

# 无核荔枝胚胎发育时期蛋白质图谱分析

李 蕾<sup>1,2</sup>, 彭存智<sup>1</sup>, 李明芳<sup>1</sup>, 郑学勤<sup>1\*</sup>

(1. 中国热带农业科学院热带作物生物技术国家重点实验室, 海口 571101; 2. 海南师范学院生物系, 海口 571158)

**摘要:** 通过二维聚丙烯酰胺凝胶电泳(2DE)以及计算机辅助的图像分析技术,对荔枝开花后 20 d 的正常与败育胚蛋白质图谱进行了初步分析。结果表明,正常胚总蛋白质斑点数为 129,败育胚总蛋白质斑点数为 130,其中 24 个蛋白质点在两种胚中的表达丰度没有明显变化,35 个蛋白质点在表达丰度上有明显差异,55%的蛋白则发生了蛋白质缺失、增加以及位置改变等变化。这两种蛋白质组的表达差异说明了胚内蛋白质成分在其败育过程中发生了变化,这些蛋白可能参与了胚败育的调节和控制。

**关键词:** 荔枝; 胚发育; 蛋白质图谱; 二维聚丙烯酰胺凝胶电泳

中图分类号: Q946.1

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2006)04-0312-06

## Proteomic Analysis of Seedless Litchi at Embryo Developmental Stage

LI Lei<sup>1,2</sup>, PENG Cun-zhi<sup>1</sup>, LI Ming-fang<sup>1</sup>, ZHENG Xue-qing<sup>1</sup>

(1. Key State Laboratory of Biotechnology for Tropical Crops, Chinese Academy of Tropical Agriculture Sciences, Haikou 571101, China;

2. Department of Biology, Hainan Normal University, Haikou 571158, China)

**Abstract:** Proteomic analysis is a new powerful tool for revealing the changes in protein level. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis (2DE) and computer image analyses were employed to compare the global protein patterns between normal and aborted embryo of litchi (*Litchi chinensis* Sonn.). Totally, 129 and 130 protein spots were obtained from normal and aborted embryos, respectively, of which 24 spots in both kind of embryos showed no significant difference, but 35 spots exhibited obvious differences in quantity. Furthermore, some spots were missing and some new spots emerged in aborted embryo compared with normal embryo. The differences in expressing the proteins between normal and aborted embryos of litchi are useful for regulating and controlling the embryo abortion.

**Key words:** Litchi; Embryo development; Proteomics mapping; Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis

荔枝 (*Litchi chinensis* Sonn.) 为无患子科 (Sapindaceae) 荔枝属植物,是我国特有的经济果树。由海南省筛选的荔枝新株系无核荔枝“陆侨”,果实大,品质好,产量高但果实的无核率不够稳定,影响了商业价值。有关荔枝胚胎败育机制研究虽已有一些报道<sup>[1-9]</sup>,但从蛋白质组学探讨其理论机制,尚未见报道。

无核荔枝在胚胎发育早期 (花后 15 d 左右)即发生胚败育<sup>[9]</sup>,果实成熟后仅见核痕迹,与同株系正常发育胚胎有明显差异。两者既属同一株系,其基因组通常是维持稳定不变的,但正常发育胚胎与败育胚胎间的基因表达即蛋白质组间则可能存在较大差异。因而寻找两者之间的差异蛋白质谱,对于揭示胚胎发育进程的本质,获得某些关键蛋白,对

收稿日期: 2005-12-29 接受日期: 2006-04-18

基金项目: 863 计划项目(2004AA001380); 海南省自然科学基金项目(80419)资助

\* 通讯作者 Corresponding author

其定性和功能分析都具有重要意义<sup>[10]</sup>。

目前关于植物的差异蛋白质研究已有一些报道<sup>[11,12]</sup>, David 等利用二维聚丙烯酰胺凝胶电泳(two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis, 2DE)技术比较了栽培于不同环境下但起源于同一种群的小麦, 结果发现所有的栽培种群的蛋白质谱都与原种群有差别, 他认为, 这不是由随机漂移引起, 而是由适应其各自的气候条件而形成。Santoni-Herbik、Von Wiren、Komtsu 等分别对拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、小麦(*Triticum spp.*)、水稻(*Oryza sativa*)、番茄(*Lycopersicon esculentum*)等进行了野生型和突变体间蛋白质组分析, 获得了蛋白质组差异表达谱, 并获得相关蛋白<sup>[13-21]</sup>。

