

# 蛋白质组学在植物雄性不育研究中的应用

韩璐, 王晶, 郑蕊

(宁夏大学 生命科学院, 宁夏 银川 750021)

**摘要:** 基因转录后还需要进行一系列的转录后修饰, 仅从基因组水平不足以揭示植物雄性不育分子机制, 还需要结合蛋白质组学的研究。现综述了近年来主要作物雄性不育的蛋白质组学研究情况, 指出不育基因表达时具有器官特异性和时空性, 并提出将蛋白质组学技术和基因工程相结合研究植物雄性不育机理的策略。

**关键词:** 植物雄性不育; 杂种优势; 蛋白质组学; 双向电泳; 质谱

**中图分类号:** S 334.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2011)18-0206-03

植物雄性不育(Male Sterility)是一种遗传现象, 具体表现为在有性繁殖过程中花药、花粉或雄配子功能丧失或产生的合子在正常环境下无法存活。据 Kaul 报道, 已在 43 科 162 属 617 个物种中发现了雄性不育株。许多学者利用细胞器 DNA 分离、分子克隆、序列分析以及分子杂交等技术对雄性不育基因进行了转录水平的研究, 利用蛋白质组学技术研究植物雄性不育相关蛋白是近几年才出现的新思路。现以几种经济作物不育系和可育系各器官不同时期蛋白质水平的差异为切入点, 阐明不育基因表达时具有器官特异性和时空性, 并展望了该领域今后研究的方向和策略。

## 1 蛋白质组学技术概述

蛋白质组学(Proteomics)概念最先是 Marc Wilkins 提出, 指由一个基因组或一个细胞、组织表达的所有蛋白质。其任务是通过系统识别和分析一个细胞、组织或亚组织中表达的总蛋白, 从而确定每个

蛋白质的突出特征, 并评价生命活动中的某些生理或病理过程。蛋白质组学技术比较复杂, 主要分为蛋白质的分离、目的蛋白的鉴定和信息分析三方面。其中, 二维凝胶电泳(Two-dimension gelelectrophoresis, 2-DE)和质谱(Mass spectrum MS)技术是蛋白质分离纯化鉴定的核心技术。蛋白质组学技术在药物靶点确定、癌细胞鉴定、植物抗逆性等方面广泛应用, 其在植物雄性不育中的应用是选育优良品种、提高作物产量的新途径。

## 2 蛋白质组学技术在植物雄性不育中的应用

转录水平并不能完全反映基因表达, 蛋白质是生命活动的承载者, 也是大多数基因功能最终的呈现形式, 因此, 从转录水平上所获取的有关基因表达的信息并不足以揭示该基因在细胞内的具体功能, 还需要从蛋白质组方面进行深入研究, 利用蛋白质组技术寻找与雄性不育相关的蛋白质, 进而通过数据库查询找到相应的基因, 具有重要的理论和实践意义。

### 2.1 水稻雄性不育蛋白质组学研究进展

魏磊等<sup>[2]</sup>利用双向电泳技术分析紫稻不育系与保持系叶片全蛋白, 发现不育系与保持系叶片之间的蛋白 2-DE 图谱差异不明显。谢锦云等<sup>[3]</sup>利用双向电泳技术分离了温敏核水稻的不育和可育花药, 通过肽指纹图谱分析及数据库检索得知几丁质酶、酸性磷酸

第一作者简介: 韩璐(1985-), 女, 在读硕士, 现主要从事生物化学与分子生物学研究工作。

责任作者: 郑蕊(1972-), 女, 硕士, 副教授, 现主要从事植物生物技术与植物蛋白质组学研究。E-mail: xlzheng@126.com。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30960208)。

收稿日期: 2011-06-29

**Abstract:** Recovery of the textile industry and soaring cotton prices after the financial turmoil, competing for raw material industries become a new bright spot. Natural wool fiber of *Calotropis gigantean* is a new alternative raw materials. *Calotropis gigantean* can cultivate in desertification, saline, sandy beaches and other wasteland. It could overcome the contradiction between cotton and grain, and expand the strategic reserve material cultivation. In this paper, the medicine, energy, raw materials and cotton cultivation techniques of *Calotropis gigantean* research progress and cultural problems were described. Making shallow understanding in the direction of *Calotropis gigantean* cultivation and research direction could provide reference for exploitation and intensive cropping.

