

不同地理种群栽培大豆 HSP 诱导合成的研究^{*}

I 华北夏大豆与东北春大豆代表品种 HSP 诱导合成的比较

王 萍 尹田夫 宋海星 马淑英
李吉平 张让堂

(中国人民解放军农牧大学 长春 130062)

摘 要

本文对华北夏大豆齐黄 10 号和东北春大豆黑农 31 号的幼苗在 40℃ 条件下进行 2、4、6、8、10hr 热击处理,分析比较不同地理种群栽培大豆 HSP 诱导合成的种类与 HSP 累积量。SDS-PAGE 结果表明:各热击时间所合成的 HSP 种类均为华北夏大豆多于东北春大豆。干胶板 CS-9000 型薄层层析扫描仪扫描结果表明,各热击时间合成 HSP 的累积量华北夏大豆明显多于东北春大豆。华北夏大豆和东北春大豆均以热击 6hr 时 HSP 种类最多,并累积量最大。

关键词 HSP;大豆(*Glycin max*);地理种群

热击蛋白(Heat shock protein, HSP)是生物体受到不良环境条件(如高温)影响时诱导细胞合成的一类蛋白。热击蛋白最早是在果蝇中观察到的^[10]。后来证明,在逆境条件下,从细菌到人类都能诱导合成 HSP,热击反应是一种普遍的生物学现象。进行热击反应与 HSP 合成的研究对阐明热胁迫对动植物有机体的影响以及动植物体对热胁迫的反应具有一定的意义。高等植物 HSP 的研究起步较晚,始于 Baszcaynski 等(1982)^[6]对玉米的研究,但进展较快,已诱导合成大豆、玉米、水稻、大麦等作物的 HSP^[1,2,3,7,8,9,11,12],并对不同热击时间、热击方式、恢复时间等 HSP 的诱导合成进行了研究。

本研究首次以不同地理种群的栽培大豆为材料,比较分析华北夏大豆和东北春大豆 HSP 的诱导合成,以寻找不同地理种群栽培大豆对热击反应的规律,为进一步了解植物

* 本文于 1993 年 8 月 23 日收到。
This paper was received on Aug. 23, 1993.

耐热性形成机制,进而为探索培育耐高温作物品种的可能途径和方法提供依据。

材料与方法

一、材料

1. 供试栽培大豆品种

华北夏大豆 齐黄 10 号,由山东农科院经作所提供。

东北春大豆 黑农 31 号,由黑龙江农科院大豆所提供。

2. 标准蛋白质采用中国科学院上海生物化学研究所东风生化试剂厂分装进口的低分子量标准蛋白质。

| | | | |
|------------|--------|-------|------|
| 磷酸化酶 B | 94KD | 牛血清蛋白 | 67KD |
| 肌动蛋白 | 43KD | 碳酸酐酶 | 30KD |
| 烟草花叶病毒外壳蛋白 | 17.5KD | | |

二、热击处理

在 25℃ 恒温箱中催芽至 1.0~1.5cm 左右,热击温度 40℃,热击时间分别为 2、4、6、8、10hr,对照为 25℃ 处理 2hr。匀浆液于 12000rpm 离心 10min。

三、电泳

采用 Laemmli^[6] SDS-PAGE 方法。浓缩胶浓度 4%,分离胶浓度 10%,点样量 20μl。

0.25% Coomassie Blue 染色,凝胶图谱在透射光下拍照,室温制干胶板。

四、处理方法

1. 以张自立等人^[4]方法测定蛋白质分子量。

2. 干胶板用 CS-9000 型薄层层析扫描仪扫描,以峰面积表示可溶性蛋白质的含量以及 HSP 的累积量。

结果与分析

一、华北夏大豆与东北春大豆 HSP 合成种类的比较

在 40℃ 条件下,分别对齐黄 10 号和黑农 31 号热击 2hr 和 6hr 后进行 SDS-PAGE,测定可溶性蛋白质分子量,结果见表 1。

40℃ 热击 2hr 时,齐黄 10 号共有 11 条可溶性蛋白区带,其中新蛋白区带 7 条,分子量分别为 46KD、51KD、70KD、73KD、81KD、85KD 和 89KD。原有分子量为 30KD 和 33KD 的 2 条蛋白区带含量比对照有所增加,但增加量少于 1 倍。而 43KD 和 62KD 的 2 条蛋白区带含量比对照增加 1~5 倍。黑农 31 号有 5 条可溶性蛋白区带,其中新蛋白区带 2 条,分子量分别为 26KD 和 73KD。原有的可溶性蛋白只有分子量为 43KD 的蛋白区带含量比对照有增加,但增加量少于 1 倍,其余分子量为 30KD 和 54KD 的蛋白区带含量没有增加。

