

等电聚焦电泳法测定羽衣甘蓝自交不亲和性的研究

张桂玲, 王超 (1. 临沂师范学院, 山东临沂 276005; 2. 东北农业大学, 黑龙江哈尔滨 150030)

摘要 利用聚丙烯酰胺凝胶等电聚焦电泳法, 研究了羽衣甘蓝强自交不亲和系、弱自交不亲和系与自交亲和系的柱头和花粉蛋白质谱带, 并进行自交, 以考察亲和指数。结果表明: 强自交不亲和系的成熟柱头(S) 和弱自交不亲和系的成熟柱头的蛋白谱带有明显差异; 强自交不亲和系有特异谱带的出现, 而弱自交不亲和系和自交亲和系柱头上没有特异谱带。对比自交不亲和系开花前2~3 d 的柱头(S) 与成熟柱头(S) 的蛋白质谱带发现了S 特异蛋白质的准确位置, 其等电点为8.5~9.1。此法可用于鉴定羽衣甘蓝的自交不亲和性。用同种方法处理花粉, 没有发现自交不亲和系的特征谱带。

关键词 羽衣甘蓝; 等电聚焦; 快速测定; 花粉—蛋白; 花柱—蛋白; 自交不亲和性

中图分类号 Q94-331 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2006)21-5461-02

Rapid Identification of Self-incompatibility of Cabbage with Isoelectric Focusing

ZHANG Gui-ling et al (Linyi Normal University, Linyi, Shandong 276005)

Abstract The technique of polyacrylamide gel isoelectric focusing was used to study the band patterns of protein in the stigma and pollen of 12 highly self-compatible lines of cabbage (*Brassica oleracea* L.). The compatibility indexes of the lines was studied by means of self-pollination in the flowering season. The protein band patterns of the stigma of the highly self-incompatible lines were shown to be difference from those of the partly self-incompatible lines and the self-compatible ones. The specific bands were only observed in the stigma of the highly-incompatible lines. Through the comparison of the band patterns of mature stigma and young stigma in 2~3 days before blooming, the specific bands related to self-incompatibility was located at the bands at PI 8.5~PI 9.1 and speculated to be the S locus specific glycoproteins. It was thus concluded that this procedure could be used to identify the self-incompatibility. When the pollen was treated with the same procedure the self-incompatibility could be identified. No specific bands were observed in self-incompatible lines.

Key words *Brassica oleracea* L.; Isoelectric focusing; Rapid determination; Pollen protein; Style protein; Self-incompatibility

羽衣甘蓝(*Brassica oleracea* L.) 自交不亲和性的测定一般采用田间花期人工自交法, 根据亲和指数判断亲和与否。此法费时费工, 测定周期长, 且由于自交授粉技术的差异和田间环境条件的影响, 测定结果往往偏低。自建立了用水溶性的苯胺蓝显示花柱中花粉管技术之后, 又形成了利用荧光染色法快速测定自交不亲和性的新方法。该法根据授粉后柱头上花粉萌发数量确定不亲和程度, 可在开花数天内测定自交不亲和性, 但其判断依据仍是人为划分的标准, 无法定性测定。大量研究表明, 羽衣甘蓝的自交不亲和机制与S 复等位基因编码的柱头S 蛋白有关。但花粉中S 基因产物的情况尚未见报道。笔者对羽衣甘蓝自交不亲和系及自交亲和系花粉和柱头蛋白质进行等电聚焦电泳, 考察其蛋白质谱带的差异性, 并以自交授粉的作对照, 探讨利用蛋白质特征的差异快速测定甘蓝自交不亲和性的可能性。

1 材料与方 法

1.1 供试材料 2001 年秋季, 以1 个稳定的羽衣甘蓝强自交不亲和系的12 个单株(A1~A12)、1 个不稳定的羽衣甘蓝弱自交不亲和系的12 个单株(B1~B12) 和1 个稳定的羽衣甘蓝自交亲和系的12 个单株为材料(C1~C12)(表1)。柱头材料: 切取开花前2~3 d 的柱头(S), 迅速放到-40℃冰柜中保存; 成熟非授粉柱头(S), 在开花前1 d 去雄套袋隔离, 24 h 后取样放到-40℃冰柜中保存。

