

小麦的热击蛋白及耐热性的获得*

周人纲 樊志和 李晓芝 王占武 韩 炜

(河北省农林科学院农业物理生理生化研究所, 石家庄 050051)

摘 要 将生长 3 天的 wheat 幼苗在不同温度下进行热击处理和同位素标记, 在 34℃ 时诱导出了十几种蛋白, 其中, 以 70、54、26、15~17KD 分子量的蛋白最为明显; 当热击时间超过 4h 时, 这些蛋白明显地减少。事先对小麦进行 34℃ 的热锻炼, 可使其获得耐热性来抵御高温的伤害。

关键词 小麦 热击 热击蛋白 耐热性

温度决定着自然界的物种分布, 它强烈地影响着作物的生长发育又不易被人控制。高等植物的热击蛋白 (HSPs) 是 1980 年 Barnett 在烟草和大豆细胞培养中发现的^[1], 后来人们不断地在各种作物中发现 HSPs^[2~5], 逐渐地认识到这是高等植物的一种普遍现象; 并对它的诱导产生和机理进行了研究。华北地区小麦生长后期经常受到干热风的危害, 高温是干热风的主导因子。本文研究了小麦 HSPs 的诱导温度和 HSPs 的诱导进程, 探讨了 HSPs 产生和小麦耐热性获得的关系。

1 材料和方法

1.1 植物材料

所用冬小麦品种为 90-80 (河北省农科院理化所小麦育种组提供), 种子经消毒后种入塑料盒中, 置 22℃ 培养箱中暗培养。培养三天的幼苗用于实验。

1.2 小麦耐热性生长实验

选择生长一致的 40 株幼苗为一组, 经不同温度处理后重新置于 22℃ 下恢复生长, 每隔 24h 量一次苗的高度, 取 40 株的平均值。

1.3 同位素标记

在对经不同温度处理后的幼苗进行标记时, 剪下 0.7g 幼芽 (约 35 个幼芽), 切口朝下, 整齐排列于一小试管中, 试管内加 0.7ml 培养介质 (1% 蔗糖、1mmol/L KPi 缓冲液, pH7.5), 再以 60μCi/ml 浓度加 S³⁵ 蛋氨酸 (2.96molBq/ml, 中国医科院放射医学研究所), 在处理温度下进行标记。标记后冲洗介质 (1% 蔗糖、1mmol/L KPi 缓冲液、5mmol/L 蛋氨酸、pH7.5), 洗去表面的放射物质后置幼苗于液氮中。标记后的小麦幼芽以 1:1 (W/V) 加提取液 (50mmol/L Tris-HCl 缓冲液, pH7.5, 2% 巯基乙醇, 5mmol/L EDTA) 匀浆, 二层纱布过滤, 用 TGL-16 台式离心机 12000×g 离心 20min, 取上清液加等体积 SDS 样品缓冲液

1993-10-12 收稿。

农业部北京农业大学生理生化开放实验室资助项目。

(0.1mol/L Tris-HCl 缓冲液, pH8.0, 2% SDS, 10% 甘油, 5% 巯基乙醇, 0.1% 溴酚兰) 煮沸 5min, 冷却后分装于小离心管内, -20°C 贮存备用。

1.4 S^{35} -Met 掺入蛋白质

S^{35} -Met 掺入蛋白质按 Mams 的 Filter-Paper Disk 方法测定^[6], 用 LKB-1210 液闪仪计数。

1.5 电泳

参照 Laemmli 的方法^[7], 在梯度 8%~16% 的 SDS 聚丙烯酰胺凝胶中电泳, 0.25% 考马斯亮兰 R-250 染色, 标准蛋白为上海生化所东风生化试剂厂产品。

1.6 放射自显影

电泳胶片脱色后, 置干胶器中加热抽干, 用 X 光胶片在 -70°C 下进行放射自显影。

2 结果与分析

2.1 温度对 HSPs 合成的影响

将在 22°C 下生长 3 天的 wheat 幼苗分别在 28°C 、 34°C 和 37°C 下热击 2h, 然后继续在原温度下用 S^{35} -Met 标记 2h, 以诱导 HSPs 的合成, 仍以 22°C 作为对照, 结果 (见图 1 放射自显影电泳图谱和图 2 自显影扫描图) 表明, 与对照相比, 随着温度的升高, 处理的每个温度都有 HSPs 合成, 在 34°C 时 HSPs 诱导合成出现最大强度, 表现为 HSPs 的种类最多, 量也最大。这些蛋白的分子量分别为 110KD、94KD、83KD、80KD、70KD、62KD、54KD、42KD、35KD、26KD、23KD、22KD 和 15~17KD, 其中以 70KD、54KD、26KD、15~17KD 的 HSPs 最为明显。 37°C 时 HSPs 的合成与 34°C 相比较能力减弱了。因而可以认为 34°C 是小麦热击蛋白合成的最适温度。这一点还可以在 S^{35} -Met 掺入蛋白质的实验中得到验证, 在不同的温度下 S^{35} -Met 掺入小麦幼芽蛋白质中的放射性活性比较见图 3, 其结果

