

橡胶树死皮病黄色体差异表达蛋白的初步分析

闫洁^{1,2}, 陈守才¹

(1. 中国热带农业科学院橡胶研究所 农业部热带作物栽培生理学重点开放实验室, 海南 儋州 571737; 2. 石河子大学 生命科学学院, 新疆 石河子 832003)

摘要: 橡胶树“死皮病”给橡胶种植业带来严重的危害。为了更好地了解和阐明死皮病发生、发展的分子机制, 研究应用双向凝胶电泳技术(two-dimensional gel electrophoresis, 2-DE)比较橡胶树死皮株与健康株胶乳黄色体蛋白质组表达的差异。采用 TCA/丙酮沉淀法提取橡胶树死皮株与健康株黄色体蛋白质并采用固相 pH 梯度(immobilized pH gradient, IPG)双向凝胶电泳分离两种材料蛋白质, 凝胶经银染色后用 PDQuest 图像分析软件进行比较分析、识别差异表达的蛋白质。成功获得橡胶树死皮株与健康株胶乳黄色体的双向凝胶电泳图谱。鉴定出 13 个蛋白差异点, 其中 10 个上调表达, 3 个下调表达。并应用质谱技术鉴定了其中部分表达差异的蛋白质点, 对上调蛋白进行功能分析, 认为上调蛋白在死皮株中表现下调的情形可能与死皮病的发生有一定的关系。

关键词: 巴西橡胶树; 死皮病; 双向凝胶电泳; 蛋白质组; 质谱

中图分类号: S 682.36 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2008)07-0058-05

巴西橡胶树[*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Muell.-Arg.] 的胶乳中含有大量特化的液泡—黄色体, 它具有多种生理功能^[1], 约占胶乳鲜重的 15%~30%。新鲜胶乳中超过 25% 的总可溶性蛋白质存在于以黄色体为主的离心底层沉淀部分, 黄色体中除含有丰富的蛋白质以外, 还含有酶和 Ca、Mg 等二价阳离子, 这些蛋白质、酶类以及二价阳离子调节黄色体内外电势差, 维持着黄色体和胶乳的稳定^[2-3]。

这种类似于植物的液泡和动物细胞中的溶酶体的黄色体小泡在橡胶树死皮病(tapping panel dryness, TPD)发生时, 在生理上发生了多种变化: 黄色体膜破裂, 释放二价金属阳离子等致凝物质, 使胶乳在原位凝固。核 DNA 发生凝聚, 黄色体膜上的 NAD(P)H 氧化酶、细胞质过氧化物酶被诱导激活等等。橡胶树 TPD 被认为是一种由伤害(割胶)和乙烯刺激(现生产上普遍采用的增产措施)引起的、复杂的生理综合症^[4,5]。橡胶树死皮病的发生给橡胶种植业带来严重的危害, 是天然橡胶单产提高的限制因子。据估计, 全世界每年因橡胶树死皮病而损失的干胶产量为 5×10^5 t, 价值相当于 4 亿美元^[6]。因此, 对于橡胶树死皮病的研究不仅在理论上而且在生产实践中都有重要意义。

了解橡胶树死皮病的形成及其分子机制是治理橡胶树死皮病的前提, 为寻找死皮发病原因和探索死皮机理, 国内外许多学者从不同学科角度做了不懈的努力, 但死皮的成因很复杂, 目前, 关于橡胶树 TPD 发生机理的假说甚多, 往往强调单个或几个因子的作用, 缺乏在蛋白质水平的系统性、整合性的研究, 就很难从某一方面对死皮的诱发原因和发病机理做出圆满的解释。而蛋白质组技术为分离和鉴定橡胶树黄色体蛋白提供了行之有效的研究手段。它利用高分辨双向电泳等技术对复杂组织进行蛋白质分离, 然后采用生物质谱等技术对蛋白质进行鉴定。一旦能够获得蛋白质组差异的足够信息, 从理论上来说就可以推断造成这种变化的原因。因此, 从蛋白质组学和差异蛋白质组学水平, 对黄色体蛋白进行全面的分离和鉴定, 通过比较橡胶树死皮株与健康株胶乳黄色体蛋白质表达谱, 找到并鉴定出显著差异表达蛋白, 可从一定程度上解释引起 TPD 发生、发展的原因, 也将为进一步阐明橡胶树死皮病的分子机理奠定基础, 促进橡胶树死皮病的防治。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 材料 研究所用的材料选自中国热带农业科学院试验农场五队的品种热研 879, 胶树龄 11 a。