**Key words:** *Calotropis gigantean*; medicinal; cotton; energy; cultivation technique

酶及谷蛋白前体等蛋白质的表达明显上调;谷氨酸氨甲酰转移酶表达量明显下降等。Imin 等<sup>[4]</sup>研究了经过低温处理后水稻三核期花药蛋白,发现表达量上调的蛋白质 47 个,表达量下降的有 11 个,鉴定的 18 个差异蛋白中一些可能是雄性不育相关蛋白。文李等<sup>[5]</sup>对红莲型细胞质雄性不育水稻的不育系、保持系及  $F_1$  代杂系的花药蛋白质进行 2-DE 分离,经质谱分析鉴定出 48 个差异蛋白质点,这些蛋白的表达量降低或不表达可能使得细胞供能不足、淀粉不能正常合成,导致花粉败育。梁海鹰等<sup>[6]</sup>对光温敏核不育水稻(培矮 64S)幼穗育性转换期进行蛋白质组学分析,结果显示:在不育变化为可育的过程中,明显表达上调的蛋白质点包括几丁质酶、丙酮酸脱氢酶等;超氧化物歧化酶、硝酸还原酶脱辅基酶蛋白等明显下调;金属硫蛋白 RicMT 只在可育系中存在。邢俊杰等<sup>[7]</sup>研究了光温敏核不育水稻基因表达产物,发现肌动蛋白表达异常,肌动蛋白的异常表达可能使花粉微丝结构改变,使得能量的运输受阻,使得花粉败育。

## 2.2 小麦雄性不育蛋白质组学研究进展

门淑珍等<sup>[8]</sup>以小麦京 411 不育株和可育株花药为材料进行双向电泳,发现不育花药比可育花药缺少相对分子量分别为 15.8、17、17.8、38、81.3 kDa 的几个多肽;分子量为 16.2 kDa 等电点约为 3.6 的酸性蛋白只在不育系出现。范宝莉等<sup>[9]</sup>比较了小麦 T 型细胞质雄性不育系与保持系花药蛋白,发现在花粉败育 2~3 核小孢子期,53、50、48 和 20 kDa 4 种蛋白质只在不育系存在。王永军等<sup>[10]</sup>通过对雄性不育小麦花药和旗叶蛋白质的比较研究发现不同时期的旗叶蛋白无差异性,但花药中存在蛋白的差异表达,说明小麦雄性不育相关蛋白主要在花药中。刘卫等<sup>[11]</sup>利用 2-DE 分析了遗传型和生理型雄性不育小麦不育系和相应保持系花药蛋白,结果显示:2 个不育材料有几个明显的特异蛋白点,而在保持系中未发现;不同的不育机理下,2 个不育材料又分别具有自己的表达特异蛋白点,比较分析可知,与花药败育有关的特定蛋白的表达,可能使物质能量代谢受阻,导致雄性不育的发生。叶景秀等<sup>[12]</sup>通过对经杀虫剂诱导产生的生理型小麦雄性不育的花药蛋白质组学分析,结果显示:不育材料和可育材料在单核期和二核期花药蛋白均有明显差异,表明不育基因表达是具有时空性;不育材料较可育材料蛋白质数目和部分蛋白质表达量均有下降,可能是这些蛋白的缺失,使得育性相关活动停滞,最终导致花粉败育。Chen 等<sup>[13]</sup>比较了可育和不育小麦的线粒体蛋白,发现 11 种线粒体蛋白表达有差异;进一步对这些点质谱鉴定后发现其中 3 个蛋白点为 SOD。王书平等<sup>[14]</sup>以经杀雄剂 SQ-1 诱导的生理型雄性不育系小麦,以及对应正常可育系所构建的等生理差异系为试材,用 2-DE 技术分离完整叶绿体蛋白质,2-DE 图谱共检测到 150 个

差异点,经质谱鉴定出 6 个差异表达蛋白质,这些蛋白直接或间接的参与了花药蛋白质转运、蛋白质互作、花药内激素调节、活性氧积累及花药的发育,这些生理代谢过程的变异可能直接导致不育系小麦的花粉败育。

## 2.3 棉花雄性不育蛋白质组学研究进展

王学德<sup>[15]</sup>以 SDS-PAGE、RAPD 和 RFLP 技术分析了西棉细胞质雄性不育系和保持系的花药线粒体蛋白,SDS-PAGE 分析表明,不育系中缺少 1 条分子量约为 31 kDa 的多肽。李成奇<sup>[16]</sup>对晋 A 及其保持系酯酶过氧化物酶电泳分析时指出:进入生殖阶段,受育性基因影响,晋 A 较其保持系明显缺少特征谱带;而非生殖阶段,晋 A 及其保持系 2 种同工酶无较大差别。张子学等<sup>[17]</sup>分析了 ms5、ms6 雄性不育两用系发育中 POD 同工酶的变化,结果显示:在单核期和二核期 2 种不同叶型的两用系 A 比 B 分别减少 1 或 2 条带,推测在不育株中,由于部分基因被阻遏,使某些基因难以表达,造成不育株中酶带减少。由于不育基因可能导致过氧化物酶同工酶基因表达异常,扰乱了花药中物质和能量代谢平衡,最终导致雄性不育。