40℃ 热击 6hr,齐黄 10 号有 12 条可溶性蛋白区带。新蛋白区带增加到 8 条,分子量分

别为 26KD、27KD、46KD、51KD、70KD、73KD、77KD 和 87KD。原有 4 条蛋白区带含量比 40℃热击 2hr 时又有所增加,其中 43KD、62KD 的蛋白质含量比对照增加 5 倍以上。黑农 31 号有 10 条可溶性蛋白区带,新蛋白区带增加到 6 条,分子量分别为 22KD、24KD、33KD、73KD、81KD 和 90KD。原有 4 条可溶性蛋白质含量均有增加,以 58KD 蛋白质含量增加最多,达 5 倍以上。

表 1 齐黄 10 号与黑农 31 号 HSP 合成种类的比较

Table 1 Comparison of HSP types between Qihuang No. 10 and Heinong No. 31

| 热击处理 Heat shock | 品 种 Cultivars | 可溶性蛋白质 区带数(条) Soluble protein bands | 新 蛋 白 质 New proteins | | 蛋白累积强度 Protein accumulation | |
|--------------------|--------------------|--|-------------------------|-----------------------------|--------------------------------|---------------------------------|
| | | | 种 类 Types | 分子量(KD) Molecular weight | 分子量(KD) Molecular weight | 增 强 度* Enhancement intensity |
| 40℃ HS 2hr | 齐黄 10 号 Qihuang | 11 | 7 | 46、51、70、73、 81、85、89 | 30 | + |
| | | | | | 33 | + |
| | | | | | 43 | ++ |
| | | | | | 62 | ++ |
| | 黑农 31 号 Heinong | 5 | 2 | 26、73 | 30 | |
| | | | | | 43 | + |
| 40℃ HS 6hr | 齐黄 10 号 Qihuang | 12 | 8 | 26、27、46、51、 70、73、77、87 | 54 | |
| | | | | | 30 | + |
| | | | | | 33 | ++ |
| | | | | | 43 | +++ |
| | 黑农 31 号 Heinong | 10 | 6 | 22、24、33、73、 81、90 | 62 | +++ |
| | | | | | 30 | + |
| | | | | | 43 | ++ |
| | | | | | 54 | ++ |
| | | | | | 58 | +++ |

*: +表示蛋白质含量比对照增加<1 倍; ++表示蛋白质含量比对照增加 1~5 倍; +++表示蛋白质含量比对照增加>5 倍。

+ express enhanceemnt of protein less one times than that of contrast;

++ express enhanceemnt of protein 1~5 times than that of contrast;

+++ express enhanceemnt of protein more 5 times than that of contrast;

从上述分析可知,40℃热击 2hr 和 6hr,HSP 合成的种类和原有可溶性蛋白质含量的增加程度华北夏大豆齐黄 10 号均多于东北春大豆黑农 31 号。

二、不同热击时间对华北夏大豆 HSP 合成的影响

齐黄 10 号在 40℃条件下分别热击 2、4、6、8、10hr,表现出对热击的反应不同(见表 2、图 1)。

从表 2 和图 1 看出,随着热击时间的延长,新蛋白区带数呈增加趋势,并主要增加低分子量蛋白质,如 27KD、26KD 和 23KD。热击 6hr 时一些高分子量新蛋白区带消失,如 81KD 和 85KD。HSP 累积量占蛋白质量的百分比随着热击时间的延长也增加,以热击 6hr 时累积量达最大值,HSP 累积量占蛋白质量的 59.93%。随后,累积量迅速下降,热击 8hr 为 38.62%,热击 10hr 降至 15.06%。表现出 40℃6hr 热击反应最强烈。

