

营养缺乏胁迫下 水稻籽粒蛋白质组图谱分析

唐秀英¹, 邵彩虹², 谢金水^{2*}

(1. 江西农业大学 农学院, 江西 南昌 330045; 2. 江西省农业科学院, 江西 南昌 330200)

摘要: 从蛋白质组学角度对营养缺乏胁迫下水稻籽粒蛋白质组变化进行研究, 以揭示营养缺乏胁迫下水稻籽粒蛋白质组的表达差异。水稻生育后期设清水及常规营养液培养 2 种处理, 待水稻成熟时提取籽粒蛋白质, 经双向电泳分离得到电泳图谱 2 张, 应用 Imagemaster 2D Elite 5.0 软件对其进行蛋白质差异表达分析, 共得到 10 个发生差异表达蛋白质点。蛋白质是细胞功能的执行者, 受细胞功能或细胞环境变化的影响。因此, 上述蛋白质发生变化的原因应与水稻在营养缺乏胁迫下籽粒生长发育特性有关。

关键词: 水稻籽粒; 蛋白质组学; 2D 图谱

中图分类号: Q946.1; S511.01 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2011)02-0217-05

An Analysis on Grain Proteome Map of Rice under Nutrition Deficient Stress

TANG Xiu-ying¹, SHAO Cai-hong², XIE Jin-shui²

(1. College of Agronomy, Jiangxi Agricultural University, Nanchang330045, China; 2. Jiangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanchang330200, China)

Abstract: In order to reveal proteomic changes in rice grains under nutrition deficient stress, the protein expression profile of rice grain under nutrition deficient stress was studied by using the approach of plant proteomics. Rice was cultured with pure water and normal nutrient solution at the late development stage. The grain proteins were extracted from mature rice and investigated by 2-DE. 2 maps were obtained and analyzed by Imagemaster 2D Elite 5.0. Software quantification showed that 10 proteins' expression abundance changed in response to nutrient stress. Protein is the carrier of cell function and significantly influenced by the variation of cell function or intercellular environment, therefore, the cause of the above protein changes should be related to the development of rice grain under nutrition deficient stress.

Key words: rice grain; proteomics; 2-DE map

植物生长发育需要吸收各种必要的营养元素, 如果植物缺乏正常所需的养分时, 就会影响植物体内的生理代谢过程, 引起营养器官或生殖器官发育的不正常, 表现出特有的生理病态, 从而引起大量蛋白质种类和表达量发生变化^[1]。水稻在营养缺乏胁迫下, 提前衰老, 导致结实率偏低、空秕率较高等现象, 不仅影响了水稻的增产优势的发挥, 而且破坏了合理灌浆动态的形成, 降低了稻米的品质。廖铁军

收稿日期: 2010-07-26 修回日期: 2011-01-20

基金项目: 国家“十一五”科技支撑计划(2006BAD02A04)和江西省农业科学院创新基金(2008CBS003)

作者简介: 唐秀英(1985—), 女, 硕士生, 主要从事水稻衰老研究, E-mail: tangxiuyingxwg@126.com; * 通讯作者: 谢金水, 研究员, E-mail: xie1960@yahoo.com.cn。

等^[2]研究表明,适量供肥及合理施用方法可增加水稻叶绿素含量、提高同化效率、增加水稻穗长、穗粒数等。丁玉川等^[3]研究了 Mg、K 营养之间存在较强的拮抗效应, Mg、K 肥的平衡施用对提高水稻产量具有重要意义。前人大多数只是从生理学层面对营养胁迫下水稻各个器官的某些生理指标进行分析,无法揭示该胁迫下水稻本身发生变化的生理途径与分子机制。随着现代生物科学技术的进步,尤其是水稻基因组精细图谱问世以来,蛋白质组学被广泛应用于水稻特定组织的基因表达与转录分析及其响应逆境胁迫的研究^[4-8]。蛋白质是生理功能的执行者,是生命现象的直接体现者。邵彩虹等^[9-10]应用蛋白质组学技术对苗期和孕穗期水稻发育特性进行分析,分别发现了 41 个和 23 个发生差异表达蛋白点。齐耀程等^[11]运用蛋白质组学方法对水稻根尖质膜进行了研究,结果鉴定了 31 个质膜相关蛋白。本文应用蛋白质组学技术,并采用 Image Master™ 2D platinum 5.0 软件对电泳图谱进行分析,以期研究营养缺乏胁迫下水稻子粒生长发育变化的分子机制提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为杂交水稻隆平 001,由江西省农业科学院提供。将生长一致的 4 叶期水稻幼苗移栽至水培桶(10 L)中,每桶 4 株,营养液参照国际水稻研究所常规营养液配方^[12],每周更换 1 次营养液。待水稻孕穗期末期时一部分水稻继续每隔 1 周换 1 次营养液,而对另一部分换作清水作对照。并每隔 1 周分别测其根系活力和倒一叶的叶绿素含量。待水稻成熟后,选取籽粒,放入超低温冰箱中保存备用。

