

低分子量热激蛋白在种子中的表达特征^{*}

刘 箭 傅家瑞

(中山大学生物学系, 广州 510275)

摘 要 选用了包括顽拗性和正常性种子在内的 4 种种子为实验材料, 运用 Western Blot 方法, 检测了低分子量热激蛋白, 发现被检的 4 种种子都含有低分子量热激蛋白. 认为低分子量热激蛋白在种子中表达的起因是组织特异性, 而不是脱水胁迫所致.

关键词 热激蛋白, 顽拗性种子, 脱水胁迫

分类号 Q 945

热冲击可使动物、植物和微生物细胞表达一套分子量为 25 kD~110 kD 的热激蛋白, 这组热激蛋白具有阻止细胞损伤和修复损伤细胞的功能, 而在高等植物中还特有一组累积含量可达总蛋白量的 1%、分子量在 15 kD~30 kD 的低分子量热激蛋白^[1], 它们分别分布在细胞质、内质网和叶绿体中, 与 90 kD、70 kD、60 kD、25 kD 热激蛋白的分子伴侣特征相比^[2], 对低分子量热激蛋白的功能研究甚少, 但从分子进化特征来看, 它们也内含几个保守序列, 推断这类低分子量热激蛋白在细胞抗逆中起了一定的作用^[3].

许多学者已经发现 LMW HSPs 主要是受诱导在植物营养组织中表达, 但与其它分子量的 HSPs 相比较, LMW HSPs 又可在种子发育的后期大量地合成, 大量地累积在干种子之中, 并在种子萌发后逐步地降解消失. 现已发现多种正常性种子都含有 LMW HSPs^[4,5]. 对于这种生物学现象, 不同的学者提出了不同的解释, 有人认为这是一种发育过程中的组织特异性表达, 但表达出的这些 LMW HSPs 在种子中的功能还不清楚; 也有人认为 LMW HSPs 在正常性种子中出现, 是受种子脱水胁迫诱导表达的, 在脱水伤害的种子细胞中扮演分子伴侣的角色. 我们进行了顽拗性种子受热、脱水和贮存中 LMW HSPs 表达特征的研究, 发现 LMW HSPs 在种子中表达只是具有组织特异性.

1 材料和方法

1.1 低分子量热激蛋白抗血清的制备

1.1.1 实验材料 选用热驯化潜能较高的 85 CT-49762 菜豆为实验品种, 将种子放在潮湿黑暗的环境下, 25℃ 培养 3~4 d, 当下胚轴伸长至 1~2 cm 时, 将气温升至 40℃, 热处理 8 h, 取下胚轴为实验材料.

* 国家自然科学基金 (39470082) 和广东省自然科学基金 (940618) 资助项目

收稿日期: 1996-06-10 刘 箭, 男, 34 岁, 理学博士

1.1.2 抗原的纯化 取热处理后的菜豆下胚轴,每 100 g 组织加入 250 mL 匀浆缓冲液 (100 mmol/L MES-Tris 5 mmol/L EGTA 2 mmol/L $MgSO_4$ 2 mmol/L DTF 2 mmol/L ATP 1 mmol/L PMSE 50 μ mol/L leupeptin 50 μ mol/L perpeptin 0.5% BSA 0.2% 水解酪蛋白, pH 7.6), 将组织匀浆后用 2 层尼龙布过滤, 滤液用 15 000 r/min 离心 30 min, 取上清液用 Beckman 50 Ti 转头在 30 000 r/min 下离心 1 h, 沉淀用 5 mmol/L pH 7.6 Tris-HCl 的溶解, 再加入等体积的 Triton X-114 缓冲液 (2.0% Triton X-114, 300 mmol/L NaCl, 2 mmol/L EGTA, 20 mmol/L Tris-HCl, pH 7.6) 混匀后在冰浴中放置 15 min, 再转入 37℃ 水浴中乳化 15 min, 10 000 r/min 离心 3 min, 取上清液, 加入 1/5 体积的 10% Triton X-114, 混匀后进行上述低温增溶, 高温乳化和离心分相萃取。取 Triton X-114 萃取后的水相制成 SDS-PAGE 中泳样, 用 12.5% ~ 16% 的 Laemmli 梯度电泳系统分离蛋白样品, 切取电泳胶片上染色后的 16 kD 热激蛋白为抗原。

