

# 玉米胚发育过程蛋白组分析

朱俊杰, 张鑫悦, 纪坤, 潘梦影, 徐秋月, 石慧玥, 张龙, 李玉玲, 董永彬

(河南农业大学农学院/河南省玉米产业融合工程技术研究中心, 郑州 450046)

**摘要:** 高油玉米是一种籽粒含油量比普通玉米高50%以上的玉米类型,其籽粒中油分含量85%集中于胚中。本研究以高油玉米自交系GY220为材料,对授粉后15 d(G15)、25 d(G25)、35 d(G35)的胚蛋白质组进行双向凝胶电泳分离,利用串联质谱对分离蛋白质进行鉴定,并分析了差异蛋白功能。结果表明在授粉后3个发育时期共鉴定到41个差异表达蛋白,其中授粉后25 d相对于15 d G25/G15上调18个,下调19个;授粉后35 d相对于25 d G35/G25上调18个,下调25个;授粉后35 d相对于15 d G35/G15上调20个,下调22个。通过GO注释分析和KEGG富集分析显示差异表达蛋白主要在小分子代谢、氧化还原和碳水化合物代谢等过程富集。根据差异蛋白表达丰度及其功能注释,甘油-3-磷酸脱氢酶(Zm00001d041962)和果糖激酶(Zm00001d035037)在15 d、25 d时蛋白表达量较高,在35 d时蛋白表达量较低;RT-PCR分析表明在自交系GY220胚发育过程中Zm00001d041962和Zm00001d035037表达量呈逐渐增加趋势,两个基因均与大豆、花生、油菜中的相关基因高度同源。本研究为进一步提升玉米籽粒品质和挖掘胚发育功能基因奠定基础。

**关键词:** 高油玉米;胚;差异表达蛋白;蛋白组学;荧光定量PCR

## Proteome Analysis of Embryo Development in Maize

ZHU Junjie, ZHANG Xinyue, JI Kun, PAN Mengying, XU Qiuyue,

SHI Huiyue, ZHANG Long, LI Yuling, DONG Yongbin

(College of Agronomy, Henan Agricultural University/Maize Industry Integration Engineering

Technology Research Center of Henan Province, Zhengzhou 450046)

**Abstract:** High-oil maize is those having more than 50% oil content compared with normal maize, and the oil content in embryo accounts for 85% out of the oil in kernel. In order to analyze the development of kernel, embryonic proteome at 15 d (G15), 25 d (G25) and 35 d (G35) after pollination of high-oil maize inbred line GY220 was isolated by two-dimensional electrophoresis technology, and the isolated proteins were identified by tandem mass spectrometry, followed by analyzing the functions of differentially expressed proteins (DEPs). As a result, a total of 41 DEPs were identified in three developmental stages. There are 18 up-regulated DEPs in the comparison of G25 with G15, but the down-regulated DEPs was 19. There are 18 up-regulated DEPs in the comparison of G35 with G15, but the down-regulated DEPs was 25. There are 20 up-regulated DEPs in the comparison of G35 with G15, but the down-regulated DEPs was 22. To reveal the functions of the 41 DEPs, GO annotation analysis and KEGG enrichment analysis was performed. The results showed that DEPs were significantly enriched in small molecule metabolism, REDOX and carbohydrate metabolism. Based on the differential protein expression abundance and functional annotation, Zm00001d041962 encoding a glycerol-3-phosphate dehydrogenase and Zm00001d035037 encoding a fructokinase were highly abundant at the stages of

收稿日期: 2023-05-22 修回日期: 2023-06-21 网络出版日期: 2023-08-02

URL: <https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230522002>

第一作者研究方向为玉米遗传育种研究, E-mail: 1439526249@qq.com

通信作者: 董永彬, 研究方向为玉米遗传育种研究, E-mail: dyb0816@163.com

**基金项目:** 河南省重大科技专项项目(201300111100); 河南省自然科学基金项目(212300410356); 河南省玉米产业技术体系(HARS-22-02-S); 河南省农业良种联合攻关项目(2022010201)

**Foundation projects:** Science and Technology Major Project of Henan Province (201300111100); Natural Science Foundation of Henan Province (212300410356); Technical System of Maize Industry of Henan Province (HARS-22-02-S); Joint Research Project of Agricultural Seed of Henan Province (2022010201)

15 d and 25 d, but sharply decreased at the stage of 35 d. Real-time PCR found that the expression of these two genes were accumulated with the embryonic development of GY220, and their orthologs in soybean, peanut and rape shared highly similarity in protein sequences. This study laid a foundation for further improving grain quality and mining functional genes of embryonic development in maize.

**Key words:** high-oil maize; embryo; differential expression protein; proteome; real-time PCR

胚是种子中重要的组成部分,是植物的幼体。胚的差异会导致同一植物的活力、生长势等性状特征表现出显著的差别<sup>[1]</sup>。高油玉米是一种籽粒含油量6%以上的高附加值玉米类型,富含人体健康所需的油酸、亚油酸和不饱和脂肪酸、维生素A等物质,对人体健康具有重要意义<sup>[2-4]</sup>。在高油玉米中,籽粒中油分含量85%集中在胚内,高油玉米的胚远大于普通玉米。

玉米基因组测序的完成使其研究进入功能基因组时代,为挖掘影响玉米籽粒发育的功能基因奠定了基础<sup>[5]</sup>。蛋白质组是指由一个细胞或一个组织的基因组所表达的全部蛋白质。早在1994年由March和Wilkins提出蛋白质组学(Proteome),并应用于蛋白质研究中<sup>[6-7]</sup>。目前蛋白质组学主要通过聚丙烯酰胺凝胶双向电泳技术<sup>[8]</sup>、质谱分析<sup>[9]</sup>等方法,对蛋白质的表达情况进行鉴定和功能分析。近年来,随着蛋白质组研究技术的发展,蛋白质组学广泛应用于作物蛋白质组研究<sup>[10]</sup>。Lin等<sup>[11]</sup>在水稻种子发育过程中发现54个具有已知功能的蛋白质,其中21个蛋白与碳水化合物代谢相关,14个蛋白与蛋白质代谢相关。吴倩等<sup>[12]</sup>在施用高低氮肥条件下对夏玉米的清蛋白含量进行统计,发现施加氮肥可以使夏玉米清蛋白含量增加,进而影响夏玉米籽粒品质。Huang等<sup>[13]</sup>研究发现在玉米胚发育和萌发过程中有11种胁迫响应蛋白与玉米耐脱水性相关。Méchin等<sup>[14]</sup>在玉米胚乳中鉴定到496种蛋白,主要参与蛋白合成、细胞防御、衰老及死亡等过程。Jin等<sup>[15]</sup>将3个优良杂交种授粉后不同发育时期的胚和胚乳进行蛋白组分析,在胚乳中发现39种差异蛋白,其主要涉及糖酵解和氧化还原平衡反应;胚中发现41种差异蛋白,主要参与油脂代谢过程。

目前,大田生产推广的高油玉米含油量在7%~10%之间,利用蛋白组学鉴定影响高油玉米胚发育关键基因,对揭示玉米籽粒产量和品质性状形成机理具有重要意义<sup>[16]</sup>。本研究利用双向电泳和质谱分析技术对高油玉米GY220授粉后15 d、25 d和35 d的胚发育过程中差异表达蛋白进行鉴定,分析影响胚发育的关键蛋白及其功能,并通过荧光定量技术

分析5个差异表达蛋白编码基因在胚发育中的表达情况,以期为进一步改良高油玉米的籽粒品质和挖掘影响胚发育的关键基因奠定基础。

## 1 材料与方 法

### 1.1 试验材料

以高油玉米自交系GY220(由中国农业大学陈绍江课题组惠赠)为材料,在自交授粉后0 d、5 d、10 d、15 d、20 d、25 d、30 d、35 d进行籽粒取样,测量籽粒干重、籽粒鲜重;剥取15 d、20 d、25 d、30 d、35 d籽粒完整胚,测量胚鲜重、胚形态及后期定量试验;剥取15 d、25 d、35 d胚进行蛋白组学分析(15 d、25 d为灌浆速率最快;35 d停止灌浆),剩余样品液氮速冻后,放入-80℃冰箱保存备用。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 籽粒、胚性状测定** 剥离授粉后不同时期的籽粒和胚各100粒,重复3次,进行称量,获得籽粒鲜重和胚鲜重;将称量后的鲜籽粒放置在恒温烘箱105℃,30 min,后置于65℃烘箱24 h以上,然后进行称量,获得籽粒干重;对授粉后3个时期的胚用直尺测量胚的长度和宽度,每个时期各测10粒。

