

研究  
简报

# 低能离子束介导大豆 DNA 的小麦雄性不育变异体蛋白水解酶分析

姬生栋<sup>1</sup> 秦广雍<sup>2</sup> 耿 颀<sup>1</sup> 夏 民<sup>1</sup> 朱晓鹏<sup>1</sup> 徐存拴<sup>1</sup> 霍裕平<sup>2\*</sup>

(<sup>1</sup>河南师范大学生命科学学院,河南新乡 453002; <sup>2</sup>郑州大学物理工程学院,河南郑州 450052)

## Analysis of Properties and Types of Proteinases in Wheat Male Sterility Variants with Soybean DNA Mediated by Low Energy Ion Beam

Ji Sheng-Dong<sup>1</sup> Qin Guang-Yong<sup>2</sup> Geng Sa<sup>1</sup> Xia Min<sup>1</sup> Zhu Xiao-Peng<sup>1</sup> Xu Cun-Shuan<sup>1</sup> Huo Yu-Ping<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang, Henan 453002; <sup>2</sup> Industrial Institute of Zhengzhou University, Zhengzhou Henan 450052, China)

离子束介导转基因技术<sup>[1,2]</sup>为远缘分子杂交育种开辟了一条新途径。近年来,这项技术引起了越来越多的育种工作者的关注和应用<sup>[3,4]</sup>,我们运用这项技术,将大豆 DNA 导入小麦,在当代就获得了一批性状优良的新株系<sup>[4]</sup>。通过对新材料的连续筛选,在第 3 代发现有个别材料分离出雄性不育变异株(见表 1)。我们利用复性电泳技术对雄性不育株和可育株的蛋白水解酶进行比较和分析。

酶是基因和性状的联接物,同工酶是从分子水平鉴别遗传变异或基因转移的一种有效手段,可作为基因表达的一种良好标志,有人通过分析转化植株同工酶谱,根据酶带缺失,酶活强弱等现象来验证直接导入的 DNA 引起调控代谢系统和基因表达的改变等的作用<sup>[5,6]</sup>。关于小麦雄性不育的发生与酶的作用已有一些报道,有人认为,细胞质不育系与其保

持系相比,在过氧化物酶谱和酶活等方面存在显著差异,并认为过氧化物酶的异常与雄性不育有关<sup>[7,8]</sup>。

蛋白水解酶在细胞的代谢过程中起重要作用,与蛋白质的降解、特异修饰等有关<sup>[9]</sup>,因此,研究介导大豆 DNA 片段的小麦第 3 代雄性不育植株的蛋白水解酶种类和性质,可为进一步研究低能离子辅助外源 DNA 片段转移至受体后,如何影响受体的基因表达及其调控的改变提供理论依据。

### 1 材料与方法

#### 1.1 材料

供试材料为离子束辅助大豆 DNA 转移至新麦 9 号的第 3 代小麦株系(见表 1),种植于河南省新乡市农业科学研究所小麦试验田。

表 1 远缘分子杂交小麦雄性不育变异体主要形态特征  
Table 1 Major characters of wheat male sterility variants

类型 Type	对照 a Control a	株系 b Strain b			株系 c Strain c			株系 d Strain d	
		b <sub>1</sub>	b <sub>2</sub>	b <sub>3</sub>	c <sub>1</sub>	c <sub>2</sub>	c <sub>3</sub>	d <sub>1</sub>	d <sub>2</sub>
株高 Plant high (cm)	69	49	67	67	75	50	50	68	68
熟期 (月/日) Mature stage (Month/Day)	6/2	6/7	6/2	6/3	6/2	6/3	6/2	6/2	6/4
雄性育性 Male fertile	F	S	F	S	F	S	F	S	F
二代株高 High of the second generation (cm)	68		67			51			67

注:a:对照;b、c、d:分别表示 3 个株系;1、2、3:表示 3 种变异体;F:可育;S:败育。下同。

Notes: a: Stands for control; b, c and d: three strain of wheat; 1, 2 and 3: three variants; F: fertile; S: sterility. The same below.

基金项目:国家“十五”科技攻关项目(2001BA302B-03),河南省“十五”重点科技攻关项目(0124020315)。

作者简介:姬生栋(1963-),男,河南焦作人,主要从事小麦育种及生理研究和教学工作。

Received(收稿日期):2002-11-04,Accepted(接受日期):2003-05-01.