1.1.2 试剂 固相 pH 梯度预制干胶条(ReadyStrip IPG strip, 17 cm, pH 3~10 L 或 pH 5~8)、载体两性电解质[Bio-LyteTM 3/10 Ampholyte, 40% (W/V) 或 Bio-LyteTM 5/8 Ampholyte, 40% (W/V)]、Tributylphosphine (TBP)均购自美国 Bio-Rad 公司; 丙烯酰胺(acrylamide)、

第一作者简介: 闫洁(1969), 女, 博士, 副教授, 研究方向为植物分子生物学及基因工程应用基础。E-mail: yanjie.shz@163.com.

通讯作者: 陈守才。E-mail: sc07@163.com.

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30471373)。

收稿日期: 2008-03-04

甲叉双丙烯酰胺(N, N'-methylenebisacrylamide)、甘氨酸(Glycine)、十二烷基磺酸钠(SDS)、甘油(Glycerol)、三氨基甲烷(Tris)、硫脲(Thiourea)、3-[3-(胆酰胺丙基)-二乙胺]-丙磺酸(CHAPS)、二硫苏糖醇(DTT)、溴酚蓝(Bromophenol Blue)、四甲基乙二胺(TEMED)、过硫酸铵(APS)、硝酸银(AgNO₃)、矿物油(Mineral Oil)、琼脂糖(Agarose)、三氯乙酸(TCA)、铁氰化钾(K₃Fe(CN)₆)、硫代硫酸钠(Na₂S₂O₃ · 5H₂O)、EDTA-二钠(EDTA-Na₂)、苯甲基磺酰氟(PMSF)和碘乙酰胺(Iodoacetamide)购自 AMRESCO 公司; 乙腈(ACN)、 α -氟-4-羟基肉桂酸(CCA)和三氟乙酸(TFA)购自 Fisher 公司; TPCK 修饰的测序级胰酶(Trypsin Gold)购自 Promega 公司; 超纯尿素(Urea)和碳酸氢铵(NH₄HCO₃)购自 BBI 公司; 低分子量标准蛋白质 Marker 购自 Forment's 公司; 其它试剂均为国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 样品的处理和收集 以割线整齐、割面无条溃疡病的正常排胶的胶树 6 株作对照 强乙烯利(5%)连续刺激 75 d(每 14~15 d 为一涂药周期), 试验期间按常规割制 d/4, 试验后测量割线死皮长度与割线总长度, 计算死皮百分率约为 60%~80%, 割胶后冰镇收集前 2~30 min 排出的胶乳迅速带回实验室。

1.2.2 黄色体蛋白质的制备 将胶乳直接于 4℃, 26 000 r/min 离心 2 h 进行分层, 取底层沉淀部分(黄色体部分)加入四倍体积 -20℃预冷的含 10%(W/V) TCA、2 mmol/L DTT 的丙酮溶液中 -20℃沉淀 4 h 以上, 于 4℃, 18 000 r/min 离心 20 min, 弃上清, 将沉淀再悬浮于 -20℃预冷的含 2 mmol/L DTT 的丙酮溶液中, -20℃沉淀 2 h, 于 4℃, 16 000 r/min 离心 15 min, 弃上清, 悬浮、沉淀步骤总共重复 3 次, 最后将沉淀真空干燥(4℃), 得到粗蛋白质, -80℃密封保存备用。将上述提取出来的蛋白质粉末, 以 1mg : 10^μL 的比例加入蛋白质裂解液(7 mol/L 尿素, 2 mol/L 硫脲, 2 mmol/L LTBP, 4%(W/V)CHAPS, 40 mmol/L Tris)静置 1 h, 间断涡旋震荡, 待其充分溶解后, 于 20℃, 15 000 r/min, 离心 10 min, 去除不溶性沉淀, 上清液即为蛋白质溶液。取上清按照 Bradford 方法^[7]略作修改对蛋白质进行定量, 立刻进行双向电泳(2-DE)或者分装后, 于 -80℃保存备用。

