

沙田柚自交、异交花粉管蛋白双向电泳分析

秦新民, 李惠敏, 薛妙男, 杨继华

(广西师范大学生命科学学院, 广西桂林 541004)

摘要: 比较分析了沙田柚自交、异交花粉管蛋白的双向电泳图谱, 两者的蛋白分布格局相似, 具有重叠性, 可分辨出 200 多个蛋白点。在异交花粉管电泳图谱中发现了 1 种特异蛋白(A), A 蛋白($M_rA=58.2$, $pI=5.9$); 在自交花粉管电泳图谱中发现了 2 种特异蛋白(B、C), B 蛋白($M_rB=26.4$, $pI=6.1$), C 蛋白($M_rC=28.0$, $pI=6.3$), 这些蛋白可能与自交不亲和有关。

关键词: 沙田柚; 花粉管蛋白; 双向电泳

中图分类号: Q946.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2004)06-0566-04

Two-dimensional electrophoresis of self and non-self pollinated pollen tube proteins of *Shatinyu*

QIN Xin-min, LI Hui-min, XUE Miao-nan, YANG Ji-hua

(College of Life Science, Guangxi Normal University, Guilin 541004, China)

Abstract: Two-dimensional electrophoresis of self and non-self pollinated pollen tube proteins of *Shatinyu* were compared and analyzed. Their proteins distribution were similar and showed overlapping. More than 200 spots were differentiated on the gel. A special protein was detected in non-self pollinated pollen tube electrophoresis, its molecular weight was 58.2 ku and pI was 5.9. Two special proteins were detected in self-pollinated pollen tube electrophoresis. Their molecular weights were 28.0 ku and 26.4 ku, respectively. Their pIs were 6.3 and 6.1. These proteins maybe interrelate to self-incompatibility of *Shatinyu*.

Key words: *Shatinyu*; pollen tube protein; two-dimensional electrophoresis

对沙田柚自交不亲和性的细胞学基础和生化基础的一系列研究(薛妙男等, 1995, 1996, 2001b), 不但确定了沙田柚为配子体自交不亲和型, 花粉管在花柱中的生长途径以及花粉管在花柱的 1/2 部位生长受阻; 而且采用亲和层析和电泳相结合的方法, 分离纯化了沙田柚花柱特异糖蛋白, 并对其生物学活性及生化性质进行了分析; 该蛋白为碱性糖蛋白, 糖含量为 9.2%; 由 2 个亚基组成, 相对分子量分别为 38.0 ku、32.0 ku; 等电点分别为 7.5 和 7.2; 生物活性测定的结果表明, 该蛋白能抑制自花花粉离体萌

发的花粉管伸长; 氨基酸序列分析表明, 32.0 ku 组分 N-端 15 个氨基酸序列与矮牵牛、花烟草等的花柱特异糖蛋白 N-端相应序列极为相似(杨继华等, 2001)。同时, 还用免疫胶体金标技术对花柱 S-糖蛋白进行了组织化学定位(薛妙男等, 2001a)。至此, 沙田柚配子体自交不亲和性在雌蕊方面已取得了较大进展。但沙田柚配子体自交不亲和性在雄蕊(花粉)方面的研究进展不大。本文将通过研究花粉管自交、异交条件下蛋白的差异, 为沙田柚配子体自交不亲和性研究提供一些新的实验证据, 为最终分

收稿日期: 2004-02-17 修订日期: 2004-04-20

基金项目: 国家自然科学基金(30160007); 教育部西部地区高等学校高级访问学者资助项目。

作者简介: 秦新民(1956-), 男, 广西灵川人, 博士, 研究员, 从事植物分子生物学研究。

离、鉴定其雄蕊 S-糖蛋白和探讨沙田柚配子体自交不亲和性的机理打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

沙田柚实验材料采自桂林市雁山文家村果园。在盛花期收集其花药干燥后保存于 -70°C 备用;同时进行人工自交(沙 \times 沙)、异交(酸 \times 沙)授粉,3 d 后收集自交、异交授粉花柱,截取花柱 1/2 部位上下 3 mm 分存于 -70°C 备用。

