

# 小麦突变体返白系返白机理研究<sup>1)</sup>

## I. 返白阶段叶蛋白质、游离氨基酸变化规律的分析

苏小静<sup>2)</sup> 汪沛洪 王永吉

(植物生化研究室)

**摘要** 在返白过程中, 返白系叶片蛋白氮含量降低, 蛋白酶活性升高, 总游离氨基酸积累, 各游离氨基酸组分变化幅度不同。变化最大的丝氨酸在全白叶片中可占总游离氨基酸量的50%。认为蛋白质含量下降, 游离氨基酸增多与蛋白酶活性升高有关。SDS-PAGE分析发现, 叶蛋白质组分没有明显的差异, 各组分的含量均有下降。Rubisco 减少最多, 全白叶中几乎见不到它的条带。复绿过程中以上各变化均逆转回复。

**关键词** 游离氨基酸, 蛋白酶活性, 突变体, 小麦

色素突变体伴随叶色的变化, 其体内的生理生化过程也会发生某些相应的变化。前人对多种类型的色素突变体蛋白质及酶类, 如色素蛋白质复合体<sup>[1, 2]</sup>、类囊体膜多肽<sup>[3]</sup>、叶可溶蛋白质<sup>[4]</sup>和过氧化氢酶<sup>[5]</sup>、硝酸还原酶<sup>[6]</sup>等进行过多方面的研究。很多资料表明, 突变体的蛋白质代谢及酶活性往往伴随着突变的发生而出现异常, 研究这些变化有助于进一步揭示突变发生的内在原因。本文报道了我们对小麦突变体返白系在返白阶段叶片内蛋白质代谢变化的初步研究结果, 为进一步探讨返白机理积累资料。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

以冬小麦返白系和矮变1号(作为对照)为材料, 详见前文<sup>[10]</sup>。

#### 1.2 测定项目及方法

(1) 蛋白氮、非蛋白氮含量分析: 采用微量凯氏定氮法。0.05 g 干材料在蒸馏水中研磨, 10% TCA (三氯乙酸) 沉淀蛋白质, 过滤, 沉淀部分用于蛋白氮分析, 滤液用于非蛋白氮分析。样品消化后在 KJELTEC AUTO 1030 Analyzer 上进行含氮量分析。

(2) 叶片蛋白质组分分析: 用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 (SDS-PAGE) 进行分析。提取液为 Tris-HCl (pH8.0) 缓冲液, 内含10%蔗糖、5%巯基乙醇、2% SDS 及 0.1% 溴酚蓝。浓缩胶浓度3.75%, 分离胶浓度10%。电泳完毕后, 凝胶用25%异丙醇

文稿收到日期: 1989-06-07

1) 国家自然科学基金资助项目。

2) 现在山西省生物研究所工作。

溶液固定，考马斯亮蓝R-250染色，10%冰醋酸脱色。凝胶片用岛津CS-930型薄层扫描仪在波长600/645nm下扫描。

(3) 游离氨基酸组分及含量分析：依照西北农业大学中心实验室的分析方法，用80%乙醇研磨叶片，提取游离氨基酸。水浴中(80°C以下)蒸干乙醇，加1 mL 15%磺基水杨酸和3 mL pH 2.2柠檬酸缓冲液溶解残渣。400 rpm离心10 min后，上清液用121 MB型氨基酸自动分析仪分析游离氨基酸组分及含量。游离氨基酸总量根据各组分含量加和而得。

(4) 蛋白酶活性分析：参考 Wittenbach<sup>[6]</sup>外源基质法。0.3 g 叶片用5 mL pH 7.5 HEPES 缓冲液研磨提取蛋白酶，4000 rpm离心10 min，上清液通过 Dextran 25 柱，外水体积部分的蛋白用于分析蛋白酶活性。以纯化的菠菜 RuBPCase 为底物，反应液包括0.4 mL 200 mM 柠檬酸缓冲液，0.4 mL 粗酶蛋白及0.2 mL RuBPCase 蛋白液(~10 mg/mL)。反应混合物在38°C保温2 h，用1 mL 10% TCA 终止反应，离心除去沉淀。用茚三酮法测定上清液中的氨态氮<sup>[7]</sup>，蛋白酶液蛋白含量采用考马斯亮蓝 G-250 法测定<sup>[8]</sup>。

