

6-11

第25卷 第3期
1997年6月西北农业大学学报
Acta Univ. Agric. Boreali-occidentalisVol. 25 No. 3
Jun. 1997

干旱对小麦幼芽蛋白质组分及等电点的影响

李妮亚¹ 高俊凤²

(1 西北农业大学实验中心, 2 基础科学系, 陕西杨陵 712100)

S512.1.01

摘要 通过水平薄层变性聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦(IEF)、十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和双向电泳(IEF×SDS-PAGE)研究表明,干旱引起小麦幼芽蛋白质组分及含量变化,主要在分子量为20~48 kD、等电点(pI)为5.34~5.65,并且干旱诱导小麦幼芽产生41.5 kD蛋白亚基,pI为5.65;分子量为36.2(pI 5.35)和15.8 kD(pI 5.70)的两个蛋白亚基含量明显增加。

关键词 小麦幼芽, 干旱, 蛋白质组分, 等电聚焦, 双向凝胶电泳

中图分类号 Q945.17, Q946.1

随着分子生物学、细胞生物学、分子遗传学的发展和新研究技术的建立,植物抗逆性研究已逐步向细胞和分子水平发展^[1]。有关植物逆境蛋白的研究,已取得了一些进展^[2,3]。据研究,逆境下诱导产生的蛋白质能使植物生化和结构发生变化以适应所在的环境,并可能是植物抗逆性的一个共同机制^[3,4]。有关干旱引起植物体内蛋白质代谢及组分的变化虽有报道^[4~6]。但对于冬小麦水分胁迫诱导蛋白的研究较少,且均用小麦三叶期、叶片及根系为材料。本文以单、双向电泳结合,并利用薄层 IEF 电泳,分析了干旱对小麦幼芽蛋白质组分变化的影响,研究了小麦幼芽等电点分布及其特点,以期植物逆境蛋白研究奠定基础,并为小麦抗旱特性的遗传改良提供参考。

1 材料与方 法

1.1 材料

冬小麦(*Triticum aestivum* L.)郑引1号种子,由西北农业大学植物生理研究室提供。

小麦种子经精选,2 g/L HgCl₂ 消毒。籽粒吸胀后置22℃温箱中催芽,露白后,选萌动(芽长0.10 cm,根长0.15 cm)一致的种子置于培养皿中,以-1.2 MPa PEG6 000 处理48 h,以相应量的无离子水处理为对照。

1.2 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)

小麦幼芽蛋白质提取液参照文献[7]。凝胶浓度为75~150 g/L 线性梯度胶。电泳操作参照文献[8]。

1.3 双向凝胶电泳(IEF×SDS-PAGE)

蛋白质的提取和制样参照文献[9],略有改动。取真空干燥后5 mg 干粉,溶于等电聚焦尿素变性裂解液[8 mol/L 尿素,20 g/L Np-40,体积分数为4% Ampholine,pH3.5~

收稿日期 1996-11-18

课题来源 农业部“八五”重点研究课题

作者简介 李妮亚,女,1954年生,助理研究员,硕士

10, 体积分数为 5% 巯基乙醇] 中, 离心, 上清液用于电泳点样。

电泳操作参照文献[8]方法。第一向经平衡后胶条, 用浓缩胶缓冲液热溶的 10 g/L 琼脂糖封固于加样槽。

标准蛋白标记胶, 参照文献[10]方法进行。单、双向电泳后, 胶片参照文献[11]银染。

1.4 薄层聚丙烯酰胺等电聚焦(PAG-IEF)

参照文献[12]方法, 略有改动, 制样同双向电泳。制胶模板规格: 20 cm × 10 cm × 0.05 cm。pH 梯度测定: 在 LKB Ampholine-PAG plate 塑料模板衬托下, 按从正极端到负极端的顺序, 等距离依次切下小片, 浸泡于具有双蒸水的小瓶中, 用贝克曼 70 型 pH 计测量每瓶内浸泡液的 pH 值, 绘制 pH 梯度曲线图。

