

观赏植物‘孩儿莲’及其近缘植物差异蛋白组的电泳分析

刘文倩, 阚雪芹, 方向明, 王海玲, 谈建中

(苏州大学 建筑与城市环境学院, 江苏 苏州 215123)

摘要: 为探讨八角属植物结实性差异的分子机理, 以‘孩儿莲’、‘杭州红茴香’及披针叶八角的幼叶为材料, 在优化蛋白质双向电泳技术的基础上, 就3种供试植物叶片蛋白质组的差异表达进行了分析。结果表明: 在采用改良酚提取法、蛋白溶解液含0.25% IPG 缓冲液、等点聚焦条件为50 000 V · Hr 时, 可以得到分离效果良好的双向电泳图谱。经2 DE Image Master 软件分析, 结果从‘孩儿莲’、‘杭州红茴香’和披针叶八角的电泳图谱上分别检测到662、644和684个蛋白质斑点, 说明在蛋白质分子水平上, ‘杭州红茴香’与披针叶八角的亲缘关系较近, 而与‘孩儿莲’的遗传差异较大。

关键词: 孩儿莲; 披针叶八角; 差异蛋白组; 双向电泳

中图分类号: S 685.99 **文献标识码** A **文章编号:** 1001-0009(2010)08-0136-04

‘孩儿莲’(*Illicium laceolatum*. cv. ‘Haierlian’)为八角科八角属植物, 树姿优美, 常年叶色翠绿, 春季花期最长可达1个月左右, 盛花时红绿相映, 似倒挂小莲花, 极具观赏价值, 因其栽种极少而被视为珍贵树种。并且, ‘孩儿莲’在苏州地区只开花不结果^[1], 从而可以避免果实毒性成分的不良影响, 有望成为观赏植物的实用新品种。但与‘孩儿莲’同为披针叶八角种的其它近缘植物, 大多结实且含有毒性成分, 对于这种结实性差异的

形成机理目前还缺乏了解。

蛋白质是基因表达的产物, 是基因型和表型的联系纽带。随着蛋白质组学研究技术的不断进步, 植物蛋白质组学已被广泛应用于植物发育、环境信号应答、遗传变异等领域的研究^[2], 但在植物亲缘关系的分析方面尚少研究报道。该试验以八角属植物披针叶八角的同种植物‘孩儿莲’、‘杭州红茴香’和披针叶八角的叶片为材料, 在优化叶片蛋白质制备及双向电泳技术的基础上, 对三者蛋白质组的差异表达及种内亲缘关系进行了研究, 旨在为八角属植物种间或种内亲缘关系的鉴定提供新的依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

3种供试植物材料分别为‘孩儿莲’、‘杭州红茴香’、披针叶八角, 均为八角属植物披针叶八角种(*Illicium*

第一作者简介: 刘文倩(1985-), 女, 在读硕士, 研究方向为园林植物与观赏园艺。

通讯作者: 谈建中(1957-), 男, 博士, 教授, 研究方向为园林植物生物技术。E-mail: szutjz@hotmail.com.

基金项目: 苏州市农业科技攻关资助项目(SNG0704)。

收稿日期: 2009-12-05

Analysis of Specific DNA Fragment in Virants from Tissue Culturing of Anthurium

ZHANG Shu-hong, CHEN Chao, DU Hong-wei, FAN Yong-shan

(Department of Life Science, Tangshan Teachers College, Tangshan, Hebei 063000)

Abstract: PCR amplifications were studied twice using ISSR primer between Anthurium variety and the tissue-culturing plant with distinctly different phenotypes. The specific DNA fragment was recovered and the sequence of PCR product was homologously analyzed with BLAST software. The results indicated that the specific DNA fragment was 680 bp and there was no higher homology with other gene or protein. New genotype would appear as new genetic recombination occurs in the tissue culturing of Anthurium.