## 2 结果及分析

### 2.1 返白阶段叶蛋白质含量与组分分析

在返白阶段，对照矮变1号叶片总蛋白氮含量及非蛋白氮含量均无明显的变化，非蛋白氮含量始终低于总蛋白氮含量。与对照相比，返白系在返白过程叶片总蛋白氮含量降低，非蛋白氮含量增高，在全白叶中这两种氮含量分别达到最低和最高，且非蛋白氮含量高于总蛋白氮含量；在复绿过程中则相反，叶片总蛋白氮含量上升，而非蛋白氮含量下降，并接近相应的对照值(图1)。返白系叶片总蛋白氮含量的变化反映了叶片总的蛋白质含量的变化。

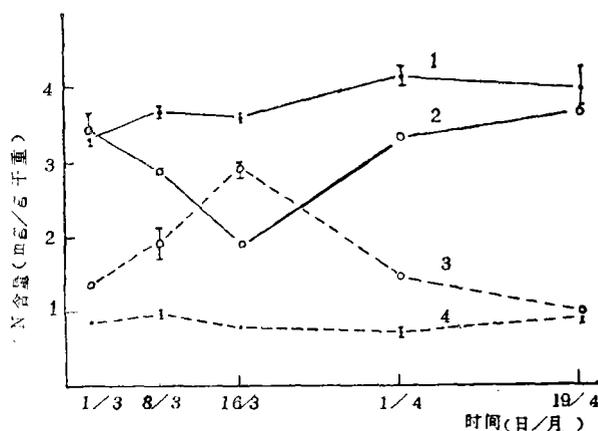


图1 返白阶段返白系叶片蛋白氮和非蛋白氮含量的变化

1. 矮变1号蛋白氮；2. 返白系蛋白氮；3. 返白系非蛋白氮；4. 矮变1号非蛋白氮

在返白系叶片总蛋白质含量降低的同时，各蛋白质组分量也发生了相应的变化。用 SDS-PAGE 分

析全白叶片的各蛋白组分(图2)时发现，蛋白质含量的降低，反映在各个组分上的降低幅度不同。全白叶中所有的蛋白组分含量都降低，其中以 Rubisco 大小2个亚基的降低幅度最大，扫描结果仅能见到2个小峰。电泳结果未见有明显的蛋白组分差异。

### 2.2 返白阶段叶片总游离氨基酸含量及各组分含量的变化

返白系和矮变1号叶片总游离氨基酸含量在返白阶段变化不同。返白系总游离氨基酸含量始终高于矮变1号，且在返白过程其含量上升，全白叶中(3月16日)含量最

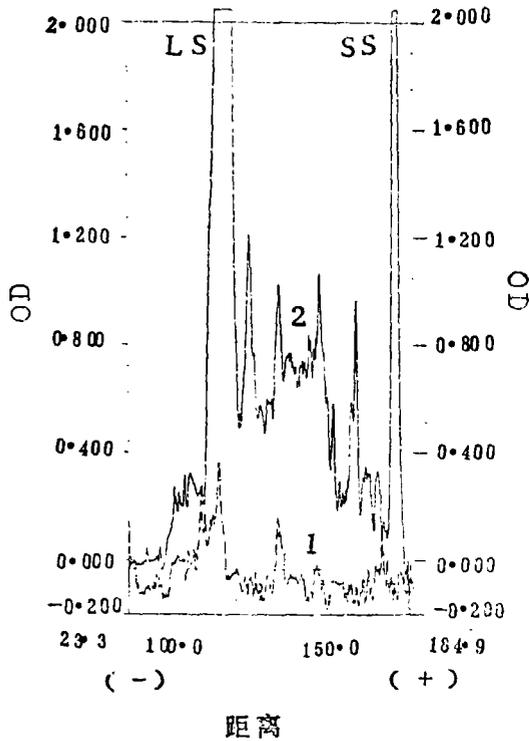


图2 返白系全白叶片蛋白质  
电泳方向自左向右  
LS,Rubisco大亚基, SS,Rubisco小亚基;  
1. 返白系; 2. 矮变1号

高，在复绿过程又迅速下降；矮变1号总游离氨基酸含量除在3月8日有1个小峰外，没有多大的变化。矮变1号在3月8日出现含量上升可能与其生育期及环境因素的影响有关（见图3）

返白阶段，游离氨基酸各组分的含量也有变化（图4）。在返白过程中，多数氨基酸无论是绝对量（氨基酸含量/叶干重），还是相对量（氨基酸含量/总游离氨基酸含量）都趋于增加，如丝氨酸（Ser）、组氨酸（His）、亮氨酸（Leu）、异亮氨酸（Ile）、赖氨酸（Lys）和缬氨酸（Val）；有的如谷氨酸（Glu）、丙氨酸（Ala）、天冬氨酸（Asp）绝对量增加而相对量却降低；其余的氨基酸如苏氨酸（Thr）、脯氨酸（Pro）、酪氨酸（Tyr）、精氨酸（Arg）、甘氨酸（Gly）、蛋氨酸（Met）和苯丙氨酸（Phe）在返白阶段或含量较少，或变化没有明显规律（表1）。上述前两部分氨基酸

