

邓朝军, 蒋际谋, 龚慧文, 等. 2个枇杷品种果皮日灼伤害差异蛋白质组分析 [J]. 福建农业学报, 2012, 27 (12): 1313-1317.
DENG C-J, JIANG J-M, GONG H-W, et al. Proteome Analysis of Loquat Peel under Sunburn in Two Varieties [J]. Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2012, 27 (12): 1313-1317.

2个枇杷品种果皮日灼伤害差异蛋白质组分析

邓朝军^{1,2}, 蒋际谋^{1,2}, 龚慧文³, 许奇志^{1,2}, 陈义勇³, 林永祥³, 郑少泉^{1,2}, 邢建宏^{3,4}

(1. 福建省农业科学院果树研究所, 福建 福州 350013; 2. 福建省龙眼枇杷育种工程技术研究中心, 福建 福州 350013;
3. 福建农林大学生命科学学院, 福建 福州 350002; 4. 三明学院资源与化工学院, 福建 三明 365004)

摘要: 以日灼抗性不同的2个枇杷品种为材料, 对短期日灼诱导处理下果皮蛋白质组的变化进行分析。结果显示, ‘红猴本’果皮日灼处理下共有32个差异表达蛋白点, 其中上调表达的有17个, 下调表达的有15个; ‘金钟’有52个差异点, 上调表达的有38个, 下调表达的有14个。2个品种果皮在相同日灼处理下差异表达蛋白数量明显不同, 预示这2个品种对日灼的敏感性不同。

关键词: 枇杷果皮; 日灼; 蛋白质组; 双向电泳

中图分类号: S 667.3

文献标识码: A

Proteome Analysis of Loquat Peel under Sunburn in Two Varieties

DENG Chao-jun^{1,2}, JIANG Ji-mou^{1,2}, GONG Hui-wen³, XU Qi-zhi^{1,2}, CHEN Yi-yong³, LIN Yong-xiang³,
ZHENG Shao-quan^{1,2*}, XING Jian-hong^{3,4}

(1. Fruit Research Institute of FAAS, Fuzhou, Fujian 350013; 2. Fujian Breeding Engineering Technology Center for Longan & Loquat, Fuzhou, Fujian 350013; 3. School of Life Sciences, Fujian Agriculture and Forestry University, Fuzhou, Fujian 350002; 4. School of Resources and Chemical Engineering, Sanming University, Sanming, Fujian 365004)

Abstract: Two-dimensional gel electrophoresis was employed to analyze the proteome of loquat peel in two varieties which have different resistance to high temperature stress under short-term sunburn. The results showed that the honghouben had 32 differentially expressed proteins point, including 17 up-regulated, 15 down-regulated, and the jinzhong had 52 differentially expressed proteins point, including 38 up-regulated, 14 down-regulated under short-term sunburn. The quantity of differentially expressed proteins of loquat peel in two varieties was different. It implicated that two varieties had different sensitivity to sunburn.

Key words: loquat peel; sunburn; proteome; 2-DE

枇杷 *Eriobotrya japonica* (Thunb.) Lindl. 是重要的亚热带特色水果之一, 在生长过程中经常会遇到旱害、冻害、日灼、病害和虫害等逆境, 造成产量和品质下降。果实日灼是一种常见的生理病害, 生产上已有许多园艺作物^[1-6]都存在不同程度的日灼现象。目前, 有关果实日灼的研究多集中在

生理生化方面, 张华云等^[7]研究日灼对莱阳茡梨果皮结构和PPO、POD活性的影响, 赵小龙等^[8]通过试验观察分析了茂谷柑果实日灼原因, 王文举^[9]等研究外源抗氧化剂对高温胁迫下红地球葡萄果实日灼的影响, 张建光等^[10]研究苹果日灼下果实中抗氧化酶的变化, 邓朝军等^[11]以‘红种’枇杷为

收稿日期: 2012-11-01 初稿; 2012-12-02 修改稿

作者简介: 邓朝军(1979-), 男, 硕士, 助理研究员, 从事果树育种、种质资源与生物技术研究(E-mail: dengchaojun2002@163.com)

