

栓皮栎成熟效应蛋白质及组分变化分析

孙琳,张存旭\*

(西北农林科技大学 林学院,陕西 杨陵 712100)

**摘要:**选用幼龄、成龄、老龄栓皮栎在幼年期和成年期的叶片,研究成熟效应过程中蛋白质及组分变化规律。结果表明,蛋白质含量随成熟效应呈现由高到低的变化趋势为幼年期>成年期,幼龄>成龄>老龄;不同蛋白质组分在成熟效应过程中变化动态和含量都存在差异,清蛋白含量逐渐增加,出现了27.0、61.8 kD与104.8 kD的清蛋白条带,球蛋白、醇溶蛋白含量逐渐减少,14.4、28.4、53.4 kD与66.0 kD的球蛋白条带和53.4 kD的醇溶蛋白条带消失,谷蛋白含量无明显变化,4种蛋白组分含量表现为清蛋白>球蛋白>醇溶蛋白>谷蛋白。

**关键词:**栓皮栎;蛋白质提取;成熟效应;SDS-PAGE

**中图分类号:**S792.18      **文献标志码:**A      **文章编号:**1001-7461(2016)03-0114-05

Protein and Its Component Analysis in the Maturation of *Quercus variabilis*

SUN Lin,ZHANG Cun-xu\*

(College of Forestry,Northwest A&F University,Yangling,Shaanxi 712100,China)

**Abstract:** The leaves which were in juvenile and matured growth stages were collected from 20- (young), 40- (matured) and 70-year-old (aged) *Quercus variabilis* trees to examine the changes of protein contents and components. The content of protein in juvenile stage was higher than that in matured stage, and the order of protein contents for the leaves from different tree ages was young>matured>aged. Differences in protein content and composition during the maturation were observed. The content of albumin gradually increased, new albumin bands were found in the bands of 27.0 kD, 61.8 kD, and 104.8 kD during maturation. Gliadin and globulin contents decreased, and the gliadin bands of 14.4 kD, 28.4 kD, 53.4 kD, 66.0 kD and the globulin bands of 53.4 kD disappeared. Glutenin content had no significant change. The contents of four protein components were albumin>globulin>gliadin>glutenin.

**Key words:** *Quercus variabilis*; protein extraction; maturation; SDS-PAGE

R. A. Brink 将幼年期向成年期转化定义为阶段变化<sup>[1]</sup>, E. J. Fortanier 和 H. Jonkers 定义为个体发育老化<sup>[2]</sup>, P. O. Olesen 定义为周期性<sup>[3]</sup>, H. Waresns<sup>[4]</sup>则采用成熟效应术语。成熟效应受茎尖本身内在机制所触发,从幼年期向成年期转变,是茎尖细胞分裂发生了某种转变的结果。一些观察也支持这种转变是发生在顶端分生组织之中的。幼年期的长短与遗传有关,同时也受环境因素的影响。至于对成年期的控制,如将成年枝条不断平茬、修剪、

连续扦插等,均可使枝条从成年期“退回”到幼年期,使之失去开花能力而保持生根能力,这种逆转称为幼化或复壮<sup>[5]</sup>。

有关树木成熟效应的生物化学和分子生物学标记方面的报道极少,仅有几种植物组织中的蛋白质组分的变化被检测到与成熟效应相关。M. C. Bon<sup>[6]</sup>等在幼年期巨杉根尖组织检测到16 kD的膜结合蛋白,而在成年期巨杉中则不存在此蛋白<sup>[7]</sup>。北美红杉幼年期、成年期及复幼处理后叶片蛋白质

