

萌发阶段籽瓜种子球蛋白的降解变化*

张玉秀 赵文明

(植物分子生物学研究室)

摘要 应用 SDS-PAGE 单向和双向电泳分析了籽瓜种子萌发过程中球蛋白组分的降解变化。55 KD 球蛋白在萌发开始后的前2天内降解最快,随后降解速度减慢,到子叶展平时完全降解。伴随着球蛋白降解,萌发第1天就出现 30~31 KD 和 34~37 KD 两种新组分,其含量在萌发的第5天增加至最大,随后又很快降解;这两种新组分都含有双硫键,其中 34~37 KD 新组分可能是球蛋白的直接降解产物。球蛋白的酸性多肽降解快,碱性多肽降至解慢,它在萌发过程完成时依然存在。

关键词 籽瓜, 球蛋白, 降解, α -酸性多肽, β -碱性多肽

中图分类号 Q946.102.2

种子萌发过程中,蛋白质的降解变化已进行了多年研究^[1-3],并涉及到许多酶类(如:蛋白酶,半胱氨酸内切酶等)的变化。Basha (1975)报道豌豆萌发过程中,豆球蛋白的降解速度大于豌豆球蛋白^[4];而大豆萌发过程中,伴大豆球蛋白的降解速度大于大豆球蛋白(Wilson, 1986)^[5]。菜豆种子萌发时云扁豆蛋白的最小亚基首先降解^[6];但是,豌豆和绿豆种子萌发时豌豆球蛋白的大亚基则首先降解^[4]。即不同作物种子蛋白质降解模式不同。此外,大豆和蚕豆萌发时,大豆球蛋白和蚕豆球蛋白的酸性多肽降解早于碱性多肽^[5,7]。瓜类球蛋白的结构与豆球蛋白有同源性,Hara (1976)简要报道南瓜种子球蛋白的降解变化^[8]。为了更详细地了解瓜类球蛋白的降解模式,本文对籽瓜种子球蛋白在萌发期的降解变化进行了研究。

1 材料和方法

1.1 材料及种子萌发

试材为皋兰黑籽瓜种子。温烫浸种后,在25~30℃下萌发,第7天子叶展平,萌发期结束。从浸种24 h开始取样,萌发第1天和第2天每隔12 h取样,第3~7天每隔24 h取样。

1.2 样品制备

把不同萌发阶段的籽苗在-5℃下进行低温干燥后,磨碎,用含SDS的样品缓冲液提取球蛋白,每10 mg样品加1 mL样品缓冲液^[9]。

1.3 电泳

SDS-PAGE单向及双向电泳(第一向为不加巯基乙醇的非还原条件;第二向为加巯基

文稿收到日期:1990-11-12。

*国家自然科学基金资助项目。

乙醇的还原条件)均在室温下进行,凝胶浓度为12.5%,电流为25 mA,考马氏亮兰R₂₅₀染色,甲醇、冰醋酸脱色。电泳谱带用岛津ES-930型自动扫描仪扫描^[10]。

2 实验结果与分析

2.1 籽瓜子种子萌发时55KD球蛋白的变化

在非还原条件下电泳,籽瓜子种子球蛋白的分子量是55KD。从图1看出:籽瓜子种子萌发过程中,55KD含量逐渐降低,到萌发第7天(子叶展平)55KD完全降解。伴随着球蛋白的降解,萌发第1天出现了30~31KD和34~37KD两种新组分,其含量随萌发天数的增加而增加;萌发5天后新组分含量又降低。为了定量描述萌发过程中球蛋白的变化,以蛋白组分的扫描面积随萌发天数的变化作出图2。

2.1.1 55KD球蛋白的降解变化

从图2看出:球蛋白在萌发的第1天降解了27.8%,第2天降解了41.7%,第3天降解了8.5%,从萌发的第4~7天降解了22.0%。所以,55KD球蛋白在萌发开始时降解较快,第2天降解速度最大,随后降解减慢

