文章编号：1005-0906(2013)03-0082-05

盐胁迫下玉米叶片差异蛋白的双向电泳分析

雷 震,裴玉贺,赵美爱,郭新梅,宋希云
(青岛农业大学/青岛市主要农作物种质创新与应用重点实验室,山东 青岛 266109)

摘 要：土壤盐碱化是影响玉米产量的重要非生物因素之一。用 200 mmol/L NaCl 溶液对耐盐玉米自交系 E28 进行盐处理,提取叶片可溶性蛋白质进行双向电泳,并用 ImageMaster™ 2D 6.00 软件分析,探究玉米的耐盐机理。结果表明,盐胁迫处理后共有 10 个有明显差异的蛋白点,其中 4 个表达上调,6 个表达下调。质谱分析和数据库搜索鉴定出应激反应蛋白和类囊体腔 19 KDa 蛋白,可能是盐胁迫后植物营养生长及光合作用受到影响的结果。

关键词：玉米;盐胁迫;双向电泳;质谱分析
中图分类号：S513 文献标识码：A

Analysis of Soluble Maize Leaf Proteins under Salinity Stress by Two-dimensional Electrophoresis

LEI Zhen, PEI Yu-he, ZHAO Mei-ai, GUO Xin-mei, SONG Xi-yun
(*Qingdao Agricultural University/Qindao Key Lab of Germplasm Innovation and Application of Major Crops, Qingdao* 266109, China)

Abstract: Soil salinization is one of the most important abiotic constraints in maize yield. Seedlings of salinity-tolerant maize inbred line E28 were treated with 200 mmol/L NaCl solution and the soluble proteins of leaves were extracted by TCA/acetone method for two-dimensional gel electrophoresis. Software ImageMaster™ 2D 6.00 was used to analyze the results. There were 4 up-expressed spots and 6 down-expressed spots in total 10 significantly different proteins. MALDI-TOF-MS analysis indicated that there were stress responsive protein and thylakoid lumenal 19 kDa protein, which were considered as the results of changes in maize growth and photosynthesis.

Key words: Maize; Salinity stress; Two-dimensional electrophoresis; MALDI-TOF-MS

我国有 660 万 hm^2 的盐碱耕地，约占全国耕地总面积的 1/10，是世界上土地受盐碱化危害较为严重的国家之一。由于灌溉不当和化肥的过度使用，土壤次生盐渍化进一步加剧，成为制约我国农业生产的一个重要因素[1~4]。对耕地面积的需求不断增加使得盐碱地的开发和耐盐作物的选育显得尤为重要。1983 年 Singh 等[5]首次报道了烟草盐适应悬浮培养细胞中的盐胁迫蛋白,后在苜蓿、马铃薯、豌豆、小麦、番茄[6~8]等植物中都有盐胁迫蛋白发现。

玉米是盐敏感作物，可通过稀盐作用、拒盐作用、微生物作用等多种方式来抵御盐胁迫影响[9]。1986 年 Ramagopa[10]首次在加盐培养基上获得了玉米盐胁迫蛋白。王春英等[11]于 1992~1995 年对 105 份玉米杂交种及自交系进行了抗盐性鉴定并指出，玉米自交系 E28 具有耐盐性。目前蛋白质组学方法对农作物的研究方兴未艾[12~17]。E28 是以 A619Ht1 为母本、旅 9 宽为父本组配经与旅 9 宽回交 3 次选育而成,A619Ht1 也具有良好的耐盐性。本实验采用蛋白质双向电泳和质谱分析技术,探究耐盐玉米自交系 E28 幼苗盐胁迫前后的蛋白差异,为玉米耐

收稿日期：2012-11-02
基金项目：国家科技支撑计划(2011BAD35B01)、青岛市科技支撑计划(12-1-3-15-nsh)、山东省“泰山学者岗位”(作物栽培学与育种学)
作者简介：雷 震(1987-),男,山东平度人,在读硕士,从事玉米分子遗传育种研究。Tel:0532-86080459
E-mail:960909128@qq.com
宋希云为本文通讯作者。Tel:0532-86080009
E-mail:songxy@qau.edu.cn

