

茉莉酸诱导的拟南芥叶片蛋白质组分析

潘怡欧,刘琳琳,张炬红,张 静,安少利,许 鹏,靳军灵,刘志伟,席景会

(吉林大学 植物科学学院,吉林 长春 130062)

摘要:植物在长期进化过程中形成了自我防御机制,能够产生特异的抗性蛋白来应对各种生物因子的胁迫,其中茉莉酸信号途径是植物必需的防御机制。本研究对拟南芥施用茉莉酸处理和对照叶片蛋白质的差异表达变化,并试图通过蛋白质组学技术来检测茉莉酸诱导的蛋白质,通过蛋白质双向电泳发现有 28 个蛋白点发生了显著的变化,其中 19 个蛋白点上调表达,9 个蛋白点下调表达。选择 10 个差异蛋白点进行了质谱鉴定,它们分别是苏氨酸蛋白激酶、热激蛋白、不依赖于维生素 B₁₂ 的蛋氨酸合酶、腺嘌呤琥珀酸合酶、碳酸酐酶等,这些蛋白质可能在拟南芥叶片应答茉莉酸反应的过程中起到重要作用,进一步进行差异蛋白的功能分析对揭示茉莉酸信号通路和植物防御机制的关系具有重要的作用。

关键词:拟南芥;茉莉酸甲酯;双向电泳;质谱

中图分类号:Q51 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2010)02-0035-05

Proteomic Analysis of Arabidopsis Leaf Proteins in Response to Methyl Jasmonate

PAN Yi-ou, LIU Lin-lin, ZHANG Ju-hong, ZHANG Jing,
AN Shao-li, XU Peng, JIN Jun-ling, LIU Zhi-wei, XI Jing-hui
(College of Plant Science, Jilin University, Changchun 130062, China)

Abstract: Plants produce jasmonic acid or methyl jasmonate (MeJA) in response to many biotic stresses, particularly insect herbivores. Jasmonate is essential signal pathway for insect defense in plants. To get a better understanding the defense response in plants for MeJA, two-dimensional electrophoresis (2-DE) accompanied with mass spectrometry (MS) were therefore applied to the study. In this study, we identified some proteins involved in jasmonate signaling, which is essential for plant defense. Of the experiments, 28 protein spots with at least 2-fold changed expression were found in Arabidopsis, 10 out of which were successfully identified using MALDI-TOF/TOF MS analysis. The MeJA responsive proteins included serine-threonine protein kinase, chloroplast heat shock protein 70-1, independent VB₁₂ methionine synthetase, adenylosuccinate synthase, carbonic anhydrase, and et al. We were able to determine a few proteins that displayed abundance changes in response to MeJA. Understanding how the plant response to MeJA is regulated will provide tools for a better study of induced defense mechanism.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; Methyl jasmonate; Two-dimensional electrophoresis; Mass spectrometry

当植物受到生物和非生物因子胁迫时,植物会产生茉莉酸(JA)和茉莉酸甲酯(MeJA)。茉莉酸是植物体内亚麻酸经十八碳烷酸途径合成的一种植物激素。它的作用是作为信号分子去激活植物防御反应相关基因的表达,茉莉酸类物质在诱导植物发生抗性反应中发挥重要作用。研究发现,大豆、水稻、

拟南芥等植物遭到昆虫为害和病原物侵染后,茉莉酸类物质水平升高;同时,外源茉莉酸类物质可以诱导相关防御基因的表达。用茉莉酸类化合物处理植物,不仅可系统诱导蛋白酶抑制剂和多酚氧化酶的合成,还能增加过氧化物酶和脂氧合酶等防御蛋白的活性,从而提高植物的抗虫性^[1]。Mewis等^[2]利

收稿日期:2009-12-21

基金项目:吉林省科技厅项目(20060545);长春市科技局国际合作项目(2007GH28)