1.2 样品制备法

1.2.1 样品缓冲液制备。 8 ml/L 尿素, 2% Titonx-100, 1% 巯基乙醇, 1% 溴酚蓝, 双蒸水。

1.2.2 柱头蛋白质提取。 称取柱头50 ng, 放入0.5 ml 的离心管中, 加入100 μl 样品缓冲液, 以尖端磨圆的细玻璃棒研磨成匀浆。

表1 供试材料与代号

材料	亲和指数	材料	亲和指数	材料	亲和指数
A1	0.4	B1	3.2	C1	17.2
A2	0.5	B2	2.8	C2	19.8
A3	0.5	B3	3.6	C3	17.5
A4	0.3	B4	2.5	C4	11.9
A5	0.1	B5	3.9	C5	12.7
A6	0.2	B6	2.1	C6	15.4
A7	0.7	B7	2.5	C7	10.8
A8	0.7	B8	3.1	C8	11.7
A9	0.8	B9	2.3	C9	13.5
A10	0.2	B10	4.6	C10	21.2
A11	0.3	B11	1.8	C11	19.0
A12	0.1	B12	4.0	C12	10.3

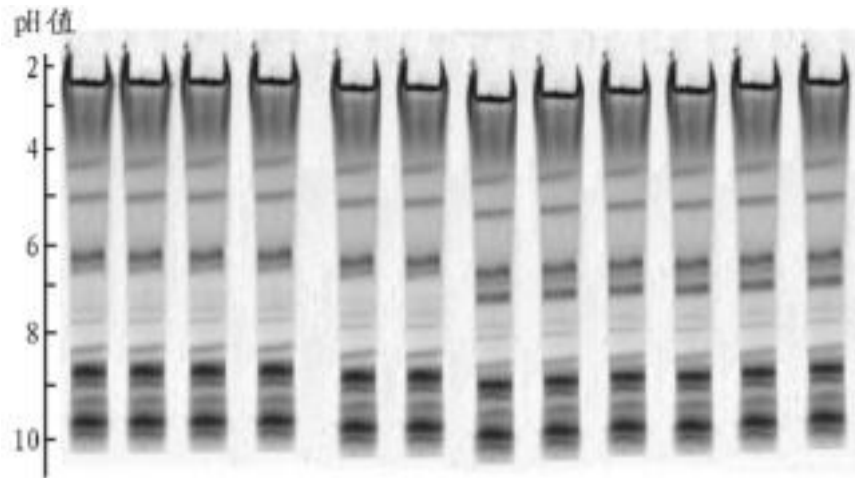
1.2.3 电泳法。 上述样品经15000 r/min 离心10 min, 取上清液参照郭尧君等的方法用加样纸加样。聚丙烯酰胺凝胶浓度7.5%, 两性电解质pH 值3.5~10, 胶板厚0.5 mm, EPS3500 型电泳仪和电泳槽, 用酸度计测定pH 值。

2 结果与分析

2.1 成熟柱头(S) 电泳图谱分析 强自交不亲和系材料(图1) A1~A6 电泳图谱完全相同, 在PI 4~PI 5.1 间有2 条弱带, 在PI 8.5~PI 10.5 间有2 条强带、4 条弱带; 材料A7~A12, 除了在PI 7.2 处多1 条强带以外, 其余均与前6 个材料谱带相同。从弱自交不亲和系(图2) 电泳图谱中可以看出, 材料B1~B5 除了在PI 8.9 处多1 条强带外, 其余均与强自交不亲和系材料A7~A12 谱带相同; 而材料B6~B12 除了在PI 8.9 处少1 条强带外, 其余均与强自交不亲和系材料A1~A6 谱带相同。从自交亲和系(图3) 电泳图谱中可以看出, 材料C6、C11、C12 的电泳图谱与弱自交不亲和系材料B6~B12 相同, 其余均与弱自交不亲和系材料B1~B5 相同。

