



银杏营养贮藏 蛋白质特性研究

● 郭红彦 编著

中国农业科学技术出版社



银杏营养贮藏 蛋白质特性研究

● 郭红彦 编著

中国农业科学技术出版社

图书在版编目 (CIP) 数据

银杏营养贮藏蛋白质特性研究/郭红彦编著. —北京: 中国农业科学技术出版社, 2010. 5

ISBN 978-7-5116-0193-3

I. ①银… II. ①郭… III. ①银杏—蛋白质—贮藏—研究
IV. ①Q949.64 ②Q946.1

中国版本图书馆 CIP 数据核字 (2010) 第 097248 号

责任编辑 张孝安 赵 赟

责任校对 贾晓红

出 版 者 中国农业科学技术出版社

北京市中关村南大街 12 号 邮编: 100081

电 话 (010) 82109708 (编辑室) (010) 82109703 (发行部)
(010) 82109704 (读者服务部)

传 真 (010) 82109700

网 址 [http:// www. castp. cn](http://www.castp.cn)

经 销 者 新华书店北京发行所

印 刷 者 北京雅艺彩印有限公司

开 本 787 mm × 1092 mm

印 张 5.75

字 数 152 千字

版 次 2010 年 5 月第 1 版 2010 年 5 月第 1 次印刷

定 价 30.00 元

前言

Preface



季节性氮素贮藏是树木氮代谢的显著特征。植物营养器官中的氮素贮藏对维持植物体内相对稳定的内环境及保证植物的正常生长发育方面具有重要意义。20 世纪 80 年代中期以来,人们发现,贮藏氮化物的主要形式是专门的贮藏蛋白质,并称之为营养贮藏蛋白质。这种蛋白质通常在夏末秋初开始积累,而在整个越冬期间维持较高含量,随着春季新梢萌发,贮藏蛋白质被降解成氨基酸,以满足枝条生长对养分的需求。贮藏蛋白质的存在不仅防止养分损失,而且也为树木在新的生长季生长发育提供必需的养分储备。

银杏 (*Ginkgo biloba* L.) 是中生代遗留下来的孑遗植物,也是我国特有的多用途经济树种。随着科学技术发展,人们对银杏叶、花、果、材化学成分的研究越来越深入,其营养价值和医疗保健作用越来越引起人们的重视,其丰产栽培及新品种选育已引起人们的重视,但有关银杏体内营养贮藏蛋白质在树木氮代谢及生长发育中的调节作用,其研究很少,有关银杏树体内营养贮藏蛋白质功能研究几乎是空白。

本书以本人完成的博士论文为基础,结合国内外相关研究资料,系统总结了银杏营养贮藏蛋白质研究成果,旨在使人们对银杏营养贮藏蛋白质有全新的认识。导师彭方仁教授为我完

2 银杏营养贮藏蛋白质特性研究

成的博士论文倾注了大量心血和汗水，在此，我向恩师致以衷心感谢和崇高敬意！

笔者开展的银杏营养贮藏蛋白质相关研究，得到国家自然科学基金项目（30872055）、高校博士点基金（20070298008）、山西农业大学科技创新基金项目（2008029）和山西农业大学博士科研起动基金资助。

在此，谨向关心、帮助我的各位老师表示衷心感谢！

郭红彦

2010年5月

目 录

Contents



第一章 导论 / 1

- 1 木本植物营养贮藏蛋白质研究进展 / 1
 - 1.1 木本植物营养贮藏蛋白质的基本特征 / 2
 - 1.2 木本植物营养贮藏蛋白质的生化特性 / 10
 - 1.3 木本植物营养贮藏蛋白质的生理功能 / 14
 - 1.4 营养贮藏蛋白质的积累与降解机理 / 17
 - 1.5 木本植物营养贮藏蛋白质研究展望 / 25
- 2 蛋白质组学及其在农林业研究中的应用 / 28
 - 2.1 蛋白质组学研究进展 / 28
 - 2.2 蛋白质组学在林业研究中的应用 / 30
 - 2.3 蛋白质组学在农业研究中的应用 / 35
 - 2.4 林木蛋白质组学研究展望 / 40
- 3 立题依据、研究目的及意义 / 41