本文采用 2DE 及计算机辅助的图像分析技术<sup>[22-26]</sup>, 对正常型发育胚和败育胚的蛋白质组图谱进行分析比较, 为荔枝胚胎败育机制研究提供科学依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

以无核荔枝(*Litchi chinensis* Sonn.)“陆侨”为供试材料, 取自海南陆桥无核荔枝基地。选取 4-5 年生正常挂果果树, 于盛花期选择开花量较大、花穗健壮的单株挂牌, 记录雌花开放期。于花后 20 d 取幼果, 冰上剥离正常发育及败育胚, 液氮速冻后于 -20℃低温保存备用。

### 1.2 蛋白质提取及测定

提取液按张以顺等<sup>[27]</sup>方法配制, 分别称取 0.5 g 正常发育及败育胚, 液氮下充分研磨, 加入 3-4 倍体积的提取液及 10%(材料鲜重)的 PVP40, 常温下再充分研磨, 12 000 ×g, 4℃下离心 15 min, 取上清液。残渣用 3-4 倍体积的提取液重提一次(不加 PVP40), 合并上清液, 用 10 倍体积无水乙醇, -20℃下沉淀 3-4 h, 12 000 ×g, 4℃下离心 15 min, 沉淀用适量提取缓冲液溶解或直接置于 -20℃冰箱备用。

在上述沉淀提取的蛋白质中加入 100 μl 裂解液(裂解液组成: 尿素 7 mol/L, 硫脲 2 mol/L, 3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙铵]-丙磺酸(CHAPS) 4%, 二硫苏糖醇(DTT) 60 mmol/L, 两性电解质 2%), 4℃下溶解过夜, 12 000 ×g, 4℃离心 15 min, 以除去样品中不溶或杂质部分。取上清液依 Bradford<sup>[28]</sup>方法测定蛋白质含量。

### 1.3 2DE

**一维固相 pH 梯度等电聚焦** 使用 Immobiline™ pH3-10 线性固相 pH 梯度(immobilized pH gradient, IPG)预制凝胶条(18 cm, 购自 Amersham Pharmacia Biotech Inc.), 在 IPGphor 电泳仪(Amersham Pharmacia Biotech Inc.)上完成。样品蛋白含量为每胶条 400 μg, 水化为 30 V, 12 h; 以 100 V 1 h, 500 V 1 h, 1 000 V 0.5 h, 8 000 V 7.5 h 电泳至 60 000 V h 时结束。

**平衡** 配制平衡液(50 mmol/L Tris, 尿素 6 mol/L, 30% 甘油, 2% SDS, 痕量溴酚蓝 BPB) 40 ml, 临用前加入 DTT, 使其终浓度为 1%, 将等电聚焦后的 IPG 胶条放入, 于摇床上振荡 15 min。再将 IPG 胶条放入临用前加进 2.5% 碘乙酰胺的平衡液中, 于摇床上振荡 15 min。

**SDS-PAGE** 在 Multiphor II 电泳仪上进行, 配制 200 mm×200 mm×1 mm, 12.5% 均匀胶。将平衡后的 IPG 胶条移至凝胶的上方, 用 0.5% 的琼脂糖封闭。电泳缓冲液为 Tris-Gly-SDS, 在 14-15℃ 时, 以每一胶条 15 mA 恒流电泳, 直至溴酚蓝前沿抵玻璃板下缘为止。

### 1.4 染色

Hoefer 凝胶自动染色仪银染。

### 1.5 图象分析

使用 Labscan 控制 ImageScanner 扫描图像, 图象扫描仪经强度校正(intensity calibration)后, 透射扫描 2DE 凝胶(光学分辨率 300 dpi, 象素深度 8 bits), 所得图谱借助图象分析软件 ImageMaster 2D Elite 进行详细分析、比较蛋白质斑点差异。图象分析软件自动将不同图谱中的相同蛋白质点匹配, 不能匹配的蛋白质斑点视为差异点。蛋白质分子的等电点和分子质量根据 IPG 胶条 pH 标示范围和低分子质量蛋白标准测算; 每个蛋白质的相对含量以其占总蛋白质的百分数表示。

## 2 结果和分析

### 2.1 胚蛋白质 2DE 图谱特征

荔枝花后 20 d 正常发育胚与败育胚双向电泳各重复 3 次, 重复性较好。它们的胚蛋白质 2DE 图谱见图 1。根据 Carsetin 坐标系统, 从左到右等电点增加, 从下往上分子量增加。由图 1 可见, 花后 20 d

