

聚乙二醇胁迫下甘蔗根系蛋白质差异表达图谱分析*

周桂^{1,2,3,4} 邹成林¹ 丘立杭² 黄丽萍¹ 杨丽涛^{2,3,4} 李杨瑞^{2,3,4**}

1. 广西民族大学化学与生态工程学院, 南宁 530006;

2. 广西大学广西亚热带生物资源保护利用重点实验室, 南宁 530004;

3. 广西农业科学院广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室, 南宁 530007;

4. 中国农业科学院甘蔗研究中心, 南宁 530007

摘要 以甘蔗品种 ROC22 为材料, 采用含 100 g/L 聚乙二醇(PEG)6000 的 Hoagland 营养液模拟干旱胁迫处理, SDS-PAGE 电泳技术分析干旱胁迫对甘蔗幼苗根系蛋白质的影响。结果表明: 与对照相比, 24 h 胁迫过程中稳定存在的新增蛋白条带为 44.5 ku, 可能是应答干旱胁迫的主要新增调节蛋白; 57.1 和 29.0 ku 蛋白条带在 24 h 处理期间相对表达量变化活跃, 胁迫初期 57.1 ku 蛋白条带显著增加, 29.0 ku 蛋白条带显著下降, 胁迫过程中出现起伏变化; 而 62.7、40.4 与 48.2 ku 蛋白条带在 PEG 胁迫早期相当长时间保持稳定, 后期才出现显著增加与下降; PEG 胁迫 14 h 处理蛋白质条带变化最活跃, 新增蛋白分子质量为 44.5 ku; 消失蛋白分子质量为 25.5、18.9 ku; 而分子质量为 81.8、48.2、38.0、29.0 ku 的蛋白条带表达量下降。甘蔗根系蛋白质在响应 PEG 胁迫的基因表达调控中扮演重要角色, 其变化可能与甘蔗 PEG 胁迫密切相关。

关键词 甘蔗; 根系; 干旱胁迫; 胁迫蛋白质; SDS-PAGE

中图分类号 S 566.101 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2010)04-0408-05

广西是全国甘蔗主产区, 而广西的蔗区主要分布在旱坡地, 约 90% 蔗区基本无灌溉条件, 干旱严重影响甘蔗的生长发育。研究甘蔗干旱胁迫分子机制对了解甘蔗抗旱机理与抗性育种意义重大。

长期进化使高等植物拥有复杂而精细的信号感受和应答系统, 植物在逆境胁迫条件下, 感知环境胁迫压力信号, 并启动胁迫有关基因表达, 引起蛋白质代谢的变化并产生胁迫蛋白来适应环境^[1-4]。干旱诱导蛋白的研究也成为揭示植物适应干旱逆境基因表达机制的热点^[5-8]。干旱胁迫可以引起植物体内蛋白质的种类和数量的变化。干旱诱导蛋白具有时空表达差异性, 简便、快速筛查干旱诱导蛋白的差异表达谱, 将为利用蛋白质组学方法深入分离、鉴定干旱诱导相关蛋白奠定基础。本研究通过 SDS-PAGE 电泳分析法, 初步探讨聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)模拟干旱胁迫处理条件下新台糖 22 号(ROC22)甘蔗品种幼苗根系蛋白质的变化规律, 旨在获得有关甘蔗抗旱诱导蛋白差异表达相关

信息, 为甘蔗幼苗根系响应 PEG 胁迫的应答蛋白的快速筛查与深入研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

甘蔗 (*Saccharum officinarum* L.) 品种 ROC22, 组培苗温室大棚沙培育苗, 自然光照, 定期浇灌营养液, 当幼苗长至 4~6 片真叶, 茎高约 25 cm 时进行处理。

1.2 PEG 胁迫处理

参照文献[9], 采用含 100 g/L 聚乙二醇(PEG)6000 的 Hoagland 营养液培养甘蔗幼苗模拟干旱处理。将长势一致的甘蔗幼苗从沙基中取出, 用蒸馏水将根系冲洗干净并用滤纸吸干根系上粘附的水分, 再将幼苗根系放入盛有含 100 g/L PEG 6000 的 Hoagland 营养液的 15 cm×18 cm 圆形塑料桶中, 每桶盛装 2 L 营养液, 每桶 6 穴, 每穴 2 株幼苗。在 HP1000GS-B 人工气候箱中培养, 昼夜温度分别为

