

大豆种子萌发中蛋白质组成的双向电泳分析^{*}

徐晓燕¹ 郑蕊^{1,2} 李春梅¹ 喻德跃^{1*}

(1. 南京农业大学大豆研究所, 国家大豆改良中心, 作物遗传与种质创新国家重点实验室, 南京 210095; 2. 宁夏大学生命科学学院, 银川 750021)

摘要 采用双向电泳技术分析大豆种子萌发时期蛋白质的差异表达。研究发现, 在考染胶上, 通过 PDQuest 分析, 在成熟干种子和萌发种子的 2-DE 图谱上分别获得 341 和 376 个蛋白斑点, 两个时期的 2-DE 图谱非常相近, 说明绝大部分大豆种子贮藏蛋白在萌发期尚未开始降解。有 21 个蛋白点在萌发的大豆种子中表达量上调, 9 个表达量下调。对这些蛋白的进一步鉴定将有助于深入理解大豆种子萌发过程的生理及分子机制。

关键词 大豆, 双向电泳(2-DE), 萌发

中图分类号 S565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2006)04-0355-05

种子在高等植物的生命周期中占据核心地位, 种子的萌发是幼苗生长的先决条件, 是植物生命延续的保证。当种子吸收了充足的水分, 在适宜温度和有氧条件下, 有活性的种子就可以萌发。从狭义上讲, 萌发是指种子吸水后, 胚轴伸长胚根突破种皮^[1], 它是一个复杂的生理过程。蛋白质组学(Proteomics)技术的发展为研究复杂代谢过程提供了有效而可靠的手段, 它是对生物体生命活动最终执行者——蛋白质的定量、动态和整体性的研究, 而双向电泳(2-dimensional gel electrophoresis, 2-DE)技术是蛋白质组研究的核心技术之一^[2,3]。它以蛋白质的等电点和分子量作为独立参数, 第一向按蛋白质的等电点不同, 对样品进行等电聚焦(Isoelectric focusing, IEF)分离, 然后在第二向根据分子量大小用十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)进行分离, 最终可获得分辨率很高的二维图谱, 为后续蛋白质的鉴定提供良好的基础^[4]。

在大豆种子蛋白质组学领域, Mooney 等^[5]已研究得到大豆成熟干种子的双向电泳图谱, 并鉴定了部分蛋白。Hajduch 等^[6]研究大豆种子发育的进程, 得到了大豆种子不同发育时期的 2-DE 图谱, 鉴定了考染胶上全部的蛋白。但到目前为止尚未开展过大豆种子萌发的蛋白质组学研究。模式植物拟

南芥中, Gallardo 等^[7]在 2-DE 银染胶上检测出的 1300 多个拟南芥种子蛋白质, 其中在吸胀期间或胚根伸出期间有 74 个蛋白质在质和量上发生改变。大豆种子在一定的温度湿度条件下萌发时蛋白质的变化, 反映了基因组被激活基因的表达情况, 是种子内生理代谢从相对静止状态到活跃状态的转变, 对探讨休眠和萌发的机理及完善大豆种子生物学的研究有重要的意义。

本研究采用双向电泳技术, 通过比较成熟干种子和萌发大豆种子蛋白的 2-DE 图谱的差异, 从蛋白质分子水平上探寻大豆种子萌发时蛋白质的变化规律, 为进一步探索大豆种子的萌发机理及相关基因的克隆奠定基础。

1 材料

1.1 大豆材料

大豆种子 N2899, 由南京农业大学国家大豆改良中心种质资源研究室提供。

1.2 试剂及设备

尿素, 硫脲, 甘氨酸, 三氨基甲烷(Tris), 碘乙酰胺, 低熔点琼脂糖, 十二烷基磺酸钠(SDS), 丙烯

* 收稿日期: 2006-03-09

基金项目: 教育部跨世纪优秀人才基金和农业部“948”项目。

作者简介: 徐晓燕(1982-), 硕士, 研究方向: 植物基因工程。

通讯作者: 喻德跃教授, 博士生导师, E-mail: dyu@njau.edu.cn

酰胺, 甲叉双丙烯酰胺, 四甲基乙二胺 (TEMED), 过硫酸胺 (AP), 碘乙酰胺, 二硫代苏糖醇 (DTT), 牛血清白蛋白 (Albumin Bovine) 为 AMRESO 分装; IPG 预制胶条, 载体两性电解质, 矿物油等均为 Bio-Rad 公司产品; 蛋白酶抑制剂 (protease inhibitor cocktail) 为 Sigma 产品; 考马斯亮兰 G-250、蔗糖、硫酸胺、三氯乙酸 (TCA) 和甘油等试剂为国产分析纯。