1.2.3 双向凝胶电泳(2-DE) 第一向固相 pH 梯度(immobilized pH gradient, IPG)等电聚焦主要按 Gorg 等^[8]的方法和 IPG phorTM等电聚焦指南描述的方法进行一些改进, 分别于 pH 3-10L 或 pH 5-8 的 IPG 胶条中加入样品蛋白 150 μg 或 200 μg, 与重水化液(7 mol/L 尿素 2 mol/L 硫脲, 2 mmol/L LTBP, 4%(W/V)CHAPS, 0.2% Bio-Lyte pH 3~10 或 0.2% Bio-Lyte pH 5~8,

0.002%溴酚蓝)混合, 总体积为 300 μL。将蛋白与水化液充分混合后移入 IPG phor 等电聚焦仪的胶条槽(IPG strip holder)中, 小心放入 17 cm IPG 干胶条, 覆盖矿物油, 在 IPG phor 等电聚焦仪上进行主动水化和等电聚焦。水化和聚焦在 18℃条件下进行, 总电压时间积为 72 450 Vh, 其中水化在 50V 低电压进行 14h, 然后经过 250V 1 h, 500V 1 h, 1 000V 1 h, 最后稳定在 10 000V 下进行。胶条平衡和第二向垂直平板 SDS-PAGE 等电聚焦结束后, 每根 IPG 胶条用 6 mL 含 SDS 的平衡液(0.375 mol/L Tris-HCl pH 8.8, 6 mol/L Urea, 20%(V/V)Glycerol, 2%(W/V)SDS)平衡 2 次, 每次 15 min, 第 1 次平衡液中含 2%(W/V)DTT, 而第 2 次平衡液中 DTT 由 2.5%(W/V)的碘乙酰胺代替。将平衡好的 IPG 胶条转移至 1.0 mm 厚的连续 12.5%的 SDS-聚丙烯酰胺均质胶上端, 胶条一端置低分子量蛋白 Marker, 用 0.5%的琼脂糖封顶固定胶条, SDS-PAGE 在 PROTEAN Plus DodecaTM电泳槽中进行, 17℃循环水冷却采用恒压方式电泳。电泳参数: 初始电压 100 V 电泳 15 min 后, 电压提高至 200V, 直至溴酚蓝前沿抵达胶边缘处为止。

1.2.4 凝胶染色 参照文献^[9,10]的方法修改后并加以改进进行银染。40%(V/V)乙醇+10%(V/V)冰醋酸固定 30 min; 30%(V/V)乙醇+0.2%(W/V)硫代硫酸钠+6.8%(W/V)无水乙酸钠致敏 30 min; 超纯水漂洗 3 次, 每次 10 min; 0.25%(W/V)硝酸银+0.04%(V/V)的 37%甲醛银染 20 min; 超纯水漂洗 2 次, 每次 1 min; 2.5%(W/V)无水碳酸钠+0.02%(V/V)的 37%甲醛显影至蛋白质斑点清晰为止; 1.46%(W/V)EDTA Na₂ · 2H₂O 溶液终止 10 min; 超纯水漂洗 10 min; 于 4℃1%(V/V)冰醋酸溶液中保存。上述各步皆在摇床上进行。