收稿日期: 2010-02-23; 修回日期: 2010-05-21

* 国家科技支撑计划项目(2007BAD30B03)、广西科技攻关重点项目(桂科攻 0782004-3)、广西科技攻关项目(桂科能 0815011)和现代农业产业技术体系建设专项(nycytx-024-01-15)资金资助

** 通讯作者. E-mail: liyr@gxaas.net

周桂, 女, 1969 年生, 博士研究生, 副教授. 研究方向: 植物生理与分子生物学. E-mail: zhouguix@sohu.com

30 ℃/20 ℃,相对湿度 75%,对照(CK)为 Hoagland 营养液培养。PEG 6000 处理后不同时间采集根样保存于-80 ℃低温冰箱备用,采样最长时间设定为 24 h,以保证 CK 在 Hoagland 营养液中保持稳定。

1.3 甘蔗根蛋白质的分离纯化与定量

采用 Tris-饱和酚法^[10]提取、纯化总蛋白,蛋白质定量参照文献^[11]方法进行。

1.4 甘蔗根系蛋白质的 SDS-PAGE 电泳

SDS-PAGE 电泳采用 4%的浓缩胶、12%分离胶,凝胶厚度为 1 mm,电极缓冲液为 Tris-甘氨酸(pH 8.3)系统。样品溶液按一定比例与上样缓冲液液振荡混匀,95 ℃加热 5 min 使蛋白质变性,离心 10 min 后取上清上样,上样量 20 μg,恒流模式(20 mA)电泳,电泳完毕采用考马斯亮蓝染色法进行染色。待充分染色观察到明显的条带时可终止染色。用 20%甲醇和 10%乙酸进行脱色,在此过程中不断更换脱色液,使胶面的底色全部脱掉,至条带清晰明朗而止。

1.5 甘蔗根系蛋白质的 SDS-PAGE 电泳图谱分析

脱色后的凝胶用台式凝胶扫描仪 GS-800 Calibrated Densitometer(BIO-RAD)进行数字化处理。扫描的参数为:分辨率 300 dpi,色彩为 256 灰阶。扫描图像与凝胶大小比例为 1:1。应用 Quantity One 软件对数字化凝胶图像进行处理与分析,根据标准蛋白分子质量来确定蛋白条带的表观分子质量,对每个条带的蛋白质进行定量分析。

2 结果与分析

2.1 PEG 胁迫下甘蔗根系蛋白质 SDS-PAGE 电泳图谱特异条带分析

图 1 为 PEG 胁迫不同时间段甘蔗根系蛋白质 SDS-PAGE 电泳图谱。从电泳图谱中可以观察到 PEG 胁迫引起了蛋白质电泳条带的变化。

经过 Quantity One 软件分析获得了 PEG 胁迫下甘蔗根系蛋白质特异性增减条带如表 1 所示。结果表明:甘蔗品种 ROC22 根系 Hoagland 营养液培养 24 h 保持稳定的对照(CK)SDS-PAGE 电泳泳道分离出 27 条带;PEG 胁迫处理后,随着 PEG 胁迫时间的延长,蛋白条带数目发生改变。PEG 胁迫早期蛋白条带数有所增加,2 h 处理新增条带为 52.7、44.5,5 h 处理新增条带为 118.9、109.7、52.7、14.3 ku;8 h 处理新增条带为 44.5、14.3 ku。

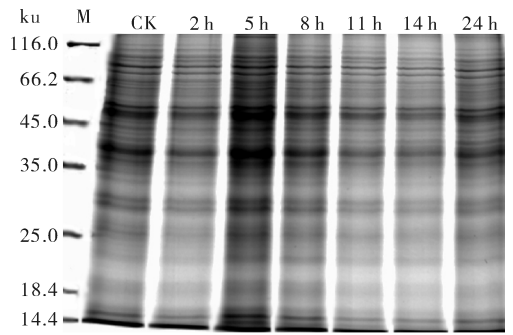


图 1 PEG 6000 胁迫下甘蔗品种 ROC22 根系蛋白质 12%分离胶 SDS-PAGE 电泳图谱

Fig.1 The SDS-PAGE protein profiles in roots of sugarcane cultivar ROC22 under PEG 6000 stress with 12% separating gels

