

王莹慧, 孙萌萌, 汪育文, 等. 高产杂交水稻两优培九衰老进程中剑叶差异蛋白质组学分析[J]. 江苏农业学报, 2018, 34(6): 1207-1216.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2018.06.002

高产杂交水稻两优培九衰老进程中剑叶差异蛋白质组学分析

王莹慧, 孙萌萌, 汪育文, 吴敏, 陈国祥

(南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210023)

摘要: 以杂交水稻两优培九孕穗期和乳熟期的剑叶为试验材料进行蛋白质组学分析。结果显示: 2个时期存在 78 个差异蛋白质, 其中 53 个被成功鉴定, 涉及 7 个功能类别, 即: 光合作用、能量代谢、蛋白质代谢、脂质代谢、碳水化合物及氨基酸代谢、信号转导和胁迫响应。细胞代谢网络表现出合成代谢下降, 物质转运活跃的趋势, 而乳熟期叶片线粒体氧化磷酸化受阻则表明分解代谢可能也有所下降。光合作用是差异蛋白质网络的核心, 乳熟期剑叶光系统 II 放氧中心复合物 (Oxygen-evolving complex, OEC)、烟酰胺腺嘌呤二核苷酸磷酸氧化还原酶 (Nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidoreductase)、ATP 合酶 (ATP synthase) 的表达量都显著降低, 同时伴随着类囊体膜脂合成相关的甘油-3-磷酸乙酰转移酶 (*GPAT3*) 的表达下调。碳同化阶段的核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶/加氧酶 (*RuBisCO*) 及其前体、活化酶 (*RCA*) 的表达也受到抑制。推测 Harpin 蛋白质结合蛋白 1 (Harpin binding protein 1, HrBP1) 表达量的减少与叶绿体内部抗氧化系统能效的降低有关, 防御蛋白下降造成的细胞内氧化失衡是水稻生长发育后期叶片衰老的重要诱因。

关键词: 杂交水稻; 剑叶; 衰老; 蛋白质组学

中图分类号: S511.01

文献标识码: A

文章编号: 1000-4440(2018)06-1207-10

Comparative flag leaf proteomic profiling of high-yielding hybrid rice Liangyoupeijiu during senescence

WANG Ying-hui, SUN Meng-meng, WANG Yu-wen, WU Min, CHEN Guo-xiang

(College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210023, China)

Abstract: In this study, the flag leaves of hybrid rice Liangyoupeijiu in booting stage and milk stage were used as materials for proteomic analysis. All 53 in 78 differently expressed proteins were identified, which were defined into seven functional categories, i.e., photosynthesis, energy metabolism, protein metabolism, lipid metabolism, carbohydrate and amino acid metabolism, signal transduction and stress response. Metabolic network were characterized by descended anabolism and

active transport events. The catabolism probably decreased when oxidative phosphorylation in mitochondria was inhibited at milk stage. Photosynthesis was in the core of protein interaction network, where oxygen evolving complex (OEC), nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidoreductase and ATP synthase were significantly reduced. Concomitantly, glycerol 3 phosphate acyltransferase (*GPAT3*) involving in thylakoid lipid synthesis was down-regulated. For carbon assimilation, expression of ribulose biphosphate carboxylase oxygenase (*RuBisCO*), *RuBisCO*

收稿日期: 2018-04-16

基金项目: 江苏省农业科技自主创新基金项目 [CX(17)3022]; 江苏省自然科学基金 (青年科技人才专项资金) 项目 (BK20171034); 江苏高校优势学科建设工程项目 (PAPD)

作者简介: 王莹慧 (1991-), 女, 河南郑州人, 硕士研究生, 研究方向为水稻光合特性。 (Tel) 18851988736; (E-mail) 1369923000@qq.com

通讯作者: 陈国祥, (E-mail) gxchenjnu@hotmail.com

precursor and *RuBisCO* activase (*RCA*) were also retarded. Impaired antioxidant system caused by less harpin binding protein 1 (HrBP1) led to disrupted redox poise, which could be an inducement of senescence of flag leaves.

Key words: hybrid rice; flag leaf; senescence; proteomics

剑叶全展后杂交水稻籽粒灌浆所需干物质的 60% 以上来自叶片的光合作用^[1], 但杂交水稻在生育后期存在若干限制性因素, 比如功能叶片提前衰老, 叶绿体加速降解, 光合能力显著降低等, 这在一定程度上影响着杂交水稻干物质的积累。因此, 深入探究杂交水稻剑叶衰老机制, 利用生物技术手段延缓或控制叶片早衰, 增强作物在灌浆充实期“源”的积累, 改善籽粒充实度, 这将对杂交水稻高产潜力的充分发挥具有重要意义^[2]。

在水稻叶片衰老研究领域, 近些年已经取得了重要进展, 但多数研究仅从水稻衰老生理或光合性状等方面开展, 从分子生物学层面精准揭示水稻叶片衰老机理的研究并不多见^[1,3-4]。随着分子生物学的迅速发展, 越来越多的研究者试图从分子水平上探究植物叶片衰老的机制^[1,5-7]。本研究借助蛋白质组学分析手段, 以超高产杂交水稻两优培九为研究材料, 探究水稻剑叶发育过程中的蛋白质表达差异性, 从蛋白质水平阐明水稻叶片发育以及衰老的机理, 以期揭示杂交水稻衰老的分子机理提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料种植

杂交水稻两优培九于 2013 年 5 月中旬种植于南京师范大学仙林校区植物园, 常规施肥管理, 及时防治病虫害。于 8 月 15 日和 9 月 25 日, 取孕穗期和乳熟期这 2 个生殖生长关键时期的水稻剑叶进行蛋白质组学分析。