Key words: Anthurium; tissue culture; virants; ISSR

lanceolatum A. C. Smith), 保存于苏州大学园艺植物品种资源基地, 取植株当年生枝条的幼叶为试验材料用于提取蛋白质。

IPG 预制胶条、IPG 缓冲液、覆盖油、CHAPS、分子量标准蛋白质、尿素、硫脲、TEMED、Tris、二硫苏糖醇(DTT)、甘氨酸、过硫酸铵、N, N'-甲叉双丙烯酰胺等均为生化纯, 所有溶液和缓冲液均用 MilliQ 系统提供的电阻不小于 18 MΩ 的双蒸水配制。

1.2 试验方法

1.2.1 叶片蛋白质的提取 尿素/硫脲法: 参照文献^[3]的方法, 取 1 g 新鲜叶片放入预冷的研钵中, 液氮中研磨破碎成粉末, 加入 5 mL 蛋白提取缓冲液(6 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、2% CHAPS、15 mmol/L 二硫苏糖醇, 14 000 rpm、4℃下离心 20 min, 取上清液至新的离心管, 14 000 rpm、4℃下离心 40 min, 取上清液, 加 3 倍体积的预冷丙酮, 置-20℃中沉淀过夜, 次日于 14 000 rpm、4℃离心 10 min, 弃上清, 留沉淀备用。改良酚提取法: 参照文献^[4]的方法, 取样同上, 加液氮破碎研磨, 加 10% TCA/丙酮 1.8 mL 振荡, 15 000 rpm、4℃离心 5 min, 弃上清液, 0.1 mol/L 醋酸铵甲醇清洗, 15 000 rpm、4℃离心 5 min, 80%丙酮 1.8 mL, 振荡至沉淀散开, 15 000 rpm、4℃离心 5 min, 弃上清, 沉淀于室温下干燥 10 min, 加体积比 1:1 的平衡酚和 SDS 提取液各 800 mL, 15 000 rpm、4℃离心 3 min, 转移中层酚至新的离心管, 加入 5 倍体积 0.1 mol/L 醋酸铵的甲醇, 于-20℃下放置 10 min, 15 000 rpm、4℃离心 5 min, 弃上清, 沉淀分别用 100%甲醇、80%丙酮清洗后离心, 蛋白沉淀于低温下干燥备用。

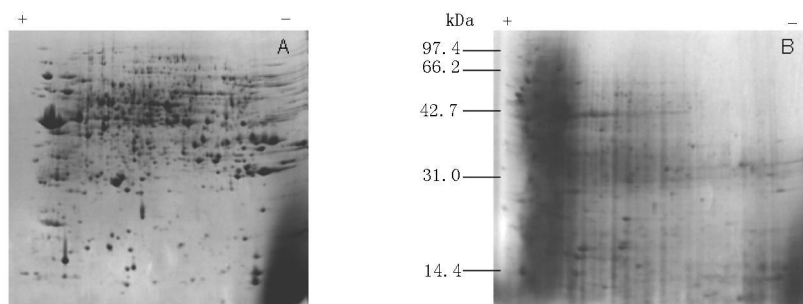
1.2.2 叶片蛋白质的双向电泳 取上述不同方法提取的蛋白沉淀, 分别用 3 种溶解液重悬, 其中溶解液 I、II、III 为分别含 0.5%、0.25%、0.125% IPG 的提取缓冲液, 充分溶解后, 采用 Bradford 法测定蛋白浓度, 样品用于双向电泳分析。第 1 项为固相 pH 值梯度等点聚焦(IPG-IEF), 在 IPGphor 等电聚焦仪(GE Healthcare)上进行。

IPG 胶条长 17 cm, pH (3~10)(NL)。取蛋白样品 800 μg, 总上样体积为 350 μL。水化及电泳方法根据 IPG 等电聚焦仪的使用说明书进行操作。其中设计 2 组电泳条件: FE-I 为 50 000V·Hr, FE-II 为 60 000V·Hr。等电聚焦结束后, IPG 胶条分别用平衡缓冲液 I (6 mol/L 尿素, 30%甘油, 0.05 mol/L Tris-HCl(pH 8.8), 2% SDS, 1% DTT) 和平衡缓冲液 II (以 1.25% 碘乙酰胺代替平衡缓冲液 I 的 DTT) 平衡 2 次, 每次平衡 15 min。第 2 项 SDS-PAGE 采用浓度为 12% 的分离胶, 以恒流电泳至溴酚蓝指示线到达凝胶底部处停止电泳。取出凝胶采用考马斯亮蓝(CBB)R250 染色。染色后的双向电泳凝胶采用 GE 公司的 Image scanner 双向电泳凝胶专用透射扫描仪高精度扫描, 采用 2DE 图像分析软件 Image Master 2D Platinum 5.0 进行蛋白斑点的检测与比较分析, 找出特异表达蛋白和差异表达蛋白, 计算蛋白斑点匹配率(蛋白斑点匹配率 = $2M_{xy}/(M_x + M_y)$, 其中 M_x 、 M_y 分别表示 2 种供试材料 x 、 y 各自具有的蛋白斑点数, M_{xy} 表示共有蛋白斑点数)。

