

磷胁迫下油菜幼苗叶片差异蛋白表达的初步分析

余永芳*, 赵丹丹*, 李玉琴, 牛银银, 田保明, 臧新**

(郑州大学 生物工程系, 河南 郑州 450001)

摘要: 以油菜品种中油 821 为材料, 利用双向电泳技术研究足磷和缺磷条件下油菜幼苗叶片差异表达的蛋白质, 进而为揭示油菜耐低磷胁迫的分子机制奠定基础。结果表明: 经电泳、PDQuest 分析后, 缺磷处理下差异显著的蛋白质点有 38 个, 19 个表达量显著上调, 19 个显著下调。磷胁迫下蛋白表达量的差异说明逆境下植物可通过多种蛋白的协调作用来适应外界环境的变化。

关键词: 油菜; 磷胁迫; 双向电泳; 蛋白质组学; 差异蛋白表达

中图分类号: S565.4 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2011)08-0089-04

Preliminary Analysis of Differential Proteins of *Brassica napus* Leaves under Phosphorous Deficiency

YU Yong-fang*, ZHAO Dan-dan*, LI Yu-qin, NIU Yin-yin, TIAN Bao-ming, ZANG Xin**

(Bioengineering Department, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

Abstract: The proteome changes in the seedling leaves of Zhongyou 821 was investigated by 2-DE, which could lay the foundation for the molecule mechanism of the rapeseed endured low phosphor. The results showed that, analysed by 2-DE, PDQuest software, the remarkable difference points of the young plants treated with no enough phosphoric were 38, and 19 proteins were up-regulated, and the other 19 points were down-regulated, which revealed that many proteins invovled in the physiological process under phosphorous deficiency.

Key words: Rapeseed; Phosphorus deficiency; Two-dimensional gel electrophoresis; Proteomics; Differential protein expression

磷在植物生长发育和代谢中发挥着重要的作用, 但土壤中的磷多数为难以利用的固定态磷或有机磷; 特别是在酸性或碱性土壤中, 由于土壤的吸附作用、低溶解性以及磷在土壤中难以移动等因素, 造成土壤有效磷不足, 这成为我国乃至全世界农业生产中限制作物产量的一个重要因子^[1]。甘蓝型油菜对缺磷敏感, 缺磷会导致油菜产量和品质下降。为此, 人们大量施用磷肥, 致使土壤变成一个巨大的磷库^[2]。因此, 根据油菜自身的特性, 研究其对磷的高效利用日渐成为热点。

蛋白质组学技术是研究植物生长发育过程中各种因素诱导的蛋白质差异表达的有效方法。目前, 有关油菜等高等植物在磷胁迫下蛋白质组学的研究仅见少数报道, 如陆锦池等^[3]研究了缺磷条件下水稻根部蛋白质组, 发现有 3 类差异表达的蛋白, 其中包括与信号

转导相关的蛋白, 与生长相关的蛋白, 与化感物质代谢相关的蛋白。刘燕等^[4]研究了低磷胁迫下玉米根系的蛋白质组学, 发现缺磷时 6 个蛋白质上调表达。李坤朋等^[5]对玉米根系的蛋白质组变化进行系统分析发现, 低磷胁迫下差异表达的蛋白参与了碳代谢、次级代谢、能量代谢、蛋白质的合成及抗性防御等过程。

本研究以油菜品种中油 821 为材料, 利用优化的双向电泳程序, 找出磷胁迫下差异表达的蛋白质点, 进而为构建油菜耐低磷胁迫的蛋白质谱及后续开展的油菜抗低磷胁迫的特异蛋白基因的确定奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料和试验处理