1.2 方法

1.2.1 样品的采集与处理

在小麦灌浆后期,取小麦旗叶,迅速放入冰壶,带回实验室后放入液氮备用。制备电泳样品时,将叶片加石英砂在液氮中研磨,冰浴匀浆(样品提取液为0.9% NaCl溶液),然后4离心(10000 × g, 15 min),取上清液分装于Eppendorf管中,保存于-80备用。

1.2.2 蛋白质浓度测定及复性电泳

按Neuhoff等<sup>[10]</sup>的方法测定样品的蛋白质浓度。复性电泳技术(SDS-GPAGE明胶原位消化法)是一种电泳后仍可保持酶生物学活性,适用于研究各类酶分子量、性质和作用的方法<sup>[15]</sup>。复性电泳(SDS-GPAGE)方法按Neuhaus-Steinmetz等<sup>[11]</sup>略有改动,分离胶浓度为10%,浓缩胶浓度为5%,每个泳道加样品的总蛋白量为50 μg,电泳在4恒压进行。电泳后将胶板放入250 mL洗涤液中(TritonX-100 12 mL, Tris-base 3.03 g, 加双蒸水500 mL,调pH 7.0)洗涤30 min,然后再用单蒸水洗2次,双蒸水洗1次,每次5 min,洗涤后,将胶板放入孵育液(3.7 g Gly, 0.37g CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O,加入500 mL双蒸水)中洗涤5 min,而后置于新孵育液中,孵育液pH值分别为5.0、7.0、8.5、37 恒温箱孵育24 h,最后参照Laemmli方法<sup>[12]</sup>进行固定、染色、脱色、照相。

1.2.3 主要试剂

Acrylamide (USB)、Bisacrylamide (Fluka)、Gelatin (Sigma)、TEMED (Bio-Rad)、SDS (GbcO)、Tris-base (GbcO)、TritonX-100 (FARCO)等,均为分析纯及以上。

2 结果

2.1 pH 5.0 时蛋白水解酶种类和活性

由图1A和表2可以看出,对照a中共检到80、72、68、47 kD 4条酶带,其中47 kD活性极弱,72 kD蛋白水解酶活性较强。株系b中,可育株b<sub>2</sub>比a多检到一条110 kD酶带,且活性较弱,其他带型与a基本一致。在不育株b<sub>1</sub>中检到4条酶带,分别为47、68、72、110 kD,且活性均较弱,但47 kD酶活相对比a和b<sub>2</sub>的酶活强。另一不育株b<sub>3</sub>的带型与对照相似,仅47 kD酶活性比对照强,其他3条酶带活性均比对照弱。不育株b<sub>1</sub>和b<sub>3</sub>的总酶活均比可育株b<sub>2</sub>和a弱。

在株系c中,可育株c<sub>1</sub>检到5条酶带,比可育株c<sub>3</sub>多检到一条40 kD的弱带。不育株c<sub>2</sub>带型与c<sub>3</sub>相似,但47 kD酶带活性比c<sub>1</sub>和c<sub>3</sub>强,c<sub>2</sub>蛋白水解酶总酶活比c<sub>1</sub>和c<sub>3</sub>弱。

在株系d中,不育株d<sub>1</sub>检到4条酶带,带型与a相似,d<sub>1</sub>酶带活性比可育株d<sub>2</sub>稍强。可育株d<sub>2</sub>中检到68、72、80 kD 3条酶带。

2.2 pH 7.0 时蛋白水解酶种类和活性

在pH 7.0时,各株系变异体及对照蛋白水解酶谱变化见图1B和表2,对照a检到4条酶带,分别为68、72、80、95 kD,其中72 kD活性很强,95 kD活性很弱。株系b中,可育株

b<sub>2</sub>的带型与a相似,但95 kD酶活比a强。不育株b<sub>1</sub>中共检到4条酶带,分别为68、72、110和220 kD,其中110 kD酶带活性较强,220 kD活性极弱。不育株b<sub>3</sub>比b<sub>2</sub>多检出3条酶带,分别是47 kD(活性弱)、220 kD(活性很弱)和260 kD(活性很弱)。

株系c分离出3种类型变异体(表1),c<sub>1</sub>和c<sub>3</sub>均可育,与a相比,c<sub>1</sub>多检出47 kD一条酶带,c<sub>3</sub>多检出220和260 kD两条弱带。不育株c<sub>2</sub>带型与c<sub>3</sub>相似,但相对应的68、72和80 kD酶带活性均比c<sub>1</sub>和c<sub>3</sub>弱。

