

DOI: 10.11913/PSJ.2095-0837.2017.40566

何宇清, 操春燕, 沈文忠, 黄冬, 马胜, 吴燕. 甘蓝型油菜种子中油体的超微结构及蛋白质组分析[J]. 植物科学学报, 2017, 35(4): 566~573

He YQ, Cao CY, Shen WZ, Huang D, Ma S, Wu Y. Study on the ultrastructure and proteome of oil bodies in *Brassica napus* L. seeds [J]. *Plant Science Journal*, 2017, 35(4): 566~573

甘蓝型油菜种子中油体的超微结构及蛋白质组分析

何宇清, 操春燕, 沈文忠, 黄冬, 马胜, 吴燕*

(武汉大学生命科学学院, 杂交水稻国家重点实验室, 武汉 430072)

摘要: 以甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)含油量较高的品种‘ZS11’、含油量中等的品种‘Westar’和‘Topas’以及含油量较低的品种‘ZS10’为实验材料, 通过超微结构观察和统计, 比较分析不同品种种子中油体形态、大小和数量的差异。研究结果显示, 品种‘ZS11’种子子叶细胞油体排列致密, 形态较小, 大部分油体的直径低于1 μm; 而在含油量中等或较低的品种中, 种子子叶细胞油体排列均显疏松, 其中‘Westar’和‘Topas’的油体较大, 而‘ZS10’的油体大小不一。本研究还通过双向电泳分析进一步检测了‘Westar’和‘ZS11’种子中总蛋白和油体蛋白的差异表达情况。结果显示, ‘Westar’和‘ZS11’种子总蛋白双向电泳图谱中, 表达量具有2倍以上差异的蛋白质点共有57个; 其中在‘Westar’中特异表达的种子总蛋白点有24个, 在‘ZS11’中有23个。在上述2个品种油体蛋白双向电泳图谱中, 表达量具有2倍以上差异的蛋白质点共有52个, 在品种‘Westar’中特异表达的有2个, ‘ZS11’中有13个。表明不同含油量的油菜品种种子在油体的结构和蛋白组份上均存在差异。

关键词: 甘蓝型油菜; 油体; 超微结构; 油体蛋白; 双向电泳

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2017)04-0566-08

Study on the ultrastructure and proteome of oil bodies in *Brassica napus* L. seeds

He Yu-Qing, Cao Chun-Yan, Shen Wen-Zhong, Huang Dong, Ma Sheng, Wu Yan*

(College of Life Science, State Key Laboratory of Hybrid Rice, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: Rapeseed is one of the most important oil crops in China. The oil content of seeds is directly related to the national economy and people's livelihood. Fatty acids in rapeseeds are stored in the form of oil bodies composed of triacylglycerol (TAG) molecules, which are made of three fatty acid chains joined covalently to a glycerol molecule. We analyzed the ultrastructural characteristics of oil bodies in the seeds of four cultivars that contained varied oil content, including high oil content ‘ZS11’, medium oil content ‘Westar’ and ‘Topas’, and low oil content ‘ZS10’. Results showed that the size and density of the oil bodies in the four cultivars were varied. In the seeds of ‘ZS11’, the density of the oil bodies was higher but the size of the oil bodies was smaller (less than 1 μm in diameter). Interestingly, the density of the oil bodies in the seeds of the medium and low oil content cultivars was lower. Larger sized oil bodies were found in the seeds of the medium oil cultivars, but oil body size in the seeds of the low oil cultivar was diverse. Because oil-body protein composition is related to oil body size

收稿日期: 2016-10-28, 退修日期: 2017-02-09。

基金项目: 国家自然科学基金(31401416)。

This work was supported by a grant from the National Natural Science Foundation of China (31401416).

作者简介: 何宇清(1974-), 女, 博士, 实验师, 研究方向为发育生物学(E-mail: yqhe@whu.edu.cn)。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: wuy@whu.edu.cn)。

and oil content of seeds, total and oil-body protein profiles in the seeds of 'ZS11' and 'Westar' were explored by two-dimensional electrophoresis. Compared with the total protein profiles, 57 differentially expressed proteins were detected in the seeds of both 'Westar' and 'ZS11' cultivars, indicating at least a two-fold difference in expression levels; in addition, 24 and 23 proteins were specifically expressed in 'Westar' and 'ZS11' seeds, respectively. Compared with the oil-body protein profiles, we observed 52 differentially expressed proteins in the oil bodies of both cultivars, indicating at least a two-fold difference in expression levels; furthermore, we detected 2 and 13 proteins specifically expressed in oil-body proteins of 'Westar' and 'ZS11' seeds, respectively. Our findings indicate that the ultrastructure and protein composition of the oil bodies differed in different rapeseed cultivars.

