

# 尖镰孢胁迫下黄瓜茎部蛋白质差异表达分析

杨 森<sup>1</sup>, 祝海娟<sup>1</sup>, 杜洪锐<sup>1</sup>, 陈瑞雪<sup>1</sup>, 党悦嘉<sup>1</sup>, 周莹莹<sup>2</sup>, 张艳菊<sup>1\*</sup>

(1. 东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030, 2. 哈尔滨市阿城区种子服务中心, 哈尔滨 150030)

**摘要** 为揭示尖镰孢胁迫下黄瓜茎部蛋白质差异,以黄瓜枯萎病高抗品系‘D0327’和感病品系‘649’为试验材料,分别接种 2 个毒力不同的尖镰孢 C9 和 S1 菌株后提取黄瓜茎部蛋白,运用双向电泳技术研究了尖镰孢侵染后茎部蛋白质组的变化。结果表明,2 个尖镰孢菌胁迫下,抗感材料茎部蛋白表达发生了变化。茎部蛋白质双向电泳图谱与对照图谱进行比较分析,成功鉴定出 8 个差异蛋白点。强毒力菌株 C9 胁迫下,感病品系中鉴定出 3 个差异蛋白,分别是烯醇化酶及亚基、肌动蛋白和放氧增强蛋白,抗病品系中差异蛋白为烯醇化酶及亚基、磷酸丙糖异构酶和核苷酸二磷酸激酶。弱毒力菌株 S1 胁迫下,感病品系中差异蛋白为 Csf-2 蛋白,抗病品系中差异蛋白为放氧增强蛋白。这些蛋白分别参与能量代谢、光合作用和胁迫反应。

**关键词** 黄瓜; 尖镰孢; 双向电泳; 质谱分析

**中图分类号:** S 436.421 **文献标识码:** A **DOI:** 10.16688/j.zwbh.2017397

## Differential expression analysis of cucumber stem proteins induced by *Fusarium oxysporum*

YANG Sen<sup>1</sup>, ZHU Haijuan<sup>1</sup>, DU Hongrui<sup>1</sup>, CHEN Ruixue<sup>1</sup>, DANG Yuejia<sup>1</sup>, ZHOU Yingying<sup>2</sup>, ZHANG Yanju<sup>1</sup>

(1. College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China;

2. Seed Service Center of Acheng District, Harbin 150030, China)

**Abstract** To reveal the difference in proteins of cucumber induced by *Fusarium oxysporum*, the resistant line ‘D0327’ and susceptible ‘649’ were inoculated with two different virulent C9 and S1 strains, and differential proteomics in cucumber stems induced by *F. oxysporum* was analyzed by two-dimensional gel electrophoresis. The results showed that there were different proteins between resistant and susceptible lines. Eight protein spots were identified by mass spectrometry: enolase and subunits, actin, exothermic protein, phosphate isomerase and nucleotide diphosphate kinase were obtained under the stress of C9, and Csf-2 and exothermic protein were obtained under the stress of S1. All of these proteins were involved in energy metabolism, photosynthesis and response to stress.

**Key words** cucumber; *Fusarium oxysporum*; 2-DE; mass spectrometry

植物在逆境胁迫环境下,一些基因被诱导表达,实现植物在蛋白组学水平的适应性调整,构建了植物整个复杂且高效的响应系统。大量研究表明,病程相关蛋白(pathogenesis related protein)是主要的宿主功能蛋白,这些重要的功能蛋白在不同类型互作系统中得到了充分的验证,明确了各种类型植物防御机制相关功能性蛋白的作用<sup>[1-3]</sup>。利用蛋白质组学技术构建植物宿主-病原菌互作体系已经成为当前研究的趋势和热点之一。

