

银杏不同器官蛋白质动态变化的电泳分析

王改萍, 彭方仁

(南京林业大学森林资源与环境学院, 江苏 南京 210037)

摘要: 利用 SDS-PAGE 电泳技术对不同季节银杏 (*Ginkgo biloba* L.) 雌雄株叶片和枝条中的贮藏蛋白质组分和可溶性蛋白质含量进行了研究。结果表明, 银杏叶片中的可溶性蛋白质含量从 10 月中旬开始逐渐减少, 11 月中旬降到最低; 枝条中的可溶性蛋白质含量从秋末到整个冬季逐渐增加, 进入早春后大幅度下降; 同一季节内, 叶片中的蛋白质含量明显高于枝条, 且雄株叶片和枝条的蛋白质含量高于雌株。单向电泳结果表明, 银杏雌雄株叶片中相对分子质量为 55 000 和 32 000 的蛋白质谱带均于 11 月中旬前消失, 表明这些蛋白质在银杏落叶前发生了转移。在银杏雌雄株枝条中, 相对分子质量为 59 000、32 000 和 27 000 的蛋白质谱带均在 12 月底染色最深, 进入早春后消失; 雄株枝条中相对分子质量为 18 000 的蛋白质谱带在 12 月底前稳定出现, 进入早春后消失。表明银杏枝条中的这些蛋白质均表现出冬季积累而春季降解的动态过程。

关键词: 银杏; 可溶性蛋白质; SDS-PAGE

中图分类号: Q946.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-0978(2007)02-0032-04

Analysis on dynamic changes of protein in different organs of *Ginkgo biloba* by SDS-PAGE
WANG Gai-ping, PENG Fang-ren (College of Forest Resources and Environment, Nanjing Forestry University, Nanjing 210037, China), *J. Plant Resour. & Environ.* 2007, 16(2): 32-35

Abstract: The protein fraction and soluble protein content in leaf and branch of *Ginkgo biloba* L. were studied by SDS-PAGE technique. The results showed that soluble protein content in leaf of male and female trees of *G. biloba* began to decrease at the second ten-days of October, and to the lowest level at the second ten-days of November. While soluble protein content in branch increased gradually from the late of autumn to the late of winter, and then decreased sharply in the early of next spring. In the same season, soluble protein content in leaf was higher than that in branch, and that of male tree was higher than that of female tree. The SDS-PAGE bands of MW (relative molecular weight) 55 000 and MW 32 000 proteins in leaf could be observed until the second ten-days of November and then disappeared, indicating that these proteins were transformed before leaves falling down. The darkest bands of MW 59 000, MW 32 000 and MW 27 000 proteins in branch were observed before the end of December but disappeared in the early of next spring; MW 18 000 protein band could be observed only male tree and maintained stably before the end of December and disappeared in the early of next spring. It is suggested that these proteins in *G. biloba* branch would be accumulated in winter and decomposed in spring.

Key words: *Ginkgo biloba* L.; soluble protein; SDS-PAGE

银杏 (*Ginkgo biloba* L.) 是中国特有的多用途经济树种之一, 可供食用、药用和观赏等。近年来, 有关银杏栽培及开发利用的研究较多^[1]。Shim 等^[2]首先在银杏中发现银杏贮藏蛋白质的存在; 彭方仁等^[3]应用电镜解剖技术对银杏贮藏蛋白质作了进一步的定位和定性研究, 找到了银杏贮藏蛋白质的季节性变化规律, 并确定了其合成的场所及时间。笔者拟采用 SDS-PAGE 单向电泳方法, 对银杏不同器官的贮藏蛋白质组分及特性进行研究, 以期为银杏蛋白质组学^[4]研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

供试的银杏叶片和 1 年生枝条均采自南京林业大学树木园内的成年健康银杏雌、雄株。9 月份开始采样, 10 月份和 11 月份每隔 10d 采样 1 次, 12

收稿日期: 2006-07-07

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30371154)

作者简介: 王改萍 (1970-), 女, 山西榆社人, 讲师, 博士研究生, 主要从事经济林木的营养生理研究。

月份和次年1月份各采样1次,次年2月中旬和3月中旬各采样1次。采样部位为树冠外围中部。样品采回后经液氮速冻3~5 min后,-20℃保存备用。

SDS-PAGE电泳所用试剂均为AMRESCO包装产品,实验用Marker由中国科学院上海生物化学研究所生产。

1.2 方法

1.2.1 蛋白质含量的测定 蛋白质提取参照文献[5]的方法进行。参照Bradford方法^[6]测定不同季节银杏叶片和枝条中的可溶性蛋白质含量,并以牛血清白蛋白作标准曲线。