蒋际谋(1974-), 男, 副研究员, 从事果树育种、种质资源和栽培技术研究(E-mail: jjm2516@126.com)

蒋际谋与邓朝军对本文贡献相当

通讯作者: 郑少泉(1964-), 男, 博士, 研究员, 从事果树育种、种质资源和品质生物技术研究(E-mail: zsq333555@163.com)

邢建宏(1979-), 男, 讲师, 在读博士, 从事植物蛋白质组学研究(E-mail: jianhong_xing@126.com)

基金项目: 公益性行业(农业)科研专项经费项目(201003073); 农业科技成果转化资金项目(2010GB2C400213); 农业部作物种质资源保护项目(NB2130135); 农业部热带作物种质资源保护项目(12RZZY); 农业部农业科研杰出人才及其创新团队; 福建省科技计划重点项目(2010Y1002、2011Y1002、2012Y1001)

试材,开展枇杷果皮热伤害的抗氧化特性研究,揭示了在高温胁迫下枇杷果皮对热伤害发生的抗氧化响应机制。利用现代分子生物学技术,特别是蛋白质组学技术来揭示果实日灼发生的分子机理是未来研究的方向。

蛋白质组是处于一定发育阶段的有机体、组织、细胞或亚细胞结构在一定的条件下所表达的全部蛋白质群体^[12]。蛋白质组学的目的在于归类细胞中蛋白的整体分布,鉴定并分析感兴趣的蛋白,研究它们的关系与功能,最终阐明某一生理过程的分子机理,为植物生长发育、抵抗逆境等研究提供技术平台。蛋白质双向电泳是利用蛋白质等电点和分子量 2 种不同特性而进行蛋白质分离的技术,具有较高的分辨率和灵敏度,已成为蛋白质检测和分析的一种强有力的生化手段^[13],已有学者利用蛋白质组学技术在果树种子败育^[14]、成花逆转^[15]等方面进行了研究,揭示了上述生理过程的分子机制。关于枇杷果实日灼的蛋白质组研究尚未见相关报道,本研究选择对日灼抗性较强的‘红猴本’和较弱的‘金钟’2 个枇杷品种,对其果皮在日灼诱导处理下蛋白质组间的差异进行双向电泳分析,为深入研究枇杷果实日灼过程中蛋白质的差异表达以及伤害机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料及处理

供试枇杷品种为‘红猴本’和‘金钟’,种植在国家果树种质福州枇杷圃。在日灼敏感的果实转色期(光照强度 $\geq 1\ 100\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,晴天),选择树冠外围中上部相同方位、结果枝性状基本一致、果实大小均匀一致无损伤的果穗 10 穗,采用果实日灼诱导仪^[11]进行诱导,诱导温度 40℃,诱导时间 90 min,以未诱导处理为对照,3 次重复。日灼诱导前和诱导 90 min 后,分别采摘试验果,削取向阳面果皮,置于液氮中预冻后在-80℃超低温冰箱中保存备用。

1.2 蛋白质提取

参照 Saravanan 等^[16]的方法,加以略微修改。取 1 g 材料置液氮中充分研磨成粉末;加入 4 mL 的酚抽提取液,待其融化后,继续研磨数分钟,转移至 10 mL 离心管中;加入等体积的 pH8.0 Tris-饱和酚,涡旋;10 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,4℃离心 10 min;取酚层到 50 mL 离心管中,加入 6 倍体积预冷的 0.1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酸铵甲醇溶液,-20℃沉淀 2 h;15 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,4℃离心 20 min,弃上清液;沉淀

悬浮于-20℃预冷的甲醇,-20℃静置 1 h;15 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,4℃离心 20 min,弃上清;沉淀再悬浮于-20℃预冷的丙酮(含 0.07% β -巯基乙醇)-20℃静置 1 h,15 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,4℃离心 20 min,弃上清。 -20℃干燥,所得干粉置-80℃保存待用。

1.3 蛋白质裂解

准确称取 10 mg 蛋白质干粉,加入 400 μL 样品裂解液,于 37℃恒温水浴 2.5 h,15 000 $\text{r}\cdot\text{min}^{-1}$,室温离心 15 min,取上清液用于蛋白质定量和双向电泳分析。

