

# 不同地理种群栽培大豆 HSP 诱导合成的研究\*

## IV. 华北夏大豆与南方春大豆 HSP 恢复的比较研究

马淑英 尹田夫\*\* 王萍 宋海星 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”和南方春大豆“苏 88-M19”在 40℃ 热击 2hr 后, 转到 25℃ 分别恢复处理 2、4、6、8、10hr。分析并比较了两者 HSP 的变化。结果表明: 随恢复期的延长, 两种大豆 HSP 的种类均在减少。累积量动态变化却有显著的区别, 在恢复 2hr 时, “齐黄 10 号”HSP 累积量急剧增加, 尔后至 10hr 时又逐渐减少; “苏 88-M19”恢复 2hr 时, HSP 累积量大幅减少, 尔后至 10hr 时又逐渐增加。

**关键词** 大豆(*Glycine max*); HSP; 热击恢复; 地理种群

热击蛋白(Heat Shock Protein HSP)是生物体受高温胁迫而产生的一种诱导蛋白。它的研究早见于 Tissierres (1974)<sup>[16]</sup>对黑腹果蝇 HSP 的报道。此后各国学者分别以不同材料, 从不同角度, 对 HSP 进行了广泛的研究<sup>[1-8, 10-13]</sup>, 发现 HSP 在生物界普遍存在; 同时研究已达到分子水平, HSP 与细胞骨架的联接<sup>[14]</sup>(Shiger, 1989); HSP 分子结构及作为分子伴侣(Chaperone)的作用机理<sup>[9]</sup>(Gething, 1992)等。然而 HSP 的恢复与其生态环境的关系至今尚未见文献报道。本文研究以华北夏大豆“齐黄 10 号”和南方春大豆“苏 88-M19”两种不同地理种群栽培大豆为材料, 对 HSP 的恢复与其自然生态环境的关系进行了初步探讨, 试图为培育耐热优良大豆品种提供理论依据。

\* 国家自然科学基金资助项目

\*\* To whom correspondence should be addressed

本文于 1994 年 11 月 7 日收到。

This paper was received on Nov. 7, 1994.

## 材料和方法

### 一、材料

#### 1. 供试大豆品种

长江中下游生态区栽培春大豆“苏 88—M19”，由江苏省农业科学院经作所提供。

黄河下游生态区栽培夏大豆“齐黄 10”由山东农科院经作所提供。

#### 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、方法

将精选的大豆籽粒消毒后，置于 25℃ 恒温箱中浸种，催芽。当幼根长约 1.0—1.5cm 左右，取 1cm 长根尖用于实验。

热击温度 40℃，热击 2 小时后，置 25℃ 恒温箱恢复培养 2、4、6、8、10hr。然后冰浴研磨，匀浆液煮沸 5min，并于 12000r. p. m 离心，取上清液存于 -20℃ 备用。电泳及扫描等其它方法同 I 报<sup>[1]</sup>。

## 结果与分析

### 一、华北夏大豆“齐黄 10 号”不同恢复期 HSP 的变化

齐黄 10 号在 40℃ 热击处理 2hr 后，转到 25℃ 恢复培养 2、4、6、8、10hr，HSP 的变化如表 1 及图 1 所示。

由表 1 及图 1 均可以看到，HSP 在最初 2hr 恢复期内，其种类没有任何变化，而累积量有较大幅度的增加，2hr HSP 累积量为 28563.652mm<sup>2</sup>。随着恢复期的延长，HSP 的种类逐渐减少，恢复到 4hr，低分子量的 HSP46KD 全部消失。恢复到 10hr，除 73KD 外其它高分子量的 HSP 也全部消失。HSP 累积量从恢复期 2hr 开始到 4hr 急剧减少，4hr 后 HSP 累积量减少缓慢。可溶性蛋白在恢复期 6hr 累积量最低，为 10544.860mm<sup>2</sup>，然后又逐渐增加。

表 1 25℃条件下齐黄 10 号不同恢复期 HSP 的变化

Table 1 Change of different recover time on HSP of Qihuang No. 10 under 25℃

恢复时间 Recover time	0(ck)	2	4	6	8	10
HSP 区带 Bands of HSP	7	7	5	2	2	1
现存分子量(KD) Present HSP molecular weight	89,85,81,73,89,85,81,73, 70,51,46	89,85,81,73, 70,51,46	89,85,73, 70,51	73,51	73,51	73
消失的 HSP 的区带 Bands of disapper HSP	—	—	2	5	5	6
消失的 HSP 的分子量(KD) Molecular weight of disapper HSP	—	—	81,46	89,85,81, 70,46	89,85,81, 70,46	89,85,81, 70,51,46
HSP 累积量(mm <sup>2</sup> ) HSP accumulation	13012.906	28563.652	2652.518	2407.812	1652.64	893.949
可溶性蛋白累积量(mm <sup>2</sup> ) Soluble protein accumulation	346986.400	324108.200	65856.380	10544.860	65939.750	34606.560

