

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2011.01134

小麦生理型和遗传型雄性不育系及其保持系小花完整叶绿体蛋白质组分比较研究

李 莉 王书平** 张改生* 王亮明 宋瑜龙 张龙雨 牛 娜 马守才

西北农林科技大学陕西省作物杂种优势研究与利用重点实验室 / 小麦育种教育部工程研究中心, 陕西杨凌 712100

摘 要: 采用固相 pH 梯度 SDS 聚丙烯酰胺双向凝胶电泳技术, 以小麦遗传型雄性不育系 ms(S)-1376、杀雄剂 SQ-1 诱导的生理型雄性不育系 ms(A)-1376, 以及对应的保持系(A)-1376 (杀雄剂诱导前的正常可育系)所构建的等基因和等生理差异系为试材, 比较分析了 2 种分离纯化完整叶绿体的方法。在确立了一套适用的技术方法的基础上, 研究了三者花粉小孢子萌发单核早期小花完整叶绿体蛋白之间的差异。采用 30%、45%和 60%的不连续蔗糖密度梯度离心的方法能够获得完整且纯度较高的叶绿体, 经 TCA-丙酮提取蛋白质后, PDQuest 软件分析, 在分子量 14.4~66.2 kD, 等电点 4~7 的线性范围内可分辨出 2-DE 图谱上 239 个较为清晰的蛋白质点, 对其中的 6 个差异表达蛋白质点进行 MALDI-TOF 肽质量指纹图谱分析, 从生物信息学数据库检索鉴定出 6 个差异蛋白质点分别是酰基辅酶 A 脱氢酶结构域蛋白、钙调结合蛋白磷酸酶、多催化功能肽酶、热休克蛋白 60、光受体蛋白 2 及 1 个未知功能的表达蛋白质。这些蛋白质在供试小麦叶绿体物质能量代谢、叶绿体防卫抵御机制、叶绿体细胞内信号转导及植物极性生长等生理应答反应中起调控作用, 它们能在本研究供试两不育系和对应可育系中差异表达, 可能与雄性不育相关。

关键词: 小麦; 遗传型和生理型雄性不育; 完整叶绿体蛋白质组; 差异表达; 2D-PAGE; MALDI-TOF-MS

Comparison of Floret Intact Chloroplast Proteome in Male Sterile Line Induced by CHA-SQ-1, Cytoplasmic-nuclear Sterile and Its Normal Fertile Lines in Wheat

LI Li, WANG Shu-Ping**, ZHANG Gai-Sheng*, WANG Liang-Ming, SONG Yu-Long, ZHANG Long-Yu, NIU Na, and MA Shou-Cai

Key Laboratory of Crop Heterosis of Shaanxi Province, Northwest A&F University / Wheat Breeding Engineering Research Center, Ministry of Education, Yangling 712100, China

Abstract: We extracted floret chloroplast proteins from the genetic male sterile line ms(S)-1376, the physiological male sterile line ms(A)-1376 induced by chemical hybridizing agent SQ-1, and their counterpart maintainer line (A)-1376 (normal fertility). These proteins were separated via 2-D electrophoresis with immobilized pH 4–7 gradients as the first dimension and SDS-PAGE as the second one. We established a set of technique available for intact chloroplast isolation and 2-DE of proteins in wheat floret and compared the effect of intact chloroplast purification using two methods. Based on the 2-DE technique, we explored the difference of the floret chloroplast proteins among the three materials tested in their early uninucleate anther stage. The result showed that we obtained high purity of intact chloroplast using discontinuous sucrose density gradient centrifugation with three-step gradient densities of 30%, 45%, and 60%. Proteins were extracted from chloroplast by TCA-acetone and analyzed by PDQuest software, we got as much as 239 protein spots within pH 4–7 and with molecular weight of 14.4–66.2 kD on each 2-DE gel. We analyzed six differential expressed proteins by matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight (MALDI-TOF)

本研究由国家高技术研究发展计划(863 计划)重大专项(2009AA101102), 国家自然科学基金项目(31071477), 高等学校博士学科点专项科研基金(20090204110024), 陕西省“13115”科技创新工程重大科技专项(2010ZDKG-68)和西北农林科技大学拔尖人才支持计划项目资助。

* 通讯作者(Corresponding author): 张改生, E-mail: zhanggsh@public.xa.sn.cn, Tel: 029-87092152

第一作者联系方式: E-mail: lili1131204@163.com, Tel: 18792644982 **共同第一作者

Received(收稿日期): 2010-12-23; Accepted(接受日期): 2011-03-27.

mass spectrometry (MS) and bioinformatical database, and found they were acyl-CoA dehydrogenase domain protein, calmodulin-binding protein phosphatase, multiple catalytic peptidase, heat-shock protein 60, light receptor protein 2 and a protein of unknown function. These proteins are involved in series of physiological reactions such as metabolism of energy substances, chloroplast defence, chloroplasts signal transduction and plant growth, the differential expression of those proteins among the three materials tested is likely related to the male sterility in wheat.

Keywords: Wheat; Genetic and physiological male sterilities; Intact chloroplast proteins; Differential expression; 2-dimensional electrophoresis; MALDI-TOF-MS

雄性不育是植物中普遍存在的一种现象,在农作物杂种优势利用中发挥着重要作用,尤其是质核互作遗传型雄性不育及杀雄剂诱导的生理型雄性不育在生产中的应用。多数学者认为核质互作雄性不育直接与线粒体相关,而对其受叶绿体影响的分歧较大。刘祚昌等^[1]分析了玉米、高粱、小麦、烟草等作物细胞质雄性不育(CMS)系及其保持系的RuBP羧化酶发现,核基因控制的小亚基在两系间没有差异,但叶绿体基因组控制的大亚基则有差异,同时CMS系酶活性高于其对应保持系。裴雁曦等^[2]则指出,Rubisco大亚基含量在榨菜胞质雄性不育系叶绿体发育的各阶段均显著低于保持系,表明RuBP羧化酶与CMS密切相关。李继耕等^[3]发现,油菜不育系相对于保持系叶绿体类囊体片层数明显减少,基粒间的基质片层变细,以致断裂,片层排列紊乱。李家洋等^[4]对玉米、甜菜及高粱叶绿体类囊体膜多肽的研究发现,细胞质雄性不育系与其保持系之间在33 kD附近肽斑大小、数量与分布有明显差异,并推测叶绿体类囊体膜多肽组成与细胞质雄性不育性之间存在联系。应燕如等^[5]采用免疫化学和氨基酸成分分析的方法对烟草叶绿体基因产物——组分I蛋白的大亚基进行分析,结果发现CMS系与其保持系的组分I蛋白差别不大。一些学者还通过叶绿体基因组离体翻译技术,发现了一些胞质雄性不育系与保持系间存在差异多肽。

