

## 羽衣甘蓝授粉过程中柱头蛋白质的泛素化

蓝兴国, 杨佳, 赵昕, 于凯, 李玉花\*

东北林业大学生命科学学院发育生物学研究室, 哈尔滨 150040

**摘要:** 分析自花授粉与异花授粉后的羽衣甘蓝柱头蛋白质泛素化变化的结果表明, 自花授粉30 min后的柱头蛋白质泛素化水平显著增加, 45 min时达到峰值; 异花授粉的柱头蛋白质泛素化水平没有变化。

**关键词:** 羽衣甘蓝; 自交不亲和; 柱头; 蛋白质泛素化

## Ubiquitination of Protein Level of Stigma after Pollination in *Brassica oleracea* var. *acephala*

LAN Xing-Guo, YANG Jia, ZHAO Xin, YU Kai, LI Yu-Hua\*

Department of Developmental Biology, College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

**Abstract:** The ubiquitinated protein levels of stigma were detected after self-pollination and cross-pollination in ornamental kale (*Brassica oleracea* var. *acephala*). The results showed that the ubiquitinated protein level increased within 30 min following a self-pollination, which had a high peak at 45 min after self-pollination. However, the noticeable change of the ubiquitinated protein level didn't occur after cross-pollination compared with self-pollination.

**Key words:** *Brassica oleracea*; self-incompatibility; stigma; protein ubiquitination

蛋白质的泛素化/去泛素化调节是一种可逆过程, 是细胞对环境刺激的基本调节方式(Pickart 2001; Reyes-Turcu 等 2009)。在植物中, 蛋白质泛素化广泛参与细胞内多种生理过程, 如激素信号转导、花发育、光周期现象、光形态建成、衰老、抗逆境反应以及自交不亲和性(self-incompatibility, SI)等(于晓敏等 2006; Smalle 和 Vierstra 2004)。现有的研究表明, 芸苔属植物自交不亲和是由 ARC1 介导的柱头细胞内信号通路引起的(Zhang 等 2009)。ARC1 具有泛素E3连接酶的活性, 可能是通过调控底物蛋白质泛素化引起的 SI (Stone 等 2003; Gu 等 1998)。本文研究羽衣甘蓝自花和异花授粉后柱头蛋白质泛素化水平的变化以及蛋白质泛素化与 SI 的关系。

### 材料与方法

羽衣甘蓝(*Brassica oleracea* L. var. *acephala* DC.)  $S_{13-b}S_{13-b}$  自交不亲和系和 W14 自交亲和系种植于本校花卉生物工程研究所(蓝兴国等 2009)。 $S_{13-b}S_{13-b}$  自交不亲和系授粉之前去雄后, 分别进行自花与异花授粉(由 W14 自交亲和系提供花粉)。于授粉后 0、15、30、45、60、120 和 180 min 收集柱

头, 每个组合大约取 200 个柱头, 速冻于液氮中。

柱头总蛋白质的提取参考 Stone 等(2003)文中方法: 在 300  $\mu$ L 总蛋白提取缓冲液[50  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl (pH 7.5), 150  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  NaCl, 10  $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ , 5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  EDTA, 5  $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  DTT, 10% (V/V) 甘油]中加入一小勺聚乙烯吡咯烷酮(polyvinylpyrrolidone, PVP)和 2  $\mu$ L 的蛋白酶抑制剂后, 柱头放在液氮中研磨成粉末, 加到蛋白缓冲液中, 剧烈混匀。冰上保温 30 min 后, 于 4  $^{\circ}\text{C}$  下、以 15 000 $\times$ g 离心 20 min。吸取上清液, 再于 4  $^{\circ}\text{C}$  下、以 15 000 $\times$ g 离心 20 min。吸取上清液, 并分装保存。

蛋白质浓度用 2-D Quant kit 试剂盒(Amersham Biosciences)定量测定。取 10  $\mu$ g 蛋白样品, 以 8% 和 12% 的 SDS-PAGE 凝胶电泳分离。Western blot 分析时, 将凝胶中的蛋白质转移至 PVDF 膜(Amersham Biosciences)。用含有 5% 牛血清白蛋白(BSA)的 TBST (含 0.1% 的 Tween-20)于室温下封闭 2 h, 一

收稿 2010-01-12 修定 2010-02-08

资助 国家自然科学基金(30900115)和中央高校基本科研业务费专项基金(DL09BA08)。

\* 通讯作者(E-mail: lyhshen@126.com; Tel: 0451-82191783)。

抗为抗泛素的抗体(Sigma Aldrich, 稀释倍数为 1:100), 二抗为与辣根过氧化物酶偶联的山羊抗兔抗体(稀释倍数为 1:5 000)。制备 LumiGLO 混合液(Cell Signaling Technology)均匀地滴在 PVDF 膜上, 在 Kodak IS2000R 图像工作站上作化学发光检测。

## 实验结果

### 1 柱头蛋白质的提取与分离

收集  $S_{13b}S_{13b}$  自交不亲和系自花授粉和异花授粉的柱头提取蛋白质并经定量后, 以 12% SDS-PAGE 电泳分离, 考马斯亮蓝染色的结果说明, 提取的柱头蛋白质条带清晰, 质量较好(图 1)。