1.2 叶绿素含量的测定

参照 Arnon^[8] 的方法测定剑叶叶绿素含量。

1.3 蛋白质组学分析

1.3.1 蛋白质的提取与浓度测定 采用三氯乙酸-丙酮沉淀法提取水稻剑叶蛋白质。称取 1.0 g 叶片, 加液氮充分研磨成粉末, 加入 10 ml 预冷的三氯乙酸沉淀液 (含 10.00% 三氯乙酸、0.07% 巯基乙醇的丙酮溶液) 充分混合, -20 ℃ 放置 1 h, 4 ℃、15 000 g 离心 15 min, 取沉淀。加入 10 ml 样品洗涤液 (含 0.07% 巯基乙醇的丙酮溶液) 悬浮振荡沉淀, -20 ℃

静置 1 h, 4 ℃、15 000 g 离心 15 min, 取沉淀并真空干燥成粉末状。以 20 ml/g 比率加入蛋白质溶解液 [7 mol/L 尿素、2 mol/L 硫脲、4.0% 3-[3-(胆酰胺丙基)二甲氨基]丙磺酸内盐 (CHAPS)、1% 二硫苏糖醇 (DTT)、0.5% 固相 pH 梯度胶条缓冲液 (IPG Buffer pH 4~7, GE Healthcare) 溶解样品粉末, 振荡混匀, 37 ℃ 温浴 1 h, 室温下 15 000 g 离心 10 min, 上清液即为蛋白质提取液。运用 Bradford 法测定蛋白质浓度, 以牛血清蛋白 (BSA) (Bio-Rad 公司产品) 作为蛋白质标准品。

1.3.2 等电聚焦电泳 用 pH 3~10、长 24 cm 的 IPG 胶条 (Bio-Rad 公司产品) 进行第一向等电聚焦, 每个样品均独立重复 3 次, 每次蛋白质上样量为 150 μg。聚焦程序为: 20 ℃ 被动水化 12 h, 250 V 线性聚焦 30 min, 1 000 V 快速聚焦 1 h, 10 000 V 线性聚焦 5 h, 10 000 V 快速聚焦 8 h, 500 V 快速聚焦 10 h。等电聚焦完成后, IPG 胶条分别在平衡液 I [0.375 mol/L Tris-HCl (pH 8.8)、6.000 mol/L 尿素、20.0% 甘油、2.0% SDS、2.0% DTT] 和平衡液 II [0.375 mol/L Tris-HCl (pH 8.8)、6.000 mol/L 尿素、20.0% 甘油、2.0% SDS、2.5% 碘乙酰胺] 中平衡 15 min。在室温下进行 12% SDS-PAGE、600 V 恒压电泳分离, 凝胶用参照 Chevallet 等^[9] 的方法进行银染。

1.3.3 凝胶图像处理 用 Epson Expression 11000XL 扫描仪扫描凝胶, 通过 PDQuest v7.4 (Bio-Rad) 软件分析孕穗期和乳熟期蛋白质表达谱的差异, 以及差异蛋白质的名称、分子量和等电点。在 3 次重复中均出现, 且丰度变化 ≥ 2 倍, 同时 *t* 检验满足 $P < 0.05$ 的蛋白质点作为差异蛋白质点。

1.3.4 胶内酶解 挖取差异蛋白质凝胶置于 96 孔板中, 加入 ddH₂O 超声波清洗 5~10 min, 加 50 μl 乙腈脱水至胶粒彻底变白, 真空抽干 5 min, 加入 50 μl 处理液 I [10 mmol/L DTT、25 mmol/L NH₄HCO₃], 56 ℃ 水浴 1 h, 冷却至室温, 吸干, 迅速加入 50 μl 处理液 II [55 mmol/L 碘乙酰胺、25 mmol/L NH₄HCO₃], 25 ℃ 避光 45 min, 加入 25 mmol/L NH₄HCO₃、50% 乙腈洗脱, 至胶粒完全变白, 真空抽干 5 min, 每孔加 2~3 μl

10 ng/ μ L胰蛋白酶液(用 25 mmol/L NH_4HCO_3 配制), 4 $^{\circ}\text{C}$ 静置 30 min, 吸去剩余酶液, 加入 10~15 μ L 25 mmol/L NH_4HCO_3 覆盖胶粒, 37 $^{\circ}\text{C}$ 温浴, 过夜(10~14 h), 加 0.1% 三氟乙酸(TFA)以终止酶解反应, 振荡离心, 用于质谱分析。

1.3.5 质谱分析 使用基质辅助激光解吸电离串联飞行时间质谱分析仪(MALDI-TOF/TOF, 型号 Ultraflex II)进行肽质量指纹图谱(Peptide mass fingerprint, PMF)鉴定。所得 PMF 图谱用 Flexanalysis 3.0 软件处理, 肽段检测算法为 SNAP 算法, 信噪比(S/N)、质量因子的域值分别为 1.5 和 50.0, 用胰蛋白酶(Porcine trypsin)的自解片段(Trypsin, $m/z=842.5094$ 、 2211.104)作为内参校准。用 Matrixscience 网站的站内 Mascot 查找系统对肽质量指纹谱进行数据库检索(<http://www.matrixscience.com>)。检索要求: 误差允许范围(Mass tolerance) 0.01%, 可以有 1 个氨基酸的误切(Miss cleavage), 修饰包括半胱氨酸的甲酰化(Carbamidomethyl)和甲

硫氨酸的氧化(Methionine oxidation), 实验和理论肽质量指纹谱匹配的肽段至少有 5 个。

1.3.6 生物信息学分析 通过 UniProtKB (<http://www.uniprot.org>) 数据库对鉴定的差异蛋白质进行分子功能和细胞定位分析。将鉴定的差异蛋白质通过 UniProtKB 的 Blast 功能搜索定位到相应的拟南芥同源基因, 并使用 GeneMania (<http://genemania.org>) 进行蛋白质网络互作预测。

2 结果与分析

2.1 杂交水稻两优培九剑叶衰老过程中叶绿素含量的变化

叶绿素作为吸收和传递光能的主要功能载体, 在叶片衰老过程中逐渐被降解, 叶色变黄。两优培九剑叶全展后, 叶绿素总含量和叶绿素 a/b 值均呈现出逐渐下降趋势且下降幅度显著(图 1)。由此可见, 水稻剑叶全展后叶片逐渐进入衰老状态。

