

ACTA

ISSN 1000-7091
CODEN: HNUOAG



华北农学报

ACTA AGRICULTURAE BOREALI-SINICA

- 中国精品科技期刊 ■ 中文核心期刊 ■ 中国科学引文数据库核心期刊 ■
- 中国科技核心期刊 ■ 中国农林核心期刊 ■ RCCSE中国核心学术期刊 ■



学报官网



微信公众号

2022 第37卷 第1期
Vol.37 No.1

华北农学报编辑部



目 次

作物遗传育种·种质资源·生物技术

小麦类钙调素 *TaCML8-A* 基因的克隆和表达分析 贾伟哲, 焦博, 王娇, 陈文烨, 杨帆, 刘永伟, 董福双, 赵立群, 周硕(1)

玉米 bZIP 基因应答逆境胁迫的表达模式分析 贾利强, 刘讯, 丁波(9)

大豆长片段插入/缺失标记的开发与应用 李曼, 史晓蕾, 邸锐, 刘志芳, 孟庆民, 付才, 杨春燕, 王冬梅, 张孟臣, 张洁, 闫龙(18)

山药 DoIPTs 基因克隆及其珠芽发芽期表达分析 唐文芳, 徐升胜, 段延碧, 龙雯虹, 杨荣萍, 张雪梅, 孟金贵(27)

转录因子 *SIMYB-related 2* 对番茄耐冷性的影响 吴红红, 段学粉, 郭仰东, 张喜春(35)

扁茎黄芪转录组测序及生物信息学分析 武悦, 陈阳, 王星哲, 单飞彪, 张勇, 孙鸿举(42)

利用籼粳交 RIL 群体进行水稻发芽期与芽期耐冷性 QTL 分析 陈子琪, 王伟革, 赵宏强, 王皓, 韩笑, 杨洛森, 辛威, 刘化龙, 郑洪亮, 王敬国(50)

耕作栽培·生理生化

耕作方式对稻茬小麦幼苗茎蘖生长生理和生产力的影响 李福建, 徐东忆, 刘凯丽, 朱敏, 李春燕, 朱新开, 丁锦峰, 郭文善(58)

不同小麦品种(系)茎秆显微结构、生化组分与茎秆强度的关系 贺洁, 孙少光, 葛昌斌, 宋丹阳, 乔冀良, 李锁平, 苏亚蕊, 廖平安(68)

施氮方式与行距配置对水稻冠层结构及产量的影响 刘俊峰, 李漪濛, 梁超, 周婵婵, 王术, 贾宝艳, 黄元财, 王岩, 王韵(77)

灌浆充实调节剂对大穗型水稻弱勢籽粒灌浆的调控效应 静莉丽, 彭廷, 赵亚帆, 赵帅兵, 王童童, 李源, 程远, 杜彦修, 张静, 孙红正, 赵全志(86)

氮素营养和根瘤菌接种对大豆结瘤固氮和生长的影响 王晓丽, 王敏, 岳爱琴, 郭数进, 王鹏, 王利祥, 杨婷婷, 张海生, 张永坡, 高春艳, 张武霞, 牛景萍, 杜维俊, 赵晋忠(95)

外源褪黑素对低温胁迫下马铃薯幼苗抗氧化系统的影响 和秋兰, 张航, 王正维, 万丽婧, 海梅荣(103)

资源环境·植物保护

施肥对农田土壤碳氮磷化学计量特征及相关酶活变化的影响 平怀香, 崔建宇, 陈硕, 魏露露, 陈清, 张德龙(112)

冬绿肥-春玉米轮作对土壤有机磷形态及其有效性的影响 张茜, 赵秋, 向春阳, 史昕倩, 杜锦(121)

引入豆角的轮作模式对设施土壤硝态氮淋失的影响 刘蕾, 王凌, 肖广敏, 茹淑华, 孙世友, 郜静, 李玘, 赵欧亚, 张国印(129)

不同有机肥对旱直播水稻品质的影响 徐令旗, 郭晓红, 张佳柠, 赵洋, 李晓蕾, 刘绍峰, 崔致远, 安懿亮, 吕艳东(137)

高粱、玉米残体的腐解特征及微生物群落结构分析 樊芳芳, 焦晓燕, 刘佳琪, 郭珺, 王劲松, 武爱莲, 白文斌, 平俊爱(147)

TaRanGAP2 在小麦抵抗叶锈菌侵染中的作用 宋姗姗, 张欣婷, 王琦, 芦远景, 侯春燕, 王冬梅(158)

苦瓜白粉病响应基因 *MeMLO1* 的克隆及表达分析 陈龙正, 刘静, 刘之洋, 夏鹏飞, 袁春汉, 宁宇(165)

向日葵列当枯斑病原菌的分离鉴定及致病力分化 张键, 王娜, 刘志达, 包婷婷, 张之为, 云晓鹏, 石必显, 张恒, 陈贵红, 陈燕芳, 赵君(172)

绿盲蝽取食诱导赤霞珠冬芽全蛋白双向电泳体系的建立与优化 高素红, 葛长虹, 周国娜, 姚淑娟, 路常宽, 高宝嘉(181)

sRNA *STnc1220* 基因缺失株对鼠伤寒沙门菌生物学特性和致病力的影响 李娜, 宁程程, 郭蕴, 季春辉, 王立霞, 张亚萍, 孟庆玲, 乔军, 才学鹏(188)

黏虫 *clip* 型丝氨酸蛋白酶基因的克隆及原核表达 连凯琪, 纪爽, 周玲玲, 时志琪, 王飞, 张元臣(195)

畜牧·水产·兽医

低蛋白日粮对湘东黑山羊肉品质及肌源性调节因子基因表达的影响 陈文勋, 周婷, 颜琼娟, 田丽娜, 曹满湖, 谭支良, 邹爱华(202)

山羊 CIDE 家族基因克隆分析及互作蛋白预测鉴定 李琪, 杨昌恒, 王永, 林亚秋, 向华, 朱江江(211)

羊口疮病毒 ORFV118 蛋白对山羊睾丸支持细胞周期、凋亡及免疫细胞因子的影响 王宪军, 向华, 张旭梅, 任玉鹏, 朱江江(222)

禽致病性大肠杆菌 Hcp2b 对雏鸡脾脏 mRNA 表达谱的影响 宋祥军, 宋自超, 沈啸, 陈哲, 蒋胡艳, 侯曼曼, 邵颖, 涂健, 祁克宗(232)

绿盲蝽取食诱导赤霞珠冬芽全蛋白 双向电泳体系的建立与优化

高素红^{1,2,3}, 葛长虹², 周国娜¹, 姚淑娟², 路常宽², 高宝嘉¹

(1. 河北农业大学 林学院, 河北 保定 071001; 2. 河北科技师范学院 农学与生物科技学院, 河北 昌黎 066600; 3. 河北省作物逆境生物学重点实验室, 河北 昌黎 066600)

