

长期定位施肥条件下夏玉米籽粒清蛋白的比较蛋白质组学分析

吴倩^{1,2,#}, 许莹莹^{1,#}, 刘树堂¹, 裴玉贺^{1,*}, 宋希云^{1,*}

¹青岛农业大学农学院, 主要农作物种质创新与应用重点实验室, 山东青岛266109

²北京平川嘉恒技术有限公司, 济南250000

摘要: 基于33年的长期定位施肥试验, 利用蛋白质组学的方法研究了长期定位施用高低氮肥对夏玉米(*Zea mays*)籽粒清蛋白的影响。试验共设3个处理: 高氮组(年施用量为276 kg·hm⁻²)、低氮组(年施用量为138 kg·hm⁻²)以及对照组(不施氮肥)。以玉米品种‘鲁玉16’为材料, 人工授粉后, 在玉米成熟期取其穗中部籽粒, 利用蛋白质双向电泳和质谱技术对籽粒清蛋白进行差异分析和鉴定。结果表明: 与不施氮肥相比, 长期高、低氮处理均导致清蛋白的含量降低, 且在低氮条件下达显著水平。双向电泳结果表明长期低氮处理与不施氮肥相比共有7个差异蛋白点, 1个上调, 6个下调; 长期高氮处理与不施氮肥相比共有6个差异蛋白点, 1个上调, 5个下调。差异蛋白的基因表达分析与双向电泳结果相一致。通过质谱鉴定并对其进行功能分类, 共分为4类, 分别为: 蛋白质及氨基酸代谢相关蛋白、能量代谢相关蛋白、表达调控及防御抗逆相关的蛋白和功能未知蛋白。

关键词: 长期定位施肥; 氮肥; 夏玉米; 清蛋白; 蛋白质组学分析

随着生活水平的提高, 人们越来越追求农产品的营养价值, 而玉米(*Zea mays*)作为重要的粮食作物, 其籽粒的发育情况对其最终的产量和营养品质均产生非常大的影响, 营养品质主要包含籽粒中的蛋白质、脂肪、维生素及矿物质等的含量。施肥能够提高产量, 改善作物品质, 而蛋白质是生命的物质基础, 因此, 研究施肥对玉米成熟籽粒贮藏蛋白的影响具有重要的意义。

玉米籽粒品质的好坏除了受自身遗传影响外, 还受到种植方式(张向前等2012)、管理方式(徐明杰等2015)、高温(杨欢等2017)、施肥(Yuan等2016; Kumar和Bohra 2014)和淹水(任佰朝等2013)等的影响。目前玉米籽粒蛋白的研究主要集中在籽粒发育过程中相关蛋白的表达特性(于涛等2017)、籽粒蛋白含量数量性状基因座(quantitative trait locus, QTL)定位(宝华宾等2016)、储藏温度对玉米中蛋白质的影响(张智猛等2005)、施肥对籽粒蛋白的影响(殷晶晶等2017)等方面。利用蛋白质组学方法研究施肥对玉米籽粒蛋白的影响鲜有报道, 对作为玉米籽粒主要贮藏蛋白质之一的清蛋白研究尚属空白。

本研究为探究长期定位施肥条件下玉米籽粒清蛋白的蛋白质组学特性, 通过双向聚丙烯酰胺凝胶电泳和离子解析飞行时间质谱技术对不同施氮条件下玉米籽粒清蛋白进行差异分析和鉴定,

以期科学合理施肥、改良玉米籽粒营养品质、指导农业生产提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验设计

试验于1978年在青岛农业大学(原莱阳农学院)莱阳试验站进行, 于2011年取样, 所选材料来源于玉米(*Zea mays* L.)品种‘鲁玉16号’。试验地采用冬小麦(*Triticum aestivum* L.)-夏玉米轮作制, 每年两作。

供试土壤为非石灰性潮土, 发育于冲积母质, 表土质地为轻壤, pH值为6.80, 有机质含量为4.10 g·kg⁻¹, 全氮量为0.50 g·kg⁻¹, 全磷(P₂O₅)量为0.46 g·kg⁻¹, 土壤有效磷(P₂O₅)含量为15 mg·kg⁻¹, 土壤速效钾(K₂O)含量为38 mg·kg⁻¹, 土壤阳离子代换量为11.80 cmol·kg⁻¹。

试验共设3个处理(对照组、低氮组、高氮组), 每个处理设3次重复, 小区面积为33.3 m²。氮肥为尿素, 对照组不施用肥料, 低量氮肥每年施用

收稿 2018-12-17 修定 2019-04-17

资助 山东省农业良种工程项目(2017LZGC005)和山东省现代农业产业技术体系玉米产业创新团队项目(SDAIT-02-01)。

并列第一作者。

* 共同通讯作者: 裴玉贺(peiyuhe1980@163.com)、宋希云(songxy@qau.edu.cn)。

量为 $138\text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}$, 高量氮肥每年施用量为 $276\text{ kg}\cdot\text{hm}^{-2}$ 。氮肥施用情况: 15%用作种肥, 35%施用于起身期, 50%施用于拔节期, 冬小麦和夏玉米各占一半。2011年, 人工授粉后, 在玉米成熟期选取5棵长势一致、有代表性的植株, 取其穗中部饱满籽粒, 经液氮速冻后于 -80°C 超低温冰箱保存, 用于蛋白质组学研究。

1.2 测定项目与方法

1.2.1 籽粒清蛋白的提取及测定

籽粒清蛋白的提取参照何照范(1985)的方法。取 0.5 g 样品加入 2 mL 水, 研磨至匀浆, 再加入 3 mL 水转移至离心管中, 用 3 mL 水冲洗研钵并振荡 5 min , $1\ 856\times\text{g}$ 离心 8 min , 取上清液, 加 8 mL 水, 振荡 5 min , $1\ 856\times\text{g}$ 离心 5 min , 取上清液, 重复4次该步骤, 用水定容至 50 mL 。吸取样液 1 mL , 加入考马斯亮蓝溶液 5 mL , 混匀, 放置 2 min , 595 nm 比色。根据以标准蛋白液浓度为横坐标、吸光度为纵坐标建立的标准曲线, 计算样品吸光度对应的清蛋白含量。

