

发育中玉米胚结合蛋白(BiP)的动态变化及定位

林晓东 傅家瑞 黄上志*

(中山大学生命科学学院生物科学与技术系, 广东广州 510275)

摘要: Western blot 检测表明, 在玉米胚发育过程中结合蛋白(BiP)含量与胚可溶性蛋白含量变化一致, 在授粉 16 d 后 BiP 含量随发育而增加; 对热激不敏感。组织化学免疫定位表明, 在玉米胚发育的不同时期, BiP 主要定位在胚芽端、初生维管组织和糊粉层中, 提示胚在构建器官的同时, 也为其功能执行准备了条件; 热激不影响其定位。

关键词: 玉米; 热激蛋白; 种子发育; 结合蛋白

中图分类号: Q946.13

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2004)02-0159-04

Changes and Localization of Binding Protein (BiP) during Maize Embryo Development

LIN Xiao-dong FU Jia-rui HUANG Shang-zhi*

(Department of Bioscience and Biotechnology, Life Science College, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: Western blot showed that binding protein(BiP) kept a high expression level during maize embryo development, which coincided with the change in embryo soluble protein. The content of soluble protein rapidly increased with the embryo development after pollination for 16 days, while BiP markedly increased from 22nd day after pollination. The BiP failed to respond to heat shock. Immunohistochemical localization showed that BiP localized in plumule, primary vascular tissue and aleurone layer during embryo development.

Key words: Maize (*Zea mays* L.); Heat shock protein; Seed development; Binding protein

热激蛋白(Heat shock protein, HSP)普遍存在于各种生物中。大部分热激蛋白作为“分子伴侣”在新生多肽的折叠、成熟和运输, 逆境胁迫受损蛋白的修复和重折叠中起着重要的作用^[1,2]。其中, HSP 70 家族的结合蛋白(Binding protein, BiP)是结合在内质网上的蛋白, 其协助蛋白分泌折叠功能尤为突出。目前, 发现它广泛存在于各种植物组织中^[3], 与蛋白的合成及运输密切相关, 特别是参与种子贮藏蛋白的合成^[4-7]。目前的研究主要采用富含贮藏蛋白的器官, 如胚乳或子叶, 探讨 BiP 的时空表达模式及其亚细胞定位, 而有关 BiP 在胚中的变化动态及组织定位的报道较少。在植物中, 胚的发育是基因顺序表达的一个复杂过程, 既包括了未来植株锥形的建成, 也同样包括贮藏蛋白的合成和积累。本研究试图探讨在发育调控下, 热激蛋白 BiP

的合成模式同胚发育的关系, 以揭示它在胚发育过程中的作用。

1 材料和方法

1.1 植物材料

玉米(*Zea mays* L.) 英 4×Mo17 的杂交种子, 采自广州市农科所。受粉后第 13 天(13 DAP)开始, 每 3 d 采样一次, 直到第 40 天。种子湿润后, 分别放入 25℃(对照)和 42℃(热激, HS)处理 2 h 或 4 h, 立即用液氮停止处理, 并将材料保存于 -40℃。

1.2 可溶性蛋白提取

取胚 0.5-1.0 g, 按 1:4 的比例加入提取缓冲液(Tris-HCl 50 mmol/L, pH 8.0, NaCl 0.5 mol/L, 巯基乙醇 10 mmol/L, Leupeptin 5 μg ml⁻¹, PMSF

收稿日期: 2003-08-07 接受日期: 2003-10-31

* 通讯作者 Corresponding author

1 mmol/L), 4℃冰浴研磨, 12 000 × g 离心 15 min, 2 次, 取上清液, 立即应用或保存于 -20℃。以考马斯亮蓝 G-250 作为显色剂, 分光光度计在波长 595 nm 处读数, 根据标准曲线计算蛋白含量。

1.3 一抗来源

BiP 的一抗为美国先锋种子公司 Chun-ping Li 博士馈赠的多克隆抗体。抗原来源于玉米, 抗体宿主为兔。

1.4 Western bolt 分析

SDS-PAGE 的条件为: 10% 的分离胶, 每板 30 mA, 电泳 25–30 min, 样品上样量为每泳道 50 μg。参照 Liu 等^[8]的方法进行 Western blot, 采用 NEN 公司的化学荧光试剂, 在暗室中曝光于 Kodak X 光片。