摘要: 建立绿盲蝽取食胁迫下赤霞珠冬芽防御反应的蛋白质组学双向电泳技术体系, 旨在为后续筛选和分析差异蛋白相关研究提供参考。选取赤霞珠葡萄冬芽, 分别设置绿盲蝽取食胁迫和空白对照试验, 于 24 h 后采集样品用液氮带回, -80 °C 冻存; 利用 TCA-丙酮法、TCA-丙酮法 + 酚抽提法提取粗蛋白干粉; 利用 CBB G-250 染色法进行蛋白质浓度测定; 确定上样量及凝胶染色技术。扫描得到凝胶图像, 进行对比分析。结果显示, 利用不同蛋白质提取方法均可获得双向电泳所需粗蛋白, 采用 TCA-丙酮法获取的粗蛋白量明显多于 TCA-丙酮法 + 酚抽提法; 2 种方法所提取的全蛋白浓度差异较大, TCA-丙酮法操作更为简便, 蛋白丢失少。不同上样量对双向电泳图谱效果的影响差异显著, 400 μg 蛋白上样量比 800 μg 所得的凝胶图片上的蛋白点清晰, 易于分离。考马斯亮蓝染色结果表明, R-350 更适用于葡萄冬芽全蛋白双向凝胶电泳技术。利用 TCA-丙酮法抽提蛋白, 400 μg 蛋白上样, pH 值 4~7 NL 17 cm 的 IPG 胶条, G-350 热染色双向电泳技术体系得到的赤霞珠冬芽全蛋白凝胶图谱, 符合绿盲蝽取食诱导赤霞珠防御反应产生防御蛋白的检测要求。

关键词: 赤霞珠葡萄; 绿盲蝽; 蛋白质组学; 双向电泳体系; 诱导抗性
中图分类号: S433.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2022)01-0181-07
doi: 10.7668/hbnxb.20192668



Establishment and Optimization of Bidirectional Electrophoresis System of Total Protein from *Cabernet sauvignon* Buds Induced by *Apolygus lucorum* Feeding

GAO Suhong^{1,2,3}, GE Changhong², ZHOU Guona¹, YAO Shujuan², LU Changkuan², GAO Baojia¹

(1. College of Forestry, Hebei Agricultural University, Baoding 071001, China; 2. College of Agronomy and Biotechnology, Hebei Normal University of Science & Technology, Changli 066600, China; 3. Hebei Key Laboratory of Crop Stress Biology (in Preparation), Changli 066600, China)

Abstract: In order to establish a proteomic 2-DE system for the defense response of *Cabernet sauvignon* winter buds under *Apolygus lucorum* feeding stress, *Cabernet sauvignon* grape winter buds were used as materials to compare the effects of different protein extraction methods, sample loading and gel staining techniques on the 2-DE chromatogram. It provided reference for subsequent studies on screening and analyzing differential proteins. Winter buds of *Cabernet sauvignon* grape were selected, and feeding stress and blank control experiments were conducted, respectively. After 24 h, the samples were taken back with liquid nitrogen and frozen at -80 °C. Crude protein powder was extracted by TCA-acetone and TCA-acetone + phenol extraction. Protein concentration was determined by CBB G-250 staining. Sample loading and gel staining techniques were determined. Gel images were obtained by scanning for comparative analysis. Crude protein for 2-DE could be obtained by different extraction methods. The amount of crude protein obtained by TCA-acetone method was significantly higher than that obtained by TCA-acetone + phenol

收稿日期: 2021-09-08

基金项目: 河北省重点研发计划农业关键共性技术攻关专项(20326507D); 河北省专业学位研究生教学案例库开发项目(KCJSZ2020096); 河北省科技厅科普专项(20557504K)

作者简介: 高素红(1976-), 女, 河北石家庄人, 副教授, 博士, 主要从事植物抗虫性和有害生物综合治理研究。
通讯作者: 高宝嘉(1958-), 男, 河北衡水人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事昆虫生态学研究。

extraction method. The concentrations of total protein extracted by the two methods were different, but both of them met the requirements of two-dimensional gel electrophoresis. TCA-acetone method was easier to operate and less protein loss. The influence of different loading amount on the effect of 2-DE was significant. Compared with 800 μg protein, 400 μg protein showed clear protein spots and was easy to separate. The results of CBB staining showed that R-350 was more suitable for total protein two-dimensional gel electrophoresis of grape winter bud. Using TCA-acetone method, 400 μg protein sample, 17 cm pH value 4-7 IPG dry adhesive strip, G-350 thermal staining 2-DE system to obtain the total protein gel map of *Cabernet sauvignon* winter buds met the requirements of further test.

Key words: *Cabernet sauvignon*; *Apolygus lucorum*; Proteomics; Two-dimensional electrophoresis; Inducible resistance

近年来,绿盲蝽 (*Apolygus lucorum* Meyer-Dür) 发生愈加猖獗,对酿酒葡萄产业产生严重威胁。前期的研究表明,早春绿盲蝽对葡萄冬芽的危害是影响酿酒葡萄植株长势和全年产量、质量的关键因素^[1]。已有的研究证实,植食性昆虫通过唾液蛋白消化溶解植物的营养物质进行取食,而植物则利用自身某些结构蛋白和昆虫唾液蛋白中的激发子进行特异结合,产生诱导抗性反应,生成抗性蛋白和抗性物质,实现对昆虫的抵抗^[2]。目前,绿盲蝽唾液蛋白与赤霞珠葡萄结合的受体蛋白仍不清楚。因此,通过获得绿盲蝽取食诱导下赤霞珠葡萄冬芽的全蛋白,进而鉴定出与绿盲蝽唾液蛋白特异性结合的蛋白受体,对于揭示赤霞珠葡萄对绿盲蝽取食产生防御反应的分子机制具有重要意义。

蛋白质组学是研究特定时间、空间以及环境因子等条件下,生物物种个体、器官、组织、细胞以及体液等的总蛋白质表达图谱的常用手段^[3],也是当下研究的热点领域之一。1975年,蛋白质组学首先由 O'Farrell^[4] 建立。Bjellqvist 等^[5] 在 1982 年利用改进的双向电泳技术得出凝胶图谱,看到明显的蛋白点,再结合质谱分析技术对蛋白点进行测定。已经建立的蛋白数据库包括 UniProt (SWISS-PROT、TrEMBL 和 PIR-PSD)、PDB、BioGRID、DDBJ、Expasy、Gepasi、IntAct、KEGG、MINT、MS-Fit、NCBI、STRING 等^[6-7],可快速鉴定已知蛋白质种类。双向电泳技术仍是目前获得动植物全蛋白质组,寻找差异蛋白,蛋白质定性定量,筛选、鉴定蛋白受体以及揭示其蛋白水平变化机制的经典研究手段^[8-11]。目前,有关赤霞珠葡萄冬芽的蛋白质组学相关研究尚未见报道。

