



研究报告 Article Report

棉花四大栽培种干旱胁迫下叶片蛋白质组分变化

张德超[✉], 阴祖军[✉], 王德龙[✉], 王俊娟[✉], 樊伟丽[✉], 王帅[✉], 孔静静[✉], 陆许可[✉], 叶武威[✉]

中国农业科学院棉花研究所, 棉花生物学国家重点实验室, 农业部棉花遗传改良重点开放实验室, 安阳, 455000

✉ 通讯作者: yewu158@163.com; ✉ 作者

分子植物育种, 2013 年, 第 11 卷, 第 15 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2013.11.0015

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放取阅论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式(中文):

张德超等, 2013, 棉花四大栽培种干旱胁迫下叶片蛋白质组分变化, 分子植物育种(online), 11(15): 1098-1105 (doi: 10.5376/mpb.cn.2013.11.0015)

引用格式(英文):

Zhang et al., 2013, The Effects of Drought Stress on Leaf Protein Components of the Four Cotton Cultivars, Fenzi Zhiwu Yuzhong (online) (Molecular Plant Breeding), 11(15): 1098-1105 (doi: 10.5376/mpb.cn.2013.11.0015)

摘要 全球气候日益变暖, 旱灾频繁发生, 干旱严重影响棉花生产。为了解棉花种质在干旱胁迫下叶片蛋白组分的变化, 选用棉花四大栽培种的抗旱和不抗旱材料 16 份, 以棉花三叶期真叶为样品, 优化棉花叶片蛋白组分提取方法, 测定正常浇水、短期干旱和长期干旱下叶片四种蛋白组分含量。结果表明: 棉花叶片各蛋白组分含量差异较大, 谷蛋白含量最高, 清蛋白、球蛋白和醇溶蛋白含量较低; 不同棉花栽培种叶片蛋白组分含量差异较大, 四倍体棉叶片总蛋白含量较高, 清蛋白和谷蛋白含量高于二倍体棉, 而二倍体棉叶片球蛋白和醇溶蛋白含量较高; 干旱胁迫下, 棉花叶片蛋白组分含量会发生相应变化, 不同栽培种、不同抗旱水平的品种蛋白组分的变化不同, 表现出蛋白质代谢的多样性。

关键词 棉花; 干旱胁迫; 清蛋白; 球蛋白; 醇溶蛋白; 谷蛋白

The Effects of Drought Stress on Leaf Protein Components of the Four Cotton Cultivars

Zhang Dechao[✉], Yin Zujun[✉], Wang Delong[✉], Wang Junjuan[✉], Fan Weili[✉], Wang Shuai[✉], Kong Jingjing[✉], Lu Xuke[✉], Ye Wuwei[✉]

State Key Laboratory of Cotton Biology, Institute of Cotton Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Key Laboratory for Cotton Genetic Improvement, Ministry of Agriculture, Anyang, 455000, P.R. China

✉ Corresponding author, yewu158@163.com; ✉ Authors

Abstract With the global warming, more and more frequent and serious drought stress has become one of the most leading elements limiting the cotton production. 16 cotton accessions with drought-tolerant and drought-sensitive *spp.* from the four cultivated species, were choosed to study the variations of protein components under drought stress. Of the tri-leaf stage of seedlings, the protein extracted method of cotton leaves was optimized, to determine four kinds of protein under the stress of the control, mild drought and heavy drought. The results indicated that there is a huge difference of protein level in different materials, Glutenin is the most, Albumin, Globin and Prolamin are relatively low; The content of protein component in leaves had a great difference in different cotton cultivars, the protein content in *G.hirsutum* and *G.barbadense* is relatively high, the content of Albumin and Globin is higher than Diploid cotton, but Globin and Prolamin in Diploid cotton is relatively high, the variation of protein contents in different cultivars, different drought resistance level changed greatly after drought stress, show the diversity of protein metabolism.

Keywords Cotton; Drought stress; Albumin; Globin; Prolamin; Glutenin

研究背景

近年来环境恶化, 全球气候变暖, 淡水资源缺

乏导致世界各地旱情频繁发生, 全球约有 43% 的耕地处于干旱和半干旱地区, 中国干旱和半干旱土地总面积为 $5.42 \times 10^{10} \text{ hm}^2$, 占全国总耕地面积的一半以上, 有些地区还遭受季节性干旱和难以预测的不定期干旱(李智念等, 2003)。干旱已成为世界农业生产面临的严峻挑战, 棉花是中国乃至全世界重要的

