

苹果实生树阶段转变特异蛋白质的 SDS-PAGE 分析

曾广娟^{1,2}, 李春敏¹, 张新忠^{3*}, 田 义², 陈东玫¹, 赵永波¹, 董文轩²

(¹ 河北省农林科学院昌黎果树研究所, 河北昌黎 066600; ² 沈阳农业大学园艺学院, 沈阳 110161; ³ 中国农业大学园艺植物研究所, 北京 100094)

摘 要: 利用聚丙烯酰胺凝胶电泳技术 (SDS-PAGE) 分析了 6 株苹果实生树 (‘红玉’ × ‘金冠’) 叶片中蛋白质随节位升高的动态变化。结果表明, 随节位升高蛋白质带发生变化, 共发现了 3 条阶段转变特异蛋白质带, 分子量分别为 55 kD、19 kD 和 17 kD。其中 55 kD 蛋白质表现为定性变化, 有 5 株实生树在 36~75 节出现, 到 101~126 节消失; 19 kD 蛋白质在实生树低节位含量高, 在 86~100 节之后含量突然降低; 17 kD 蛋白质在实生树低节位含量低, 随着植株的发育蛋白质在 36~50 节含量突然增加并保持稳定, 到 91~105 节后含量突然下降。认为这 3 种蛋白质是苹果实生树阶段转变的特异蛋白质。

关键词: 苹果; 阶段转变; 蛋白质; SDS-PAGE

中图分类号: S 661.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2008) 07-1059-06

SDS-PAGE Analysis of Phase Change-related Proteins in Apple (*Malus domestica* Borhk.)

ZENG Guang-juan^{1,2}, LI Chun-min¹, ZHANG Xin-zhong^{3*}, TIAN Yi², CHEN Dong-mei¹, ZHAO Yong-bo¹, and DONG Wen-xuan²

(¹ Changli Institute of Pomology, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Changli, Hebei 066600, China; ² College of Horticulture, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China; ³ Institute for Horticultural Plants, China Agricultural University, Beijing 100094, China)

Abstract: Dynamic changes of proteins in leaves from different nodes in 6 hybrid seedlings (Jonathan × Golden Delicious) were analyzed with SDS-polyacrylamide gel electrophoresis in apple. Three protein bands were found specific in different phases. The molecular mass of the 3 protein bands were approximately 55 kD, 19 kD and 17 kD. The 55 kD protein presented qualitatively between No. 36 - 75 and No. 101 - 126 nodes. The change of 19 kD and 17 kD proteins was found quantitatively. In leaf samples taken below nodes No. 86 - 100, the content of 19 kD protein was higher, but a sharp decrease occurred in leaves above nodes No. 100. The content of 17 kD protein kept high between No. 36 - 50 and No. 91 - 105 nodes. It is therefore suggested that the 3 proteins were phase change-related in apple seedlings.

Key words: *Malus domestica*; phase change; protein; SDS-PAGE

木本被子植物的个体发育分为童期 (juvenile phase)、成年营养生长期 (adult vegetative phase) 和生殖生长期 (reproductive phase) (Poethig, 1990)。处于童期的植株即使给予成花诱导措施, 仍不能成花, 随着发育, 植株逐渐具备成花潜力, 这一阶段实生树体内发生着由童性向成熟的转变, 这一连续的渐进的生理过程称为阶段转变 (Hackett, 1983)。

收稿日期: 2008-01-21; 修回日期: 2008-06-11

基金项目: 河北省自然科学基金项目 (C2007000967)

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: zhangxinzhong999@126.com)

Zhang 等 (2007) 研究苹果实生树个体发育过程中内源多酚的动态变化, 发现童期、成年营养生长期和生殖生长期分别出现多酚的变化, 而且随节位升高, 苹果实生树叶片、芽、韧皮部中内源细胞分裂素含量发生明显变化 (Zhang et al., 2006)。植物阶段转变过程中体内发生的一切生理变化均是由一系列基因调控的, 蛋白质是基因表达的产物, 植物阶段转变的过程必然伴随着蛋白质定性或定量的变化。因此, 与阶段转变密切相关的特异蛋白质的分离及鉴定对认识多年生木本被子植物阶段转变的分子机制具有重要意义。

