

文章编号: 1000-5692(2006)03-0265-05

矮化杉木蛋白质组的差异凝胶电泳分析

黄华宏¹, 童再康¹, 朱玉球¹, 高燕会¹, 许长寿², 何福基¹

(1. 浙江林学院 林业与生物技术学院, 浙江 临安 311300; 2. 浙江省临安市马啸乡林业站, 浙江 临安 311323)

摘要: 建立具有高分辨率和稳定性的矮化杉木 *Cunninghamia lanceolata* 叶片蛋白质的双向电泳图谱, 研究杉木矮化突变的机理。取同一生长环境下的野生型杉木及矮化突变型杉木新梢顶端的叶片, 液氮研磨成粉末后用改良 TCA-丙酮沉淀法提取总蛋白, 分别用 CY2 和 CY3 标记, 用 DIGE 技术进行分析。与野生型杉木相比, 在矮化突变型杉木的叶片组织中, 有 14 个蛋白质表达水平显著增加, 另外 15 个蛋白质表达水平显著下降。所得的 29 个差异蛋白质可能与杉木矮化突变的发生有关。图 3 表 3 参 9

关键词: 林木遗传育种学; 杉木; 矮化突变; 蛋白质组; 差异凝胶电泳

中图分类号: S722.3 **文献标识码:** A

杉木 *Cunninghamia lanceolata* 为我国特产, 分布于长江流域以南各省区, 是重要的速生用材针叶树种之一。杉木矮化突变体是速生木本植物中难得的珍贵种质, 为研究杉木生长的分子遗传学机制提供了理想材料。研究揭示其矮化突变的分子机制, 对培育生长速度快、品质性状优良的杉木优株或无性系, 以及促进林业生产的可持续发展都具有十分重要的意义。迄今为止, 有关木本植物矮化突变机制的报道主要集中在苹果 *Malus* sp. 和柑橘 *Citrus* sp. 等果树上^[1,2]。以往多数研究认为, 果树的树体大小受到植物生长调节剂的明显控制^[3]。矮化杉木发现于 20 世纪 70 年代, 但至今尚无有关矮化杉木的研究报道。课题组经过 20 a 的繁殖与不同地区栽培试验, 发现杉木矮化性状遗传稳定(树高遗传重复力达 0.97)。一般条件下, 10~20 年生平均树高为 1.86 m, 平均胸径仅 4.2 cm, 树冠呈半球形, 侧枝间距 1~3 cm, 针叶质地嫩软, 雌、雄球花生长异常, 花极少且孢子叶球仅为正常杉木的 25% 左右。利用双向电泳技术找出差异蛋白并进一步克隆基因, 已成为揭示突变机制的一种有效手段。如何瑞锋等^[4]应用双向电泳分析了水稻 *Oryza sativa* 温敏叶绿素突变体的叶片蛋白, 以探讨其突变原因。李慧玉等^[5]则采用双向电泳研究了樟子松 *Pinus sylvestris* var. *mangolica* 突变丛生枝的发生机理。课题组利用凝胶内差异显示电泳(differential gel electrophoresis, 简称 DIGE)技术, 以同一生长环境下的矮化突变型和野生型杉木新梢顶端的叶片作为研究材料, 进行蛋白质组差异凝胶电泳分析, 直接从差异表达的蛋白质水平来探讨杉木矮化突变的发生机理, 为速生相关基因的分选和分子育种提供理论基础和科学依据。

收稿日期: 2005-09-19; 修回日期: 2006-01-19

基金项目: 浙江省科学技术攻关项目(2004C12022)

作者简介: 黄华宏, 讲师, 硕士, 从事植物遗传育种研究。E-mail: huanghh@zjfc.edu.cn

1 材料与方 法

1.1 植物材料

矮化突变型杉木和野生型杉木皆为5年生嫁接植株,生长在同一环境下,在杉木生长季采新梢顶端的叶片,放入冰瓶带回实验室。用剪刀稍作修剪,迅速用去离子水冲洗3次,滤纸轻轻吸干残余液滴,放入冻存管,迅速置于液氮中保存。