Key words: *Brassica napus*; Oil body; Ultrastructure; Oil body protein; Two-dimensional electrophoresis

油菜(*Brassica napus* L.)是我国主要的油料经济作物之一,是食用植物油和优质蛋白的重要来源。提高油菜种子含油量,改善其蛋白组成,对发展国民经济及提高人民生活水平具有重要意义。油菜种子的油脂主要以三酰甘油的形式贮存于油体中。Tzen 等^[1]和程红焱等^[2]提出的油体结构模型认为,油体是由半单位膜(half-unit membrane)包裹液态三酰甘油而形成的球体。半单位膜由单层磷脂分子及其镶嵌的蛋白组成,基本单位为 13 个磷脂分子和 1 个油体蛋白分子组成;磷脂占油体表面成分的 80%,其余 20% 为油体蛋白,但油体表面的大部分被油体蛋白覆盖^[1,2]。油体蛋白包括油质蛋白(oleosins)、钙结合油质蛋白(caleosins)和固醇油质蛋白(steroleosins)^[1-3]。Oleosins 是碱性蛋白,分子量为 15 ~ 30 kD,等电点为 5.7 ~ 6.6^[4];而 Caleosins 的分子量为 15 ~ 32 kD^[5,6],等电点为 5.6 ~ 6.2^[6,7]。甘蓝型油菜的 steroleosin 蛋白已被鉴定了 2 种,为 steroleosin-A 和 steroleosin-B。其中 steroleosin-A 蛋白由 349 个氨基酸残基组成,分子量为 39 kD,等电点为 6.06; steroleosin-B 蛋白由 461 个氨基酸残基组成,分子量为 51 kD,等电点为 6.29^[8]。

油菜种子含油量与油体的形态、大小、数量之间具有一定的关系。韦存虚等^[9]通过对油菜种子半薄切片和超薄切片的观察,统计分析了子叶细胞中不同大小的油体数量。董劲松等^[10,11]研究了油菜种子中油体的积累过程,发现低油品种的子叶细胞中油体的积累过程在早期与高油品种相同,但后期与高油品种相比存在差异。对不同含油量品种子

叶细胞中油体数量的比较表明,油体的数量和截面积之和与含油量间存在正相关。

种子含油量与油体蛋白的组成之间也存在一定的关系。Katavic 等^[6]研究了油菜不同栽培品种 'Reston' 和 'Westar' 种子中油体的油脂成分,并鉴定了 oleosins、ATS1 和 steroleosins 等油体蛋白。Siloto 等^[12]研究了拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)中一个 18 kD 的 oleosins 基因,发现干扰该基因的表达可导致种子中油体的大小和油脂积累发生改变,种子萌发延迟。Hu 等^[13]考察了不同含油量油菜种子中油体的大小,发现低油品种种子中存在一些异常大的油体,推测其与 oleosins 积聚较少有关。随着植物蛋白质组学的广泛应用,关于油菜种子中油体蛋白的蛋白质组学研究也有一些报道。如 Jolivet 等^[14]提取了油菜种子中的油体蛋白,制备了 S1 ~ S5、CLO1 和 SLO1 免抗血清,并对油体蛋白进行了系统的基因组和蛋白质组学研究,发现油菜基因组包含 19 个 oleosins、5 个 caleosins、9 个 steroleosins 蛋白的编码序列。其中 oleosins 和 caleosins 在种子发育早期(授粉 12 ~ 17 d,即鱼雷形胚时期前后)已经积聚,而 steroleosins 积聚的时间较晚(大约在授粉 25 d)^[7]。李玉琴、甘露和梁丛敏等^[4,15-17]分别通过双向电泳法对不同含油量油菜种子的全蛋白及油体蛋白进行了研究,并鉴定了其差异蛋白。

油菜不同品种由于自身代谢能力以及环境条件的不同,其种子含油量也具有差异。本研究选取甘蓝型油菜含油量不同的 4 个品种 'Westar'、'Topas'、'ZS10'('中双 10 号')和 'ZS11'('中

双11号')为材料,通过超微结构观察和双向电泳技术对其种子中油体的结构和蛋白组分进行分析和比较,并探讨油体和含油量之间的相关性,以期为提高种子含油量研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

选用甘蓝型油菜品种‘Westar’、‘Topas’、‘ZS10’和‘ZS11’,种植于武汉大学苗圃中,2013年9月底至10月初播种,次年5月取材。‘ZS11’种子由中国农业科学院油料作物研究所华玮研究员提供。这4个品种中‘ZS11’种子的含油量最高,可达49.5%^[17];‘Westar’^[18]和‘Topas’^[19-21]种子的含油量居中;‘ZS10’种子的含油量最低,平均为40.24%。

1.2 实验方法

1.2.1 超薄切片与透射电镜观察

将甘蓝型油菜种子浸泡于ddH₂O中,4℃过夜。去除种皮,子叶用2.5%的戊二醛固定液前固定,1%四氧化锇后固定,乙醇梯度脱水,丙酮过渡;Spurr树脂渗透、包埋、聚合。采用Sorvall MT-X超薄切片机切片。半薄切片用甲苯胺蓝染色,在Nikon TE-2000U上观察,CoolSNAP HQ2 CCD成像系统拍照。超薄切片经醋酸双氧铀和柠檬酸铅双重染色,在FEI Tecnai G2 20上观察,其附带的CCD成像系统拍照。油体数目与大小的统计分析方法为:每个样品选取至少55个直径最大的油体,测量其直径,计算平均值。ZS10子叶细胞中的油体明显分为大小2类,大油体的统计方法同上,小油体的统计方法则是随机选取蛋白体和细胞核周围的至少82个油体,测量其直径,计算平均值。蛋白体数目与大小的统计分析方法为:每个样品随机选取至少60个细胞,统计每个细胞内的蛋白体数,计算平均数;每个样品随机选取至少20个蛋白体,测量其直径,计算平均值。