盐机制的探究及耐盐品种的选育提供一定的理论基础。

1　材料与方法

1.1　供试材料

玉米自交系 E28 由青岛农业大学分子育种实验室提供。

1.2　实验方法

1.2.1　材料准备

挑选颗粒饱满的玉米种子,经 0.1% $HgCl_2$ 消毒 15 min 后用蒸馏水反复冲洗干净,25℃吸涨过夜;后转入垫有两层湿润滤纸的大培养皿中,每皿 25 粒 28℃/25℃(昼/夜)萌发至 3 叶期转入培养盆。沙培分为处理组和对照组,处理组早晚各浇 10、15 mL 200 mmol/L NaCl 溶液,空白组浇等量蒸馏水,处理组和对照组各设 3 个重复。处理 7 d 后,用灭菌剪刀剪取长势一致的处理组和对照组叶片,超纯水洗净,剪成 3 cm 长的小段并去除较粗的叶脉,液氮速冻后冷藏于 -80℃备用。

1.2.2　蛋白质样品的准备

参照改进的 Damerval[18]方法提取玉米叶片可溶性蛋白,取 0.6 g 叶片材料液氮充分研磨,加入预冷的三氯乙酸 (TCA)/丙酮溶液过夜;12 000 r/min、4℃离心 1 h 沉淀,用预冷的丙酮溶液洗涤,并重复 1 次;12 000 r/min、4℃离心 1 h 后沉淀摊开干燥;将干粉按 1:25 比例加入裂解液[7 mol/L 尿素,2 mol/L 硫脲,4% 两性电解质 CHAPS,2% 两性电解质载体(pH 值 4 ~ 7),40 mmol/L 二硫苏糖醇(DTT)]在液氮和 35℃水浴锅中反复冻融,并振荡至蛋白完全溶解;12 000 r/min、4℃离心 1 h,取上清按 1:10 比例加入冷丙酮沉淀过夜;12 000 r/min、4℃离心 1 h 后沉淀,加入适量水化液[8 mol/L 尿素,2% CHAPS,0.5% 两性电解质载体(pH 值 4 ~ 7),2.8 mg/mL DTT]用超声振荡使沉淀充分溶解;12 000 r/min、4℃离心 1 h,并用移液器小心吸取上清蛋白溶液,测定蛋白浓度,-80℃保存备用。

玉米可溶性蛋白的浓度测定参照 Bradford 法[19],采用牛血清蛋白作为标准蛋白。

1.2.3　双向电泳

玉米叶片可溶性蛋白质的双向电泳参照 O'Farrell[20]的方法,选用 24 cm pH 值 4~7 胶条进行水化,上样蛋白量 300 μg。第一向等电聚焦 18 h:步骤及保持时间,100 V→1 hr;步骤及保持时间,300 V→1 h;步骤及保持时间,500 V→1 h;梯度,1 000 V→2 h;梯度,8 000 V→3 h;步骤及保持时间,8 000 V→10 h。第二向 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳使用 12.5% 浓度的分离胶及 0.5% 含溴酚蓝指示剂的低熔点琼脂糖作为封胶液,每根胶条 1 W 功率电泳 1 h,后转为每根 3 W 电泳至溴酚蓝指示线到凝胶底端。银染法进行凝胶的染色,以进行下一步的分析。

1.2.4　凝胶的扫描与图像分析

银染后的凝胶采用透射模式分辨率 300 dpi 进行扫描,图像用 ImageMasterTM platinum6 软件进行分析,设定合适的参数进行找点操作,并手动删除假点和不理想的点。对凝胶设定 2 个 Landmarker,进行凝胶胶点匹配操作,分别创建对照组和处理组两个分组并进行组内和组间分析。以 Vol% 为参比标准,差异大于 1.5 倍的蛋白点认为是差异显著蛋白点。

