

## 不同氮素水平下小黑麦旗叶蛋白质差异表达

李晶, 吉彪, 商文楠, 陈龙涛, 魏玲, 魏湜\*

东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030

**摘要:** 在不同氮素水平下, 研究小黑麦叶片蛋白质差异表达, 进行MALDI-TOF-MS和生物信息学分析。找到7个差异表达蛋白, 即与蛋白质合成和信号传导相关的蛋白、与清除自由基有关的酶、与叶绿体的发育和代谢有关蛋白、与植物碳代谢有关的酶、与氮素同化有关的酶。氮素对植物生长发育、物质代谢和信号传导影响全面, 从蛋白点的鉴定分析来看, 功能蛋白是其影响的重点。

**关键词:** 小黑麦; 差异表达; 双向电泳; 氮素

## Protein Differential Expression under Different Nitrogen Application Treatment in Triticale

LI Jing, JI Biao, SHANG Wen-Nan, CHEN Long-Tao, WEI Ling, WEI Shi\*

College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China

**Abstract:** Proteins differential expression under different nitrogen levels were analyzed in triticale. Seven differentially expressed proteins were found by MALDI-TOF-MS and bioinformatics analysis, including proteins related with protein synthesis and signal transduction, enzyme related with elimination of the free radical, proteins related with chloroplast growth and metabolism, enzyme related with carbon metabolism, and enzyme related with nitrogen assimilation. Nitrogen had overall effects on growth, substance metabolism and signal conduction of plant. Identification and analysis on protein spots showed that the emphasis of its influence was functional proteins.

**Key words:** triticale; differential expression; dimensional electrophoresis; nitrogen

蛋白双向电泳已成为蛋白质检测和分析的一种强有力的生化手段(孙一丁等 2008)。双向电泳技术在生物及非生物胁迫蛋白质组研究上应用较多, 在栽培措施引起的蛋白差异表达上还未见报道。氮素是植物营养中重要的不可缺少的营养元素, 其存在于植物体蛋白质的结构中。氮也是叶绿素的重要组分, 通过影响叶绿素的含量来影响作物的光合物质生产。氮是一些酶的组成部分, 参与植物的多种生化过程。增施氮肥能促进植株体内氮代谢, 成为作物产量提高的重要措施。本文设计了不同的氮素水平, 通过双向电泳技术, 旨在找出小黑麦叶片中与氮素代谢相关的蛋白点, 并鉴定这些蛋白点的生物功能, 以此探讨氮素对小黑麦叶片光合作用影响的分子遗传机制。这对于小黑麦蛋白质组学研究, 充分发挥小黑麦生产潜力具有理论和实践指导意义。

### 材料与方法

试验选用小黑麦(triticale)品种‘东农 5305’和

‘东农 96026’[小黑麦是由小麦属(*Triticum*)和黑麦属(*Secale*)物种经属间有性杂交和杂种染色体加倍而人工结合成的新物种, 其英文名称是由小麦属名的字头和黑麦属名的字尾组合而成, 1935年起已成为国际上的通用名称], 于2007~2008年在东北农业大学香坊实验实习基地进行。4月5日播种, 8月3日收获。设4个施氮水平: 0 ( $N_0$ )、75 ( $N_{75}$ )、150 ( $N_{150}$ )和 225  $kg \cdot hm^{-2}$  ( $N_{225}$ ), 3次重复, 8行区, 5 m 行长。种肥磷酸二铵 247  $kg \cdot hm^{-2}$  ( $P_2O_5$  113 kg)、氯化钾 190 kg ( $K_2O$  121 kg)和尿素总量的 1/2 与种子分层施下, 其余 1/2 尿素作为追肥于拔节期结合浇水开沟追施于土壤。苗期镇压一次, 其他管理措施同一般大田。

采用美国 Bio-Rad 公司等点聚焦系统、垂直板电泳系统; IPG 胶条及载体两性电解质购自 Bio-

收稿 2010-01-25 修定 2010-02-08

资助 黑龙江省农业委员会项目(GC05B708)。

\* 通讯作者(E-mail: weishi5608@163.com; Tel: 0451-55191599)。

Rad 公司, 分子试剂购自 Sigma 公司。

样品制备及蛋白质浓度测定: 参照 Damerval 等 (1986) 的方法提取旗叶总蛋白质并略有改动, 即 TCA/丙酮法: 于开花期取 3 g 小黑麦旗叶, 洗净吸干水分, 于冰浴的研钵中加入液氮研磨至细粉, 装入 10 mL 离心管中, 加入 5 倍体积 10% TCA-丙酮 (-20 °C 预冷、含 20 mmol·L<sup>-1</sup> 的 DTT), -20 °C 沉淀 1 h, 4 °C 12 000 r·min<sup>-1</sup> 离心 20 min, 沉淀悬浮于 5 mL 冷丙酮中, -20 °C 过夜, 离心去丙酮, 重复 3 次, 直到蛋白呈纯白色。蛋白用裂解缓冲液溶解, 参考 Bradford (1976) 的方法测定浓度。