1.2.2 胚总蛋白提取

将2g甘蓝型油菜干燥的种子浸泡于ddH₂O中,4℃过夜。去除种皮,用液氮将种子研磨至粉末状。先加入10mL提取液(包含0.7mol/L蔗糖、0.1mol/L氯化钾、50mmol/L EDTA、0.5mol/L Tris, pH 7.5),再加入10mL Tris饱和酚,冰上每隔5min振荡1次,共6次。于

5000 r/min、4℃离心30min。吸出上层酚相,加入与酚相同体积的提取液,冰上每隔5min振荡1次,总共6次。以上操作总计重复3次。用所得酚5倍体积的醋酸铵甲醇溶液,对蛋白质进行沉淀。再用甲醇洗涤1次,丙酮洗涤2次。分装干燥后,-80℃保存、备用。

1.2.3 油体分离和油体蛋白提取

参考李玉琴^[4]、韦存虚等^[9]和梁丛敏等^[16]的方法并稍作修改。将2g干种子浸泡于ddH₂O中4℃过夜。去除种皮,用10mL预冷的研磨液(0.6mol/L蔗糖、0.01mol/L磷酸钠缓冲液,pH 7.5)在冰上充分研磨至匀浆状。研磨液过3层纱布,收集滤液,加入10mL漂浮液I(0.4mol/L蔗糖、0.01mol/L磷酸钠缓冲液,pH 7.5),10000g离心30min,收集上层油体,并用20mL去污清洗液(0.1%Tween-20、0.2mol/L蔗糖、0.005mol/L磷酸钠缓冲液,pH 7.5)悬浮油体。将其加至50mL离心管中,再加入20mL的0.01mol/L磷酸钠缓冲液(pH 7.5),10000g离心30min,收集上层油体,并用20mL离子洗脱液(2mol/L氯化钠、0.6mol/L蔗糖、0.01mol/L磷酸钠缓冲液,pH 7.5)悬浮油体。将其加至50mL离心管中,再加入20mL的漂浮液II(2mol/L氯化钠、0.25mol/L蔗糖、0.01mol/L磷酸钠缓冲液,pH 7.5),10000g离心30min,收集上层油体,并用少量研磨液悬浮油体,4℃保存备用。

在油体中加入3.0mL石油醚,室温振荡2min,13000g离心5min,去上层石油醚。重复3次。在空气中挥发掉多余的石油醚。加入4.5mL氯仿/甲醇(2:1,V/V),室温振荡2min,13000g离心5min,去上层氯仿/甲醇和下层研磨液,留富含蛋白的中间层,重悬于1.5mL水中。加入4.5mL氯仿/甲醇(2:1,V/V),室温振荡2min,13000g离心5min,去上层氯仿/甲醇和下层水,留富含蛋白的中间层,重悬于1.5mL水中。重复多次直至油分除尽。涡旋5min,重悬于6.0mL丙酮中,-20℃沉淀16h以上。13000g离心30min,所得蛋白质沉淀风干成干粉,-80℃保存备用。

1.2.4 双向电泳

第一向等电聚焦采用IPG预制胶条(24cm,pH 4~7)。上样量120μg,上样体积460μL,等

电点聚焦仪为 GE ETTAN IPGPHOR3。电泳结束后用硝酸银染色。脱色后凝胶用 UMAX Powerlook1100 扫描仪扫描(分辨率 200 dpi), 用 ImageMaster 2D platinum 5.0 (General Electric Company) 软件进行图像分析。