1.2.2 籽粒清蛋白的SDS-PAGE

十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE)的装置为DYZC-24B型电泳仪(北京市六一仪器厂), 板胶厚 1 mm 。分离胶浓度为12%, 浓缩胶浓度为5%。将 $200\text{ }\mu\text{g}$ 样品加入点样孔。开始时电压为 100 V , 待溴酚兰完全进入浓缩胶界面后, 以 120 V 恒压电泳至结束。电泳后, 考马斯亮蓝染色并脱色, 采用UMAX Powerlook 2100XL扫描仪扫描成像。

1.2.3 籽粒清蛋白的纯化与定量

取上述清蛋白提取液用丙酮沉淀, $13\ 021\times\text{g}$ 离心 1 h , 用裂解液溶解, 裂解液含 $7\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素、 $2\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫脲、4% 3-[(3-胆酰胺丙基)-二乙胺]-丙磺酸{3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate, CHAPS}、 $40\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ β -巯基乙醇、0.2%固相pH梯度缓冲液(immobilized pH gradient buffer, IPG buffer), pH为4~7。用2-D Clean-Up Kit纯化蛋白试剂盒纯化蛋白后, 用水化液溶解蛋白, 水化液含 $8\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素、2% CHAPS、 $20\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ β -巯基乙醇、0.5% IPG buffer, pH为

4~7。采用Bradford (1976)法定量, 以牛血清白蛋白为标准蛋白。

1.2.4 籽粒清蛋白的双向电泳

取含 $200\text{ }\mu\text{g}$ 蛋白质的上述蛋白质溶液, 用上样水化缓冲液(水化液+0.002%溴酚蓝+0.012%去除点拖尾试剂)补充体积到 $450\text{ }\mu\text{L}$ 后, 将 24 cm 、pH为4~7的固相pH梯度线性胶条覆盖于该蛋白溶液上方, 被动水化 17 h , 进行等电聚焦(20°C , 100 V , 1 h ; 300 V , 1 h ; 500 V , 1 h ; $1\ 000\text{ V}$, 2 h ; $8\ 000\text{ V}$, 3 h ; $8\ 000\text{ V}$, 10 h ; 500 V)。聚焦结束后, 分别用含1% β -巯基乙醇和2.5%碘乙酰胺的胶条平衡缓冲液{含 $6\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 尿素、2% SDS、 $0.075\text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 三羟甲基氨基甲烷[tris(hydroxymethyl)aminomethane, Tris]、30%甘油、0.002%溴酚蓝, pH为8.8}平衡胶条各 15 min 。平衡完毕后, 将胶条紧贴在12%聚丙烯酰胺凝胶上方, 进行第二向电泳(每根胶条 3 W , $24\sim 27\text{ h}$)。电泳结束后采用改进的银染方法对凝胶进行染色, 然后用UMAX PowerLook 2100XL扫描仪扫描图像, 图像分析采用ImageMaster platinum 6.0软件, 实验重复3次。选取表达丰度上调或下调1.5倍并且在统计学 T 检验上 $P<0.05$ 的蛋白质为差异蛋白质点进行质谱分析。

1.2.5 蛋白消化

从凝胶中切下蛋白点, 用 $500\text{ }\mu\text{L}$ 脱色液[$25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 碳酸氢铵、50%乙腈]洗脱3次, 每次洗脱 1 h , 弃上清液, 再添加 $500\text{ }\mu\text{L}$ 乙腈使蛋白点脱水。将处理后的蛋白点放置在 $200\text{ }\mu\text{L}$ 缓冲液[$25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 碳酸氢铵、 $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ β -巯基乙醇]中, 56°C 条件下水浴 1 h , 进行二硫键的裂解; 加入 $200\text{ }\mu\text{L}$ ($25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 碳酸氢铵、 $55\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 碘乙酰胺)缓冲液, 室温避光条件下水浴 45 min , 进行半胱氨酸的烷基化; 用 $25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 碳酸氢铵缓冲液洗涤蛋白点两次, 并用 $500\text{ }\mu\text{L}$ 乙腈脱水; 用胰蛋白酶溶液(含 $10\text{ ng}\cdot\mu\text{L}^{-1}$ 的 $25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 碳酸氢铵缓冲液)覆盖蛋白点, 在冰上放置 30 min 后, 弃去剩余的胰蛋白酶溶液, 并加入 $25\text{ }\mu\text{L}$ 的 $25\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 碳酸氢铵, 37°C 条件下放置 12 h , 进行蛋白水解, 加入5% (质量分数)甲酸终止反应。

1.2.6 质谱分析和数据库搜索

使用MALDI/TOF质谱仪(Bruker ultrafleXtreme,

Germany)对蛋白点进行鉴定。蛋白经消化后, 将1 μL肽液滴在Anchorchip板上, 室温条件下干燥, 在相同位置将0.1 μL的α-氰基-4-羟基肉桂酸滴在板上, 质量范围为500~3 500 Da, 扫描分辨率为50 000半峰全宽(full width at half maximum, FWHM)。选择3~5个最丰富的一级质谱峰用于二级质谱扫描。

使用Mascot 2.3.02软件(Matrix Science, London, UK)进行数据库搜索、肽质量指纹分析和二级质谱分析, 该数据库与国家生物技术信息中心非冗余数据库进行了比较。蛋白质鉴定的得分大于63并且在统计学T检验上 $P<0.05$ 被定义为显著差异表达的蛋白。