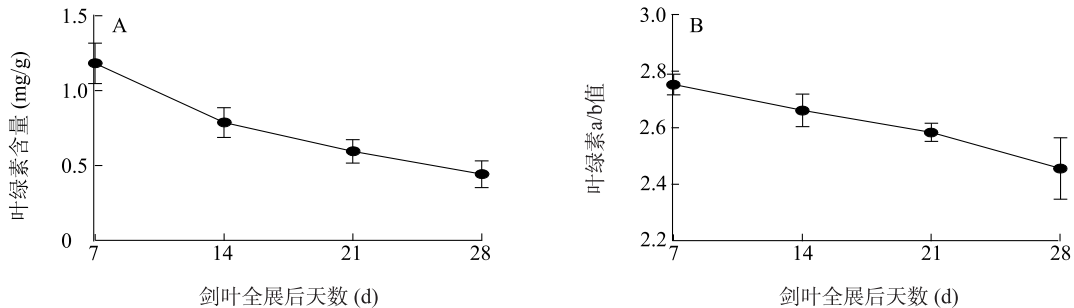


图 1 杂交水稻两优培九剑叶全展后叶绿素含量变化

Fig.1 Changes of chlorophyll II content of flag leaves of hybrid rice Liangyoupeijiu during days after full expansion

2.2 杂交水稻两优培九剑叶衰老过程中蛋白质表达谱的变化

在 3 张重复试验的等电聚焦电泳凝胶上都可以检测到超过 1 000 个清晰的蛋白质点(图 2)。对孕穗期和乳熟期 2 个时期的凝胶图像进行对比和解析, 共发现 78 个蛋白质点表达谱存在差异。与孕穗期(剑叶全展后 7 d)相比, 乳熟期(剑叶全展后 28 d)有 21 个蛋白质点表达量增加, 57 个蛋白质点表达量下降。

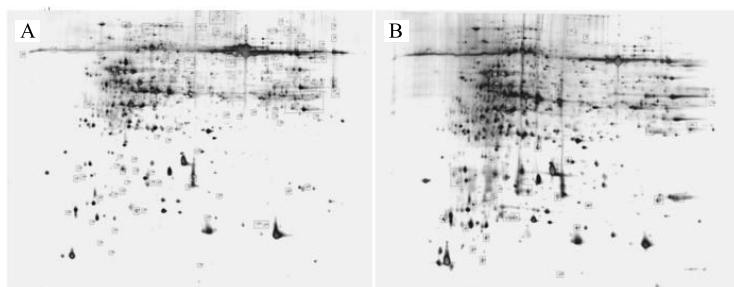
2.3 杂交水稻两优培九剑叶衰老过程中差异表达蛋白质的鉴定和功能分类

经过 MALDI-TOF/TOF 串联质谱分析, 乳熟期剑叶中 78 个差异表达蛋白质点中 53 个被成功鉴

定, 这 53 个蛋白质点的详细信息列于表 1。从表 1 中发现存在多个蛋白质点鉴定为同一蛋白质的情况, 比如核酮糖-1,5-二磷酸羧化/加氧酶激酶(蛋白质点 1 132 和 1 166), 核酮糖-1,5-二磷酸羧化/加氧酶激酶活化酶(蛋白质点 976 和 1 101), 核糖体蛋白(蛋白质点 1 156 和 1 136)。在其他研究中也有类似的现象^[10]。这可能是由蛋白质的降解或者甲基化、磷酸化修饰等原因造成。根据 UniProtKB (<http://www.uniprot.org/uniprot/>) 网站上每个蛋白质的注释及其参与的生化途径进行功能分类和亚细胞定位分类^[11]。按照其功能, 这些蛋白质被归于 8 类: 光合作用(Photosynthesis) 18.9%, 能量代谢(Energy metabolism) 3.8%, 蛋白质代谢(Protein metabolism)

15.1%, 脂质代谢 (Lipid metabolism) 3.8%, 碳水化合物及氨基酸代谢 (Carbohydrate and amino acid metabolism) 3.8%, 信号转导 (Signal transduction) 7.5%, 胁迫响应 (Stress response) 11.3%, 未知功能 (Unknown function) 35.8% (图 3-A)。通过亚细胞

定位发现, 这些蛋白质分别位于叶绿体、线粒体、过氧化物酶体、内质网、高尔基体、液泡、细胞质、细胞核和细胞膜上, 但是有 32.1% 的蛋白质在细胞中的具体位置和分布尚不清楚, 除此之外位于叶绿体中的蛋白质数目最多, 占 30.2% (图 3-B)。



A: 孕穗期 (剑叶全展后 7 d); B: 乳熟期 (剑叶全展后 28 d)。

图 2 杂交水稻两优培九生殖生长关键时期剑叶蛋白质双向电泳图

Fig.2 The two-dimensional electrophoresis protein maps of flag leaves of hybrid rice Liangyoupeijiu during the critical periods of reproductive growth

2.4 杂交水稻两优培九剑叶衰老过程中差异蛋白质的表达变化

2.4.1 光合相关蛋白质的表达变化 通过蛋白质组学分析发现, 乳熟期剑叶中与光合作用相关的蛋白质整体表达下降 (表 1)。光反应相关蛋白质 CP23 蛋白 (Chloroplast 2.3×10⁴ polypeptide of photosystem II)、放氧复合体蛋白 1 (Oxygen-evolving complex protein1)、铁氧化还原蛋白-NADP (H) 氧化还原酶 (Putative ferredoxin-NADP (H) oxidoreductase)、ATP 合酶 CF1β 亚基 (ATP synthase CF1 beta subunit, ATPB) 和 *atpB* 基因编码产物 (*atpB* gene product) 的表达下调, 碳固定与转化的相关蛋白质 *RuBisCO* 酶大小亚基及其前体和 *RuBisCO* 活化酶及其小同工型前体的表达也呈现下降趋势。