目前,已从不同方法和层次报道^[6-9]了小麦雄性不育机制研究结果,但其发生机制至今还未真正被揭示,尤其鲜见在以蛋白质组学和以亚细胞蛋白质水平以叶绿体为载体的研究报道。本研究在亚细胞蛋白质水平上,通过对小麦单核早期小花高纯度完整叶绿体的分离,利用双向电泳技术比较了不同类型育性背景下的雄性不育系与对应保持系之间叶绿体蛋白质表达谱的差异,对差异表达蛋白质进行MALDI-TOF-MS分析鉴定、功能注释和亚细胞定位,以探索叶绿体与雄性不育的关系,以期为进一步在亚细胞水平研究雄性不育的机制奠定基础,进而促进小麦雄性不育的实践应用。

1 材料与方法

1.1 植物材料及取样

供试材料为经过杀雄剂SQ-1诱导的生理型雄性不育系ms(A)-1376和其对应的具有正常可育细胞质的保持系(A)-1376,以及对应1376的同核异质遗传型雄性不育系ms(S)-1376,其中ms(A)-1376和(A)-1376为1对不育与可育等生理系,ms(A)代表具有普通小麦(*Triticum aestivum*)不育细胞质;ms(A)-1376和ms(S)-1376为1对生理型和遗传型同核异质不育系,不育系ms(S)-1376A由西北农林科技大学陕西省作物杂种优势研究与利用重点实验室采用具有斯卑尔脱小麦(*T. spelta*)不育细胞质的不育系ms(S)-8230-144A与普通小麦栽培品种1376通过多代核置换回交育成,其保持系(A)-1376回交世代已在20代以上,不育性稳定,综合农艺性状优良,已成为本重点实验室用来进行多种不育类型小麦杂种优势理论研究与实践应用的重要骨干亲本材料。

2008年10月,将所有材料均种植于西北农林科技大学农场试验田,次年4月初,待材料(A)-1376发育到旗叶伸出倒二叶鞘的一半,即Feek's 8.5时,喷施杀雄剂SQ-1诱导其产生100%生理雄性不育。依据镜检和形态学特征来判断小孢子发育时期,4℃下剥取小麦单核早期小花,去芒和颖壳,-80℃保存备用。

1.2 完整叶绿体的制备

1.2.1 差速离心结合蔗糖密度梯度离心法 根据Elias等^[10]和陈云伟等^[11]的方法,略有改动。取50 g小花,加入500 mL预冷的研磨介质,其中含0.33 mol L⁻¹山梨醇、0.1% (W/V) BSA、0.1% (V/V) β-巯基乙醇、5 mmol L⁻¹ EDTA的50 mmol L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.0,经组织匀浆仪中速间隔匀浆4次,每次10 s;然后用4层无菌纱布过滤,滤液于4℃下700×g离心5 min;取上清液3 000×g (4℃)离心10 min,用研磨介质悬浮细胞器沉淀,即为叶绿体粗提液。

于50 mL离心管(A管)中制备蔗糖梯度(W/V),其中含25 mmol L⁻¹ EDTA的50 mmol L⁻¹ Tris-HCl

(pH 8.0), 自下而上的蔗糖浓度分别为 52%和 30%。将叶绿体粗提液铺于蔗糖梯度上, 4℃下 30 000×g 离心 2 h, 蔗糖分界处出现深绿色条带, 即为完整叶绿体; 吸出此条带, 以 3 倍体积研磨介质稀释, 再于 4℃下 3 000×g 离心 15 min, 沉淀即为纯化的完整叶绿体。取少量镜检其完整性, 并检测其浓度, 剩余部分以备提取蛋白质。

1.2.2 改良的蔗糖密度梯度离心法 将叶绿体粗提液铺于含有 60%、45%和 30%蔗糖溶液梯度管(B管)中, 4℃下 30 000×g 离心 2 h 后, 梯度管中呈现两条明显的绿色条带, 收集 45%和 60%蔗糖分界处条带, 即为完整叶绿体。用 3 倍体积研磨介质稀释, 4℃下 3 000×g 离心洗涤 15 min; 沉淀经等渗悬浮介质(含 150 mmol L⁻¹ NaCl, 25 mmol L⁻¹ EDTA 的 50 mmol L⁻¹ Tris-HCl, pH 8.0)于 4℃下 3 000×g 离心洗涤 15 min, 即可得到纯度较高的完整叶绿体沉淀。

1.2.3 叶绿素含量测定 参考 Arnon 的叶绿素含量计算公式^[12], 在 50 μL 叶绿体悬浮液中加入 18 mL 丙酮(85%)和 1.95 mL Milli-Q 水, 4℃下 4 000×g 离心 10 min, 于 652 nm 波长下测定吸光值, 计算叶绿体含量(*Cr*), $Cr\text{ (mg mL}^{-1}\text{)} = A_{652}/34.5 \times \text{稀释倍数}$, 本试验中稀释倍数为 40。

1.3 叶绿体蛋白质的制备

参照陈蕊红等^[13]的方法, 略有改动。在叶绿体样品中加入预冷的 TCA-丙酮溶液(10% TCA、0.07% β-巯基乙醇和 10 mmol L⁻¹ PMSF), -20℃沉淀过夜, 4℃下 25 000×g 离心 30 min, 弃上清液, 加丙酮溶液(含 0.07% β-巯基乙醇和 10 mmol L⁻¹ PMSF), -20℃沉淀 1 h, 4℃下 25 000×g 离心 30 min, 反复洗涤 3~4 次, 得到纯白色的蛋白质沉淀物, 真空冷冻干燥, -80℃保存备用。

将蛋白干粉与水化液[9 mol L⁻¹ 尿素, 4% (W/V) CHAPS, 65 mmol L⁻¹ DTT, 0.25% (V/V)载体两性电解质 Biolyte]充分混匀, 于液氮与 29℃水浴中交替冻融 3 次, 22℃下 25 000×g 离心 15 min, 上清液即为叶绿体蛋白质。经 Bradford 法^[14]测定蛋白质浓度, 分装后-80℃冻存。

1.4 双向电泳(2-DE)

参照 BIO-RAD 操作手册优化双向电泳过程, pH 3~10、7 cm IPG 胶条上样量为 80 μg, 以蛋白水化液(8 mol L⁻¹ 尿素, 4% CHAPS, 65 mmol L⁻¹ DTT, 0.5% IPG 缓冲液, pH 3~10, 0.001%溴酚蓝)稀释至终体积 140 μL; pH 4~7、17 cm IPG 胶条等电聚焦程序参见

叶景秀等^[15]的方法, 上样量为 280 μg, 上样体积 350 μL, PROTAIN IEF Cell 型电泳仪(BIO-RAD)等电聚焦结束后, 胶条经 2 次平衡, 每次 15 min。将 IPG 胶条置于 13% SDS-PAGE 垂直电泳系统进行分离, 凝胶用银染方法^[16]染色。

1.5 凝胶图像分析

染色后的 2-DE 凝胶用 UMAX Power Look 2100XL 型光密度扫描仪(台湾力捷公司)透射扫描获取图像, PDQuest 分析软件对图像上的蛋白质点进行分析。

1.6 差异蛋白的质谱鉴定及功能分析

差异表达蛋白质点经胰蛋白酶水解后, 经 MALDI-TOF-MS 飞行时间质谱分析仪(德国 Bruker Daltonics 公司生产)分析, 获得的肽质量指纹图谱(PMF), 通过 Mascot 软件对 SWISS-PROT 数据库进行检索鉴定。