的胚蛋白质斑点较少,相对集中于中部偏左(等电点 pI 5-7),表示中性、偏酸性蛋白较多,碱性蛋白偏少。蛋白质分子量主要集中于 25-90 kD 之间。

## 2.2 胚蛋白质 2DE 图谱分析

采用图像分析软件 ImageMaster 2D Platinum 对两组胶进行分析,将凝胶去除纹理和消除背景,进行自动点检测,手工消除因杂质或明显的瑕疵形

成的“假点”,添加或切割因距离过近被识别成同一蛋白的蛋白点。结果表明,花后 20 d 正常胚蛋白质斑点数为 129,败育胚蛋白质斑点数为 130,二者数量差异较小。以 L001、L002、L003、L004 四个蛋白点作为地界标,对两块胶进行蛋白质匹配,图中绿色标记点为匹配上的蛋白质点,红色标记点为非匹配蛋白质点(图 2)。两组胶中匹配的蛋白质有 59 个,占 45.6%。

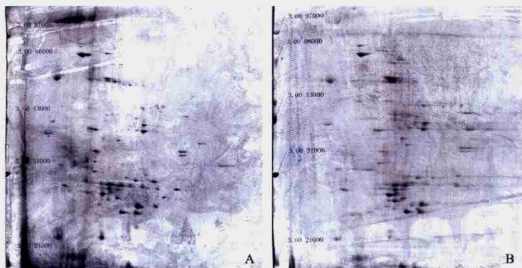


图 1 花后 20 d 的胚蛋白质组图谱

Fig. 1. Proteomics mapping in embryos of litchi 20 days after anthesis (DAA)

A. 正常胚 Normal embryo; B. 败育胚 Aborted embryo

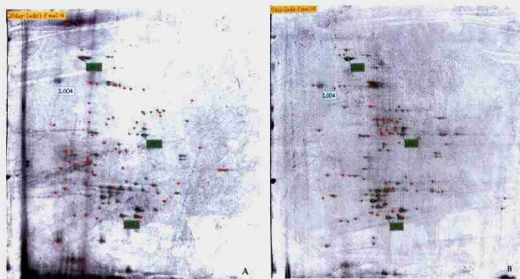


图 2 花后 20 d 胚蛋白质组图谱匹配与非匹配蛋白点

Fig. 2. Matched protein spots and non-matched protein spots in embryos of litchi 20 DAA

A. 正常胚 Normal embryo; B. 败育胚 Aborted embryo. 绿色和红色标记点分别为匹配和非匹配的蛋白质点  
Matched and non-matched protein spots are marked with green and red cross respectively.

一旦蛋白点被检定, ImageMaster 2D Platinum 可自动计算每一个蛋白点的蛋白质含量。其含量值可以以光密度(OD)、体积(Vol)和相对光密度(%OD)、相对体积(%Vol)表示。相对光密度和相对体积不受凝胶之间由于实验条件改变而发生变化的影响,是评价凝胶之间蛋白质表达差异的一种相当有效的方法。图3用散点图表征来自两张凝胶的蛋白点值之间的线性依赖关系。X为来自败育胚凝胶的蛋白点, Y为来自正常胚凝胶的蛋白点, 两块胶上匹配的59个蛋白质中有24个线性依赖相关系数高于0.95,说明这24个蛋白质点是相似的,在两组胶中质和量上没有差异。

柱状图可直接显示蛋白点的蛋白点值、集中趋势和离差。本实验中,生成蛋白点群的柱状图所选取的蛋白质点值类型为%OD, 选用了算术平均数100%和均方偏差100%统计学方法。柱状图窗口中,标准化方式选取了原始蛋白点值(Value),为在所有的柱状图中展示一个等同的等级。图4A为含有21个蛋白点的蛋白点群柱状图, 这些是在败育胚中表达量减弱的蛋白质点。图4B为在败育胚中表达量增加的蛋白点群柱状图, 以上两柱状图中,垂直的橘黄色棒对应于蛋白点值,蓝色水平线代表了选定的集中趋势,红色线条描绘出用[中心值±离差]定义的范围边界。这35个蛋白质点在表达量上表现出差异,表明这些蛋白质成分在胚胎发育过程

