

赤霉素对刺槐实生苗中 核糖核酸酶活力的影响*

陆宪辉

(南京林业大学)

摘要 赤霉素(纯 GA_3) $20 \mu g \cdot ml^{-1}$ 处理刺槐(*Robinia pseudoacacia* L.)实生苗48 h后核糖核酸酶(RNase)的活力增加两倍左右,对实生苗的子叶、幼茎和幼根中RNase活力的刺激效应基本相同。5-氟尿嘧啶、亚胺环己酮及高浓度嘌呤霉素可强烈抑制 GA_3 刺激RNase活力的增加,而放线菌素D则显示出刺激作用。标记RNase的部分提纯,揭露了RNase活力的增加是由于它新合成的缘故。

关键词 刺槐; 赤霉素; 核糖核酸酶; 3H -亮氨酸

植物实生苗的生长依赖于胚乳或子叶中贮藏的蛋白质、碳水化合物和其它营养物质。在大麦和小麦中,这些贮藏物是经发芽胚中合成物和分泌物 GA_3 调节方可利用。这种激素能诱导糊粉组织合成和分泌一些水解大分子的水解酶类^[2,6,7,11~13]。Brown P. H等(1986)用 GA_3 处理大麦糊粉层断定,RNase的分泌取决于 GA_3 ,但这种酶的合成是否也由 GA_3 决定尚未研究^[4]。目前有关木本植物中RNase的激素调节报道不多,本文将研究 GA_3 对刺槐实生苗中RNase活力的可能刺激方式,以便阐明 GA_3 是活化预先存在的酶分子,还是刺激酶的新合成,以及为赤霉素处理树木种子和培育壮苗提供理论依据。

一、材料与方法

种子萌发 由于刺槐种子的种皮很坚硬,先用75℃热水浸泡25 min,然后在冷水中浸种48 h,待芽突破种皮1~2 mm时,选择整齐的刚萌发种子,转移到含有待研究的各种化合物或其混合物的盛有珍珠砂的培养皿中,在25℃黑暗条件下发芽,按规定的时间,取样制备RNase制剂。

酶液制备 所有提取步骤都在冰浴中完成。取实生苗(2 g)放在玻璃研钵中,加入4 ml 0.05 M醋酸钠缓冲液(pH 5.0)研磨。匀浆物在5 000 rpm下离心20 min,取上清液定容至5 ml,作为粗酶液待测。

酶活力测定 参考D. M. Hanson(1969)^[6]并稍加修改。反应混合液含有0.05 ml 30 mM 巯基乙醇、1 ml 酵母RNA(2 mg/ml)、0.1 ml 酶液和用0.05 M醋酸钠缓冲液(pH 5.0)

本文于1989年1月收到。

* 郭继善副教授协助测定放射性,谨致谢意。

把总体积调至1.5 ml。这种混合液在37 °C下保温30 min, 然后放在冰浴中3~4 min, 加入1.5 ml 冷硝酸镧-HCl试剂(0.02 M $\text{La}(\text{NO}_3)_3$ -0.2 M HCl), 强烈搅拌混合液, 放在4 °C下10 min和在冰冻离心机中于5 000 rpm下离心15 min, 取上清液稀释10倍, 用751型分光光度计测定在260 nm下的O.D值。以反应混合物中0.1 ml 酶在30 min内催化形成具有O.D值0.1的镧酸可溶性RNA碎片的酶量为1个酶活力单位。

蛋白质含量测定 按M. M. Bradford (1976)描述的Coomassie亮蓝G₂₅₀染色法测定^[5]。

RNase 热稳定性测定 酶液在65°C恒温水浴中保温不同时间(10、20、30、40、50和60min)以后取出, 在5 000 rpm下离心除去变性蛋白质, 取上清液测定RNase活力。

