

黄瓜杂交二代抗黄瓜白粉病的蛋白质组学初步分析

范海延¹, 陈捷^{2*}, 吕春茂³, 张春宇¹, 孙权¹

(¹ 沈阳农业大学生物科学技术学院, 沈阳 110161; ² 上海交通大学农业与生物学院, 上海 201101; ³ 沈阳农业科技开发院, 沈阳 110161)

摘要: 通过分组分离法建立 F₂ 代抗感池, 利用 2-DE 差异显示和质谱分析研究了抗病池和感病池的差异蛋白质组。抗感池经双向电泳检测到近 500 个蛋白点, 质谱分析鉴定出 9 种抗感池表达差异蛋白点, 分别为抗病基因蛋白 (SSP3110), 14-3-3 脑蛋白家族蛋白 (SSP1411), 粪卟啉原氧化酶 (SSP5513), 碳酸酐酶 (SSP5412), α -半乳糖苷酶 (SSP5710), 推定的蛋白 (SSP6002), 17.8 kDa 的热激蛋白 (SSP0710), 假想蛋白 (SSP3111), (S)-2-羟酸氧化酶 (SSP4610)。其中有 3 种蛋白的性质及生物学功能未知, 其余 6 种蛋白分别与光合作用、呼吸作用、抗病反应及信号转导等有密切关系。这些蛋白都可能与抗性有关或与发育相关的蛋白网络中的一部分, 它们在黄瓜抗病反应中起着不同的作用。

关键词: 黄瓜; 白粉病; 蛋白质; 双向电泳; 质谱

中图分类号: S 642.2 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2007) 02-0349-06

Proteomic Analysis of F₂ Generation of Cucumber Against the Cucumber Powdery Mildew Disease

FAN Hai-yan¹, CHEN Jie^{2*}, Lü Chun-mao³, ZHANG Chun-yu¹, and SUN Quan¹

(¹ Biological Science & Technology, Shenyang Agricultural University, Shenyang 110161, China; ² School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiaotong University, Shanghai 201101, China; ³ Academy of Shenyang Agriculture Science and Technology, Shenyang 110161, China)

Abstract: Proteomic approaches using two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) were adopted to identify proteins from cucumber leaves differentially expressed in F₂ generation of cucumber. Nearly 500 proteins were reproducibly detected, including 39 specific proteins expressed in F₂ sensitive pool samples and 22 specific proteins expressed in resistance pool samples. 35 proteins were two-fold upper limit and 46 proteins were two-fold lower limit. Analysis with MALDI-TOF-MS showed that nine important proteins associated with defensive reaction were identified in F₂ cucumber, a protein of disease resistance gene (SSP3110), 14-3-3 brain protein homolog (SSP1411), coproporphyrinogen oxidase (SSP5513), carbonic anhydrase (SSP5412), α -galactosidase-like protein (SSP5710), putative protein (SSP6002), 17.8 kDa class small heat shock protein (SSP0710), hypothetical protein (SSP3111), (S)-2-hydroxy-acid oxidase (EC1.1.3.15) -cucurbit (SSP4610). All of those proteins were probably parts of network of resistance or development-related proteins. This study gives new insights into cucumber powdery mildew resistant response in cucumber leaves and demonstrates the power of the proteomic approach in plant biology studies.

Key words: Cucumber; Powdery mildew; Protein; Two-dimensional gel electrophoresis; Mass spectrometry

收稿日期: 2006-10-20; 修回日期: 2007-01-31

基金项目: 辽宁省博士启动基金资助项目 (1040179); 沈阳农业大学博士后基金资助项目

* 通讯作者 Author for correspondence (E-mail: jiechen59@sjtu.edu.cn)

致谢: 感谢上海交通大学农业与生物技术学院蔡润教授和潘俊松副教授惠赠黄瓜品种。

有关黄瓜白粉病 (*Sphaerotheca fuliginea*) 抗性遗传规律的研究较多, 但看法并不一致, 关于黄瓜抗病机制也不完全清楚。生命现象的发生往往是多因素影响的, 必然涉及到多个蛋白质; 多个蛋白质的参与是交织成网络的, 或平行发生, 或呈级联因果; 同时在执行生理功能时蛋白质的表现是多样的、动态的。

