

温敏核不育系水稻株 1S 及其矮秆突变体 SV14 茎的蛋白质组学比较

萧小鹏¹, 杨远柱², 林建中¹, 童春义¹, 杨粤军¹, 黄绿红¹, 李彦¹, 刘选明¹

(1. 湖南大学生命科学与技术研究院, 化学生物传感与计量学国家重点实验室, 长沙 410082;

2. 湖南亚华种业科学研究院, 长沙 410001)

摘要 采用双向凝胶电泳对温敏核不育水稻株 1S 和其矮秆突变体 SV14 的茎(穗颈下第 1 节和第 2 节)蛋白进行了分离, 通过银染显色, 获得了分辨率和重复性较好的双向电泳图谱. 选取了 26 个蛋白质点采用 MALDI-TOF-MS 进行肽质谱指纹图分析, 最终有 12 个蛋白质点得到了可靠鉴定. 其中在 SV14 中相对于株 1S 上调的仅有 OSJNBa0039C07.13 蛋白, 其它蛋白均表现为下调. 这些差异蛋白按照功能可分为 4 类: (1) 能量代谢相关蛋白; (2) 次生代谢相关蛋白; (3) 调控蛋白; (4) 未知蛋白. 对光合系统 II 氧延伸复合物蛋白质前体 2, 果糖二磷酸醛缩酶, UDP-葡萄糖醛脱羧酶对应的基因进行了半定量 RT-PCR 分析, 发现这几个基因与蛋白质的表达不一致, 可能是 RNA 发生了翻译后修饰而减少了蛋白表达量的结果. 这些差异蛋白很可能与水稻矮化有关, 为水稻矮秆基因的寻找提供了另一个有效途径.

关键词 水稻; 矮秆突变体; 蛋白质组学; 半定量 RT-PCR

中图分类号 O657; Q51

文献标识码 A

文章编号 0251-0790(2008)01-0041-05

在两系法杂交水稻育种中, 所用不育系为光温敏型核不育系, 其育性受光照和温度双重控制, 其中温敏核不育系主要受温度影响. 不育系株 1S 是由湖南亚华种业科学研究院采用遗传距离较远的不同生态类型材料杂交育成的籼型广亲和温敏核不育系^[1]. 其育性转换临界温度值为 23 °C 左右, 具有配合力强、生育期短、产量高和米质好等特性, 在国内广为推广. 但因其株型偏高, 制种授粉时需要人工辅助, 杂种后代偏高易倒伏, 给生产带来诸多不便. 为了解决这个问题, 本实验室采用离体细胞组织培养筛选体细胞无性系突变体的方法, 获得了株 1S 的矮化突变体 SV14, 除提高了其配合力外, 其它性状基本不变, 从而大大提高了该不育系的应用价值^[2].

水稻植株矮秆基因的研究一直受到重视^[3,4], 但是到目前为此, 水稻植株矮化的机理还没有得到明确的解释. 本文应用蛋白质组学的方法, 对株 1S 和其矮秆突变体 SV14 的茎(穗颈下第 1 节和第 2 节)进行研究, 得到了一些差异蛋白质点, 并鉴定了部分蛋白质, 从基因水平验证了蛋白质表达. 从蛋白质表达水平初步了解了水稻植株的矮化, 为进一步开展水稻矮秆基因的研究奠定了基础.

1 实验部分

1.1 试剂与仪器

固相 pH 梯度干胶条(pH = 3 ~ 10, 线性梯度, 24 cm)、载体两性电解质(pH = 3 ~ 10)、固相 pH 梯度等电聚焦电泳(IPG)缓冲液(pH = 3 ~ 10)、矿物油、尿素、3-(3-(胆酰胺基丙基)二甲氨基)丙磺酸盐(CHAPS)和二硫苏糖醇(DTT)均为 Amersham Biosciences 公司产品; 丙烯酰胺、硫脲、过硫酸铵、四甲基乙二胺(TEMED)、牛血清白蛋白(BSA)、苯甲基磺酰氟(PMSF)、碘乙酰胺、甘氨酸、三羟甲基氨基甲烷(Tris)、十二烷基硫酸钠(SDS)、乙腈、TPCK-胰蛋白酶、铁氰化钾、硫代硫酸钠、三氟乙酸和基质 α -氰基-4-羟基肉桂酸(CCA)均为 Sigma 公司产品; Taq 酶为 MBI 公司产品; 植物 RNA 提取试剂盒

收稿日期: 2007-06-04.

