

大豆种子贮藏蛋白的研究概况^{*}

许 月 朱长甫 石连旋 盛艳敏 苗以农

(东北师范大学生命科学院, 长春 130024)

GENERAL REVIEW IN THE STUDY OF THE SOYBEAN SEED STORAGE PROTEIN

Xu Yue Zhu Changfu Shi Lianxuan Sheng Yanmin Miao Yinong

(School of Life Sciences, Northeast Normal University, Changchun 130024)

大豆种子中贮藏有丰富的蛋白质,其含量约为种子总重量的 40%,在有的野生大豆中甚至达到 55%。这些贮藏蛋白(storage protein)包括球蛋白(globulin)(约 60–70%)、白蛋白(albumin)(约 20%)、胰蛋白酶抑制剂(trypsin inhibitor)(约 5–10%)、植物凝集素(phytochmaglutinins)(约 3%)、蛋白酶(proteases)和磷酸酶(phosphatases)等几种类型^[26]。大豆种子贮藏蛋白中大部分是球蛋白,它主要包括豆球蛋白(legumin)又称大豆球蛋白(glycinin)和豌豆球蛋白(vicilin)又称伴大豆球蛋白(canglycinin)两种类型,经蔗糖密度梯度离心,其沉降系数分别为 11S 和 7S,所以又分别被称为 11S 蛋白和 7S 蛋白,这两种蛋白共占种子蛋白总量的 70%,是大豆种子贮藏蛋白的主要成分。此外,人们又在大豆及其它豆类种子中发现一种 2S 蛋白^[16–42],它不完全是贮藏蛋白,其中的主要成分有蛋白酶抑制剂的活性^[25]。

11S 蛋白在 SDS-PAGE(SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳)时可分为酸性和碱性两类亚基,其总数多达 10 余个,确切数目众说不一。Kitamura 等(1976)^[23]报道至少有 4 种不同的碱性亚基(B₁–B₄)和酸性亚基(A₁–A₄),B₁:B₂:B₃:B₄为 1:1:2:2, A₁:A₂:A₃:A₄为 1:1:2:2 而 Badley(1975)^[11]的电镜研究证明:11S 蛋白有 12 个亚基,包装为两个六边形的圆柱桶状的扁圆体。

7S 蛋白包括两种类型:β-球蛋白(β-conglycinin)和 γ-球蛋白(γ-conglycinin),其中 β-球蛋白是主要的存在形式。在 SDS-PAGE 时,7S 蛋白可分为三个亚基:α'(83Kd)、α(76Kd)和 β(53Kd),它们以同源或异源的三聚体形式存在^[20]。Thanh 和 Shibasaki(1977, 1978)^[39–40]把 7S 蛋白分成 6 种异构体(B₁–B₆):B₁,α'ββ; B₂,αββ; B₃,αα'β; B₄,ααβ; B₅,ααα; B₆,ααα。这些异构体在氨基酸比例和碳氢比例上都稍有不同。

2S 蛋白在圆盘电泳上可分为 6 个带,其中 α₂ α₃ α₄ 3 个带为主带,占全部 2S 蛋白的 80%。

* 收稿日期 1998-01-08 This paper was received on Jan. 8, 1998.

大豆种子贮藏蛋白在种子形成过程中逐渐合成和积累,又在种子萌发过程中逐渐降解,这些贮藏蛋白为大豆幼苗的萌发提供了氨基酸和氮的主要来源;同时,大豆种子贮藏蛋白也是一种重要的食用植物蛋白,它营养价值丰富、全面,应用前景十分广阔;此外,大豆种子贮藏蛋白基因表达调控机制的研究也是一个有价值的课题。所以,进行大豆种子贮藏蛋白的研究是十分必要且有意义的。下面仅就大豆种子贮藏蛋白的合成和积累、营养价值及其基因表达的调控机制的研究情况进行简要的介绍。