2 结果与分析

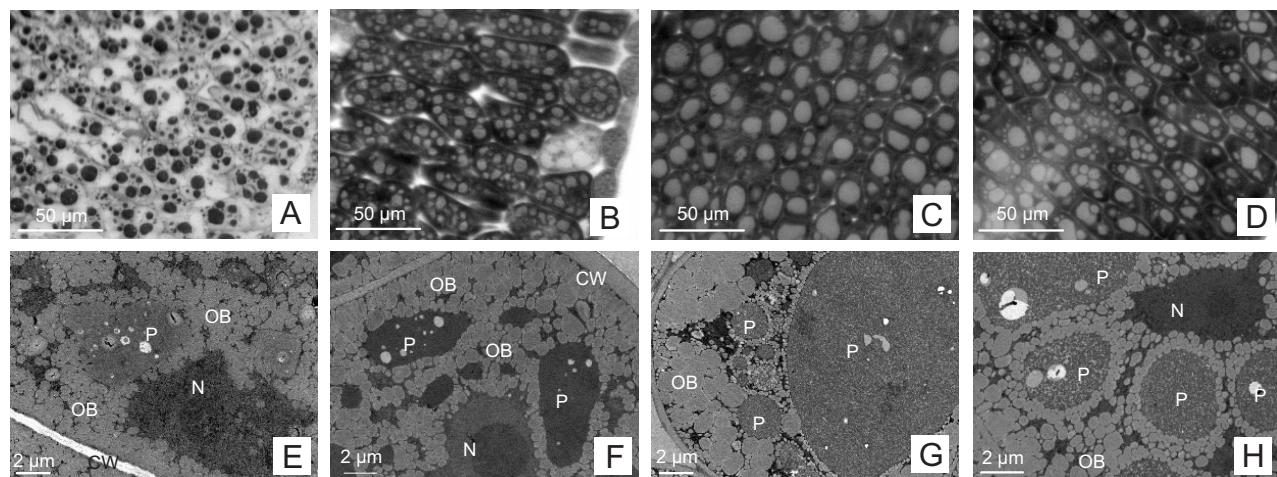
2.1 种子中油体分布的特点

研究表明, 在相同的种植条件下, ‘Westar’、‘Topas’、‘ZS10’和‘ZS11’4个品种的种子百粒重分别为 (0.43 ± 0.01) g、 (0.32 ± 0) g、 (0.52 ± 0.01) g、 (0.5367 ± 0.0058) g。在‘Westar’和‘ZS11’的子叶细胞中, 内含物颗粒的分布特点相似, 蛋白体松散地围绕着细胞核排列, 被大小较为均一的油体包围(图 1)。‘Westar’的子叶细胞中油体普遍较小, 直径小于1 μm的油体所占比率高于66%, 只有个别油体的直径大于2 μm, 甚至2.5 μm; ‘ZS11’的子叶细胞中直径小于1 μm的油体所占比率高于90%; ‘Topas’的子叶细胞中油体相对较大, 大部分油体的直径为1~1.5 μm, 小于1 μm和大于1.5 μm的油体比率分别为10%和20%(图 2)。与前3个品种相比, ‘ZS10’的子叶细胞中油体具有明显的大小分化(图 1: G), 在蛋白体、细胞核和细胞壁边缘分布有较多的小油

体, 平均直径低于0.4 μm, 尤其是蛋白体周围, 小油体数目多且排列致密; 在细胞其它地方则分布有较多的大油体, 大部分的直径超过1 μm, 个别超过2 μm(图 2)。在‘Westar’、‘Topas’和‘ZS11’的子叶细胞中油体排列紧密整齐, 其间细胞空隙小; ‘ZS10’的子叶细胞中油体则排列疏松, 细胞空隙较大。油体一般呈球体或不规则形, 在靠近细胞壁或细胞核等密度较大的地方, 有些油体被挤压成长柱形(图 1)。‘Westar’、‘Topas’、‘ZS10’和‘ZS11’的种子切片中, 油体所占切片面积的比例分别为53.67% ± 5.37%、53.5% ± 9.18%、51.83% ± 6.89%和62.58% ± 5.84%。

在‘Westar’和‘ZS11’的子叶细胞中, 蛋白体的大小和数目相似, 平均直径约为10 μm, 平均数目约为8个/细胞; 与前二者相比, ‘Topas’的子叶细胞中, 蛋白体的大小无明显不同, 但数目明显较多, 平均约为21个/细胞; ‘ZS10’的子叶细胞中, 蛋白体明显体积大而数量少, 平均直径约为16 μm, 平均数目低于4个/细胞(图 1、图 3、图 4)。

以上结果说明, 甘蓝型油菜种子中油体的分布与含油量的高低可能具有一定的关系。含油量较高的‘ZS11’与含油量较低的‘ZS10’相比较, 二者种子重量相似, 但油体分布规律不同, 含油量也不同。



A ~ D: 从左到右分别为油菜‘Westar’、‘Topas’、‘ZS10’、‘ZS11’子叶的半薄切片。E ~ H: 从左到右分别为油菜‘Westar’、‘Topas’、‘ZS10’、‘ZS11’子叶的超薄切片。CW: 细胞壁; N: 细胞核; OB: 油体; P: 蛋白体。
A ~ D: Semi-thin sections of cotyledons in ‘Westar’, ‘Topas’, ‘ZS10’, and ‘ZS11’ seeds (left to right). E ~ H: Ultra-thin sections of cotyledons in ‘Westar’, ‘Topas’, ‘ZS10’ and ‘ZS11’ seeds (left to right). CW: cell wall; N: nucleus; OB: oil bodies; P: protein bodies.

图 1 油菜不同品种子叶的半薄切片和超薄切片

Fig. 1 Semi-thin and ultra-thin sections of cotyledons in different *Brassica napus* cultivars