第一向等电聚焦电泳 (IEF): 等电聚焦在 20 °C 下自动进行, 每胶条限流 50 μA, 参数为主动水化 50 V 14 h; 250 V 0.5 h; 1 000 V 1 h (快速); 8 000 V 4 h (线性); 72 000 V 1 h (快速); 500 V。

胶条平衡: 胶条先在平衡液 I (0.375 mol·L<sup>-1</sup> Tris-HCl pH 8.8, 6 mol·L<sup>-1</sup> 脲, 20% 甘油, 2% SDS, 2% DTT) 中于摇床平衡 15 min, 再在平衡液 II (2.5% 碘乙酰胺替换 2% DTT, 其余组分同平衡液 I) 中平衡 15 min。

第二向 SDS-PAGE: 封胶凝固后进行垂直电泳, 电流设定: 20 mA 40 min; 40 mA 6~7 h。

染色: 染色方法参考 Coomassie-G250 考染法 (Candiano 等 2004)。

统计分析: 与双向图谱的软件分析: 染色后凝胶用 UMAX Power Look 2100XL 扫描仪获取图像, 扫描参数设置为 256 阶灰度、300 dpi 透射扫描。扫描后的图像用 Bio-Rad 公司的 PDQuest 8.0.1 软件

分析处理, 同一个处理的 3 张胶组成一个重复组, 选择重复性好的差异表达蛋白质点进行质谱鉴定。

蛋白质点质谱分析及数据检索: 将切好的蛋白点做好标记和记录, 送至上海卓康生物公司进行酶解和 MALDI-TOF-MS 分析, 获得的蛋白质肽段质量数据在 <http://www.matrixscience.com> 中检索找到相匹配的蛋白, 得到的蛋白数据在 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>、<http://www.expasy.ch/sport/> 或 <http://predictome.bu.edu/> 等数据库中进行检索, 找到其相应功能及相关信息。

## 实验结果

### 1 小黑麦叶片蛋白质双向电泳 IPG 胶条筛选

预先制备小黑麦‘东农 5305’叶片蛋白质样品, 采用 pH 3~10 和 pH 4~7、17 cm 长的 IPG 胶条进行双向电泳。从图 1 中可以看出, 小黑麦叶片蛋白在 pH 3~10 的双向电泳图谱上主要集中在酸性区域, 右侧斑点较少, 中间斑点相对集中, pH 值范围分布为 3~7, 而碱性区域 pH 值 7~10 之间蛋白很少, 几乎没有明显可见的蛋白点, 说明小黑麦叶片蛋白大部分属于酸性蛋白; pH 4~7、17 cm 长的 IPG 胶条的双向电泳图谱清晰度高、蛋白点分布好。故在试验中选择 pH 4~7、17 cm 长的 IPG 胶条进行双向电泳。

### 2 小黑麦旗叶蛋白质的差异表达

如图 2 所示, 经对开花期小黑麦叶片氮含量测定的研究基础上选择开花期氮含量差异显著的 N<sub>0</sub> 和 N<sub>150</sub> 两处理, 每个处理制备 3 次, 经软件分析两

