

# ‘乌叶’荔枝胚胎发育过程特异蛋白的变化

陈伟<sup>1</sup> 吕柳新<sup>2</sup> 黄春梅<sup>1</sup> 周洁<sup>1</sup> 梁文裕<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 福建农林大学生命科学学院, 福州 350002; <sup>2</sup> 福建农林大学园艺学院, 福州 350002)

**摘要:** 应用改进的 IEF-SDS-PAGE 技术比较分析了荔枝胚胎分化发育过程中蛋白质组分的变化。结果表明, 大多数蛋白质组分在各发育时期的图谱相似, 但不同发育时期存在变化。试验共发现了前期鱼雷胚的 43.7 kD、pI3.5 和 55 kD、pI9.4, 后期鱼雷胚的 23.4 kD、pI6.6 和 25.1 kD、pI6.8 以及前期子叶胚的 25.1 kD、pI9.3 和 64.6 kD、pI5.9 等 6 个新出现的特异蛋白。后期心形胚的图谱上蛋白质点数最多, 可分辨蛋白质斑点数约 300 个, 这与蛋白质含量的测定结果一致。以上特异蛋白在多次重复中均显示出良好的重现性。因此认为, 这些特异蛋白在胚胎分化发育中可能起重要作用。

**关键词:** 荔枝; 胚胎; 特异蛋白; 分化发育

**中图分类号:** S 667.1    **文献标识码:** A    **文章编号:** 0513-353X (2001) 06-0504-05

植物胚胎的分化发育过程, 从分子生物学角度看, 是基因在机体内因素协同作用下, 在时间和空间上顺序表达的过程<sup>[1,2]</sup>。因此, 与胚胎分化发育密切相关的特异蛋白和基因的分离及鉴定对认识胚胎分化发育的分子本质具有重要意义。近年来已有水稻<sup>[2]</sup>、大麦<sup>[3]</sup>、大豆<sup>[4,5]</sup>和胡萝卜<sup>[6]</sup>胚胎发育时期的特异蛋白的研究报道, 其中部分基因已被克隆, 并已研究了其表达<sup>[6~11]</sup>。但木本植物, 尤其是顽拗植物, 由于其组织细胞中富含酚和醌类物质, 分子生物学方面的研究受到限制<sup>[12]</sup>。因此尚未见荔枝胚胎特异蛋白及其基因表达的报道。本研究用改进的双向电泳技术<sup>[13]</sup>分析荔枝胚胎发育过程中蛋白质组分的表达动态, 为进一步纯化和富集与胚胎分化发育相关的特异蛋白并克隆与其相关的基因, 最终实现荔枝胚胎发育的调控奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

荔枝 (*Litchi chinensis* Sonn.) 品种为‘乌叶’ (胚胎发育正常), 种植在福建省漳州市九湖镇内寮荔枝品种园。选用约 15 年生、生长发育结果正常的植株 3 株。在花期一致的果穗上, 于谢花后 32、37、42 和 47 d 采集正常果实, 用冰壶带回实验室, 立即剥离胚胎, 分别挑选后期心形胚、前期鱼雷胚、后期鱼雷胚和前期子叶胚<sup>[14]</sup>, 称重后贮于 -20℃ 冰箱备用。试验于 1999~2000 年进行。两年重复。

### 1.2 蛋白提取

取 0.5 g 样品, 按其鲜样质量的 10% 加入水不溶性 PVP (聚乙烯吡咯烷酮), 研成粉

收稿日期: 2001-05-14; 修回日期: 2001-08-23

基金项目: 福建省自然科学基金资助项目 (B0110020)

状后, 再加入 10 倍体积 -20℃ 预冷丙酮 (含 10% TCA 和 0.07%  $\beta$ -Me)。涡旋后静置于 -20℃ 1h 沉降蛋白, 随后 4℃ 15 000  $\times g$  离心 20min, 弃上清液。取沉淀重复处理 2 次。最后一次沉淀置于 -20℃ 下 24 h, 使丙酮完全挥发。准确称取蛋白丙酮干粉 20 mg, 加 0.5 mL 样品裂解液 (9.5 mol/L 尿素, 2% Nonidet P-40, 0.2% Ampholine pH 3~10, 0.4% Ampholine pH 5~7 和 0.4% Ampholine pH 6~8; 5%  $\beta$ -Me), 放置 37℃ 水浴 2 h, 15 000  $\times g$  离心 10 min, 上清液用于蛋白质电泳分析。

