

文章编号 :1003- 8701(2011)02- 0001- 03

吉林省粳稻盐胁迫响应差异表型和蛋白质分析

侯军梅,王 丹,闫海生,马景勇*

(吉林农业大学农学院,长春 130118)

摘要:以吉林粳稻耐盐型吉 8945 和盐敏感型吉农大 808 为试验材料,通过双向聚丙烯酰胺凝胶电泳技术(2-DE)以及基质辅助激光解吸离子化时间飞行质谱(MALDI-TOF-MS/MS)技术,分别对早期幼苗(10d 苗龄)在正常和盐胁迫条件(100 mmol/L NaCl)下盐胁迫响应蛋白质组进行分析、鉴定,在叶片中,与对照相比,盐处理后吉 8945 有 21 个点明显上调,吉农大 808 中 35 个点上调表达,其中 12 个点在吉 8945 和吉农大 808 均上调表达且差异明显。选取其中 6 个点进行 MALDI-TOF-MS/MS 质谱分析,鉴定出两种蛋白质,分别为磷酸丙酮酸水合酶和核酮糖 1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶。

关键词:水稻;盐胁迫;蛋白质;双向电泳;MALDI-TOF-MS

中图分类号:S511

文献标识码:A

Analysis on Differential Phenotype and Protein of Rice in Response to Salt Stress in Jilin Province

HOU Jun-mei, WANG Dan, YAN Hai-sheng, MA Jing-yong

(Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: Two hybrid rice strains, 'Ji 8945' (salt-tolerant) and 'Jinongda 808' (salt-sensitive), were used in this experiment. Two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis and MALDI-TOF-MS/MS techniques were employed to isolate and characterize salt stress responsive proteins of hybrid rice seedlings in early period of 10-day old under normal and salt stress (100mM NaCl) conditions. The results showed that 21 or 35 up-regulated spots were significantly found in 'Ji 8945' and 'Jinongda 808' leaves compared with the control. Six of them were selected and identified by MALDI-TOF-MS/MS. Only two proteins were identified, i.e., ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and enolase.

Keywords: Rice; Salt stress; Protein; Two-dimensional electrophoresis; MALDI-TOF-MS

水稻是世界上近一半人口的主要粮食,而盐害是导致水稻减产的重要原因之一^[1]。在亚洲有 2 150 万 hm² 水稻受到盐胁迫的危害;在我国受干旱、盐侵害的稻田约占栽培面积的 1/5,其中在我国东北土壤盐碱化十分严重,而且,这种情况仍在不断加剧^[2]。因此,研究、培育耐盐品种,提高土地利用率

从而扩大水稻种植面积,提高水稻产量刻不容缓^[3]。

水稻不同生育阶段受盐碱危害的程度不同,通过观察水稻不同生长时期在盐胁迫条件下的蛋白质组表达情况,动态分析水稻的蛋白质组变化,对新逆境相关蛋白质进行分离与功能鉴定,这不仅能揭示参与胁迫耐受的蛋白质翻译后调控机制,而且可以增进对耐受胁迫分子机理的认识^[4]。同时也有利于进一步探索植物不同生育阶段的抗盐机理,而且对于今后培育水稻耐盐新品种、提高作物产量、品质、抗盐性以及推动我国农业的发展均具有重要意义^[5]。本试验从蛋白质组学角度分别对耐盐(吉 8945)和盐敏感(吉农大 808)水稻 10

收稿日期:2010-12-11

基金项目:吉林省科技支撑项目(20070227);长春市科技支撑项目(09KZ28)和吉林省财政厅作物育种项目(zx08001-027B)

作者简介:侯军梅(1984-),女,在读硕士,主要从事转基因水稻抗逆性方面的研究。

通讯作者:马景勇,研究员,E-mail:99n2@163.com

d 苗龄幼苗的叶片在 100 mmol/L NaCl 盐胁迫条件下差异表达的蛋白质进行了初步分析,同时对这与抗盐相关蛋白做了详细讨论。

1 材料与方法

1.1 试验材料

两个耐盐性不同杂交水稻供试品种吉 8945 (耐盐)和吉农大 808(盐敏感)由吉林农业大学提供。本试验材料于 2010 年 6~8 月在吉林农业大学组织培养室发芽盒中培养完成。

1.2 试验方法

1.2.1 幼苗的培养

精选吉 8945 和吉农大 808 种子各 100 粒,分别播于垫有两层湿润发芽纸的盒中,每盒 50 粒。设清水对照和 100 mmol/L NaCl 处理,水稻种子于 25℃光照条件下萌发培养 10d,每天更换盐溶液,以保持盐浓度不变。每天观察种子萌发及幼苗生长情况。待幼苗生长至 10 d(一叶一心)时取材,分别收集不同处理及不同品种的叶片和根材料,装入样品袋,液氮速冻后储存于 -80℃冰箱中备用。