1.1.3 抗血清的制备和 IgG 的纯化 选用体重 2 kg 以上的纯种新西兰兔, 将含 50 μ g 抗原蛋白的电泳胶条与完全福氏佐剂研磨后, 在兔子背部和足下多点注射, 30 d 后注射由不完全福氏佐剂制成的等量抗原, 25 d 后再注射一次, 30 d 后向腋肌淋巴结注射一次, 30 d 后进行一次静脉加强免疫注射, 10 d 后心脏采血收取抗血清, 收取后的抗血清用 $(NH_4)_2SO_4$ 沉淀纯化, 放入 -70℃ 冰箱中保存。

1.2 Western Blot 分析

分别取荔枝种子、芒果种子、莲子种子和菜豆种子的子叶, 用 50 mmol/L Tris-HCl 研磨抽提, 提取液用水饱和重蒸酚抽提 2 次, 酚相用 5 倍体积无水甲醇沉淀, 将沉淀离心后用冷丙酮洗涤沉淀 2 次, 制成 SDS-PAGE 电泳样备用。

将 SDS 电泳样品用 12.5% SDS-PAGE Laemmli 电泳系统进行分离, 然后用 LKB Nova Blot 半干式转移电泳槽以 0.8 A/cm 的工作条件转移 2 h, 将样品转移至硝酸纤维素膜 (BRL 产品) 后, 用 BLOTTO 溶液 (5% 脱脂奶粉, 0.5% Tween 20, TBS) 阻断未结合位点, 用 0.5% Tween 20-TBS 洗涤 NC 膜 (3×5 min), 用 1:100 抗 LMW HSP 兔 IgG-BLOTTO 溶液温育 NC 膜 2 h, 再用 Tween 20-TBS 洗涤 NC 膜 (3×5 min), 将 NC 膜浸 Biotin-SAR IgG 溶液中, (1:100 的 Biotin 化羊抗兔 IgG-BLOTTO 溶液) 1 h, 用 Tween 20-TBS 洗涤 NC 膜 (3×5 min), 用 HRP-Avidin 溶液 (1:1000 HRP 标记 Avidin-Tween 20-TBS) 温育 1 h 后, 用 Tween 20-TBS 洗涤 NC 膜 (4×5 min), 将 NC 膜用 4 CN 溶液显色 (8 mmol/L 4-chloro-1-naphthol, 0.02% H_2O_2 , 50 mmol/L Tris-HCl), 显色后的 NC 膜用 UV P-Works 奔腾 586 成像系统制片。

2 结果与讨论

用 ^{35}S -Met 标记的菜豆下胚抽 LMW HSP 在微粒体组分中标记信号较强, 说明 LMW HSP 在微粒体组分中相对富集 (图 1), 特别是 18 kD、16 kD 和 14 kD 的 LMW HSP。从考马斯亮兰 R-250 染色的电泳胶片上切取 16 kD 的热激蛋白为抗原 (图 2), 制成的抗 LMW HSP 兔 IgG 能与 18 kD、16 kD 和 14 kD 3 种热激蛋白发生免疫反应 (图 3、7、8), 也说明 LMW HSPs 有较强的保守性 (Vig 1992)。

莲子种子是一个很耐贮存的种子, 而菜豆种子则属正常性种子中耐藏性较差的一类, 芒果和荔枝种子则是不耐脱水也不耐贮存的典型顽拗性种子。尽管 4 种种子耐藏耐脱水属性

不同,但 Western Blot 结果显示 4 种种子子叶中都含有低分子量热激蛋白,顽拗性种子中 LMW HSPs 表达强度不受高温和脱水诱导而变化,这些都说明 LMW HSPs 不是种子耐脱水性和耐藏性的决定因子,只是具有组织特异性的表达成份 (图 3).

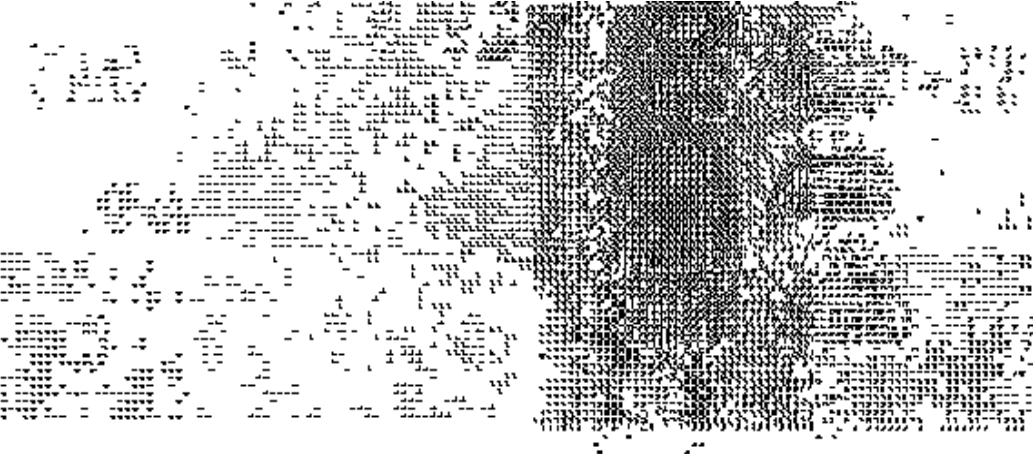


图 1 ^{35}S -Met 标记的菜豆下胚轴细胞膜微囊外周蛋白

Fig. 1 ^{35}S -methionine labelled peripheral protein of membranal vesicle in hypocotyl of *Phaseolus vulgaris*

