

小麦质核互作型雄性不育系及其保持系 花药差异蛋白质组学分析*

陈蕊红 叶景秀 张改生** 王俊生 牛娜 马守才 赵继新 朱建楚

(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, 杨凌 712100)

摘要 为了能从蛋白质水平揭示小麦细胞质雄性不育的分子遗传机制, 采用 IEF/SDS-PAGE 双向凝胶电泳技术, 对小麦质核互作型雄性不育系(S)-1376A 及其保持系(A)-1376B 在花药发育的单核期、二核期蛋白质进行了差异蛋白质组学研究, 经考马斯亮蓝染色, 得到了重复性较好的双向电泳图谱. PDQuest 软件在分子质量 9.0~100.0 ku、等电点 4~7 线性范围内, 可识别约 610 个蛋白质点, 对 28 个差异表达的蛋白质点采用基质辅助激光解吸分离飞行时间质谱进行肽指纹图谱分析, 并利用 Mascot 软件在 NCBI 数据库搜索, 鉴定出 12 个差异表达蛋白, 其中 5 个差异表达蛋白可能与雄性不育有关, 分别是泛素结合酶 E2、甘氨酸富集蛋白、抗坏血酸过氧化物酶、假定半胱氨酸蛋白酶抑制剂及 1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶小链克隆 512, 它们参与了物质能量代谢、细胞程序化死亡及花发育调控等过程, 推测不育系(S)-1376A 雄性不育性可能与这些生理生化代谢有关. 研究结果为揭示雄性不育机理提供了理论依据.

关键词 小麦, 质核互作型雄性不育, 差异蛋白质组学, 双向凝胶电泳, 基质辅助激光解吸飞行时间质谱

学科分类号 Q946.1, Q51

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00515

细胞质雄性不育 (cytoplasmic male sterility, CMS) 是一种广泛存在于高等植物中的生物学现象, 因其雄性生殖系统不能产生有功能的花粉, 而雌性生殖系统发育和营养生长完全正常的特点, 使其在杂交制种中免去了“去雄”的繁琐步骤, 已成为作物杂种优势利用的重要途径. 随着一些模式植物及一些物种的基因组信息的不断完善和丰富, 对细胞质雄性不育也有了新的认识. 目前普遍认为, 细胞质雄性不育系的不育性是由于线粒体基因组重排形成嵌合基因而造成的^[1], 对雄性不育性的研究也主要集中在嵌合基因的分离和结构分析及转录、转录后水平的调控等方面^[2, 3]. 然而, 关于细胞质雄性不育形成的内在机理仍需更进一步的研究.

蛋白质是基因表达的最终产物, 也是基因功能的执行者. 利用蛋白质组学技术, 比较研究与不育相关的关键发育时期不育系和保持系花药蛋白质组的变化, 可以较全面地反映与育性相关蛋白质或多肽的表达变化特征、以及蛋白质的修饰及互作关系, 对了解雄性不育花药败育发生的原因及其生理生化代谢机制具有重要作用. 近几年, 利用蛋白质

组学技术进行植物雄性不育性的研究已有一些报道, Mihr 等^[4]研究表明, 甘蓝型油菜雄性不育系 *Tournefortii* 及近等基因可育系两者在花药的全蛋白质及线粒体蛋白质之间存在明显的差异, 差异蛋白可能与雄性不育有关. Wen 等^[5]对红莲型细胞质雄性不育水稻的不育系(YTA)和保持系(YTB)及杂交 F1 代的四分体时期花药总蛋白进行双向凝胶电泳分析, 48 个差异蛋白质点分别参与了代谢、蛋白质合成、转录、信号转导、细胞凋亡等重要生理过程, 推测可能是导致花药败育的原因. Hochholdinger 等^[6]通过对玉米 T 型胞质不育系和可育系线粒体蛋白质组的比较研究发现, 由核编码的线粒体蛋白质的表达存在差异, 且细胞质对编码线

* 国家自然科学基金(301705760), 国家高技术研究发展计划(863)(2002AA207004), 陕西省“13115”科技创新工程重大科技专项(2007ZDKG-020), 国家杨凌农业生物技术育种中心专项基金(99-1A)和西北农林科技大学拔尖人才支持计划项目资助项目.

** 通讯联系人.

Tel/Fax: 029-87092292, E-mail: zhanggsh@public.xa.sn.cn

收稿日期: 2008-07-19, 接受日期: 2008-09-02

粒体蛋白质的核基因表达具有调控作用, 认为这很有可能与育性表达紧密相关. 前述研究都显示出蛋白质组学技术作为进一步阐释植物细胞质雄性不育机理的潜力.

然而, 目前针对小麦细胞质雄性不育的蛋白质组学研究报道甚少. 有鉴于此, 本研究特以小麦花药为材料, 在建立了相应的蛋白质双向凝胶电泳技术的基础上, 对花药差异蛋白质组学进行了分析与研究, 旨在为揭示小麦细胞质雄性不育形成的机理提供理论依据和技术支撑.

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料.

供试小麦雄性不育系(S)-1376A [(S)代表具有斯卑尔脱小麦细胞质]是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(*Triticum spelta* L.)不育细胞质的不育系(S)-8230-144A 与普通小麦(*T. aestivum* L.)栽培品种西农 1376 通过多代核置换回交育成的稳定不育系, 目前回交世代已在 20 代(BC₂₀)以上, 不育性非常稳定, 综合农艺性状优良. 其不育系和保持系多年来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与实践应用的重要骨干亲本种质材料.

不育系(S)-1376A 和保持系(A)-1376B [(A)代表具有普通小麦细胞质], 于 2005 年秋种植于西北农林科技大学农场试验田. 细胞学观察表明, 不育系(S)-1376A 花粉败育的主要时期为单核期, 但也有少量花粉发育至二核期发生败育. 依次, 本实验于 2006 年 4 月中旬, 先行形态学观察和细胞学镜检, 分别采集(S)-1376A 和保持系(A)-1376B 小孢子发育至单核期、二核期幼穗, 液氮速冻后存储于 -80℃ 冰箱备用.

1.1.2 仪器和试剂.

