



# 大豆叶片蛋白响应干旱胁迫的双向电泳分析

甄文轩, 杨晓桐, 郭歌扬, 宋 颖, 赵雨薇, 臧 新

(郑州大学 生命科学院, 河南 郑州 450001)

**摘 要:**大豆是我国重要的农作物之一,蛋白质组学技术是解析植物响应逆境胁迫的重要工具之一。为进一步推进对响应干旱胁迫的大豆叶片蛋白的鉴定工作,以大豆幼苗的叶片为研究对象,用甘露醇溶液模拟干旱胁迫,处理 24 h 后提取叶片蛋白粉进行双向电泳分离和图谱差异分析。结果表明:采取三氯醋酸(TCA)–丙酮沉淀法提取的叶片蛋白进行双向电泳分离能够得到稳定清晰的双向电泳蛋白图谱。采取 PD-Quest 软件对干旱胁迫下的大豆叶片蛋白表达图谱进行差异分析,共检测和匹配 425 个大豆叶片蛋白点,其中差异表达的蛋白点有 101 个,60 个表达量上调,41 个表达量下调。本研究结果表明有一部分大豆叶片蛋白响应了干旱胁迫。

**关键词:**大豆;干旱胁迫;双向电泳;表达图谱

## Two-dimensional Electrophoresis Pattern Analysis of Leaf Proteins from Soybean under Drought Stress

ZHEN Wen-xuan, YANG Xiao-tong, GUO Ge-yang, SONG Ying, ZHAO Yu-wei, ZANG Xin

(School of Life Science, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China)

**Abstract:** Soybean is one of the important crops in China. Proteomics technology is one of the important tools to analyze plant response to stress. To lay the foundation for further identification of homologous proteins of soybean leaf protein in response to drought stress, the leaves of soybean seedlings were used as research objects. The mannitol solution was used to simulate drought stress. After 24 h treatment, the leaf protein powder was extracted for two-dimensional electrophoresis separation and spectral difference analysis. The results showed that the leaf protein was extracted by trichloroacetic acid-acetone precipitation method for two-dimensional electrophoresis analysis to obtain a stable and clear two-dimensional electrophoresis protein map. PD-Quest software was used to analyze the protein expression profiles of soybean leaves under drought stress. A total of 425 soybean leaf protein spots were detected and matched. There were 101 differentially expressed protein spots, among which 60 were up-regulated, and 41 were down-regulated. The results of this study indicated that there were some soybean leaf proteins responded to drought stress.

**Keywords:** Soybean; Drought stress; Two-dimensional electrophoresis; Expression map

大豆[*Glycine max* (Linn.) Merr.]是豆科大豆属植物,是我国重要的农作物之一。干旱是影响大豆产量的最重要的非生物胁迫之一。因此,研究干旱胁迫对大豆生长情况和产量的影响具有重要意义。许多研究证明,干旱胁迫能够诱导大豆的一系列生化过程发生改变。王厚鑫等<sup>[1]</sup>的研究表明,干旱胁迫下大豆的光合作用受到抑制,光合器官被破坏,生物量降低。高亚梅等<sup>[2]</sup>研究发现干旱胁迫下大豆根中过氧化氢酶、超氧化物歧化酶和过氧化物酶 3 种酶的活性显著增加,植物的光合速率

降低。高蕾等<sup>[3]</sup>的研究表明随着干旱胁迫的加强,大豆叶片的可溶性蛋白和相对含水量降低,同时过氧化物酶活性和过氧化氢酶活性增强。董兴月等<sup>[4]</sup>、王燕平等<sup>[5]</sup>等的研究表明,在干旱胁迫下不同品种大豆叶片含水量下降,丙二醛逐渐累积,可溶性糖和游离脯氨酸含量升高。王春燕等<sup>[6]</sup>研究表明,随着水分胁迫强度的增加,大豆叶片气孔的长度和宽度减小,气孔密度增加。Mohammadi 等<sup>[7]</sup>运用蛋白质组学方法(RNA transcripts and pull-down)探究大豆在干旱胁迫和 PEG 渗透胁迫下其蛋

