

北海道黄杨叶片应答低温胁迫的蛋白质组分析

郝 强, 张睿鹂, 冷平生, 关雪莲*

(北京农学院园林学院, 北京 102206)

摘 要: 采用双向电泳的蛋白质组学方法分析了北海道黄杨叶片蛋白质对低温胁迫的应答反应。北海道黄杨植株在室外种植, 从 2008 年 10 月—2009 年 2 月每月提取叶片总蛋白。在考马斯亮蓝染色的 2-DE 胶上发现 36 个表达量显著差异蛋白点, 其中通过质谱鉴定出 19 个蛋白质, 包括已知的和新鉴定的低温胁迫相关蛋白质。这些鉴定出的蛋白质涉及多个生理过程, 如能量与代谢、调控、防御应答等, 同时这些蛋白质的表达模式与生理生化变化模式相一致。

关键词: 北海道黄杨; 蛋白质组; 低温胁迫; 双向电泳; 肽指纹图谱

中图分类号: S 687

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2011) 11-2169-11

Proteomic Analysis of Cold Stress Responses in *Euonymus japonicus* Leaves

HAO Qiang, ZHANG Rui-li, LENG Ping-sheng, and GUAN Xue-lian*

(College of Landscape, Beijing University of Agriculture, Beijing 102206, China)

Abstract: A proteome study based on 2-D gel electrophoresis was performed in order to analyse the cold-stress response of *Euonymus japonicus* ‘Cuzhi’ leaves. The plants were grown in the outdoor and total proteins were extracted from leaves monthly from Oct, 2008 to Feb, 2009. Our results demonstrated significant variations existed in 36 protein spots detected on CBB stained 2-DE gels, among which 19 proteins were identified by mass spectrometry, including well known and newly identified cold-responsive proteins. The identified proteins were involved in several processes, such as energy and metabolism, regulatory, defense response etc. The expression patterns of these proteins were consistent with physiological and biochemical changes.

Key words: *Euonymus japonicus*; proteome; cold stress; 2-DE; PMF

北海道黄杨 (*Euonymus japonicus* ‘Cuzhi’) 是卫矛科常绿阔叶木本植物, 其成熟植株具有极强的抗冻能力, 可以耐受 -23.9 °C 的低温且叶片翠绿不落 (关雪莲 等, 2007), 是近年来从国外引进并在园林绿化中推广应用的优良常绿树种。研究其在低温胁迫过程中的抗冷性分子机理, 对推动园林植物种质资源改良, 扩大常绿阔叶植物种植范围等具有重要意义。蛋白质组学技术是分析信号通路和植物对环境刺激的复杂应答的有力工具, 但相关数据库的缺失一直制约着其应用范围。近年来随着多种植物特别是毛果杨 (*Populus trichocarpa*) 全基因组测序的完成, 使用蛋白质组学技术手段研究北海道黄杨响应低温胁迫的蛋白质组的变化成为可能。Renaut 等 (2004) 对树龄 3 个月的

收稿日期: 2011-07-12; 修回日期: 2011-10-25

基金项目: 北京市科委项目 (Z080005032508017); 北京市属高等学校人才强教计划项目 (PXM2009-014207-076874)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: guanxl3152@sina.com)

杨树在 4℃ 分别处理 7 d 和 14 d, 通过双向电泳分离叶片蛋白质, 采用 MALDI-TOF MS 鉴定了其中 26 个蛋白质。乌凤章 (2004) 检测了白桦幼苗在 4℃ 处理当天、4 d 和 14 d 的蛋白质凝胶图谱, 用 ESI-MS/MS 从 37 个丰度 2 倍以上变化的蛋白点中鉴定了 15 个蛋白质, 按其功能分为 4 类: 信号转导、光合作用、碳氮能量代谢和应激相关蛋白。但这些研究仅限于室内短期低温处理, 而植物应答低温胁迫过程是一个复杂的网络, 尤其是在室外生长的木本植物越冬时还涉及到干旱和短日照等因素影响。作者通过前期对试验条件的摸索, 已经建立了一套适合北海道黄杨叶片蛋白质的双向电泳体系 (郝强 等, 2010), 利用这一体系, 对露天越冬的北海道黄杨叶片蛋白进行双向电泳分析, 查找表达量变化大且稳定表达的蛋白点, 再运用基质辅助激光解吸飞行时间质谱 (MALDI-TOF MS) 和数据库搜索技术, 分析并鉴定这些差异表达蛋白, 推测其在植物低温胁迫过程中的作用。

1 材料与方法

1.1 材料

试验所用北海道黄杨 ‘粗枝’ (*Euonymus japonicus* ‘Cuzhi’) 植株种植在北京农学院园林学院苗圃露地, 水肥灌溉充分, 生长良好。分别于 2008 年 10、11、12 月和 2009 年 1、2 月, 每月 15 日上午 8 时取中等大小, 叶形端正, 无病虫害, 无损伤的叶片进行生理生化指标测定和蛋白质提取。

1.2 方法

1.2.1 生理生化指标测定

过氧化物酶 (POD) 活性的测定采用愈创木酚染色法, 超氧化物歧化酶 (SOD) 活性的测定采用氮蓝四唑染色法, 质膜透性采用电导法测量, 可溶性糖和游离脯氨酸含量测定参照李合生 (2000) 的方法。

1.2.2 蛋白质的提取

蛋白质提取采用酚/SDS 法 (Wang et al., 2006); 采用 Bradford (1976) 的方法进行蛋白质定量; 双向电泳时蛋白质上样量为 110 μg, 使用 24 cm pH 4 ~ 7 IPG 胶条, 参照 Bio-Rad 胶条使用说明书设置等电聚焦程序, 每根 24 cm 胶条限制电流为 50 μA, 上样总体积为 450 μL, 凝胶染色方法采用考马斯亮蓝染色法 (Candiano et al., 2004), 每种处理设置 3 个重复。

1.2.3 图像与数据分析

采用 PowerLook 2100 XL 扫描仪对凝胶进行图像扫描, 凝胶图像用 Bio-Rad PDQuest 2-DE 分析软件分析, 获得蛋白点的等电点、分子量、相对表达量以及凝胶之间蛋白质点匹配的信息。建立比较组, 对同一处理的 3 次重复间进行匹配, 只有 3 次重复中都存在的点被确定为事实存在的蛋白点, 即重复组蛋白点; 采用 Total quantity in analysis set 进行蛋白质定量的均一化, 表达量呈现两倍以上变化且差异显著 ($P < 0.05$) 的点被认为是差异表达蛋白点。