1 大豆种子贮藏蛋白的合成和积累的研究

大豆种子贮藏蛋白主要在发育的大豆子叶中合成,并以蛋白体形式沉积。首先 mRNA 指导的 11S 和 7S 蛋白在粗面内质网上合成,其中 11S 蛋白的 mRNA 并不分别指导 40Kd 亚基和 20Kd 亚基的合成,而是只合成 60Kd 的前体,这个前体含有一个短信号肽,它引导蛋白质进入粗面内质网内腔;当 7S 和 11S 蛋白分泌进入内质网膜腔内时,7S 蛋白进行糖基化,而 11S 蛋白不进行糖基化;此后,7S 和 11S 蛋白通过液泡膜进入液泡,同时大液泡通过液泡膜分隔、一些部位的缢缩和出芽三种方式形成小液泡。郑易之等 (1990)^[6] 提出蛋白质在液泡中积累有三种方式:在一类液泡中,蛋白质逐渐沉积在液泡膜的部分内表面,这部分膜及其附着的蛋白质以出芽方式形成蛋白体;在另一类液泡中,蛋白质聚集成团块,游离于液泡之中,只有少量蛋白质沉积在液泡膜上;还有一类液泡,其中含有絮状、呈均匀分布的蛋白质。在液泡中,11S 蛋白前体分解为酸性多肽和碱性多肽,然后酸性多肽和碱性多肽结合成为 11S 蛋白质分子,最后 11S 蛋白和糖基化的 7S 蛋白结合在同一个蛋白体中。陈敏等 (1987)^[3] 对栽培、半野生和野生大豆种子发育过程中贮藏蛋白的合成和运输进行了比较研究,发现:栽培大豆子叶细胞内蛋白质发育为单点中心式,野生大豆子叶细胞内蛋白体的形成为多点边缘式;栽培大豆种子贮藏蛋白合成、运输不同步,主要以内质网膨胀小泡形式在子叶细胞内运输贮藏蛋白至沉积部位,野生大豆内质网直接与蛋白体相连,而且有高尔基囊泡和内质网分泌泡为细胞内贮藏球蛋白运输的另一途径,加快了贮藏蛋白在子叶细胞内的运输。

关于大豆种子贮藏蛋白积累的时间进程的报道较多^[1 2 7 18 20 30]。一般认为 7S 蛋白在开花后 15-20 天时开始逐渐合成,同时或 3-5 天后 11S 蛋白开始缓慢积累,此后这两种蛋白的含量先是明显增加,然后增加又趋缓慢,最后增加停止,整个蛋白质绝对含量的增加速率呈现先慢后快,最后又趋缓慢的 S 型曲线。Meinke 等 (1981)^[30] 通过 SDS-PAGE 和 DNA-RNA 杂交方法分析种子发育时 7S 和 11S 蛋白的积累情况,发现:11S 的酸性和碱性亚基及 7S 的 α' 和 α 亚基在授粉后 18-20 天就开始积累,但 7S 的 β 亚基和 11S 的 A_4 亚基的积累比前者要迟 1-2 周,其出现次序如下:最早是 7S 的 α' 、 α 亚基,其次是 11S 的酸性和碱性亚基,最后是 7S 的 β 亚基和 11S 的 A_4 亚基。Meinke 等 (1981)^[30] 还发现胚轴和子叶积累蛋白质的情况有差异,每 mg 胚轴积累的脲酶和 7S 的 α' 亚基与子叶积累的相等,但胚轴中 7S 的 α 亚基和 11S 蛋白含量却很低,而 7S 的 β 亚基和 11S 的 A_4 亚基在胚轴中几乎没有积累。这些情况表明:大豆种子贮藏蛋白基因的表达在时间和空间上受发育的控制。

许守民等 (1994)^[1 2] 对高、低蛋白质含量的两种栽培大豆和两种野生大豆分别进行比较,发现栽培和野生大豆的高蛋白含量均与其种子发育过程中较早较快的贮藏蛋白合成

及积累速率。液泡中高效的蛋白贮藏方式及蛋白体在子叶细胞中占有较大体积相联系。他们的研究揭示了高、低蛋白含量的两种栽培大豆和两种野生大豆在贮藏蛋白合成、部分亚基合成积累的时间顺序以及蛋白体发育方面存在着差异,但这些差异是否具有普遍性还有待进一步研究