1.2.5　差异蛋白质的 MALDI-TOF-MS 鉴定及数据库比对

将确定检测的差异蛋白点用 1.5 mm 切胶笔切下,置于已标号的 0.5 mL eppendorf 管中,记录相应的位置;交给华大基因公司进行蛋白点的酶解、洗脱和 MALDI-TOF-MS 鉴定,使用 Mascot 软件在 NCBInr 玉米数据库中进行比对。

2　结果与分析

2.1　蛋白质提取方法的改进效果

本实验在原有 TCA 丙酮法基础上增加了液氮冻融及超声波促溶的步骤。叶片干粉加入裂解液后反复冻融可促进蛋白的释放溶解,提高蛋白提取效率,超声波振荡增强了水化液对沉淀的溶解和杂质的析出。由表 1 可以看出,使用 60 μL 相同体积水化液溶解蛋白沉淀,Bradford 法测得改进前的提取方法蛋白平均浓度为 1.46 μg/μL,改进后方法浓度提高到 3.49 μg/μL,多次实验结果表明,提取方法的改进提高了蛋白质的浓度,能够更好地适应双向电泳上样的要求。

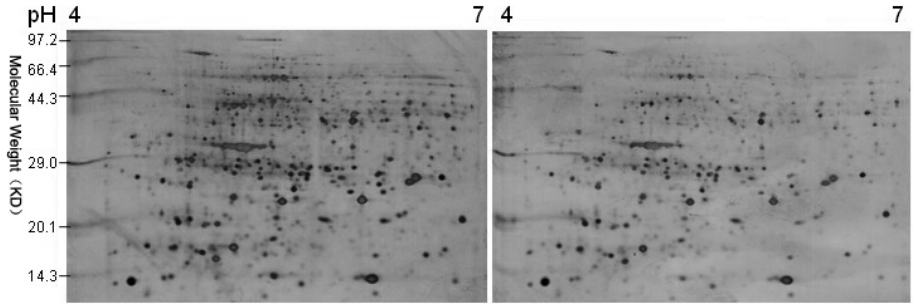
表 1　提取方法改进前后蛋白质浓度的变化

Table 1　The change of protein concentrations before and after improvement of extraction method　μg/μL

重复 Replicate	1	2	3	平均 Average
改进前浓度	1.12	1.59	1.67	1.46
改进后浓度	3.28	3.56	3.64	3.49

使用相同的参数,对改进方法前后的蛋白样品进行双向电泳(图 1),根据 ImageMaster™ 2D platinum6

软件分析,改进后胶面有 944 个点,较改进前的 793 个点增加了 151 个点,且胶点形状规则,凝胶背景清晰,拖尾横纹干扰少,能更好地满足实验研究的需要。



改进后的方法 改进前的方法

图 1 玉米叶片蛋白双向电泳图

Fig.1 The two-dimensional gel electrophoresis of maize leaf proteins

2.2 盐胁迫处理的双向电泳分析

使用 ImageMaster™ 2D platinum6.0 软件对玉米自交系 E28 盐胁迫前后的双向电泳图进行分析,选择差异大于 1.5 倍的点为显著差异点,共识别 10 个差异蛋白。与对照组相比,盐胁迫处理后有 4 个蛋白表达上调、6 个表达下调(图 2)。对照组和盐处理组中点 431 和点 479 的差异表达结果见图 3。