2 结果及分析

2.1 干旱对小麦幼芽蛋白质等电点分布的影响

小麦幼芽蛋白质等电聚焦结果见图 1。从图 1a 中可以看出, 在 pH 3.5~8.9 范围内, pH 值和凝胶长度线性关系良好。水平平板薄层凝胶, 由于其本身的聚焦优点(胶薄, 时间短), 可使小麦幼芽蛋白质等电点相差小的组分充分分离。特别是在 pH 3.86~6.31 范围内, 众多组分清晰分离, 从而可确定各组分的等电点。

小麦幼芽蛋白质亚基的等电点(pI)从酸性区到碱性区都有分布(图 1b), 在 10 cm 胶板上可分辨出近 50 条谱带。无论是干旱胁迫还是正常供水的小麦幼芽谱带基本相似。在碱性区(pH 7.23~9.0), 有少量谱带分布, 在酸性区(pH 4.86~6.31)具有三处谱带密集区(高含量区), pH 分别为 5.72~6.31, 5.18~5.68 和 4.86~4.95。从图 1b 的结果不难看出, 小麦幼芽蛋白质亚基的 pI 主要在偏酸性范围内(pH 4.86~6.31)分布。

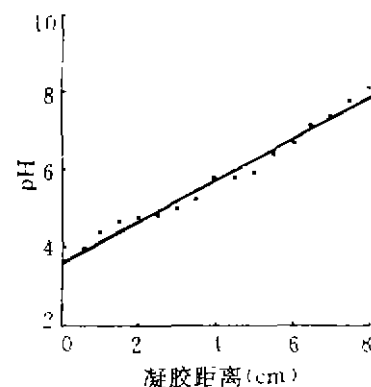


图 1a 薄层等电聚焦电泳的 pH 梯度

从胶片(图 1b)上可以看出, 在偏酸性区, 干旱胁迫下小麦幼芽蛋白质亚基等电点分布较对照多出两条 pI 为 3.69 和 3.87 的蛋白谱带, 尤其 pI 3.87 谱带含量高。由图 1b 中还可以看出, 在 pH 5.18~5.68, 处理与对照谱带略有差异(处理 7 条, pI 分别为 5.34, 5.37, 5.42, 5.46, 5.48, 5.57 和 5.65, 比对照多出 pI 为 5.42 的蛋白谱带)。

2.2 干旱对小麦幼芽蛋白质组分的影响

由 SDS-PAGE 图谱(图 2)可见, 小麦幼芽蛋白质约有 20 多条谱带。在干旱胁迫(-1.2 MPa)48 h 后, 明显诱导产生分子量为 41.5 kD 新蛋白。图 2 扫描结果表明, 胁迫后的小麦幼芽蛋白质组分无论在高分子量或低分子量区域, 含量均增加, 并且干旱也引起小分子量(14~25 kD, 箭头表示)蛋白组分的变化。但可溶性蛋白含量在胁迫 48 h 时呈下降趋势^[13], 表明干旱时小麦幼芽正常的蛋白质合成受到抑制, 而使植物在适应逆境过程中, 调节基因表达, 以诱导产生新的蛋白质。这与已报道的结果一致^[6]。