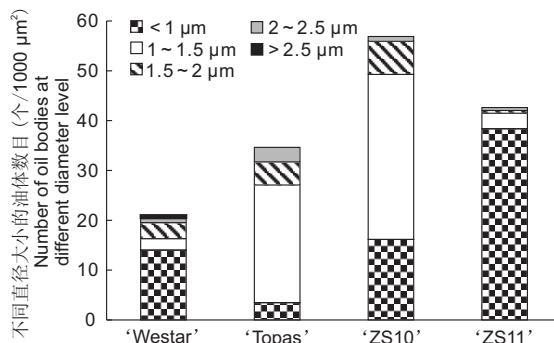


图2 不同直径大小的油体数目

Fig. 2 Number of oil bodies of different diameters

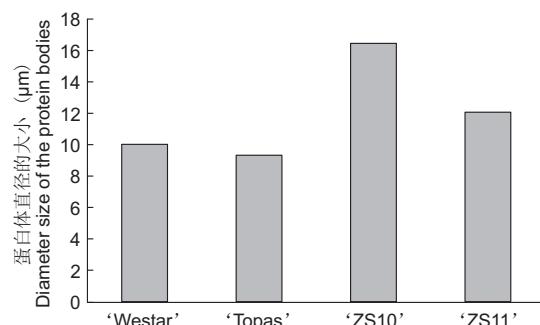


图3 蛋白体直径的大小

Fig. 3 Diameter of protein bodies

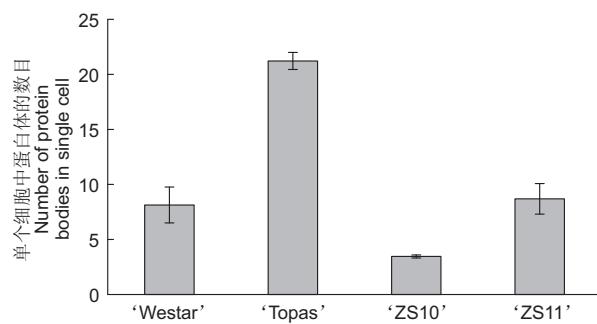
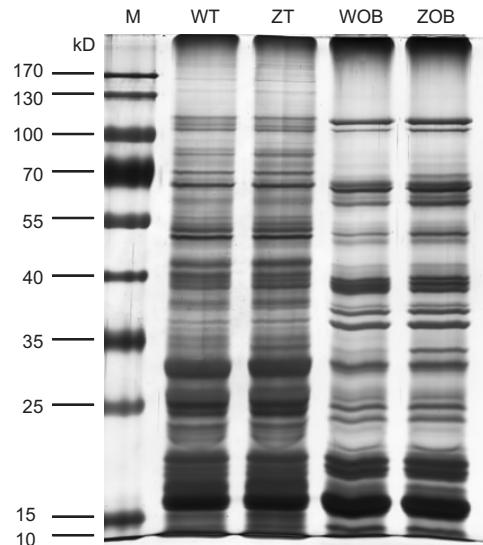


图4 单个细胞中蛋白体的数目

Fig. 4 Number of protein bodies in single cell

2.2 胚总蛋白和油体蛋白分析

SDS-PAGE 和双向电泳研究结果显示，不同品种油菜胚的总蛋白和油体蛋白在部分条带上存在一定程度的定性或定量的差别(图5)。在‘Westar’及‘ZS11’成熟种子胚总蛋白双向电泳图谱中均出现，且表达量差异在2倍以上的蛋白质点共57个，其中在‘Westar’中表达量高的蛋白质点有23个，‘ZS11’中有34个。出现在‘Westar’成熟种子胚总蛋白双向电泳图谱中的特异蛋白质点有24个；而仅出现在‘ZS11’成熟种子的胚总蛋白质点有23个(图6)。



M: 蛋白标记；WT: ‘Westar’胚总蛋白；ZT: ‘ZS11’胚总蛋白；WOB: ‘Westar’胚中的油体蛋白；ZOB: ‘ZS11’胚中的油体蛋白。

M: Protein marker; WT: Total protein in ‘Westar’ embryo; ZT: Total protein in ‘ZS11’ embryo; WOB: Oil body protein in ‘Westar’ embryo; ZOB: Oil body protein in ‘ZS11’ embryo.

图5 油菜不同品种胚的总蛋白及油体蛋白 SDS-PAGE 电泳图

Fig. 5 SDS-PAGE of total and oil body proteins in *Brassica napus* embryos

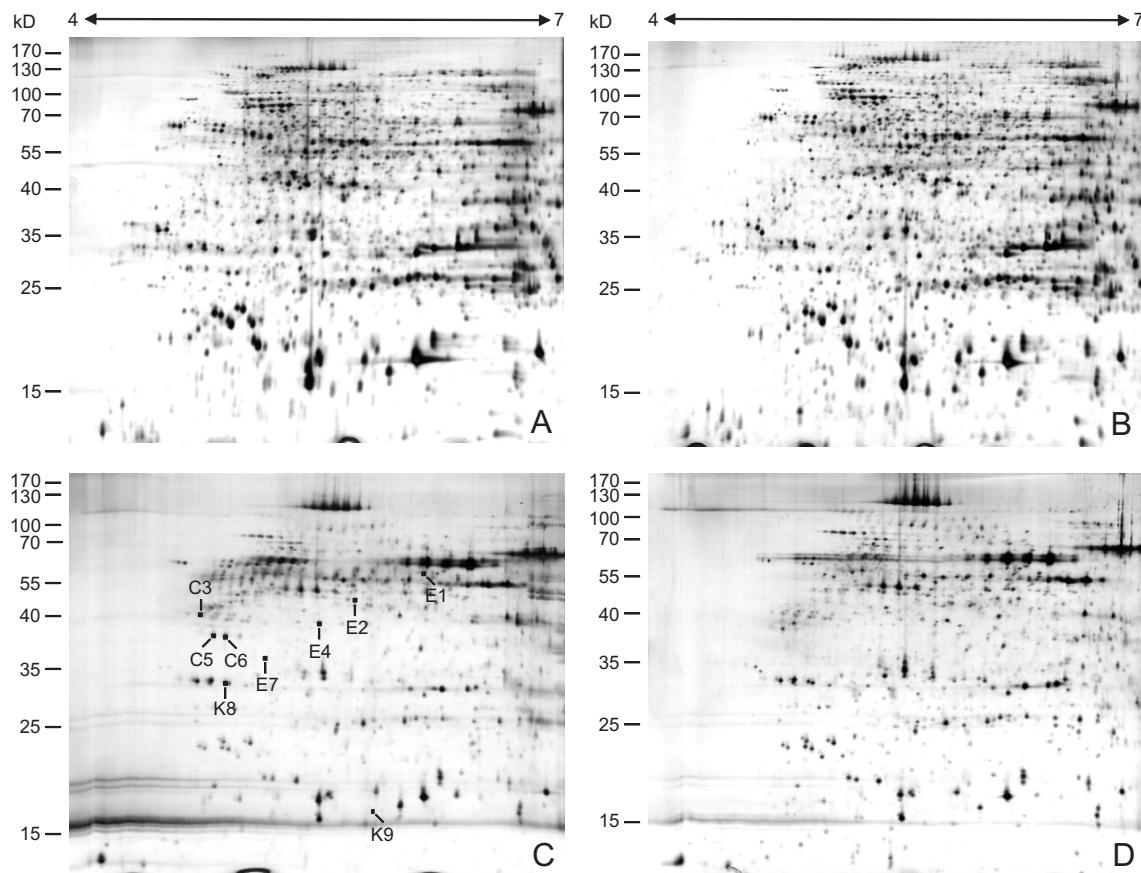
在‘Westar’及‘ZS11’成熟种子胚油体蛋白双向电泳图谱中均出现，且表达量差异在2倍以上的蛋白质点共52个。其中在‘Westar’中表达量高的蛋白质点有3个，ZS11中有49个；特异出现在‘Westar’成熟种子胚中的蛋白质点有2个；而仅出现在ZS11成熟种子胚的蛋白质点有13个(图6)。