PROTEAN IEF Cell 等电聚焦系统、PROTEAN II xi Cell 垂直电泳系统、PDQuest 8.0.1 凝胶图像分析软件均为美国 Bio-Rad 公司产品; UMAX Power Look 2100XL 光密度扫描仪为台湾力捷公司产品; Autoflex MALDI-TOF-MS 质谱仪为德国 Bruker 公司产品.

固相 pH 梯度预制 IPG 胶条(17 cm, pH4~7), 载体两性电解质, 矿物油购自美国 Bio-Rad 公司; 丙烯酰胺, N, N'-2 甲叉双丙烯酰胺, 十二烷基磺

酸钠(SDS), 二硫苏糖醇(DTT), CHAPS, 尿素, 硫脲, Tris, 甘氨酸, 过硫酸铵(AP), 碘乙酰胺, TEMED 均为 Sigma 公司产品; 胰蛋白酶、 α 氨基-4-羟基肉桂酸、三氟乙酸(TFA)为 Roche 公司产品, 其他为国产分析纯试剂.

1.2 方法

1.2.1 花药蛋白质样品制备. 蛋白质样品提取参照 Damerval 等^[7]的方法, 用前在 4℃ 下剥取花药(约 2g), 加 10% PVP 和少量石英砂, 液氮中研磨成细粉. 低温下用 TCA-丙酮法制得蛋白干粉, 蛋白干粉 1 mg 与 20 μ l 蛋白质裂解缓冲液[7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 4% CHAPS, 65mmol/L DTT, 2%两性电解质 Biolyte(其中 1% pH 3~10, 1% pH 4~6)]的比例充分混合, 4℃ 搅拌, 悬浮振荡 2 min, 在液氮与 35℃ 水浴中交替冻融 3 次, 每融一次涡旋振荡 2 min, 于 24℃ 下 20 000 g 离心 15 min. 上清液即为蛋白质样品, Bradford 法^[8]测定样品液蛋白质的浓度后, 分装至 1.5 ml 离心管, -80℃ 储存备用.

1.2.2 第一向等电聚焦电泳. 主要参照 Bio-Rad 公司等电聚焦系统说明进行, 根据浓度测定结果, 取 1 mg 蛋白质样品加适量水化液[7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 4% CHAPS, 65 mmol/L DTT, 0.2%两性电解质 Biolyte(其中 0.1% pH 3~10, 0.1% pH 4~6), 痕量溴酚蓝]至终体积为 350 μ l, 充分混匀后, 沿 IPG 聚焦盘槽缓慢均匀加入. 将 pH4~7, 17 cm IPG 胶条胶面朝下覆盖在样品上, 并在胶面上覆盖 2 ml 矿物油, 置于 PROTEAN IEF Cell 型等电聚焦电泳仪上, 水化和聚焦在 20℃ 自动进行, 以 50 V 低电压水化 12 h 后, 按 500 V 1 h, 1 000 V 1 h, 4 000 V 1 h, 8 000 V 4 h 电泳后, 最后在 8 000 V 恒压下继续进行等电聚焦, 总电压时间积为 80 000 Vh 时结束电泳.

1.2.3 第二向 SDS-PAGE. 第一向等电聚焦结束后, 将 IPG 胶条放于 5 ml 胶条平衡缓冲液 I [6 mol/L 尿素, 2% SDS, 0.375 mol/L Tris-HCl(pH8.8), 20% 甘油, 2% DTT(现加)]中振荡平衡 15 min, 再转入 5 ml 胶条平衡缓冲液 II [6 mol/L 尿素, 2% SDS, 0.375 mol/L Tris-HCl(pH8.8), 20%甘油, 2.5%碘乙酰胺(现加)]中振荡平衡 15 min. 平衡完毕后将胶条转移到 13% SDS-PAGE 凝胶上, 低熔点琼脂糖封胶后, 进行第二向 SDS-PAGE, 15℃ 循环水冷却, 待溴酚蓝至凝胶底部时停止电泳. 凝胶染色采用胶体考马斯亮蓝染色法.

1.2.4 图谱分析. 采用 UMAX Powerlook 2100XL 型

光密度扫描仪对经考马斯亮蓝染色的 2-DE 凝胶进行扫描照相, 分辨率为 600dpi; 用 PDQuest8.0.1 软件对图像进行分析, 包括背景消减、斑点检测、匹配、数据分析等, 获取差异表达蛋白质点。

1.2.5 差异表达蛋白质点的质谱分析及鉴定.

a. 考染蛋白质点的胶内酶解. 在 2-DE 凝胶上切取差异蛋白质点于 1.5 ml EP 管内, 双蒸水洗后, 用 50%乙腈和 50 mmol/L 碳酸氢钠溶液反复脱色, 每次 5 min, 至蓝色褪去后, 乙腈脱水真空抽干. 加入含 10 mmol/L DTT 的 25 mmol/L 碳酸氢铵溶液, 于 56℃ 还原 1 h, 再用含 55 mmol/L 碘乙酰胺的 25 mmol/L 碳酸氢铵于室温黑室中烷基化 45 min, 依次用 25 mmol/L 碳酸氢铵、50%乙腈溶液和乙腈洗, 乙腈脱水到胶粒完全变白为止, 真空干燥后, 加 20~25 μ l Trypsin 酶液 (Promega Sequencing Grade Modified Trypsin 10~15 mg/L 于 25 mmol/L NH_4HCO_3 , pH8.0), 覆盖胶块, 等待吸胀 15 min 左右, 调整酶液. 37℃ 过夜 15 h 左右. 酶解后的肽片段用 50%乙腈(内含 0.5% TFA) 萃取 2 次, 合并萃取液, 冷冻干燥.

b. MALDI-TOF-MS 肽质量指纹分析. 将 0.75 μ l 样品与基质(新鲜配制 10 g/L 的 α - 氰基 -4- 羟基肉桂酸)等体积混合, 点于靶上, 让靶自然干

燥. 最后将靶装入质谱仪进行分析, 仪器相应的参数为反射模式, 离子源加速电压 1 为 19.1 kV, 加速电压 2 为 16.4 kV, N_2 激光波长 337 nm, 离子延迟提取 90 ns, 真空度 1.5e^{-006} mbar, 质谱信号单次累加 200 次, 正离子谱测定. 肽质量指纹图谱 (PMF) 质量扫描范围为 700~4 000 u.

c. 数据库检索分析. 将获得的肽指纹图谱 (PMF) 数据通过 Mascot 搜索引擎 (<http://www.matrixscience.com>) 并用下列参数在 NCBI nr 数据库中检索蛋白质信息: Species, green plant; 酶, 胰蛋白酶(trypsin); 肽质量模式, monoisotopic; 肽质量允错, ± 100 ppm; 荷电状态, 1+; 最大漏切位点, 1; 一般认为 Sequence coverage>10%, 至少有 4 个片段匹配.