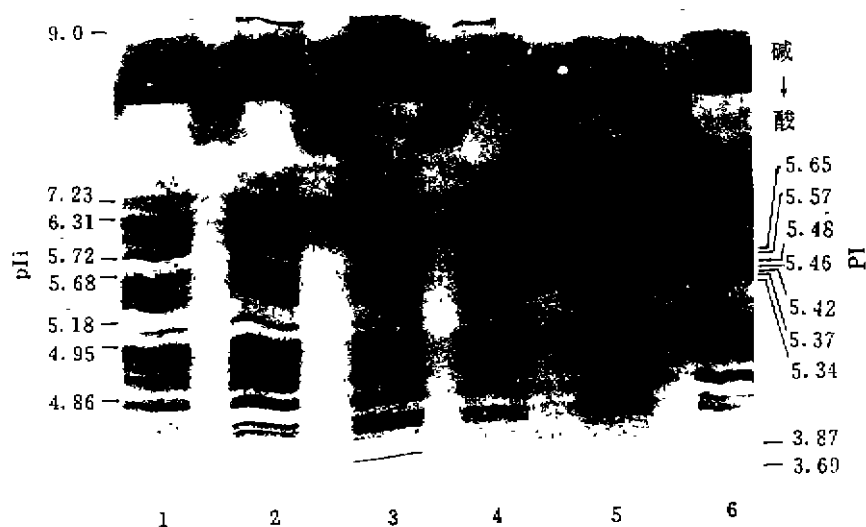


图 1b 小麦幼芽蛋白质薄层聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦

1,2,4,5,对照; 3,6:-1.2 MPa 胁迫 48 h; 1,2,3:点样 30 μ L; 4,5,6:点样 25 μ L

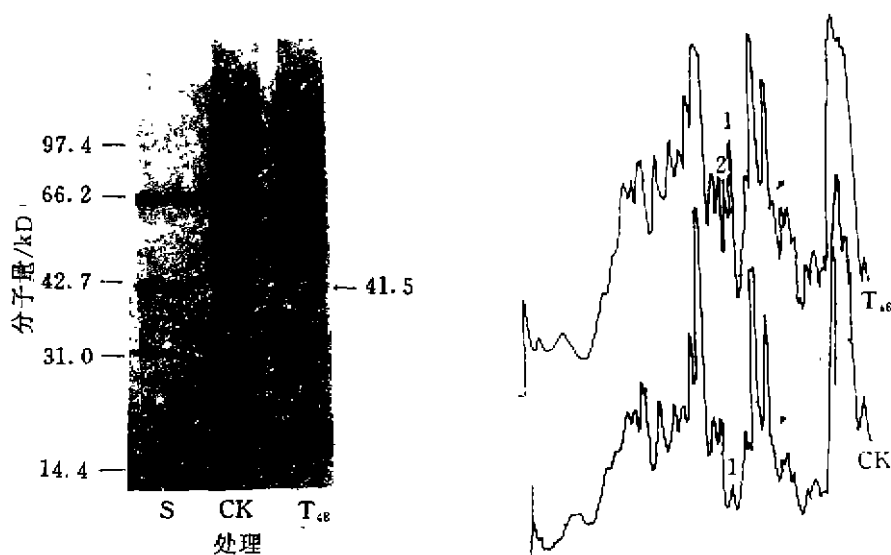


图 2 小麦幼芽蛋白质 SDS-PAGE 图谱及扫描结果

S. 标准蛋白; CK. 对照; T₄₈. -1.2 MPa 处理 48 h; 1. 分子量 38.6 kD; 2. 分子量 41.5 kD; 箭头示新诱导蛋白

2.3 干旱下小麦幼芽蛋白质组分变化与等电点分布的关系

从小麦幼芽蛋白质的 IEF×SDS-PAGE 染色胶片(图 3)上可以观察到 100 多个色斑,从高分子量到低分子量,pH 由低到高均有分布,但偏酸性区分布较多;干旱处理的小麦幼芽蛋白质斑点比正常供水的分布密集,且明显多出 3 个蛋白点:蛋白 1,36.3 kD(pI 5.35);蛋白 2,41.5 kD(pI 5.65);蛋白 3,15.8 kD(pI 5.70)。比较小麦幼芽蛋白质的双向

电泳(图3)、IEF(图1b)和 SDS-PAGE(图2)的结果可以看出,在 SDS-PAGE 图谱及扫描图中,干旱引起小麦幼芽蛋白质组分及含量变化,主要分布在 pI 为 5.34~5.65,分子量为 20~48 kD,薄层 IEF 显示出 pH5.18~5.68 区域内是一个谱带密集区,双向电泳图谱中也表明,该区蛋白斑点胁迫处理比对照密集。