³H-亮氨酸参入 根据GA₃刺激48 h实生苗中RNase活力最大, 决定在GA₃(20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)存在条件下于黑暗中发芽生长48h的实生苗中, 加入DL-[4,5-³H]-亮氨酸(2 $\mu\text{Ci}/\text{ml}$, 比度105 ci/m Mol.), 实生苗在52 h收集, 用无离子水充分洗涤, 直到洗涤水与无离子水的DPM相近为止。

RNase的局部纯化和放射性测定 取³H-亮氨酸参入的实生苗和对照实生苗各25 g, 放入匀浆器中, 加入50 ml 0.01 M醋酸钠缓冲液(pH5.0)匀浆。匀浆液在冰冻离心机中于5 000 rpm下离心20 min, 上清液通过预先用0.01 M醋酸钠缓冲液(pH5.0)平衡的CM-纤维素柱, 用0.05 M醋酸钠缓冲液(pH5.6)洗脱, 每组分收集5 ml。把具有RNase活力的高峰组分再通入预先用含有0.1 M KCl的0.05 M Tris-HCl (pH7.3)平衡的Sephadex G₁₀₀柱, 用同样缓冲液淋洗, 每组分收集5 ml, 将具有RNase活力的高峰组分对着40%蔗糖溶液透析, 浓缩至1 ml 和用6 N HCl在80 °C下水解16 h。水解产物进行双向纸层析(正丁醇-12% NH_4OH -95%乙醇(13:3:3)和正丁醇-80%甲酸-水(15:3:2)), 亮氨酸斑点的DPM用Beckman LS-5801型液闪谱仪测定。

以下结果为两次试验共4个重复的平均值。

二、结 果

(一) GA₃对刺槐实生苗中RNase活力的效应

图1、2表明, GA₃以20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 浓度对刺槐实生苗中RNase活力的刺激效应最大, 比对照增加两倍左右。低于这个浓度对RNase活力基本上无刺激效应, 高于这个浓度时, 刺激效应有所减弱, 但仍比对照高。在GA₃(20 $\mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$)处理后的12 h RNase活力开始增加, 一直到48 h达高峰, 此后便逐渐下降。

GA₃对刺槐实生苗子叶、幼茎和幼根中的RNase活力的刺激效应基本相同, 惟幼根稍弱。从子叶、幼茎和幼根中RNase活力分布来看, 以幼根的RNase活力最大, 而子叶和幼茎的RNase活力基本相同(表1)。

(二) RNase的热稳定性

图3显示, GA₃处理的实生苗和对照的实生苗制备的粗酶液在65 °C下具有相同的RNase活力钝化曲线。

(三) RNA合成抑制剂对GA₃刺激RNase活力的效应

5-氟尿嘧啶是RNA合成的有效抑制剂, 它对RNase活力也有明显的抑制作用。在

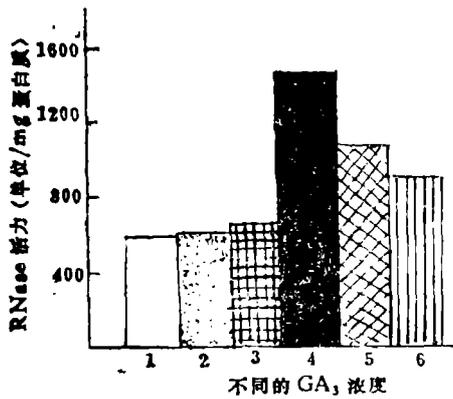


图1 不同浓度GA₃处理48 h对实生苗中RNase活力的影响

1. 水(对照), 2. 5 µg·ml⁻¹, 3. 10 µg·ml⁻¹,
4. 20 µg·ml⁻¹, 5. 40 µg·ml⁻¹, 6. 80 µg·ml⁻¹