作者简介:潘怡欧(1978-),女,吉林长春人,讲师,博士,主要从事昆虫毒理学和昆虫生理生化研究。

通讯作者:席景会(1965-),男,黑龙江人,教授,博士,硕士生导师,主要从事昆虫与植物互作蛋白质组学的相关研究。

用突变体以及外源激素处理等方法证实 JA 与植物的诱导防御相关。至今有关植物对植食者诱导抗性的研究中,主要注重诱导抗性现象的描述及其生理生化机理的探索,有关植物产生抗虫作用的机制在许多方面还不清楚,如各种信号通路在细胞和分子水平上调控植物诱导防御的机制,茉莉酸信号通路相关蛋白与植物抗虫性的关系等^[3]。

自从 Farmer和 Ryan^[4]报道外源茉莉酸甲酯能够诱导植物的抗虫性后,茉莉酸和茉莉酸甲酯对植物抗虫作用的诱导受到了人们的关注,有许多研究报道^[5]。茉莉酸能调节植物生长发育的多个过程,更为重要的是,茉莉酸能提高植物在虫害胁迫条件下的抗性反应,并且可以作为激发子诱导植物防卫基因的表达^[6]。

植物防御分子机制的研究取得了一定的进展,但仍然有很多利用基因组学技术难以解决的问题。同时基因在转录、翻译后产生蛋白质的过程中,存在着转录水平、翻译水平的调控,仅在核酸水平不能提供完整的信息。蛋白质组学的发展为虫害诱导的植物防御机制的研究开拓了新的思路,突破从单个基因或基因组着手研究的局限性,为进一步阐明许多尚不清晰的植物诱导防御机制提供了技术基础。

本研究以模式植物拟南芥为材料,利用 MeJA 做激发子,分析了拟南芥叶片在 MeJA 处理后蛋白表达的差异,以期探讨非生物激发子诱导拟南芥的效果,旨在为有效利用植物诱导防御机制提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验材料及处理

拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*, Col-0), 拟南芥种子在 MS 培养基中培养至出芽后 7 d, 幼苗转移至营养土和蛭石混合培养 (营养土 蛭石 = 2 : 1), 在人工气候箱中培养 21 d, 培养条件为白天 22℃, 光强度 $80 \mu\text{mol}/(\text{s}\cdot\text{m}^2)$, 夜晚培养温度 20℃, 相对湿度为 75%, 光暗比为 16 h : 8 h。

喷洒 MeJA 诱导处理组: 配制 0.1 mmol/L 浓度的 MeJA, 取出培养 28 d 的拟南芥, 把 0.1 mmol/L 浓度的 MeJA 溶液喷洒在拟南芥叶片上, 放置回培养箱中, 8 h 后收集植株, 液氮冷冻, 放入 -80℃ 冰箱中保存。

空白对照组: 用 MillQ 级纯水喷洒培养 28 d 的拟南芥植株, 8 h 后收集植株, 液氮冷冻, 放入 -80℃ 冰箱中保存。

1.2 蛋白质样品制备

蛋白质提取方法采用饱和酚抽提法^[7]。样品

溶解在常用的蛋白质裂解液中 (7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 2% CHAPS, 2% SB3-10, 20 mmol/L DTT, 5 mmol/L TCEP, 2% IPG Buffer, 0.002% 溴酚蓝)。蛋白浓度采用 Bradford 法^[8]测定, 蛋白质样品冻存于 -80℃ 备用。

1.3 蛋白质双向电泳

1.3.1 等电聚焦 (IEF) 剥开固相 pH 梯度 (IPG) 胶条 (pH 4~7) 保护膜后, 将 IPG 胶条胶面朝下置于预先加好样品液的聚焦槽中, 矿物油覆盖后室温水化 16 h (水化上样 300 μg), 然后进行等电聚焦电泳。试验所用仪器为 Ettan DALT 双向电泳仪。

1.3.2 胶条平衡和 SDS 聚丙烯酰胺凝胶电泳 等电聚焦结束后进行 IPG 胶条的平衡, 胶条平衡参照 Finnie 等^[9]报道的方法进行, 平衡后进行聚丙烯酰胺凝胶电泳, 采用恒流进行电泳, 待电泳至凝胶前沿约 0.5 cm 时, 终止电泳。每个试验样品重复 6 次。