1.2.4 胶内酶解, 蛋白质鉴定和数据库检索

用枪头切取差异蛋白点, 使用 Roche 蛋白质组级胰蛋白酶 (Trypsin) 参照说明对蛋白点进行胶内酶解。吸取 1 μL 样品提取液, 点在 Anchorchip 靶上, 晾干, 然后吸取 0.1 μL α-氰基-4-羟基肉桂酸 (CHCA) 基质点在晾干的样品上, 待样品晾干后用 0.1% 三氟乙酸除盐, 洗脱两次后, 将靶送进 Autoflex II MALDI-TOF 质谱仪 (Bruker Daltonics), 质谱仪设置参考仪器操作指南。

使用 MASCOT 分析质谱结果肽指纹图谱 (PMF), 选用 NCBI nr 数据库, 物种分类选择 Viridiplantae (Green Plants), 固定修饰为半胱氨酸乙酰基化修饰 [Carbamidomethyl (C)], 可变修饰为 Oxidation

(M), 允许 1 个错误酶切位点, 肽质量标准差 $200 \times 0.0001\%$ 。

采用如下 3 个质量控制标准进行筛选: (1) 肽段匹配数量大于或等于 4; (2) 蛋白质序列覆盖度大于 10%; (3) MOWSE 分数高于 95% ($P < 0.05$) 显著性阈值。只有符合上述 3 个标准的匹配结果才被视为有效鉴定结果。

1.2.5 蛋白质功能分析和预测细胞内定位

蛋白质鉴定结果采用 NCBI 之基本局部序列搜索工具 BLAST 进行比对, 并结合 KEGG (Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, <http://www.genome.jp/kegg>) 识别其对应的基因语义学 (Gene Ontology, GO) 范畴与代谢途径。所有鉴定蛋白质提交至 TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>) 预测蛋白质定位。

2 结果与分析

2.1 影响北海道黄杨冬季室外生长的因素

北京的冬季持续时间长, 气候特点是晴朗, 干燥, 寒冷, 少雪。1 月份最冷, 平均气温 -4.8°C 。低温和干旱是影响植株正常生长的主要因子。本试验中为了最大程度减少干旱的影响, 在刚入冬土壤上冻前对供试材料进行了充分灌溉, 因此可认为低温是主要影响因子。图 1, A 是本试验材料生长过程中北京地区从 2008 年 10 月至 2009 年 2 月的月平均气温变化情况, 可以看出从 10 月开始气温大幅降低, 并在 1 月左右到达最低点, 然后才开始慢慢回升。

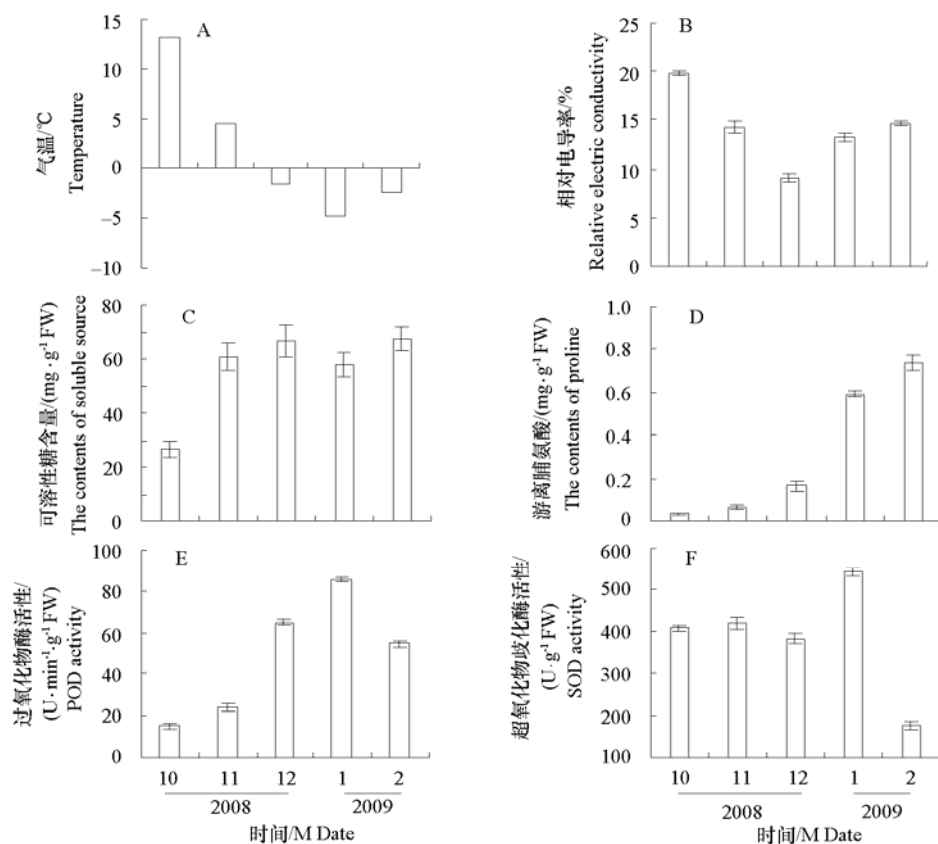


图 1 北海道黄杨叶片在冬季生理生化指标的变化

Fig. 1 Variations of physiological and biochemical indicators of *E. japonicus* 'Cuzhi' leaves during winter

2.2 生理生化指标分析

如图 1 所示 2008 年 10 月—2009 年 2 月期间,北海道黄杨叶片组织的相对电导率与室外温度变化基本呈正相关(图 1, B),而可溶性糖、游离脯氨酸含量,过氧化物酶和超氧化物歧化酶活性与温度变化呈负相关(图 1, C~F)。此外还发现,叶片相对电导率和可溶性糖含量在 10—11 月间有一次较大的变化,而之后则保持相对稳定。植物在遭受寒冷胁迫时,细胞膜的渗透性会发生变化,导致叶片组织的相对电导率降低,氧化还原平衡受到破坏,为适应或抵御胁迫,细胞会通过可溶性糖和游离脯氨酸的增加来进行调节来维持细胞膜的稳定性,并通过增强抗氧化物酶的活性来保持氧化还原平衡。试验测得的这些指标变化说明北海道黄杨叶片在 10 月到 11 月间的降温过程中获得了对低温胁迫的适应性。