1.2 方法

1.2.1 花粉管的培养与收集 花柱识别蛋白的制备参照杨继华等(2000)和张绍铃等(2000)的方法进行:取沙田柚自交、异交后 1/2 花柱段,加 0.1 mol/L 的 Tris-HCl 蛋白提取缓冲液(含 10 mmol/L NaCl, 10 mmol/L EDTA-2 Na, 1 mmol/L CaCl_2 , 1 mmol/L DTT, 1 mmol/L PMSF, pH7.8), 冰浴研磨提取, 12 000 rpm 冰冻离心 15 min, 取上清液, 用 35% 饱和度的 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 盐析, 盐析得到的沉淀用双蒸水透析 2 d 后, PEG 6 000 浓缩, 然后用含 12% 蔗糖的 BKS 培养液(含 0.02% 硫酸镁, 0.01% 硝酸钾, 0.03% 硝酸钙, 0.01% 硼酸, pH5.6)(Brewbaker 等, 1963)溶解成浓度 2 mg/mL, 置于 -70°C 备用。

将低温保存的沙田柚花粉于室温(25°C)快速解冻过夜, 撒播在含 12% 蔗糖的 BKS 培养液中, 置于生化培养箱 27°C 暗培养 2 h 后加入自交、异交花柱蛋白提取物, 并使其终浓度达到 0.2 mg/mL, 继续培养 6 h, 过滤收集萌发花粉(带花粉管)。

1.2.2 花粉管蛋白的提取 取 20 mL 离心管, 按 500 mg 萌发花粉加入 5 mL 0.1 mol/L 的 Tris-HCl 蛋白提取缓冲液, 离心管置于冰浴中, 用 JY98-III 型超声波细胞粉碎机(宁波新芝科学仪器厂), 按功率 600 W, 超声时间为 3 s/次, 间歇时间 6 s/次, 共进行 120 次的一组参数进行破碎花粉管。样液于 4°C 静置抽提 2 h, 然后在 4°C , 12 000 rpm 条件下离心 30 min, 取上清, 在双蒸水中进行透析过夜, 次日 PEG 6000 浓缩到原提取液体积的 1/5 后分装 EP 管, 100 μL /管, 存放于 -70°C 备用。

1.2.3 双向电泳 采用 IEF/SDS-PAGE 双向电泳, 参照 O'Farrell(1975)、何瑞锋等(2000)和谷瑞升等(1999)方法, 略有改动。

样品处理: 低温保存的花粉管蛋白提取液, 室温

解冻后, 加入 5 倍体积 -20°C 预冷的丙酮(含 0.07% 巯基乙醇), -20°C 放置过夜, 次日在 4°C , 12 000 rpm 条件下离心 20 min, 弃上清, 再将沉淀悬浮于同样的冷丙酮, -20°C 放置 1 h, 同样条件下离心去丙酮后将沉淀干燥成粉, 用 5 倍样品鲜重的样品裂解液(9 mol/L 尿素, 2% NP-40, 2% 载体两性电解质 pH3~9.5, 2% DTT)充分溶解沉淀蛋白。上样前于 10 000 rpm 离心 5 min。

第一向等电聚焦(IEF): 采用自制电泳装置, 取内径 2 mm, 长 10 mm 的双通玻璃管 6~8 根。凝胶浓度 $T=4\%$, 载体两性电解质 pH 范围 3~9.5(北京解放军军事医学科学院产品)。电极液为: 上槽(负极)0.02 mol/L NaOH, 下槽(正极)0.01 mol/L H_3PO_4 ; 预电泳: 每管加 20 μL 样品裂解液, 依次进行 200V 10 min, 300V 30 min, 400V 30 min 的预电泳。预电泳结束, 每管上样 15 μL (其中有两管为空白对照, 用来测 pH 值), 在室温下, 按 400V 1 h, 600V 12 h, 800V 1 h 的程序进行聚焦电泳。

取胶、测 pH 值: 聚焦结束后, 将要测定 pH 值的空白胶条按每段 1 cm 长等分为若干段捣碎, 按顺序放入小离心管, 各加 1 mL 双蒸水, 密封 12 h, 用精密 pH 计测定各段 pH 值, 然后绘制 pH 梯度曲线, 根据蛋白组分聚焦部位距胶条正极端实际长度确定其 pI 值。