研究发现高等植物阶段转变过程中存在着小分子量蛋白质的变化。许多植物上曾发现童期特异蛋白质。如巨杉 (*Sequoiadendron giganteum*) 童期组织中有一种与膜相关的蛋白质 J16, 分子量为 16 kD, 在成龄期组织中却检测不到 (Bon, 1988)。相反, 有些植物上存在成龄期特异的蛋白质, 如板栗成龄区枝条组培苗中有 38 kD 和 43.6 kD 的两条特异蛋白质带, 但童期枝条的组培苗中没有检测到 (Amo-Marco et al., 1993)。另一些植物既能检测到童期特异蛋白质, 又能检测到成龄期特异蛋白质。Hackett 等 (1991) 在洋常春藤 (*Hedera helix*) 童期叶柄中鉴定出了分子量 25 kD、等电点 PI 9 的特异性多肽, 而在成龄态叶柄中检测到分子量 28 kD、等电点 PI 5.3 的专一性多肽。在北美红杉 (*Sequoia sempervirens*) 中发现磷酸化的 32 kD 蛋白质仅在成熟期出现, 而在童期的细胞中却检测到了被磷酸化的分子量为 31 kD 的特异蛋白质 (Kuo et al., 1995)。还有许多植物中虽未能检测到与童期、生殖生长期相关的特异蛋白质的定性差异, 但检测到了某些蛋白质含量的变化。Besford 等 (1996) 在甜樱桃 (*Prunus avium*) 童期茎尖上发现过量表达的 12 kD 蛋白质。而 Hand 等 (1996) 在甜樱桃上发现 28 kD 的多肽在童期茎尖含量丰富。在柑桔成龄组织中多量表达的是 59.7 kD 的蛋白质 (Snowball et al., 1991)。Garcia 等 (2000) 在橄榄 (*Olea europaea*) 上发现 29 kD 的多肽在童期叶片组织中多量表达, 而 35 kD 蛋白质在成龄组织中高量表达。Huang 等 (2003) 在北美红杉的童期组织中发现 36、44、46 kD 蛋白质大量表达, 29 kD 蛋白质含量较少, 成龄态组织中含有更多量的 34、36 kD 蛋白质。

本研究利用 SDS-PAGE 技术分析苹果实生树不同节位叶片的蛋白质动态变化, 为进一步研究阶段转变的生理和分子机制奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

选取生长一致的 4 年生苹果杂种实生树 ('红玉' × '金冠') 6 株 (株系号分别为: 02-16-116, 02-17-042, 02-17-115, 02-18-034, 02-18-126, 02-19-132)。2007 年春季萌芽后每株实生树从根茎部选留基生萌蘖, 从树干中部选留旺盛新梢。6 月 6 日分别采集基生萌蘖、与基生萌蘖有部分节位重叠的树干中部旺盛新梢、以及与树干中部旺盛新梢有部分节位重叠的树冠内新梢的叶片, 每株树单独取样, 从根茎部开始, 每 5 节为一样品。样品采集完毕迅速放入冰盒内带回实验室, 用液氮处理后装入保鲜袋, 置 -40 °C 冰箱备用。

1.2 蛋白质提取

蛋白质提取参照谷瑞升等 (1999) 的 Tris-HCl 法, 有所改进。取冷冻叶片, 液氮研磨, 准确称取 0.5 g 粉末置 10 mL 离心管中, 加入 0.3 g PVPP 和 4.5 mL 蛋白质提取缓冲液 (62.5 mmol · L⁻¹ Tris-HCl pH 6.8, 0.5% SDS, 10% 甘油, 5% 巯基乙醇), 涡旋 30 s, 4 °C 放置 1 h, 充分溶解蛋白质。放置后的样品摇匀, 4 °C 12 000 × g 离心 20 min, 取上清液 1.5 mL 转移至 10 mL 离心管中, 加入 4.5 mL 预冷丙酮, 摇匀, -20 °C 放置 1 h 沉降蛋白质, 之后 4 °C 5 000 × g 离心 10 min。弃上清液, 沉淀在 -20 °C 下放置 1 h, 使丙酮完全挥发。加入 250 μL 上样缓冲液溶解蛋白质 (62.5 mmol · L⁻¹ Tris-HCl pH 6.8, 10% 甘油, 5% 巯基乙醇), 其间涡旋 3~4 次, 1 h 后 4 °C 12 000 × g 离心 20 min, 取上