1.2.2 吉林粳稻幼苗早期盐胁迫响应蛋白质分离与鉴定

采用冷丙酮/三氯乙酸沉淀法对粳稻品种吉 8945 和吉农大 808 不同处理下的叶片总蛋白提取;蛋白质浓度测定采用 Bradford(1976)法;双向电泳:第一向胶条水合及等电聚焦,以下步骤参照 BIO-RAD 公司 PROTAIN IEF Cell instruction Manual 操作程序及注意事项进行;第二向 SDS-PAGE 电泳,以下操作参照 BIO-RAD 公司 PROTAIN® Xi Cell and PROTAIN® Xi 2-D Cell instruction Manual 操作程序及注意事项进行;用 GS-800 光密度扫描仪对凝胶进行扫描(像素大小为 300 bpi,文件格式为 TIFF)。采用 Bio-Rad PDQuest (8.0) 分析软件进行凝胶图像匹配分析 Mascot (<http://www.matrixscience.com>) 数据库对 MALDI-TOF-MS 检测得到的肽质量指纹图谱进行检索。

2 结果与分析

2.1 盐胁迫下杂交水稻早期幼苗表型鉴定

在种子萌发阶段,由于吸水速度受盐碱抑制,

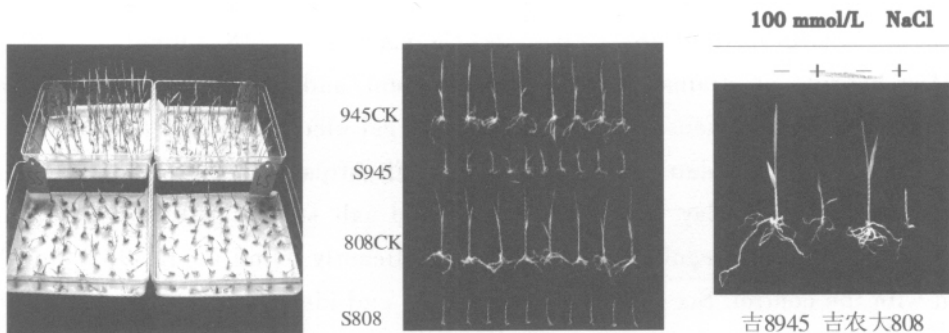


图 1 吉林粳稻早期(播后 10 d 苗龄)幼苗盐胁迫下的表型(945CK-吉 8945 对照组;S945-吉 8945 试验组;808 CK-吉农大 808 对照组;S808-吉农大 808 试验组)

种子发芽不齐,芽势降低。种子萌发后,对盐反应较敏感,表现芽尖枯黄、弯曲,迟迟不能绿化,幼苗期遇盐危害,自叶尖端渐向基部、由下部叶片渐向心叶,先发生卷叶,后渐枯黄,根系发育不良,根尖变黄褐色,秧苗全株几乎枯焦。在 100 mmol/L NaCl 胁迫条件下,杂交水稻幼苗的生长受到抑制,由于地下部直接与盐水接触,受到的伤害更大,导致根冠比同时减小。吉 8945 和吉农大 808 幼苗生长受抑制程度差异明显。吉 8945 幼苗长势优于吉农大 808,而且与吉农大 808 相比,吉 8945 根冠比在对照与盐处理下差异不明显。无论从幼苗长势上,还是根冠比值上来看,吉 8945 表现出较强的耐盐性,而吉农大 808 则对盐比较敏

感。见图 1,图 2。

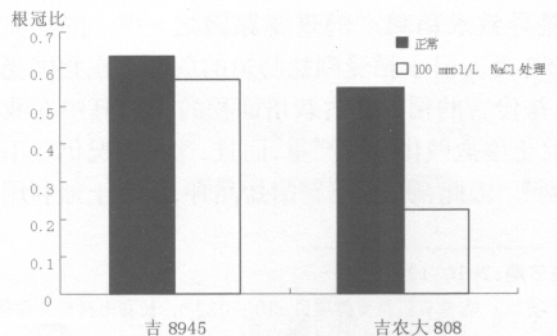


图 2 吉林粳稻早期幼苗在 100 mmol/L NaCl 处理下根冠比变化

2.2 盐胁迫响应差异蛋白质的分离与鉴定

2.2.1 地上部盐胁迫响应差异蛋白质的分离

在相同条件下对试验组及对照组分别进行 3 次双向电泳,其总蛋白分布模式极其相似,电泳图谱具有较好的重现性。采用 PDQuest 软件对吉 8945 和吉农大 808 分别在对照(945CK、808CK)和盐处理下(S945、S808)的双向电泳图进行斑点自动检测和人工去除,分别得到 544、495、526、