2.3 双向电泳图谱分析

采用 PDQuest 软件分析露天越冬过程中北海道黄杨叶片总蛋白质双向电泳图谱(图 2),从 10 月室外降温开始到翌年 2 月寒冷胁迫基本结束的过程中,重复组北海道黄杨叶片蛋白点数分别为 170、97、122、99 和 101。组间分析发现 36 个符合 t 检验($P < 0.05$)且表达量变化 2 倍以上的显著差异蛋白点。

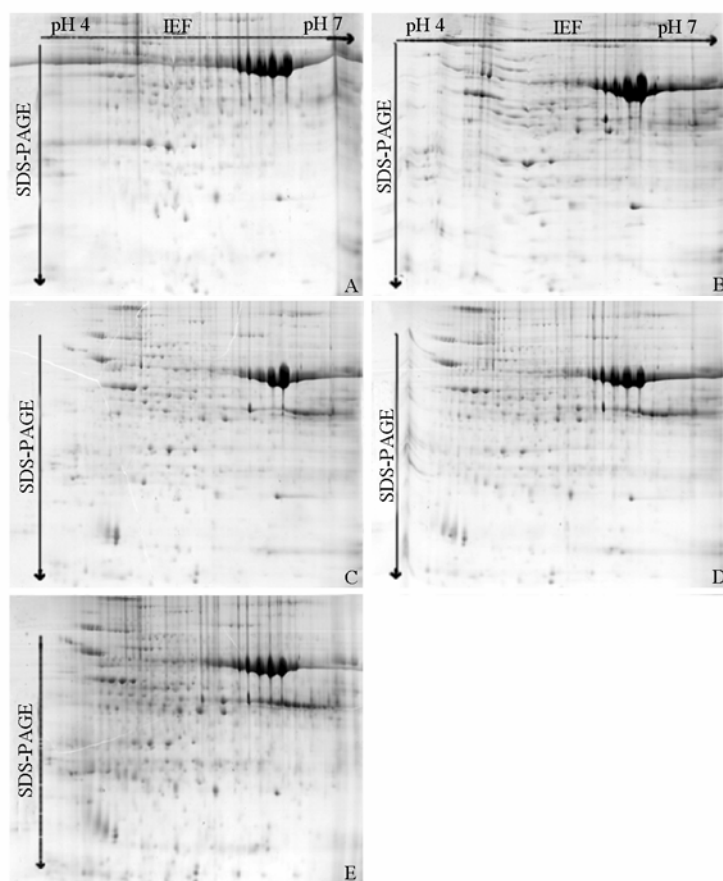


图 2 北海道黄杨叶片总蛋白质双向电泳图谱

A: 2008 年 10 月; B: 2008 年 11 月; C: 2008 年 12 月; D: 2009 年 1 月; E: 2009 年 2 月。

Fig. 2 2-DE maps of *E. japonicus* 'Cuzhi' leaf proteins during winter

A: Oct. 2008; B: Nov. 2008; C: Dec. 2008; D: Jan. 2009; E: Feb. 2009.

2.4 蛋白质功能分析

对 36 个差异蛋白点进行质谱分析, 用 MASCOT 进行数据库匹配, 鉴定了其中 19 个蛋白质点可能对应的蛋白质 (表 1, 图 3)。

表 1 在冬季 5 个不同月份北海道黄杨叶片差异蛋白鉴定结果 (2008 - 10—2009 - 02)

Table 1 Identified proteins of *E. japonicus* 'Cuzhi' leaf responsive to outdoor cold stress (2008 - 10—2009 - 02)

蛋白点 Spot	蛋白名称 Protein name	注册码 Accession	物种 Species	理论值/实验值 Theoretical/Observed		分数 Score	匹配肽 段数 Peptides matched	序列覆 盖度/% Sequence coverage	推测定位 Location
				等电点 pI	分子量/kD Mr				
101	叶绿体核酮糖 - 1, 5 - 二磷酸加氧酶活化酶 Chloroplast rubisco activase	ABM01871	桑 <i>Morus alba</i> var. <i>multicaulis</i>	4.8/5.1	27.3/39.9	71	6	23	其他 Other location
102	核酮糖 - 1, 5 - 二磷酸加氧酶活化酶 Rubisco activase	XP_002532996	蓖麻 <i>Ricinus communis</i>	5.4/5.3	52.4/43.2	78	7	14	其他 Other location
103	核酮糖 - 1, 5 - 二磷酸加氧酶活化酶 Rubisco activase	AAK25800	马蹄莲 <i>Zantedeschia aethiopica</i>	5.3/5.3	47.2/47.4	130	11	26	其他 Other location
104	核酮糖 - 1, 5 - 二磷酸加氧酶活化酶 Rubisco activase	1909374A	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	5.5/5.4	42.9/43.0	74	5	12	其他 Other location
105	核酮糖 - 1, 5 - 二磷酸加氧酶活化酶 Rubisco activase	ABF38996	富贵草 <i>Pachysandra terminalis</i>	5.6/5.7	34.8/16.3	76	5	21	其他 Other location
106	核酮糖 - 1, 5 - 二磷酸加氧酶活化酶 Rubisco activase	ABF38996	富贵草 <i>Pachysandra terminalis</i>	5.6/5.8	34.8/15.4	72	6	23	其他 Other location
107	核酮糖 - 1, 5 - 二磷酸加氧酶活化酶 Rubisco activase	ABF38996	富贵草 <i>Pachysandra terminalis</i>	5.6/5.9	34.5/39.1	73	9	21	其他 Other location
108	放氧增强蛋白 1 Oxygen-evolving enhancer protein 1	ACG31595	玉米 <i>Zea mays</i>	5.6/5.7	34.8/32.8	71	6	11	叶绿体 Chloroplast
109	假想蛋白 Hypothetical protein	CAN61828	葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	5.8/5.5	33.4/32.1	86	8	36	叶绿体 Chloroplast
110	前苯丙脱水酶 ADT6 (Arogenate dehydratase 6)	NP_563809	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	6.1/4.9	45.1/20.2	73	4	21	叶绿体 Chloroplast
111	果糖二磷酸醛缩酶 Fructose-bisphosphate aldolase, putative	XP_002531508	蓖麻 <i>Ricinus communis</i>	6.8/5.7	42.9/39.4	74	7	23	叶绿体 Chloroplast
112	果糖 - 6 - 磷酸醛缩酶 Fructose-6-P aldolase	XP_001697282	莱茵衣藻 <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	5.9/6.1	31.0/34.9	71	5	22	线粒体 Mitochondrion
113	肌动蛋白 Actin	AAP73460	陆地棉 <i>Gossypium hirsutum</i>	5.4/5.5	41.9/45.1	111	11	33	其他 Other location
114	FtsH 蛋白前体 FtsH-like protein P1tf precursor	AAD17230	烟草 <i>Nicotiana tabacum</i>	6.0/5.4	74.5/68.3	76	9	14	叶绿体 Chloroplast
115	反转录转座子蛋白 Retrotransposon protein, putative	ABA92141	水稻 <i>Oryza sativa</i>	8.7/5.5	216.6/40.8	81	14	12	分泌通路 Secretory pathway
116	Os08g0412100	NP_001061792	水稻 <i>Oryza sativa</i>	6.4/6.5	110.0/112.0	88	8	10	分泌通路 Secretory pathway
117	未命名蛋白产物 Unnamed protein product	CBI36832	葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	5.4/5.4	24.9/22.4	77	5	18	其他 Other location
118	假想蛋白 Hypothetical protein	XP_002518777	蓖麻 <i>Ricinus communis</i>	6.3/5.6	23.6/23.6	83	5	21	其他 Other location
119	假想蛋白 Hypothetical protein	BAC83670	水稻 <i>Oryza sativa</i>	11.1/6.6	40.9/40.8	76	5	17	其他 Other location