等电聚焦电泳仪 Protean IEF cell, 垂直板电泳仪 Ettan DALT six 为 Amersham Pharmacia Biosciences 公司产品; VersaDoc 3000 凝胶成像系统, PDQuest 图像分析软件均为 Bio-Rad 公司产品; 超速离心机为美国 Beckman 公司产品; Vcx600 超声破碎仪美国天美公司产品。

2 方法

2.1 萌发时期大豆种子样品的准备

选取干燥度一致、饱满、种皮色泽正常的种子, 将所有大豆种子经 0.1% HgCl_2 溶液浸没消毒 2min 后用纯水漂洗 6 次, 吸水纸吸干 (注: 整个过程不超过 5min, 以避免种子吸水膨胀), 然后将种子置于分别含 18ml 去离子水、垫有双层 9cm 定性滤纸的玻璃培养皿 (内径为 9cm 中), 每皿 30 粒。并用圆头玻棒将滤纸下面的气泡赶出, 使纸平整, 盖上盖, 置于 25℃ 摄氏度恒温光照培养箱中避光发芽。取胚根突破种皮 2~3mm 的种子, 去皮 -80℃ 保存。

2.2 大豆种子可溶性蛋白 2-DE 样品制备

用三氯乙酸 (TCA) 法, 蛋白样品的提取在低温下操作, 方法参照郑蕊等^[8] 并略做改进。大豆干种子 5 粒去皮和胚根突破种皮 2~3mm 的萌发的种子 5 粒, 加入 10% PVP, 于液氮中磨成粉末, 转入 10mL 离心管中, 加入 5mL 冷 10% TCA-丙酮溶液, 内含 20mM 的 DDT, -20℃ 沉淀 1h, 4℃ 15,000rpm 离心 15min, 沉淀悬浮于 5mL 冷丙酮中 (内含 20mM 的 DDT), -20℃ 放置 2h 或过夜, 期间间歇振荡, 4℃, 15,000rpm, 离心 20min, 去丙酮, 该步重复 3~4 次, 直到有机相呈无色为止。将沉淀冷冻干燥成粉, 即制得丙酮粉。

每 mg 丙酮粉加入 15ul 的蛋白质裂解缓冲液 (7M 脲、2M 硫脲、4% CHAPS、65 mM 的 DTT、2% 载体两性电解质 pH3-10, 0.1% protease inhibitor cocktail) 溶解。4℃ 搅拌摇床摇匀 2h, 冰浴超声波处理 3min, 4℃, 35,000g 离心 20min (重复一次),

取上清液, 即得蛋白样品, 分装, -80℃ 冻存。以牛血清白蛋白作为标准品, 采用 Bradford 法^[9] 测定样品液中蛋白质的浓度。

2.3 种子可溶性蛋白的双向电泳 (2-DE)

2.3.1 第一向固相 pH 梯度等电聚焦电泳 (IPG-IEF) 每个样品用水化液 (7M 脲、2M 硫脲、4% CHAPS、65 mM 的 DTT、2% 载体两性电解质 pH3-10, 痕量溴酚兰) 分别稀释, 涡旋混匀, 12000rpm 离心 10min, 取上清液上样到等电聚焦盘中。每根 17 cm pH3-10 线性 IPG 预制胶条, 考染蛋白质上样量为 1mg, 总上样体积为 350μl。

第一向 IEF, 将 pH3-10, 17cm 干胶条从 -80℃ 冰箱中取出, 在室温下放置 10min 后, 去掉保护膜, 胶面朝下紧贴样品, 赶走胶条与样品液之间的气泡, 室温放置 1h 后, 胶条上加入 2~3mL 矿物油。在 IPGphor 电泳仪上等电聚焦, 电泳温度为 19℃, 等电聚焦电泳参数设置为, 水化在 50V 低电压下 12h, 然后经过 200V 0.5h、500V 0.5h、1000V 1h、2000V 1h, 最后稳定在 8000V 下进行 50000Vhr。

2.3.2 平衡 聚焦完毕后, 胶条先在平衡液 I (0.375M Tris HCl pH 8.8, 6M 尿素, 30% 甘油, 5% SDS, 2% DTT) 中于摇床平衡 15min, 再在平衡液 II (2.5% 碘乙酰胺替代 2% DTT, 其余组分同于平衡液 I) 中平衡 15min。