第二章 银杏营养贮藏蛋白质的细胞学研究 / 43

- 1 引言 / 43
- 2 材料与方法 / 44
 - 2.1 研究材料 / 44
 - 2.2 采样方法 / 44
 - 2.3 光镜样品的制作 / 44
 - 2.4 电镜样品的制作 / 45

2 银杏营养贮藏蛋白质特性研究

3 结果与分析 / 45

3.1 银杏的年生长周期 / 45

3.2 银杏显微结构分析 / 46

3.3 银杏超微结构分析 / 57

4 结论与讨论 / 67

4.1 银杏的贮藏蛋白质细胞属于杨树型 / 68

4.2 银杏营养贮藏蛋白质在植株中的分布 / 68

4.3 营养贮藏蛋白质的积累 / 69

4.4 银杏营养贮藏蛋白质的动用 / 70

第三章 银杏营养贮藏蛋白质生物化学性质研究 / 73

1 引言 / 73

2 材料与方法 / 74

2.1 研究材料 / 74

2.2 采样方法 / 74

2.3 试剂 / 75

2.4 可溶性蛋白质干粉的制备 / 77

2.5 可溶性蛋白质含量的测定 / 78

2.6 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳 / 79

2.7 双向凝胶电泳 / 80

2.8 SDS-聚丙烯酰胺凝胶的过碘酸-Schiff (PAS) 试剂染色 / 82

3 结果与分析 / 83

3.1 银杏不同部位可溶性蛋白质含量的 动态变化 / 83

3.2 银杏不同部位营养贮藏蛋白质的 单向电泳分析 / 88

3.3	银杏营养贮藏蛋白质的双向电泳分析 / 95
3.4	银杏营养贮藏蛋白质的糖蛋白质性质的分析 / 100
4	结论与讨论 / 105
4.1	银杏不同部位可溶性蛋白质含量的差异 / 105
4.2	银杏营养贮藏蛋白质组分的确定 / 106
4.3	银杏不同部位营养贮藏蛋白质具有明显的 季节变化规律 / 108
4.4	双向电泳方法的探讨 / 109
4.5	银杏营养贮藏蛋白质具有糖蛋白质的性质 / 110
4.6	凝胶不同染色方法的比较 / 113

第四章 银杏营养贮藏蛋白质的免疫化学特性研究 / 114

1	引言 / 114
2	材料与方法 / 115
2.1	研究材料 / 115
2.2	采样方法 / 115
2.3	试剂 / 115
2.4	银杏营养贮藏蛋白质抗血清的制备 / 118
2.5	银杏 32kDa 和 36kDa 两种蛋白质免疫印迹 / 123
2.6	酶标免疫光镜定位 / 125
2.7	胶体金免疫电镜定位 / 126
3	结果与分析 / 127
3.1	银杏营养贮藏蛋白质抗体制备的分析 / 127
3.2	银杏营养贮藏蛋白质的免疫印迹分析 / 133
3.3	银杏营养贮藏蛋白质免疫组织 化学定位分析 / 139

4 银杏营养贮藏蛋白质特性研究

4 结论与讨论 / 142

4.1 银杏营养贮藏蛋白质抗体获得 / 142

4.2 银杏 36kDa 和 32kDa 营养贮藏蛋白质
组分的确定 / 144

第五章 总结论 / 146

1 主要研究结论 / 147

1.1 银杏营养贮藏蛋白质的细胞学研究 / 147

1.2 银杏营养贮藏蛋白质的生化性质的研究 / 148

1.3 银杏营养贮藏蛋白质的免疫组织
化学定位研究 / 150

1.4 银杏营养贮藏蛋白质组分的确定 / 151

2 本研究的创新与特色 / 152

参考文献 / 153

第一章

导 论



1 木本植物营养贮藏蛋白质研究进展



树木中氮素的季节性循环与树木在秋季的休眠和春季休眠被打破是密切相关的。这种营养物质位置的转移往往受控于顶芽、茎和根部蛋白质、淀粉、类脂等物质的积累。这些贮藏物质能为在冬季进行的呼吸作用和其他代谢过程提供底物，同时在春季蒸腾作用形成前，有助于芽的萌发和根部早期阶段的生长。营养物质的季节性循环是多年生植物重要的越冬策略，对树木减少营养物质的损失、生物量积累以及自身抵抗不良环境的能力有重要作用（Steward and Thompson, 1950）。