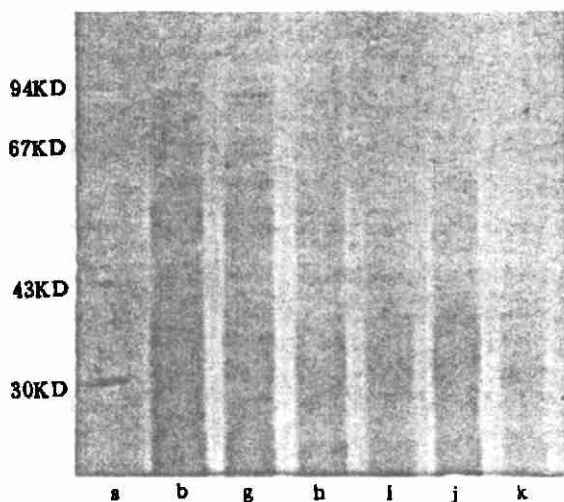


图 1 25℃条件下热击恢复不同时间齐黄 10 号 SDS-PAGE

Fig. 1 SDS-PAGE of different recover time on HSP of Qihuang No. 10 under 25℃

b—40℃2hr      g—25℃2hr      h—25℃4hr  
i—25℃6hr      j—25℃8hr      k—25℃10hr

## 二、南方春大豆“苏 88—M19”不同恢复期 HSP 的变化

苏 88—M19 在 40℃热击处理 2hr 后,转到 25℃恢复培养 2、4、6、8、10hr, HSP 的变化由表 2 可见。

由表 2 看出, HSP 随恢复时间增加其种类在减少。到 6hr 时, 高分子量的 HSP 全部消失, 而低分子量的 HSP (35KD 和 24KD) 却一直很稳定, 至 10hr 时仍存在。HSP 的累积量在恢复期的开始 2hr 内下降很快, 由 193609.87mm<sup>2</sup> 下降到 2618.905mm<sup>2</sup>, 然后在 2—10hr 恢复期内又逐渐增加。恢复 4hr 时, 可溶性蛋白累积量最低为 102724.690mm<sup>2</sup>, 然后又逐渐增加。

表 2 25℃条件下苏 88—M19 不同恢复期 HSP 的变化

Table 2 Change of different recover time on HSP of Shu88—M19 under 25℃

恢复时间(hr) Recover time	0(ck)	2	4	6	8	10
HSP 区带 Bands of HSP	6	3	3	2	2	2
现存 HSP 分子量(KD) Present HSP molecular weight	81,70,67, 64,35,24	64,35,24	64,35,24	35,24	35,24	35,24
消失的 HSP 的区带 Bands of disapper HSP	—	3	3	4	4	4
消失的 HSP 的分子量(KD) Molecular weight of disappeared HSP	—	81,70,67	81,70,67	81,70, 67,64	81,70, 67,64	81,70, 67,64
HSP 累积量(mm <sup>2</sup> ) HSP accumulation	193609.87	2618.905	7488.518	19165.046	21564.268	22819.796
可溶性蛋白累积量(mm <sup>2</sup> ) Soluble protein accumulation	268902.600	144269.100	102724.690	285110.300	210773.400	191592.400

三、华北夏大豆“齐黄 10 号”与南方春大豆“苏 88—M19”HSP 恢复的比较

在 25℃时,分别对两种大豆材料热击恢复 2、4、6、8、10hr,齐黄 10 号与苏 88—M19 的 HSP 种类和累积量都有所不同,如表 3

表 3 齐黄 10 号与苏 88—M19 HSP 变化的比较

Table 3 Comparison of HSP between Qihuang No. 10 and Shu 88—M19

恢复时间 (hr)		0(CK)	2	4	6	8	10
品 种							
齐黄 10 号 Qihuang No. 10	种类 Types	7	7	5	2	2	1
	累积量 Accumulation	13012.906	28563.625	2652.518	2407.812	1652.64	893.949
苏 88—M19 Shu 88—M19	种类 Types	6	3	3	2	2	2
	累积量 Accumulation	193609.87	2618.905	7488.518	19165.046	21564.268	22819.796