的变化在复绿过程均有逆转回复的趋势（图4）。

游离氨基酸中变化幅度最大的是丝氨酸，它在全白叶片中可以占到总游离氨基酸含量的50%以上。

### 2.3 返白阶段蛋白酶活性的变化

从表2中可以看到，与矮变1号相比，在返白过程中返白系叶片内蛋白酶活性上升，全白叶中活性最高，而复绿时随着叶色的恢复，蛋白酶活性又迅速下降。这种规律与叶片总蛋白氮含量变化规律相反。

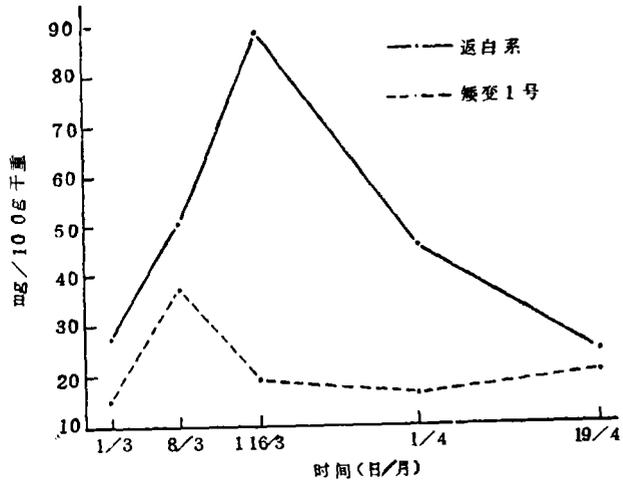


图3 返白阶段返白系叶片总游离氨基酸含量的变化

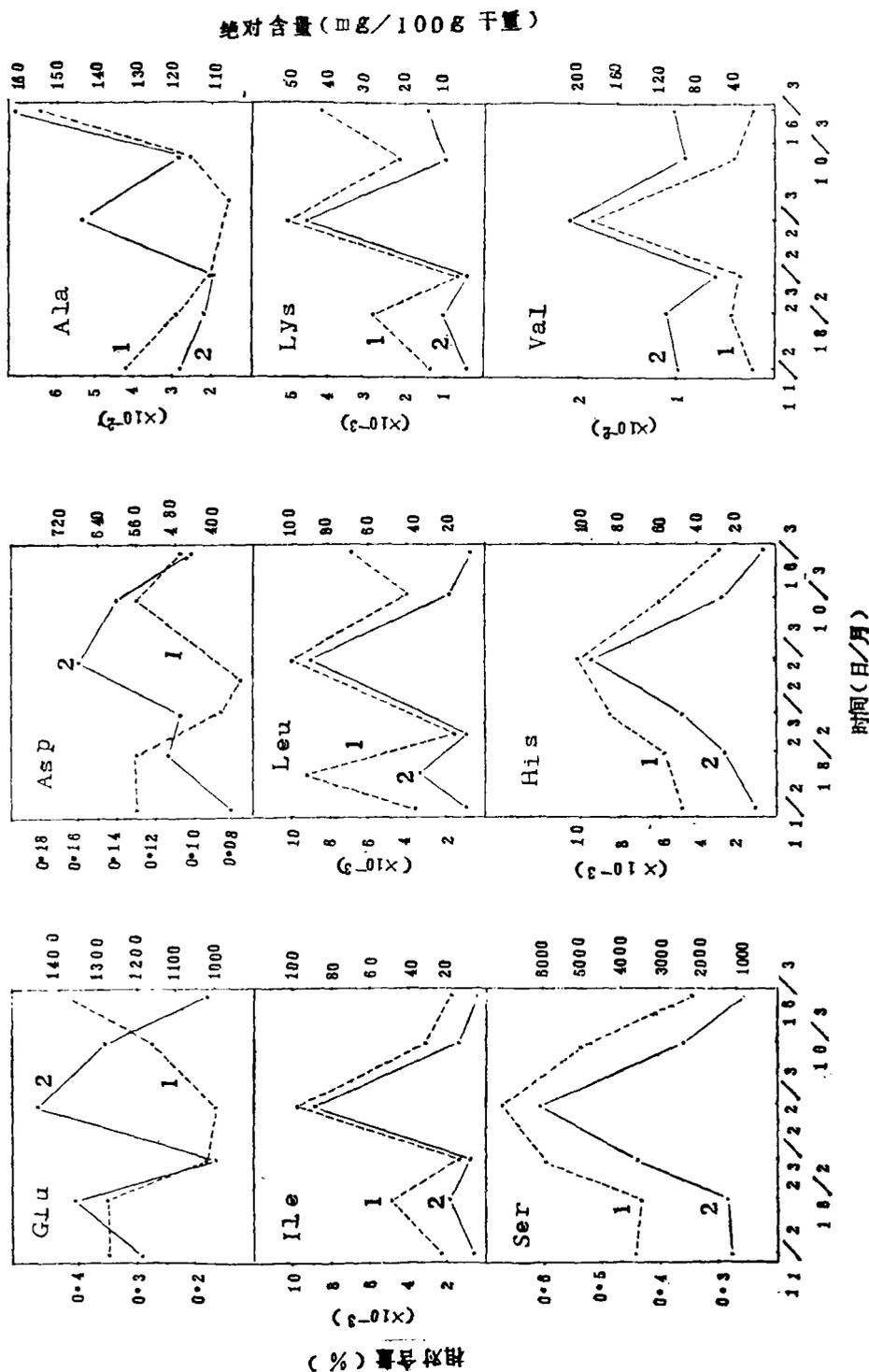


图 4 返白阶段返白叶片内游离氨基酸(部分)组分含量的变化  
1, 相对含量; 2, 绝对含量

表1 返白阶段返白系叶片内部分游离氨基酸组分含量的变化 (mg/100g鲜重)

氨基酸名称	小麦品系	返白及复绿时间				
		2月11日	2月23日	3月2日(最白)	3月10日	3月16日
苏氨酸	返白系	微	微	微	微	微
	矮变1号	微	微	微	微	微
脯氨酸	返白系	微	94.755	微	微	微
	矮变1号	55.987	128.934	69.023	微	微
酪氨酸	返白系	1.155	微	1.056	微	0.660
	矮变1号	1.026	0.968	微	1.261	1.105
精氨酸	返白系	无	无	11.097	无	无
	矮变1号	无	1.076	无	无	无
蛋氨酸	返白系	1.334	1.721	2.699	0.781	1.391
	矮变1号	0.796	1.707	1.192	1.165	1.014
甘氨酸	返白系	1.143	2.653	2.953	3.162	4.689
	矮变1号	1.027	19.216	8.025	2.063	3.014
