

‘乌龙岭’龙眼胚胎发育时期特异性蛋白质的变化

梁文裕¹, 陈伟^{2*}, 宋瑞锋², 张凤²

(1. 宁夏大学生命科学学院, 银川 750021; 2. 福建农林大学生命科学学院, 福州 350002)

摘要: 应用 IEF-SDS-PAGE 技术分析龙眼胚胎分化发育过程中蛋白质组分的变化。结果表明, 在各发育阶段大多数蛋白质组分的电泳图谱基本一致, 但也有变化。其中花后 38 d 存在 TE₁ (27.1 kD, pI 7.3), TE₂ (17.5 kD, pI 8.2) 2 个特异蛋白, 45 d 存在 TE₃ (11.4 kD, pI 7.6), TE₄ (13.2 kD, pI 9.9) 2 个特异蛋白, 52 d 存在 TE₅ (22.6 kD, pI 7.2), TE₆ (18.6 kD, pI 8.3), TE₇ (23.5 kD, pI 3.6) 3 个特异蛋白。31 d 胚胎电泳图谱中的蛋白质点数相对较多, 表明此时蛋白质旺盛合成与积累, 这与蛋白含量的变化基本一致。龙眼胚胎发育过程中特异蛋白的出现或消失, 对胚胎的分化发育具有重要作用。

关键词: 龙眼; 胚胎发育; 双向电泳; 特异蛋白

中图分类号: Q946.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2005)03-0229-04

Changes in Specific Proteins in Embryos of Longan at Different Development Stages

LIANG Wen-yu¹, CHEN Wei^{2*}, SONG Rui-feng², ZHANG Feng²

(1. College of Life Science, Ningxia University, Yinchuan 750021, China;

2. College of Life Science, Fujian Agricultural and Forestry University, Fuzhou 350002, China)

Abstract: IEF-SDS-PAGE (isoelectric focusing electrophoresis-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis) technique was applied to comparing and analyzing the changes in protein component during embryo differentiation and development of longan (*Dimocarpus longan* Lour. cv. Wulongling). The results showed that major components of proteins were generally similar at different development stages, but some changes also took place. The 7 new specific proteins were observed at different stages of the embryo development. They were TE₁ (27.1 kD, pI 7.3), TE₂ (17.5 kD, pI 8.2) on 38 days after anthesis (DAA); TE₃ (11.4 kD, pI 7.6), TE₄ (13.2 kD, pI 9.9) on 45 DAA; TE₅ (22.6 kD, pI 7.2), TE₆ (18.6 kD, pI 8.3), TE₇ (23.5 kD, pI 3.6) on 52 DAA. These specific proteins showed good repeatability in the experiments. The number of protein points were comparatively higher on 31 DAA gel electrophoretogram, which indicated that rich synthesis and accumulation of proteins appeared at the stage of 31 DAA, and coincided with the results of the protein contents determined. The appearance or disappearance of the specific proteins might play an important role in longan's embryo differentiation and development.

Key words: Longan; Embryo development; Two-dimensional gel electrophoresis; Specific protein

植物胚胎分化发育的过程是基因在机体内外因素作用下, 在时间和空间上顺序表达的过程, 其表达的方式以合成某种蛋白质为主。由于这些蛋白质很可能是胚胎发育时期特异基因表达的产物, 与该时期细胞的功能或组织的形态建成及机体的生理生化变化密切相关, 因此作为一种重要的分子标

记, 特异蛋白为研究胚胎分化过程的基因表达调控提供了物质基础, 对认识胚胎分化发育的分子本质有重要意义。近年来, 利用双向电泳技术研究在植物胚胎发育中的特异蛋白有不少报道, 但大多集中在草本作物, 如大麦^[1]、水稻^[2]、黄瓜^[3]、胡萝卜体细胞胚^[4]、玉米^[5]等, 在木本植物中仅见荔枝有相关特异

收稿日期: 2004-07-13 接受日期: 2004-10-18

基金项目: 国家自然科学基金(30370999); 福建省自然科学基金(C0410013)资助

* 通讯作者 Corresponding author

蛋白的研究报道^[6]。至于龙眼胚胎发育时期特异蛋白的研究,至今尚未见报道^[7]。本研究应用改进的双向电泳技术^[8]分析龙眼胚胎发育过程中蛋白质的动态变化,为分离纯化与胚胎发育相关的蛋白质,进而克隆相关基因,为实现龙眼胚胎分化发育的分子调控奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