收稿日期:2015-11-24 修回日期:2016-01-19

基金项目:西北农林科技大学唐仲英育种专项(2015)。

作者简介:孙琳,女,在读硕士,研究方向:林木遗传育种。E-mail:1102018920@qq.com

\* 通信作者:张存旭,男,副教授,研究方向:林木遗传育种。E-mail:cxzhang@nwsuaf.edu.cn

的 2D 图谱存在差异。从 90 年生杉树基部和树冠叶片检测到不同的蛋白质<sup>[8]</sup>,在成熟的栗树基部和树冠也有同样的发现<sup>[9]</sup>。柑橘属免疫学研究表明,60 kD 的蛋白质在成熟柑橘叶片中大量存在,而在幼龄叶片中含量极少<sup>[10]</sup>。在常春藤花色素积累过程中,阶段差异是由基因表达差异造成的<sup>[11]</sup>。花色苷的酶生物合成途径中,控制合成二氢黄酮醇还原酶的基因仅在幼年期叶片中被诱导<sup>[12]</sup>。

本研究选用栓皮栎(*Quercus variabilis*)作为模型来研究成熟效应调控的生化和分子机制。栓皮栎是我国最主要的软木资源树种,能进行木材、薪材、食用菌、天麻、橡子、橡碗(栲胶)生产<sup>[13]</sup>。其有性繁殖比较困难,目前主要依靠天然更新<sup>[14]</sup>。由于种子不能较长时间储藏,且后代易出现遗传分化。所以利用无性繁殖进行良种选育,例如扦插繁殖和茎段离体培养等<sup>[13-15]</sup>。但这些无性繁殖的方法无一例外都会受到成熟效应的影响而产生繁殖材料老化的现象。在无性繁殖后的生长状况及生根能力方面,采自母株树冠下部靠近主干的繁殖材料及分生组织优于采自母株树冠上部<sup>[5]</sup>。本研究通过选用不同树龄植株以及同一植株的基部和树冠中部叶片作为材料,研究相同和不同基因型在成熟效应过程中蛋白质及组分变化规律,探讨在不同遗传和发育阶段可能存在的蛋白质组分差异,以期深化认识栓皮栎阶段转变机制及复幼提供生化标记。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

栓皮栎叶片采自西北农林科技大学北校区及树木园幼龄、成龄、老龄(20、40 a 与 70 a) 3 个不同树龄的栓皮栎树。每个树龄随机选择 3 个基因型,2014 年冬季对其基部韧皮部进行造伤,使其产生基部萌条。在 2015 年 10 月开始采样,分别采集 5 g 基部和树冠中部的叶片,直接放入冰盒带回,用 0.1% 商品洗涤剂水清洗,自来水冲洗干净,迅速放入液氮中 3~5 min 后,分装、标记,在-70℃ 冰箱内保存备用。基部和树冠中部叶片分别代表幼年期和成年期的叶片。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 蛋白质的提取

1.2.1.1 总蛋白质的提取 取冷冻叶片,液氮研磨,准确称取 1 g 粉末置 10 mL 离心管中,加入 0.4 g PVPP 和 5 mL 蛋白提取缓冲,涡旋 30 s,4℃ 放置 2 h,充分溶解蛋白。放置后的样品摇匀,4℃ 12 000 g 离心 20 min,取上清 1.5 mL 转移至 10 mL 离心

管中,加入 6 mL -20℃ 预冷丙酮,摇匀,-20℃ 放置过夜沉降蛋白,之后 4℃ 5 000 g 离心 10 min。弃上清,沉淀在-20℃ 放置 1 h,使丙酮完全挥发。加入 40 μL 上样缓冲液溶解蛋白,其间涡旋 3~4 次,1 h 后 4℃ 12 000 g 离心 20 min,取上清 30 μL,加入 5 μL 10% SDS,混匀后在沸水浴中热处理 5 min,冷却至室温即为待测蛋白溶液<sup>[16]</sup>。

1.2.1.2 蛋白质的分级提取 根据 Osborne 的可溶性分类法,将栓皮栎蛋白质分为清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白、谷蛋白 4 类,分级提取<sup>[17]</sup>。

1)清蛋白:取冷冻叶片,液氮研磨,准确称取 1 g 粉末置 10 mL 离心管中,加入 0.4 g PVPP 和 5 mL 清蛋白提取缓冲,涡旋 30 s,4℃ 放置 2 h,充分溶解蛋白。放置后的样品摇匀,4℃ 27 000 g 离心 15 min,取上清液。