2 结果与分析

2.1 小麦花药双向电泳图谱的建立及图像分析

选用 pH4~7, 17 cm 的 IPG 胶条, 采用 IEF/SDS-PAGE 双向凝胶电泳技术对小麦细胞质雄性不育(S)-1376A 和保持系(A)-1376B 不同发育时期花药总蛋白质进行了分离, 经考马斯亮蓝 G-250 染色后, 获得了分辨率和重复性均较好的 2-DE 图谱(图 1). 实验共重复 3 次, 以确保实验结果的可靠

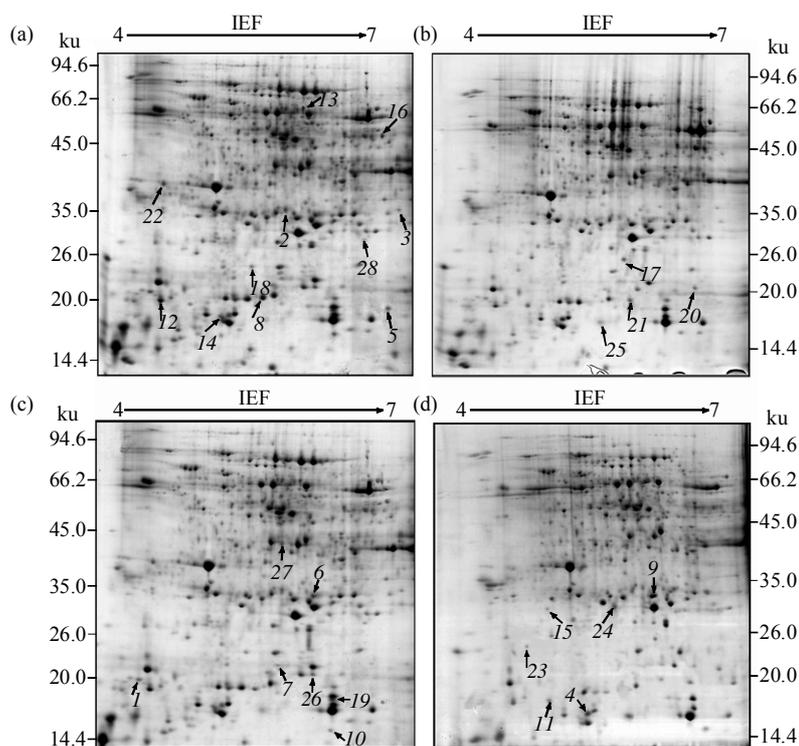


Fig. 1 2-DE anther protein maps of the male-sterile line (S)-1376A and its maintainer (A)-1376B

(a, c) Uninucleate anther stage and binucleate anther stage of (S)-1376A. (b, d) Uninucleate anther stage and binucleate anther stage of (A)-1376B. The arrows show spots analyzed by MALDI-TOF/MS.

性. PDQuest 8.0.1 软件对不育系(S)-1376A(单核期、二核期)及保持系(A)-1376B(单核期、二核期)不同时期花药的 2-DE 图谱进行比较分析, 在 Local regression 模式下, Floating Ball 40 背景抽提, Median 3×3 噪声过滤类型, 点检测灵敏度为 39.33 下, 在等电点 4.0~7.0, 分子质量 9.0~100.0 ku 之间, 不育系(S)-1376A(单核期, 二核期)和保持系(A)-1376B(单核期, 二核期)的 2-DE 图谱上平均可识别 623、612、608、596 个清晰的蛋白质点, 各个时期蛋白质点图谱十分相似, 且蛋白质点大多分布在偏酸性 pH 4.5~6.5、分子质量 15.0~94.0 ku 范围内. (S)-1376A 单核期与(A)-1376B 单核期的双向电泳图谱匹配率为 95%, 与(S)-1376A 二核期的匹配率为 93%, 与(A)-1376B 二核期的匹配率为 92%, 表明这四者之间主要蛋白质表达水平基本相同, 仅有少量蛋白质发生了变化.

2.2 不同时期蛋白质谱表达差异的分析

PDQuest 软件对两个不同时期的蛋白质点在不育系和保持系中的差异表达蛋白进行了分析, 为了获得较准确的比较结果, 以所有检测出的蛋白质点的浓度总和进行均一化处理, 以消除不同凝胶间的实验误差, 分析结果表明, 在两个不同时期,

(S)-1376A 和(A)-1376B 两者之间存在有明显的差异, 包括量的差异和有无的差异. 将在任意两个 2-DE 图谱表达量度差异大于 2 倍点的差异视为量的差异, 低于 2 倍的差异视为系统误差, 共获得有无或量的差异蛋白质点 28 个(图 1 箭头所示). 这 28 个蛋白质点的相对丰度如图 2. 图 3 为部分差异蛋白质点的局部放大图. 依据其表达变化特点将这 28 个蛋白质点分为 5 组. 第一组包括点 3, 5, 7, 10, 16, 18, 19, 26, 28 等, 表现为在不育系单核期、二核期特异表达, 而在保持系的两个时期均缺失, 其中点 5, 10, 16, 18, 26, 28 在不育系单核期的表达量大于二核期的表达量. 第二组为在保持系两个时期同时出现, 而在不育系的两个时期均未表达的蛋白质点, 包括点 17, 20, 21, 23 等. 第三组为点 4, 9, 11, 24, 25 是与不育系两个时期相比, 在保持系单核期, 二核期表达量均大于 2 倍以上的点. 第四组包括点 1, 2, 6, 8, 12, 13, 14, 22, 27 等, 其在不育系两个时期表达量均比保持系两个时期大于 2 倍以上的点. 第五组为 15 号点, 在保持系单核期及不育系两个时期表达量均较低, 而在保持系的二核期表达量急剧增加.