表2 40℃条件下热击不同时间对齐黄10号HSP合成的影响

Table 2 Effect of different heat shock time on Hsp synthesis of Qihuang.No. 10 under 40℃

| 热击时间(hr) Heat shock time | 0(ck) | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 |
|--|-------|------------------------------|-----------------------------|---------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| 可溶性蛋白区带 Soluble protein bands | 6 | 11 | 12 | 12 | 12 | 11 |
| 新蛋白区带 New protein bands | — | 7 | 7 | 8 | 8 | 8 |
| 新蛋白分子量(KD) New protein molecular weight | — | 46,51,70, 73,81,85, 89 | 27,46,51, 70,73,85 89 | 26,27,46, 51,70,73, 77,87 | 23,26,27, 51,70,73 77,87 | 23,26,27, 51,70,73 77,87 |
| HSP 累积量(mm ²) Hsa accumulation | — | 40283.111 | 33882.583 | 123771.309 | 25751.149 | 3334.715 |
| HSP 累积量占蛋白质量的 百分比(%) Hsp accumulation rate | — | 39.93 | 40.11 | 59.93 | 38.62 | 15.06 |

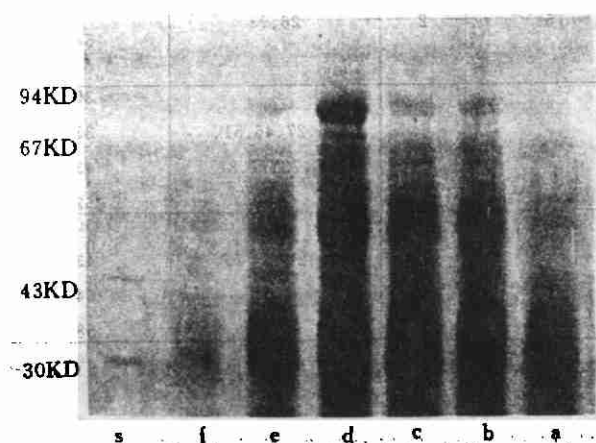


图1 40℃条件下热击不同时间齐黄10号 SDS-PAGE
Figure 1 SDS-PAGE of different heat shock time on Hsp
synthesis in Qihuang 10 under 40℃

a—25 2hr b—40℃ 2hr c—40℃ 4hr d—40℃ 6hr
e—40℃ 8hr f—40℃ 10hr s—standard protein

三、不同热击时间对东北春大豆HSP合成的影响

黑农31号40℃热击2、4、6、8、10hr,对热击反应不同(见表3)。

随着热击时间的延长,黑农31号新蛋白区带数随之增加,主要也是增加低分子量蛋白质,如24KD和22KD。HSP累积量随热击时间延长而增加,以热击6hr达最大值,为9128.393mm²。热击8hr HSP累积量与6hr相似(8125.197mm²)。当热击10hr时,HSP累积量迅速下降到1725.370mm²。表现出热击6hr时热击反应最强烈,热击10hr时HSP累积量急速下降。

表 3 40℃条件下热击不同时间对黑农 31 号 HSP 合成的影响
Table 3 Effect of different heat shock time on HSP synthesis
in Heinong No. 31 under 40℃

| 热击时间(hr) Heat shock time | 0(ck) | 2 | 4 | 6 | 8 | 10 |
|---|-------|----------|--------------------|-----------------------|-----------------------|--------------------|
| 可溶性蛋白区带 Soluble protein bands | 4 | 5 | 9 | 10 | 10 | 9 |
| 新蛋白区带 New protein bands | — | 2 | 5 | 6 | 6 | 5 |
| 新蛋白分子量(KD) New protein molecular weight | — | 26、73 | 26、33、73、 81、90 | 22、24、33、 73、81、90 | 22、24、33、 73、81、90 | 22、33、73、 81、90 |
| HSP 累积量(mm ²) Hsp accumulation | — | 678. 523 | 5889. 453 | 9128. 393 | 8125. 197 | 1725. 370 |

四、华北夏大豆与东北春大豆的 HSP 合成与累积量的比较

从表 2、表 3 可以看出,齐黄 10 号和黑农 31 号均随着热击时间的延长新蛋白区带数增加,并在热击 6hr 时出现的种类最多。在 40℃条件下分别热击 2、4、6、8、10hr 时,新蛋白区带数齐黄 10 号为 7、7、8、8、8 条,黑农 31 号为 2、5、6、6、5 条,在相同处理条件下,前者新蛋白区带数均高于后者。