收稿日期:2017-08-26

基金项目:河南省高等学校重点科研项目(18A180005);大学生创新创业训练计划(201810459067)。

第一作者简介:甄文轩(1998–),女,学士,主要从事生物化学研究。E-mail:18838200120@163.com。

通讯作者:臧新(1968–),男,博士,副教授,主要从事植物细胞工程蛋白组学与植物细胞工程研究。E-mail:zangxin@zzu.edu.cn。

白的变化,发现干旱胁迫下蛋氨酸合成酶表达量下调,进而影响了大豆幼苗的正常生长。

近年来,有关大豆响应逆境胁迫的蛋白质组学分析也见诸报道。Khatoon 等<sup>[8]</sup>用双向电泳方法研究了淹水胁迫下大豆不同器官的特异反应,结果表明,大豆幼苗的根和叶片有 51 个差异表达蛋白、下胚轴有 66 个。Komatsu 等<sup>[9]</sup>利用蛋白质组学方法研究了淹水胁迫下大豆线粒体蛋白的表达变化情况。Ma 等<sup>[10]</sup>选用大豆盐敏感基因型品种和抗盐基因型品种的幼苗进行 NaCl 处理,发现其叶片中有 91 个蛋白质表达出现差异,其中绝大部分蛋白点得到鉴定。王文军等<sup>[11]</sup>利用蛋白质组学方法研究了冷害和干旱对大豆种子的影响,结果显示干旱引起 6 种蛋白表达量上调,2 种蛋白在冷害时表达量下调。但是,现有利用蛋白质组学进行大豆抗性蛋白的鉴定研究中,有关干旱胁迫对大豆幼苗期影响的蛋白质组学分析报道较少。本研究用甘露醇模拟干旱环境,利用双向电泳对干旱胁迫下大豆叶片蛋白进行电泳分离,得到响应干旱胁迫的大豆幼苗蛋白表达图谱,获得响应干旱胁迫的大豆叶片蛋白点,为后续响应干旱胁迫的大豆叶片蛋白的鉴定打下基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

试验材料为大豆品种中黄 37。

### 1.2 方法

1.2.1 试验材料的培养处理 将大豆种子用水浸泡后种于 pindstrup 营养土中,于恒温光照培养室中培养。培养条件为光照  $12\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ ,恒温  $25^{\circ}\text{C}$ ,每日定时浇水。培养 12 d 后,大豆长出两片真叶,对试验组幼苗用  $300\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  甘露醇处理 24 h,对照组幼苗用等量的纯水处理。

1.2.2 提取蛋白样品 采用三氯醋酸(TCA)-丙酮沉淀法提取大豆叶片蛋白质<sup>[12]</sup>。称取试验组和对照组大豆真叶各 2 g,分别在液氮中充分研磨成粉末状,然后转移至 50 mL 离心管中,按 1:15 比例加入预冷的 10% TCA-丙酮 30 mL,涡旋混匀。于  $-20^{\circ}\text{C}$  反应 4 h,期间多次涡旋。然后于  $4^{\circ}\text{C}$  条件下  $15\,000\text{ g}$  离心 30 min,弃去上清液。加入 95% 丙酮 30 mL 并涡旋使沉淀散开,  $-20^{\circ}\text{C}$  反应 2 h,期间多次涡旋。2 h 后,  $4^{\circ}\text{C}$  条件下  $15\,000\text{ g}$  离心 30 min,弃去上清液。此步骤重复进行至 TCA 被洗净,保留沉淀。分装至 1.5 mL 离心管中,  $-80^{\circ}\text{C}$  长期保存。