- 1 25℃生长的菜豆下胚轴
 - 2 40℃热处理的菜豆下胚轴
- 箭头为抗原

图 2 SDS-PAGE 分离 LMW HSP 抗原

Fig. 2 LMW HSP antigen separated by SDS-PAGE

- 1 40℃热处理菜豆细胞的膜微囊外周蛋白
 - 2 25℃生长的菜豆细胞的膜微囊外周蛋白
- 箭头为抗原

图 3 Western Blot 分析种子中 LMW HSPs

Fig. 3 Using Western blot to analyze LMW HSPs in seeds

- a 1, 2 荔枝种子子叶
- 3, 4 42℃热处理 4 h 后的荔枝种子子叶
- 5, 6 脱水 15% 后的荔枝种子子叶
- 7, 8 菜豆种子子叶
- b 1, 2 莲种子子叶
- 3, 4 芒果种子子叶
- 5, 6 42℃处理 4 h 芒果子叶
- 7, 8 脱水 15% 芒果子叶

种子耐脱水与否是一个极度复杂的问题,可能与诸多因子相关,例如, WCP(水通道)、Ubiquitin(蛋白质降解辅助因子)、LEA 蛋白(脱水素)、蛋白酶、蛋白酶抑制剂、离子捕获剂、Chaperone(分子伴侣)、多糖等等。就 Chaperone (HSPs)而言, LMW HSPs 只是其中的一类,它参与了阻止蛋白质变性和保护 mRNA 的过程^[6],实验证明 LMW HSPs 不仅存在于正常性种子中,而且存在于顽拗性种子之中,说明其生理功能可能已超出了热保护、脱水保护、结合 mRNA 等等, LMW HSPs 生物学意义可能更加广泛,参与了各种类型种子都经历过的发育代谢过程。

参 考 文 献

1 DeRocher A E, Helm K W, Lauzon L M, et al. Expression of a conserved family of cytoplasmic low molecular weight heat shock proteins during heat shock stress and recovery. Plant Physiol.

- 1991, 96 1038~ 1047
- 2 Jakob V, Gaestel M, Engel K, et al. Small heat shock proteins are molecular chaperon. J Biol Chem, 1993, 268 1517~ 1520
 - 3 Vig N P, Vig J, Brambl R. Phylogeny of the crystallin related heat shock proteins. J Mol Evol, 1992, 35 573~ 545
 - 4 Coca M, Almoguera C, Jordano J. Expression of sunflower low- molecular-weight heat-shock proteins during embryogenesis and persistence after germination: localization and possible functional implications. Plant Mol Biol, 1994, 25 479~ 492
 - 5 Hernandez H O, Vierling E. Expression of low molecular weight heat-shock proteins under field condition. Plant Physiol, 1993, 101 1209~ 1216
 - 6 Nover L, Scharf K D, Veumann D. Cytoplasmic heat shock granules are formed from precursor particles and associated with a specific set of mRNA. Mol Cell Biol, 1989, 9 1298~ 1308
 - 7 吴显荣, 刘箭, 徐晓玲. 热锻炼能提高菜豆细胞可溶性蛋白 SOD 膜 ATP酶和质子泵在体外的热稳定性. 生物化学杂志, 1995, 6 259~ 263

Expression of Low-Molecular-Weight Heat-Shock Proteins in Seeds

Liu Jian^{*} *Fu Jiarui*

Abstract Low-molecular-weight heat-shock protein has been found in orthodox seeds, and it has been proposed that this protein was related to desiccation of orthodox seeds. In this study four kinds of seeds, including orthodox seeds and recalcitrant seeds, were chosen as materials. The LMW HSPs was detected by western blotting in all of the four seeds in spite of their different biological characteristics. The results demonstrated that LMW HSPs expression in seeds was tissue specific only, not water stress induced.

Keywords heat-shock protein, recalcitrant seed, water stress

^{*} Department of Biology, Zhongshan University, Guangzhou 510275