1.2 主要试剂

丙烯酰胺,甲叉双丙烯酰胺,尿素,硫脲,甘氨酸,TRIS,CHAPS,SDS,碘乙酰胺,固相pH干胶条(IPG strip pH 3~10, NL, 24 cm), Ampholyte pH 3~10, 2-D clean up 试剂盒,蛋白质定量试剂盒,均为Amersham公司产品;硫代硫酸钠,无水乙酸钠,为国产分析纯。所有溶液均用Mill-Q水配制。

1.3 主要仪器

Ettan TM IPGphorTM 等电聚焦电泳仪, Ettan TM DALT Six 垂直板电泳仪, Typhoon 9400 多功能荧光扫描成像系统, DeCyder Image Quant TM V5.0 凝胶图像分析软件,均为Amersham公司产品;P80MX 超速冷冻离心机,为Hitachi公司产品;UV8200 分光光度计为Hitachi公司产品。

1.4 实验方法

1.4.1 叶片全蛋白的制备 叶片全蛋白的制备采用TCA-丙酮沉淀法,具体步骤参照杨传平等^[6]的报道。所得样品蛋白质的浓度用2-D Quant kit测定。

1.4.2 荧光标记蛋白质及其双向电泳 用CY2和CY3标记野生型和突变型的蛋白质,实验设计见表1。蛋白质第一向等电聚焦的参数:30 V, 12 h; 500 V, 1 h; 1 000 V, 1 h; 8 000 V, 8 h。第二向SDS-PAGE的凝胶质量浓度为 $125 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$,电泳参数

表1 杉木样品的2D-DIGE实验设计

Table 1 2D-DIGE experimental design for *Cunninghamia lanceolata*

胶条号	CY2 标记样品	CY3 标记样品
Gel 1	野生型的叶片(control)	矮化突变型的叶片(dwarf)
Gel 2	野生型的叶片(control)	矮化突变型的叶片(dwarf)
Gel 3	野生型的叶片(control)	矮化突变型的叶片(dwarf)

设定为:20 W, 45 min; 60 W, 8 h。具体处理步骤参照 Perales 等^[7]的报道。

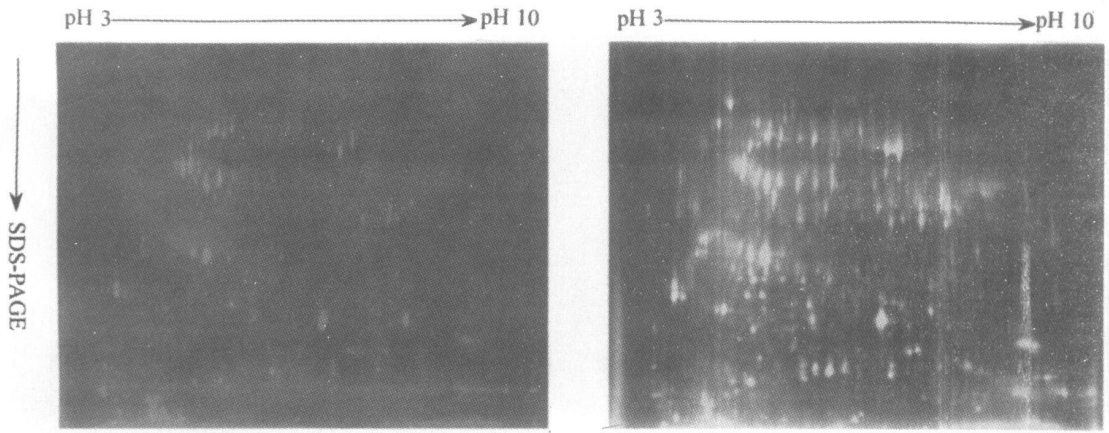
1.4.3 图像分析与数据处理 荧光标记的蛋白经凝胶电泳后,Milli-Q冲洗数次,用Typhoon 9400 荧光扫描仪在不同激发光下扫描成像。所使用的滤光片和PTM电压如下:CY2, Blue2 (488)/600; CY3, Green (530)/680。所得的蛋白质组图谱用DeCyder Image Quant TM V5.0 凝胶图像分析软件进行点识别、背景消除、点匹配及差异蛋白质分析。蛋白匹配以野生型杉木叶片的凝胶图像作为对照。

