

棉纤维发育突变体胚珠全蛋白及种子水溶性蛋白 SDS 凝胶电泳分析

赖童飞, 贾银华, 杜雄明*

(中国农业科学院棉花研究所, 农业部棉花遗传改良重点开放实验室, 河南 安阳 455000)

摘要:利用饱和酚法提取了棉纤维发育突变体胚珠的全蛋白以及种子水溶性蛋白, 比较分析了不同发育时期棉花胚珠蛋白含量的变化。通过对野生型和纤维突变体全蛋白的 SDS 凝胶电泳图谱的比较分析, 在二倍体棉种的突变体及其野生型间找到了三条可能与表皮细胞分化相关的差异蛋白条带, 在种子水溶性蛋白中则发现了五条差异条带, 为进一步研究与棉纤维分化相关的分子机制提供了参考。

关键词:棉纤维; 蛋白质; SDS 凝胶电泳

中图分类号:S562.035.3 **文献标识码:**A

文章编号:1007-7807(2008)05-0330-05

Preliminary Study on the Whole Proteins of Ovule and Water-Soluble Proteins of Seeds in Cotton Fiber Mutants by SDS-PAGE

LAI Tong-fei, JIA Yin-hua, DU Xiong-ming*

(Cotton Research Institute of CAAS; Key Laboratory for Cotton Genetic Improvement, Ministry of Agriculture, Anyang, Henan 455000, China)

Abstract: The whole proteins of ovules and water-soluble proteins from seed in cotton fiber mutant were extracted and the variation of the protein contents of cotton ovules during different growing stage were analyzed. Through comparing the SDS-PAGE patterns between the wild types and their mutants, three distinct bands which are probably related to the initiation of the ovule epidermal cell have been found between the mutant and its wild type of the diploid cotton. Moreover, we also discovered five distinct bands in the wild type and its mutant of the species from SDS-PAGE profile of seed water-soluble proteins. This research provides some information for further detecting the molecular mechanics about the differentiation and development of cotton fiber.

Key words: cotton fiber; protein; SDS-PAGE

棉纤维是重要的纺织原料, 其分化、发育的过程也是其产量和品质形成的过程。尽管在基因组和转录组水平上已做了大量的工作, 但成果仅局限于激素的影响、转录因子的调控以及特异基因的表达差异, 对于控制棉纤维分化和发育的分子机理尚知之甚少。作为生理功能的直接执行者, 蛋白质本身的复杂性注定其包含着许多重要的生物学信息, 使基因组学不能准确地预测其翻译后修饰、蛋白质定位、甚至表达量差异等结构和动力学的变化, 需要对细胞生长过程中蛋白质本身进行直接的分析研究。目前, 直接在蛋白质水平对

棉花进行的研究主要集中在对同功酶表达差异的比较分析以及利用特征蛋白对不同棉种进行分类, 上述工作很难揭示蛋白质在棉花种子和纤维发育过程中的重要作用。突变体材料的研究是一种重要的研究手段。通过对棉纤维发育突变体与其野生型蛋白质组的比较研究, 为了解棉纤维发育过程中蛋白质的结构与功能提供了有效途径, 有可能揭示影响棉纤维发育的关键因素, 为育种家高效发掘种质资源、利用分子生物学的手段改良棉花纤维品质、进行种质创新提供理论基础。为此, 本实验对三组棉纤维突变体材料不同发育

时期蛋白质含量进行了间接测量,同时对三组材料的全蛋白以及两组短纤维发育突变体的种子水溶性蛋白进行了 SDS 凝胶电泳,并对其蛋白表达图谱进行了初步的分析。

1 材料和方法

1.1 材料

以中国农业科学院棉花研究所品种资源室所提供的三组突变体作为供试材料(图 1)。第一组为四倍体棉种陆地棉 GZNn 及其无绒有絮突变体 GZNn2-1(棉子表现为显性的光子性状)、gznn1-1(棉子表现为隐性的光子性状);第二组为二倍体栽培棉种亚洲棉 DPL971(wt)及其从中选育出来的 DPL972(mu)无绒有絮突变体;第三组为徐州 142 及其无绒无絮突变体。三组突变体经田间自交选纯后用于实验分析。