1.3.3 银染及凝胶图像分析 分析胶按照 Blum 等^[10]报道的方法对蛋白质凝胶进行染色, 染色结束后, 利用 ImageMaster™ 2D Platinum 6.0 软件对双向电泳凝胶图像进行分析, 分析步骤包括差异蛋白点检测、凝胶图谱标准化处理、蛋白点匹配和生物统计。

制备胶蛋白样品上样量为 1200 μg , 除了上样量与分析胶不同外, 其他电泳条件一致, 利用考马斯亮蓝法染色。

1.4 差异蛋白的质谱鉴定

从考马斯亮蓝染色的凝胶上选取差异蛋白点, 切取差异点后, 采用胰蛋白酶对其进行酶解, 酶解采用 Hughes 等^[11]报道的方法进行。利用 MALDI 串联飞行时间质谱仪 (MALDI FT/TOF/TOF, ultraflex III, Bruker Daltonics) 进行蛋白鉴定, 通过 MASCOT 网站程序检索 NCB Inr 和 SwissProt 数据库进行蛋白质的鉴定。

1.5 生物信息学分析

依据 MapMan 数据库 (<http://www.mapman.org.uk>) 提供的注释信息, 以及美国拟南芥信息资源中心 (The Arabidopsis Information Resource, TAIR) 提供的信息, 进行蛋白质功能分类。

2 结果与分析

2.1 茉莉酸诱导条件下拟南芥叶片蛋白质双向电泳

对拟南芥在茉莉酸甲酯处理后的样品和对照样品的蛋白质进行了双向电泳, 蛋白质凝胶进行银染后, 通过软件分析, 在 pH4~7 的蛋白质凝胶上, 平均可识别 (1036 ± 41) 个蛋白点, 重复性较好 (图 1)。

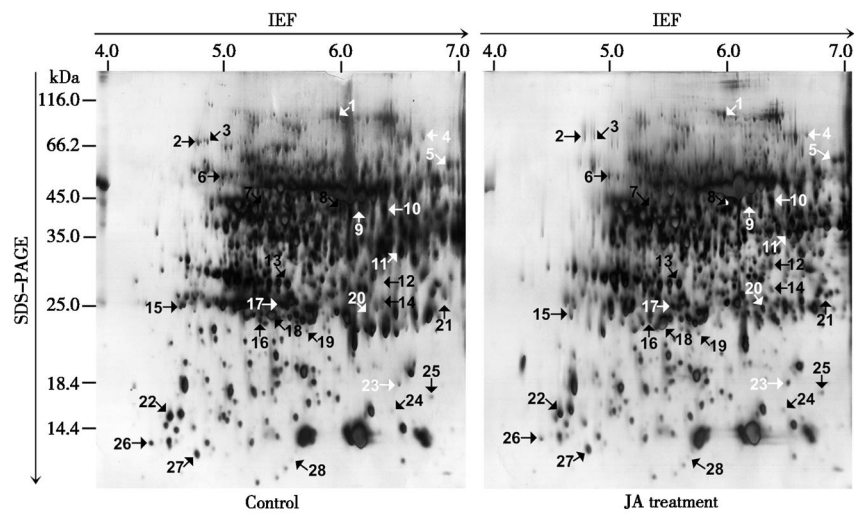


图 1 茉莉酸诱导条件下拟南芥叶片蛋白质双向电泳图谱

Fig 1 Proteomic maps of two-dimensionally separated control and JA induced leaf proteins for *Arabidopsis thaliana*

利用 ImageMaster 2D 软件凝胶图谱分析的结果表明,一些蛋白在不同处理间的表达丰度存在明显的差异,以蛋白质丰度变化在 2 倍以上作为检测阈值,结果表明在茉莉酸诱导条件下,有 28 个蛋白点的表达发生了变化,这些蛋白点在 2-DE 图谱表现上调或下调,反映了在茉莉酸甲酯诱导条件下拟南芥叶片蛋白的表达特点。