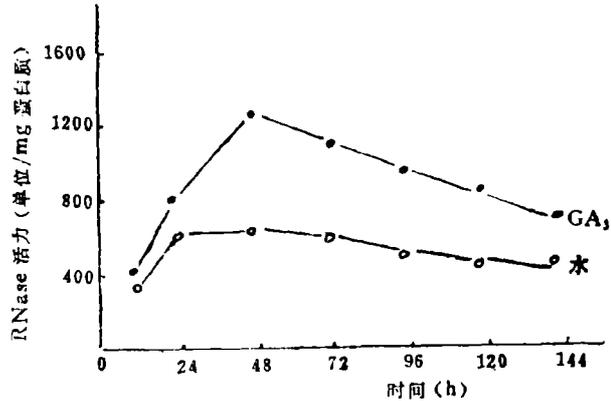


图2 GA₃(20 µg·ml⁻¹)刺激实生苗中RNase活力的时间进程

表1 GA₃对刺槐实生苗子叶、幼茎和幼根中RNase活力的影响

处 理 ^①	RNase活力(单位/mg蛋白质)					
	子 叶	占对照(%)	幼 茎	占对照(%)	幼 根	占对照(%)
水 (对照)	487	100	472	100	890	100
GA ₃ (20 µg·ml ⁻¹)	984	203	964	204	1680	189

① 幼苗用GA₃处理48 h。

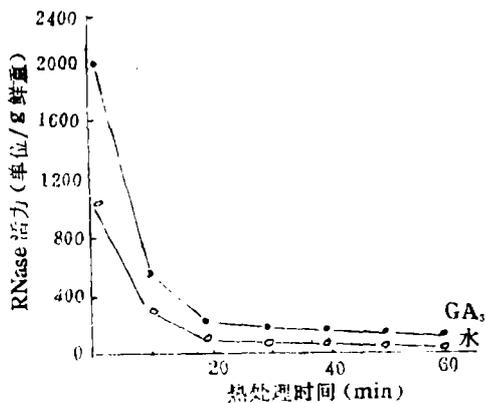


图3 GA₃(20 µg·ml⁻¹)对刺槐实生苗RNase热稳定性的影响

5 µg·ml⁻¹ 浓度下可抑制RNase活力30%，而在10 µg·ml⁻¹ 浓度下则抑制RNase活力45%。5-氟尿嘧啶对GA₃刺激RNase活力的抑制效应比它本身单独的抑制效应更大(表2)。

放线菌素D虽然也是RNA合成的抑制剂，但是它的效应与5-FU相反，对刺槐实生苗中RNase活力不但不抑制，反而有刺激效应，而且对GA₃刺激RNase活力具有明显增效作用(表3)。

表 2 5-氟尿嘧啶(5-FU)对 GA₃ 刺激实生苗中 RNase 活力的影响

处 理 ^①	RNase 活 力 (单位/mg蛋白质)	占 对 照 (%)
水(对照)	1 963	100
GA ₃ (20 μg·ml ⁻¹)	3 962	201
5-FU(5 μg·ml ⁻¹)	1 375	70
5-FU(10 μg·ml ⁻¹)	1 080	55
GA ₃ (20 μg·ml ⁻¹) + 5-FU(5 μg·ml ⁻¹)	692	49
GA ₃ (20 μg·ml ⁻¹) + 5-FU(10 μg·ml ⁻¹)	511	26

① 实生苗用 GA₃ 和 5-FU 处理 48 h。

表 3 放线菌素 D(Ac + D) 对 GA₃ 刺激实生苗中 RNase 活力的影响

处 理 ¹⁾	RNase 活 力 (单位/mg蛋白质)	占 对 照 (%)
水(对照)	1 963	100
GA ₃ (20 μg·ml ⁻¹)	3 962	201
Ac + D(5 μg·ml ⁻¹)	3 200	162
Ac + D(10 μg·ml ⁻¹)	2 159	119
GA ₃ (20 μg·ml ⁻¹) + Ac + D(5 μg·ml ⁻¹)	4 224	215
GA ₃ (20 μg·ml ⁻¹) + Ac + D(10 μg·ml ⁻¹)	3 945	200

