

牵牛光周期诱导过程中相关特异蛋白质出现时期的研究*

李立武 谭克辉

(中国科学院植物研究所, 北京 100044)

摘 要

本文研究了日本紫花牵牛子叶在短日照条件下诱导花芽分化的作用。运用双向电泳技术观察到在诱导后特定时期子叶中有一特异蛋白质的形成。不同时期去子叶对花芽分化有显著影响, 核酸、蛋白质合成抑制剂处理子叶亦有抑制诱导的效应。结合三方面的实验结果, 讨论了子叶中特异蛋白质合成的时间进程与诱导花芽分化的关系。

关键词: 光周期诱导, 双向电泳, 抑制剂, 蛋白质, 牵牛

光周期诱导植物开花是植物发育进程中极重要且复杂的环节。已证明叶片是感受光周期诱导的部位^[1]。一些研究表明特定基因按特定顺序在特定时空的转录表达是植物发育进程所必须^[2]。但对于叶片内与光周期诱导过程密切相关的基因及其表达则缺乏了解。

蛋白质是基因表达的产物, 也是许多生理功能的执行者。研究叶片在光周期诱导过程中蛋白质组份的变化, 有助于揭示这一过程的分子机制。许多研究者用不同的手段对光周期诱导后叶片蛋白质组份进行了分析, 但结果各异^{[3, 4] 1)}。

为了深入研究紫花牵牛子叶中与光周期诱导过程密切相关的特异蛋白质及其出现的时期, 进而揭示基因表达机制, 我们进行了下述研究。

一、材料与方 法

1. 材料培养

本研究用日本紫花牵牛为材料。精选大小一致种子, 用浓硫酸浸泡 0.5 h, 然后清水冲洗过夜。次日置湿滤纸上暗处发芽 (25℃), 1 天后选发芽一致的幼苗种于石英砂中, 置人工气候箱 (NK SYSTEM BIOTRON) 中连续光照培养。光强为 6000lx, 温度为 25℃。待子叶展开后, 即可用于实验处理。

2. 不同时期去子叶或向子叶施加抑制剂处理对牵牛开花的影响

选取 12 组长势一致的幼苗, 每组 6 株, 移栽于土中。分别给予如下处理。

本文 1989 年 12 月 1 日收到, 1990 年 6 月 29 日收到修改稿。

* 本项目为中国科学院重大课题。

1) 戴尧仁等, 1986 年中国植物生理学会第四次全国学术会议论文摘要汇编, 191 页。

(1) 16h 黑暗处理; (2) 连续光照处理; (3) 16h 暗处理+中间 10min 白光间断; (4) 16h 暗处理后迅速去子叶; (5) 16h 暗处理后照光 8h 再去子叶; (6) 16h 暗处理后照光 24h 再去子叶; (7) 先去子叶, 再给植株 16h 暗处理; (8) 向子叶涂抹 10^{-5} mol/L 放线菌素 D 后, 立即给植株 16h 暗处理; (9) 植株接受 16h 暗处理后立即向子叶涂抹 10^{-5} mol/L 放线菌素 D; (10) 向植株子叶涂抹 0.2% 氯霉素后, 立即给植株 16h 暗处理; (11) 16h 暗处理后立即向子叶涂抹 0.2% 氯霉素; (12) 16h 暗处理后持续光照 24h, 再向子叶涂抹 0.2% 氯霉素。

将 12 组植株置连续光照下培养, 温度为 25°C , 观察开花情况。

3. 蛋白质的双向电泳分析

蛋白质的提取据 Damerval^[6] 的方法。自光周期处理完毕开始计时, 经 0, 8, 72h 分别取经(1), (2), (3) 3 种处理的植株子叶 2g, 24h 后分别取经(1), (2), (3), (8), (9) 5 种处理的植株子叶 2g, 于液氮中研磨成粉, 加入 10% TCA (用丙酮配制, 内含 0.07% 的 2-巯基乙醇) 50ml, 置 -20°C 冰箱中沉淀 1h。低温离心 (4°C) $20000 \times g$, 15min。沉淀悬浮于冷丙酮中, -20°C 放置 1h。低温离心 (4°C) $15000 \times g$, 12min。沉淀真空干燥成粉。称取干粉 35mg, 溶于 400ul UKS (9.5mol/L 尿素、5mmol/L K_2CO_3 , 1.25% SDS, 0.5% DTT, 2% 两性电解质, pH3—9.5, 6% Triton X-100) 中。室温下放置 1h, $15000 \times g$ 离心 15min。上清即可用于双向电泳分析。双向电泳据 O'Farrell 的方法^[7]。