在株系d中,不育株d<sub>1</sub>共检出4条酶带,分别为68、72、80和95 kD,与可育株d<sub>2</sub>蛋白水解酶酶带相似,d<sub>1</sub>中68 kD酶活稍高于d<sub>2</sub>,d<sub>1</sub>总酶活比d<sub>2</sub>稍高。

2.3 pH 8.5 时蛋白水解酶种类和活性

从表2和图1C中可以看出,对照a共检到3条酶带,分别为68、72和80 kD,可育株b<sub>2</sub>比a多检到一条95 kD弱带。不育株b<sub>1</sub>仅检到两条酶带,72和95 kD,且活性较弱。不育株b<sub>3</sub>检到3条酶带,与a带型相似。不育株b<sub>1</sub>和b<sub>3</sub>的总酶活均比a和b<sub>2</sub>弱。

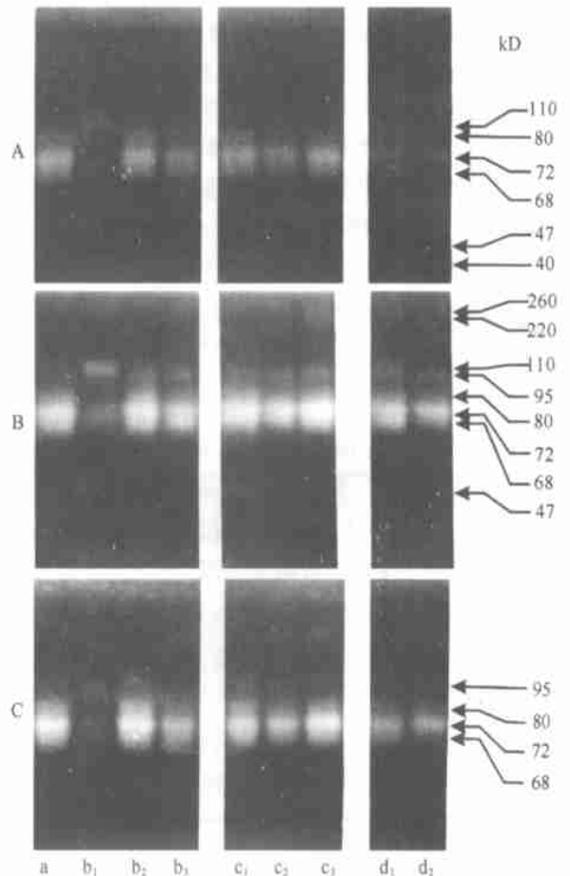


图1 不同pH条件下小麦雄性不育变异体叶片蛋白水解酶谱  
Fig.1 Zymograph of wheat leaves of male sterility variants under different pH  
A:pH 5.0; B:pH 7.0; C:pH 8.5

株系 c 中, 两种类型可育株  $c_1$  和  $c_3$  中均检测到 68、72 和 80 kD 3 条活性较强的酶带,  $c_1$  中多的检测到 1 条 95 kD 弱带。不育株  $c_2$  检测到的酶带与  $c_1$  相似, 但相对应的 68、80 和 95 kD 酶带酶活性  $c_2$  比  $c_1$  弱。

株系 d 中出现两种类型变异体, 可育株  $d_2$  检测到 68、72、80 和 95 kD 4 条酶带, 不育株  $d_1$  比  $d_2$  少检测到 1 条 95 kD 的弱带,  $d_1$  总酶活比  $d_2$  稍弱。

表 2 雄性不育小麦叶片蛋白水解酶的种类和活性

Table 2 Types and activity of proteinases in leaves of wheat male sterility variants

pH	分子质量 (MW) (kD)	对照(a)	株系 b Strain b			株系 c Strain c			株系 d Strain d	
		Control a	$b_1$	$b_2$	$b_3$	$c_1$	$c_2$	$c_3$	$d_1$	$d_2$
5.0	40					+				
	47	+	2+	+	2+	+	+	+	+	
	68	2+	+	2+	2+	2+	2+	2+	+	+
	72	3+	+	3+	2+	3+	3+	3+	2+	2+
	80	+		2+	+	+	+	+	+	+
	110		+	+						
7.0	47				+	+				
	68	3+	+	3+	3+	3+	2+	3+	2+	2+
	72	4+	+	4+	3+	4+	3+	4+	3+	3+
	80	2+		2+	+	2+	+	2+	+	+
	95	+		2+	+	+	+	+	+	+
	110		3+							
	220		+		+		+	+		
260				+		+	+			
8.5	68	3+		3+	+	3+	2+	3+	+	+
	72	4+	+	4+	2+	4+	4+	4+	2+	2+
	80	3+		3+	+	3+	+	3+	+	+
	95		+	+		+	+			+