11 h 后蛋白条带数有所减少。11 和 14 h 处理新增条带为 44.5 ku,消失条带为 25.5、18.9 ku;24 h 处理新增条带为 44.5 ku,消失条带为 65.1、41.8、25.5 ku。其中 5 h 处理新增条带最多,但在胁迫过程中并不稳定存在。24 h 胁迫处理过程中稳定存在的新增蛋白条带为 44.5 ku 蛋白,消失条带为 25.5 ku 蛋白。

表 1 PEG 胁迫下甘蔗根系蛋白质电泳图谱特异蛋白条带变化

Table 1 The changes of specific protein bands in electrophoretic pattern in roots of sugarcane under PEG 6000 stress

PEG 胁迫时间/h	蛋白质条带数	特异蛋白条带 The specific protein bands	
PEG stress time	The number of protein bands	新增蛋白分子质量/ku Molecular weight of new protein	消失蛋白分子质量/ku Molecular weight of disappeared protein
0	27		
2	29	52.7,44.5	
5	31	118.9,109.7,52.7,14.3	
8	29	44.5,14.3	
11	26	44.5	25.5,18.9
14	26	44.5	25.5,18.9
24	25	44.5	25.5,41.8,65.1

2.2 PEG 胁迫强度对甘蔗根系蛋白质组分相对含量的影响

PEG 胁迫不仅引起甘蔗根系中蛋白质条带的增减变化,而且出现蛋白质表达量的改变。随着胁迫时间延长,胁迫强度增大,甘蔗根系中有 6 种蛋白表达量发生了明显的变化,而其他蛋白质没有发生明显的变化。这 6 种蛋白表达量随 PEG 胁迫时间发生的变化如表 2 所示。从表 2 可知,随着胁迫时间的延长、胁迫强度的增大,与对照相比,甘蔗根系 62.7、48.2、40.4 ku 蛋白条带在 PEG 胁迫早期相当长时间保持稳定,无显著性差异,后期才出现显著

变化,其中 62.7 ku 蛋白条带 24 h 相对含量显著提高到对照的 2.5 倍,40.4 ku 蛋白条带相对含量显著提高到对照的 1.6 倍,48.2 ku 蛋白条带 14 h 处理相对含量显著下降 ($P < 0.05$),下降到对照的 34.9%;57.1 ku 蛋白条带与 29.0 ku 蛋白条带在 24 h 处理期间变化活跃,其中 57.1 ku 蛋白条带

胁迫 5 h 相对含量显著增加 ($P < 0.05$),5 h 处理表达量最高,达到对照的 2.2 倍;11 h 下降至对照水平 ($P > 0.05$);29.0 ku 蛋白条带在胁迫开始的 2 h 就显著下降 ($P < 0.05$),随后 5 h 显著增加,11 h 与 14 h 又显著下降 ($P < 0.05$),24 h 再上升到对照水平。

表 2 PEG 胁迫对甘蔗根蛋白质组分相对含量的影响

Table 2 Effect of PEG stress on relative content of protein components in sugarcane roots

PEG 胁迫时间 PEG stress time/h	蛋白质相对含量 Relative content of protein				
	62.7 ku	57.1 ku	48.2 ku	40.4 ku	29.0 ku
0	1.32±0.20 b	1.60±0.23 b	8.94±0.40 a	2.62±0.38 b	4.70±0.27 a
2	1.21±0.24 b	2.45±0.30 b	7.20±0.60 ab	2.15±0.42 b	2.62±0.04 b
5	0.93±0.08 b	3.52±0.30 a	8.11±0.23 a	2.36±0.20 b	3.99±0.34 a
8	0.90±0.14 b	2.59±0.38 ab	7.17±0.66 ab	2.58±0.38 b	3.56±0.52 ab
11	1.10±0.30 b	1.82±0.39 b	7.07±0.91 ab	2.23±0.31 b	2.64±0.39 b
14	1.04±0.25 b	2.57±0.29 ab	3.12±0.54 c	2.62±0.28 b	2.45±0.33 b
24	3.24±0.49 a	2.22±0.25 b	5.49±0.53 b	4.19±0.21 a	4.21±0.35 a