选取油菜中油 821 (由郑州大学生物工程系田保明教授提供), 播种于育苗穴盘中, 蛭石和珍珠岩按 2 : 1

收稿日期: 2011-03-19

作者简介: 余永芳 (1985-), 女, 河南信阳人, 在读硕士研究生, 研究方向: 油菜生物学。E-mail: yuyongfang899@163.com

赵丹丹 (1985-), 女, 河南三门峡人, 在读硕士研究生, 研究方向: 油菜生物学。* 赵丹丹、余永芳为并列第一作者

** 通讯作者: 臧新 (1968-), 男, 河南驻马店人, 副教授, 博士, 主要从事植物细胞工程研究。E-mail: zangxin@zzu.edu.cn

©1994-2015 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

的比例混合。试验设对照(+P)和缺磷处理(-P), 每处理 2 个穴盘。将基质分别用完全营养液和缺磷营养液浇透, 然后挑取大小一致的种子进行播种。完全营养液(+P)的配方: 2mmol/L KNO₃, 3mmol/L CaCl₂, 1mmol/L K₂SO₄, 0.5mmol/L MgSO₄, 0.4mmol/L KH₂PO₄, 0.15mmol/L K₂HPO₄, 0.2mmol/L Fe-Na-EDTA, 14mmol/L H₃BO₃, 5mmol/L MnSO₄, 3mmol/L ZnSO₄, 0.7mmol/L (NH₄)₆ Mo₇O₂₄, 0.7mmol/L CuSO₄, 0.1mmol/L CoCl₂^[6]。缺磷营养液(-P): 去掉完全营养液中的 KH₂PO₄ 和 K₂HPO₄ 成分。营养液平均每 5 d 更换 1 次。油菜生长条件: 昼/夜温度为 25℃/15℃, 散光培养。

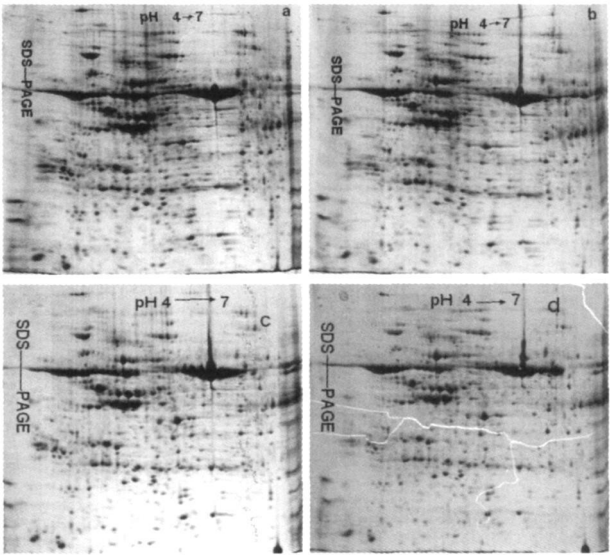
1.2 蛋白质双向电泳

取培养 30 d 的中油 821 第 1 片真叶, 用改良的 TCA/丙酮法提取叶片细胞总蛋白^[7]。蛋白质定量参照 Bradford 法^[8], 具体方法参照《生物化学实验原理和方法》^[9]。双向电泳参照甘露等^[10]的方法, 等电聚焦采用 pH4~7 的预制 IPG 胶条(长 17 cm)

进行; 电泳后凝胶图像用 PDQuest 8.0.1 软件进行分析, 选取主胶, 手动选择原始图像上的最大点和最弱点, 选择高斯模型, 去除背景, 运行自动斑点检测, 然后手动匹配斑点, 将所有斑点标准化, 分析凝胶之间的斑点表达差异, 得出最终的报告结果。

2 结果与分析

由图 1 分析可知, 中油 821 幼苗叶片在正常磷浓度下检测到 468 个蛋白点, 缺磷处理后检测到 432 个蛋白点。在本试验方法和条件的基础上, 使用 PDQuest 8.0.1 软件, 将图像裁剪成相同大小, 去除背景噪音, 建立试验组, 进行斑点自动检测和匹配, 初次匹配后, 对一些软件不能准确匹配的点进行手动校正, 最后建立分析组, 出最终报告。经软件分析后发现, 中油 821 幼苗叶片在缺磷处理后表达量发生显著上调(上调 2 倍)的蛋白质点有 19 个(表 1, 图 2), 发生显著下调(下调 2 倍)的蛋白质点有 19 个(表 2, 图 3)。