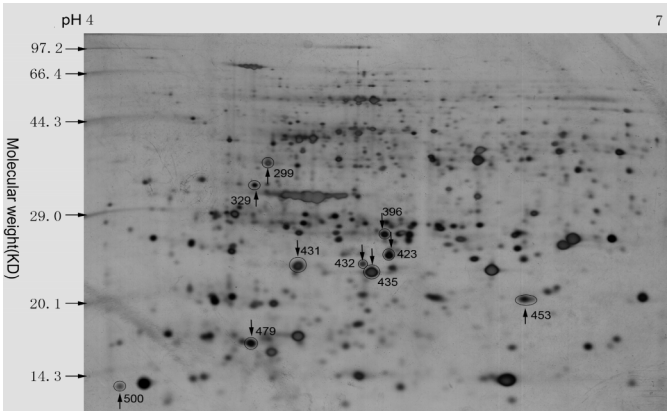
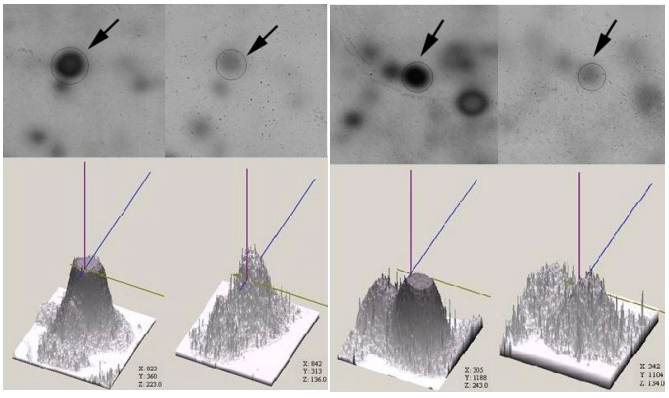


图 2 软件分析生成的双向电泳差异蛋白参照图谱

Fig.2 2-D-IEF-PAGE consensus master map of maize leaf proteins under salinity stress analysis



431 的差异表达 479 的差异表达

图 3 对照组和盐处理组中点 431 和点 479 的差异表达

Fig.3 The expressed proteins of spot 431 and 479 in control group and treated group

2.3　差异蛋白点的 MALDI-TOF-MS 鉴定结果

从差异蛋白中选择 5 个丰度较高的蛋白点进行质谱鉴定,鉴定出 2 个阳性结果,分别为玉米应激反应蛋白和类囊体腔 19 KDa 蛋白(表 2)。

表 2　盐胁迫下玉米叶片差异蛋白质谱鉴定结果

Table 2　Results of differentially expressed proteins identified by MALDI-TOF-MS under salinity stress

编 号 Code	蛋白名称 Protein name	得 分 Score	分子量(kD) Molecular weight	等电点 p	覆盖率(%) Coverage	表达量 Quantity
431	应激反应蛋白	63.1	22.365 81	7.49	37.69	↓
479	类囊体腔 19KDa 蛋白	165.0	27.359 76	5.35	22.18	↓

3　结论与讨论

3.1　双向电泳方法的改进

双向电泳是从蛋白质组学角度分析基因表达差异的一项技术[21],在鉴定蛋白质的表达变化方面有着明显的优势。双向电泳对于蛋白样品质量要求较高,李冠军等[22]以玉米苗期叶片为材料进行蛋白质组学研究时,对蛋白质裂解液、蛋白质浓度测定体系、等电聚集电泳电压和时间、聚丙烯酰胺凝胶浓度等技术参数都做了改进,实验效果有了很大的提高。本实验对传统双向电泳方法做了改进,蛋白提取时液氮反复冻融及超声波促溶使最终蛋白浓度有了明显的提高,冷丙酮和三氯乙酸沉淀蛋白质则有利于减少酚类和色素的干扰,80%冷丙酮沉淀蛋白过夜并高速离心可以有效地去除盐类。第一向等电聚焦过程中电压上升顺利,证明蛋白样品含盐少,蛋白质纯度高,能够较好地满足实验的要求。

3.2　盐胁迫下蛋白的差异表达

Quesada V 等[23]认为,土壤盐碱化的成因是多方面的,包括农业灌溉、长期的水流变化对地表的冲刷、世界范围的水流变化等。土壤盐分过高引起土壤水势降低造成根系吸水困难,严重者引起根细胞水分向外渗透[24],是造成玉米伤害的直接原因。受盐害后,根的生长吸收、呼吸合成受到抑制,气孔活动及蒸腾作用受影响,叶绿素含量减少,且光合作用效率降低[25,26]。Hu Feng 等[27]在水稻中报道了由拟南芥 AtTLP 同源基因 *OsTLP27* 编码的与玉米类囊体腔 19 KDa 蛋白完全相同的蛋白,其在光合作用和叶绿体发育中具有重要功能,并指出它的减少会导致色素含量减少,光化学效率降低,即光系统Ⅱ(PSⅡ)最高光化学效率(F_v/F_m)、PSⅡ有效量子产量(ΦPSⅡ)、电子转移率(ETR)和光化学淬灭(qP)值降低,同时降低了叶绿体相关功能基因的表达,基粒的大小和数目也随之减少。