基金项目: 国家教育部重点科技项目(批准号: 2002-78)资助.

联系人简介: 刘选明, 男, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事生物化学分析与分子生物学研究. E-mail: sw_xml@hnu.cn

为安比奥生物技术公司产品；其它试剂均为国产分析纯试剂，所有试剂均用超纯水配制。

Ettan™ IPGphor™ 等电聚焦系统、EPS601 电泳仪、Ettan™ DALTsix 大型垂直电泳槽、MultiTemp III 循环水浴箱、UTA-1100 扫描仪和适配器均为 Amersham Biosciences 公司产品；UV-1600 型紫外分光光度计为北京瑞利分析仪器公司产品；LGJ-10 冷冻干燥机为北京四环科学仪器厂产品；Voyager DE-STR 飞行时间质谱仪为美国 Applied Biosystems 公司产品。

1.2 样品制备

株 1S 由湖南亚华种业科学研究院提供。取相同条件(日平均温度高于 28 °C)下栽培的温敏核不育水稻株 1S 和其矮秆突变体 SV14 的差异较明显的茎(穗颈下第 1 节和第 2 节)，剪短，在液氮中研成粉末，并悬浮于含有质量分数为 10% 的三氯乙酸和 0.3% DTT 的预冷丙酮溶液中，于 -20 °C 冰箱中沉淀过夜后，于 4 °C，以 16000 r/min 速度离心 1 h。弃去上清液，重悬沉淀于 0.3% DTT 的预冷丙酮溶液中，于 4 °C，以 16000 r/min 速度离心 30 min。弃去上清液，重复操作 1 次。将沉淀冷冻干燥后置于 -80 °C 保存备用。

1.3 双向凝胶电泳

第一向等电聚焦电泳参考 Gorg 等^[5]的方法和 IPGphor™ 等电聚焦系统操作指南进行。第二向垂直 SDS-PAGE 电泳参考文献[6]的方法进行。使用体积分数为 10% 的分离胶。

1.4 银染和图像分析

参考 Amersham Biosciences 公司关于双向电泳的实验技术指南的银染方法进行染色。染色后的凝胶用图像扫描仪透射扫描成像，所得图谱用 PDQuest 软件进行图像分析，比较蛋白质点差异。

1.5 肽质谱指纹图分析和数据库检索

参照文献[6]的方法对蛋白质点胶内酶切，提取多肽混合物进行 MALDI-TOF-MS 质谱分析。采用反射模式，正离子测定，离子源加速电压 20 kV，激光波长 337 nm，脉冲宽度 3 ns，离子延迟提取 100 ns，真空度 5.3×10^{-5} Pa，质谱信号单次扫描累加 100 次。获得的混合物肽片段数据通过 Mascot (<http://www.matrixscience.com>) 网站进行检索。数据库为 NCBI；物种为水稻；胰酶酶切；允许不完全裂解位点数为 1；固定修饰为碘乙酰胺化；可变修饰为甲硫氨酸氧化；质量容差为 0.2。

1.6 半定量 RT-PCR 分析

参考文献[7]方法，用植物 RNA 提取试剂盒提取株 1S 和 SV14 茎的总 RNA，然后逆转录得到第一链 cDNA。分别选取 40、42 和 43 对应的基因进行半定量 RT-PCR 分析，所设引物分别为 40：正义链：5'-ACCACCAAGAAGACCATCACC-3'，反义链：5'-GTCCTCGTCAGCACCGTTAC-3'；42：正义链：5'-TCGCTACGCCATCATCTGC-3'；反义链：5'-CCCTCTCAATGTTCTCCGCC-3'；43：正义链：5'-GATGATGGGCGTGTGTTAG-3'；反义链：5'-TTCTTCTTGGGCACTTGGA-3'，以 β -actin 作为内标。PCR 扩增程序如下：95 °C 变性 5 min 后，按 95 °C 变性 30 s，59 °C 退火 30 s，72 °C 延伸 30 s，进行 25 个循环，最后于 72 °C 延伸 5 min。