1.2 籽粒蛋白质的提取

称取籽粒 1 g 左右,剪碎,立即放入预冷的加有 0.5 g 聚乙烯吡咯烷酮的研钵中研磨成均匀粉末,研磨过程中不断加入液氮以保持样品蛋白质稳定性。研磨后,移到离心管中,用 TCA 丙酮法^[13]沉淀蛋白质,并于 4 °C 18 000 g 离心 15 min,直至样品的上清液呈无色。最后真空抽干所得的沉淀。得到的沉淀加入适量蛋白质裂解液(9 mol/L 脲,40 g/L CHAPS,40 mmol/L Tris,10 g/L DTT,5 g/L IPG Buffer)用超声清洗器于 20 ~ 25 °C 水浴超声 30 min,25 °C 18 000 g 离心 15 min,弃沉淀,上清即蛋白质样品溶液,于 -80 °C 贮存待用。

1.3 双向电泳

电泳前,蛋白质溶液先按 Ramagli 等^[14-15]介绍的方法,用牛血清蛋白作标准曲线测定蛋白质浓度。电泳的一向采用人工制备的胶条,样品蛋白的上样量为 180 μg,在 200、300、400、500、600 V 下分别聚焦 30 min;800 V 下聚焦 10 h;1 000 V 下聚焦 11 h。

进行第二向 SDS - PAGE 前,IPG 胶条用 10 mL 平衡液(60 mmol/L Tris - HCL(pH6.8),20 g/L SDS,50 g/L β - 巯基乙醇,φ = 0.1 甘油,0.5 g/L 溴酚蓝)平衡 30 min。SDS - PAGE 电泳参数为:先 10 mA/板,1 h,再 20 mA/板,约 5 h。

1.4 蛋白质成像与分析

电泳结束后,SDS - PAGE 胶经 φ = 0.5 甲醇,φ = 0.05 ~ 0.10 乙酸固定后,用改进后的硝酸银银染法染色约 30 min,改进后的硝酸银银染法染色液为:2 g/L AgNO₃,φ = 0.37 甲醛。染色后用双蒸水冲洗 2 次,加显色液显色,用 φ = 0.05 冰醋酸终止显色,用双蒸水冲洗 3 次,湿胶扫描成像。用 Image Master™ 2D platinum 5.0 软件分析得到的图谱。

表 1 根系活力
Tab.1 Root activity

处理 Treatments	根系活力 Root activity				
	第 0 周 The zero week	第 1 周 The first week	第 2 周 The second week	第 3 周 The third week	第 4 周 The forth week
全营养液培养 Cultured with total nutrient solution	0.168	0.163	0.158	0.152	0.143
纯水培养 Cultured with pure water	0.166	0.187	0.153	0.128	0.101

表2 叶绿素含量
Tab.2 Chlorophyll content

处理 Treatments	叶绿素含量 SPAD				
	第0周	第1周	第2周	第3周	第4周
	The zero week	The first week	The second week	The third week	The forth week
全营养液培养 Cultured with total nutrient solution	45.6	45.5	46.8	46.7	44.3
纯水培养 Cultured with pure water	45.5	45.1	44.4	41.8	38.6

2 结果与分析

表1和表2分别为全营养和营养胁迫下即用纯水培养的水稻的根系活力和叶绿素含量变化值。表2显示,营养胁迫初期(第7天),为适应养分缺乏的环境,水稻根系活力表现出显著增强的变化,以提高根系吸收养分效率,维持植株对养分的需求。随着环境中养分的持续减少,根系活力明显下降,至胁迫后第4周,营养胁迫下根系活力仅为初期的50%左右;而全营养培养下,水稻根系活力呈缓慢下降趋势,至第4周,根系活力为最初的85%。根系的衰老显著影响地上部叶片,水稻剑叶的SPAD值变化表明,在根系活力下降显著的后期,营养胁迫下叶片叶绿素降解加剧,而全营养液培养下水稻叶片叶绿素含量变化不明显,相对于全营养液培养,营养胁迫加快了水稻衰老进程。