龙眼(*Dimocarpus longan* Lour.)品种为‘乌龙岭’(胚胎发育正常),种植在福建省农业科学院果树研究所龙眼品种园。选用约 15 a 生,生长发育结果正常的植株 3 株,在花期一致的果穗上,于谢花后 31 d、38 d、45 d、52 d、59 d 采集正常果实用冰壶带回实验室,剥离胚胎后,样品立即贮藏于 -20℃ 冰箱备用。试验于 2001–2002 年进行。两年重复。

1.2 蛋白质提取

称取样品 1.0 g,加入 10 倍体积 -20℃ 预冷丙酮[含 10%三氯乙酸(TCA)和 0.7% β-巯基乙醇(β-Me)]研磨成匀浆,涡旋后静置于 -20℃ 1 h 沉淀蛋白质,随后 4℃,15 000×g 离心 20 min,弃上清液,重复处理 2 次。最后 1 次沉淀置于 -20℃ 下 36 h,使丙酮完全挥发。准确称取蛋白丙酮干粉 25 mg,加 0.5 ml 样品裂解液(9.5 mol/L 尿素,2% 乙基苯基聚乙二醇(NP-40),0.2% 两性电解质载体安福灵(Ampholine) pH 3.5–10.0,0.4% 安福灵 pH 5–7 和 0.4% 安福灵 pH 6–8,5% β-Me)于 37℃ 水浴 2 h。常温下 15 000×g 离心 10 min,取上清液用于蛋白质电泳分析。

1.3 双向电泳

第一向等电聚焦电泳(isoelectric focusing electrophoresis, IEF):胶长 11 cm,内径 1.5 mm。胶浓度为 4%,10 ml 胶中含尿素 5.5 g,双蒸水 1.97 ml,10% NP-40 2 ml,30% Acr-Bis (Acr 28.38%; Bis 1.62%)母液 1.33 ml,3 种 pH 梯度的两性电解质载体(pH 5–7 200 μl, pH 6–8 200 μl, pH 3.5–10.0 100 μl),10%过硫酸铵 10 μl, N,N,N',N'-四甲基乙二胺(TEMED) 4 μl。上样量为 25 μl 蛋白提取液(约含 50 μg 蛋白)。预电泳为 200 V,15 min; 300 V,30 min; 400 V,1 h。正式电泳为 600 V,12 h; 800 V,2 h; 1 000 V,2 h。电泳后胶条先用 12.5% TCA 固定 10 min,于平衡液(5%甘油,2.1%十二烷基硫酸钠(SDS),0.1 mol/L Tris-HCl,2% β-Me,pH 6.8)中平衡 10 min,直接进行第二向电泳或 -20℃ 冰冻保存。

第二向 SDS 聚丙烯酰胺凝胶垂直板电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE):垂直板规格为 20 cm×20 cm,胶厚 1 mm。分离胶和浓缩胶浓度分别为 12%和 4%。用 0.5%琼脂糖(电极缓冲液配制)封闭胶条,电泳条件为每板 20 mA,6 h 或 15 mA,8 h。银染法染色^[9]。等电点及分子量测定参照陈伟等^[8]方法。每样品 3 次重复。

1.4 图像采集与分析

利用 BIO-RAD Gel Doc2000 凝胶成像系统对凝胶扫描成像并进行分析^[9]。

1.5 蛋白质含量的测定

参照 Lowry^[10]方法测定。每样品 3 次重复。

2 结果和分析

2.1 胚胎蛋白质含量的变化

从图 1 可见,乌龙岭龙眼胚胎蛋白质在花后 31 d 含量最高,38 d 含量略有下降,但仍维持在较高水平;花后 45 d 有一个较明显的降低,随后平缓下降。这一结果从蛋白质水平上反映出了胚胎发育在 38 d 前的新陈代谢要比后期旺盛,说明这一时期基因表达十分活跃,蛋白质大量合成,而随后蛋白质的含量下降,表明 38 d 后基因表达趋缓,蛋白质合成减弱,同时随着胚胎的进一步发育,胚内储藏性物质逐渐积累,蛋白质含量相对降低。

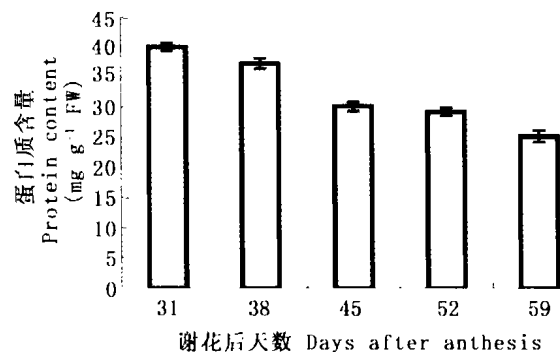


图 1 不同发育时期龙眼胚胎蛋白质含量变化
Fig. 1 Changes in protein content in longan embryos during different development stages