2 结果与分析

2.1 不同叶绿体分离方法的比较

分别采用两种不同的蔗糖密度梯度离心体系提取小麦小花完整叶绿体, 离心结束后, 梯度管中呈现不同的离心效果。管 A 在 30%与 60%蔗糖的分界处有一条明显的绿色条带(图 1-A), 管 B 分别在 30%与 45%、45%与 60%蔗糖的分界处各有一条明显的绿色条带(图 1-B)。由于叶绿体光合作用的产物主要是葡萄糖, 其中一部分产物合成后转化为淀粉颗粒并暂时贮存在叶绿体的淀粉核中, 因此, 完整的叶绿体经 KI-I₂ 溶液染色后, 在显微镜下呈现淀粉粒的颗粒状, 而破碎的叶绿体由于淀粉核破裂, 镜检时呈蓝紫色的块状。管 A 条带中即存在完整叶绿体, 也包含破碎叶绿体及细胞碎片(图 1-C), 计数测定得出完整叶绿体的分离效率约 65%; 管 B 分离出 2 条绿色条带, 上层条带中含有大量破碎的叶绿体和细胞组织(图 1-D), 下层条带富集了大量的完整叶绿体(图 1-E), 完整叶绿体的分离效率达到 95%以上。在紫外分光光度计测定完整叶绿体的 A_{652} 值为 1.012, 则完整叶绿体含量为 1.173 mg mL⁻¹。

2.2 不同分离方法提取叶绿体蛋白质对凝胶电泳的影响

小花中含有大量的色素、酚类、醌类等次生代谢物质, 如果样品处理不当, 这些物质将会严重干扰第一向 IEF。各条带经 TCA-丙酮法提取出蛋白质后, 用梯度 SDS-PAGE 进行蛋白质的分离检测(图

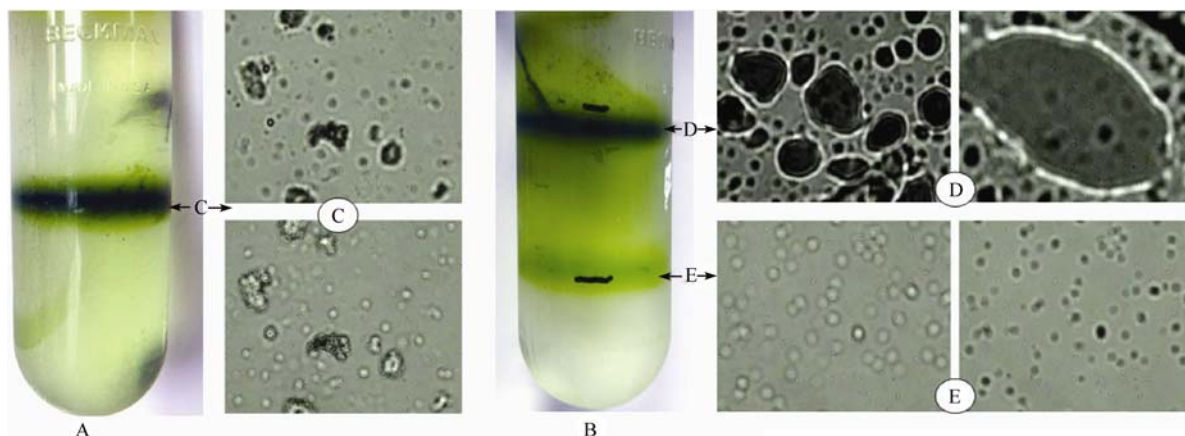


图 1 蔗糖密度梯度纯化完整叶绿体

Fig. 1 Sucrose density gradient purification of intact chloroplasts

A: 以两层蔗糖密度梯度(上层: 60%蔗糖 25 mL; 下层: 30%蔗糖 15 mL)离心纯化叶绿体; B: 以三层蔗糖密度梯度(上层: 60%蔗糖 10 mL; 中层: 45%蔗糖 15 mL; 下层: 30%蔗糖 10 mL)离心纯化叶绿体; C: 破碎叶绿体、完整叶绿体及大量细胞碎片($\times 400$); D: 细胞碎片及大量破碎叶绿体($\times 400$); E: 完整叶绿体($\times 400$)。

A: Two-step sucrose density gradient for purifying floret chloroplasts (upper layer: 25 mL of 60% sucrose solution, lower layer: 15 mL of 30% sucrose solution); B: Typical three-step sucrose density gradient for purifying floret chloroplasts (upper layer: 10 mL of 60% sucrose solution, middle layer: 15 mL of 45% sucrose solution, lower layer: 10 mL of 30% sucrose solution) C: Broken chloroplasts, intact chloroplasts, and lots of cell debris ($\times 400$); D: Cell debris and lots of broken chloroplasts ($\times 400$); E: Intact chloroplasts ($\times 400$).

2-A), 泳道 2 中为 A 管中提取的叶绿体蛋白(图 1-C), 泳道 2 和泳道 3 分别为 B 管提取的上层和下层叶绿体蛋白(图 1-D 和 E)。叶绿体蛋白质组中, RUBP 羧化酶(加氧酶)的含量约占 50%~60%, 是叶绿体标志性的酶, 它是一个杂多聚体($\alpha 8\beta 8$), 由 8 个相同的大亚基和 8 个小亚基组成, 而大亚基是由叶绿体 DNA 的一个基因编码的, 其分子量为 55 kD, 小亚基则是由核 DNA 的一个多基因家族编码的, 其分子量为 15 kD, 因此可以根据 RUBP 羧化酶(加氧酶)在凝胶中的分子量和显色程度(蛋白质含量)检测叶绿体纯化的程度。比较电泳图谱可知, 在相同上样量的基

础上, 各泳道在条带分布及条带数量上基本保持一致, 而在个别条带的蛋白质含量上存在明显差异, 大约 55 kD 处, E 泳道的蛋白质含量明显比 C 和 D 泳道高, 背景更清晰; D 泳道蛋白质含量则相对较少, 背景模糊。因此, 结合镜检, 研究认为体系 B 的上层叶绿体完整性相对较差, 纯度不高, 蛋白质中次生代谢物质含量较高, 不适合叶绿体蛋白质组学的研究。

为了进一步确定合适的分离纯化方法及明确完整叶绿体蛋白质组的分布特点, 选用 7 cm, pH 3~10 的 IPG 胶条, 每胶条上样量 80 μ g, 采用固相 pH 梯

