

黄萎病菌胁迫条件下棉花叶片的蛋白质组分析

王 雪, 马 骏, 张桂寅, 李喜焕, 王省芬*, 马峙英*

(河北农业大学/河北省作物种质资源重点实验室, 河北保定 071001)

摘要:以陆地棉低酚棉品种豫无 620 为材料,在接种黄萎病菌后 24 h、48 h 和 72 h 提取叶片蛋白质,采用双向电泳技术研究棉花在黄萎病菌胁迫条件下叶片蛋白质组的变化。结果表明,棉苗在黄萎病菌胁迫下,24 h、48 h 和 72 h 三个时间的叶片蛋白质图谱与未接种对照组均存在显著差异,病菌胁迫下的棉苗叶片被诱导产生大量新的蛋白质,而且在三个时间均出现了 DB1、DB2 和 DB3 差异蛋白点。通过 MALDI-TOF-MS 分析和数据库检索,发现 DB1、DB2 和 DB3 分别与 DEAD/H box RNA helicase、丝氨酸蛋白酶抑制剂和 ODR-3 蛋白具有 70%、42% 和 85% 的同源性,推测这些蛋白可能在棉花对黄萎病的抗性反应中发挥作用。

关键词:棉花;蛋白质组;黄萎病;双向电泳;生物质谱

中图分类号:S562.032 **文献标识码:**A

文章编号:1002-7807(2007)04-0273-06

Proteomic Analysis of Cotton Leaf under *Verticillium dahliae* Stress

WANG Xue, MA Jun, ZHANG Gui-yin, LI Xi-huan, WANG Xing-fen*, MA Zhi-ying*

(Agricultural University of Hebei, Key Laboratory of Crop Germplasm Resources of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract: The interaction between cotton and *Verticillium dahliae* is a field of importance in molecular biology of plant disease resistance. However, there is no report on proteome of cotton under *Verticillium dahliae* stress. Two-dimensional electrophoresis was employed to analyze the proteome from leaves of cotton glandless variety Yuwu 620 at 24 h, 48 h and 72 h, after inoculating *Verticillium dahliae*. The results showed that there were significant differences between inoculated plants and control in the proteomic map. After infection of the pathogen, a lot of new proteins were induced to express in the cotton seedlings. At the time of 24 h past inoculation, 88 new proteins were detected, and at 48 h and 72 h, 97 and 101 proteins appeared, respectively. Besides, some of proteins showed intensity differences between inoculated plants and control. Three spots, DB1, DB2 and DB3, were all detected at three stages post inoculation. Analyzing via MALDI-TOF-MS and Mascot software, the three differential expression proteins were partly homologous to DEAD/H box RNA helicase (at 70%), serine proteinase inhibitor (40%) and ODR-3 protein (85%), respectively. The protein spot DB1 might have NBS domain and have important function in signal transduction pathway and the immune regulation of host. DB2 belonged to potato proteinase inhibitor I family. It would accumulate in plant as plant was infected by microbes, and could inhibit the proteolytic enzymes of pathogens. DB3 belonged to a subunit of G protein. This protein might combine with receptor to activate some signal transduction pathway. It is likely that they play an important role in the resistance responses to *Verticillium dahliae*.

Key words: cotton; proteome; *Verticillium wilt*; two-dimensional electrophoresis; bio-mass spectrometry

收稿日期:2006-08-16 作者简介:王雪(1979-),女,硕士;*通讯作者,cotton@hebau.edu.cn

基金项目:国家重大基础研究前期研究专项(2004CCA01100),国家自然科学基金(30471105),教育部高等学校博士学科点专项科研基金(20040086002),河北省自然科学基金(C2004000365)