a、c 代表足磷条件下幼苗叶片的表达图谱; b、d 为缺磷处理 30 d 后幼苗叶片的表达图谱。每个样品上样 500μg, CBB G-250 染色

图 1 经缺磷、足磷处理 30 d 后油菜叶片蛋白双向电泳图谱

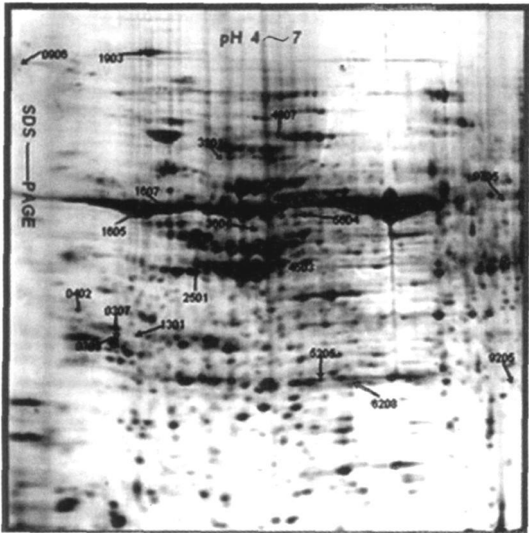
表 1 中油 821 叶片缺磷处理后蛋白表达量显著上调的蛋白质点及表达量

点编号	正常处理的表达量	缺磷处理 30 d 后的表达量	点编号	正常处理的表达量	缺磷处理 30 d 后的表达量
0307	1 162.0	2 623.2	3801	86.8	589.0
0309	252.2	876.9	4503	1 745.8	9 441.8
0402	1 334.2	2 948.7	4602	322.2	698.4
0906	317.6	675.9	4807	122.7	1 601.4
1301	605.1	2 144.5	5205	1 066.8	3 186.3
1605	4 815.2	11 551.3	5604	812.7	1 700.5
1607	6 449.1	22 027.9	6208	698.9	2 407.8
1903	4.8	602.2	9205	569.5	1 379.2
2501	1 386.1	4 216.2	9705	1 110.7	9 149.4
3604	318.1	782.1			

注: 表中表达量为 2 次双向电泳凝胶蛋白质表达量的平均值。下同

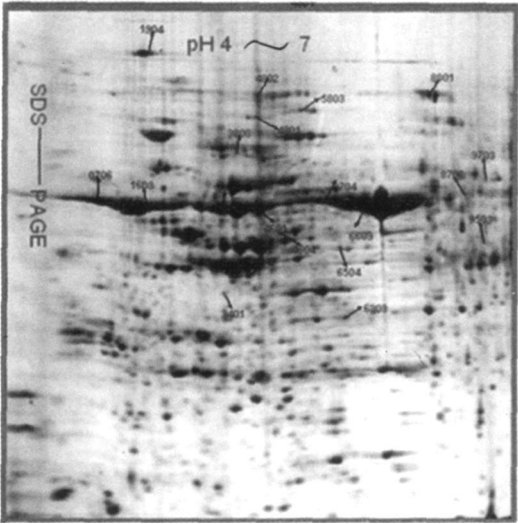
表 2 中油 821 叶片缺磷处理后蛋白表达量显著下调的蛋白质点及表达量

点编号	正常处理的 表达量	缺磷处理 30 d 后 的表达量	点编号	正常处理的 表达量	缺磷处理 30 d 后 的表达量
0706	17 704. 4	5 440. 2	5803	1 432. 6	421. 5
1608	1 996. 8	738. 6	6303	2 300. 8	1 062. 4
1904	1 423. 5	603. 0	6504	715. 2	262. 2
3401	692. 3	264. 4	6609	4 445. 9	655. 5
3601	15 038. 0	2 882. 0	6704	8 835. 6	2 395. 7
3808	1 124. 0	375. 0	8706	2 285. 8	905. 6
4601	14 529. 2	5 656. 9	8801	2 628. 0	866. 6
4604	2 863. 4	1 396. 7	9503	1 856. 0	771. 7
4801	2 275. 4	917. 7	9703	1 744. 8	723. 5
4802	4 537. 8	1 758. 3			