1.2.5 凝胶图像扫描与分析 显色后的双向电泳凝胶用 Bio-Rad 的 GS-800TM校准光密度扫描仪透射扫描, 采集图像, 同一处理的二维电泳重复 3 次, 利用 PDQuest 7.40 图像分析软件对凝胶图像进行强度校正、斑点检测、背景消减、选择参考胶、以及图谱的匹配。根据蛋白质斑点表达量的变化进行比较和分析, 寻找蛋白质差异点。以蛋白质的数字信号相差超过 2 倍确定上调表达和下调表达, 相差低于 0.5 倍为基本保持不变。

1.2.6 质谱分析 胶内蛋白质的酶解及质谱鉴定参照 Promega 的 Trypsin (Mass Spectrometry Grade)使用说明书的方法修改后并加以改进。用适当加工的移液器 tip 头将目的蛋白质点沿染色边缘切下放入样品管中, 加入 200 μL 新鲜制备的脱色工作液(30 mmol/L K₃Fe(CN)₆与 100 mmol/L Na₂S₂O₃ · 5H₂O 溶液按体积比 1 : 1 混合后形成)放置 1~2 min 后, 可见蛋白质点的棕色消失, 此时马上用水冲洗停止反应, 移去其中的溶液, 加入 200

μL 水, 放置 20 min 洗涤, 重复 2 次, 至胶粒由黄色变成无色, 加入 100 μL 的 100% ACN 在室温下浓缩胶粒 5 min, 真空冷冻抽干, 将 1 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的 Trypsin 储液溶于 40 mmol/L $\text{NH}_4\text{HCO}_3/10\%\text{ACN}$ 溶液, 使其终浓度为 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$, 每管加 10 μL 于 4 $^\circ\text{C}$ 预温 1 h 后将多余的酶液弃去, 覆盖 20 μL 酶消化缓冲液 (40 mmol/L $\text{NH}_4\text{HCO}_3/10\%\text{ACN}$) 于 37 $^\circ\text{C}$ 酶解消化 16~18 h, 之后加入 50 μL 抽提液 (50% ACN/5% TFA) 萃取 60 min 抽提肽片断, 重复抽提 1 次, 最后将 2 次抽提液合并真空冷冻抽干浓缩, 将上述样品重新溶解在适量含 5 mg/mL CCA 的 50% ACN+0.1% TFA 中, 取 1 μL 酶解肽段进行 MALDI-TOF-MS 质谱分析。

肽质指纹图谱 (PMF) 将获得的肽质指纹图谱 (PMF) 信息, 进行内部校正, 去除胰蛋白酶的自动降解峰、角蛋白的特征峰、以及背景杂质峰, 将校准后的谱图转化为单同位素峰, 选取谱图中信噪比较好, 分辨率较高, 离子峰相对较高且处于 1 000~3 000 Da 之间的肽段进行同源性查询。该项分析委托北京华大蛋白质研究中心来完成。

数据库搜索: 用 MASCOT (www.matrixscience.com) 软件查询 SwissProt 以及 NCBI nr 上真核细胞的非冗余蛋白数据库, 对获得的混合物肽片段数据进行搜索, 物种为 Green plant, 搜库参数如下: 肽质量指纹图中的肽片段质量选择在 1 000~3 000 范围, 可耐受的精确程度为 ± 0.5 , 固定修饰为脲甲基半胱氨酸烷基化 (carbamidomethyl), 可变修饰为甲硫氨酸残基的不完全氧化 (oxidation), 离子选择 $[M+H]^+$, 模式为 Monoisotopic, 结果的可信度根据 mascot 的评分 ($P < 0.05$) 标准判断,

匹配分数超过 69 分者被认为具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 巴西橡胶树死皮株与健康株胶乳黄色体双向凝胶电泳图谱

试验对胶乳黄色体蛋白进行了 3 次双向电泳重复性检测, 结果 3 次双向电泳图谱非常相似, 有较高的重复性, 说明结果稳定可信。用 PDQuest 7.40 图像分析软件进行点分析, 将其中的一块胶定为参考胶进行 3 块胶之间的蛋白质点的匹配, 组内图像匹配率均可达 89% 以上, 匹配率较高, 能满足 2D 分析的需要。