基因表达的最终产物是蛋白质。植物在不同阶段和环境条件下都会有不同的基因表达,因此也就会有不同的蛋白质产生。随着蛋白质组技术的发展和不断完善,对植物蛋白质组的研究越来越深入^[1]。在蛋白质组研究技术中,目前较常用的是双向电泳和生物质谱技术。双向电泳技术是等电聚焦电泳和聚丙烯酰胺凝胶电泳的结合,可同时将蛋白质从等电点和分子量两个方向分开,是目前分辨率较高的蛋白质分离技术,通过此方法对蛋白质组分进行分离后即可利用生物质谱技术对其进行鉴定。蛋白质组研究已涉及水稻、玉米、小麦等多种植物,对这些植物的抗病、抗逆、品质等方面的蛋白质组研究已取得一定的进展。朱友林等^[2]研究了水稻抗、感白叶枯病近等基因系在接种病菌后的蛋白质表达,发现两个差异表达的蛋白点与抗病反应有关。霍晨敏等^[3]对小麦耐盐突变体盐胁迫下的蛋白质组进行分析,发现了5个差异蛋白,认为这些蛋白可能在盐胁迫下对维持叶绿体及整个细胞的功能起重要作用。在棉花中, Franklin 等^[4]利用双向电泳技术对棉花接种根结线虫后的蛋白质差异表达进行研究,发现一个可能与根结线虫抗性反应相关的蛋白。

黄萎病是危害棉花的重要病害之一。目前已有很多有关棉花黄萎病研究的报道,涉及到黄萎病菌的侵染机制^[5-6]、棉花对黄萎病的抗性反应^[7-8]、棉花抗性的生化机制^[9-10]和抗黄萎病的分子生物学^[11-13]等方面。但在黄萎病菌胁迫条件下,有关棉花蛋白质组的研究未见报道。本研究拟采用双向电泳和生物质谱技术,研究黄萎病菌胁迫下棉花叶片蛋白质组的变化,分析棉花蛋白质组水平上的抗性基因表达,为棉花抗病性选择和抗黄萎病基因克隆提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 供试材料

供试品种为陆地棉(*Gossypium hirsutum*)低酚品种豫无 620,接种用的黄萎病菌系分离于海岛棉抗病品种 Pima90-53,经鉴定属于强致病力菌系。均由河北农业大学棉花遗传育种研究室提供。

1.2 试验方法

1.2.1 棉苗培育与病菌接种。取豫无 620 的种子,用凉水在室温下浸种 8 h, 25℃催芽 12 h。将发芽整齐的种子种于装有蛭石的塑料营养钵中,在昼温为 25~30℃,夜温为 15~20℃的条件下培

养棉苗。采用王省芬等^[14]底部定量注菌液法接种。待棉苗长至二叶一心时接种黄萎病菌,将孢子悬浮液从底部注入营养钵中。接种后的棉苗置于人工培养室内培养(光照 12 h,光强 6000~7000 lx,昼温 25~26℃,夜温 20~22℃),用空气加湿器调控湿度,定期浇 Hoagland 营养液。

1.2.2 棉花叶片全蛋白的提取。在棉苗接种黄萎病菌后的 24 h、48 h、72 h 三个时间段,分别提取接种和未接种对照棉苗的叶片全蛋白。具体步骤为:取棉花叶片 1 g,在液氮中研磨成粉末,转入 10 mL 离心管中,加入 4 mL 提取缓冲液 I(10%三氯乙酸、0.07%β-巯基乙醇的冷丙酮溶液),振荡混匀,在 -20℃静置 1 h, 4℃下 10000 r·min⁻¹离心 20 min,弃去上清液。加入 4 mL 提取缓冲液 II(0.07%β-巯基乙醇的冷丙酮溶液),振荡混匀,在 -20℃静置 1 h, 4℃下 10000 r·min⁻¹离心 20 min,弃去上清液,重复此步骤 2 次。用冷丙酮清洗沉淀,所得沉淀物在 -20℃下干燥, -70℃保存备用。

1.2.3 固相 pH 梯度等电聚焦电泳(IEF)和第二向垂直板 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。取低温保存的蛋白质样品干粉 20 mg 与 1 mL 水化液混合,振荡混匀, 4℃下放置 20 h, 4℃下 12000 r·min⁻¹离心 15 min,吸取上清液,用 Bradford 法测定蛋白质浓度。采用主动水化进行第一向等电聚焦电泳,上样量为 300 μL。电泳程序为:50 V, 12 h; 250 V, 30 min; 1000 V, 1 h; 10000 V, 5 h; 10000 V 聚焦到 60000 Vh(volt-hours)。电泳结束后取出胶条,进行平衡。第一步在平衡缓冲液母液中加入 2%的 DTT,平衡时间为 20 min;第二步在母液中加入 2.5%的碘乙酰胺,平衡时间为 25 min,平衡后的胶条即可进行第二向电泳。