通过 BLAST 和 KEGG 对这 19 个推测的蛋白质进行功能注释, 并与露天越冬期间北海道黄杨生理生化指标变化相比较, 这些蛋白可以分为能量与代谢、调控、防御应答和未知功能蛋白等 4 类。其中前苯丙脱水酶 (蛋白点 110)、果糖 - 6 - 磷酸醛缩酶 (蛋白点 112)、反转录转座子蛋白 (蛋白点 115) 和抗病蛋白 (蛋白点 116) 是首次在植物应答低温胁迫研究中报道。

2.4.1 能量与代谢

通过质谱结果匹配和基因功能分析, 9 个蛋白 (蛋白点 101 ~ 109) 可能与光合作用相关, 其中 7 个蛋白点 (蛋白点 101 ~ 107) 可能属于核酮糖 - 1, 5 - 二磷酸羧化酶/加氧酶相关蛋白 (图 3)。

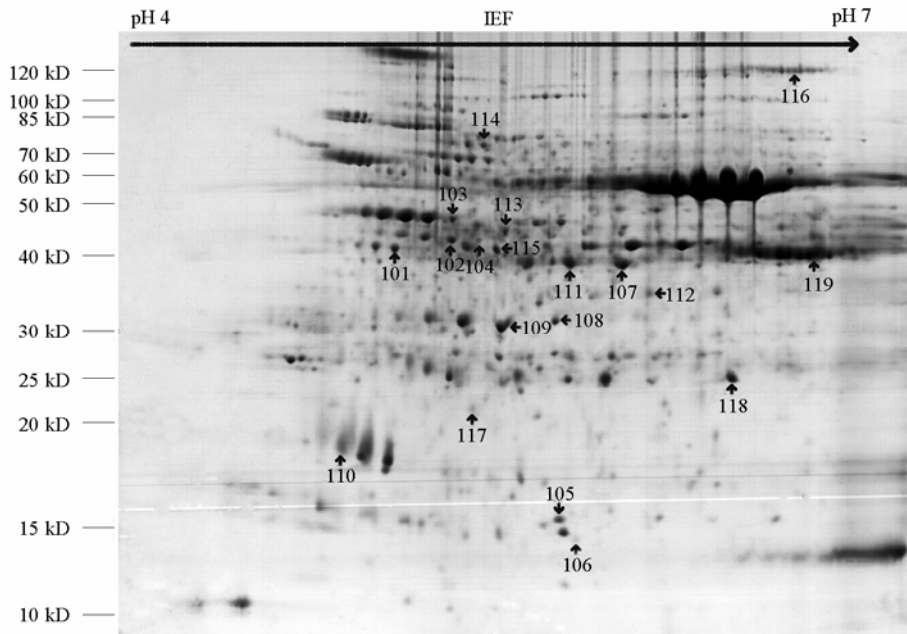


图 3 1 月北海道黄杨叶片总蛋白质双向电泳图谱

箭头: 质谱鉴定蛋白点。

Fig. 3 2-DE map of *E. japonicus* 'Cuzhi' leaf proteins in January

Arrow: Identified differential expressed proteins by MALDI-TOF MS.

蛋白点 101、103 ~ 107 经 MASCOT 鉴定可能为核酮糖 - 1, 5 - 二磷酸羧化酶/加氧酶活化酶 (ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase, RCA), RCA 通过封闭底物结合位点或阻止甲氨酰化促进多种糖磷酸基的去除, 并且能够保持 RuBisCO 在激活的状态 (Wang & Portis, 1992)。蛋白点 102 经过 BLAST 和 KEGG 分析, 可能为核酮糖二磷酸羧化酶小亚基。RuBisCO 小亚基已被证明可以影响 RuBisCO 的催化效率和特异性 (Nakano et al., 2006)。

