

文章编号:1673-1689(2006)03-0075-04

热休克对小麦未成熟种子萌发、生物发光和抗氧化酶活性的影响

刘红梅¹, 廖祥儒², 吴立峰², 蒋继志¹

(1. 河北大学 生命科学学院, 河北 保定 071002; 2. 江南大学 工业生物技术教育部重点实验室, 江苏 无锡 214036)

摘要: 以小麦(*Triticum aestivum* L.)品种石 4185 为材料,研究了 45 ℃处理 0~120 min 对小麦未成熟籽粒谷胱胱转移酶(GST)、谷胱胱还原酶(GR)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)活性,超微弱发光,种子萌发和愈伤组织诱导的影响。结果表明,热休克处理使未成熟籽粒萌发率、愈伤组织诱导率和 GST 活性明显增加,且其作用随处理时间的延长而增大;在处理过程中, CAT 活性先减少后增加,热休克对 GR 活性无明显影响。GST 的活性与蛋白质质量分数呈显著正相关。

关键词: 热休克;谷胱胱转移酶;幼胚;小麦;超微弱发光

中图分类号:Q 946

文献标识码:A

Effect of Heat Shock on Biophoton and Activities of Antioxidant Enzymes in Immature Wheat Grains

LIU Hong-mei¹, LIAO Xiang-ru², WU Li-feng², JIANG Ji-zhi¹

(1. College of Life Science, Hebei University, Baoding 071002, China; 2. Key Laboratory of Industrial Biotechnology, Ministry of Education, Southern Yangtze University, Wuxi 214036, China)

Abstract: The effect of high temperature (45 ℃) for 0~120 min on the activities of GST, GR, CAT, POD, biophoton, seed germination, and callus induction of immature wheat (*Triticum aestivum* L.) grains were determined. The results showed that heat shock increased seed germination, callus induction, and the activity of GST markedly. These impacts enhanced with the increase of treating time. During the treatment, the activity of CAT reduced in the short time treatment and increased in the longer treatment. There were no effects of heat shock on the activity of GR. The activity of GST was significantly related positively to the content of the protein.

Key words: heat shock; glutathione S-transferase; immature embryo; wheat; biophoton

热休克处理能够提高细胞清除活性氧的能力,改善植物细胞对逆境的适应。植物细胞内存在多

种活性氧清除的途径^[1],其中起主要作用的是活性氧的抗氧化酶系统^[1]。超氧化物歧化酶(SOD)、过

收稿日期:2005-09-23; 修回日期:2005-11-22.

基金项目:河北省博士基金资助项目.

作者简介:刘红梅(1978-),女,河北保定人,生物化学与分子生物学硕士研究生.

氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)等是活性氧抗氧化酶系统的重要保护酶。它们能有效地阻止活性氧的积累,防止膜脂的过氧化作用,延缓植物的衰老,使植物维持正常的生长和发育过程^[1]。POD和CAT主要存在于植物过氧化物酶体与乙醛酸循环体中,在线粒体、细胞质及内质网中也有存在,是清除H₂O₂的主要酶类^[2-4]。谷胱甘肽(GSH)是参与清除活性氧的重要物质,通过GST和GR催化可以由氧化态谷胱甘肽(GSSG)再生或与其他化合物的亲电基团反应,生成谷胱甘肽衍生物以降低化合物反应活性。生物超微弱发光在一定程度上可以反映细胞的生理状态,周禾和杨起简等报道了穗上发芽的小麦其超微弱发光现象^[5]。

作者以前的研究也证实,热休克处理可以改善水稻组织培养细胞的生理状态。但热休克处理小麦未成熟种子,能否改变未成熟胚生理状态还不清楚,生理状态的改变是否与清除活性氧的能力的提高有关也待研究。作者以小麦为材料,研究了45℃高温处理对籽粒细胞培养行为、超微弱发光及各种酶活性的影响。

1 实验材料

所取小麦(*Triticum aestivum* L)品种为石4185。开花后13 d剪取小麦穗,放入45℃恒温箱中分别处理0,0.5,1.0,2.0 h(以未经处理的小麦穗作为对照)后,取出幼胚,用于酶活测定和愈伤组织诱导。愈伤组织诱导的种子用体积分数70%的乙醇溶液浸泡1 min后,用1 mol/L的HgCl₂溶液处理6 min,无离子水冲洗4遍,接种在诱导培养基上,每板20~30粒。

2 实验方法

2.1 酶液提取

小麦未成熟籽粒经冰浴研磨,用50 mmol/L Tris-HCl(pH 7.8)提取,在0℃、10 000 r/min下离心20 min,取上清液用于蛋白质和酶活性测定。