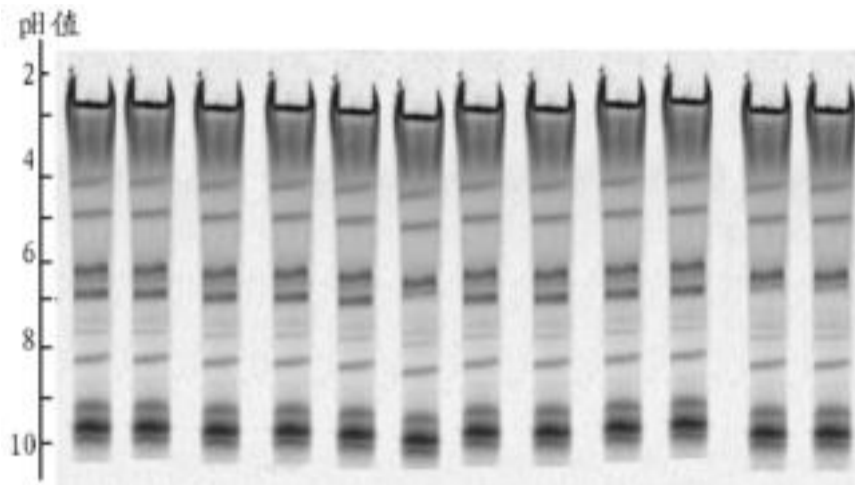
从以上分析可以看出, 强自交不亲和系与弱自交不亲和系、自交亲和系之间的不同在于, 强自交不亲和系材料A1~

A12 共有的谱带是 $\text{pI } 8.9$ 处的 1 条强带, 这是强自交不亲和系在蛋白质方面的表达, 而后两者没有此谱带。弱自交不亲和系没有表达此谱带, 很可能是 S 糖蛋白合成速度和表达含量不同造成的。



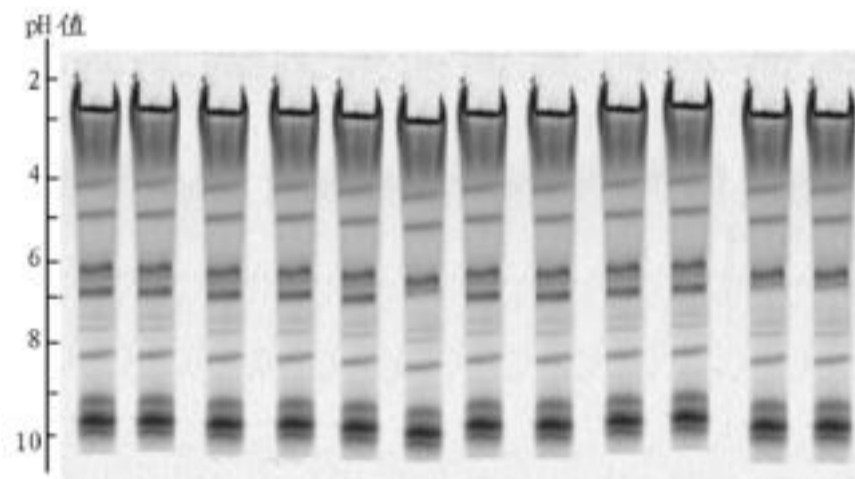
注: 从左至右依次为 A1 ~ A12。

图1 强自交不亲和系成熟柱头的电泳图谱(S)



注: 从左至右依次为 B1 ~ B12。

图2 弱自交不亲和系成熟柱头的电泳图谱(S)



注: 从左至右依次为 C1 ~ C12。

图3 自交亲和系成熟柱头的电泳图谱(S)