2.2 胚胎发育的特异蛋白

图 2 显示龙眼胚胎发育过程中从花后 31 d 至 59 d 的蛋白质电泳图谱。总体来讲,各时期的主要蛋白质组分没有变化,体现了胚胎蛋白质组分的稳定性,但也存在差异(表 1)。花后 31 d 胚胎中 14.8 kD、

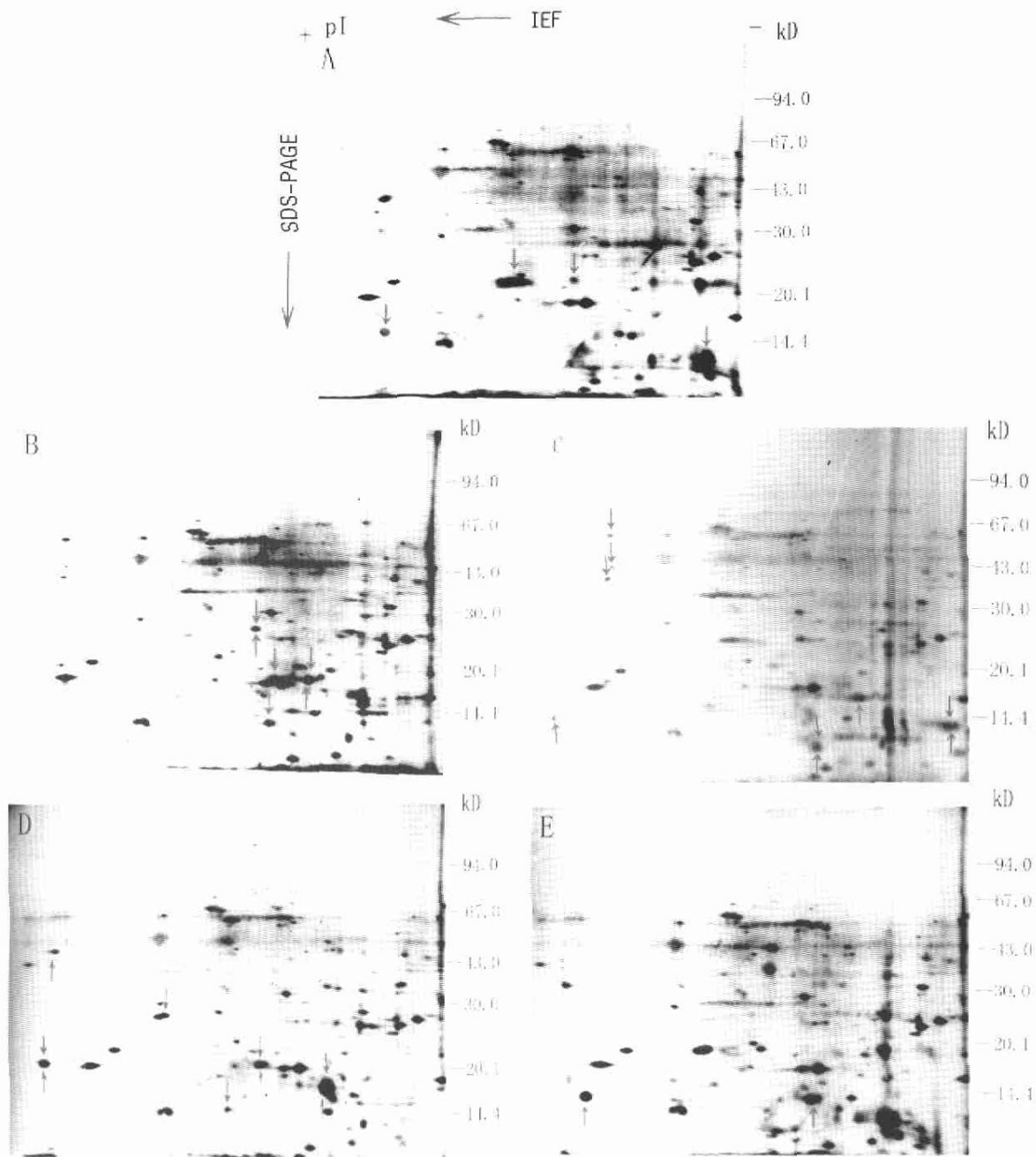


图 2 龙眼胚胎蛋白质的双向电泳图谱

Fig. 2 Two-dimensional gel electrophoresis patterns of proteins in embryos of longan

