

花生种子老化相关蛋白质的初步研究

范国强 傅家瑞 陈润政

(中山大学生命科学学院, 广州 510275)

摘要

本文以粤油 116 花生 (*Arachis hypogaea* L.) 为材料, 对不同处理种子的除子叶“种胚” (以下简称“种胚”) 的蛋白质进行了研究。实验结果表明, 当花生种子活力下降到一定程度时, 其“种胚”内出现一种新蛋白质 (pI 6.2, MW 10 KD), 随种子老化程度加深, 含量逐渐增多。我们认为该蛋白质与花生种子老化存在着一定的相关关系, 可作为该种子老化的标志。

关键词: 花生种子; 种胚; 蛋白质; 电泳

在贮存过程中, 种子因老化而逐渐丧失活力。有人认为种子的这种活力降低与种子内遗传物质完整性丧失有关^[1, 2] 然而, 有的研究则表明, 种子老化主要发生在 RNA 和膜的变化水平上^[1, 3, 4, 7]。至于与生命活动密切相关蛋白质的研究则很少, 即使有些研究, 也只是对劣变种子萌发早期事件的工作^[1, 9, 8]。本文以不同处理的花生种子为材料, 研究老化引起种胚内基因表达最终产物——蛋白质的变化, 找出与老化相关的蛋白质, 以进一步揭示种子老化机理。

材料与amp;方法

一. 材料及处理

实验所用花生 (*Arachis hypogaea* L.) 品种——粤油 116 均由广东省农业科学院经济作物研究所提供。

室温干燥处理 分别将 1986、1988、1990、1991 年收获的花生种子, 当年风干后装入放有变色硅胶的干燥器内室温贮存待用。种子发芽率分别为 0、10%、68% 和 98%。

人工老化处理 将 1991 年贮存的种子剥皮后放入温度为 38℃、相对湿度为 95% (饱和氯化钡溶液控制) 的恒温箱内进行老化处理。老化时间分别为 1、2、4、6d, 然后, 取出种子于室温下风干待用, 并以部分种子测定其发芽率。经过 1、2、4、6d 老化处理种子的发芽率分别为 92%、85%、80%、70%, 发芽率为 95% 的风干种子作对照。

花生种子经上述两种处理后, 提取其“种胚”蛋白质。

二. 实验方法

蛋白质提取 用略有修改的 Damerval¹⁹ 法。将 3g 花行“种胚”放入液氮(LN₂)预冷的研钵内,用适量 LN₂ 研成粉末,加入 30ml 冷 10% 三氯醋酸(TCA)溶液(用丙酮配制,含 0.07% 巯基乙醇)内, -20℃ 静止 1h 后, 10 000xg 离心 10min(4℃), 收集沉淀, 真空干燥后作供试样品。

三. 蛋白质双向凝胶电泳

样品制备 称取 30mg 上述真空干燥的干粉置于 1.5ml 离心管内, 加入 400ul UKS (9.5mol/L 尿素、5mol/L k₂CO₃、0.5%(W/V) 二硫苏糖醇、1.25%(W/V) 十二烷基磺酸钠、2%(V/V) 两性载体电解质 pH3.5 -10、6%(W/V) Triton X-100) 溶液, 振荡混匀, 于 50℃ 水浴中温育 10min, 然后室温 8 000 xg 离心 15 min, 上清液即为电泳分析的蛋白质样品。

电泳分析 第一向等电聚焦用略有修改的 O'Farrell¹¹¹ 法。凝胶柱长 15cm、内径 1.5mm, 凝胶浓度 4%。上、下槽电极液分别为 0.5 mol/L NaOH 和 0.1 mol/L H₃PO₄。每管加 3.5 mg 蛋白质样品 25 μl 覆盖液(9.5 mol/L 尿素、1%(V/V) 两性载体电解质 pH 3.5-10), 500 V 电泳 24h。之后, 取出凝胶条于平衡液(0.0625 mol/L Tris. HCl pH6.8、10%(V/V) 甘油、2.3(W/V) 十二烷基磺酸钠、5%(V/V) 巯基乙醇、5%(V/V) 四甲基乙二胺)中平衡 20 min。第二向电泳用 laemili¹¹⁰ 法。浓缩胶和分离胶浓度分别为 4% 和 13%。电泳结束后, 将凝胶用染色液(0.25%(W/V) 考马斯亮蓝 R₂₅₀、45% 甲醇、10% 冰醋酸)染色和脱色液(10% 甲醇、70% 冰醋酸)脱色, 脱色好的凝胶用于照相。