2 2 茉莉酸诱导条件下拟南芥叶片蛋白的差异表达

对茉莉酸甲酯诱导组的拟南芥蛋白进行双向电泳,比较对照和处理的 2-DE 凝胶图谱,经分析发现,茉莉酸甲酯喷洒诱导处理拟南芥 8 h 后,有 28 个蛋白点的丰度发生了显著变化(蛋白点的丰度变化在 2 倍以上),其中 19 个蛋白点上调表达,9 个蛋白点下调表达(图 2)。

差异蛋白质组学研究的目标在于通过不同处理条件下样本之间蛋白质的差异,揭示并验证蛋白质的变化与相关功能蛋白的关系,这需对蛋白进行质谱鉴定和生物信息学分析。

2 3 差异表达蛋白的质谱鉴定

利用 MALD FTOF/TOF MS 技术对制备胶表现明显的 12 个差异蛋白点进行了质谱分析,采用 Matrix science 网站提供的 Mascot 检索程序,进行数据库检索,对检索数据进行分析,其中有 10 个蛋白点被成功鉴定,有 2 个蛋白的分数较低,未能得到鉴定,结果见表 1。

所鉴定的蛋白包括苏氨酸蛋白激酶、热激蛋白、不依赖于维生素 B₁₂ 的蛋氨酸合酶、腺嘌呤琥珀酸合酶、碳酸酐酶、DNA 损伤修复蛋白、二氢新蝶呤醛缩酶、肌动蛋白和尿苷酸激酶,还有一个未知功能的蛋白质。经过功能分析发现这些蛋白在热胁迫、氨基酸代谢、核苷酸代谢、光合作用、碳代谢等方面发挥

重要的作用。

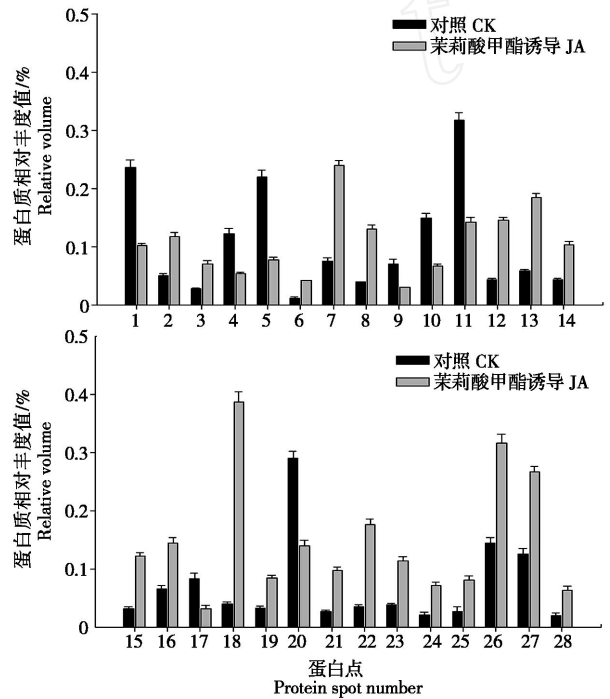


图 2 拟南芥在茉莉酸甲酯诱导条件下的蛋白点的丰度变化

Fig 2 Images of 2-DE from *Arabidopsis thaliana* under MeJA stress with protein spots abundance changes

3 讨论与结论

3 1 热激蛋白 (Chloroplast heat shock protein 70-1, HSP70-1)

植物在长期的进化过程中,形成一系列独特的生理机制,能够对不同类型的胁迫做出应答,以避免或减少胁迫对自身的伤害,热激蛋白是植物对逆境胁迫的防卫机制成员中的一员,其在逆境胁迫下的表达增强可提高植物防御的能力^[12]。HSP70 作为分子伴侣,通过阻止蛋白聚合而有助于植物细胞适