**1.2.2 蛋白质样品提取** 按照酚抽提法<sup>[17-18]</sup>提取授粉后15 d、25 d、35 d高油玉米胚总蛋白,参照Bradford<sup>[19]</sup>方法,以牛血清蛋白为标准溶液测定蛋白浓度。

**1.2.3 双向凝胶电泳** 高油玉米胚蛋白的双向电泳参照O'Farrell<sup>[20]</sup>方法,采用24 cm, pH4~7的胶条(IPG, Bio-Rad)进行水化,上样量800 μg,上样体积450 μL。第一向等点聚焦:先进行S1水化,50 V, 12 h; S2除盐,200 V, 1 h; S3除盐,500 V, 1 h; S4升压,1000 V, 0.5 h; S5升压,5000 V, 0.5 h; S6升压,10000 V, 1 h; S7聚焦,10000 V, 10 h; S8保存,500 V, 12 h。第二向SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳:在经第一向等点聚焦之后,使用12%的分离胶及溴酚蓝的琼脂糖凝胶作封胶液。凝胶使用改良考马斯亮蓝染色法染色:(1)固定:电泳结束后将凝胶置于固定液(40%乙醇、10%冰乙酸)中固定2 h;(2)染色:固定之后,用超纯水漂洗15 min,重复2次。洗涤好后用

改良考马斯亮蓝<sup>[21]</sup>G-250(0.12% CBB G250、10% 硫酸铵、10% 硫酸、20% 乙醇)染色1 d; (3)脱色成相:用洗脱液(10% 乙酸),经3~4次换液至背景清晰即可进行图片扫描。

**1.2.4 凝胶扫描与图像分析** 用UMAK凝胶成像系统扫描凝胶获得图像,用PDQuest分析软件进行背景消减,蛋白点检测,获得蛋白点位置坐标等,手动删除假点,用ImageMaster platinum 6.0软件进行蛋白表达丰度统计,重复3次。选取表达丰度差异在3倍以上且在统计学T测验上 $P < 0.05$ 蛋白质点为显著差异蛋白质点。将检测到的差异蛋白点手动切下,分装于离心管中,记录对应差异蛋白点序列编号(依据双向电泳凝胶图上蛋白质分子量从上到下依次编号),进行质谱鉴定。

**1.2.5 质谱鉴定与数据库比对** 选择重复性较好的差异表达量在3倍以上的蛋白,进行蛋白质酶解,将酶解后的肽段重新溶解于5  $\mu$ L含0.1% TFA的溶液中,然后按照1:1的比例与含50% ACN和1% TFA的 $\alpha$ -氰基-4-羟基肉桂酸饱和溶液混合,取1  $\mu$ L样品进行质谱点靶鉴定,用ABI5800串联飞行时间谱仪(MALDI-TOF/TOF)进质谱分析,将一级和二级质谱数据整合并使用GPS 3.6(Applied Biosystems)和Mascot2.3(Matrix Science)对质谱数据进行分析 and 蛋白鉴定,将分析结果比对数据库NCBIInr(<https://ftp.ncbi.nlm.nih.gov/blast/db/FASTA/>)进行检索。

**1.2.6 GO、KEGG分析** 将准备好的数据(由质谱

分析得到的差异蛋白,根据蛋白序列在NCBI中查找对应的差异基因保存于txt文档)上传至TBtools软件获得GO富集图;KEGG富集分析:先进行KEGG功能注释,打开KEGG官方网站(<https://www.kegg.jp/kegg/>),上传由质谱分析得到的差异蛋白序列,获得注释结果,保留注释结果中geneID和KO\_ID两列,上传omicshare(<https://www.omicshare.com/tools>)在线平台,获得KEGG富集图。

**1.2.7 目的基因表达分析** 将储藏于-80℃冰箱中的胚在液氮中磨成粉末后,用TRnaZol Reagent试剂盒(新赛美生物科技有限公司)分别抽提授粉后15 d、20 d、25 d、30 d、35 d籽粒和胚的总RNA;设计荧光定量引物(表1),内参基因为*tubulin*<sup>[22]</sup>,利用Bioradchorom 4实时荧光定量PCR仪进行基因表达定量分析。对定量数据的CT值进行分析,采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ (Livak)对数据进行处理,利用prism软件进行绘图。RT-PCR反应体系:以反转录的cDNA为模板,利用Hieff<sup>®</sup> qPCR SYBR Green Master Mix荧光定量试剂盒,配制体系10  $\mu$ L Hieff<sup>®</sup> qPCR SYBR Green Master Mix,0.4  $\mu$ L Primer-F,0.4  $\mu$ L Primer-R,1.0  $\mu$ L模板cDNA,8.2  $\mu$ L ddH<sub>2</sub>O补充至20  $\mu$ L。RT-PCR反应程序:95℃预变性5 min,95℃变性10 s,60℃退火/延伸30 s,共循环40次,溶解曲线阶段,按仪器默认设置。

目的基因在自交系B73中的表达情况依据转录组数据库(中国农业大学赖锦盛课题组)整理。

表1 本研究所用引物信息

Table 1 The information of primers used in this study

引物名称 Primer name	正向序列(5'→3') Forward sequences(5'→3')	反向序列(5'→3') Reverse sequence(5'→3')
1304	CTCCATCTTCCACAACGAGGA	ATCTAGTTGGCCTTGGCGATG
2309	ATAACCACGTGCCTTGGTGG	GCAACATCTCTGCCTCCAGT
3601	GATACAAACGCAGGTGGCA	TGACTCAACCCAAGTTGCC
4707	CTTCAGGAGCGTGCAAAAGG	CATATCGAATCCGCCCTGGT
7001	CAGACATCCAGGTGACGCTGG	GAGCACACCGTTCTCGCAGC
tubulin	CAGTGTGCTGCCCTTATCCC	TTAGAAAAAGCATCCGCCGAC

**1.2.8 蛋白同源性分析** 根据差异表达蛋白序列,在NCBI(<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)查找花生、大豆、油菜中同源基因的蛋白序列,利用DNAMAN软件进行序列比对。

**1.2.9 不同发育时期胚差异蛋白比较** 将利用质谱鉴定到的蛋白点对应蛋白号在蛋白数据库

Uniprot(<https://www.uniprot.org/>)中进行功能注释,并依据其参与的生物学过程、分子功能、细胞构成进行分类。蛋白点与ImageMaster platinum 6.0软件统计的蛋白表达丰度对应起来,3个发育时期中后面时期与前面时期蛋白丰度相比增加则该基因为上调表达蛋白,反之为下调表达蛋白。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同发育时期胚形态比较

对不同发育时期高油玉米自交系 GY220 的籽

粒干重、籽粒鲜重、胚鲜重进行测量,胚的大小在授粉后 15~35 d 逐渐增大(图 1);30~35 d 胚鲜重、籽粒干重、籽粒鲜重基本保持不变(图 2),表明籽粒在授粉后 30 d 时开始进入脱水状态。

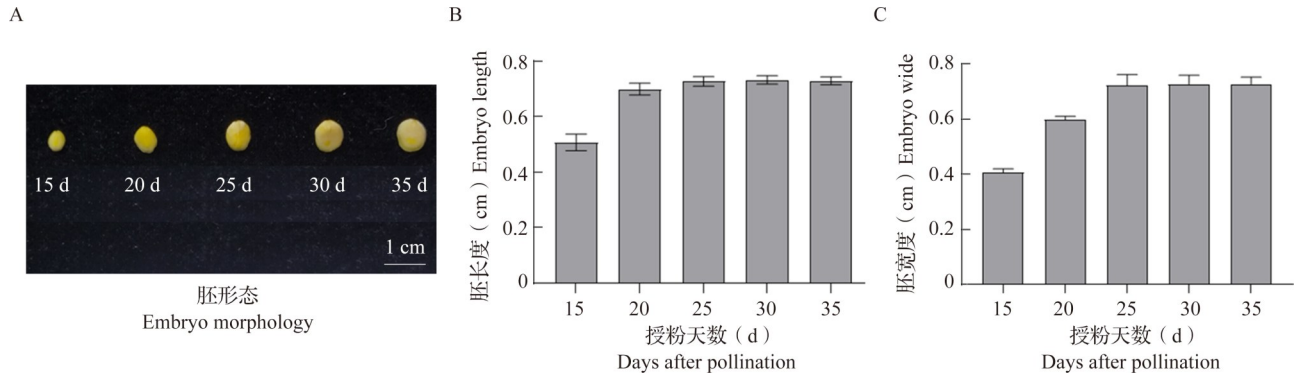


图 1 不同发育时期玉米胚的动态变化

Fig. 1 Dynamic changes of maize embryo at different development periods

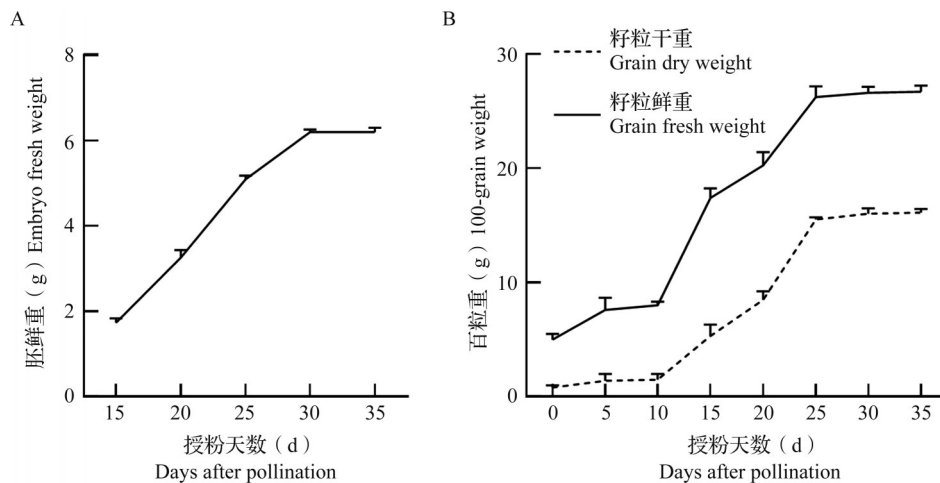


图 2 不同发育时期胚鲜重和籽粒干鲜重动态变化

Fig. 2 Dynamic changes of embryo fresh weight and grain dry fresh weight at different development periods