注: 蛋白水解酶活性表示方法: + 活性弱 2+ 活性较弱 3+ 活性强 4+ 活性很强。

Notes: Indication of activity of proteinases + weak 2+ general 3+ strong 4+ stronger.

### 3 讨论

离子束介导外源 DNA 的小麦在第 3 代个别株系中分离出部分雄性不育变异体。它们与对照和同株系可育植株叶片的蛋白水解酶活性电泳图谱结果表明, 不育植株蛋白水解酶种类和性质与对照和同株系可育植株间存在明显差别。这种蛋白水解酶谱的差异与张花等<sup>[8]</sup>对雄性不育小麦过氧化物酶的研究结果类似, 他们对小麦 7 个同核异质不育系的 POD 酶谱进行了分析, 认为 POD 酶谱的差异是细胞质基因对过氧化物酶基因的表达有调控作用, 不育系过氧化物酶谱带的变化可能是雄性不育发生的原因之一。株系 b 和 c 的不育株变异体总酶活在 3 种 pH 值条件下, 均比对照和本株系可育株弱, 这一结果与马翎健等<sup>[13]</sup>报道的牡山羊草细胞质小麦核代换系的育性与其 SOD、CAT 的酶活性呈正相关的结论相一致。但是, 在株系 d 中, 不育株  $d_1$  在 pH 5.0 时, 它的总酶活却比可育株稍强, 而在 pH 8.5 时,  $d_2$  又比  $d_1$  的总酶活稍弱, 这说明单从某种 pH 条件下得到的蛋白水解酶活性强弱来解释可育株与不育株的关系并不确切。不同株系间及可育株与不育株间总酶活出现的这种差异, 有待进一步研究。不育株  $b_1$  检测到的 110 kD 蛋白水解酶带是所分析的几种不育变异体中  $b_1$  所独有的, 以及在 pH 5.0 时不育株  $b_1$  和

$b_3$  中检测到的 47 kD 酶带活性比可育株  $b_2$  强等, 对这些特殊蛋白水解酶的进一步研究, 将为揭示不育机理提供一定的理论依据。在株系 b、c、d 中, 不育株蛋白水解酶带型存在明显差别, 这可能是由于外源 DNA 片段随机进入受体所致。杨景成等<sup>[14]</sup>研究了外源 DNA 导入普通小麦的雄性不育变异, 认为外源 DNA 整合进受体基因组, 打破了受体原有的核苷酸顺序, 改变了其基因的表达和调控, 从而引起后代变异。从导入外源 DNA 的小麦株系第 3 代变异体的蛋白水解酶种类和性质看, 未导入外源 DNA 的对照株 a 与株系 b、c、d 的各个变异体蛋白水解酶种类和性质存在一定差异, 说明离子束介导外源 DNA 的第 3 代小麦变异体中可能仍保留着外源 DNA 片段, 即转入小麦中的外源 DNA 片段, 在第 3 代并未完全丢失、沉默。朱新产等<sup>[6]</sup>发现将大赖草 DNA 导入小麦, 其变异后代出现了 POD 等同功酶的差异酶带, 酶带缺失, 酶活改变, 认为是由于直接导入的 DNA 可能引起调控代谢系统的改变或调控基因的表达。株系 c 中, 在 pH 5.0 和 8.5 时, 变异株  $c_3$  与对照 a 的蛋白水解酶谱基本一致, 但在 pH 7.0 时变异株  $c_3$  比对照 a 多检测到了 260 和 220 kD 两条弱带, 这说明, 用蛋白水解酶分析小麦变异后代, 至少要在酸性、中性、碱性条件下各选择一个适宜 pH 值, 尽量避免因 pH 选点不广而造成分析误差。