因此, 要对生命的复杂活动有全面和深入的认识, 必然要在整体、动态、网络的水平上对蛋白质进行研究。本试验通过 2-DE 差异显示和质谱分析, 研究了黄瓜杂交 F_2 代抗性相关蛋白质组的变化, 这对于从根本上揭示黄瓜抗白粉病的本质具有重要意义, 并将为黄瓜抗病基因克隆和抗性育种提供重要基因资源。

1 材料与方法

1.1 材料

供试黄瓜为抗黄瓜白粉病的品系 R17 和感病品系 S17 的 F_2 代, 其中 R17 和 S17 均为 Nevada (荷兰温室类型光皮品种) 与 Husen (以色列温室类型光皮品种) 杂交组合分离的后代材料, R17 和 S17 为自交 7 代的品系。

将种子催芽后播在装有草炭土 蛭石体积比为 1:2 的营养钵中, 温室中培养。待长至两片真叶时取第 1 片真叶置于 -80°C 冰箱中备用。

对第 2 片真叶进行挑战接种, 发病后根据分离群体分组分析法 (BSA) 把 F_2 群体分为抗病池和感病池两组。

分别将抗病池和感病池植株的第 1 片真叶混合在一起, 进行蛋白质的提取和制备。

1.2 双向凝胶电泳

蛋白质提取采用三氯乙酸/丙酮法 (钱小红和贺福初, 2004)。

裂解缓冲液配方为 9.5 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 4% 3-[3-(胆酰氨基丙基)二甲胺基]丙磺酸内盐 (CHAPS), 1% 二硫苏糖醇, 0.25% 两性电解质 (pH 3~10), 10 mmol/L 苯甲基磺酰氟 (Angelika et al, 2004)。

等电聚焦蛋白样品的浓度检测采用美国伯乐公司蛋白质检测试剂盒 1, 蛋白样品终浓度为 $3\text{ }\mu\text{g}/\mu\text{L}$, 上样量为 $350\text{ }\mu\text{L}$ 。IPG 胶条长度为 17 cm, IEF 条件为 20 $^{\circ}\text{C}$, 250 V 2 h, 300 V 2 h, 600 V 2 h, 1 500 V 3 h, 8 000 V 5 h, 和 8 000 V 94 000 Vh。

等电聚焦完成后, 将 IPG 胶条分别在平衡液 (6 mol/L 尿素, 2% 十二烷基磺酸钠, 50 mmol/L Tris-HCl pH 8.8, 20% 甘油, 2% 二硫苏糖醇) 和平衡液 (6 mol/L 尿素, 2% 十二烷基磺酸钠, 50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.8, 20% 甘油, 2.5% 碘乙酰胺) 中各平衡 15 min。将胶条置于凝胶上, 用低熔点琼脂糖封胶液封注顶部 (胶条与凝胶之间不能有气泡)。

SDS 凝胶配制参照郭尧君 (1999) 的方法, 第 2 向 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的分离胶浓度为 12.5%, 电泳参数为 15 mA/凝胶 1 h, 50 mA/凝胶 6 h。G-250 胶体考染法染色。上述试验所用的等电聚焦仪、电泳槽和电泳仪均为美国伯乐公司产品。图像采集和图像分析采用 VersaDocTM Imaging Systems 与 PDQuest 7.2。

1.3 质谱分析与数据库检索

样品用 4700 串联飞行时间质谱仪 [4700 Proteomics Analyzer (TOF/TOFTM)] 进行质谱分析, 激光光源为 355 nm 波长的 Nd: YAG 激光器, 加速电压为 20 kV, 采用正离子模式和自动获取数据的模式采集数据。

肽质量指纹图谱 (PMF) 质量扫描范围为 700~3 500 Da, 且强度最大的 5 个峰进行串联质谱分析; 图谱用肌红蛋白 (myoglobin) 酶解肽段进行外标校正。

