

# 春小麦种子脱水蛋白的检测及其积累动态\*

王海庆, 沈裕虎

(中国科学院西北高原生物研究所, 青海西宁 810001)

**摘要:** 植物种子对细胞脱水具有高度的耐受性, 研究种子的细胞脱水保护机制对植物的抗旱性改良具有重要参考价值。为了给种子脱水保护机制的研究提供信息, 以 8 个春小麦品种为试材, 利用免疫印迹方法对种子中的脱水蛋白成分进行了检测和初步的比较, 结果发现, 在不同春小麦品种间, 种子脱水蛋白成分存在差异, 即具有多态性。春小麦种子脱水成熟过程中, 脱水蛋白从乳熟期开始积累, 到蜡熟期以后脱水蛋白条带数不再增加, 而只表现为量的增加。

**关键词:** 春小麦; 种子; 脱水蛋白

**中图分类号:** S 512 1; S 326

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1009-1041(2005)04-0096-04

## Immunological Detection and Temporal Accumulation of Dehydrins in Spring Wheat Kernel

WANG Hai-qing, SHEN Yu-hu

(Northwest Plateau Institute of Biology, the Chinese Academy of Sciences, Xining, Qinghai 810001, China)

**Abstract:** Plant seed had great tolerance to extreme cellular dehydration. Elucidating the mechanism of seed tolerance to dehydration would provide valuable clues to plant drought tolerance improvement. Dehydrins were known as a group II later embryogenesis abundance proteins that function in protection of cellular macromolecules under cellular dehydration caused by abiotic stresses. Immunoblot which using antibodies against a conserved dehydrin amino acid sequence was used to detect dehydrins in kernels from different spring wheat cultivars. Polymorphism was found in dehydrins among different spring wheat varieties. The temporal pattern of accumulation during kernel development indicated an increase in dehydrins from stage of milky ripeness and with maximum levels detected at stage of complete ripeness. The components of dehydrins reached the culmination at stage of waxy ripeness.

**Key words:** Spring wheat; Kernel; Dehydrin

干旱是影响植物生长发育及其地理分布的非生物因素之一, 也是农业生产的重要限制因子。提高农作物的抗旱性, 使其在干旱缺水环境下获得较高的产量是雨养地区的主要育种目标之一。植物抗旱机理的研究, 是农作物抗旱改良的基础。植物在受到干旱胁迫时会在体内发生一系列生理生化上的变化, 来抵御不利环境所造成的伤害, 如合成脱落酸引起气孔关闭, 产生小分子渗透调节物质以及合成对细胞内生物大分子具有保护作用的蛋白质等。脱水蛋白属于LEA蛋白家族, 在植物受到干旱、高盐以及寒冷等可能引起细胞脱水的胁迫下, 在细胞内广泛表达, 并大量合成<sup>[1,2]</sup>。脱水蛋白在结构上存在一个保守的具有兼性的 $\alpha$ -螺旋结构域, 被称为K片段, 在细胞脱水状态下对胞内的生物大分子具有保护作用, 其作用方式可能与分子伴侣相类似<sup>[3]</sup>。构成K片段的氨基酸序列在被子植物中具有高度的保守性, 利用这段多肽片段为抗原制备的抗体可以广泛识别来自多种植物中的脱水蛋白成分<sup>[2]</sup>。现在已经发现, 脱水蛋白在体外对反复冻融的酶蛋白的活性具有保护作用, 而且还具有和抗冻蛋白一样的热滞后和抑制冰晶生长的特性<sup>[4]</sup>。除了脱水胁迫能够引起脱水蛋白的表达外, 在植物器官如花粉和种子的成熟过程中以及外源脱落酸处理等也能引起脱水蛋白的表达和积累<sup>[3]</sup>。在抗旱作物的选育中, 基因型间的差异是选择的基础。实际上除了在不同基因型间存在差异外, 在植物同一个体的不同器官之间也存在差异, 这种差异在

\* 收稿日期: 2005-03-29

修回日期: 2005-05-21

基金项目: 中国科学院西北高原生物研究所所长择优基金项目; 中国科学院西北高原生物研究所知识创新工程重点领域项目; 中科院、中组部西部之光人才培养计划项目。

作者简介: 王海庆(1971-), 男, 助理研究员, 博士, 从事植物抗逆和抗病生化与分子生物学研究。

© 1994-2009 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. <http://www.cnki.net>