图中标箭头的点为缺磷处理后显著上调的蛋白质点

图 2 缺磷处理后油菜叶片蛋白表达量显著上调的蛋白质点



图中标箭头的点为缺磷处理后显著下调的蛋白质点

图 3 缺磷处理后油菜叶片蛋白表达量显著下调的蛋白质点

3 结论与讨论

本研究在甘露等^[10]已建立的甘蓝型油菜蛋白

双向电泳体系基础上发现, 缺磷处理 30 d 后油菜叶片蛋白有 38 个差异表达, 其中有 19 个表达量发生显著上调, 19 个发生显著下调, 在后续的试验中将选取部分点进行质谱鉴定, 从而为揭示油菜耐低磷胁迫的分子机制以及遗传性状的改良奠定基础。

双向电泳作为蛋白质组学的核心技术, 已被广泛用于模式动植物的研究, 包括样品制备、等电聚焦和 SDS-PAGE 等。样品制备是双向电泳中最基础的环节, 本研究在 TCA/丙酮法提取植物蛋白体系的基础上, 优化裂解液的配方, 降低了 Tris-HCl 的浓度, 适当提高 DTT 的浓度, 并延长了裂解的时间, 实践表明, 裂解时间的长短对提取的效果非常重要, 并且在接下来的试验中发现, 对提取的蛋白以干粉的形式保存能够有效防止蛋白质的裂解。通过前期工作发现, 油菜叶片总蛋白主要集中在 pH4 ~ 7 的梯度范围内, 因此, 本试验采用 pH4 ~ 7 的胶条 (长 17 cm), 提高了低丰度蛋白的分辨率。在等电聚焦中, 采用主动水化与被动水化相结合的步骤, 上样之后, 先室温被动水化 1 ~ 3 h, 再进行主动水化。主动水化可以促进大分子蛋白进入胶条, 但是同时会损失一部分小分子蛋白, 结果发现将主动水化与被动水化结合起来, 比单独使用主动水化的效果要好。在等电聚焦时, 稳定的高电压有助于蛋白点的迁移, 为了得到重复性好、分辨率高的双向电泳图谱, 本试验延长了低电压的电泳时间, 进行有效除盐, 另外也延长了聚焦的时间, 取得了较好的效果。胶条的平衡也是至关重要的一步, 本试验严格控制平衡的时间, 第 1 次平衡 15 min, 第 2 次 14 min 且应注意避光, 另外, 平衡后的胶条要先在 1× 电泳缓冲液中浸泡, 这样可以减少聚丙烯酰胺凝胶电泳时出现的纵条纹。最后对扫描后的凝胶进行干胶保存, 考虑到甘油保存的凝胶容易长菌, 因此, 干胶的全过程必须确保在无菌条件下进行。 (下转第 112 页)

10 d, 密度增加 1.5 万 ~ 3.0 万株/hm²。

3.3 加强田间管理

应早间苗早定苗、早追肥、预防病虫害。施肥应采取平衡配方施肥, 即 N、P₂O₅、K₂O 比例为 1 : (0.5 ~ 1) : 0.7, 即三元素复合肥 (N : P₂O₅ : K₂O = 15 : 15 : 15), 施肥量为 525 ~ 1050 kg/hm², 并在现蕾期可适当追施尿素 75 ~ 150 kg/hm²; 磷、钾肥全部作底肥, 氮肥 70% 作底肥, 30% 作追肥施于现蕾至始花期。加强病虫害综合防控, 在芝麻出苗前后可采取毒饵防治地老虎 (用敌百虫等药剂与炒香的麦麸混合田间撒施); 幼虫盛发期可用 48% 毒死蜱 (乐斯本) 乳油、20% 氯虫苯甲酰胺, 傍晚时喷药效果好。蚜虫为害初期要早喷洒 10% 吡虫啉可湿性粉剂 1500 倍液, 或 10% 烯啶虫胺 2500 倍液; 用 2.5% 高效氯氟氰菊酯 (功夫) 乳油 3000 倍液、5% 氟虫脲 (卡死克) 乳油 4000 倍液等防治棉铃虫、荚野螟、芝麻天蛾等害虫。对于芝麻病害, 可用 50% 多菌灵 500 倍液、70% 甲基硫菌灵 800 ~ 1000 倍液, 防治芝麻茎点枯病、枯萎病, 兼治多种真菌性叶部病害; 用 72% 农用硫酸链霉素 4000 倍液防治细菌性角斑病; 发现零星轻发病株时, 及时喷药防治, 拔除、销毁重病株^[4]。在生育后期及时排涝、防旱, 并喷施磷酸二氢钾、光合微肥、叶片保护剂等 1 ~ 2 次, 以养根护叶防早衰, 提高籽粒饱满度。