本研究以绿盲蝽取食诱导下赤霞珠葡萄冬芽为试材,通过比较分析不同的蛋白提取方法、上样量及考马斯亮蓝染色所得到的赤霞珠葡萄冬芽全蛋白双向凝胶电泳图谱效果,构建适用于葡萄冬芽蛋白质分析的最佳双向电泳技术体系,以便为后续揭示在绿盲蝽取食诱导和机械损伤下,赤霞珠葡萄蛋白质

组的差异变化,筛选差异蛋白,分析其功能和结构以及为绿盲蝽取食诱导赤霞珠葡萄抗性反应和抗性机制的进一步研究提供技术支撑。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 供试昆虫 绿盲蝽由河北省植物保护研究所(保定)提供,在 27 $^{\circ}\text{C}$ 、L:D = 16 h:8 h、强度 66%、湿度 60% 条件下,用新鲜四季豆饲养绿盲蝽试验种群。挑选大小一致的 3 龄若虫^[12-13],试验前 4~6 h 饥饿处理,进行接虫试验。

1.1.2 样品采集 在河北省昌黎县朗格斯酒庄有限公司酿酒葡萄种植基地进行试验。供试酿酒葡萄品种为赤霞珠,生长状况良好。选择同一葡萄植株上距地面 50~100 cm 外观和长势一致的 2 个饱满冬芽作为样本,分别编号记作接虫芽和对照芽。其中,接虫芽:于冬芽上接入 5 头健壮的绿盲蝽 3 龄若虫后套袋;对照芽不进行任何处理直接套袋。每处理 3 次重复。24 h 后分别摘取葡萄冬芽样品置于液氮暂存,然后转移至实验室放置于 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱冻存。

1.1.3 试剂与仪器

1.1.3.1 生化药剂 TCA、Acetone、2-Hydroxy-1-ethanethiol、PVPP、Sucrose、SDS、Tris-base、HCl、Ammonium acetate、Methyl alcohol、Urea、Thiourea、CHAPS、DTT、Ampholyte solution、Ampholime、Bromophenol blue、Coomassie brilliant blue、GLYCEROL、Iodoacetamide、Acrylamide、Ammonium persulphate、TEMED、Glycine、Low melting point agarose、平衡酚、双甲叉丙烯酰胺,以上药品购自 Sigma 公司,均为分析纯。mineral oil、IPG 干胶条 pH 值 3~10 24 cm、pH 值 4~7 17 cm 购自 GE Healthcare 公司。标准分子量蛋白 Marker 购自 Thermo 公司。

蛋白提取液、蛋白裂解液、平衡液 A、平衡液 B、SDS-PAGE 凝胶溶液、0.5% 低熔点琼脂糖溶液、固定液、染色液、脱色液的配制方法参考王银翠等^[14]

的方法进行。

1.1.3.2 主要仪器 GL-20G-II 冷冻离心机(上海安亭科学仪器厂)、扫描仪(ImageScanner III)、723 可见分光光度计(上海佑科仪器仪表有限公司)、冷冻干燥机(LABCONCO)、FA2204B 电子天平(上海佑科仪器仪表有限公司)、双向 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳仪(GE)、电热恒温水浴锅(江苏省金坛市医疗仪器厂)、XH-C 涡旋混合器(荣华仪器制造有限公司)、摇床、移液器(Eppendorf)、石英比色皿等。

1.2 试验方法

1.2.1 蛋白质样品制备与浓度测定 TCA-丙酮法参考王银翠等^[14]的方法。取冻存的赤霞珠冬芽 0.3~0.4 g, 充分研磨, 分步加入蛋白提取液 I、II 萃取蛋白, 纯白色沉淀冷冻干燥后得到蛋白粗提干粉。称质量, 计算粗蛋白质产率。

酚抽提方法参考王瑞璞等^[15]的方法, 有改动。取 0.1~0.2 g 粗蛋白干粉, 加入 2 mL Tris 平衡酚和 2 mL SDS Buffer 于 10 mL 小管中; 充分涡旋 30 s, 离心 3 min; 将上层的酚相吸出, 放入一新管中, 剩余液体继续提取酚相; 将冷醋酸铵甲醇溶液加入最终所得的酚相中, 放入 -20 °C 冰箱静置沉降 30 min 取出, 离心 5 min; 将沉淀再用冷醋酸铵甲醇溶液洗 2 次, 再用预冷的 80% 丙酮洗 2 次后冷冻干燥。蛋白干粉 -80 °C 冻存储备用。

利用 CBB G-250 染色法测定蛋白质浓度。

1.2.2 双向凝胶电泳 选用 24 cm pH 值 3~10 和 17 cm pH 值 4~7 这 2 种规格 IPG 预制胶条 (-20 °C 冻存), 设置 400, 800 μg 蛋白上样量, 加入裂解液充分裂解。将不同处理蛋白液加入 GE 聚胶槽, 预制 IPG 胶条胶面朝下吸收 12 h 样品溶液。往胶槽缓慢加入 2~3 mL 矿物油, 相邻 2 个胶条槽也要放满矿物油, 夹好电极, 设置第一向等电聚焦程序: 250 V 快速升压除盐 1 h, 500 V

线性升压除盐 2 h, 1 000 V 线性升压除盐 1 h, 4 000 V 线性升压 1 h, 8 000 V 线性升压 1 h, 8 000 V 聚焦 48 000 V·h, 1 000 V 保持任意时间。聚焦结束后, 立即平衡胶条, 并制备 12% 蛋白分离胶, 进行第二向 SDS-PAGE 电泳。电泳结束后, 取出凝胶, 划边并切角作记号(酸性端)。

1.2.3 凝胶染色 热考马斯亮蓝 R-350 染色法: 电泳结束后, 将蛋白分离胶放入固定液中, 于摇床上缓慢摇动 30 min 进行固定。用电磁炉将配制好的 R-350 凝胶染色液加热至 90~100 °C^[16], 将凝胶放入其中, 并置于摇床上缓慢摇动 15 min 进行染色, 至背景与染液一致。染色结束后, 将凝胶放入配制好的脱色液中, 摇床上缓慢摇动 30 min。脱色液与背景相近, 则需更换新鲜的脱色液, 重复 3~4 次, 直到凝胶背景清晰, 能看到蛋白点为宜。

冷考马斯亮蓝 R-350、R-250 染色法: 方法同上, 省略掉第 2 步加热环节, 将凝胶直接放入染色液中摇床轻微摇动 60 min 以上。脱色时过夜进行。

1.3 凝胶图像扫描和分析

利用 ImageScanner III 扫描仪扫描 SDS-PAGE 凝胶图谱, 获得电子图像; 利用 PDQuest Advanced-8.0.1 凝胶分析软件进行蛋白点丰度检测等图像分析。

