植物营养与肥料学报 2012,18(2):417-425
Plant Nutrition and Fertilizer Science

NaCl 胁迫对菜用大豆种子膨大初期蛋白质表达的影响

王 聪[1], 朱月林[2*], 杨立飞[2], 杨恒山[1]
(1 内蒙古民族大学农学院,内蒙古通辽 028042; 2 国家大豆改良中心,南京农业大学园艺学院,南京 210095)

摘要: 采用蛭石栽培,对开花后 10 d 的菜用大豆[*Glycine max* (L.) Merr.]进行 100 mmol/L NaCl 处理,利用双向电泳(Two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE)技术对胁迫 5 d 时的种子蛋白质进行分离,并对处理与对照 2-DE 图谱中蛋白质表达进行比较分析。在对照和处理的 2-DE 图谱上均检测到 327 个蛋白点,有 28 个差异表达蛋白,其中 16 个较对照显著上调,另外 12 个显著下调。利用基质辅助激光解吸离子化飞行时间质谱(Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)对其中 6 个丰度差异较大(丰度变化在 2.5 倍以上)的蛋白进行分析,通过数据库检索,从中鉴定出 5 个蛋白质,分别是大豆球蛋白前体 G2、肌动蛋白、大豆球蛋白前体 G2 相似蛋白、类 α-微管蛋白和 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂,并对这些蛋白质在 NaCl 胁迫下可能的作用进行了讨论。结果表明,NaCl 胁迫对菜用大豆种子膨大初期的蛋白质代谢产生了显著影响,肌动蛋白、类 α-微管蛋白和 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂可能参与了对 NaCl 胁迫的应答反应。

关键词: 菜用大豆种子; NaCl 胁迫; 双向电泳; 差异表达蛋白
中图分类号: S643.06;Q945.78　　**文献标识码:** A　　**文章编号:** 1008-505X(2012)02-0417-09

Effect of NaCl stress on protein expression of vegetable soybean seed at early filling stage

WANG Cong[1], ZHU Yue-lin[2*], YANG Li-fei[2], YANG Heng-shan[1]
(*1 College of Agriculture, Inner Mongolia University for Nationalities, Tongliao, Inner Mongolia 028042, China;*
2 China National Center for Soybean Improvement/College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Under vermiculite culture conditions, vegetable soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] was treated with 100 mmol/L NaCl at the 10th day after flowering. After the separation of proteins from the seeds at the 5th day of the NaCl stress by two-dimensional gel electrophoresis (2-DE), the differences in protein expression were analyzed between the NaCl treatment and the control. About 327 proteins are detected at each 2-DE map, of which 28 proteins are found to be differentially expressed. Among these NaCl-stress-changed proteins, 16 proteins are up-regulated, while other 12 proteins are down-regulated significantly. Out of the 28 proteins, the abundances {JP2 of 6 proteins are changed more than 2.5 times. The 6 proteins are analyzed by using the matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) and searched in the database which allows the identification of 5 spots. These identified proteins are Glycinin G2 precursor, actin, similar to GLYCININ G2 PRECURSOR, alpha-tubulin-like protein and Kunitz trypsin inhibitor. The protein metabolisms at early seed-filling of vegetable soybean of the identified proteins are influenced significantly under the NaCl stress, and actin, alpha-tubulin-like protein and Kunitz trypsin inhibitor might be involved in NaCl stress responses.

收稿日期: 2011-08-25　　**接受日期:** 2011-12-29
基金项目: "十一·五"国家高技术(863)研究计划重大项目(2006AA10A110);国家转基因生物新品种培育科技重大专项(2009ZX08004-011B);内蒙古民族大学科研创新团队计划项目(NMD1003);内蒙古民族大学博士启动基金项目(BS217)资助。
作者简介: 王聪(1968—),男,内蒙古和林格尔县人,教授,博士,主要从事蔬菜生理和生物技术研究。E-mail: tongliaowangcong@163.com
* 通讯作者 Tel: 025-84396742, E-mail: ylzhu@njau.edu.cn

Key words: vegetable soybean seed; NaCl stress; two-dimensional gel electrophoresis; differentially expressed proteins

蛋白质组学(proteomics)以蛋白质组为研究对象,是从整体角度分析细胞内动态变化的蛋白质组成成分、表达水平与修饰状态,了解蛋白质之间的相互作用与联系,揭示蛋白质功能与活动规律的一个新的研究领域,其核心技术包括双向电泳(two-dimensional gel electrophoresis,2-DE)和质谱(mass spectrometry,MS)技术。目前,蛋白质组学作为在蛋白生化水平上研究植物复杂生命现象本质的前沿和热点学科[1],已有效地应用于分析非生物因子胁迫下植物的蛋白响应过程。