采用 T=12%、C=2.6%的均一胶进行电泳。先在 15 mA 稳流条件下电泳 30 min,再在 25 mA 稳流条件下进行,直至溴酚蓝指示剂到达凝胶底部时停止电泳。第二向电泳结束后,将胶放置于考马斯亮蓝 R-250 染色液中,振荡染色过夜。倒掉染色液,加入脱色液,继续在摇床上振荡脱色,每隔 30 min 换一次脱色液,直至背景透明。

1.2.4 凝胶扫描和图像分析。考马斯亮蓝显色后的胶片通过上海中晶科技有限公司生产的 ScanMarker8700 电泳扫描分析系统获取图像,用 PDQuest7.3.1 图像分析软件处理图像,对图像进行格式调整、背景消减、斑点检测、胶图匹配等。

1.2.5 质谱分析及数据分析和对比。通过胶图匹配后找到差异点,剪去尖端约 1 cm 的 100 μ L 吸头从胶片上挖出差异表达的蛋白点,然后放入 1.5 mL 离心管中,记录并编号,送至北京华大基因中心蛋白质平台进行质谱分析。所使用质谱仪为 Bruker Autoflex, N2 激光器(发射波长 337 nm),加速电压 20 kV。将质谱数据与 NCBI 的蛋白质数据库进行比对,获取差异表达蛋白质的相关信息。

2 结果与分析

2.1 黄萎病菌胁迫下棉花叶片蛋白质组双向电泳图谱分析

分别取接种黄萎病菌后 24 h、48 h、72 h 三个时间段的棉花叶片全蛋白,经过双向电泳和考马斯亮蓝染色,获得蛋白质图谱。

通过比较接种后的叶片全蛋白双向电泳图谱和对照的电泳图谱,发现在接种黄萎病菌后,表达

的蛋白质点数明显增多,且在部分蛋白质的表达量上也存在着差异。经过胶图匹配,在接种后 24 h 的图谱中找到了 88 个差异表达的蛋白点(图 1)。在接种后 48 h,蛋白点的数目同样比对照明显增多,找到了 97 个差异表达的蛋白点。接种后 72 h 所表达的蛋白点数目也较对照增加很多,找到了 101 个差异表达的蛋白点。从图 2 中可以看出,碱性端蛋白点较少,大部分蛋白点集中在酸性端。另外,在胶的部分区域蛋白质表达量也有所变化,例如图 2 中的 A 区域,在黄萎病菌胁迫下,该位置的蛋白质表达量明显增大。

2.2 差异蛋白点的 MALDI-TOF-MS 分析

经过胶图匹配,在接种后三个时间段均有不同数目的差异蛋白表达。对三个时间段的差异蛋白点进行比较,找到 3 个在三个时间段均有表达的差异蛋白点(图 3)。将 3 个差异蛋白点从凝胶上挖出,进行 MALDI-TOF-MS 分析,获得蛋白质的肽指纹图谱(图 4)。