由表 1、2、3 说明,在 2hr 恢复期时,齐黄 10 号 HSP 种类没有变化,HSP 累积量增加到 219.5%;苏 88—M19 的 HSP 减少 3 种,即 HSP 81KD、70KD、67KD 消失,HSP 累积量减少到 1.4%。在 4hr 恢复期时,齐黄 10 号 HSP 减少 2 种,即 HSP 81KD、46KD 消失,HSP 累积量减少到原来的 20.40%;苏 88—M19 HSP 种类没有变化,HSP 累积量增加到原来的 3.90%,在 6hr 恢复期时,齐黄 10 号 HSP 减少 3 种,即 HSP 89KD、85KD、70KD 消失,HSP 累积量为原来的 18.50%;苏 88—M19HSP 减少 1 种,即 HSP 64KD 消失,HSP 累积量为原来的 9.90%。在 8hr 恢复期时,两种大豆的 HSP 种类均没有改变,累积量齐黄 10 号减少到原来的 12.70%;苏 88—M19 HSP 累积量却增加到原来的 11.10%。在 10hr 恢复期时,齐黄 10 号 HSP 减少 1 种,即 HSP 51KD 消失,HSP 累积量减少到原来的 6.90%;苏 88—M19HSP 种类仍无变化,HSP 累积量增加到原来的 11.80%。

总之,华北夏大豆齐黄 10 号 HSP 随恢复期的延长,种类逐渐减少,低分子量的 HSP 消失的较早;HSP 的累积量在开始 2hr 内骤增,2—4hr 内骤减,尔后均缓慢减少。南方春大豆苏 88—M19 HSP 种类开始减少很快,然后较缓慢,高分子量 HSP 消失较早,在 4hr 时全部消失,而低分子量 HSP 种类没变化;HSP 累积量在恢复期 2hr 内骤减,在其它恢复时间,其中 4—6hr 内增加速度较快,如图 2。

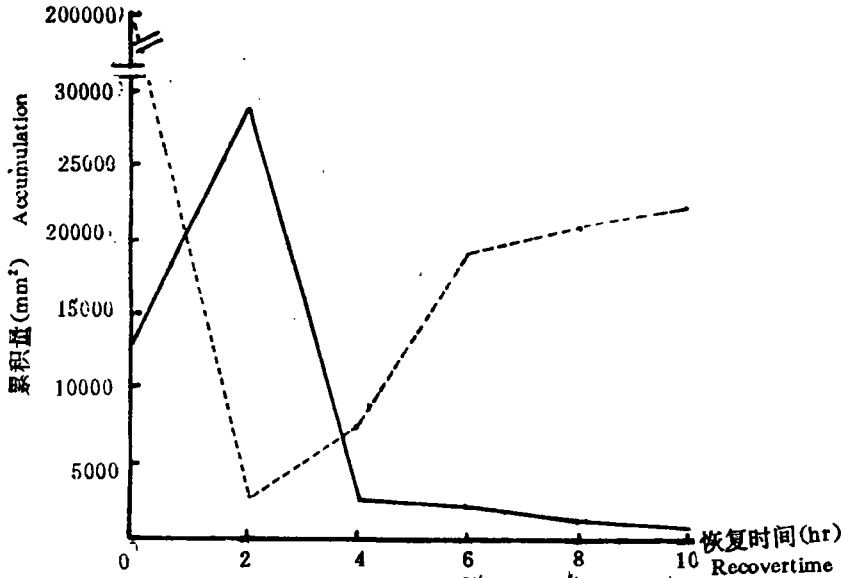


图 2 不同恢复期 HSP 累积量的变化

Fig. 2 Changes of accumulation of HSP at different recover time

——齐黄 10 号 (Qihuang No. 10)      .....苏 88—M19 (Shu 88—M19)

由此可看出,相同的热击恢复条件,不同生态环境的大豆 HSP 变化有差异。

## 讨 论

不同地理种群的大豆在热击(40℃)条件下,均产生 HSP,再于 25℃ 条件下处理,又出现 HSP 恢复现象。但由于两种大豆(齐黄 10 号,苏 88—M19)所处的自然生态环境不同,其 HSP 的恢复能力有显著的差异。