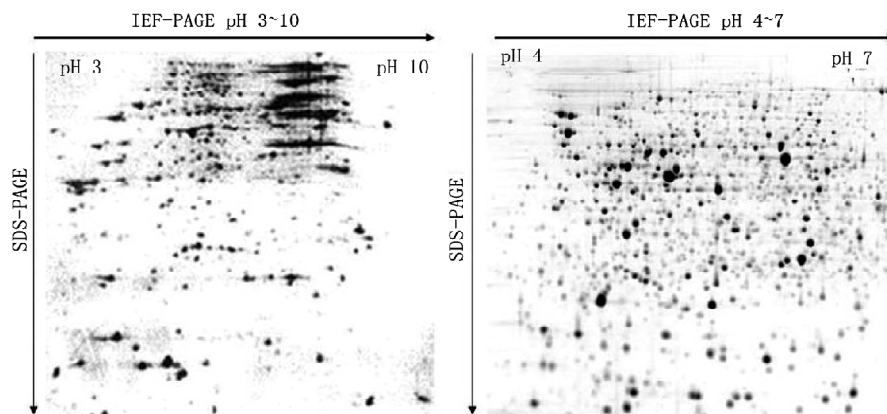


图 1 不同 pH 范围的小黑麦叶片蛋白双向电泳图谱

Fig. 1 2-DE maps of different pH ranges of triticale leaves proteins

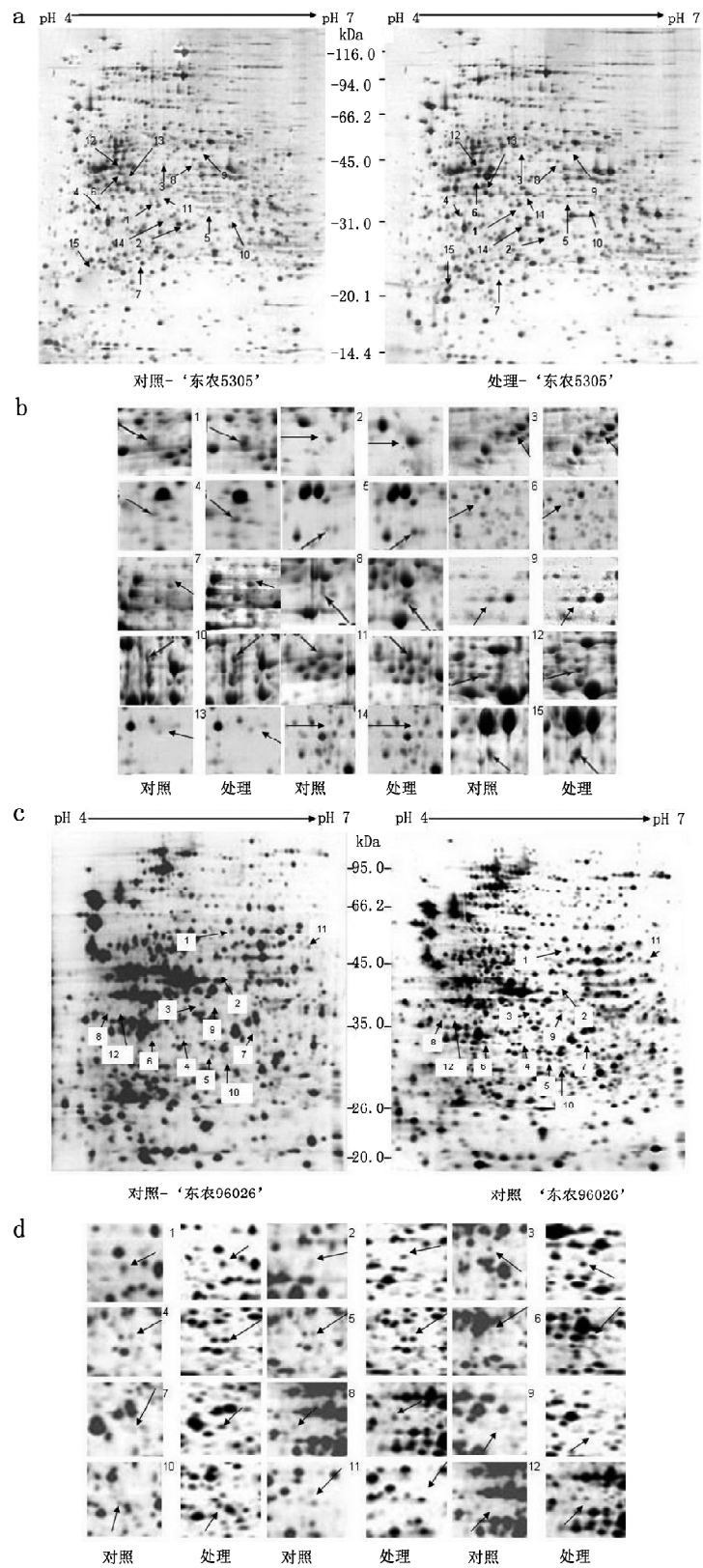


图2 不同处理旗叶蛋白质双向电泳图谱及表达量上调蛋白放大图片

Fig.2 2-DE maps and enlarged pictures which increased protein expression levels of flag leaf protein in different treatment