2)球蛋白:将提取清蛋白后的沉淀再悬浮于 5 mL 球蛋白提取液中。4℃ 搅拌 2 h。4℃ 27 000 g 离心 15 min,取上清液。

3)醇溶蛋白:将提取球蛋白后所得的沉淀再悬浮于 5 mL 醇溶蛋白提取液,4℃ 搅拌 1.5 h。4℃ 27 000 g 离心 15 min,取上清液。

4)谷蛋白:将提取醇溶蛋白后所得的沉淀再悬浮于 5 mL 谷蛋白提取液。室温搅拌 2 h。25℃ 27 000 g 离心 15 min,取上清液。

将所得的上清液进行丙酮沉淀,操作方法同 1.2.1.1。

1.2.2 蛋白质含量的测定 取待测蛋白质溶液 1 mL,用水补足体积到 4 mL,加 5 mL 考马斯亮蓝 G-250 溶液,混匀后在 595 nm 测吸光值<sup>[18]</sup>。

1.2.3 SDS-PAGE 采用不连续电泳方法,分离胶为 4.8%,浓缩胶为 12.5%。将栓皮栎叶片蛋白提取液离心后上样 10 μL,稳压电泳,当溴酚蓝指示剂距胶底部 2 cm 时,停止电泳,剥下胶片后,将胶片固定后进行考马斯亮蓝 R-250 染色,脱色液脱色,数码照相分析<sup>[19]</sup>。

### 1.3 数据处理

数据采用 Excel2003 及 SPSS16.0 统计软件进行处理,LSD 多重检验法检验蛋白质含量的差异显著性。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同基因型栓皮栎蛋白质含量变化差异

不同基因型蛋白质含量无明显变化(表 1)。幼龄、成龄、老龄栓皮栎 3 个基因型的幼龄期蛋白质及组分含量无显著性差异,说明基因型不影响栓皮栎

蛋白质含量的变化。

### 2.2 蛋白质含量变化差异

成熟效应过程中蛋白质含量呈现由高到低的变化特征(表 2)。幼年期含量较高,成年期较低;在幼龄栓皮栎中含量较高,在成龄栓皮栎中含量下降,到老龄栓皮栎含量下降到最低值。3 个树龄蛋白质含量存在显著性差异,表明栓皮栎蛋白质含量随着成熟效应逐渐降低,说明栓皮栎在幼年期具有较高的合成和积累蛋白质的能力。

### 2.3 蛋白质组分含量变化差异

不同蛋白质组分在成熟效应过程中变化动态和

含量都存在差异,由幼年期到成年期,清蛋白含量上升,幅度较大;球蛋白和醇溶蛋白含量明显下降,且球蛋白始终高于醇溶蛋白;谷蛋白含量则始终最低,且无明显变化。4 种蛋白组分含量以清蛋白最高,表现为清蛋白>球蛋白>醇溶蛋白>谷蛋白(表 2)。

从幼龄栓皮栎到老龄栓皮栎,清蛋白含量随树龄的增加而逐渐升高;球蛋白和醇溶蛋白含量在幼龄栓皮栎中较高,随树龄的增加而逐渐下降;谷蛋白含量始终最低,且无明显变化。3 个树龄清蛋白、球蛋白、醇溶蛋白含量均存在显著性差异,谷蛋白无显著性差异。而清蛋白和球蛋白含量变化幅度最大。

表 1 不同基因型蛋白质含量

Table 1 Protein content changes in different genotypes

树龄	基因型	总蛋白	清蛋白	球蛋白	醇溶蛋白	谷蛋白
幼龄	1	165.81±0.08	79.61±1.56	54.29±1.24	25.61±1.77	6.30±1.45
	2	163.60±1.32	78.30±0.83	52.30±2.21	29.79±1.05	3.21±2.46
	3	162.29±3.12	79.59±0.26	51.21±2.45	27.40±2.03	4.09±3.15
成龄	1	159.20±1.28	82.52±1.47	49.28±2.02	24.11±2.17	3.33±2.46
	2	165.79±1.71	89.18±2.34	49.42±1.56	23.49±2.13	3.67±1.67
	3	157.31±0.97	78.20±1.87	49.10±1.78	23.70±1.57	6.30±3.34
老龄	1	157.71±2.32	86.66±1.90	45.85±2.02	20.56±2.11	4.62±2.25
	2	155.49±1.22	86.34±2.06	46.05±3.12	20.34±2.34	2.78±3.12
	3	156.40±2.37	86.50±2.13	45.90±2.11	20.10±1.43	3.90±2.56