20 世纪 50 年代初期，人们对植物体内贮藏氮化物的作用一直持怀疑态度，并认为当年施氮肥对树木生长有显著影响，而贮藏氮素的作用并不重要（Steward and Thompson, 1950）。后来通过对苹果、桃等果树的深入研究发现这些贮藏氮化物对树木的生长、开花、结实都有重要的作用（Hill and Williams, 1967）。有研究者在一些温带树种中分离并得到专门的贮藏蛋白质，称之为营养贮藏蛋白质（Stepien *et al.*, 1994）。

营养贮藏蛋白质（Vegetative storage proteins, VSPs）是许多落叶树木越冬期间贮藏氮素的主要形式。这种蛋白质通常在夏末秋初树体中开始积累，整个越冬期间维持较高含量，在春季

则随着新梢的萌发,贮藏蛋白质被降解成氨基酸以满足枝条生长对养分的需求(Staswick, 1994)。贮藏蛋白质的存在不仅防止了养分的损失,而且也为树木在新生长季的生长发育提供了必需的养分储备。有关木本植物营养贮藏蛋白质的研究最早是在苹果和其他果树中进行的,其后在许多落叶树种及部分常绿针叶树体内的皮层细胞、次生韧皮部薄壁细胞、维管束形成层细胞、木质射线细胞中,均发现有一种结构上类似于双子叶植物种子蛋白体的高含量蛋白质器官(Greenwood *et al.*, 1990; Sauter and Wellenkamps, 1988; Wetzal *et al.*, 1989a)。利用半薄切片光学显微镜观察及超薄切片电子显微镜技术,有关蛋白质染色特性和胃脘酶消化特性的研究,证实了柳树(Sauter and Wellenkamps, 1988)和杨树(Sauter *et al.*, 1988)的具膜凝集物具有蛋白质特性,利用 SDS-凝胶电泳技术测定出了杨树木材提取物中一种 32kDa 的蛋白质组分(Sauter and Wellenkamps, 1988)。同时利用免疫金法成功地标记了液泡凝集物中的这种物质,并用白兔获得了这种蛋白质抗体,从而对其蛋白质特性得以证实(Stepien *et al.*, 1994)。目前对木本植物 VSP 的分类和定位、生化特性、生理功能、合成与降解机理、基因表达与调控等方面进行了大量研究,积累了丰富的资料(彭方仁等, 2001)。

1.1 木本植物营养贮藏蛋白质的基本特征

20 世纪 80 年代中期以来,从其他温带树木中分离的贮藏蛋白质,称之为营养贮藏蛋白质(Stepien *et al.*, 1994)。营养贮藏蛋白质有如下特点:①积累在循环库外的贮藏组织细胞的液泡中;②在休眠季节,其占贮藏组织可溶性蛋白质的相当大比例,在 SDS-PAGE 图谱上表现为少数几条显著的蛋白质谱带;③在树木重新生长后其含量显著降低,甚至在谱带上完全消失

(Clausen and Apel, 1991); ④它们的积累和降解受“源-库关系”的调节 (Staswick, 1994)。

Kang 和 Titus (1980a) 发现, 树皮中蛋白质与种子中蛋白质存在明显差异, 表现在: ①树皮蛋白质的含量低。在休眠季节, 苹果树皮蛋白质含量占树皮干重的 3.35% (Kang and Titus, 1980a); 大多数种子中, 蛋白质含量占种子干重的 20% ~ 40% (Millerd, 1975); ②树皮蛋白质大多为水溶性蛋白质, 种子蛋白质大多为盐溶性蛋白。在苹果树皮可溶性蛋白质中其水溶性蛋白质占 85%, 盐溶性蛋白质占 15% (Kang and Titus, 1980a)。在休眠的黄瓜种子子叶中, 蛋白质占子叶干重的 26%, 其中 93% 为球蛋白 (即盐溶性蛋白) (Chou and Splittstoesser, 1972)。