收稿日期: 2013 年 03 月 12 日

接受日期: 2013 年 05 月 08 日

发表日期: 2013 年 05 月 29 日

基金项目: 本研究由国家 973 重点基础研究发展计划(2010CB126006)资助



经济作物，其种植面积居经济作物之首(宋贵方等, 2011)。干旱严重影响棉花生长发育和产量，每年因旱灾减产的棉花占总量的 30%以上，旱灾面积达 $6.70 \times 10^6 \text{ hm}^2$ ，特别是在棉花的主产区新疆，干旱是限制棉花产量的主要因素(张玲等, 2008)。目前，研究者在生理、生化以及转录水平针对植物的抗旱调控机制开展研究，随着功能基因组学的深入，许多抗旱相关的基因也被克隆并进行了功能分析。蛋白质是生命活动的执行者，人们对植物蛋白质组学研究的日益重视，但是对于植物在干旱胁迫下的蛋白质组分研究还相对较少。李妮亚等(1998)研究发现干旱引起小麦幼芽蛋白质组分及含量变化，主要集中在分子量为 20~48 kD、等电点 5.34~5.65 的蛋白。陈明涛等(2010)研究发现刺槐根尖可溶性蛋白含量在短期中度干旱和长期重度干旱下显著减少，而在中长期中度干旱和短期重度干旱下显著增加；侧柏根尖可溶性蛋白含量在短期中度干旱和重度干旱下显著增加，长期中度干旱和中期重度干旱下减少；随着胁迫程度加重和处理时间的延长，油松根尖可溶性蛋白含量总体增加，而沙棘则减少。Salekdeh 等(2002)研究了两个水稻品种在干旱胁迫以及复水后的蛋白质组分变化，得到 1 000 多个蛋白点，结果发现有 42 个蛋白点的丰富度在干旱胁迫下发生明显变化。蛋白质按在不同溶剂中的溶解性进行系统分类并命名，即清蛋白(溶于水)、球蛋白(溶于稀盐)、醇溶蛋白(溶于乙醇)和谷蛋白(溶于稀酸或稀碱)(Bean et al., 1998)。不同品种蚕豆子的贮藏蛋白组分具有一定的差异，表现出一定的多态性；干旱能促进小麦清蛋白和球蛋白含量在灌浆初期的积累，但至灌浆末期蛋白含量降低(石建斌等, 2012; 许振柱等, 2003)。徐燕(2007)研究 4 种植物高温胁迫下叶片蛋白组分变化，发现清蛋白含量升

高，而醇溶蛋白含量升高更显著。然而有关干旱胁迫下棉花叶片蛋白质组分含量的变化少见报道。

棉花在分类上属于双子叶植物(*Dicotyledons*)、锦葵科(*Malvaceae*)、棉属(*Gossypium*)，是一种重要的天然纤维植物，棉属有四大栽培种，其中亚洲棉(*G.arboreum*)和草棉(*G.herbaceum*)为异源二倍体棉种，陆地棉(*G.hirsutum*)和海岛棉(*G.barbadense*)为四倍体棉种(潘家驹, 1998, 中国农业出版社, pp.1-11)。陆地棉高产、优质，海岛棉纤维性状优良，草棉极早熟，亚洲棉抗逆性好，棉属四大栽培种是棉花遗传育种的最重要种质资源。本试验以棉花三叶期真叶为样品，优化了棉花叶片蛋白组分提取方法，测定了棉花四大栽培种 16 份材料叶片蛋白组分含量，分析发现棉花叶片蛋白组分含量差异显著，干旱胁迫下棉花叶片蛋白组分含量会发生相应变化，不同栽培种、不同抗旱水平的品种蛋白组分的变化不同。本研究旨在从蛋白组分的角度探讨棉花种质的遗传多样性，揭示干旱胁迫下各组分蛋白含量变化与抗旱性的关系。

1 结果与分析

1.1 棉花四个栽培种叶片蛋白组分含量比较分析

利用优化的蛋白组分提取方法对棉花四个栽培种叶片中的四种蛋白组分分别提取，并进行比较(表 1)，分析表明：棉花四个栽培种叶片总蛋白含量无显著差异，而同一栽培种中的各蛋白组分含量存在显著差异。其中，谷蛋白在四种蛋白组分中含量最高，含量均大于 24 mg/g；清蛋白、醇溶蛋白和球蛋白含量较低，含量均小于 7 mg/g。同一蛋白组分在不同栽培种中的含量存在显著差异。清蛋白和谷蛋白在四倍体棉花(陆地棉和海岛棉)中的含量显

表 1 正常浇水棉花叶片组分蛋白含量(mg/g)多重比较

Table 1 Multi-comparison results of protein composition content (mg/g) of variety factors

栽培种 Cultivar	清蛋白 Albumin	球蛋白 Globin	醇溶蛋白 Prolamin	谷蛋白 Glutenin	合计 Summation
陆地棉 <i>G.hirsutum</i>	4.43a	2.81b	4.84b	30.54a	42.62a
海岛棉 <i>G.barbadense</i>	5.02a	2.80b	5.75a	31.72a	45.30a
亚洲棉 <i>G.arboreum</i>	2.36b	6.51a	5.81a	25.73b	40.45a
草棉 <i>G.herbaceum</i>	1.67c	5.29a	6.28a	24.35b	37.51a

注：各组数值不同小写字母表示组间差异达 0.05 显著水平

Note: Different letters after constant value indicate significant difference among cultivar types at $P < 0.05$

著高于二倍体棉花(亚洲棉和草棉), 而球蛋白呈现相反的趋势, 在四倍体棉花(陆地棉和海岛棉)中的含量显著低于二倍体棉花(亚洲棉和草棉)。球蛋白在亚洲棉叶片中含量最高, 达到 6.51 mg/g, 醇溶蛋白在陆地棉叶片中含量最低, 含量为 4.84 mg/g。

1.2 陆地棉干旱胁迫下蛋白组分含量变化分析

由图 1 看出干旱胁迫下, 陆地棉抗旱品种中清蛋白和球蛋白的含量显著升高, 随着干旱程度的增加, 清蛋白呈现出先升高再降低的趋势, 球蛋白的含量一直升高, 醇溶蛋白含量先降低再升高, 而谷蛋白含量持续降低。在陆地棉不抗旱品种中, 清蛋白、醇溶蛋白和谷蛋白含量的变化趋势与抗旱材料基本一致, 而球蛋白含量先升高在降低。干旱胁迫后, 抗旱品种清蛋白和球蛋白的含量显著高于不抗旱品种, 而醇溶蛋白和谷蛋白的含量差异不显著。

