

发育中花生胚离体萌发和蛋白酶活性 变化及脱落酸的影响*

林 鹿** 傅家瑞

(中山大学生物学系, 广州 510275)

摘 要 发育过程中花生胚氨肽酶有两个活性高峰, 与贮藏蛋白质的两个合成高峰相吻合, 发育晚期有微弱的羧肽酶活性出现. 脱落酸能抑制离体胚萌发, 抑制内肽酶和羧肽酶活性, 但不抑制氨肽酶活性. 发育早期离体胚萌发时贮藏蛋白质降解依赖于羧肽酶. Act-D 和 CHM 处理结果表明羧肽酶在成熟胚已预存但活性处于抑制状态.

关键词 脱落酸, 花生胚, 蛋白酶

分类号 Q945.4

植物种子贮藏蛋白质含量与种子活力水平有密切关系^[1-3]. 降解贮藏蛋白质的酶有3类: 氨肽酶、羧肽酶和内肽酶^[4,5]. 已往的研究大多数集中于成熟种子, 而发育中蛋白酶的形成与活性的研究报道则很少^[6]. 脱落酸能调控种子发育过程, 它能抑制种子萌发, 使种子维持正常的胚性发育^[7,8]. 那末, 种子发育过程中氨肽酶、羧肽酶和内肽酶的变化及脱落酸对它们的作用是如何的呢? 本文以离体花生胚为材料, 报道这方面的研究结果.

1 材料与方 法

花生(*Arachis hypogaea* L.)材料种植于中山大学试验小区内. 按黄上志的方法划分种子发育时期, 于不同的发育时期取发育一致的种子, 剥去种皮, 获得离体胚^[9].

1.1 贮藏蛋白质含量测定 取 15, 25, 35, 45, 55, 65 和 75DAP(果针入土后天数)花生胚, 其子叶经冰冻干燥后研磨成粉末, 按 1:10(w/v)加入正己烷于-20℃过夜脱脂, 2500×g 离心 15×g, 脱脂粉中的盐溶蛋白质参照 Yamada 的方法^[10], 用含 NaCl 10%, 1mmol/L PMSF 和 10mmol/L β-巯基乙醇的 0.01mol/L 磷酸缓冲液(pH7.9)匀浆, 于 4℃静置 3h, 20000r/min 离心 30min, 上清液即为盐溶蛋白质提取液. 花生球蛋白, 伴花生球蛋白和 2S 球蛋白组分含量, 依 Yamada 的方法^[11], 用固体硫酸铵加入上述盐溶蛋白质提取液中进行分级沉淀, 40%饱和度下沉淀的为伴花生球蛋白, 65%沉淀的为花生球蛋白, 85%沉淀的为 2S 球蛋白, 沉淀用 0.01mol/L 磷酸缓冲液(pH7.9)溶解后, 按 Bradford 的方法测定各蛋白组分的含量^[12].

收稿日期: 1993-09-18

* 国家自然科学基金和高等学校博士点专项科研基金资助项目

** 现在华南理工大学轻化工程系工作

1.2 萌发试验 取 25,45 和 65DAP 的花生种子,剥去种皮后用 75%酒精处理 5s,再用 0.15%氯化亚汞消毒 10min,于垂直板发芽箱内 28℃黑暗条件下发芽 2,4,6,8 和 10 天时测定发芽率及蛋白酶活性.脱落酸(10^{-4} mol/L)处理时,先用脱落酸溶液湿润玻板上滤纸,花生胚放置好后(每板 20 个胚),将脱落酸溶液注入箱内至 2cm 高度.放线菌素 D (Act-D)(20mg/L)和环己亚胺(CHM)(20mg/L)处理方法和脱落酸相同.

1.3 蛋白酶提取与活性测定 蛋白酶提取按 Basha 的方法^[5].子叶用 1:5(w/v)含 10mmol/L 巯基乙醇的 50mmol/L Tris-HCl 溶液(pH7.4)研磨,在 4℃条件下 25000×g 离心 20min,一部份上清液用于测定氨肽酶活性.另一部份上清液用含有 10mmol/L 巯基乙醇的 50mmol/L 乙酸钠溶液(pH5.0)透析过夜,27000×g 离心 20min,上清液用于测定羧肽酶和内肽酶活性.