1) 实生苗用 GA₃ 和 Ac + D 处理 48 h。

(四) 蛋白质合成抑制剂对 GA₃ 刺激 RNase 活力的效应

从表 4 来看, 亚胺环己酮对 GA₃ 刺激 RNase 活力所必需的蛋白质合成有显著的抑制效应, 在 5 和 10 μg·ml⁻¹ 浓度下, 抑制 RNase 活力达 57~63 %。

表 4 亚胺环己酮(CHM)对 GA₃ 刺激实生苗中 RNase 活力的影响

处 理 ^①	RNase 活 力 (单位/mg蛋白质)	占 对 照 (%)
水(对照)	2 241	100
GA ₃ (20 μg·ml ⁻¹)	4 370	195
CHM(5 μg·ml ⁻¹)	964	43
CHM(10 μg·ml ⁻¹)	832	37
GA ₃ (20 μg·ml ⁻¹) + CHM(5 μg·ml ⁻¹)	1 102	49
GA ₃ (20 μg·ml ⁻¹) + CHM(10 μg·ml ⁻¹)	750	32

① 实生苗用 GA₃ 和 CHM 处理 48 h。

嘌呤霉素对 GA₃ 刺激 RNase 活力的抑制效应比较小, 低浓度时基本上无抑制效应, 而在 40 μg·ml⁻¹ 和 60 μg·ml⁻¹ 的较高浓度下, 对 GA₃ 刺激 RNase 活力的抑制效应比亚胺环己酮弱得多, 一般只有 26~43 % 的抑制效应(表 5)。

(五) GA₃ 对 ³H-亮氨酸参入 RNase 的效应

标记 RNase 的部分提纯揭示, ³H-亮氨酸能优先参入 GA₃ 处理实生苗中的 RNase(表 6)。

表 5 嘌呤霉素对GA₃刺激实生苗中RNase活力的影响

处	理 ^①	RNase 活 力 (单位/mg蛋白质)	占 对 照 (%)
水(对照)		2 140	100
GA ₃ (20 μg·ml ⁻¹)		4 300	203
嘌呤霉素(40 μg·ml ⁻¹)		1 562	73
嘌呤霉素(60 μg·ml ⁻¹)		1 092	51
GA ₃ (20 μg·ml ⁻¹) + 嘌呤霉素(40 μg·ml ⁻¹)		1 627	76
GA ₃ (20 μg·ml ⁻¹) + 嘌呤霉素(60 μg·ml ⁻¹)		1 219	57

① 实生苗用 GA₃ 和嘌呤霉素处理48 h。

表 6 GA₃对³H-亮氨酸参入刺槐实生苗中RNase的影响

处	理	RNase 活 力 (单位/mg蛋白质)	参入 RNase 的 ³ H- 亮氨酸 (DPM/mg蛋白质) ^①
水 (对 照)		69 580	1 004
GA ₃ (20 μg·ml ⁻¹)		143 630	2 324

① DPM/mg蛋白质是毫克蛋白质水解产物中³H-亮氨酸的绝对脉冲数值。

三、讨 论

GA₃ 20 μg·ml⁻¹ 处理刺槐实生苗48 h后, RNase活力可增加两倍左右。低于这个浓度, GA₃ 对 RNase活力基本上无刺激效应; 高于这个浓度, GA₃ 刺激 RNase活力虽然有所下降, 但仍比对照的 RNase活力高。图1表明, GA₃ 刺激刺槐实生苗中 RNase活力的提高, 必须达到一定的临界浓度才有效。这个临界浓度应在 10 μg·ml⁻¹ 和 20 μg·ml⁻¹ 之间。GA₃ (20 μg·ml⁻¹) 刺激刺槐实生苗 RNase活力的时间进程显示, 在处理后的24~48 h达到高峰, 并一直延至 96 h 都有明显增加。这一结果与 GA₃ 诱导大麦糊粉层分泌 RNase 的进程相一致^[4]。GA₃ 处理48 h, 对实生苗子叶、幼茎和幼根的 RNase活力基本上具有相同的刺激效应, 无器官间差异。表1说明, 刺槐在幼苗阶段, 不同器官对 GA₃ 具有相同的敏感性。