1.2.2 SDS-PAGE电泳 采用单向电泳垂直平板装置进行不连续凝胶电泳。分离胶12%,浓缩胶5%,相关试剂的配制及样品的处理和电泳的详细过

程参照文献[5]的方法进行。

2 结果和分析

2.1 不同器官可溶性蛋白质含量的分析

对不同季节银杏叶片和枝条的可溶性蛋白质含量进行分析,结果见表1。由表1可见,银杏叶片中的可溶性蛋白质含量随叶片的衰老而下降,但在11月中旬叶片变黄之前均保持在较高水平;而枝条中的可溶性蛋白质含量基本表现出从9月至12月不断积累、12月至春季萌芽期间明显降低的变化趋势。比较发现,同一季节叶片内的可溶性蛋白质含量明显高于枝条,雄株的叶片和枝条中的可溶性蛋白质含量远高于雌株,说明雄株的营养生长明显优于雌株。

表1 银杏叶片及枝条内可溶性蛋白质含量的比较

Table 1 Comparison of soluble protein content in leaf and branch of *Ginkgo biloba* L. in different times

样品 Sample	不同时期可溶性蛋白质含量/ $\mu\text{g} \cdot \text{g}^{-1}$ Content of soluble protein in different times (MM-DD)									
	09-20	10-03	10-13	10-23	11-03	11-12	11-23	12-24	02-20	03-15
雄株叶片 Leaf of male tree	95.85	100.70	102.33	102.20	88.54	71.00				
雌株叶片 Leaf of female tree	90.00	101.04	90.80	97.14	88.00	75.00				
雄株枝条 Branch of male tree	61.69	72.72	69.45	78.87	82.06	85.02	92.63	94.63	60.64	68.14
雌株枝条 Branch of female tree	47.38	57.31	60.87	65.30	68.10	70.92	79.00	76.55	59.29	67.45

2.2 蛋白质组分的SDS-PAGE电泳分析

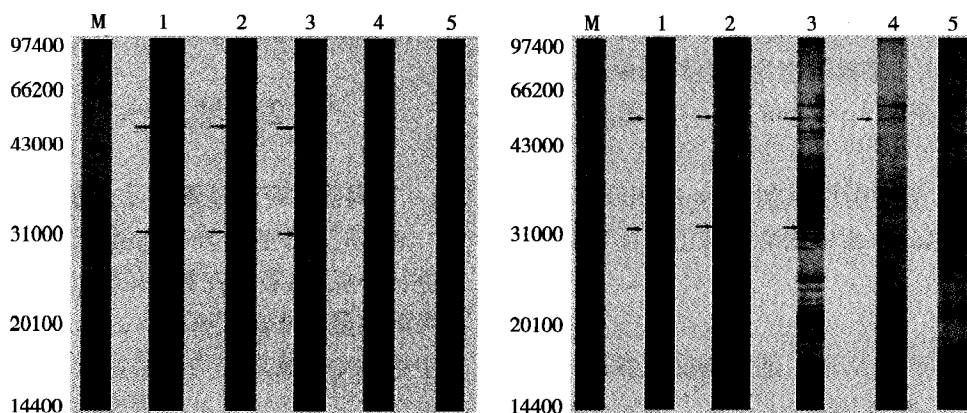
2.2.1 叶片中蛋白质组分的SDS-PAGE电泳分析 银杏叶片中蛋白质组分的SDS-PAGE电泳图谱(图1)显示,银杏叶片中的蛋白质组分及含量随季节的波动发生规律性变化。由图1可见,变化最明显的是相对分子质量为55 000的蛋白质,在雌株叶片各电泳图谱中,10月下旬前采集的样品都存在该蛋白质的清晰条带,11月初后消失;在雄株叶片的电泳图谱中,11月初前采集的样品均有该蛋白质条带,11月中旬即将落叶时消失。相对分子质量为32 000的蛋白质在雌、雄株叶片电泳图谱中的变化规律相同,10月下旬前保持稳定,11月中旬后消失。

银杏叶片中含有大量的蛋白质,但是真正参与植物养分代谢的蛋白质仍未知。从SDS-PAGE电泳图中发现,大量蛋白质条带在不同季节银杏叶片中均有出现,且随季节波动无明显改变。根据叶片中蛋白质利用的特点,可以认为这类蛋白质是用于叶片自身代谢等生理过程的结构或功能蛋白;而根