先采用 17 cm pH3~10L 的固相 IPG 胶条进行橡胶树死皮株与健康株胶乳黄色体蛋白 2-DE 分离, 图谱经斑点检测后, 进行凝胶匹配, 死皮株与健康株 2-DE 图谱间的匹配率为 79%, 经 PDQuest 7.40 软件分析后, 共检测到了大约 700 个蛋白质点, 差异蛋白点主要集中在 pH 5~8 的范围内, 有些蛋白点相互覆盖, 不利于匹配分析和进一步的质谱鉴定。为提高蛋白质点的分辨率, 进一步采用窄范围的 17 cm pH 5~8 的线性固相 IPG 胶条进行 2-DE 分析, 可将上样量增大至 200 μg , 结果显示用 pH 5~8 的胶条进行蛋白质的分离效果好, 分辨率大大提高。蛋白质的分布范围较广, 大多数集中在 20~70 kD 区域, pH 5~8 上几乎均匀分布, 有助于一些低丰度蛋白质点的检出。经银染和 PDQuest 7.40 软件分析后, 确定在死皮株与健康株胶乳黄色体中可检出大约 850 个蛋白质点, 死皮株与健康株黄色体的 2-DE 图谱匹配率为 84%, 进一步检测出 13 个表达差异明显的蛋白质点。其典型的 2-DE 图谱见图 1。

