

## T型雄性不育小麦种子蛋白的电泳分析\*

滕晓月 陈雪晖

(中国农业大学生物学院,北京 100094)

**摘要:** 以梯度 SDS-PAGE 方法分析了 T 型小麦雄性不育系及其保持系种子醇溶蛋白和谷蛋白组分,发现两系间有明显差异,而且四个不同品种小麦不育系均有各自与保持系区别的谱带出现,表明 T 型雄性不育小麦醇溶蛋白基因的表达有品种特异性。用单、双向电泳结合银染技术进一步分析了胚乳醇溶蛋白,发现不育系 11A 和 14A,分别有 24 kD 和 36 kD 的特异蛋白。

**关键词:** 小麦; T 型雄性不育; 种子蛋白; 双向电泳; 梯度 SDS-PAGE

**中图分类号:** Q512.5; S330

细胞质雄性不育(cytoplasmic male sterility,简称 CMS)是作物杂种优势利用的一个重要途径,但其 CMS 形成的机理迄今尚未搞清。舒群芳等发现雄性不育水稻胚乳蛋白中有两个特异蛋白<sup>[1]</sup>,小麦这方面的研究未见报道。

种子蛋白质的组分相当稳定,几乎不受环境因子的影响,因此近年来种子蛋白组分的分析广泛用于植物的分类、进化、作物育种及遗传变异等方面的研究<sup>[2]</sup>。本试验以 T 型小麦雄性不育系及其保持系种子为材料,对其醇溶蛋白和谷蛋白组分进行了比较研究,试图发现与雄性不育有关的特异蛋白,为了解小麦雄性不育基因的表达及其特点提供一些资料。

### 1 材料和方法

**1.1 材料** 供试材料为 T 型(T. timopheevi)细胞质小麦雄性不育系 BT881,411,双 1/051,蚰包 036/山前//洛夫林 13///7206 和 74 长 1/HWY 1775 及其相应保持系,依次分别简称为 01A/01B 02A/02B 07A/07B 11A/11B 14A/14B,此五种不育系均回交在 10 代以上,由北京农业大学植物科技学院孙其信教授提供。

### 1.2 方法

**1.2.1 种子醇溶蛋白的梯度 SDS-PAGE 方法** 样品提取:取种子干粉 10 mg,按 1:3 (W/V)加入 1 mol·L<sup>-1</sup>脲混匀,室温浸提过夜。15 000 r·min<sup>-1</sup>离心 10 min,上清液加入等体积 SDS 样品处理液,沸水浴中 3 min,取 15 μL 点样。

电泳及染色:8%~25%梯度 SDS-PAGE,Laemmli 体系,胶厚 1 mm,CBBR-250 染色。

**1.2.2 种子谷蛋白的梯度 SDS-PAGE 方法** 样品提取:上述 1 mol·L<sup>-1</sup>脲提过的沉淀物水洗后加入裂解缓冲液(含 2% SDS 5% 巯基乙醇的 62.5 mmol·L<sup>-1</sup>)Tris-HCl(pH6.8) 35 μL,混匀,过夜,15 000 r·min<sup>-1</sup>离心 5 min,上清液于沸水浴中 3 min,取 18 μL 上样。

收稿日期:1995-03-09

\* 本课题为北京农业大学植物生理生化开放实验室资助项目

电泳及染色,梯度胶浓度为11%~25%,其他方面与醇溶蛋白的电泳方法相同。

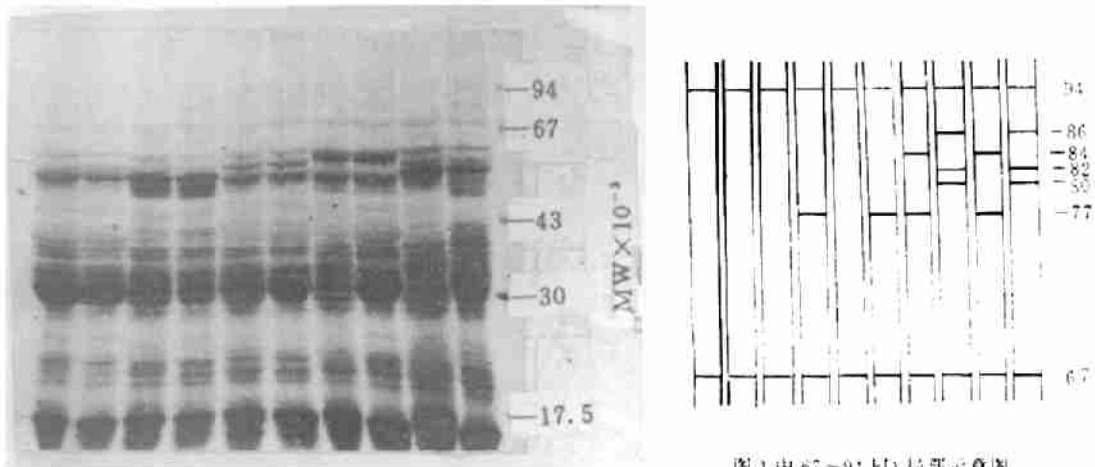
**1.2.3 胚乳醇溶蛋白的梯度 SDS-PAGE 方法** 干种子4℃吸胀24h后,去除种皮及胚,即为实验所用胚乳。