2 结果与分析

2.1 提取方法对蛋白质提取率及双向电泳效果的影响

采用 2 种提取方法提取叶片总蛋白质, 尿素/硫脲法提取的蛋白质率为 4.69 mg/g, 高于改良酚提取法的 2.06 mg/g。其次, 取相同含量的蛋白质样品液上样进行双向电泳, 结果如图 1 所示。在相同电泳条件下, 无论在检测的蛋白质斑点数还是凝胶图谱的清晰度上, 用改良酚提取法制备的蛋白质样品都明显地优于尿素/硫脲法, 表现在前者分离得到的蛋白质斑点数多, 而且聚合良好, CBB 染色后凝胶背景比较清晰, 而后者可检测的蛋白质斑点较少, 横向及纵向拖尾严重, 凝胶背景较深, 蛋白分离很不清晰。因此, 从双向电泳的分离效果来判断, 改良酚提取法更适合于‘孩儿莲’等八角科植物蛋白质双向电泳的样品制备。



A. 改良酚提取法

B. 尿素/硫脲提取法

图 1 不同方法提取叶片蛋白质的双向电泳图谱(杭州红茴香)

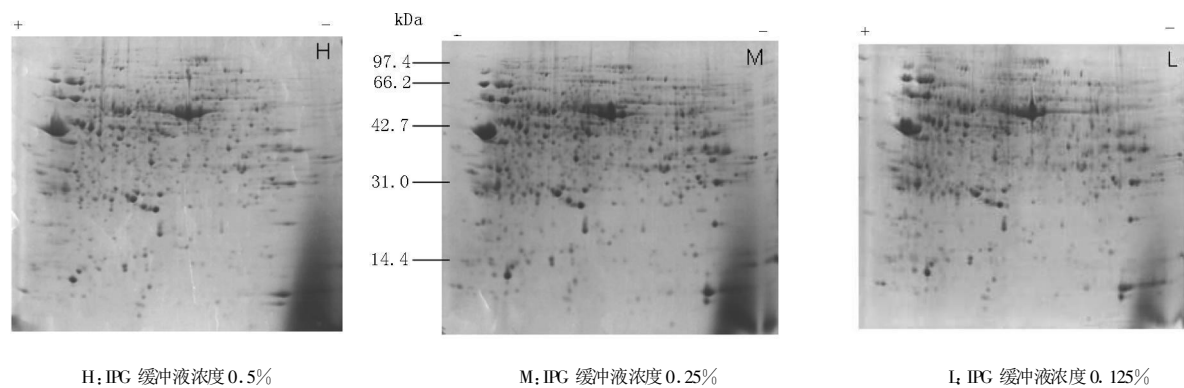


图2 不同 IPG 缓冲液浓度的叶片蛋白双向电泳图谱(孩儿莲)

2.2 溶解液成分对蛋白质双向电泳效果的影响

根据上述试验结果,采用改良酚提取法获得的叶片蛋白质沉淀,分别用含不同浓度 IPG 的 3 种蛋白溶解液重悬蛋白样品进行双向电泳,得到的凝胶电泳蛋白图谱也检测到一定的差异。由图 2 可见,随着 IPG 缓冲液使用浓度的降低,23DE 图谱的碱性端下侧的染色区域越来越小,背景干扰减少,外观上被检测的蛋白斑点增多。综合蛋白斑点数和背景干扰程度 2 方面的结果,认为用于蛋白质重悬的缓冲液中,IPG 缓冲液的添加浓度以 0.25%为宜。

2.3 不同等点聚焦条件对双向电泳分离效果的影响

根据前述试验结果,采用改良酚提取法获得的叶片蛋白质,用 IPG 浓度为 0.25%的蛋白溶解液重悬,在 2 种不同的等点聚焦程序下进行双向电泳。结果在等点聚焦程序的 2-DE 图谱上,检测到的蛋白斑点数略多于程序 II,而且程序 II 的横向拖尾严重(图略),认为在进行第 1 项等电聚焦时,采用程序 I 的电泳条件较为适宜。