2.1.2 萌发过程中新组分的变化

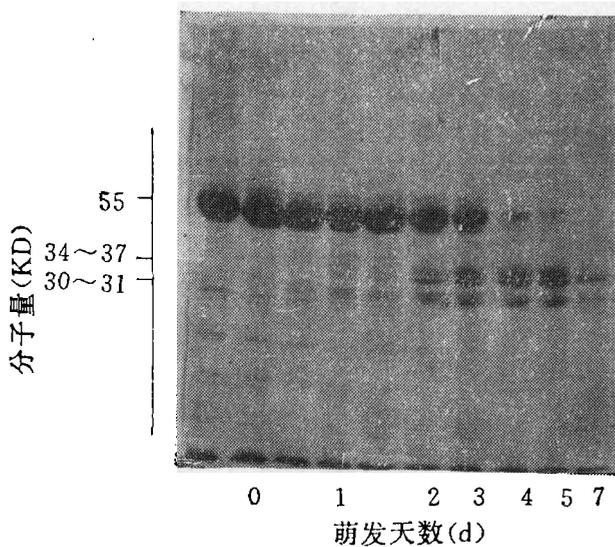


图1 萌发过程中籽瓜子种子球蛋白 SDS-PAGE

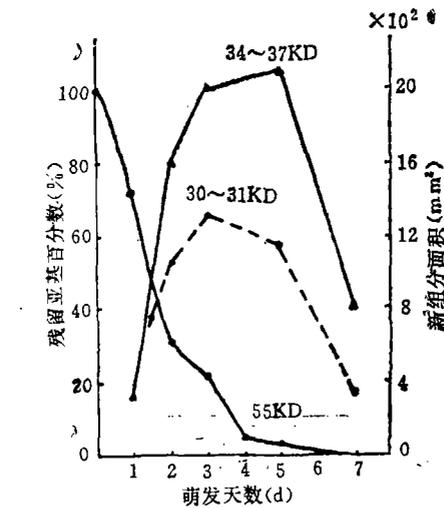


图2 55KD球蛋白及新组分30~31KD和34~37KD含量的变化

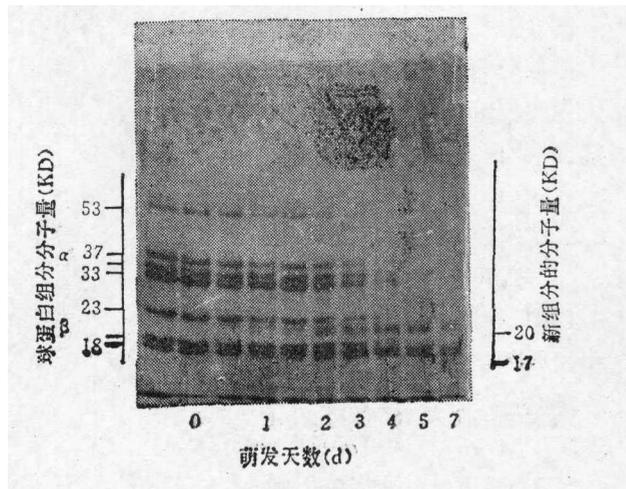


图3 籽瓜子种子萌发过程中球蛋白组分在还原条件下的SDS-PAGE

含量也增加最多；第3~5天，球蛋白降解速度减慢，新组分(34~37KD)含量增加幅度也减小；到第5天球蛋白只剩3%，而新组分34~37KD含量达到最大值；第5天后新组分又很快降解。

2.2 种子萌发过程中球蛋白多肽组分的变化

在还原条件下电泳，55KD球蛋白裂解为3种 α -酸性多肽(37KD, 35KD和33KD)及3种 β -碱性多肽(23KD, 19KD和18KD)，此外还有一种不含双硫键的53KD球蛋白。从图3和图4看出：随着种子萌发的进程，53KD球蛋白，33~37KD酸性多肽及18~23KD碱性多肽含量逐渐降低。但是，不同的组分降解速度不同，其中53KD降解最快，萌发第4天就完全消失；3种酸性多肽及两种碱性多肽(19KD和23KD)在萌发