GA₃ 对刺槐实生苗中 RNase活力的刺激效应不是由于活化预先存在的酶分子作用, 就是由于刺激酶的重新合成。从 GA₃ 处理的和对照的实生苗粗酶液在 65 °C 下具有相同的 RNase活力钝化曲线表明, 前者原因是不存在的。为阐明 GA₃ 的作用方式, 研究了 RNA 和蛋白质合成抑制剂对 GA₃ 刺激 RNase活力的影响。GA₃ 刺激实生苗中 RNase活力的效应对5-氟尿嘧啶很敏感, 它暗示了, 在 GA₃ 处理和对照实生苗中, 新的转录为刺激 RNase活力所必需。放线菌素 D 虽然与 5-氟尿嘧啶一样, 都是 RNA 合成抑制剂, 但是对 GA₃ 刺激 RNase活力的效应与 5-氟尿嘧啶相反(表3)。据报道, 放线菌素 D 和其它物质能引起蛋白质和一些酶的产生^[1, 8~10]。放线菌素 D 对刺槐实生苗 RNase活力的刺激效应似乎是由于抑制了一些新产生的与 RNase衰变有关物质的结果。Palmiter 和 Schimke(1973) 及 Jones 和 Northcote(1981) 曾提出这样的假设: 放线菌素 D 起这种作用是它减少了各种 mRNA 之间对转译竞争的或者是改变蛋白质降解速度的缘故^[8, 9]。亚胺环己酮是蛋白质合成的有效抑制

剂, 它对刺槐实生苗中 RNase 活力的显著抑制(表 4)可以看作是 GA_3 刺激酶活力必需蛋白质合成的重要证据之一。嘌呤霉素可与核蛋白体肽基转移酶相互作用, 阻止蛋白质合成继续进行。因此, 在 $40 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 和 $60 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的较高浓度下, 它能阻止刺槐实生苗中 RNase 的继续合成, 从而对酶活力具有一定的抑制作用。

标记 RNase 的部分提纯揭露, ^3H -亮氨酸能优先参入 GA_3 处理的实生苗的 RNase 中(表 6)。为了考查 ^3H -亮氨酸是不是直接参入, 对具有 RNase 活力的 Sephadex G_{100} 柱淋洗液的高峰组分进行水解, 水解产物再进行纸层析和对亮氨酸斑点进行分析。结果表明, ^3H -亮氨酸是直接参入的。这就进一步证实 GA_3 对刺槐实生苗 RNase 活力的刺激效应是起因于这种酶的重新合成, 而不是它的活化作用。因此, 用 $20 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ 的 GA_3 处理刺槐种子来提高 RNase 活力, 对贮藏核酸的分解、利用和幼苗健壮生长是有利的。