本研究中鉴定的玉米类囊体腔 19 KDa 蛋白表达下调,认为盐胁迫后玉米类囊体腔 19 KDa 蛋白的表达降低与其光合作用的下降有着直接关系。根系的盐胁迫压力势必造成地上玉米叶片生长和功能的受阻,影响了营养供应,叶片可溶性蛋白多呈现表达下调的趋势。应激反应蛋白的下调也可能是植物营养生长减弱的结果,与 Singh、Ramagopa 等研究盐胁迫蛋白时出现耐盐蛋白积累的结果并不吻合,耐盐玉米品种(自交系)的耐盐过程可能会伴随着抗性蛋白的产生和相关代谢蛋白的差异表达,这也是进一步实验的探索要点。

参考文献:

[1] 徐艳霞 . 利用 TOPSIS 法综合评价芽苗期青贮玉米种质耐盐性[J]. 杂粮作物,2010,30(2):101-104 .

[2] 藏金萍,曹志艳,李姗姗 . 水稻耐盐相关 QTC 研究进展[J] . 安徽农业科学,2011,39(20):12041-12043 .

[3] 柳成荫, 杨洪兵 . NaCl 胁迫与等渗 PEG 处理对荞麦幼苗渗调物质累积的影响[J] . 西南农业学报,2011,24(4):1279-1281 .

[4] 王贻莲,魏艳丽,宋莉璐,等 . NaCl 胁迫对大麦种子萌发与幼苗生长的影响[J] . 湖北农业科学,2011,50(17):3494-3497 .

[5] Singh N K, Handa A K, Hasegawa P M, et al. Electrophoretic protein patterns in cultured cells of tobacco adapted to NaCl[J]. Plant Physiol., 1983, 72: 533-535.

[6] King G J, Hussey C E J R, Turner V A. A protein induced by NaCl in suspension cultures of Nicotiana tabacum accumulates in whole plant roots[J]. Plant Mol. Biol., 1986, 7: 441-449.

[7] Gulick P, Dvorák J. Gene induction and repression by salt treatment in roots of the salinity-sensitive Chinese Spring wheat and the salinity-tolerant Chinese Spring × Elytrigia elongata amphiploid[J]. Proc. Natl. Acad. Sci., 1987, 84(1): 99-103.

[8] Staples R C, Sacher R F. Prospects for Biosaline Research[J]. Proc US-Pak Biossline Res. Workshop, 1986, 40-41.

[9] 段显德,周　波,杨国会,等 . 玉米耐盐性研究[J] . 通化师范学院学报,2001(2):67-69 .

[10] Ramagopal S. Protein synthesis in a maize callus exposed to NaCl and mannitol[J]. Plant Cell Rep., 1986, 84: 94-98.

[11] 王春英,张秀清,王志武 . 玉米杂交种及自交系抗盐性的鉴定[J]. 玉米科学,1996(2):23-26 .

[12] Salekdeh G H, Komatsu S. Crop proteomics: aim at sustainable agriculture of tomorrow[J]. Proteomics, 2007, 7: 2976-2996.

[13] Agrawal G K, Jwa N S, Rakwal R. Rice proteomics: ending phase I and the beginning of phase II[J]. Proteomics, 2009, 9: 935-963.

[14] Finnie C, Svensson B. Barley seed proteomics from spots to structures [J]. J. Proteomics, 2009, 72: 315-324.