结果与分析

一. 室温老化花生种子“种胚”蛋白质的变化

室温贮存下, 不同活力花生种子“种胚”蛋白质双向凝胶电泳结果见图 1。由图 1 可以看出, 花生种子“种胚”的蛋白质种类多达数百种, 为了研究“种胚”蛋白质与花生种子老化的关系, 我们特找出其中变化比较显著的蛋白质点加以分析。比较 a 和 b 可以观察到, a 图中没有 d 图存在的蛋白质点 1.1(pI 6.2、MW 10 KD), 说明高活力花生种子“种胚”内不存在这种蛋白质, 而低活力种子“种胚”内则形成了这种蛋白质。b、c 和 d 图中都有蛋白质 1.1 的存在, 但是其在量上存在明显差异。即 d 图中蛋白质 1.1 的量大于 c 图, c 图又大于 b 图。这表明随着花生种子活力的降低, 即老化程度的加深, 其“种胚”内蛋白质 1.1 的量逐渐增加。意味着蛋白质 1.1 可能与花生种子老化有密切关系。

二. 人工老化处理对花生“种胚”蛋白质的影响

将 1991 年采收风干的花生种子老化处理(见材料与与方法)后, 提取“种胚”蛋白质进行分析。其蛋白质双向凝胶电泳图如图 2。由图 2 可以看出, 花生种子经不同程度的人工老化处理后, 其“种胚”的蛋白质也发生了一定的变化。对 a、b、c 和 d 图来说, 不同处理间某些蛋白质(多肽)如 2.2、2.3 蛋白质点, 量上存在差异, 而观察不到不同的处理间电泳图上蛋白质点的不同

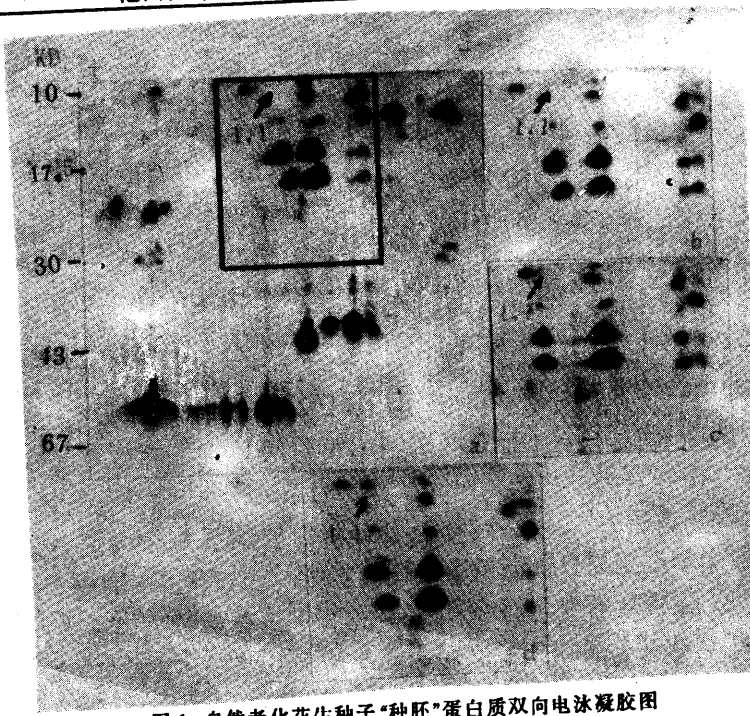


图1 自然老化花生种子“种胚”蛋白质双向电泳凝胶图
 Fig. 1 Two dimensional SDS-PAGE of cotyledonless embryonic proteins of naturally aged peanut seed
 a. 1991; b. 1990; c. 1988; d. 1986. b.c.d are amplified parts as the one in rectangle in a