## 2.4 大豆雄性不育蛋白质组学研究进展

曾维英等<sup>[18-20]</sup>利用双向电泳技术分别比较了 2 种大豆质核互作雄性不育系 NJCMS1A、NJCMS2A 与其相应保持系 NJCMS1B、NJCMS2B 花药的蛋白质,结果显示:在花药中,保持系 NJCMS1B 与不育系 NJCMS1A 有 24 个差异表达蛋白点,保持系 NJCMS2B 与不育系 NJCMS2A 有 25 个差异表达蛋白点;种子中仅有少量差异表达蛋白点;叶片中基本没有差异表达蛋白点。差异表达的蛋白可能是在花粉发育过程中一些关键酶或者重要的代谢中间物质,结果表明:雄性不育基因多在花药中表达。陈培等<sup>[21]</sup>研究了大豆质核互作雄性不育系 W931A 及其同型保持系 W931B 不同器官的蛋白质组进行比较性研究,发现不育系与其保持系花药 SDS-PAGE 图谱在二胞花粉期间有 3 条差异带,种子和苗期叶片的蛋白质 SDS-PAGE 图谱基本没有差异,表明大豆雄性不育相关基因表达具有器官特异性。

## 3 展望

利用物种间的杂种优势可以增加经济作物的产量,培育雄性不育植株是获得优良品种、增加产量的一个有效途径,但是自然界中自发产生的不育系不稳定、抗逆性差而且很难找到合适的恢复系和保持系等,人工去雄要花费大量的时间和精力。近年来,分子生物学技术的发展为雄性不育的研究提供了有力的根据,因此,通过分子生物学及植物基因工程手段获得转基因雄性不育系的研究和应用具有广阔的前景。Ma X D 等<sup>[21]</sup>应用 cDNA-AFLP 对棉花的 ms5ms6 双隐性核雄性不育两用系的不育株和可育株花粉发育的 3 个时期的蛋白质进行对比分析,共得到 17 个差异表达片

段,它们分别属于 11 种表达模式,其中 14 个片段可以在 NCBI 数据库中找到同源序列,这些片段所编码的基因可能参与了信号转导、转录、能量代谢、细胞壁发育等相关过程。

针对 2-DE 技术中存在的分辨率低、重复性低及不可定量等问题,Marouga 等<sup>[22]</sup>将荧光染料用于 2-DE 技术中,产生了荧光差异双向电泳技术(2-DIGE),Sheoran 等<sup>[23-24]</sup>利用 2-DIGE 技术分别研究了核不育型番茄突变体 7B-1 和野生型之间的蛋白差异及甘蓝型雄性不育油菜不育系和保持系的花药蛋白,其结果无论分辨率还是在重复性都较常规 2-DE 高。蛋白质组学自身技术的发展和成熟也为研究植物雄性不育提供了基础。

利用蛋白质组技术找到与不育相关的蛋白质,然后通过蛋白质数据库的搜索寻找编码育性相关蛋白的基因成为研究植物雄性不育的一种新思路,这种方法以蛋白质组特有的可比对性和高重复性克服了寻找不育基因保守序列时的假阳性情况,今后再利用基因工程技术将造成雄性不育的基因导入到可育品种中获得转基因不育系。这对作物植物雄性不育的研究不但提供了理论依据,而且缩短了育种周期,带来了不可估量的经济效益。