Ramani 和 Apte[2]用放射性同位素自显影双向电泳法研究水稻幼苗在盐胁迫下多基因的瞬时表达时发现,至少有35个蛋白质被盐胁迫诱导,17个蛋白质被抑制,其中包括20个在这之前未曾报道的低丰度蛋白。这些发现对寻找渗透应答新基因,尤其是那些在水稻盐耐性获得中起瞬时调节作用的基因十分重要。Majoul 等[3]用蛋白质组学方法对热胁迫下六倍体小麦蛋白质表达的变化进行研究,发现有24个上调蛋白,19个下调蛋白。将这些蛋白质进行质谱分析,从中鉴定出42个蛋白质,其中部分为植物代谢途径中的酶,有5个上调蛋白与一些低分子量热激蛋白存在相似性,有3个蛋白与延伸因子或真核翻译起始因子有关,还有一些蛋白参与了非生物胁迫应答或植物防御机制。周伟辉等[4]的研究发现,高温胁迫导致水稻叶片中光合作用相关蛋白以及能量类、代谢类蛋白表达量下降,同时,高温胁迫也诱导产生了一些抗逆蛋白。另外,耐热品种和敏感品种之间蛋白质表达存在差异。高温导致Rubisco相关蛋白表达量下降,敏感品种的下降程度远大于耐热品种;高温诱导耐热品种叶片中PSII放氧复合蛋白1表达。能量类蛋白中,ATP合成酶相关蛋白的表达在敏感品种中显著下降,且其铁氧化蛋白-NADP(H)-氧化还原酶(FNR)表达量下降。敏感品种磷酸吡哆醛-转移酶的表达量显著下降,而耐热品种表现上升。高温胁迫诱导耐热品种叶片中2-cys过氧化物酶(BAS1)表达量显著上升。Jagadish 等[5]研究了高温、干旱及高温+干旱胁迫下水稻小穗蛋白质组,发现有29个蛋白点的丰度在上述胁迫下变化显著,其中多数蛋白点仅对干旱胁迫敏感,而对高温胁迫敏感的蛋白同时对干旱胁迫也敏感;干旱胁迫下显著上调的蛋白点中,有6个点的丰度在高温+干旱条件下恢复到对照水平,而高温胁迫下丰度显著上调的2个蛋白点在高温+干旱条件下其丰度的上调幅度大幅增加。

盐胁迫已成为引起植物产量和品质下降的一种主要的非生物胁迫类型。盐胁迫下,植物体会在细胞、分子等不同水平发生一系列变化,对胁迫做出响应,以降低逆境对其造成的伤害。蛋白质是生理功能的执行者,植物在生存环境发生变化的条件下,其体内功能蛋白的表达也会发生相应的变化,对其蛋白质进行分离、鉴定、功能分析,即可了解植物体对环境变化的响应机制。目前,科研工作者运用双向电泳和质谱技术对大豆种子蛋白质的动态变化及不同基因型大豆种子储藏蛋白的差异性进行了研究[6-8],但未见有关盐胁迫下大豆种子中差异蛋白研究的报道。我们已就NaCl胁迫对菜用大豆种子中球蛋白表达的影响进行了研究[9],本实验以菜用大豆为材料,运用双向电泳技术对NaCl胁迫下种子膨大初期差异表达蛋白进行研究,以期为菜用大豆生殖生长时期对NaCl胁迫的响应机理奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试材培育及处理

供试菜用大豆[*Glycine max* (L.) Merr.]为南京地区主栽品种"理想高产95-1"。试验在南京农业大学玻璃温室内进行。4月10日干种子直播于上直径39 cm、下直径26 cm、高34 cm的塑料盆中,蛭石作基质,每盆定苗4株。真叶展开后每2 d浇1/4浓度日本园试营养液1次,每盆浇1 L;开花后浇1/2浓度营养液,浇液量同前期。

5月13日始花。此后一周内每天挂牌标记开花期,并记录每天的挂牌数,以此确定每天的开花数。5月15日花数最多,实验即以该天开花形成的种子为研究对象。

开花后10 d(5月25日)进行NaCl处理。通过NaCl处理浓度筛选实验[10]确定适宜的NaCl处理浓度为100 mmol/L。NaCl溶于1/2浓度日本园试营养液,均匀浇入基质中,每2 d浇液1次,每盆浇1 L。对照仅浇营养液。每处理5盆,3次重复,随机排列。

5月30日(NaCl处理后5 d)开始取样,取同一天开花(5月15日)形成的种子。

1.2 测定方法

1.2.1 菜用大豆未成熟种子中可溶性蛋白质的提取　将 0.5 g 未成熟种子在液氮中磨成粉末，用 TCA 丙酮沉淀法制得蛋白粉[11-12]。每 mg 蛋白粉中加入 10 μL 蛋白质裂解缓冲液［8 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、4% CHAPS(w/v)、65 mmol/L DTT、1% 两性电解质 pH 4～7(v/v)，0.1% 蛋白酶抑制剂(w/v)］溶解。4℃搅拌 10 min 后，100 r/min 下摇床摇匀 20 min，冰浴超声波处理 3 min，4℃、35000 r/min离心 20 min，取上清液，即得蛋白样品，用蛋白质定量试剂盒测定样品液中蛋白质的浓度。

1.2.2 双向电泳(2－DE)　样品用上样缓冲液［8 mol/L 尿素，4% CHAPS(w/v)，50 mmol/L DTT，0.5% IPG Buffer pH 4～7(v/v)，痕量溴酚蓝］稀释，每根 17 cm pH 4～7 线性 IPG 预制胶条(为 Bio-Rad 公司产品)，考染蛋白质上样量为 850 μg，总上样体积为 350 μL。水化和聚焦在 19℃下自动进行。50 V 电压下水化 12 h 后，经过 250 V 0.5 h、500 V 0.5 h、1000 V 1 h、3000 V 1 h，最后稳定在 8000 V 下聚焦 50000 Vh。聚焦完毕后，胶条在平衡液［0.375 mol/L Tris-HCl(pH 8.8)，6 mol/L 尿素，30% 甘油，5% SDS(w/v)，2% DTT(w/v)］中平衡 15 min，然后进行第二向 SDS－聚丙烯酰胺凝胶电泳，分离胶浓度为 12%。

1.2.3 染色、脱色　第二向电泳结束后，凝胶用双蒸水漂洗 3 次后用考马斯亮蓝染色液［20% 甲醇(v/v)、1.6% 磷酸(v/v)、8 % 硫酸铵(w/v)和 0.08 % 考马斯亮蓝 G250(w/v)］染色 16 h，然后用脱色液(20% 甲醇、5% 冰醋酸、75% 蒸馏水)脱色，中间更换 2～3 次脱色液，脱色至背景清晰。