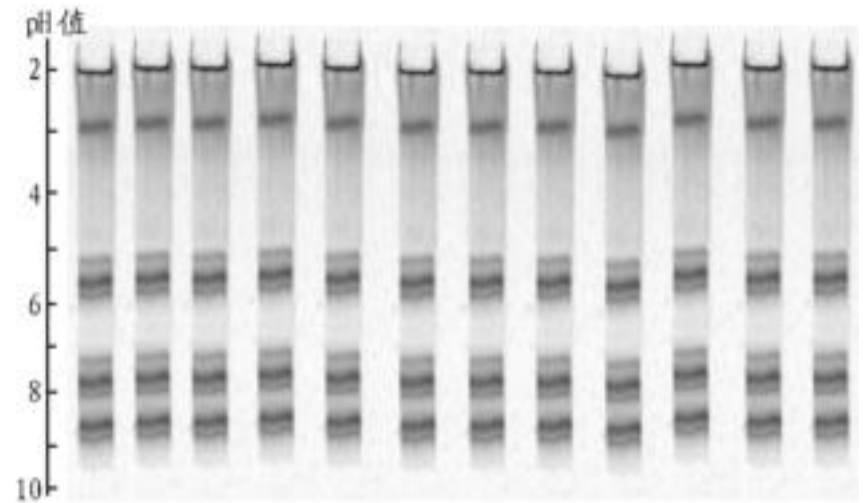
2.2 开花前 2 ~ 3 d 的非成熟柱头(S) 电泳图谱分析 强自交不亲和系材料(图 4) A1 ~ A12 谱带完全相同, 同时与弱自交不亲和系材料 B1 ~ B12(图 5) 之间无差异, 均在 $\text{pI } 3.3$ 、 $\text{pI } 6.0$ 、 $\text{pI } 8.0$ 、 $\text{pI } 9.0$ 处有 1 条强带, 在 $\text{pI } 5.9$ 、 $\text{pI } 8.4$ 、 $\text{pI } 9.3$ 处各有 1 条弱带; 而自交亲和系材料(图 6) 在 $\text{pI } 4.0$ 、 $\text{pI } 6.5$ 、 $\text{pI } 9.0$ 、 $\text{pI } 9.9$ 各有 1 条强带, 在 $\text{pI } 7.0$ 、 $\text{pI } 9.1$ 、 $\text{pI } 10.0$ 处各有 1 条弱带, 这与强自交不亲和系谱带的等电点有所不同。

从非成熟柱头的电泳谱带中可以看出, 强自交不亲和系与弱自交不亲和系之间无明显的差异, 而与自交亲和系材料的谱带之间等电点有所不同, 同时在 $\text{pI } 4.2$ 处多了 1 条弱带。

3 小结与讨论

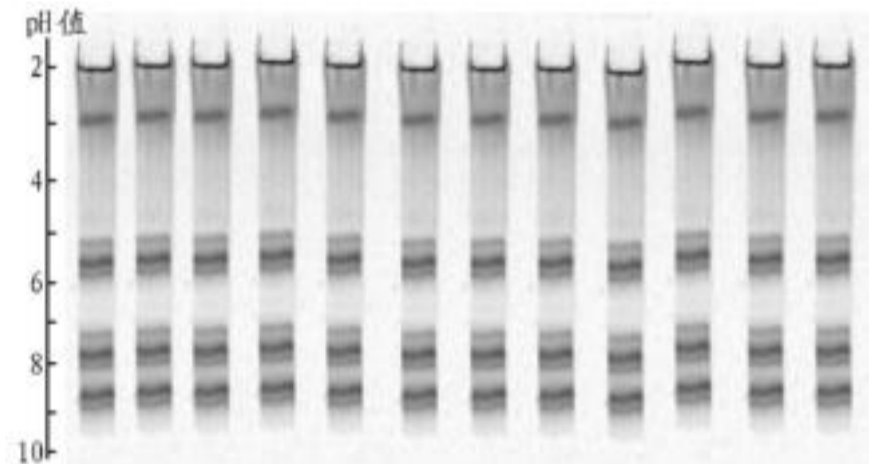
许多研究表明, 柱头 S 特异蛋白质是水溶性蛋白质, 在不同的基因型中表现出复杂的多态性。分析 S 复等位基因