将扫描得到的2D电泳图谱用Image Master™ 2D platinum 5.0自动检测蛋白质点,然后手工去除错误识别的杂点。并根据已知的某几个蛋白质斑点的等电点(PI)和相对分子量(MW)得到每个蛋白质斑点的近似PI和MW(表3)。图1为2种处理的电泳图谱,经软件统计分析,2张图谱中均可分辨出500多个稳定可重复的蛋白质点,这些蛋白质点在2D胶上分布较均匀,表观分子量(Mr)为8~120 kDa。其中大多数蛋白质的等电点(PI)分布在pH 4~8范围内,约占总数的90%以上。

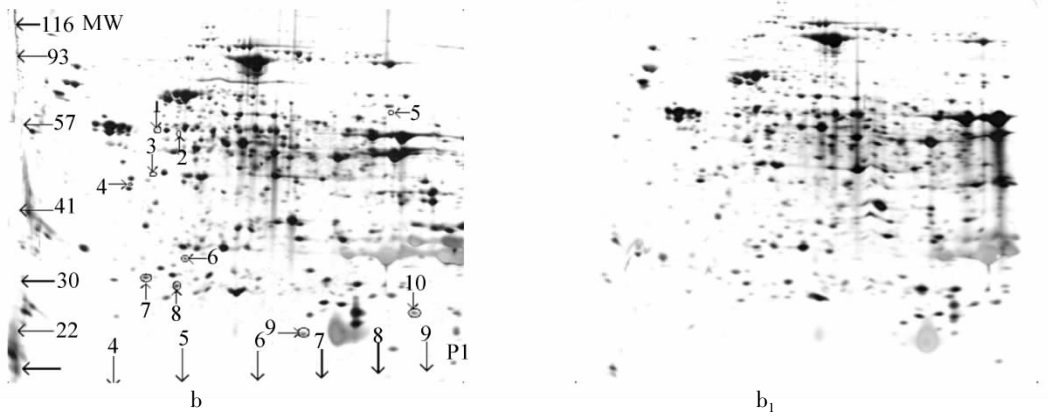
对2张图谱的蛋白质点的表达丰度(由软件根据蛋白质点的相对体积自动生成的数量值)进行差异检测,共得到10个明显的差异蛋白质点,其表达丰度见表4。10个蛋白质点的表达量比较分析表明,在b₁中,有4个新增的蛋白质点(编号2、3、4、5);1(编号10)个蛋白质点消失;2个蛋白质点(编号1、6)表达量上调;3个蛋白质(编号7、8、9)表达量下调。图2为部分差异蛋白质点的放大图。图3为部

表3 差异点的近似分子量和等电点
Tab.3 Approximate molecular weight and Isoelectric point of differential protein spots

编号 Number	分子量/kDa Molecular weight	等电点 Isoelectric point
1	55	4.71
2	54	5.04
3	45	4.59
4	44	4.32
5	61	8.62
6	32	5.20
7	30	4.57
8	29	5.07
9	24	7.02
10	26	8.75

表4 籽粒差异蛋白质点表达丰度
Tab.4 Expression abundance (intensity of spots) of differential protein spots in rice grain

编号 Number	处理 Treatments	
	b	b ₁
1	27.9	55.7
2	0	71.6
3	0	91.2
4	0	58.0
5	0	99.5
6	93.2	113.0
7	124.0	36.8
8	124.0	29.2
9	98.6	17.0
10	88.7	0



b: 全营养液培养的水稻籽粒 2D 电泳图谱; b₁: 营养胁迫下培养的水稻籽粒 2D 电泳图谱。

b: 2-DE maps of proteomes in rice grain which has cultured with total nutrient solution; b₁: 2-DE maps of proteomes in rice grain which has cultured with pure water.

