

# 低温胁迫下酸浆叶片蛋白差异分析

徐 磊<sup>1</sup>,谭福忠<sup>1</sup>,郑 巍<sup>1</sup>,师 臣<sup>1</sup>,崔洪秋<sup>1</sup>,张志刚<sup>1</sup>,赵 越<sup>2</sup>

(1. 黑龙江省农业科学院 大庆分院,黑龙江 大庆 163316;2. 黑龙江省科学院 大庆分院,黑龙江 大庆 163319)

**摘要:**为进一步研究酸浆抗寒机理,以 25℃ 室温条件(对照)和 5℃ 低温处理条件下酸浆幼苗叶片为材料,运用蛋白质双向电泳结合质谱技术分析低温胁迫下酸浆叶总蛋白差异表达。结果表明:表达量存在显著差异的蛋白质点有 16 个,与对照组相比,表达量增加的蛋白质点 9 个,表达量减少的蛋白质点 6 个,新增蛋白质点有 1 个。经过鉴定,这些差异表达的蛋白质分别属于代谢相关蛋白、信号转导蛋白、能量相关蛋白、结合蛋白、抗性相关蛋白等。

**关键词:**酸浆;差异蛋白质;双向电泳

**中图分类号:**S567 **文献标识码:**A **文章编号:**1002-2767(2015)10-0030-04 **DOI:**10.11942/j.issn1002-2767.2015.10.0030

近些年来由于环境恶化,气候的不稳定因素越来越多,骤然降温的天气常出现,给农业生产造成巨大危害,低温胁迫已经成为农业增产的重要限制因素。提高植物抗寒性、抗冷性是解决这些问题的最有效的方法之一。目前,人们对植物低

温抗性研究主要集中在玉米、小麦、水稻、番茄、黄瓜、果树等作物上,在植物低温逆境条件下生理生化指标的变化研究比较明确,但迄今为止还没有明确的关于植物发生低温伤害的原理及植物的抗冻机制的相关报道<sup>[1]</sup>。在低温逆境条件下,植物通常会改变自身的一系列代谢过程来适应低温伤害,同时就会伴随着植物细胞内蛋白质种类和数量上的变化,蛋白质是生理功能的执行者,是生命现象的直接体现者,蛋白质组学在植物低温胁迫的研究已逐步被应用,并取得很好的研究成果<sup>[2]</sup>。

**收稿日期:**2015-05-28  
**第一作者简介:**徐磊(1985-),男,黑龙江省青冈县人,硕士,研究实习员,从事玉米育种与生物技术研究。E-mail:

参考文献:

[1] 王文丽,吴松全,寇莹莹,等. 文冠果种质资源的 RAPD 分析[J]. 辽宁林业科技,2012(1):11-12.

[2] 周庆源,傅德志. 文冠果生殖生物学的初步研究[J]. 林业科学,2011,46(1):158-162.

[3] 高晓欣,张芸香,郭晋平. 文冠果 DNA 提取及 RAPD 反应体系的优化[J]. 山西农业大学学报:自然科学版,2011,31(4):315-320.

[4] 芦娟,柴春山,吴文俊,等. 文冠果反应体系的建立及优化[J]. 中国农学通报,2014,30(1):32-36.

[5] 芦娟,柴春山,吴文俊,等. 文冠果干燥叶片高质量 DNA 提取方法研究[J]. 湖南农业科学,2013(5):1-3,4.

[6] 张芸香,刘晶晶,白晋华,等. 应用均匀设计优化文冠果 ISSR-PCR 反应体系[J]. 山西农业大学学报:自然科学版,2014,34(3):315-320.

## DNA Extraction of *Xanthoceras sorbifolia* Bunge and Optimization of RAPD and ISSR Reaction Systems

GUO Jing-liang, RUAN Cheng-jiang

(Institute of Plant Resources of Dalian Nationalities University, Dalian, Liaoning 116600)

**Abstract:** In order to study the genetic diversity of *Xanthoceras Sorbifolia* germplasms, taking 48 individuals as materials growing in natural cultivated population in the Qitai county of Xinjiang germplasm nursery. Leaves DNA of each sample were extracted using the modified CTAB method, RAPD and ISSR reaction systems were optimized. The results showed that the optimal RAPD reaction system was in the total volume of 20  $\mu$ L for PCR amplification, containing 30 ng template DNA, 2  $\mu$ L 10  $\times$  PCR buffer, 2.0 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> Mg<sup>2+</sup>, 0.1 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> dNTPs, 1U *Taq* enzyme. The optimal ISSR analysis reaction system was in the total volume of 20  $\mu$ L for PCR amplification, containing 30 ng template DNA, 2  $\mu$ L 10  $\times$  PCR buffer, 2.5 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> Mg<sup>2+</sup>, 0.2 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup> dNTPs, 1U *Taq* enzyme. In these optimum reaction systems, RAPD and ISSR analysis had stability and repeatability very well.