### 2 自花与异花授粉柱头蛋白质泛素化水平的变化

将等量的蛋白质样品以 8% 的 SDS-PAGE 电泳

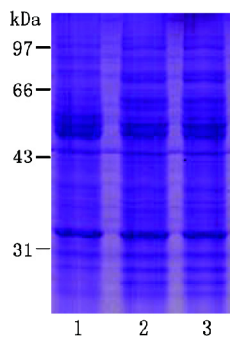


图 1 柱头蛋白质的电泳图谱

Fig.1 Electrophorogram of protein extracts from stigma

1: 未授粉的柱头蛋白质; 2: 自花授粉后 1 h 的柱头蛋白质; 3: 异花授粉后 1 h 的柱头蛋白质。

分离后, 采用抗泛素的抗体通过 Western blot 的方法检测蛋白质泛素化的结果表明, 自花授粉 30 min 后的柱头蛋白质泛素化水平有明显增加; 自花授粉 45 min 后的柱头蛋白质泛素化水平达到峰值; 随后蛋白质泛素化水平下降, 并维持在基本的水平上(图 2-a)。而在异花授粉过程中, 柱头蛋白质泛素化水平变化不明显(图 2-b)。这说明蛋白质泛素化是特异性地参与了自花授粉后引起 SI 反应的。

## 讨论

芸苔属 SI 的生理学研究表明, 自花与异花授粉会引起柱头细胞内不同的生理反应(Dickinson 1995), 在柱头细胞内可能有 2 种不同的信号通路参与授粉反应。本研究发现, 自花与异花授粉对柱头蛋白质泛素化的影响是不同的。自花授粉诱导柱头内蛋白质泛素化水平增高, 而异花授粉引起的蛋白质泛素化变化并不明显。这说明自花授粉是特异性地诱导柱头蛋白质泛素化的, SI 信号通路的传递与蛋白质泛素化密切相关, 而蛋白质泛素化可能不参与异花授粉过程。

蛋白质泛素化是一种蛋白质翻译后修饰, 调控蛋白质的生物活性。一般认为, 多聚泛素化修饰的蛋白运送到 26S 蛋白酶体中降解, 一般标记靶蛋白的泛素链不少于 4 个泛素分子; 而少于 4 个或是单泛素化修饰可能与膜转运和转录调控等有关(Vierstra 2009)。自花授粉中蛋白质泛素化条带的

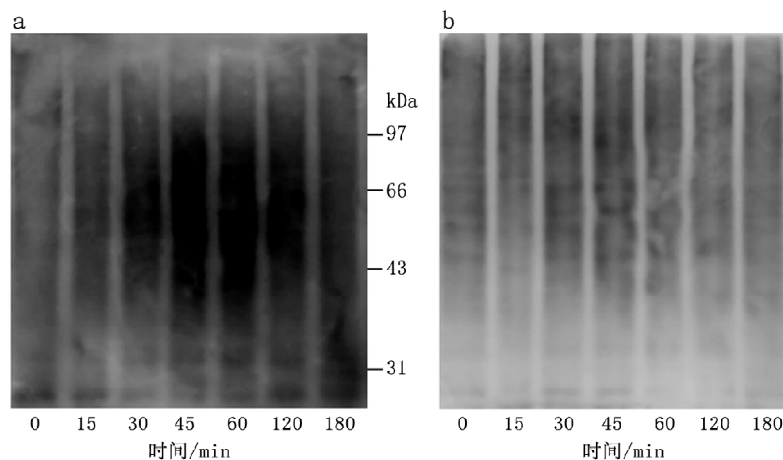


图 2 授粉后柱头的蛋白质泛素化水平

Fig.2 Level of ubiquitinated protein from stigma after pollination

a: 自花授粉后的柱头蛋白质; b: 异花授粉后的柱头蛋白质。

增加,一方面可能是由于有多种泛素化的底物,另一方面可能是由于不同数量的泛素化修饰引起的。因此,进一步鉴定这些泛素化的底物并对其功能进行分析,对揭示SI的分子机制来说可能是有意义的。

### 参考文献

- 蓝兴国, 杨佳, 李玉花(2009). 羽衣甘蓝花粉 *SCR<sub>13-b</sub>* 基因的分选及其功能分析. 园艺学报, 36: 539~544
- 于晓敏, 蓝兴国, 李玉花(2006). 泛素/26S蛋白酶体途径与显花植物自交不亲和反应. 植物学通报, 23: 197~206
- Dickinson H (1995). Dry stigma, water and self-incompatibility in *Brassica*. Sex Plant Reprod, 8: 1~10
- Gu T, Mazzurco M, Sulaman W, Matias DD, Goring DR (1998). Binding of an arm repeat protein to the kinase domain of the *S*-locus receptor kinase. Proc Natl Acad Sci USA, 95: 382~387
- Pickart CM (2001). Mechanisms underlying ubiquitination. Annu Rev Biochem, 70: 503~533
- Reyes-Turcu FE, Ventii KH, Wilkinson KD (2009). Regulation and cellular roles of ubiquitin-specific deubiquitinating enzymes. Annu Rev Biochem, 78: 363~397
- Smalle J, Vierstra RD (2004). The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. Annu Rev Plant Biol, 55: 555~590
- Stone SL, Anderson EM, Mullen RT, Goring DR (2003). ARC1 is an E3 ubiquitin ligase and promotes the ubiquitination of proteins during the rejection of self-incompatible *Brassica* pollen. Plant Cell, 15: 885~898
- Vierstra RD (2009). The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. Nat Rev Mol Cell Biol, 10: 385~397
- Zhang Y, Zhao Z, Xue Y (2009). Roles of proteolysis in plant self-incompatibility. Annu Rev Plant Biol, 60: 21~42