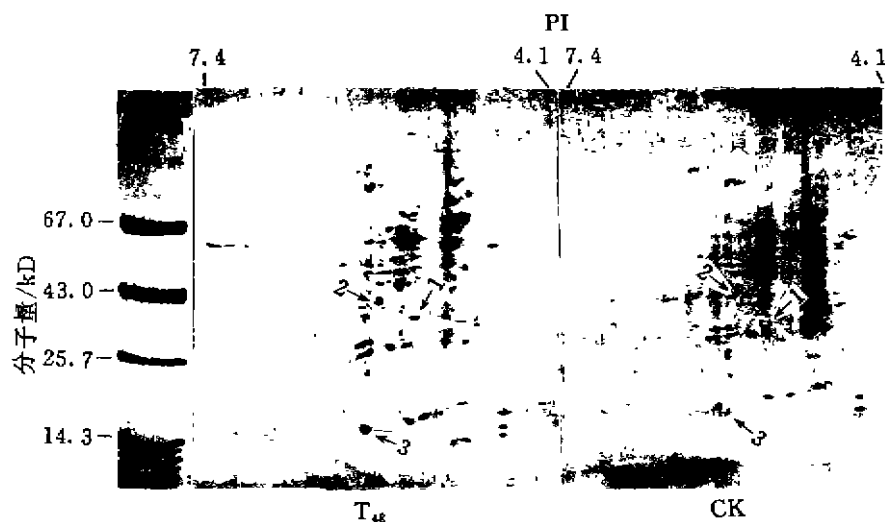


图3 小麦幼芽蛋白质双向电泳图谱

1. 分子量 36.2 kD, pI 5.35; 2. 分子量 41.5 kD, pI 5.65; 3. 分子量 15.8 kD, pI 5.70;
T₄₈. -1.2 MPa 处理 48 h; CK. 对照

3 讨论

在多种逆境胁迫下,如温度过高或过低、淹水或干旱、盐分过高、污染物、病菌侵染等,植物体内正常的蛋白质合成常会受到抑制。但也会发现一些被诱导出新的蛋白或原有蛋白质含量的明显增加。本实验结果也证实这一点。干旱可引起小麦幼芽蛋白质组分变化,而这些诱导产生的蛋白质,均在低分子量范围变化,其等电点均为偏酸性范围。这与已报道的干旱诱导蛋白的部分性质具有相似之处^[14]。研究表明^[4],无论是 ABA 还是渗透胁迫都能诱导抗旱性不同的冬小麦叶片产生分子量为 15~20 kD, pI 4.7~5.7 的一些新蛋白。本文通过薄层水平平板等电聚焦(图1b)显示,受干旱胁迫小麦幼芽比对照多出 pI 3.87 和 3.69 两条谱带,即表明偏酸性蛋白增多,推测可能是对水分胁迫的一种响应。贺道耀等^[15]报道了盐胁迫引起水稻愈伤组织蛋白图谱发生很大的变化,主要表现在蛋白组分等电点的分布上,相比之下在分子量分布上的变化要小得多。这个现象指示了当盐胁迫时细胞蛋白质的次级结构变化比较大,而一级结构变化相对较小。经盐胁迫后蛋白质电泳图谱中等电点的变化在水稻高脯氨酸细胞变异系和原型之间存在的差异是,变异系蛋白图谱向偏酸性端位移,即偏酸性蛋白质增加,相反,原型蛋白图谱向碱性端移动,移动幅度较大,表明其碱性蛋白质增多。由这种结果可以看出,变异系在盐胁迫下细胞的蛋白质相对比较稳定,这种稳定性可能是其脯氨酸含量增高,脯氨酸对蛋白质结构有保护作用所

致。作者曾对分子量为 41.5 kD, pI 5.65 的诱导蛋白氨基酸组成进行分析(待发表), 该蛋白中脯氨酸占总氨基酸残基 38.5%, 酸性氨基酸占总氨基酸残基 17.16% (Asp, Glu), 而碱性氨基酸占 4.65%, 表明该蛋白具有高强度的带电性。这与已研究较清楚的 LEA (Late embryogenesis abundant protein, 水分胁迫诱导的胚胎发生后期富有蛋白) 蛋白性质很相似, 均具有较高的亲水性及热稳定性的特点, 代替水起保护膜结构的功能^[16,17]。因此, 推测干旱诱导 41.5 kD 蛋白, 有可能起到保护细胞结构以防脱水的功能。