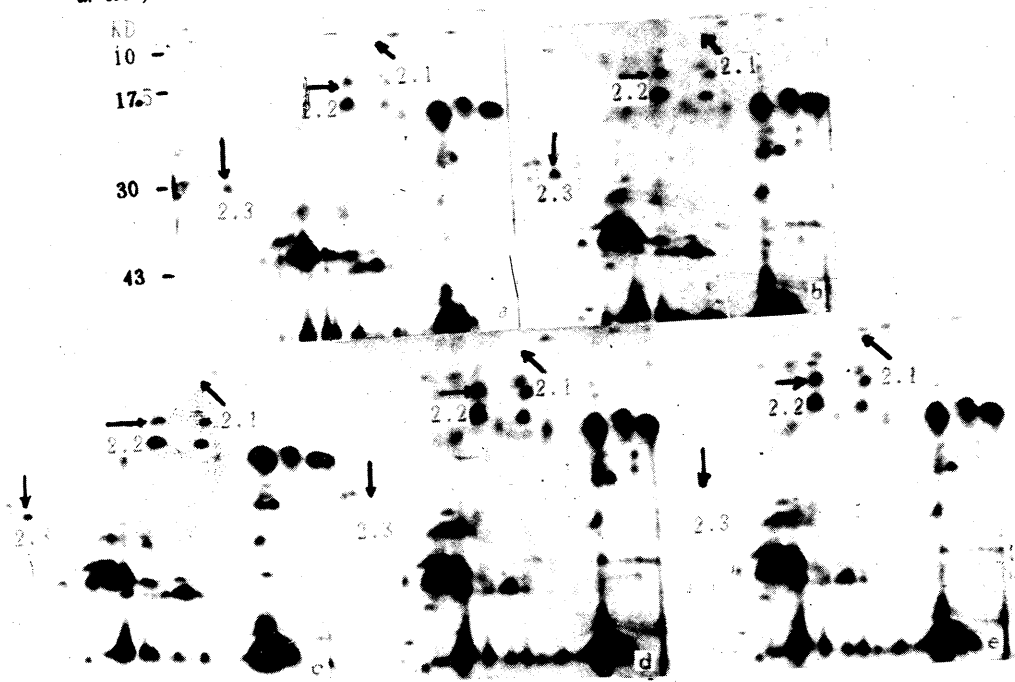


图2 人工老化花生种子“种胚”蛋白质双向电泳凝胶图
 Fig. 2 Two dimensional gel SDS-PAGE of cotyledonless embryonic proteins of artificially aged peanut seed
 a. 0 day; b. 1 day; c. 2 days; d. 4days; e. 6 days.

同。表明 b、c、d 与 a 中的蛋白质相比没有发生质的变化。a、b、c、d 分别与 e 比较后发现, e 中出现了一种 a、b、c、d 中都不存在的蛋白质点 2.1。这说明花生种了随着人工老化程度的加深, 其“种胚”内出现了一种新的蛋白质(pI 6.2, MW 10 KD)。由该蛋白质的等电点(pI)和分子量(MW), 即其在双向电泳凝胶图上的位置知道。其与蛋白质 1.1 为同一蛋白质。这充分说明了该蛋白质与花生种子老化的相关性。

讨 论

吸涨向日葵种子胚轴 mRNA 体外翻译结果表明, 低活力种子胚轴中出现了高活力胚轴中没有的两种蛋白质^[9]。在其它种子中也观察到老化引起种子蛋白质的变化, 而没有质的变化^[2, 9]。这些实验只是观察了老化种子萌发初期蛋白质的变化, 没有考核到老化干种子与吸涨种子物质代谢间的显著差异^[4, 9]。此外, 体外翻译蛋白质结果与体内蛋白质变化也不尽完全相同。因此, 这些结果不能充分说明种子老化的实质。我们利用不同老化程度的花生种子为材料, 研究了“种胚”蛋白质的变化, 找出了与花生种子老化相关的蛋白质。