为了检测上述双向电泳的分离效果，本研究选取9个蛋白质点(C3、C5、C6、E1、E2、E4、E7、K8、K9)进行了质谱鉴定(图6: C)。结果表明，这些蛋白涉及能量代谢、热激反应、抗性、蛋白质合成与水解、叶绿体功能等(表1)。

以上结果说明，不同含油量的油菜品种，如含油量中等的‘Westar’与含油量较高的‘ZS11’相比较，种子总蛋白和油体蛋白组分确实存在一定的差异。

3 讨论

不同含油量的甘蓝型油菜，其成熟种子中油体的形态、大小、数量和分布也具有各自的特点。傅丽霞和瞿波^[22]的研究表明，在高油份材料中，子



A: ‘Westar’胚总蛋白; B: ‘ZS11’胚总蛋白; C: ‘Westar’胚中的油体蛋白; D: ‘ZS11’胚中的油体蛋白。

A: Total proteins in ‘Westar’ embryo; B: Total proteins in ‘ZS11’ embryo; C: Oil body proteins in ‘Westar’ embryo; D: Oil body proteins in ‘ZS11’ embryo.

图6 油菜不同品种胚的总蛋白及油体蛋白双向电泳图

Fig. 6 2-DE maps of total and oil body proteins in *Brassica napus* embryos

叶贮藏细胞内油体大,排列紧密,呈多边形镶嵌分布,油体间空隙小;在低油份材料中,子叶贮藏细胞内油体排列疏松,多呈椭圆形,大小不等,油体间的空隙大;在中油份材料中,子叶贮藏细胞内油体和蛋白体的结构、大小及分布状态介于高、低含油材料之间。董劲松等^[11]报道,高油品种的子叶贮藏细胞内油体排列紧密,几乎不存在空隙,油体数量明显较多,经常发现数个截面比较大的油体周围分布着数量较多的小油体;相对而言,在低油品种中,油体排列疏松,油体间空隙较大,油体数量较少,大小相对均匀,单个油体的截面积比高油品种稍大。甘露等^[15]报道,高含油量的种子一般油体形态都比较小且排列紧密;低含油量的种子一般油体形态较大且出现超大油体结构,低含油量种子的种胚中,蛋白质储藏腔明显多于高含油量种子的种胚。Boulard等^[23]的研究结果则表明,含油量较高的品种‘Warzanowski’与含油量较低的‘Am-

ber’相比,成熟种子中油体的体积较大。

本研究选用了甘蓝型油菜含油量不同的4个品种‘Westar’、‘Topas’、‘ZS10’和‘ZS11’,其中‘ZS11’种子的含油量最高,可达49.5%;‘Westar’和‘Topas’种子的含油量居中;‘ZS10’种子的含油量最低,平均为40.24%。其成熟种子的子叶细胞中油体的排列规律与前人研究结果相似,在含油量高的‘ZS11’子叶细胞中油体排列整齐,油体间的细胞间隙小;在含油量低的‘ZS10’子叶细胞中油体排列疏松,油体间的空隙大。对油体大小的观察则发现,在含油量高的‘ZS11’子叶细胞中油体普遍偏小,直径小于1 μm的油体所占比率高于90%,这与董劲松等^[11]和甘露等^[15]的研究结果相似;在含油量低的‘ZS10’子叶细胞中油体大小不等,这与傅丽霞和瞿波^[22]的观察结果相似。这几项研究结果与本研究相比,存在一定差异,原因主要为:(1)实验材料的含油量高低只是

表1 图6-C中蛋白质点的质谱鉴定结果
Table 1 LC-MS/MS analysis results of protein spots in Fig. 6-C