应不同逆境,当植物受到害虫危害后,叶片的蒸腾速率增加,从而加大了干旱的风险,而 HSP70的诱导表达可能有利于植物防御害虫的取食诱导所产生的间接伤害。Tsvejkova等^[13]研究结果表明,HSP可以

调节膜脂多态性,稳定膜的液晶相,HSP与膜脂的相互作用可提高膜的流动性。HSP与膜的缔合作用可以维护膜的完整性,这可能是植物在受到外界胁迫下的保护机制之一。

表 1 茉莉酸甲酯处理后差异蛋白的质谱鉴定

| Tab 1 Differentially expressed proteins identified by MS in response to methyl jasmonic acid for Arabidopsis thaliana | | | | | |
|---|------------|--|--------------------------|---------------|------------------|
| 蛋白点号 No | 登录号 AGI | 蛋白质名称 Protein name | 蛋白功能 Protein function | 蛋白分值 Score | 肽段匹配率 / % S C |
| 1 | AT2G25880 | threonine protein kinase | B N 35. 2 | 80 | 53 |
| 2 | AT4G24280 | chloroplast heat shock protein 70-1 | B N 20. 2 1 | 511 | 34 |
| 4 | AT5G17920 | cobalam in-independent methionine synthase | B N 13. 1. 3 4 | 475 | 30 |
| 10 | AT3G57610 | adenylosuccinate synthase | B N 23. 1. 2 20 | 196 | 6 |
| 13 | AT3G05010 | carbonic anhydrase | B N 8. 3 | 161 | 33 |
| 18 | AT1G09310 | unknown protein | B N 35. 2 | 108 | 58 |
| 22 | AT1G20340 | DRT112 | B N 1. 1. 5. 1 | 119 | 27 |
| 24 | AT3G11750 | 7, 8-dihydioneopterin aldolase | B N 25. 9 | 65 | 9 |
| 27 | AT4G29350 | actin | B N 31. 1 | 204 | 44 |
| 28 | AT3G18680 | uridylyate kinase | B N 23. 4 | 301 | 40 |

活性氧 (Reactive oxygen species, ROS)作为信号分子在植物抵抗病原菌的入侵和对逆境胁迫的过程中起作用。当植物体遭遇逆境胁迫时,细胞中 ROS水平会大大增加而形成氧化胁迫,造成细胞组分如蛋白质、碳水化合物和脂质的氧化损伤。而 HSP作为抗氧化剂,可以清除过剩的活性氧,表明在茉莉酸处理情况下,HSP表达量的提高有助于增强植物的抗逆能力^[14]。在分子水平深入研究 HSP的功能以及与其他蛋白分子之间的作用关系,将有助于弄清其在提高植物抗逆能力的作用机制。

3 2 碳酸酐酶 (Carbonic anhydrase)

碳酸酐酶是一个重要的光合作用酶,它通过催化 CO₂ 和 HCO₃⁻ 之间的相互转化反应,来降低 CO₂ 在叶肉细胞中的扩散阻力,为羧化反应提供底物。碳酸酐酶的作用是在液相中将 CO₂ 分子融化为溶解度高、易于运输的离子态 HCO₃⁻,加快 CO₂ 在液相中的转运速率,减小光合作用非气孔限制。碳酸酐酶参与多种生物过程,包括 pH调节、离子交换、CO₂ 转运、呼吸作用和光合 CO₂ 固定等^[15]。

在茉莉酸诱导条件下,碳酸酐酶表达量增加,说明活性增强,不同程度地提高了植物的光合作用,碳酸酐酶对光合作用的调控作用使得碳酸酐酶活性增加的同时光合速率也上升。而在病原菌侵染和昆虫取食胁迫条件下,植物细胞原有的体内平衡被打破,为了建立新的平衡植物需要启动各种防御措施,如清除氧自由基及合成渗透调节物质,这些过程均需要消耗额外的能量,碳酸酐酶的变化可能有助于植物激活整个能量代谢过程,提高植物的防御功效。而 Slaymaker等^[16]报道,碳酸酐酶具有抗氧化活性,能够降低植物在受到病原菌侵染时所产生过量的