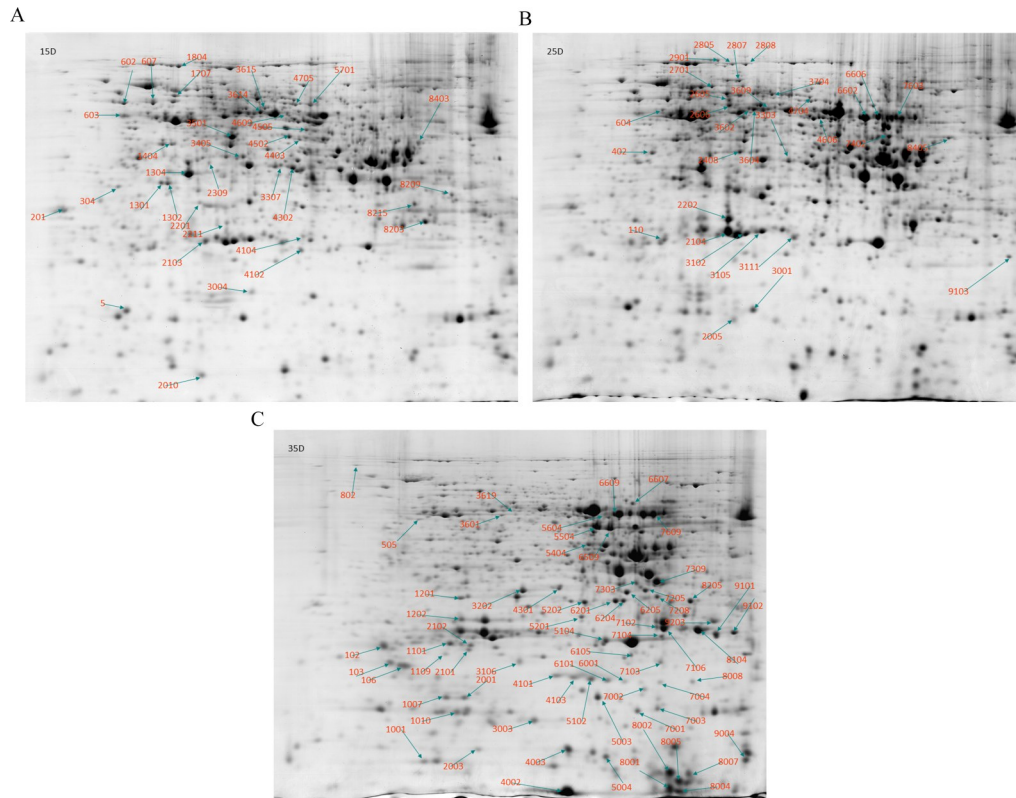
### 2.2 双向凝胶电泳分析

利用 PDquest 软件对自交系 GY220 授粉后 15 d、25 d、35 d 胚蛋白的双向电泳凝胶图进行分析(图 3),以蛋白含量差异达到 3 倍以上的蛋白点为显著蛋白点,共识别 61 个差异蛋白,通过 MALDI-TOF 质谱分析对 61 个蛋白点进行鉴定,共鉴定到 41 种不同蛋白质(<https://doi.org/10.13430/j.cnki.jpgr.20230522002>, 附表 1)。

### 2.3 差异表达蛋白功能分类

对获得的差异表达蛋白 GO 分析表明其参与多种生物学过程,具有多种分子功能。在生物过程中,代谢过程、细胞过程和细胞代谢过程占比分别为 74.2%、58.1%、54.8%;分子功能中,催化和绑定功

能占比最大,为 64.5%;细胞组成中,细胞组分和细胞内组分占比最大,为 35.5%(图 4)。通过 KEGG 富集分析对差异蛋白进行功能聚类(图 5),差异蛋白参与多种代谢过程, $P$ -value<0.01 为显著富集过程,主要有小分子代谢过程(Small molecule metabolic process) 12 种、酒精代谢过程(Alcohol metabolic process) 7 种、单糖代谢过程(Monosaccharide metabolic process) 5 种、细胞碳水化合物代谢过程(Cellular carbohydrate metabolic process) 6 种、氧化还原作用(Oxidation reduction) 9 种、碳水化合物代谢过程(Carbohydrate metabolic process) 7 种、氧化还原酶(Oxidoreductase activity) 10 种。

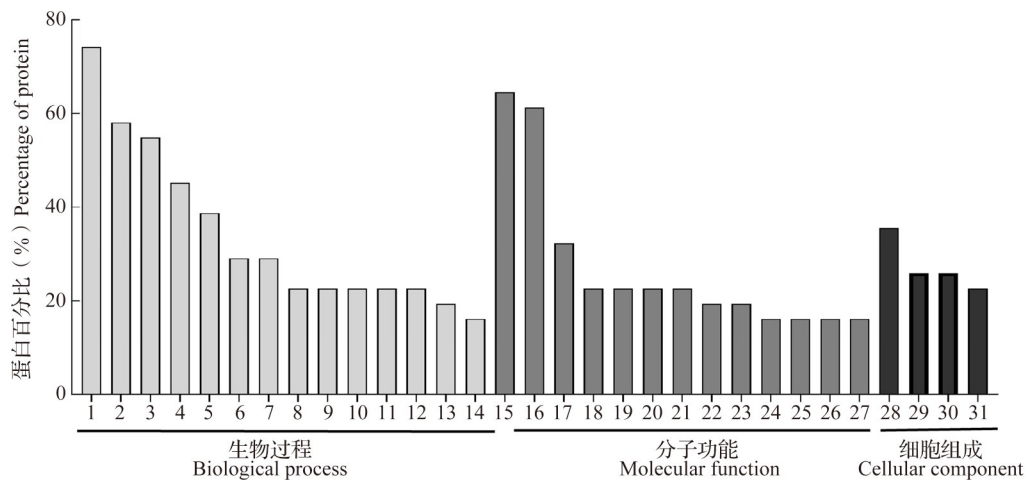


A: 授粉后 15 d; B: 授粉后 25 d; C: 授粉后 35 d; 图中数字为差异蛋白点标号

A: 15 days after pollination; B: 25 days after pollination; C: 35 days after pollination; The numbers in the picture are different protein dot labels

图3 不同发育时期胚蛋白凝胶双向电泳分析

Fig. 3 Two-dimensional gel electrophoresis analysis of proteins in different periods of embryo



1: 代谢过程; 2: 细胞过程; 3: 细胞代谢过程; 4: 初级代谢过程; 5: 小分子代谢过程; 6: 氧化还原反应; 7: 细胞大分子代谢过程; 8: 酒精代谢过程; 9: 碳水化合物代谢过程; 10: 细胞生物合成过程; 11: 生物合成过程; 12: 生物调节; 13: 细胞碳水化合物代谢过程; 14: 单糖代谢过程; 15: 催化活性; 16: 结合; 17: 氧化还原反应; 18: 离子束缚; 19: 阳离子结合; 20: 转移酶活性; 21: 金属离子结合; 22: 过渡金属离子结合; 23: 核苷酸结合; 24: 嘌呤核苷酸结合; 25: 核苷酸结合; 26: 嘌呤核苷酸结合; 27: 腺苷核苷酸结合; 28: 细胞组分; 29: 细胞内组分; 30: 细胞质; 31: 其他

1: Metabolic process; 2: Metabolic process; 3: Cellular metabolic process; 4: Primary metabolic process; 5: Small molecule metabolic process; 6: Oxidation reduction; 7: Cellular macromolecule metabolic process; 8: Alcohol metabolic process; 9: Carbohydrate metabolic process; 10: Cellular biosynthetic process; 11: Biosynthetic process; 12: Biological regulation; 13: Cellular carbohydrate metabolic process; 14: Monosaccharide metabolic process; 15: Catalytic activity; 16: Binding; 17: Oxidoreductase activity; 18: Ion binding; 19: Cation binding; 20: Transferase activity; 21: Metal ion binding; 22: Transition metal ion binding; 23: Nucleotide binding; 24: Purine nucleoside binding; 25: Nucleoside binding; 26: Purine nucleotide binding; 27: Adenyl nucleotide binding; 28: Cell part; 29: Intracellular part; 30: Cytoplasm; 31: Others