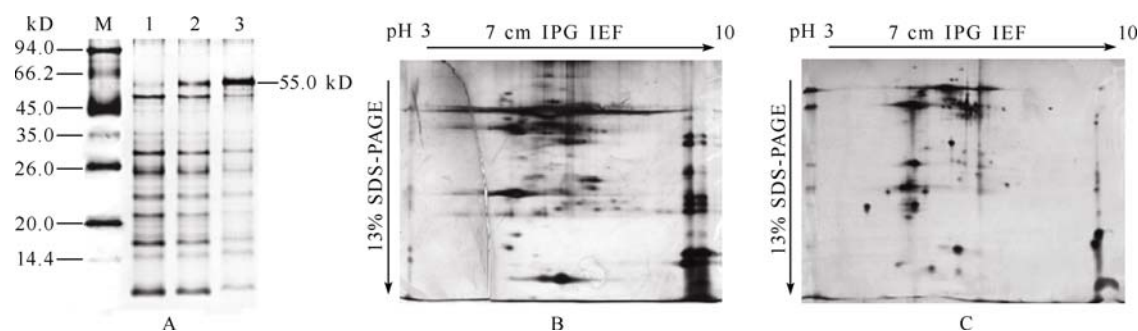


图 2 完整叶绿体蛋白质图谱

Fig. 2 Maps of floret intact chloroplast proteome

A: 叶绿体 SDS-PAGE(13%)电泳银染图谱, M: Marker; 1: B 管中提取的上层叶绿体蛋白(图 1-D); 2: A 管中提取的叶绿体蛋白(图 1-C); 3: B 管中提取的下层叶绿体蛋白(图 1-E)。B: 图 2-A 泳道 2 的叶绿体 2D-PAGE 电泳银染图谱。C: 图 2-A 泳道 3 的叶绿体 2D-PAGE 电泳银染图谱。

A: Silver-stained SDS-PAGE (13%) image of chloroplasts, M: Marker; 1: Chloroplast protein purified from the upper layer using the method of three-step sucrose density gradient (Fig. 1-D); 2: Chloroplast protein purified using the method of two-step sucrose density gradient (Fig. 1-C); 3: Chloroplast protein purified from the lower layer using the method of three-step sucrose density gradient (Fig. 1-E). B: Silver-stained 2D-PAGE image of chloroplasts in lane 2 of Fig. 2-A. C: Silver-stained 2D-PAGE image of chloroplasts in lane 3 of Fig. 2-A.

度 IEF/13% SDS-PAGE 双向电泳对图 1-C 和图 1-E 叶绿蛋白质进行分离(图 2-B), 经体系 A 提取的叶绿体(图 1-C)裂解出的蛋白质, 所得的 2-DE 图谱(图 2-B)蛋白点较模糊, 分辨率低, 横竖条纹干扰严重, 同时因为样品中含有大量的次生代谢物质, 等电聚焦时电流比较大。而体系 B 提取的叶绿体(图 1-E)所得的 2-DE 图谱(图 2-C)背景干净, 蛋白点清晰呈圆形, 横竖条纹干扰少。相比之下, 研究确定 30%、45%、60%的不连续蔗糖密度梯度离心的方法是较理想的分离纯化完整叶绿体的方法, 叶绿体蛋白质组主要集中在 pH 4~7 范围内。

2.3 不育系与可育系叶绿体蛋白组比较分析

选用 pH 4~7、17 cm IPG 胶条和 13% SDS-PAGE 凝胶电泳体系对不同处理材料的叶绿体蛋白进行

2-DE 分离, 在实验条件严格一致的情况下, 获得了分辨率较高和重复性较好的 2-DE 图谱(图 3), 经 PDQuest 软件包分析后, 生理型雄性不育系、保持系和遗传型雄性不育系在分子量 14.4~66.2 kD 之间可检测到的蛋白点数分别为 160、146 和 187。3 个材料共同表达 89 个蛋白质, 生理型不育系与保持系、遗传型不育系与保持系、生理型不育系与遗传型不育系共同表达的蛋白数分别为 15、21 和 40, 而生理型不育系、保持系和遗传型不育系分别独自表达 16、21 和 37 个蛋白(图 4)。图 5 是部分差异表达蛋白点的局部放大图和 3D 模式图。

2.4 差异表达蛋白 MALDI-TOF-MS 鉴定

经 MALDI-TOF-MS 分析两不育系中 6 个特异表达蛋白, 所得肽指纹图谱(PMF)经 Profound 和

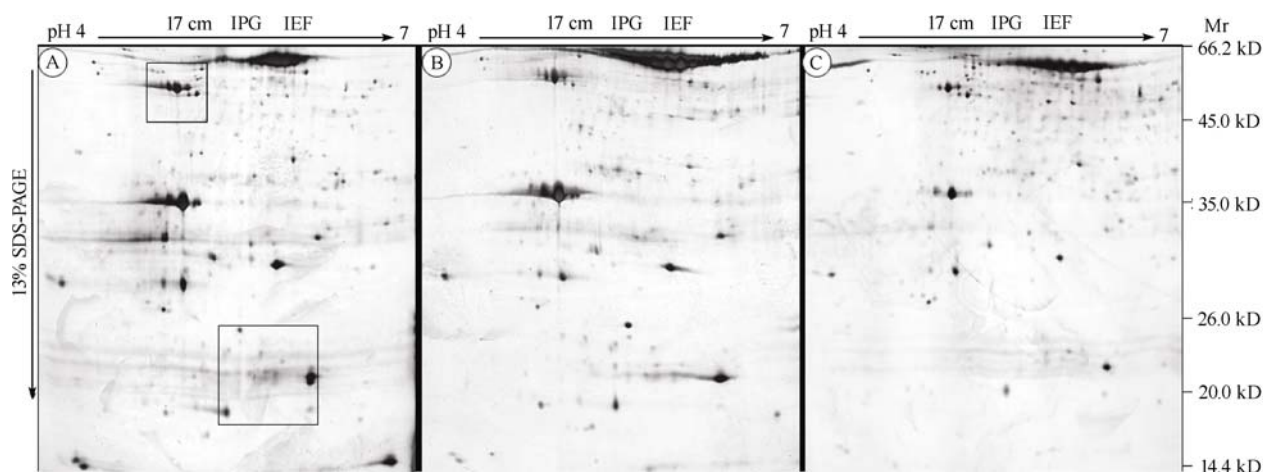


图 3 小麦 1376 单核早期两不育系和可育系间小花叶绿体蛋白差异的 2-DE 图谱(13% SDS-PAGE)

Fig. 3 2-DE maps of floret chloroplast protein among two male sterility and fertility lines in early uninucleate anther stage (13% SDS-PAGE)

A: 生理型雄性不育系小花叶绿体蛋白; B: 可育系小花叶绿体蛋白; C: 遗传型雄性不育系小花叶绿体蛋白。

A: Floret chloroplast protein from physiological male sterile line ms(A)-1376; B: Floret chloroplast protein from fertile line (A)-1376; C: Floret chloroplast protein from genetic male sterile line ms(S)-1376.