2 结果与分析

双向电泳结束后,每块SDS-PAGE胶用488 nm 和 530 nm 等2种波长的激发光进行扫描,获得野生型杉木叶片蛋白质组图谱和矮化突变型杉木叶片蛋白质组图谱。图1是从Gel 3中扫描得到的蛋白质组荧光图谱。3块胶扫描所得的蛋白质组图谱用分析软件DeCyder 5.0进行批量分析,发现Gel 3中被检测到的蛋白质点最多,有1 215个点;所有胶中平均检测到有1 179个点,其中相匹配(所有图谱共有的)有906个,占匹配蛋白质总数的77%。不能相匹配的检测点被认为是杂质微粒或者是由实验所带来的随机误差。图2显示了Gel 3中扫描得到的蛋白质组图谱。图谱中17和18号蛋白质点的三维图像见图3。在Gel 3中,17号蛋白质点在矮化杉木新梢顶端的叶片中表达量下调最多,降低了35.72倍,其等电点和相对分子量分别为8.04和24.2 kDa;而18号蛋白质点在矮化杉木新梢顶端的叶片中表达量上调最大,提高了6.09倍,其等电点和相对分子量分别为5.25和22.2 kDa。

蛋白质组图谱中相匹配点的统计学分析发现,有124个蛋白质点的体积差异超过20%,其中有14个蛋白质表达量增加了2.2倍以上,15个蛋白质表达量下降超过了3.0倍以上,并在所有的胶中表现出相同的趋势(增加或降低)。为了便于在蛋白质组图谱中查找每个差异点,我们将这29个差异点添加了标记号,并清楚地显示于图2中。它们的等电点、相对分子量及表达量变化等信息列于表2

和表 3。这些表达差异的蛋白点可能与杉木矮化突变有关。

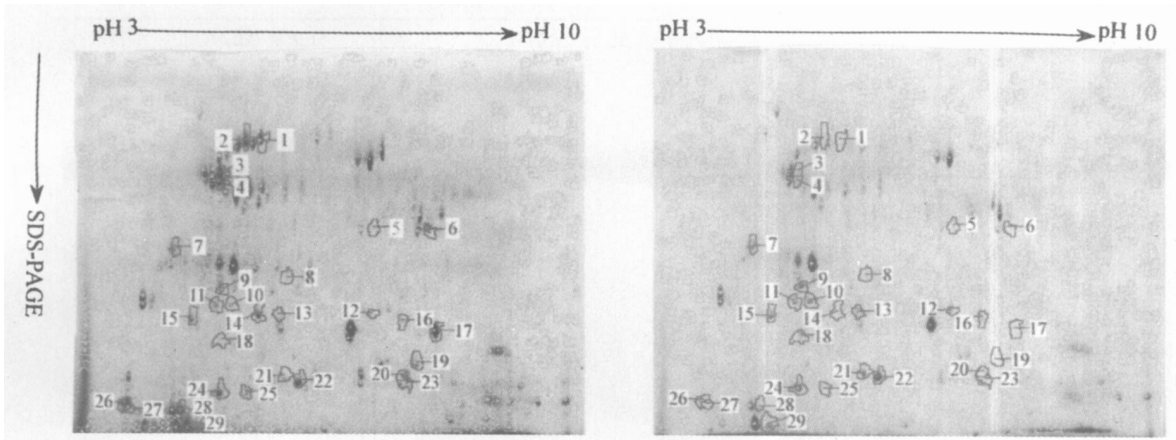


A: 野生型杉木叶片蛋白质

B: 矮化突变型杉木叶片蛋白质

图 1 杉木叶片蛋白的双向凝胶电泳荧光图谱

Figure 1 The 2-DE fluorescence map of proteins from *Cunninghamia lanceolata* leaves