二、结果与分析

1. 不同时期分析子叶蛋白质的结果

用本文采用的方法做双向电泳分析, 可鉴别出 300 个左右的多肽点, 图谱清晰, 结果重复性高。

牵牛幼苗经 SD, CL, NB 处理后, 0, 8h 取子叶做蛋白质双向电泳分析, 未发现 3 种不同处理间子叶中有蛋白质组份的差异。光周期后过 24h 取子叶分析。观察到经 SD 处理的

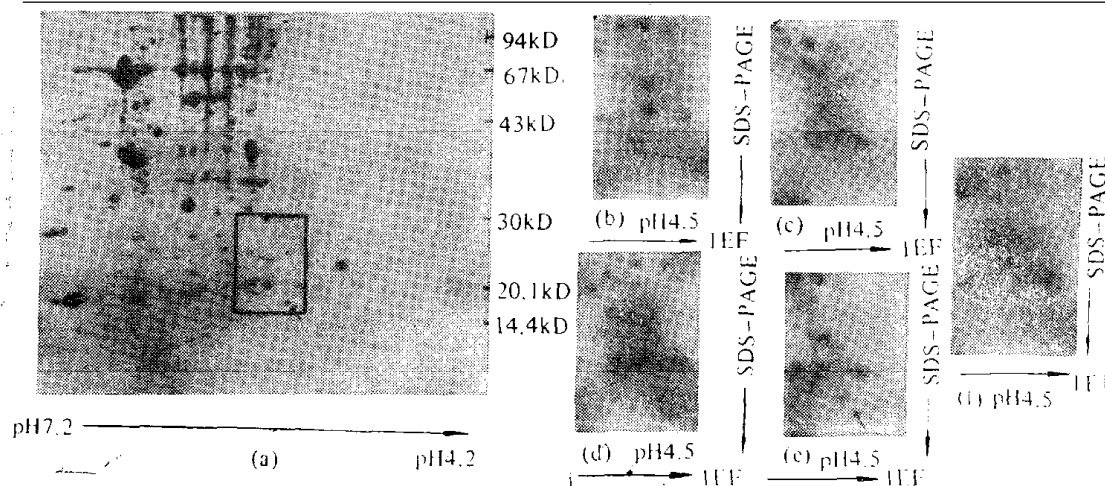


图 1 牵牛子叶经受不同光周期处理后不同时期蛋白质双向电泳分析

((a) 子叶经 SD 处理后过 24h 进行蛋白质分析(箭头所示为特异蛋白质), (b) — (d) 为不同处理相应于 (a) 图框中部位的放大, (b) 植株经 SD, CL 或 NB 处理后 0h 子叶蛋白质电泳图谱, (c) 植株经 SD, CL 或 NB 处理后 8h 子叶蛋白质电泳图谱, (d) 植株经 CL 或 NB 处理后 24h 子叶蛋白质电泳图谱, (e) 植株经 SD 处理后 24h 子叶蛋白质电泳图谱, (f) 植株经 SD, CL 或 NB 处理后 72h 子叶蛋白质电泳图谱)

幼苗子叶中出现一种特异蛋白质 (MW:19kD, pI:4.5)。而经过 NB,CL 处理的子叶中则未观察到此蛋白质点。植株经 SD 处理后过 72h 时再取子叶分析,该蛋白质点消失 (图 1)。

牵牛经 SD 处理后,再置连续光照下培养即能开花;而经 CL,NB 处理的植株则不能。可以看出:子叶中该特异蛋白质的出现与植株开花能力呈正相关。不同时期取子叶分析的结果表明,该蛋白质的出现有特定时间顺序。植株经过 SD 处理后,再过 24h 才能检测到特异蛋白质,由此推测在 16h 黑暗处理期间,不足以在子叶中完成光周期诱导的全过程。去子叶实验及施加抑制剂实验支持这一推测。

表 1 光周期处理前后不同时期去子叶对牵牛开花的影响

处 理	株高* (cm)	节数* (节)	种子萌发到观察到 花芽所需天数	开花植株百分率 (%)
SD 前去子叶	30	6	未观察到花芽	0
SD 后迅速去子叶	29	5	未观察到花芽	0
SD 后过 8h 去子叶	25	5	未观察到花芽	0
SD 后过 24h 去子叶	18	3	19	100%
SD	16	2	15	100%
CL	40	6	未观察到花芽	0
NB	40	6	未观察到花芽	0