自然老化与人工老化花生种子“种胚”蛋白质电泳凝胶图有一定差异(图 1 和图 2)。其原因可能是, 人工老化种子在加速老化过程中, 由于高温、高湿的作用, 内部物质代谢发生较大变化^[9]这种变化在蛋白质方面相应地表现出来。人工老化与自然老化处理间种子蛋白质存在差异的现象在其他研究中也观察到^[9]。无论两种处理形式有何不同, 但结果都降低了种子活力, 在这一点上二者是相同的。这与我们的实验结果一致, 即两种处理“种胚”双向电泳凝胶图上出现了很多相同的蛋白质(多肽)点, 尤其是随着种子老化程度加深而出现的分子量和等电点分别为 10KD 和 6.2 的蛋白质。因此, 我们认为, 自然老化和人工老化诱导产生的这种蛋白质为花生种子老化的特异相关蛋白质。至于该蛋白质在细胞中的位置及功能有待进一步研究。

参 考 文 献

- [1] 陈光仪、傅家瑞, 花生种子劣变过程中一些酶活性的变化, 植物学报, 1987, 29(2):164-170.
- [2] Bavrajappa, B. S., H. S. Shetty, H. S. Pakash, Membrane deterioration and other biochemical changes associated with accelerated aging of maize seeds. Seed Science and Technology, 1991, 19:279-286.
- [3] Bray, C. M., T. Chow, Lesions in post-ribosomal supernatant fraction associated with loss of viability in pea (*Pisum arvanse*) seed. Biochemia et Biophysica Acta, 1976, 442:1-13.
- [4] Bray, C. M., T. Chow, Lesions in the ribosomal of non-viable pea (*Pisum arvanse*) embryonic axis tissue. Biochemia et Biophysica Acta, 1976, 442:14-23.
- [5] Damerval, C., Two dimensional gel electrophoresis. Electrophoresis, 1986, 7:52-54.
- [6] Dell'Aquila, A., G. Zoch, Different forms of EFI and viability in wheat embryos. Phytochemistry, 1976, 15: 1607-1610.
- [7] Dell'Aquila, A., P. D. Leo, Damages at translational level in aged wheat embryos. Plant Science Letters, 1978, 12:

217-226

- [8] Ganguli, S., M. S. Sem, Some physiological differences between naturally and artificially aged wheat seeds. *Seed Science and technology*, 1990, 18:507-514.
- [9] Gidrol, X., A. Noubhan, A. Pradet, Biochemical changes induced by accelerated aging in sunflower seeds: II RNA population and protein synthesis. *Physiologica Plantarum*. 1990, 80:598-604.
- [10] Laemili, U. K., Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227:680-685.
- [11] O'Farrell, H., High resolution of two dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 1975, 250:4007-4021.
- [12] Villiers, T. A., Seed aging: Chromosome stability and extended viability of seeds stored fully imbibed. *Plant Physiology*, 1974, 53:875-878.

STUDIES OF PROTEINS RELATED TO PEANUT (*ARACHIS HYPOGAEA*) SEED AGING

Fan Guoqiang Fu Jiarui Chen Runzheng

(*Institute of Life Sciences of Zhongshan University, Guangzhou 510275*)

Abstract

Seed aging involves many changes, such as, enzyme activities, integrities of membrances and nuclear acids and others, which result in the loss of seed viability finally, but these can not explain the mechinasm. This paper deals with changes of proteins in cotyledonless embryos of Peanut (*Arachis hypogaea*) seeds wiht various treatments by means of two dimensional gel electro-phoresis. The results indicated that a new protein (pI 6.2, MW 10 KD) appeared in the dry aged cotyledonless embryos, which did not exist in the highly viable embryos, regardless of naturally or artificially aged Peanut seeds. Moreover, the content of the protein increased with intensity of the seed aging, The protein was considered as specific one to the Peanut seed aging.

Key words: Peanut seed; Embryo; Protein; Electrophoresis