在越冬的 5 个月中, 蛋白点 102、104 和 107 的蛋白表达量都从 10 月开始大幅增长, 并在 11 月到达顶峰, 然后开始下降, 而蛋白点 101、103 和 105 则在 12 月达到顶峰, 之后开始下降, 蛋白点 106 表达量则基本保持稳定 (图 4, A)。这些同属于 RuBisCO 活化酶的片段在冬季初期多数都表现为增强表达, 推测这可能是植物对低温和脱水等冬季气候胁迫的适应性变化。在温度最低的 1 月, 除蛋白点 106 外, 其他 RuBisCO 相关蛋白都出现下调表达, 这种碳代谢水平的下降说明植物在冬季减少代谢来适应低温胁迫, 同时这些蛋白在表达量上的差异说明了在应答低温胁迫时植物蛋白质表达的复杂性, 因为即使是同一种蛋白, 构成蛋白的不同亚基在不同状态下也可能存在表达量的差异。

蛋白点 108 经鉴定可能为放氧增强蛋白 1 (oxygen-evolving enhancer protein 1), 蛋白点 109 可能为假想蛋白 (hypothetical protein), 经过 BLAST 和 KEGG 分析, 推测为光系统 II 放氧复合体 33 kD

亚基 OEP (photosystem II oxygen-evolving complex 33 kD subunit), OEP 是一种锰稳定蛋白, 参与能量代谢和光合作用 (Sugihara et al., 2000)。这两个蛋白点在 10 月开始增强表达, 在 11 月到达顶峰并逐渐开始回落 (图 4, A)。

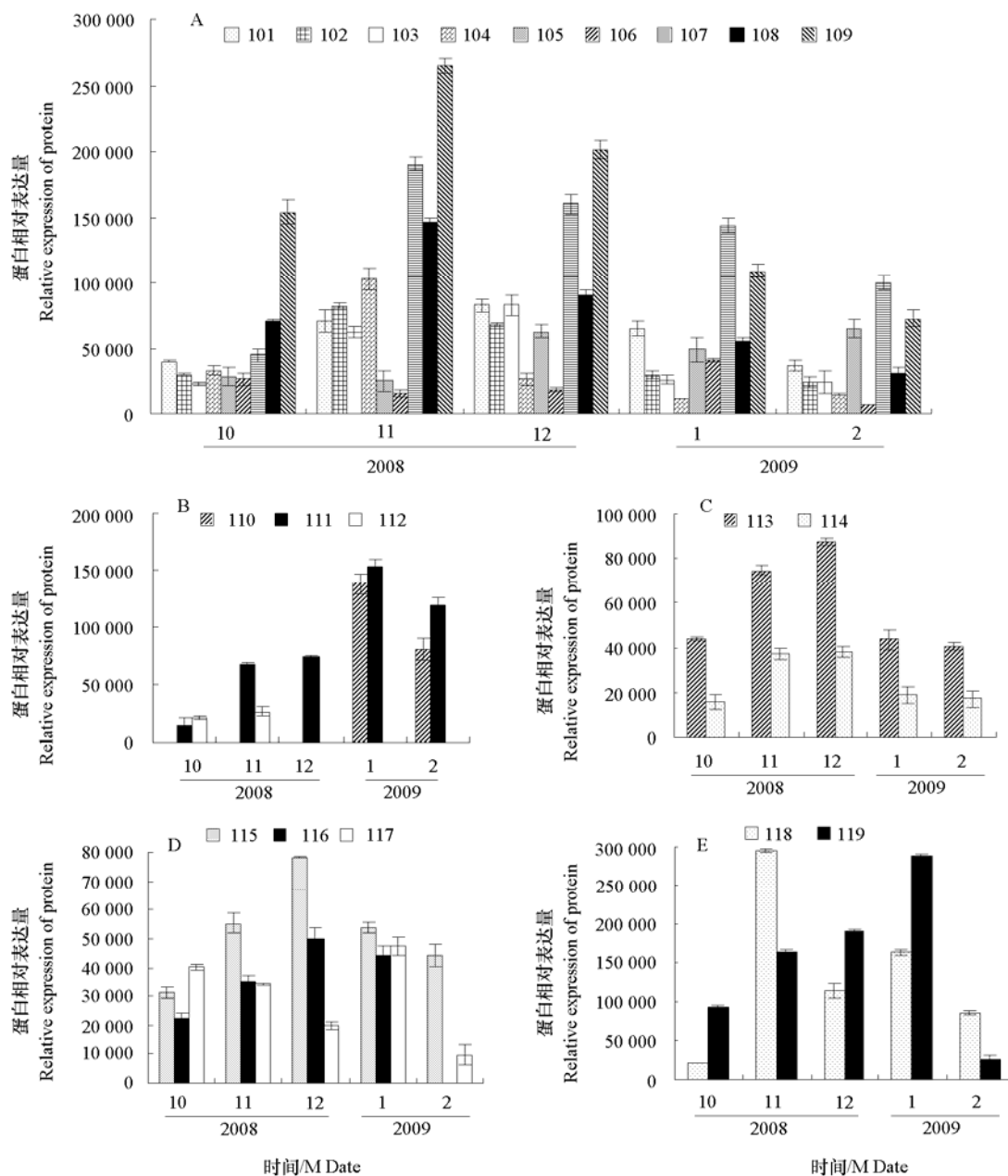


图 4 差异蛋白质 (101 ~ 119) 的相对表达量在不同月份的变化

Fig. 4 Monthly variations of relative expression of identified proteins

以上 9 个光合作用相关蛋白质在植物越冬过程中的变化规律, 表明光合作用元件对冬季低温是敏感的, 这可能也是净光合速率在冬季降低的一个主要原因 (Yan et al., 2006)。

蛋白点 110 经鉴定可能为前苯丙脱水酶[ADT6 (arogenate dehydratase 6) arogenate dehydratase/prephenate], 又称为预苯酸脱水酶, 负责苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸的合成 (<http://www.uniprot.org/uniprot/Q9SGD6>)。蛋白点 111 经鉴定可能为果糖二磷酸醛缩酶 (fructose-bisphosphate aldolase,

putative dehydratase, FBPase), 参与糖酵解/糖异生, 磷酸戊糖途径, 果糖和甘露糖代谢, 光合作用中的碳固定, 生物碱与植物激素的合成和代谢通路 (Regina & Shimon, 2000)。蛋白点 110 在 10 月、11 月和 12 月都没有表达, 在次年 1 月才出现表达, 2 月表达量略微下降 (图 4, B)。

蛋白点 111 在越冬期间的 5 个月中表达量不断增强, 在 1 月到达顶峰并开始回落 (图 4, B)。这一结果表明 FBPase 可能与植物适应冬季低温胁迫时的能量和物质代谢有关。