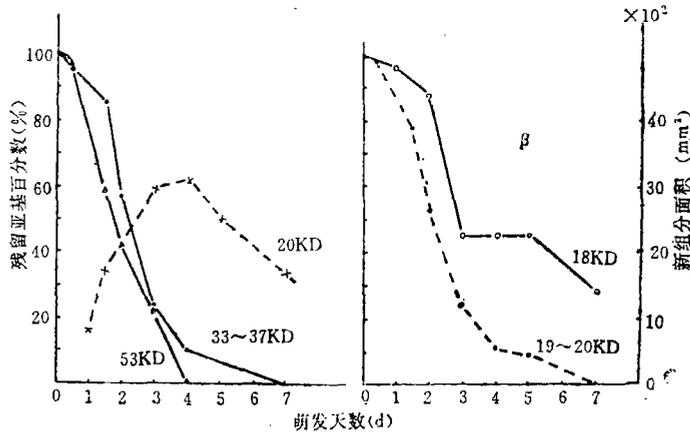


图4 53KD、 α -酸性多肽、 β -碱性多肽及新组分20KD含量变化

第7天完全消失；而18KD碱性多肽降解缓慢，萌发末期依然存在。由此可见，籽瓜种子萌发过程中高分子量的组分首先降解，低分子量的组分降解较晚。

伴随着球蛋白的降解，萌发第1天也出现20KD和17KD两种新组分，其含量变化曲线与34~37KD和30~31KD新组分基本相同。

2.3 萌发过程中所出现新组分的结构

籽瓜种子萌发过程中，出现了34~37KD, 30~31KD(非还原条件)和20KD, 17KD(还原条件)等4种新组分。SDS-PAGE双向电泳(图5)表明：34~37KD可裂解为20KD, 18KD和17KD 3种组分；30~31KD裂解为20KD, 13KD和12KD 3种组分。这表明34~37KD和30~31KD

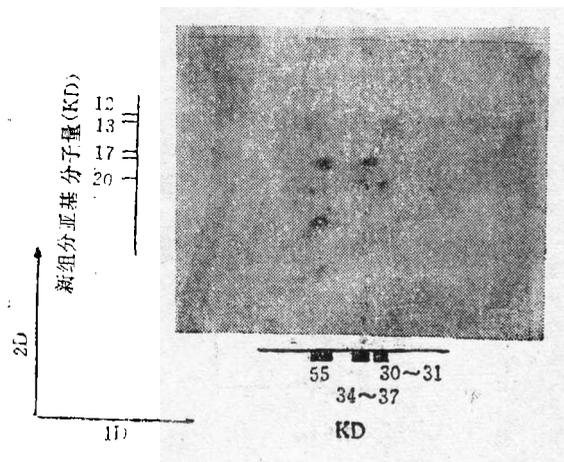


图5 萌发第3天籽瓜种子球蛋白SDS-PAGE双向电泳1D。不加巯基乙醇的非还原条件 2D。加巯基乙醇的还原条件

新组分是含双硫键的蛋白质, 其中34~37 KD由20 KD-S-S-18 KD和20 KD-S-S-17 KD两个多肽对组成, 30~31 KD新组分由20 KD-S-S-13 KD和20 KD-S-S-12 KD两个多肽对组成。

3 讨论与结论

3.1 55KD球蛋白的降解与新组分的产生

籽瓜种子萌发过程中, 55 KD球蛋白的降解量与新组分的生成量相一致。即在萌发的头两天, 球蛋白降解最快, 新组分34~37 KD和30~31 KD含量增加最多; 此后, 随着球蛋白的缓慢降解, 新组分含量逐渐增加, 萌发第5天新组分(34~37KD)含量达到最大值, 而球蛋白几乎完全降解。这表明籽瓜萌发过程中分子量较高的球蛋白降解为分子量较小的组分。第5天后, 新组分又快速降解。这与Hara (1976) 报道的南瓜种子球蛋白的降解特点和新组分的变化相一致。

3.2 34~37KD新组分的性质

图5表明, 34~37 KD新组分是含双硫键的蛋白质, 它由两个多肽对组成; 在萌发4天的籽瓜种子清蛋白组分中只含有34~37 KD, 盐溶球蛋白溶液中不仅含有55 KD球蛋白, 还含有34~37 KD新组分, 表明萌发时蛋白质的水溶性增强; 将盐溶球蛋白在30℃下进行加热变性实验, 发现34~37 KD新组分与球蛋白55 KD一样, 都具有热稳定性。由于34~37 KD新组分的结构、溶解性及热稳定性等均与球蛋白55 KD相同, 并能裂解出18 KD组分(球蛋白的碱性多肽), 所以34~37 KD可能是55 KD球蛋白的直接降解产物。这与Hara (1976) 在南瓜上所得结果相一致。