参 考 文 献

- [1] Amerhin, N. et al., 1979, Superinduction of phenylalanine ammonialyase in gherkin hypocotyls caused by the inhibitor L- α -amino oxy- β -phenylpropionic acid, *Biochim. Biophys. Acta*, 583: 434~442.
- [2] Ashford, A. E. et al., 1974, Cytochemical localization of phosphatase in barley aleurone cell: The pathway of gibberellic acid induced enzyme release, *Planta*, 120: 81~105.
- [3] Bradford, M. M., 1976, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, 72: 248~254.
- [4] Brown, P. H., 1986, Barley aleurone layers secrete a nuclease in response to gibberellic acid, *Plant Physiol.*, 82: 801~806.
- [5] Chrispeels, M. J. et al., 1967, Gibberellic acid-enhanced synthesis and release of α -amylase and ribonuclease by isolated barley aleurone layer, *Plant Physiol.*, 42: 398~406.
- [6] Hanson, D. M. et al., 1969, Enzymes of nucleic acid metabolism from wheat seedlings. I. Purification and general properties of associated deoxyribonuclease, ribonuclease, and 3'-nucleotidase, *J. Biological Chemistry*, 244: 2440~2449.
- [7] Jacobsen, J. V. et al., 1967, Gibberellic acid-induced synthesis of protease by isolated aleurone layers of barley, *Plant Physiol.*, 42: 1596~1600.
- [8] Jones, D. H. et al., 1988, Induction by hormones of phenylalanine ammonia-lyase in bean cell suspension cultures: Inhibition and superinduction by actinomycin, *D. Europ. J. Biochem.*, 116: 117~125.
- [9] Palmiter, R. D. et al., 1973, Regulation of protein synthesis in chick oviduct III. Mechanism of ovalbumin superinduction by actinomycin, *D. J. Biol. Chem.*, 248: 1502~1512.
- [10] Sacher, J. A. et al., 1977, Wound-induced RNase in senescing bean pod tissue: Post transcriptional regulation of RNase, *Plant Cell Physiol.*, 18: 161~171.
- [11] Taiz, L. et al., 1977, Gibberellic acid enhancement of DNA turnover in barley aleurone cell, *Plant Physiol.*, 60: 182~189.
- [12] Taiz, L. et al., 1970, Gibberellic acid, β -1, 3-gluconase and the cell wall of barley aleurone layer, *Planta*, 92: 73~84.
- [13] Woodward, J. R. et al., 1982, Purification and chemical properties of two 1,3- \rightarrow 1,4 -glucon endohydrolase from germinating barley, *Europ. J. Biochem.*, 121: 663~669.

EFFECT OF GIBBERELLIC ACID ON THE ACTIVITY OF RIBONUCLEASE FROM BLACK LOCUST SEEDLINGS

Lu Xianhui

(Nanjing Forestry University)

Abstract There was about two-fold stimulation of RNase activity by the application of GA₃ at 20ppm to Black Locust seedlings for 48 hours. Stimulative effect of GA₃ on RNase activity to the cotyledons, young stems and young roots of seedlings was basically the same. The increase in activity was inhibited by the administration of 5-fluorouracil, cycloheximide and puromycin but stimulated by the administration of actinomycin D. It seems likely that actinomycin D treatments resulted in maintenance of high levels of enzyme activity by inhibiting the production of substances associated with enzyme decay. Purification of labelled RNase revealed that GA₃ enhanced the RNase activity mainly by its fresh synthesis.

Key words Black locust; gibberellic acid; ribonuclease; ³H-leucine

第四届林业遥感研讨会在京召开

1989年11月17~19日,中国林学会森林经理学会遥感学科组在北京召开了第四次林业遥感研讨会。来自教学、生产和科研部门的16个单位的35名专家教授参加了会议。

大会以遥感在森林资源监测中的应用为主题,本着节俭和务实的精神,开门见山地讨论了林业遥感面临的主要问题和对策。

林业部资源司陈振杰处长介绍了我国森林资源所面临的危机,要求林业调查要逐年提交变动数字,这就给林业遥感提出了现实的任务。

几位专家就今后5年林业遥感的发展、林业遥感的效率分析和国外林业遥感情况进行了介绍。专家们指出,多年来遥感在林业中的应用为林业资源监测、资源清查及灾害预测和评估诸方面节约了大量经费,林业遥感投入、产出比大约为1:4。

会议期间参观了中科院资源信息研究所遥感应用研究室和林业部调查规划院资源监测中心。代表们对他们的工作给予了较好的评价,认为他们的工作显示了我国林业遥感的水平和今后的方向。

与会专家和教授一致认为,林业遥感面向生产是当务之急,要尽快召开论证会,对已取得成果如何转化为生产力的方法和途径进行研究,并开展推广和普及工作。

预定下届林业遥感研讨会在东北举行。(中国林业科学研究院资源信息所 赵宪文)