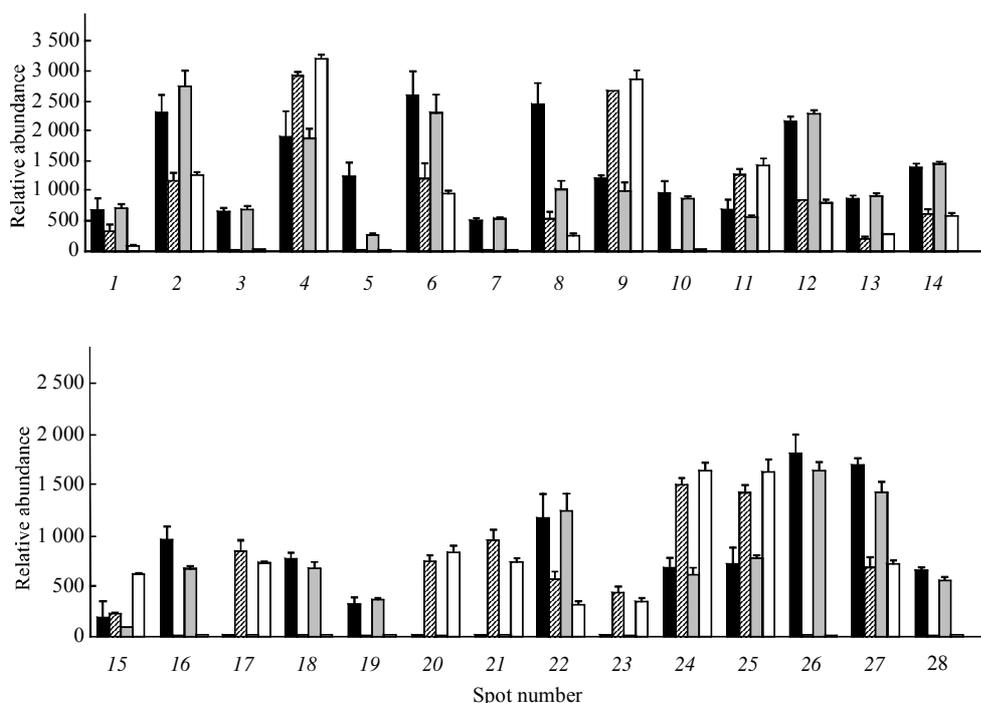


Fig. 2 Histograms showing the volume changes of 28 differentially displayed spots from 2-DE

The T-ticks on the top of each bar indicate the standard error. ■: Uninucleate stage of (S)-1376A; ▨: Uninucleate stage of (A)-1376B; ▤: Binucleate stage of (S)-1376A; □: Binucleate stage of (A)-1376B.

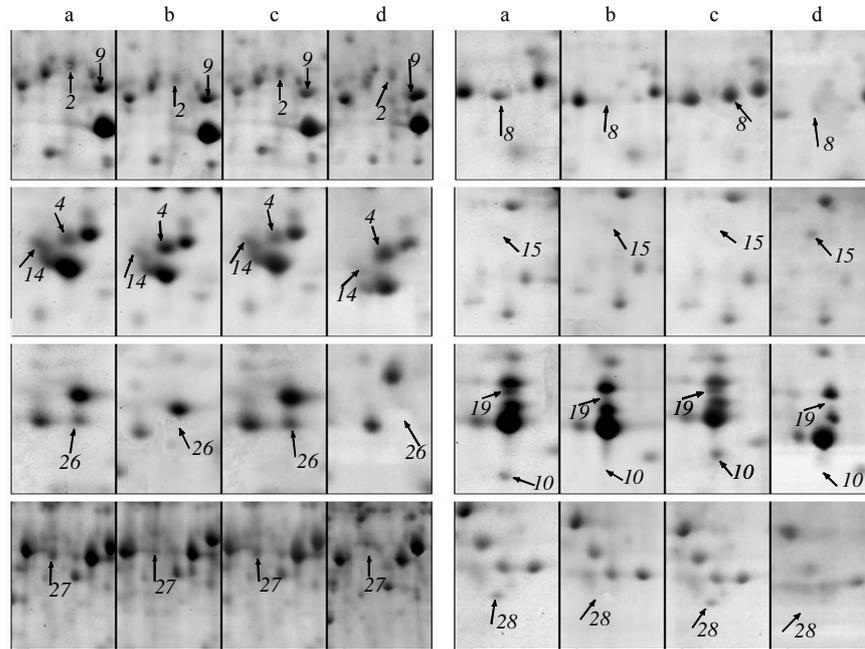


Fig. 3 Enlargements of some differentially expressed protein spots in Fig.1

(a, c) Uninucleate anther stage and binucleate anther stage of (S)-1376A. (b, d). Uninucleate anther stage and binucleate anther stage of (A)-1376B.