ROS,增强了植物的抗病性。

在本试验中,通过质谱鉴定还检测到一个在茉莉酸甲酯诱导下表达变化的未知功能的蛋白质,由于对未知蛋白的信息了解有限,茉莉酸诱导的表达变化与植物防御机制的关系还需要进行深入的研究。

本研究利用蛋白质双向电泳并结合质谱技术鉴定了茉莉酸甲酯应答蛋白的改变,其中部分蛋白是新发现的茉莉酸甲酯应答蛋白,经分析这些蛋白可能在茉莉酸甲酯信号转换中发挥重要作用,它们的功能需要进一步的研究。

参考文献:

[1] Parta H, Rocha-Sosa M. Plant lipoxygenases physiological and molecular features [J]. Plant Physiology, 2002, 130: 15 - 21.

[2] Inga Mewis, Heidi M Appel, Amanda Hom, et al Major signaling pathways modulate arabidopsis glucosinolate accumulation and response to both phloem-feeding and chewing insects [J]. Plant Physiology, 2005, 138: 1149 - 1162

[3] Farmer E E, Aimeras E, Krishnamurthy V. Jasmonates and related oxylipins in plant responses to pathogenesis and herbivory [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2003, 6: 372 - 378.

[4] Farmer E E, Ryan C A. Octadecanoid precursors of jasmonic acid activate the synthesis of wound-inducible proteinase inhibitors [J]. Plant Cell, 1992, 4: 129 - 134.

[5] Liechti R, Farmer E E. The jasmonate pathway [J]. Science, 2002, 296: 1649 - 1650.

[6] Blee E. Impact of phyto-oxylipins on plant defense [J]. Trends in Plant Science, 2002, 7: 315 - 321.

- [7] Wang W, Scali M, Vignani R, *et al* Protein extraction for two-dimensional electrophoresis from olive leaf, a plant tissue containing high levels of Interfering compounds [J]. Electrophoresis, 2003, 24: 2369 - 2375.
- [8] Bradford M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein using the principle of protein dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248 - 254.
- [9] Finnie C, Melchior S, Roepstorff P, *et al* Proteome analysis of grain filling and seed maturation in barley [J]. Plant Physiology, 2002, 129: 1308 - 1319.
- [10] Blum H, Beier H, Gross H J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels [J]. Electrophoresis, 1987, 8: 93 - 99.
- [11] Hughes SM, Moroni-Rawson P, Jolly R D, *et al* Sub-mitochondrial distribution and delayed proteolysis of subunit c of the H^+ -transporting ATP-synthase in ovine ceroid-lipofuscinosis [J]. Electrophoresis, 2001, 22: 1785 - 1794.
- [12] Wang W X, Vinocur B, Shoseyov O, *et al* Role of plant heat-shock proteins and molecular chaperones in the abiotic stress response [J]. Trends Plant Science, 2004, 9: 244 - 252.
- [13] Tsvetkova N M, Horvath I, Török Z, *et al* Small heat-shock proteins regulate membrane lipid polymorphism [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 13504 - 13509.
- [14] Gustavsson N, Kokke B P, Hamdahl U, *et al* A peptide methionine sulfoxide reductase highly expressed in photosynthetic tissue in *Arabidopsis thaliana* can protect the chaperone-like activity of a chloroplast-localized small heat shock protein [J]. Plant Journal, 2002, 29 (5): 543 - 553.
- [15] Williams T G, Flanagan L B, Coleman J R. Photosynthetic gas exchange and discrimination against $^{13}CO_2$ and $C^{18}O^{16}O$ in tobacco plants modified by an antisense construct to have low chloroplast carbonic anhydrase [J]. Plant Physiology, 1996, 112: 319 - 326.
- [16] Slaymaker D H, Navarre D A, Clark D, *et al* The tobacco salicylic acid-binding protein 3 (SABP3) is the chloroplast carbonic anhydrase, which exhibits antioxidant activity and plays a role in the hypersensitive defense response [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 11640 - 11645.