

盐胁迫下红树植物蛋白质的比较分析*

周涵韬 林 鹏

(厦门大学生命科学学院 361005)

摘要 采集白骨壤的种子分别置于盐度为 0 的自来水和盐度为 50 的海水中沙培,从叶片中抽提总蛋白质,同时进行双向电泳。比较发现 3 个蛋白质点 SR1、SR2、SR3 只在盐度为 50 的海水培养下稳定地出现,另 1 个蛋白质点 SR4 只在无盐条件下出现。初步认为这 4 种蛋白质与白骨壤的耐盐性相关。

关键词 白骨壤, 双向电泳, 耐盐性

红树林是生长于热带、亚热带陆海交汇的海湾河口潮间带的盐生木本植物群落,在维护海岸生态平衡、防风减灾、护堤保岸、环境污染监测、净化与防治等方面发挥重要的作用。白骨壤(*Avicennia marina*)属泌盐型红树植物,多自然分布在滩面外缘低潮带,有些也延续到高潮带。在大潮时几乎全部淹没或仅露出树冠,曾被称为“海底森林”。白骨壤对盐度的适应较广,一般以盐度为 5~20 的海水为多,实验室条件下,在盐度为 0 的自来水和盐度 50 海水中生长情况良好^[1]。它是进行耐盐性生理研究及耐盐蛋白质基因筛选的好材料。自 1975 年,Ó Farrell 等建立双向电泳技术后,已有许多改进,双向电泳由于具有高分辨率和高灵敏度已成为分析复杂蛋白质混合物的基本工具^[2]。本研究以耐盐性强的滩涂红树植物——白骨壤为材料,运用双向电泳技术分析耐盐相关蛋白质,将为进一步从分子水平了解植物的耐盐机理提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料

白骨壤果实成熟时(9~10 月份),自福建龙海浮宫红树林自然保护区摘收同一母树发育良好、无病虫害及机械损伤的果实于实验室沙培。沙粒取自厦门港沙滩,经自来水反复冲洗直至盐度 < 0.4,装入 2 个花盆中,每盆植 5 粒果实,分别加入盐度 50 的海水和盐度为 0 的自来水,自然光照培养。每天用相应培养液补充散失的水分,每隔 15 d 更换 1 次培养液。培养约 50 d,用于蛋白质提取。

1.2 方法

1.2.1 白骨壤叶片蛋白质的抽提 取白骨壤叶片 0.5~1.0 g,按其鲜重的 10%加入不溶性聚乙烯吡咯烷酮,用 3 ml 的蛋白提取缓冲液(65 mmol/L Tris-HCl

pH 6.8, 0.5% SDS, 10%甘油, 10%三氯乙酸和 5%β-巯基乙醇)研碎样品,转移至 10 ml 离心管中,样品混匀后在 4℃条件下震荡浸提 1 h,12 000 r/min 离心 20 min,将上清液转移至 50 ml 离心管中,加入 3 倍体积的 -20℃预冷的丙酮,混匀后在 -20℃下放置 30 min,12 000 r/min 离心 10 min,保留沉淀蛋白。杂质干扰多的样品可以用 -20℃预冷的 80%丙酮冲洗 1 次。沉淀置于干燥器中真空抽气 15 min,以挥发丙酮。用 15 倍样品鲜重的聚焦样品缓冲液充分溶解沉淀蛋白,溶解后 12 000 r/min 离心 5 min,去沉淀,重复离心 1 次,此时得到的上清液即第一向电泳分析的上样液。

蛋白定量采用 Bradford 1976 年的方法。配制考马斯亮蓝 G-250 蛋白质显色液,其组成为:0.01%(W/V)考马斯亮蓝 G250,4.7%(W/V)乙醇,8.5%(W/V)磷酸。以标准蛋白质做蛋白质浓度与 OD 值间标准曲线,取待分析的蛋白质溶液于考马斯亮蓝 G250 蛋白质显色液中,测定 OD 值,根据标准曲线计算蛋白质的浓度。

1.2.2 第一向电泳(IFE) 称取尿素 5.5 g,加 1.3 ml 丙烯酰胺液(28.38%丙烯酰胺,1.62%甲叉双丙烯酰胺),2.0 ml 10% NP-40,1.7 ml H₂O。待尿素完全溶解后,加 0.55 ml pH 5~8 两性电解质(Ampholine)和 0.17 ml pH 3.5~10 两性电解质(Ampholine),抽气后再加 10 μl 10%过硫酸铵和 7 μl TEMED,混匀后灌制 10 根柱胶。电极液为 0.01 mol/L H₂PO₄(正极)和 0.02 mol/L NaOH(负极)。每管上样 80~100 μl(约 200 μg