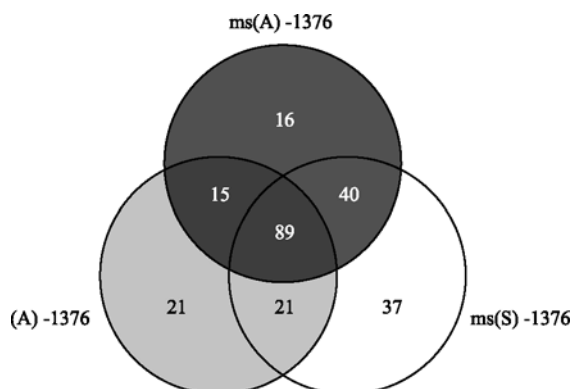


图 4 不育系与可育系单核早期小花叶绿体表达共有和特异蛋白数文氏图

Fig. 4 Comparison of total number of protein spots and unique co-expressed proteins in 2-DE among two male sterility and fertility lines illustrated with Venn diagram

Mascot 搜索 NCBI 数据库, 并结合双向凝胶电泳图谱综合分析, 鉴定为酰基辅酶 A 脱氢酶结构域蛋白、钙调结合蛋白磷酸酶、多催化功能肽酶、热休克蛋白 60、光受体蛋白 2 和 1 个未知功能蛋白(表 1)。

3 讨论

3.1 完整叶绿体的提纯

分离完整叶绿体有 3 个主要困难: (1)细胞壁包裹。破碎细胞的力量要能足以打破细胞壁的同时保持叶绿体的完整性, 因此本试验采用组织匀浆机中速间歇式破碎小麦颖花组织, 充分释放细胞壁包裹的叶绿体、线粒体等其他质体。(2)叶绿体中由于淀

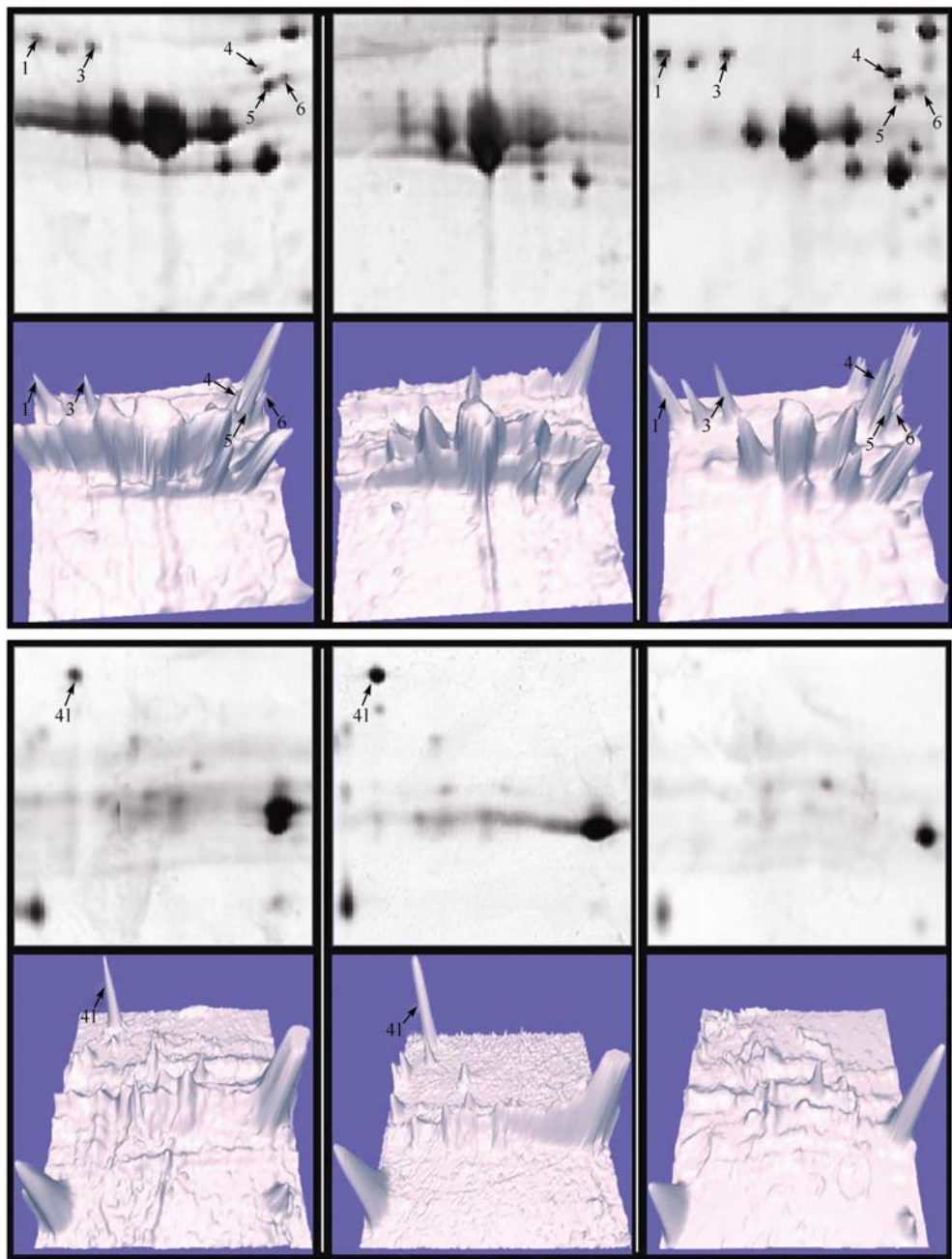


图 5 图 3 中部分差异表达蛋白的局部放大图和对应的三维效果图
Fig. 5 Magnified sections and 3D views of partial differentially expressed protein spots in the rectangles of Fig. 3

表 1 差异表达蛋白的 PMF 数据库检索的鉴定结果
Table 1 Differentially-expressed proteins identified by PMF query

编号 Spot No.	登录号 Acc. No.	理论 Mr/pI Theoretical Mr/pI	试验 Mr/pI Experimental Mr/pI	分值 Score	覆盖率 Sequence coverage (%)	匹配蛋白 Protein name	来源物种 Organism resource
1	gi 120599501	42.355/5.09	50.51/4.07	52	34	Acyl-CoA dehydrogenase domain protein	<i>Shewanella</i> sp. W3-18-1
3	gi 33440265	40.936/9.00	50.78/4.51	57	37	Calmodulin-binding protein phosphatase	<i>Physcomitrella patens</i>
4	gi 2511568	79.270/9.15	64.87/4.68	57	59	Multicatalytic endopeptidase	<i>Arabidopsis thaliana</i>
5	gi 161702919	56.794/6.54	51.04/4.70	54	22	Heat shock protein 60	<i>Ageratina adenophora</i>
6	gi 189085805	18.872/8.78	61.58/4.36	60	60	Phototropin 2	<i>Glandularia flava</i>
41	gi 71905591	20.503/9.02	24.75/5.38	40	25	Expressed protein	<i>Arabidopsis thaliana</i>

粉积累成致密颗粒会在离心过程中使叶绿体破碎,因此可以通过自然植物在短光照时间和/或低光照强度的条件下生长而得以消除淀粉的积累,在匀浆前将植物放在黑暗中 24~48 h 以除去淀粉。(3)匀浆过程中,液泡中储藏的有毒物质会释放出来;可以通过在研磨缓冲液中加入可溶解的聚乙烯吡咯烷酮(PVP)或牛血清白蛋白(BSA)和巯基化合物(β -巯基乙醇)来降低其毒害影响。