2 大豆种子贮藏蛋白的营养价值的研究

大豆种子不仅含有丰富的蛋白质,而且含有种类齐全的氨基酸,特别是含有 8 种人体必需的氨基酸,其中禾谷类蛋白中较缺乏的赖氨酸的含量较丰富,而含硫氨基酸的含量较少,这直接影响到大豆种子贮藏蛋白的营养品质。因此,提高大豆种子贮藏蛋白中含硫氨基酸的相对含量,使其氨基酸平衡,对于提高大豆营养品质和蛋白利用率具有重要意义。

大豆种子中含硫氨基酸的多寡主要由遗传因素决定。大豆种子贮藏蛋白由白蛋白、球蛋白等多种蛋白质组成,这些蛋白质又分别由不同的亚单位组成,这些亚单位因其结构基因的差异而具有不同的氨基酸组成,所以各种蛋白质中含硫氨基酸的多寡也就各不相同^[4]。Kapoot 和 Gupat (1977)^[22]经测定指出:大豆球蛋白含有种子全部甲硫氨酸的 73%,含有种子全部色氨酸的 71%,白蛋白含有种子全部甲硫氨酸的 16%,含有种子全部色氨酸的 20%,不同基因型之间在各种蛋白组分比例上存在差异。另外,大豆球蛋白的 7S 和 11S 蛋白的氨基酸组分有很大差异,11S 蛋白含硫氨基酸含量远高于 7S 蛋白,所以通过筛选富于 11S 蛋白的种子来选育优质蛋白的品种是一个很好的途径^[5-32]。Kitamura 和 Kaizuma (1981)^[24]已找到 11S/7S 比值高的品系,11S/7S 分别为 2.59 和 1.61,其含硫氨基酸比普通大豆高 1.2 倍。徐豹等 (1993)^[8]在对 104 份野生大豆的含硫氨基酸含量进行测定后,获得了 5 份高硫氨基酸的优质种质,其中含硫氨基酸含量最高达 3.253g/16gN,远高于联合国粮农组织规定的标准蛋白的氨基酸含量 3g/16gN 可见,通过扩大筛选获得更多高含硫氨基酸的种质是极有可能且意义重大的。

决定大豆种子中含硫氨基酸的多寡的不仅仅是遗传因素,还有环境因素,尤其是硫的水平对其有很大影响。Holowach 等 (1984)^[21]用实验证明:外源甲硫氨酸可提高大豆子叶中蛋白质的甲硫氨酸含量,而且可增加 11S/7S 的比值。Gayler 等 (1985)^[19]指出:在缺硫的情况下,大豆种子贮藏蛋白的 α 及 α' 亚基的蓄积量基本不变,而 β 亚基的蓄积量增加了大约 3 倍。另外,将大豆未成熟子叶在添加甲硫氨酸的培养基中进行体外培养时, α 及 α' 亚基的基因表达没有变化,而 β 亚基的基因表达却受到完全抑制^[9]。 β 亚基基本不含甲硫氨酸,其含硫氨基酸的含量特别低,是 11S 蛋白含硫氨基酸含量的 1/3 可见,硫的水平对大豆种子贮藏蛋白的氨基酸组成和含硫氨基酸的多寡有很大影响。除此而外,氮对大豆种子贮藏蛋白的含硫氨基酸的多寡也有很大影响。Peak 等 (1997)^[33]的研究表明:氮的形式可以影响 7S 蛋白中 β 亚基的含量和 11S/7S 的比值,进而影响到含硫氨基酸的多寡。用稳定的 N_2 作为唯一氮源,大豆种子贮藏蛋白的含量减少 5%,各亚基含量均有所下降,7S 蛋白,尤其是 β 亚基的含量下降幅度大于 11S 蛋白;而若用还原的氮替代 NO_3^- 作为氮源,大豆种子贮藏蛋白的含量增加 4%, β 亚基的含量相应增加,而 α 及 α' 亚基含量不受氮形式变化的影响^[33]。我们已经知道 β 亚基含硫氨基酸的含量低,由此推断:氮是影响大豆种子中含硫氨基酸多寡的又一重要因素。

含硫氨基酸缺乏使大豆的营养价值大大降低,多年来人们一直试图通过育种使其得

以改善,其中诱发突变体是重要的方法之一。但是,这些努力尚未取得完全成功。目前较为有效可行的方法是利用基因工程改善大豆贮藏蛋白基因,但这方面的工作要建立在在大豆贮藏蛋白基因表达调控的研究的基础上。