2.4.2 代谢相关蛋白质的表达变化 植物的生长发育过程伴随着氨基酸、蛋白质、糖类和脂质的代谢。乳熟期剑叶中与细胞代谢相关的蛋白质胍脂合成酶 (*GSL11*)、半胱氨酸合成酶 (*OASA1*)、甘油-3-磷酸乙酰转移酶 (*GPAT3*) 表达下调, 同时光合相关蛋白质表达也下降, 说明叶片衰老过程中蛋白质合成受阻。此外, 核蛋白质合成的 60S、40S、质体及线粒体蛋白质合成的 30S 和 50S 相关

蛋白质表达量降低, 例如核糖体蛋白 S19 (Ribosomal protein S19)、核糖体蛋白 L1 家族蛋白 (Ribosomal protein L1 family protein)、核糖体蛋白 S3 (Ribosomal protein S3) 和糖基化修饰相关的 *N*-糖胺酰转移酶 (*CGL1*) 表达量也下降, 而蛋白质转运相关的 Ras 蛋白 (*RABA5C*) 及脂质转运有关的磷脂转运 ATP 酶 2 (*ALA2*) 含量上升。

2.4.3 信号转导及胁迫响应相关蛋白质的表达变化 植物叶片衰老过程中, 细胞与细胞器的结构与功能发生一系列改变, 包括丙二醛和活性氧的产生, 叶绿体类囊体膜完整性的破坏, 膜脂过氧化严重等。为了抵御过氧化造成的损伤, 植物大量表达与逆境胁迫、防御相关的蛋白质。本研究中, 乳熟期剑叶中过氧化物酶 21 和转录因子类似 R2R3MYB 结构域蛋白 (Similar to R2R3MYB-domain protein) 表达量都表现出上升的趋势, 但与胁迫响应相关的 Harpin 蛋白结合蛋白 1 (Harpin binding protein 1)、叶绿体 4.1×10⁴ RNA 茎环结合蛋白 b (Chloroplast stem-loop binding protein of 4.1×10⁴ b) 和 S 受体激酶 *PK3* 前体样蛋白 (S-receptor kinase *PK3*) 出现表达量下降趋势。在信号转导通路蛋白质方面, 形成素样蛋白 5 (Formin protein5) 和 Shaggy 相关的蛋白激酶 κ 也出现表达下调。

表 1 通过质谱分析鉴定的 53 个水稻剑叶差异表达蛋白质的具体信息

Table 1 Detailed information of the fifty-three differently expressed proteins of rice flag leaves identified by mass spectrometry

功能	点号	蛋白质 含量 变化	登陆号	等电 点	分子 量 ($\times 10^3$)	得分	匹配 数	覆盖率 (%)	蛋白质名称	亚细胞 定位	同源基因
光合作用 相关蛋白质	163	上调	gi1164375543	5.56	20.02	86	15	68	叶绿体光系统 II 2.3×10^4 蛋白质	叶绿体	<i>At1g06680</i> (<i>PSBP</i>)
	439	下调	gi1149392725	5.10	30.59	92	16	47	二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶活化酶	叶绿体	<i>At2g39730</i> (<i>RCA</i>)
	544	下调	gi11739292	5.10	26.50	85	17	45	放氧复合体蛋白 1	叶绿体	<i>At5g66570</i> (<i>PSBO</i>)
	976	下调	gi113569643	4.78	21.74	81	12	51	二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶活化酶	叶绿体	<i>At2g39730</i> (<i>RCA</i>)
	1001	下调	gi1162733297	5.59	52.39	122	26	46	RuBisCO 活化酶小同工型前体	叶绿体	<i>At2g39730</i> (<i>RCA</i>)
	1125	下调	gi1141052915	7.98	41.09	42	10	23	假定的铁氧化还原蛋白-NADP(H) 氧化还原酶	叶绿体	<i>At1g20020</i> (<i>LFNR2</i>)
	1132	下调	gi11312204666	6.07	4.919	31	4	67	二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶大亚基	叶绿体	<i>AtCg00490</i> (<i>rbcL</i>)
	1166	下调	gi1110288945	8.51	40.76	84	13	29	二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶长链前体	叶绿体	<i>AtCg00490</i> (<i>rbcL</i>)
	1174	下调	gi11552857	5.30	53.95	40	12	32	<i>atpB</i> 基因编码产物(叶绿体)	叶绿体	<i>AtCg00480</i> (<i>atpB</i>)
	1196	下调	gi111466794	5.47	54.03	118	25	42	ATP 合酶 CF1 的 β 亚基	叶绿体	<i>AtCg00480</i> (<i>atpB</i>)
能量代谢 相关蛋白质	996	下调	gi1125564321	5.35	40.35	62	10	21	假定蛋白 OsI_31986(丙酮酸脱氢酶 E1 的 β 亚基, 线粒体)	线粒体	<i>At5g50850</i> (<i>MAB1</i>)
	1223	下调	gi1115454943	5.86	82.14	59	16	20	线粒体的 NADH-泛醌氧化还原酶 7.5×10^4 亚基前体	线粒体	<i>At5g37510</i> (<i>EMB1467</i>)
蛋白质代谢 相关蛋白质	89	上调	gi11213601	10.28	10.65	54	8	62	核糖体蛋白 S19, 部分(叶绿体)	叶绿体	<i>ATCG00820</i> (<i>rps19</i>)
	109	上调	gi11222640895	5.97	44.53	45	11	21	假定蛋白 OsJ_28001(Ras 相关蛋白 RABA5c)	高尔基体	<i>At2g43130</i> (<i>ARA-4</i>)
	264	上调	gi1125600937	8.44	16.80	44	6	36	假定蛋白 OsJ_24969	质膜	<i>At3g09770</i> (<i>LOG2</i>)
	1027	下调	gi11297597994	9.90	10.51	46	7	59	核糖体蛋白 L1 家族蛋白	细胞质	<i>At1g14320</i> (<i>RPL10A</i>)
	1111	下调	gi11297607886	6.57	9.35	41	4	41	Os08g0113300 蛋白	细胞质	<i>At3g07370</i> (<i>CHIP</i>)
	1120	下调	gi1125525322	6.24	48.93	43	12	23	假定蛋白 OsI_01316(SAD1/UNC-84 结构域蛋白 1)	细胞核	<i>At5g04990</i> (<i>SUN1</i>)
	1143	下调	gi11218191883	5.86	39.14	42	11	27	假定蛋白 OsI_09579(<i>N</i> -糖酰胺转移酶)	高尔基体	<i>At4g38240</i> (<i>CGL1</i>)
	1156	下调	gi11223927404	10.00	17.50	33	4	26	核糖体蛋白 S3	叶绿体	<i>AtCg00800</i> (<i>rps3</i>)
脂质代谢 相关蛋白质	1178	下调	gi11297597994	9.90	10.51	46	7	59	核糖体蛋白 L1 家族蛋白	细胞质	<i>At1g14320</i> (<i>RPL10A</i>)
	29	上调	gi1125604750	4.99	18.98	47	7	35	假定蛋白 OsJ_28405(磷脂转运 ATP 酶 2)	内质网	<i>At5g44240</i> (<i>ALA2</i>)
碳水化合物及 氨基酸代谢 相关蛋白质	1084	下调	gi1125525211	8.83	60.63	52	11	7	假定蛋白 OsI_01201(可能的甘油-3-磷酸酰基转移酶)	叶绿体/ 线粒体/ 内质网	<i>At4g01950</i> (<i>G3PAT</i>)
	1088	下调	gi1153791819	5.27	37.36	51	8	16	假定的半胱氨酸合酶	细胞质	<i>At4g14880</i> (<i>OASA1</i>)
	1126	下调	gi11670441572	9.58	1.46	35	5	42	假定胍胍质合酶 6	质膜	<i>At3g59100</i> (<i>GSL11</i>)