**Keywords:** *Xanthoceras sorbifolia*; DNA; RAPD; ISSR

在我国酸浆属植物有 5 个种属 2 个变种,包括酸浆、苦职、小酸浆、灯笼果、毛酸浆、挂金灯和大果酸浆,其中毛酸浆在东北三省分布最为广泛<sup>[3]</sup>,但由于缺乏对酸浆抗冷性的系统研究和设施采用的抗冷品种,致使低温冷害成为限制酸浆优质高产的主要限制因素。本试验利用蛋白质双向电泳并结合质谱分析技术,选用抗冷性较好的红果酸浆叶片作为研究材料,鉴定低温胁迫下蛋白质的差异,为深入研究酸浆抗寒机制以及进一步进行抗性育种提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

选取长势相同的酸浆幼苗置于 5℃ 低温培养箱进行胁迫处理,以 25℃ 室温培养为对照(由黑龙江八一农垦大学农学院提供)。

### 1.2 方法

1.2.1 蛋白质提取及含量测定 酸浆叶片蛋白质的提取参考 Gallardo 等<sup>[4]</sup>方法并略作改进。蛋白质含量的测定采用 Bradford 法<sup>[5]</sup>,光密度 OD 值在紫外分光光度波长为 595 nm 下测定,绘制蛋白质标准曲线,计算蛋白样品的浓度。

1.2.2 双向凝胶电泳 等电聚焦采用 pH4~7 的 24 cm 的 IPG 胶条,蛋白上样量为 1 200  $\mu$ g,胶条限流 50  $\mu$ A,20℃ 自动进行水化和聚焦,聚焦条件及参数设置参照双向电泳体系建立及优化进行<sup>[6]</sup>,3 次重复。

1.2.3 凝胶染色和扫描 采用考马斯亮蓝染色,电泳结束后将凝胶转入固定液中固定 1 h;然后用超纯水洗涤 3 次,每次 15 min;之后在考染液(R350),90℃ 染色 20 min;用脱色液(10%冰乙酸)中脱色。脱色后的凝胶用扫描仪(型号 ImageScanner)扫描成图谱,扫描后用软件(Image Master 3D Platinum 7.0)分析。

1.2.4 质谱鉴定和数据库搜索 对蛋白双向凝胶进行分析后,用 EP 枪头挖取差异显著的蛋白质点,放入灭菌的离心管用于胶内酶解。委托华大基因公司进行二级质谱分析,分析后的蛋白质进行数据库比对,明确其生物信息学功能。

## 2 结果与分析

### 2.1 双向电泳图谱比较

利用蛋白质双向电泳技术对 25℃ 室温条件下酸浆和 5℃ 低温胁迫下酸浆进行叶片蛋白质组

分析,获得了背景清晰,重复性较好的凝胶图谱(见图 1、图 2),通过观察比较 2 组 2D-图谱可以明显看出,蛋白质点的分布模式非常相似,但是两者在个别蛋白质点的表达情况上存在着明显差异。利用 Imagemaster 2D Platinum 7.0 图像分析软件对叶片总蛋白质双向电泳图谱进行匹配和比较分析发现,25℃ 对照组双向电泳图谱上一共检测到了 1 210 个蛋白质点,在 5℃ 低温处理的双向电泳图谱上一共检测到了 1 189 个蛋白质点。

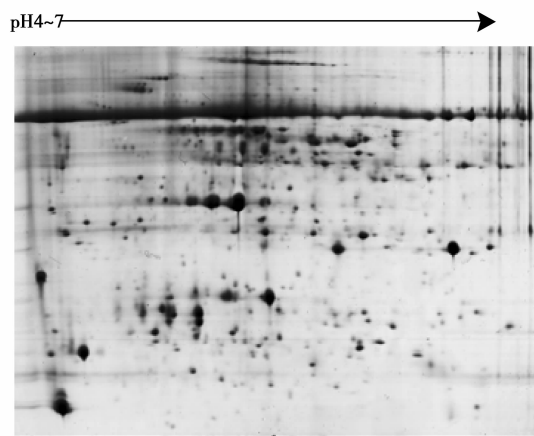


图 1 25℃ 室温蛋白质的双向电泳凝胶图谱  
Fig. 1 Two-dimensional electrophoresis gel of leaf proteins extracted from physalis exposed to 25℃

