

研究
简报

小麦花药、子房和胚胎发育过程中的蛋白质含量和电泳谱带* 变化

余万峰 赵洁*

(武汉大学植物发育生物学教育部重点实验室, 湖北武汉, 430072)

Changes of Protein Content and Profile during the Development of Anther, Ovary and Embryo in Wheat (*Triticum aestivum* L.)

YU Wan-Feng ZHAO Jie*

(Key Laboratory of MOE for Plant Developmental Biology, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

近年来, 高等植物的有性生殖已成为植物发育生物学研究的热点。在一些植物, 如松树^[1]、黄瓜^[2]、棉花^[3]、兰州百合^[4]和柏树^[5]等的花药、子房或胚等生殖器官可溶性蛋白的分析研究中, 均发现具有各自的特异蛋白。小麦作为重要的粮食作物, 对其生殖过程中蛋白质变化的研究甚少。我们利用 SDS-PAGE 不连续凝胶电泳技术, 分析和比较了不同发育时期花药、子房和胚的可溶性蛋白含量和电泳谱带变化, 试图寻找特异蛋白, 为进一步研究打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

小麦 (*Triticum aestivum* L.) 品种鄂麦1号种植于本校温室内。用正常发育的小麦中部小穗的花药进行压片观察, 以确定花药发育的不同时期。收集同一发育时期的花药, 同时, 收集与花药发育时期同步的子房。另取开花后5、7、10、20、30d 和成熟种子的子房, 于解剖镜下剥出胚珠; 置于 Olympus (CK30) 倒置显微镜下, 用自制的玻璃微针从胚珠中分离出完整的胚, 保存在-20℃ 备用。本实验重复取材3次, 实验结果基本一致。

根据花粉发育的6个时期收集花药, 时期 I: 花粉母细胞期; 时期 II: 减数分裂及四分体期; 时

期 III: 单核早期; 时期 IV: 单核晚期; 时期 V: 二核期; 时期 VI: 三核期。同时收集与上述花药6个发育时期同时的各期子房。为方便叙述, 文中以时期 I-VI 分别代表与花药发育同期的子房。

1.2 制样方法

收集的各期样品按照1:4的比例加入蛋白提取液 [0.5 mol L⁻¹ Tris-HCl (pH 6.8), 5% β-巯基乙醇], 转入1 mL 玻璃匀浆器中冰浴研磨; 离心 (12000 r/min in 20 min, 4℃) 后取上清液, 放入沸水浴中3~5 min, 最后置于-20℃ 备用。

1.3 蛋白质含量的测定

样品稀释100倍后, 用分光光度计 (PERKIN ELMER UV/VIS spectrometer Lambda Bio20) 测定 A₂₆₀ 和 A₂₈₀ 值, 根据蛋白质浓度与吸光值的关系计算出蛋白质含量^[6]。

关系式为: 蛋白质浓度 (mg/mL) = 1.45 A_{280nm} - 0.74 A_{260nm}

1.4 蛋白质的 SDS 不连续凝胶电泳

聚丙烯酰胺凝胶按 Laemmli^[7] 的方法配制, 胶厚1 mm, 分离胶浓度12%, 浓缩胶浓度5%, 电泳至指示剂前沿距胶下沿1 cm 左右。样品和标准蛋白 (上海丽珠东风生物技术有限公司) 分别按1:1的比例与样品缓冲液混合, 上样量为20 μL (蛋白质含量约150 μg/mL)。使用 DYY-4 型稳压稳流电泳仪,

* 基金项目: 国家自然科学基金项目资助 (30170091)

作者简介: 余万峰, 女, 1978年生, 湖北武汉人。武汉大学生命科学院2000级硕士研究生。

* 通讯作者

致谢: 作者感谢本研究室杨弘远教授审阅全文, 博士生邹建伟和杨军在实验和写作过程中给予热情指导, 郭荆哲同学协助图像处理工作。

Received on (收稿日期): 2001-10-12, Accepted on (接受日期): 2002-03-05

DYY-III26型垂直板电泳槽(北京六一仪器厂)。在恒压150V条件下,电泳9h。银染采用Blum^[8]的方法。染色后分别用扫描仪(MICROTEK, ARTIKSCAN TM 2500)和凝胶成像系统(BD-RAD, GelDoc2000)对凝胶进行图像分析。

2 结果和讨论

2.1 花药和子房发育过程中蛋白质含量比较

花药和子房发育过程中的蛋白含量在时期II均达到最高值,时期IV降到最低(图1)。无论是花药还是子房,蛋白质浓度在发育过程中有两个峰值,一次是从花粉母细胞经减数分裂到四分体时期,另一次则是单核晚期以后的有丝分裂期。这一结果与王林嵩^[3]在棉花花粉和Bedinger等^[9]在玉米花粉中的结果相似。

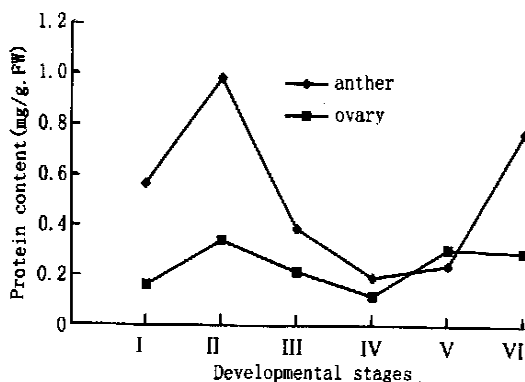


图1 小麦不同发育时期花药和子房的蛋白质含量变化
I. 花粉母细胞期 II. 减数分裂及四分体期 III. 单核早期 IV. 单核晚期 V. 二核期 VI. 三核期