1.2 方法

1.2.1 全蛋白的提取。在低温无菌的环境下采集并剥取不同发育时期(-1,1,6,12,18,24 DPA)新鲜胚珠,10 DPA(Days Post Anthesis)以上胚珠剥除纤维。利用液氮冷冻研磨及饱和酚^[1]提取法提取棉胚珠总蛋白。

1.2.2 棉花种子水溶性蛋白的提取。提取

GZNn、GZNn2-1、gznn1-1、DPL971、DPL972 种子水溶性蛋白^[2]。采用 Bradford 法对提取的蛋白进行定量分析。

1.2.3 SDS 凝胶电泳。采用 Laemmli Buffer System^[3]进行 SDS 凝胶电泳^[4],浓缩胶浓度为 4%,分离胶浓度为 15%,上样量为每孔 20~30 μg 蛋白,100 V 恒压运行后,再以 300 V 恒压运行 4 h,Swain 法银染^[5]。

2 结果与分析

2.1 棉纤维发育过程中蛋白质含量的变化

分别选取陆地棉四倍体棉种 GZNn、Xu142 和亚洲棉二倍体棉种 DPL971 以及它们的纤维突变体,利用饱和酚法提取-1,1,6,12,18,24 DPA 胚珠全蛋白,涵盖了纤维起始分化及初生壁合成两个时期。经重复试验,通过对粗蛋白产率分析发现,野生型与突变体、二倍体棉种和四倍体棉种在相同发育时期蛋白含量非常接近,而对于不同发育时期蛋白含量的变化曲线(图 2)也十分相似。在开花前后胚珠蛋白质含量达到最高值,并随着进一步的快速生长,蛋白质含量迅速降低,在 10 DPA 以后下降趋势减慢,进入次生壁合成期后蛋白含量达到一个相对稳定的阶段。

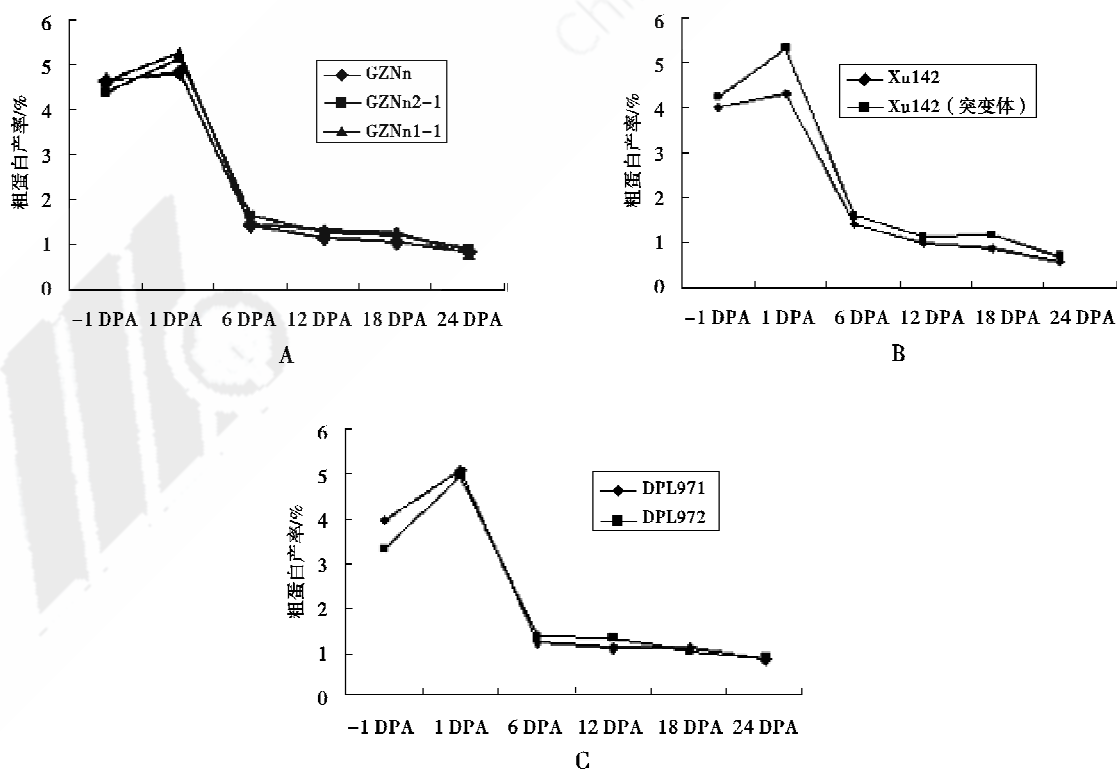


图 2 不同发育时期野生型与突变体蛋白含量变化

Fig. 2 The yield ratio change of protein on GZNn, DPL971 and Xu142 in different growing times