1.5 免疫组织化学定位

按常规石蜡组织切片法处理材料, 切片厚度为 10 μm, 贴片后脱蜡复水, 用 TBS (Tris-HCl 50 mmol/L, pH 7.4, NaCl 150 mmol/L) 略为清洗, 在 90℃ 的柠檬酸钠缓冲溶液 (10 mmol/L, pH 6.0) 中进行抗原修复 20 min, 室温冷却 30 min, 用双蒸水与 TBS 各漂洗 1 次, 用含 5% 牛血清白蛋白 (BSA) 的 TBS 封闭 10 min, 在片上直接滴加稀释度为 1:100 的 BiP 一抗溶液, 在 37℃ 下孵育 2 h, 用 TBS 略为清洗后, 再与结合 HRP (辣根过氧化物酶) 的二抗 (北京中山生物技术有限公司的产品) 溶液 (工作浓度为 1:500) 37℃ 孵育 1 h, 清洗后, 与反应底物 AEC (3-Amino-9-ethylcarbazole) 溶液 (北京中山生物技术有限公司的产品) 反应 15 min, 双蒸水清洗后, 用铁苏木精对染 1–2 min, 略为漂洗后, 用水溶性树脂封片。结合在二抗上的 HRP 会将反应底物催化产生红色物质, 而没有结合 BiP 的部位呈苏木精的蓝紫色。初步镜检后, 选择较清晰的结构, 在 Olympus 显微镜下拍照。

2 结果和分析

2.1 玉米胚的发育和可溶性蛋白的变化

玉米胚发育曲线呈单 S 型 (图 1), 同前人报道相类似^[9]。22 DAP 以前, 胚的干重增长缓慢, 22–34 DAP 迅速增长, 34 DAP 时达到最大值, 单个胚干重为 28.5 mg, 为玉米种子的生理成熟期。40 DAP 时干重略微下降。可溶性蛋白的迅速增加稍早于干重的积累, 在发育早期 (16 DAP 以前) 可溶性蛋白含量很

低, 16 DAP 时单个胚可溶性蛋白的含量仅为 0.1 mg, 约占胚干重的 1.3%。16 DAP 以后迅速增加, 一直延续到发育后期, 在 40 DAP 时达到 2.67 mg, 占胚干重的 10.1%。

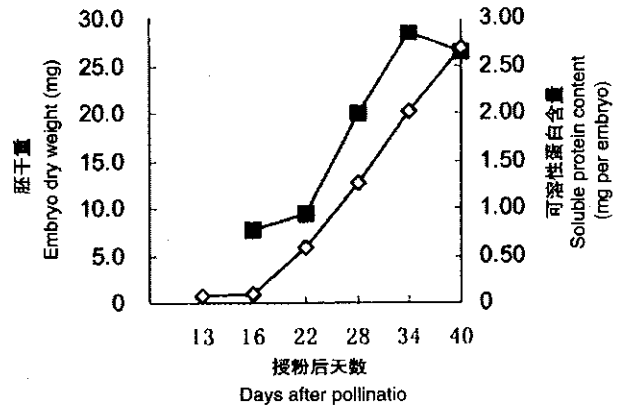


图 1 玉米胚发育过程中胚干重和可溶性蛋白的变化

Fig. 1 Changes in embryo dry weight and soluble protein content

■ Embryo dry weight; ◇ Soluble protein

2.2 在玉米种子发育过程中结合蛋白的变化

Western blot 结果表明 (图 2 A), BiP 有分子量分别为 74.6 kD 和 65.8 kD 的两条蛋白杂交带, 其中, 74.6 kD 的蛋白含量高且稳定, 而 65.8 kD 的蛋白杂交信号不稳定。按相等的蛋白量进样进行 Western blot 检测发现, 除了在早期 (13 DAP) BiP 含量略低外, 在玉米胚发育的其它阶段, 基本上保持相对一致的比例。根据玉米胚可溶性蛋白的大量积累时期为 16–34 DAP, 有理由认为发育中后期 (22–40 DAP) 的胚中 BiP 含量要明显高于前期。若按相同胚数量的蛋白量进样 (图 2 B), 发现 BiP 在 16 DAP 以前单个胚含量较低, 22 DAP 明显增加, 以后随发育增加, 40 DAP 时含量达最高。可见, BiP 的积累同胚的生长或蛋白积累相关。BiP 已被证实同种子的贮藏蛋白合成有关^[3,5,9]。特别是玉米醇溶蛋白 (zein) 在蛋白体的沉积, 需要 PDI (Protein disulfide isomerase, 蛋白二硫键异构酶)、BiP 等分子伴侣协助, 其中 α -zein 进入蛋白体, 是由 BiP 协助进行的^[10]。