由于叶绿体和线粒体在细胞质中分布较多且较难分离,叶绿体中难免有大量线粒体污染;因此需根据其不同离心率的沉降速度增大离心速度,以此获得较纯净的叶绿体;两层蔗糖密度梯度离心技术分离效果较普通的差速离心效果好,但由于蔗糖浓度梯度不明显而分离效果一般,在两层蔗糖密度层之间有完整叶绿体也有破碎叶绿体,对后续蛋白沉淀效果不很好;而改进的三层蔗糖密度梯度离心技术是在原有基础上加一层 45%浓度的蔗糖,并替换 52%蔗糖为 60%,使梯度较为明显,从而更好地分离破碎叶绿体和完整叶绿体;其次,在密度梯度离心时,离心机的加速一定要缓慢,而减速时也要缓慢,否则会破坏蔗糖浓度梯度层。

取出离心管可以看到有 2 层绿色带,最上层的为破碎叶绿体,沉在底层的为白色粗颗粒,小心吸取出 45%~60%蔗糖之间界面上的完整叶绿体,转移到稀释的叶绿体悬浮介质快速离心洗涤 3 遍,为防止叶绿体吸水膨胀破裂,用等渗溶液离心洗涤,可得较完整纯净的叶绿体,以备后续沉淀叶绿体蛋白。

3.2 差异表达蛋白的功能推测

杀雄剂 SQ-1 诱导的生理型雄性不育系与其对应可育系及同核异质的遗传型雄性不育系细胞质遗传背景相同,属于等生理差异系和等基因差异系。本实验提取了完整纯化的叶绿体,排除线粒体的干扰后,生理型雄性不育系和可育系间的差异,即可能就是叶绿体中的差异;而遗传型雄性不育系和正常可育系间的差异既有叶绿体中引起雄性不育相关基因差异,还有种性之差。特别是有些蛋白在两不育系中表达而在可育系中未表达,表现出一定的差异性。如酰基辅酶 A 脱氢酶结构域蛋白、钙调结合蛋白磷酸酶、热休克蛋白 60、光受体蛋白 2、多催化功能肽酶在两不育系中表达而可育系中缺失;未知功能蛋白质点只在遗传型雄性不育系中特异表达;

与正常可育系相比,两不育系中也有一些蛋白明显下调表达,有些蛋白在生理型雄性不育系中明显上调表达而在遗传型雄性不育系未表现明显差异,这些差异蛋白是否与雄性不育直接相关,还有待深入研究以证实。

Spot1 被鉴定为酰基辅酶 A 脱氢酶结构域蛋白,此类蛋白直接或间接地参与生物能量及物质代谢过程。在植物生化代谢过程中,糖、脂肪、氨基酸分解代谢产生乙酰辅酶 A,进而合成脂肪酸、胆固醇、酮体等;植物体乙酰辅酶 A 通过三羧酸循环和氧化磷酸化彻底氧化产生 CO_2 、 H_2O ,释放能量推动 ATP 合成。酰基辅酶 A 脱氢酶结构域蛋白在氧化脱氢过程中调解底物酰基辅酶 A 的释放,并在特定的靶位点与脱氢酶相结合,直接或间接影响该生化代谢过程。本试验中酰基辅酶 A 脱氢酶结构域蛋白在两不育系中均特异表达,推测经杀雄剂诱导或其他信号刺激下,此蛋白异常表达,与底物酰基辅酶 A 结合使酰基辅酶供应不足从而阻碍正常的三羧酸循环或氧化磷酸化过程,进而抑制能量 ATP 的合成,对植物正常的生化代谢起负调控作用,从而使细胞代谢失调,导致不育;赵虎基等^[17]发现禾本科植物叶绿体中乙酰辅酶 A 羧化酶是催化脂肪酸生物合成中的第一个关键酶,也是禾本科除草剂的靶蛋白。因此推测,小麦叶绿体中的酰基辅酶 A 脱氢酶是杀雄剂 SQ-1 的靶蛋白,它们在一定作用位点相结合,影响叶绿体内某些能量或物质代谢进而引起不育。

Spot3 被鉴定为钙调结合蛋白磷酸酶,此酶是一种唯一受 Ca^{2+} 调节的蛋白磷酸酶,是生物体内蛋白磷酸化和可逆蛋白磷酸化过程的重要组成部分,植物通过可逆性磷酸化调节细胞内许多信号转导反应,调控细胞的代谢、增殖、发育与分化、程序性死亡等^[18];蛋白磷酸酶亚基 PP2A 还参与细胞周期、DNA 复制、信号转导、分化、凋亡和细胞恶性转化等细胞生物学过程^[19];马伯军等^[20]证明水稻钙调磷酸酶 B 亚基蛋白基因在盐害等逆境中显著表达,维持植物细胞内 K^+ 和 Na^+ 的稳态,提高了植物的耐盐性;孔令安等^[21]以裸子植物青杆(*Picea wilsonii* Mast)花粉为材料,研究表明蛋白磷酸酶 PP1/PP2A 参与 ABA、病原侵染、胁迫及发育信号转导途径,调控花粉管生长过程中胞外分泌活性;PP1/PP2A 通过可逆磷酸化调节花粉管中 Ca^{2+} 梯度,从而调控花粉萌发和花粉管极性生长。在本试验中两不育系叶绿

体钙调结合蛋白磷酸酶均特异表达,和上述研究胁迫条件下相一致,推测在杀雄剂处理后,或遗传型雄性不育系受某种信号刺激或其他因素诱导后,小麦叶绿体内钙调结合蛋白磷酸酶异常表达,并受钙离子调控加速磷酸化过程从而使可逆磷酸化受阻,导致植株的不育。

Spot4 被鉴定为多催化功能肽酶,又称蛋白酶和蛋白水解酶,能够水解肽链并活化各种蛋白质,具有多重催化功能;生物在受到胁迫或代谢紊乱时,机体内某些物质如核酸、光合色素、蛋白质、激素含量都会发生相应的变化,参与这些代谢的蛋白水解酶大量合成进而引起蛋白或叶绿素等物质水解。本试验中两不育系此种蛋白酶过量表达,推测在杀雄剂或其他因素刺激下,细胞内正常代谢紊乱,机体受到胁迫,从而促使此蛋白酶过量表达,引起细胞内育性相关蛋白的水解,导致植株不育;也可能是不育现象发生后,机体内信号机制作用于各个代谢,并导致机体一些物质如光合色素、激素降解及育性相关蛋白水解等。至于与雄性不育之间的关系,还需要进一步研究。

Spot5 经鉴定为热休克蛋白 60 (heat shock protein 60, HSP)。此类蛋白是结构高度保守并可被热胁迫诱导表达的蛋白,占细胞总量 5%~10%,是维持细胞生命活动所必需的;在细胞增生、胚胎分化、生长发育、激素刺激等生理条件下热休克蛋白均可以表达。动物中它主要作为线粒体分子伴侣维持线粒体正常结构及功能,并能减少线粒体产生氧自由基;在胞浆中可与凋亡相关因子互作而抑制细胞的凋亡;向珣等^[22]研究发现植物热休克蛋白主要存在于细胞质叶绿体和内质网中,并进一步发现大量的热激蛋白以膜外周蛋白的形式连接在质膜和液胞膜上,与膜蛋白分子互作,阻止膜蛋白变性从而稳定膜系统;张俊环等^[23]对葡萄叶片热激蛋白 sHSP17.6 的亚细胞定位发现其主要分布在叶绿体的片层膜、线粒体、细胞核的核仁和核质以及胞质中,但是以叶绿体上的颗粒密度最大;王丽等^[24]发现叶绿体内小分子量热休克蛋白过量表达可提高植物的抗寒性;杨传燕等^[25]发现番茄叶绿体小分子热激蛋白的过量表达提高了植株的基础耐热性。小分子热激蛋白在提高植物细胞抗热能力、抑制细胞凋亡、促进细胞骨架形成、保护细胞结构、增强耐脱水能力、制约离子吸收、以及渗透调节等生理代谢中至关重要;