种子上表现得尤为突出。在种子成熟后其含水量低于 10%，但是在遇到合适的条件后仍然能够重新获得活力而萌发，其中必然存在相应的非常完善的细胞脱水保护机制。因此，以种子作为模式，研究细胞脱水保护机制，对于抗旱育种具有重要的参考价值。本试验对不同小麦品种间脱水蛋白的差异进行了检测，并对种子成熟过程中脱水蛋白的积累动态进行了分析，希望为种子脱水保护机制的研究提供前期的基本信息。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料

选自甘肃和青海的春小麦品种 8 份(表 1)，以中国春为对照，进行成熟种子脱水蛋白的检测。种子成熟过程中脱水蛋白积累动态变化分析以青春 533 为材料。

### 1.2 试剂

兔抗脱水蛋白抗体为 Stressgen 公司产品，辣根过氧化物酶偶连的山羊抗兔 IgG 二抗购自北京中山生物技术有限公司。辣根过氧化物酶荧光底物检测试剂盒为 Roche 公司产品。低分子量蛋白质标准为上海丽珠公司产品。蛋白浓度测定试剂盒为 Bio-Rad 公司产品。其余试剂为国产或进口分析纯。

### 1.3 实验方法

1.3.1 种子抗热变性蛋白提取 小麦种子抗热变性蛋白提取参照 Werner-Fraczek 等<sup>[5]</sup>的方法进行。单粒种子研碎后，加入 500  $\mu$ L 提取缓冲液(30 mmol/L TES, 50 mmol/L NaCl, 1 mmol/L PM SF, pH 7.5) 在冰浴中充分匀浆，然后在 14 000 r/min, 4 离心 10 min。取上清液继续在 14 000 r/min, 4 离心 10 min，弃去沉淀，保留上清。将最终获得的上清液在沸水浴中加热 10 min 后在冰上冷却，14 000 r/min, 4 离心 10 min，取上清液测定蛋白浓度并制备 SDS-PAGE 样品。

1.3.2 SDS-PAGE 和免疫印迹检测 SDS-PAGE 参照 Laemmli<sup>[6]</sup>的方法，浓缩胶浓度为 4%，分离胶浓度为 12.5%。电泳结束后参照 Towbin<sup>[7]</sup>的方法电转移到硝酸纤维素膜上。转到膜上的蛋白条带经过丽春红染色检测转移效果后，在含有 5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液中室温下封闭 1 h 或在 4 冰箱中过夜。之后经过少量 TBST 漂洗，在含有 0.5% 脱脂奶粉的 TBST 缓冲液中中和 1:2500 工作浓度的一抗室温下孵育 1.5 h，将硝酸纤维素膜用 TBST 漂洗两次，每次 10 min。将经过一抗孵育并漂洗过的膜在 1:5000 的二抗中进行孵育，除了将一抗换为二抗外，其余条件和一抗孵育时相同。二抗反应结束，用 TBST 漂洗三次，每次 30 min。最后用辣根过氧化物酶荧光底物检测试剂进行检测，用 X 光胶片曝光记录结果。

1.3.3 小麦种子成熟过程中脱水蛋白积累动态分析 开花期对大田种植的青春 533 同一天开花的麦穗进行标记，花后一周开始分期取样直至完全成熟。每次取穗中部籽粒，迅速投入液氮中带回室内，转到 -75 保存。同时取 10 穗中的籽粒测定含水量。在进行种子脱水蛋白检测中，将提取的种子总蛋白进行蛋白含量测定后，调整各样品到相同的蛋白含量，然后进行沸水浴处理后制备 SDS-PAGE 样品。SDS-PAGE 和免疫印迹条件均同前述。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同春小麦品种种子脱水蛋白的差异