由无性型真菌镰孢属尖镰孢黄瓜专化型 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* 侵染引起的黄瓜枯萎病是黄瓜生产中的重要土传病害,由于保护地的特殊环境条件和长期连作,土壤中病原菌的积累量越来越多,导致黄瓜枯萎病等土传病害发生逐年加重。*F. oxysporum* 通常定殖于植物的维管束,对输导组织产生危害,同时产生相应的毒素,致使茎基部维管束变褐,严重地影响了水、矿物质及营养的运输及黄瓜的生长<sup>[4]</sup>。植物茎部除了运输水、

收稿日期: 2017-10-18 修订日期: 2018-03-01

基金项目: 国家自然科学基金(31171792);黑龙江省自然科学基金重点项目(ZD2016003)

\* 通信作者 E-mail: zhangyanju1968@163.com

矿物盐、营养和代谢物外,也参与长距离信号运输,作为对病原菌、共生体和环境压力入侵的一种反应场所<sup>[5]</sup>。当病原菌侵染植物时,会有病程相关蛋白及其产物等一系列抗性相关物质产生,其中包括代谢酶、与压力有关的蛋白质等。

本研究采用双向电泳技术分析在两种毒力不同的尖镰孢胁迫下黄瓜抗感枯萎病品系茎中蛋白质的差异表达,用质谱分析方法鉴定与抗病相关的蛋白质,从蛋白水平初步探索抗枯萎病机制,从而为维管束病害中寄主与病原的互作提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

黄瓜枯萎病高抗品系‘D0327’和感病品系‘649’,由东北农业大学黄瓜课题组提供。尖镰孢黄瓜专化型 *Fusarium oxysporum* f. sp. *cucumerinum* 强毒力菌株 C9 和弱毒力菌株 S1,由东北农业大学植物病理研究室提供<sup>[6]</sup>。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 接种

将培养在 PSA 平板上的供试菌种移入 PL 培养液中,置于 25~28℃,转速 110~120 r/min 的恒温摇床中振荡培养 7~10 d。将菌液用 4 层纱布滤掉菌丝体,滤液在转速 4 000 r/min 下离心 10 min 后移去上清液,加入无菌蒸馏水配制成  $1.0 \times 10^7$  个/mL 的孢子悬浮液。于黄瓜幼苗两片真叶期,采用灌根法将 2 个毒力不同的尖镰孢菌株分别接种抗感黄瓜品系<sup>[7]</sup>。接种后待感病品系‘649’茎部出现变黄症状后(7 d)进行取材,将整株茎剪成 5 cm 茎段用锡纸包好,迅速用液氮处理后置于-80℃冰箱中保存备用。

#### 1.2.2 黄瓜茎部蛋白质的提取

利用 TCA-丙酮法<sup>[8]</sup>,提取黄瓜茎组织蛋白质。利用考马斯亮蓝法<sup>[9]</sup>测定蛋白质浓度并进行定量。称取 1 g 黄瓜茎放入预冷的研钵中,加入液氮研磨至粉末状;将粉末转移至 2 mL EP 管中,加入 5 倍体积预冷的 10% TCA-丙酮溶液,漩涡振荡至其混合充分,放于-20℃冰箱沉淀过夜;4℃,13 000 r/min 离心 30 min,移去上清液;向沉淀中加入 5 倍体积预冷的丙酮溶液(含 0.07%  $\beta$ -巯基乙醇,-20℃预冷),充分混合,置于-20℃冰箱中静置 1 h(期间漩涡振荡几次);4℃,13 000 r/min 离心 30 min,移去上清液

(重复上述步骤 6~7 次,洗至上清呈无色);沉淀经真空干燥制成蛋白质干粉,-80℃保存备用。

### 1.2.3 蛋白质双向电泳

第一向电泳选择 24 cm,pH 4~7 的 IPG 胶条进行等电聚焦,第二向电泳采用 12.5% 的 SDS-PAGE 分离胶,双向电泳结束后进行考马斯亮蓝 G-250 染色,每个处理进行 3 次重复。获得的 2-DE 凝胶图像通过 Imagemaster 2D Platinum 7.0 软件进行图像分析。与参考胶比较,特异表达、表达量上调或下调 2 倍以上被认为是差异表达的蛋白质点。