1.3 海岛棉干旱胁迫下蛋白组分含量变化分析

由图 2 看出干旱胁迫下海岛棉抗旱品种海 7124

清蛋白和球蛋白含量一直升高, 醇溶蛋白含量先降低再升高, 和陆地棉抗旱品种叶片蛋白组分变化大体一致, 而谷蛋白含量先稍微升高再降低; 海岛棉不抗旱品种清蛋白、球蛋白含量先升高再降低, 醇溶蛋白和谷蛋白含量一直降低, 并且长期干旱胁迫后叶片醇溶蛋白和谷蛋白含量明显低于对照。

1.4 亚洲棉和草棉干旱胁迫下蛋白组分含量变化分析

由图 3 看出干旱胁迫下亚洲棉抗旱材料中清蛋白含量一直升高, 与海岛棉变化趋势一致, 但是长期干旱胁迫后清蛋白含量较对照显著升高; 球蛋白和谷蛋白含量变化不显著; 辽宁中棉醇溶蛋白含量一直降低, 石系亚 1 号醇溶蛋白含量先升高后降低, 二者在长期干旱胁迫后醇溶蛋白含量显著低于对照。亚洲棉不抗旱材料凤阳中棉清蛋白先升高再降低, 球蛋白和醇溶蛋白含量一直降低, 其变化趋势和非洲棉不抗旱材料一致。亚洲棉不抗旱材料凤阳中棉谷蛋白含量一直降低, 而非洲棉谷蛋白含量先轻微升高再降低。

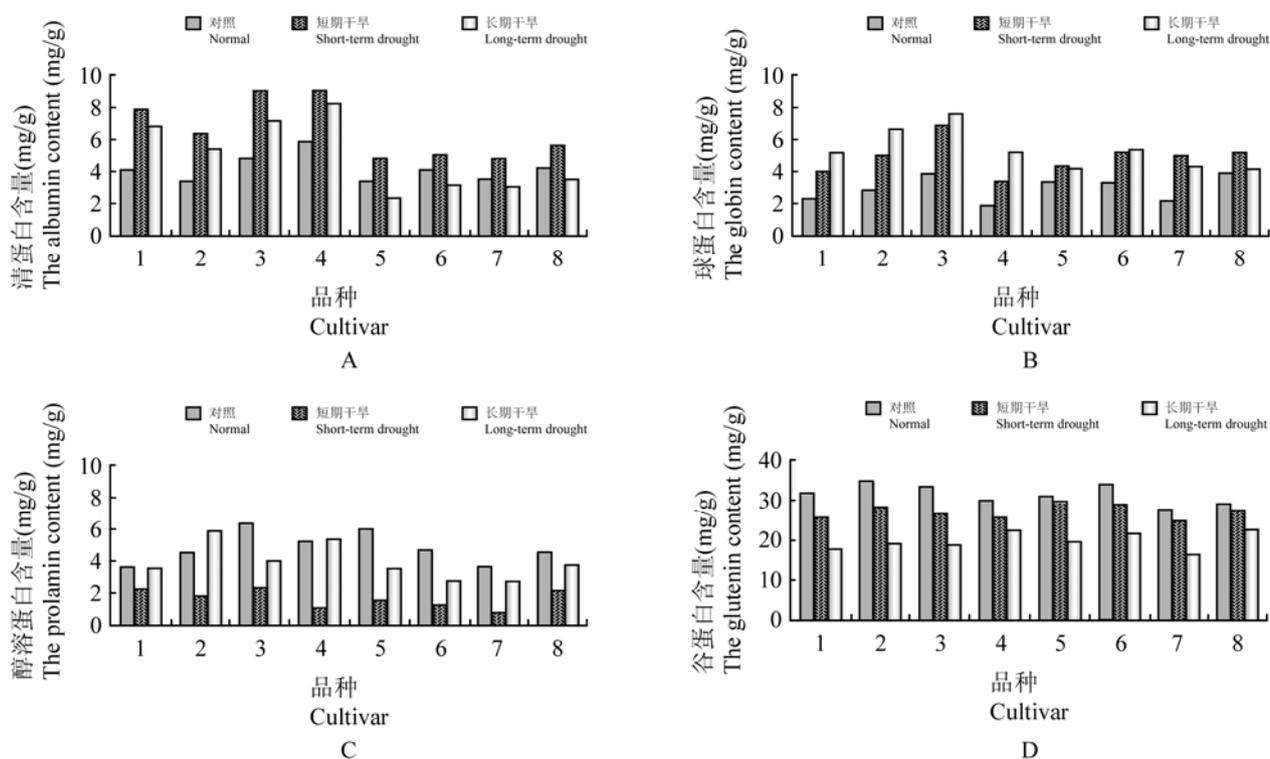


图 1 不同陆地棉品种干旱胁迫下蛋白组分含量变化

注: A,B,C,D: 1: 中 H177; 2: 中 9806; 3: 冀 668; 4: GK50; 5: 中 s9612; 6: 中棉所 35; 7: 冀 1286; 8: 邯 242

Figure 1 The protein component content of different *G. hirsutum* varieties under drought stress

Note: A,B,C,D: 1: Zhong H177; 2: Zhong9806; 3: Ji668; 4: GK50; 5: Zhong s9612; 6: Zhongmiansuo35; 7: Ji1286; 8: Han242