1.2.7 总RNA提取和cDNA合成

参照TaKaRa的MiniBEST Plant RNA Extraction Kit试剂盒的步骤提取总RNA。参照TaKaRa的Prime Script RT Master Mix (Perfert Real Time)试剂盒的反转录步骤进行cDNA的合成。

1.2.8 实时荧光定量PCR

以合成的cDNA作为基因扩增的模板, 选取与差异蛋白点相关的基因设计引物(表1), 以玉米Actin基因作为内参, 参照TaKaRa的TB Green Premix Ex Taq II (Tli RNaseH Plus)试剂盒的步骤进行荧光定量PCR反应。通过实时荧光定量获取循环阈值(cycle threshold, C_t), 基因相对表达量计算采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 的方式:

相对倍数= $2^{-\Delta\Delta C_t(\text{目标基因})}$
 $\Delta\Delta C_{t(\text{目标基因})} = \text{处理组} \Delta C_{t(\text{目标基因})} - \text{对照组} \Delta C_{t(\text{目标基因})}$
 $\Delta C_{t(\text{目标基因})} = C_{t(\text{目标基因})} - C_{t(\text{内参})}$

表1 引物名称与序列
Table 1 List of primers and sequences

引物名称	引物序列(5'→3')
72	TTGGGAAAACGCTTGTG
102	ATCAGCGTGGTGGTGAGCCA
110	TGACACACCTGAGCCTCTTT
115	GTGGGGAGACGAGGACAAG
132	CTGCTGGACTTCTGGGTGAG
133	GTGGGGAGACGAGGACAAG
177	CGTGTGTGGGTCAAGAAAGG
213	TTGTGTGCCGCAACAACG
218	GTGCGGCATCCTGTACGG
Actin	GTCCATGAGGCCACGTACAA

1.3 数据处理

采用SPSS 21.0软件对数据进行差异显著性分析(T检验), $P<0.05$ 为显著差异, $P<0.01$ 为极显著差异。用Excel 2010软件进行柱状图的制作。

2 实验结果

2.1 长期施用高低氮肥对玉米籽粒清蛋白含量的影响

从图1可以看出, 长期施用高氮、低氮条件下, 清蛋白含量分别为2.94%、2.14%, 与不施氮肥(3.12%)相比, 含量均降低, 并且在低氮条件下降幅较大, 高氮条件下降幅较小。方差分析结果表明, 长期施用低氮与不施氮肥相比, 清蛋白含量显著下降, 而长期施用高氮与不施氮肥相比, 清蛋白含量并未出现显著变化。

2.2 玉米籽粒清蛋白的单向SDS-PAGE分析

不同处理玉米籽粒清蛋白单向电泳结果如图2所示。可以看出与对照组相比, 高氮处理组和低氮处理组的清蛋白图谱均观察到差异表达的蛋白质谱带。

2.3 玉米籽粒清蛋白的双向电泳分析

双向电泳检测结果如图3所示, 与对照组相比, 共发现13个蛋白点在长期定位施用高低氮肥条件下显著差异表达, 有3个点(点102、点115和点218)

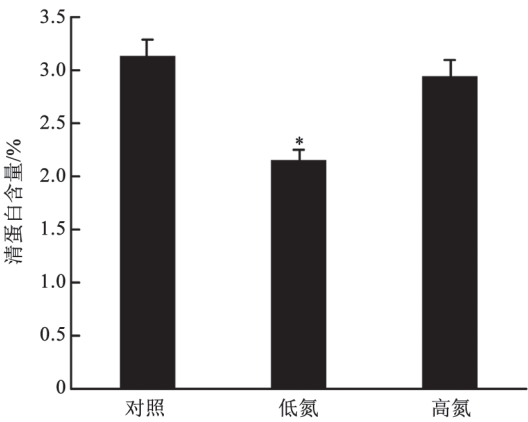


图1 长期施用高低氮肥对玉米籽粒清蛋白含量的影响
Fig.1 Effect of long-term different nitrogen fertilizer treatments on albumin content in maize kernel
*代表与对照相比差异显著($P<0.05$)。

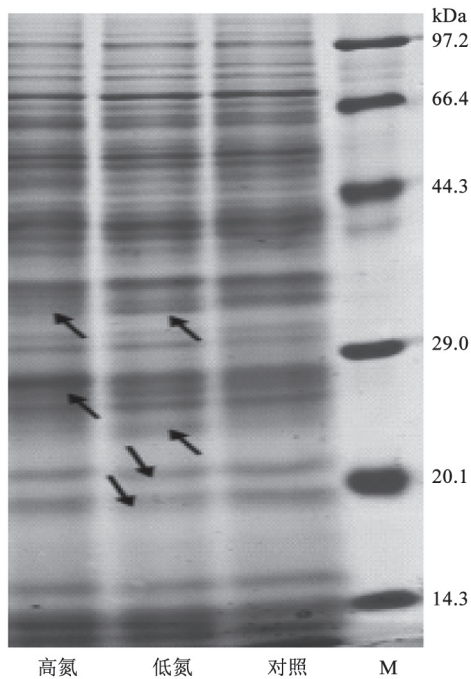


图2 不同处理玉米籽粒清蛋白的单向SDS-PAGE图谱

Fig.2 SDS-PAGE map of maize kernel albumin under different treatments

箭头表示与对照相比表达上调的蛋白条带和表达下调的蛋白条带, M为蛋白marker。

在高氮和低氮处理条件下与对照相比均差异表达。长期低氮处理的玉米籽粒清蛋白与对照组相比共有7个差异蛋白点, 1个点(点232)表达量上调, 6个点(点213、点115、点110、点132、点218和点102)表达量下调; 长期高氮处理的籽粒清蛋白与对照组相比共有6个差异蛋白点, 其中1个点(点177)表达量上调, 5个点(点133、点115、点218、点72和点102)表达量下调。