1.2.3 SDS-PAGE 采用 SDS-PAGE 检测蛋白样品的提取效果。取 50 mg 蛋白样品粉末,加入  $300\text{ }\mu\text{L}$   $1\times\text{loading buffer}$  涡旋混匀,  $15\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 15 min,取上清液上样,  $20\text{ }\mu\text{g}$  用于 SDS-PAGE 分离, SDS-PAGE 分离胶浓度为 12%。蛋白质定量采用 Bradford 法<sup>[13]</sup>。

### 1.2.4 双向电泳

(1)样品裂解:称取蛋白 50 mg,加裂解液  $300\text{ }\mu\text{L}$  涡旋混匀,使其裂解至少 2 h,期间持续涡旋震动。裂解完成后  $15\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 15 min,取上清液。采用 Bradford 法定量后取  $350\text{ }\mu\text{g}$  上样,然后加入 1/2 浓度的裂解液。

(2)一向等电聚焦电泳(IEF):电泳采用实验室自制管状胶。待一向凝胶完全凝固后,安装在等电聚焦电泳装置上,倒入适量的  $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的  $\text{H}_3\text{PO}_4$  溶液。在电泳装置的上槽内倒入适量的  $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  的 NaOH 溶液。按照  $200\text{ V }30\text{ min}$ ,  $400\text{ V }16\text{ h}$ ,  $600\text{ V }1\text{ h}$  的程序进行等电聚焦电泳。

(3)胶条平衡:胶条取出后,放入一向凝胶平衡缓冲液中,在摇床上平衡 2 次,每次 15 min。平衡缓冲液含  $62.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$  Tris-HCl (pH6.8), 2.5% SDS, 10% 甘油, 5% 巯基乙醇。

(4)二向 SDS-PAGE:SDS-PAGE 分离胶浓度为 12%。于浓缩胶上均匀滴加一层加热融化的 0.5% 低熔点琼脂糖封胶液,然后将平衡好的一向胶条平铺在浓缩胶上,加低熔点琼脂糖用以固定一向胶条;组装 SDS 二向电泳槽,在内外槽内加入电泳缓冲液,保证外槽液面没过分离胶底端,内槽加满电泳缓冲液并加入适量溴酚蓝溶液,用以指示电泳进程;  $50\text{ mA}$  恒流电泳,待溴酚蓝线到达凝胶底端时停止电泳。

(5)凝胶染色:待电泳结束后,将分离胶放入固定液中,摇床固定 1 h;固定结束后,将分离胶放入染色液中,摇床染色 1 h;染色结束后,换上脱色液,脱色至凝胶背景清晰,在此期间可更换脱色液。

1.2.5 数据处理 使用 UMAX2100 扫描仪扫描图像,分辨率为 200 dpi,调整其它参数以使图像清晰,另存为 TIF 格式图片。

用 PD-Quest 8.0.1 软件对对照组和干旱处理组的 2-DE 凝胶(TIFF 图片)进差异分析。通过背景消减,蛋白点检测和匹配以及差异表达量的比较,确定差异表达蛋白点。

2 结果与分析

2.1 三氯醋酸-丙酮沉淀法提取叶片蛋白的 SDS-PAGE 分离结果

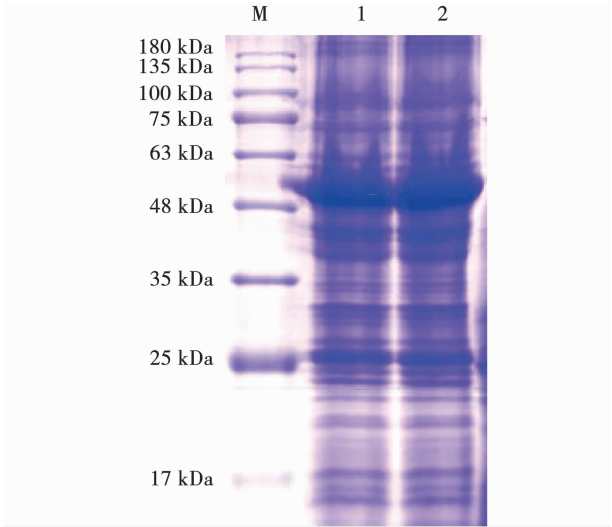
由图 1 可知,三氯醋酸-丙酮沉淀法获得的样品条带丰富,背景清晰,表明该方法获得的样品效果较好。