中发生了变化,进而可能参与胚胎发育的调节和控制。

与正常胚胎凝胶电泳图比较,胚胎发育的蛋白质2DE图谱中,在PI 6-7、分子量(MW) 35-43 kD处可见有一组新蛋白质点群(图5),这些新蛋白质点的产生可能与胚胎发育有更直接的相关。

### 3 讨论

陈伟<sup>[29]</sup>、张以顺<sup>[30]</sup>等也进行了荔枝胚胎发育时期的蛋白质双向电泳研究,但仅是胚胎后期(花后40-50 d)的蛋白质电泳。本文进行了无核荔枝胚发育过程中花后20 d的双向电泳。前文已表明<sup>[9]</sup>,无核荔枝胚发育发生在花后15 d左右,故进行这一阶段的蛋白质组差异表达谱分析,对于揭示胚胎发育机制更有意义。但此时的幼胚剥离非常困难,取样量较少,双向电泳蛋白上样量低,凝胶染色只能采用银染法,这对于进一步的肽质量指纹图谱分析有一定影响。而发育后期的蛋白质在数量和表达丰度上均较前期有所增加,通过对发育后期蛋白质组差异表达图谱进行分析,采用MALDI-TOF-MASS鉴定了部分差异蛋白(待发表)。

第一相电泳中,本文采用了商品化的预制IPG胶条,IPG重泡涨上样和低电压主动上样促进了低拷贝数蛋白的分离,但蛋白质的溶解问题和丢失问题仍可能存在。两组凝胶中分离出的蛋白质点相对

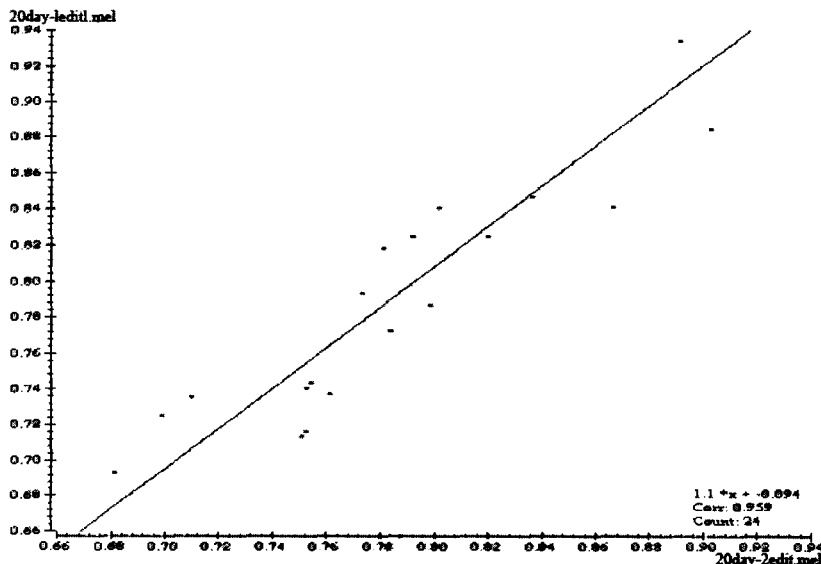


图3 两块胶中%OD变化较小的蛋白质相关图

Fig. 3 Correlation of less changed protein spots in %OD between normal and aborted embryos of litchi

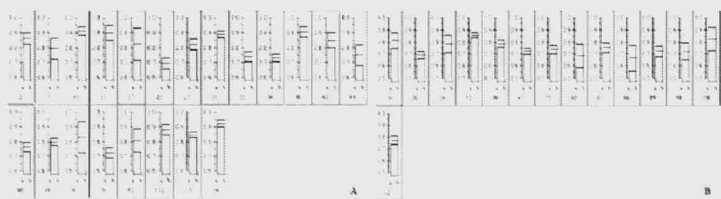


图4 败育胚中表达量变化的蛋白质点

Fig. 4 Spots expressing quantitative changes in protein from aborted embryos.

Decreased (A) and increased (B) protein spots in aborted embryos of litchi

A. 败育胚中表达量减弱的蛋白质点 Decreased protein spots in aborted embryo;

B. 败育胚中表达量增加的蛋白质点 Increased protein spots in aborted embryo

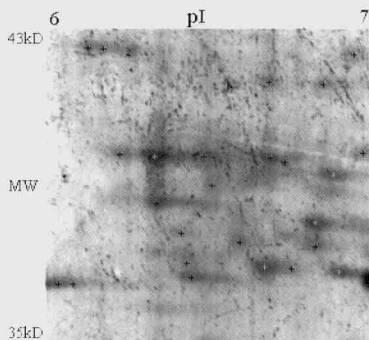


图5 败育胚中新出现的蛋白质点

Fig. 5 New emerged protein spots in aborted embryo

红色标记点为新出现的蛋白质点 Red crosses are new emerged protein spots.