样品提取与种子醇溶蛋白的方法相同。电泳及染色除梯度胶用10%~15%外,其他方面和种子醇溶蛋白电泳方法相同。

**1.2.4 胚乳醇溶蛋白的等电聚焦—梯度 SDS-PAGE(简称 IEF-SDSGPAGE)** 样品提取,样品与提取液之比为1:10(W/V),两性电解质为pH 3~9.5:pH 5~7:pH 6~9=1:4:2。电泳,第一向IEF在110mm×1.8mm的玻璃管中进行,Np-40,两性电解质的终浓度分别为3%和2%。两性电解质的组成为pH 3~9.5:pH 5~7:pH 6~9=1:4:2,总伏特数为6400伏特小时。第二向为12%~18%梯度 SDS-PAGE,Laemmli体系,胶厚1mm。染色,参照Hochstrasser及T. Rabilloud法银染<sup>[4,5]</sup>。

## 2 结果与分析

**2.1 种子醇溶蛋白的比较** 用8%~25%梯度 SDS-PAGE 方法比较了五个品种不育系及其保持系种子醇溶蛋白组分(图1)。除01A/01B外,其他四个不育系与其保持系相比均有显著差异,02A与02B,07A与07B比较,不育系均缺少一条77kD的多肽,而11A与11B,14A与14B相比不育系均出现77kD和84kD的两条带,但都缺少80kD、82kD和86kD的三个条带。进一步比较五个不育系与保持系的种子醇溶蛋白电泳图谱,发现无论不育系还是保持系各品种均有各自独特的电泳谱带,表现出明显的品种特异性,此结果与前人研究<sup>[2]</sup>一致。



从左至右依次为(from left to right):

01A/01B,02A/02B,07A/07B,11A/11B,14A/14B

图1中67~94kD局部示意图

A schematic representation of 57~94 kD

从左至右依次为(from left to right):

01A/01B,02A/02B,07A/07B,11A/11B,14A/14B

图1 小麦种子醇溶蛋白的梯度 SDS-PAGE 图谱

Fig.1 SDS-PAGE gradient electrophoretic patterns of the wheat seed gliadins

**2.2 种子谷蛋白的比较** 用11%~25%梯度 SDS-PAGE 方法比较了五个品种小麦不育系及其保持系种子谷蛋白组分。由结果(图2)可见,07A与07B,11A与11B比较不育系均少一条69kD的条带,而02A与02B,14A与14B相比,不育系均少一条68kD的条带,并