苯丙氨酸	返白系	3.370	1.905	1.298	2.335	3.095
	矮变1号	2.486	3.711	2.380	3.946	3.385

表2 返白阶段返白系叶片内蛋白酶活性的变化

叶色变化	返白过程			复绿过程	
	绿(对照)	浅绿	白叶	浅绿	绿叶
蛋白酶活性 ( $\mu\text{gN/g蛋白}\cdot\text{2h}$ )	4.808	6.929 $\pm 0.526$	20.939 $\pm 0.267$	7.199 $\pm 1.884$	1.635 $\pm 0.476$

### 3 讨论

返白系在返白过程叶蛋白含量降低,总游离氨基酸含量增多,各游离氨基酸组分含量也有一定改变。与此同时,蛋白酶活性升高;在复绿过程中,这些变化都可逆转。这种特性和叶细胞结构<sup>[10]</sup>及色素代谢变化相一致。

用 SDS-PAGE 分析全白叶片蛋白质组分的结果表明:返白系全白叶中多数蛋白组分含量均有变化,基本趋势是降低,其中以 Rubisco 大、小 2 个亚基降低的幅度最大,变化也最明显。Rubisco 是一种重要的叶蛋白,占叶可溶蛋白的 50% 左右,它催化光合  $\text{CO}_2$  的固定。因此, Rubisco 量的减少及叶绿体内部结构的破坏<sup>[10]</sup>,会影响光合作用的进行。

蛋白酶活性变化是返白阶段值得注意的一个现象。在返白过程中,随着返白程度的

加深,蛋白酶活性上升(表2);而复绿时蛋白酶活性又下降。有趣的是这种变化趋势恰好与叶片总蛋白质含量的变化趋势相反。许多研究者认为,Rubisco是植物蛋白水解酶的最佳底物,该酶活性的升高可能导致了Rubisco的大量水解。因此,我们认为返白系蛋白酶活性的变化与叶蛋白含量的变化可能有一定的联系。但是,什么原因促使细胞内蛋白酶活性发生这种变化,目前还不清楚。