较少,原因之一可能与发育早期蛋白质种类少和含量低有关,另外可能存在蛋白质的溶解问题和丢失。故蛋白质提取方法的进一步优化仍是今后工作的一部分。

本实验通过2DE电泳技术以及计算机辅助的图像分析技术,对荔枝正常与败育胚蛋白图谱进行了初步分析,获得荔枝正常与败育胚蛋白质组差异表达谱。结果表明蛋白在两种胚表达上有明显而稳定的量(蛋白质点染色的深浅)和质(蛋白质点的缺失、增加以及位置改变等)的变化,这两种蛋白质组表达差异的分析结果说明了细胞内很多蛋白质成分在胚发育过程中发生了变化,这些蛋白可能参与

与胚发育过程的调节和控制。

采用2DE进一步分离并确定胚发育发生前和发生后不同时期的差异蛋白,结合肽质量指纹图谱分析鉴定这些差异蛋白,了解目的蛋白质在胚发育过程中功能退变的作用将是后续的主要工作。

#### 参考文献

- [1] Lü L X (吕柳新), Chen R M (秦荣木), Chen J L (陈景泳). Observation of the embryo development stages of *Litchi* [J]. Subtrop Plant Sci (热带亚热带植物科学), 1985, (1):1-5. (in Chinese)
- [2] Ye X L (叶秀莲), Wang F X (王凤雄), Qian N F (钱南芬). Embryological studies of *Litchi chinensis* [J]. Acta Bot Yunnan (云南植物学学报), 1992, 14(1):59-65. (in Chinese)
- [3] Qiu Y P (邱燕平), Zhang Z W (张冠斌), Qiu R X (邱荣熙). Study on embryo and endosperm development of *Litchi chinensis* Sonn. [J]. Chin Bull Bot (植物学通报), 1994, 11(3):45-47. (in Chinese)
- [4] Chen W (陈伟), Lü L X (吕柳新). Changes in polyamine content in relation to embryo development in litchi ovules [J]. J Trop Subtrop Bot (热带亚热带植物学报), 2000, 8(3):229-234. (in Chinese)
- [5] Chen W (陈伟), Lü L X (吕柳新), Ye C L (叶陈亮). Relationship between embryo abortion and endogenous hormones in litchi ovules [J]. J Trop Crop (热带作物学报), 2000, 21(3):34-38. (in Chinese)
- [6] Chen W (陈伟), Lü L X (吕柳新). Relationship between embryonic development and changes of endogenous hormones in litchi (*Litchi chinensis* Sonn.) ovules [J]. J Appl Environ Biol (应用与环境生物学报), 2000, 6(5):419-422. (in Chinese)
- [7] Chen W, Lü L X. Relationship between litchi embryo abortion and phenolic inhibitors [J]. Acta Bot Sin, 2002, 44(2):168-172.
- [8] Chen W (陈伟), Lü L X (吕柳新), Huang C M (黄春梅). Studies on 'Wuyue' litchi specific proteins in the embryo development stages