清液 200 μL , 加入 40 μL 10% SDS 和痕量溴酚蓝, 混匀后在沸水浴中热处理 5 min, 冷却至室温即为待测蛋白质溶液。

1.3 SDS-PAGE

采用不连续双垂直板 (22.0 cm \times 14.5 cm \times 1.0 mm) 聚丙烯酰胺凝胶电泳 (PAGE), 北京市六一仪器厂 DYY-11B 型三恒电泳仪。分离胶浓度 12.5%, 浓缩胶 4%, 将 15 g Tris, 72 g 甘氨酸, 5 g SDS 溶于 1 L 去离子水中即为 5 倍电极缓冲液, 用时稀释 5 倍。预电泳 1 h。上样量 5 μL , 开始电流 15 mA, 进入分离胶后 25 mA。电泳时间: 2.0 ~ 2.5 h。银染显色, 每样品 2 次重复。凝胶用 UMAX Powerlook 2100XL (日本) 扫描仪扫描, 实际测量溴酚蓝的距离和蛋白质谱带的距离, 计算迁移率, 绘制蛋白质标准曲线图, 估算特异蛋白质分子量。低分子量标准蛋白质分子量范围: 14.4 ~ 97.4 kD (购自上海生工)。

2 结果与分析

2.1 特异蛋白质带的确定

随实生树节位升高, 蛋白质带发生变化, 不同实生树有所不同。供试的 6 株实生树中共检测到 3 条共同的差异蛋白质带 B_1 、 B_2 和 B_3 (图 1)。

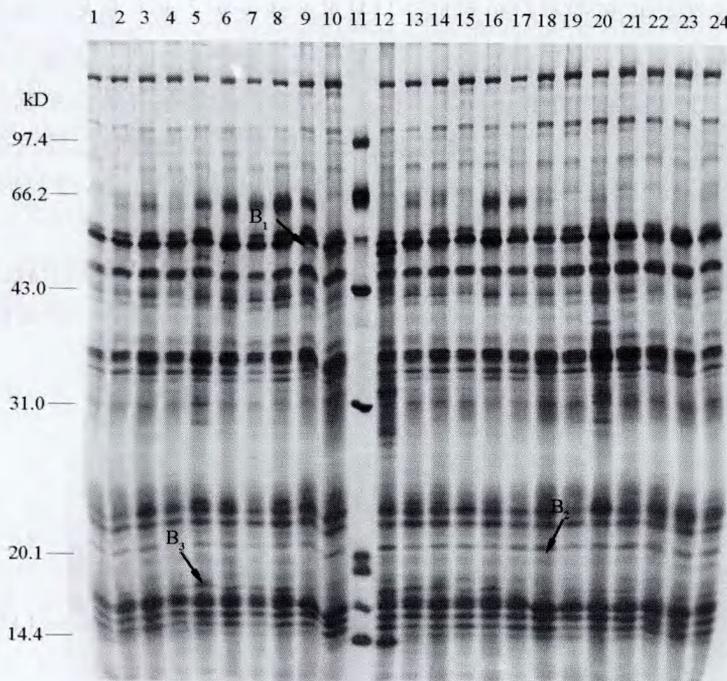


图 1 苹果实生树 (02-16-116) 叶片蛋白质 SDS-PAGE 电泳

从左至右第 1 泳道 31 ~ 35 节, 第 2 泳道 36 ~ 40 节, 依次向右, 每 5 节为一样品 (第 11 泳道为标准分子量蛋白质), 最右泳道为 141 ~ 145 节。

B_1 (58.1 kD), B_2 (19.0 kD), B_3 (17.1 kD)。

Fig. 1 SDS-PAGE electrophoresis gel images of protein in apple seedlings

From left to right; the 1st line is 31 - 35 nodes, the 2nd line is 36 - 40 nodes, and analogically, the last line is 141 - 145 nodes. The 11th line is the marker.

B_1 (58.1 kD), B_2 (19.0 kD), B_3 (17.1 kD).