2 结果与分析

2.1 不同蛋白提取方法比较

采用 TCA-丙酮法和 TCA-丙酮法 + 酚抽提的方法提取赤霞珠葡萄冬芽粗蛋白干粉, 结果表明(表 1), TCA-丙酮法提取赤霞珠冬芽粗蛋白干粉质量在 0.028 7~0.039 6 g, 产率为 1% 左右, 蛋白浓度约为 89.450 0 μg/mL; TCA-丙酮法 + 酚抽提法提取粗蛋白干粉质量在 0.002 9~0.004 3 g, 产率仅占样本的 0.1% 左右, 蛋白浓度约为 187.400 0 μg/mL, 表明 TCA-丙酮法 + 酚抽提法所提出的蛋白干粉更纯, 但产率较低。

表 1 不同提取方法赤霞珠冬芽全蛋白质量及浓度比较

Tab. 1 Comparison of total protein quality and concentration of winter buds of Cabernet sauvignon with different extraction methods

提取方法 Extraction method	粗蛋白干粉质量/g Crude protein dry powder weight	粗蛋白质产率/% Crude protein productivity	蛋白浓度/(μg/mL) Protein concentration
TCA-丙酮法 TCA-acetone method	0.034 2 ± 0.004 8A	1.000 0 ± 0.017 6A	89.450 0 ± 7.254 0A
TCA-丙酮法 + 酚抽提 TCA-acetone + phenol extraction	0.003 7 ± 0.000 6B	0.100 0 ± 0.001 9B	187.400 0 ± 15.250 3B

注: 表中不同大写字母表示在 0.01 水平上差异极显著 ($P < 0.01$)。

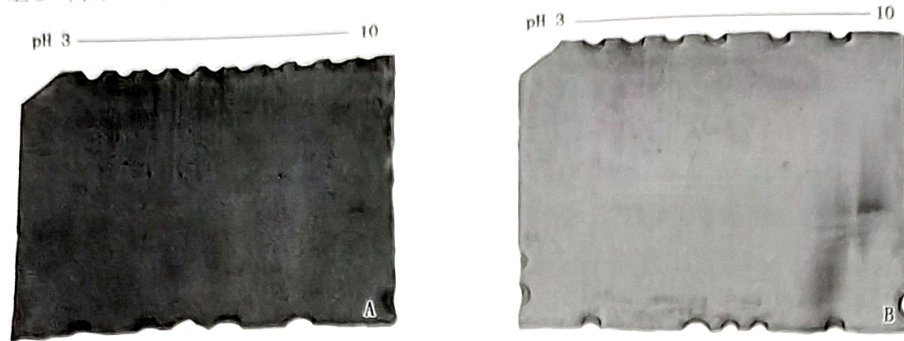
Note: Different capital letters in the table indicate extremely significant difference at the 0.01 level ($P < 0.01$).

利用 2 种提取方法所得全蛋白粉进行双向凝胶电泳试验, 采用 pH 值 3~10 NL 24 cm IPG 胶条, 结果如图 1 所示, 绿盲蝽取食诱导赤霞珠葡萄冬芽内大多数蛋白点分布在 pH 值 4~7 内, 分子质量为

20~100 ku。通过 PDQuest 凝胶图谱分析, TCA-丙酮法提取赤霞珠冬芽全蛋白凝胶图谱上检测到 699 个蛋白点(图 1-A), 且点的颜色较深, 更圆更清晰; 而 TCA-丙酮法 + 酚抽提赤霞珠冬芽全蛋白凝胶图

谱上仅检测到 246 个蛋白质点,并且蛋白点较 TCA-丙酮法颜色浅,数量少(图 1-B)。相较而言,TCA-丙

酮提取方法效果更好,蛋白丢失少。



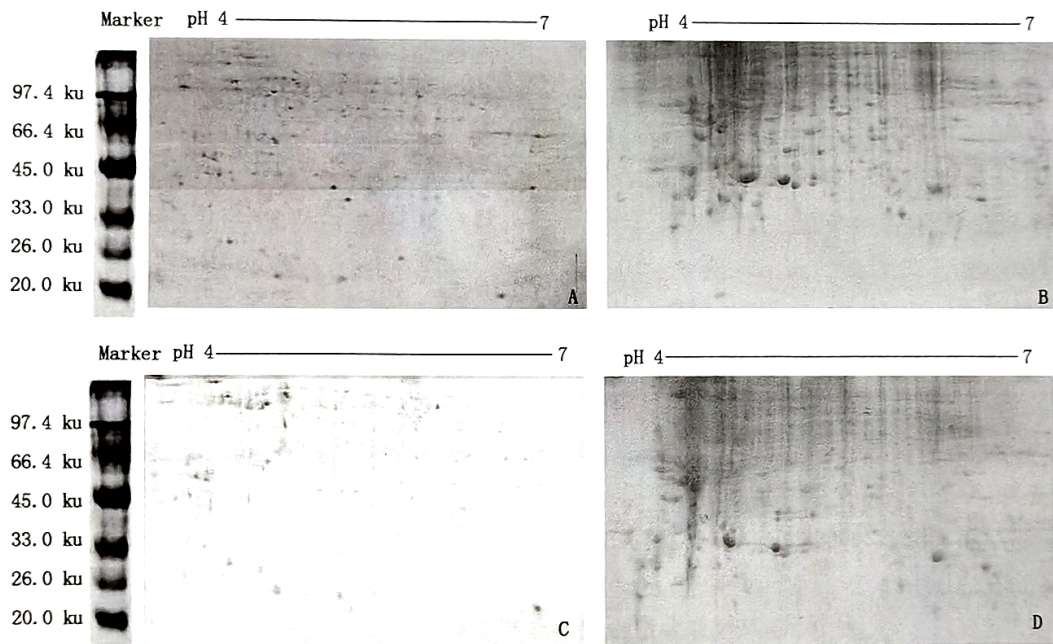
A. TCA-丙酮法全蛋白 2-DE 图像;B. TCA-丙酮法 + 酚抽提全蛋白 2-DE 图像。
A. TCA-acetone total protein 2-DE image; B. TCA-acetone + phenol extraction total protein 2-DE image.

图 1 pH 值 3~10 的 24 cm 胶条绿盲蝽取食诱导赤霞珠冬芽全蛋白不同提取方法双向凝胶电泳图对比
Fig. 1 Comparison of different extraction methods of total protein from *Cabernet sauvignon* winter buds induced by *Apolygus lucorum* feeding with 24 cm rubber strips at pH 3-10 by two-dimensional gel electrophoresis

2.2 不同蛋白上样量比较

分别选用 400, 800 μg 粗蛋白上样量,采用 pH 值 4~7 NL 17CM IPG 胶条,水化上样,进行第一向等电聚焦电泳及第二向 SDS-PAGE 凝胶电泳,利用凝胶扫描仪得到蛋白图谱,如图 2 所示,图 2-A、C

为上样量 400 μg 凝胶蛋白图谱,不同分子量蛋白可分辨率高,蛋白点数多,能进行有效的分离。蛋白点圆,边界清晰;对于上样量为 800 μg 凝胶图谱(图 2-B、D),蛋白点可分辨率较低,横纵向拖尾现象严重,不能进行有效分离,蛋白点边界模糊。



A. 绿盲蝽取食诱导赤霞珠冬芽 400 μg 蛋白上样量的 2-DE 图像;B. 绿盲蝽取食诱导赤霞珠冬芽 800 μg 蛋白上样量的 2-DE 图像;C. 对照 400 μg 蛋白上样量的 2-DE 图像;D. 对照 800 μg 蛋白上样量的 2-DE 图像。
A. 2-DE image of 400 μg protein loading amount of *Cabernet sauvignon* winter bud induced by *Apolygus lucorum* feeding; B. 2-DE image of 800 μg protein loading amount of *Cabernet sauvignon* winter bud induced by *Apolygus lucorum* feeding; C. 2-DE image of 400 μg protein loading amount; D. 2-DE image of 800 μg protein loading amount.