* 福建省青年科技人才创新项目基金资助(2001J033)。第一作者:周涵韬,出生于 1970 年,博士,副教授,研究方向:植物分子生物学。E-mail:htzhou@public.xm.fj.cn
收稿日期:2001-11-12;修回日期:2001-12-30。

蛋白质)。在 16 °C 下按下列程序聚焦电泳: 300 V×1 h, 500 V×16 h, 800 V×1 h。电泳后的胶条转移到凝胶平衡液 (10% 甘油, 0.1% β-巯基乙醇, 4% SDS, 0.1 mol/L Tris-HCl, pH 6.8) 中, -20 °C 下保存备用。

1.2.3 第二向 SDS-平板电泳 取丙烯酰胺液 (29.1% 丙烯酰胺, 0.9% 甲叉双丙烯酰胺) 24 ml, 分离胶缓冲液 (1.5 mol/L Tris-HCl pH 8.8, 0.4% SDS) 15 ml, H₂O 20 ml, 再加 10% 过硫酸铵 190 μl, TEMED 40 μl, 混匀后灌制 2 块浓度为 12% 的平板凝胶 (14 cm×1.5 mm×12 cm), 即为分离胶。取丙烯酰胺液 (29.1% 丙烯酰胺, 0.9% 甲叉双丙烯酰胺) 4 ml, 浓缩胶缓冲液 (0.5 mol/L Tris-HCl pH 6.8, 0.4% SDS) 7.5 ml, H₂O 18 ml, 再加 10% 过硫酸铵 120 μl, TEMED 100 μl, 混匀后灌制浓度为 4% 的浓缩胶 (14 cm×1.5 mm×2.5 cm)。

取出 IFE 胶条, 在原平衡液中平衡 5 min, 然后放置在浓缩胶顶部, 1% 琼脂糖 (用凝胶平衡液配制, 含 0.0025% 溴酚蓝) 固定。取 100 ml 电极缓冲液 (1% SDS, 3.22% Tris 碱, 14.1% 甘氨酸) 加水稀释至 1 000 ml, 分别注入上、下槽。在 4 °C 下, 每块胶 10 mA 电泳过夜 (约 12 h)。

1.2.4 凝胶电泳后的染色 用考马斯亮蓝染色和银染色的结合染色法^[4]。

2 结果与分析

在相同的条件下, 对高盐和无盐条件培养下的白骨壤叶片蛋白质同时进行双向电泳, 凝胶成像系统扫描记录, 结果见图 1。运用 Lab Work 软件对双向电泳图谱进行分析, 结论如下:

(1) 高盐条件培养下的白骨壤叶片蛋白质双向电泳后出现 167 个蛋白点, 无盐条件培养下的白骨壤叶片蛋白质双向电泳后出现 165 个蛋白点。蛋白质分子量范围为 20~100 kD 之间, 等电点范围 (pI) 为 3.5~9。

(2) 高盐培养和无盐培养下, 白骨壤叶片蛋白质大部分相同, 只有 4 种蛋白质有差异。高盐培养下有 3 个蛋白质点, 在无盐培养下没有出现, 分别命名为 SR1、SR2、SR3。1 个蛋白质点, 在无盐培养下的白骨壤叶片中出现, 高盐培养下没有出现, 命名为 SR4。初步认为这 4 种蛋白质与白骨壤的抗盐性相关。