### 1.3 双向电泳

第一向 IEF 电泳: 胶管长 15 cm, 内径 1.5 mm。10 mL 胶中含尿素 5.5 g, d-d H<sub>2</sub>O 1.97 mL, 10% NP-40 2 mL, 30% Acr-Bis (Acr 28.38%; Bis 1.62%) 母液 1.33 mL, 3 个 pH 梯度的两性电解质载体 (pH 5~7, 200  $\mu$ L; pH 6~8, 200  $\mu$ L; pH 3~10, 100  $\mu$ L), 10% 过硫酸铵 10  $\mu$ L, TEMED 5  $\mu$ L。胶长 11 cm。上样量为每管 20  $\mu$ L 蛋白提取液 (约含 50  $\mu$ g 蛋白)。预电泳为 200 V, 15min; 300 V, 30 min; 400 V, 1 h。正式电泳为 600 V, 16 h; 800 V, 2 h。

第二向 SDS-PAGE 垂直板电泳: 垂直板规格为 20 cm  $\times$  20 cm, 胶厚 1 mm。分离胶和浓缩胶浓度分别为 12% 和 4%。电泳条件为每板 20 mA, 5 h。银染法染色<sup>[13]</sup>。等电点及分子量测定参照陈伟等<sup>[13]</sup>方法。每样品 3 次重复。

### 1.4 蛋白质含量测定

参照 Lowry<sup>[15]</sup>法测定。每样品 3 次重复。

## 2 结果与分析

### 2.1 胚胎总蛋白质含量变化

从图 1 可见, 乌叶荔枝后期心形胚和前期鱼雷胚总蛋白质含量较高, 后期鱼雷胚总蛋白质含量有一个较明显的降低。这一结果从蛋白质水平上反映了心形胚时期的新陈代谢较后期旺盛, 说明这一时期基因表达十分活跃, 因而蛋白质大量合成。而随后发育时期蛋白质含量下降, 可能主要有两个原因:

(1) 蛋白质合成减弱, 或降解相对加快; (2) 细胞内的淀粉、脂类等贮藏物质合成增加使单位鲜样质量的蛋白质含量相对降低。

### 2.2 胚胎发育的特异蛋白

图 2, A~D 显示荔枝心形胚至子叶胚发育过程的胚胎蛋白质电泳图谱, 主要蛋白质组分是相似的, 体现了胚蛋白质组分的稳定性。尽管总体上相似, 但不同发育时期胚的蛋白质组分亦存在变化, 如 32 DAA (后期心形胚) 的胚中存在的 77.6 kD、pI 9.5 蛋白, 而在 37 DAA (前期鱼雷胚) 及随后各时期的胚中该蛋白消失 (图 2, A); 37 DAA 胚中有 2 个新的蛋白出现 (图 2, B), 其中一个为酸性的 43.7 kD、pI 3.5 蛋白 (命名为 TE<sub>1</sub>) 该蛋白点十分清晰, 表达量大; 另一个是 55.0 kD、pI 9.4 的碱性蛋白 (命名为 TE<sub>2</sub>)。此外, 该期 15.1 kD、pI 6.3, 20.9 kD、pI 5.5, 22.9 kD、pI 8.1 和 46.8 kD、pI 8.5 等 4 个蛋白在

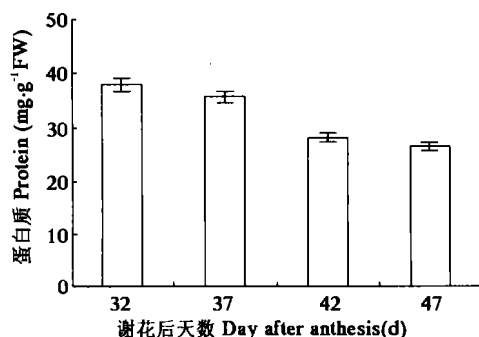


图 1 荔枝胚胎不同发育时期总蛋白质含量变化

Fig. 1 Changes of total protein content in litchi embryos during different development stages