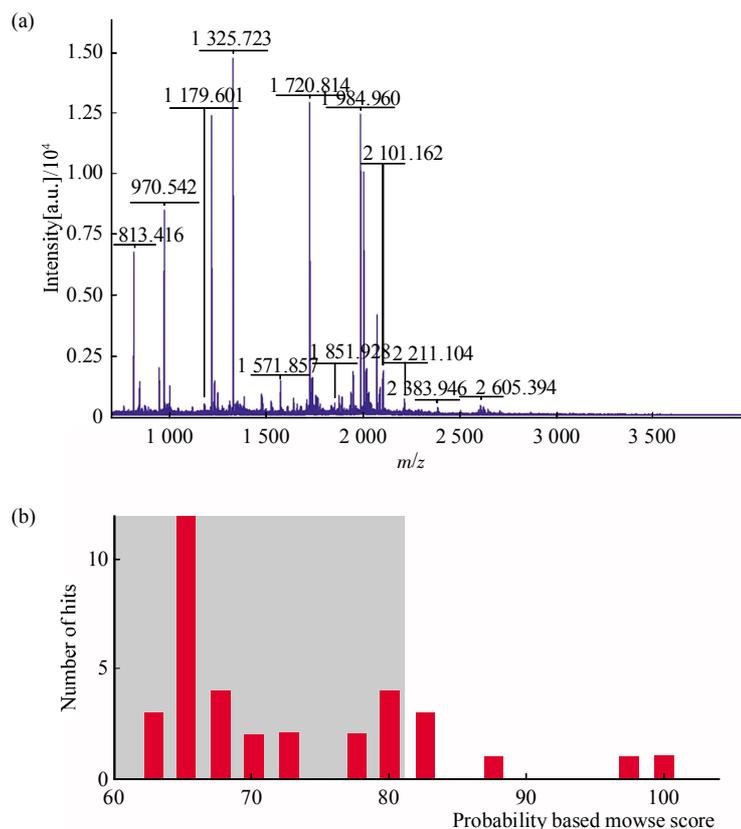
2.3 差异表达蛋白的 MALDI-TOF-MS 分析及数据库检索

将 28 个差异表达的蛋白质点从 2-DE 胶上切下, 进行蛋白质斑点的脱色和胶上原位消化、酶解, 酶解后的肽混合物经 MALDI-TOF-MS 分析, 均获得了肽质量指纹图, 应用 Mascot 软件在 NCBI nr 数据库中搜索鉴定蛋白质, 28 个蛋白质点中有 12 个点得到了阳性结果(表 1), 而对于其他的

16 个点未能鉴定出有意义的结果. 对 12 个阳性结果结合双向凝胶电泳相应点的表观等电点、分子量、匹配肽段的多少及得分进行综合分析, 有 7 个蛋白质点被鉴定为, 泛素结合酶 E2, 甘氨酸富集蛋白, 抗坏血酸过氧化物酶, 假定半胱氨酸蛋白酶抑制剂, 1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶小链克隆 512 及 2 个功能未知的蛋白质. 图 4 是 spot5 的肽质量指纹及匹配的肽段数.

Table 1 Differentially-expressed proteins identified by PMF query

Spot No.	Accession No.	Theoretical M/pI	Experimental M/pI	Sequence coverage(%)	Score	Protein name
5	gi 5381389	17.2/6.14	17.9/6.79	43%	82	Ubiquitin-protein ligase E2
8	gi 40363759	19.6/5.63	19.8/5.59	91%	144	Putative glycine-rich protein
13	gi 118497858	64.65/8.09	64.1/5.79	33%	80	Long chain fatty acid CoA ligase
14	gi 50726501	16.99/10.87	16.4/5.13	48%	78	Hypothetical protein
15	gi 15808779	27.96/5.10	29.3/4.80	49%	125	Ascorbate peroxidase
16	gi 147834873	55.8/6.69	56.2/6.74	17%	71	Hypothetical protein
17	gi 56783763	23.26/5.82	23.9/5.90	35%	77	Putative cysteine proteinase inhibitor
18	gi 118483707	22.78/5.12	22.5/5.21	49%	69	Unknown
20	gi 11990897	19.73/8.8	21.4/6.52	55%	114	Ribulose-1, 5-bisphosphatecarboxylase / oxygenase small subunit
24	gi 131394	27.4/8.84	29.5/5.51	72%	177	23 ku subunit of oxygen evolving system of photosystem II
25	gi 132107	13.2/5.84	15.1/5.72	57%	78	Ribulose bisphosphate carboxylase small chain clone 512 (rubico small subunit)
26	gi 11990893	19.73/9.06	20.5/6.11	54%	82	Ribulose-1, 5-bisphosphatecarboxylase / oxygenase small subunit



The matched peptides for spot 5 are shown in bold red font as follows:

1 MANSNLPKRI **IKETQR**LLSE PAPGISASPS EDNMRDFNVM ILGPAQSPYE
 51 GGVF**KLELFL** **PEEYPMAPPK** VRFLTKIYHP NIDKLGRICL DILKDKWSPA
 101 **LQIRTVLLSI** QALLSAPNPD DPLSENIAKH WKSNEAEAVE **TAKEWTRL**YA
 151 TGA

Fig. 4 MALDI-TOF-MS analysis of spot 5

(a) Peptide mass fingerprinting of protein spot 5. (b) Mowse score and Database query result of spot 5. Protein score is $-10 \lg P$, where P is the probability that the observed match is a random event. Protein scores greater than 81 are significant ($P < 0.05$).

3 讨 论

3.1 不同发育时期雄性不育系及保持系花药蛋白质的变化

生物体内蛋白质的存在是一个动态的过程, 具有明显的时空性和可调节性. 植物同一组织在不同空间和时间内所表达的蛋白质都不相同, 细胞质雄性不育花药败育过程中所涉及的蛋白质变化是个动态的变化过程, 运用蛋白质组学对在不同发育时期, 不育系和保持系两种材料表达的蛋白质进行差异比较, 对了解雄性不育花药败育发生的原因具有重要作用. 以往在其他作物虽有相关报道^[5, 9], 但多数都集中在对花药发育的某一个时期进行差异比较分析, 所得出的结果并不能全面反映在雄性不育花药败育过程中蛋白质的动态变化过程. 细胞学观

察表明, 小麦质核互作型雄性不育系(S)-1376A 花粉败育的主要时期为单核期, 但也有少量花粉发育至二核期败育. 因此, 本研究对质核互作型雄性不育系(S)-1376A 及保持系(A)-1376B 在两个不同时期的花药蛋白质进行了差异蛋白质组比较研究. 为了明确小麦花药蛋白质组分布特点, 我们最初采用 17 cm, pH 3~10 的非线性胶条对小麦花药蛋白质进行分离, 染色后, 在胶面上检测到大约 320~350 个蛋白质点^[10], 但其中大部分蛋白质集中在 pH 4~7 范围内, 有的高丰度蛋白质斑点出现重叠现象, 未能对此区域蛋白质进行很好的分离. 为了获得更好的分离效果, 我们再改用 pH 4~7 范围的线性胶条进行双向电泳分离, 可检测到大约 600 个蛋白质点, 大大地提高了小麦花药蛋白质的分辨率. 表明 pH 4~7 的线性胶条更适用于对小麦花药

蛋白的分离.