(3) SR1 等电点为 pI 4.5, 分子量为 28 kD; SR2 等电点为 pI 8.7, 分子量为 32 kD; SR3 等电点为 pI 9.0, 分

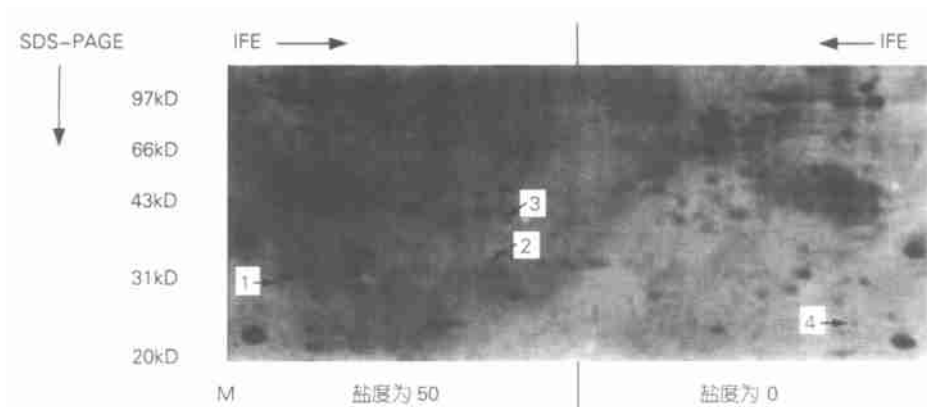


图 1 高盐和无盐条件培养白骨壤叶片蛋白质的双向电泳

Fig. 1 Two dimensional polyacrylamide gel electrophoresis of proteins in the leaves of *Avicennia marina* in 50 and 0 salinity condition
1. SR1, 2. SR2, 3. SR3, 4. SR4, M: marker

子量为 42 kD; SR4 等电点为 pI 5.0, 分子量为 22 kD。

3 讨论

3.1 双向电泳技术的改进

3.1.1 红树植物白骨壤叶片蛋白质提取方法

的改进 红树植物组织有大量的色素、酚、醌等次生代谢产物^[3], Ó Farrell 等的方法不能直接用来分析植物组织, 特别是叶片组织中的蛋白质。在木本植物蛋白质提取上, 前人先后提出了许多以排除色素、酚、醌等干扰的植物蛋白质样品制备方法。作者摸索出适合

红树植物蛋白质提取的方法。采用 10%三氯乙酸抑制蛋白酶活性,保证在制样过程中蛋白质不被降解。加入不溶性聚乙烯吡咯烷酮吸附剂,既减少了植物中色素、酚类和醌类等次生代谢物质干扰,又快捷方便,且省时、经济、高效。另外,经丙酮处理后真空干燥的样品,易于保存,应用方便。运用本方法提取白骨壤叶片蛋白质得率在 500~800 $\mu\text{g/g}$, FW(leaf)。一次蛋白质样品制备可满足 2~3 次双向电泳的用量。

3.2 盐胁迫环境对白骨壤蛋白质表达的影响

植物体内各细胞、组织、器官的基因组成完全一致,但基因的表达存在时间、空间上差异。林鹏等^[5]的研究发现白骨壤较强的耐盐性与叶片的泌盐结构、叶片光合作用和蒸腾作用、体内酶及蛋白质的改变等相关,进而由基因控制这些变化。本研究发现,在 50 和 0 盐度下白骨壤叶片蛋白质的组成发生了变化。高盐多

出了 3 种蛋白质,同时也丧失了 1 种蛋白质。当然,需通过蛋白组学的研究(蛋白质序列分析、相关基因的研究、蛋白质表达的研究等)进一步阐明白骨壤耐盐的分子机制。但这种随盐度改变,白骨壤叶片蛋白质的组成发生变化是不争的事实。☀

主要参考文献

- 1 林鹏. 红树林. 北京:海洋出版社,1984. 12~15
- 2 朱玉贤. 现代分子生物学. 北京:高等教育出版社,1997. 96~102
- 3 林鹏. 中国红树林生态系. 北京:科学出版社,1997. 86~91
- 4 Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. Molecular Cloning: A laboratory manual. second ed., New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 125~130
- 5 Lin Peng. Mangrove Ecosystem in China, Beijing / New York: Science Press, 1999. 134~146

COMPARATIVE STUDY OF *Avicennia marina* PROTEINS IN SALT-TOLERANT CONDITIONS USING TWO-DIMENSIONAL GEL ELECTROPHORESIS

ZHOU Har-tao LIN Peng

(School of Life Sciences, Xiamen University, 361005)

Received: Nov., 12, 2001

Key Words: *Avicennia marina*, Two dimensional gel electrophoresis, Salt tolerance

Abstract

Leaf proteins of *Avicennia marina*, which is cultured in 50 and 0 salinity condition respectively, were isolated for two dimensional gel electrophoresis analysis. Comparing the electrophoresis map, there are 3 proteins: SR1 (pI 4.5, 28 kD); SR2 (pI 8.7, 32 kD); SR3 (pI 9.0, 42 kD) which only appeared in the leaves in 50 salinity condition; and 1 protein SR4 (pI 5.0, 22 kD) only appeared in the leaves in 0 salinity condition. These proteins are the candidate salt tolerant proteins for further researches.

(本文编辑:张培新)