2.3.3 第二向 SDS PAGE 第二向 SDS PAGE 采用分离胶浓度为 12%。用低熔点琼脂糖封胶液 (0.5% 低熔点琼脂糖, 25 mM Tris, 198 mM 甘氨酸, 0.1% SDS, 痕量溴酚兰) 封闭, 待封胶液凝固后, 在酸性端加相对分子质量标准蛋白质, 进行第二向垂直电泳。5w/gel 恒功率电泳, 待溴酚蓝前沿进入分离胶后, 再以 15w/gel 恒功率电泳, 直到溴酚蓝前沿到达距玻璃板底部 0.5~1cm 处, 结束电泳, 准备剥胶与染色。

2.3.4 考马斯亮蓝染色 ddH₂O 水洗 3 次, 每次 15min, 12% TCA 固定 2h 后, ddH₂O 水洗 3 次, 每次 15min。20% 甲醇, 1.6% 磷酸, 8% 硫酸铵和 0.08% 考马斯亮蓝 G250 染色 16~24h, ddH₂O 漂洗脱色。

2.3.5 2-DE 图像分析 凝胶用 Bio-Rad 公司 VersaDoc 3000 凝胶成像系统扫描并用 PDQuest 软件进行图像的分析处理, 包括背景消减、斑点检测、匹配、分子量和等电点计算、获取斑点位置坐标及蛋白质质量值的标准化分析等。

3 结果

3.1 2-DE 图谱的特征

成熟干大豆种子和萌发时大豆种子蛋白的 2-DE 图谱见图 1A 和图 1B。根据 Cartesin 坐标系, 从左到右等电点增加, 从上往下分子质量降低。从图 1 可以看到, 两图谱左右两侧斑点较少, 中间 (PI 在 7.0 附近) 斑点数目相对集中。蛋白质分子

大小主要集中在 15KD 至 100KD 之间。各点染色深浅和面积差异很大, 示意蛋白质质量各不相同。

3.2 2-DE 图谱分析

通过严格一致的程序操作, 得到了重复性很高的 2-D 电泳图谱。PDQuest 软件分析这两个时期的蛋白图谱(图 1), 在 pH3-10, 分子量 10-120KD 范围内分别检测到 341、376 个蛋白点, 两个时期 2-DE 图谱蛋白点匹配率平均为的 79.9%。