性好,因此各组突变体三个时期的带型基本一致;第三,在二倍体材料中,在-1 DPA 找到了三条差异条带,大小分别为 9.9 KD、20.6 KD、28.4 KD (图 3B),均存在于突变体 DPL972 中,其中后两条带蛋白重复性较好,猜测这三条差异蛋白条带与棉纤维的形态建成可能有密切关系,并以负调控机制发挥作用。

2.2.2 种子水溶性蛋白的凝胶电泳分析。通过两次重复试验三次重复测量,在种子水溶性蛋白 SDS 凝胶电泳图谱中我们没有在四倍体棉种及其突变体间找到有意义的差异条带,这也和突变

体与野生型遗传背景过近有关。但是在二倍体 DPL971 及其短绒突变体 DPL972 的种子水溶性蛋白中发现了两个区域存在着差异条带,一个区域为 28~30 KD 之间,野生型中存在两条比较明显的差异条带;另一区域则在 70~75 KD 之间,野生型中我们也发现了三条较为明显的差异条带(图 4)。这五条带在图谱上非常的明显,至少可以说明野生型在蛋白质表达量上与突变体存在着差异。而差异蛋白具体与该组材料的突变体表型差异有关还是与其他生长发育的代谢途径有关则还需要作进一步的考证。

表 1 水溶性蛋白浓度

Table 1 The concentration of water-soluble protein

$g \cdot L^{-1}$

样品	实验重复 1			实验重复 2			平均浓度
	测量值 1	测量值 2	测量值 3	测量值 1	测量值 2	测量值 3	
DPL971	1.0083	1.0215	0.9642	0.9610	0.9408	1.0304	0.9877
DPL972	0.9637	1.0473	1.0872	1.0413	1.0090	1.1229	1.0452
GZN	1.2738	1.2354	1.3632	1.2905	1.2825	1.3930	1.3064
GZn2-1	1.4579	1.5201	1.4611	1.3254	1.5266	1.3931	1.4474
gznn1-1	1.2641	1.5100	1.4510	1.3319	1.4268	1.5004	1.4140

同时利用 Bradford 法对短纤维突变体的两组材料提取的种子水溶性蛋白稀释 10 倍后进行了浓度的测量,结果如表 1 所示。在两组突变体材料中,突变体的蛋白含量均高于野生型的蛋白含量,四倍体组的蛋白含量要高于二倍体组,这与材料间 AD 染色体组与 A 染色体组的差异是对应的^[9]。

3 讨论

3.1 深入研究棉纤维发育突变体差异蛋白,有助于揭示控制棉纤维分化及发育的分子生理机制

目前,直接在蛋白质水平对棉纤维发育进行研究的报道相对较少。Graves 和 Steward^[10]利用双向电泳结合银染的方法,研究了纤维细胞发育过程中蛋白质组分的变化,但图谱背景较高,分辨率低,提供的信息有限。Turley 和 Ferguson^[11]比较分析了种子无纤维突变体和野生型的基因表达情况,并找到了仅在野生型表达的五种蛋白。Yao 等^[1]改良了饱和酚抽提法并获得了高质量的电泳图谱,但还没有进一步应用的报道。本文试图通过以上实验找到不同类型纤维发育突变体间的蛋白质差异,以加深对棉纤维发育相关蛋白的认识。结果表明,不同时期的野生型和突变体之间的蛋白差异不明显;凝胶图谱上,对于四倍体棉种,野生型和突变体之间基本上没有非常明显的差异蛋白条带,但在二倍体棉种的突变体