图4 不同发育阶段玉米胚差异表达蛋白GO分析

Fig. 4 GO analysis of differentially expressed proteins at the embryo of different development stages

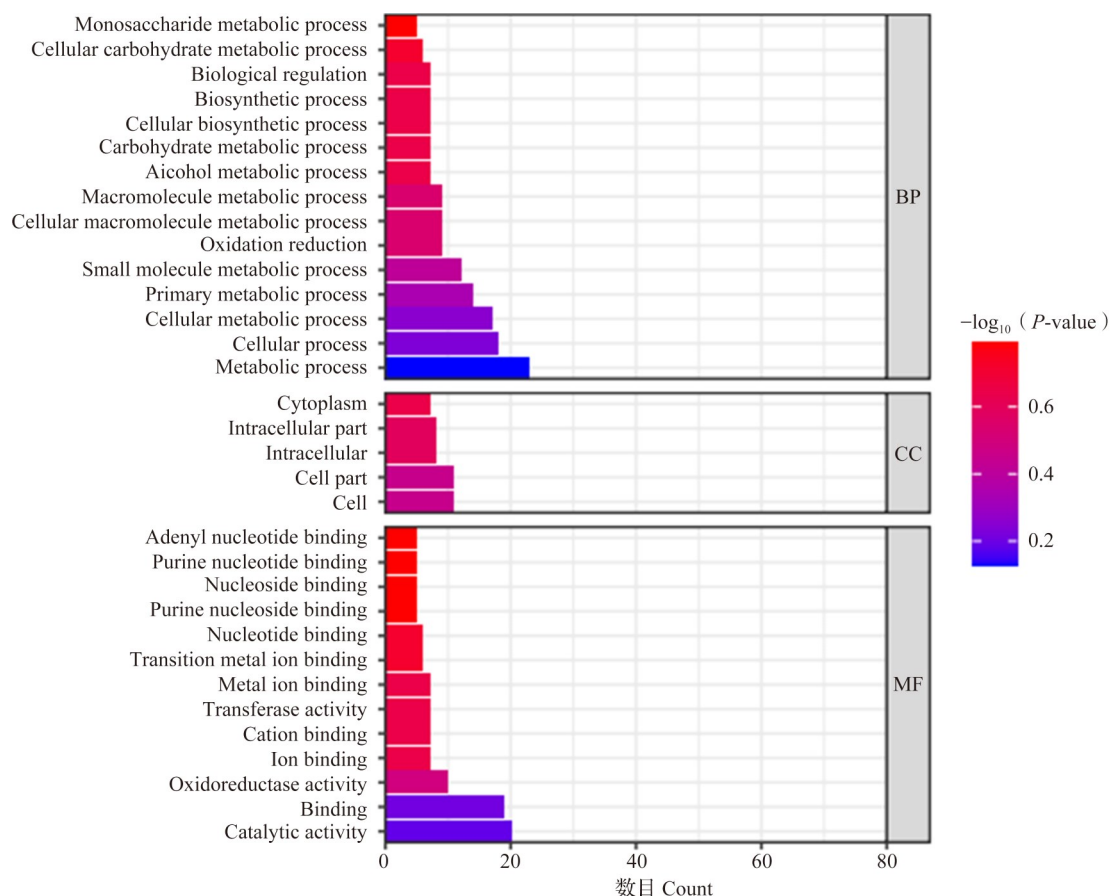


图5 不同发育阶段胚差异表达蛋白KEGG分析

Fig. 5 KEGG analysis of differentially expressed proteins at the embryo of different development stages

#### 2.4 差异表达蛋白功能分析

通过Uniprot数据库对鉴定到的41个差异表达蛋白进行功能分类,主要分为8类;对蛋白表达量进行比较,在授粉后25 d相对于15 d(G25/G15)、在授粉后35 d相对于25 d(G35/G25)、在授粉后35 d相对于15 d(G35/G15)中,上调蛋白分别有18个、18个、20个,下调蛋白分别有19个、25个、22个(表2)。在G25/G15中,下调表达蛋白主要涉及脂质代谢、脂肪酸生物合成、磷脂和肌醇的生物合成、酶和辅酶调节剂、碳水化合物代谢等功能。G35/G25中上调表达蛋白主要涉及氧化还原催化活性、应激反应、醛类代谢、维持细胞氧化还原环境稳态、乙烯的生物合成、参与胚胎发生等功能。在G35/G15中下调表达蛋白主要涉及糖酵解和糖异生、磷脂合成、植物细胞应激反应、膜内外离子交换、果糖代谢、光合作用等功能。

#### 2.5 差异蛋白编码基因的表达分析

根据差异表达蛋白在Uniprot数据库中功能预测,挑选5个具有重要功能的差异表达蛋白:果糖激酶(编号1304)可以催化果糖和ATP反应,在糖酵解

过程中发挥作用;甘油-3-磷酸脱氢酶(编号2309)参与细胞呼吸和脂质代谢;磷酸果糖激酶(编号4704)具有催化糖酵解和糖异生作用;琥珀酸半醛脱氢酶(编号3601)连接氧化磷酸化和电子传递,参与三羧酸循环;乙醛脱氢酶(编号7001)可将乙醛转变为乙酸。对差异表达蛋白编码基因在高油玉米自交系GY220和普通玉米自交系B73不同发育时期胚和籽粒中表达情况进行分析(图6~8),显示编码果糖激酶基因 *Zm00001d035037* 的表达量在胚发育中逐渐增加,在30 d达到最大,而该基因在B73中表达量呈下降趋势,表明其可能在高油玉米胚发育后期果糖和葡萄糖向脂肪转化的过程中起作用。编码甘油-3磷酸脱氢酶基因 *Zm00001d041962* 表达量在GY220胚发育中逐渐升高,35 d达到最大,而该基因在B73中表达量呈下降趋势,表明其在GY220胚发育后期高表达,可能有助于提高胚中油脂转化速率。编码磷酸果糖激酶基因 *Zm00001d044754* 在GY220胚发育35 d时表达量较高,而在自交系B73中呈下降趋势,表明其可能在籽粒发育后期糖类向脂质转化过程中起作用。编码琥珀酸半醛脱氢酶

基因 *Zm00001d015404* 表达量在 GY220 胚中呈下降趋势,而在自交系 B73 中呈先上升后下降;编码乙酰脱氢酶基因 *Zm00001d018298* 在自交系 GY220 胚中