2.4 差异蛋白的质谱分析和功能分类

对差异蛋白点进行质谱检测, 结果如表2所示。根据蛋白质的功能将10个蛋白点分成4大类, 与蛋白质及氨基酸代谢相关的蛋白2个: 213 (60S酸性核糖体蛋白P3)和218 (果胶甲酯酶抑制因子结构域蛋白前体); 与能量代谢相关的1个: 102 (胁迫蛋白39短链脱氢蛋白/还原酶SDR家族蛋白); 与表达调控及防御抗逆相关的蛋白5个: 72 (半胱氨酸合酶亚型3)、110 (乙二醛酶I)、115 (rab28蛋白)、132 (谷胱甘肽-S-转移酶)和133 (胚胎发育晚期丰富蛋白

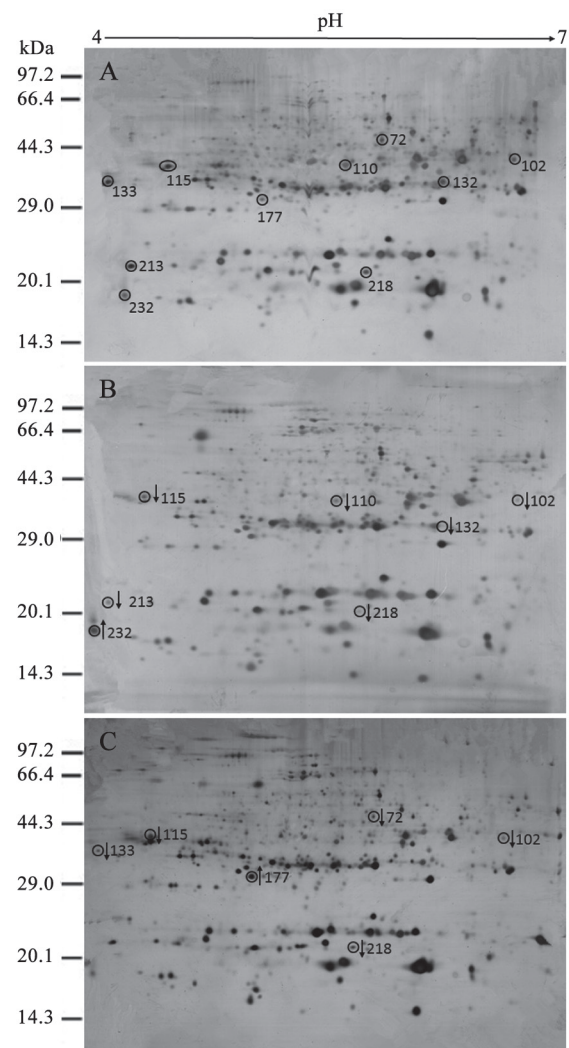


图3 不同处理玉米籽粒清蛋白的双向电泳图

Fig.3 Two-dimensional electrophoretogram of maize kernel albumin under different treatments

A: 对照组; B: 低氮组; C: 高氮组。箭头表示与对照相比表达上调的蛋白点和表达下调的蛋白点。

D-34); 功能未知蛋白2个: 177 (1,2-双羟基-3-酮-5-甲基硫戊烯双氧酶2)和232 (假定蛋白733594)。

2.5 差异蛋白相关基因的表达分析

为了验证这些差异蛋白点, 本试验进行了差异蛋白相关基因的表达分析。由图4可以看出, 与不施氮肥相比, 长期施用低量氮肥条件下, 所有差异蛋白基因的表达均表现为显著或极显著下调, 其中, 点115表达量最低; 长期施用高氮条件下, 除了点177表现为极显著上调, 其他点均表现为显著

表2 长期定位施肥条件下玉米籽粒清蛋白差异点的质谱鉴定结果

Table 2 MS results of difference points of maize grain albumin under long-term located fertilization

蛋白点	NCBI登记号	分子质量/Da	蛋白得分	等电点	覆盖/%	描述	表达量
213	gi 413943208	12 041.57	207	4.12	21.67	60S酸性核糖体蛋白P3	↓
218	gi 259490412	18 783.38	256	6.10	66.48	果胶甲酯酶抑制因子结构域蛋白前体	↓
102	gi 414590803	38 883.91	434	9.15	48.88	胁迫蛋白39短链脱氢蛋白/还原酶SDR家族蛋白	↓
72	gi 414869052	34 225.98	349	5.52	38.46	半胱氨酸合酶亚型3	↓
110	gi 37932483	32 450.46	82.1	5.50	26.55	乙二醛酶I	↓
115	gi 22460	27 692.74	282	4.60	50.72	rab28蛋白	↓
132	gi 226494943	25 406.10	205	7.21	38.84	谷胱甘肽-S-转移酶	↓
133	gi 670362060	28 390.92	409	4.26	49.83	胚胎发育晚期丰富蛋白D-34	↓
177	gi 414864926	23 622.54	142	4.84	30.81	1,2-双羟基-3-酮-5-甲基硫戊烯双氧酶2	↑
232	gi 414876534	22 859.20	95.4	5.96	21.94	假定蛋白733594	↑

箭头表示与对照相比表达量上调(↑)的蛋白点和表达量下调(↓)的蛋白点; 蛋白得分表示检测到的蛋白的可信度评分, 得分>63被认为是差异蛋白; 覆盖表示检测到的氨基酸含量占总氨基酸含量的比例。