除此之外,在保护电子传递链(线粒体 sHSPs)和光系统 II 的电子传递(叶绿体 sHSPs)等过程中有很大作用。本研究中 HSP 在两种不育材料中特异表达,推测杀雄剂处理或不育现象发生后,小麦细胞内保护机制促使此类热休克蛋白异常表达,维持小麦叶绿体内光系统有效电子传递,并维持正常气孔闭合进程,提高小麦细胞防御能力,进而维持小麦叶绿体内光合作用及其他物质能量代谢的正常运行。

Spot6 经鉴定是一种光受体蛋白 2,首次在拟南芥中发现,是植物叶绿体内一类重要的蛋白。植物通过光受体感受光线的波长、大小及强弱而调节自身生长发育;其中蓝光受体 Phototropin-1, Phototropin-2 主要靠介导向光生长,叶绿体移动,叶片伸展,气孔开闭等生理应答而调节植物捕获光能,降低光伤害,吸收二氧化碳,从而促进植物光合作用。植物遗传分析发现^[26] phot1 和 phot2 参与了拟南芥叶片蓝光诱导的胞质 Ca^{2+} 浓度短暂升高,并且激活了叶肉细胞中的 Ca^{2+} 通道。Gilliberto 等^[27]研究发现,Phototropin-2 过量表达会导致番茄色素大量合成;曹双河等^[28]在光敏雄性不育中发现光受体蛋白与光诱导雄性不育具有很大相关性。在本研究中,两不育系中光受体蛋白 2 相对于可育系特异表达,推测小麦小花在受到杀雄剂的胁迫或其他因素引起的自身代谢紊乱时,光合作用受阻,该光受体蛋白 2 特异表达,直接或间接调节叶绿体内光合作用机制,并参与不育系叶绿体代谢的防卫机制从而最大可能地维持物质能量代谢进程。

Spot41 是首次在拟南芥中发现并定位于叶绿体内的一种功能未知蛋白,此蛋白质在叶绿体上呈点状分布,据推测可能为叶绿体内膜转位蛋白^[29]。本研究中此蛋白在杀雄剂诱导的生理型雄性不育系和正常可育系中均显著表达而遗传型雄性不育系中未表达,表明此蛋白表达可能与杀雄剂诱导不育无直接关系,也可能是由于种性差异导致两种细胞质背景[(S)型和(A)型],即叶绿体本身的差异。当然,也不排除它是存在于叶绿体遗传系统内与遗传型不育相关的蛋白,因为生理型不育事实上很可能是育性基因在转录过程中所产生的系列变异,因为这种不育性是生理型的,不会传递给后代;而遗传型不育事实上是原育性功能基因的表达,可以上下代间传递。由于蛋白信息数据库有限,有关叶绿体蛋白研究报道还甚少,对其功能鉴定还没有明确定位,因

此, 对于此蛋白的具体生理功能及与雄性不育的关系还有待研究。

4 结论

改进的 30%、45%和 60%蔗糖密度梯度离心和离心机缓慢加速、降速能提取较完整的纯净叶绿体。发现 6 个差异表达蛋白, 分别为植物代谢相关的酰基辅酶 A 脱氢酶结构域蛋白、与叶绿体细胞内信号转导相关的钙调结合蛋白磷酸酶、与肽链水解及蛋白质活化有关的多催化功能肽酶、叶绿体防卫机制相关的热休克蛋白 60、保护光电子传递系统及有效传递的光受体蛋白 2 及一种功能未知蛋白。这些叶绿体内蛋白可能在雄性不育过程中起着重要作用。但其作用的因果关系目前还不清楚, 需进一步研究。

References

- [1] Liu Z-C(刘祚昌), Li J-G(李继耕), Luo H-X(罗会馨), Chen F-T(陈福太). Studies on the ribulose biphosphate carboxylase and cytoplasmic male-sterility. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 1983, 10(1): 36–42 (in Chinese with English abstract)
- [2] Pei Y-X(裴雁曦), Chen Z-J(陈竹君), Cao J-S(曹家树). Comparative study on polypeptides of mitochondria and chloroplast between the male cytoplasmic sterile line and its maintainer line in tuber mustard (*Brassica juncea* Coss. var. *tumida*). *Acta Bot Boreali-Occident Sin* (西北植物学报), 2004, 24(8): 1511–1513 (in Chinese with English abstract)
- [3] Li J-G(李继耕), Gao W-Q(高文琴). Studies on the chloroplast ultrastructure in the cytoplasmic male-sterile line and its maintainer of *Brassica napus*. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 1983, 10(4): 280–282 (in Chinese with English abstract)
- [4] Li J-Y(李家洋), Li J-G(李继耕). Chloroplast thylakoid membrane polypeptides and cytoplasmic male sterility. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 1986, 13(6): 430–436 (in Chinese with English abstract)
- [5] Ying Y-R(应燕如), Ni D-Z(倪大洲), Cai Y-X(蔡以欣). Comparative analysis of the fraction I protein in rice, wheat, rape and tobacco cytoplasmic male sterile systems. *Acta Genet Sin* (遗传学报), 1989, 16(5): 362–366 (in Chinese with English abstract)
- [6] Zhang L-Y(张龙雨), Li H-X(李红霞), Zhang G-S(张改生), Wang J-S(王俊生), Han Y-F(韩艳芬), Yuan Z-J(袁正杰), Niu N(牛娜), Ma S-C(马守才). Cloning and expression analysis of *cMDH* gene related to cytoplasmic male sterile wheat with *Aegilops kotschyi* cytoplasm. *Acta Agron Sin* (作物学报), 2009, 35(9): 1620–1627 (in Chinese with English abstract)
- [7] Guo Y-P(郭艳萍), Wei F(位芳), Zhang G-S(张改生), Cheng H-G(程海刚), Song Y-L(宋瑜龙), Wang Q(王青), Niu N(牛娜), Ma S-C(马守才), Li H-X(李红霞). Molecular and cytological analyses of 1BL/1RS wheat and fertility-restoring locations for male sterile lines with *Aegilops* cytoplasm. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2010, 43(14): 2839–2847 (in Chinese with English abstract)
- [8] Wang J-S(王俊生), Yuan L(袁蕾), Zhang M-Z(张明珠), Zhang G-S(张改生), Niu N(牛娜), Ma S-C(马守才), Li H-X(李红霞). Expression of Ubiquitin-26S proteasome pathway in physiological male sterility of wheat induced by chemical hybrid agents SQ-1. *J Agric Biotechnol* (农业生物技术学报), 2010, 18(4): 695–701 (in Chinese with English abstract)
- [9] Zhang M-Z(张明珠), Yuan L(袁蕾), Wang J-S(王俊生), Zhang G-S(张改生), Guo W-J(郭文江), Zhang L-Y(张龙雨). Expressing analysis of *cACO* gene in male sterile wheat induced by chemical hybridizing agent SQ-1. *Chin J Biochem Mol Biol* (中国生物化学与分子生物学报), 2010, 26(8): 740–748 (in Chinese with English abstract)
- [10] Elias B A, Givan C V. Density gradient and differential centrifugation methods for chloroplast purification and enzyme localization in leaf tissue. *Planta*, 1978, 142: 317–320
- [11] Chen Y-W(陈云伟), Zhang N-H(张年辉), Zhao Y(赵云), Du L-F(杜林方), Nakai M. Preparation of envelope membrane of rape chloroplast and detection of *Toc33*. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), 2004, 40(2): 223–225 (in Chinese)
- [12] Sun Q(孙群), Hu J-J(胡景江). Techniques for Plant Physiology Research (植物生理学研究技术). Yangling: Northwest A & F University Press, 2005. pp 127–131 (in Chinese)
- [13] Chen R-H(陈蕊红), Ye J-X(叶景秀), Zhang G-S(张改生), Wang J-S(王俊生), Niu N(牛娜), Ma S-C(马守才), Zhao J-X(赵继新), Zhu J-C(朱建楚). Differential proteomic analysis of anther proteins between cytoplasmic-nuclear male sterility line and its maintainer in wheat (*Triticum aestivum* L.). *Prog Biochem Biophys* (生物化学与生物物理进展), 2009, 36(4): 431–440 (in Chinese with English abstract)
- [14] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities utilizing the principle of protein dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248–254
- [15] Ye J-X(叶景秀), Chen R-H(陈蕊红), Zhang G-S(张改生), Wang J-S(王俊生), Wang S-P(王书平), Li L(李莉), Niu N(牛娜), Ma S-C(马守才), Li H-X(李红霞), Zhu J-C(朱建楚). Analysis on anther proteins of wheat male sterile line induced by chemical hybridizing agent SQ-1. *J Agric Biotechnol* (农业生物技术学报),