品种处理及对照蛋白图谱,并将蛋白表达量上调点图谱放大。经电泳图谱比较分析可知,‘东农5305’在等电点4~7、分子量14.4~116.0 kDa范围内,可识别约846个蛋白点,蛋白质大部分分布在分子量24~63 kDa、等电点4.3~6.2之间(图2-a),通过软件自动匹配,处理中出现了15个较对照表达量上调的蛋白点(图2-b)。(‘东农96026’在等电点4~7、分子量20~95 kDa范围内,可识别约843个蛋白点,蛋白质大部分分布在分子量28~62 kDa、等电点4.5~6.4之间(图2-c),通过软件自动匹配,处理中出现了12个较对照表达量上调的蛋白点,蛋白质点在2D胶上的重复性为:沿等电聚焦方向偏差为(3.39±0.24) mm ( $n=3$ ),沿SDS-PAGE方向偏差为(3.61±

0.36) mm ( $n=3$ ) (图2-d)。

### 3 差异表达蛋白质的质谱鉴定

选择显著上调表达(3倍以上)的7个差异蛋白质点进行MALDI-TOF-MS鉴定,旗叶差异表达蛋白质点的质谱鉴定结果见表1。基于质谱鉴定结果,可将鉴定出的7个叶片蛋白归为以下几类:(1)与蛋白质合成和信号传导相关的蛋白:生长调节蛋白和细胞质动力蛋白;(2)与清除自由基有关的酶:锰过氧化物歧化酶和抗坏血酸过氧化物酶;(3)与叶绿体的发育和代谢有关蛋白:叶绿体30S核糖体蛋白;(4)与植物碳代谢有关的酶:1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶大亚基;(5)与氮素同化有关的酶:谷氨酰胺合成酶。

表1 旗叶差异表达蛋白质点的质谱鉴定结果

Table 1 Identification of differential protein spots by ESI-Q MS/MS and database searching of flag leaf

蛋白点序号	待测蛋白的分子量	待测蛋白的等电点	鉴定的蛋白质
1	37.02	5.73	生长调节蛋白
2	49.84	5.72	锰过氧化物歧化酶
3	33.41	6.10	叶绿体30S核糖体蛋白
4	32.82	5.27	细胞质动力蛋白
5	31.34	5.66	抗坏血酸过氧化物酶
6	33.26	5.03	1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶
7	47.10	6.87	谷氨酰胺合成酶

序号中1、2、3分别来自‘东农5305’差异点中的5、9、10;序号中4、5、6、7分别来自‘东农96026’差异点中的4、5、6、11。

## 讨 论

生长调节蛋白可以刺激细胞的生物活性,调节植物生长发育,高表达的生长调节蛋白与烟草的生长发育相关(崔红等2008);细胞质动力蛋白,是信号传递过程中重要的酶,在植物生长发育和抗逆反应中起重要作用。本研究中生长调节蛋白和细胞质动力蛋白在施氮处理后,表达量上调,表明适当增加氮肥供应,促进了植物生长,同时植物叶片传递信号的动力来源充足,信号传递畅通,使植物抗逆性得到提高。

超氧化物歧化酶(SOD)是一种重要的金属抗氧化酶。根据辅基部位结合的不同分为四类:锰超氧化物歧化酶(Mn-SOD),铁超氧化物歧化酶(Fe-SOD),铜锌超氧化物歧化酶(Cu/Zn-SOD)和镍超氧化物歧化酶(Ni-SOD)。锰过氧化物歧化酶催化过

氧化物自由基歧化,使细胞免于被过氧化物自由基所破坏,具有抗衰老作用。小麦的氮素营养与其后期旗叶衰老密切相关,增施氮肥能够改善活性氧清除酶的代谢合成,维持较高的生理活性(李春喜等2002);对于易衰型棉花品种,适期适量增施氮肥,通过减轻细胞的膜质过氧化程度,在延缓衰老、改善叶片的光合特性中具有较重要的作用(张海娜等2008)。

抗坏血酸过氧化物酶是利用抗坏血酸为电子供体的H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>的清除剂,提高植物体内抗氧化酶活性和增强抗氧化代谢的水平是提高植物抗逆性的有效途径之一(孙卫红等2005)。APX能提高氧化耐受性的作用已在许多植物中有报道(Wang等2002)。大豆cAPXs研究中观察到,APX的转录、翻译和翻译后调控可能增强农作物抵抗环境胁迫的能力(Caldwell等1998)。本研究中N<sub>150</sub>处理小黑麦旗叶