所得结果用 GPS+MASCOT进行数据库检索。搜索参数设置：数据库为 NCB Inr, 检索种属为绿色植物，数据检索的方式为结合式 (combined)；最大允许漏切位点为 1；酶为胰蛋白酶。质量误差范围设置：PMF 0.3 Da, MS/MS 0.4 Da；在数据库检索时胰酶自降解峰和污染物质的峰都手工剔除。

2 结果与分析

2.1 F_2 抗感池的双向电泳图谱比较

经双向电泳，共有近 500个蛋白点在考马斯亮蓝染色的 2-D胶上分离。其中，感病池在 2-D胶上分离得到约有 490个蛋白点，有 39种蛋白质在感病池中特异表达；抗病池在 2-D胶上分离得到约有 480个蛋白点，其中 22种蛋白在抗病池中特异表达，抗病池相对于感病池有 35种蛋白上调 2.0倍以上和 46种蛋白下调 2.0倍以上。

感病池和抗病池的蛋白质组图谱相似系数为 0.881 (表 1, 图 1)。

表 1 F_2 抗感池蛋白质组的基本信息

Table 1 General information of proteome of F_2 resistant pools and sensitive pools

材料 Samples	总蛋白点数 Total spots	未匹配蛋白点数 Number of spots unmatched	上调 2 倍以上的蛋白 Two-fold upper proteins	下调 2 倍以上的蛋白 Two-fold lower proteins
抗病 Resistant	480	22	46	35
感病 Sensitive	490	39	-	-