中发现了差异蛋白条带。这可能与二倍体棉种遗传背景相对简单,干扰条带较少有关,并不能说明四倍体棉种的野生型和突变体之间在蛋白水平上没有差异。同时本实验提取的是棉纤维起始及快速伸长期棉胚珠的全蛋白,那么可以猜测,表达量最高的的基因应该属于细胞骨架基因家族,这个特定的家族对纤维的极性伸长和细胞的形状有直接的作用,还有数量众多的基因大量表达参与细胞壁以及细胞壁相关蛋白的合成。但最大的基因组族群应该是与代谢相关的基因,也是我们最为关注的焦点,但由于其丰度低,以及瞬时表达等特性,为研究带来了难度。同时有很多组成型基因不仅仅在一个时期表达,虽然在表达图谱上没有变化的显示,但是并不代表他们不重要,而是意味着他们所起调节作用可能存在于其它水平,相关基因表达蛋白的多效性也不容我们忽视。本实验通过 SDS 凝胶电泳找到的差异蛋白,可能与棉花表皮细胞的分化起始密切相关,进一步的分析将有助于揭示控制棉纤维分化及发育的分子生理机制。

3.2 深化棉花蛋白质水平的研究依赖于技术的改进

SDS 凝胶电泳作为蛋白质的一种研究手段,重复性好,分辨率高,能够在一定层面上提供靶蛋白的信息,但作为棉纤维发育蛋白质组学的工具,对于胚珠表皮细胞分化复杂的网络调控机制,其

使用受到了一定的限制,远远不能满足实验需要。而且,由于电泳过程中蛋白的扩散、染色过程中出现的负染、分离胶长度的限制以及较深的背景对条带的统计造成很大的影响,图谱上所有种质分辨率均在一百条左右,不能真实反映出棉种间蛋白数量上的差异,与棉花表皮细胞特定时期接近两万种基因表达的实际情况还有着巨大的差距^[12]。此外,从蛋白质染色技术上看,由于银染技术灵敏度高,常被采用,但银离子被还原后与蛋白进行了不可逆的结合,对蛋白的后续鉴定造成了影响;而利用考马斯亮蓝 R250 染色,由于灵敏度相对较弱,则有可能不易发现差异蛋白条带,Candiano^[13]发现的考马斯亮蓝 G250 染色方法在一定程度上解决了这一问题。此外,还必须配合其他纯化、富集手段,或使用更高通量的二维电泳技术,以深化棉花蛋白质水平的研究。

参考文献:

- [1] YAO Yuan, Yang Yi-wei, Lu Jin-yuan. An efficient protein preparation for proteomic analysis of developing cotton fibers by 2-DE [J]. *Electrophoresis*, 2006, 27(22): 4559-4569.
- [2] 辛景树,陈牛斗,张春庆,等. 棉花品种图谱[M]. 北京:中国农业科学技术出版社,2003.
- [3] LAEMMLY U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 [J]. *Nature*, 1970, 227(5259): 680-685.
- [4] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 北京:科学出版社,2005:123-156.
- [5] SWAIN M, Ross N W A. Silver stain protocol for proteins yielding high resolution and transparent background in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gels[J]. *Electrophoresis*, 1995, 16 (6): 948-951.
- [6] 杜雄明,潘家驹,汪若海. 棉纤维细胞分化和发育[J]. *棉花学报*, 2000, 12(4): 212-217.
- [7] 王素会,杜雄明. 两个棉纤维发育突变体分子生物学研究进展[J]. *棉花学报*, 2003, 15(6): 376-379.
- [8] 曲延英,马金霞,陈敬峰,等. 种子贮藏蛋白电泳技术在棉花品种鉴定中的应用[J]. *新疆农业大学学报*, 2004, 27(4): 23-26.
- [9] 朱新产,赵文明,廖祥儒. 棉属种子蛋白质组分的差异变化[J]. *棉花学报*, 1995, 7(4): 223-225.
- [10] GRAVES D A, Steward J M. Analysis of the protein constituency of development of cotton fibers [J]. *J Exp Bot*, 1988, 39: 59-69.
- [11] TURLEY R B, Ferguson D L. Changes of ovule proteins during early fiber development in a normal and a fiberless line of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) [J]. *Plant Physiol*, 1996, 149: 695-702.
- [12] WILKINS T A. Cotton fiber genomics; Developmental mechanisms[J]. *Pflanzenschutz -Nachrichten Bayer*, 2005, 58(1): 119-139.
- [13] GIOVANNI C, Maurizio B, Luca M, et al. Blue silver; very sensitive colloidal coomassie G-250 staining for proteome analysis[J]. *Electrophoresis*, 2004, 25: 1327-1333. ●