图 2 pH 值 4~7 的 17 cm 胶条不同上样量赤霞珠冬芽全蛋白双向凝胶电泳图对比
Fig. 2 Comparison of total protein of *Cabernet sauvignon* winter bud by two-dimensional gel electrophoresis of 17 cm rubber strips at pH 4-7 with different loading amount

从图 2 可以看出,绿盲蝽取食刺激赤霞珠葡萄冬芽的全蛋白凝胶图谱(图 2-A)和健康葡萄冬芽的蛋白凝胶图谱(图 2-C)相较,蛋白点数量、大小、深浅均有很大差异,甚至出现某些蛋白点消失或者增加的现象。利用 PDQuest 蛋白分析软件对比分析,

健康的赤霞珠葡萄冬芽(对照)全蛋白凝胶图谱上检测到 543 个蛋白点,而绿盲蝽取食刺激后赤霞珠葡萄冬芽全蛋白凝胶图谱上检测到 699 个蛋白点。绿盲蝽取食刺激胁迫后,赤霞珠葡萄冬芽蛋白点明显增多,部分蛋白含量也发生明显变化,出现差异蛋

白。表明绿盲蝽取食刺激可诱导赤霞珠葡萄冬芽蛋白质组发生改变,产生防御反应,其形成的防御蛋白可进一步利用质谱进行差异蛋白定性定量分析。

2.3 不同考马斯亮蓝染剂比较

2.3.1 R-250、R-350 与 G-250 染色效果比较 双向电泳技术中有关蛋白的染色方法,以考马斯亮蓝染色法最为常用。本研究采用 R-250、R-350 与 G-250 3 种染剂对聚丙烯酰胺凝胶上的蛋白点进行

染色,对比分析图谱效果。R-350 染色后图像背景清晰,对比度高,蛋白点分辨率高(图 3-A);R-250 染色效果和 R-350 无明显差异(图 3-B),R-350 和 R-250 均适用于双向凝胶电泳图谱染色。从图 3-C 可以看出,G-250 染色法图像背景模糊,蛋白点分辨率低,不适用于双向凝胶电泳图谱染色。试验结果表明,R-250、R-350 与 G-250 相比,能得到更高分辨率的凝胶图像,容易进行图谱分析。

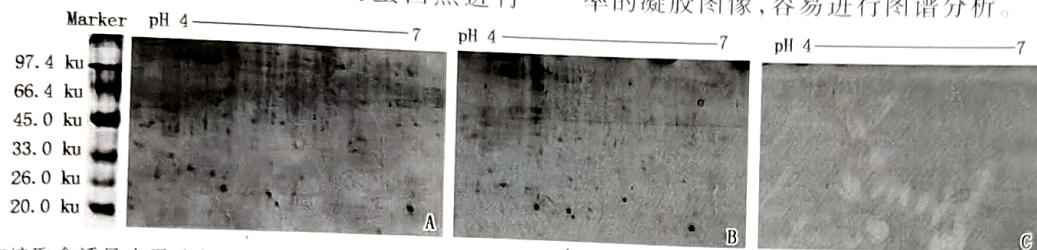


图 3 pH 值 4~7 的 17 cm 胶条不同染剂赤霞珠冬芽全蛋白双向凝胶电泳图对比
A. 绿盲蝽取食诱导赤霞珠冬芽全蛋白 R-350 染剂 2-DE 图像; B. 绿盲蝽取食诱导赤霞珠冬芽全蛋白 R-250 染剂的 2-DE 图像;
C. 绿盲蝽取食诱导赤霞珠冬芽全蛋白 G-250 染剂的 2-DE 图像。
A. 2-DE image of the total protein R-350 dye of *Cabernet sauvignon* winter buds induced by *Aplygus lucorum* feeding;
B. 2-DE image of the total protein R-250 dye of *Cabernet sauvignon* winter buds induced by *Aplygus lucorum* feeding;
C. 2-DE image of the total protein G-250 dye of *Cabernet sauvignon* winter buds induced by *Aplygus lucorum* feeding.

Fig. 3 Comparison of total protein of *Cabernet sauvignon* winter bud with 17 cm rubber strips at pH 4-7 with different dyes by two-dimensional gel electrophoresis

2.3.2 热染法和冷染法染色效果比较 由图 4 可知,经过 R-350 冷染色和加热染色后的凝胶图谱背景均较为清晰,蛋白点对比度高,低浓度蛋白也得到较好的显现。从染色时间上比较,采用热染法比冷染法在染色和脱色时间上明显减少。热染法染色时间仅需 15~20 min,而冷染法则至少需要 60~

120 min。热染法不仅缩短了染色时间,而且凝胶背景清晰,易脱色,脱色时间不超过 60 min;冷染法需要时间更长,需要过夜脱色。试验结果表明,绿盲蝽取食诱导赤霞珠葡萄冬芽蛋白质组双向凝胶电泳体系采用热染法更加省时高效,且操作简单、效果良好。

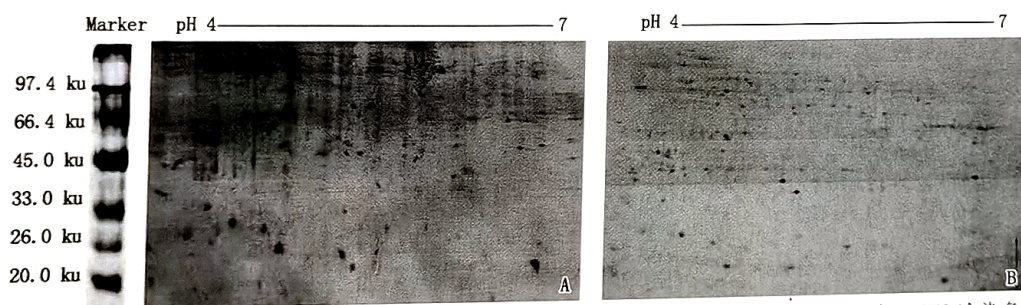


图 4 pH 值 4~7 的 17 cm 胶条赤霞珠冬芽全蛋白 R-350 冷热染色双向凝胶电泳图对比
A. 绿盲蝽取食诱导赤霞珠冬芽全蛋白 R-350 热染色的 2-DE 图像; B. 绿盲蝽取食诱导赤霞珠冬芽全蛋白 R-350 冷染色的 2-DE 图像。
A. 2-DE image of R-350 hot staining of *Cabernet sauvignon* winter buds total protein induced by *Aplygus lucorum* feeding; B. 2-DE image of R-350 cold staining of *Cabernet sauvignon* winter buds total protein induced by *Aplygus lucorum* feeding.