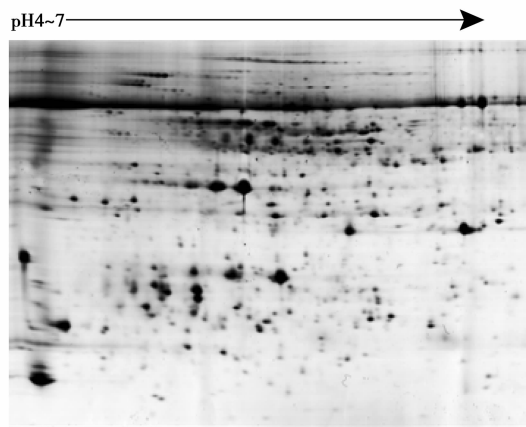


图 2 5℃ 低温条件处理下蛋白质的双向电泳凝胶图谱  
Fig. 2 Two-dimensional electrophoresis gel of leaf proteins extracted from physalis exposed to 5℃

### 2.2 差异蛋白质的质谱鉴定

通过定性和定量分析,表达量发生显著变化的差异蛋白质点共有 16 个并成功鉴定,其中表达量增加的蛋白质点 9 个,表达量减少的蛋白质点 6 个,新增蛋白质点有 1 个,选取差异表达的蛋白质点进行质谱鉴定。采用等电点、分子量、MOWSE

分数、匹配肽段数、覆盖率等参数作为标准,部分差异表达蛋白点的分析结果见表 1。

由表 1 可以看出,在已经鉴定出的 16 个蛋白点中,有许多蛋白质质谱鉴定结果却显示为同一蛋白质,但是在凝胶上并不在同一位置(如 4 号

和 5 号、82 号和 87 号),表明这个蛋白质的一级结构相似,但它们的匹配段数、覆盖率并不相同,所以推测结构相似。由于蛋白质的翻译后修饰对其发挥其生物功能起着相当重要的作用,因此这些蛋白质点及功能值得进一步深入研究。

表 1 差异表达蛋白的鉴定结果

Tab 1 Identification of differential expressed proteins

序号 No.	登录号 Accession No.	蛋白名称 Protein name	等电点/分子量 PI/Mw	得分 Score	匹配段数 Matches	覆盖率/% Coverage
1	gi 3334337	Superoxide dismutase 超氧化物歧化酶	5.65/15346	340	5	43
4	gi 313586389	Chloroplast manganese stabilizing protein 叶绿体锰稳定蛋白	6.73/34325	313	6	40
5	gi313586398	Chloroplast manganese stabilizing protein 叶绿体锰稳定蛋白	6.53/34325	450	7	38
10	gi 71056574	Glutathione-s-transferase 谷胱甘肽-S-转移酶	6.42/32451	345	7	39
14	gi 242087035	Rubisco small chain precursor 二磷酸核酮糖小亚基前体	6.52/30245	254	5	33
33	gi 349144	Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶	6.41/53421	456	7	22
39	gi 3914019	S-adenosylmethionine synthetase S-腺苷甲硫氨酸合成酶	6.48/47926	339	6	33
53	gi 238928434	Anthocyanin 5-aromatic acyltransferase-like protein 脂肪酸代谢相关的蛋白芳香族的花青素酰基转移酶	4.94/34657	354	6	35
54	gi 17691470	Receptor protein kinase-related protein-like 受体类蛋白激酶	6.98/33571	245	6	46
59	gi 3271028	Cytosolic malate dehydrogenase 苹果酸脱氢酶	5.83/32415	387	4	34
64	gi 3273828	Gamma glutamyl hydrolase 蛋白水解酶	6.65/41328	401	7	45
82	gi 168586	Pyruvate,orthophosphate Dikinase 丙酮酸正磷酸双激酶	5.65/23542	372	6	41
87	gi 168586	Pyruvate,orthophosphate Dikinase 丙酮酸正磷酸双激酶	6.32/23542	341	6	41

2.3 蛋白质的功能分类

利用 NCBI 和 GO 数据库对所鉴定的 16 个差异蛋白质进行检索,对其功能进行分类(见图 3)。结果表明,16 个差异蛋白质分别属于代谢相关蛋白(25%)、信号转导蛋白(12%)、能量相关蛋白(38%)、结合蛋白(6%)、抗性相关蛋白(19%)等。

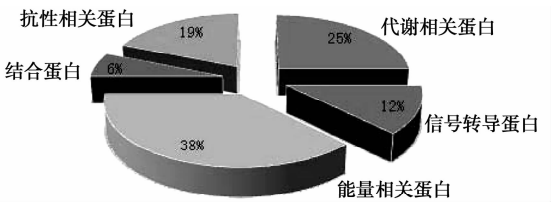


图 3 差异表达蛋白的功能分类

Fig. 3 Functional classification of the differentially expressed proteins

### 3 结论与讨论

本试验利用蛋白质双向电泳及质谱分析技术,对低温胁迫下酸浆差异蛋白质组学进行研究,共发现了 16 个差异蛋白,通过质谱鉴定及数据库搜索获得了样品蛋白的序列信息,并对蛋白的同源性、功能等方面进一步深入讨论,经过分析这些蛋白主要分为能量相关蛋白、代谢相关蛋白、结合蛋白、信号转导蛋白、抗性相关蛋白、未知蛋白六大类,其中能量相关蛋白最多,接近 50%。