在恢复期 2hr 内,齐黄 10 号的 HSP 种类没有减少,累积量增加到 219.5%,而苏 88—M19 的 HSP 种类减少 3 种,累积量减少到 1.4%。这表明华北夏大豆(齐黄 10 号)HSP 的合成对热胁迫不如南方春大豆(苏 88—M19)敏感;同时从热击(40℃)2hr HSP 的累积量也可看出(齐黄 10 号 HSP 累积量为 13012.906mm²,苏 88—M19 HSP 累积量为 193609.89)。这可能因为华北夏大豆生育期间的气温逐渐降低,耐热锻炼较少,而南方春大豆生育期间的气温逐渐升高,得到了“热锻炼”,由于长期自然选择的结果,南方春大豆耐热性提高,适应了环境,这也说明了 HSP 可能是生物体为适应环境,保护自身免受伤害而产生的保护蛋白。

华北夏大豆(齐黄 10 号)从恢复期 2hr 以后,HSP 累积量逐渐下降,10hr 时为开始时的 6.9%,而南方春大豆(苏 88-M19)从恢复期 2hr 以后,HSP 累积量逐渐增加,到 10hr 时为开始时的 11.80%。由此可见华北夏大豆在其自然生态环境下没有或很少产生 HSP;而南方春大豆在其较高温度的自然生态环境下,逐渐形成特定种群,自身可产生少量 HSP。这可能也是南方春大豆 HSP 比华北夏大豆 HSP 恢复慢的原因之一。

华北夏大豆(齐黄 10 号)在恢复期 10hr 时,只有 73KD HSP 存在,但累积量一直减少;南方春大豆(苏 88-M19)在恢复期 10hr 时,35KD HSP 一直存在,且累积量随恢复期的延长而逐渐增加。这一情况在绿豆 HSP 恢复中也存在<sup>[3]</sup>。虽然还不清楚各种 HSP 的确切功能,但有学者认为:高分子量 HSP 在细胞中主要起结构作用,增强细胞对逆境的耐受能力和恢复能力<sup>[16,17]</sup>。低分子量的 HSP 主要起调节作用<sup>[5]</sup>。不同生态环境的大豆 HSP 恢复状况有差异,南方春大豆在热击恢复 10hr 时,其 HSP 种类和累积量都多或高于华北夏大豆。两者对热击恢复的差异与其自然生态环境有密切关系,至于其机理有待于进一步研究。

### 参考文献

- [1] 王萍等,1994,大豆科学,13(2):171-176
- [2] 尹田夫等,1989,农业生化通讯,1(1):10-13
- [3] 刘德立等,1991,华中师范大学学报(自然科学版)25(3):329-334
- [4] 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
- [5] 周菊华等,1990,武汉植物学研究,8(1):87-100
- [6] 张孔恬等,1986,遗传学报,13(4):266-276
- [7] Ashburner, M. et al., Cell 1979. 17:241-254
- [8] Baszczyński, C. L. et al., 1982, Can J Biochem 60:569-579
- [9] Gething, M. J. and Sambrook, J. (1992) Protein folding in the cell. Nature 355:33-45
- [10] Laemmli, U. K., 1970, Nature 227:680-685
- [11] Lin C. Y. et al., 1984, Plant Physiol, 74:152-160
- [12] Key, J. L. et al., 1981, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78:3526-3530
- [13] Marmiroli, N. et al., 1986, Genet Agrar 40:9-25
- [14] Shiger Koysau, Eisuke Nishida, Yoshihiko. Migata eta (1989), HSP 100, a 100-KD heat shock protein, a  $Ca^{2+}$ -Calmodulin-regulated actin-binding proteins J. Biol. Chem. 264:15083-15087
- [15] Schlesinger M. J. J Cell Biol, 1986, 103:321-325
- [16] Tissieres A. et al., J. Mol Biol, 1974, 84:389
- [17] Vincent M, Tanguay, R. M., J Mol Biol, 1982, 162:365

## THE STUDY ON INDUCED SYNTHESIS HSP OF SOYBEAN (*G. MAX*) OF DIFFERENT GEOGRAPHICAL ORIGINATION

### IV Comparative Study on Recover HSP of Summer Soybean in North China and Spring Soybean in South

Ma Shuying Yin Tianfu Wang Ping  
Song Haixing 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 South, cultivar Shu 88—M19, were treated with heat shock under 40℃ for 2hr, Then put them under 25℃ 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 the types of HSP of both soybean were lessen with the prolonging of recover time. Accumulation of HSP of soybean was obviously different. Accumulation of HSP of Qihuang No. 10, was suddenly increase of recovering for 2hr. And it decreased gradually until 10hr of recovering time. Accumulation of HSP of Shu 88—M19 was suddenly decreased of recovering for 2hr. And it increased gradually until 10hr of recovering time.

**Key words** Sobyean (*Glycine max*); HSP; Recover of Heat shock; Geographical groups