2.2 光子数的测定

生物发光光子数用BPCL超微弱发光仪(中科院生物物理所提供)进行测定,每次用小麦籽粒10粒,实验条件见文献^[6]。

2.3 GST活性测定

GST酶活测定参考Terada^[7]等方法,反应体系为:1 mmol/L 2,4-二硝基氯苯(CDNB),0.1 mmol/L GSH,50 mmol/L Tris-HCl(pH 6.5),1 mmol/L EDTA。单位酶活性定为:每分钟催化一

个微摩尔的谷胱甘肽参与反应的蛋白量(1 U=1 μmol/min)。

2.4 GR活性测定

GR酶活测定参考Mulpuri^[8]等方法,反应体系成分如下:40 mmol/L EDTA,4 mmol/L GSSG,Tris-HCl pH 7.8,0.5 mg/mL NADPH,H₂O,样品,30℃保温。单位酶活性定为:每分钟催化还原一个纳摩尔的谷胱甘肽的蛋白量(1U=1 nmol/min)。

2.5 POD活性测定

POD活性的测定参照Amako等的方法。一个单位酶活性定为1 μmol/min^[9]。

2.6 CAT活性测定

CAT活性的测定参考文献^[10],反应体系为10 mmol/L H₂O₂,pH 7.0的50 mmol/L磷酸钠缓冲液,反应温度为37℃,在λ=240 nm下测定光吸收值。酶活性定为:每分钟催化还原一个纳摩尔的CAT的蛋白量(1U=1 nmol/min)。

2.7 蛋白质质量分数的测定

在试管中加入4 mL考马斯亮兰G-250,再分别加入不同处理的籽粒提取液0.1 mL,5 min后,在595 nm下测光吸收值。此次对照为4 mL考马斯亮兰G-250与0.1 mL H₂O的混合液^[11]。

2.8 数据分析

采用SPSS 8.0进行数据分析。所有数据均来自3组单独的实验,各有两个重复。

3 实验结果

3.1 热休克对小麦籽粒超微弱发光的影响

热休克对小麦籽粒超微弱发光的影响与处理时间有关(图1),在30 min以内,45℃处理对籽粒超微弱发光无明显影响,热休克处理60 min和90 min使籽粒超微弱发光明显增强($P < 0.05$),结果见图1。

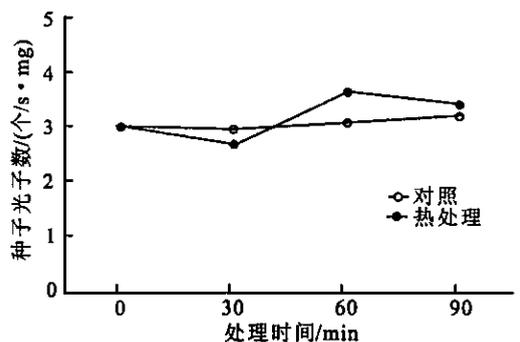


图1 热休克对小麦未成熟籽粒超微弱发光的影响
Fig. 1 Effect of heat shock on biophoton of immature wheat grains

3.2 热休克对小麦籽粒种子萌发和愈伤组织形成的影响

将热休克处理过的籽粒接种于诱导愈伤组织的培养基上,不同处理愈伤组织形成及种子萌发情况也有差别(表 1);其中热休克处理 60 min 和 90 min 使籽粒愈伤组织诱导率明显增高($P < 0.01$),但 90 min 处理效果明显低于 60 min 处理($P < 0.01$);热休克处理 60 min 和 90 min 也导致部分籽粒发芽,其中 90 min 处理作用显著($P < 0.05$)。

表 1 热休克对小麦未成熟籽粒种子萌发和愈伤组织形成的影响

Tab. 1 Effect of heat shock on seed germination and callus formation of immature wheat grains

处理时间/min	接种数/粒	产生愈伤组织的种子		萌发的种子	
		粒	比率/%	粒	比率/%
0	180	7	3.9	0	0
30	290	9	3.1	0	0
60	300	53	17.7	1	0.3
90	240	38	15.8	10	4.2

3.3 热休克对小麦籽粒蛋白质质量分数的影响

45 °C 处理 60 min 和 90 min 也使小麦籽粒蛋白质质量分数显著升高($P < 0.01$),在 120 min 以内处理时间越长活性增加越大,结果见图 2。

