zymogram of area C of wild, semi—wild and cultivated soybean were formed, ot the same time, the othe bands were disappeared.

The responses of area A, B esterase zymogram of wild, srmi—wild and cultivated soybean to heat shock were not susitive.

At 26°C (control), 35°C (2h), 40°C (2h), the colours of the sixth band of the main esterase zymogram in area C of wild soybean became less deep gradually, with the increase of heat shock temperature. The colours of the fifth band of the main esterase zymogram band of the semi—wild soybean became deeper in area C. The colours of the sixth band of the main esterase zymogram band of cultivated soybean gave no regular change in area C.