且此带在 07A 与 07B, 11A 与 11B 两个品种上也表现出相同趋势, 即不育系此带颜色比保持系浅得多, 说明不育系此带蛋白含量比保持系少得多。

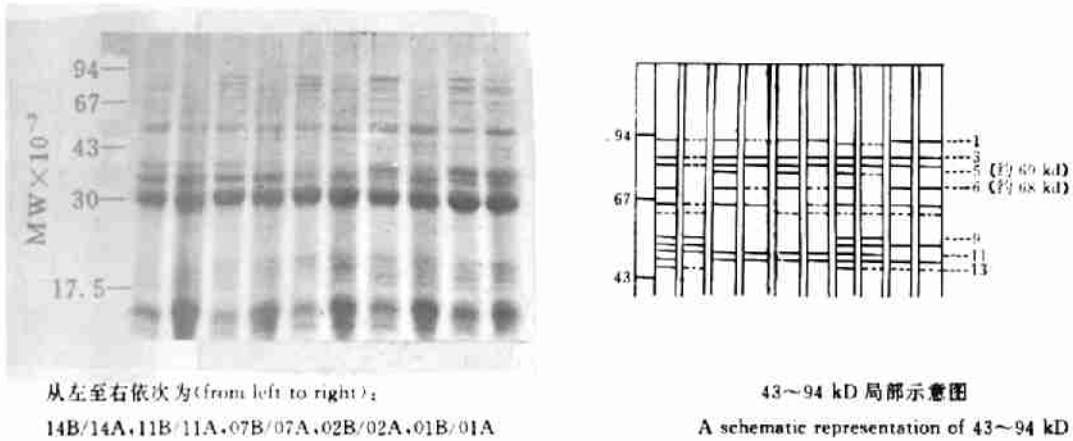


图 2 种子谷蛋白梯度 SDS-PAGE 图谱

Fig. 2 SDS-PAGE gradient electrophoretic patterns of the wheat seed glutenin

**2.3 胚乳醇溶蛋白梯度 SDS-PAGE 图谱的比较** 用 10%~15% 梯度 SDS PAGE 方法比较了四个不育系及其保持系胚乳醇溶蛋白组分, 结果见图 3。从图 3 明显看出, 不育系 (14A) 与保持系 (14B) 之间存在显著差异。14A 比 14B 多一条分子量为 36 kD 的多肽 (箭头所示), 而在 67 kD 的条带上, 14A 颜色大大浅于 14B (箭头所指), 表明二者多肽含量上显著不同。其他三个品种胚乳醇溶蛋白组分用单向电泳方法未发现两系之间有明显差异。

**2.4 IEF-SDS GPAGE 双向电泳图谱的比较** 以等电聚焦 (IEF) 为第一向, 以梯度 SDS-PAGE 为第二向, 用双向电泳方法比较了不育系 (11A) 与保持系 (11B) 胚乳醇溶蛋白组分的异同, 结果见图 4(A, B)。将图 4 A

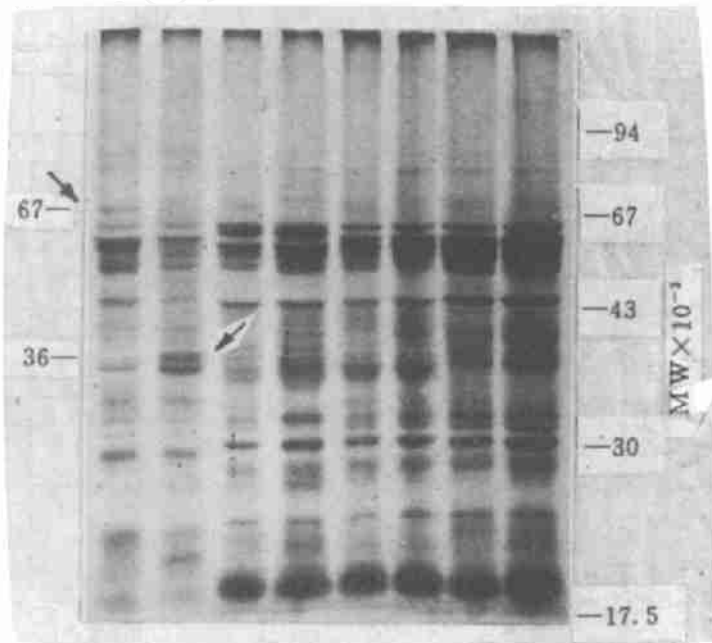


图 3 胚乳醇溶蛋白梯度 SDS-PAGE 图谱

Fig. 3 SDS-PAGE gradient electrophoretic patterns of the gliadins from wheat endosperm

从左右依次为 (from left to right):  
14B/14A, 11B/11A, 07B/07A, 02B/02A

与 B 显色斑点逐一比较, 发现不育系 (11A) 比保持系 (11B) 多一个分子量为 24 kD 的多肽

(图4A箭头所示),而且不育系(11A)中有两个分子量分别为30 kD和28 kD的多肽(图4A中箭头所示)其浓度较保持系明显增高,这两个斑点,在不育系中大而浓,在保持系中隐约可见,表明不育系与相应保持系这两个多肽蛋白含量上有显著差异。