清除自由基有关酶的高量表达表明适当增施氮肥有缓解叶片衰老, 延长光合功能的重要生理作用。

就高等植物而言, 叶绿体蛋白质数目占其蛋白质总数的10%~25% (Van Wijk 2000), 叶绿体的核糖体蛋白与叶绿体内的蛋白质合成有关, 叶绿体基质是光合碳同化和叶绿体内多种物质合成代谢的关键场所。利用2-DE结合质谱和Edman测序等技术鉴定出了菠菜叶绿体基质核糖体30S和50S亚基蛋白(Yamaguchi和Subramanlan 2000); 在河南与福建生态区烟叶中所鉴定出的差异蛋白中也发现30S核糖体蛋白(崔红等2008)。本研究中叶绿体核糖体蛋白的高表达, 也表明适当增施氮肥促进了蛋白质的合成和运转, 利于蛋白质含量提高, 这与施氮处理蛋白质含量高的结果相一致。

1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶是光合作用中决定碳同化速率的关键酶(Wang和Xun 2005)。施氮量增加, 植株将更多的叶氮投入到电子传递体和羧化系统中, 进一步优化了叶氮分配, 增加了电子传递和羧化能力, 与其具有较高的光合能力是一致的(雷鸣等2009)。本研究中施氮 $150\text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 较 $0\text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 的1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶表达量上调, 活性的能力增强, 这说明适当增施氮小黑麦的碳同化效率增加, 光合作用加强。这也与旗叶光合速率和叶绿素荧光参数的变化趋势一致。

GS是处于氮代谢中心的多功能酶, GS活性增强可提高细胞内多种氮代谢酶和部分糖代谢酶效应(Kleinhofs和Warner 1991; 黄勤妮等1995)。本试验中中氮水平( $N_{150}$ )下谷氨酰胺合成酶活性增加, 表达量上调, GS活性的提高, 可带动氮代谢途径运转增强, 促进氨基酸的合成和转化, 进一步验证了适当施氮可提高氮代谢运转能力。

### 参考文献

崔红, 冀浩, 张华, 邵惠芳, 李东宵, 陈亮(2008). 不同生态区烟草

- 叶片蛋白质组学的比较. 生态学报, 28 (10): 4874~4878
- 黄勤妮, 印莉萍, 柴小清, 刘祥林, 洪剑明, 赵微平(1995). 不同氮源对小麦幼苗谷氨酰胺合成酶的影响. 植物学报, 37 (11): 856~862
- 雷鸣, 李树云, 张石宝, 胡虹(2009). 氮素对红波罗花光合作用和生长的影响. 云南植物研究, 31 (1): 82~88
- 李春喜, 姜丽娜, 代西梅, 尚玉磊, 洪志霞(2002). 小麦氮素营养与后期衰老关系的研究. 麦类作物学报, 20 (2): 39~41
- 孙卫红, 王伟青, 孟庆伟(2005). 植物抗坏血酸过氧化物酶的作用机制、酶学及分子特性. 植物生理学通讯, 41 (2): 143~146
- 孙一丁, 章成, 黄兴奇, 王玲仙, 程在全(2008). 野生稻种子胚乳蛋白的提取及双向电泳条件的确立. 西南农业学报, 21 (2): 313~316
- 张海娜, 李存东, 肖凯(2008). 氮素对不同衰老特性棉花品种光合特性和细胞保护酶活性的影响. 华北农学报, 23 (5): 170~174
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities utilizing the principle of protein-dye binding. Anal Biochem, 72: 248~254
- Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri GM, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti PG (2004). Blue silver: a very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. Electrophoresis, 25: 1327~1333
- Caldwell CR, Turano FJ, McMahon MB (1998). Identification of two cytosolic ascorbate peroxidase cDNAs from soybean leaves and characterization of their products by functional expression in *E. coli*. Planta, 204: 120~126
- Damerval C, Vienne DD, Zivy M, Thiellement H (1986). Technical improvements in two dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat seedling proteins. Electrophoresis, 7: 52~54
- Kleinhofs A, Warner RL (1991). Advances in nitrogen assimilation. In: Mifflin BJ, Lea PJ (eds). Intermediary Nitrogen Metabolism. San Diego: Academic, 89~120
- Van Wijk KJ (2000). Proteomics of the chloroplast: experimentation and prediction. Trends Plant Sci, 5 (10): 420~425
- Wang Q, Xun CY (2005). Affects of nitrogen and phosphorus on plant leaf photosynthesis and carbon partitioning. Shandong Fores Sci Technol, 160: 59~62
- Wang W-Q, Li Bin, Meng Q-W, Zou Q (2002). The sequence of *Lycopersicon esculentum* thylakoid-bound ascorbate peroxidase gene *TiAPX*. J Plant Physiol Mol Biol, 28 (6): 491~492
- Yamaguchi K, Subramanlan A (2000). The plastid ribosomal proteins. Identification of all the proteins in the 30S subunit of an organelle ribosome (chloroplast). J Biol Chem, 275 (37): 28455~28465