1.1.1 木本植物营养贮藏蛋白质的分类与定位

从目前研究的木本植物贮藏蛋白质体来看主要存在两种类型, 一类被称为杨树型, 研究的树种有杨树 (*Populus*)、柳树 (*Salix*)、槭树 (*Acer*)、接骨木 (*Sambucus nigra*)、松树 (*Pinus*)、云杉 (*Picea*)、香脂冷杉 (*Abies balsamea*)、北美香柏 (*Thuja occidentalis*) 等, 这些树木的 VSP 在秋天和冬天出现在薄壁细胞的单膜小泡 (小液泡) 中, 它们类似于种子中的蛋白质体 (Protein body), 所以被称为蛋白质体, 但也有人称它们为贮藏蛋白质液泡 (Protein-storage vacuoles); 另一类则被称为橡胶型, 主要研究过的树种有巴西橡胶 (*Hevea brasiliensis*)、苦楝 (*Melia azedarach*)、降香黄檀 (*Dalbergia odorifera*) 等热带树种, 它们的贮藏蛋白质主要存在于细胞的中央大液泡中。这些蛋白质体或贮藏蛋白质液泡, 主要存在于次生韧皮部和皮层组织的薄壁细胞内 (Greenwood *et al.*, 1990; Wetzal *et al.*, 1989b; Sauter and Wellenkamps, 1988), 此外在木射线薄壁细胞 (van

Cleve *et al.*, 1988; 谭海燕等, 2000)、形成层细胞 (Harms *et al.*, 1992) 及维管形成层内 (Wetzel and Greenwood, 1991) 也有报道。在温带树木的茎中, 各种组织细胞中均可积累贮藏蛋白质。例如, 在杨树和柳树的皮层薄壁细胞、次生韧皮部、次生木质部, 甚至形成层细胞中都曾观察到蛋白体 (Sauter *et al.*, 1988; Sauter and Wellenkamp, 1988; Sauter and van Cleve, 1989; Wetzel and Greenwood, 1991)。类似的情况也见于除巴西橡胶树以外的其他几种热带树木, 但是, 形成层细胞无液泡蛋白质内含物 (Wu and Hao, 1991; Hao and Wu, 1993), 这可能与温带树木和热带树木不同的生长发育特性有关 (郝秉中和吴继林, 1993)。

营养贮藏蛋白质的积累及蛋白质体超微结构, 均随着季节及组织年龄的变化而变化 (Coleman *et al.*, 1993), 秋季, 美洲黑杨 (*Populus deltoides*) 及糖槭 (*Acer saccharum*) 树干皮层细胞内均没有发现贮藏蛋白质液泡 (Wetzel *et al.*, 1989a); 欧美杨 (*Peuramericana*) 蛋白质体在冬季呈颗粒状分布, 而春季随着贮藏蛋白质液泡的增大, 蛋白质体呈集中的块状分布。郝秉中等 (1993) 认为, 温带树木与热带树木贮藏蛋白质形式的差别可能与它们的生长发育特性有关, 温带树木中含贮藏蛋白质的薄壁细胞在树木生长——休眠——生长期间, 细胞液泡发生如下明显变化: 中央大液泡——分散的小液泡 (包括蛋白体) ——中央大液泡 (Greenwood *et al.*, 1990; Wetzel and Greenwood, 1991; Wu and Hao, 1991)。这种细胞液泡化变化, 可能是温带树木发育的一般特点, 不管它们的韧皮部细胞中是否含有贮藏蛋白质。另一方面, 已研究的热带树种由于都是落叶树, 因而有一个落叶同时停止生长的时期, 但是它们在生长——停止生长——生长期间, 薄壁组织细胞的液泡并不发生明显变化, 而是一直保持着中央大液泡 (Wu and Hao, 1987, 1991)。联系到温带和热带树