### 1.2.4 质谱鉴定和蛋白鉴定

委托哈尔滨赛信生物科技有限公司进行 MALDI-TOF-TOF/MS 质谱分析。质谱分析结果利用软件 Mascot 2.3.02 进行分析,经过 NCBI(nr)数据库和黄瓜基因组数据库(<http://www.icugi.org/cgi-bin/ICuGI/genome/index.cgi?organism=cucumber>)分析,获得相关蛋白质点的鉴定结果。

### 1.2.5 差异蛋白基因表达验证

在黄瓜基因组数据库中搜索编码蛋白的基因,利用在线工具 GenScript Real-time PCR (TaqMan) Primer Design 进行设计(<https://www.genscript.com/ssl-bin/app/primer>)。引物序列发送至上海生物工程技术有限公司进行合成,引物序列见表 1。

表 1 qRT-PCR 引物序列

Table 1 Primer sequences for qRT-PCR

基因编号 Gene no.	引物序列(5'-3') Sequence of primer
CsEF1 $\alpha$	F:CGCTCTTCTTGCTTTACCCCTT R:TACCTTGCCTTGGAGTATTTGG
Csa5M611600.1	F:GCAACACTTGGCCGTATCAT R:AATTTGCTGTTCCTTGCCCT
Csa6M484600.2	F:CACCATCGGAGCTGAGAGAT R:CTCATCCTGTCTGCAATGCC
Csa4M063440.1	F:TACAGCGTCCAACGTGAATG R:CCCTCCACAACTTCCTTGC
Csa6M450370.1	F:TGGTGCAAATGCCATACTCG R:TGCAAGCTTGTTTCCTGCAT
Csa4M598000.1	F:TGGAACAAACGAGGAGGTGA R:CCAGTAAACGCACCACCTTT
Csa3M116710.1	F:TGGACTCTGATGTGGGAACC R:GTAAACGGGACCTTCTGGGA
Csa017651	F:GGGTGATCTATATGGAAAGCTGGA R:TTCATGTAGGTCGACACCGT
Csa6M522690.1	F:CCTCTGCAATGGCTCTTTCC R:CTGACTTGCTGGCAGTCTTC

采用 TRIzol 法提取黄瓜叶片总 RNA<sup>[10]</sup>。根据 Toyobo 反转录试剂盒 ReverTra Ace qPCR RT-Kit 说明书反转录成 cDNA。依照 SYBR® Green Realtime PCR Master Mix 说明书进行。参照基因为 *CsEF1α* (GenBank Accession Number: XM\_004138916)<sup>[11]</sup>。反应体系 SYBR Green PCR Master Mix, 10 μL; 上游引物 0.5 μL; 下游引物 0.5 μL; cDNA 2 μL; ddH<sub>2</sub>O 7 μL。反应条件: 95℃ 3 min; 95℃ 10 s, 58℃ 20 s, 72℃ 30 s, 40 次循环; 55℃ 10 s, 81 次循环; 4℃, 10 min。采用 2<sup>-ΔΔCT</sup> 相对定量分析方法计算出基因的相对表达量<sup>[12]</sup>, 并用 DPS 7.05 数据处

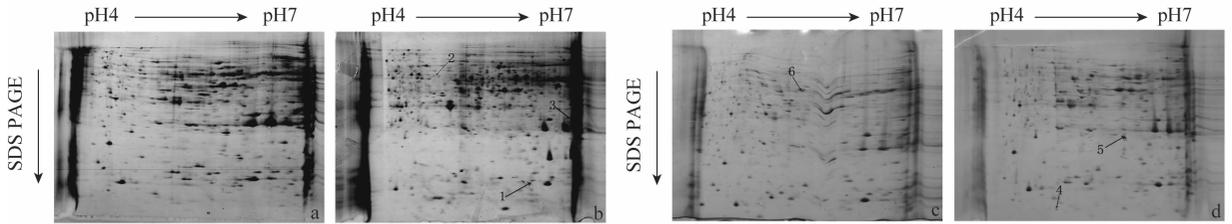
理系统软件进行方差及显著性分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 尖镰孢胁迫下不同抗性黄瓜品系茎组织蛋白双向电泳图谱分析