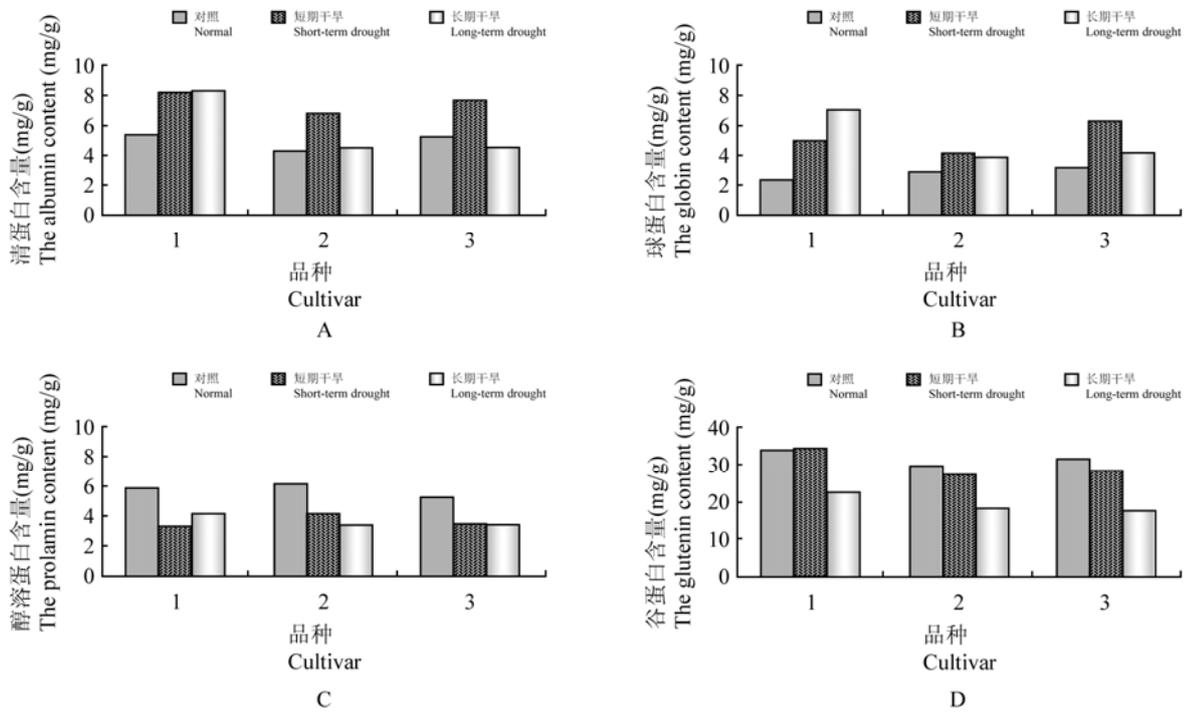


图2 不同海岛棉品种干旱胁迫下蛋白组分含量变化

注: A,B,C,D: 1: 海 7124; 2: 海 1; 3: 比马 1号

Figure 2 The protein component content of different *G. barbadense* varieties under drought stress

Note: A,B,C,D: 1: Hai7124; 2: Hai1; 3: Bimal1

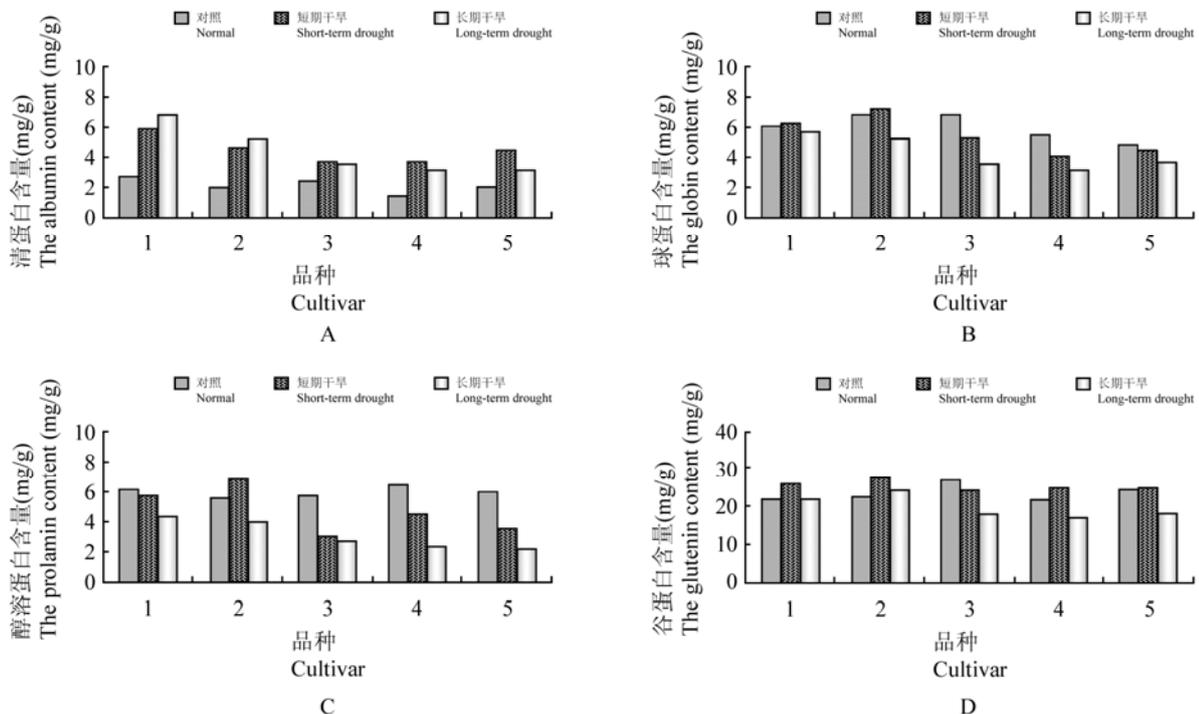


图3 不同亚洲棉和草棉品种干旱胁迫下蛋白组分含量变化

注: A,B,C,D: 1: 辽宁中棉; 2: 石系亚 1 号; 3: 凤阳中棉; 4: 高台草棉; 5: 褐籽草棉

Figure 3 The protein component content of different *G. arboreum* and *G. barbadense* varieties under drought stress