2.2 干旱胁迫下大豆叶片蛋白双向电泳分离图谱

干旱胁迫下的大豆叶片蛋白经双向电泳分析后获得大豆蛋白表达图谱如图 2 所示,表达图谱背景清晰,蛋白点整齐,纵向和横向拖尾不明显。两块凝胶图具有高度相似性,说明可以进一步分析。

2.3 响应干旱胁迫的蛋白点的分析

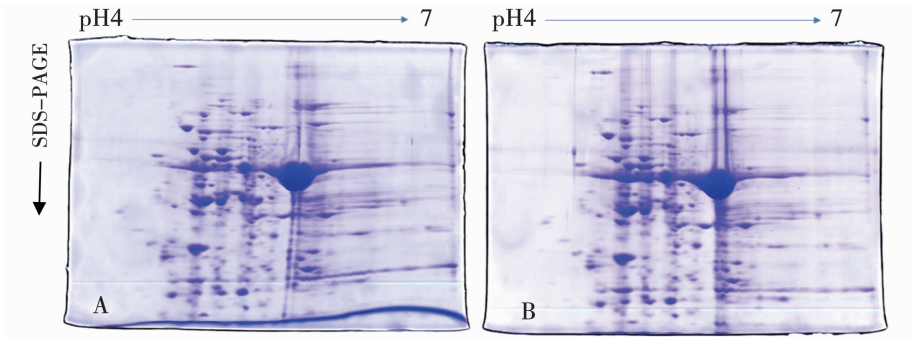
利用 PD-Quest 8. 0. 1 软件的 3D 视图功能直观观察凝胶上各蛋白点的细微差异,进行分辨(图 3)。



M;Marker;泳道 1、2;TCA 法提取的样品。  
M;Marker; Lanes 1 and 2;Samples extracted by TCA.

图 1 三氯醋酸-丙酮沉淀法提取叶片蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 1 SDS-PAGE analysis of leaf protein extraction by trichloroacetic acid-acetone precipitation method



A:大豆对照组蛋白粉样品;B:0.3 mol·L<sup>-1</sup>甘露醇处理组样品。单张凝胶从左至右为酸碱度由酸到碱,从上到下为蛋白分子量由大到小。

A: The soybean control protein powder sample; B: 0.3 mol·L<sup>-1</sup> mannitol treatment group sample. The single gel has a pH from acid to alkali from left to right, and the protein molecular weight from top to bottom is from large to small.