和放射自显影完全一致。 34°C 时 S^{35} -Met 掺入小麦幼苗的蛋白质最多。 37°C 时明显减少, 40°C 时掺入蛋白质的 S^{35} -Met 仅为 34°C 时的 5%, 表明在此温度下蛋白质合成显著下降。

2.2 34°C 热击条件下 HSPs 合成的时间进程

将小麦在 34°C 下分别热击不同的时间, 其结果 (图 4) 表明, 在适宜的热击条件下 HSPs 的诱导产生很快, 2h 即可达到较高的强度, 在一定的时间范围内随着时间的延长 HSPs 的诱导强度不断增加, 4h 达到高峰, 以后随着时间的延长, HSPs 的诱导产生反而减弱。图 4 还表明, HSPs 在植物体内的持续时间也是暂短的, 当从热击温度 (34°C) 降到正常温度 (22°C) 2h 后, HSPs 明显减弱, 6h 后 HSPs 基本消失。

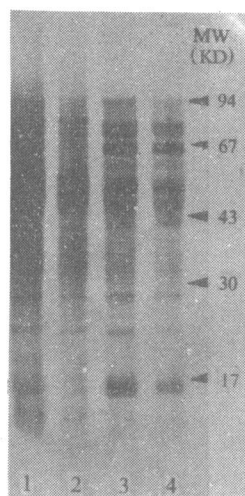


图 1 不同温度下 HSPs 的诱导合成

- | | |
|---------------------------|--------------------------------|
| 1. 28°C ; | 2. 对照 (22°C) |
| 3. 34°C ; | 4. 37°C |

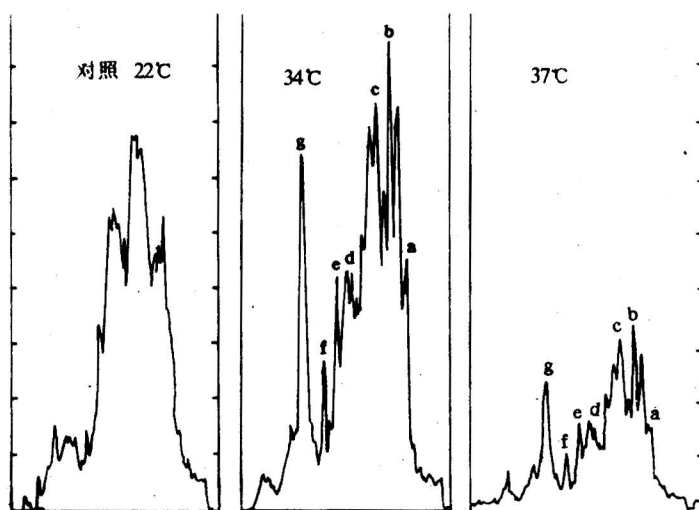


图2 不同温度诱导 HSPs 放射自显影扫描图

a 110KD HSPs; b 70 KD HSPs; c 54KD HSPs; d 42KD HSPs; e 35KD HSPs; f 26KD HSPs; g 17KD HSP

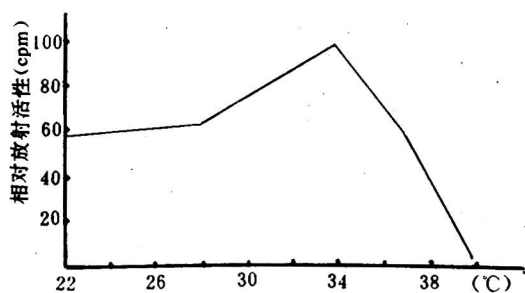


图3 不同温度对 S^{35} -Met 掺入的影响

2.3 小麦幼苗耐热性的获得

为了选择进行耐热性试验的条件,将在 22°C 生长 3 天的 wheat 幼苗分别在 28°C、34°C、38°C、42°C、46°C 下热击 2h,再置 22°C 下继续生长,每隔 24h 量一次苗的高度,共量三次,72h 结束。结果如图 5,三次的测量结果表明,34°C 以下热击与 22°C 的对照生长速度相比变化不大,34°C 以上的热击使小麦的生长速度开始下降,因此把 34°C 定为小麦热锻炼的最适温度。46°C 的热击使得小麦幼苗的生长速度明显下降,因而把 46°C 定为小麦幼苗的“致死”温度。