对玉米胚进行热激 2 h 或 4 h, BiP 的表达几乎没有受影响 (图 3)。BiP 在实验中表现为热激不敏感而具发育调控的特征。根据胁迫反应, 热激蛋白可区分为两种类型: HSP (热激蛋白) 和 HSC (Heat shock cognate protein, 热激组成型蛋白)。前者为典型的热激蛋白, 在常态下不存在, 热激或胁迫诱导表达, 而且随热激或胁迫的消失而迅速消失。而后者在常态下存在, 与正常的生命活动相关, 热激或

胁迫对 HSC 没有作用或只增加其表达。这两种类型的热激蛋白在结构和功能上都很难区分^[1,2]。从 BiP 的功能上看,它可能充当看家蛋白的功能,维持蛋白的正常合成,从属于热激蛋白的 HSC 型。



图 2 玉米胚发育过程中 BiP 的 Western blot

Fig. 2 Western blot of BiP during maize embryo development

A. 按相等的蛋白量进样; B. 按相等胚数量的蛋白量进样; M. 标准蛋白分子量,泳道数字表示授粉后天数。A, loading the same amount of soluble protein; B, loading protein amount of the same number of embryos. The number under the lane indicates days after pollination (DAP); M, protein molecular weight marker.

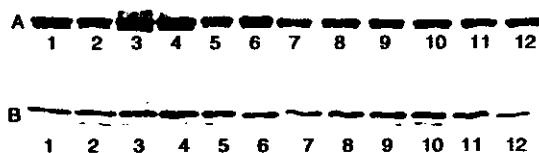


图 3 热激处理玉米胚 BiP 的 Western blot

Fig. 3 Western blot of BiP after heat shock (HS)

A. 热激 2 h; B. 热激 4 h。泳道 1, 3, 5, 7, 9, 11 为对照, 2, 4, 6, 8, 10, 12 为热激; 1-2, 3-4, 5-6, 7-8, 9-10, 11-12 分别代表 13 DAP, 16 DAP, 22 DAP, 28 DAP, 34 DAP 和 40 DAP。A, HS 2 h; B, HS 4 h. Lanes 1, 3, 5, 7, 9, 11 for control, lanes 2, 4, 6, 8, 10, 12 for HS; Lanes 1-2, 3-4, 5-6, 7-8, 9-10, 11-12 represent 13, 16, 22, 28, 34 and 40 days after pollination, respectively.

2.3 结合蛋白在玉米胚中的定位

经组织化学定位发现, BiP 在发育早期 (13 DAP) 就已经在胚芽、初生维管束和盾片外侧的糊粉层中存在, 而且并不随发育或热激而变化 (图 4)。结合前面的结果, 可以推测 BiP 在玉米胚 13-40 DAP 的发育阶段, 只增加了含量。在胚芽端, BiP 的分布是最密集的, 而该区域是细胞分裂和蛋白合成的旺盛区域。而糊粉层和初生维管束, 在未来种子萌发时蛋白动员和运输中起重要作用。BiP 在这些器官中的存在丰富, 提示了胚在发育过程中, 除了构建未来植株的雏形外, 也为其相应器官功能的执行作好了准备。最近有报道, 利用 GUS 基因作为报告基因同 BiP 的启动序列融合, 转入植物材料中, 发现 GUS