* 株高、节数均为自种子萌发始第 42 天时所测。

2. 不同时期去子叶处理对开花的影响

如表 1 所示,暗处理前去子叶,暗处理后迅速去子叶及暗处理后再持续光照 8h 去子叶的植株都一直保持营养生长,而暗处理后持续光照培养 24h 再去子叶的植株可在后期开花。表明子叶中光周期诱导过程持续到暗处理完毕后的 24h。

3. 不同时期向子叶施加代谢抑制剂对开花的影响

放线菌素 D 为 mRNA 合成抑制剂。暗处理前向子叶涂抹 10^{-5} mol/L 放线菌素 D 则有效抑制开花,但不影响营养生长。而在暗处理后向子叶涂抹同样浓度的放线菌素 D 则不抑制开花 (表 2) 这表明暗处理引发了子叶中与开花诱导相关的特定基因的转录及 mRNA 的合成。这种转录合成随着暗处理的结束而完成。

氯霉素是蛋白质合成抑制剂。暗处理前向子叶涂抹 0.2% 氯霉素,延迟花芽分化。暗处理后向子叶涂抹同样浓度的氯霉素,则完全抑制花芽分化,植株保持营养生长。而暗处理后 24h 后向子叶涂抹 0.2% 氯霉素,则不抑制开花 (表 2)。表明与开花诱导相关的特异蛋白质的合成主要是在暗处理后的 24h 内。暗处理期间可能只有少量该蛋白质的合成。前述对子叶不同时期蛋白质的电泳分析表明在暗处理后 24h 才检测到特异蛋白质,也证实了这一点。

与光周期诱导相关的 mRNA 的合成伴随着暗处理的结束而完成,而相应特异蛋白质的合成则持续到暗处理结束后的 24h。可见参与光周期诱导过程的基因表达的主要调控步骤是在转录水平上。分析转录抑制剂对子叶蛋白质组份的影响也支持这一推测。

4. 向子叶涂抹放线菌素 D 对蛋白质组份的影响

转录抑制剂——放线菌素 D 在暗处理前施加于子叶上,抑制牵牛开花的诱导。暗处理后过 24h 用双向电泳分析子叶蛋白质组份,检测不到前述特异蛋白质。若在牵牛子叶经暗处理后

表 2 暗处理前后不同时期向子叶涂抹抑制剂对开花的影响

处 理	株高* (cm)	节数* (节)	种子萌发观察到 花芽所需天数	开花植株百分率 (%)
SD 前涂氯霉素	40	7	39	50%
SD 后迅速涂氯霉素	40	7	未观察到花芽	0
SD 后过 24h 涂氯霉素	18	3	18	100%
SD 期间涂放线菌素 D	51	7	未观察到花芽	0
SD 后涂放线菌素 D	30	5	20	100%
SD	16	2	15	100%
CL	40	6	未观察到花芽	0
NB	40	6	未观察到花芽	0

* 株高、节数均为自种子萌发始第 42 天时所测。

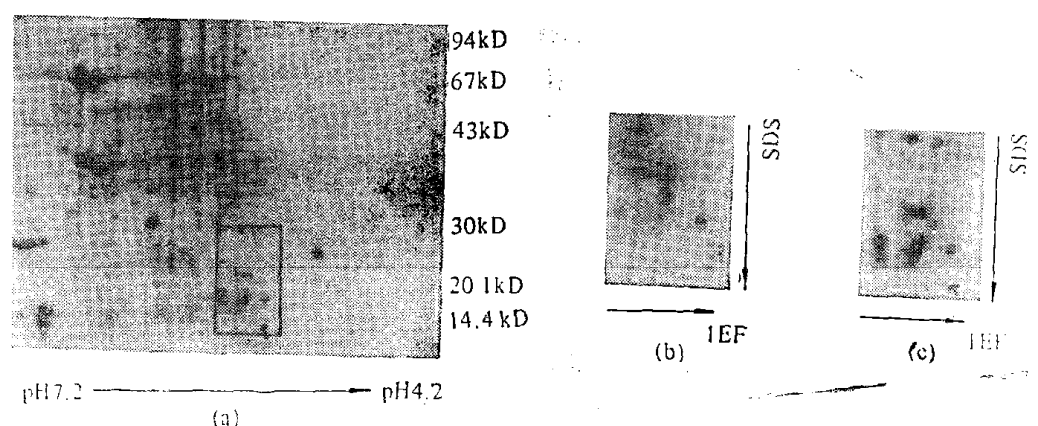


图 2 暗处理不同时期向子叶涂抹放线菌素 D 对子叶蛋白质组份的影响

((b), (c) 为不同时期所做电泳分析结果相应于 (a) 图框中部位的放大。(a) 图为植株经 SD 处理后 24h 子叶蛋白质电泳图谱, 箭头所示为特异蛋白质, (b) 暗处理前向子叶涂抹放线菌素 D, SD 后过 24h 子叶蛋白质电泳图谱, (c) 暗处理后向子叶涂抹放线菌素 D, SD 后过 24h 子叶蛋白质电泳图谱)