42 DAA (后期鱼雷胚) 消失。这一结果提示了在鱼雷胚发育前期的结构基因表达变化较大。在 42 DAA 图谱上我们亦发现 2 个新的蛋白, 即 23.4 kD、pI 6.6 和 25.1 kD、pI 6.8, 分别命名为  $TE_3$  和  $TE_4$ , 另一个 54.9 kD、pI 3.5 的蛋白在 47 DAA (前期子叶胚) 消失 (图 2, C), 从整个图谱看, 42 DAA 的蛋白点明显较 32 和 37 DAA 时期少。说明鱼雷胚后期的基因表达不如前两期活跃。47 DAA 图谱上的蛋白点无明显变化, 保持相对稳定, 但也出现了 2 个新的特异蛋白, 即 25.1 kD、pI 9.3 和 64.6 kD、pI 5.9, 分别命名为  $CE_1$  和  $CE_2$  (图 2, D)。以上结果显示了荔枝胚胎发育过程中蛋白质组分的系列变化 (表 1), 这亦反映了荔枝胚胎发育过程中基因表达的特点。

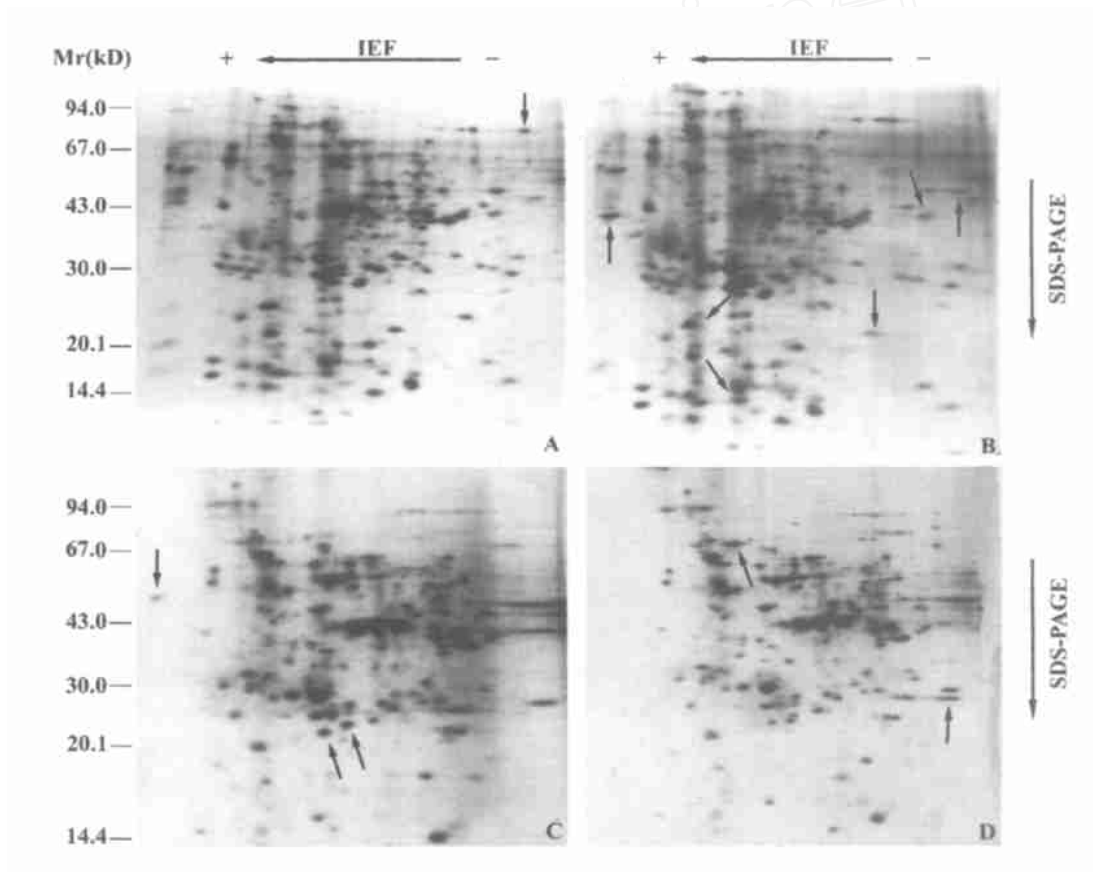


图 2 荔枝胚胎蛋白质双向电泳图谱

A. 后期心形胚; B. 前期鱼雷胚; C. 后期鱼雷胚; D. 前期子叶胚。

箭头 ( ) 示新出现的特异蛋白; 箭头 ( ) 示将消失的特异蛋白。

Fig. 2 Two-dimensional electrophoresis patterns of proteins in embryos of litchi

A. Late heart-stage; B. Early torpedor stage; C. Late torpedor stage; D. Early cotyledon stage.

Arrows ( ) indicate newly emerged specific proteins;

Arrows ( ) indicate disappearing specific proteins.