2 结果与讨论

2.1 株 1S 和 SV14 茎蛋白的双向电泳图谱分析

图 1 为株 1S 和 SV14 茎蛋白的双向电泳图谱。此图谱是通过严格一致的操作程序得到的，其重复性较高。茎蛋白质点大多数分布在偏酸性区域(pH = 4 ~ 7)，分子量范围 20000 ~ 70000，在 pH = 5 ~ 6 时，分子量在 30000 ~ 60000 范围内较为集中。通过分析发现，株 1S 和 SV14 共有 45 个差异蛋白质点，其中，与株 1S 相比，在 SV14 中有 12 个蛋白质点上调，有 9 个蛋白质点下调。有 15 个蛋白质点仅在株 1S 中表达，有 9 个蛋白质点仅在 SV14 中表达。

2.2 株 1S 和 SV14 茎差异蛋白质点的鉴定

根据差异蛋白的表达量和质量，选取了 26 个蛋白质点进行肽质谱指纹分析及数据库检索，最终有 12 个蛋白质点得到了可靠的鉴定(见表 1)。部分蛋白质点由于在 MALDI-TOF 分析中肽质谱指纹图分辨率比较低，灵敏度不够，或者因为匹配率和覆盖率太低未能得到鉴定，还需要通过其它分析方法进

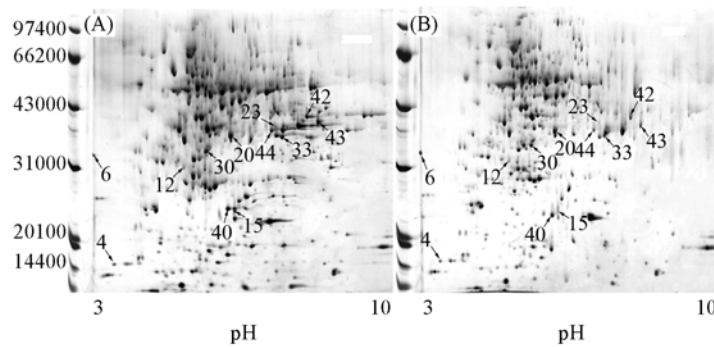


Fig. 1 2D-gel protein patterns of Zhu-1S(A) and SV14 stem(B)

Table 1 Functional classification of the identified Zhu-1S and SV14 stem proteins

Spot No.	Protein description	Accession No.	M_r	pI	Sequence Coverage rate(%)	Peptides matched	Protein alteration*
Photosynthesis							
40	Probable photosystem II oxygen-evolving complex protein 2 precursor	NP_911136	27094	8.66	42	9	↓
Regulatory proteins							
15	U1p1 protease-like protein	BAD36141	9246	4.93	65	4	↓
33	osr40c1 protein	CAA64683	39254	6.3	40	8	↓
Energy metabolism							
44	Putative glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase	XP_472949	36921	6.34	21	5	↓
42	Putative fructose-bisphosphate aldolase	AAT85154	39238	6.96	36	6	↓
20	Cytoplasmic malate dehydrogenase	AAP54283	35888	5.75	34	5	↓
30	Probable proteasome endopeptidase complex	T03925	29897	5.37	18	5	↓
4	Aminotransferase-like	BAD33900	20023	4.95	36	3	↓
Secondary metabolism							
12	Putative caffeoyl-coA O-methyltransferase	XP_483167	27925	5.11	36	6	↓
43	UDP-glucuronic acid decarboxylase	BAB84334	39455	7.16	39	8	↓
23	putative isoflavone reductase	NP_908373	34398	6.26	27	7	↓
Others							
6	OSJNBa0039C07.13 protein	XP_472344	47844	6.32	19	4	↑

* ↑: Upregulated in SV14; ↓: downregulated in SV14.