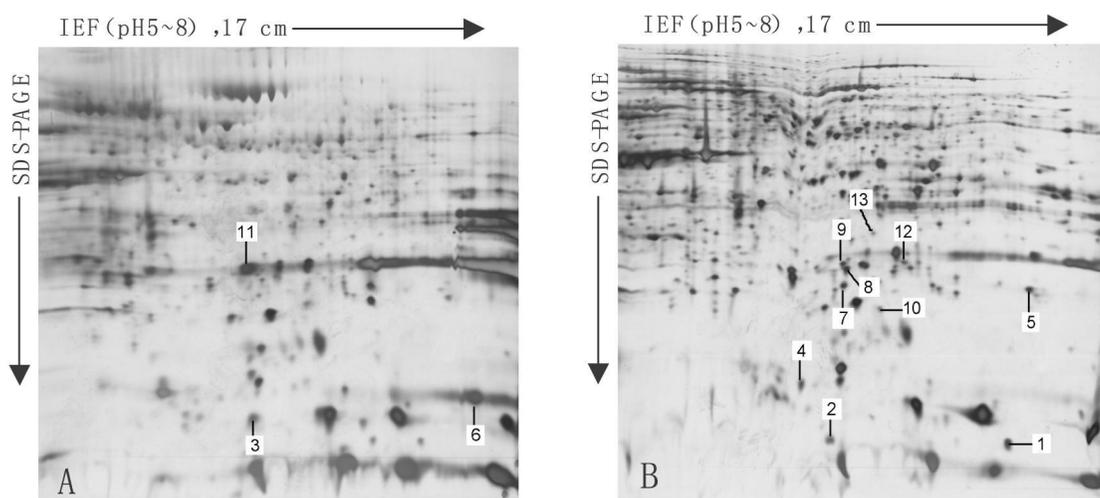


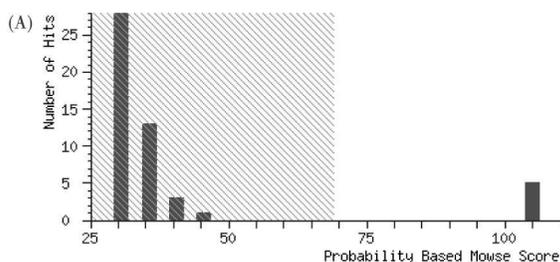
图 1 巴西橡胶树死皮株和健康株胶乳黄色体蛋白质双向凝胶电泳图谱

注: A, 健康株; B, 死皮株。部分差异表达蛋白质用线条标出并用数字标明 其中 spot 4, spot 6, spot 12 进行质谱鉴定。

2.2 差异蛋白点的 MALDI-TOF-MS 肽质指纹图分析

选取 pH 5~8 的 2D 胶上的 3 个具有显著差异的蛋

白质点 spot4, spot 6, spot12 经胶内原位酶切和肽段提取后, 进行 MALDI-TOF-MS 肽质指纹图测定, 并以酶自动降解峰($m/z=1993.9772$)进行校正。搜索数据库选用 Mascot 软件, 利用 Matrix Science 的 Mascot 查询软件搜索 SWISS-PROT 和 NCBI nr 数据库, 搜索结果如图 2 (A) 所示(以 spot6 为例), 所搜索出来的第一类蛋白质(包括不同的异构体)得分为 105 分, 大大地超过 69 分, 说明鉴定结果可靠。结合 2-DE 图谱上相应蛋白质的分子量、等点电, 确定其中 1 个蛋白为渗透蛋白(osmotin), 其匹配结果如图 2 (B) 所示; 另外两个蛋白还要进一步确定。



(B) gi| 83656817

```

NNCPYTVVAA ASPGGRRRLD  RGQSWTLNVA  PGTAMARIWG
RTDCNFDSSG  RGRCATGDCG  ALECKGWGVP  PNTLAEYALN
QFGNMDFDI  SLVDGFNIPM  DFSPTTGRCR  GIRCADIN G
QCPRELRVPS  GCNNPCTVFK  TNEYCCTNGQ  GSCGPTNFSK
FFKTRCPDAY  SYPQDDP

```

图2 Spot 6 蛋白质点 PMF 数据在数据库中查询到 Mascot 结果(A)及数据库检索结果(B)

3 讨论

双向电泳图谱的高重现性是比较差异样品的关键, 除了试验过程中所应用的药品及仪器参数要保持一致之外, 好的样品制备是 2-DE 成功与否的关键, 为了获得更多的蛋白质信息, 要求尽量提高样品蛋白质的溶解性并减少蛋白质的损失和降解。

研究曾对比多种蛋白质提取方法, 最终选择步骤简单、蛋白质提取量多、电泳效果好的 TCA-丙酮沉淀法提取黄色体蛋白质, 不但能降低蛋白质的损失量, 由于样品中含杂质少, 也保证了 IPG 等电聚焦顺利进行; 为保证蛋白质的有效分离, 试验选用窄范围的 17 cm pH 5~8 的线性固相 IPG 胶条进行 2-DE 分析, 较好地解决了蛋白质点密集、难分开的问题, 而且能得到更为清晰、分辨率更好的蛋白质图谱, 且蛋白质图谱的重复性也较好(资料待发表), 为后续的鉴定工作打下了良好的基础。

自 O' Farrell (1975)^[11] 提出双向电泳 (dielectrophoresis) 技术以来, 这项技术经过不断发展, 它与肽质指

纹图谱分析技术和氨基酸测序技术相结合, 已成为研究蛋白质组的关键核心技术之一, 目前国内蛋白质组学在橡胶死皮方面的研究还未见报道。实验室应用固相 pH 梯度双向凝胶电泳技术分离橡胶树健康株和死皮株胶乳黄色体蛋白质, 建立双向凝胶电泳图谱, 初步对二者差异显著蛋白质点进行了质谱鉴定。