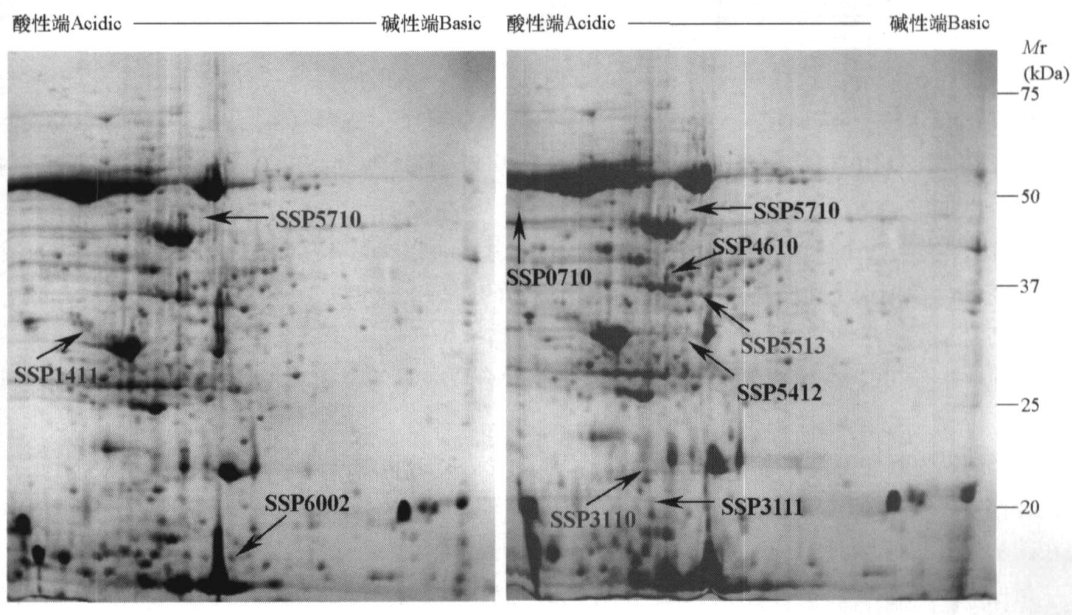


图 1 F_2 抗感池的双向电泳图谱

箭头所示为差异蛋白点。

Fig. 1 2-DE map of sensitive and resistance sample of F_2

Arrows show different proteins

2.2 F_2 抗、感池差异蛋白的质谱鉴定

我们认为，在不同重复胶的同一位置都出现的蛋白点是同一个蛋白，选取其中 14个差异蛋白点

进行了分析鉴定。

通过串联飞行时间质谱仪质谱分析, Swiss-Prot和 NCB I数据库查询, 鉴定出 9个蛋白点 (表 2), 另 5个蛋白点因匹配率太低而未得到鉴定。

表 2 F₂ 抗、感池差异蛋白质谱鉴定结果

Table 2 F₂ differentially accumulated proteins identified by MS

序号 Spot No	蛋白名称 Protein name	得分 Score	等电点 PI	分子量 MW (Da)	匹配度 Intensity matched	编号 No
SSP3110	抗病基因蛋白 Disease resistance gene, putative	65	5.31	138 905.2	40.021	gi 12322541
SSP1411	14-3-3脑蛋白家族 14-3-3 brain protein homolog	61	4.82	29 619.6	9.999	gi 695767
SSP5513	粪卟啉原氧化酶 Coproporphyrinogen oxidase	334	5.97	36 735.2	31.599	gi 29367603
SSP5412	碳酸酐酶 Carbonic anhydrase, putative	121	6.66	28 736.6	20.310	gi 21593413
SSP5710	-半乳糖苷酶 A5g08380	97	6.32	46 077.9	10.582	gi 30725668
SSP6002	推定的蛋白 Putative protein	60	6.01	80 826.2	27.194	gi 6850848
SSP0710	17.8 kDa热激蛋白 17.8 kDa class small heat shock protein	73	5.60	177 640.0	9.469	gi 4836471
SSP3111	假想蛋白 Hypothetical protein	63	9.39	23 857.1	19.415	gi 24817258
SSP4610	(S) - 2 - 羟酸氧化酶 (S) - 2-hydroxy-acid oxidase (EC1.1.3.15) -cucurbit	150	8.79	40 288.2	14.258	gi 7431428

鉴定出的 9个蛋白点代表 9种不同的蛋白质, 其中仅 F₂抗病池表达的蛋白点 (QUALITY) 有 SSP4511, SSP5513, SSP5412, SSP3110, SSP0710, SSP3111, SSP4610; 仅 F₂感病池表达的蛋白点 (QUALITY) 有 SSP1411, SSP6002; 抗病池比感病池蛋白含量高 2.0 倍以上, 表达的蛋白点为 SSP5710 (图 2)。

F₂抗病池鉴定出的蛋白点 SSP3110为一种抗病基因蛋白, 该蛋白与一种抗病基因表达的蛋白匹配率高, 而且已在拟南芥中得到纯化, 它可能与植物的防御反应相关。

SSP5513为粪卟啉原氧化酶, 是植物中四吡咯生物合成中的第 8种酶, 催化粪卟啉原氧化脱羧生成原卟啉原 IX。在植物中这个反应和卟啉生物合成较早的步骤均在质体中进行, 原卟啉原 IX可转变为叶绿素生物合成中第一个中间产物。

SSP5412为碳酸酐酶, 参与催化 CO₂和水与碳酸、质子和碳酸氢盐离子之间的快速转换。绿色植物光合作用所需的 CO₂来自于大气, 在植物体内 CO₂以碳酸氢盐离子的形式贮存, 光合作用中碳酸酐酶在碳酸氢盐离子转化成 CO₂过程中起重要作用。

蛋白点 SSP5710是 -半乳糖苷酶, 在 F₂抗感池中均明显可见, 但抗病池中的含量明显比感病池提高, 它在黄瓜中的作用尚未知。

SSP1411为 14-3-3脑蛋白家族, 是感病池中的上调蛋白。对于复杂的生活环境和生长发育的变化, 植物需要一系列调节因子和相应的反应, 这些变化似乎与庞大多样的 14-3-3家族密切相关。14-3-3二聚体同工型通过蛋白质间相互作用和磷酸化作用参与细胞内和细胞间信号转导。在拟南芥、玉米、大麦、水稻、烟草、燕麦、大豆、蚕豆、马铃薯、豌豆和番茄中均已发现 14-3-3 蛋白。这些蛋白的功能也已被发现。拟南芥和玉米中的 14-3-3家族在转录调节过程中与 G-box DNA 蛋白质复合物有关。当植物处于低温、低氧、盐胁迫和病原菌侵染等逆境时, 14-3-3 蛋白可能调节磷酸化事件, 并