木本筛分子季节发育的差别 (郝秉中等, 1993), 热带树木季节发育的性质与温带树木可能是很不同的。

1.1.2 木本植物营养贮藏蛋白质在树木中的分布

Greenwood 在热带树种巴西橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 的次生韧皮部和温带落叶树种西洋接骨木 (*Sambucus nigra*) 的树皮中, 发现了积累营养贮藏蛋白质的专门结构, 特别是在一些温带树种中, 人们发现这种结构类似于种子贮藏细胞组织中的蛋白体, 并称之为蛋白体或者蛋白贮藏液泡 (Greenwood *et al.*, 1986; Sauter and Wellenkamp, 1988; van Cleve *et al.*, 1989)。大量研究表明这种结构广泛存在于树木的营养器官中, 而且蛋白体的数量和蛋白质内含物的量在不同树种间以及同种树木不同细胞之间存在较大的差异。说明树木氮化物的贮藏形式可能是多样的, 有的以蛋白质形式积累在蛋白体中, 有的以其他无机或有机氮化物形式积累 (表 1-1) (吴继林和郝秉中, 1986, 1994, 1997; 郝秉中等, 2000; van Cleve *et al.*, 1989; Greenwood and Wetzal, 1990; Wetzal and Greenwood, 1991; Clausen and Apel, 1991; Sauter and van Cleve, 1992; van Cleve and Apel, 1993; Stepien and Martin, 1992; Sennerby, 1986; Wu and Hao, 1991; 田维敏和吴继林, 2002)。

表 1-1 木本植物营养贮藏蛋白质的主要特征及定位

Table 1-1 The main characteristic and localization of VSPs in Woody plants

植物名称 The name of plants	取材部位 Sample organs	积累部位 Accumulation organs	蛋白体/蛋 白贮藏 大液泡 Protein body/ storage vacuole	光镜/电镜 Optical/ lectron microscope
<i>Populus × canadensis</i>	3 年生枝条	次生木质部	蛋白体	电镜免疫细胞化学定位

(续表)

植物名称 The name of plants	取材部位 Sample organs	积累部位 Accumulation organs	蛋白体/蛋 白贮藏 大液泡 Protein body/ storage vacuole	光镜/电镜 Optical/ electron microscope
<i>Salix microstachya</i>	2 ~ 4 年生 枝条	树皮	蛋白体	免疫荧光组织 细胞化学定位
<i>Populus cana- densis</i>	1 ~ 3 年生 枝条	次生木质 部	蛋白体	电镜免疫细胞 化学定位
<i>Sophora japon- ica</i>	小的侧枝	叶、树皮	蛋白贮藏大 液泡	电镜免疫细胞 化学定位
<i>Populus × eu- rameri.</i>	d = 10cm 枝 条	树皮	蛋白体	酶联免疫组织 细胞化学定位
<i>Populus cana- densis</i>	2 ~ 3 年生 枝条	树皮	蛋白体	光镜、扫描电 镜及电镜免疫 细胞化学定位
<i>Sambucus nigra</i>	2 ~ 3 年生 枝条	内侧树皮	蛋白体	免疫荧光组织 细胞化学定位
<i>Populus × canadensis</i>	3 年生枝条	次生木质 部	蛋白体	电镜免疫细胞 化学定位
<i>Hevea brasiliensis</i>	1 ~ 2 年生 枝条	树皮	贮藏大液泡	光镜、电镜
<i>Khaya senega- lensis</i>	1 ~ 2 年生 枝条	树皮	贮藏大液泡	光镜、电镜
<i>Melia azedarach</i>	1 ~ 2 年生 枝条	树皮	贮藏大液泡	光镜、电镜
<i>Chukrasia tabularis</i>	1 ~ 2 年生 枝条	树皮	贮藏大液泡	光镜、电镜
<i>Dalbergia odorifera</i>	1 ~ 2 年生 枝条	树皮、木 质部	贮藏大液泡	光镜、电镜
<i>Picea abies</i>	1 ~ 2 年生 枝条	茎内层树 皮	蛋白体	电镜、光镜
<i>Picea glauce</i>	1 ~ 2 年生 枝条	茎内层树 皮	蛋白体	电镜、光镜