的类型可知, 甘蓝 S 复等位基因一般分为 2 类: 型基因活性很高, 自交不亲和性稳定; 型活性很低, 自交不亲和性表现很弱。该试验选取的强自交不亲和系经多代选育性状稳定, 说明这些材料的 S 基因属于 型。而 型基因的 DNA 序列同源性超过 90%, 故 S 特异谱带比较集中, 该试验结果表明, S 蛋白质的 pI 为 $8.9 \sim 9.1$ 。Nshio 和 Hrata 检测的 S 特异蛋白质的等电点为 $7.5 \sim 9.0$, Gaude 等分离得到的与 S 基因有关的蛋白质, 发现其等电点在 pH 值 $6.6 \sim 8.3$ 的区域内, 这与该试验结果有所不同。Nasrallah 研究证实了开花前 2 ~ 3 d 的柱头 S 基因活性较低。Hrata 和 Nasrallah 等研究表明, S 蛋白质在柱头中的积累量与柱头的不亲和性一致。



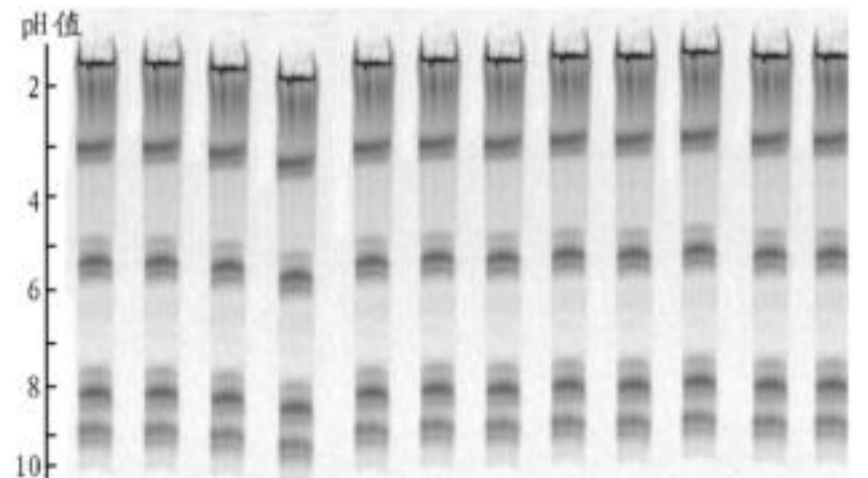
注: 从左至右依次为 A1 ~ A12。

图4 强自交不亲和系非成熟柱头的电泳图谱(S)



注: 从左至右依次为 B1 ~ B12

图5 弱自交不亲和系非成熟柱头的电泳图谱(S)



注: 从左至右依次为 C1 ~ C12。

图6 自交亲和系非成熟柱头的电泳图谱(S)

利用等电聚焦电泳法观察羽衣甘蓝成熟柱头的电泳图谱, 强自交不亲和系在 $\text{pI } 8.5 \sim 9.1$ 处有 1 条谱带, 而弱自交不亲和系和自交亲和系则没有此带, 根据特异谱带的有无可以鉴定羽衣甘蓝强自交不亲和系。

(下转第 5464 页)

(上接第5462页)

参考文献

- [1] 王小佳, 裴炎, 杨光伟, 等. 甘蓝自交不亲和系、自交系花粉、柱头蛋白质的等电聚焦电泳和游离氨基酸分析[J]. 园艺学报, 1991, 18(1): 91 - 93.
- [2] NASRALLAHJ B, KAOTH, CHENC H, et al. Amino acid sequence of glycoproteins encoded by three alleles of the S locus of *Brassica Oeracea* [J]. *Nature*, 1987, 326: 617 - 619.
- [3] NASRALLAHJ B, YUS M, NASRALLAH ME. Self-incompatibility genes of *Brassica Oeracea*. expression, isolation and structure [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1988, 85: 551 - 555.
- [4] HNATA K, NSHOT. Signa proteins in self-incompatible *Brassica campestris* L. and self-incompatible relatives, with special reference to S allele specificity [J]. *Jpn J Genet*, 1978, 53: 27 - 33.
- [5] NASRALLAHJ B, DONEY R C, NASRALLAH ME. Biosynthesis of glycoproteins involved in the pollen-stigma interaction of incompatibility in developing flowers of *Brassica Oeracea* L [J]. *Parta*, 1985, 165: 100 - 107.