2.3 PEG 胁迫下甘蔗根系蛋白质电泳条带相似性分析

由 SDS-PAGE 电泳图谱列相似性分析(图 2)可知:与对照(CK)相比,2、5、8、11、14、24 h 处理甘蔗根系蛋白条带的列相似性比值分别为 87.9%、84.0%、86.3%、87.6%、75.9%、77.1%;其中 14 h 处理列相似性比值最小,也就是蛋白条带变化最大,24 h 处理列相似性比值次之;而处理早期的 2~

11 h 期间,列相似性比值相差不大,表明早期胁迫期间,蛋白质变化差别不大;表明 14 h 处理蛋白质变化最活跃。

2.4 PEG 胁迫处理 14 h 甘蔗根系蛋白质组分差异表达分析

由以上分析已知,PEG 胁迫 14 h 为甘蔗根系蛋白质变化最活跃期,不仅发生了蛋白质条带的增减变化,而且出现蛋白质表达量的改变。

从 PEG 胁迫 14 h 下甘蔗品种 ROC22 根系蛋白质电泳条带的光密度分布曲线(图 3)观察,蛋白条带波形图基本一致,主要是蛋白表达量的改变。其中表达量显著下降的蛋白条带分子质量为 81.8、48.2、38.0、29.0 ku。

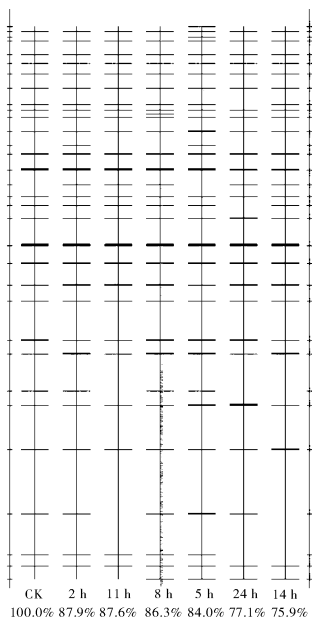


图 2 PEG 胁迫下甘蔗品种 ROC22 根系蛋白质 SDS-PAGE 图谱相似性

Fig. 2 The similarity of SDS-PAGE protein patterns in roots of sugarcane cultivar ROC22 under PEG stress

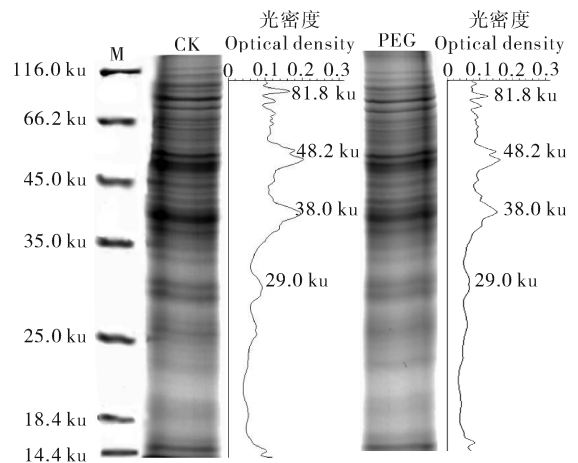


图 3 PEG 胁迫 14 h 下甘蔗根系蛋白质组分差异表达分析
Fig. 3 Analysis on the differential expression of protein components in roots of sugarcane

3 讨论

植物在干旱胁迫下产生的干旱诱导蛋白因品种、组织器官、干旱胁迫强度不同以及生长发育时期不同等而表现出不同的变化规律,并发挥着不同的作用^[6,12-13]。本研究结果说明随着干旱胁迫时间的延长与胁迫强度的增大,甘蔗品种 ROC22 根系 PEG 胁迫响应蛋白出现增与减的动态变化。