图1 蛋白质组 2D 电泳图谱

Fig. 1 2-DE maps of proteomes in rice grain

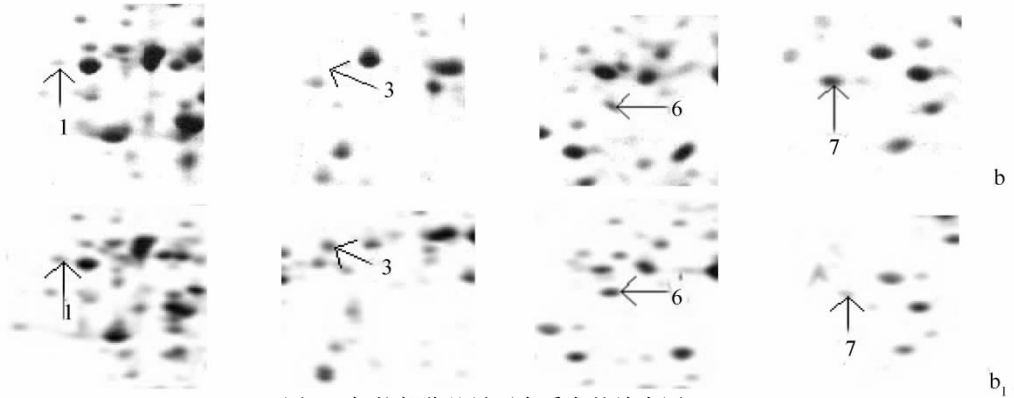


图2 籽粒部分差异蛋白质点的放大图

Fig. 2 Some differential expression protein spots in rice grain

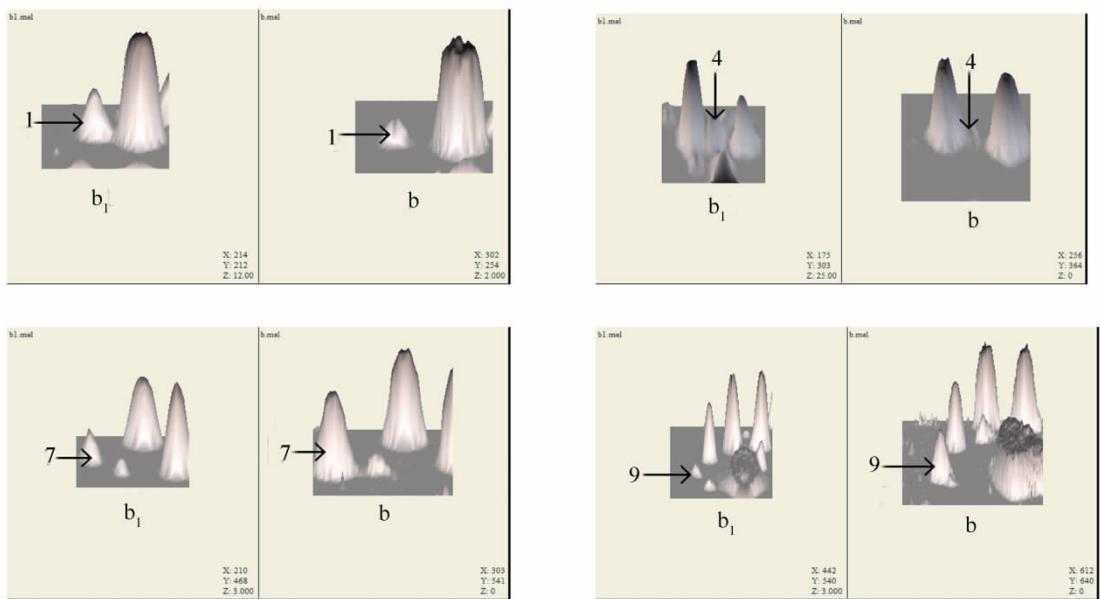


图3 籽粒部分差异蛋白质点的 3D 图

Fig. 3 The 3D of some differential expression protein spots in rice grain

分差异蛋白质点的3D图。

经 Image Master™ 2D platinum 5.0 的 scatters plot 分析, 2 种不同处理的籽粒样品图谱上的蛋白点相对体积相关系数只达到 0.259(图4), 表明水稻籽粒蛋白质的组成受营养缺乏胁迫的影响。

由此可见, 在营养缺乏胁迫的条件下, 引起基因表达的量 and 质的差异, 从而引起蛋白表达的差异。

3 讨论

本研究采用双向电泳技术, 并借助强大的 Image Master™ 2D platinum 5.0 软件分析比较营养胁迫和全营养液培养

的水稻籽粒的 2-DE 图谱, 筛选得到 10 个差异表达明显的蛋白质点。笔者将在下一步工作对这 10 个蛋白质点进行质谱鉴定, 以期揭示在营养缺乏胁迫下水稻籽粒生长发育变化的分子机制提供理论依据。

在水稻的生长环境中, 常常受到来自非生物因子的胁迫, 这些胁迫严重影响了水稻的生长发育和生存。营养胁迫只是土壤胁迫的一方面。在营养胁迫下, 水稻可通过根系形态和生理生化适应性变化机制来调节自身活化和吸收养分的强度, 而根的生长情况和活力水平直接影响地上部的营养状况和产量水平。在本研究中, 养分胁迫下根系活力和叶绿素含量在处理第 3 周和第 4 周均表现下降, 因此, 可推断根系活力和叶绿素含量的变化是造成籽粒蛋白差异表达的因素。本文仅对在营养胁迫下水稻的籽粒进行了研究, 如果要全面探讨水稻在营养胁迫下生长发育的变化机理, 尚需对水稻的其他组织器官进行研究, 目前有关这方面的研究正在进行中。