- 2009, 17(5): 858–864 (in Chinese with English abstract)
- [16] Ye J-X(叶景秀), Zhang G-S(张改生), Wang S-P(王书平), Chen R-H(陈蕊红), Wang J-S(王俊生), Niu N(牛娜), Ma S-C(马守才), Li H-X(李红霞), Zhu J-C(朱建楚). Differential proteomic studies on pollen grain proteins of wheat male sterile line induced by chemical hybridizing agent SQ. *Chin J Biochem Mol Biol* (中国生物化学与分子生物学报), 2009, 25(10): 949–957 (in Chinese with English abstract)
- [17] Zhao H-J(赵虎基), Wang J-H(王建华), Gao P(高鹏), Gu R-L(顾日良), Zhang J-Q(张京强), Wang T-Y(王天宇), Wang G-Y(王国英). Cloning of plastid acetyl-CoA carboxylase cDNA from *Setaria italica* and sequence analysis of graminicide target site. *Acta Bot Sin* (植物学报), 2004, 46(6): 751–756 (in Chinese with English abstract)
- [18] Liu S-H(刘诗航), Wang C-X(王彩香), Mao X-G(毛新国), Liu H-M(刘惠民), Li A(李昂), Jing R-L(景蕊莲). Cloning of protein phosphatase 2A regulatory subunit gene *TaB β -1* and its expression patterns under abiotic stresses in wheat. *Sci Agric Sin* (中国农业科学), 2010, 43(11): 2197–2208 (in Chinese with English abstract)
- [19] Tang Z(唐征), Yang K(杨凯), Feng Y-Q(冯永庆), Qin L(秦岭). Cloning and homology analysis of chestnut protein phosphatase PP2A catalytic subunit gene. *J Beijing Univ Agric* (北京农学院学报), 2009, 24(2): 1–4 (in Chinese with English abstract)
- [20] Ma B-J(马伯军), Gu Z-M(顾志敏), Tang H-J(唐海娟), Chen X-F(陈析丰), Liu F(刘峰), Zhang H-S(张红生). Preliminary study on the function of calcineurin B-like protein gene *OsCBL8* in rice. *Chin J Rice Sci* (中国水稻科学), 2009, 23(2): 127–134 (in Chinese with English abstract)
- [21] Kong L A, Wang M, Wang Q L, Wang X H, Lin J X. Protein phosphatase 1 and/or 2A is involved in the regulation of calcium uptake and pollen tube development in *Picea wislonii*. *Tree Physiol*, 2006, 26: 1001–1012
- [22] Xiang X(向珣), Li C-Q(李成琼), Lei J-J(雷建军). Research of HSPs and heat resistance. *Northern Hortic* (北方园艺), 1999, (4): 9–10 (in Chinese)
- [23] Zhang J-H(张俊环), Huang W-D(黄卫东). Cold acclimation induce the changes in the sub-cellular distribution of small heat shock protein 17.6 in young grape leaves during heat stress. *Acta Agric Boreali-Sin* (华北农学报), 2009, 24(2): 8–11 (in Chinese with English abstract)
- [24] Wang L, Zhao C M, Wang Y J, Liu J. Over-expression of chloroplast-localized small molecular heat-shock protein enhances chilling tolerance in tomato plant. *Acta Photophysiol Sin*, 2005, 31(2): 167–174
- [25] Yang C-Y(杨传燕), Wang C(王翠), Zhang J-X(张景霞), Wang J-Y(王佳颖), Wang L(王丽), Liu J(刘箭). Over-expression of chloroplast-localized small molecular heat-shock protein enhances the thermotolerance in plant. *J Shandong Normal Univ* (Nat Sci) (山东师范大学学报·自然科学版), 2008, 23(4): 106–108 (in Chinese with English abstract)
- [26] Stoelzle S, Kagawa V, Wada M, Hedrich R, Dietrich P. Blue light activates calcium-permeable channels in *Arabidopsis* mesophyll cells via the phototropin signaling pathway. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 1456–1461
- [27] Gilliberto L, Perrotta G, Pallara P. Manipulation of the blue light photo-receptor cryptochrome 2 in tomato affects vegetative development, flower in time, and fruit antioxidant content. *J Plant Physiol*, 2005, 137: 199–208
- [28] Cao S-H(曹双河), Zhang X-Q(张相岐), Zhang A-M(张爱民). Review of the molecular regulation mechanism and genetics of photoperiod- and/or thermosensitive male sterility. *Bull Bot* (植物学通报), 2005, 22(1): 19–26 (in Chinese with English abstract)
- [29] Cui Y-L(崔永兰), Wang P-C(王鹏程), Yang Z-N(杨仲南), Zhang S(张森). Chloroplast localization of the expressed protein encoded by *At3g61870* in *Arabidopsis thaliana*. *Acta Bot Sin* (西北植物学报), 2008, 28(4): 662–666 (in Chinese with English abstract)