Note: A,B,C,D: 1: Liaoning Zhongmian; 2: Shixiya1; 3: Fengyang Zhongmian; 4: Gaotai Caomian; 5: Hezi Caomian

2 讨论

干旱胁迫下植物产生一系列的形态、生理生化及生物物理等方面的变化,以维持正常的生命活动。干旱对植物生理过程的影响是通过蛋白的合成与降解调控作用来实现的,干旱胁迫引起蛋白组分相互转化,而蛋白组分变化跟细胞的生理生化有关,如氨基酸的合成、激酶的活性、光合作用、能量代谢、活性氧的清除、核酸和蛋白质的合成。任东涛和赵松岭(1997)在研究小麦干旱胁迫蛋白中发现,干旱胁迫蛋白变化不仅于量的增加,生物体中调节蛋白组分间相对含量的变化对于抗旱具有更大的意义。蛋白组分的变化可以反映细胞内蛋白质合成、变性及降解等多方面的信息,不同栽培种、不同抗旱水平的品种,蛋白组分的变化不同,表现出蛋白质代谢的多样性。

棉花四大栽培种短期干旱胁迫后叶片中清蛋白含量均升高,参与代谢活动的酶类主要以清蛋白形式存在,清蛋白表达量升高用以维持正常的新陈代谢(康俊梅等,2005),长期干旱胁迫后叶片清蛋白表达量又有所降低,这是因为干旱胁迫加重,叶片出现萎蔫,光合作用减弱,清蛋白的合成减少。抗旱品种清蛋白代谢比较稳定,其清蛋白含量降低的程度都比不抗旱品种小,清蛋白含量仍维持较高水平,其中抗旱性较强的亚洲棉在干旱胁迫后,清蛋白含量一直升高,长期干旱胁迫后,叶片清蛋白含量较对照升高2倍以上。实验结果表明,棉花的抗旱性可能与清蛋白的合成密切相关,干旱胁迫下棉花叶片通过增加清蛋白的合成来参与抗旱性调节,干旱胁迫后清蛋白含量高的品种抗旱性亦强。因此,清蛋白含量变化可以做为棉花抗旱性筛选的指标,为棉花种质抗旱性鉴定、筛选提供理论依据和参考指标。

陆地棉和海岛棉干旱胁迫后叶片球蛋白含量一直升高,且抗旱品种叶片球蛋白含量高于不抗旱品种,干旱胁迫下蛋白水解酶活性增强,导致大量蛋白质降解,降解产生的蛋白质多为球蛋白。Hanson等(1979)认为球蛋白累积只是植株在缺水时的一种损伤表现,球蛋白作为重要的一类蛋白质,一部分维持细胞渗透压,使其在干旱时仍能吸收水分,保证光合等生理过程的正常进行,另一部分参与干旱胁迫蛋白的合成,减轻干旱胁迫对细胞造成的伤害。亚洲棉和非洲棉叶片球蛋白含量较高,短期干旱胁迫后叶片球蛋白含量变化不明显,长期干

旱胁迫后其球蛋白含量降低。二倍体棉和四倍体棉干旱胁迫下叶片球蛋白含量变化不一致,可能是基因组的差异,导致球蛋白代谢途径不同。

陆地棉和海岛棉短期干旱胁迫后醇溶蛋白含量降低,由于醇溶蛋白主要是一些膜蛋白,受干旱影响膜蛋白合成减少,但在长期干旱条件下,植物细胞许多生理过程的不能正常进行,光合作用在一定程度上受到抑制,叶绿体膨胀,排列紊乱,基质片层模糊,基粒间连接松弛,类囊体层肿胀或解体,细胞诸多结构破坏,膜结合蛋白游离出来转化为简单蛋白,醇溶蛋白含量增加。干旱胁迫下醇溶蛋白含量先降低在升高的结果与棉花下胚轴膜蛋白活性在干旱胁迫时呈“V”字型变化(薛刚和高俊凤,1994)相一致。而亚洲棉和非洲棉叶片醇溶蛋白含量一直降低,可能是由于二倍体棉抗旱性较好,细胞结构稳定,长期干旱胁迫下,醇溶蛋白合成减少,但细胞结构为破坏,故醇溶蛋白含量一直降低。

干旱胁迫下,棉花叶片谷蛋白含量降低,不抗旱品种较抗旱品种在干旱条件下谷蛋白含量降低更显著。这是由于干旱胁迫下谷蛋白降解或重新折叠,转化为他类型的蛋白,维持其他代谢所需的能量和碳架,以抵抗干旱造成的伤害,使细胞内正常的新陈代谢得以维持,使植物体内的生理生化反应正常进行(李德全等,1992)。四大栽培种中亚洲棉干旱胁迫下谷蛋白降解最少,亚洲棉抗旱性最好,是棉花抗旱性选育的重要种质资源。