2.4 ‘孩儿莲’及其近缘植物差异蛋白质组的分析

采用上述优化的蛋白质双向电泳技术体系,对‘孩儿莲’等 3 个近缘植物材料的叶片蛋白质进行了双向电泳,得到了较为清晰的电泳图谱,经 ImageMaster 2D Platinum5.0 软件分析,结果在‘孩儿莲’‘杭州红茴香’和披针叶八角 的 2-DE 图谱上分别检测到 662、644 和 684 个蛋白斑点。其中,‘孩儿莲’与杭州‘杭州红茴香’的匹配蛋白斑点(图 3,绿色为匹配斑点,红色为未匹配斑点)有 418 个,匹配率为 64.0 %,差异表达在 2 倍以上的蛋白组分共有 129 个,差异在 3 倍以上的有 64 个,表达量差异最高达 19.7 倍。‘孩儿莲’和披针叶八角 的匹配蛋白斑点有 463 个,匹配率为 63.9%,差异表达在 2 倍以上的蛋白组分共有 118 个,差异在 3 倍以上的有 57 个,表达量差异最高达 12.89 倍。‘杭州红茴香’和披针叶八角 的匹配蛋白斑点有 468 个,匹配率为 70.5%,差异表达在 2 倍以上的蛋白组分共有 118 个,差异在 3 倍以上的有 51 个,表达量差异最高达 11.95 倍。

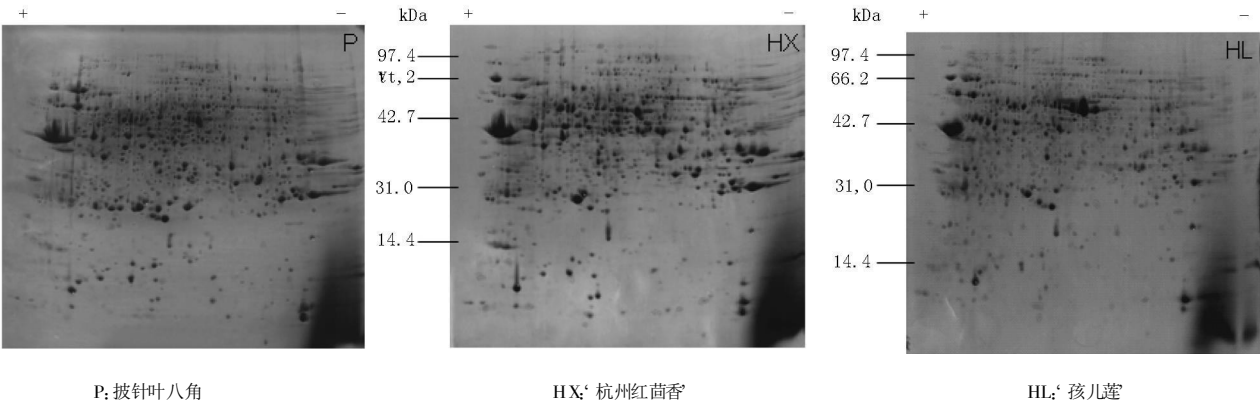


图3 ‘杭州红茴香’、披针叶八角、孩儿莲 蛋白质组双向电泳图谱的比较

3 结论与讨论

在蛋白质双向电泳技术体系中,样品制备技术是最为关键的环节之一^[5],植物组织材料由于富含色素、多

酚、脂类、多糖等干扰物质,通常比悬浮培养细胞更难获取高质量的蛋白质样品。特别是‘孩儿莲’等八角属植物叶片革质,破碎后组织液呈粘稠状,含有大量的次生

代谢产物, 从而影响蛋白质样品的质量及电泳分离效果。为此, 该试验在分析和比较前人研究结果^[5-8]的基础上, 采用改良酚提取法从‘孩儿莲’等 3 种八角属植物中提取蛋白质样品, 就 IPG-IEF/SDS-PAGE 双向电泳效果进行了比较分析, 结果在蛋白质提取率、图谱清晰度以及分离效果等方面, 改良酚提取法都优于常规的尿素/硫脲提取法。同时, 通过调整 IPG 缓冲液浓度、等点聚焦条件等, 得到了重复性好、背景比较清晰的双向电泳图谱, 在普通 CBB 染色条件下, 可以检测到 600 多个蛋白质斑点。可以认为优化的双向电泳技术对八角属等木本植物的蛋白质组学研究具有参考价值。