据田维敏等^[7]对树木叶片中贮藏蛋白质的相关研究还可认为,随季节发生变化的蛋白质应为叶片脱落时的转移蛋白,是银杏休眠阶段营养贮藏蛋白质的有效来源。

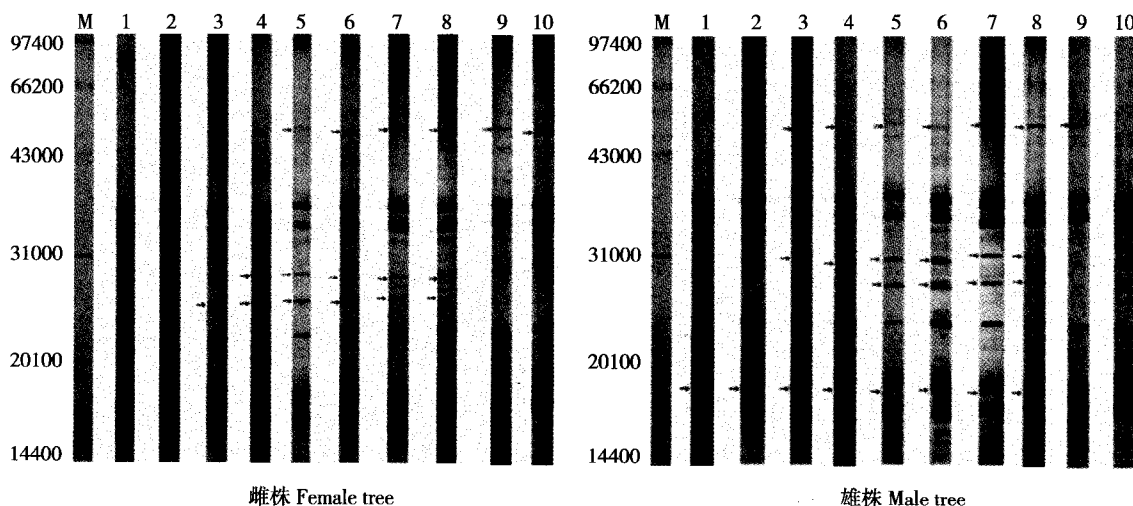
2.2.2 枝条中蛋白质组分的SDS-PAGE电泳分析 银杏枝条中蛋白质组分的变化分2个阶段,即由秋季进入冬季时的积累阶段和由冬季进入春季(树木开始萌动前)时的降解阶段。根据雌、雄株枝条中蛋白质的SDS-PAGE电泳图谱(图2)可以发现,在秋季到早春萌发的整个过程中,发生变化的蛋白质包括相对分子质量为59 000、32 000、27 000和18 000的蛋白质,且它们在银杏雌、雄株中的变化不同。

相对分子质量为59 000的蛋白质变化最为显著,在雌株的SDS-PAGE电泳图中,9月中旬到10月上旬采集的样品中没有该蛋白质条带,11月初后该蛋白质条带出现,并随季节变化染色加深;而雄株的SDS-PAGE电泳图中此条带在10月中旬出现,之后随季节变化染色加深;在雌株和雄株的SDS-



雌株 Female tree
雄株 Male tree
M: Marker; 1: 9 月中旬 The second ten-days of September; 2: 10 月上旬 The first ten-days of October; 3: 10 月下旬 The last ten-days of October; 4: 11 月初 The beginning of November; 5: 11 月中旬 The second ten-days of November.

图 1 不同时期银杏叶片蛋白质的单向 SDS - PAGE 电泳图谱
Fig. 1 SDS-PAGE band spectrum of protein in leaf of *Ginkgo biloba* L. in different times



M: Marker; 1: 9 月中旬 The second ten-days of September; 2: 10 月上旬 The first ten-days of October; 3: 10 月中旬 The second ten-days of October; 4: 10 月下旬 The last ten-days of October; 5: 11 月初 The beginning of November; 6: 11 月中旬 The second ten-days of November; 7: 11 月下旬 The last ten-days of November; 8: 12 月底 The end of December; 9: 2 月下旬 The last ten-days of February; 10: 3 月中旬 The second ten-days of March.

图 2 不同时期银杏枝条蛋白质的单向 SDS - PAGE 电泳图谱
Fig. 2 SDS-PAGE band spectrum of protein in branch of *Ginkgo biloba* L. in different times

PAGE 电泳图中该蛋白质条带均在 11 月底和 12 月时染色达到最深;进入早春后,雌株中该蛋白质条带染色变浅,且在 2 月中旬和 3 月中旬无明显变化,但在雄株中该蛋白质条带则消失。

相对分子质量为 32 000 的蛋白质条带在雌株和雄株样品中出现的时间不同,在雌株中 10 月下旬出现,随后染色逐渐加深并达稳定状态;在雄株中 10 月中旬出现,11 月底至 12 月底后染色最深,进入早春后该蛋白质条带在雌、雄株中均未出现。

相对分子质量为 27 000 的蛋白质条带在雌株中

于 10 月中旬出现,在雄株中于 11 月初出现,并保持稳定,但进入早春(2 月份和 3 月份)后该蛋白质条带则完全消失。

雄株中相对分子质量为 18 000 的蛋白质条带在 12 月底前均存在,且染色相对稳定,进入早春(2 月份和 3 月份)后该蛋白质条带消失。而在雌株中则没有明显变化。