1.2.4 2－DE 图像分析　凝胶经 Bio-Rad 公司 VersaDoc 3000 凝胶成像系统扫描后用 Image Master Platinum 软件(Amersham Biosciences，Piscataway，NJ)进行分析处理，包括背景消减、蛋白质点检测、分子量和等电点计算等[9, 13]，同时为了定量各蛋白质点的表达水平，较准确地反映各点量的变化，本实验运用该软件对各点相对体积进行了分析[6]。相对体积即单个蛋白质点的体积占胶内所有点总体积的百分数。用相对体积代替体积进行定量分析，便于不同胶内蛋白质点的比较分析。待测样品的双向电泳分析和凝胶图谱分析重复 3 次。

1.2.5 蛋白质的质谱鉴定　将脱色后凝胶上的目标蛋白质点切下送中科院上海生命科学研究院蛋白质组研究分析中心进行质谱鉴定。使用德国 Bruker 公司产 BIFLEX III 型 MALDI－TOF 质谱仪进行分析，氮激光器，激光波长 337 nm。离子源加速电压为 20 kV，反射电压为 23 kV，正离子反射检测，以基质峰、酶自动降解片段峰进行校正，去除角蛋白峰和胰酶自切峰，精确标定强度为基质峰强度 2 倍以上的峰，获得肽质量指纹图谱[13]。

用 MASCOT(http：//www. matrixscience. com)软件在 NCBInr 蛋白库中对获得的肽片段数据进行检索，物种为 Green plant。为确保蛋白质鉴定的可靠性，每个被鉴定的蛋白序列覆盖率至少达 15% 以上，理论分子量、等电点(theoretical Mr/I)与 2－DE 图谱所获的分子量、等电点(experimental Mr/I)值相差不超过 25%；最大未水解酶切位点数(max missed cleavages)，选择 1；固定修饰，选择 Carbamidomethyl (C)；可变修饰，选择 Oxidation (M)；可接受的肽段分子量误差为 0.3 Da。

1.3 统计分析

应用 SAS 统计分析软件对试验数据进行统计和分析，采用 *t* 测验法进行差异显著性检验。

2 结果与分析

2.1 NaCl 胁迫下菜用大豆种子蛋白质双向电泳图谱分析

研究表明，大豆种子发育过程中蛋白质点主要分布在 pH 4～7 的范围[6]，为了得到分离效果较好的蛋白质图谱，本研究采用 pH 4～7 的线性 IPG 胶条对菜用大豆种子蛋白质进行分离，得到了重复性好的 2－DE 图谱(图 1)。用 Image Master Platinum 软件对图谱进行检测，在分子量 14.4～94.0 kD，等电点 4～7 范围内，对照和处理的 2－DE 图谱上均检测到 327 个蛋白质点。

用 Image Master Platinum 软件对两 2－DE 图谱进行匹配分析，并计算各蛋白点的相对体积，以此来表示各蛋白的丰度。结果显示，对照与 NaCl 处理的 2－DE 图谱之间存在 3 次重复一致出现的 28 个差异表达蛋白，其中 16 个蛋白显著上调，另外 12 个显著下调(图 1)。对照及处理 2－DE 图谱中各上调蛋白和下调蛋白的相对体积(蛋白质丰度)见表 1。

2.2 部分差异表达蛋白的基质辅助激光解吸离子化飞行时间质谱分析

从 28 个差异表达蛋白中选取 6 个丰度变化较大的点 1、2、7、16、25 及 26(丰度变化在 2.5 倍以上)进行基质辅助激光解吸离子化飞行时间质谱

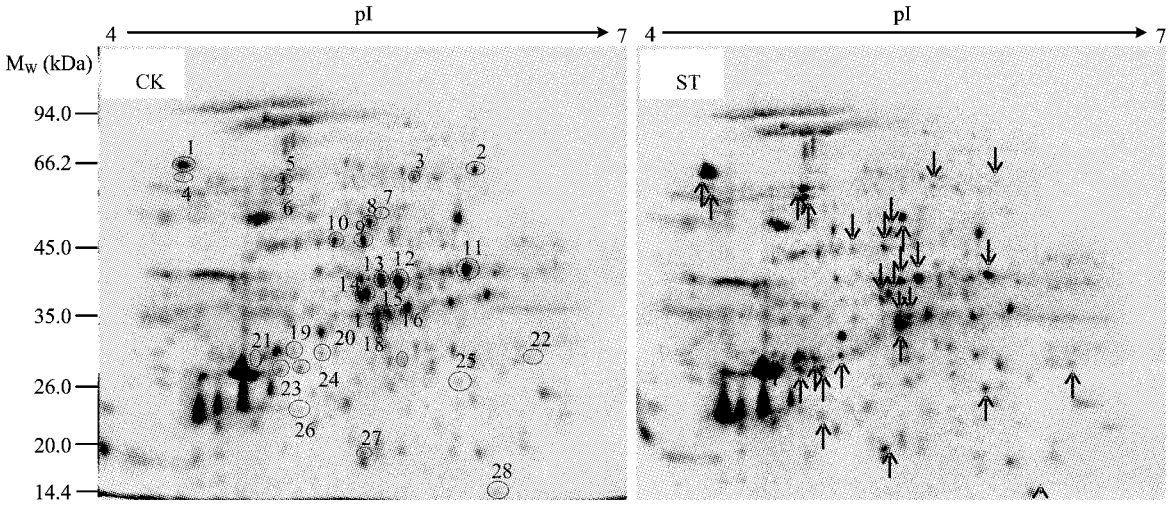

图1 NaCl胁迫下菜用大种子膨大初期蛋白质双向电泳图谱

Fig. 1 Two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) maps of vegetable soybean seed proteins at the early filling stage under the NaCl stress