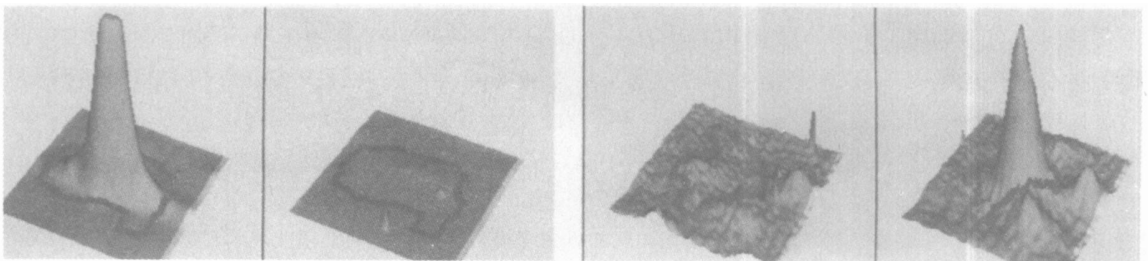


A: 野生型杉木叶片蛋白质

B: 矮化突变型杉木叶片蛋白质

图 2 杉木叶片蛋白的双向凝胶电泳图谱

Figure 2 The 2-DE map of proteins from *Cunninghamia lanceolata* leaves



A: 17 号蛋白质点

B: 18 号蛋白质点

图 3 蛋白质点的三维图

Figure 3 The 3-D intensity charts of 2 spots

3 讨论

迄今为止, 已发现许多植物矮化突变体, 尤其在草本植物方面。研究认为多数植物矮化突变与植

物赤霉素(GA)和油菜素类固醇(BR)有关;少数植物矮化突变与生长素(IAA)有关;也有一些植物矮化突变是某些同源异型盒基因的不正常表达所致^[8]。为探明杉木矮化的原因,课题组近年又采用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)分析了相同生长环境下矮化突变型和野生型杉木叶片内源激素的差异,结果发现矮化个体叶片中GA₃未检测到,IAA含量仅为正常个体的1/40~1/10,而脱落酸(ABA)、玉米素(ZT)和玉米素核苷(ZR)的含量在2种类型个体间差异不大,初步认为该突变株可能是由于GA合成缺陷引起。然而,GA的合成途径复杂,需要10余种酶,分别为内-Copalyl双磷酸合成酶(CPS)、内-贝壳杉烯合成酶(KS)、内-贝壳杉烯19-氧化酶(EKO)、内-贝壳杉烯酸7 β 羟化酶、GA₁₂-醛合成酶、GA₇-氧化酶(GA_{7OX})、GA₁₃-羟化酶(GA_{13OX})、GA₂₀-氧化酶(GA_{20OX})、GA₃- β 羟化酶(GA₃ β OX)和GA₂-氧化酶(GA_{2OX})^[9]。这些酶的编码基因在拟南芥

*Arabidopsis thaliana*和水稻等植物中已被克隆,研究证明编码基因的突变会引起相关植物出现严重矮化或半矮化表型。实验所得到的差异蛋白点可能与GA生物合成的相关酶有关。课题组下一步将对这些蛋白质进行质谱鉴定,获得其肽指纹图谱,经数据库获得此蛋白质的序列、结构和功能信息,并进一步分离相关矮化基因,揭示杉木矮化突变的分子机理。

参考文献:

- [1] 张新忠, 刘玉艳, 龙成莲. 苹果矮化砧木矮化机理的研究现状和展望[J]. 河北职业技术师范学院学报, 1996, 10(2): 62-65.
- [2] LLISO I, FOMER J B, TALON M. The dwarfing mechanism of citrus rootstocks F&A 418 and #23 is related to competition between vegetative and reproductive growth[J]. *Tree Physiol*, 2004, 24: 225-232.
- [3] 刘彦红, 张志华. 果树矮化机理研究进展[J]. 河北农业大学学报, 2002, 25(增刊): 92-91.
- [4] 何瑞锋, 丁毅, 余金洪. 水稻温敏叶绿素突变体叶片蛋白的双向电泳分析[J]. 作物学报, 2001, 27(6): 875-880.
- [5] 李慧玉, 董京祥, 姜静. 樟子松突变丛生枝蛋白质的双向电泳分析[J]. 生物技术, 2004, 14(1): 35-37.