图 2 大豆叶片蛋白 2-DE 表达图谱  
Fig. 2 The 2-DE map of soybean leaf protein

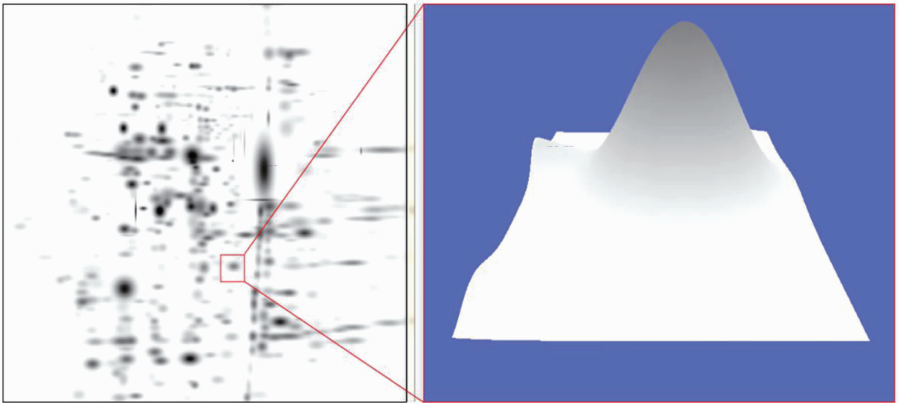
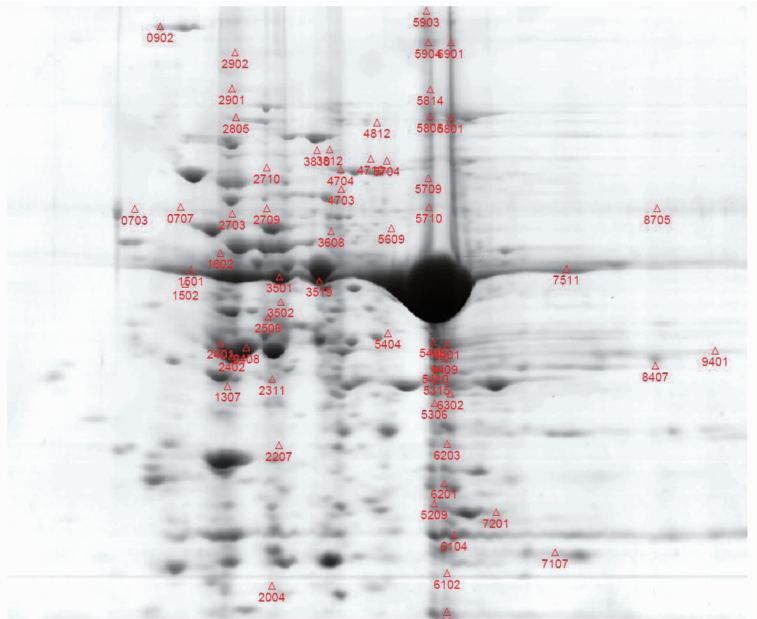


图 3 大豆对照组蛋白质表达量的三维图谱  
Fig. 3 Three-dimensional map of protein expression in soybean control group

对匹配点的光密度值进行分析,设定试验组光密度值大于等于对照组 2 倍的点为表达量上调,如图 4 所示,图中上调点有 60 个,占差异蛋白点的

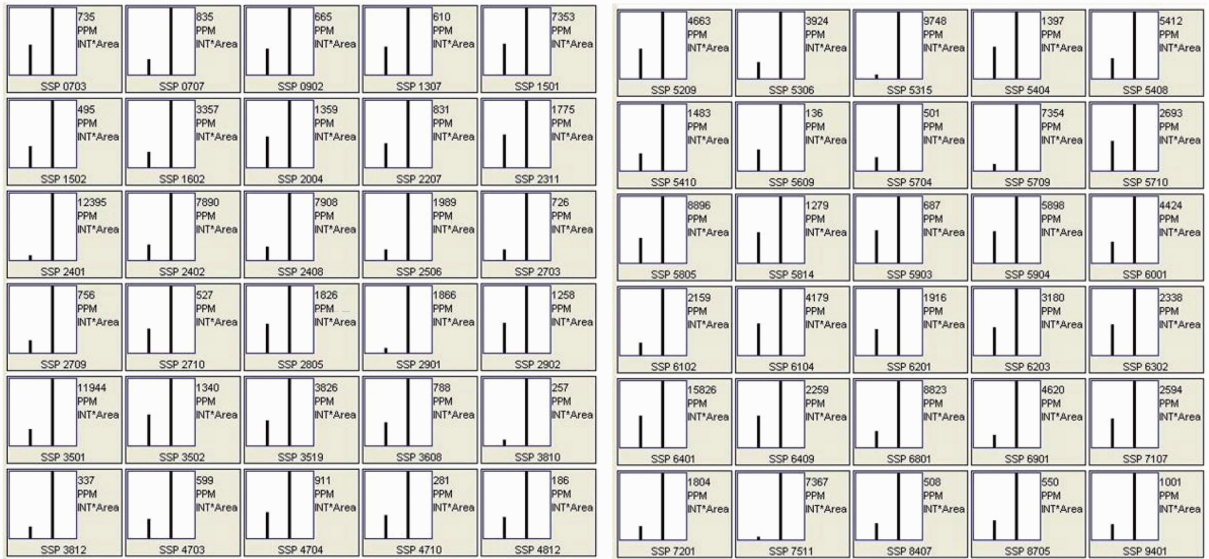
59. 41%,其量化柱状图如图 5 所示,差异点的柱状图可以直观定性地展现大豆叶片响应蛋白差异表达的情况。