在黄瓜受霜霉病菌侵染时可作为植物毒植物素壳梭孢素的受体分子 (Aitken, 1995; Ferl, 1996; Wu et al, 1997)。

蛋白点 SSP0710为 17.8 kDa的热激蛋白。通常热激蛋白家族 HSPs是细胞质蛋白, 在不同胁迫条件下生物可合成 HSPs。HSPs在蛋白质互作中起重要作用, 包括蛋白质折叠、蛋白质构象建立, 并能阻止蛋白质聚集 (Pearl, 2001)。因此该热激蛋白可能与植物抗病防御反应有关。

SSP6002、SSP3111和 SSP4610分别为一种推定的蛋白、假想蛋白和 (S) - 2 - 羟酸氧化酶, 这 3 种蛋白的性质及其在黄瓜抗白粉病中的作用尚不清楚。

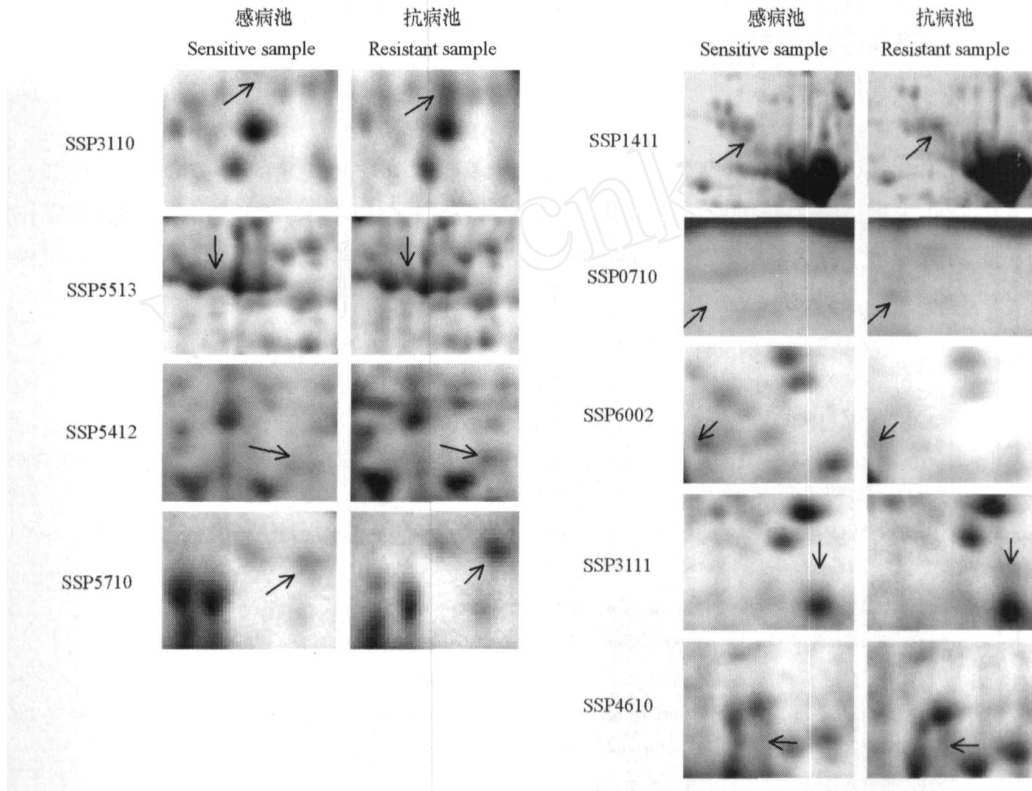


图 2 F_2 代抗感池的差异蛋白比较

箭头所示为差异蛋白点。

Fig 2 The differential protein spots from F_2 resistant samples and sensitive samples