### 参考文献

- [1] 魏磊,丁毅,胡耀军,等. 紫稻细胞质雄性不育系叶片全蛋白双向电泳分析[J]. 遗传学报,2002,29(8):696-699.
- [2] 谢锦云,李小兰,陈平,等. 温敏核不育水稻花药蛋白质组初步分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2003,19(2):215-221.
- [3] Imin N, Kerim T, Rolfe B G, Weinman J J. Effect of early cold stress on the maturation of rice anthers[J]. Proteomics,2004(4):1873-1882.
- [4] Wen L, Liu G, Li S Q, et al. Proteomic analysis of anthers from honglian cytoplasmic male sterility line rice and its corresponding maintainer and hybrid [J]. Botanical Studies,2007,48:293-309.
- [5] 梁海鹰,谢锦云,陈平,等. 光温敏核不育水稻幼穗育性转换期蛋白质组的初步分析[J]. 广东海洋大学学报,2007,27(3):117-118.
- [6] 邢俊杰,李莉,李磊,等. 水稻光温敏核不育基因表达产物初步研究[J]. 生命科学研究,2008,12(2):126-130.
- [7] 门淑珍,刘博林. 小麦显性雄性核不育材料后代不育株与可育株不同器官的蛋白质比较研究[J]. 作物学报,2001,27(1):117-122.
- [8] 范宝莉,王振英,陈宏,等. 小麦 T 型细胞质雄性不育系、保持系蛋白双向电泳比较分析[J]. 实验生物学报,2004,37(1):45-49.
- [9] 王永军,张改生,孙苏阳,等. 遗传型与生理型雄性不育小麦花药和旗叶蛋白质的比较研究[J]. 麦类作物学报,2007,27(6):965-968.
- [10] 刘卫,陈蕊红,张改生,等. 小麦遗传型与生理型雄性不育花药蛋白双向电泳分析[J]. 遗传,2008,30(8):1063-1068.
- [11] 叶景秀,陈红,张改生,等. 杀雄剂 SQ-1 诱导小麦雄性不育花药蛋白质组分析[J]. 农业生物技术学报,2009,17(5):858-864.
- [12] Chen R H, Liu W, Zhang G S, et al. Mitochondrial Proteomic Analysis of Cytoplasmic Male Sterility Line and Its Maintainer in Wheat (*Triticum aestivum* L.)[J]. Agricultural Sciences in China,2010,9(6):771-782.
- [13] 王书平,张改生,叶景秀,等. 杀雄剂 SQ-1 诱导小麦生理型雄性不育小花完整叶绿体差异蛋白质的鉴定[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2010,26(9):854-861.
- [14] 王学德. 细胞质雄性不育棉花线粒体蛋白质和 DNA 的分析[J]. 作物学报,2000,26(1):35-39.
- [15] 李成奇,石跃进,潘转霞,等. 棉花晋 A 及其保持系酯酶过氧化物酶 PAGE 电泳分析[J]. 华北农学报,2004,19(4):11-13.
- [16] 张子学,信纪存,徐玉江,等. 棉花 ms5ms6 雄性不育两用系发育过程中 POD 同工酶分析[J]. 西北植物学报,2006,26(3):517-520.
- [17] 曾维英,杨守萍,盖钧镒,等. 大豆质核互作雄性不育系 NJCMS1A 及其保持系的花药差异蛋白质组学研究[J]. 中国农业科学,2007,40(12):2679-2687.
- [18] 曾维英,杨守萍,喻德跃,等. 大豆质核互作雄性不育系 NJCMS2A 及其保持系的花药蛋白质组比较研究[J]. 作物学报,2007,33(10):1637-1643.
- [19] 曾维英,杨守萍,喻德跃,等. 大豆雄性不育系与其保持系不同器官蛋白质比较[J]. 西北植物学报,2008,28(8):1619-1624.
- [20] 陈培,张磊,邱丽娟,等. 大豆质核互作雄性不育系 W931A 及其保持系的差异蛋白质组学比较分析[J]. 作物杂志,2009(6):24-28.
- [21] Ma X D, Xing C Z, Guo L P, et al. Analysis of Differentially Expressed Genes in Genic Male Sterility Cotton(*Gossypium hirsutum* L.) Using cDNA-AFLP [J]. Journal of Genetics and Genomics,2007,34(6):536-543.
- [22] Marouga R, David S, Hawkins E. The development of the DIGE system: 2D fluorescence difference gel analysis technology [J]. Anal Bioanal Chem, 2005,382(3):669-678.
- [23] Sheoran I S, Ross A R S, Olson D J H, et al. Differential expression of proteins in the wild type and 7B-1 male-sterile mutant anthers of tomato (*Solanum lycopersicum*): a proteomic analysis[J]. Proteomics, 2009, 71(6):624-636.
- [24] Sheoran I S, Sawhney V K. Proteome analysis of the normal and Ogura (*ogu*)CMS anthers of *Brassica napus* to identify proteins associated with male sterility[J]. Botany,2010:217-230.

## Application of Proteomics to the Plant Male Sterility

HAN Lu, WANG Jing, ZHENG Rui

(College of Life Sciences, Ningxia University, Yinchuan, Ningxia 750021)

**Abstract:** There are series of post-transcriptional modification after gene transcription. It does not reveal the molecular mechanism of male sterility in plants just from the genome, also requires studies of proteomics. This paper reviewed the application of proteomics to some main crops. The results showed that the expression of sterile gene had time and space characteristics and organ specificity, also proposed a strategy of studying plant male sterility by combining proteomic technologies with genetic engineering.

**Key words:** plant male sterility; heterosis; proteomics; two-dimensional electrophoresis; mass spectrum