表 2 不同树龄蛋白质含量变化

Table 2 Protein content changes in different tree ages

时期	树龄	总蛋白	清蛋白	球蛋白	醇溶蛋白	谷蛋白
幼年期	幼龄	163.90±1.44a	79.17±0.61a	52.60±1.28a	27.60±1.72a	4.53±1.30a
	成龄	160.77±3.64b	83.30±4.53b	49.27±0.12b	23.77±0.25b	4.43±1.33a
	老龄	156.53±0.90c	86.50±0.16c	45.93±0.12c	20.33±0.21c	3.77±0.74a
成年期	幼龄	123.90±1.47a	100.43±2.20a	9.47±0.17a	10.33±0.21a	3.67±0.49a
	成龄	120.47±2.21b	104.50±1.63b	6.20±0.08b	6.70±0.22b	3.07±0.92a
	老龄	118.47±1.51c	108.87±0.29c	3.00±0.08c	2.53±0.69c	4.10±0.62a

注:同列不同字母(a,b,c…)分别表示在  $p\leq 0.05$  水平显著差异。

### 2.4 蛋白质图谱差异

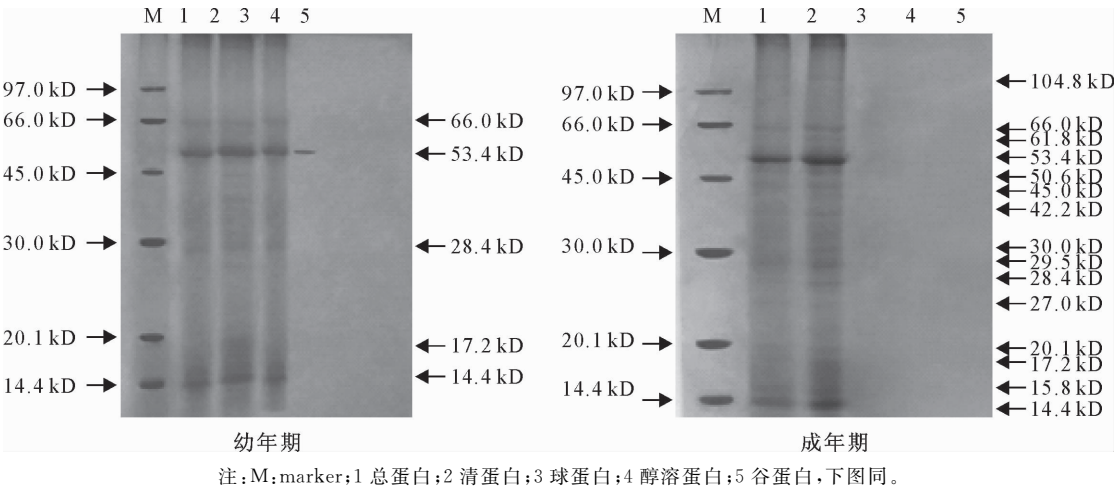
从图 1、图 2、图 3 可以看出,栓皮栎在成熟效应过程中存在丰富的蛋白质组分,其分子量的变化范围 14.4~104.5 kD,且存在着差异蛋白质的产生与消失。分子量为 14.4、17.2、28.4、53.4 kD 与 66.0 kD 共 5 种蛋白质组分始终存在,但是表达量上存在一定差异。从幼龄栓皮栎到老龄栓皮栎,清蛋白含量有上升趋势,表现为清蛋白条带明显变宽;球蛋白、醇溶蛋白含量降低,表现为条带颜色逐渐变浅;谷蛋白则无蛋白条带出现。