本研究表明棉花叶片各蛋白组分含量差异较大,谷蛋白含量最高,清蛋白、球蛋白和醇溶蛋白含量较低;不同棉花栽培种叶片蛋白组分含量差异较大,四倍体棉叶片总蛋白含量较高,清蛋白和谷蛋白含量高于二倍体棉,而二倍体棉叶片球蛋白和醇溶蛋白含量较高;干旱胁迫后不同栽培种不同抗旱水平的品种蛋白组分含量也有较大差异,这种差异可能是蛋白质代谢途径的差异引起的。短期干旱处理时叶片蛋白质含量的差异,主要是清蛋白、球蛋白和醇溶蛋白含量的变化造成的,长期干旱处理时叶片蛋白质含量的差异,主要是谷蛋白含量的变化造成的。本研究首次从蛋白组分方面研究棉花抗旱性,干旱胁迫下棉花叶片蛋白组分含量会发生相应变化,不同栽培种叶片蛋白组分变化差异显著,表明不同棉花栽培种存在遗传多样性。其中抗旱性强的品种是棉花抗旱性选育的重要种质资源,清蛋白含量变化可以做为棉花抗旱性筛选的指标。不同基



因型及抗旱水平棉花蛋白组分变化,从一定程度上揭示了棉花抗旱性形成的内在基础。

3 材料与amp;方法

3.1 实验材料

选取本实验室多年抗旱鉴定的 16 份材料,其中 8 份陆地棉、3 份海岛棉、3 份亚洲棉和 2 份草棉,其中亚洲棉和草棉由国家棉花种质中期库提供,供试材料见表 2。

表 2 供试棉花品种编号

Table 2 Cotton varieties Numbers for test

序号 NO.	名称 Name	栽培种 Cultivar	抗旱性 Drought resistance
1	中 H177 Zhong H177	陆地棉 <i>G.hirsutum</i>	抗 Resistant
2	中 9806 Zhong 9806	陆地棉 <i>G.hirsutum</i>	抗 Resistant
3	冀 668 Ji668	陆地棉 <i>G.hirsutum</i>	抗 Resistant
4	GK50	陆地棉 <i>G.hirsutum</i>	抗 Resistant
5	中 S9612 Zhong S9612	陆地棉 <i>G.hirsutum</i>	不抗 Sensitive
6	中棉所 35 Zhong 35	陆地棉 <i>G.hirsutum</i>	不抗 Sensitive
7	冀 1286 Ji 1286	陆地棉 <i>G.hirsutum</i>	不抗 Sensitive
8	邯 242 Han 242	陆地棉 <i>G.hirsutum</i>	不抗 Sensitive
9	海 7124 Hai 7124	海岛棉 <i>G.barbadense</i>	抗 Resistant
10	海 1 Hai 1	海岛棉 <i>G.barbadense</i>	不抗 Sensitive
11	比马 1 号 Bima 1	海岛棉 <i>G.barbadense</i>	不抗 Sensitive
12	辽宁中棉 Liaoning Zhongmian	亚洲棉 <i>Garboreum</i>	抗 Resistant
13	石系亚 1 号 Shixiya 1	亚洲棉 <i>Garboreum</i>	抗 Resistant
14	凤阳中棉 Fengyang Zhongmian	亚洲棉 <i>Garboreum</i>	不抗 Sensitive
15	高台草棉 Gaotai Caomian	草棉 <i>G.herbaceum</i>	不抗 Sensitive
16	褐籽草棉 Hezi Caomian	草棉 <i>G.herbaceum</i>	不抗 Sensitive

3.2 材料处理

选择饱满均匀一致的种子,室温泡种 24 h,种于沙与蛭石 1:1 混匀的的塑料盆中,在光照培养箱(光照 14 h, 32℃; 黑暗 10 h, 25℃)中生长 30 d 左右至三叶期。参考 Sengupta 等(2011)对照组正常浇水,处理组停止浇水进行干旱胁迫,在短期干旱(土壤含水量约 6%)、长期干旱(土壤含水量约 3%)时分别取棉花真片,液氮冷冻后存于-80℃冰箱备用。

3.3 蛋白组分提取与测定方法

3.3.1 蛋白组分提取

棉花叶片液氮研磨样品均匀, 加入 4 倍体积 10% TCA-丙酮溶液, 于 -20°C 放置 2 h (推荐过夜), 4°C 、15 000 g, 离心 30 min, 弃上清; 沉淀用 4 倍体积于样品的 -20°C 预冷丙酮溶液, 重新悬浮, 于 -20°C 放置 1 h 以上, 15 000 g 离心 30 min; 重复上一步如此至上清清亮, 弃上清, 沉淀用真空干燥机抽干, 制备的粗蛋白干粉依次加入 ddH_2O 、0.5 mol/L NaCl 溶液、75%乙醇、0.01 mol/L NaOH 溶液提取四种组分蛋白(王雪等, 2007; 胡新中等, 2005)。

3.3.2 组分蛋白含量测定

使用 GE 2D-Quant 试剂盒进行样品处理, 酶标仪测定 A480 吸光值, 标准曲线见图 4, 计算蛋白浓度。

3.3.3 蛋白组分提取条件的优化

以中 H177 叶片清蛋白为例进行提取条件的优化, 其中提取液体积/粗蛋白干粉和震荡时间对蛋白组分提取影响较大。设置提取液/粗蛋白干粉 30 $\mu\text{L}/\text{mg}$ 、40 $\mu\text{L}/\text{mg}$ 、50 $\mu\text{L}/\text{mg}$ 、70 $\mu\text{L}/\text{mg}$ 四个梯度, 设置震荡时间 5 min、15 min、30 min、45 min 四个梯度, 测定不同提取条件下蛋白浓度。从表 3 可以看出, 提取次数对蛋白质提取量影响很大, 第一次蛋白质提取量最大, 第三蛋白质提