齐黄 10 号和黑农 31 号的 HSP 累积量均随着热击时间的延长而增加。齐黄 10 号热击 2hr, HSP 累积量迅速增加。热击 4hr 与热击 2hr 累积量相似,热击 6hr,急剧上升,达最大值。热击 8hr 迅速下降,表现出 HSP 累积量的增加与减少速度快。与齐黄 10 号相比,黑农 31 号 HSP 累积量的增加与减少速度较平缓,即 HSP 累积量逐渐上升,又慢慢地下降。

讨 论

不同地理种群的栽培大豆在 40℃条件下热击 2、4、6、8、10hr,均表现出随着时间的延长 HSP 种类增多。在各相同的热击条件下所诱导合成的 HSP 种类数是不同的,但均以华北夏大豆 HSP 种类多于东北春大豆。同时,还发现华北夏大豆与东北春大豆所合成的 HSP 分子量也是不同的。随着热击时间的延长,华北夏大豆与东北春大豆 HSP 累积量均呈增加趋势。热击 6hr 时达最大累积量,之后下降。华北夏大豆的 HSP 累积量在各处理时间均高于东北春大豆,并且累积量增加与减少的速度华北夏大豆比东北春大豆快。总之,不论是 HSP 种类,还是 HSP 累积量,华北夏大豆均多于东北春大豆,表现为华北夏大豆对热击反应更强烈。

前人研究结果认为,当动植物体受高温胁迫时,细胞内一些大分子生物合成被抑制,同时启动新的基因,合成一类新的蛋白质,减轻细胞内微环境因外界逆境胁迫的伤害,从而使细胞维持新的平衡状态。当逐渐升高温度时,可使细胞诱导合成 HSP 保护正常蛋白质的合成,提高植物的“致死温度”。而突然热冲击,则抑制蛋白质和 HSP 的合成。华北夏大豆生长在温度较高的低纬度地区,得到了“热锻炼”,适应了该环境条件,形成特定种群,

可能因而导致了在热击处理时所产生的 HSP 种类和累积量均多于生长在较冷凉高纬度地区的东北春大豆。

华北夏大豆与东北春大豆当热击时间延长时, HSP 累积量的增加与减少规律不完全相同, 可能两者对热击反应的机理不同, 有待于进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 尹田夫, 1989, 农业生化通讯, 1(1): 10~13
- [2] 梅尚筠等, 1988, 华中师范大学学报(自然科学版)化学专辑, (1): 169~174
- [3] 周菊华等, 1990, 武汉植物学研究, 8(1): 87~100
- [4] 张自立等, 1990, 植物细胞和体细胞遗传学技术与原理, 399~405
- [5] Baszczynski, C. L. et al., 1982, Can J Biochem 60: 569~579
- [6] Laemmli, U. K., 1970, Nature 227: 680~685
- [7] Lin, C. Y. et al., 1984, Plant Physiol, 74: 152~160
- [8] Key, J. L. et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 3526~3530
- [9] Marmiroli, N. et al., 1986, Genet Agrar 40: 9~25
- [10] Ritossa, F., 1962, Experientia 18: 571~573
- [11] Schoeffl, F. et al., 1983, Plant Mol. Biol. 2: 269~278
- [12] Voinikov, V. K. et al., 1986, Fiziologiya Rastenii 33: 221~225

THE STUDY ON INDUCED SYNTHESIS HSP OF SOYBEAN (*G. max*) OF DIFFERENT GEOGRAPHICAL GROUPS

I Comparative Study on Induced Synthesis Hsp of Summer Soybean in North Chian and Spring Soybean in Northeast

Wang Ping Yin Tianfu Song Haixing Ma Shuying

Li Jiping Zhang Yangtang

(University of Agricultural and Animal Sciences of PLA)

Abstract

Summer soybean in north China, cultivar Qihuang No. 10, and spring soybean in Northeast cultivar Heinong No. 31, were treated with heat shock under 40°C for 2hr, 4hr, 6hr, 8hr, 10hr, for analysing comparatively the types and accumulation of HSP of soybean (*G. max*) of different geographical groups. The results indicated that types of Hsp of summer soybeans in North China were more than that of spring soybean in Northeast. Hsp accumulation of summer soybean in North China was obviously more than that of spring soybean in Northeast according to scanning dry gelationous plate with CS-9000 scanner. The Hsp types and Hsp accumulation of both summer soybean in North China and spring soybean in Northeast were planty 6hr with heat shock.

Key words HSP; Soybean (*G. max*); Geographical species group