续表 1 Continued 1

功能	点号	蛋白质 含量 变化	登陆号	等电 点	分子 量 ($\times 10^3$)	得分	匹配 数	覆盖率 (%)	蛋白质名称	亚细胞 定位	同源基因
信号转导 相关蛋白质	1	上调	gi125596876	6.26	15.29	36	9	55	假定蛋白 OsJ_21000 (胚胎形成跨膜样蛋白)	质膜	-
	942	下调	gi1297727405	10.17	40.69	36	9	23	Os10g0205900 蛋白 (形成素样蛋白 5)	质膜	At1g26150 (PERK10)
	1096	下调	gi1658061195	7.11	28.83	81	11	38	预测的类 shaggy 相关的蛋白激酶 κ	质膜	At1g09840 (ASK10)
胁迫响应 相关蛋白质	4	上调	gi1253762014	6.72	30.04	45	10	30	过氧化物酶 21	过氧化物酶体	At1g05250
	17	上调	gi115489106	8.76	9.37	36	3	23	类似 R2R3MYB 结构域蛋白	细胞核	At3g06490 (MYB108)
	24	上调	gi150726261	7.01	9.21	42	12	11	有机阳离子转运体样蛋白	液泡膜	At3g20660 (OCT4)
	1078	下调	gi121902061	11.58	26.82	38	6	20	S 受体激酶 PK3 前体样蛋白	质膜	At1g11350 (SD113)
	1127	下调	gi115488340	8.59	41.62	72	9	16	Os12g0420200 蛋白 (叶绿体的 41 kDa RNA 茎环结合蛋白 b)	叶绿体	At1g09340 (CRB)
未知功能 蛋白质	1176	下调	gi138679325	8.92	28.36	49	4	20	harpin 结合蛋白 1	叶绿体	At3g23400 (FIB4)
	5	上调	gi151535907	6.39	9.65	51	7	55	假定蛋白	-	-
	16	上调	gi125572367	11.20	10.84	47	8	64	假定蛋白 OsJ_03809	-	-
	21	上调	gi150725661	8.65	6.07	56	5	74	假定蛋白	-	-
	66	上调	gi1297722251	4.44	12.71	37	5	34	Os03g0438400 蛋白	-	-
	71	上调	gi150725518	11.94	8.34	47	4	39	假定蛋白	-	-
	82	上调	gi1218190619	5.16	12.56	45	8	50	假定蛋白 OsI_06993	-	-
	102	上调	gi1297722285	12.08	5.76	44	5	66	Os03g0573750 蛋白	质膜	AT2G19350
	983	下调	gi1258644729	9.43	25.44	39	5	17	假定蛋白	-	-
	997	下调	gi1218186471	6.05	10.52	38	7	71	假定蛋白 OsI_37558	-	-
	1079	下调	gi190399326	5.13	11.98	33	7	53	H0313F03.10 蛋白	-	-
	1080	下调	gi149387835	9.95	20.17	37	8	32	假定蛋白	-	-
	1091	下调	gi138637146	10.50	20.72	45	9	38	假定蛋白	-	-
	1092	下调	gi119920114	9.40	68.03	49	15	18	假定的逆转录因子	细胞核	-
	1097	下调	gi116310988	11.46	25.89	41	6	26	OSIGBa0138E08-OSIG-Ba0161L23.4 蛋白	-	-
	1109	下调	gi1297721349	10.19	11.87	54	4	37	Os02g0580800 蛋白	-	-
	1134	下调	gi1218198007	11.15	15.73	48	5	28	假定蛋白 OsI_22617	-	-
	1137	下调	gi162733034	6.81	8.15	47	6	59	假定蛋白 LOC_Os11g14690	-	-
	1148	下调	gi1297721349	10.19	11.87	44	4	37	Os02g0580800 蛋白	-	-
	1149	下调	gi125577371	5.19	11.88	45	8	70	假定蛋白 OsJ_34120	-	-