红色三角标记为表达量上调的蛋白点。  
Up-regulated expression spot are labeled by red triangle.

图 4 干旱胁迫下大豆叶片中表达量上调的蛋白点

Fig. 4 Protein spots up-regulated in soybean leaves under drought stress



每个上调蛋白量化图中左侧柱为对照组,右侧柱为试验组。PPM:百万分率,定义为百万分之一;SSP:标准点号<sup>[14]</sup>。下同。  
Left column of each up-regulated protein quantization histogram is control group, right column is test group. PPM: Parts per million, defined as one in a million; SSP: Standard point number<sup>[14]</sup>. The same below.

图 5 60 个上调蛋白点的量化柱状图

Fig. 5 Up-regulated histogram of 60 protein spots

设定光密度值小于等于对照组 1/2 的为表达量下调,共有下调点 41 个(图 6),占差异蛋白点的 40. 59%,其量化柱状图如图 7 所示。

结果显示,对干旱处理大豆叶片试验组与对照组匹配的 425 个蛋白点中,有 101 个蛋白点表达量

出现差异,其中 60 个表达量上调,41 个表达量下调,表明干旱条件下大豆机体动员了一部分叶片蛋白响应干旱胁迫,大豆为了适应干旱可能调节了相关的代谢机制,且上述这些差异表达的蛋白可能就是相应代谢机制的产物。





流下,避免对凝胶溶液造成较大的冲击。

在初步点检测的过程中,往往会遇到有些点位置靠近、重叠,导致后续工作进行困难。这就需要充分利用 PD-Quest 软件等相关工具,耐心选择最大点(最强点)、最小点(最弱点),定义横条纹和纵条纹的规模;并且在点编辑步骤中利用手工重新匹配校正,以达到完美效果。

4 结 论

本研究对干旱胁迫下的大豆叶片蛋白进行双向电泳分离,建立了适用于以大豆叶片为材料的双向电泳体系,获得了背景清晰的差异表达图谱并对其进行初步分析,结果表明一部分大豆叶片蛋白响应了干旱胁迫,为响应干旱胁迫的大豆同源性鉴定及功能基因的发掘奠定基础。本研究中发现的表达量上调、下调的蛋白可能就是大豆为了响应干旱胁迫而调节相应代谢水平和途径的产物,但是这些现象的原因及机理尚不清楚,还需在今后的研究中结合质谱鉴定技术进一步深度探究以全面剖析大豆响应干旱胁迫的分子机制。

参考文献

[1] 王厚鑫,刘鸣达,张惠,等. 施硅对草地早熟禾生长特性和抗旱性的影响[J]. 北方园艺, 2007, 31 (9) :135-137. (Wang H X, Liu M D, Zhang H, et al. Effects of silicon application on growth characteristics and drought resistance of Kentucky bluegrass [J]. Northern Horticulture, 2007, 31 (9) : 135-137. )

[2] 高亚梅,韩毅强,杜吉到,等. 干旱胁迫对大豆酶活性的影响[J]. 黑龙江八一农垦大学学报,2007(4):13-16. (Gao Y M, Han Y Q, Du J D, et al. Effects of drought stress on soybean enzyme activity[J]. Journal of Heilongjiang Bayi Agricultural University, 2007(4) : 13-16. )