3 条带的分子量估算结果如表 1 所示, 取众值得到 3 条蛋白质带的分子量分别是 55 kD、19 kD 和 17 kD。其中 55 kD 蛋白质带表现为定性差异, 只在生长发育的特定时期出现。19 kD 和 17 kD 的两条蛋白质带在实生树的某些节位含量高, 而后含量突然降低, 为定量差异。3 条谱带株间重复较好, 节位差别较小。因此认为上述 3 条蛋白质带为苹果实生树阶段转变的特异蛋白质带。

表 1 3 种特异蛋白质的分子量

Table 1 Mass of three specific proteins of apple seedlings

序号 No.	实生树株号 Seedlings No.	谱带 1(B ₁)/kD Band 1(B ₁)	谱带 2(B ₂)/kD Band 2(B ₂)	谱带 3(B ₃)/kD Band 3(B ₃)
1	02-16-116	58.1	19.0	17.1
2	02-17-042	55.0	19.0	
3	02-17-115	53.6	19.9	16.5
4	02-18-034	55.0	18.6	17.0
5	02-18-126	56.6	19.0	17.0
6	02-19-132	54.5	18.5	16.7
取众值 Mode		55	19	17

2.2 特异蛋白质在单株上的变化趋势及临界节位的确定

如图 2 所示, 3 条特异蛋白质带在 6 株实生树上变化趋势基本一致。在同一单株上, 55 kD 蛋白质在 19 kD 和 17 kD 两种蛋白质含量均高时出现, 在它们含量降低后消失, 表现为定性差异。

随实生树节位升高, 55 kD 蛋白质在不同实生树上出现和消失的临界节位单株间有差异, 但随实生树节位升高出现 2 个定性的临界点, 有 5 株实生树 55 kD 蛋白质出现的临界点在 36~75 节之间, 其消失的临界节位在 101~126 节之间。实生单株 '02-17-042' (株号 2) 的 55 kD 蛋白质变化的临界节位较其它 5 株偏高, 从 101~105 节开始出现, 146~150 节开始消失。

19 kD 蛋白质在实生树低节位含量高且含量稳定, 到特定节位后含量突然下降。随实生树节位升高, 6 株实生树 19 kD 蛋白质含量变化只有 1 个临界点。其中 5 株实生树 19 kD 蛋白质含量骤然下降

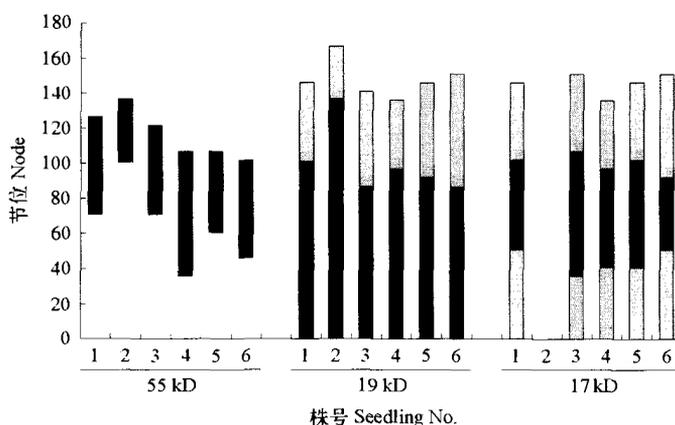


图 2 苹果阶段转变特异蛋白质在不同实生树的动态变化

黑色代表蛋白质含量高, 灰色代表蛋白质含量下降, 1~6 分别代表实生树 02-16-116、02-17-042、02-17-115、02-18-034、02-18-126、02-19-132。

Fig. 2 The regulation and critical node of 3 specific protein in six apple hybrid seedlings

Black represented high content of protein, grey represented low content of protein, 1~6 represented seedlings No. 02-16-116, 02-17-042, 02-17-115, 02-18-034, 02-18-126, 02-19-132.

的临界节位均出现在 86 ~ 100 节, 单株 '02-17-042' 与其它单株差异稍大, 19 kD 蛋白质含量下降的临界节位出现在 131 ~ 135 节。

17 kD 的蛋白质在实生树低节位含量低, 生长到一定节位后含量突然增加并保持稳定, 直到较高节位又突然下降。随实生树节位升高, 17 kD 蛋白质含量变化出现 2 个临界点, 而且在所测定的 5 株实生树上其临界节位相差不大。2 个临界点分别是 36 ~ 50 节和 91 ~ 105 节。从 36 ~ 50 节开始, 17 kD 蛋白质含量突然增加并保持稳定, 91 ~ 105 节之后含量突然降低, '02-17-042' 单株重复试验中未能检测到 17 kD 蛋白质带的变化。