3 大豆种子贮藏蛋白基因表达的调控的研究

近年来,关于大豆种子贮藏蛋白基因表达的调控的研究正在逐渐深入,主要的研究方法如下:首先,通过导入基因来研究基因表达的特异性;其次,在体外使启动子序列发生变异,通过观察对基因表达的影响来测定与基因表达调控有关的顺式作用元件;然后,根据体外凝胶转移分析法来测定反式作用因子。下面就以 α' 及 β 基因为中心,探讨一下在研究种子贮藏蛋白基因表达调控机制的过程中出现的问题。

3.1 转基因方法系的建立

在研究植物的基因表达的调控时,常用转基因植物作为实验材料,但是育成转基因植物需花费一定的时间,而且在实验室中较易进行基因重组的植物种很有限^[35];此外,导入的外源基因的表达又受到位置效应的影响^[34]。所以,必须综合多个转基因植物个体的结果进行判断,尤其是在测定启动子内的顺式作用元件时,必须构建多种转基因植物。这样又出现了新的困难,实验材料制作起来太费时费力。目前解决这一困难的方法是:将外源基因直接导入植物细胞,从而研究基因瞬时的表达。实际上很多基因都是随着原生质体电击法等转基因方法系的建立而被解析的^[28-38],在种子贮藏蛋白基因的研究中也有试用转基因表达系测定顺式作用元件的例子。研究编码玉米种子贮藏蛋白-玉米醇溶蛋白(zein)的基因表达调控中用了转基因方法系,将19Kd玉米醇溶蛋白的基因导入胡萝卜培养细胞制备的原生质体中时,发现具有转录活性,通过这种方法研究启动子5'端缺失变异的效果,得出SV40含有增强子核心序列的区域对转录活性有很重要的意义^[36-43]。

用电击法将7S蛋白基因导入大豆、日日草及烟草的培养细胞及烟草叶肉细胞的原生质体中时,发现 α' 、 β 以及所有基因的表达活性都很高,其表达量几乎可与35S启动子媲美,但另一方面,大豆植物原有的硫素营养应答性与ABA应答性消失^[17]。后来对19Kd玉米醇溶蛋白基因也用导入同一基因家族的基因得到的转基因植物测定顺式作用元件,结果与用转基因植物表达系的结果不同,SV40含有增强子核心区域的缺失对表达量没有明显的影响^[29]。另外, α' 基因的启动子也有与SV40的增强子核心相同的序列,但这个领域的缺失对转基因植物的基因表达没有影响^[14]。这些结果表明:以培养细胞的原生质体为材料的转基因方法系使种子贮藏蛋白基因的组织特异性消失,而且其表达调控的模式也发生变化。

3.2 转基因植物系的建立

用转基因植物进行的研究表明:将从高等植物中得到的基因导入异种植物中时,其基因表达的方式依然不变^[4]。种子贮藏蛋白基因也不例外,7S蛋白基因是转基因植物研究中所采用的最早的种子贮藏蛋白基因。 α' 基因被导入烟草中,得到了其表达具有种子特异性的结论^[13]。用转基因的方法测定了在种子成熟过程中矮牵牛 α' 基因与 β 基因表达的时间进程,发现与大豆的表达模式非常相象,即 α' 与 β 基因的mRNA表达数日停留在较低水平^[31]。另外,转基因植物烟草与大豆一样, β 基因在子叶中的表达量比胚轴中的表达量高^[12]。由以上可推测:转基因植物中的7S蛋白基因与大豆的7S蛋白基因受着相同的组

织特异性及时期特异性的基因表达的调控。

另外,我们已经知道大豆 β 亚基基因的表达受硫素营养的影响^[19 21],大豆根据硫营养的多少改变所合成的种子贮藏蛋白的组成,这种硫素营养对种子贮藏蛋白的调控在其它植物中也存在^[37],因此推测:对硫素营养的应答机制是普遍存在的。