[注(Note):对照CK; ST—NaCl胁迫NaCl stress; M_W—分子量Stands for molecular weight; pI—等电点Isoelectric point]

表1 NaCl胁迫下28个差异表达蛋白的丰度变化

Table 1 Changes in abundances of 28 differentially expressed proteins

蛋白点编号 Spot No.	蛋白质丰度(%, Vol.) Protein abundance CK	ST	丰度变化 Change in abundance	蛋白点编号 Spot No.	蛋白质丰度(%, Vol.) Protein abundance CK	ST	丰度变化 Change in abundance
2	0.291 ±0.022	0.062 ±0.005	-4.694	24	0.225 ±0.016	0.444 ±0.037	+1.973
26	0.125 ±0.012	0.373 ±0.031	+2.984	6	0.315 ±0.022	0.585 ±0.041	+1.857
7	0.175 ±0.015	0.520 ±0.050	+2.971	21	0.130 ±0.010	0.237 ±0.017	+1.823
16	1.020 ±0.094	0.378 ±0.025	-2.698	8	0.600 ±0.046	0.358 ±0.026	-1.676
25	0.117 ±0.009	0.304 ±0.020	+2.598	13	1.463 ±0.155	0.891 ±0.070	-1.642
1	0.915 ±0.074	2.342 ±0.182	+2.560	4	0.132 ±0.009	0.198 ±0.016	+1.500
23	0.248 ±0.021	0.577 ±0.040	+2.327	20	0.167 ±0.010	0.250 ±0.025	+1.497
3	0.242 ±0.017	0.109 ±0.008	-2.220	22	0.175 ±0.011	0.255 ±0.018	+1.457
27	0.240 ±0.018	0.529 ±0.038	+2.204	18	0.828 ±0.060	1.162 ±0.146	+1.403
10	0.562 ±0.050	0.256 ±0.025	-2.195	15	0.591 ±0.047	0.432 ±0.035	-1.368
19	0.264 ±0.020	0.578 ±0.048	+2.189	17	0.538 ±0.048	0.401 ±0.030	-1.342
28	0.136 ±0.010	0.283 ±0.024	+2.081	11	1.176 ±0.125	0.900 ±0.070	-1.307
9	0.660 ±0.056	0.321 ±0.028	-2.056	5	0.613 ±0.041	0.798 ±0.065	+1.302
12	1.074 ±0.088	0.529 ±0.042	-2.030	14	0.503 ±0.047	0.400 ±0.038	-1.258

注(Note):"丰度变化"栏内正数表示NaCl胁迫下的蛋白质丰度与对照丰度的比值,负数表示对照丰度与NaCl胁迫下丰度的比值

The positive number under the "Change in abundance" column stands for the ratio of protein abundance in NaCl treated seeds to that of the control, and the negative for the ratio of the control to the NaCl treatment. ST—NaCl胁迫NaCl stress.

(matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-MS)分析,从中鉴定出5个蛋白,分别是点2、7、16、25及26(表2)。

表 2　差异表达蛋白的肽质量指纹图谱数据库检索鉴定结果

Table 2　Differentially expressed proteins identified by peptide mass finger printing map(PMF) query

蛋白点编号 Protein spot No.	实验分子量/等电点 Experimental Mw/pI	理论分子量/等电点 Theoretical Mw/pI	序列覆盖率 Sequence coverage (%)	分子量检索概率得分 MOWSE score	登录号 Accession No.	蛋白名称 Protein name
2	65.4/5.96	54.9/5.46	16	104	gi|121277	大豆球蛋白 G2 前体 Glycinin G2 precursor
7	54.4/5.47	42.0/5.31	36	129	gi|58013197	肌动蛋白 Actin
16	35.9/5.51	28.9/6.32	28	95	gi|26056845	大豆球蛋白 G2 前体相似蛋白 GLYCININ G2 PRECURSOR
25	26.5/5.88	27.0/6.29	23	70	gi|76573359	类 α-微管蛋白 Alpha-tubulin-like protein
26	23.1/5.05	24.3/4.83	27	83	gi|39725579	Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂 Kunitz trypsin inhibitor

注(Note): M_W—分子量 Stands for molecular weight; pI—等电点 Isoelectric point.

图 2 为蛋白点 7 的肽质量指纹图谱,图中用黑体数字标注的 12 条肽段为蛋白点 7 与肌动蛋白(actin)匹配到的肽段;图 3 为 actin 的氨基酸序列,图中粗体划线的 12 条肽段是蛋白点 7 与 actin 相匹配的肽段及相对应的氨基酸序列,序列覆盖率达 36%。