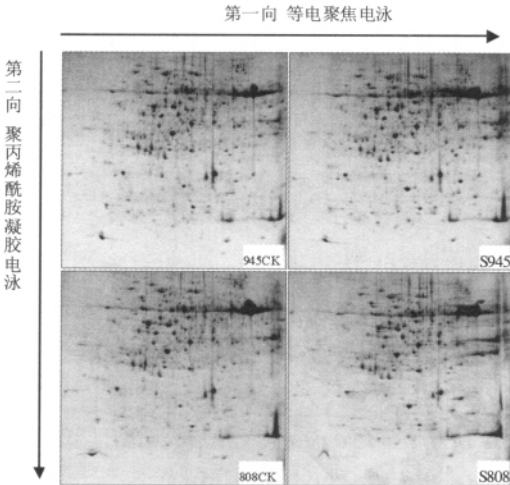


图 3 用 17 cm pH4-7 IPG 胶条分离的盐胁迫下吉林粳稻幼苗早期(10 d 苗龄)叶片 2-DE 图谱(945CK-吉 8945 对照组;S945-吉 8945 试验组;808 CK-吉农大 808 对照组;S808-吉农大 808 试验组)

2.2.2 地上部盐胁迫响应差异表达蛋白质的鉴定

对以上 6 个表达差异较明显、重复性好的蛋白质点进行 MALDI-TOF-MS/MS 分析,结果共鉴定出两种蛋白质,其中 5 个点均鉴定为 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶、1 个点为磷酸丙酮酸水合酶。这些蛋白主要参与植物碳水化合物和能量代谢的调节。

3 讨论

在本试验中,利用 2-D 电泳分别对盐胁迫条件下不同盐敏感性杂交水稻 10d 苗龄幼苗叶片和根蛋白质组进行了分离,并且对 6 个受盐胁迫差异表达明显且重复性好的蛋白质点进行 MALDI-TOF-MS 分析,共鉴定出 2 个蛋白质。鉴定出的蛋白名称及表达变化情况分别为 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(表达上调)、磷酸丙酮酸水合酶(表达上调),下面对这 2 种蛋白做出讨论。

3.1 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶

1,5-二磷酸核酮糖羧化酶(Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase,通常简称为 Rubisco)位于叶绿体基质中,是一种调节植物光合作用的关键酶,是植物蛋白中含量最丰富的蛋

440 个蛋白点。以对照作为参考胶对四副 2-D 胶图进行匹配分析,结果发现其双向电泳图谱格局基本一致,匹配率均达 90%以上。与对照相比,盐胁迫条件下,吉 8945 中有 21 个上调蛋白点,而吉农大 808 中有 35 个上调蛋白点。选取在 S808 和 S8945 中表达差异最显著的 6 个蛋白点进行质谱分析。见图 3,图 4。

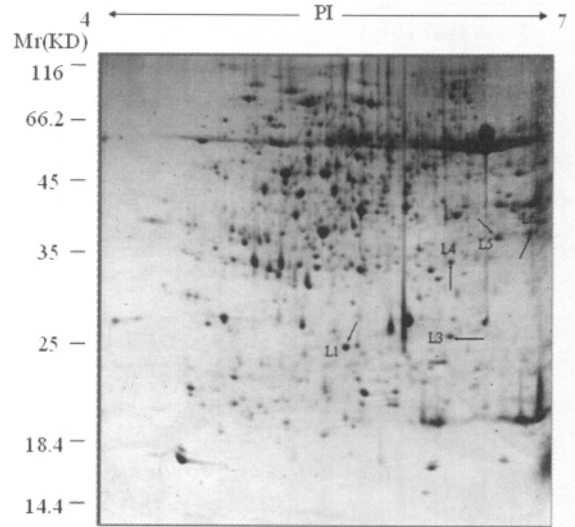


图 4 Master 参考胶(808CK),图中标记 6 个差异蛋白点分别为 L1、L2、L3、L4、L5、L6

白,约占绿叶总蛋白的 12%~35%,占绿叶可溶性蛋白质含量 50%左右。它参与了植物光合作用和光呼吸过程,在调节两者之间的关系中起重要作用。它可以催化 1,5-二磷酸核酮糖与二氧化碳的羧化反应或与氧气的氧化反应。Rubisco 酶作为光合碳同化的关键酶,其活性高低直接影响光合速率。高光林等^[6]研究了盐胁迫对果树光合生理的影响,结果表明,盐胁迫可降低人心果 Rubisco 酶的羧化效率,使叶绿体 CO₂ 分压减小,表明 Rubisco 酶活性受盐胁迫限制。此外,Hajduch 等研究了重金属如铜、钙、汞等对水稻叶片的形态学及内部蛋白表达变化的影响,结果发现 Rubisco 酶表达活性也受重金属胁迫抑制。推测它们可能通过抑制光合蛋白核酮糖二磷酸羧化酶加氧酶的表达而降低光合作用。同时胁迫诱导下产生了一系列的胁迫相关蛋白质。本试验中 Rubisco 酶大亚基在盐胁迫后均表达上调,分析其原因可能是由于 Rubisco 酶通过改变自身的表达量来调控一些关键酶的表达,促进光合作用,从而使植株获得一定的耐盐性^[7]。