24h 期间向子叶施加放线菌素 D, 不抑制开花诱导, 用双向电泳可检测到子叶中存在该特异蛋白质 (图 2)。

这表明该特异蛋白质在特定时期产生的确与开花诱导密切相关。其产生的调控主要是在转录水平上。

三、讨 论

叶片中进行的光周期诱导过程包含着一系列生理生化变化。基于许多代谢抑制剂的实验, Hess 推测叶片中特异 RNA 及蛋白质的合成与诱导过程密切相关^[7]。但迄今对光周期诱导过程中叶片 RNA 的分析较少, 且无明确结果。对蛋白质的分析矛盾较多。戴尧仁指出经诱导的牵牛子叶蛋白质组份与未经诱导的对照相比, 减少了几条带^[1]; 而 Oota^[8]、郝乃斌等^[3]的分析结果则与之相反。M.Lay-Yee^[9] 提取子叶 mRNA, 进行体外翻译后, 比较不同光周期处理 (SD, NB, CL) 间的翻译产物只有量的区别。这些分析结果的差异, 我们认为可能与取

1) 见 1152 页脚注。

样分析的时期有关。

光周期诱导花芽分化与其它生命进程一样,在生化水平上看,显然是一个多步骤的、动态的生命活动过程。在诱导过程的不同时期进行着不同的生理生化变化。可以设想与开花诱导密切相关的特异蛋白质也是在特定时期、特定空间出现并发挥作用的。前人对于光周期诱导过程中蛋白质变化的研究,矛盾结果的部分原因可能是未注意到发育进程的时空顺序。

本研究运用双向电泳分析了光周期诱导不同时期子叶中蛋白质组份,观察到与开花诱导密切相关的蛋白质及其出现与消失的时期。表明参与叶片光周期诱导过程的基因特定表达有特定时间顺序。结合观察去子叶处理及施加抑制剂处理对牵牛开花的影响,可以看出在叶片中进行的光周期诱导过程需要经过 16h 暗处理及其后的 24h 内才得以完成。与诱导密切相关的 mRNA 的合成是在暗期内完成的,而特异蛋白质的合成则持续到暗期结束后的 24h。

阐明基因表达的调控机制是了解植物发育本质的关键。Mohr 指出:在种子萌发、黄化叶变绿等关键性发育步骤中,主要调控机制是在转录或翻译水平上^[10]。本研究用转录抑制剂——放线菌素 D 在暗处理前涂沫子叶,可阻止开花诱导,也抑制该特异蛋白质的产生。表明在牵牛子叶光周期诱导过程中,关键性调控步骤位于转录水平。

进一步研究该特异蛋白质的生理功能及其基因的转录调控机制,将有助于揭示光周期诱导开花的分子生物学本质。

参 考 文 献

- [1] Lang, A., in *Encyclopedia of Plant Physiology* (Ed. Ruhland, W.), Springer, Berlin, 1965, Vol. XV, pp. 1380—1536.
- [2] Bernier, G., in *Cellular & Molecular Aspects of Floral Induction* (Ed. Bernier, G.), Longman, London, 1970, pp51—80.
- [3] 郝乃斌等,植物学报,30(1988),3: 292—296.
- [4] Maeng, J., *Korean J. Bot.*, 4(1982), 168—174.
- [5] O'Farrell, P. H., *The Journal of Biological Chemistry*, 250(1975), 4007—4021.
- [6] Damerval, C., *Electrophoresis*, 7(1986), 52—54.
- [7] Hess, D., *Dtsch. Bot. Ges.*, 83(1970), 279—300.
- [8] Cota, Y. et al., in *Cellular & Molecular Aspects of Floral Induction* (Ed. Bernier, G.), Longman, London, 1970, pp139—151.
- [9] Lay-Yee, M. et al., *Planta*, 171(1987), 104—109.
- [10] Mohr, H., *Lectures on Photomorphogenesis*, Springer, Berlin, 1972.