蛋白点 112 经鉴定可能为果糖 - 6 - 磷酸醛缩酶 (fructose-6-P aldolase), 参与磷酸戊糖途径, 来自莽草酸途径的生物碱的合成, 植物激素的合成和代谢通路, 在 10 和 11 月有轻微表达量, 从 12 月开始没有表达 (图 4, B)。

2.4.2 调节蛋白

蛋白点 113 经鉴定可能为肌动蛋白 (actin), 涉及多种细胞内过程, 包括细胞通讯、肌动蛋白细胞骨架调节、细胞分裂等 (Lee & Workman, 2007)。

蛋白点 114 经鉴定可能为类 FtsH 蛋白前体 (FtsH-like protein Pftf precursor), 通过 BLAST 和 KEGG 分析推测此蛋白为细胞分裂蛋白酶 FtsH (cell division protease FtsH), 参与蛋白质的折叠、分选与降解、细胞生长与死亡等细胞内过程 (Cui et al., 2005)。

蛋白点 113 和 114 在越冬的 5 个月的表达变化规律基本相似。二者均在 10 月开始上调表达, 在 12 月到达顶峰并开始迅速回落 (图 4, C)。

2.4.3 防御应答

蛋白点 115 经鉴定可能为反转录转座子蛋白 (retrotransposon protein), 是属于 Ty3-gypsy 亚族的一种推测蛋白质, 其基因序列富含抗病基因片段 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/77549344>)。其在 10 月表达量开始逐渐上升, 在 12 月到达顶峰并开始回落 (图 4, D)。反转录转座子被外部环境变化或胁迫激活在真核生物中是一种共同机制。植物反转录转座子被认为与胁迫激活的分子途径密切相关, 它可能通过修饰控制植物抗病基因表达的顺式作用因子来发挥作用 (Grandbastien, 1998)。

蛋白点 116 经鉴定可能为 Os08g0412100, 通过 BLAST 和 KEGG 分析推测此蛋白为抗病蛋白 (disease resistance protein RPM1), 在植物对环境的适应和植物 - 病原菌相互作用过程中发挥作用 (Torneroa et al., 2002)。其表达量自 10 月开始增强, 在 12 月达到顶峰, 翌年 1 月迅速回落 (图 4, D)。

蛋白点 117 经鉴定可能为未命名蛋白产物 (unnamed protein product), 通过 BLAST 和 KEGG 分析推测此蛋白为胁迫相关蛋白 (Stress-related protein) 或命名为橡胶延长因子蛋白 [Rubber elongation factor protein (REF)] (Sookmark et al., 2002)。其在 10 月就有表达, 11 和 12 月略回落, 翌年 1 月又上升至 10 月水平, 2 月才出现下降 (图 4, D)。

2.4.4 未知功能蛋白

蛋白点 118 经鉴定可能为保守假定蛋白 (conserved hypothetical protein), 此蛋白在 10 月开始上调表达, 在 11 月到达峰值, 之后表达量开始下降; 蛋白点 119 经鉴定可能为假定蛋白 (hypothetical protein), 此蛋白在翌年 1 月表达量升至顶点, 之后下降 (图 4, E)。这两个蛋白的具体功能目前还没有得到验证。

3 讨论

蛋白质组复杂多变的特点与蛋白质作为细胞功能执行者的身份直接相关。在细胞中, 除管家蛋白外, 多数蛋白参与功能行使, 参与对环境刺激的反应, 当细胞功能或细胞环境发生改变时, 细胞

中蛋白质表达会相应变化,以能动应对各种环境变化(邵彩虹 等,2008)。通过对越冬过程中叶片生理生化指标的测定和差异蛋白质的鉴定和功能分析,共鉴定出涉及能量与代谢的蛋白 12 个、调控蛋白 2 个、防御应答蛋白 3 个和未知功能蛋白 2 个。

在 10—11 月期间,随着室外气温的快速下降,北海道黄杨的光合作用和糖类合成相关蛋白质(蛋白点 101~107、蛋白点 109)的表达量快速增加,同时细胞内可溶性糖的含量也快速增加,吴娜等(2006)也观察到类似的结果。这说明植物在抗寒锻炼过程中大量积累糖类物质,降低了水势,增加了细胞持水力,降低冰点,加强树体营养,提高锻炼效果,还可为春季的早期生长提供能源和底物,促进脱落酸积累,间接诱导蛋白质合成。在 11 月之后,RuBisCO 相关蛋白质表达量下调,同时负责清除 ROS 的过氧化物酶活性逐渐增强。Ahsan 等(2007)曾在研究番茄叶片应答水分缺失胁迫时发现 RuBisCO 和 RuBisCO 活化酶出现下调表达,并认为 ROS 可能修饰 RuBisCO,使其易于被蛋白酶所降解,推测 ROS 促进 RuBisCO 或 RuBisCO 活化酶的降解,其可能参与了水分缺失及其他环境胁迫下叶片衰老时的分子应答,本试验结果与其一致。

蛋白点 108 和 109 被推测为 OEP,Jung 等(2006)在研究一个独特的稻瘟病类病变突变体时,发现 OEP 蛋白在突变株 *blm* 中存在差异表达,并认为这种蛋白涉及氧气释放和光系统 II 的稳定性。钟传飞等(2008)研究了北京地区大叶黄杨越冬进程中光系统 II 的行为特征,发现大叶黄杨叶片的光合速率从 11 月开始下降,在次年 1 月到达最低点,本试验观察到的北海道黄杨越冬期间叶片蛋白点 108 和蛋白点 109 的变化与之相一致。

蛋白点 110 被推测为前苯丙脱水酶,以往有研究表明此酶定位在叶绿体基质中(Cho et al.,2007)。该酶的主要作用是通过莽草酸分支通路将苯丙氨酸前体转变为苯丙氨酸。而芳香族氨基酸又是植物体内许多化合物的合成前体,可以转变为木质素、生长素、单宁和生物碱吗啡等物质(Nelson & Cox,2000)。