3.3 顺式作用元件的研究

顺式作用元件的研究是以 α' 基因为中心进行的。首先得到 α' 基因启动子区域5'端缺失的变异株;然后利用转基因烟草研究此变异株的基因表达,测定与基因表达调控有关的顺式作用元件。结果表明:转录起始点上游-257bp序列的表达量与含有更长区域的基因表达量相同;如果此序列变短,则表达量下降;而只具有转录起始点至-69bp序列的启动子几乎不能转录^[14]。因此推测:-257~-69bp之间存在着决定转录量的重要的顺式作用元件。分析这个DNA序列,发现ANCCCA出现5次,由此推测此序列对启动子的活性有一定的作用^[14]。切除-257~-79bp区域,将其插入到花椰菜花叶病毒35S启动子的-90位置,构建成嵌合体启动子,再将嵌合体启动子连接上CAT(氯霉素乙酰转移酶)报告基因,导入到烟草中,测定所得的转基因植物烟草中CAT报告基因的活性,发现:在叶中的表达量与35S启动子相同,在种子中的表达量比未插入此序列时增加数十倍^[15]。将这个DNA片段插入到报告基因的下流或逆向插入时也都有促进种子中基因表达的作用,由此推测 α' 启动子DNA的-257~-79bp序列不仅是本身转录所必需的,而且也可促进异种启动子在种子中的表达,即具有种子特异的增强子的活性^[15]。将 α' 亚基基因和 β 亚基基因克隆在一个质粒上转入植物,发现 β 亚基的表达会提高很多,这个实验也证明了 α' 基因启动子区域具有增强子活性的结论^[31]。

3.4 反式作用因子的研究

以 α' 及 β 基因的上游序列为探针,利用转膜分析技术,测定出了大豆未成熟子叶的粗核抽提液部分中存在具有DNA结合活性的因子-SEF(大豆胚性因子, Soybean embryo factor)。经测定,SEF在大豆成熟中期到后期具有活性,因此,它可能与S蛋白基因的表达调控有关^[10 27]。在SEF中检测出SEF1~4四个结合活性,其中SEF1 SEF3 SEF4都是识别特定的碱基序列的结合因子。通过足迹法等实验证明:SEF1与ATATTTA(T/A)序列,SEF3与AADDDA... (27bp)... AADDDA序列,SEF4与(A/G)TTTTT(A/G)序列特异地结合^[10]。这些因子的结合活性随大豆种子的成熟程度而改变,这与 α' 基因的表达量随时间变化有关,说明这些因子与转录调控有关^[27]。此外,SEF2基因在大肠杆菌的DNA中也容易找到同源DNA,因此碱基序列的特异性低^[10]。据推测,SEF3是与种子特异的增强子活性有关的反式作用因子^[10],但尚不能确定。

综上所述,大豆种子贮藏蛋白的合成、积累及营养价值的研究已逐渐深入到基因表达调控的水平,可见基因表达调控的研究仍是今后研究的重要课题。

参 考 文 献

- [1] 许守民, 苗以农, 朱长甫, 刘学军, 徐豹, 郑惠玉, 1994, 植物学报, 36(2): 111-115
- [2] 许守民, 苗以农, 朱长甫, 刘学军, 徐豹, 郑惠玉, 1994, 植物学报, 36(5): 380-384
- [3] 陈敏, 苗以农, 唐树延, 1989, 大豆科学, 8(2): 153-157