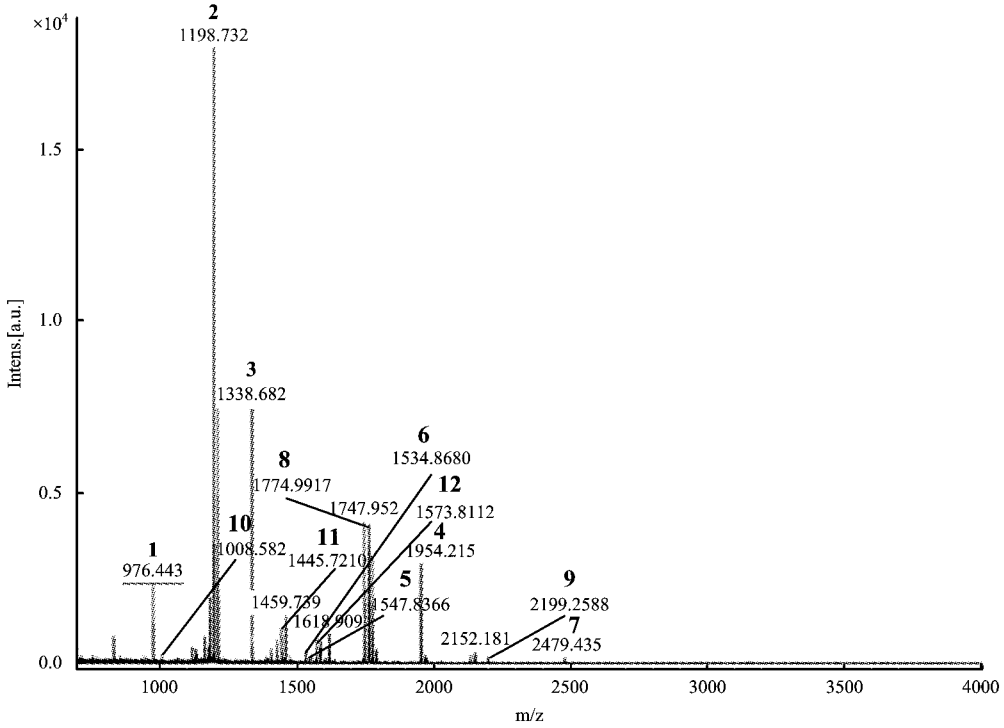

图 2　蛋白点 7 的肽质量指纹图谱

Fig. 2　Peptide mass fingerprinting map of protein spot 7

[注(Note): 用黑体数字标注的肽段为蛋白点 7 与肌动蛋白匹配到的肽段

The peptides marked with bold numbers are matched peptides of spot 7 with actin.]

1 MADGEDIQPL VCDNGTGMVK AGFAGDDAPR AVFPSIVGRP RHTGVTVWMG

51 QK DAYVGDEA QSKRGILTLK YPIEHGIVSN WDDMEKIWHH TFYNELR VAP

101 EEHPVLLTEA PLNPKANREK MTQIMFETFN VPAMYVAIQA VLSLYASGRT

151 TGIVLDSGDG VSHTVPIYEG YALPHAILR L DLAGRDLTDS LMKILTER GY

201 MFTTTAEREI VRDIKEKLAY VALDYEQELE TAKSSSSVEK NYELPDGQVI

251 TIGAERFRCP EILFQPSLIG MEAPGIHETT YNSIMKCDVD IRK DLYGNIV

301 LSGGSTMFPG IADRMSKEIT ALAPSSMKIK VVAPPERKYS VWIGGSILAS

351 LSTFQQMWIS KGEYD ESGPS IVHRKCF

图3 Actin 的氨基酸序列

Fig. 3 The amino acid sequence of actin

[注(Note):粗体划线的12个肽段是蛋白点7与actin相匹配的肽段及相对应的氨基酸序列,标注的数字为肽质量指纹图谱中匹配到的肽段编号 Twelve peptides and their amino acid sequences in bold and underlined of spot 7 are matched with actin, the marked numerals stand for the matched peptide peak numbers of peptide mass fingerprinting.]

3 讨论

种子发育可分为胚胎形成、种子膨大和成熟三个阶段,其中种子膨大是种子发育过程中持续时间最长的阶段,该阶段主要进行细胞分裂、膨大及储藏物质合成等生理活动。对大豆而言,花后2～6周属种子膨大期[14],此期的代谢活动对种子储藏物质积累及种子品质的优劣具有至关重要的作用[15]。种子膨大初期(花后2～3周)主要进行细胞分裂,储藏物质的合成是在细胞分裂完成之后进行,种子的生长则是通过细胞膨大及储藏物质的积累来实现[16]。蛋白质代谢与种子的生命活动是密切相关的,且其代谢是一个动态变化过程,在种子发育的不同阶段会合成类型数量不同的蛋白质。Hajduch等[6]的研究发现,大豆种子膨大过程中,代谢类蛋白(如各种代谢酶)、与细胞生长、分裂相关蛋白(如微管蛋白,肌动蛋白等)及信号转导蛋白的表达量在种子膨大的前期较高,随着种子的发育其表达量逐渐降低,而储藏蛋白的表达量随着种子的发育逐渐增加。这些动态变化的蛋白质构成了细胞某一时刻的特征性生命活动基础,对其进行研究是认识生命活动本质的一个恰当而直接的途径[17]。

NaCl胁迫所引起的渗透胁迫、离子毒害以及次生的氧化胁迫会对细胞造成伤害,引起细胞代谢紊乱[18],进而影响蛋白质的代谢和积累。运用蛋白质组学技术对NaCl胁迫后某一时期的差异表达蛋白进行研究,即可获得NaCl胁迫下该时期蛋白质代谢变化的信息,进而揭示NaCl胁迫对该时期生命活动的影响。本研究结果显示,NaCl胁迫5 d(花后15 d)后,对照与处理的2-DE图谱之间出现了28个差异表达蛋白,这充分说明了NaCl胁迫对菜用大豆种子膨大初期的蛋白质代谢产生了显著影响。

球蛋白是大豆的主要储藏蛋白,其主要组分有7S球蛋白和11S球蛋白,两者占储藏蛋白的75%左右[19]。11S球蛋白又称大豆球蛋白,由6个亚基组成[20]。研究表明,大豆球蛋白由5个非等位基因Gy1、Gy2、Gy3、Gy4和Gy5分别编码形成5个大豆球蛋白前体分子G1、G2、G3、G4和G5[19,21]。本研究表明,NaCl胁迫2-DE图谱中大豆球蛋白前体G2(protein spot 2)及大豆球蛋白前体G2相似蛋白(protein spot 16)均显著下调。说明NaCl胁迫对菜用大豆种子中11S储藏蛋白及相似蛋白的积累产生了显著的抑制作用。