1.4 蛋白质含量测定

Bradford^[17]法测定样品中蛋白质含量,以牛血清蛋白(BSA)作为标准蛋白。

1.5 双向电泳分析

1.5.1 IEF 采用 Ettan IPGphor 等电聚焦系统,24 cm IPG 胶条。依据 Bradford 定量结果取含有 1.3 mg 蛋白的样品溶液,加水化液至终体积为 450 μL ,离心片刻,向 IPG 胶条槽(strip holder)中加入 450 μL 溶有样品的溶胀液后,再将 IPG 胶条去掉保护膜,胶面向下放入胶条槽中,使溶胀液浸湿整个胶条,注意避免胶面和泡涨液产生气泡。然后滴加 800 μL 覆盖油,盖上胶条槽的盖子,放于电聚焦仪上。等电聚焦的参数见表 1。

表 1 IPGphor 等电聚焦程序设定
Table 1 Program of IEF on IPGphor

步骤	电压/V	最大电流/ μA	时间/h	电压 \times 电流
1	30	50	12.0	360
2	200	50	1.0	200
3	500	50	1.0	500
4	1000	50	1.0	1000
5	8000(梯度)	50	0.5	2250
6	8000	50	5.0	40000
总计		50	20.5	44310

1.5.2 胶条平衡 等电聚焦结束后,取出 IPG 胶条,放入含 1% w/v 的 DTT 平衡液 I(50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-Cl pH 8.8,6 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素,30% 甘油,2% SDS,1% DTT,0.002% 溴酚蓝)中,缓慢平衡 15 min;取出胶条并用滤纸稍微吸干,再转移至含有 2.5% w/v 的碘乙酰胺平衡液 II(50 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-Cl pH 8.8,6 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素,30% 甘油,2% SDS,2.5% 碘乙酰胺,0.002% 溴酚蓝)中,平衡 15 min。取出胶条后用滤纸吸去残余平衡液,

用 $1\times$ SDS 电泳缓冲液冲洗 1 s 后, 转移至第二向 SDS-PAGE 胶上。

1.5.3 SDS-PAGE SDS-PAGE 电泳在 EttanTM DALTII 垂直板电泳系统中进行, 分离胶的浓度为 12.5% (30.8% Acr-bis, $1.5\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ Tris-HCl、pH 8.8, 10% SDS, 10% AP, TEMED), 无浓缩胶。将平衡好的 IPG 胶条转移至 PAGE 胶上, 用融化的低熔点琼脂糖封闭液 (0.5% w/v 琼脂糖, 0.002% 溴酚蓝溶于 SDS 电泳缓冲液中) 封住胶条, 进行 SDS-PAGE 电泳。恒流 15 mA/胶电泳 30 min 后, 改用 30 mA/胶电泳, 待示踪溴酚蓝至凝胶底部边缘时停止电泳。

1.5.4 染色及图像分析 电泳结束后, 将 SDS-PAGE 胶放入染色液 (0.5% 考马斯亮蓝 R-250、50% 甲醇、10% 乙酸、40% dd 水) 中, 室温摇床摇动染色 2 h 左右, 随后经脱色液 (30% 甲醇、10% 乙酸、40% dd 水) 脱色处理至背景变浅、蛋白点清晰可见, 其间更换脱色液数次。脱色后的 2-DE 胶用 EPSON PERFECTION 2480 PHOTO 扫描仪扫描并保存图像, 扫描光学分辨率为 300dpi。图像分析采用 ImageMaster 2D Platinum 5.0 软件分析。

2 结果与分析

2.1 ‘红猴本’果皮日灼下差异蛋白质组的分析

采用优化后的双向电泳体系, 对 ‘红猴本’ 果皮日灼处理组和对照组的蛋白质进行双向电泳, 得到较为清晰的电泳图谱 (图 1), 其蛋白质组分主

要分布在等电点 pI 5~6、分子量 $(21\sim90)\times10^3$ Da 的范围内。利用 ImageMaster 2D Platinum 5.0 软件, 以对照组为参比胶, 处理组为分析胶对 2-DE 图谱进行分析, 结果显示, 在处理组和对照组的 2-DE 图谱上分别检测到 899 和 891 个蛋白斑点。处理组与对照组的匹配蛋白斑点有 701 个, 匹配率为 78.0%。将表达量差异在 1.5 倍以上的点定为差异点, 对照与处理之间差异表达蛋白点共有 32 个, 其中上调表达的有 17 个, 下调表达的有 15 个。在 17 个上调表达的蛋白点中, 差异在 2 倍以上的有 10 个, 最高达 4.45 倍。在 15 个下调表达的蛋白点中, 差异在 2 倍以上的有 12 个, 最高达 4.58 倍。