蛋白点 111 被推测为 FBPase,Hou 等(2009)研究了冬小麦阶段白化系突变株 *FA85*,这种白化系突变株在早春返青期全株变为白色,而在气温回升时才转变为绿色。其 FBPase 较其亲本小麦 *Aibian1* 大幅下调表达,认为 FBPase 的下调表达与低温驯化有关。Regina 和 Shimon(2000)也报道了 FBPase 与燕麦叶绿体的热诱导适应相关。Jorge 等(2006)在研究圣栎(*Quercus ilex* L.)叶片蛋白质组应答干旱胁迫时也发现 FBPase 增强表达。在拟南芥中也报道过有许多胁迫环境诱导糖代谢相关基因编码的糖酵解酶的产生(Jung et al.,2003)。本试验观察到的北海道黄杨越冬期间叶片蛋白点 110 表达量不断增加的结果与之一致。

蛋白点 112 被推测为果糖-6-磷酸醛缩酶,有研究表明低温胁迫不仅降低了糖酵解的活性,同时也降低了磷酸戊糖途径活性,电子传递途径转变为抗氰呼吸,这种途径的改变对低温下植物体内开辟能量流起重要作用(周功克 等,2000)。

在 10—12 月期间,叶片的相对电导率快速降低,而被推测为肌动蛋白的蛋白点 113 的相对表达量快速增强,表明细胞膜对低温的敏感性,随着温度快速下降其透性也出现较大变化。肌动蛋白被认为在植物感知低温信号过程中参与钙离子内流所激发的细胞膜流动性的改变,蛋白质代谢被认为是植物应答低温胁迫时的主要过程,Orvar 等(2000)在对紫花苜蓿的研究中发现肌动蛋白的聚合剂和解聚剂会对钙离子内流分别带来抑制和促进的效果,表明其在钙离子流信号感知过程中起到重要作用。在研究水稻秧苗应答低温胁迫时也发现 FtsH 蛋白前体和其他一些蛋白质代谢相关分子伴侣和蛋白酶,并认为新的蛋白质合成对植物应答低温胁迫是必需的,植物细胞中有活性的蛋白质质量控制系统在植物抵御低温胁迫过程中发挥重要作用(Mann,2000)。

蛋白点 116 被推测为抗病蛋白(RPM1),Boyes 等(1998)在研究拟南芥过敏反应时发现 RPM1 是一种质膜外周蛋白,在过敏性反应发生时 RPM1 退化,表明在感染部位存在一个负反馈回路,控

制着细胞程序性死亡和整体抗病反应的程度。

蛋白点 117 被推测为胁迫相关蛋白。Jorge 等 (2006) 在圣栎叶片不同发育阶段的蛋白质组分析中也鉴定了这种蛋白质。蛋白点 116 和 117 在冬季的稳定表达和在 2 月的表达量下降可能与 2 月温度回升, 胁迫条件逐渐解除有关。

游离脯氨酸在 1 月大量产生, 同时负责合成芳香氨基酸的前苯丙脱水酶 (蛋白点 108) 也在 1 月大量产生, 与此同时反转录转座子蛋白 (蛋白点 115)、病原相关蛋白 (蛋白点 116) 在 12 和 1 月表达达到最大值, 这些证据均表明北海道黄杨叶片在冬季应答低温胁迫过程中, 胁迫相关蛋白质的产生具有重要作用。

以上结果说明在北海道黄杨应答冬季低温胁迫过程中叶片蛋白质组变化与生理生化过程变化相一致, 同时也证明了采用植物蛋白质组学技术来进行抗逆性研究的可行性。应用蛋白质组学和生物信息学方法并结合植物逆境生理学, 有望探明植物在逆境过程中涉及的蛋白质所参与的代谢途径及其作用机理。

References

- Ahsan N, Lee D G, Lee S H. 2007. A comparative proteomic analysis of tomato leaves in response to waterlogging stress. *Physiologia Plantarum*, 131 (4): 555 - 570.
- Bradford M M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248 - 254.
- Boyes D C, Nam J, Dangl J L. 1998. The *Arabidopsis thaliana* RPM1 disease resistance gene product is a peripheral plasma membrane protein that is degraded coincident with the hypersensitive response. *PNAS*, 95 (26): 15849 - 15854
- Candiano G, Bruschi M, Musante L, Santucci L, Ghiggeri G M, Carnemolla B, Orecchia P, Zardi L, Righetti P G. 2004. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *Electrophoresis*, 25: 1327 - 1333.
- Cho M H, Corea O R, Yang H, Bedgar D L, Laskar D D, Anterola A M, Moog-Anterola F A, Hood R L, Kohalmi S E, Bernards M A, Kang C, Darin L B L, Lewis N G. 2007. Phenylalanine biosynthesis in *Arabidopsis thaliana* (Identification and characterization of arogenate dehydratases). *The Journal of Biol Chem*, 282 (42): 30827 - 30835.
- Cui S, Huang F, Wang J. 2005. A proteomic analysis of cold stress responses in rice seedlings. *Proteomics*, 5: 3162 - 3172.
- Grandbastien M A. 1998. Activation of plant retrotransposons under stress conditions. *Trends in Plant Science*, 3 (5): 181 - 187.
- Guan Xue-lian, Zhang Yu, Ma Qing-shui, Wan Shan-xia, Yu Jian-jun. 2007. Variation of the POD, SOD activity and MDA content in the foliar structure of 4 evergreen broad-leaf plants within autumn-winter period. *Journal of Anhui Agricultural Science*, 35 (15): 4422 - 4423. (in Chinese)
- 关雪莲, 张 宇, 马清水, 万善霞, 于建军. 2007. 4 种常绿阔叶植物越冬期间叶片组织 POD、SOD 活性和 MDA 含量的变化. *安徽农业科学*, 35 (15): 4422 - 4423.
- Hao Qiang, Ge Xiu-xiu, Zhang Rui-li, Wei Li-li, Guan Xue-lian. 2010. A modified 2-DE technique for leaf proteomics analysis of northern evergreen broad-leaf woody plants. *Acta Bot Boreali-occident Sinica*, 30 (9): 1906 - 1912. (in Chinese)
- 郝 强, 葛秀秀, 张睿鹏, 尉莉莉, 关雪莲. 2010. 北方常绿阔叶木本植物叶片蛋白质双向电泳技术体系优化. *西北植物学报*, 30 (9): 1906 - 1912.
- Hou D, Xu H, Du G. 2009. Proteome analysis of chloroplast proteins in stage albinism line of winter wheat (*Triticum aestivum*) FA85. *BMB Reports*, 450 - 455.
- Jorge I, Navarro R M, Lenz C. 2006. Variation in the holm oak leaf proteome at different plant developmental stages, between provenances and in response to drought stress. *Proteomics*, 6: S207 - S214.
- Jung S H, Lee J Y, Lee D H. 2003. Use of SAGE technology to reveal changes in gene expression in *Arabidopsis* leaves undergoing cold stress. *Plant Mol Biol*, 52: 553 - 567.
- Jung Y H, Rakwal R, Agrawal G K. 2006. Differential expression of defense/stress-related marker proteins in leaves of a unique rice blast lesion