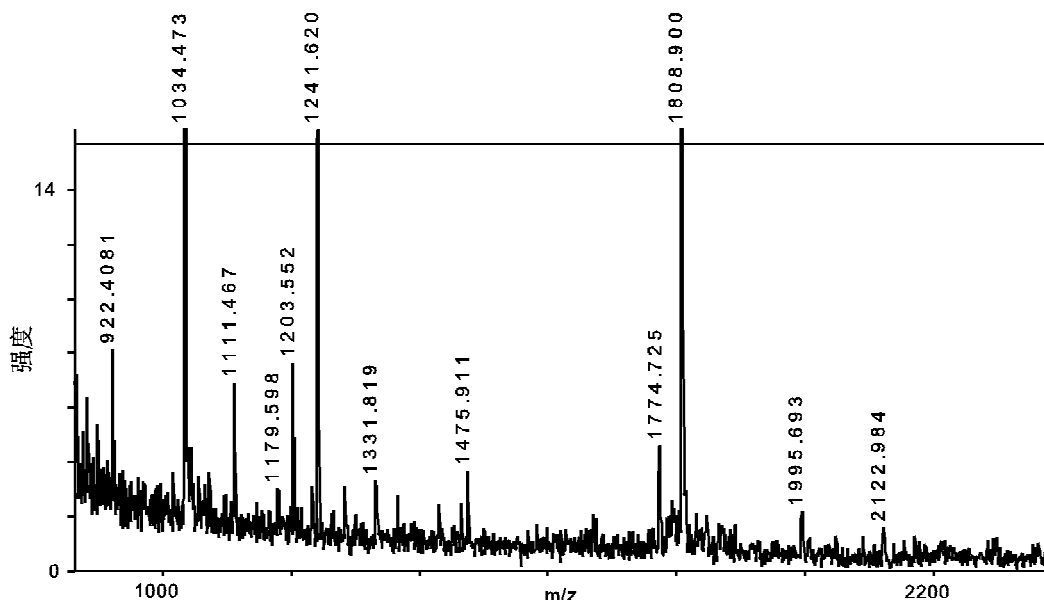


图 4 差异点 DB2 的部分肽指纹图谱

Fig. 4 Part of peptide mass fingerprinting of differential protein spot DB2

2.3 差异表达蛋白质比对结果分析

将肽指纹图谱数据用 Matrixscience 的 Mascot 软件搜索 NCBI 蛋白质数据库,找到 3 个与差异点匹配的蛋白,并将结果用 BLASTx 与基因数据库进行比对。通过将差异蛋白点质谱分析后所得的肽指纹图谱与 NCBI 的蛋白质数据进行同源性比较,结果发现:蛋白点 DB1 与水稻中的 DEAD/H 盒 RNA 解旋酶(DEAD/H box RNA helicase)具有同源性,同源性达 70%,分析此蛋白

属于 RNA 解旋酶家族。此蛋白可能含有 NBS 结合域,在寄主和病原菌互作的信号传导过程中起至关重要的作用,且对宿主的免疫起调节作用。

蛋白点 DB2 与丝氨酸蛋白酶抑制剂具有 42% 的同源性。蛋白酶抑制剂在植物的防御机制中具有重要作用,植物受到病原物侵染后蛋白酶抑制剂会在植物体内富集,进而抑制病原物的蛋白水解酶。

蛋白点 DB3 与 ODR-3 具有同源性,同源性达 85%。此蛋白为 G 蛋白的 α 亚基,在抗病基因中有一类编码偶联 G 蛋白的受体。G 蛋白主要在信号传导过程中具有重要作用,其与受体结合后激活信号传导途径,进而在抗病反应中发挥作用。

3 讨论

本研究对接种黄萎病菌与对照棉株的叶片蛋白图谱比较分析后发现,在接种后 24 h、48 h、72 h 出现了大量新的蛋白质,其中碱性端蛋白点较少,大部分蛋白点集中在酸性端,说明棉花叶片蛋白质大部分属于酸性蛋白。在有关植物与真菌互作过程的研究中,有很多报道认为酸性蛋白参与了抗病反应,如被病原菌诱导的几丁质酶和 β -1,3 葡聚糖酶大多以酸性形式存在,活跃地聚集在被侵染植物的非原生质体内^[15]。本试验在棉花与黄萎病菌互作过程中发现了 DB1、DB2 和 DB3 差异表达的蛋白,这 3 个蛋白均在酸性端。它们可能是与棉花的抗黄萎病反应相关的蛋白质,其中蛋白点 DB1 与 DEAD/H box RNA 解旋酶同源,DEAD/H box 蛋白在原核生物和真核生物的各种组织中都存在。在抗性基因编码的蛋白质中有一种是含有核苷酸结合位点(NBS)的蛋白,NBS 存在于许多 ATP-或 GTP-结合蛋白中^[16],属于此类的抗性基因都可以赋予寄主抵御病毒、细菌、真菌等入侵的能力。DEAD/H box 蛋白也是一种 ATP 结合蛋白,因此可能也具有核苷酸结合位点。在本试验中经棉花黄萎病菌诱导后,在棉苗的蛋白质电泳图谱中发现有 DEAD/H box RNA 解旋酶的表达,因为推测此蛋白具有 NBS,此蛋白可能作为受体与病菌的激发子结合,从而在信号传导过程中发挥作用,进而诱导一系列的防卫反应。