A. 31 DAA-stage; B. 38 DAA-stage; C. 45 DAA-stage; D. 52 DAA-stage; E. 59 DAA-stage; 箭头(↑)示新出现的特异蛋白;

箭头(↓)示将消失的特异蛋白 Arrows (↑) indicate newly emerged specific proteins; arrows (↓) indicate disappearing specific proteins.

pI 4.7, 21.4 kD, *pI* 6.6, 12.3 kD, *pI* 9.6 等 3 个蛋白点, 在 38 d 后的胚胎中不出现(图 2 A); 38 d 的胚胎中, 有 2 个新蛋白点出现, 即 27.1 kD, *pI* 7.3 和 17.5 kD, *pI* 8.2, 分别命名为 TE₁ 和 TE₂, 在随后的发育阶段又消失了, 此外, 另有 2 个蛋白点(17.8 kD, *pI* 7.6, 12.7 kD, *pI* 7.7)消失(图 2 B); 在 45 d 的电泳图谱上(图 2 C), 共有 4 个新蛋白点出现, 其中 11.4 kD, *pI* 7.6, 13.2 kD, *pI* 9.9 等 2 个蛋白点清晰, 表达量大, 为该时期特有的蛋白质, 分别命名为 TE₃、TE₄, 另

有 5 个蛋白点消失, 其中 56.9 kD, *pI* 4.7, 43.4 kD, *pI* 4.7, 40.4 kD, *pI* 4.6 以后均未出现, 这表明龙眼胚胎在 38-45 d 内结构基因表达变化较大。在 52 d 的图谱中(图 2 D), 有 4 个新蛋白点出现, 其中 23.5 kD, *pI* 3.6 和 18.6 kD, *pI* 8.3 的 2 个蛋白点表达量大, 3 个蛋白点为特有: 22.6 kD, *pI* 7.2, 18.6 kD, *pI* 8.3, 23.5 kD, *pI* 3.6, 分别命名为 TE₅、TE₆、TE₇。59 d 的电泳图谱上, 23.5 kD, *pI* 3.6, 25.8 kD, *pI* 5.5, 22.6 kD, *pI* 7.2, 18.6 kD, *pI* 8.3, 15.2 kD, *pI* 6.3 等 5 个蛋白点

消失,但 13.9 kD、*pI* 4.1, 13.8 kD、*pI* 7.7 等 2 个蛋白点出现,其中 13.9 kD、*pI* 4.1 蛋白点表达量大,十分清晰(图 2 E)。这显示了龙眼胚胎发育过程中蛋白质组分的变化,反映了龙眼胚胎发育过程中基因表达的特点。

表 1 龙眼胚胎不同发育时期特异蛋白的变化
Table 1 Changes in specific proteins in longan embryos during different development stages

谢花后天数 Days after anthesis	新出现的特异蛋白 Newly emerged specific proteins	将消失的特异蛋白 Disappearing specific proteins
31		21.4(6.6); 22.2(7.6); 12.3(9.6); 14.8(4.7)
38	27.1(7.3); 17.5(8.2)	27.1(7.3); 17.5(8.2); 17.8(7.6); 12.7(7.7)
45	16.4(8.4); 13.2(9.9); 11.4(7.6); 14.4(3.8)	56.9(4.7); 43.3(4.7); 40.4(4.6); 13.2(9.9); 11.4(7.6)
52	54.0(3.8); 22.6(7.2); 23.5(3.6); 18.6(8.3)	25.8(5.5); 23.5(3.6); 15.2(6.3); 18.6(8.3); 22.6(7.2)
59	13.8(7.7); 13.9(4.1)	

括号前为分子量 (kD), 括号内为等电点 (*pI*)。Data before parentheses are molecular weight (kD); in the parentheses are isoelectric point (*pI*)。Data before parentheses are molecular weight (kD); in the parentheses are isoelectric point (*pI*)。