选用 pH 4~7, 17 cm 的 IPG 胶条, 在雄性不育系(S)-1376A 及保持系(A)-1376B 两个不同时期共获得差异蛋白质点 28 个, 这 28 个差异蛋白质点一方面表现为, 在花药发育的单核期, 不育系相对于保持系出现了一些特异表达或表达量上调的蛋白质点, 同时与保持系相比也有一些蛋白质点缺失, 或部分蛋白质点表达量下调, 说明在花药败育的关键时期, 一些特定的蛋白质参与了此过程, 这些特异表达或上调的蛋白质点可能起到一种阻遏作用, 遏制了一些正常花粉发育所需要蛋白质的表达, 表现在 2-DE 胶上即为不育系上一些蛋白质点的缺失或表达量的下调. 另一方面表现为不育系二核期的花药蛋白质较其单核期部分蛋白质点表达量的下调, 说明在花粉败育后, 可能由于参与正常花粉发育的部分蛋白质被降解或正常的代谢受阻所致. 对这 28 个差异表达蛋白质点进行 PMF 鉴定, 初步鉴定出了 7 个差异表达蛋白, 经数据库检索, 这些差异蛋白为泛素结合酶 E2、甘氨酸富集蛋白、抗坏血酸过氧化物酶、假定半胱氨酸蛋白酶抑制剂、1, 5- 二磷酸核酮糖羧化酶 / 加氧酶小链克隆 512 及 2 个功能未知的蛋白质, 很有可能与(S)- 1376A 雄性不育性有关.

3.2 差异表达蛋白的功能推测

Spot 5 被鉴定为泛素蛋白结合酶 E2(ubiquitin-protein ligase E2), 泛素 - 蛋白酶体途径是目前已知的所有真核生物体内具有高度选择性的最为重要的蛋白质降解途径. 在该过程中涉及一系列的酶参与反应, 包括泛素活化酶(E1)、泛素结合酶(E2)和泛素蛋白结合酶(E3), 该途径是细胞内短寿命蛋白和一些异常蛋白降解的普遍途径, 并参与细胞的多种生理活动代谢过程, 在细胞周期调控、细胞凋亡、发育和信号转导、植物衰老等方面具有重要的调控作用, 对维持细胞正常的生理功能具有十分重要的意义^[11~14]. 有研究表明, 泛素 - 蛋白酶体途径对花器官发育及花发育方面具有重要的调控作用^[15, 16]. 本研究在不育材料中检测到泛素蛋白结合酶 E2 的高表达, 由此推测可能由于不育系中泛素蛋白结合酶 E2 的特异表达, 引起泛素 - 蛋白酶体途径紊乱, 使细胞正常代谢受阻, 细胞凋亡异常, 花粉发育受阻, 最终导致不育发生. 本实验室李红霞等^[17]利用 SSH 技术研究了具有相同细胞质的雄性不育系及近等基因可育系中不育和可育 cDNA 文库的基因表达情况, 结果也表明, 泛素 - 蛋白酶体途径的代谢

与小麦雄性不育过程细胞凋亡有关, 这可进一步验证泛素 - 蛋白酶体途径与小麦雄性不育紧密相关性.

Spot 8 被鉴定为甘氨酸富集蛋白质(putative glycine-rich protein), 植物中的甘氨酸富集蛋白质(glycine-rich protein, GRP)是一类结构简单、主要由富含甘氨酸的高度重复序列组成的蛋白质, 它是单子叶植物细胞壁的一种重要结构蛋白, 其表达具有组织特异性, 并受发育阶段和多种环境因素的调控. 有研究报道, 有些 GRP 基因是绒毡层组织特异表达的, 已被广泛用于产生雄性不育的转基因植物. Mariani 等^[18]在烟草花药的绒毡层细胞中发现了一个特异表达的启动子 TA29, 该启动子为一个编码相对分子质量为 33 000 的富含甘氨酸的蛋白质, 将该启动子与核糖核酸酶基因 Barnase 相连构建成嵌合基因 TA29-Barnase 进行转化烟草和油菜, 获得了植物雄性不育植株. 罗玉英等^[19]的研究发现, TA29 是一个具有严格时空特异性的启动子, 它的特异表达的部位是绒毡层细胞, 特异表达时间是花粉母细胞减数分裂至小孢子有丝分裂时期. 康俊根等^[20]以 cDNA-AFLP 技术分别对 4 种具有不同败育时期特征的甘蓝雄性不育材料和遗传背景一致的可育材料进行分析, 序列分析结果表明富含甘氨酸蛋白、糖基水解酶家族基因等与花药发育 4 个时期雄性育性的建成有关. 本研究中, 甘氨酸富集蛋白质仅在不育系中表达, 而在保持系中缺失, 推测可能由于甘氨酸富集蛋白在绒毡层组织中的特异表达, 在花粉发育的特定阶段, 使得绒毡层组织的正常发育受到影响, 致使小孢子失去营养来源而逐渐消退, 导致雄性不育的发生.

Spot15 被鉴定为抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX), APX 是一种存在于高等植物中的一种以抗坏血酸为电子供体的专一性很强的过氧化物酶, 其催化的反应为: $2AsA(\text{抗坏血酸}) + H_2O_2 \rightarrow 2MDA(\text{单脱氢抗坏血酸}) + 2H_2O$, 在该反应途径中, 底物过氧化氢(H_2O_2)是一种活性氧, 它会通过 Haber-Weiss 反应生成毒性更大的活性氧(如 $\cdot OH$), 生物体内产生的 H_2O_2 和 O_2 等活性氧若得不到及时清除, 就会在细胞中积累, 引起细胞凋亡^[21]. Mittler 等^[22]在病毒诱导烟草细胞程序化死亡(PCD)的实验中发现细胞质抗坏血酸过氧化物酶活性下降, 据此他们认为细胞清除 H_2O_2 能力下降所导致 H_2O_2 的积累诱发了 PCD 过程. Jiang 等^[23]认为哈克尼西棉细胞质雄性不育是一种由线粒体基因突变引起的活性氧积累伤害花粉母细胞的程序性

死亡, 是雄性细胞对活性氧积累过程的过敏反应. Li 等^[24]在水稻红莲型雄性不育系中的研究结果表明, 在花粉发育过程中, 小孢子母细胞遭受活性氧的危害, 并引起了细胞的 PCD, 并最终导致花粉败育. 本研究中, 我们推测, 由于清除活性氧的酶促系统中抗坏血酸过氧化物酶在不育系中表达量的明显下调, 使得其不能及时清除体内的 H_2O_2 , 致使 H_2O_2 等活性氧在花药中大量积累, 引起了花药组织细胞的细胞凋亡, 并最终导致了花粉的败育.