第二向 SDS-PAGE: 对于要进行第二向 SDS-PAGE 电泳的胶条, 放入平衡液(0.06 mol/L Tris-HCl, pH6.8, 10% 甘油, 5% 巯基乙醇, 2% SDS, 0.001% 溴酚蓝)平衡 20 min。第二向采用垂直平板电泳装置, 凝胶大小为 13 cm \times 11 cm \times 0.1 cm, 浓缩胶 4%, 分离胶 10%, 制备浓缩胶时在一端插入单孔梳, 以便加入标准蛋白。待胶聚合好后, 将平衡后的胶条对半切开以便于平放在浓缩胶顶部并用 1% 琼脂糖封胶, 单孔处加入 20 μL 的标准蛋白样品(上海西巴斯生技公司产品, 分子量范围为 14.4~97.4 ku); 电极缓冲液系统为 Tris-甘氨酸(pH8.3), 含 0.1% SDS, 恒压 150V 至电泳结束。

电泳结束后, 剥下胶板进行银染。银染步骤: 凝胶板于固定液 I (40% 甲醇, 10% 乙酸) 固定 30 min; 在固定液 II (10% 乙醇, 5% 乙酸) 固定 2 次, 每次 15 min; 然后于氧化液 (0.1% 重铬酸钾, 0.02% HNO_3) 氧化 5 min; 双蒸水洗 2 次, 每次 5 min; 再于硝酸银溶液 (0.2% AgNO_3) 中反应 20 min; 双蒸水洗 1 min; 最后于显影液 (2.536% 无水 Na_2CO_3 , 临

用前加入 50 μL 37% 甲醛/100 mL 溶液) 振荡显影至出现清晰蛋白斑点后用 12% 乙酸进行定影。

2 结果

自交、异交花粉管蛋白经双向电泳后, 从图 1: a、b 可以看出, 进行高灵敏度的银染后的自交、异交花粉管全蛋白双向电泳图谱, 具有较高的分辨率, 两者的格局基本一致, 具有重叠性, 可以分辨出 200 多个蛋白点。对双向电泳图谱的蛋白分布情况分析发现: 这些蛋白主要分布在 pH 4.5~7.6 之间; 从不同分子量蛋白分布来看, 主要分布在 43.0~20.0 ku 的范围内, 而 97.4~66.2 ku 范围内的蛋白较少。自交、异交花粉管蛋白的分布格局一样, 在各 pH 和

不同分子量范围内的分布几乎无差异。考虑到已知花柱与自交不亲和有关的蛋白处于 pI 范围 5.0~7.5 之间, 在多次的重复实验中主要考察该范围内自交、异交条件下的蛋白点的变化或差异情况, 则发现自交花粉管在 20.1~31.0 ku 范围内出现 2 个与异交花粉管不同的点(箭头所示 B、C), 而异交花粉管在 66.2~43.0 ku 范围内出现一个不同点(箭头所示 A)。根据标准蛋白, 采用复日 Smart View 2001 凝胶电泳分析软件进行分子量计算, 同时在等电聚焦后作出的 pH 梯度曲线上找到相对应分子量蛋白的 pI 值。结果显示, A 蛋白的相对分子量 Mr 为 58.2 ku, 等电点 pI 为 5.9; B 蛋白的相对分子量 Mr 为 26.4 ku, 等电点 pI 为 6.1; C 蛋白的相对分子量 Mr 为 28.0 ku, 等电点 pI 为 6.3。