由于脱水蛋白具有抗热变性的特性，因此对提取的种子总蛋白进行沸水浴加热处理，离心后去除热敏感的蛋白成分，然后对获得的抗热变性蛋白成分中的脱水蛋白进行免疫印迹鉴定(图 1)。在实验中使用的抗体是利用脱水蛋白中保守的 K 结构域片段为抗原制备而成，可对包括小麦在内的多种植物中的脱水蛋白成分进行特异性的识别。为了验证结果的可靠性，在实验中以中国春作为对照，将获得的结果和已有文献<sup>[5]</sup>中报道的结果进行比较，结果表明两者相同。通过对来自甘肃青海两省的 8 个小麦品种的鉴定，发现能与脱水蛋白抗体发生反应的条带主要集中在 14~25 kD 和 41~44 kD 的分子量范围中。在

表 1 供试小麦品种基本信息

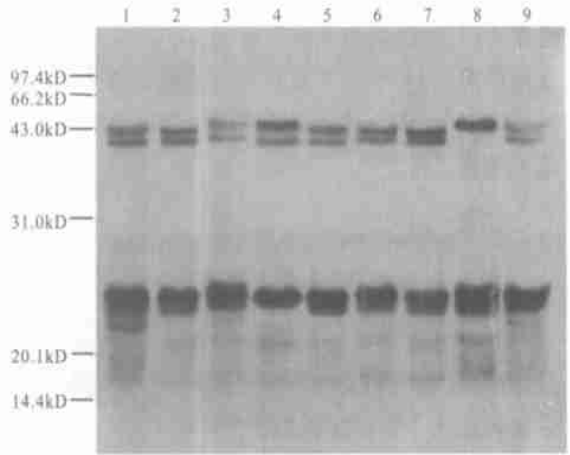
Table 1 Spring wheat cultivars used

品种	Cultivars	育成地	Origin
高原 602	Gaoyuan 602	青海	Qinghai
青春 533	Qingchun 533	青海	Qinghai
高原 338	Gaoyuan 338	青海	Qinghai
互助红	Huzhuhong	青海	Qinghai
和尚头	Heshangtou	甘肃	Gansu
甘麦 8 号	Ganmai 8	甘肃	Gansu
定西 24	Dingxi 24	甘肃	Gansu
佛手麦	Fuoshoumai	青海	Qinghai

41 kD 左右处除了佛手麦只存在一条带之外, 其余品种均存在两条明显的条带。在不同春小麦品种间, 种子脱水蛋白免疫印迹条带数和分子量大小上均存在差异。佛手麦为四倍体小麦, 染色体组成为AABB, 而其它染色体组成均为AABBDD 的六倍体小麦, 因此 43 kD 分子量脱水蛋白条带可能与D 组染色体有关。

### 2.2 春小麦种子成熟进程中脱水蛋白的积累变化特点

脱水蛋白在种子发育过程中, 伴随着种子的脱水而积累。通过对青春 533 不同时期种子中抗热变性蛋白的 SDS-PAGE 电泳检测, 发现在相同含量的种子总蛋白中, 小麦种子成熟过程中抗热变性蛋白成分含量呈现逐步上升的趋势, 而且条带数量也明显增多(图 2)。对这些抗热变性蛋白利用脱水蛋白抗体进行免疫印迹结果表明脱水蛋白也呈现逐步积累的趋势, 在种子含水量降低到 50% 左右时就已经开始合成积累, 到种子完全成



1. 高原 602; 2. 青春 533; 3. 高原 338; 4. 互助红; 5. 和尚头; 6. 甘麦 8 号; 7. 定西 24; 8. 佛手麦; 9. 中国春  
1. Gaoyuan 602; 2. Qingchun 533; 3. Gaoyuan 338; 4. Huzuhong; 5. Heshangtou; 6. ganmai 8; 7. Dingxi 24; 8. Fuoshoumai; 9. CS

图 1 春小麦成熟种子脱水蛋白的免疫印迹鉴定  
Fig 1 Immunoblot analysis of dehydrins in kernels from different spring wheats

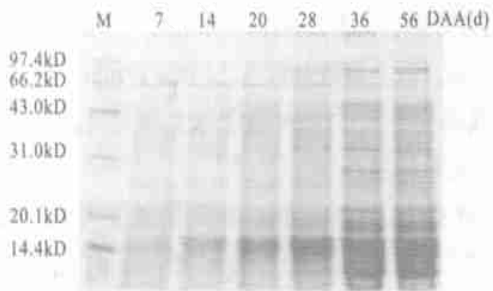


图 2 种子成熟进程中抗热变性蛋白的 SDS-PAGE  
Fig 2 SDS-PAGE profile of heat tolerant proteins during kernel development