1.4 羧肽酶(EC.3.4.17.1)活性测定 按 Mitsushahi 的方法^[13].反应系统为 2.5ml 含 0.5mmol/L 苄氧羰基-甘氨酸-苯丙氨酸(CBPA)的 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液+0.1ml 酶液.30℃保温 30min 后加入 1ml 15% TCA,4000×g 离心 20min,上清液按 Yemm 的方法测定 α -氨基酸含量^[14].酶的一个活性单位定为每分钟内反应系统释放 0.01mmol 氨基酸.

1.5 氨肽酶(EC.3.4.11.1)活性测定 按 Mitushashi 的方法^[13].反应系统为 2.9ml 含 0.4mmol/L L-亮氨酸-对-硝基苯胺(LAP)的 50mmol/L Tris-HCl 缓冲液(pH7.4)+0.1ml 酶液.酶的一个活性单位定义为反应系统在 410nm 波长的 OD 值每分钟增加 0.001.

1.6 内肽酶(EC.3.4.21.26)测定 按 Cameron 和 Medel 的改良法^[15].反应系统为 2.5ml 含 10mmol/L β -巯基乙醇,2.5mmol/L 苯甲酰-L-精氨酸-对-硝基苯胺(BAPA)的 50mmol/L Tris-HCl (pH8.1)+0.5ml 酶液.酶的一个活性单位定义为反应系统在 410nm 波长的 OD 值每分钟增加 0.001.

1.7 内源脱落酸含量测定 按吴颂如的方法^[16],用南京农业大学提供的脱落酸(ABA)酶联免疫测试药盒测定.取萌发一定天数的花生胚洗净后加入 80%甲醇溶液在冰浴中研磨,在 4℃条件下 500×g 离心 2 次,每次 10min.合并上清液分别在 pH8.0 和 pH2.5 条件下用乙酸乙酯提取 3 次.样品经 N_2 吹干并甲酯化后,取 50 μ l 加入药盒微量滴定板小孔内与 50 μ l ABA 抗体结合.洗涤后加入显色剂邻苯二胺于 37℃温育 30min,加入 50 μ l 2mol/L H_2SO_4 终止反应,于 ME891 型酶联免疫检测仪上测定读数,由 ABA 标准曲线上查出样品 ABA 含量.

2 结果与分析

2.1 不同发育时期花生离体胚萌发及脱落酸的影响 从表 1 可以看出,25DAP 的花生胚已具有萌发能力,45DAP 花生胚的萌发能力已达 100%,但当 ABA 存在时,胚的萌发率却为零,65DAP 胚 4 天的萌发率已达 100%,但 ABA 处理的胚虽经 10d 萌发,萌发率只有 28%.至于胚根长度,45DAP 的花生胚萌发 10d 时胚根长为 5.3cm,65DAP 的胚此时根长达 8.4cm,但 ABA 处理的胚根长仅为 1.1cm.由此可见,ABA 对胚的萌发和胚根伸长的抑制作用十分明显,和 ABA 对离体培养中花生胚萌发抑制作用的报道是相似的^[9]

表 1. 脱落酸(10^{-4} mol/L)对不同发育时期胚离体萌发的影响

Tab.1 Effect of ABA on germination of peanut embryos during different development stages

发育时期	萌发天数/d	萌发率/%		胚根长度/cm	
		ABA 处理	对照	ABA 处理	对照
25DAP	2	0	23	0	0.6
	4	0	38	0	1.7
	6	0	54	0	2.1
	8	0	58	0	2.6
	10	0	61	0	3.1
45DAP	2	0	78	0	1.8
	4	0	100	0	2.9
	6	0	100	0	3.7
	8	0	100	0	4.6
	10	0	100	0	5.3
65DAP	2	0	84	0	2.4
	4	0	100	0	3.9
	6	13	100	0.3	5.2
	8	21	100	0.4	6.8
	10	28	100	1.1	8.4

2.2 蛋白酶的活性变化及脱落酸的影响

(1)不同发育时期花生胚蛋白酶活性及内源脱落酸含量的变化. 图 1,2 显示,花生胚发育过程中氨肽酶出现了两个活性高峰,分别在 35DAP 和 65DAP,后一个高峰活性更大