呈先下降后上升趋势,而在自交系 B73 中呈波动表达,表明这两个基因在不同自交系胚发育中的功能存在差异。

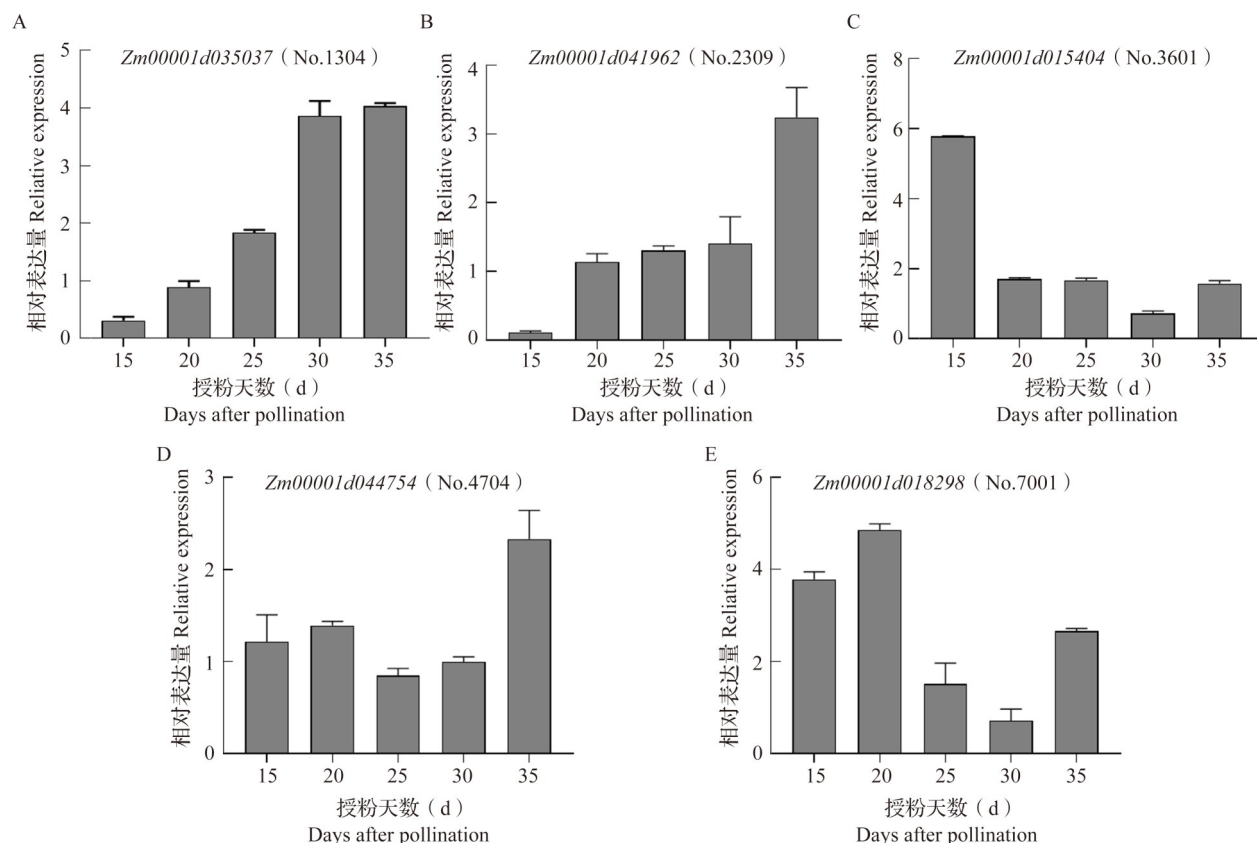
表 2 不同发育时期差异表达蛋白功能

Table 2 The function of differentially expressed proteins at different development stages

功能 Function	G25/G15	G35/G25	G35/G15
翻译后修饰、蛋白周转、伴侣 Posttranslation modification, protein turnover, chaperones	1/1	1/1	1/0
碳水化合物的运输与代谢 Carbohydrate transport and metabolism	1/5	1/7	1/7
能量的产生与转移 Energy production and conversion	1/3	0/6	0/6
核糖体结构和生物发生 Ribosomal structure and biogenesis	0/1	0/1	0/1
功能预测 General function prediction only	3/1	2/1	3/1
辅酶代谢 Coenzyme metabolism	0/3	0/3	0/3
无机离子的运输与代谢 Inorganic ion transport and metabolism	1/1	1/1	1/1
次生代谢物的合成运输与代谢 Secondary metabolites biosynthesis transport and atabolism	11/4	13/5	14/3
总计 Total	18/19	18/25	20/22

G15、G25、G35 分别为授粉后 15 d、25 d、35 d;前面为上调,后面为下调;G25/G15、G35/G25、G35/G15 分别为授粉后 25 d 相对于 15 d、35 d 相对于 25 d、35d 相对于 15 d

G15, G25 and G35 were 15, 25 and 35 days after pollination, respectively; In front of the / is up, behind the / is down; The values of G25/G15, G35/G25, G35/G15 were 25 d versus 15 d, 35 d versus 25 d, 35 d versus 15 d after pollination, respectively



括号内为蛋白质编号;下同

The data in parentheses is the protein number; The same as below

图 6 自交系 GY220 胚中差异蛋白编码基因表达特征

Fig. 6 Expression characteristics of differential protein encoding genes in embryos of inbred line GY220

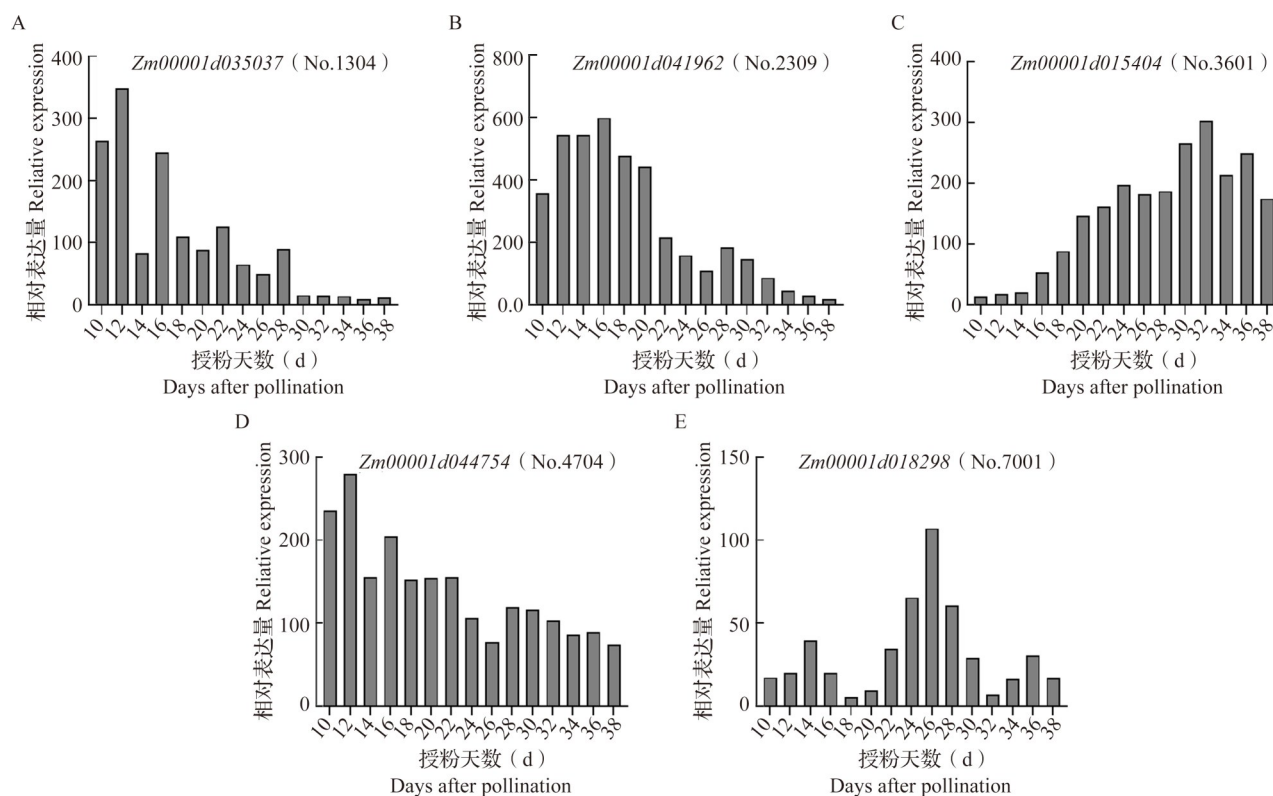


图7 自交系 B73 胚中差异蛋白编码基因表达特征

Fig. 7 Expression characteristics of differential protein encoding genes in embryos of inbred line B73