肌动蛋白是组成微丝的结构蛋白。两条线性排列的肌动蛋白链形成的螺旋构成微丝,状如双线捻成的绳子。微丝是细胞骨架的重要成分,在植物生长发育过程中具有许多重要的生理功能,如维持细胞形态和确定胞内区隔;细胞的收缩、运动等。此外,微丝还具有信号转导的功能。大量研究表明,微丝与来自于质膜的信号转导的级联放大密切相关[22-27]。渗透胁迫下,植物细胞发生了一系列生理

变化，如胞液 Ca^{2+} 浓度发生改变[28-29]；促分裂原活化蛋白激酶级联反应激活[30]；肌醇信号系统中多磷酸肌醇的快速合成[31-32]。以上这些生理变化都与肌动蛋白微丝的调节机制有关[33-34]。肌动蛋白微丝是真核细胞胞外信号的靶标和综合者，其结构的改变很可能是对生物和非生物胁迫信号的一个应答反应[35]。研究表明，质壁分离引起细胞 Ca^{2+} 浓度迅速升高，由此直接导致肌动蛋白亚基聚合亲和力增加[36]或间接地通过一系列 Ca^{2+} 信号转导途径来影响肌动蛋白活动[37-38]。Komis 等研究发现[39]，渗透胁迫下，与对照相比，吊篮叶肉质壁分离细胞中膜下肌动蛋白微丝含量显著增加，同时肌动蛋白微丝发生了聚合重组，认为肌动蛋白网状组织迅速重组对逆境胁迫下植物组织细胞信号感知是非常重要的。Galbraith 等[40]的研究表明，动物沿血管排列的内皮细胞持续不断地受到来自血液的剪切应力，为了抵消这种应力，这些内皮细胞形成了庞大的皮层肌动蛋白应力纤维。吊篮叶肉质壁分离细胞质膜下形成大量肌动蛋白网很可能是为了抵消质膜受到来自质壁分离引起的剪切应力，这可能与动物细胞形成肌动蛋白应力纤维的机制相同[39]。同时，肌动蛋白微丝重组可阻止“凸形”原生质体出现，维持质膜的稳定性，进而维持细胞的正常形态[39]。此外，肌动蛋白重组还可能控制质膜离子通道和水通道调节，维持细胞渗透平衡，进而维持原生质体体积[39]。本研究中，菜用大豆种子肌动蛋白（protein spot 7）的丰度在 NaCl 胁迫下显著增加，说明 NaCl 胁迫对肌动蛋白的表达产生了显著的诱导作用。这与吊篮叶肉细胞在渗透胁迫下的反应相同。NaCl 胁迫可导致植物细胞发生一系列的生理变化，如质壁分离、膜脂过氧化等，同时可导致 Ca^{2+} 浓度迅速升高，而 Ca^{2+} 浓度的升高可能直接或间接诱导肌动蛋白微丝聚合重组[36-38]，进而引起肌动蛋白大量合成。而肌动蛋白微丝聚合重组在对胞外信号感知、维持细胞正常形态及质膜稳定性、维持细胞渗透平衡等方面发挥着重要作用。肌动蛋白是肌动蛋白微丝聚合重组的物质基础，NaCl 胁迫下肌动蛋白表达量增加可能是菜用大豆种子细胞阻止或缓解盐胁迫伤害的一种应激反应。

Valkov 和 Ivanov[41]研究发现，豌豆叶绿体中的纤维状骨架结构由类微管蛋白组成。Margolin[42]认为类微管蛋白 FtsZ 在植物叶绿体和部分线粒体分裂过程中发挥着重要作用。而有关植物体中类 α-微管蛋白的生理功能还未见报道。本研究中 NaCl 胁迫下类 α-微管蛋白（protein spot 25）的表达量显著增加，推测该蛋白也可能与种子细胞器（叶绿体和线粒体）的分裂有关。种子膨大初期的主要生理活动是细胞分裂、增殖，NaCl 胁迫下细胞通过大量合成类 α-微管蛋白来维持细胞器乃至细胞分裂、增殖的顺利进行，进而降低 NaCl 胁迫对种子膨大造成的不利影响。

蛋白酶抑制剂在植物、动物及微生物体中普遍存在，在调节内源酶活性、抵抗害虫及病源微生物入侵中发挥着重要作用[43]。蛋白酶抑制剂可分为 48 个家族[44]，其中 Kunitz 型蛋白酶抑制剂属典型丝氨酸蛋白酶抑制剂，广泛存在于植物体中。大豆中胰蛋白酶抑制剂约有 7 ～ 10 种[45]，其中 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂在大豆中含量最丰富。通常认为 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂具有调节内源蛋白酶活性和植物防御等作用，是植物自身保护系统的重要组成部分。研究表明，植物体内胰蛋白酶抑制剂可与蛋白水解酶结合，使酶以无活性的形式存在，酶受到激活后，中和掉抑制剂从而表现出逐渐增强的酶活力[46-48]。说明胰蛋白酶抑制剂能与相应的蛋白水解酶形成一定的动态平衡，防止自身蛋白质发生分解代谢。Ledoigt 等[49]研究发现，马铃薯块茎在水分胁迫下积累大量 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂，认为该抑制剂与其它多肽密切相关，通过保护其它多肽免受胰蛋白类蛋白酶分解而行使植物保护功能。本研究结果显示，NaCl 胁迫下菜用大豆种子中 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂（protein spot 26）的表达量显著增加。这与水分胁迫下马铃薯块茎的表现相同。说明非生物逆境胁迫可对 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂表达产生诱导作用。NaCl 胁迫可导致膜脂过氧化，打破蛋白质的代谢平衡，加速蛋白质分解、破坏[50-51]，而胰蛋白酶抑制剂大量表达，可有效抑制蛋白酶的水解活力，降低蛋白质的分解速度，同时还可保护其它防御蛋白不被降解，提高细胞的防御能力。NaCl 胁迫下 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂表达量增加可能是菜用大豆种子对 NaCl 胁迫的一种应答反应。

4　结论

NaCl 胁迫对菜用大豆种子膨大初期的蛋白质代谢产生了显著影响。NaCl 胁迫下种子细胞通过大量合成肌动蛋白来确保信号感知、维持细胞原生质正常形态及渗透平衡等功能的顺利实现；通过大量合成 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂来抑制蛋白质的

分解,同时提高细胞的防御能力,进而降低 NaCl 胁迫对细胞造成的伤害,这可能是其对 NaCl 胁迫的一种应答反应。

参考文献:

[1] Drewes G, Bouwmeester T, Cellzome A G. Global approaches to protein-protein interactions[J]. Curr. Opin. Cell Biol., 2003, 15(2): 199-205.