- [J]. *Acta Hort Sin* (园艺学报), 2001, 28(6):504-508.(in Chinese)
- [9] Yang Y H(杨应华), Li L(李蕾), Yu D N(余诞生). Research on the seed abortion and fruit development in a seedless litchi strain [J]. *J Hainan Norm Univ Nat Sci* (海南师范学院学报 自然科学版), 2002, 15(2):71-74.(in Chinese)
- [10] He D C(何大澄), Xiao X Y(肖雪媛). Differential proteomics and its applications [J]. *J Beijing Norm Univ Nat Sci*(北京师范大学学报 自然科学版), 2002, 38(4):558-562.(in Chinese)
- [11] Liang Y(梁宇), Jing Y X(荆玉祥), Shen S H(沈世华), *Advances in plant proteomics* [J]. *Acta Phytoecol Sin* (植物生态学报), 2004, 28(1):114-125.(in Chinese)
- [12] Guo Y M, Shen S H, Jing Y X, et al. Plant proteomics in the post-genomic era [J]. *Acta Bot Sin*, 2002, 44(6):631-641.
- [13] David J L, Zivy M, Cardi M L, et al. Protein evolution in dynamically managed populations of wheat: adaptive responses to macro-environmental conditions [J]. *Theor Appl Gen*, 1997, 95: 932-941.
- [14] Santoni V, Bellini C, Caboche M. Use of two-dimensional protein-pattern analysis for the characterization of *Arabidopsis thaliana* mutants [J]. *Planta*, 1994, 192:557-566.
- [15] Herbig A, Giritch A, Horstmann C, et al. Iron and copper-nutrition dependent changes in protein expression in a tomato wild type and the nicotianamine-free mutant chloronerva [J]. *Plant Physiol*, 1996, 111:533-540.
- [16] Von Wiren N, Peltier J B, Rouquie D, et al. Four root plasma lemma polypeptides under-represented in the maize mutant *ys1* accumulate in a Fe-efficient genotype in response to iron-deficiency [J]. *Plant Physiol Biochem*, 1997, 35:945-950.
- [17] Komatsu S, Muhammad A, Rakwal R. Separation and characterization of proteins from green and etiolated shoots of rice (*Oryza sativa* L.): towards a rice proteome [J]. *Electrophoresis*, 1999, 20:630-636.
- [18] Komatsu S, Kajiwara H, Hirano H. A rice protein library: a data-file of rice proteins separated by two-dimensional electrophoresis [J]. *Oret Appl Gen*, 1993, 86:935-942.
- [19] Damerval C, LeGuilloux M. Characterization of novel proteins affected by the O<sub>2</sub> mutation and expressed during maize endosperm development [J]. *Mol Gen Gen*, 1998, 257:354-361.
- [20] Salekdeh G H, Siopongco J, Wade L J, et al. Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery [J]. *Proteomics*, 2002, 2:1131-1145.
- [21] Blockstock W P, Weir M P. Proteomics: quantitative and physical mapping of cellular proteins [J]. *Tibtech*, 1999, 17:121-127.
- [22] Ding Q X(丁勤学), Que H P(阙海萍), Guo Y J(郭尧君). Comparison of the two dimensional electrophoresis patterns between adult and aged murine brains in proteomic analysis [J]. *Prog Biochem Biophys*(生物化学与生物物理学进展), 2001, 28(5):683-687.(in Chinese)
- [23] Pan W(潘卫), Wang Y X(王应雄), Li G(黎刚). Study on the proteome of embryo of early stage in mice [J]. *Chin Biotechn*(中国生物工程杂志), 2003, 23(4):4-7.(in Chinese)
- [24] Li L(李蕾), Ying W T(应万涛), Yang H Y(杨何义), et al. Two dimensional electrophoresis separation technique in proteome [J]. *Res Chin J Chromatogr* (色谱), 2003, 21(1):27-31.(in Chinese)
- [25] Lin J K(林金科), Zheng J G(郑金贵), Yuan M(袁明), et al. The improvement of isolation and the method of two-dimensional electrophoresis of protein from tea plant [J]. *J Tea Sci*(茶树科学), 2003, 23(1):16-20.(in Chinese)
- [26] Jia Y F(贾宇峰), Lin Q X(林秋霞), Guo Y J(郭尧君). The image analysis of two dimensional gel electrophoresis [J]. *Prog Biochem Biophys*(生物化学与生物物理学进展), 2001, 28(2):246-250.(in Chinese)
- [27] Zhang Y S(张以顺), Xiang X(向旭), Huang S Z(黄上志), et al. A method for extracting embryo proteins in *Litchi chinensis* Sonn. [J]. *J Trop Subtrop Bot* (热带亚热带植物学报), 2003, 11(2): 174-176.(in Chinese)
- [28] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principles of protein dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72:248-254.
- [29] Chen W(陈伟), Lü L X(吕柳新). The improved method of two-dimensional electrophoresis of protein in recalcitrant plant litchi [J]. *J Fujian Agri Univ* (Nat Sci)(福建农业大学学报 自然科学版), 2001, 30(1):123-126.(in Chinese)
- [30] Zhang Y S(张以顺), Xiang X(向旭), Huang S Z(黄上志), et al. Changes in endogenous hormone and protein content during embryo abortion in litchi [J]. *J Plant Physiol Mol Biol* (植物生理与分子生物学学报), 2003, 29(3):233-238.(in Chinese)