蛋白质双向电泳是差异蛋白质组学研究的主要实验技术之一, 而差异蛋白质组学能够将基因表达与植物代谢、植物表型问题联系在一起。因此, 通过差异蛋白质来检测遗传多样性、了解植物种内和种间进化趋势也有许多成功的尝试^[9-11]。如 David 等及 Picard 等利用 2D-PAGE 分析了亲缘关系很近的硬粒小麦 (*Triticum aestivum* Linn.) 不同株系的遗传多样性, 发现品系间的多态性很低, 并且 7 个蛋白可以用于基因型的鉴定。该研究以‘孩儿莲’等 3 个披针叶八角种的近缘植物为材料, 应用上述双向电泳技术分析了叶片蛋白质组的差异表达, 结果在蛋白质(斑点)水平上检测到了遗传多样性, 其中‘孩儿莲’与‘杭州红茴香’、披针叶八角的斑点匹配率约为 64.0%, 而‘杭州红茴香’与披针叶八角之间的匹配率为 70.5%, 推测‘孩儿莲’与披针叶八角种内其它近缘植物的遗传差异较大, 与其“花而不实”的表型可能

具有某种联系, 但其具体生理原因及分子机理还有待进一步研究。

参考文献

- [1] 金友理. 太湖备考[M]. 苏州: 苏州古籍出版社, 1985: 304.
- [2] Agrawal G K, Yonekura M, Iwahashi Y, et al. System, trends and perspectives of proteomics in dicot plants Part I: Technologies in proteome establishment[J]. Chromatography, 2005, 815: 109-123.
- [3] Tan J Z, Yamanaka Y, Kawasaki H, et al. Proteomic analysis of developmental changes of hypocotyl proteins in germinating soybean seeds[J]. Breeding Research, 2005, 7(1): 150.
- [4] Wei Wang Rita, Vignani Monica, Scali et al. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis[J]. Electrophoresis, 2006, 27: 2782-278.
- [5] 皇甫海燕, 官春云, 郭宝顺, 等. 蛋白质组学及植物蛋白质组学研究进展[J]. 作物研究, 2006(5): 577-579.
- [6] 王一鸣, 花宝光, 王有年, 等. 桃果实蛋白质双向电泳影响因素的研究[J]. 园艺学报, 2007, 34(6): 1579-1584.
- [7] Wang W, Scali M, Vignani R, et al. Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf: a plant tissue containing high levels of interfering compounds[J]. Electrophoresis, 2003, 24: 2369-2375.
- [8] 刘伟霞, 潘映红. 适用于小麦叶片蛋白质组分析的样品制备方法[J]. 中国农业科学, 2007, 40(10): 2169-2176.
- [9] 孟慧, 段翠芳, 曾日中. 植物蛋白质组学研究概况[J]. 热带农业科学, 2006, 26(2): 60-64.
- [10] David J L, Zlvy M, Cardin M L, et al. Protein evolution in dynamically managed populations wheat: adaptive responses to macro-environmental conditions[J]. Theor Appl Genet, 1997, 95: 932-941.
- [11] 刘卫群, 李浩. 差异蛋白质组学在植物研究中的应用[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(17): 4201-4203.

Electrophoresis Analysis of Differential Proteome Between ‘Haierlian’ and its Close Relationship Plants in *Illicium lanceolatum*

LIU Wen-qian, KAN Xue-qin, FANG Xiang-ming, WANG Hai-ling, TAN Jian-zhong¹

(Department of Horticulture, School of Architecture and Urban Environment, Soochow University, Suzhou, Jiangsu 215123)

Abstract: To investigate the molecular mechanism of fruitfulness difference in *Illiciaceae* plants, differential proteome were analyzed by using young leaves of Haierlian, Hong hui xiang, *Illicium lanceolatum* A. C. Smith on the basis of optimizing 2-DE technology. 2-DE maps with good separation were obtained when IEF condition was 50 000 V · Hr using protein dissolving solution containing IPG buffer concentration 0.25% and phenol/SDS buffer for protein extraction. Analyzed by 2-DE Image Master software, 662, 684 and 644 protein spots were detected respectively from Haierlian, Hong hui xiang, *Illicium lanceolatum* A. C. Smith, and showed that Hong hui xiang and *Illicium lanceolatum* A. C. Smith had close genetic relationship and Haierlian had more genetic difference with them.

Key words: Haierlian; *Illicium lanceolatum*; differential proteome; two-dimension electrophoresis(2-DE)