行逐一证实^[8]。图 1(A)和(B)中箭头标出的为株 1S 和 SV14 茎蛋白中已经鉴定的差异蛋白质点。图 2 为已鉴定的蛋白质点的放大图。

由于样品提取时可能有些疏水性膜蛋白未能溶解在样品提取液中,同时有些含量很低的蛋白质未能通过银染显示,而且进行第一向和第二向电泳时,部分蛋白质可能不能顺利进入胶中,所以 2D 胶上显现出来的是株 1S 和 SV14 茎中可溶性含量相对较高的蛋白质。因此只有当与植株矮化相关的蛋白质属于上述可溶性蛋白且含量相对较高时才会出现。

2.3 株 1S 和 SV14 茎差异蛋白质点的功能分析

已鉴定的差异蛋白质点在 SV14 茎中相对于株 1S 上调的仅有 OSJNBa0039C07.13 蛋白。其它蛋白均表现为下调,这些蛋白质点有 U1p1 蛋白酶类似蛋白、蛋白酶体内肽酶复合物、咖啡辅酶 A 氧转甲基酶、转氨酶、

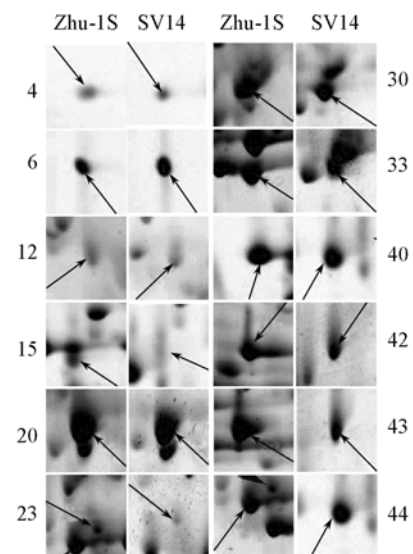


Fig. 2 Close-up views of the identified protein spots

光合系统 II 氧延伸复合物蛋白前体 2、果糖二磷酸醛缩酶、UDP-葡糖醛酸脱羧酶、*osr40c1* 蛋白、三磷酸甘油醛脱氢酶、异黄酮还原酶、细胞质苹果酸脱氢酶. 这些差异蛋白按功能可分为如下 4 类:

(1) 能量代谢相关蛋白. 如三磷酸甘油醛脱氢酶、细胞质苹果酸脱氢酶、果糖二磷酸醛缩酶和转氨酶. 三磷酸甘油醛脱氢酶和细胞质苹果酸脱氢酶均为氧化还原酶. 这两种酶在细胞的糖原代谢途径中起关键作用, 同时它们也参与了不同代谢物的合成以及能量的产生^[9]. 果糖二磷酸醛缩酶存在于细胞质中, 参与了糖酵解过程. 转氨酶是催化氨基酸与酮酸之间氨基转移的一类酶. 转氨酶与氨基酸代谢的合成和降解以及乙烯、多胺和特异蛋白合成前体的产生有关^[10]. 这几种酶在 SV14 的茎中都表现为下调. 这说明 SV14 茎矮化的原因有可能是能量代谢障碍导致能量供应不足引起的.

(2) 次生代谢相关蛋白. 如 UDP-葡糖醛酸脱羧酶, 咖啡辅酶 A 氧转甲基酶和异黄酮还原酶. UDP-葡糖醛酸脱羧酶是蛋白多糖合成中的关键酶, 参与了 UDP-木糖的合成, 在其中为异木聚糖和葡聚糖的生物合成提供糖基. UDP-木糖是半纤维素和糖蛋白合成的重要底物. 在水稻、玉米、小麦和大麦等农作物中, 糖基木聚糖是含淀粉的胚乳细胞壁和糊粉层的主要成分^[11]. 在禾本科植物的细胞壁中, 糖基木聚糖比葡聚糖要产生得多. UDP-木糖不仅是葡聚糖生物合成的底物, 而且还是催化木聚糖合成的 β -(1,4)-利多卡因转移酶的底物^[12,13]. 咖啡辅酶 A 氧转甲基酶参与木质素的生物合成^[14], 它能促进细胞壁增厚, 使细胞减少伤害或被病原体入侵. 最近有研究结果显示它可能参与了烟草中苯丙酸的代谢^[15]. 异黄酮还原酶是一种 NADPH 依赖的氧化还原酶, 这种氧化还原酶参与了异黄酮植物抗毒素的生物合成^[16]. 异黄酮植物抗毒素是植物在遇到病菌和一些生物和非生物胁迫时产生的低分子抗菌混合物^[17]. 异黄酮是通过苯丙酸途径和其它分支途径由 *L*-苯基丙氨酸和丙二酰辅酶 A 合成而来^[18]. 这三种酶在 SV14 的茎中也都为下调. 这说明在水稻茎中细胞壁的生长受限以及抵御功能下降引起了茎的缩短, 具体机制还需要进一步研究证明.