分析结果表明,二磷酸核酮糖小亚基前体(Rubisco small chain precursor)和核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶大亚基(Ribulose biphosphate carboxylase oxygenase, Rubisco)均是代谢相关蛋白,在低温胁迫下这两种蛋白表达量均上升。这可能是低温胁迫下酸浆的光和作用减弱,自身产生更多的大小亚基来促进能量代谢来适应低温胁迫,产生更多的能量抵御外界的刺激,这与前期的研究测定结果相吻合<sup>[7]</sup>。

苹果酸脱氢酶(Cytosolic malate dehydrogenase)是与能量代谢相关的蛋白,在低温胁迫下表达量上升。苹果酸脱氢酶表达量的增加,为酸浆在低温胁迫下的生长发育提供更多的能量,在一定程度上可以避免循环被破坏或阻断。酸浆在低温胁迫下要维持正常的生理功能,需要消耗更多的能量,这与试验前期测定的结果相吻合。

低温胁迫大多造成对酸浆细胞的氧化损伤,

由于活性氧的产生。谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione-s-transferase)属抗性相关蛋白,在低温胁迫下表达量上升,且随着胁迫时间的延长而增加。这可能是谷胱甘肽-S-转移酶的表达量的增加在激活酸浆的抗氧化防御机制中发挥重要作用,提高了清除活性氧的能力。大量研究表明,多种胁迫因子同时诱导谷胱甘肽-S-转移酶的表达,在植物的逆境应答中起重要作用<sup>[8-9]</sup>。

#### 参考文献:

- [1] 沈静,曹致中. 野牛草响应低温胁迫的生理机制和蛋白质组学初步研究[D]. 兰州:甘肃农业大学,2010:1-10.
- [2] Davis B D. Mechanism of Bactericidal Action of Aminoglycosides [J]. Microbiological Reviews,1988,52(1):153.
- [3] 宋晓宏,李景富. 毛酸浆多倍体诱导的初步研究[D]. 哈尔滨:东北农业大学,2006:1-10.
- [4] Gallrdo K, Job C, Groot S P, et al. Proteomic analysis of Arabidopsis seed germination and priming[J]. Germany: Plant Physiology, 2001, 126: 835-848.
- [5] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Anal Biochem, 1976, 72: 248-254.
- [6] 李景富,徐磊,张贺,等. 番茄黄化突变体叶片蛋白质双向电泳技术体系的优化[J]. 东北农业大学学报, 2014, 45(4): 46-50
- [7] 张志刚,殷奎德. 低温胁迫对酸浆生理特性的影响[J]. 黑龙江农业科学, 2013(10): 71-73.
- [8] 汤泽生,代庆阳,苏学辉. 南黄大麦叶细胞的亚显微结构[J]. 中国农业科学, 1989, 22(2): 22-24.
- [9] 钱前,杨炜,黄大年,等. 水稻白绿苗的可溶性蛋白质电泳分析[J]. 中国水稻科学, 1991, 5(4): 183-185

## Analysis on *Physalis* Leaf Protein Differences Under Low Temperature Stress

XU Lei<sup>1</sup>, TAN Fu-zhong<sup>1</sup>, ZHENG Wei<sup>1</sup>, SHI Chen<sup>1</sup>, CUI Hong-qiu<sup>1</sup>, ZHANG Zhi-gang<sup>1</sup>, ZHAO Yue<sup>2</sup>  
(1. Daqing Branch of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Daqing, Heilongjiang 163316; 2. Daqing Branch of Heilongjiang Academy of Sciences, Daqing, Heilongjiang 163319)

**Abstract:** In order to provided more theoretical basis for studying the cold resistance mechanism of *Physalis*, taking *Physalis* seedling leaves as materials which had been processed under 25℃ room temperature (control) and 5℃ low temperature, *Physalis* leaf protein difference expression was analyzed with two-dimensional electrophoresis of protein and mass spectrometry. The results showed that there were 16 protein spots which had significant variations in protein expression amount. Compared with the control group, 9 protein spots expression amount increased, 6 protein spots expression amount decreased and one new protein spot was found. Appraisal identified that these differentially expressed proteins respectively belonged to metabolism related protein, signal transduction protein, energy related protein, binding protein, resistance related proteins and so on.

**Keywords:** *Physalis*; protein differences; two-dimensional electrophoresis