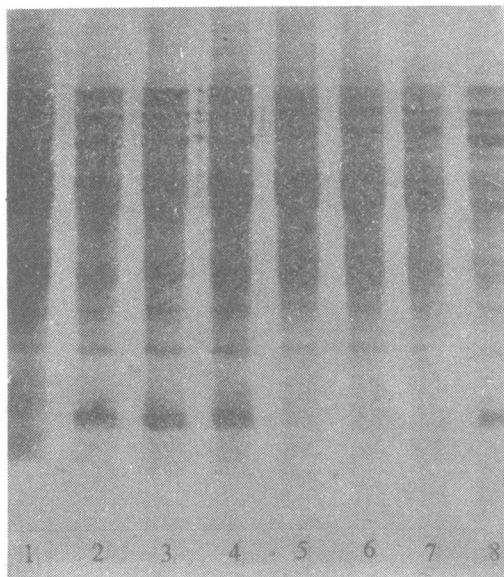


图4 小麦 HSPs 诱导产生的时间进程

1 对照 (22°C); 2 34°C 2h; 3 34°C 3h;
4 34°C 4h; 5 22°C 2h (恢复); 6 22°C
4h (恢复); 7 22°C 6h (恢复);
8 34°C 6h。

根据上述实验结果,先将生长3天的麦幼苗在34℃下分别热击1、2、3h,再在“致死”温度46℃下处理2h,然后置22℃下恢复生长,每隔24h测量幼苗的高度,结果表明,小麦幼苗未经34℃锻炼从22℃直接转移到46℃处理2h恢复24h后,苗的高度($2.6 \pm 0.22\text{cm}$)与处理前($2.5 \pm 0.19\text{cm}$)相差不多,证明生长受到明显抑制,而在34℃下热击1、2、3h后再在“致死”温度下处理2h后,22℃恢复24h,苗的高度分别为 $3.2 \pm 0.28\text{cm}$, $3.6 \pm 0.34\text{cm}$ 和 $3.9 \pm 0.28\text{cm}$,均与未经锻炼有明显差异。48h、72h测量苗的高度结果与其相似。说明34℃的热锻炼提高了小麦幼苗的耐热性,减轻了小麦幼苗在46℃这个“致死”温度处理时的伤害程度,在这个热锻炼的范围内,随着热锻炼时间的延长耐热性也随之提高。

为了更进一步说明问题,将小麦幼苗分别在34℃下用 $\text{S}^{35}\text{-Met}$ 进行标记1、2、3h,然后进行放射活性比较。结果表明,随着标记时间的延长, $\text{S}^{35}\text{-Met}$ 掺入蛋白质的强度不断增加,说明HSPs的合成在逐渐增加。

3 讨论

小麦在热击条件下,和大豆、水稻等作物一样可产生热击蛋白,这些蛋白的产生主要依靠外界适当的温度,小麦在34℃时产生的热击蛋白种类和数量最为丰富,这可能因为小麦属冷季作物,较大豆、玉米、水稻等的热击温度要低些^[8-10,12]。就热击蛋白的分子量而言,从电泳图谱可以明显地看出,HSP70和HSP15-17KD二组蛋白最为突出。对动、植物中HSP70研究的比较多,人们普遍认为HSP70在进化中有高度的保守性,并对生物的耐热性有一定的作用^[11]。植物中热击蛋白多为低分子量蛋白,小麦的15~17KD蛋白最为突出,比玉米、大豆等小分子量蛋白的范围小^[8],因而15~17KD这组蛋白可能是小麦热击蛋白的突出特点。

34℃下合成进程表明,HSPs的合成是相当迅速的,4h即可达到最大强度,但维持这种强度的时间是短暂的,随着热击时间的延长HSPs的合成反而减少。这可能说明HSPs合成关闭是植物本身的一种自动调节作用,当HSPs在体内积累到一特定的水平时,本身就有抑制HSPs产生的功能。HSPs合成短暂的还表现在小麦从热击温度回到正常温度2h后,HSPs就明显减少了,6h后就基本消失。这种随着外界胁迫条件的解除,正常蛋白合成逐渐恢复,人们普遍认为,HSPs合成是在转录水平上进行调节的,这种转录效益看来是相当快的。