#### 2.1.1 C9 胁迫下黄瓜抗、感品系蛋白双向电泳图谱

利用 Imagemaster 2D Platinum 7.0 图像软件分析, 并对分析结果进行筛选, 最终确定 C9 胁迫下感病品系中共有 6 个符合 2 倍以上并且有 99% 统计学显著性差异的蛋白质点, 抗病品系中共有 3 个差异蛋白点(见图 1)。



a: 感病品系‘649’对照; b: 感病品系‘649’接种C9; c: 抗病品系‘D0327’对照; d: 抗病品系‘D0327’接种C9  
a: CK for susceptible line ‘649’; b: Susceptible line ‘649’ inoculated with C9; c: CK for resistant line ‘D0327’; d: Resistant line ‘D0327’ inoculated with C9

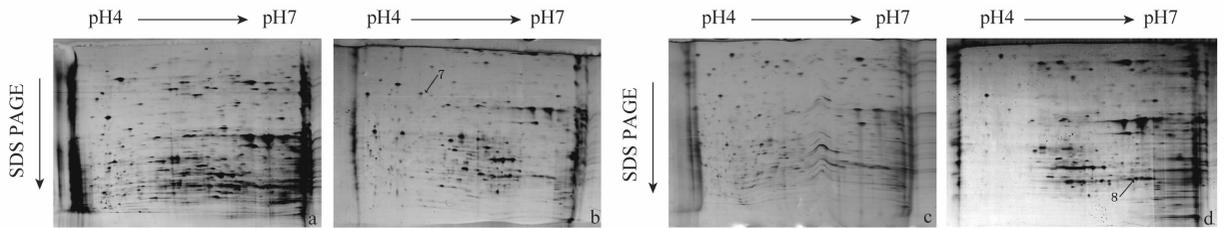
图 1 C9 胁迫下黄瓜抗、感品系茎部蛋白的双向电泳图

Fig. 1 The 2-DE map of differential protein spots in susceptible and resistant cucumber lines under the stress of C9

#### 2.1.2 S1 胁迫下黄瓜抗、感品系蛋白双向电泳图谱

S1 胁迫下感病品系中共有 4 个符合 2 倍以上并且有 99% 统计学显著性差异的蛋白质点, 抗病品

种中共有 5 个差异蛋白点(见图 2)。从双向电泳图谱可以看出, 无论感病还是抗病品系, S1 胁迫下出现的差异蛋白点大都集中在对照。



a: 感病品系‘649’对照; b: 感病品系‘649’接种S1; c: 抗病品系‘D0327’对照; d: 抗病品系‘D0327’接种S1  
a: CK for susceptible line ‘649’; b: Susceptible line ‘649’ inoculated with S1; c: CK for resistant line ‘D0327’; d: Resistant line ‘D0327’ inoculated with S1

图 2 S1 胁迫下黄瓜抗、感品系茎部蛋白的双向电泳图

Fig. 2 The 2-DE map of differential protein spots in susceptible and resistant cucumber lines under the stress of S1