Fig. 4 Comparison on 2-DE image of R-350 cold and hot staining of *Cabernet sauvignon* winter buds total protein with 17 cm rubber strip at pH 4-7

3 讨论与结论

3.1 蛋白提取方法对双向电泳图谱的影响

植物全蛋白的提取方法种类较多,不同材料采用的提取方法也有一定的差异。已有研究结果显示,幼嫩组织蛋白提取常采用 TCA-丙酮法,酚提取法适用于复杂样本的蛋白提取^[17-18]。目前报道的有关葡萄不同器官中全蛋白的提取方法都各有差

异^[15,19-20]。本试验提取酿酒葡萄赤霞珠冬芽全蛋白时,采用了常用提取方法 TCA-丙酮法和王瑞璞等^[15]提取葡萄种子蛋白的 TCA-丙酮法+酚抽提法 2 种方法,证实 TCA-丙酮法提取蛋白方法简单,蛋白不易丢失,蛋白量大,进一步进行双向电泳凝胶图谱效果也较好;而 TCA-丙酮法+酚抽提法工艺复杂,虽然杂质去除效果较好,提取蛋白更纯,但缺点是蛋白提取量少,蛋白易丢失。这与王瑞璞等^[15]对

葡萄种子蛋白质双向电泳技术的研究结果存在明显差别,表明相同植物不同部位的蛋白质含量及提取方法都有所差别。

3.2 蛋白上样量对双向电泳图谱的影响

蛋白上样量的大小决定双向电泳凝胶图谱的分辨率。索慧英等^[21]研究了杨树叶片蛋白质双向电泳上样量对凝胶图谱的影响,认为上样量过小,样本蛋白点表现的不完全;上样量过大,蛋白点过多,不易分离,多为无效蛋白点。本研究摸索了适用于赤霞珠葡萄冬芽双向电泳体系的样本量,对于 pH 值 3~10 NL 24 cm 和 pH 值 4~7 NL 17 cm 的 IPG 胶条,上样量为 400 μg 蛋白干粉时,所得凝胶图谱蛋白点清晰,易于分离;800 μg 蛋白上样量,蛋白点不易分离,会产生严重的横、竖向拖尾现象。

3.3 考马斯亮蓝染剂对双向电泳结果的影响

考染以其操作简便、灵敏度仅次于银染,且可用于切下蛋白质进行质谱分析等特性,在双向凝胶电泳技术中占有重要地位。染色效果好的凝胶图谱,背景清晰,蛋白点光滑,对比度高^[22]。本试验 R-250 和 R-350 染料均适合于酿酒葡萄赤霞珠冬芽全蛋白双向电泳凝胶染色,其中 R-350 染色是所有染料中唯一可以达到几乎无背景的染色方法,且经过改进其染色和脱色时间大为节省。G-250 染料则应用于蛋白浓度或含量测定,不适用于 SDS-PAGE 凝胶图谱染色。此外,热染法较冷染法在染色和脱色更为节省时间,操作简单,且图像背景清晰度和蛋白点对比度无显著差异。因此,在后续试验中建议使用 R-350 热染色法。

3.4 结论

本研究建立并优化了绿盲蝽取食胁迫下赤霞珠冬芽防御反应的蛋白质组学双向电泳技术体系,结果表明,利用 TCA-丙酮法抽提蛋白,400 μg 蛋白上样, pH 值 4~7 NL 17 cm 的 IPG 胶条、8 000 V 聚焦 48 000 V·h、G-350 热染色双向电泳技术体系得到的赤霞珠冬芽全蛋白凝胶图谱,符合绿盲蝽取食诱导赤霞珠防御反应产生防御蛋白的检测要求。绿盲蝽取食刺激胁迫后,赤霞珠葡萄冬芽蛋白点明显增多,部分蛋白含量也发生明显变化,出现差异蛋白。表明绿盲蝽取食刺激可诱导赤霞珠葡萄冬芽蛋白质组发生改变,产生防御反应。

环境胁迫条件下植物的不同组织、器官和亚细胞水平的蛋白表达水平变化的研究报道很多^[23-26]。植物突变体差异表达蛋白挖掘、分离、鉴定有助于了解基因和蛋白质的功能,在遗传、毒理、抗逆性、抗药性分子机理等方面具有重要的理论意义和实用价值^[27-30]。进一步深入研究绿盲蝽取食胁迫下赤霞

珠葡萄防御反应和保护机制的分子基础,明确其蛋白质组水平上的变化,差异表达蛋白质的归属、性质和功能,筛选与抗性相关的特异蛋白。并与抗性基因联合分析,推测和验证特异蛋白与抗性相关基因之间的关键通路,可为揭示绿盲蝽取食诱导赤霞珠抗性反应机制,合理有效地开展抗性育种或新型杀虫剂的研发提供研究基础。

参考文献:

- [1] 高素红,路常宽,赵春明,王硕,周雅茹. 酿酒葡萄园区绿盲蝽种群动态与监测技术[J]. 应用昆虫学报, 2015, 52(5): 1167-1173. doi: 10. 7679/j. issn. 2095-1353. 2015. 139.
Gao S H, Lu C K, Zhao C M, Wang S, Zhou Y R. The population dynamics and monitoring of *Apolygus lucorum* in vineyards[J]. *Chinese Journal of Applied Entomology*, 2015, 52(5): 1167-1173.
- [2] 罗智捷. 茶小绿叶蝉唾液介导茶树抗虫防御及其机理的研究[D]. 福州: 福建农林大学, 2020. doi: 10. 27018/d. cnki. gfjnu. 2020. 000327.
Luo Z J. The mechanism of tea leafhopper saliva mediating defense response of tea plants[D]. Fuzhou: Fujian Agriculture and Forestry University, 2020.
- [3] 韩月雯,吴瑞,马超锋,李园园. 病毒-宿主蛋白相互作用组学研究进展[J]. 病毒学报, 2021, 37(4): 997-1003. doi: 10. 13242/j. cnki. bingduxuebao. 004015.
Han Y W, Wu R, Ma C F, Li Y Y. Research progress in viral-host protein interactomics[J]. *Chinese Journal of Virology*, 2021, 37(4): 997-1003.
- [4] O'Farrell P. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1975, 250(10): 4007-4021. doi: 10. 1016/S0021-9258(19)41496-8.
- [5] Bjellqvist B, Ek K, Giorgio Righetti P, Gianazza E, Görg A, Westermeier R, Postel W. Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: Principle, methodology and some applications[J]. *Journal of Biochemical and Biophysical Methods*, 1982, 6(4): 317-339. doi: 10. 1016/0165-022X(82)90013-6.
- [6] 左惠心,殷元虎,韩玲,马君义,宋仁德,余群力. 宰后牦牛肉保水性变化与差异蛋白的生物信息学分析[J]. 农业机械学报, 2017, 48(7): 325-331, 300. doi: 10. 6041/j. issn. 1000-1298. 2017. 07. 041.
Zuo H X, Yin Y H, Han L, Ma J Y, Song R D, Yu Q L. Changes of postmortem water-holding capacity in yak muscle and bioinformatic analysis of differentially abundant proteins[J]. *Transactions of the Chinese Society for Agricultural Machinery*, 2017, 48(7): 325-331, 300.
- [7] Weiland F, Zammit C M, Reith F, Hoffmann P. High resolution two-dimensional electrophoresis of native proteins[J]. *ELECTROPHORESIS*, 2014, 35(12/13): 1893-1902. doi: 10. 1002/elps. 201400060.
- [8] 刘莹洁,王瑛丽,王琴,杨方云,周彦,周常勇. 褐色橘蚜全蛋白双向电泳体系条件优化[J]. 植物保护学报, 2018, 45(4): 689-696. doi: 10. 13802/j. cnki. zwbhxb. 2018. 2017191.
Liu Y J, Wang Y L, Wang Q, Yang F Y, Zhou Y, Zhou C Y. Optimization of two-dimensional gel electrophoresis technology system for total protein from brown Citrus aphid *Toxoptera citricida*[J]. *Journal of Plant Protection*, 2018, 45(4): 689-696.
- [9] 张辉,白晨,王华忠,张惠忠,李晓东,付增娟,赵尚敏,鄂圆圆,张自强,王良. 甜菜双向电泳体系条件的优化[J]. 华北农学报, 2017, 32(5): 112-116. doi: 10. 7668/hbxb. 2017. 05. 017.
Zhang H, Bai C, Wang H Z, Zhang H Z, Li X D, Fu Z J, Zhao S M, E Y Y, Zhang Z Q, Wang L. Optimization of two dimen-