以上结果说明虽然实生树株间特异蛋白质变化的临界节位略有不同, 但总趋势一致。

3 讨论

本研究发现的苹果实生树阶段转变的 3 条特异蛋白质带在 6 株实生树上变化的趋势和规律一致, 但临界节位株间有差异, 尤其是实生树 '02-17-042' 检测到的 55 kD 和 19 kD 蛋白质出现和消失的临界节位均远高于其它实生树。盛炳成等 (1992) 曾对 7 个苹果不同的杂交组合进行研究, 指出苹果实生树不同杂交组合童期长短不同, 同一杂交组合不同单株之间童期长短也不同。不同实生单株间阶段转变临界点存在差异是必然。

SDS-PAGE 图谱上的一个条带中既可能含有一种蛋白质组分, 也可能存在分子量大致相同的多种蛋白质。本试验依据电泳图谱得到的 17 kD 和 19 kD 两条蛋白质条带, 不同节位间存在条带染色程度差异, 既有可能是一种蛋白质或几种蛋白质含量变化所致, 也可能是条带内蛋白质组分出现定性差异所致。

依迁移率估算特异蛋白质带的分子量, 是 SDS-PAGE 技术的通用方法, 虽然在不同实生树的电泳图上所测分子量不同, 但根据蛋白质条带的相对位置及带型特征进行判定可以确认所获得的 3 条蛋白质带即 B₁、B₂、B₃ 的每条带在不同实生树单株间是相同的。

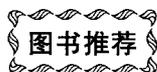
本试验在 6 株实生树上检测到了 3 条共同的蛋白质带, 既有定性差异的蛋白质带, 也有定量差异的蛋白质带, 说明在实生树个体发育过程中存在蛋白质定性和定量差异。这与 Zhang 等 (2007) 对苹果实生树个体发育过程中内源多酚动态变化的研究中发现阶段转变过程中分别存在根皮苷、槲皮素、杨梅苷、咖啡酸的定性和定量的变化刚好相互印证。而且, 随节位升高, 苹果实生树叶片、芽、韧皮部中内源细胞分裂素含量发生明显变化 (Zhang et al., 2006)。这些研究结果均可以相互支持, 是深入研究阶段转变生理和分子机制的良好基础。

前人研究与阶段转变相关的特异蛋白质时, 通用的方法是分别取某实生单株童期、成龄期样品进行比较, 寻找差异蛋白质。而本试验从苹果实生树树干基部到树冠顶部连续取样, 研究蛋白质随节位升高的动态变化。根据本试验的结果看, 6 株实生树每株都具有各自独有的蛋白质带 (数据未列出), 仅以某一株实生树的样品研究阶段转变所取得结果会有较大偏差。而且, 仅取童期和成龄期样品, 检测不到成年营养生长期特异性蛋白质存在和动态变化。

References

- Amo-Marco J B, Vidal N, Vieitez A M, Ballester A. 1993. Polypeptide markers differentiating juvenile and adult tissues in chestnut. *J Plant Physiol*, 142: 117 - 119.
- Besford R T, Hand P, Peppitt S D, Richardson C M, Thomas B. 1996. Phase change in *Prunus avium*: Differences between juvenile and mature shoots identified by 2-dimensional protein separation and *in vitro* translation of mRNA. *J Plant Physiol*, 147: 534 - 538.
- Bon M C. 1988. J16: An apex protein associated with juvenility of *Sequoiadendron giganteum*. *Tree Physiol*, 4 (4): 381 - 387.
- Garcia J L, Avidan N, Troncoso A, Sarmiento R, Lavee S. 2000. Possible juvenile-related proteins in olive tree tissues. *Sci Hort*, 85: 271 - 284.