参考文献:

- [1] Suzuki K, Itai R, Suzuki K, et al. Formate dehydrogenase, an enzyme of anaerobic metabolism, is induced by iron deficiency in barley roots [J]. *Plant Physiol*, 1998, 116(2): 725-732.
- [2] 廖铁军, 赵竞英, 黄云, 等. 磷酸二氢钾铵对水稻的营养效应研究 [J]. *西南农业大学学报*, 2002, 24(2): 165-168.
- [3] 丁玉川, 罗伟, 徐国华. 镁、钾营养及其交互作用对水稻产量、产量构成因素和养分吸收的影响 [J]. *水土保持学报*, 2008, 22(3): 178-182.
- [4] Cui S X, Huang F, Wang J, et al. A proteomic analysis of cold stress responses in rice seedlings [J]. *Proteomics*, 2005, 5(12): 3162-3172.
- [5] Zhang Y P, Jin F, Chai X Q, et al. 2-DE method and proteomic map analysis in rice leaves under iron deficient stress [J]. *China J Bioinform*, 2004, 2(3): 6-10.
- [6] Antonius K, Michael P, Washburn B, et al. Proteomic survey of metabolic pathways in rice [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(18): 11969-11978.
- [7] Trisiriro J A, Jeyachok N, Chen S T. Proteomics characterization of different bran proteins between aromatic and nonaromatic rice (*Oryza sativa* L. ssp. indica) [J]. *Proteomics*, 2004, 4(7): 2047-2057.
- [8] Nazrul I, Lonsdale M, Upadhyaya N M, et al. Protein extraction from mature rice leave for two-dimensional gel electrophoresis and its application in proteome analysis [J]. *Proteomics*, 2004, 4(7): 1903-1908.
- [9] 邵彩虹, 谢金水, 黄永兰, 等. 孕穗期水稻不同功能叶的发育蛋白质组学分析 [J]. *中国水稻科学*, 2009, 23(5): 456-462.
- [10] Shao Cai-hong, Wang Jing-yuan, Lin Wen-xiong. Differential proteomic analysis of leaf development at rice (*Oryza sativa*) seedling stage [J]. *Agricultural Sciences in China*, 2008, 9(7): 1153-1160.
- [11] 齐耀程, 王宁, 程彦伟, 等. 水稻根尖质膜蛋白质组学研究方法的建立 [J]. *中国水稻科学*, 2008, 22(2): 111-117.
- [12] 毛达如. 植物营养研究方法 [M]. 北京: 中国农业大学出版社, 2000: 16.
- [13] Candiano G, Bruschi M, Musante L, et al. Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis [J]. *Electrophoresis*, 2004, 25(9): 1327-1333.
- [14] Wang X C, Li X F, Li Y X. A modified coomassie brilliant staining method at nanogram sensitivity compatible with proteomic analysis [J]. *Biotech Lett*, 2007, 29(10): 1599-1603.
- [15] 夏其昌, 曾荣. 蛋白质化学与蛋白质组学 [M]. 北京: 科学出版社, 2004: 278.

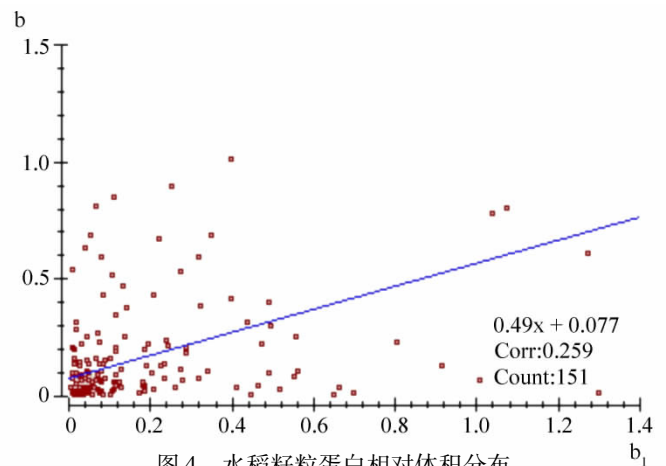


图4 水稻籽粒蛋白相对体积分布
Fig.4 V% Scatter plot of rice grain proteins