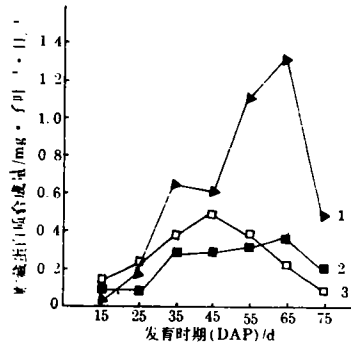
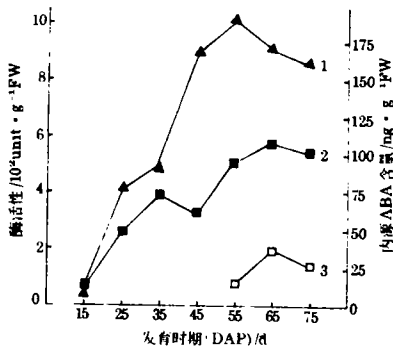


图 1 不同发育时期花生胚蛋白酶活性及 ABA 含量变化

图 2 不同发育时期花生胚贮藏蛋白各组分累积速度变化

Fig.1 Changes of endogenous ABA content and peptidases activities of peanut embryos during different development stages

Fig.2 Changes of synthesis velocity of storage proteins of peanut embryos during different development stages

- 1 Endogenous ABA content;
- 2 Aminopeptidase activity;
- 3 Carboxypeptidase activity.

- 1 Arachin;
- 2 Conarachin;
- 3 2S globulin.

一些,发育中花生胚在 55DAP 有微弱的羧肽酶活性出现,65DAP 活性上升,然后在 75DAP 趋于下降. 贮藏蛋白质的花生球蛋白和伴花生球蛋白组分有两个合成高峰,一个在 35DAP,另一个在 65DAP. 2S 球蛋白的合成高峰出现在 45DAP,然后趋于下降. 花生胚内源 ABA 在发育过程中趋于上升,在后期没有明显下降.

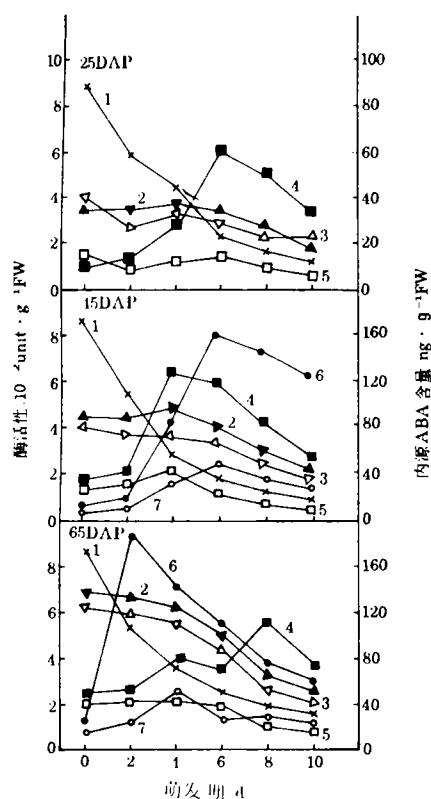


图 3 不同发育时期花生离体胚萌发过程中蛋白酶活性及内源 ABA 含量变化和外加 ABA 对蛋白酶活性的影响

Fig. 3 Endogenous ABA content, activities of peptidases and effect of exogenous ABA on them in germinating peanut embryos in vitro

- 1 Endogenous ABA content;
- 2 Aminopeptidase;
- 3 Aminopeptidase with ABA treatment;
- 4 Carboxylpeptidase;
- 5 Carboxylpeptidase with ABA treatment;
- 6 Endopeptidase;
- 7 Endopeptidase with ABA treatment.

(2)不同发育时期的离体花生胚萌发过程中蛋白酶活性及内源 ABA 含量变化和外加 ABA 对蛋白酶活性的影响. 从图 3 可以看出,不同时期花生离体胚萌发过程中,内源 ABA 含量都趋于下降. 尤其在 0~4d 内,中后期胚的内源 ABA 含量下降的速度更快一些. 萌发过程中,氨基酸酶没有明显的活性高峰出现,45DAP 后活性下降了. 25DAP 花生离体胚萌发时,检测不到内肽酶活性,但随着种子的发育,45DAP 的离体胚在萌发 6d 时其活性出现了一个高峰,而发育后期胚的活性高峰在萌发 2d 内就出现了. 25DAP 的胚萌发 6d 时羧肽酶活性达到高峰,45DAP 的是 4d,但 65DAP 的活性高峰延迟到 8d. 随着胚的成熟,羧肽酶活性也提高了,早期胚萌发时,氨基酸酶活性趋于下降,内肽酶活性不出现及羧肽酶活性提高的结果说明了此时胚贮藏蛋白质降解依赖于羧肽酶. 外源 ABA 明显地抑制了羧肽酶和内肽酶活性,对氨基酸酶活性的抑制作用不明显.