3.4 适期打顶和适当晚收

芝麻打顶可以提高叶片光能利用效率和水分利

用效率^[5], 适期打顶使产量构成因素更加合理, 表现出主茎果轴长延长、单株蒴数、蒴粒数、千粒重增加, 秕籽率下降, 从而提高品种产量和商品品质^[6-7]。郑黑芝麻 1 号春播应于 7 月底进行小打顶, 夏播则以立秋前后打顶为宜。收获一般以植株下部 2 ~ 3 个果节微裂时或植株中部呈现种子固有色泽时开始收获为宜; 收后应小捆架晒, 以防霉变, 以提高品种的商品品质。

参考文献:

- [1] 王鹏, 韩伟, 王文亮. 我国黑色食品的营养保健功能及开发前景 [J]. 现代农业科技, 2010(17): 359-362.
- [2] 沈梅. 黑芝麻和白芝麻中微量元素含量的比较研究 [J]. 中国卫生检验杂志, 2007, 17(12): 2309-2310.
- [3] 陈和兴, 刘凤兰, 赵应忠. 名特优黑芝麻新品种中芝 9 号的选育 [J]. 中国油料, 1994(4): 53-55.
- [4] 杨永东, 薛香云, 杨修身, 等. 河南省芝麻主要病害综合治理研究 [J]. 华北农学报, 1992, 7(1): 112-117.
- [5] 高桐梅, 卫双玲, 张海洋, 等. 打顶对芝麻不同叶位光合特性的影响研究 [J]. 中国油料作物学报, 2009, 31(4): 492-498.
- [6] 卫双玲, 高桐梅, 张海洋, 等. 不同时期打顶对不同地点夏芝麻产量、品质及光合特性的影响 [J]. 华北农学报, 2010, 25(4): 170-174.
- [7] 张明义, 张合记. 芝麻两次打顶高产栽培技术 [J]. 山西农业科学, 1990(7): 24-25.

(上接第 91 页)

参考文献:

- [1] 黄宇. 甘蓝型油菜酸性磷酸酶与磷营养关系的研究 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2007.
- [2] 郭玉春. 不同基因型水稻对磷胁迫的响应及分子机制的研究 [D]. 福州: 福建农林大学, 2005.
- [3] 陆锦池, 王海斌, 陈荣山, 等. 化感水稻 PI312777 响应低磷胁迫的差异蛋白质组学分析 [J]. 中国农学通报, 2009, 25(14): 148-152.
- [4] 刘燕. 根形态在玉米耐低磷中的作用及侧根发育的蛋白组学研究 [D]. 北京: 中国农业大学, 2006.
- [5] 李坤朋. 不同基因型玉米对磷胁迫的反应及根系蛋白质组学研究 [D]. 济南: 山东大学, 2007.
- [6] Desclos M, Dubousslet L, Etienne P, et al. A proteomic profiling approach to reveal a novel role of *Brassica*

napus drought 22 kD/ water-soluble chlorophyll-binding protein in young leaves during nitrogen remobilization induced by stressful conditions [J]. Plant Physiology, 2008, 147: 1830-1844.

- [7] Damerval C, De Vienne D, Zivy M, et al. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat seedling proteins [J]. Electrophoresis 1986, 7(1): 52-54.
- [8] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254.
- [9] 陈雅蕙, 陈来同, 余瑞元, 等. 生物化学实验原理和方法 [M]. 北京: 北京大学出版社, 2008.
- [10] 甘露, 李殿荣, 臧新, 等. 甘蓝型油菜蛋白双向电泳体系的建立 [J]. 作物学报, 2010, 36(4): 612-619.