[2] Ramani S, Apte S K. Transient expression of multiple genes in salinity-stressed young seedlings of rice (*Oryza sativa* L.) cv. Bura Rata[J]. Biochem. Biophys. Res. Commun., 1997, 233(3): 663-667.

[3] Majoul T, Bancel E, Triboï E *et al*. Proteomic analysis of the effect of heat stress on hexaploid wheat grain: characterization of heat-responsive proteins from non-prolamins fraction[J]. Proteomics, 2004, 4(2): 505-513.

[4] 周伟辉, 薛大伟, 张国平. 高温胁迫下水稻叶片的蛋白响应及其基因型和生育期差异[J]. 作物学报, 2011, 37(5): 820-831.
Zhou W H, Xue D W, Zhang G P. Protein response of rice leaves to high temperature stress and its difference of genotypes at different growth stage[J]. Acta Agron. Sin., 2011, 37(5): 820-831.

[5] Jagadish S V K, Muthurajan R, Rang Z W *et al*. Spikelet proteomic response to combined water deficit and heat stress in rice (*Oryza sativa* cv. N22)[J]. Rice, 2011, 4(1): 1-11.

[6] Hajduch M, Ganapathy A, Stein J W *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 Physiol., 2005, 137(4): 1397-1419.

[7] Zarkadas C G, Gagnon C, Gleddie S *et al*. Assessment of the protein quality of fourteen soybean (*Glycine max* L. Merr.) cultivars using amino acid analysis and two-dimensional electrophoresis[J]. Food Res. Int., 2007, 40(1): 129-146.

[8] Natarajan S, Xu C, Bae H *et al*. Proteomic and genetic analysis of glycinin subunits of sixteen soybean genotypes[J]. Plant Physiol. Biochem., 2007, 45(6-7): 436-444.

[9] 王聪, 朱月林, 杨立飞, 等. NaCl 胁迫对菜用大豆种子球蛋白表达的影响[J]. 西北植物学报, 2008, 28(11): 2145-2153.
Wang C, Zhu Y L, Yang L F *et al*. Expression levels of globulins in vegetable soybean seeds under NaCl stress[J]. Acta Bot. Bor-Occid. Sin., 2008, 28(11): 2145-2153.

[10] 王聪, 朱月林, 杨立飞, 等. 菜用大豆耐盐品种的筛选及其耐盐生理特性[J]. 江苏农业学报, 2009, 25(3): 621-627.
Wang C, Zhu Y L, Yang L F *et al*. Screening of vegetable soybean cultivars for salt tolerance and their physiological characteristics[J]. Jiangsu J. Agric. Sci., 2009, 25(3): 621-627.

[11] Gallardo K, Job C, Groot S P C *et al*. Proteomic analysis of Arabidopsis seed germination and priming[J]. Plant Physiol., 2001, 126(2): 835-848.

[12] 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, 25(3): 165-170.
Zheng R, Yu D Y. Improvement of two-dimensional electrophoresis of bean seed protein for proteome analysis[J]. Soybean Sci., 2005, 25(3): 165-170.

[13] Yang L F, Zhu Y L, Hu C M *et al*. Separation and identification of specific proteins in leaves of grafted cucumber under NaCl stress[J]. Acta Hortic., 2008, 771: 183-190.

[14] Meinke D W, Chen J, Beachy R N. Expression of storage-protein genes during soybean seed development[J]. Planta, 1981, 153(2): 130-139.

[15] Thelen J J, Ohlrogge J B. Metabolic engineering of fatty acid biosynthesis in plants[J]. Metab. Eng., 2002, 4(1): 12-21.

[16] Herman E M, Larkins B A. Protein storage bodies and vacuoles[J]. Plant Cell, 1999, 11(4): 601-614.

[17] 何大澄, 肖雪媛. 差异蛋白质组学及其应用[J]. 北京师范大学学报(自然科学版), 2002, 38(4): 558-562.
He D C, Xiao X Y. Differential proteomics and its applications[J]. J. Beijing Norm. Univ. (Nat. Sci.), 2002, 38(4): 558-562.

[18] 潘瑞炽, 董愚得. 植物生理学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1995. 318-335.
Pan R Z, Dong Y D. Plant physiology[M]. Beijing: Higher Education Press, 1995. 318-335.

[19] Nielsen N C, Dickinson C D, Cho T J *et al*. Characterization of the glycinin gene family in soybean[J]. Plant Cell, 1989, 1(3): 313-328.

[20] Staswick P E, Hermodson M A, Nielsen N C. Identification of the cystines which link the acidic and basic components of the glycinin subunits[J]. J. Biol. Chem., 1984, 259(21): 13431-13435.

[21] Renkema J M S, Knabben J H M, van Vliet T. Gel formation by beta-conglycinin and glycinin and their mixtures[J]. Food Hydrocolloids, 2001, 15(4-6): 407-414.

[22] Meagher R B, Mckinney E C, Kandasamy M K. Isovariant dynamics expand and buffer the responses of complex systems: the diverse plant actin gene family[J]. Plant Cell, 1999, 11(6): 995-1006.