[15] Blomqvist L A, Ryberg M, Sundqvist C. Proteomic analysis of the e-tioplast inner membranes of wheat(*Triticum aestivum*) by two-dimen-sional electrophoresis and mass spectrometry[J]. Physiol Plant, 2006, 128: 368-381.

[16] Blomqvist L A, Ryberg M, Sundqvist C. Proteomic analysis of highly purified prolamellar bodies reveals their significance in chloroplast development[J]. Photosynth Res., 2008, 96: 37-50.

[17] Komatsu S, Ahsan N. Soybean proteomics and its application to func-tional analysis[J]. J. Proteomics, 2009, 72: 325-336.

[18] Damerval C, de Vienne D, Zivy M, et al. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic varia-tion detected in wheat-seedling proteins[J]. Electrophoresis, 1986, 7: 52-54.

[19] Bradford M M. A rapid and sensitive for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of proteindye binding[J]. Anal. Biochem., 1976, 72: 248-254.

[20] O'Farrell P H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins[J]. J. Biol. Chem., 1975, 250: 4007-4021.

[21] Foad Fatehi, Abdolhadi Hosseinzadeh, Houshang Alizadeh, et al. The proteome response of salt-resistant and salt-sensitive barley geno types to long-term salinity stress[J]. Mol. Biol. Rep., 2012, 39: 6387-6397.

[22] 李冠军，付凤玲 . 玉米叶片总代白提取和双向电泳技术的改进[J] . 玉米科学，2006，14(6)：100-103 .

[23] Quesada V, Garcia-Martinez S, Piqueras P, et al. Genetic architecture of NaCl tolerance in Arabidopsis thaliana[J]. Plant Physiol., 2002, 130: 951-963.

[24] 山东省农业科学院玉米研究所 . 玉米生理[M] . 北京：农业出版社，1987 .

[25] Peng Z, Wang M, Li F, et al. A proteomic study of the response to salinity and drought stress in an introgression strain of bread wheat[J]. Mol. Cell Proteomics, 2009, 8: 2676-2686.

[26] Meloni D A, Oliva M A, Martinez C A, et al. Photosynthesis and ac-tivity of superoxide dismutase, peroxidase and glutathione reductase in cotton under salinity stress[J]. Environ. Exp. Bot., 2003, 49: 69-76.

[27] Hu F, Kang Z H, Qiu S C, et al. Overexpression of OsTLP27 in rice improves chloroplast function and photochemical efficiency[J]. Plant Sci., 2012, 195: 125-134.

(责任编辑：朴红梅)

(下转第 86 页)

(上接第 81 页)

[63] 王 琦，王 伟，申腾飞，等 . 玉米中 3 个 *CIPK* 同源基因在干旱和低温胁迫下的表达分析[J] . 华中农业大学学报，2011，30(5)：545-551 .

[64] 刘彦丹，英 生，张登峰，等 . 玉米逆境胁迫响应基因 *ZmbZIP71* 的克隆与表达分析[J] . 植物遗传资源学报，2011，12(5)：775-781.

[65] Yang G, Zou H, Wu Y, et al. Identification and characterisation of candidate genes involved in chilling responses in maize(*Zea mays* L.) [J]. Plant cell, tissue and organ culture, 2011, 106(1): 127-141.

[66] Kong X P, Pan J W, Zhang M Y, et al. *ZmMKK4*, a novel group C mi-togen-activated protein kinase kinase in maize(*Zea mays* L),confers salt and cold tolerance in transgenic *Arabidopsis*[J]. Plant, Cell & En-vironment, 2011, 34(8): 1291-1303.

[67] Quan R, Shang M, Zhang H, et al. Improved chilling tolerance by transformation with *betA* gene for the enhancement of glycinebetaine synthesis in maize[J]. Plant Science, 2004, 166(1): 141-149.

[68] Ohta S, Ishida Y, Usami S. High-level expression of cold-tolerant pyruvate, orthophosphate dikinase from a genomic clone with site-di-rected mutations in transgenic maize[J]. Mol. Breeding, 2006, 18(1): 29-38.

(责任编辑：姜媛媛)