表 2 利用串联质谱技术得到的差异表达蛋白鉴定

Table 2 Identification of differently expressed proteins by MS/MS

点号 Spot no.	基因编号 Gene no.	分子量/Da MW	等电点 pI	序列覆盖率/% Sequence coverage	得分 Score	蛋白名称 Protein name	表达模式 Expression pattern
1	Csa5M611600.1	59 885.2	5.90	36	470	Enolase	上调
2	Csa6M484600.2	41 911.0	5.31	72	1 100	Actin	上调
3	Csa4M063440.1	28 292.3	7.61	44	557	Oxygen-evolving enhancer protein	下调
4	Csa6M450370.1	47 942.5	5.48	61	752	Enolase isoform X1	上调
5	Csa4M598000.1	27 502.3	5.61	65	784	Triosephosphate isomerase	上调
6	Csa3M116710.1	16 450.5	6.30	73	657	Nucleoside diphosphate kinase	上调
7	Csa017651	18 010.9	5.15	44	233	Csf-2 protein	下调
8	Csa6M522690.1	28 239.1	5.14	30	258	Chlorophyll a-b binding protein of LHCII type I	上调

## 2.2 差异蛋白质点的质谱鉴定

通过质谱技术检测,获得质谱图谱,8 个 PMF 出峰情况良好,根据 NCBI 黄瓜数据库检索得到 8 个阳性结果。通过对两种尖镰孢处理后的抗感黄瓜品系进行分析,最终成功鉴定出 8 个差异蛋白点,其中 6 个差异蛋白上调表达,2 个下调表达,如表 2。差异蛋白点的质谱结果如下。

强毒力菌株 C9 胁迫下,感病品系中鉴定出 3 个差异蛋白点,分别是 1、2 和 3 号,抗病品系中差异蛋白为 4、5 及 6 号。弱毒力菌株 S1 胁迫下,感病品系中差异蛋白为 7 号,抗病品系中差异蛋白为 8 号。

1 和 4 号为烯醇化酶及其亚基。在糖酵解中烯醇化酶及其亚基主要参与 2-磷酸-D-甘油酸与磷酸烯醇式丙酮酸之间进行相互转化。

2 号蛋白点为肌动蛋白。肌动蛋白是构成真核生物细胞骨架的重要成分,它参与细胞运动,以及多种细胞内过程,对细胞生长、分裂、分化、细胞内囊泡运输、细胞壁的生物合成、共生现象、胞吞胞吐作用以及膜的循环利用等方面具有较好的控制作用<sup>[13]</sup>。

3 号和 8 号蛋白点分别为放氧增强蛋白 OEE (oxygen-evolving enhancer protein)和捕光复合体 I 型叶绿素 a/b 结合蛋白(LHCII type I chlorophyll a/b-binding protein)。这 2 个蛋白均与植物光合作用有关,8 号蛋白参与光合作用原初反应的蛋白质,主要功能进行捕获叶绿素,相关研究指出叶绿素的含量与植物的抗病性呈正相关,叶绿素含量升高,植株的抗病性增强。

5 号蛋白点为磷酸丙糖异构酶(TPI)。磷酸丙糖异构酶在生物体内的功能主要是参与糖酵解,是糖酵解途徑中的主要蛋白酶。TPI 催化磷酸丙糖异构体在二羟丙酮磷酸和 D-甘油醛-3-磷酸之间的可逆转化,是糖酵解中不可或缺的酶。

6 号蛋白点为核苷酸二磷酸激酶(NDPK/NDK)。在生物体内核苷酸二磷酸激酶催化磷酸基团在 ATP 和 NDP 两者之间进行可逆的转移,用以维持 ATP 和 NTP 两者浓度在细胞内的稳定。