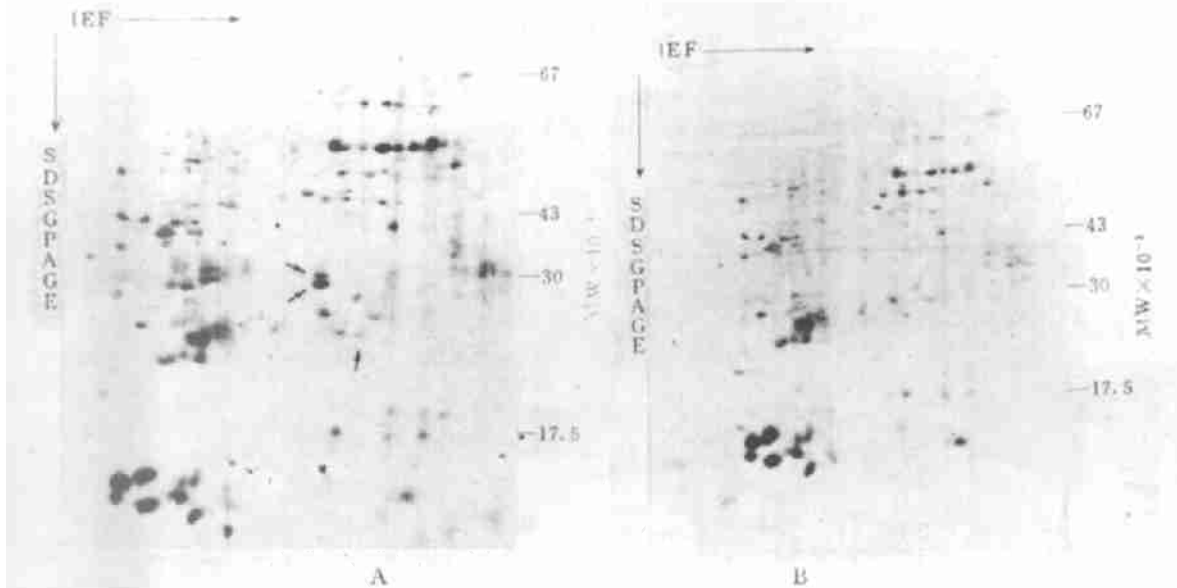


图4 胚乳醇溶蛋白的双向电泳图谱,A 不育系,B 保持系

Fig. 4 Two-dimensional electrophoretic patterns of the gliadins extracted from wheat endosperm

A. male-sterile line; B. maintainer line

### 3 讨论

本文对T型小麦不育系及其保持系种子蛋白(醇溶蛋白、谷蛋白)组分进行了比较研究,发现一些重要差异。与保持系相比,不育系在蛋白组分上均出现明显异常。这种异常一方面表现在不育系本身出现一些独特蛋白,如胚乳醇溶蛋白中14A的36 kD多肽,11A的24 kD多肽,这些多肽的出现可能抑制了花粉发育某一环节的进行,因而导致了雄性不育。明显异常表现的另一方面是不育系缺失一些蛋白质,如种子醇溶蛋白中,不育系(02A, 07A)均缺少77 kD多肽,11A,14A均缺少80,82,86 kD多肽,种子谷蛋白中不育系(07A, 11A)缺少69 kD多肽,02A与14A缺少68 kD多肽,这些缺失的多肽可能是花粉发育全过程中某一环节所必需,缺少它就形成不育。由于雄性不育系与其保持系是同核异质材料,所以上述明显异常的出现可能和胞质基因的表达有密切关系。

本研究证明了雄性不育基因表达和品种之间有密切的关系。醇溶蛋白(gliadins)占小麦种子贮藏蛋白的40%,它是种子发育特定时期的基因产物。由于醇溶蛋白的组成在一特定品系中是稳定的,因此常被作为品种及纯度鉴定的生化指标<sup>[3]</sup>。本文试图通过种子醇溶蛋白的分析,探讨雄性不育基因表达的特点。

种子醇溶蛋白测定结果表明不育系及其相应保持系之间存在显著差异,说明雄性不育基因在种子中有表达,而且这种表达可能还和品种有关。比较五种不同小麦种子醇溶蛋白电

泳图谱发现各品种均有自己独特的谱带,而且四种同核异质的不育系各自均有与保持系不同的特征条带,进一步说明了雄性不育小麦醇溶蛋白基因的表达有品种特异性。

### 参 考 文 献

- 1 舒群芳,王苏生,易清明. 雄性不育水稻胚乳蛋白的双向电泳分析. 遗传,1989,11(3): 5~8
- 2 Ladizinsky G et al. Seed protein electrophoresis in taxonomie and evolutionary studies. Theor Appl Genet, 1979, 54: 145~151
- 3 滕晓月,陶龙兴,孙雷心. 小麦品种的蛋白电泳鉴定. 作物学报,1988,14(4): 322~328
- 4 Hochstrasser D F, Putschornik A, Merrile R. Development of polyarylamide gels that improve the separation of proteins and their detection by silver staining. Anal Biochemistry, 1988, 173: 412~423
- 5 Thierry R. A comparison between low background silver diammine and silver nitrate protein stains. Electrophoresis, 1992, 13: 429~439

## Electrophoretic Analysis on Constitutions of Seed Protein from T-type Male Sterile Wheat

Teng Xiaoyue      Chen Xuehui

(College of Biological Sciences, CAU, Beijing 100094)

**Abstract:** Differences have been found in wheat gliadins and glutenins of male-sterile lines and maintainer lines of T-type using silver-stained one and two-dimensional gel electrophoresis. A 36 kD polypeptide was found in male-sterile line of 14A. The male-sterile line of 11A showed a 24 kD polypeptide and the contents of 30 kD protein and 28 kD protein were much higher compared with its maintainer line. Gliadins of four different wheat cultivars were studied and results revealed that the differences between male-sterile lines and their maintainer lines were dependent on the cultivar.

**Key words:** wheat; T-type male sterility; seed protein; two-dimensional electrophoresis; gradient SDS-PAGE