登陆号、得分、匹配数和覆盖率通过 Mascot 软件从 NCBI nr、Swiss Prot 和 EST 数据库数据分析获得。覆盖率:蛋白质氨基酸序列被匹配的肽段所覆盖的百分比;得分:肽段分子量计算得分;匹配数:肽段氨基酸序列匹配数;-:未知。

2.5 杂交水稻两优培九剑叶衰老过程中差异蛋白质的互作网络分析

通过 UniProtKB 的 Blast 分析,我们得到了 34 个已鉴定蛋白质的拟南芥同源基因(表 1)。利用

GeneMANIA 对这些同源基因进行蛋白质互作预测,以寻找在孕穗期和乳熟期水稻叶片中蛋白质网络的关键节点蛋白质。蛋白质互作网络分析结果(图 4)显示,围绕光合作用的蛋白质,例如 RuBisCO 大亚

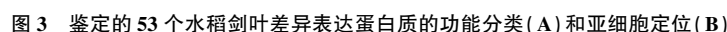


Fig.3 Functional classification and distribution (A) and protein subcellular locations (B) of all 53 identified differently expressed proteins of rice flag leaves

3 讨论

两优培九乳熟期剑叶衰老过程中,光合相关的蛋白质表达量降低,这些蛋白质涉及光反应各个途

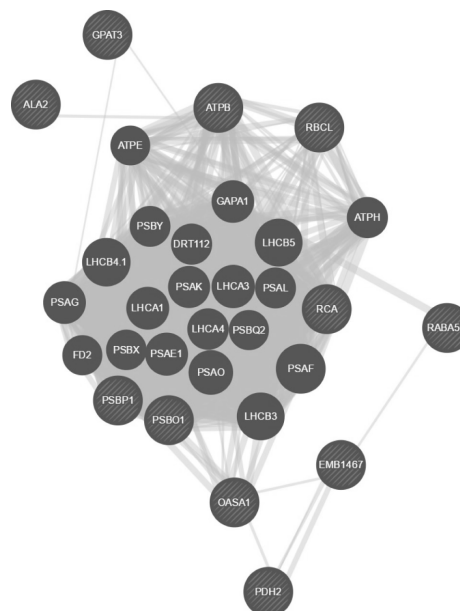


图4 水稻孕穗期和乳熟期剑叶差异表达蛋白质(拟南芥同源蛋白质)的互作网络

Fig.4 Interaction network of differentially expressed proteins (homologous proteins in *Arabidopsis thaliana*) in rice flag leaves during booting stage and milk stage

径。在暗反应中, RuBisCO、RuBisCO 前体和 RuBisCO 活化酶 3 个主要蛋白质表达量发生变化。RuBisCO 含量降低将削弱暗反应中 CO_2 的浓缩与固定, 进而不利于作物有机物的积累。RuBisCO 活化酶为 RuBisCO 的伴侣分子, 能够调节其活性, 其主

要作用是通过移除 RuBisCO 活化位点上的抑制性糖类实现对 RuBisCO 的激活^[20]。有研究结果表明,受某种因素影响,未活化的 RuBisCO 与 RuBP (1,5-二磷酸核酮糖) 紧密结合,形成 RuBisCO-RuBP 复合物,使 RuBisCO 钝化,不能进行反应;在光下, RuBisCO 活化酶水解 ATP 并使 RuBisCO-RuBP 复合物解离, RuBP 被释放; RuBisCO 被氨甲酰化,与 Mg^{2+} 形成三元复合物 (RuBisCO- CO_2 - Mg^{2+} , ECM), ECM 与 RuBP 结合即可启动羧化反应^[21]。RuBisCO 活化酶含量和活性的减少将加速 RuBisCO 酶含量与活性的下降^[22-23]。由此可以看出, RuBisCO 和 RuBisCO 活化酶的表达是相互关联的。这说明剑叶衰老时,光反应和暗反应过程的许多蛋白质表达量均有变化。

在细胞代谢方面,两优培九乳熟期剑叶在衰老进程中,表现出氨基酸、蛋白质、糖类和脂质的合成代谢下降,物质转运活跃的趋势。核糖体蛋白在蛋白质生物合成中发挥着重要作用,其在乳熟期剑叶中表达下调可能是 RuBisCO 大亚基和 RuBisCO 活化酶表达下调的原因之一。*N*-糖胺酰转移酶 (CGL1) 是蛋白质 *N* 型糖基化修饰的关键酶, *N*-糖胺酰转移酶表达的下调可能对糖蛋白的含量有调控作用。起蛋白质转运作用的 P 型环状核苷三磷酸水解酶超家族蛋白 (ARA4) 随着剑叶衰老而上调^[24]。此外, Keech 等^[25]证实拟南芥叶片的衰老进程伴随着细胞微管系统的解体。本研究中连接细胞核骨架和细胞骨架的 LINC 复合体组分蛋白 SAD1/UNC-84 结构域蛋白表达量的下降表明细胞骨架结构系统的变化也是叶片衰老的重要标志。

半胱氨酸合成酶 (*OAS1*) 的功能是催化半胱氨酸的合成,而半胱氨酸是合成抗氧化剂谷胱甘肽的重要底物之一^[26]。乳熟期剑叶中半胱氨酸合成酶 (*OAS1*) 的表达量下调,说明谷胱甘肽的合成逐渐减少。蛋白质网络分析结果显示, *OAS1* 和多个光合蛋白质 (LHCA1、LHCA3、PSBO1 等) 以及线粒体 NADH-辅酶 Q 脱氢酶 (*EMB1467*)、丙酮酸脱氢酶 (*PDH2*) 共表达,推测其在叶绿体和线粒体功能衰退方面存在一定影响。胼胝质合成酶 6 (*GSL11*) 通常参与细胞壁延伸,同时能够抵抗环境胁迫和病原体侵染,其表达量的下调说明水稻植株在衰老过程中抵御逆境的能力逐步下降^[26-28],这可能也是两优培九在生殖生长后期衰老加速的原因之一。