表2 矮化突变杉木叶片2-DE图谱中表达量增加的蛋白点

Table 2 Protein spots with increased volume in the mutant

蛋白点代号	蛋白点索引号	等电点	分子量/kDa	增加倍数
5	461	7.14	45.7	3.24
7	527	4.34	41.1	3.07
8	639	6.11	31.1	2.26
9	677	5.10	31.6	2.43
10	731	5.20	28.5	2.90
11	735	4.99	28.4	2.56
12	766	7.04	27.4	3.10
13	769	5.89	26.5	2.67
15	788	4.60	26.0	2.81
16	795	7.56	25.9	3.14
18	857	5.25	22.2	6.09
21	999	5.94	17.9	3.81
22	1 014	6.14	17.4	2.97
24	1 060	5.04	16.2	2.33

表3 矮化突变杉木叶片2-DE图谱中表达量减少的蛋白点

Table 3 Protein spots with decreased volume in the mutant

蛋白点代号	蛋白点索引号	等电点	分子量/kDa	减少倍数
1	177	5.60	82.8	-4.57
2	183	5.39	81.2	-3.30
3	264	5.03	68.0	-5.23
4	282	5.02	63.4	-7.30
6	471	7.91	46.6	-3.42
14	773	5.58	26.7	-4.77
17	836	8.04	24.2	-35.72
19	953	7.75	19.7	-4.52
20	989	7.60	18.2	-7.19
23	1 019	7.64	17.5	-5.41
25	1 061	5.41	16.3	-5.57
26	1 092	3.68	15.4	-4.59
27	1 116	3.72	14.9	-4.55
28	1 129	4.45	14.6	-4.90
29	1 218	4.54	13.1	-5.13

- [6] 杨传平, 姜静, 梁艳, 等. 白桦雄花序发育初期蛋白质的双向电泳图谱分析[J]. 东北林业大学学报, 2004, 32(1): 1-4.
- [7] PERALES M, EUBELL H, HEINEMEYERL J, *et al.* Disruption of a nuclear gene encoding a mitochondrial gamma carbonic anhydrase reduces complex I and supercomplex I + III₂ levels and alters mitochondrial physiology in *Arabidopsis* [J]. *Mol Biol*, 2005, 350: 263-277.
- [8] 虞慧芳, 曹家树, 王永勤. 植物矮化突变体的激素调控[J]. 生命科学, 2002, 14(2): 85-88, 76.
- [9] 王金祥, 李玲, 潘瑞焱. 高等植物中赤霉素的生物合成及其调控[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(1): 1-8.

Proteome study of dwarf mutant in *Cunninghamia lanceolata* by 2D-DIGE

HUANG Hua-hong¹, TONG Zai-kang¹, ZHU Yu-qiu¹, GAO Yan-hui¹, XU Chang-shou², HE Fu-ji¹

(1. School of Forestry and Biotechnology, Zhejiang Forestry College, Lin'an 311300, Zhejiang, China; 2. Maxiao Forest Station of Lin'an City, Lin'an 311323, Zhejiang, China)

Abstract: To establish the maps of two-dimensional differential gel electrophoresis, the dwarfing mechanism of the mutant in *Cunninghamia lanceolata* was analyzed. The leaves from normal and dwarf plants were ground into powder with liquid nitrogen. The total proteins were extracted with the modified TCA-acetone method, labeled with CY2 or CY3 respectively, analyzed by 2D-DIGE. After electrophoresing, the gels were respectively imaged by Typhoon 9400 using different emission filter and spot-features were analyzed by DeCyder software in each paired normal/dwarf comparison. The results showed that 14 unique proteins had a 2.2-fold increase and 15 proteins that had a 3.0-fold decrease were found in dwarfed plants. These 29 proteins might be associated with the dwarfing. [Ch, 3 fig, 3 tab, 9 ref.]

Key words: forest tree breeding; *Cunninghamia lanceolata*; dwarf mutant; proteome; differential gel electrophoresis (DIGE)