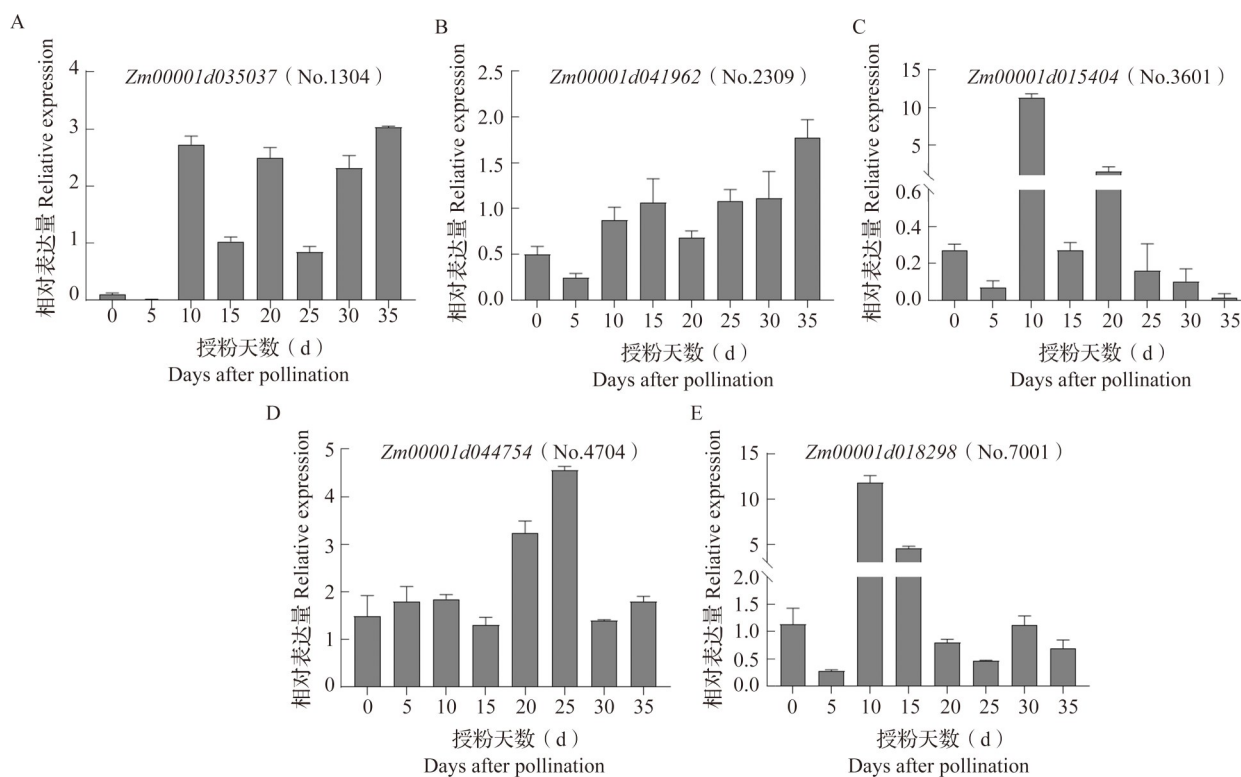


图8 自交系 GY220 籽粒中差异蛋白编码基因表达特征

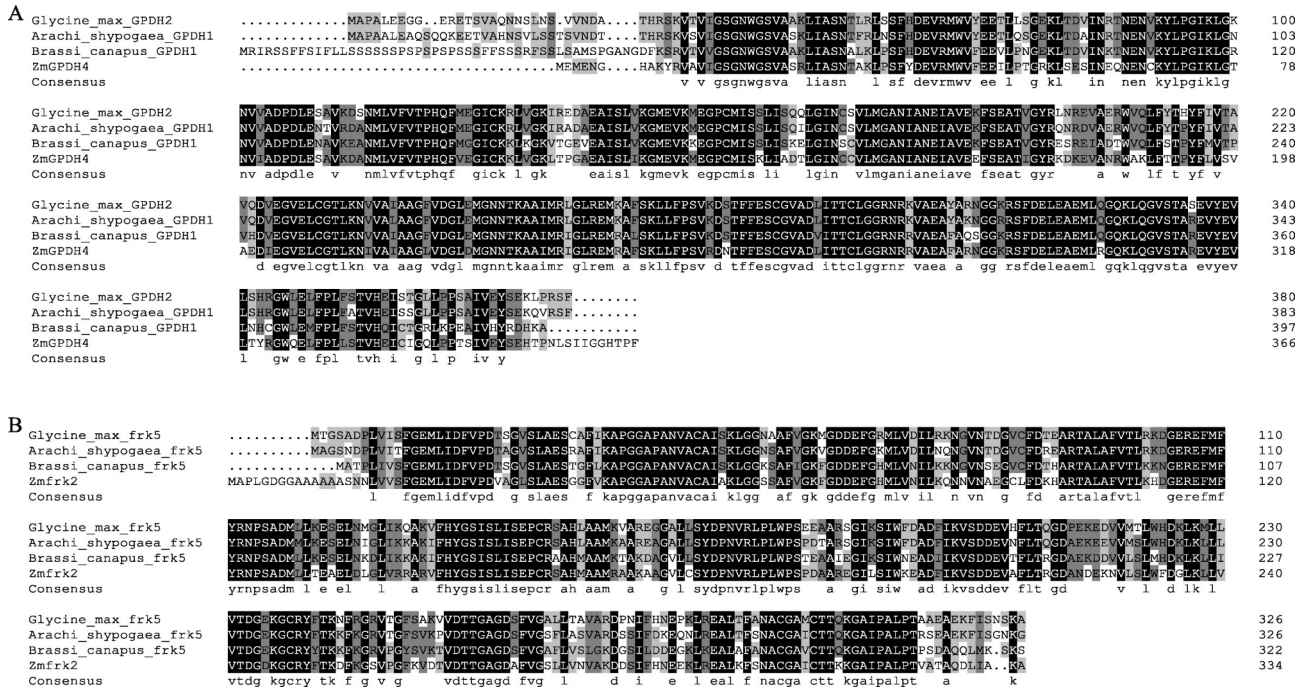
Fig. 8 Expression characteristics of differential protein encoding genes in kernels of inbred line GY220



### 2.6 差异表达蛋白同源比对

根据高油玉米不同发育时期胚中蛋白表达特征,选择 Zm00001d035037、Zm00001d041962 两个差异表达蛋白,分析其与大豆(*Glycine max*)、花生(*Arachis hypogaea*)、油菜(*Brassica napus* L.)等3种

油料作物中的蛋白序列同源性(图9),结果表明甘油-3-磷酸脱氢酶、果糖激酶在3种油料作物中与玉米的蛋白序列相似度分别达到78.30%和82.05%以上,具有较高同源性。



A: 果糖激酶; B: 甘油-3-磷酸脱氢酶  
 A: Fructokinase-2; B: Glycerol-3-phosphate dehydrogenase

图9 差异表达蛋白与油料作物中同源基因氨基酸序列比对

Fig. 9 Amino acid sequence comparison of differential expression proteins with homologous gene of oil crops

### 3 讨论

高油玉米85%的含油量储藏在胚芽中<sup>[23]</sup>,为挖掘高油玉米胚中油脂转化关键基因,本研究利用双向电泳技术和质谱分析技术从不同发育时期的高油玉米胚中鉴定到41种差异表达蛋白,主要涉及催化、绑定、氧化还原等功能,以及细胞代谢、碳水化合物代谢等过程(图4、图5),表明玉米胚发育涉及多重生物学过程;对不同发育时期差异蛋白表达量分析,显示同一材料不同时期中,随着胚发育进程,表达量降低的蛋白点数目增多,也有部分与油脂转化相关的蛋白在胚发育后期表达量增加,这表明高油玉米胚发育后期可能主要进行油脂转化和积累。根据不同发育时期胚差异蛋白功能,对5个与碳水化合物代谢、糖类代谢、油脂转化、逆境胁迫相关蛋白编码基因进行表达分析,显示在玉米自交系B73和GY220中的表达量存在差异,这可能与基因转录

之后的修饰、蛋白翻译后(蛋白降解和输出)的精细化调控有关<sup>[24]</sup>。

玉米籽粒发育中,细胞内有机物质转化的过程最初由蔗糖转化为果糖和葡萄糖,进而转化为脂肪等有机物质进行贮存<sup>[25]</sup>,植株体内油分的积累需要经历脂肪酸及脂肪酰-CoA的合成、甘油-3-磷酸的生成、脂肪酰-CoA和甘油-3-磷酸的脱水缩合形成三酰甘油等3个阶段<sup>[26]</sup>。关于油分的研究,前人对甘油-3-磷酸的关注较低,甘油-3-磷酸是三酰甘油合成路径中的初始底物,而甘油-3-磷酸脱氢酶是催化磷酸二羟丙酮转化为甘油-3-磷酸和NAD<sup>+</sup>的关键酶<sup>[27]</sup>,甘油-3-磷酸脱氢酶的表达直接影响甘油-3-磷酸的含量,进而影响油脂转化。Vigeolas等<sup>[28]</sup>研究甘蓝型油菜种子生长过程中发现甘油-3-磷酸的含量会导致种子中油脂含量上升;Fu等<sup>[29]</sup>在3个不同地点种植甘蓝型油菜高油品系H105,发现催化甘油-3-磷酸合成的甘油-3-磷酸脱氢酶基因表达上

升,表明该基因在油分积累过程中有一定作用;王艳芳等<sup>[25]</sup>研究发现在高油玉米籽粒中出现蔗糖和果糖含量高峰时,果糖向乙酰CoA的转化速率可能影响脂肪合成速率。本研究中涉及油脂转化的差异蛋白有3-氧酰基载体蛋白质还原酶、果糖激酶、甘油-3-磷酸脱氢酶、磷酸甘油酸酯变位酶等,分析表明这4个差异蛋白表达量呈下降趋势;对甘油-3-磷酸脱氢酶基因和果糖激酶编码基因进行定量分析,发现与蛋白水平表达趋势相反,这可能与转录后蛋白质的修饰有关,表明玉米胚发育过程中油脂的积累涉及多种生物学过程。

植物为了避免逆境胁迫对生长发育造成不利影响,在感知非生物胁迫后会引发相关基因的表达,同时植物由于自身呼吸作用产生代谢途径中断,从而导致有毒物质的积累<sup>[30]</sup>。王加琪等<sup>[31]</sup>发现植物响应干旱、高低温等非生物胁迫时,硫化氢和脱落酸通过交互作用调控植物响应胁迫;热休克蛋白又称作热激蛋白,是一类在生物体遭受环境胁迫时大量表达的蛋白质,有利于生物体抵御不良环境<sup>[32]</sup>。植物热休克蛋白不仅在植物抗生物和非生物胁迫中发挥作用,还通过正向调节抗氧化酶系统来增强膜稳定性和解毒活性氧,利用活性氧作为分子信号来诱导HSP产生,在生物胁迫下积累和稳定病原相关蛋白来增强植物的免疫力<sup>[33]</sup>。谷胱甘肽还原酶是植物体内一种重要的抗氧化酶,主要生理功能是将氧化型谷胱甘肽还原成还原型谷胱甘肽,从而为活性氧的清除能力提供还原力,保护植物免受伤害<sup>[34]</sup>;晚期胚胎发育丰富蛋白(LEA)是在种子发育后期产生的一类小肽,能够提升种子抗旱、耐低温的能力<sup>[35]</sup>,Wang等<sup>[36]</sup>研究发现玉米LEA-2蛋白家族基因*ZmNHL1*能提升玉米对干旱胁迫的耐受能力。本研究中发现热休克蛋白(编号7001)在不同玉米自交系胚发育中呈不同的表达趋势,该蛋白可能与胚发育中逆境胁迫响应有关。