关于热击蛋白的功能和机理,人们的看法不完全一致。据本实验的结果可以这样认为,在一定的条件下HSPs的积累和植物耐热性的获得是成正相关关系。这一点可以从预先经过34℃热锻炼的小麦再在46℃“致死”温度下处理后的生长状况得到证实,由于预先34℃的热锻炼使植物正常的蛋白合成受到了抑制,同时启动新的基因合成了HSPs。由于HSPs的存在,才使植物免遭在“致死”温度下的伤害。HSPs是怎样提高植物的耐热性的,我们认为主要和

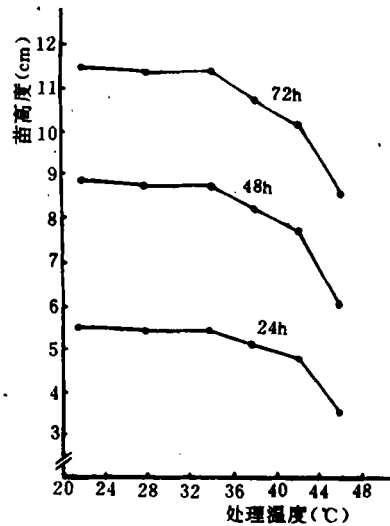


图5 不同温度热击对小麦幼苗生长的影响

HSPs 的选择定位有关^[10], 例如 HSP70 这个蛋白, 无论在动物还是植物体内在抗热作用中它都起着明显的保护作用, HSP70 在热击中可能是主要的骨架蛋白, 主要集中于单克隆抗体的糖蛋白中, 大概是细胞膜和糖蛋白结合的中间物。而其它不同分子量的蛋白又分别和不同的细胞结构相结合, 小麦植株中低分子量的 HSPs 可能与细胞核、细胞膜、细胞骨架相结合, 当遭到高温胁迫时, 它们保持着细胞内环境的稳定, 防止高温对细胞平衡的破坏, 使它们不受或少受外界高温的伤害, 致使作物在“致死”温度下得已存活。

参 考 文 献

- 1 Barnett T et al. Heat shock induced protein in plant cells. *Developmental Genetics*, 1980, 1: 331~340
- 2 Harrington HM et al. Interaction of heat and salt shock in cultured tobacco cell. *Plant Physiol*, 1988, 88: 618~625
- 3 Michael A et al. Synthesis of the low molecular weight heat shock proteins in plant. *Plant Physiol*, 1987, 84: 1007~1017
- 4 Roy HB. Heat shock and the heat shock proteins. *Biochem J*, 1986, 240: 315~324
- 5 Joe LK et al. Heat shock proteins in plant. *Biochemistry*. 1981, 78: 3526~3530
- 6 Mans RJ et al. Measurement of the incorporation of radioactive amino acids into protein by a filterpaper disk method. *Archives of Biochem and Biophys*, 1961, 94: 48~53
- 7 Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of heat of Bacteriophage T₄. *Nature*, 1970, 227: 680~695
- 8 Burke JJ et al. The heat-shock response in higher plant: a biochemical model. *Plant, Cell and Environment*, 1988, 11: 441~444
- 9 Brodl MR. Regulation of the synthesis of normal cellular proteins during heat shock. *Physiologia Plantarum*, 1989, 75: 439~443
- 10 Pam Cooper et al. Heat shock proteins in maize. *Plant Physiol*, 1983, 73: 215~222
- 11 Chen Hwei-Hwang et al. Adaptability of crop plant to high temperature stress. *Crop Science*. 1982, 22: 719~725
- 12 梅尚筠等, 水稻的热休克蛋白. *华中师范大学学报*, 1988, 1: 169~173

Heat-Shock Protein and Acquisition of Heat Tolerance in Wheat

Zhou Rengang Fan Zhihe Li Xiaozhi Wang Zhanwu Han Wei

(Institute of Agro-Physics, Plant Physiology and Biochemistry, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051)

Abstract Three-day-old wheat seedlings were subjected to different heat stress by using S³⁵-methionine to label the proteins synthesized during the treatments. More than 10 sorts of protein were induced at 34 C, among them the 70, 54, 26, 15—17KD proteins were the most ones. The amounts of proteins induced declined significantly after 4 hour stress. The seedlings first exposed to 34 C developed heat tolerance to otherwise lethal temperature.

Key words: Wheat; Heat shock; Heat shock protein; Heat tolerance