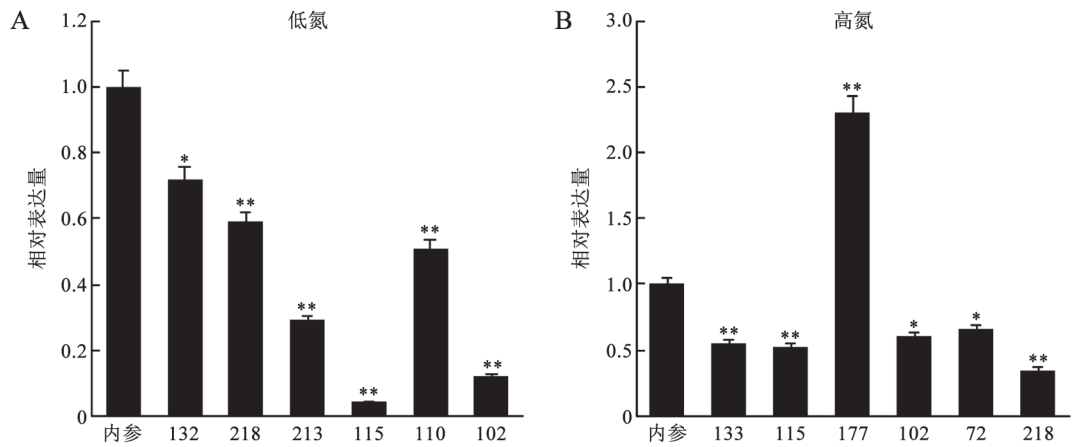


图4 差异蛋白基因的相对表达量
Fig.4 The expression of genes related to differential proteins

A: 高氮组实时荧光定量PCR分析; B: 低氮组实时荧光定量PCR分析。*和**分别代表与内参相比差异显著(P<0.05)和极显著(P<0.01)。

或极显著下调, 其中点218表达量最低。试验结果与双向电泳结果相一致。

3 讨论

3.1 长期定位施用高低氮肥对玉米籽粒清蛋白的影响

氮素是植物生长发育过程中必不可少的大量元素之一, 合理施用氮肥是提高作物产量和品质的重要措施, 过量施用氮肥不仅会导致大量的氮素损失, 土壤酸化, 还会造成土壤中积累大量的硝态氮(王敬等2016)。减少氮肥的施用量虽然可以

降低氮肥的损失, 但会造成作物的产量和品质降低(Constantin等2010)。关于作物对氮素吸收利用机制的研究已有一些进展, 张华珍和徐恒玉(2011)指出, 氮素主要参与作物体内蛋白质、核酸等重要物质的合成过程, 该过程涉及多个酶, 如硝酸还原酶(nitrate reductase, NR)、亚硝酸还原酶(nitrite reductase, NiR)、谷氨酰胺合成酶(glutamine synthetase, GS)以及谷氨酸合成酶(glutamate synthase, GOGAT)。Hsu和Tsay (2013)研究表明NRT1 (nitrate transporter1)、NRT2 (nitrate transporter 2)等家族的基因在作物的氮素吸收利用等方面有重要作用。为从作物籽粒品质

方向进一步了解氮素的作用机制, 本试验以玉米籽粒主要贮藏蛋白之一的清蛋白为研究对象, 在不同施氮条件下对其进行差异分析和鉴定。

前人已研究表明施氮对作物籽粒清蛋白含量具有影响, 结果却不尽相同。Ning等(2009)对水稻(*Oryza sativa*)进行5个氮素水平的处理, 结果表明水稻清蛋白含量随着氮素水平的增加而上升。汪燕等(2017)在研究14个不同的苦荞(*Fagopyrum tataricum*)品种对低氮的响应中发现, 9个品种清蛋白含量低于对照, 其中6个品种达到显著或极显著差异水平。杨恩琼等(2009)研究表明, 氮肥施用量在150~200 kg·hm⁻²时能显著提高玉米清蛋白含量, 若施用氮肥过高会导致清蛋白含量下降。本研究在33年的长期定位施用高低氮肥条件下, 对籽粒清蛋白含量进行了测定, 结果表明与不施氮肥相比, 长期定位施用高低氮肥均导致夏玉米籽粒清蛋白含量下降。因此, 本研究认为若要提高玉米籽粒清蛋白含量、提升籽粒品质, 应合理控制氮肥的施用量, 不宜过高或过低。本研究发现, 在低氮条件下与不施氮肥相比, 清蛋白含量的下降达显著水平, 而高氮条件下未达显著水平, 表明低氮对籽粒蛋白品质的影响更大一些, 在农业生产中, 更应注重改良低量氮肥对玉米籽粒蛋白品质的影响。

3.2 差异表达蛋白的功能分析

3.2.1 蛋白质及氨基酸代谢相关蛋白

真核生物的核糖体为80S, 包括60S和40S两个大小亚基。在植物中, 60S酸性核糖体P蛋白除P1和P2外, 还包括P3, 既能参与蛋白质的生物合成, 又具有调控植物发育的功能(Bailey-Serres等1997)。本试验鉴定的60S酸性核糖体蛋白P3 (点213)在长期低氮处理条件下表达下降, 而对照组和高氮处理没有差异, 表明低氮处理可能会抑制P3蛋白合成过程的一些途径, 导致其含量下降。

本试验鉴定的果胶甲酯酶抑制因子(pectin methyl esterase inhibitor, PMEI)结构域蛋白前体(点218)在高低氮处理下表达量均下降。有研究指出果胶甲酯酶(pectin methyl esterase, PME)是一种重要的果胶酶, 普遍存在于高等植物的不同组织器官中, 如根、茎、叶、果实等(Pelloux等2007)。PME对细胞壁的组成和降解、种子萌发、根尖延

伸、开裂、果实软化成熟、抗病等方面具有重要作用(Al-Qsous等2004)。而PMEI是一种对PME有抑制作用的蛋白, 其对PME的活性具有调控作用(冀美玲等2017), 该蛋白在高低氮处理下表达量均下降, 可缓解PMEI对PME的抑制作用。通过实时荧光定量PCR, 发现其在高氮条件下表达量最低, 进一步探寻这种蛋白在高氮下的调节方式, 对提高籽粒清蛋白含量意义重大。