2.2 ‘金钟’果皮日灼下差异蛋白质组的分析

采用上述优化的蛋白质双向电泳技术体系, 对 ‘金钟’ 果皮日灼处理组和对照组的蛋白质进行双向电泳, 得到背景清晰、分离效果较好的电泳图谱 (图 2)。从图中可以看出, ‘金钟’ 果皮蛋白质组分与 ‘红猴本’ 相似, 主要分布在等电点 pI 5~6、分子量 $(21\sim90)\times10^3$ 的范围内。对 ‘金钟’ 果皮蛋白组 2-DE 图谱的分析结果显示, 处理组和对照组的 2-DE 图谱上分别有 855 和 832 个蛋白斑点。其中, 处理组与对照组的匹配蛋白斑点有 641 个, 匹配率为 75.0%。同样, 将表达量差异在 1.5 倍以上点定为差异点, 对照组与处理组差异表达蛋白点有 52 个, 其中上调表达的有 38 个, 下调表达的有 14 个。上调表达的 38 个蛋白点中, 差异在 2 倍以上的有 28 个, 最高达 6.80 倍。下调表达的 14 个点中, 差异在 2 倍以上的有 7 个, 最高的为 2.14 倍。

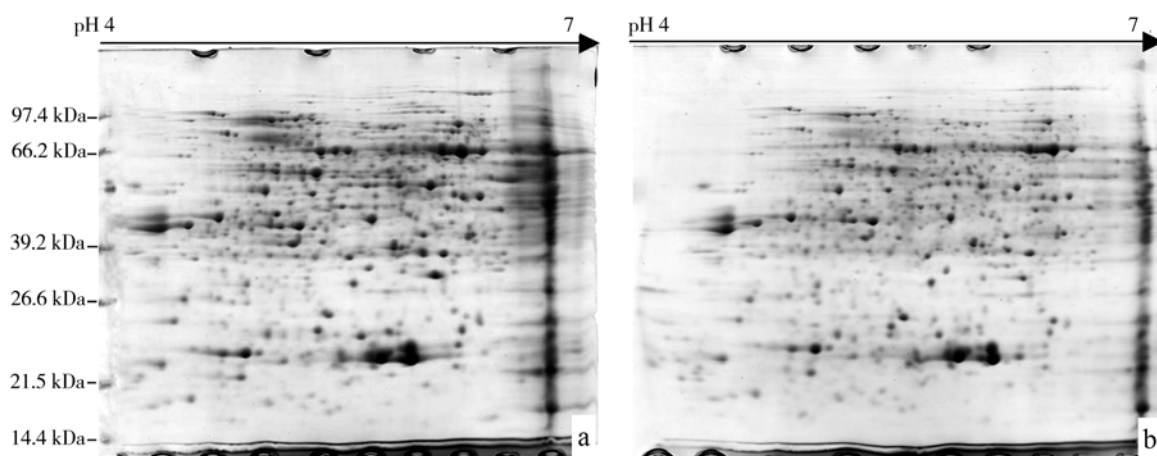


图 1 日灼处理下 ‘红猴本’ 果皮蛋白质组 2-DE 图谱

Fig. 1 The 2-DE maps of loquat peel in ‘honghouben’ under sunburn

注: a 为处理组, b 为对照组。

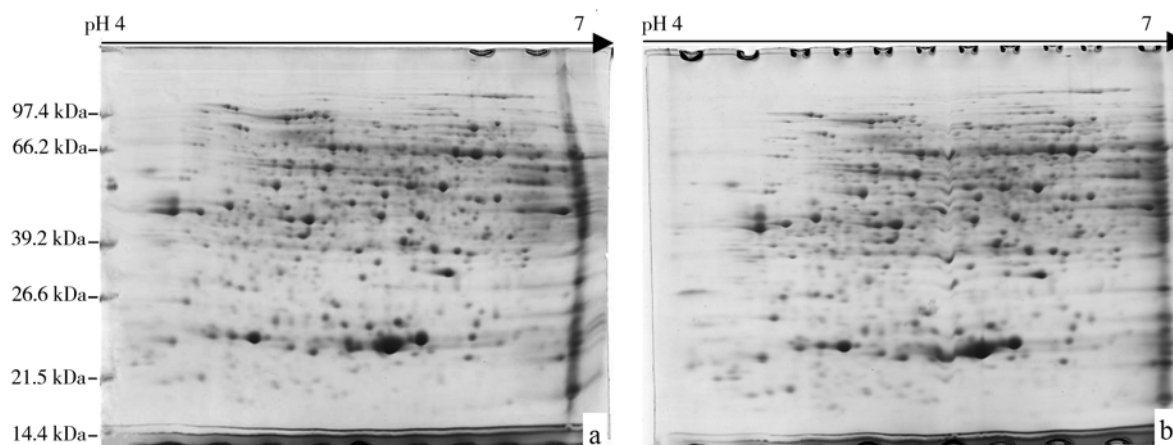


图 2 日灼处理下‘金钟’果皮蛋白质组 2-DE 图谱

Fig. 2 The 2-DE maps of loquat peel in ‘jinzhong’ under sunburn

注：a 为处理组，b 为对照组。

2.3 2 个品种果皮日灼下差异蛋白质组的比较