能量代谢是植物体最基本的代谢途径之一,在植物生长发育中发挥着重要的作用,本研究中获得6种碳水化合物与能量代谢相关差异蛋白,主要涉及糖酵解(Ppi-phosphofructokinase、Glycerol-3-phosphate dehydrogenase、Fructokinase-2)、氧化磷酸化(Adenosine kinase、Aldose reductase、Vacuolar ATP synthase catalytic subunit A)。完全成熟的籽粒胚乳中储存大量有机物,活跃的糖酵解活动为水稻籽粒萌发提供大量能量<sup>[37]</sup>。本研究与糖酵解途径相关的酶在授粉后15 d时大量积累,但在25 d、

35 d时表达量逐渐减少,氧化磷酸化途径相关蛋白在授粉后15 d大量表达,表明玉米籽粒发育早期同样存在活跃的糖酵解途径,为籽粒萌发提供能量,满足玉米生长发育需求。

#### 参考文献

- [1] 薛春雷, 逯晓萍, 韩平安, 张坤明, 张瑞霞, 董婧. 高丹草及其亲本种子胚差异蛋白质组学分析. 科技导报, 2018, 36(14): 88-98  
Xue C L, Lu X P, Han P A, Zhang K M, Zhang R X, Dong J. Differential proteomic analysis of seed embryos of Gaudan Grass and its parents. Science and Technology Guide, 2018, 36(14): 88-98
- [2] 韩博. 高油玉米应用价值及发展前景. 现代农业科技, 2011, 1: 114  
Han B. Application value and development prospect of high oil maize. Modern Agricultural Science and Technology, 2011, 1: 114
- [3] 刘秀红. 高油玉米的利用价值及发展前景. 现代农业科技, 2011, 6: 109, 111  
Liu X H. Utilization value and development prospect of high oil maize. Modern Agricultural Science and Technology, 2011, 6: 109, 111
- [4] 裴爱田, 逯苗. 高油玉米的发展概述. 中小企业管理与科技, 2009, 9: 237  
Pei A T, Lu M. Development overview of high oil maize. Small and Medium-sized Enterprise Management and Technology, 2009, 9: 237
- [5] 石海波. 玉米籽粒发育差异表达蛋白研究. 呼和浩特: 内蒙古农业大学, 2015  
Shi H B. Study on differentially expressed proteins of maize grain development. Hohhot: Inner Mongolia Agricultural University, 2015
- [6] 陈小洁, 铁双贵, 岳润清. 双向电泳技术在植物蛋白质组学研究中的应用. 现代农业科技, 2012, 20: 13-14  
Chen X J, Tie S G, Yue R Q. Application of two-dimensional electrophoresis in the study of plant proteomics. Modern Agricultural Science and Technology, 2012, 20: 13-14
- [7] Yan S J, Bhawal R, Yin Z B, Thannhauser T, Zhang S. Recent advances in proteomics and metabolomics in plants. Molecular Horticulture, 2022, 2(1): 37
- [8] 吕秀华, 娄维义, 党永岩, 柴魏君, 许立春. 电泳技术的发展和应. 农业与技术, 2001, 3: 43-45  
Lv X H, Lou W Y, Dang Y Y, Chai W J, Xu L C. Development and application of electrophoresis technology. Agriculture and Technology, 2001(3): 43-45
- [9] 刘翠平, 方积年. 质谱技术在糖类结构分析中的应用. 分析化学, 2001, 6: 716-720  
Liu C P, Fang J N. Application of mass spectrometry in the analysis of carbohydrate structure. Analytical Chemistry, 2001, 6: 716-720

- [10] Bansal M, Sharma M, Kanwar P, Goyal A. Recent advances in proteomics of cereals. *Biotechnology and Genetic Engineering Reviews*, 2016, 32(1-2): 1-17
- [11] Lin S K, Chang M C, Tsai Y G, Lur H S. Proteomic analysis of the expression of proteins related to rice quality during caryopsis development and the effect of high temperature on expression. *Proteomics*, 2005, 5(8): 2140-2156
- [12] 吴倩,许莹莹,刘树堂,裴玉贺,宋希云.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. *植物生理学报*, 2019, 55(6): 858-866  
Wu Q, Xu Y Y, Liu S T, Pei Y H, Song X Y. Comparative proteomic analysis of summer maize grain albumin under long-term location fertilization. *Journal of Plant Physiology*, 2019, 55(6): 858-866
- [13] Huang H, Møller I M, Song S Q. Proteomics of desiccation tolerance during development and germination of maize embryos. *Proteomics*, 2012, 12(4): 1247-1262
- [14] Méchin V, Balliau T, Château-Joubert S, Davature M, Langella O, Négroni L. A two-dimensional proteome map of maize endosperm. *Phytochemistry*, 2004, 65: 1609-1618
- [15] Jin X, Fu Z, Ding D, Li W, Liu Z, Tang J. Proteomic identification of genes associated with maize grain-filling rate. *PLoS ONE*, 2013, 8: e59353
- [16] 李桂林,张新怡,夏文丽,张呈豪,唐泽新.热激蛋白的研究进展及应用前景. *曲阜师范大学学报:自然科学版*, 2023, 49(1): 73-80  
Li G L, Zhang X Y, Xia W L, Zhang C H, Tang Z X. Research progress and application prospect of heat shock protein. *Journal of Qufu Normal University: Natural Science Edition*, 2023, 49(1): 73-80
- [17] Wang X, Li X, Li Y. A modified Coomassie Brilliant Blue staining method at nanogram sensitivity compatible with proteomic analysis. *Biotechnol Lett*, 2007, 29(10): 1599-1603
- [18] Saravanan R S, Rose J K. A critical evaluation of sample extraction techniques for enhanced proteomic analysis of recalcitrant plant tissues. *Proteomics*, 2004, 4(9): 2
- [19] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976, 7(72): 248-254
- [20] O'Farrell P H. High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. *The Journal of Biological Chemistry*, 1975, 250(10): 4007-4021
- [21] 刘丽娟,舒烈波,陈海荣,罗利军.适用于生菜叶片蛋白质双向电泳方法的建立及初步应用. *植物遗传资源学报*, 2009, 10(1): 106-110  
Liu L J, Shu L B, Chen H R, Luo L J. It is suitable for the establishment and preliminary application of two-dimensional electrophoresis method of protein in lettuce leaves. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2009, 10(1): 106-110
- [22] 张中保,李会勇,石云素,宋燕春,黎裕,王天宇.应用实时荧光定量PCR技术分析玉米水分胁迫诱导基因的表达模式. *植物遗传资源学报*, 2007, 8(4): 421-425  
Zhang Z B, Li H Y, Shi Y S, Song Y C, Li Y, Wang T Y. Real-time fluorescence quantitative PCR was used to analyze the expression patterns of genes induced by water stress in maize. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2007, 8(4): 421-425
- [23] Curtis P E, Leng E R, Hageman R H. Development changes in oil and fatty acid content of maize strains varying in oil content. *Crop Science*, 1968, 8(6): 689-693
- [24] Gygi S P, Rochon Y, Franza B R, Aebersold R. Correlation between protein and mRNA abundance in yeast. *Molecular and Cellular Biology*, 1999, 19(3): 1720-1730
- [25] 王艳芳,杨东伟,张立军,马兴林,关义新.高油玉米灌浆期籽粒可溶性糖含量与脂肪积累的关系. *沈阳农业大学学报*, 2006, 2: 144-146  
Wang Y F, Yang D W, Zhang L J, Ma X L, Guan Y X. Relationship between soluble sugar content and fat accumulation in high oil corn grain at filling stage. *Journal of Shenyang Agricultural University*, 2006, 2: 144-146
- [26] 张超.油菜甘油-3-磷酸脱氢酶基因的克隆及功能研究.南京:南京农业大学,2012  
Zhang C. Cloning and Functional study of glycerol -3-phosphate dehydrogenase gene in rape. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2012
- [27] Sharma N, Phutela A, Malhotra S P, Singh R. Purification and characterization of dihydroxyacetone phosphate reductase from immature seeds of *Brassica campestris* L. *Plant Science: An International Journal of Experimental Plant Biology*, 2001, 160(4): 603-610
- [28] Vigeolas H, Geigenberger P. Increased levels of glycerol-3-phosphate lead to a stimulation of flux into triacylglycerol synthesis after supplying glycerol to developing seeds of *Brassica napus* L. in planta. *Planta*, 2004, 219(5): 827-835
- [29] Fu S X, Cheng H, Qi C. Microarray analysis of gene expression in seeds of *Brassica napus* planted in Nanjing (altitude: 8.9 m), Xining (altitude: 2261.2 m) and Lhasa (altitude: 3658 m) with different oil content. *Molecular Biology Reports*, 2009, 36(8): 2375-2386
- [30] Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, Van Breusegem F. Reactive oxygen gene network of plants. *Trends in Plant Science*, 2004, 9(10): 490-498
- [31] 王加琪,向汝华,李忠光.硫化氢和脱落酸在植物响应逆境胁迫中的交互作用. *生物学杂志*, 2022, 39(1): 94-98  
Wang J Q, Xiang R H, Li Z G. Interaction of hydrogen sulfide and abscisic acid in plant response to stress. *Journal of Biology*, 2022, 39(1): 94-98
- [32] 李桂林,张新怡,夏文丽,张呈豪,唐泽新.热激蛋白的研究进展及应用前景. *曲阜师范大学学报:自然科学版*, 2023, 49(1): 73-80  
Li G L, Zhang X Y, Xia W L, Zhang C H, Tang Z X. Research progress and application prospect of heat shock