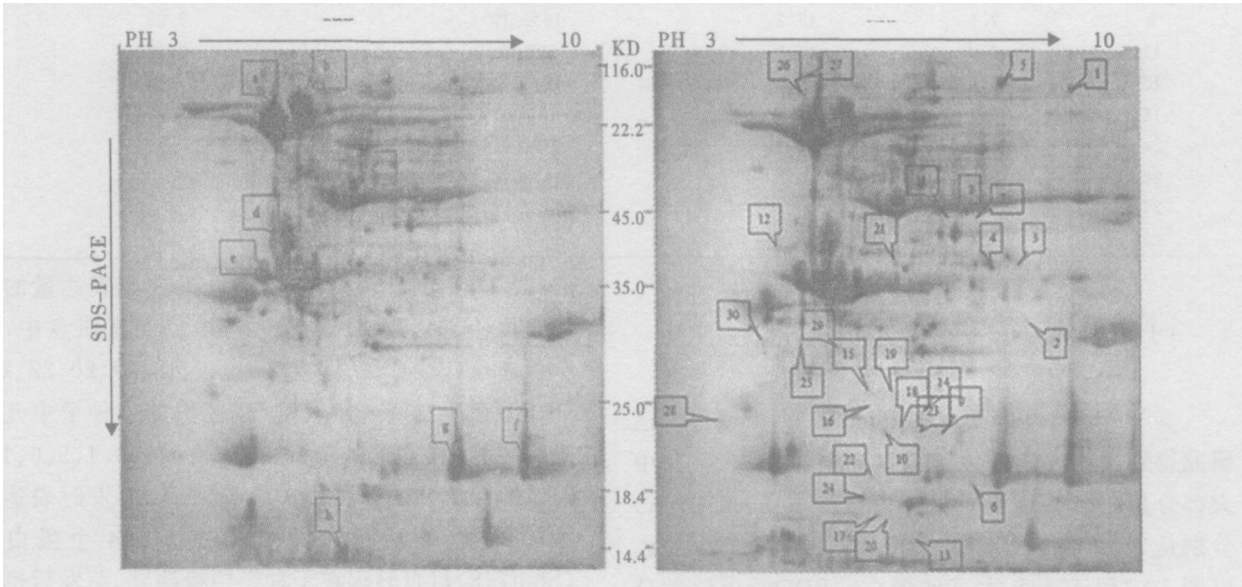


图 1 成熟干大豆种子 (A) 和萌发的大豆种子 (B) 蛋白 2-DE 图谱

Fig. 1 2-DE gels of mature dry (A) and germinated (B) soybean seed proteins

表 1 萌发种子中表达量增加的蛋白

Table 1 Proteins up regulated in germinated seed

蛋白点编号	等电点	分子量	干种子中蛋白量	萌发种子中蛋白量
Spot numbers	Isoelectric point	Molecular mass(KD)	Protein quantity in dry mature seed	Protein quantity in germinated seed
1	8.8	105.8	700.65	1406.36
2	8.2	30.6	7.16	135.49
3	8.2	39.2	435.64	762.52
4	7.8	38.3	1008.15	1912.73
5	7.9	109.9	2007.13	3339.84
6	7.6	19.2	213.61	566.69
9	7.2	27.2	7.15	362.11
10	6.4	22.5	7.15	693.36
12	5.1	44.4	7.15	1260.88
13	6.9	15.5	696.15	68650.62
14	7.0	24.1	7.15	345.09
17	6.4	16.8	7.15	367.54
18	6.2	22.8	7.15	787.55
19	6.5	25.4	7.15	348.92
20	6.5	16.5	7.15	174.59
21	6.5	38.4	285.62	599.86
22	6.3	19.6	7.15	241.59
23	6.9	22.8	7.15	639.31
25	5.2	29.4	178.64	607.14
28	4.2	22.8	7.15	478.38
30	4.7	29.2	7.15	501.79

PDQuest 软件分析各个蛋白随种子萌发进程的出现与否以及表达量的增减,检测到质量较好的表达量变化超过 1.5 倍以上的蛋白点 30 个(表 1、表 2),都是低丰度蛋白,高丰度蛋白在种子的萌发

期变化不明显。表 1 给出了相对于成熟的干种子萌发时表达量增加的蛋白点;表 2 给出了相对于成熟的干种子萌发时表达量降低的蛋白点。

表 2 萌发种子中表达量降低的蛋白点

Table 2 Proteins down regulated in germinated seed

蛋白点编号	等电点	分子量	干种子中蛋白量	萌发种子中蛋白量
Spot numbers	Isoelectric point	Molecular mass(KD)	Protein quantity in dry mature seed	Protein quantity in germinated seed
7	7.5	46.7	1107.74	7.28
8	7.4	47.2	1636.19	7.28
11	7.2	46.2	593.83	7.28
15	6.2	25.9	1574.20	876.31
16	6.2	24.4	159.12	7.28
24	6.1	18.1	2351.97	1149.76
26	5.2	90.1	1573.19	900.92
27	5.2	108.7	1121.98	620.81
29	5.8	28.9	2137.07	759.40

4 讨论

鉴于 Mooney 等^[19], Hajduch 等^[6], 郑蕊等^[8] 已研究得到大豆成熟干种子的双向电泳图谱,且其中大部分蛋白已鉴定出。据此可推测 a、b、c(图 1A) 分别是 7Sβ- 伴大豆球蛋白的 α′、α、β 亚基;d、e、f、g、h(图 1A)属于 11S 大豆球蛋白。PDQuest 软件分析表明,它们的含量一直保持较高的水平,几乎没有变化。胚轴伸长,胚根突破种皮,萌发期结束,紧接着是幼苗的生长。因此贮藏蛋白的降解并非在萌发期而是在幼苗生长阶段(Smith, 1981)。当然这种界限并不是绝对的,萌发过程中很少量的贮藏蛋白在有限的区域降解,它们可能是由贮藏的蛋白酶降解的^[11]。

大豆种子蛋白主要是贮藏蛋白,占种子总蛋白的 60%,这些蛋白质之间的表达量差异高达 100 倍,一些低丰度蛋白就会被高丰度蛋白所“遮蔽”,这是在凝胶上检测到比较少蛋白点(图 1)的主要原因^[10]。在研究中,也尝试过通过调整上样量来优化 2-DE 胶,减小上样量,横向条纹、纵向条纹、拖尾现象明显减轻,但检测到的蛋白点数变少,差异蛋白点基本上都是低丰度蛋白,检测到的就更少;增加上样量,横向条纹、纵向条纹、拖尾现象严重,而且第一向聚焦不好,影响实验结果。当然最彻底的方法,是去除这些贮藏蛋白,但贮藏蛋白是以复杂的膜结合蛋白体的形式存在于种子中的^[12],植物中尚未见到相关报道,需研究摸索。