[3] 高蕾,孙海龙. 干旱胁迫对大豆幼苗生长及生理特性的影响[J]. 黑龙江科学,2011,2(6):7-9. (Gao L, Sun H L. Effects of drought stress on growth and physiological characteristics of soybean seedlings[J]. Heilongjiang Science,2011,2(6):7-9. )

[4] 董兴月,林浩,刘丽君,等. 干旱胁迫对大豆生理指标的影响[J]. 大豆科学,2011,30(1):83-88. (Dong X Y, Lin H, Liu L J, et al. Effects of drought stress on physiological indexes of soybean[J]. Soybean Science,2011,30(1):83-88. )

[5] 王燕平,王晓梅,侯国强,等. 干旱胁迫对不同生态型大豆生理生化特征的影响[J]. 中国农学通报,2014,30(12):93-100. (Wang Y P, Wang X M, Hou G Q, et al. Effects of drought stress on physiological and biochemical characteristics of different ecotypes of soybean [J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2014, 30(12) : 93-100. )

[6] 王春艳,庞艳梅,李茂松,等. 干旱胁迫对大豆气孔特征和光合参数的影响[J]. 中国农业科技导报,2013,15(1):109-115. (Wang C Y, Pang Y M, Li M S, et al. Effects of drought stress on stomatal characteristics and photosynthetic parameters of soybean [J]. China Agricultural Science and Technology Review, 2013, 15(1) : 109-115. )

[7] Mohammadi P P, Moieni A, Hiraga S, et al. Organ-specific proteomic analysis of drought-stressed soybean seedlings[J]. Journal of Proteomics,2012,75:1906-1923.

[8] Khatoon A, Rehman S, Hiraga S, et al. Organ-specific proteomics analysis for identification of response mechanism in soybean seedlings under flooding stress[J]. Journal of Proteomics,2012,75:5706-5723.

[9] Komatsu S, Yamamoto A, Nakamura T, et al. Comprehensive analysis of mitochondria in roots and hypocotyls of soybean under flooding stress using proteomics and metabolomics techniques[J]. Journal of Proteome Research, 2011, 10(9) :3993-4004.

[10] Ma H Y, Song L R, Shu Y J, et al. Comparative proteomic analysis of seedling leaves of different salt tolerant soybean genotypes[J]. Journal of Proteomics,2012,75:1529-1546.

[11] 王文军. 大豆种子冷害和 PEG 引发的蛋白质组学分析[D]. 呼和浩特市:内蒙古农业大学,2008. (Wang W J. Proteomic analysis of soybean seed chilling injury and PEG induced [D]. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2008. )

[12] Damerval C, de Vienne D, Zivy M. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat seedling proteins [J]. Electrophoresis, 1986, 7 (1) :52-54.

[13] Braford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding[J]. Analytical Biochemistry,1976,72:248-254.

[14] Park I, Ndjomou J, Wen Y, et al. Inhibition of HCV replication by oxysterol-binding protein-related protein 4 (ORP4) through interaction with HCV NS5B and Alteration of lipid droplet formation [J]. PLoS One, 2013, 8(9) :e75648.

[15] Herman E M, Helm R M, Jung R, et al. Genetic modification removes an immune dominant allergen from soybean[J]. Plant Physiology,2003,132(1):36-43.

[16] Hurkman W J, Tanaka C K. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis[J]. Plant Physiology,1986,81(3):802-806.

[17] Meyer Y, Grosset J, Chartier Y, et al. Preparation by two-dimensional electrophoresis of proteins for antibody production: Antibodies against proteins whose synthesis reduced by auxin in tobacco mesophyll protoplasts [J]. Electrophoresis, 1988, 9 (11) : 704-712.

[18] Wang W, Vignani R, Scali M, et al. Removal of lipid contaminants by organic solvents from oilseed protein extract prior to electrophoresis[J]. Analytical Biochemistry,2004,329(1):139-141.

[19] Hurkman W J, Tanaka C K. Solubilization of plant membrane proteins for analysis by two-dimensional gel electrophoresis[J]. Plant Physiology,1986,81(3):802-806.