蛋白点 DB2 在数据库中检索的结果是与丝氨酸蛋白酶抑制剂部分同源,丝氨酸蛋白酶抑制剂属于马铃薯抑制剂 I 家族。有研究表明,蛋白酶抑制剂在植物对害虫和病原体的侵染防御系统中具有十分重要的作用,在植物受到病原物入侵后会在植物体内富集,可能会抑制病原物的蛋白水解酶,此特性在番茄和马铃薯的丝氨酸蛋白酶抑制剂 I、II 得到了证明^[17-19]。Maria 等人^[20]的研究发现,在真菌入侵时,在发芽的玉米种子中有蛋白酶抑制剂的表达,进一步的研究表明蛋白酶

抑制剂在发芽的玉米种子抵御真菌侵染的防卫机制中会被激活并发挥作用。本试验中经黄萎病菌侵染后的棉苗中有蛋白酶抑制剂的表达,推测此蛋白可能参与棉花的抗黄萎病机制。

蛋白点 DB3 经数据库检索与 ODR-3 同源性达到 85%。ODR-3 属于 G 蛋白的 α 亚基,G 蛋白是由 α 、 β 和 γ 亚单位组成的异三聚体,在膜受体与效应器(effectors)之间的信号传导中起中介作用。植物中的抗病基因主要是其编码产物作为受体与激发子结合,从而激发一系列的防卫反应。在抗病基因中有一类就是编码偶联 G 蛋白的受体^[21]。研究表明,植物异三聚体 G 蛋白负责将质膜表面受体(GPCR)和质膜内侧的效应器偶联起来,在细胞跨膜信号传导中发挥着重要的作用,调控许多细胞反应过程,如植物对激素、干旱和病原物的反应、离子通道、细胞分裂、极性生长和光反应等^[22]。在本试验中接种黄萎病菌后的棉苗中有 G 蛋白表达,其可能在与受体偶联后通过腺苷酸环化酶途径激活代谢中的一些靶蛋白,进而调节细胞反应,达到抗病的目的。

自 1975 年 O'Farrell^[23]建立了双向电泳技术体系以来,此技术已在蛋白质组研究中发挥了重要作用。本研究对黄萎病菌胁迫下的 3 个差异蛋白点进行质谱鉴定的结果表明,黄萎病菌胁迫下棉花叶片蛋白质组产生了与 DEAD/H box RNA helicase、丝氨酸蛋白酶抑制剂、ODR-3 同源性较高的蛋白,这些蛋白很可能在棉花的抗黄萎病机制中发挥作用。目前在植物中双向电泳已被用于分离新的基因,在本试验的后续研究中可以这些差异表达的蛋白为基础进行基因克隆,即将这些差异蛋白的氨基酸序列进行分析,按照遗传密码推测并合成相应的核苷酸片段,以此片段为探针从 cDNA 文库中筛选相应的克隆,或用 PCR 的方法扩增出编码特异蛋白的 DNA 片段,从而成功地克隆编码特异蛋白的基因^[24],为进一步利用基因工程进行抗病育种奠定重要基础。

参考文献:

- [1] 梁 宇,荆玉祥,沈世华.植物蛋白质组学研究进展[J].植物生态学报,2004,28(1):114-125.
- [2] 朱友林,吴键胜,王金生.水稻对白叶枯病菌抗性相关蛋白的双向电泳分析[J].中国农业科学,2000,33(4):91-93.
- [3] 霍晨敏,赵宝存,葛荣朝,等.小麦耐盐突变体盐肋