3.3 球蛋白多肽组分的降解特点

球蛋白的3种 α -酸性多肽组分降解变化曲线与55 KD球蛋白相同, 随萌发的进展, 其含量逐渐降低, 到第5天只剩下4%, 子叶展平时完全消失。3种 β -碱性多肽降解在萌发的第3~5天降解缓慢, 特别是18 KD碱性多肽在萌发第3~5天几乎无变化, 到第5天后很快降解, 萌发结束时(第7天)还有30%未降解。所以籽瓜种子萌发过程中酸性多肽降解快, 碱性多肽降解慢。这与前人^[9, 10, 11]报道的蚕豆和大豆种子球蛋白的降解模式相同。

参 考 文 献

- 1 Bouter D, Barber T J. Amino-acid metabolism in germinating seeds of *Vicia faba* L. in relation to their biology. *New Phytol*, 1963; 62: 301~306
- 2 Ashtom F M, Dahmen W J. A partial purification and characterization of two amino peptidases from *Cucurbita maxima* cotyledons. *Phytochem*, 1967; 641~653
- 3 Harris N, Chrispeels M J. Histochemical and biochemical observations on storage protein metabolism and protein body autolysis in cotyledons of germinating mung beans. *Plant Physiol*, 1975; 56: 292~299
- 4 Basha S, Beevers L. The development of proteolytic activity and protein degradation during the germination of *Pisum sativum* L. *Planta*, 1975; 124: 77~87
- 5 Wilson K A, Rightmire B R, Chen J C *et al.* Differential proteolysis of glycinin and β -conglycinin polypeptides during soybean germination and seedling growth. *Plant Physiol*,

- 1986, 82: 71~76
- 6 Nielsen S S, Liener I E. Degradation of the major storage protein of *Phaseolus vulgaris* during germination. *Plant Physiol*, 1975, 74: 494~498
 - 7 Shutov A D, Bulmaga V P, Boldt *et al.* Investigation of the modification of reserve proteins of Vetch seeds during germination and limited proteolysis. *Biokhimiya*, 1981, 46: 841~851
 - 8 Hara I, Wada K, Wakabayashi S *et al.* Pumpkin (*Cucurbita* sp) seed globulin I. purification characterization, and subunit structure *Plant and Cell Physiol*, 1976, 17: 799~814
 - 9 赵文明. 水稻谷蛋白是类似于豆球蛋白的蛋白质. *实验生物学报*, 1988, 21: 239~244
 - 10 Blowers L E, Wilson T M A. Size and charge heterogeneity in subunits of major seed storage protein, cucurbitin identification of a polyprotein precursor in immature seed of the wster melon *Citrillus Lanatus*. *Journal of Experimental Botany*, 1983, 34: 1134~1144
 - 11 庄炳昌, 徐豹. 萌发过程中大豆 (*G. max*) 种子蛋白组分变化的研究. *作物学报*, 1988, 14: 232~235

Changes in Degradation of Cucurbitin of Seedy Watermelon Seeds During Their Germination Stage

Zhang Yuxiu Zhao Wenming

(*Plant Molecular Biological Laboratory*)

Abstract The degradation of cucurbitin of the seedy watermelon seeds was studied by one and two dimensional SDS Gel Electrophoresis during the process of their germination. Cucurbitin of 55KD was degraded most rapidly in the first 2 days of germination, later its degradation speed gradually slowed. When the leaflets spread, its degradation ceased. With its degradation going on, the new fractions of 30-31KD and 34-37KD appeared in day 1 of germination, the contents of which increased most in the 5th day of germination, and then rapidly degraded. The two new fractions contained double sulfur bands, of which 34-37KD was considered to be a product of proteolysis of cucurbitin. The acidic polypeptides of cucurbitin was rapidly degraded and basic polypeptides was degraded slowly, and still existed when the process of germination completed.

Key words seedy watermelon, cucurbitin, degradation, α -acidic polypeptide, β -basic polypeptide