由幼年期到成年期,幼龄栓皮栎出现了 10 条非常明显的清蛋白质条带,分子量为 15.8、20.1、27.0、29.5、30.0、42.2、45.0、50.6、61.8 kD 与 104.8 kD,即清蛋白含量大幅度提升;而分子量为

14.4、28.4、53.4 kD 与 66.0 kD 的球蛋白质条带和分子量为 53.4 kD 的醇溶蛋白质条带在幼龄栓皮栎中消失(图 1)。

从图 2 可以看出,由幼年期到成年期,成龄栓皮栎蛋白质共出现了 5 条较为清晰的清蛋白质条带,分子量分别为 15.8、29.5、30.0、61.8 kD 与 104.8 kD,且原有的蛋白条带明显变宽、颜色加深,说明清蛋白质含量明显增加;而球蛋白、醇溶蛋白、谷蛋白条带的变化同图 1。

老龄栓皮栎由幼年期到成年期共出现了分子量为 27.0、61.8 kD 与 104.8 kD 的 3 条不甚清晰的清蛋白质条带,原有的 5 条蛋白条带明显变宽(图 3),说明清蛋白质含量显著增加;球蛋白质、醇溶蛋白、谷蛋白条带的变化同图 1。



注: M: marker; 1 总蛋白; 2 清蛋白; 3 球蛋白; 4 醇溶蛋白; 5 谷蛋白, 下图同。

图 1 幼龄栓皮栎蛋白 SDS-PAGE 凝胶电泳图

Fig. 1 SDS-PAGE electrophoretogram of the protein in the leaves of yong trees

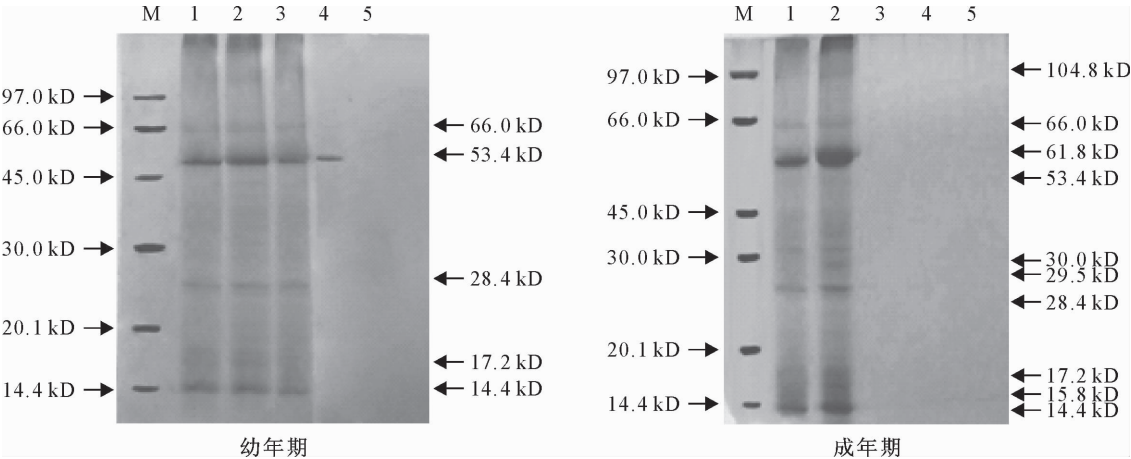


图 2 成龄栓皮栎蛋白 SDS-PAGE 凝胶电泳图

Fig. 2 SDS-PAGE Electrophoretogram of protein in the leaves from matured trees

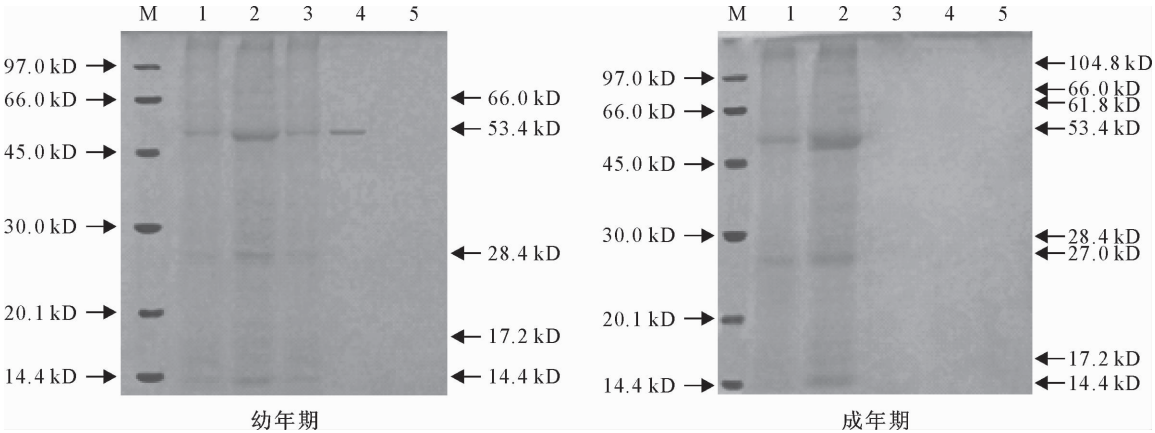


图 3 老龄栓皮栎蛋白 SDS-PAGE 凝胶电泳图

Fig. 3 SDS-PAGE Electrophoretogram of protein in the leaves from aged trees

3 结论与讨论