3 讨论

蛋白质是基因表达的产物,生物体的性状是由蛋白质体现的。从双向电泳图谱可见:龙眼胚胎在发育过程中(花后 31-59 d)绝大多数蛋白质基本不变,少数蛋白质在数量、分子量、等电点及延续时间的长短等性质上存在差异,具有发育阶段的特异性,表明它们与组织或细胞在该时期的特定生理功能有关,这些特异蛋白为研究龙眼胚胎发育的基因调控及分子机理提供了有价值的参考资料。同时,从实验结果可以看出,龙眼谢花后 31 d 胚胎双向电泳图谱中蛋白质点数相对较多,提示蛋白质的旺盛合成与积累在 31 d 的胚胎期或更早,与我们测定的蛋白质含量结果基本一致,也与缪国华等对水稻的研究^[11]和陈伟等对荔枝的研究结果^[6]基本上是一致的。表明胚胎基因在前期表达活跃,与胚胎所处的生理状态相一致。

陈伟等^[6]指出:胚胎发育过程中特异性蛋白质的出现和消失,与胚胎分化发育密切相关,一些发育阶段特异性蛋白质的变化是胚胎分化发育的良好标志。在 38-52 d 胚胎期共出现了 TE₁、TE₂、TE₃、TE₄、TE₅、TE₆、TE₇ 等 7 个特异蛋白,其中有些表达量大,蛋白点清晰,而其他一些蛋白质只持续一段时间,这些特异蛋白具有发育阶段的特异性,可以

作为一种分子标记,标示龙眼胚胎发育的过程和阶段,但还需从解剖学和生理学方面加以证实。另外,在 31-59 d 的发育中,有许多蛋白点消失或逐渐消失,说明这些蛋白质已降解失去活性,可能表明其生物学功能已经结束。

胚胎发育是植物最重要的发育过程之一,与此相关的基因常常是其生命过程中必不可少的。对本研究观察到的 7 个特异性蛋白质 TE₁₋₇ 进行进一步的研究,进而筛选出与龙眼胚胎发育相关的基因,将对研究该基因的生物学功能及其对龙眼胚胎发育的调控机理具有重要意义。

参考文献

- [1] Pedersen S, Simonsen V, Loeschche V. Overlap of gametophytic and sporophytic expression in barley [J]. *Theor Appl Gen*, 1987, 75:200-206.
- [2] Zhang B (张斌), Tang X H (唐锡华). Studies on rice embryo proteins with developmental stages specificity [J]. *Acta Phyto-physiol Sin*(植物生理学报), 1992, 18(1):85-92.(in Chinese)
- [3] Lin M(林鸣), Cao Z X(曹宗巽). The floral-specific proteins of cucumber [J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), 1996, 38(7):525-529.(in Chinese)
- [4] Zhu C P(朱长甫), Kamada H(镰田博), He Y K(何奔昆), et al. Isolation and sequencing of embryogenic cell protein from carrot [J]. *Acta Biol Exp Sin*(实验生物学报), 1997, 30(1):13-18. (in Chinese)
- [5] Yang Z H (杨中汉), Zhang Y H (张一洪). Purification of the specific plasma membrane proteins from the surface of sperm cells of *Zea mays* [J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), 1997, 39(5):422-426.(in Chinese)
- [6] Chen W(陈伟), Lü L X(吕柳新), Huang C M(黄春梅), et al. Studies on 'Wuye' litchi specific proteins in the embryo development stages [J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), 2001, 28(6): 504-508.(in Chinese)
- [7] Liang W Y(梁文裕), Chen W(陈伟), Lü L X(吕柳新). Advances in specific proteins at different stages of plant embryo development [J]. *J Fujian Agri For Univ (Nat Sci)*(福建农林大学学报自然科学版), 2003, 32(1):98-103.(in Chinese)
- [8] Chen W(陈伟), Huang C M(黄春梅), Lü L X(吕柳新). The improved method of two-dimensional electrophoresis of protein in recalcitrant plant litchi [J]. *J Fujian Agri Univ* (福建农业大学学报), 2001, 30(1):123-126.(in Chinese)
- [9] Jia Y F(贾宇峰), Lin Q X(林秋霞), Guo Y J(郭尧君), et al. The image analysis of two-dimensional gel electrophoresis [J]. *Prog Biochem Biophys*(生物化学与生物物理进展), 2001, 28(2):246-250.(in Chinese)
- [10] Lowry O H, Rosebrough N J, Farr A L. Protein measurement with the folin phenol reagent [J]. *J Biol Chem*, 1951, 193:265-275.
- [11] Liao G H(缪国华), Tang X H(唐锡华). Proteins of developing rice embryos as characterized by two-dimensional gel electrophoresis [J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), 1985, 27(4):375-380.(in Chinese)