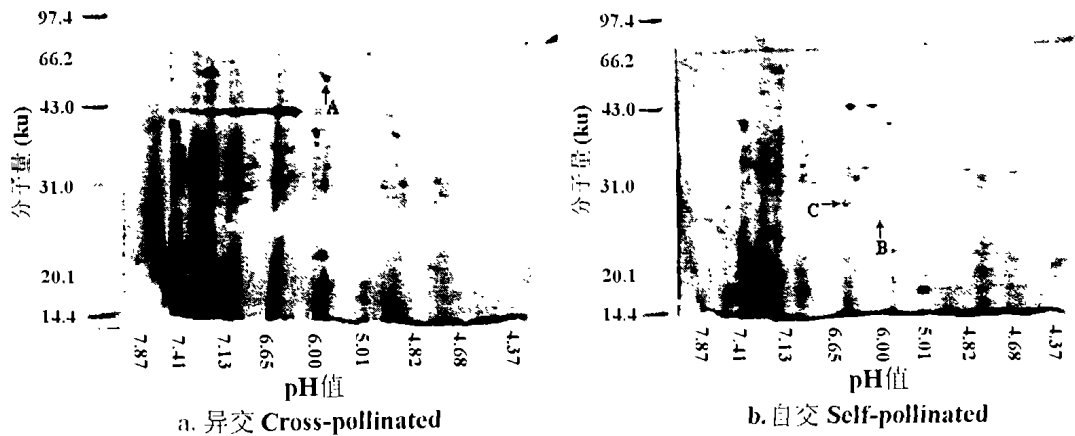


图 1 花粉管双向电泳图谱

Fig. 1 Two-dimensional electrophoresis pattern of proteins from pollen tube

3 讨论

本实验参照薛妙男等(2000)分析沙田柚花柱特异蛋白和 Floyd 等(2000)对烟草(*Nicotiana tabacum*)花粉管进行特异蛋白的研究方法, 采用双向电泳结合高灵敏度的银染技术, 通过对自交、异交条件下的花粉管蛋白格局进行了比较分析, 发现自交、异交条件下的花粉管蛋白格局相似, 但在自交图谱上, 有两个蛋白点(相对分子量分别为 26.4 ku 和 28.0 ku, 等电点分别为 6.1 和 6.3)在已知花柱与自交不亲和相关的特异蛋白所处分子量范围内(pI 5.0~7.5, Mr 22~32 ku); 而异交条件下只有一个(Mr 为 58.2, pI 为 5.9)不同于自交条件下的蛋白点, 但

该点不在已知花柱与自交不亲和相关的特异蛋白所处分子量范围内(pI 5.0~7.5, Mr 22~32 ku)。

在配子体自交不亲和系统中, 花粉自交不亲和因子一般认为是存于花粉管(细胞质)或花粉内壁, 但具体在哪个位置至今仍不清楚。虽然已有实验证据证明沙田柚自交花柱 S-糖蛋白特异性地抑制自花花粉管生长, 但花柱 S-糖蛋白抑制花粉管生长的机理仍未清楚: 究竟是 S-糖蛋白的 RNase 活性降解了花粉管内的 RNA 还是 S-糖蛋白与花粉管内某一物质发生相互作用以导致花粉管生长受到阻抑? 要解决该问题关键是鉴别出花粉(管)中识别因子。Kao 和 McCubbin(1996)就 S-糖蛋白抑制花粉管伸长的过程提出了两种模型: 一是“受体”模型, 即花柱 S-糖蛋白有选择地进入带有与自己相同 S 基因型的

花粉管,并在其中降解其 RNA 而抑制花粉管继续伸长;二是“核酸酶抑制剂”模型,认为在花粉管内花粉 S 基因编码一种特异的核酸酶活性抑制剂,该抑制剂抑制所有除自己的等位基因编码的 S-核酸酶外的其他各种核酸酶的活性。该模型下花柱 S-糖蛋白无选择性地进入花粉管,在其进入带有不同 S 基因型的花粉管时,其 RNase 的活性将受到高度专一性抑制物质抑制,花粉管继续生长,而在进入带有相同 S 基因型的花粉管时,并不受到抑制剂抑制其 RNase 的活性,花粉管伸长受到抑制。由于在一定 S-糖蛋白浓度范围内,离体花粉管的长度与其呈直线负相关,而高浓度的 S-糖蛋白也可能因物理、化学的作用而产生一些带毒性的物质抑制花粉管的生长,这与经加热处理过的花烟草 S-糖蛋白已经不具有 S-RNase 的活性但仍能抑制其花粉管的伸长的现象相同(Gray 等,1991)。因此,目前仍缺乏 S-糖蛋白直接抑制花粉管生长的证据。对于这两种截然不同的关于配子体自交不亲和的模型假说,只有分离和鉴定出花粉(管)中的 S-糖蛋白才能对它们作出正确的判断。

考虑到现有的关于配子体自交不亲和的两种模型学说,我们的结果从一个方面支持了“核酸酶抑制剂”模型。也就是说,沙田柚花柱 S-糖蛋白无选择性地进入花粉管,在其进入带有不同 S 基因型(即异交条件下)的花粉管时,受到了高度专一性抑制物质(本实验结果中的 A 蛋白可能是这种抑制剂)抑制其 RNase 的活性,导致 RNase 的抑制作用失活,因此花粉管继续生长;而在进入带有相同 S 基因型(即自交条件下)的花粉管时,花粉管内花粉 S 基因编码的核酸酶活性抑制剂(本实验中鉴别到的 B、C 蛋白可能是这类抑制剂)并不抑制其 RNase 的活性, RNase 仍可以发挥其降解 RNA 的作用,花粉管伸长也因此受到抑制。然而由于至今仍没有实验能准确鉴定出配子体型自交不亲和系统中花粉相关蛋白,因此也就缺少关于花粉自交不亲和和识别因子理化性质的实验数据。有资料表明,花柱中 S 基因不能在花粉中表达(Clark 等,1994),并且花粉中 S-RNase 活性非常低。这都意味着花粉中 S 基因产物与花柱中 S 基因产物虽然存在着结构上的互补关系,但却是显然不同的。因此,至于本实验检测到的这些蛋白是否是沙田柚配子体自交不亲和性有关的特异蛋白,是否是“核酸酶抑制剂”模型的有力证据还有待对这些蛋白的理化性质、空间结构等作细