- Gu Rui-sheng, Liu Qun-lu, Chen Xue-mei, Jiang Xiang-ning. 1999. Comparison and optimization of the methods on protein extraction and SDS-PAGE in woody plant. *Chinese Bulletin of Botany*, 16 (2): 171-177. (in Chinese)
- 谷瑞升, 刘群录, 陈雪梅, 蒋湘宁. 1999. 木本植物蛋白提取和 SDS-PAGE 分析方法的比较和优化. *植物学通报*, 16 (2): 171-177.
- Hackett W P. 1983. Phase change and intra-clonal variability. *Hortscience*, 18 (6): 840-844.
- Hackett W P, Murray J, Woo H. 1991. Cellular biochemical and molecular analysis of maturation related characteristics in *Hedera helix*. //Ahyja M R. *Woody Plant Biotechnology*. New York: Plenum Press; 77-81.
- Hand P, Besford R T, Richardson C W, Peppitt S D. 1996. Antibodies to phase related proteins in juvenile and mature *Prunus avium*. *Plant Growth Regulation*, 20: 25-29.
- Huang L C, Pu S Y, Murashige T, Fu S F, Kuo T T, Huang D D, Huang H J. 2003. Phase-and age-related differences in protein tyrosine phosphorylation in *Sequoia sempervirens*. *Biol Plant*, 47 (4): 601-603.
- Kuo J L, Huang H J, Cheng C M, Chen L J, Huang B L, Huang L C, Kuo T T. 1995. Rejuvenation *in vitro*: Modulation of protein phosphorylation in *Sequoia sempervirens*. *J Plant Physiol*, 146: 333-336.
- Poethig R S. 1990. Phase change and the regulation of shoot morphogenesis in plants. *Science*, 250: 923-930.
- Snowball A M, Zeman A M, Tchan Y T, Mullins M G, Goodwin P B. 1991. Phase change in citrus: Immunologically detectable differences between juvenile and mature plants. *Aust J Plant Physiol*, 18: 385-396.
- Sheng Bing-cheng, Tao Jian-min, Xu Xi-lou, Xu Hui-ying, Dai Wen-hao. 1992. Study on correlation between growth and juvenile period of apple hybrid seedlings. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 15 (2): 130-133. (in Chinese)
- 盛炳成, 陶建敏, 徐喜楼, 徐慧英, 戴文浩. 1992. 苹果杂种实生苗生长与童期相关的研究. *南京农业大学学报*, 15 (2): 130-133.
- Zhang X Z, Zhao Y B, Li C M, Chen D M, Wang G P, Chang R F, Shu H R. 2007. Potential polyphenol markers of phase change in apple (*Malus domestica*). *J Plant Physiol*, 164: 574-580.
- Zhang X Z, Zhao Y B, Wang G P, Chang R F, Li C M, Shu H R. 2006. Dynamics of endogenous cytokinins during phase change in *Malus domestica* Borkh. *Proc. 27th Inter Congre Hort Sci Seoul, Korea*; 8: 12-19.



《蔬菜学》

本书由方智远院士主编, 江苏科学技术出版社出版发行。全书共分7大章, 33个小节, 44万字, 552页, 本书系统地记叙了中国蔬菜学发展的历史轨迹、学术成就; 比较全面地论述了蔬菜作物种质资源、遗传育种、栽培技术、病虫害防治以及贮藏加工等各个专业的性质、研究内容; 简述了21世纪中国蔬菜学的发展趋势。本书兼理论性与实践性、政策性与操作性于一体, 有利于读者更加深入地了解蔬菜学, 研究蔬菜学, 是从事蔬菜科研、教学及生产实践有关人员的良好参考书籍。定价: 47元(含邮费)。

《中国蔬菜品种志》

本书由中国农业科学院蔬菜花卉研究所主编, 已于2002年9月出版发行。全书分上、下卷, 1~6章为上卷, 包括根菜类、白菜类、芥菜类、甘蓝类、绿叶菜类及葱蒜类, 计2263个品种, 1347页; 7~12章为下卷, 包括瓜类、茄果类、豆类、薯芋类、水生蔬菜类和多年生蔬菜类, 计2550个品种, 1177页。入志的品种中, 地方品种占90%以上, 少量在全国栽培时间较长、种植面积较大的一代杂种也选入其中。本书较全面系统而又有重点地反映了中国丰富的蔬菜品种资源概貌、研究成果及育种水平, 可供蔬菜科研、教学、生产及种子单位、农业行政单位的人员参考。本书出版后受到读者普遍好评, 现尚有少量存书, 特以优惠价格490元(上、下卷)提供给读者(原价980元)。

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街12号中国农科院蔬菜花卉所《园艺学报》编辑部, 邮编100081。