造成死皮的生产上的强割和强乙烯刺激可以认为是外界施加的逆境胁迫, 研究已经证明橡胶树死皮病是由强割和强乙烯刺激引起的程序性细胞死亡现象^[12]。而植物细胞程序性死亡的最主要特点是液泡破裂和核 DNA 凝聚(Groover 和 Jones, 1999; O'Brian 等 1998)^[13-14]。各种逆境对细胞的最大伤害就是破坏膜系统和大分子结构。渗透蛋白(osmotin)是植物在渗透胁迫下产生的一种适应性蛋白, 其在植物抗逆反应中起着重要的作用, 被人们称为植物的免疫蛋白。渗透蛋白在植物逆境生理中起着重要作用, 其表达与许多逆境和环境因子有关^[15]。在逆境条件下, 植物诱导合成的许多蛋白(例如渗透蛋白)和一些还原性的糖类, 可以用以维持细胞膜结构和功能的稳定性。在研究中, 渗透蛋白在死皮株胶乳黄色体中表达量出现下调, 与死皮树胶乳黄色体膜出现破裂现象有一定的关系。

通过对橡胶树黄色体蛋白在死皮株与健康株之间的表达模式进行了对比研究, 通过二者银染扫描 2-DE 图谱的分析比较, 发现至少有 13 种存在有明显的表达差异, 主要表现为 DE 图谱斑点的增减以及染色的深浅上, 如图 1 所示, 一些蛋白质(如 spot4, spot12)的表达量有所增加, 而另一些蛋白质(如 spot6)则有所降低。试验选定 3 个差异表达蛋白点进行质谱分析, 但最终仅鉴定出 1 种蛋白, 其原因可能是二维电泳的分辨率或质谱分析敏感性的限制, 以及部分蛋白可能是未发现的新蛋白。要真正阐明这些差异点与橡胶树死皮之间的关系还有很多工作要做, 在此试验结果的基础上今后可以对更多的差异点进行肽质量指纹图谱分析, 并对部分差异蛋白点进行测序, 通过一系列分析技术的不断完善, 对橡胶树死皮发生、发展的过程有一个较全面的了解。

参考文献

- [1] D'Auzac J, Drevot J. What's new luteoid? Vacuolar system model from Hevea latex[J]. Plant Physiology Biochemistry, 1995, 33(6): 765-777.
- [2] Cardoso M J, Hamid S, Sunderasan E, et al. B-serum is highly immunogenic when compared to C-serum using enzyme immunoassay[J]. Journal Nature Rubber Research, 1994, 9: 205-211.
- [3] D'Auzac J, Jacob J L, Prevot J C, et al. The regulation of cispolyisoprene production[J]. Present Research Plant Physiology, 1997, 1: 273-331.
- [4] 范思伟, 杨少琼. 强割和排胶过度引起的死皮是一种特殊的局部衰老病害[J]. 热带作物学报, 1995, 16(2): 15-22.
- [5] Faridah Y, Siti Anija M A, Ghandimathi H. Changes in some physiological latex parameters in relation to over exploitation and onset of induced tapping panel dryness[J]. Nature Rubber Research, 1996, 10: 182-186.

[6] 蒋菊生,周钟毓. 面向 21 世纪的我国天然橡胶科技[J]. 热带作物研究, 1997(3): 1-7.

[7] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254.

[8] Gong A, Obemaier C, Boguth G, et al. The current state of two dimensional electrophoresis with immobilized pH gradients[J]. Electrophoresis, 2000, 21(6): 1037-1053.

[9] Yan J X, Wait R, Berkelman T, et al. A modified silver staining protocol for visualization of proteins compatible with matrix-assisted laser desorption/ionization and electrospray ionization-mass spectrometry[J]. Electrophoresis, 2000, 21(17): 3666-3672.

[10] 郭尧君. 蛋白质电泳实验技术[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2005: 107-108.

[11] O' Farrell P H. High resolution of two dimensional electrophoresis of proteins[J]. J Biol Chem, 1975, 250: 4007-4021.

[12] Shoucai Chen, Shiqing Peng, Guixiu Huang, et al. Association of decreased expression of a Myb transcription factor with the TPD (tapping panel dryness) syndrome in *Hevea brasiliensis*[J]. Plant Molecular Biology, 2003, 51(1): 51-58.