Mohammadkhani 等^[14]采用 SDS-PAGE 电泳分离技术报道干旱胁迫对 2 个玉米品种可溶性蛋白质组成与种类的影响,指出玉米根系中 38、50、57、65 ku 蛋白和 15、17、20、27、30、37、54、59 ku 叶蛋白在干旱胁迫中表达量增加,干旱胁迫诱导产生 15、19、27 ku 根蛋白和 22 ku 叶蛋白。Purty 等^[15]报道田菁属植物干旱胁迫 16 h,新产生 198、121、66、60、54、40 ku 蛋白,24 h 20 ku 蛋白增加。Beltranol 等^[16]报道小麦水分胁迫下新产生了 108.5 ku、84.8 ku 和 63 ku 蛋白。前人研究结果表明干旱诱导产生的新蛋白以及发生蛋白表达量增减改变的主要是一些小分子蛋白为主。本研究采用 SDS-PAGE 电泳分离技术观察到在 PEG 胁迫处理 24 h 内,甘蔗品种 ROC22 根系干旱诱导产生的新蛋白以及主要的蛋白质组分的动态变化也以小分子蛋白为主,这将为后期蛋白质分离提供依据。

甘蔗品种 ROC22 根系 PEG 胁迫各时间段均有新增蛋白,但 24 h 胁迫过程中稳定存在的新增蛋白条带为 44.5 ku 蛋白,其可能是甘蔗品种 ROC22 根系应答干旱胁迫的主要新增调节蛋白。

除了诱导产生新蛋白外,甘蔗品种 ROC22 根系更主要通过蛋白质组分相对含量的动态变化来应答干旱胁迫。PEG 胁迫 24 h 过程中观察到 62.7、40.4 与 48.2 ku 蛋白条带在胁迫处理前期相当长时间保持稳定,到胁迫后期 62.7 和 40.4 ku 蛋白条带相对含量才显著提高,48.2 ku 蛋白条带胁迫后期相对含量才显著下降,它们可能是参与干旱胁迫保护机制相关的蛋白,在轻度胁迫时保持稳定,重度胁迫时才被降解破坏。

而 57.1 和 29.0 ku 蛋白条带在 24 h 处理期间相对表达量变化活跃,胁迫初期相对含量就分别出现显著增加与下降,胁迫过程中出现起伏变化,说明 57.1 和 29.0 ku 蛋白条带可能通过表达量的动态变化参与甘蔗根系应答干旱胁迫。

处理 24 h 期间,以处理后 14 h 蛋白质变化最

活跃,既有新增蛋白条带(44.5 ku)和消失条带(25.5、18.9 ku),又有表达量显著下降的蛋白条带(81.8、48.2、38.0、29.0 ku)。

以上研究结果表明:甘蔗根系通过新增蛋白、蛋白质降解消失以及相对含量变化等参与响应 PEG 胁迫的基因表达调控。SDS-PAGE 快速、简便筛查出甘蔗根系响应 PEG 胁迫的蛋白质差异表达基本信息,可为后续采用蛋白质组学方法深入分离、鉴定干旱诱导相关蛋白奠定基础。

参 考 文 献

- [1] BRANDAZZA A, ANGELI S, TEGONI M, et al. Plant stress proteins of the thaumatin-like family discovered in animals[J]. FEBS Lett, 2004, 572(1/2/3): 3-7.
- [2] KOVACS D, KALMAR E, TOROK Z, et al. Chaperone activity of ERD10 and ERD14, two disordered stress-related plant proteins[J]. Plant Physiol, 2008, 147(1): 381-390.
- [3] LUBARETZ O, ZUR-NIEDEN U. Accumulation of plant small heat-stress proteins in storage organs[J]. Planta, 2002, 215(2): 220-228.
- [4] 杨国正, 张秀如, 孙湘宁, 等. 棉花热激蛋白产生规律的初步研究[J]. 华中农业大学学报, 1997, 16(1): 18-24.
- [5] GOLDGUR Y, ROM S, GHIRLANDO R, et al. Desiccation and zinc binding induce transition of tomato abscisic acid stress ripening: 1. a water stress- and salt stress-regulated plant-specific protein, from unfolded to folded state[J]. Plant Physiol, 2007, 143(2): 617-628.
- [6] PANDEY D M, WU R Z, HAHN E J, et al. Drought effect on electrophoretic protein pattern of *Anoectochilus formosanus* [J]. Scientia Horticulturae, 2005, 168: 161-166.
- [7] PAYET N, AVELANGE-MACHEREL M H, MACHEREL D. Structure and function of a mitochondrial late embryogenesis abundant protein are revealed by desiccation[J]. Plant Cell, 2007, 19(5): 1580-1589.
- [8] SHARMA A D, VASUDEVA R, KAUR R. Expression of a boiling-stable protein (BsCyp) in response to heat shock, drought and ABA treatments in sorghum bicolor[J]. Plant Growth Regulation, 2006, 50(2/3): 249-254.
- [9] 周桂, 李杨瑞, 杨丽涛, 等. 乙烯利对聚乙二醇胁迫下甘蔗叶类黄酮及相关酶活性的影响[J]. 华中农业大学学报, 2009, 28(4): 404-408.
- [10] ZHOU G, YANG L T, LI Y R. SDS-PAGE protein profile of sugarcane plantlets under drought stress conditions[C]//LI Y R, NASR M I, SOLOMON S, et al. Proceedings of the International Conference IS-2008, Al Arish, Egypt, September 11-14, 2008. Cairo: Engineering House Press Co, 2008: 472-475.
- [11] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of proteins using the princi-