- sional electrophoresis system of sugar beet[J]. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2017, 32(5): 112-116.
- [10] 于亚文, 朱新荣, 张建. 高白鲑肌肉蛋白质组双向电泳技术体系的优化[J]. *中国食品学报*, 2019, 19(7): 168-174. doi:10.16429/j.1009-7848.2019.07.022.
- Yu Y W, Zhu X R, Zhang J. Optimization of two-dimensional gel electrophoresis for proteome from *Coregonus peled* muscle[J]. *Journal of Chinese Institute of Food Science and Technology*, 2019, 19(7): 168-174.
- [11] 张鹏飞, 黄愉淋, 耿双双, 陈富美, 付强, 黄凤玲, 陆阳清, 张明. 水牛睾丸曲精细管蛋白质组双向电泳方法的建立及优化[J]. *基因组学与应用生物学*, 2019, 38(4): 1474-1479. doi:10.13417/j.gab.038.001474.
- Zhang P F, Huang Y L, Geng S S, Chen F M, Fu Q, Zhang P L, Lu Y Q, Zhang M. Establishment and optimization of two-dimensional electrophoresis for proteome of buffalo testicular seminiferous tubules[J]. *Genomics and Applied Biology*, 2019, 38(4): 1474-1479.
- [12] 高佳敏, 高素红, 高宝嘉. 昆虫取食和机械损伤对葡萄叶片代谢物的影响[J]. *西北农业学报*, 2019, 28(9): 1543-1551. doi:10.7606/j.issn.1004-1389.2019.09.021.
- Gao J M, Gao S H, Gao B J. Effects of insect feeding and mechanical damages on metabolites in leaves of grape[J]. *Acta Agriculturae Boreali-occidentalis Sinica*, 2019, 28(9): 1543-1551.
- [13] 李林懋, 门兴元, 叶保华, 于毅, 张安盛. 绿盲蝽对冬枣不同生长期的为害[J]. *植物保护学报*, 2013, 40(6): 545-550. doi:10.13802/j.cnki.zwbhxb.2013.06.010.
- Li L M, Men X Y, Ye B H, Yu Y, Zhang A S. Damage of mirid bug *Apolygus lucorum* to winter jujube at different growth stages[J]. *Acta Phytophylacica Sinica*, 2013, 40(6): 545-550.
- [14] 王银翠, 周国娜, 张斌, 陈明叶, 高宝嘉. 油松毛虫取食和剪叶刺激胁迫下油松的蛋白质表达差异分析[J]. *林业科学*, 2016, 52(8): 68-75. doi:10.11707/j.1001-7488.20160809.
- Wang Y C, Zhou G N, Zhang B, Chen M Y, Gao B J. Difference in protein expression of *Pinus tabulaeformis* induced by *Dendrolimus tabulaeformis* feeding and leaf-cutting stimulation[J]. *Scientia Silvae Sinicae*, 2016, 52(8): 68-75.
- [15] 王瑞璞, 崔蕾, 张小莹, 王茜, 张朝红, 李琰. 葡萄种子蛋白质双向电泳体系的建立[J]. *北方园艺*, 2015(20): 86-91. doi:10.11937/bfy.201520021.
- Wang R P, Cui L, Zhang X Y, Wang Q, Zhang C H, Li Y. Establishment of two-dimensional electrophoresis system of grape seed[J]. *Northern Horticulture*, 2015(20): 86-91.
- [16] 倪瑞涓, 曹洪祥, 杨传平, 李海英, 王柏臣. 一种聚丙烯酰胺凝胶的快速染色方法——热考染法[J]. *黑龙江大学自然科学学报*, 2008, 25(3): 393-395, 400. doi:10.3969/j.issn.1001-7011.2008.03.028.
- Ni R J, Cao H X, Yang C P, Li H Y, Wang B C. A rapid staining method of polyacrylamide gel electrophoresis—heated CBB staining[J]. *Journal of Natural Science of Heilongjiang University*, 2008, 25(3): 393-395, 400.
- [17] 周琳, 申加枝, 段玉, 王婷, 王玉花, 朱旭君, 马媛春, 房婉萍. 茶树叶片蛋白双向电泳体系建立与应用[J]. *亚热带植物科学*, 2019, 48(3): 220-226. doi:10.3969/j.issn.1009-7791.2019.03.003.
- Zhou L, Shen J Z, Duan Y, Wang T, Wang Y H, Zhu X J, Ma Y C, Fang W P. Establishment and application of two-dimensional gel electrophoresis technology system for total protein of *Camellia sinensis* leaf[J]. *Subtropical Plant Science*, 2019, 48(3): 220-226.
- [18] 宋归华, 张迎新, 侯泽豪, 孙坤坤, 方正武, 马东方, 张改生, 王书平. 小麦小花细胞核蛋白质双向电泳体系的优化[J]. *麦类作物学报*, 2018, 38(6): 686-692. doi:10.7606/j.issn.1009-1041.2018.06.08.
- Song G H, Zhang Y X, Hou Z H, Sun K K, Fang Z W, Ma D F, Zhang G S, Wang S P. Optimization of two-dimensional electrophoresis for nucleus from wheat flaret[J]. *Journal of Triticeae Crops*, 2018, 38(6): 686-692.
- [19] 焦竹青, 许培磊, 王振兴, 艾军, 刘迎雪, 秦红艳, 杨义明. 山葡萄花序蛋白质双向电泳技术体系的建立[J]. *果树学报*, 2012, 29(5): 945-951. doi:10.13925/j.cnki.gsb.2012.05.039.
- Jiao Z Q, Xu P L, Wang Z X, Ai J, Liu Y X, Qin H Y, Yang Y M. Establishment of two-dimensional electrophoresis platform for *Vitis amurensis* flower[J]. *Journal of Fruit Science*, 2012, 29(5): 945-951.
- [20] 张玉洁, 张军科, 罗世杏. 葡萄叶片蛋白质双向电泳技术体系的建立[J]. *北方园艺*, 2010(13): 147-151. doi:10.11937/bfy.2010013054.
- Zhang Y J, Zhang J K, Luo S X. Study on the conditions of 2-DE analysis of proteome in grape leaves[J]. *Northern Horticulture*, 2010(13): 147-151.
- [21] 索慧英, 郑密, 卢晗, 曲冠证, 李莹. 杨树叶片蛋白质双向电泳图谱的建立[J]. *林业科学研究*, 2020, 33(2): 128-137. doi:10.13275/j.cnki.lykxyj.2020.02.016.
- Suo H Y, Zheng M, Lu H, Qu G Z, Li Y. Two-dimensional electrophoresis profiles for proteins of poplar leaf[J]. *Forest Research*, 2020, 33(2): 128-137.
- [22] 张微, 刘迪, 于婷婷, 刘晓羽. 苹果梨芽变果实蛋白质荧光差异双向凝胶电泳体系建立[J]. *分子植物育种*, 2019, 17(9): 2996-3000. doi:10.13271/j.mph.017.002996.
- Zhang W, Liu D, Yu T T, Liu X Y. Establishment of 2D-DIGE for the protein of pingguoli bud mutation fruit[J]. *Molecular Plant Breeding*, 2019, 17(9): 2996-3000.
- [23] Bhattacharjee M, Dhar S, Handique P J, Acharjee S, Sarmah B K. Defense response in chickpea pod wall due to simulated herbivory unfolds differential proteome profile[J]. *The Protein Journal*, 2020, 39(3): 240-257. doi:10.1007/s10930-020-09899-9.
- [24] Hajian Z, Ghasemi M F E, Alikhani F E. The study of stress conditions on growth and proteome of *Raoultella planticola*: A new emerging pathogen[J]. *Archives of Microbiology*, 2021, 203(6): 3269-3278. doi:10.1007/s00203-021-02312-8.
- [25] Mishra S, Verma S K. Differential expression of proteins in *Pseudomonas mendocina* SMSKVR-3 under arsenate stress[J]. *Journal of Basic Microbiology*, 2021, 61(4): 351-361. doi:10.1002/jobm.202000671.
- [26] Jian M Y, Zhang D Z, Wang X Y, Wei S W, Zhao Y, Ding Q, Han Y C, Ma L J. Differential expression pattern of the proteome in response to cadmium stress based on proteomics analysis of wheat roots[J]. *BMC Genomics*, 2020, 21(1): 343. doi:10.1186/s12864-020-6716-8.
- [27] Scali M, Moscatelli A, Bini L C, Onelli E, Vignani R, Wang W. Protein analysis of pollen tubes after the treatments of membrane trafficking inhibitors gains insights on molecular mechanism underlying pollen tube polar growth[J]. *The Protein Journal*, 2021, 40(2): 205-222. doi:10.1007/s10930-021-09972-x.
- [28] Altenbach S B, Chang H C, Simon-Buss A. Deciphering the immunogenic potential of wheat flour: A reference map of the salt-soluble proteome from the US wheat Butte 86[J]. *Proteome Science*, 2020, 18(1): 1-13. doi:10.1186/s12953-020-00164-6.
- [29] Zhang P, Zhu Y Q, Shen C J, Zhou S J. Proteome analysis of cucumber responses to *Pseudoperonospora cubensis* infection[J]. *Journal of Plant Pathology*, 2019, 101(4): 917-925. doi:10.1007/s42161-019-00290-x.
- [30] Yamada E, Sasai K, Higa R, Mizuguchi H, Fuse Y. Characterization and dynamic analysis of dissolved proteins in lake Biwa using two-dimensional electrophoresis[J]. *Analytical Sciences*, 2020, 36(6): 753-759. doi:10.2116/analsci.19P450.

《华北农学报》(双月刊)

ACTA AGRICULTURAE BOREALI-SINICA

主办单位:

北京市农林科学院、北京市农学会
河北省农林科学院、河北省农学会
山西省农业科学院、山西省农学会
河南省农业科学院、河南省农学会
天津市农业科学院、天津市农学会
内蒙古自治区农牧业科学院、农学会

华北农学报

HUABEI NONGXUEBAO

(双月刊, 1986年创刊)

第37卷 第1期 2022年2月28日

ACTA AGRICULTURAE BOREALI-SINICA

(Bimonthly, Started in 1986)

Vol.37 No.1 Feb. 28, 2022

主管单位: 河北省农林科学院
编辑出版: 《华北农学报》编辑部
主 编: 李成贵
地 址: 石家庄市和平西路 598 号 050051
电 话: 0311-87652166
电子邮件: hbnxb@163.com; hbnxb@haafs.org
印刷装订: 石家庄燕赵创新印刷有限公司
订 购 处: 全国各地邮局
国内发行: 河北省报刊发行局
国外发行: 中国国际图书贸易总公司 (北京 399 信箱)
定 价: 40.00 元 / 期; 240.00 元 / 年

Responsible Institution: Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences
Edited and Published by: Editorial Department of ACTA AGRICULTURAE
BOREALI-SINICA
Editor-in-chief: Li Chenggui
Address: 598, West Heping Road, Shijiazhuang 050051
Telephone: 0311-87652166
E-mail: hbnxb@163.com; hbnxb@haafs.org
Domestic Subscription by: Local Post Office
Domestic Distributor: Hebei Bureau for Distribution of Newspapers and
Journals
Issued Abroad by: International Book Trading Corporation P.O.Box 399,
Beijing, P.R.China
Price: US\$40.00/Issue; US\$240.00/Year

ISSN 1000-7091
CN 13-1101/S

邮发代号: 18-10