2.3 Act-D 和 CHM 对羧肽酶活性的影响 图 4 表明,ActD 和 CHM 都抑制了发育前期胚羧肽酶的活性. 成熟中期胚萌发 0~4d 内,CHM 显著地抑制羧肽酶的活性,但 8d 后 Act-D 处理的羧肽酶活性也下降了,显示此时胚已有预存的羧肽酶 mRNA,CHM 阻止了

羧肽酶的合成,从而抑制酶的活性,萌发 8d 时,由于 Act-D 抑制了羧肽酶 mRNA 的进一步合成,mRNA 水平下降了,因而抑制了酶的合成.发育后期胚萌发 0~4d 内,羧肽酶活性不受 Act-D 和 CHM 的影响,8d 后其活性被明显抑制,结果表明,此时胚需重新合成羧肽酶 mRNA.这个结果与此时胚萌发过程中羧肽酶活性有两个较明显的高峰的表现是一致的.

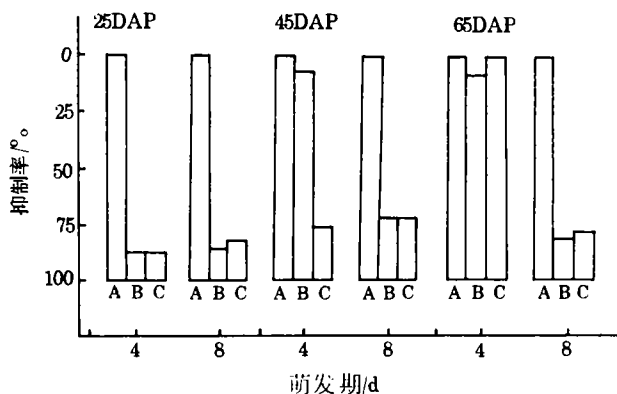


图 4 Act-D 和 CHM 对不同发育时期花生胚萌发时羧肽酶活性的影响

Fig. 4 Effect of Act-D and CHM on the activities of carboxylpeptidase in germinating peanut embryos in vitro

A. CK; B. Act-D treatment; C. CHM treatment

3 讨论

植物胚胎发育中,蛋白质组分是不断变化的^[17]. Andrei^[4]认为,蛋白酶是在种子萌发初期迅速合成的,它们受蛋白质合成抑制剂环己亚胺抑制.傅家瑞^[18,19]报道,干花生种子中具有很高的中性氨肽酶活性,该酶是预存的.Kanichi^[6]报道一种棕榈种子发育过程中有两类蛋白酶 A 和 B 的存在,A 产生于种子发育晚期,B 在发育早期就有了.本研究结果表明,氨肽酶在种子发育早期已被合成.在花生种子发育过程中,氨肽酶的两个活性高峰与贮藏蛋白质的花生球蛋白和伴花生球蛋白两个组分合成高峰是吻合的,氨肽酶活性不受 ABA 抑制和萌发过程中活性下降了,因此,氨肽酶可能与贮藏蛋白质合成时多肽链的修饰有关,也可能是萌发过程中其它蛋白酶活性的启动者.发育早期胚萌发过程缺乏内肽酶活性,后期胚萌发时羧肽酶活性高峰迟于内肽酶出现的证据表明,羧肽酶主要起水解小分子蛋白的作用.花生球蛋白和伴花生球蛋白降解则依赖于内肽酶的活动^[1].从 Act-D 和 CHM 对羧肽酶作用的结果来看,蛋白酶可以受抑制的形式存在.植物发育过程中能适时启动蛋白酶合成基因,但选择性抑制了酶活性,ABA 可能是抑制酶活性的主要因子.发育中蛋白酶形成和活性变化对于种子活力形成的意义仍有待进一步研究.