致而深入的分析实验来验证。

本实验得到南京大学医药生物技术国家重点实验室华子春教授的指导,特此致谢。

参考文献:

- Brewbaker JL, Kwack BH. 1963. The essential role of calcium in pollen germination and pollen tube growth[J]. *Am J Bot*, **50**: 859—865.
- Clark KR, Thomas LS. 1994. The S-ribonuclease gene of *Peunia hybrida* is expressed in nonstylar tissue, including immature anther[J]. *Plant Physiol*, **106**: 25—36.
- Floyd RA, Bart K, Jan Derksen, et al. 2000. The pollen-specific gene Ntp303 encode a 69-kDa glycoprotein associated with the vegetative membranes and the cell wall[J]. *Sex Plant Reprod*, **12**: 276—284.
- Gray JE, McClure BA, Boning I, et al. 1991. Action of the style product of the self-incompatibility gene of *Nicotiana glauca* (S-RNase) on in vitro grown pollen tubes[J]. *The Plant Cell*, **3**: 271—283.
- Gu RS(谷瑞升), Liu QL(刘群录), Chen XM(陈雪梅), et al. 1999. An improved method of 2D-electrophoresis for protein analysis of woody plants(一种省时高效的木本植物蛋白双向电泳分析方法)[J]. *J Beijing Forest Univ*(北京林业大学学报), **21**(5): 7—10.
- He RF(何瑞锋), Ding Y(丁毅), Zhang JF(张剑锋), et al. 2000. Improvement in the two-dimensional electrophoresis of protein from the leaves of plant(植物叶片蛋白质双向电泳技术的改进与优化)[J]. *Hereditas*(遗传), **22**(5): 319—321.
- Kao TH, McCubbin AG. 1996. How flowering plants discriminate between self and non-self pollen to prevent inbreeding[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, **93**: 12 059—12 065.
- O'Farrell PH. 1975. High resolution of two-dimensional electrophoresis of proteins[J]. *J Bio Chem*, **250**(10): 4 007—4 021.
- Xue MN(薛妙男), Chen TT(陈腾士), Yang JH(杨继华). 1995. Observation on self and cross-compatibility in *Shatinyu*(沙田柚自交和异交亲和性观察)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), **22**(2): 127—132.
- Xue MN(薛妙男), Li YP(李义平), Zhang XH(张杏辉), et al. 2001a. Immune-gold localization of recognition protein in the self-pollination style of *Shatinyu*(沙田柚自交花柱中识别蛋白的免疫金定位)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), **28**(1): 59—61.
- Xue MN(薛妙男), Yang JH(杨继华). 2000. Two-dimensional electrophoresis of self-and cross-pollinated style proteins of *Shatinyu*(沙田柚自交、异交花柱蛋白质的双向电泳)[J]. *J Guangxi Normal Univ(natural science edition)*(广西师范大学学报(自然科学版)), **18**(3): 83—85.
- Xue MN(薛妙男), Yang JH(杨继华). 2001b. The growth way of pollen tubes in the style of *Shatinyu* and its discernment(沙田柚花粉管在花柱中的生长途径及其识别)[J]. *J* (下转第 523 页 Continue on page 523)

大陆北半球上最大的野生草本观赏花卉种质资源库。对观赏价值较高的种类,统一由资源库中调出,并实行严格的“三证制度”:即采集者需有采集证,收购者需有收购证,外销部门需有外销证。通过立法及行政措施确定野生草本观赏花卉资源库的所有权、使用权,使其成为温带地区开展野生花卉引种、驯化、家植的中心。