将 IEF, SDS-PAGE 以及 IEF×SDS-PAGE 的三种电泳技术的结合研究表明, 水分胁迫能显著的引起小麦幼芽蛋白质组分的分子量及等电点的分布的变化。实验中通过 IEF 还发现了单肽链具有电荷多态性。但诱导蛋白 41.5 kD 其内部的结构特点又怎样呢? 还需要深入研究。

参 考 文 献

- 1 汤章城. 植物抗逆机理的研究. 国家自然科学基金资助项目简介. 北京: 科学出版社, 1994, 79~80
- 2 钱永常, 余叔文. 植物中的逆境蛋白. 植物生理学通讯, 1989(5), 5~11
- 3 Sachs M M, David T H. Alteration of gene expression during environmental stress in plants. Ann Rev Plant Physiol, 1986, 37: 363~376
- 4 沈 波, 李云荫. 渗透胁迫和脱落酸对冬小麦叶片蛋白质的影响. 作物学报, 1996, 22(3): 288~293
- 5 徐恒平, 汪沛洪. 土壤干旱对小麦根系蛋白组分变化的影响. 西北农业学报, 1992, 1(1): 33~36
- 6 李 震, 李云荫, 曹 敏. 水分胁迫对抗旱性不同的冬小麦品种叶片蛋白质影响的比较. 华北农学报, 1993, 8(4): 21~25
- 7 陈毓基. 生物化学研究技术. 北京: 中国农业出版社, 1995, 198
- 8 哈密斯 BD, 利克伍德 D; 刘毓秀, 程桂芳译. 蛋白质的凝胶电泳——实践方法. 北京: 科学出版社, 1986
- 9 逮 斌, 林 兵. 一种改良的植物蛋白质双向电泳方法. 生物化学与生物物理进展, 1989, 16(6): 480~481
- 10 孙崇荣, 李育庆, 汪景长等. 水稻种子蛋白质组分的双向电泳分析. 作物学报, 1987, 13(1): 63~68
- 11 郭尧君. SDS 电泳技术的实验考虑及最新进展. 生物化学与生物物理进展, 1991, 18(1): 32~37
- 12 宋宏新, 李军超, 赵德义, 红宽 R104 种子谷蛋白的电泳分析. 西北植物学报, 1996, 16(2): 174~179
- 13 李妮亚, 高俊凤. 水分胁迫对抗旱性不同的冬小麦幼芽蛋白质的影响. 干旱地区农业研究, 1997, 15(1): 85~90
- 14 Contreras A A, Ayala J W, Reyes J L et al. Cell wall proteins induced by water deficit in bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedling. Plant Physiol, 1995, 107: 1119~1125
- 15 贺道耀, 余叔文. 水稻高脯氨酸愈伤组织变异体盐胁迫下氨基酸和蛋白质组分的变化. 植物生理学报, 1995, 21(2): 123~130
- 16 厉秀茹, 郭玉海, 冷强等. 植物水分亏缺时基因的表达及其功能. 见: 程炳高主编: 植物生理与农业研究. 北京: 中国农业科技出版社, 1995, 332~337
- 17 Bray E A. Molecular responses to water deficit. Plant Physiol, 1993, 103: 1035

Effect of Osmotic Stress on Isoelectric Point and Subunit Composition of Proteins in Shoots of Wheat

Li Niya Gao Junfeng

(The Central Lab, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract Studies of proteins in shoots of wheat with isoelectric focusing, sodium dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) and two-dimensional electrophoresis (IEF×SDS-PAGE) show that changes in protein profiles and level of protein occur mainly with the molecular weight of 20~48 kD, pI values of 5.34~5.65 and osmotic stress, and the predominant protein (subunit) with apparent MW of 41.5 kD can be induced also. While, the level of two proteins [36.2 kD (pI 5.35), 15.8 kD (pI 5.70)] increased greatly.

Key words shoot of wheat, osmotic stress, protein composition, isoelectric focusing, two-dimensional electrophoresis