7 号蛋白点为 Csf-2 蛋白。该蛋白是一种分泌蛋白,其主要功能与植物防御反应相关,参与应答生物刺激,但具体作用机理尚未清楚。

## 2.3 差异蛋白基因表达验证

通过 qRT-PCR 对差异蛋白基因的表达进行了验证,结果如图 3 所示。8 个差异蛋白基因的表达

模式均与其蛋白表达相一致,说明差异蛋白是由基因差异表达引起的。

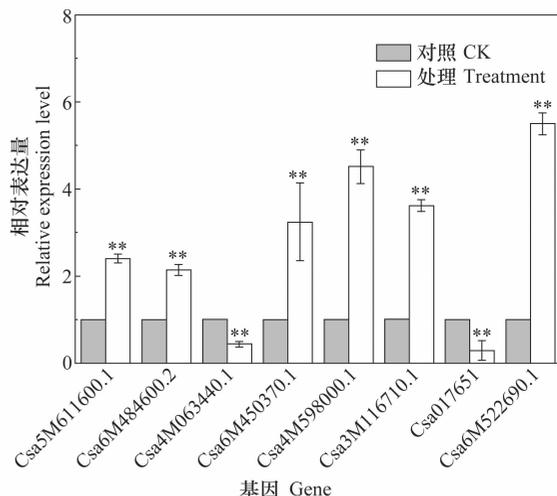


图 3 差异蛋白基因相对表达量

Table 3 Relative expression of differential protein genes

## 3 讨论

蛋白质是生命最直接的体现,在生理及病理条件的改变下,生物体的蛋白会产生结构及功能的变化<sup>[14]</sup>。植物在被病原体侵染刺激后,其本身会产生一系列的防御反应,尤其是一些病程相关蛋白的表达会有一定的变化<sup>[15-16]</sup>。本研究采用双向电泳技术分析在两种毒力不同的尖镰孢胁迫下黄瓜抗、感枯萎病品系茎中蛋白质的差异表达,共鉴定出 8 个差异蛋白。根据其功能不同,将 8 个蛋白分为能量代谢相关蛋白、光合作用相关蛋白和胁迫反应相关蛋白。

能量代谢相关蛋白为 1、4、5、6 号,1、4 号蛋白为烯醇化酶及其亚基,5 号蛋白为磷酸丙糖异构酶(TPI),6 号蛋白为核苷酸二磷酸激酶(NDPK/NDK),这 4 种参与能量生成的蛋白质在本研究中均出现上调表达,且 3 种在抗病品系出现,说明在同一菌株胁迫下抗感品系表现出一定的差异性,对外界不良环境表现出一定的抗性。这 4 种与能量相关的蛋白均在高毒力菌株 C9 的胁迫下差异表达,说明毒力高的菌种可更好地激活植物组织相关蛋白的表达,进而提高抗病性。

光合作用相关蛋白为 3、8 号,3 号蛋白为放氧增强蛋白 OEE (oxygen-evolving enhancer protein),8 号蛋白为捕光复合体 I 型叶绿素 a/b 结合蛋白(LHCII type I chlorophyll a/b-binding protein)。

叶绿素含量与植物抗病性正相关<sup>[17]</sup>, 8号是参与光合作用原初反应的蛋白质, 与植物叶绿素含量相关, 很可能参与黄瓜抗枯萎病的反应。S1菌株胁迫下, 8号蛋白在抗病品系中上调表达, 而C9菌株胁迫下, 3号蛋白在感病品系中下调表达, 说明在毒力不同的菌株诱导下蛋白表达存在差异。

胁迫反应相关蛋白为2号, 肌动蛋白。该蛋白在高毒力菌株侵染感病品系中上调表达。肌动蛋白普遍存在真核生物中, 在细胞外表组织形态的维持、正常生长、细胞运动等中具有重要意义<sup>[9,18]</sup>。

通过本试验可以看出在病原菌胁迫下, 为适应外界环境的变化, 植物体内迅速做出反应, 尤其是在毒力强的菌株胁迫下表现得更为明显。通过分析上述试验结果, 说明参与物质和能量代谢的蛋白与黄瓜抗枯萎病相关。本研究初步探讨了黄瓜枯萎病菌诱导黄瓜的抗性应答机理, 为进一步筛选抗性相关特异蛋白质作为标记性状选育新的抗性黄瓜品种奠定理论基础。