的(表 1),9 个下调的(表 2),且蛋白点表达量的变化幅度不同。在 21 个表达量增加的蛋白点中,13 个蛋白点(Spot2、9、10、12、14、17、18、19、20、22、23、28、30)在萌发期大量表达,在成熟的干种子中几乎未检测到;其它的 8 个蛋白点(Spot1、3、4、5、6、13、21、25)在成熟的干种子中能检测到,萌发时表达量增加。9 个表达量降低的蛋白点中 4 个蛋白点(Spot7、8、11、16)仅在干种子中检测到,萌发后迅速降解,萌发期几乎检测不到;其它的 5 个蛋白点(Spot15、24、26、27、29)萌发后表达量降低。

何大澄等^[13] 认为在生物体不同的发育阶段会合成类型、数量不同的蛋白质,这些动态变化的蛋白质组构成了细胞某一时刻的特征性生命活动的基础,是认识生命活动本质的一个恰当而直接的途径。蛋白质组学技术为研究这些动态变化的蛋白质提供了一个很好的方法,在对大豆种子萌发时可溶性蛋白双向电泳实验结果分析的基础上,将进一步结合肽质量指纹图谱和数据检索分析鉴定这些差异蛋白,通过这一系列分析技术的不断完善,对萌发时期物质和能量代谢途径、信号通路等有一个较全面的了解。

参 考 文 献

1 Bewley JD. Seed germination and dormancy[J] . Plant Cell, 1997, 9: 1055- 1066
2 乌云塔娜, 张党权, 谭晓风. 蛋白质组学及其在植物研究中的应用[J] . 中南林学院学报, 2005, 25(4): 115- 119.
3 万晶宏, 贺福初. 蛋白质组学技术的研究进展[J] . 科学通报. 1999, 44(9): 904~ 911.

- 4 吴庆知, 黄开勋, 徐辉碧. 双向凝胶电泳技术进展[J]. 生物技术通讯. 2002, 13(2): 28 ~ 30.
- 5 Mooney BP, Thelen JJ. High throughput peptide mass fingerprinting of soybean seed proteins: automated workflow and utility of UniGene expressed sequence tag databases for protein identification[J]. Phytochemistry, 2004, 65: 1733 ~ 1744.
- 6 Hajdich M, Ganapathy A, Stein JW, et al. A Systematic proteomic study of seed filling in soybean. Establishment of high resolution two dimensional reference maps, expression profiles, and an interactive proteome database[J]. Plant Physiology, 2005, 137: 1397 ~ 1419.
- 7 Gallardo K, Job C, Groot SP, et al. Proteomic analysis of Arabidopsis seed germination and priming[J]. Plant Physiol, 2001, 126: 835 ~ 848.
- 8 郑蕊, 喻德跃. 适于蛋白质组研究的大豆种子蛋白双向电泳技术的改进[J]. 大豆科学, 2005, 24(3): 166 ~ 170.
- 9 Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding[J]. Anal Chem, 1976, 72: 248 ~ 254.
- 10 Smith DL. Cotyledons of Leguminosae[J]. In: Polhill RM, Ravens PH, eds. Advances in legume systematics. 1981, London: Royal Botanic Gardens, 927 ~ 940.
- 11 Müntz K, Belozersky MA, Dunaevsky YE, et al. Stored proteinases and the initiation of storage protein mobilization in seeds during germination and seedling growth[J]. Journal of Experimental Botany, 2001, 52(362): 1741 ~ 1752.
- 12 Herman EM, Larkins BA. Protein storage bodies and vacuoles[J]. Plant Cell, 1999, 11: 601 ~ 613.
- 13 何大澄, 肖雪媛. 差异蛋白质组学及其应用. 北京师范大学学报[J]. 2002, 38(4): 558 ~ 562.

2-DE ANALYSIS OF PROTEINS DURING SEED GERMINATION IN SOYBEAN

Xu Xiaoyan¹ Zheng Rui^{1,2} Li Chunmei¹ Yu Deyue^{1*}

(1. Nanjing Agricultural University, Soybean Research Institute, National Center for Soybean Improvement, and National Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing 210095; 2. College of Life Science, Ningxia University, Yinchuan 750021)

Abstract Two dimensional gel electrophoresis (2-DE) was utilized to analyze proteins with differential expressions during soybean seed germination. It was found that 341 and 376 protein spots were present in dry mature seeds and germinated seeds in 2-DE maps, stained by coomassie brilliant blue and analyzed by PDQuest image software. The 2-DE map of germinated seed was very similar to that of dry mature seed, suggesting that most of soybean seed storage proteins weren't mobilized during seed germination. And 21 up regulated proteins and 9 down regulated proteins were found during seed germination. The further identification for these protein spots would help to understand the physiological and molecular mechanisms of soybean seed germination.

Key words Soybean; Two dimensional gel electrophoresis (2-DE); Germination