3.2.2 能量代谢相关蛋白

短链脱氢/还原酶(short-chain dehydrogenase/reductase, SDR)是一个非常大的蛋白家族, 包括许多不同的氧化还原酶(oxidoreductase)、异构酶(isomerase)和裂解酶(lyases)等, 这些酶催化多种底物, 包括类固醇(steroid)、维生素A (vitamin A)、前列腺素(prostaglandin, PG)、糖类化合物、醇类化合物以及其他许多的小分子化合物(Jörnval等1995)。点102为一般应激的39链脱氢蛋白, 本试验表明该蛋白在长期施用高低氮肥条件下表达量均下调。相关研究表明较高的施氮量会抑制糖的积累(刘娜等2015), 可能是因为长期施用高低氮肥条件下短链脱氢蛋白表达量下降, 导致一些酶的催化能力降低, 进而抑制了糖类化合物等的合成。

3.2.3 表达调控及防御抗逆相关蛋白

rab28蛋白(点115)是rab蛋白家族的成员, 在植物学中研究较多。它在种子胚芽和成熟植物体的分生组织中表达, 定位于细胞核上, 参与调控脱落酸(abscisic acid, ABA)的表达(Nieva等2005)。本试验发现该蛋白在长期施用高低氮肥条件下表达量均下调, ABA含量也会因此降低。大多数研究表明长期施肥会降低ABA的含量, 陈新红等(2005)研究认为高氮处理使ABA含量降低, 王熊军等(2011)研究指出ABA含量在不同氮素水平下相比于空白对照均显著降低。通过实时荧光定量PCR, 我们发现该蛋白在低氮条件下表达量最低, 探寻该蛋白在低氮条件下的作用机理, 对提高籽粒清蛋白含量具有重要的意义。本研究发现另一个与ABA调控相关的胚胎发育晚期丰富蛋白D-34 (点133)在长期高氮处理下表达量下降, 该蛋白是植物胚胎发生后种子中大量积累的一类蛋白质(Dure等1981), 可受外源ABA、干旱、渗透和低温胁迫诱导产生

(邹永东等2008),可能是氮素营养延缓了作物的衰老和功能衰退,导致细胞内的ABA含量下降,从而表达量降低。

半胱氨酸合酶(cysteine synthase, CS)是半胱氨酸(cysteine, Cys)到谷胱甘肽(glutathione, GSH)合成途径的一个关键酶,它可能改变细胞内的GSH库,以抵抗逆境下的氧化胁迫。研究表明CS基因受硫、氮及光照条件协调的控制(施伟平2005)。CS亚型3(点72)参与构成CS。试验表明点72的表达量在长期定位施低氮条件下与对照组没有差异,而施高氮表达量下降,说明土壤中氮素过高可能会抑制CS的表达,进而导致玉米对逆境的抵抗能力降低。

点110为乙二醛酶I(glyoxalase I, Gly I)是一种胞内酶,普遍存在于各种细胞中,尤其是线粒体中,它的活性贯穿整个生命的始终,乙二醛酶系统(Gly I、Gly II和Gly III)在植物耐逆性形成中起着重要作用(王月等2018)。点132为谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione S-transferase, GST),参与有毒物质的解除(雷安平等2009)。本试验发现Gly I(点110)和GST(点132)在长期定位施高氮条件下与对照组没有差异,而施用低氮表达量下降,因此,在低氮条件下作物的耐逆、抗病能力可能会降低,相关研究表明氮肥供应不足易诱发全蚀病、胞囊线虫病、根腐病等病害(彭龙腾2012)。

3.2.4 其他蛋白

点177为1,2-双羟基-3-酮-5-甲基硫戊烯双氧酶2(1,2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene dioxygenase 2),是一种加氧酶,其功能未知。假定蛋白(点232)是一类已经证明存在于生物体内但是其结构和功能均未知的蛋白。本研究通过双向电泳检测发现点177和点232分别在长期施用高氮和低氮条件下与不施氮肥相比表达量上调,点177通过实时荧光定量分析表达量极显著上调。因此,推测点177可能是一种高氮防御蛋白,而点232可能是一种低氮防御蛋白,可增加玉米的抗逆性,其作用机理及功能值得我们去进行进一步的探究。

参考文献(References)

- Al-Qsous S, Carpentier E, Klein-Eude D, et al (2004). Identification and isolation of a pectin methylesterase isoform that could be involved in flax cell wall stiffening. *Planta*, 219 (2): 369–378
- Bailey-Serres J, Vangala S, Szick K, et al (1997). Acidic phosphoprotein complex of the 60S ribosomal subunit of maize seedling roots. Components and changes in response to flooding. *Plant Physiol*, 114 (4): 1293–1305
- Bao HB, Liang SQ, Lyu YD, et al (2016). Analysis of meta-QTL and candidate genes related to protein concentration in maize grain. *Jiangsu J Agr Sci*, 32 (4): 736–745 (in Chinese with English abstract) [宝华宾, 梁帅强, 吕远大等(2016). 玉米籽粒蛋白含量Meta-QTL及候选基因分析. *江苏农业学报*, 32 (4): 736–745]
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248–254
- Chen XH, Liu K, Xi LL, et al (2005). Effects of soil moisture and nitrogen on abscisic acid and cytokinin contents in the aboveground plant parts of rice. *Acta Agron Sin*, 31 (11): 1406–1414 (in Chinese with English abstract) [陈新红, 刘凯, 奚岭林等(2005). 土壤水分与氮素对水稻地上器官脱落酸和细胞分裂素含量的影响. *作物学报*, 31 (11): 1406–1414]
- Constantin J, Mary B, Laurent F, et al (2010). Effects of catch crops, no till and reduced nitrogen fertilization on nitrogen leaching and balance in three long-term experiments. *Agr Ecosyst Environ*, 135 (4): 268–278
- Dure L III, Greenway SC, Galau GA (1981). Developmental biochemistry of cottonseed embryogenesis and germination: changing messenger ribonucleic acid populations as shown by *in vitro* and *in vivo* protein synthesis. *Biochemistry*, 20 (14): 4162–4168
- He Z (1985). Seed Quality of Cereal and Oil Crops and Analytical Techniques. Beijing: China Agriculture Press (in Chinese) [何照范(1985). 粮油籽粒品质及其分析技术. 北京: 中国农业出版社]
- Hsu PK, Tsay YF (2013). Two phloem nitrate transporters, NRT1.11 and NRT1.12, are important for redistributing xylem-borne nitrate to enhance plant growth. *Plant Physiol*, 163 (2): 844–856
- Ji ML, Li L, Chen M, et al (2017). Identification and expression analysis of *PMEI* gene family in peach. *Plant Physiol J*, 53 (11): 1988–1996 (in Chinese with English abstract) [冀美玲, 李玲, 陈敏等(2017). 桃果胶甲酯酶抑制因子 *PMEI* 基因家族的鉴定及表达分析. *植物生理学报*, 53 (11): 1988–1996]
- Jörnvall H, Persson B, Krook M, et al (1995). Short-chain dehydrogenases/reductases (SDR). *Biochemistry*, 34 (18): 6003–6013