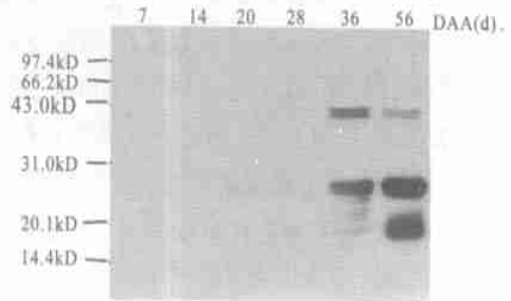


图 3 种子成熟进程中脱水蛋白的免疫印迹鉴定  
Fig 3 Immunoblot analysis of dehydrins during kernel development

熟时达到最高(图 3, 图 4), 此时种子发育进入乳熟期, 一般已经具有萌发能力。从脱水蛋白不同成分来看, 伴随着种子含水量的降低, 首先出现约 25 kD 的条带, 然后在含水量降低到 45% 左右时 43 kD 条带出现。到含水量为 35% 时种子已经达到农艺学上的蜡熟期, 免疫印迹条带数目与完全成熟时种子基本相同, 而只表现出量上的差别(图 3, 图 4)。

### 3 讨论

脱水蛋白作为在高温或低温、高盐、干旱以及发育过程中随着植物细胞脱水而产生的一类蛋白, 现在普遍认为在细胞脱水情况下, 对生物大分子和细胞膜具有保护作用。此外, 还发现脱水蛋白具有抑制冰晶生长、降低溶液冰点的抗冻特性<sup>[4]</sup>。在经过了冷适应锻炼的植物中, 脱水蛋白呈现大量积累<sup>[8,9]</sup>。成熟植物种子含水量降低到 10% 以下后, 在经受极端脱水过程后, 细胞仍然能够保持活力。因此种子可以作为研究植物细胞脱水保护机制的一个模式系统。在本研究中, 小麦种子在成熟脱水过程中, 抗热变性蛋白的相对含量逐步提高, 脱水蛋白成分只是其中

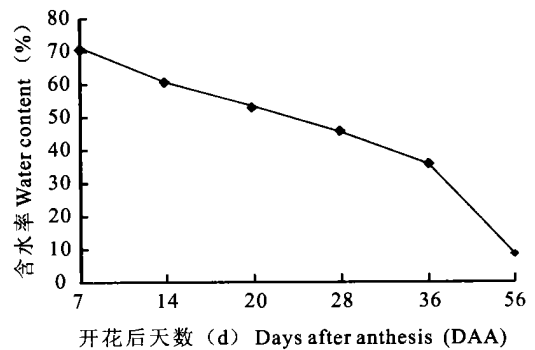


图 4 种子含水率变化曲线  
Fig 4 Water content during kernel development

的一部分。这些除了脱水蛋白以外的对热不敏感的蛋白质成分在种子脱水保护中发挥何种功能, 是非常令人感兴趣的问题。

在小麦、玉米和大麦中发现脱水蛋白和春化反应、生育期、植株高度以及抗寒性等性状相连锁<sup>[10-14]</sup>。在本试验中发现春小麦种子脱水蛋白的电泳条带在不同品种间存在差异, 即存在多态性。那么是否可以通过将种子脱水蛋白和小麦的抗旱性相联系, 作为筛选抗旱品种的一个指标或标记, 是值得探讨的问题。由于本试验中只对少数几个春小麦品种的种子脱水蛋白进行了检测, 尚不能对此给予明确回答。因此对此还需要对大量小麦品种的样品进行检测和统计分析。