取量已不足总量的 10%, 重复一次蛋白质即可基本提取完全。加入提取液的量对提取的蛋白质浓度影响较大, 按 30 $\mu\text{L}/\text{mg}$ 和 40 $\mu\text{L}/\text{m}$ 加入提取液, 出样品不能充分溶解, 首次提取的蛋白质浓度较低, 仅占总蛋白的一半左右; 而按 70 $\mu\text{L}/\text{mg}$ 加入提取液, 加入了过多的提取液, 导致得到的蛋白质浓度较低, 不利于蛋白质浓度测定; 按 50 $\mu\text{L}/\text{mg}$ 加入提取液, 粗样品即能充分溶解得到蛋白质浓度又高, 因此, 按干粉/提取液 50 $\mu\text{L}/\text{mg}$ 加入提取液较合适。震荡时间对蛋白质提取量也有影响: 震荡 5 min 时, 蛋白质提取不完全; 震荡时间超过 30 min, 蛋白浓度反而降低, 可能是震荡时间过长造成蛋白降解; 震荡 15 min 时, 提取的蛋白溶度最高, 较为合适。

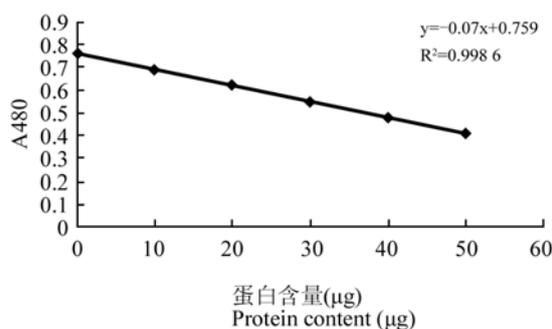


图 4 蛋白浓度标准曲线

Figure 4 The standard line of proteins concentration

表 3 不同提取条件下清蛋白浓度($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)

Table 3 Albumin concentration under different extraction conditions ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$)

提取次数 Times	A	B	C	D	E	F	G	H
1	1.24	1.45	2.12	1.47	1.87	2.06	1.55	1.46
2	1.46	0.90	0.62	0.53	0.61	0.67	0.69	0.59
3	0.53	0.46	0.35	0.31	0.38	0.32	0.41	0.36
平均值 AVG	1.08	0.94	1.03	0.77	0.95	1.02	0.88	0.83

注: A,B,C,D: 分别按 30 $\mu\text{L}/\text{mg}$ 、40 $\mu\text{L}/\text{mg}$ 、50 $\mu\text{L}/\text{mg}$ 、70 $\mu\text{L}/\text{mg}$ 加入提取液, 振荡 10 min; E,F,G,H: 分别按 50 $\mu\text{L}/\text{mg}$ 加入提取液, 振荡 5 min, 15 min, 30 min, 45 min

Note: A,B,C,D: Separately according to 30 $\mu\text{L}/\text{mg}$ 、40 $\mu\text{L}/\text{mg}$ 、50 $\mu\text{L}/\text{mg}$ and 70 $\mu\text{L}/\text{mg}$ join extract, shock 10 min; E,F,G,H: Separately according to 50 $\mu\text{L}/\text{mg}$ join extract, shock 5 min, 15 min, 30 min and 45 min

作者贡献

张德超是本研究的执行人, 完成数据分析, 论文初稿的写作; 樊保香、王帅主要负责实验材料的种植、王德龙、王俊娟负责实验材料处理和取样; 陆许可、孔静静参与材料材料的蛋白提取、浓度测定、试验结果分析工作; 叶武威是本实验的构思者及负责人, 指导实验设计, 结果分析, 论文写

作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家 973 重点基础研究发展计划 (2010CB126006) 资助。作者感谢棉花生物学重点实验室马丽华老师的技术支持与指导, 感谢中棉所植保室路猷永、李兆群在本实验过程中的帮助。