## 参考文献

- [1] HOUTERMAN P M, SPEIJER D, DEKKER H L, et al. The mixed xylem sap proteome of *Fusarium oxysporum*-infected tomato plants [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2007, 8(2): 215 - 221.
- [2] KIM S T, KANG Y H, WANG Y, et al. Secretome analysis of differentially induced proteins in rice suspension-cultured cells triggered by rice blast fungus and elicitor [J]. *Proteomics*, 2009, 9(5): 1302 - 1313.
- [3] LEE J, Bricker T M, Lefevre M, et al. Proteomic and genetic approaches to identifying defence-related proteins in rice challenged with the fungal pathogen *Rhizoctonia solani* [J]. *Molecular Plant Pathology*, 2006, 7(5): 405 - 416.
- [4] 周红梅, 毛爱军, 张丽蓉, 等. 黄瓜枯萎病接种方法及抗性遗传的研究[J]. *华北农学报*, 2010, 5(4): 186 - 190.
- [5] DE BOER A H, VOLKOV V. Logistics of water and salt

- transport through the plant: structure and functioning of the xylem [J]. *Plant, Cell and Environment*, 2003, 26: 87 - 101.
- [6] 刘东, 代丽婷, 蒲子婧, 等. 黄瓜枯萎病菌毒力、营养体亲和性及 ISSR 分析[J]. *植物病理学报*, 2012, 42(5): 456 - 465.
  - [7] 翁祖信, 徐新波, 冯东听, 等. 黄瓜枯萎病菌生理小种研究初报[J]. *中国蔬菜*, 1989(2): 19 - 21.
  - [8] DAMERVAL C, DE VIENNE D, ZIVY M, et al. Technical improvements in two-dimensional electrophoresis increase the level of genetic variation detected in wheat-seedling proteins [J]. *Electrophoresis*, 1986, 7: 52 - 54
  - [9] TOYAMA H, NISHIBAYASHI E, SAEKI M, et al. Factors required for the catalytic reaction of PqqC/D which produces pyrroloquinoline quinine [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2007, 354(1): 290 - 295.
  - [10] WU T, QIN Z W, ZHOU X Y, et al. Transcriptome profile analysis of floral sex determination in cucumber [J]. *Journal of Plant Physiology*, 2010, 167: 905 - 913.
  - [11] WAN H, ZHAO Z, QIAN C, et al. Selection of appropriate reference genes for gene expression studies by quantitative real-time polymerase chain reaction in cucumber [J]. *Analytical Biochemistry*, 2010, 399(2): 257 - 261.
  - [12] SCHMITTGEN T D, LIVAK K J. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method [J]. *Nature Protocols*, 2008, 3(6): 1101 - 1108.
  - [13] STOTZ H U, LONG S R. Expression of the pea (*Pisum sativum* L.)  $\alpha$ -tubulin gene TubA1 is correlated with cell division activity [J]. *Plant Molecular Biology*, 1999, 41(5): 601 - 604.
  - [14] 范海延, 陈捷, 邵美妮, 等. 白粉病菌胁迫下黄瓜 R17 抗病品系叶片蛋白质组分析[J]. *园艺学报*, 2009, 36(6): 829 - 834.
  - [15] 方献平, 陈文岳, 马华升, 等. 植物应答病菌胁迫的抗性蛋白研究进展[J]. *核农学报*, 2014, 28(5): 825 - 832.
  - [16] 王雪, 段玉玺, 陈立杰, 等. 大豆胞囊线虫胁迫下大豆根部蛋白质差异表达分析[J]. *中国油料作物学报*, 2015, 37(1): 96 - 101.
  - [17] 王春明, 郭建国, 漆永红, 等. 葡萄叶片叶绿素质量分数与其霜霉病抗性的关系[J]. *西北农业学报*, 2016(3): 458 - 464.
  - [18] 刘曦, 张少斌, 汪澈, 等. 植物肌动蛋白功能的研究进展[J]. *生物技术通报*, 2010(3): 13 - 16.

(责任编辑: 田 喆)