基因型并不影响栓皮栎蛋白质含量的变化。成熟效应才是栓皮栎蛋白质及组分变化最主要的原因之一。栓皮栎在成熟效应过程中存在丰富的蛋白质组分,其分子量的变化范围 14.4~104.5 kD,且存

在着差异蛋白质的产生与消失。分子量为 14.4、17.2、28.4、53.4 kD 与 66.0 kD 共 5 种蛋白质组分始终存在,但是表达量上存在一定差异。显然,这些蛋白质是维持细胞基础代谢所必须的基因表达的产物。但是从幼年期到成年期以及幼龄栓皮栎到老龄栓皮栎的过程中,发现蛋白质含量是逐渐下降,说明

树龄越小,栓皮栎合成和积累蛋白质的能力越高。

栓皮栎从幼年期到成年期树龄差距明显大于从幼龄栓皮栎到老龄栓皮栎,所以,蛋白质含量变化在幼年期到成年期最明显。从幼年期到成年期,蛋白质含量有大幅度的下降,条带变窄、颜色变浅;清蛋白含量显著上升,出现了 3~10 条不等的清蛋白条带,但在整个成熟效应过程中仅出现 27.0、61.8 kD 与 104.8 kD 的 3 条带;球蛋白含量明显下降,表现为 14.4、28.4、53.4 kD 与 66.0 kD 的条带完全消失,醇溶蛋白含量也有所下降,仅有的 53.4 kD 的条带消失;谷蛋白含量始终最低,无蛋白质条带出现。

从幼龄栓皮栎到老龄栓皮栎,蛋白质含量也有小幅度的下降,幼龄栓皮栎中蛋白质含量较高,成龄栓皮栎中蛋白质含量下降,到老龄栓皮栎蛋白质含量下降到最低值,表现为蛋白质条带颜色变浅。清蛋白含量有上升趋势,表现为清蛋白条带明显变宽;球蛋白、醇溶蛋白含量降低,表现为条带颜色逐渐变浅;谷蛋白则无蛋白条带出现。

在整个成熟效应过程中,清蛋白和球蛋白含量变化幅度最大,说明在本试验条件下,清蛋白和球蛋白含量的差异是栓皮栎蛋白质含量差异以及成熟效应进程的原因之一。因此,通过育种和无性繁殖手段,调控栓皮栎的幼年期向成年期的迈进,提高栓皮栎中球蛋白含量并降低清蛋白含量,有利于栓皮栎的幼化,保持很高的生根能力;反之则有利于缩短栓皮栎的幼年期,尽快进入成年期,以等待收获。

参考文献：

[1] BRINNK R A. Phase change in higher plants, and somatic cell heredity [J]. Quart. Rev. Biol. ,1962,37:1-22.