5.2 注重珍稀物种的就地保护和迁地保护

通过扩大自然保护区的范围,建立一套完整的技术档案,不断加强珍稀物种的就地保护和迁地保护工作力度,对于那些抗逆性强,生态幅度宽的种类可利用植物园繁育中心进行迁地保护;对于远离保护区,分布区域十分狭窄人工繁殖不易成活的种类,可由地方的林业、环保、农业等部门的协调建立小型专种的自然保护区,同时还要以《森林法》、《动植物保护法》为依据,加大打击那些直接或间接破坏野生草本观赏花卉的力度,妥善地保护好野生遗传资源。

5.3 做好野生草本观赏花卉的引种驯化工作

通过对野生草本观赏花卉的生态、生殖等方面的研究,积极做好引种驯化工作,明确野生花卉的引种方向、对象、种类。通过采用杂交、多倍体、辐射等多种育种手段,培育出花大、色艳、味美、观赏价值高、适应性强的园艺新品种,筛选出适合露地栽培、建立花坛、以及家庭盆栽等的种质资源,并结合生物技术进行试管快繁,将种质资源在短期内转化为商品,从而丰富温带地区观赏植物的种类,创造出更多的独具地方特色的景观。

本调查的植物照片均存于中科院植物研究所植物图像库。在野外调查的过程中,得到了中科院植物所徐克学研究员,长白山国家级自然保护区科研中心刘军主任,博物馆刘利副馆长的大力支持和帮助,中科院植物研究所的陈之端研究员给本文进行了修改,谨此致谢。

参考文献:

- 李建东, 吴榜华, 盛连喜. 2001. 吉林植被[M]. 长春: 吉林省科学技术出版社, 61—396.
- 傅立国. 1992. 中国植物红皮书—稀有濒危植物(第一册)[M]. 北京: 科学出版社, 1—736.
- Wu ZY(吴征镒). 1991. The areal-types of Chinese genera of seed plants(中国种子植物属的分布区类型)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), (增刊 IV): 1—135.
- Zhou Y(周 繇). 2003a. The wild aquatic flower resource in Changbai Mountains(长白山野生水生花卉资源)[J]. *Chinese Society of Landscape architecture*(中国园林), 19(89): 59—62.
- Zhou Y(周 繇). 2003b. Wild potted plant resources in Changbai Mountains(长白山区野生盆景植物资源)[J]. *Forestry science & technology*(林业科技), 29(4): 52—54.
- Zhou Y(周 繇). 2004a. Study on the climbers planting plants resources in Changbai Mountains(长白山区野生攀缘绿化植物资源的研究)[J]. *J Hubei Univ Nature Science Edition*(湖北大学学报自然科学版), 26(2): 155—159.
- Zhou Y(周 繇). 2004b. On protection of rare and endangered plants in Changbai Mountains(长白山区珍稀濒危植物的现状与保护)[J]. *J of Zhejiang Forestry College*(浙江林学院学报), 21(3): 263—268.

(上接第 569 页 Continue from page 569)

- Guangxi Normal Univ(natural science edition)*(广西师范大学学报(自然科学版)), 19(2): 61—66.
- Xue MN(薛妙男), Yang JH(杨继华), Zhang XH(张杏辉). 1996. Basic studies on the structure of self-incompatibility of *Shatinyu*(沙田柚自交不亲和性结构基础研究)[J]. *Chin Bull of Bot*(植物学通报), 13(专): 87—88.
- Yang JH(杨继华), Li HY(李红艳), Xue MN(薛妙男). 2000. The purification and identification of S-glycoprotein in the style of *Citrus grandis* var. *shatinyu* Hort(沙田柚花柱 S-糖蛋白的分离及鉴定)[J]. *J Guangxi Normal University(natural science edition)*(广西师范大学学报(自然科学版)), 18(4): 66—70.

- Yang JH(杨继华), Yao GR(尧桂荣), Xue MN(薛妙男). 2001. Purification and amino-terminal sequencing of style S-glycoproteins in *Citrus grandis* var. *Shatinyu* Hort.(沙田柚花柱 S-糖蛋白的纯化和 N-端序列测定)[J]. *J Guangxi Normal Univ(Natural Science Edition)*(广西师范大学学报(自然科学版)), 19(1): 72—79.
- Zhang SL(张绍铃), Shin Hiratsuka(平冢申). 2000. Effects of the style S-glycoproteins on the pollen germination and the tube growth in *Pears*(*Pyrus serotina* Rhed.) *in vitro*(梨花柱 S-糖蛋白对离体花粉萌发及花粉管生长的影响)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), 27(4): 251—256.