3.2 磷酸丙酮酸水合酶

磷酸丙酮酸水合酶(也叫烯醇酶)(下转第 20 页)

- edge of hardy plant adaptations to freezing stress may help us to reduce winter damage[J]. *Science*, 1970, 169: 1260.
- [8] 洪剑明, 邱泽生. 植物抗性生理 (一)[J]. *生物学通报*, 1997, 32(5): 13-15.
- [9] 洪剑明, 邱泽生. 植物抗性生理 (二)[J]. *生物学通报*, 1997, 32(6): 6-8.
- [10] 汤学军, 傅家瑞. 植物胚胎发育后期富集(LEA)蛋白的研究进展[J]. *植物学通报*, 1997, 14(1): 13-18.
- [11] 何军贤, 傅家瑞. 种子 Lea 蛋白的研究进展[J]. *植物生理学通讯*, 1996, 32(4): 241-246.
- [12] 黄永芬, 付贵荣, 赵晓祥, 等. 美洲拟蝶抗冻蛋白基因(afp)导

- 入番茄的研究[J]. *生物化学杂志*, 1997, 13(4): 418-422.
- [13] 费云标, 黄涛, 舒念红, 等. 植物抗寒冻的分子遗传与基因工程[J]. *生物工程进展*, 1996, 16(1): 15-16.
- [14] 金海翎, 商慧深, 张庆琪, 等. 美洲拟蝶抗冻肽基因在 *E. coli* 中的表达[J]. *实验生物学报*, 1995, 28(1): 77-83.
- [15] 沈漫, 王明麻, 黄敏仁. 植物抗寒机理研究进展[J]. *植物学通报*, 1997, 14(2): 1-8.
- [16] 刘强, 赵南明, K Yamaguchi-Shinozaki, 等. DREB 转录因子在提高植物抗逆性中的作用 [J]. *科学通报*, 2000, 45(1): 11-16.

磷酸丙酮酸水合酶(也叫烯醇酶) (下转第 20 页)
(上接第 3 页) 是糖酵解途径中催化 2-磷酸甘油酸与磷酸烯醇式丙酮酸之间进行转化的酶。糖酵解途径是植物在逆境条件下物质和能量代谢的重要途径, 烯醇酶作为糖酵解途径的一个关键性的酶在抗逆反应中起着重要作用。烯醇酶(enolase)是糖酵解途径中的一个重要酶类, 其可以催化磷酸甘油酸脱水形成磷酸烯醇式丙酮酸, 该反应是糖酵解途径中唯一的一步脱水反应。相关研究表明, 植物在厌氧、高盐、干旱、高温、低温等胁迫条件下, 烯醇酶的表达量及酶活性均会产生相应的变化, 从而为逆境条件下植物产生大量自由基而导致的光合系统损伤的修复提供能量, 对于细胞活性的维持具有重要作用^[8]。

参考文献:

- [1] 黄大年, 王慧中, 郭龙彪. 水稻转基因研究及其育种[M]. 北京: 中国农业科技出版社, 2006: 90-91.
- [2] 管清杰, 罗秋香, 夏德习, 等. 水稻 OsAPX1 基因在烟草中的表达及其抗盐性研究[J]. *分子植物育种*, 2007, 5(1): 7.
- [3] 闫新甫. 转基因植物[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 197-206.
- [4] 方良俊, 符小琴, 叶群珊, 等. 诱抗剂对水稻幼苗耐盐性的诱导作用[J]. *核农学报*, 2006, 20(4): 273-276.
- [5] 陈志德, 仲维功, 杨杰. 水稻新种质资源的耐盐性鉴定评价[J]. *植物遗传资源学报*, 2004, 5(4): 351-355.
- [6] 李玉全, 张海艳, 沈法富. 作物耐盐性的分子生物学研究进展[J]. *山东科学*, 2002, 15(2): 8-14.
- [7] 杨永利, 富东英, 甄常生. 应用土壤盐碱改良剂控制水稻苗期盐害的研究[J]. *农业环境科学学报*, 2004, 23(3): 555-559.
- [8] 朱晓军, 杨劲松, 梁永超, 等. 盐胁迫下钙对水稻幼苗光合作用及相关生理特性的影响[J]. *中国农业科学*, 2004, 37(10): 1497-1503.