- protein. *Journal of Qufu Normal University: Natural Science Edition*, 2023, 49(1): 73-80
- [33] Ul Haq S, Khan A, Ali M, Khattak A M, Gai W X, Zhang H X, Wei A M, Gong Z H. Heat shock proteins: Dynamic biomolecules to counter plant biotic and abiotic stresses. *International Journal of Molecular Sciences*, 2019, 20(21): 5321
- [34] 林源秀, 顾欣昕, 汤浩茹. 植物谷胱甘肽还原酶的生物学特性及功能. *中国生物化学与分子生物学报*, 2013, 29(6): 534-542
- Lin Y X, Gu X X, Tang H R. Biological characteristics and functions of plant glutathione reductase. *Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2013, 29(6): 534-542
- [35] 刘洋, 邢鑫, 李德全. LEA 蛋白的分类与功能研究进展. *生物技术通报*, 2011(8): 36-43
- Liu Y, Xing X, Li Q D. Studies on the classification and function of LEA proteins. *Biotechnology Bulletin*, 2011, 8: 36-43
- [36] Wang G, Su H, Abou-Elwafa S F, Zhang P, Cao L, Fu J, Xie X, Ku L, Wen P, Wang T, Wei L. Functional analysis of a late embryogenesis abundant protein ZmNHL1 in maize under drought stress. *Journal of Plant Physiology*, 2023, 280: 153883
- [37] Lee J, Koh H J. A label-free quantitative shotgun proteomics analysis of rice grain development. *Proteome Science*, 2011, 9(1): 61

附表 1 GY220 不同时期差异蛋白鉴定结果

Schedule 1 Identification results of different proteins in GY220 at different periods

蛋白点 (编号)	蛋白序列号	蛋白名称	蛋白质 (等电点/分子量)	功能分类	物种
Spot no.	Accession	Protein name	Protein (pI/Mr(KDa))	Functional categories	Species
7309	gi 315493392 gb ADU32868.1	aldose reductase	6.47/35.66	氧化还原催化活性	玉米
4704	gi 194700662 gb ACF84415.1	ppi-phosphofructokinase	5.96/61.02	催化 d-果糖 6-磷酸的磷酸化	玉米
8215	gi 194702574 gb ACF85371.1	fatty acid biosynthesis I	9.33/32.69	脂肪酸的生物合成	玉米
7001	gi 194689314 gb ACF78741.1	class II heat shock protein	9.33/32.69	应激反应	玉米
9103	gi 195606062 gb ACG24861.1	late embryogenesis abundant protein	8.98/21.19	功能未知	玉米
7003	gi 53771902 gb AAU93534.1	unknown protein	9.47/31.93	维持细胞氧化还原稳态	玉米
7103	gi 413955864 gb AFW88513.1	hypothetical protein		功能未知	玉米
3303	gi 76160835 gb ABA40392.1	putative stearyl-acyl-carrier protein desaturase	6.20/44.52	脂肪酸的生物合成	玉米
402	gi 4582787 emb CAB40376.1	adenosine kinase	5.23/36.03	转化能量	玉米
2408	gi 414588136 tpg DAA38707.1	TPA: hypothetical protein		功能未知	玉米
2606	gi 194703702 gb ACF85935.1	unknown	8.39/49.02	功能未知	玉米
2701	gi 195658441 gb ACG48688.1	vacuolar ATP synthase catalytic subunit A	5.30/68.42	质子交换	玉米
3001	gi 1546919 emb CAA69225.1	translation initiation factor 5A	5.61/17.50	结合核糖体	玉米
3105	gi 194701654 gb ACF84911.1	APx1 - Cytosolic Ascorbate Peroxidase	5.24/23.51	结合的血红素	玉米
8203	gi 5929932 gb AAD56653.1	voltage-dependent anion channel protein 2	7.84/29.18	功能未知	玉米
4606	gi 194705010 gb ACF86589.1	unknown	6.00/53.12	维持细胞氧化还原稳态	玉米
7106	gi 195607196 gb ACG25428.1	osmotin-like protein precursor	7.50/26.25	功能未知	玉米
9004	gi 195658019 gb ACG48477.1	seed maturation protein	9.46/11.64	功能未知	玉米
5	gi 195619268 gb ACG31464.1	peroxiredoxin-5	7.74/23.82	保护细胞免受氧化应激	玉米
602	gi 195615742 gb ACG29701.1	ruBisCO large subunit-binding protein subunit alpha	5.20/61.40	辅酶和酶调节剂	玉米
1304	gi 195638916 gb ACG38926.1	fructokinase-2	5.34/35.53	促进果糖代谢	玉米

1707	gi 168588 gb AAA33499.1	bisphosphoglycerate-independent phosphoglycerate mutase	5.29/60.62	参与糖酵解	玉米
1804	gi 168586 gb AAA33498.1	pyruvate,orthophosphate dikinase	5.74/10.27	结合金属离子	玉米
2309	gi 194707136 gb ACF87652.1	glycerol-3-phosphate dehydrogenase	5.48/40.31	参与碳水化合物代谢	玉米
3004	gi 195609518 gb ACG26589.1	glycine-rich protein 2b	5.92/20.30	结合锌离子	玉米
3501	gi 194689980 gb ACF79074.1	methionine adenosyltransferase	5.57/43.02	参与乙烯生物合成的第一步	玉米
3614	gi 11762100 gb AAG40328.1	myo-inositol 1-phosphate synthase	5.65/56.25	肌醇的生物合成	玉米
4102	gi 87133468 gb ABD24377.1	1-Cys peroxiredoxin antioxidant	6.31/24.91	真菌的防御反应	玉米
4502	gi 28802887 emb CAD70058.1	GDP-mannose 3,5-epimerase 1 [Zea mays]		功能未知	玉米
4301	gi 195636062 gb ACG37499.1	embryonic protein DC-8	6.16/33.57	功能未知	玉米
5404	gi 195627248 gb ACG35454.1	sorbitol dehydrogenase	6027/38.87	结合锌离子	玉米
5504	gi 228310 prf 1802402A	globulin 2		发挥免疫作用	玉米
6105	gi 195647380 gb ACG43158.1	PREDICTED:probable GTPase-activating protein AGD11	6.82/9.08	功能未知	玉米
6607	gi 194689616 gb ACF78892.1	PREDICTED: hypothetical protein isoform X2	6.44/49.36	功能未知	玉米
1007	gi 195608002 gb ACG25831.1	hypothetical protein	5.42/18.82	功能未知	玉米
1010	gi 194708718 gb ACF88443.1	17.4 kDa class I heat shock protein 3	5.71/17.83	分子伴侣活动	玉米
1201	gi 195658465 gb ACG48700.1	late embryogenesis abundant protein D-34	5.41/27.17	功能未知	玉米
2003	gi 195658977 gb ACG48956.1	embryonic protein DC-8 [Zea mays]	6.61/14.23	功能未知	玉米
3003	gi 134597 sp P23345.2	RecName: Full=Superoxide dismutase [Cu-Zn] 4A		抗氧化剂	玉米
3601	gi 195607992 gb ACG25826.1	succinate semialdehyde dehydrogenase [Zea mays]	5.68/52.57	功能未知	玉米
4003	gi 195607718 gb ACG25689.1	antimicrobial peptide MBP-1 precursor [Zea mays]	6.68/46.00	发挥氧化作用	玉米

蛋白序列号: NCBI 登录号; 蛋白点编号为双向凝胶电泳图中蛋白质编号

Protein sequence number: NCBI accession number; The protein point number is the protein number in the two-dimensional gel electrophoresis