为了比较 2 个品种之间对日灼的敏感程度，将相同日灼处理下‘红猴本’和‘金钟’果皮蛋白的双向电泳结果进行综合分析。从蛋白点和表达量来看，在短期日灼处理下（90 min），‘红猴本’蛋白质组变化较小，差异蛋白点只有 32 个，而‘金钟’变化较大，有 52 个差异点。这预示着 2 个品种对日灼的敏感性不同，与‘金钟’相比，‘红猴本’对日灼的敏感性较低。从差异蛋白表达趋势来看，‘红猴本’在处理前后，其果皮蛋白组上调与下调的蛋白数量相当（上调 17 个，下调 15 个），而‘金钟’处理前后，上调表达蛋白明显多于下调表达蛋白（上调 38 个，下调 14 个）。

3 讨 论

双向凝胶电泳是差异蛋白质组学研究的主要实验技术之一，而差异蛋白质组学能够将基因表达与植物生理代谢等问题联系在一起，为揭示植物各种生理变化的分子机理提供了有力手段^[12]。果实日灼其实质是高温逆境对果实造成的一种伤害^[3,11,21]。植物在逆境条件下强光典型的反应就是在细胞内产生一系列抗御逆境的特异蛋白质，对逆境造成的细胞破坏进行修复和清除。植物抵抗逆境的强弱在一定程度上与这些逆境蛋白产生的种类和数量有关^[18]。已有研究表明，日灼下多数果实中的保护酶类均会发生相应的变化^[11,19-20]。酶本身就是蛋白质，酶含量与活性的变化是果实在日灼伤害下蛋白质组差异表达的具体体现。

本课题组对枇杷果皮日灼下的生理生化指标进行了测定^[11]发现在 40℃ 高温下，SOD 和 POD 酶

的活性均呈下降趋势。试验从蛋白质组的水平上研究日灼伤害下枇杷果皮蛋白的差异表达，结果表明，2 个枇杷品种的果皮在日灼伤害下其蛋白质组分均有差异表达，这与前期研究的酶含量水平上所获得的结果具有一致性。同时，本研究结果还表明，日灼抗性强的‘红猴本’果皮蛋白质组的变化明显小于抗性弱的‘金钟’，这从蛋白质组的层面揭示了 2 个品种对日灼的抗性不同。本研究仅从差异点的数量和表达量上来初步分析 2 个品种对日灼伤害的反应，今后还需对差异表达点进行质谱分析与蛋白数据库鉴定，从差异表达蛋白所参与的生理代谢途径方面来阐明枇杷果皮日灼发生的分子机理，最终为抗日灼品种的选育提供理论依据。