(续表)

植物名称 The name of plants	取材部位 Sample organs	积累部位 Accumulation organs	蛋白体/蛋 白贮藏 大液泡 Protein body/ storage vacuole	光镜/电镜 Optical/ electron microscope
<i>Populus × canadensis</i>	5年生枝条	次生木质部	蛋白体	电镜、光镜
<i>Salix caprea</i>	2年生枝条	次生木质部	蛋白体	电镜、光镜
<i>Pinus sylvestris</i>	1~2年生枝条	叶、茎内层树皮	蛋白体	电镜
<i>Pinus strobes</i>	1~2年生枝条	叶、茎内层树皮	蛋白体	电镜
<i>Abies balsamea</i>	1~2年生枝条	叶	蛋白体	电镜
<i>Thuja occidentalis</i>	1~2年生枝条	叶、茎内层树皮	蛋白体	电镜
<i>Salix microstachya</i>	2~3年生枝条	茎内层树皮	蛋白体	光镜
<i>Populus deltoids</i>	2~3年生枝条	茎内层树皮	蛋白体	光镜
<i>Acer saccharum</i>	2~3年生枝条	茎内层树皮	蛋白体	光镜
<i>Quercus rubra</i>	2~3年生枝条	茎内层树皮	蛋白体	光镜
<i>Robinia pseudoacacia</i>	2~3年生枝条	茎内层树皮	蛋白体	光镜
<i>Tilia Americana</i>	2~3年生枝条	茎内层树皮	蛋白体	光镜
<i>Betula papyrifera</i>	2~3年生枝条	形成层	蛋白体	光镜
<i>Alnus glutinosa</i>	2~3年生枝条	茎内层树皮	蛋白体	光镜

(续表)

植物名称 The name of plants	取材部位 Sample organs	积累部位 Accumulation organs	蛋白体/蛋 白贮藏 大液泡 Protein body/ storage vacuole	光镜/电镜 Optical/ electron microscope
<i>Gleditsia</i> <i>triancanthos</i>	2 ~ 3 年生 枝条	茎内层树 皮	蛋白体	光镜
<i>Fraxinus</i> <i>Americana</i>	2 ~ 3 年生 枝条	茎内层树 皮	蛋白体	光镜
<i>Fagus sylvati-</i> <i>ca</i>	2 ~ 3 年生 枝条	茎内层树 皮	蛋白体	光镜
<i>Acer</i> <i>saccharum</i>	2 ~ 3 年生 枝条	茎内层树 皮	蛋白体	光镜
<i>Acer rubrum</i>	2 ~ 3 年生 枝条	茎内层树 皮	蛋白体	光镜
<i>Salix spaethii</i>	2 ~ 3 年生 枝条	茎内层树 皮	蛋白体	光镜
<i>Salix smithia-</i> <i>na</i>	2 ~ 3 年生 枝条	茎内层树 皮	蛋白体	光镜
<i>Populus</i> <i>deltoides</i>	2 ~ 3 年生 枝条	茎内层树 皮	蛋白体	光镜
<i>Populus</i> × <i>canadensis</i>	2 ~ 3 年生 枝条	茎内层树 皮	蛋白体	光镜
<i>Populus cana-</i> <i>densis</i>	3 年生枝条	次生木质 部	蛋白体	电镜
<i>Populus</i> × <i>canadensis</i>	3 年生枝条	次生木质 部	蛋白体	电镜
<i>Larix deciduas</i>	1 ~ 2 年生 枝条	茎皮层、 形成层	蛋白体	电镜
<i>Salix</i> <i>microstachya</i>	2 ~ 4 年生 枝条	树皮	蛋白体	电镜
<i>Salix viminalis</i>	幼茎	形成层	蛋白体	电镜