表 1 荔枝胚胎不同发育时期特异蛋白的变化

Table 1 Changes in specific proteins of litchi embryos during different development stages

谢花后天数 Day after anthesis (d)	胚胎发育 Embryo development	新出现的特异蛋白 Newly emerged specific proteins	将消失的特异蛋白 Disappeared specific proteins
32	后期心形胚 Late heart-stage		77.6(9.5) *
37	前期鱼雷胚 Early torpedo-stage	43.7(3.5);55.0(9.4)	15.1(6.3);20.9(5.5);22.9(8.1);46.8(8.5)
42	后期鱼雷胚 Late torpedo-stage	23.4(6.6);25.1(6.8)	54.9(3.5)
47	前期子叶胚 Early cotyledon-stage	25.1(9.3);64.6(5.9)	

\* 括号前为分子量 (kD); 括号内为等电点 (pI)。

\*Molecular weight (kD) before parentheses; isoelectric point (pI) in the parentheses.

### 3 讨论

在双向电泳图谱中观察到, 大多数蛋白质在荔枝心形胚至子叶胚的发育过程中基本不变, 少数蛋白质在数量、分子量、等电点及延续时间的长短等性质上存在差异, 具有发育时期的特异性。推测它们与组织或细胞在该时期的特定生理功能相关, 这些特异蛋白为研究荔枝胚胎发育的分子机理及基因调控提供了参考价值。

本试验结果显示, 荔枝心形胚双向电泳图谱中的蛋白质点数出现最多, 提示蛋白质的旺盛合成与积累是在球形胚和心形胚之间, 并说明该期的基因表达十分活跃。这与此期胚胎所处的生理状态吻合, 与测定的蛋白质含量一致。

荔枝胚胎分化发育过程中, 共出现了 6 个特异蛋白, 其中 TE<sub>1</sub>、TE<sub>2</sub>、TE<sub>3</sub> 和 TE<sub>4</sub> 都在鱼雷胚期出现, TE<sub>1</sub> 在前期鱼雷胚出现并在后期消失, 而 TE<sub>2</sub>、TE<sub>3</sub> 和 TE<sub>4</sub> 则一直存在到子叶胚, CE<sub>1</sub> 和 CE<sub>2</sub> 仅在子叶胚期出现。以上结果说明 TE<sub>1</sub> 可能在心形胚至鱼雷胚的分化发育中有重要作用, TE<sub>2</sub>、TE<sub>3</sub> 和 TE<sub>4</sub> 参与鱼雷胚发育全过程, 其生物学功能可能一直延续到子叶胚, 而 CE<sub>1</sub> 和 CE<sub>2</sub> 则可能与子叶胚分化发育紧密相关。荔枝胚胎分化发育过程中消失的蛋白提示其生物学功能已结束。

胚胎发育是植物最重要的发育过程之一, 与此相关的基因常常是其生命过程中必不可少的, 因此和胚胎发育相关基因的突变将导致胚胎败育<sup>[16]</sup>。如能克隆出与鱼雷胚或子叶胚形成有关的特异蛋白的相关基因, 通过构建其反义 RNA 基因导入荔枝, 并在胚胎中特异表达, 就可能导致胚胎败育, 获得焦核果。从特异蛋白入手分离基因, 在许多植物中已获得成功<sup>[17,18]</sup>。然而, 荔枝胚胎发育是一个多基因控制的极其复杂的生理过程, 通过操作编码某一特异蛋白的单一基因来调控荔枝胚胎发育的可能性是非常有限的。因此, 在荔枝胚胎发育特异蛋白的相关基因操作中应充分加以综合考虑。

### 参考文献:

- 1 陈 伟. 荔枝 (*Litchi chinensis* Sonn.) 胚胎发育的生理生化基础: [博士学位论文]. 福州: 福建农林大学, 2000. 6~7
- 2 张 斌, 唐锡华. 水稻胚胎发育时期的特异性蛋白质. 植物生理学报, 1992, 18 (1): 85~92
- 3 Clark A J, Higgings P, Martin H, et al. An embryo-specific protein of barley. Eur. J. Biochem., 1991, 199 (1): 115~121
- 4 Walling L, Drews G N, Goldberg R B. Transcriptional and Posttranscriptional regulation of soybean seed protein mRNA Levels. Proc. Natl. Acad. Sci., 1986, 83: 2123~2127
- 5 Ladin B F, Tierney M L, Meinke D W. Developmental regulation of  $\alpha$ -conglycinin in Soybean axes and cotyledons. Plant Physiol.,