Spot17 被鉴定为假定的半胱氨酸蛋白酶抑制剂 (putative cysteine proteinase inhibitor), 半胱氨酸蛋白酶是一类重要的蛋白酶家族, 与植物细胞程序化死亡有关^[25, 26], 曾维英等^[9]报道, 在大豆胞质雄性不育系 NJCMS1A 中, 半胱氨酸蛋白酶可能参与了细胞程序化死亡过程, 并将其与大豆胞质雄性不育系小孢子败育紧密相关联系. 更多的证据表明, 花药组织的细胞程序化死亡与雄性不育有关^[27, 28], 花药组织中绒粘层细胞的程序化死亡是小孢子败育的原因之一^[24, 29]. 半胱氨酸蛋白酶抑制剂是半胱氨酸蛋白酶的抑制因子, 能与半胱氨酸蛋白酶活性部位结合而抑制该酶的催化活性, 可以保护细胞免受不合适的内源或外部的蛋白质水解^[25, 30], 是植物组织中重要的一种防卫体系. 有研究证明, 半胱氨酸蛋白酶抑制剂可以阻止线粒体中细胞凋亡诱导因子 (AIF) 的释放^[31]. Solomon 等^[25]发现, 可通过内源半胱氨酸蛋白酶抑制剂基因的异位表达抑制半胱氨酸蛋白酶的活性, 由此阻抑了由氧化态胁迫触发的细胞凋亡. Zhang 等^[32]的研究发现, 在玉米 S-Mo17^{REB3} 可育系中, 半胱氨酸蛋白酶抑制剂是细胞程序化死亡的抑制因子, 在可育系中的上调表达, 可能抑制绒粘层细胞程序化死亡的进程. 鉴于半胱氨酸蛋白酶抑制剂在保持系中的高活性表达而在不育系中缺失, 推测可能由于半胱氨酸蛋白酶抑制剂在不育系的缺失, 使得植物的自身防卫代谢调控紊乱, 致使半胱氨酸蛋白酶的过量表达, 导致花药组织中的绒粘层细胞的过早或延迟凋亡解体, 最终引起小孢子的败育.

1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶小链克隆 512 (ribulose biphosphate carboxylase small chain clone 512), 是 Rubisco 小亚基的一个片段, Rubisco 是光合作用和光呼吸的关键酶, 参与乙醛酸和乙二酸代谢及碳固定的过程, 与能量代谢有关, 其在不育系的两个时期表达量明显下调, 表明能量代谢可能与花药发育紧密相关.

差异表达蛋白质点 16, 18 鉴定为假定蛋白, 可能与雄性不育性有关, 但其功能有待于进一步的研究, 而点 13, 14, 24, 26 由于其理论等电点与实际表观等电点差距较大, 对其并未做进一步的研究. 至于 28 个差异表达蛋白质点中的其他 17 个点, 可能由于现有数据库的不完善及鉴定方法等原因未能搜索出有意义的结果, 可结合串联质谱和增加数据库等进行进一步鉴定, 为探索小麦质核互作型雄性不育的机理提供更多线索.

参 考 文 献

- Hanson M R, Bentolila S. Interactions of mitochondrial and nuclear genes that affect male gametophyte development. *Plant Cell*, 2004, **16** (Suppl): S154~S169
- Schnable P S, Wise R P. The molecular basis of cytoplasmic male sterility and fertility restoration. *Trends Plant Sci*, 1998, **3**(5): 175~180
- Akagi H, Nakamura A, Sawada R, *et al.* Genetic diagnosis of cytoplasmic male sterile cybrid plants of rice. *Theor Appl Genet*, 1995, **90**(7/8): 948~951
- Mihr C, Baumgartner M, Dieterich J H, *et al.* Proteomic approach for investigation of cytoplasmic male sterility (CMS) in Brassica. *J Plant Physiol*, 2001, **158**(6): 787~794
- 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. *Botanical Studies*, 2007, **48**(3): 293~309
- Hochholdinger F, Guo L, Schnable P S. Cytoplasmic regulation of the accumulation of nuclear-encoded proteins in the mitochondrial proteome of maize. *The Plant Journal*, 2004, **37**(2): 199~208
- Damerval C, Vienne D D, Zivy M, *et al.* Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat seedling proteins. *Electrophoresis*, 1986, **7**(1): 52~54
- Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Chem*, 1976, **72**(1): 248~254
- 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. *中国农业科学*, 2007, **40**(12): 2679~2687
Zeng W Y, Yang S P, Gai J Y, *et al.* *Scientia Agricultura Sinica*, 2007, **40**(12): 2679~2687
- 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质双向电泳分析. *遗传*, 2008, **30**(8): 1063~1068
Liu W, Chen R H, Zhang G S, *et al.* *Hereditas*, 2008, **30**(8): 1063~1068
- Woo H R, Chung K M, Park J H, *et al.* ORE9, an F-box protein that regulates leaf senescence in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 2001, **13**(8): 1229~1790
- Stirnberg P, Sande K V D, Iyler H M. MAX1 and MAX2 control shoot lateral branching in *Arabidopsis*. *Development*, 2002, **129**(50):