Arrows show different proteins

3 讨论

蛋白质是生理功能的执行者, 是生命现象的直接体现者, 对蛋白质结构和功能的研究将直接阐明生命在生理和病理条件下的变化机制。

蛋白质生理功能的实现离不开蛋白质与蛋白质或蛋白质与其他生物大分子之间的相互作用 (Auerbach et al, 2002)。细胞内的许多活动, 如信号转导等都是通过一个复杂而广泛的蛋白质相互作用网络来实现。

以往人们对单一防御反应相关酶蛋白和信号做了大量研究, 所得出的结论多数是依据少数生理因子与抗性关系得出的。通过蛋白质组学研究表明: 植物对病害的抗性本质需要从蛋白质群角度进行探索, 才能最终为人们提供自然条件下黄瓜抗白粉病全息机制。

本研究双向电泳中检测到近 500 个蛋白点, F_2 代抗病池与感病池蛋白质点总数相差不明显。我们发现抗性后代与能量代谢、信号转导和抗性基因表达有一定的相关性。在抗病池中发现了抗病基因蛋白和热激蛋白, 两者可能与黄瓜抗病或抗逆密切相关。

由于已发现 14-3-3 蛋白参与磷酸化过程, 并可与病菌毒素结合, 因此在感病池发现的 14-3-3 蛋白可能与易感病性信号分子调控有关。 F_2 抗病池或感病池中均有一些不匹配的蛋白, 可能与特异非亲和性互作有关。植物抵御病害的一系列防御反应是许多蛋白质相互作用共同完成的 (Sun et al, 2004)。

本研究中所有的上调或下调蛋白都可能是与抗性有关或是与发育相关的蛋白网络中的一部分, 它们在黄瓜抗病反应中可能起着不同的作用。

虽然我们在黄瓜叶片蛋白质的双向电泳图谱上可以观察到 500 个左右的蛋白质点, 但这并不能代表整个黄瓜叶片的蛋白质组。

本研究仅分析了黄瓜蛋白质组的很小一部分, 仍有许多抗性相关蛋白需要进一步鉴别。比如, 随着病原菌侵入的时间进程, 寄主防御反应会涉及哪些蛋白和蛋白互作网络, 在抗性反应中起关键作用的膜蛋白和核蛋白, 离子运输及信号转导过程是哪些, 为了更好的了解黄瓜抗病反应我们尚需更深入的研究。

References

- Aitken A. 1995. 14-3-3 proteins on the MAP. *Trends Biochem. Sci*, 20: 95 - 97.
- Angelika Gorg, Walter Weiss, Michael J Dunn. 2004. Current two-dimensional electrophoresis technology for proteomics. *Proteomics*, 4: 3665 - 3685.
- Auerbach D, Taminy S, Hottiger M O. 2002. The post-genomic era of interactive proteomics: facts and perspectives. *Proteomics*, 2: 611 - 623.
- Ferl R J. 1996. 14-3-3 proteins and signal transduction. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.*, 47: 49 - 73.
- Guo Rao-jun. 1999. *Experimental technique of protein electrophoresis*. Beijing: Science Press (in Chinese).
- 郭尧君. 1999. *蛋白质电泳实验技术*. 北京: 科学出版社.
- Pearl L H. 2001. Prodromou C: structure, function, and mechanism of the Hsp90 molecular chaperone. *Adv. Protein Chem.*, 9: 157 - 186.
- Qian Xiao-hong, He Fu-chu. 2004. *Proteomics: theory and method*. Beijing: Science Press (in Chinese).
- 钱小红, 贺福初. 2004. *蛋白质组学: 理论与方法*. 北京: 科学出版社.
- Sun T K, Seok Y, Sang G K, Han J K, Sun Y K, Du H H, Yu S J, Kyu Y K. 2004. Proteome analysis of rice blast fungus (*Magnaporthe oryzae*) proteome during appressorium formation. *Proteomics*, 4: 3579 - 3587.
- Wu K, Lu G, Sehnke P, Ferl R J. 1997. The heterologous interactions among plant 14-3-3 proteins and identification of regions that are important for dimerization. *Arch. Biochem. Biophys.*, 339: 2 - 8.