返白过程中蛋白质降解,导致了非蛋白氮及氨基酸“库”容量的增加,从而出现游离氨基酸的积累。由于各种蛋白质的氨基酸组成不同,以及在蛋白酶作用下各种蛋白质降解的量不同,而且各种氨基酸自身代谢也不尽相同,因此出现了各种游离氨基酸组分含量变化上的差异,有的增加,有的减少。关于产生氨基酸绝对量和相对量变化不一致(图4)的原因,估计与每种氨基酸积累的幅度和总游离氨基酸积累的幅度不一致有关。在游离氨基酸中,丝氨酸的变化最为明显,在全白叶中它可以占到总游离氨基酸的50%以上。丝氨酸对蛋白酶活性有诱导、促进作用<sup>[11,12]</sup>,返白系叶片中也可能存在这种正反馈作用。至于产生丝氨酸大量积累的原因以及更进一步的生理作用,还需详尽研究。

返白系在返白过程中蛋白质含量及蛋白酶活性的变化与衰老叶片中的变化相似<sup>[13]</sup>,但游离氨基酸的变化则与衰老叶片不同,衰老叶片中不积累游离氨基酸。这是由于衰老叶片中蛋白质水解所产生的游离氨基酸外运至其它组织器官的缘故。返白系叶片积累游离氨基酸,说明蛋白质水解产物可能未发生转移。这究竟是什么原因造成的,以及有什么生理意义,是值得注意的问题,有待进一步研究。

#### 参 考 文 献

- 1 李玉湘,李继耕.玉米叶绿体突变系中叶绿素蛋白质复合体的研究.遗传学报,1982,9(5):344-349
- 2 李玉湘,耿玉轩,李继耕.大麦叶绿体突变体中叶绿素蛋白质复合体的研究.遗传学报,1983,1(3):197-202
- 3 Li Ji-geng, Ki Yu-xiang, Gen Yu-xuan et al. Two dimensional analysis of thylakoid membrane polypeptides of a barley mutant. *Theor. Appl. Genet.*, 1984, 68: 381-384
- 4 孙敬三,吴石君,朱至清等.水稻白化花粉植株可溶性蛋白质的电泳分析.遗传学报,1977,4(4):359-360
- 5 Eyster H C. Catalase activity in chloroplast pigment deficient types of corn. *Plant Physiol*, 1950, 25: 630-638
- 6 Warner R L, Kleinhofs A. Relationships between nitrate reductase, nitrite reductase, and ribulose diphosphate carboxylase activities in chlorophyll-deficient mutants of barley. *Crop Science*, 1974, 14: 654-658
- 7 波钦诺克 X·H 著,荆家海,丁钟荣译.植物生物化学分析方法.北京:科学出版社,1981.95-101
- 8 汪沛洪,陈毓荃等编.基础生物化学实验指导.西安:陕西科学技术出版社,1986.66-68,74-77
- 9 Wittenbach V A. Ribulose bisphosphate carboxylase and proteolytic activity in wheat leaves from anthesis through senescence. *Plant Physiol*, 1979, 64: 884-887
- 10 苏小静,汪沛洪.小麦返白系返白机理研究 I. 返白阶段叶绿体超微结构观察.西北农业大学学报,1990,2: 73-77
- 11 L-比弗斯著;薛应龙,欧阳光宗译.植物的氮代谢.北京:科学出版社,1981.300
- 12 Veierskor B, Satler, S, Thimann K V. Metabolism of oat leaves during senescence VIII The Role of L-serine in modifying senescence. *Plant Physiol*, 1985, 78: 315-316

- 13 Wittenbach V A, Ackerson R C, Giaquinta R T et al. Changes in Photosynthesis, ribulose bisphosphate carboxylase, proteolytic activity, and ultrastructure of soybean leaves during senescence. *Crop Science*, 1980, 20: 225—21

## Studies on the Albescent Mechanism in the Mutant “Stage Albinism Line of Winter Wheat”

### I. Studies on Some Changes of Protein Metabolism

During the Albescent Stage

Su Xiaojing, Wang Peihong Wang Yunji

(*Plant Biochemistry Research Lab, Northwestern  
Agricultural University*)

**Abstract** In the albescent process, the content of protein N decreased, the proteolytic activity increased, and total free amino acids accumulated, and each amino acid varied in different extent. The greatest one changed was Ser. in the white leaves, accounting for 50% of total content. It is considered that the decrease of the content of protein N might be related to the change of proteolytic activity. It was discovered by analysis that the content of protein compositions of the mutant leaf all decreased, and Rubisco decreased most. In wheat leaves, it almost disappears, but we didn't find any significant difference in the components. In the regreening stage, all changes described above could be reversed.

**Key words** free amino acids, proteolytic activity, protein metabolism, mutant, wheat