- 迫下的蛋白质组分析[J]. 遗传学报, 2004, 31(12): 1408-1414.
- [4] FRANKLIN E C, Johnie N J, Roy G C, et al. Changes in cotton root proteins correlated with resistance to root knot nematode development [J]. The Journal of Cotton Science, 1997, 1:38-47.
- [5] 吕金殿, 甘 莉, 阎隆飞. 棉花黄萎病菌毒素的纯化与特性研究[J]. 植物病理学报, 1991, 21(2): 127-133.
- [6] 章元寿, 王建新, 顾本康. 用棉花黄萎病菌毒素检测棉花抗病性的研究[J]. 植物保护, 1991(4):2-4.
- [7] BELL A A. *Verticillium* wilt[M]// Hillocks R J. Cotton disease. Wallingford(UK): CABI, 1992: 87-126.
- [8] SMIT F, Dubery I A. Cell wall reinforcement in cotton hypocotyls in response to a *V. dahliae* elicitor [J]. Phytochemistry, 1997, 44:811-815.
- [9] MACE M E. Contribution of tylose and terpenoid aidedyde pnytoalexins to *Verticillium* wilt resistance in cotton [J]. Physiological Plant Phthology, 1978, 12(1):1-11.
- [10] 马峙英, 刘叔倩, 王省芬, 等. 过氧化物酶同工酶与棉花黄萎病抗性的相关研究[J]. 作物学报, 2000, 26(4): 431-437.
- [11] 高玉千, 聂以春, 张献龙. 棉花黄萎病基因的 QTL 定位[J]. 棉花学报, 2003, 15(2):73-78.
- [12] TOWNSEND B J, Poole A, Blake C J, et al. Anti-sense suppression of a (+)-delta-cadinene synthase gene in cotton prevents the induction of this defense response gene during bacterial blight infection but not its constitutive expression [J]. Plant Physiology, 2005, 38(1):516-528.
- [13] JAMES J T, Dubery I A. Inhibition of polygalacturonase from *Verticillium dahliae* by a polygalacturonase inhibiting protein from cotton [J]. Phytochemistry, 2001, 57(2):149-156.
- [14] 王省芬, 马峙英. 一种新的棉花黄萎病抗性鉴定方法[J]. 棉花学报, 2002, 14(4):231-233.
- [15] 李海燕, 束怀瑞, 刘润进. VAM 真菌诱导植物产生防御反应的生物化学及分子生物学基础[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2002, 33(1):107-111.
- [16] BAKER B, Zambryski P, Staskawica B, et al. Signaling in plant-microbe interactions [J]. Science, 1997, 276:726-733.
- [17] GRAHAM J S, Pearce G, Merryweather J, et al. Wound-induced proteinase inhibitors from tomato leaves I. The cDNA-deduced primary structure of pre-inhibitor I and its post-translation processing [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1985, 260:6555-6560.
- [18] GRAHAM J S, Pearce G, Merryweather J, et al. Wound-induced proteinase inhibitors from tomato leaves II. The cDNA-deduced primary structure of pre-inhibitor II [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1985b, 260:6561-6564.
- [19] SÁNCHEZ-SERRANO J, Schmidt R, Schell J, et al. Nucleotide sequence of a proteinase inhibitor II encoding cDNA of potato and its mode of expression [J]. Molecular General Genetics, 1986, 203:15-20.
- [20] MARIE J C, Dora R B, San S. Expression of a maize proteinase inhibitor gene is induced in response to wounding and fungal infection: systemic wound-responses of monocot gene [J]. The Plant Journal, 1994, 6(2):141-150.
- [21] HAMMOND-KOSACK K E, Jones J D. Responses to plant pathogens in biochemistry and molecular biology of plants [M]// Buchanan B B, Gruissem W, Jones R L. Rockville, Maryland, USA: American Society of Plant Physiology, 2000:1102-1156.
- [22] 宋水山, 杨文香, 李来宁, 等. 植物 G 蛋白与植物防卫反应[J]. 中国生物工程杂志, 2006, 26(3):73-77.
- [23] OFARRELL P H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1975, 250(10):4007-4020.
- [24] 朱 宏. T 型小麦细胞质雄性不育和可育株总水溶性差异蛋白质研究 [D]. 沈阳:东北农业大学, 2003. ●