- Kumar R, Bohra JS (2014). Effect of NPKS and Zn application on growth, yield, economics and quality of baby corn. *Arch Agron Soil Sci*, 60 (9): 1193–1206
- Lei AP, Chen H, Li SF, et al (2009). Function, application, cloning and expression of glutathione S-transferases. *Environ Sci Technol*, 32 (12): 85–91 (in Chinese with English abstract) [雷安平, 陈欢, 黎双飞等(2009). 谷胱甘肽S-转移酶的功能、应用及克隆表达. *环境科学与技术*, 32 (12): 85–91]
- Liu N, Song B, Yan Z, et al (2015). Effect of nitrogen application on the content of soluble sugar and key enzyme activities in sugar metabolism of sugar beet. *Chin Agr Sci Bull*, 31 (27): 183–189 (in Chinese with English abstract) [刘娜, 宋柏权, 闫志山等(2015). 氮肥施用量对甜菜蔗糖代谢关键酶和可溶性糖含量的影响. *中国农学通报*, 31 (27): 183–189]
- Nieva C, Busk PK, Domínguez-Puigjaner E, et al (2005). Isolation and functional characterisation of two new bZIP maize regulators of the ABA responsive gene *rab28*. *Plant Mol Biol*, 58 (6): 899–914
- Ning H, Liu Z, Wang Q, et al (2009). Effect of nitrogen fertilizer application on grain phytic acid and protein concentrations in japonica rice and its variations with genotypes. *J Cereal Sci*, 50 (1): 49–55
- Pelloux J, Rustérucci C, Mellerowicz EJ (2007). New insights into pectin methylesterase structure and function. *Trends Plant Sci*, 12 (6): 267
- Peng L (2012). Effect of nitrogen fertilizer on wheat growth. *Anhui Agr Sci Bull*, 18 (22): 51, 63 (in Chinese) [彭龙腾(2012). 氮肥对小麦生长的影响. *安徽农学通报*, 18 (22): 51, 63]
- Ren BC, Zhang JW, Li X, et al (2013). Effect of waterlogging on grain filling and quality of summer maize. *Sci Agr Sin*, 46 (21): 4435–4445 (in Chinese with English abstract) [任佰朝, 张吉旺, 李霞等(2013). 淹水胁迫对夏玉米籽粒灌浆特性和品质的影响. *中国农业科学*, 46 (21): 4435–4445]
- Shi WP (2005). Expression and analysis of glycolate oxidase and cysteine synthase in plants (dissertation). Guangzhou: Agricultural University of South China (in Chinese with English abstract) [施伟平(2005). 植物乙醇酸氧化酶与半胱氨酸合酶的表达及分析(学位论文). 广州: 华南农业大学]
- Wang J, Cheng Y, Cai Z, et al (2016). Effects of long-term fertilization on key processes of soil nitrogen cycling in agricultural soil: a review. *Acta Pedol Sin*, 53 (2): 292–304 (in Chinese with English abstract) [王敬, 程谊, 蔡祖聪等(2016). 长期施肥对农田土壤氮素关键转化过程的影响. *土壤学报*, 53 (2): 292–304]
- Wang XJ, Jiang YS, Qi XX, et al (2011). Effects of different applying nitrogen fertilizer on growth and endogenous hormones of *Sophora japonica* L. *Hunan Agr Sci*, (1): 113–116 (in Chinese with English abstract) [王熊军, 蒋运生, 漆小雪等(2011). 氮肥不同施用方式对槐树生长及内源激素影响的研究. *湖南农业科学*, (1): 113–116]
- Wang Y, Liang C, Sun Y, et al (2017). The yield and quality of tartary buckwheat varieties and the response to low nitrogen. *J Guizhou Norm Univ Nat Sci*, 35 (6): 66–73 (in Chinese with English abstract) [汪燕, 梁成刚, 孙艳红等(2017). 不同苦荞品种的产量与品质及其对低氮的响应. *贵州师范大学学报(自然科学版)*, 35 (6): 66–73]
- Wang Y, Zhou ZH, Ye XY, et al (2018). Methylglyoxal: a new signaling molecule in plants. *Plant Physiol J*, 54 (1): 10–18 (in Chinese with English abstract) [王月, 周志豪, 叶芯好等(2018). 甲基乙二醛: 植物中一种新的信号分子. *植物生理学报*, 54 (1): 10–18]
- Xu MJ, Zhang L, Wang XY, et al (2015). Effects of different management patterns on uptake, distribution and fate of nitrogen in summer maize. *J Plant Nutr Fert*, 21 (1): 36–45 (in Chinese with English abstract) [徐明杰, 张琳, 汪新颖等(2015). 不同管理方式对夏玉米氮素吸收、分配及去向的影响. *植物营养与肥料学报*, 21 (1): 36–45]
- Yang EQ, Huang JG, He TB, et al (2009). Effect of nitrogen fertilizer application on yield and nutritional qualities of food maize. *J Plant Nutri Fert*, 15 (3): 509–513 (in Chinese with English abstract) [杨恩琼, 黄建国, 何腾兵等(2009). 氮肥用量对普通玉米产量和营养品质的影响. *植物营养与肥料学报*, 15 (3): 509–513]
- Yang H, Shen X, Lu DL, et al (2017). Effects of heat stress durations at grain formation stage on grain yield and starch quality of waxy maize. *Sci Agr Sin*, 50 (11): 2071–2082 (in Chinese with English abstract) [杨欢, 沈鑫, 陆大雷等(2017). 籽粒建成期高温胁迫持续时间对糯玉米籽粒产量和淀粉品质的影响. *中国农业科学*, 50 (11): 2071–2082]
- Yin JJ, Zhao Y, Tian XH (2017). Effect of storage temperature and humidity on maize protein. *Sci Technol Food Ind*, 38 (3): 331–335 (in Chinese with English abstract) [殷晶晶, 赵妍, 田晓花(2017). 不同储藏温湿度对玉米中蛋白质的影响. *食品工业科技*, 38 (3): 331–335]
- Yu T, Li G, Liu P, et al (2017). Proteomic analysis of maize reveals expression characteristics of stress-related proteins during grain development. *Sci Agr Sin*, 50 (11): 2114–2128 (in Chinese with English abstract) [于涛, 李耕, 刘鹏等(2017). 蛋白质组学分析揭示玉米籽粒发育过程中胁迫相关蛋白的表达特性. *中国农业科学*, 50 (11): 2114–2128]
- Yuan M, Liang B, Liu S, et al (2016). Effect of Long-term application of chemical fertilizer on the quality of summer