参考文献：

- [1] BAS V D E. Sunburn management [J]. Compact Fruit Tree, 1999, 32 (1): 13-14.
- [2] LARRY E. S, CINDY K, et al. Elfving. Sunburn Browning Decreases At-Harvest Internal Fruit Quality of Apples (Malus domestica Borkh.) [J]. International Journal of Fruit Science, 2009, 9: 425-437.
- [3] 张建光, 刘玉芳, 孙建设, 等. 苹果果实日灼人工诱导技术及阈值温度研究 [J]. 园艺学报, 2003, 30 (4): 446-448.
- [4] 马克元, 程福厚, 傅玉瑚, 等. 鸭梨果实果点和锈斑的发育 [J]. 园艺学报, 1995, 22 (3): 295-296.
- [5] 张建光, 刘玉芳, 孙建设, 等. 嘎拉苹果高温处理与果实日灼的关系 [J]. 中国农业科学, 2003, 36 (6): 731-734.
- [6] 王胜雄, 陈尚围. 活动式遮阳网防治枇杷果实日灼试验总结 [J]. 现代园艺, 2010, (7): 7.
- [7] 张华云, 王善光, 牟其芸, 等. 套袋对莱阳梨果皮结构和 PPO、POD 活性的影响 [J]. 园艺学报, 1996, 23 (1): 23-26.
- [8] 赵小龙, 李贤良, 刘升球, 等. 茂谷柑果实日灼、粒化原因分

- 析 [J]. 中国南方果树, 2006, 35 (2): 5—6.
- [9] 王文举, 张亚红, 平吉成, 等. 外援抗氧化剂对高温胁迫下红地球葡萄果实日灼的影响 [J]. 北方园艺, 2010, (1): 4—6.
- [10] 张建光, 李英丽, 刘玉芳, 等. 高温、强光对苹果树冠不同方位果皮的氧化胁迫研究 [J]. 中国农业科学, 2004, 37 (12): 1976—1980.
- [11] 邓朝军, 许奇志, 蒋际谋, 等. 高温胁迫对枇杷果皮热伤害的抗氧化特性影响 [J]. 热带亚热带植物学报, 2012, 20 (5): 439—444.
- [12] 阮松林, 马华升, 王世恒, 等. 植物蛋白质组学研究进展 II: 蛋白质组技术在植物生物学研究中的应用 [J]. 遗传, 2006, 28 (12): 1633—1648.
- [13] 牛屹东, 冯捷, 崔恒, 等. 蛋白质双向电泳实验手册 [M]. 北京: 北京大学医学出版社, 2006: 1—4.
- [14] LIU H, L Y Z, ZHEN S Q, et al. Comparative proteomic analysis of longan (*Dimocarpus longan* Lour.) seed abortion [J]. *Planta*, 2010, (231): 847—860.
- [15] YOU X R, WANG L X, LIANG W Y, et al. Floral reversion mechanism in longan (*Dimocarpus longan*Lour.) revealed by proteomic and anatomic analyses [J]. *Journal of Proteomics*, 2012, 75 (4): 1099—1118.
- [16] SARAVANAN RS, ROSE JK. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues [J]. *Proteomics*, 2004, 4 (9): 2522—2532.
- [17] 汪家政, 范明. 蛋白质技术手册 [M]. 北京: 科学出版社, 2005: 42—47.
- [18] 高必达, 陈捷. 生理植物病理学 [M]. 北京: 科学出版社, 2006: 156—162, 203—220.
- [19] 张建国. 苹果 (*Malus domestica* Borkh.) 果实日灼原因、机理及预防 [D]. 石家庄: 河北农业大学, 2005.
- [20] 吴月燕. 高温胁迫对藤稳葡萄生长结果的影响 [J]. 果树学报, 2001, 18 (5): 280—283.
- [21] 邓朝军, 蒋际谋, 张小艳, 等. 枇杷果皮热伤害发生影响因子研究 [J]. 福建农业学报, 2012, 27 (10): 1081—1086.

(责任编辑: 柯文辉)