- 1987, 84: 35 ~ 41
- 6 朱长莆, 镰田博, 原田宏, 等. 与胡萝卜胚胎发生相关的胚性细胞蛋白 63cDNA 分离及其基因表达研究. 植物学报, 1997, 39 (12): 1091 ~ 1098
- 7 Quatrano R S. Regulation of gene expression by ABA during angiosperm embryo development. In: Miflin B J (ed). Oxford Surveys of Plant Molecular biology 3. Oxford: Oxford University Press, 1986. 467 ~ 477
- 8 Bassuner R, Baumlein H, Huth A, et al. Abundant embryonic mRNA in field bean (*Vicia faba* L.) codes for a new class of seed proteins: cDNA cloning and characterization of the primary translation product. Plant Mol. Biol., 1988, 11 (3): 321 ~ 334
- 9 Dure L, Crouch M, Harada J, et al. Common amino sequence domains among the LEA proteins of higher plants. Plant Mol. Biol., 1989, 12 (5): 475 ~ 486
- 10 Kiyosue T, Yamaguchi-shinozaki K, Shinozaki K, et al. cDNA cloning of ECP40, an embryogenic-cell protein in carrot, and its expression during somatic and zygotic embryogenesis. Plant Mol. Biol., 1993, 21 (6): 1053 ~ 1058
- 11 Lin X, Huang G S, Zimmerman J L. Isolation and characterization of a diverse set of genes from carrot somatic embryos. Plant physiol., 1996, 112 (3): 1365 ~ 1374
- 12 丁晓东, 吕柳新. 从顽拗植物荔枝提取基因组 DNA 技术的研究. 应用与环境生物学报, 2000, 6 (2): 142 ~ 145
- 13 陈 伟, 黄春梅, 吕柳新. 顽拗植物荔枝蛋白质双向电泳的改良方法. 福建农业大学学报, 2001, 30 (1): 123 ~ 126
- 14 吕柳新, 余小玲, 叶明志, 等. 荔枝胚胎发育机制的探讨. 福建农学院学报, 1989, 18 (2): 149 ~ 155
- 15 Lowry D M, Rosebrough N J, Farr R L, et al. Protein measurement with folin phenol reagent. J. Biol. Chem., 1951, 193: 265 ~ 275
- 16 Meinke D W. Perspective on genetic analysis of plant embryogenesis. Plant Cell, 1991, 3: 857 ~ 866
- 17 O 'uellet F, Houde M, Sarhan F. Purification, characterization and cDNA cloning of the 200 kDa protein induced by cold acclimation in wheat. Plant cell physiol., 1993, 34 (1): 59 ~ 63
- 18 刘迎芳, 王春霞, 赵进东, 等. 美洲商陆中新发现的一种抗菌蛋白基因的克隆和表达. 植物学报, 1999, 41 (10): 1036 ~ 1040

## Studies on ' Wuye ' Litchi Specific Proteins in the Embryo Development Stages

Chen Wei<sup>1</sup>, L üLiuxin<sup>2</sup>, Huang Chunmei<sup>1</sup>, Zhou Jie<sup>1</sup>, and Liang Wenyu<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> College of Life Sciences, <sup>2</sup> College of Horticultural Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou 350002)

**Abstract:** Modified IEF-SDS-PAGE technique was applied in comparing and analyzing the changes of the protein components during the differentiation and development of litchi embryos. The results showed that while most of the proteins in different stages shared similar gel maps, which indicated the stability of embryo protein components, some were found changing. This experiment discovered 6 new specific proteins in different stages of the embryo development. They were 43.7 kD pI 3.5, 55.0 kD pI 9.4 in early torpedo-stages; 23.4 kD pI 6.6, 25.1 kD pI 6.8 in late torpedo-stage; 25.1 kD pI 9.3, 64.6 kD pI 5.9 in early cotyledon-stage. The number of the protein points was the highest in late heart-stage gel map, which indicated that gene expression was most active at the heart embryo stage. The number of protein spots visualized with silver staining is about 300. This result coincided with the one of the protein content determination. These specific proteins showed good repeatability in the repeated experiments. It is therefore suggested that these specific proteins might play an important role in litchi embryo differentiation and development.

**Key words:** Litchi; Embryo; Specific protein; Embryo development