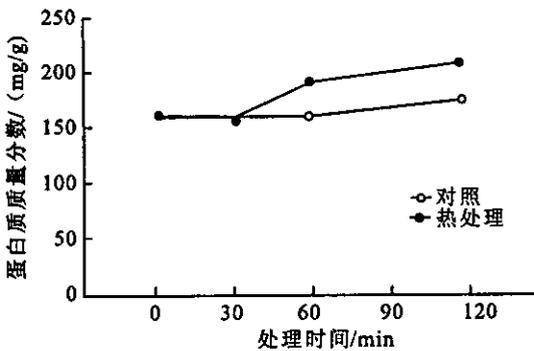


图 2 热休克对小麦未成熟籽粒蛋白质质量分数的影响

Fig. 2 Effect of heat shock on protein content of immature wheat grains

3.4 热休克对小麦种子 GST 活性的影响

45 °C 处理 30 min 即引起小麦种子 GST 活性显著升高($P < 0.01$),处理 60 min 时增至最大,并维持在较高水平上,结果见图 3。

3.5 热休克对小麦种子 GR 活性的影响

在 60 min 内热休克对小麦幼胚的 GR 活性变化没有明显的影响,处理时间的不同 GR 的活性也无明显变化,但随后迅速下降并明显低于对照($P < 0.05$),结果见图 4。