[2] FORTANIER E J, JONKERS H. Juvenility and maturity of plants as influenced by their ontogenetically and physiological aging [J]. Acta Horticulturae, 1976, 56(56):37-44.

[3] OLESON P O. On cyclophysis and topophysis[J]. Silvae Genetica, 1978, 27:173-178.

[4] HACKETT W. Juvenility, maturation, and rejuvenation in woody plants[J]. Horticultural Reviews, 1985, 7:109-155.

[5] 朱之梯, 盛莹萍. 论树木的老化—幼年性、成年性相互关系及其利用[J]. 北京林业大学学报, 1992, 14(Supp. 3):92-104.

[6] BON M. J16: An apex protein associated with juvenility of *Sequoiadendron giganteum*[J]. Tree Physiol. , 1988, 4(4): 381-387.

[7] HUANG L C, HUANG B L, MURASHIGE T, *et al.* Rejuvenation of *Sequoia sempervirens* by repeated grafting of shoot tips onto juvenile rootstocks in vitro. model for phase reversal of trees[J]. Plant Physiol. , 1992, 98(1):166-173.

[8] BON M, RICCARDI F, MONTEUUIS O. Influence of phase change within a 90-year-old *Sequoia sempervirens* on its in vitro organogenic capacity and protein patterns [J]. Trees, 1994, 8(6):283-287.

[9] AMO-MARCO J B, VIDAL N, VIEITEZ A M, *et al.* Polypeptide markers differentiating juvenile and adult tissues in chestnut[J]. Plant Physiol. , 1993, 142(1):117-119.

[10] SNOWBALL A M, ZEMAN A M, TCHAN Y T, *et al.* Phase change in citrus: immunologically detectable differences between juvenile and mature plants [J]. Plant Physiol. , 1991, 18(4):385-396.

[11] MURRAY J R, SMITH A G, HACKETT W P. Differential dihydroflavonol reductase transcription and anthocyanin pigmentation in the juvenile and mature phases of ivy (*Hedera helix* L.) [J]. Plant, 1994, 194(1):102-109.

[12] HUANG L C, LIN L Y, CHEN C M, *et al.* Phase reversal in *Sequoia sempervirens* in relation to mtDNA[J]. Plant, 1995, 94(3):379-383.

[13] 郑万钧. 中国树木志(第二卷)[M]. 北京:中国林业出版社, 1985:2330.

[14] 闻天声. 栓皮栎的培养与用途[J]. 中国林副特产, 1991, 17(2):29.

[15] 周建云, 林军, 何景峰, 等. 栓皮栎研究进展与未来展望[J]. 西北林学院学报, 2010, 25(3):43-49.

ZHOU J Y, LIN J, HE J F, *et al.* Review and perspective on *Quercus variabilis* research [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2010, 25(3):43-49. (in Chinese)

[16] 郝丽丽, 张存旭, 杨阳, 等. 栓皮栎种胚发育过程中储藏物质积累变化研究[J]. 西北林学院学报, 2011, 26(4):128-131.

HAO L L, ZHANG C X, YANG Y, *et al.* Changes of storage Substance accumulation during zygote embryos development of *Quercus variabilis* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2011, 26(4):128-131. (in Chinese)

[17] FONSECA P A, FERREIRA R B, TEIXEIRA A B. Seed proteins from *Quercus suber*[J]. Journal of Agricultural and Food Chemistry, 1997, 45(9):3443-3447.

[18] 路苹, 于同泉, 王淑英, 等. 蛋白质测定方法评价[J]. 北京农学院学报, 2004, 21(2):65-69.

LU P, YU T Q, WANG S Y, *et al.* A review on determination of protein [J]. Journal of Beijing Agricultural college, 2004, 21(2):65-69. (in Chinese)

[19] 郭尧君. 蛋白质电泳试验技术[M]. 2 版. 北京:科学出版社, 2005.