- maize. *Adv J Food Sci Technol*, 11 (2): 117–122
- Zhang HZ, Xu HY (2011). Research progress on the enzymes during plant nitrogen assimilation. *North Hortic*, (20): 180–183 (in Chinese with English abstract) [张华珍, 徐恒玉(2011). 植物氮素同化过程中相关酶的研究进展. *北方园艺*, (20): 180–183]
- Zhang X, Huang G, Bian X, et al (2012). Effects of intercropping on quality and yield of maize grain, microorganism quantity, and enzyme activities in soils. *Acta Ecol Sin*, 32 (22): 7082–7090 (in Chinese with English abstract) [张向前, 黄国勤, 卞新民等(2012). 间作对玉米品质、产量及土壤微生物数量和酶活性的影响. *生态学报*, 32 (22): 7082–7090]
- Zhang ZM, Dai LX, Hu CH, et al (2005). Effects of nitrogen on protein, protein constituents and relevant enzymes activity of maize. *Plant Nutr Fert Sci*, 11 (3): 320–326 (in Chinese with English abstract) [张智猛, 戴良香, 胡昌浩等(2005). 氮素对不同类型玉米蛋白质及其组分和相关酶活性的影响. *植物营养与肥料学报*, 11 (3): 320–326]
- Zou YD, Shi LS, Liu GB, et al (2008). Structure and function of group 1 late embryogenesis abundant proteins. *Chin Bull Life Sci*, 20 (3): 489–494 (in Chinese with English abstract) [邹永东, 施丽沙, 刘国宝等(2008). 植物胚胎发育晚期丰富蛋白1组的结构与功能. *生命科学*, 20 (3): 489–494]

Comparative proteomic analysis of albumin in summer maize kernel under long-term located fertilization

WU Qian^{1,2,#}, XU Ying-Ying^{1,#}, LIU Shu-Tang¹, PEI Yu-He^{1,*}, SONG Xi-Yun^{1,*}

¹College of Agronomy, Qingdao Key Lab of Germplasm Innovation and Application of Major Crops, Qingdao Agricultural University, Qingdao, Shandong 266109, China

²Beijing Pingchuan Jiaheng Technology Co., Ltd., Jinan 250000, China

Abstract: The effects of high and low nitrogen fertilizers (276 and 138 kg·hm⁻² per year, respectively) on albumin of summer maize (*Zea mays*) kernel were studied using proteomic method based on a long-term fertilization trial for 33 years. The middle grains were obtained from a maize variety ‘Luyu 16’ at the mature period after artificial pollination. Then, differentially expressed proteins were analyzed and identified using protein two-dimensional gel electrophoresis and mass spectrometry. The results showed that the content of albumin in the low nitrogen group significantly decreased compared to the control. A total of 7 and 6 differentially expressed proteins were identified in low and high nitrogen group, respectively. Moreover, compared to the control, 6 and 5 proteins were down-regulated in low and high nitrogen group, respectively. The results of gene expression of different proteins were consistent with that of the two-dimensional electrophoresis. These identified proteins were subsequently classified into four categories according to their functions including protein and amino acid metabolism, energy metabolism, expression regulation and defense resistance as well as unknown function proteins.

Key words: long-term located fertilization; nitrogen fertilizer; summer maize; albumin; proteomic analysis

Received 2018-12-17 Accepted 2019-04-17

This work was supported by the Agriculture Improved Variety Project in Shandong Province (2017LZGC005), and the Maize Industry Innovation Team of Modern Agricultural Industry System in Shandong Province (SDAIT-02-01).

#Co-first authors.

*Co-corresponding authors: Pei YH (peiyuhe1980@163.com), Song XY (songxy@qau.edu.cn).