基因在维管束及细胞旺盛分裂区域分布^[11,12]。由此可见, BiP 基因的定位表达是由保守的调控元件调控的, 同它的功能执行密切相关。

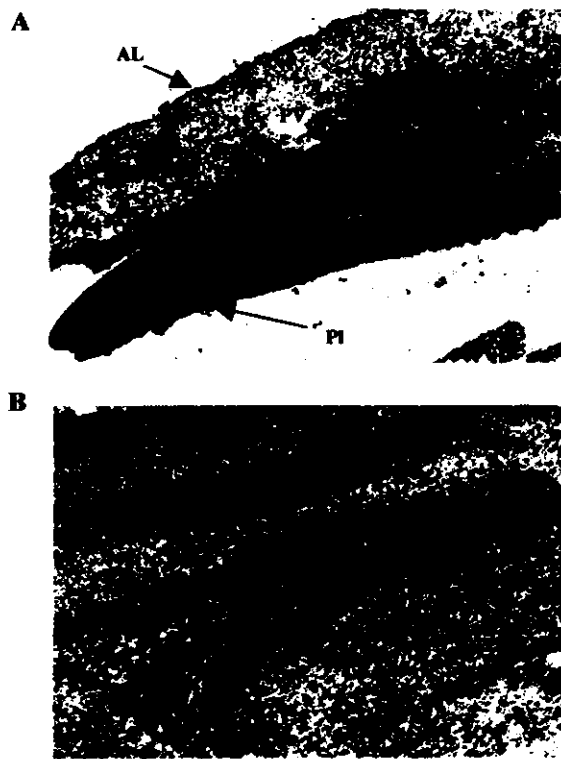


图 4 BiP 在 28 DAP 玉米胚中的组织定位

Fig. 4 Localization of BiP in maize embryo after pollination for 28 days

A: $\times 30$; AL: 糊粉层; PV: 初生维管组织; Pl: 胚芽端; B: $\times 180$, 示初生维管组织。A: $\times 30$; AL: Aleurone layer; PV: Primary vascular tissue; Pl: Plumule; B: $\times 180$, showing primary vascular tissue.

参考文献

- [1] Huang X F (黄祥富), Huang S Z (黄上志), Fu J R (傅家瑞). Regulation and function of the heat shock protein in plants [J]. Chin Bull Bot (植物学通报), 1999, 16 (5): 530-536. (in Chinese)
- [2] Schlersinger M J. Heat shock proteins [J]. J Biol Chem, 1990, 265 (21): 2111-2114.
- [3] Kalinski A, Rowley D L, Loer D S, et al. Binding-protein expression is subjected to temporal developmental and stress-induced regulation in terminally differentiated soybean organs [J]. Planta, 1995, 195(4): 611-621.
- [4] Forward B S, Misra S. Characterization and expression of the Dougl-fir luminal binding protein (PmBiP) [J]. Planta, 2000, 212 (1): 41-51.
- [5] Hatano K, Shimada T, Hiraiwa N. A rapid increase in the level of binding protein (BiP) is accompanied by synthesis and degradation of storage protein in pumpkin cotyledons [J]. Plant Cell Physiol, 1997, 38(3): 344-351.
- [6] Muench D G, Wu Y J, Zhang Y S, et al. Molecular cloning, expression and subcellular localization of a BiP homolog from rice

- endosperm tissue [J]. *Plant Cell Physiol*, 1997, 38(4): 404–412.
- [7] Wrobel R L, Obrian G, Boston R S. Comparative analysis of BiP gene expression in maize endosperm [J]. *Gene*, 1997, 204: 105–113.
- [8] Liu J(刘军), Huang S Z(黄上志), Fu J R(傅家瑞). Synthesis of heat shock protein in maize seed embryo with different vigor during germination [J]. *Acta Bot Sin* (植物学报), 2000, 42(3): 253–257. (in Chinese)
- [9] Doehlert D C, Smith L J, Duke E R. Gene expression during maize kernel development [J]. *Seed Sci Res*, 1994, 4(3): 299–305.
- [10] Li C P, Larkins B A. Expression of protein disulfide isomerase is elevated in the endosperm of the maize floury-2 mutant [J]. *Plant Mol Biol*, 1996, 30(5): 873–882.
- [11] Buzeli R A, Cascardo J C, Rodrigues L A, et al. Tissue-specific regulation of BiP genes: a cis-acting regulatory domain is required for BiP promoter activity in plant meristems [J]. *Plant Mol Biol*, 2002, 50(4–5): 757–771.
- [12] Forward B S, Osusky M, Misra S. The Douglas-fir BiP promoter is functional in *Arabidopsis* and responds to wounding [J]. *Planta*, 2002, 215(4): 569–576.