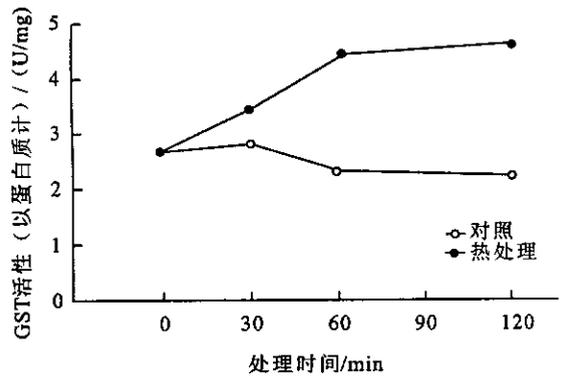


图 3 热休克对小麦未成熟籽粒 GST 的影响

Fig. 3 Effect of heat shock on GST activity of immature wheat grains

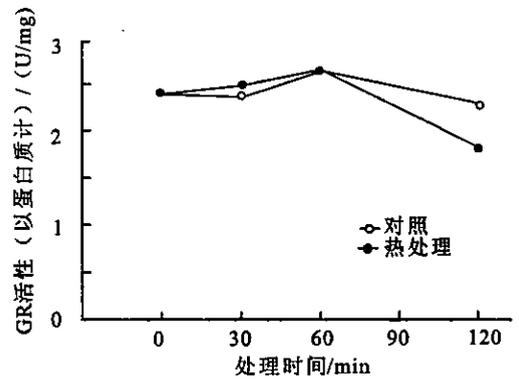


图 4 热休克对小麦未成熟籽粒 GR 活性的影响

Fig. 4 Effect of heat shock on GR activity of immature wheat grains

3.6 热休克对小麦种子 POD 活性的影响

随热休克处理时间的延长 POD 的活性有明显的降低,并在 30 min 后明显低于对照($P < 0.01$),结果见图 5。

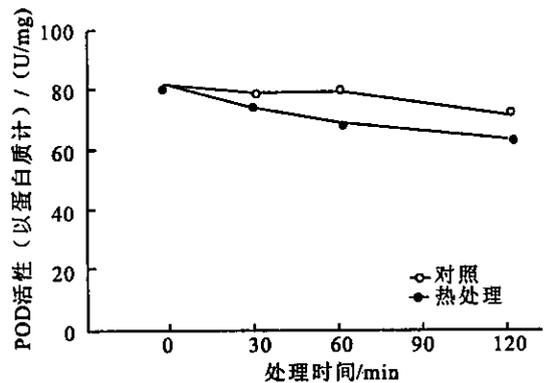


图 5 热休克对小麦未成熟籽粒 POD 的影响

Fig. 5 Effect of heat shock on POD activity of immature wheat grains

3.7 热休克对小麦幼胚 CAT 活性的影响

在 2 h 内正常温度下,小麦籽粒 CAT 活性变化不大,45 °C 处理小麦籽粒 CAT 酶活性明显较高,处理效果随处理时间的延长而增大,结果见图 6。

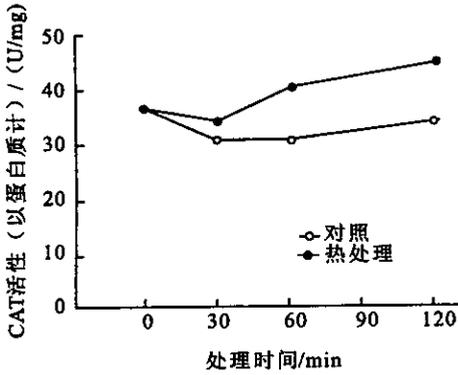


图6 热休克对小麦未成熟籽粒CAT的影响

Fig. 6 Effect of heat shock on CAT activity of immature wheat grains

4 讨论

热休克处理能够影响植物细胞的生理状态,从而改善细胞对逆境的适应。从实验结果可以看出:在0—2 h的热休克处理过程中,GST的活性随着处理时间的延长而稳步增长,但蛋白质质量分数由图2显示在1 h开始明显增大,这说明有其它蛋白质的大量合成。因为GST和CAT的活性和蛋白质的质量分数呈正相关($P < 0.001$)。其变化趋势都是增大的,说明可能是有了GST和CAT的基因

表达。此时GR的活性没有明显的变化,说明短时间热休克对谷胱甘肽还原酶没有影响,高温逆境所引起的酶活性变化确实不同。

在处理0.5 h的样品中POD的活性较低,但1 h和2 h的处理,它的活性又显著增高,说明在高温处理时POD活性短时间内是钝化的,而随着时间的延长,在高温的持续刺激之下,又可能有了POD基因的表达,导致了其酶活性的升高。CAT亦是如此。

由结果可以看出:POD、CAT与GST是两类不同性质的酶,它们的蛋白质对热的反应不同。GST在热休克处理时其活性一直处于上升趋势。而CAT在刚受热时,则发生了钝化,在持续高温刺激之时才有了蛋白质的表达,活性升高。

经SPSS分析,蛋白质质量分数与未成熟种子的超微弱呈显著正相关($P < 0.01$),说明了热休克所引起的蛋白质表达可能是引起超微弱发光增强的主要原因之一。这种变化可能也有利于种子的发芽和愈伤组织的诱导。

另外,从本实验结果来看,蛋白质质量分数的增加与CAT、GST酶的活性增加是有关系的。但是这几种酶是否表达尚需在基因水平上进行验证。

参考文献:

- [1] Kaiserwm. The effect of hydrogen peroxidase on CO_2 fixation of isolated intact chloroplasts[J]. *Biochem Biophys Acta*, 1976,400:476—482.
- [2] Peng M, Kuc J. Peroxidase-generated hydrogen peroxide as a source of antifungal-activity in vitro and on tobacco leaf disks[J]. *Phytopathol*, 1992,82:696—699.
- [3] Martinez C, Baccou JC, Bresson E, et al. Salicylic acid mediated by the oxidative burst is a key molecule in local and systemic responses of cotton challenged by an avirulent race of *Xanthomonas campestris* pv *malvacearum*[J]. *Plant Physiol*, 2000,122:757—766.
- [4] 田国忠,李怀方,裘维蕃. 植物过氧化物酶研究进展[J]. *武汉植物学研究*, 2001, 19(4): 332—344.
- [5] 周禾,杨起简. 成熟小麦抗穗发芽能力与超弱发光关系的研究[J]. *生物化学与生物物理进展*, 1995,22(3):241—243.
- [6] 吴立峰,廖祥儒,崔少强,等. PEG预处理对小麦种子萌发过程中的生物发光及抗氧化酶活性的影响[J]. *河北大学学报:自然科学版*, 2005,25(增刊):97—100.
- [7] Tarada T, Maeda H, Okamoto K, et al. Modulation of glutathione S-transferase activity by a thiol/disulfide exchange reaction and involvement of thioltransferase[J]. *Arch Biochem Biophys*, 1993,300:495—500.
- [8] Mulpuri V R, Gopinadhan P, Douglas P O. Ultraviolet-B and Ozone-Induced biochemical changes in antioxidant enzymes of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant Physiol*, 1996,110:125—136.
- [9] Amako K, Chen G X, Asada K. Separate assays specific for ascorbate peroxidase and guaiacol peroxidase and for the chloroplastic and cytosolic isozymes of ascorbate peroxidase in plants[J]. *Plant Cell Physiol*, 1994,35:497—504.
- [10] Liao X R, Zhu X C, He P C. A cationic peroxidase from leaves of *Vitis pseudoreticulata*[J]. *Phytochemistry*, 1999, 51: 143—145.
- [11] Bradford M M. A rapid method of the quantitation of microgram quantities of protein the principle of protein-dye binding[J]. *Anal Biochem*, 1976,72: 248—254.