- mimic mutant (*blm*). *J Proteome Res*, 5 (10): 2586 – 2598.
- Lee K K, Workman J L. 2007. Histone acetyltransferase complexes: One size doesn't fit all. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 8: 284 – 295.
- Li He-sheng. 2000. Principles and technology of plant physiology and biochemistry experiments. Beijing: Higher Education Press. (in Chinese)
- 李合生. 2000. 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社.
- Mann N H, Novac N, Mullineaux C W. 2000. Involvement of an FtsH homologue in the assembly of functional photosystem I in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC6803. *FEBS Lett*, 479 (12): 72 – 77.
- Nakano R, Ishida H, Makino A. 2006. *In vivo* fragmentation of the large subunit of ribulose-1, 5-bisphosphate carboxylase by reactive oxygen species in an intact leaf of cucumber under chilling-light conditions. *Plant Cell Physiol*, 47: 270 – 276.
- Nelson D L, Cox M M. 2000. Lehninger principles of biochemistry. USA. WH Freeman.
- Orvar B L, Sangwan V, Omann F. 2000. Early steps in cold sensing by plant cells, the role of actin cytoskeleton and membrane fluidity. *The Plant Journal*, 23 (6): 785 – 794.
- Regina M, Shimon G. 2000. Identification and characterization of a heat-induced isoform of aldolase in oat chloroplast. *Plant Mol Bio*, 44: 487 – 498.
- Renaut J, Lutts S, Hoffmann L. 2004. Responses of poplar to chilling temperatures: Proteomic and physiological aspects. *Plant Biology*, 6: 81 – 90.
- Shao Cai-hong, Wang Jing-yuan, Lin Wen-xiong. 2008. Differential proteomics analysis of leaf development at rice (*Oryza sativa*) seedling stage. *Scientia Agricultura Sinica*, 41 (11): 3831 – 3837. (in Chinese)
- 邵彩虹, 王经源, 林文雄. 2008. 苗期水稻叶片发育进程的差异蛋白质组学分析. *中国农业科学*, 41 (11): 3831 – 3837.
- Sookmark U, Pujade-Renaud V, Chrestin H. 2002. Characterization of polypeptides accumulated in the latex cytosol of rubber trees affected by the tapping panel dryness syndrome. *Plant Cell Physiol*, 43: 1323 – 1333.
- Sugihara K, Hanagata N, Dubinsky Z. 2000. Molecular characterization of cDNA encoding oxygen evolving enhancer protein 1 increased by salt treatment in the mangrove *Bruguiera gymnorhiza*. *Plant Cell Physiol*, 41: 1279 – 1285.
- Torneroa P, Chaoa R A, Luthina W N. 2002. Large-scale structure-function analysis of the *Arabidopsis* RPM1 disease resistance protein. *The Plant Cell*, 14: 435 – 450.
- Wang W, Rita V, Monica S, Mauro C. 2006. A universal and rapid protocol for protein extraction from recalcitrant plant tissues for proteomic analysis. *Electrophoresis*, 27: 2782 – 2786.
- Wang Z Y, Portis A R. 1992. Dissociation of ribulose-1,5-bisphosphate bound to ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and its enhancement by ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase mediated hydrolysis of ATP. *Plant Physiol*, 99: 1348 – 1353.
- Wu Feng-zhang. 2008. Proteomic analysis of low temperature stress responses and chloroplast RNA binding proteins in *Betula platyphylla* [Ph. D. Dissertation]. Harbin: Northeast Forestry University. (in Chinese)
- 乌凤章. 2008. 白桦低温胁迫响应与叶绿体 RNA 结合蛋白的蛋白质组学研究 [博士论文]. 哈尔滨: 东北林业大学.
- Wu Na, Zhou Huai-jun, Xiao Fang. 2006. Changes of water content and soluble sugar in the leaves of three evergreen broad-leaf plants of *Celastraceae* during overwintering. *Journal of Northwest Forestry University*, 21 (4): 36 – 38. (in Chinese)
- 吴 娜, 周怀军, 肖 芳. 2006. 3 种常绿阔叶植物越冬期间叶片水分及可溶性糖的动态变化. *西北林学院学报*, 21 (4): 36 – 38.
- Yan S P, Zhang Q Y, Tang Z C, Su W A, Sun W N. 2006. Comparative proteomic analysis provides new insights into chilling stress responses in rice. *Molecular & Cellular Proteomics*, 5: 484 – 496.
- Zhong Chuan-fei, Gao Zhi-kui, Li Wei. 2008. Study on characteristic of chlorophyll a fluorescence kinetics of overwintering *Euonymus japonicus* in Beijing. *Journal of Agricultural University of HeBei*, 31 (5): 9 – 14. (in Chinese)
- 钟传飞, 高志奎, 李 伟. 2008. 北京地区大叶黄杨越冬进程中光系统 II 的行为特征. *河北农业大学学报*, 31 (5): 9 – 14.
- Zhou Gong-ke, Li Hong-yu, Wen Jiang-qi, Kong Ying-zhen, Liang Hou-guo. 2000. The cyanide-resistant respiration in callus of *Nicotiana rustica* cv. Gansu yellow flower under low temperature. *Acta Botanica Sinica*, 42 (7): 679 – 683. (in Chinese)
- 周功克, 李红玉, 文江祁, 孔英珍, 梁厚果. 2000. 低温胁迫下甘肃黄花烟草愈伤组织的抗氰呼吸. *植物学报*, 42 (7): 679 – 683.