- ple of protein-dye binding [J]. *Ana Biochem*, 1976, 72: 248-254.
- [12] LOBATO A K S, OLIVEIRA-NETO C F, COSTA R C L, et al. Biochemical and physiological behavior of *Vigna unguiculata* (L.) Walp. under water stress during the vegetative phase [J]. *Asian J Plant Sci*, 2008(7): 44-49.
- [13] OOSTHUIZEN I B, SNYMAN H A, PRETORIUS J C. Protein concentration in response to water stress in *Themeda triandra* Forsk [J]. *South African Journal of Plant and Soil*, 2006, 23(1): 43-48.
- [14] MOHAMMADKHANI N, HEIDARI R. Effects of drought stress on soluble proteins in two maize varieties [J]. *Turk J Biol*, 2008, 32: 23-30.
- [15] PURTY R S, AGRAWAL V, GUPTA S C. Induction of a novel boiling stable protein in response to desiccation and ABA treatments in *Sesbania sesban* var. bicolour leaves [J]. *Biol Plant*, 2005, 49: 137-140.
- [16] BELTRANO J, RONCO M, ARANGO M C. Soil drying and rewatering applied at three grain developmental stages affect differentially growth and grain protein deposition in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Braz J Plant Physiol*, 2006, 18: 341-350.

Differential Expression Profile of Proteins in Sugarcane Roots under PEG Stress

ZHOU Gui^{1,2,3,4} ZOU Cheng-lin¹ QIU Li-hang²
HUANG Li-ping¹ YANG Li-tao^{2,3,4} LI Yang-rui^{2,3,4}

1. *Chemistry and Ecological Engineering College, Guangxi Nationality University, Nanning 530006, China;*

2. *Guangxi Key Laboratory of Subtropical Bioresources Conservation and Utilization, Guangxi University, Nanning 530004, China;*

3. *Guangxi Crop Genetic Improvement and Biotechnology Laboratory, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China;*

4. *Sugarcane Research Center of Chinese Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China*

Abstract The pattern changes of SDS-PAGE protein in sugarcane roots subjected to water stress condition were studied. The sugarcane cultivar ROC22 was used as the plant material and treated with nutrient solution containing 100 g/L polyethylene glycol 6000 (PEG 6000) for simulating drought stress. The proteins were isolated from different samples by SDS-PAGE. The results revealed that a new 44.5 ku protein band was appeared stably during 24 h PEG stress, which may be the main regulatory protein responding to water stress. The relative content of 57.1 ku and 29.0 ku protein bands changed actively during 24 h PEG stress, the former increased and the latter decreased markedly at the early PEG stress stage. The relative contents of the 62.7, 48.2 and 40.4 ku proteins remained unchanged for a long time at the late PEG stress stage. The most active changes of the protein bands were found at 14 h PEG stress, and a new protein band of 44.5 ku appeared, the 25.5 and 18.9 ku protein bands disappeared while the 81.8, 48.2, 38.0 and 29.0 ku protein bands declined markedly in roots at the same time. The proteins might play an important role in gene expression and regulation in roots of sugarcane, and its changes could be correlated with the PEG stress.

Key words sugarcane; roots; drought stress; stress proteins; SDS-PAGE