参考文献

- Bean S.R., Lyne R.K., Tilley K.A., Chung O.K., and Lookhart G.L., 1998, A rapid method for quantitation of insoluble polymeric proteins in flour, *Cereal Chemistry*, 75(3): 374-379
<http://dx.doi.org/10.1094/CCHEM.1998.75.3.374>
- Cheng M.T., Zhao Z., and Quan J.E., 2010, Variation of soluble protein components and contents in seedling root tips of four trees under drought stress, *Xibei Zhiwu Xuebao (Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica)*, 30(6): 1157-1165 (陈明涛, 赵忠, 权金娥, 2010, 干旱对 4 种苗木根尖可溶性蛋白组分和含量的影响, *西北植物学报*, 30(6): 1157-1165)
- Hanson A.D., Nelsen C.E., Pedersen A.R., and Everson E.H., 1979, Capacity for proline accumulation during water stress in barley and its implications for breeding for drought resistance, *Crop Science*, 19(4): 489-493
<http://dx.doi.org/10.2135/cropsci1979.0011183X001900040015x>
- Hu X.Z., Zheng Z.M., Wei Y.M., Zhang G.Q., Zhang S.Q., and Wei Q., 2005, A study of protein component methods analysis, *Zhongguo Liangyou Xuebao (Journal of the Chinese Cereals and Oils Association)*, 20(4): 12-16 (胡新中, 郑建梅, 魏益民, 张国权, 张胜强, 魏强, 2005, 蛋白质组分分析方法比较研究, *中国粮油学报*, 20(4): 12-16)
- Kang J.M., Yang Q.C., and Fan F.Z., 2005, Effects of drought stress on induced protein in the different drought resistance alfalfa leaf, *Caodi Xuebao (Acta Agrestia Sinica)*, 13(3): 199-202 (康俊梅, 杨青川, 樊奋成, 2005, 干旱对苜蓿叶片可溶性蛋白的影响, *草地学报*, 13(3): 199-202)
- Li D.Q., Zou Q., and Cheng B.G., 1992, Different drought-resistant wheat varieties under drought conditions osmoregulation and osmotic adjustment substance, *Zhiwu Shengli Xuebao (Acta Phytophysiologica Sinica)*, 18(1): 37-44 (李德全, 邹琦, 程炳嵩, 1992, 土壤干旱下不同抗旱性小麦品种的渗透调节和渗透调节物质, *植物生理学报*, 18(1): 37-44)
- Li N.Y., Gao J.F., and Wang P.H., 1998, The effects of drought stress on wheat germ protein characteristics, *Zhiwu Shengli Xuebao (Acta Phytophysiologica Sinica)*, 24(1): 65-71 (李妮亚, 高俊凤, 汪沛洪, 1998, 小麦幼芽水分胁迫诱导蛋白的特征, *植物生理学报*, 24(1): 65-71)
- Li Z.N., Wang G.M., and Zheng Z.W., 2003, Research on ABA in plants under drought stress, *Ganhan Diqu Nongye Yanjiu (Agricultural Research in the Arid Areas)*, 21(2): 99-104 (李智念, 王光明, 曾之文, 2003, 植物干旱胁迫中的 ABA 研究, *干旱地区农业研究*, 21(2): 99-104)
- Ren D.T., and Zhao S.L., 1997, The influence of water stress the spring wheat flag leaf protein metabolism in half arid areas, *Zuowu Xuebao (Acta Agronomica Sinica)*, 23(4): 468-473 (任东涛, 赵松岭, 1997, 水分胁迫对半干旱区春小麦旗叶蛋白质代谢的影响, *作物学报*, 23(4): 468-473)
- Salekdeh G.H., Siopongco J., Wade L.J., Ghareyazie B., and Bennett J., 2002, Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery, *Proteomics*, 2(9): 1131-1145
[http://dx.doi.org/10.1002/1615-9861\(200209\)2:9<1131::AID-PROT1131>3.0.CO;2-1](http://dx.doi.org/10.1002/1615-9861(200209)2:9<1131::AID-PROT1131>3.0.CO;2-1)
- Sengupta D., Kannan M., and Reddy A.R., 2011, A root proteomics-based insight reveals dynamic regulation of root proteins under progressive drought stress and recovery in *Vigna radiata* L. Wilczek, *Planta*, 233(6): 1111-1127
<http://dx.doi.org/10.1007/s00425-011-1365-4>
PMid:21298284
- Shi J.B., Hou W.W., and Liu Y.J., 2012, Comparative study on seed storage protein of faba bean, *Zhiwu Yichuan Ziyuan Xuebao (Journal of Plant Genetic Resources)*, 13(2): 304-307 (石建斌, 侯万伟, 刘玉皎, 2012, 蚕豆种子贮藏蛋白质组分的比较研究, *植物遗传资源学报*, 13(2): 304-307)
- Wang X., Ma J., Zhang G.Y., Li X.H., Wang X.F., and Ma Z.Y., 2007, Proteomic analysis of cotton leaf under verticillium dahliae stress, *Mianhua Xuebao (Cotton Science)*, 19(4): 273-2781 (王雪, 马骏, 张桂寅, 李喜焕, 王省芬, 马峙英, 2007, 黄萎病菌胁迫条件下棉花叶片的蛋白质组分析, *棉花学报*, 19(4): 273-2781)
- Xu Y., 2005, Effects of elevated atmospheric CO₂ concentration and temperature on soluble protein content and allocation of *Betula albo-inensis* seedlings, Thesis for M.S, The Chinese Academy of Science, Supervisor: Wang K.Y., pp.32-47 (徐燕, 2007, CO₂ 浓度和温度升高对红桦可溶性蛋白含量和分配的影响, 硕士学位论文, 中国科学院研究生院, 导师: 王开运, pp.32-47)
- Xu Z.Z., Yu Z.W., Wang D., and Zhang Y.L., 2003, Effect of irrigation conditions on protein composition accumulation of grain and its quality in winter wheat, *Zuowu Xuebao (Acta Agronomica Sinica)*, 29(5): 682-687 (许振柱, 于振文, 王东, 张永丽, 2003, 灌溉条件对小麦籽粒蛋白质组分积累及其品质的影响, *作物学报*, 29(5): 682-687)
- Xue G., and Gao J.F., 1994, Effects of osmotic stress on fatty acid composition and ATPase activity plasma membrane in cotton root and hypocotyl, *Xibei Zhiwu Xuebao (Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica)*, 14(1): 39-44 (薛刚, 高俊凤, 1994, 渗透胁迫对棉花根和下胚轴 PM 脂肪酸组分和 ATPase 的影响, *西北植物学报*, 14(1): 39-44)
- Zhang L., Li F.G., Liu C.L., Zhang C.J., and Wu Z.X., 2008, Research Progress on Drought-tolerant gene of cotton, *Anhui Nongye Kexue (Journal of Anhui Agricultural Sciences)*, 36(5): 1781-1782, 1813 (张玲, 李付广, 刘传亮, 张朝军, 武芝霞, 2008, 棉花耐旱相关基因研究进展, *安徽农业科学*, 36(5): 1781-1782, 1813)