通过对各蛋白质条带的分析可以发现,从秋季到冬季(12 月底),这些蛋白质条带都在某一阶段出现,之后逐渐积累,直到染色最深,反映出蛋白质的

积累特性,是蛋白质的积累阶段;而从12月底到早春的2月份和3月份,这些蛋白质条带普遍消失或染色较弱,表明此阶段为蛋白质的降解阶段。研究还发现,雌、雄株枝条内蛋白质积累的起始时间不同,普遍表现为雄株早于雌株。

相关研究结果表明,树木营养贮藏蛋白质可能存在于茎、根及树皮等部位^[8-10]。彭方仁等^[10]对1年生银杏枝条进行的细胞学研究发现,银杏枝条内的贮藏蛋白质含量在11月至12月达到最大值,进入春季后几乎全部消失,与本研究得出的银杏蛋白质的积累和降解规律基本一致,可认定这些发生变化的蛋白质与营养贮藏蛋白有关。

3 讨 论

3.1 银杏叶片和枝条中蛋白质含量的变化

银杏叶片中的可溶性蛋白质含量从秋季到落叶期显著减少;枝条内的蛋白质含量从秋季到冬季逐渐积累增加,而从冬季到早春则逐渐减少,这种变化规律符合落叶植物的营养转移特性^[2,10]。同一季节内,叶片中的蛋白质含量明显高于枝条。另外,无论是在叶片还是枝条内,雄株的蛋白质含量均高于雌株,这主要与其营养生长有关,但具体机理尚未确定。

3.2 银杏叶片和枝条中蛋白质组分的变化

银杏叶片中发生变化的蛋白质组分包括相对分子质量为55 000和32 000的蛋白质,这2种蛋白质的SDS-PAGE电泳条带均在落叶前消失,但消失的时间略有不同,表明银杏雌、雄株叶片中的蛋白质在落叶前具有不同的转移特性。

银杏枝条中发生变化的蛋白质组分为相对分子质量为59 000、32 000和27 000的蛋白质,这些蛋白质的SDS-PAGE电泳条带在12月底时染色最深,表现为积累特性;从12月到次年2月,条带染色变浅或消失,说明这些蛋白质组分在早春萌动时降解。以上特性说明,这些发生变化的蛋白质与枝条内的

营养贮藏蛋白质有关^[8,10]。

此外,在雄株中还发现相对分子质量为18 000的蛋白质条带在进入早春后消失,而在雌株中未有明显变化。根据营养生长规律可以认为,雄株的营养生长强于雌株。在早春根系尚未萌动且不能进行营养吸收时,植物需要更多贮存的营养参与生长,因此,植物体本身可通过分解一些小分子量的功能蛋白质的为生长提供足够营养,但具体机理尚不清楚。

另外,雌、雄株枝条的蛋白质组分发生变化的起始时间不同,普遍表现为雄株蛋白质的积累时间早于雌株。相对分子质量为59 000和32 000的蛋白质组分在雄株枝条中出现的时间均早于雌株,尽管雄株中相对分子质量为27 000的蛋白质条带出现稍晚于雌株,但其含量的增加却显著高于雌株,这也与银杏雌、雄株中蛋白质含量变化的趋势相似。

参考文献:

- [1] 陈 鹏. 目前国内外银杏研究进展概况[J]. 浙江林业科技, 1991, 11(4): 70-75.
- [2] Shim K K, Titus J S. Accumulation and mobilization of storage proteins in ginkgo shoot bark[J]. J Kor Soc Hor Sci, 1985, 26: 350-360.
- [3] 彭方仁, 郭 娟, 徐柏森. 木本植物营养贮藏蛋白质研究进展[J]. 植物学通报, 2001, 18(4): 445-450.
- [4] 梁 宇, 荆玉祥, 沈世华. 植物蛋白质组学研究进展[J]. 植物生态学报, 2004, 28(1): 114-125.
- [5] 王改萍, 彭方仁, 李生平. 银杏叶片蛋白质含量动态变化的电泳分析[J]. 南京林业大学学报, 2006, 30(4): 114-118.
- [6] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-252.
- [7] 田维敏, 吴继林, 郝秉中. 大叶桃花心木营养贮藏蛋白质的细胞学研究[J]. 热带作物学报, 1999, 20(4): 25-31.
- [8] 吴继林, 郝秉中. 巴西橡胶树茎次生韧皮部中贮藏蛋白质的细胞[J]. 生物学通报, 1986, 31(3): 221-223.
- [9] Greenwood J S, Stinissen H M, Peumans W J, et al. Sambucus nigra agglutinin is located in protein bodies in the phloem parenchyma of the bark[J]. Planta, 1986, 167: 275-278.
- [10] 彭方仁, 郭 娟, 王改萍. 银杏营养贮藏蛋白质的亚细胞结构定位[J]. 植物学报, 2004, 46(1): 77-85.