- 1134~1141
- 13 Blilou I, Frugier F, Folmer S, *et al.* The *Arabidopsis* HOBBIT gene encodes a CDC27 homolog that links the plant cell cycle to progression of cell differentiation. *Genes Dev*, 2002, **16**(19): 2566~2575
- 14 杨娜, 侯巧明, 南洁, 等. 泛素结合酶的结构及其功能研究进展. *生物化学与生物物理进展*, 2008, **35**(1): 14~20
Yang N, Hou Q M, Nan J, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2008, **35**(1): 14~20
- 15 Samach A, Klensz J E, Kohalmi S E, *et al.* The unusual floral organs gene of *Arabidopsis thaliana* is an F box protein required for normal patterning and growth in the floral meristem. *The Plant Journal*, 1999, **20**(4): 433~445
- 16 Ni W M, Xie D X, Hobbie L, *et al.* Regulation of flower development in *Arabidopsis* by SCF complexes. *Plant Physiology*, 2004, **134**(4): 1574~1585
- 17 李红霞, 张龙雨, 张改生, 等. 黏类小麦育性相关基因 SSH 文库的构建. *作物学报*, 2008, **34**(6): 965~971
Li H X, Zhang L Y, Zhang G S, *et al.* *Acta Agronomica Sinica*, 2008, **34**(6): 965~971
- 18 Mariani C, Beuckeleer M D, Truettner J, *et al.* Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature*, 1990, **347**(6295): 737~741
- 19 罗玉英, 李怀军, 刘玉乐, 等. 转基因雄性不育烟草花药绒毡层及花粉发育的特点. *遗传*, 1998, **20**(4): 51
Luo Y Y, Li H J, Liu Y L, *et al.* *Hereditas*, 1998, **20**(4): 51
- 20 康俊根, 王晓武, 张国裕, 等. 利用 cDNA-AFLP 检测甘蓝雄性不育相关基因的时序性表达. *园艺学报*, 2006, **33**(3): 544~548
Kang J G, Wang X W, Zhang G Y, *et al.* *Acta Horticulturae Sin*, 2006, **33**(3): 544~548
- 21 Maxwell D P, Nickels R, McIntosh L. Evidence of mitochondrial involvement in the transduction of signals required for the induction of genes associated with pathogen attack and senescence. *Plant J*, 2002, **29**: 269~279
- 22 Mittler R, Lam E, Shulaev V, *et al.* Signals controlling the expression of cytosolic ascorbate peroxidase during pathogen induced programmed cell death in tobacco. *Plant Mol Biol*, 1999, **39**(5): 1025~1035
- 23 Jiang P D, Zhu Y G, Wang X L, *et al.* Metabolism of reactive oxygen species in the cytoplasmic Male-Sterile cotton anther. *Agricultural Sciences in China*, 2007, **6**(3): 275~280
- 24 Li S Q, Wan C X, Kong J, *et al.* Programmed cell death during microgenesis in a Honglian CMS line of rice is correlated with oxidative stress in mitochondria. *Functional Plant Biology*, 2004, **31**(4): 369~376
- 25 Solomon M, Belenghi B, Delledonne M, *et al.* The involvement of cysteine proteases and protease inhibitor genes in the regulation of programmed cell death in plants. *Plant Cell*, 1999, **11**(3): 431~443
- 26 Tadamasu U, Shigemi S, Yuko O, *et al.* Circadian and senescence-enhanced Expression of a tobacco cysteine protease gene. *Plant Molecular Biology*, 2000, **44**(5): 649~657
- 27 Greenberg J T. Programmed cell death: a way of life for plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**(22): 12094~12097
- 28 Ku S, Yoon H, Suh H S, *et al.* Male-sterility of thermosensitive genic male-sterile rice is associated with premature programmed cell death of the tapetum. *Planta*, 2003, **217**(4): 559~565
- 29 Balk J, Leaver C J. The PET1-CMS mitochondrial mutation in sunflower is associated with premature programmed cell death and cytochrome c release. *The Plant Cell*, 2001, **13**(8): 1803~1818
- 30 Yamada T, Ohta H, Shinohara A, *et al.* A cysteine protease from maize isolated in a complex with cystatin. *Plant Cell Physiol*, 2000, **41**(2): 185~191
- 31 Yuste V J, Moubarak R S, Delettre C, *et al.* Cysteine protease inhibition prevents mitochondrial apoptosis-inducing factor (AIF) release. *Cell Death and Differentiation*, 2005, **12**(11): 1445~1448
- 32 Zhang Z X, Tang W H, Zhang F D, *et al.* Fertility restoration mechanisms in S-Type cytoplasmic male sterility of Maize (*Zea mays L.*) revealed through expression differences identified by cDNA microarray and suppression subtractive hybridization. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2005, **23**(1): 17~38

Differential Proteomic Analysis of Anther Proteins Between Cytoplasmic-Nuclear Male Sterility Line and Its Maintainer in Wheat(*Triticum aestivum* L.)*

CHEN Rui-Hong, YE Jing-Xiu, ZHANG Gai-Sheng**, WANG Jun-Sheng,

NIU Na, MA Shou-Cai, ZHAO Ji-Xin, ZHU Jian-Chu

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

Abstract Cytoplasmic male sterility (CMS) is the maternally inherited inability to produce functional pollen in a range of crop plants and has been widely used for the production of hybrid seed in plant breeding. To better understand the molecular mechanism on protein level and find the crucial proteins which related to fertility, total anther proteins extracted from uninucleate and binucleate stage of (S)-1376A and (A)-1376B were separated by two-dimensional electrophoresis, the coomassie brilliant blue stained protein spots were analyzed using PDQuest software, among 610 reproducibly protein spots could be visualized on each 2D-gel within M 9.0~100.0 ku and pI 4~7. A total of 28 differentially expressed proteins were identified by matrix-assisted laser desorption ionization time of flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS), 5 of them were identified following NCBI database queries, which are ubiquitin-protein ligase E2, putative glycine-rich protein, ascorbate peroxidase, putative cysteine proteinase inhibitor, ribulose biphosphate carboxylase small chain clone 512. These proteins were involved in the process of energy metabolism, programmed cell death (PCD), regulating flower development. These results provide a clue for elucidating the mechanism of CMS.

Key words wheat, cytoplasmic male sterility, 2-dimensional electrophoresis, differential proteomics, MALDI-TOF-MS

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2008.00515

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (301705760), Hi-Tech Research and Development Program of China(2002AA207004), The Key Scientific and Technological Innovation Special Projects of Shaanxi "13115" (2007ZDKG-020), Special Program of National Agricultural Biotechnology & Breeding Center Yangling Branch (99-1A) and Support Top Talents Plan Projects of Northwest A&F University.

**Corresponding author.

Tel/Fax: 86-29-87092292, E-mail: zhanggsh@public.xa.sn.cn

Received: July 19, 2008 Accepted: September 2, 2008