#### 参考文献

- [1] Chose T J. Dehydrins: emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins[J]. *Physiologia Plantarum*, 1996, 97: 795- 803
- [2] Chose T J, Fento R D, Moonan F. A view of plant dehydrins using antibodies specific to the carboxyl terminal peptide[J]. *Plant Molecular Biology*, 1993, 23: 279- 286
- [3] Campbell S A, Chose T J. Dehydrins: genes, proteins, and associations with phenotype traits[J]. *New Phytologist*, 1997, 137: 61- 74
- [4] Wisniewski M, Webb R, Balsamo R, *et al*. Purification, immunolocalization, cryoprotective, and antifreeze activity of PCA60: A dehydrin from peach (*Prunus persica*) [J]. *Physiologia Plantarum*, 1999, 105: 600- 608
- [5] Werner-Fraczek J E, Chose T J. Genetic studies of Triticeae dehydrins: assignment of seed protein and a regulatory factor to map positions[J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 97: 220- 226
- [6] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T<sub>4</sub>[J]. *Nature*, 1970, 227: 680- 685
- [7] Towbin H, Staehelin T, Gordon J. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: Procedures and some applications[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1979, 76: 4350- 4354
- [8] Rinne P, Kaikuranta P, van der Plas L, *et al*. Dehydrins in cold-acclimated apices of birch (*Betula pubescens* Ehrh.): production, localization and potential role in rescuing enzyme function during dehydration[J]. *Planta*, 1999, 209: 377- 388
- [9] Welling A, Kaikuranta P, Rinne P. Photoperiodic induction of dormancy and freezing tolerance in *Betula pubescens*: Involvement of ABA and dehydrins[J]. *Physiologia Plantarum*, 1997, 100: 119- 125
- [10] Laurie D A, Pratchett N, Bezant J H, *et al*. RFLP mapping of five major genes and eight quantitative loci controlling flowering time in a winter × spring barley (*Hordeum vulgare* L.) cross[J]. *Genome*, 1995, 38: 575- 585
- [11] Bezant J, Laurie D, Pratchett N, *et al*. Marker regression mapping of QTL controlling flowering time and plant height in a spring barley (*Hordeum vulgare* L.) cross[J]. *Heredity*, 1996, 77: 64- 73
- [12] Hayes P M, Blake T, Chen T H, *et al*. Quantitative trait loci on barley (*Hordeum vulgare* L.) chromosome 7 associated with components of winterhardiness[J]. *Genome*, 1993, 36: 66- 71
- [13] Ribaut J M, Hoisington D A, Deutsch J A, *et al*. Identification of quantitative trait loci under drought conditions in tropical maize: I. Flowering parameters and the anthesis-silking interval[J]. *Theor Appl Genet*, 1996, 92: 905- 914
- [14] Touzet P, Winkler R G, Helentjaris T. Combined genetics and physiological analysis of a locus contributing to quantitative variation [J]. *Theor Appl Genet*, 1995, 91: 200- 205

## 欢迎订阅 2006 年《草食家畜》杂志

《草食家畜》杂志系中国畜牧学类核心期刊之一, 主要介绍国内外有关草食家畜研究领域的新成果、新理论、新技术、新信息、生产管理经验和动态等。报道内容为牛、羊、山羊、马、骆驼、家兔、鹿等草食家畜的遗传育种、繁殖技术、饲养管理、饲料营养、家畜生理、家畜卫生、畜产品生产、草原牧草、畜病防治和牧业经济等方面的科研成果、论文等内容。适合各级从事畜牧科研、教学和生产管理人员阅读。本刊为季刊, 大 16 开本, 48 页, 11 万余字, 季末月 25 日出版, 每期定价 4.50 元, 全年 4 期 18.00 元(邮寄每期加邮资 1.00 元)。本刊代号: 58- 71, 全国各地邮局均可订阅, 亦可向本刊编辑部函订。

为了促进我国兽医、畜牧、草原科学技术的进步, 本刊愿为国内、外广告客户提供有偿的发表园地。广告业务范围包括优良家畜品种、牧草种子、各种饲料添加剂、肉、乳、蛋、毛、皮畜产品、兽药和疫苗、仪器设备、牧业机械及各种情报信息。热忱欢迎各地广大广告客户来人来函联系广告业务。

### 欢迎订阅 欢迎赐稿 欢迎惠登广告

广告经营许可证: 新工商广字: 6501024000031 号 帐号: 00440104001279

开户银行: 中国农行新疆分行乌鲁木齐友好路支行营业室 银行行号: 103881000445(也可直接汇款至本刊编辑部)

地址: 乌鲁木齐市克拉玛依东路 21 号 新疆畜牧科学院《草食家畜》编辑部

邮编: 830000

电话: (0991)4843824

联系人: 刘金定