参 考 文 献

- 1 李黄金, 黄上志, 傅家瑞. 花生种子活力与贮藏蛋白质降解的关系. 华南植物学报, 1993 (试刊 I): 78~83
- 2 黄上志, 傅家瑞. 花生种子的发育与贮藏蛋白质的合成与积累. 植物生理学报, 1992, 18 (2): 142~149
- 3 黄丽萍, 傅家瑞. 花生种子萌发早期事件与活力的关系. 中山大学学报 (自然科学版), 1991, 30: 88~95
- 4 Andrei D S, Vaintraub. I A. Degradation of storage proteins in germinating seeds. *Phytochemistry*, 1987, 26 (6): 1557~1566
- 5 Basha S M, Cherry J P. Proteolytic enzyme activity and storage protein degradation in cotyledons of germinating peanut (*Arachis hypogaea* L.) seeds. *J Agric Food Chem*, 1978, 26: 229~234
- 6 Kanichi O, Kyauna H, Shinji K. Changes in levels of protease and their inhibitor during development of the seeds of Job's tear (*Coix lacryme-jobi* L. var. *ma-yuen-stapf*) and their locations and interactions. *Plant Cell Physiol*, 1989, 30 (5): 699~705
- 7 林鹿, 金剑平, 傅家瑞. 渗透因素对离体发育花生胚内源 ABA, 萌发和贮藏蛋白质合成与累积的影响. 植物生理学通讯, 1993, 4: 270~272
- 8 覃章铮, 唐锡华, 潘国桢等. 水稻胚乳内源 ABA 含量的变化及其与发育和萌发的关系. 植物学报, 1990, 32: 448~455
- 9 黄上志, 傅家瑞. 脱落酸对花生胚萌发和贮藏蛋白质合成的影响. 植物生理学报, 1993, 19 (1): 31~37
- 10 Yamada T, Aibra S, Morita Y. Accumulation pattern of arachin and its subunits in maturation of groundnut seeds. *Plant Cell Physiol*, 1980, 21 (7): 1217~1226
- 11 Yamada T Aibra S. Morita Y. Isolation and some properties of arachin subunits. *Agric Biol Chem*, 1979, 43: 2563~2568
- 12 Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248~254
- 13 Mitsuhashi W, Koshiha T, Minamikawa T. Influence of axisremoval on amino-, carboxyl- and endo-peptidase activities in cotyledons of germinating *Vigna Mungo* seeds. *Plant Cell Physiol*, 1984, 25 (4): 547~554
- 14 Yemm E N, Cocking E C. The determination of amino acid with ninhydrin. *Analyst*, 1955, 80: 209~213
- 15 Cameron E C, Memdel M. A non-proteolytic "trypsin-like" enzyme. *Plant physiol*, 1971, 48: 278~281
- 16 吴颂如, 陈婉芬, 周燮. 酶联免疫法 (ELISA) 测定植物内源激素. 植物生理学通讯, 1988, 5: 53~57
- 17 张斌, 唐锡华. 水稻胚胎发育时期的特异性蛋白质. 植物生理学报, 1992, 18 (1): 85~92
- 18 傅家瑞. 种子生理. 北京: 科学技术出版社, 1985
- 19 Fu J R, Huang S Z, Li H J. Seed vigor in relation to the synthesis and degradation of storage

proteins in peanut (*Arachis hypogaea* L.) seeds. In the Fourth Internatinal Workshop on Seeds. Angers, France, 1992, 3: 811~816

Germination and Changes of Activities of Peptidases During Development of Peanut Embryos in Vitro and Effect of Absciscic Acid on Them

Lin Lu * *Fu Jiarui*

Abstract Aminopeptidase activity had two peaks during development of peanut (*Arachis hypogaea* L.) embryos, which coincided with the synthesis of storage proteins. A weak activity peak of carboxypeptidase emerged in the late stage of development of embryo. Aminopeptidase might have an important role in modifying the structure of peptides of storage proteins. Absciscic acid inhibited germination of embryos in vitro, decreased activities of endopeptidase and carboxypeptidase, but aminopeptidase activity was not affected. Degradation of storage proteins in germinating embryos in vitro during development was dependent upon carboxypeptidase. Endogenous ABA content declined in germinating embryos. Results from Act-D and CHM treatment showed that carboxypeptidase existed in cells of matured embryos but its activity was mainly inhibited.

Keywords absciscic acid, peanut embryos, peptidases

* Department of Light Chemical Engineering, South China Technology University, Guangzhou 510641