(3) 调控蛋白. 如光合系统 II 氧延伸复合物蛋白质前体 2, U1p1 蛋白酶类似蛋白和 *osr40c1* 蛋白. 光合系统 II 氧延伸复合物蛋白质前体 2 参与光合作用. 有研究表明, 光合系统 II 氧延伸复合物与氧延伸和光合系统 II 的稳定性有关^[19], 臭氧和二氧化硫抑制其作用^[20,21], 而盐促进其作用^[22]. *osr40c1* 蛋白属于一种可能具备结构功能的新植物蛋白家族, 它对水稻幼苗的根适应高渗环境有一定作用^[23]. 结构蛋白能防止水分丧失, 保持细胞硬度, 对植物组织对盐胁迫和渗透胁迫有重要作用. 泛素(Ub)和泛素类似蛋白(Ulp)在细胞中通过共价修饰来调节其它细胞蛋白质作用的功能. 选择性蛋白降解, DNA 修补, 细胞循环控制, 细胞程序性死亡和生物及非生物胁迫响应等几个细胞生理学过程都与此途径有关^[24]. 这几种蛋白在 SV14 茎中均表现为下调. 这些调控蛋白可能在茎的发育中起到一定的促进作用, 所以它们的下调影响了茎的发育, 从而使茎变短.

(4) 未知蛋白. 如 OSJNBa0039C07.13 蛋白. 其功能不详.

2.4 半定量 RT-PCR 分析

蛋白质点 40, 42 和 43 对应的基因半定量 RT-PCR 结果见图 3. 可以看出, 在基因水平, 这 3 个基因在 SV14 茎中都是上调的, 而在蛋白质水平上则正好相反. 可能是这 3 个基因在株 1S 中转录后的 mRNA 经翻译产生的蛋白质发生了翻译后修饰, 从而减少了对应蛋白的表达量. 其中蛋白质点 42 对应的基因表达量差异最明显, 说明它对应的基因在株 1S 中产生的蛋白质发生的翻译后修饰较多. 这些差异基因有可能与水稻矮化有关, 但还需要进一步的研究证明.

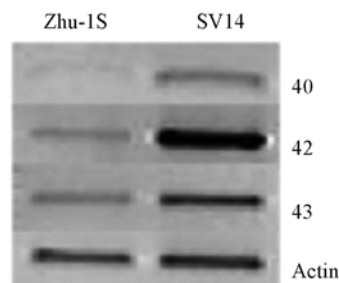


Fig. 3 Comparison of RNA expression pattern with that of its corresponding protein during Zhu-1S and SV14 stem

参 考 文 献

[1] YANG Yuan-Zhu (杨远柱), TANG Ping-Lai (唐平徠), YANG Wen-Cai (杨文才), *et al.*. Hybrid Rice (杂交水稻) [J], 2000, 15(2): 6-9