编号 No.	匹配蛋白 Match protein	数据库登录号 UniProtKB accession number	匹配得分 Score	参数 Expect value	肽段覆盖率(%) Protein coverage	表达量 (Westar/ZS11)* Expression level
E1	甲基丙二酸半醛脱氢酶 Methylmalonate-semialdehyde dehydrogenase	A0A078HHK9_BRANA	124	5.90E-08	18	+
E2	线粒体加工肽酶 α -1 亚基 Probable mitochondrial-processing peptidase subunit alpha-1	M4DCT8_BRARP	351	1.20E-30	28	+
C3	热激蛋白 70 Heat shock 70 kDa protein 5-like	M4DJG6_BRARP	238	2.30E-19	16	++
E4	上皮硫特异蛋白 Epithiospecifier protein-like	A0A078GYV5_BRANA	258	2.30E-21	52	+
C5	未知蛋白 Unknown protein	A0A078G591_BRANA	71	0.011	26	++
C6	真核翻译起始因子 3 的 H1 亚基 Eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H1	A0A078FVE7_BRANA	110	1.50E-06	11	++
E7	60S 酸性核糖体 P0 蛋白 60S acidic ribosomal protein P0	M4ELT2_BRARP	276	3.70E-23	28	+
K8	天冬氨酸蛋白酶 Aspartic proteinase	A0A078HBF3_BRANA	200	1.50E-15	24	+++
K9	质体脂结合蛋白 6 Probable plastid-lipid-associated protein 6, chloroplastic	A0A078D737_BRANA	307	2.90E-26	39	+++

注: + 表示蛋白质点出现; ++ 表示蛋白质表达量为 2 倍以上; +++ 表示蛋白质特异性表达。

Notes: + Indicates protein spot is present; ++ Indicates more than two-fold increase; +++ Indicates spot is specifically expressed.

相对而言,不同的研究者有不同的定义。如在本文中,高油品种的含油量为 49.5%,但在傅丽霞和瞿波^[22]的报道中,中油份材料的含油量就达到 49% ~ 51%,其高油份材料的含油量更高达 58% ~ 62%。在董劲松等^[11]的报道中,高油品种的含油量却只有 44.82% ~ 47.98%。因此,本文的高油材料应该对应傅丽霞和瞿波研究中的中油材料,本文的中油材料应该对应董劲松等研究中的高油材料。又如‘Westar’品种,在本文中被划分为中油材料,在董劲松等的报道中却被划分为低油材料。(2)油菜种子的含油量受到不同环境条件的影响,即使是同一品种,种植在日照时间、海拔高度和营养成分不同的条件下,种子的含油量也不同。如‘Westar’种子的含油量一般约为 43%,但董劲松等所采用的‘Westar’种子含油量却为 37.12%; Elahi 等^[19]采用的‘Topas’种子含油量为 (47.31 ± 0.31)%,但在 Dawood 等^[20]的报道中‘Topas’种子的含油量为 45.97%,在 Mekki^[21]的报道中,‘Topas’种子的含油量为 41.82%。随着同一品种的油菜在不同的生长条件下种子含油量的不同,其

子叶细胞中油体的形态大小和分布也会有相应的变化。如傅丽霞和瞿波所采用的高、中、低油分材料均为‘华黄一号’优系,其子叶贮藏细胞中油体却具有不同的形态、大小和分布。

总之,本文的实验结果表明,含油量较高的品种(含油量 49.5%)与含油量中等或较低的品种相比,含油量较高的子叶细胞中一般油体形态较小,大部分油体直径低于 1 μm ,且排列紧密;含油量中等或较低的子叶细胞中一般油体形态较大,或大小不一,且排列疏松。但本文并未研究含油量更高(如含油量高于 50%)的材料,含油量的增长究竟是通过油体数目的增加,或油体体积的增大,或二者兼而有之,尚需进一步的研究。本文还对‘Westar’和‘ZS11’种子中的全蛋白和油体蛋白进行了双向电泳分离,获得了二者的蛋白表达图谱,随后的质谱鉴定结果证明通过本实验方法分离出的蛋白质可用于质谱分析,但因鉴定的蛋白质点数目有限,尚未发现有差异表达的油体蛋白。下一步我们将根据油体蛋白 oleosins、caleosins、sterol-oleosins 的等电点和分子量对双向电泳结果中剩下的

差异表达蛋白进行质谱分析, 从而为揭示高、低含油量甘蓝型油菜种子中油体蛋白的差异、油体蛋白与含油量之间的相关性研究, 培育高含油量的油菜品种提供理论依据。

参考文献:

- [1] Tzen JT, Huang AH. Surface structure and properties of plant seed oil bodies [J]. *J Cell Biol*, 1992, 117 (2): 327–335.
- [2] 程红焱, 宋松泉. 种子的贮油细胞器——油体及其蛋白 [J]. 植物学通报, 2006, 23 (4): 418–430.
- Cheng HY, Song SQ. Seed lipid storage organelles: oil bodies and their proteins [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2006, 23 (4): 418–430.
- [3] Tzen JTC. Integral proteins in plant oil bodies [J]. *ISRN Botany*, 2012, 2012: 173954.
- [4] 李玉琴. 不同含油量甘蓝型油菜种子全蛋白及油体蛋白的双向电泳分析 [D]. 郑州: 郑州大学, 2012.
- [5] Chen JC, Tsai CC, Tzen JT. Cloning and secondary structure analysis of caleosin, a unique calcium-binding protein in oil bodies of plant seeds [J]. *Plant Cell Physiol*, 1999, 40 (10): 1079–1086.
- [6] Katavic V, Agrawal GK, Hajduch M, Harris SL, Thelen JJ. Protein and lipid composition analysis of oil bodies from two *Brassica napus* cultivars [J]. *Proteomics*, 2006, 6 (16): 4586–4598.
- [7] Jolivet P, Boulard C, Bellamy A, Valot B, d'Andréa S, et al. Oil body proteins sequentially accumulate throughout seed development in *Brassica napus* [J]. *J Plant Physiol*, 2011, 168 (17): 2015–2020.
- [8] 徐春雷. 甘蓝型油菜 *steroleosin* 基因的克隆与表达 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2008.
- [9] 韦存虚, 钱风凌, 李爱民, 张永泰, 周卫东, 王幼平. 油菜种子油体的观察和大小分析 [J]. 中国油料作物学报, 2009, 31 (4): 445–448.
- Wei CX, Qin FL, Li AM, Zhang YT, Zhou WD, Wang YP. Oil body observation in seeds of *Brassica napus* L. [J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 2009, 31 (4): 445–448.
- [10] 董劲松. 甘蓝型油菜 (*Brassica napus* L.) 油体发育机制及其与含油量相关性研究 [D]. 南京: 南京农业大学, 2008.
- [11] 董劲松, 石东乔, 高建芹, 李成磊, 刘洁, 等. 甘蓝型油菜油体数量及面积之和与含油量的相关性 [J]. 植物学报, 2009, 44 (1): 79–85.
- Dong JS, Shi DQ, Gao JQ, Li CL, Liu J, et al. Correlation between the quantity and the sum of area of oil bodies and oil content in Rapeseed (*Brassica napus*) [J]. *Chinese Bulletin of Botany*, 2009, 44 (1): 79–85.
- [12] Siloto RM, Findlay K, Lopez-Villalobos A, Yeung EC, Nykiforuk CL, Moloney MM. The accumulation of oleosins determines the size of seed oilbodies in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2006, 18 (8): 1961–1974.
- [13] Hu Z, Wang X, Zhan G, Liu G, Hua W, Wang H. Unusually large oilbodies are highly correlated with lower oil content in *Brassica napus* [J]. *Plant Cell*, 2009, 28 (4): 541–549.
- [14] Jolivet P, Boulard C, Bellamy A, Larré C, Barre M, et al. Protein composition of oil bodies from mature *Brassica napus* seeds [J]. *Proteomics*, 2009, 9 (12): 3268–3284.
- [15] 甘露. 不同含油量甘蓝型油菜品种比较蛋白质组学研究 [D]. 武汉: 华中科技大学, 2011.
- [16] 梁丛敏, 李玉琴, 杨冬之, 臧新, 田保明, 等. 甘蓝型油菜种子油体蛋白提取及双向电泳分析 [J]. 南方农业学报, 2013, 44 (11): 1776–1780.
- Liang CM, Li YQ, Yang DZ, Zang X, Tian BM, et al. 2D-polyacrylamide gel electrophoresis analysis and extraction of oil body protein in seeds of *Brassica napus* [J]. *Journal of Southern Agriculture*, 2013, 44 (11): 1776–1780.
- [17] Gan L, Zhang CY, Wang XD, Wang H, Long Y, et al. Proteomic and comparative genomic analysis of two *Brassica napus* lines differing in oil content [J]. *J Proteome Res*, 2013, 12 (11): 4965–4978.
- [18] 官春云. 加拿大油菜品种的演变及现状 [J]. 中国油料作物学报, 1994, 16 (4): 74–79.
- Guan CY. Evolution and status of rape varieties in Canada [J]. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences*, 1994, 16 (4): 74–79.
- [19] Elahi N, Duncan RW, Stasolla C. Modification of oil and glucosinolate content in canola seeds with altered expression of *Brassica napus* LEAFY COTYLEDON1 [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2016, 100: 52–63.
- [20] Dawood M, Sadak M, Reyad B, El-Sayed A, El-Gayar S. Changes in chemical composition during germination of some canola varieties changes in oil content and fatty acid composition [J]. *Sci Agri*, 2013, 2 (3): 77–82.
- [21] Mekki B. Yield and quality traits of some canola varieties grown in newly reclaimed sandy soils in Egypt [J]. *World Appl Sci J*, 2013, 25 (2): 258–263.
- [22] 傅丽霞, 瞿波. 不同含油量油菜种子子叶贮藏细胞内脂体和蛋白体超微结构的研究 [J]. 华中农业大学学报, 1993, 12 (6): 556–560.
- Fu LX, Qu B. Studies on the ultrastructure of oily bodies and protein bodies in the cotyledon storage cell of mature seeds in rapeseed [J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 1993, 12 (6): 556–560.
- [23] Boulard C, Bardet M, Chardot T, Dubreucq B, Gromova M, et al. The structural organization of seed oil bodies could explain the contrasted oil extractability observed in two rapeseed genotypes [J]. *Planta*, 2015, 242 (1): 53–68.