[13] Groover A, Jones A M. Treachery element differentiation uses a novel mechanism coordinating programmed cell death and secondary cell wall synthesis[J]. Plant Physiology, 1999, 119: 375-384.

[14] O'Brian E W, Baguley B C, Murray B G. Early stages of the apoptotic pathway in plant cells are reversible[J]. Plant J, 1998, 13: 803-814.

[15] Xu Y, Chang P, Liu D, et al. Plant defense genes are synergistically induced by ethylene and methyl jasmonate[J]. The Plant Cell, 1994, 6: 1077-1085.

Preliminary Analysis of the Proteins Expressed Differentially of Lutoid on the Latex of Tapping Panel Dryness(TPD) in Rubber Tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)

YAN Jie^{1,2}, CHEN Shou-cai¹

(1. Key Laboratory of Agriculture Ministry for the Cultivation and Physiology of Tropical Crops, Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou, Hainan 571737, China; 2. College of Life Sciences, Shihezi University, Shihezi, Xinjiang 832003, China)

Abstract: Tapping Panel Dryness (TPD) of *Hevea brasiliensis* causes severe losses to the rubber plantations and leading to severe loss in natural rubber production around the world. To better explore and understand the mechanism of Tapping Panel Dryness (TPD) of *Hevea brasiliensis* onset, differential proteomic analysis is conducted in lutoid proteins from latex of healthy and TPD trees by two-dimension gel electrophoresis (2-DE). The lutoid proteins from latex of healthy and TPD trees were isolated by TCA/cold acetone precipitation. And these were prepared by means of immobilized pH gradient (IPG) based on 2-DE. After silver staining, the differential expression proteins of two kinds were analyzed using image analysis software (PDQuest). Using proper method stated above, satisfactory 2-DE maps of lutoid proteins from latex of healthy and TPD trees obtained and the preliminary analysis results were reported. There were 13 spots were notable detected, including 10 up-regulated proteins and 3 down-regulated proteins and some different-expressed protein spots between the two types of tissues were detected by mass spectrometry. According to the functions of osmotin in which down-regulated in TPD trees, this protein change might be considered to have relationship with TPD broom.

Key words: Rubber tree (*Hevea brasiliensis* (Willd. ex A. Juss.) Muell. -Arg); Tapping panel dryness (TPD); Two-dimensional gel electrophoresis; Proteome; Mass spectrometry



8月

8月节气: 立秋、处暑。
8月农事: 立秋、处暑
 节气内气温高, 时伴有台风出现, 因此, 应重点做好防风排涝工作。水稻应着手防治二化螟、三代纵卷叶螟; 玉米则以防治穗螟为主; 棉花防治棉花黄叶病、四代棉铃虫成为农

民的当务之急; 是秋冬菜的播种和育苗季节, 也是北方大白菜的移栽季节; 水果要提前做好秋季施肥和早期防治落叶病, 为明年水果的优质丰产奠定坚实的基础。

进入8月, 天气炎热, 苹果、梨树要疏枝透光, 铺反光膜; 中熟品种要进行除袋, 摘叶转果和中耕除草; 高接改换品种; 喷施“天达 2116”1 000 倍液 and 杀虫灭菌剂防治日灼, 促进果实膨大, 防治金文细蛾、落叶病、炭疽病、腐烂病、

轮纹病、黑斑病、黑性病等病虫害。

8月萝卜、白菜、秋黄瓜、秋马铃薯、菠菜、辣菜、抗冻甘蓝、环茎甘蓝等蔬菜播前要用天达 2116 浸种、拌种, 芹菜定植要用天达 2116 蘸根。棉花铃盛期要喷施天达 2116, 促使棉花多结桃, 结大桃, 保秋桃, 减少棉花落铃和烂铃, 抗涝防旱; 夏玉米抽穗吐丝期喷施天达 2116, 可使玉米授粉良好, 不秃顶、不缺粒, 提高结实率; 水稻抽穗期喷施天达 2116, 则效果更为明显。