## References

- [1] Yu Zengliang, Yang Jianbo, Wu Yuejin, Cheng Beijiu, He Jianjun, Huo Yuping. Transferring GUS gene into rice cells by low energy ion beam. In: Nuclear Instruments and Methods in Physics Research. B80/81. 1993. 1328—1331
- [2] Yang J-B(杨剑波), Wu L-J(吴李君), Wu J-D(吴家道), Wu Y-J(吴跃进), Yu Z-L(余增亮), Xu Z-H(许智宏). Transgenic Plant of Rice derived from Low Energy Ion beam. *Chinese Sci Bull*, (科学通报), 1994, 39(16): 1530—1534
- [3] Ji S-D(姬生栋), Li J-X(李吉学), Xu C-S(徐存栓), Qin G-Y(秦广雍), Huo Y-P(霍裕平), Zhao Z-W(赵宗武), Ma H-P(马华平). The Analysis of protein variation of wheat offsprings irradiated exogenous DNA from soybean. *Journal of Triciceae Crops* (麦类作物学报), 2001, 21(3): 18—21
- [4] Wu L-F(吴丽芳), Yu Z-L(余增亮) Distant molecular hybrid derived from soybean and wheat with ion implantation and variation Analysis. *Acta Agriculturae Nucleatae Sinica*(核农学报), 2000, (4): 206—211
- [5] Ji S-D(姬生栋), Li J-X(李吉学), Zhao J-J(赵俊杰), Xu C-S(徐存栓), Qin G-Y(秦广雍), Huo Y-P(霍裕平). The analysis of proteinase zymography of transgenic wheat leaves by irradiation of low energy. *Journal of Triciceae Crops* (麦类作物学报), 2001, 21(3): 5—8
- [6] Zhu X-C(朱新产), Liao X-R(廖祥儒), Fu Z-X(付增宪). An analysis of variation characteristics of the progenies derived from introducing leym us racem osus gene into common on wheat. *Acta Univ Agric Boreali Occidentalis*(西北农业大学学报), 2002, 28(1): 6—10
- [7] Qi Z-Z(祁忠占), Peng Y-K(彭永康). Comparative study of peroxidase isoenzyme of wheat male-sterile maintainer and restorer lines. *Acta Agriculturae Boreali Sinica*(华北农学报), 1988, 3(2): 1—5
- [8] Zhang H(张花), He Z-C(何之常), Xu N-Y(徐乃瑜). Study on the cation isoperoxidase of cytoplasmic male sterile wheat in heading stage. *J Wuhan Univ. (Natural Science Edition)* 武汉大学学报(自然科学版), 1995, 41(6): 719—723
- [9] Vassili J D. Pepper M S. Membran proteases in focus. *Nature*, 1994, 370: 14—15
- [10] Neuhoff V, Philipp K, Zimmer H G. A Simple. Versatile, sensitive and volume independent method for quantitative protein determination which is independent of other external influences. *Z Physiol. Chem*, 1979, 360: 1657—1670.
- [11] Neuhaus-Steinmetz U, Xu Cur-shuan, Fracella F. Heat shock response and cytotoxicity in C6 rat glioma cells: structure-activity relationship of different alcohols. *Mol Pharmacol*, 1994, 45: 36—41
- [12] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, 227: 680—685
- [13] Ma L-J(马翎健), Si M-R(司美茹), Song X-Y(宋喜悦), Hu Y-G(胡银钢), Xi Y-J(奚亚军), He B-R(何蓓如), Liu S-D(刘曙东). Relationship between microspore abortion and activities of Super-oxide Dismutase (SOD) and Catalase (CAT) of wheat nuclear substitutional lines in *Ae. juvenalis* cytoplasm. *Journal of Triciceae Crops* (麦类作物学报), 2001, 21(3): 35—37
- [14] Yang J-C(杨景成), Yu Y-J(于元杰), Liu F-Z(刘凤珍), Qi Y-F(齐延芳), Shen F-F(沈法富). Molecular Verification on male sterile mutant after injected exogenous DNA into wheat. *Acta Agriculturae Nucleatae Sinica*(核农学报), 2001, 14(6): 371—374
- [15] Heussen C, Dowdle E. B. Electrophoretic analysis of plasminogen activators in polyacrylamide gels containing sodium dodecylsulfate and copolymerized substrate. *Anal Biochem*, 1980, 102: 196—202

## 重要启事

2004年起本刊《作物学报》由双月刊改为月刊,96面/期,定价20元/期。特此敬告。