Fig 1 Changes of protein content of anthers and ovaries at different developmental stages in wheat
I. pollen mother cell II. meiosis and tetrad III. early uninucleate pollen IV. late uninucleate pollen V. binucleate pollen VI. trinucleate pollen

2.2 花药、子房和胚中蛋白质电泳谱带变化

2.2.1 花药发育到二核期出现3种特异蛋白其分子量分别为40 kDa、27 kDa和20.7 kDa(图2),这些蛋白可能与萌发孔的成熟以及花粉内壁的形成有关^[10]。其他发育时期,32.3 kDa、31.4 kDa和8.4 kDa 3种蛋白虽均有表达,但在二核期和三核期的表达有明显优势。另外,9.1 kDa蛋白在减数分裂和四分体时期以及二核期都有较明显的表达,推测此种蛋白可能与启动细胞分裂有关,但还需进一步

证实。

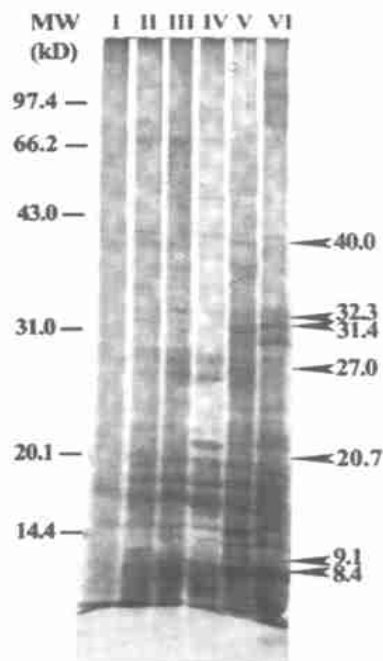


图2 小麦不同发育时期花药蛋白电泳谱带
I. 花药母细胞时期 II. 减数分裂及四分体时期 III. 单核早期 IV. 单核晚期 V. 二核期 VI. 三核期
Fig 2 Protein profiles of the anthers at different developmental stages in wheat
I. Pollen mother cell II. Meiosis and tetrad III. Early uninucleate pollen IV. Late uninucleate pollen V. Binucleate pollen VI. Trinucleate pollen

2.2.2 与花药相似,子房发育过程中蛋白质在时期V发生明显变化:在时期V和时期VI 99.9 kDa、87.3 kDa和75.5 kDa蛋白消失,而这3种蛋白在前几个时期均有明显的表达;6.2 kDa和5.5 kDa蛋白为时期V和时期VI的优势表达蛋白(图3)。时期V和时期VI的蛋白质也有差异:38.7 kDa蛋白是时期V的特异蛋白,71.0 kDa和5.2 kDa蛋白则分别是时期VI的特异蛋白和优势表达蛋白。44.5 kDa蛋白在时期II消失,在时期III和IV又重新出现。从蛋白质电泳图谱看,小麦子房发育过程中蛋白成分的变化与花药蛋白非常相似,说明小麦不同生殖器官的发育是相互关联的,可能存在某种调控雌、雄生殖器官发育的共同机制。

2.2.3 20d前后的胚蛋白组分变化较大(图4)优势表达蛋白:在第20d,第30d胚和成熟胚中的80.4 kDa,75.2 kDa,72.9 kDa,21.9 kDa和20.8 kDa蛋白;还有第20d胚中19.8 kDa蛋白和第30d胚中

的18.9 kDa 蛋白; 第30d 胚和成熟胚中有28.1 kDa 和22.9 kDa 蛋白。特异蛋白: 第30d 和成熟胚中的54.3 kDa、35.0 kDa 和17.1 kDa 蛋白; 29.8 kDa 蛋白只出现在第30d 胚中, 说明它可能是30d 胚的特异蛋白。

一般来说, 小麦胚的发育成熟过程中有很多 L EA (Late Embryo Abundant) 蛋白^[11]。文中很多胚蛋白在开花20d 后的胚中优势表达或特异表达, 这些是否是 L EA 蛋白, 还需进一步证实。

References

- [1] Fernando D D, Owens J N, Yu X, Ekramoddoullah A KM. RNA and protein synthesis in *in vitro* pollen germination and tube elongation in *Pinus monticola* and other conifers. *Sex Plant Reprod*, 2001, 13: 259~ 264
- [2] Lin M (林鸣), Cao Z-X (曹宗巽). The fibrat-specific proteins of cucumber. *Acta Bot Sin* (植物学报), 1996, 38: 148~ 149
- [3] Wang L-S (王林嵩), Pang G-C (庞广昌), Ma Q-X (马全祥). Study on isoenzyme and proteins during pollen development. *Acta Bot Boreal-Occident Sin* (西北植物学报), 1997, 17: 458~ 462
- [4] Tang J (汤健), Zhu G-L (朱广廉), Cao Z-X (曹宗巽). The specific prote

图3 小麦不同发育时期子房蛋白电泳谱带
I-VI期为与图2中花药发育各期同时的子房

Fig 3 Protein profiles of ovaries at different developmental stages in wheat
I-VI mean the ovary stages simultaneous with the anther stages as shown in Fig 2

镛 龙

图4 小麦不同发育时期胚蛋白电泳谱带

A. 开花后7d 胚 B. 开花后10d 胚 C. 开花后20d 胚 D. 开花后30d 胚 E. 成熟胚

Fig 4 Protein profiles of embryos at different developmental stages in wheat

A. Embryos of 7 days after anthesis B. Embryos of 10 days after anthesis C. Embryos of 20 days after anthesis D. Embryos of 30 days after anthesis E. Mature embryos