- [2] LIU Xuan-Ming(刘选明), YANG Yuan-Zhu(杨远柱), CHEN Cai-Yan(陈彩艳), *et al.*. Chinese J. Rice Sci. (中国水稻科学)[J], 2002, **16**(4): 321—325
- [3] LIANG Guo-Hua(梁国华), PAN Xue-Biao(潘学彪), GU Ming-Hong(顾铭洪), *et al.*. Chinese J. Rice Sci. (中国水稻科学)[J], 1995, **9**(5): 189—192
- [4] LI Xin(李欣), XU Jin-Feng(徐金凤), WANG Xing-Wen(王兴稳), *et al.*. Journal of Yangzhou University, Agricultural and Life Science Edition(扬州大学学报, 农业与生命科学版)[J], 2002, **23**(1): 40—44
- [5] Grog A., Obermaier C., Boguth G., *et al.*. Electrophoresis[J], 1999, **20**(4/5): 712—717
- [6] XIE Jin-Yun(谢锦云), LI Xiao-Lan(李小红), CHEN Ping(陈平), *et al.*. Chin. J. Biochem. Mol. Biol. (中国生物化学与分子生物学报)[J], 2003, **19**(2): 215—221
- [7] Meadus W. J.. Biological Procedures Online[J], 2003, **5**(1): 20—28
- [8] NIE Song(聂松), CHEN Ping(陈平), LIANG Song-Ping(梁宋平). Chem. J. Chinese Universities(高等学校化学学报)[J], 2005, **26**(1): 68—72
- [9] Minarik P., Tomaskova N., Kollarova M., *et al.*. Physiol. Biophys. [J], 2002, **3**: 257—265
- [10] Kiddle G. A., Bennett R. N., Hick A. J., *et al.*. Plant Cell Environ. [J], 1999, **22**: 433—445
- [11] Izydorczyk M. S., Biliaderis C. G.. Carbohydrate Polymer[J], 1995, **28**: 33—48
- [12] Faik A., Price N. J., Raikhel N. V., *et al.*. Proceedings of the National Academy of Sciences[J], 2002, **99**: 7797—7802
- [13] Bailey R. W., Hassid W. Z.. Proceedings of the National Academy of Sciences[J], 1966, **56**: 1586—1593
- [14] Ye Z. H., Kneusel R. E., Matern U., *et al.*. Plant Cell[J], 1994, **6**: 1427—1439
- [15] Maury S., Geoffroy P., Legrand M.. Plant Physiol. [J], 1999, **121**: 215—223
- [16] Paiva N. L., Edwards R., Sun Y., *et al.*. Plant Mol. Biol. [J], 1991, **17**: 653—667
- [17] Dixon R. A.. Nature[J], 2001, **411**: 843—847
- [18] Dixon R. A., Achnine L., Kota P., *et al.*. Mol. Plant Pathol. [J], 2002, **3**: 371—390
- [19] Sugihara K., Hanagata N., Dubinsky Z., *et al.*. Plant Cell Physiol. [J], 2000, **41**: 1279—1285
- [20] Agrawal G. K., Rakwal R., Yonekura M., *et al.*. Proteomics[J], 2002, **2**: 947—959
- [21] Rakwal R., Agrawal G. K., Kubo A., *et al.*. Exp. Bot. [J], 2003, **49**: 223—235
- [22] Kim D. W., Rakwal R., Agrawal G. K., *et al.*. Electrophoresis[J], 2005, **26**: 4521—4539
- [23] Moons A., Gielen J., Vandekerckhove J., *et al.*. Planta[J], 1997, **202**: 443—454
- [24] Hershko A., Ciechanover A.. Annu. Rev. Biochem. [J], 1998, **67**: 425—479

Proteomics Comparative Analysis of Thermo-sensitive Genic Male-sterile Rice Zhu-1S and Its Dwarfing Variant SV14 Stem

XIAO Xiao-Juan¹, YANG Yuan-Zhu², LIN Jian-Zhong¹, TONG Chun-Yi¹,
YANG Yue-Jun¹, HUANG Lü-Hong¹, LI Yan¹, LIU Xuan-Ming^{1*}

(1. College of Life Science and Biotechnology, State Key Laboratory of Chemo-Biosensing and Chemometrics,
Hunan University, Changsha 410082, China;

2. Academy of Seed Industry of Hunan Yahua, Changsha 410001, China)

Abstract The stem of thermo-sensitive genic male-sterile rice Zhu-1S and its dwarfing variant SV14 were separated by 2-DE. Twelve differential spots were identified by MALDI-TOF-MS. In the 2-DE protein patterns of SV14, one up-regulated proteins and eleven down-regulated proteins were identified. According to the functional classification of identified proteins, they were divided into the following categories: (1) energy metabolism; (2) secondary metabolism; (3) regulatory proteins; (4) proteins with unknown function. Furthermore, semi-quantitative RT-PCR was carried out to verify the different expressions. These results shows converse changes in expression at both the RNA and protein levels. The converse changes suggest that during the process of stem development some kind of post-transcriptional modification of these genes occurred. The results show that these proteins may be related to dwarfing rice stem and provide another pathway for finding the dwarfing gene.

Keywords Rice; Dwarfing variant; Proteomics; Semi-quantitative RT-PCR (Ed.: J, H, Z)