[23] Volkmann D, Baluška F. Actin cytoskeleton in plants: from transport networks to signaling networks[J]. Microsc. Res. Tech., 1999, 47(2): 135-154.

[24] Staiger C J. Signaling to the actin cytoskeleton in plants[J]. Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol., 2000, 51: 257-288.

[25] Mccurdy D W, Kovar D R, Staiger C J. Actin and actin-binding proteins in higher plants[J]. Protoplasma, 2001, 215(1-4): 89-104.

[26] Hussey P J, Allwood E G, Smertenko A P. Actin-binding proteins in the Arabidopsis genome database: properties of functionally distinct plant actin-depolymerizing factors/cofilins[J]. Philos. Trans. R. Soc. Lond B Biol. Sci., 2002, 357(1422): 791-798.

[27] Šamaj J, Ovecka M, Hlavacka A *et al*. Involvement of the mito-

gen-activated protein kinase SIMK in regulation of root hair tip growth[J]. EMBO J., 2002, 21(13): 3296-3306.

[28] Brownlee C, Goddard H, Hetherington A M *et al*. Specificity and integration of responses: Ca^{2+} as a signal in polarity and osmotic regulation[J]. J. Exp. Bot., 1999, 50(Spec. Iss.): 1001-1011.

[29] Knight H. Calcium signaling during abiotic stress in plants[J]. Int. Rev. Cytol., 2000, 195: 269-324.

[30] Jonak C, Ligterink W, Hirt H. MAP kinases in plant signal transduction[J]. Cels. Cell. Mol. Life Sci., 1999, 55(2): 204-213.

[31] Munnik T, Meijer H J G, ter Riet B *et al*. Hyperosmotic stress stimulates phospholipase D activity and elevates the levels of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate[J]. Plant J., 2000, 22(2): 147-154.

[32] Meijer H J G, Arisz S A, van Himbergen J A J *et al*. Hyperosmotic stress rapidly generates lyso-phosphatidic acid in Chlamydomonas[J]. Plant J., 2001, 25(5): 541-548.

[33] Richelme F, Benoliel A M, Bongrand P. Dynamic study of cell mechanical and structural responses to rapid changes of calcium level[J]. Cell Motil. Cytoskeleton, 2000, 45(2): 93-105.

[34] Sullivan R, Burnham M, Török K *et al*. Calmodulin regulates the disassembly of cortical F-actin in mast cells but is not required for secretion[J]. Cell Calcium, 2000, 28(1): 33-46.

[35] Poulter N S, Staiger C J, Rappoport J Z *et al*. Actin-binding proteins implicated in formation of the punctate actin foci stimulated by the self-incompatibility response in papaver[J]. Plant Physiol., 2010, 152: 1274-1283

[36] Strzelecka-Golaszewska H. Divalent cations nucleotides, and actin structure[J]. Results Probl. Cell Differ., 2001, 32: 23-41.

[37] Janmey P A. Phosphoinositides and calcium as regulators of cellular actin[J]. Annu. Rev. Physiol., 1994, 56: 169-191.

[38] Janmey P A. The cytoskeleton and cell signaling: component localization and mechanical coupling[J]. Physiol. Rev., 1998, 78: 763-781.

[39] Komis G, Apostolakos P, Galatis B. Hyperosmotic stress-induced actin filament reorganization in leaf cells of *Chlorophyton comosum*[J]. J. Exp. Bot., 2002, 53(375): 1699-1710.

[40] Galbraith C G, Skalak R, Chien S. Shear stress induces spatial reorganization of the endothelial cell cytoskeleton[J]. Cell Motil. Cytoskeleton, 1998, 317-330.

[41] Valkov N, Ivanov A G. Immunogold-localization of tubulin-like protein in the intra-skeletal structure of pea chloroplasts[J]. NATO ASI Ser.: Ser. A: Life Sci., 1992, 226: 463-468.

[42] Margolin W. FtsZ and the division of prokaryotic cells and organelles[J]. Nat. Rev. Mol. Cell Biol., 2005, 6(11): 862-871.

[43] Habib H, Fazili K M. Plant protease inhibitors: a defense strategy in plants[J]. Biotechnol. Mol. Biol. Rev., 2007, 2(3): 068-085.

[44] Rawlings N D, Tolle D P, Barrett A J. Evolutionary families of peptidase inhibitors[J]. J. Biochem., 2004, 378: 705-716.

[45] Bode W, Huber R. Natural protein proteinase inhibitors and their interaction with proteinaes[J]. Eur. J. Biochem., 1992, 204(2): 433-451.

[46] Ryan C A. Proteolytic enzymes and their inhibitors in plants[J]. Annu. Rev. Plant Physiol., 1973, 24: 173-196.

[47] Dunaevskii Y E, Pavlikova E B, Belyakova G A *et al*. Physiological role of protease inhibitors in plants: two groups of active inhibitors in buckwheat seed[J]. Mol. Biol., 1995, 29(6): 747-750.

[48] Mezhlum'yan L G, Redina É F, Yuldashev P Kh. Functions of inhibitors of proteolytic enzymes in plants[J]. Chem. Nat. Compd., 1997, 33(1): 31-35.

[49] Ledoigt G, Griffaut B, Debiton E *et al*. Analysis of secreted protease inhibitors after water stress in potato tubers[J]. Int. J. Biol. Macromol., 2006, 38: 268-271.

[50] Bowler C, Montagu M V, Lnze D. Superoxide dismutase and stress tolerance[J]. Annu. Rev. Plant Physiol. Mol. Biol., 1992, 43: 83-116.

[51] Alscher R G, Donahue J L, Cramer C L. Reactive oxygen species and antioxidants: relationships in green cells[J]. Physiol. Plant., 1997, 100(2): 224-233.