- [4] 林忠平, 尹光初, 1983, 大豆科学, 2(2): 232- 238
- [5] 林忠平, 尹光初, 雷勃钧, 1985, 科学通报, 30 462- 465
- [6] 郑易之, 何孟元, 胡阿林, 郝水, 1990, 植物学报, 32(2): 97- 102
- [7] 郑易之, 何孟元, 郝水, 1992, 植物学报, 34(6): 641- 644
- [8] 徐豹, 张明, 路琴华, 庄炳昌, 常碧影, 1993, 大豆科学, 12(3): 265- 266
- [9] 南川隆雄, 1991, 植物细胞工学, 3 568- 576
- [10] Allen, R. D., F. Bernier, P. A. Lessard and R. N. Beachy, 1989, Plant Cell, 1 623- 631
- [11] Badly, R. A., D. A. Atkinson, H. Hauser, D. Oldani, J. P. Greem and J. M. Stubbs, 1975, Biochimica et Biophysica Acta, 412 214- 228
- [12] Barker, S. J., J. J. Harada and R. B. Goldberg, 1988, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 85 458- 462
- [13] Beachy, R. N., Z. L. Chen, R. B. Horsch, S. G. Rogers, N. J. Hoffmann and R. T. Fraley, 1985, EMBO J., 4 3047- 3053
- [14] Chen, Z. L., M. A. Schuler and R. N. Beachy, 1986, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 83 8560- 8564
- [15] Chen, Z. L., N. S. Pan and R. N. Beachy, 1988, EMBO J., 7 297- 302
- [16] Danielsson, C. E., 1994, Biochem. J., 44 387- 400
- [17] Fujiwara, T., S. Naito, M. Chion and T. Nagata, 1991, Plant Cell Rep., 11 602- 606
- [18] Gayler, K. R. and G. E. Sykes, 1981, Plant Physiol., 67 958- 961
- [19] Gayler, K. R. and G. E. Sykes, 1985, Plant Physiol., 78 582- 585
- [20] Hill, J. E. and R. W. Breidenbach, 1974, Plant Physiol., 53 747- 751
- [21] Holowach, L. P., J. F. Thompson and J. J. Madison, 1984, Plant Physiol., 74 576- 583
- [22] Kapoor, A. C. and Y. P. Gnpta, 1977, Food Sci., 61 1558- 1561
- [23] Kitamura, K., T. Takagi and K. Shibasaki, 1976, Agricultural and Biological Chemistry, 40(9): 1837
- [24] Kitamura, K. and N. Kaizuma, 1981, Breed., 31 353- 359
- [25] Koshiyana, I., M. Kikuchi, K. Harada and D. Fukushima, 1981a, J. Agric. Food Chem., 29 336- 340
- [26] Larkins, B. A., 1981 in The Biochemistry of Plants: A comprehensive treatise. (P. K. Ptumpf and E. E. Conn editor-in-chief)
- [27] Lessard, P. A., R. D. Allen, F. Bernier, J. D. Crispion, T. Fujiwara and R. N. Beachy, 1991, Plant Mol. Biol., 16 397- 413
- [28] Marcotte, W. R., S. H. Russel and R. S. Quatrano, 1989, Plant Cell, 1 969- 976
- [29] Matzke, A. J. M., E. M. Stoger, J. P. Scherthaner and M. A. Matzke, 1990, Plant Cell Biol., 14 323
- [30] Meinke, D. W., J. Chen and R. N. Beachy, 1981, Planta, 153 130- 139
- [31] Naito, S., P. H. Dube and R. N. Beachy, 1988, Plant Mol. Biol., 11 109- 123
- [32] Payne, P. T., 1983 In Seed Protein, J. Daussant, J. Mosse and J. Vaughan eds 223- 253
- [33] Peak, N. C., J. Imsande, R. C. Shoemaker and R. Shibles, Crop Science, 1997, 37(2): 498- 503
- [34] Peach, C., J. Velten, 1991, Plant Mol. Biol., 17 49- 60
- [35] Potrykus, L., 1991, Ann. Rev. Plant Phys. Plant Mol. Biol., 42 205- 225
- [36] Shortwell, M. A. and B. A. Larkins, 1989, in The Biochemistry of Plants, Academic Press, 15 297- 345
- [37] Speneer, D., W. G. Rerie, P. J. Randall and T. J. V. Higgins, 1990, Aust. J. Plant Physiol., 17 356
- [38] Takahashi, Y., Y. Niwa, Y. Machida and T. Nagata, 1990, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87 8013
- [39] Thanh, V. H. and Shibasaki, 1977, Biochem. Biophys. Acta 490 370- 384
- [40] Thanh, V. H. and K. Shibasaki, 1978a, J. Agric. Food Chem. 26 692- 695
- [41] Weising, K., J. Schell and G. Kahl, 1988, Ann. Rev. Genet., 22 421- 477
- [42] Wolf, W. J. and D. R. Briggs, 1959, Arch. Biochem. Biophys., 85 188- 199
- [43] Wolf, W. J., 1970, J. Agr. Food Chem., 18 969- 976