甘油-3-磷酸乙酰转移酶 (*GPAT3*) 是甘油磷脂合成步骤中第一步反应的关键酶,在甘油三酯 (TG) 和甘油磷脂 (Phosphatidylcholine) 的生物合成中扮演重要角色。乳熟期剑叶中 *GPAT3* 含量的减少从源头上造成类囊体膜的减少,继而导致叶片光合能力下降,推测叶绿体的衰老是膜-蛋白质系统协同变化的结果。然而,磷脂转运 ATP 酶含量上升则说明供给内膜系统的磷脂可能增加,推测在叶片衰老进程中,作为膜系统主要构成组分的磷脂系统在不同细胞区域的周转具有异质性。值得注意的是,脂质代谢与蛋白质代谢类似,均呈现出合成受阻而转运活跃的规律。

植物衰老进程中高分子物质的分解代谢越旺盛,消耗的能量则越多,而线粒体作为主要的产能细胞器,需保持活性以满足衰老过程中的能量需求,因此,与叶绿体不同,线粒体的衰老往往是滞后的^[29]。本研究中,水稻剑叶线粒体中的 NADH-辅酶 Q 脱氢酶和丙酮酸脱氢酶的表达量在乳熟期显著下降,限制了糖酵解产生的 NADH 和丙酮酸进入线粒体再利用,说明在叶片衰老后期线粒体氧化磷酸化效率降低可能与分解代谢逐渐削弱有关。

R2R3MYB 结构域蛋白是植物中广泛存在且功能多样的一类 MYB 蛋白质,参与次生代谢调节,细胞形态建成,激素刺激和逆境胁迫响应,分生组织形成及细胞周期控制等诸多生物过程, *R2R3MYB* 基因受各种逆境胁迫的诱导^[30-32]。 *R2R3MYB* 在乳熟期表达量上升,我们推测水稻衰老进程中, MYB 转录因子与序列为 TAACTG 的核心元件结合,激活多个功能基因发挥作用,延缓植物衰老^[33-36]。此外,作为液泡离子转运蛋白的重要类型之一,有机阳离子转运样蛋白 (Organic cation transporter-like protein) 的表达量增加表明其在水稻衰老进程中具有重要作用^[37]。 HrBP1 是植物叶绿体内产生的受体蛋白,能够与病原菌侵染植株时产生的 Harpin 信号蛋白特异性结合,乳熟期剑叶中 HrBP1 蛋白表达的显著下调可能导致叶绿体对活性氧的氧化压力变得敏感,促进光系统蛋白的降解,加速叶绿体的衰老进程^[38-39]。此外,先前的研究结果表明叶绿体 RNA 茎环结构结合蛋白 b (Chloroplast stem-loop binding protein of 41kDa b, CRB/CSP41b) 对叶绿体 RNA 的转录和翻译有调控作用^[40]。但近年来的研究结果显示 CSP41b 也是一个与干旱、盐渍等逆境响应相关

的蛋白质,可能与脱落酸(ABA)信号转导有关^[41-42]。本研究中,乳熟期剑叶CSP41b表达量的下调可能对叶绿体基因编码蛋白质有调控作用,且同叶绿体核糖体蛋白的翻译水平调控一致,但其对叶片衰老的具体调控机制还需进一步研究。随着生长发育进程,过氧化物酶表达量增加,推测过氧化物酶兼具两方面效应:一是作为抗氧化酶类,负责清理代谢产物H₂O₂自由基;二是过氧化物酶同时还有生成H₂O₂的功能^[43-44],可能在水稻剑叶衰老过程中促进H₂O₂生成,最后导致水稻细胞膜发生过氧化,结构完整性遭到破坏,表现为促进衰老的效应。因此,细胞氧化压力的增加和抗氧化系统性能的逐步降低是叶片衰老进程的重要特征。

参考文献:

- [1] 谢金水,邵彩虹,唐秀英,等.养分胁迫对籽粒灌浆期水稻叶片衰老影响的蛋白质组学分析[J].中国水稻科学,2011,25(2):143-149.
- [2] 孙波,周勇军,林拥军.一个水稻叶片衰老上调表达基因的初步生物学功能分析[J].作物学报,2012,38(11):1988-1996.
- [3] 阳成伟,彭长连,段俊,等.超高产杂交稻剑叶衰老过程中PSII功能的变化[J].热带亚热带植物学报,2004,12(2):147-152.
- [4] 郑圣先,聂军,戴平安,等.控释氮肥对杂交水稻生育后期根系形态生理特征和衰老的影响[J].植物营养与肥料学报,2006,12(2):188-194.
- [5] 李兆伟,熊君,齐晓辉,等.水稻灌浆期叶片蛋白质差异表达及其作用机理分析[J].作物学报,2009,35(1):132-139.
- [6] 王元琮,何冰,林峰,等.调控玉米阻止授粉后叶片衰老的QTL定位[J].江苏农业学报,2017,33(4):747-753.
- [7] MUSHTAQ R, KATIYAR S, BENNETT J. Proteomic analysis of drought stress-responsive proteins in rice endosperm affecting grain quality[J]. Journal of Crop Science and Biotechnology, 2008, 11(4):227-232.
- [8] ARNON D L. Copper enzymes in isolated chloroplasts; polyphenoloxidase in *Beta vulgaris* L. [J]. Plant Physiology, 1949, 24(1):1-15.
- [9] CHEVALLET M, LUCHE S, RABILLOU T. Silver staining of proteins in polyacrylamide gels Nat Protoc 1:1852-1858 [J]. Nature Protocol, 2006, 1(4):1852-1858.
- [10] 吕春芳.低光强对水稻光氧化突变体812HS生理及蛋白影响的研究[D].南京:南京师范大学,2016.
- [11] BRIESEMEISTER S, BLUM T, BRADY S, et al. SherLoc2: a high-accuracy hybrid method for predicting subcellular localization of proteins [J]. Journal of Proteome Research, 2009, 8(11):5363-5366.
- [12] QUIRINO B F, YOOSUN N, HIMELBLAU E, et al. Molecular aspects of leaf senescence [J]. Trends in Plant Science, 2000, 5(7):278-282.
- [13] LIM P O, WOO H R, HONG G N. Molecular genetics of leaf senescence in *Arabidopsis* [J]. Trends in Plant Science, 2003, 8(6):272-278.
- [14] YOSHIDA S. Molecular regulation of leaf senescence [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2003, 6(1):79-84.
- [15] ANDERSSON A, KESKITALO J, SJÖDIN A, et al. A transcriptional timetable of autumn senescence [J]. Genome Biology, 2004, 5(4):1-13.
- [16] BUCHANAN-WOLLASTON V. The molecular biology of leaf senescence [J]. Journal of Experimental Botany, 1997, 48(307):181-199.
- [17] VAN D G E, SCHWACKE R, SCHNEIDER A, et al. Transcription analysis of *Arabidopsis* membrane transporters and hormone pathways during developmental and induced leaf senescence [J]. Plant Physiology, 2006, 141(2):776-792.
- [18] ZHANG A H, LU Q T, YAN Y, et al. Comparative proteomic analysis provides new insights into the regulation of carbon metabolism during leaf senescence of rice grown under field conditions [J]. Journal of Plant Physiology, 2010, 167(16):1380-1389.
- [19] ZHANG C, YIN Y, ZHANG A, et al. Comparative proteomic study reveals dynamic proteome changes between superhybrid rice LYP9, and its parents at different developmental stages [J]. Journal of Plant Physiology, 2012, 169(4):387-398.
- [20] YAMORI W, CAEMMERER S V. Effect of rubisco activase deficiency on the temperature response of CO₂ assimilation rate and rubisco activation state: Insights from transgenic tobacco with reduced amounts of rubisco activase [J]. Plant Physiology, 2009, 151(4):2073-2082.
- [21] 裴正蕾.小麦 Rubisco 和 Rubisco 活化酶抗体的制备及应用 [D].扬州:扬州大学,2002.
- [22] SALVUCCI M E, PORTIS A R, OGRE W L. A soluble chloroplast protein catalyzes ribulosebiphosphate carboxylase/oxygenase activation in vivo [J]. Photosynthesis Research, 1985, 7(2):193-201.
- [23] CHAO M N, YIN Z T, HAO D R, et al. Variation in rubisco activase (RCA β) gene promoters and expression in soybean [*Glycine max* (L.) Merr.] [J]. Journal of Experimental Botany, 2014, 65(1):47-59.
- [24] UEDA T, ANAI T, TSUKAYA H, et al. Characterization and subcellular localization of a small GTP-binding protein (*Ara-4*) from *Arabidopsis*: conditional expression under control of the promoter of the gene for heat-shock protein HSP81-1 [J]. Molecular & General Genetics Mgg, 1996, 250(5):533-539.
- [25] KEECH O, PESQUET E, GUTIERREZ L, et al. Leaf senescence is accompanied by an early disruption of the microtubule network in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 2010, 154(4):1710-1720.
- [26] NAKAMURA, YAMAGUCHI Y, SANO H. Four rice genes encoding cysteine synthase: isolation and differential responses to sulfur, nitrogen and light [J]. Gene, 1999, 229(1/2):155-161.

- [27] ZAYALIEV R, UEKI S, EPEL B L, et al. Biology of callose (β -1, 3-glucan) turnover at plasmodesmata [J]. *Protoplasma*, 2011, 248 (1): 117-130.
- [28] XIE B, DENG Y F, KANAOKA M M, et al. Expression of arabidopsis callose synthase 5 results in callose accumulation and cell wall permeability alteration [J]. *Plant Science*, 2012, 183 (2): 1-8.
- [29] BLUEMKE A, SOMERVILLE S C, VOIGT C A. Transient expression of the *Arabidopsis thaliana* callose synthase PMR4 increases penetration resistance to powdery mildew in barley [J]. *Advances in Bioscience & Biotechnology*, 2013, 4 (8): 810-813.
- [29] RUBERTI C, BARIZZA E, BODNER M, et al. Mitochondria change dynamics and morphology during grapevine leaf senescence [J]. *Plos One*, 2014, 9 (7): e102012.
- [30] 乔孟, 于延冲, 向凤宁. 拟南芥 R2R3-MYB 类转录因子在环境胁迫中的作用 [J]. *生命科学*, 2009, 21 (1): 145-150.
- [31] JUNG C, SEO J S, HAN S W, et al. Overexpression of *AtMYB44* enhances stomatal closure to confer abiotic stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology*, 2008, 146 (2): 623-635.
- [32] ZHANG H, LIANG W Q, YANG X J, et al. Carbon starved anther encodes a MYB domain protein that regulates sugar partitioning required for rice pollen development [J]. *Plant Cell*, 2010, 22 (3): 672-689.
- [33] YOO J H, PARK C Y, KIM J C, et al. Direct interaction of a divergent CaM isoform and the transcription factor, MYB2, enhances salt tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2005, 280 (5): 3697-3706.
- [34] AGARWAL M, HAO Y J, KAPOOR A, et al. A R2R3 type MYB transcription factor is involved in the cold regulation of *CBF* genes and in acquired freezing tolerance [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2006, 281: 37636-37645.
- [35] XIE R J, ZHENG L, DENG L, et al. The role of R2R3MYB transcription factors in plant stress tolerance [J]. *Journal of Animal & Plant Sciences*, 2014, 24 (6): 1821-1833.
- [36] ZHANG L C, ZHAO G Y, XIA C, et al. A wheat R2R3-MYB gene, *TaMYB30-B*, improves drought stress tolerance in transgenic *Arabidopsis* [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2012, 63 (63): 5873-5885.
- [37] TORRE S, GISELE A M, MARCOS A G, et al. Identifying water stress-response mechanisms in citrus by in silico transcriptome analysis [J]. *Genetics & Molecular Biology*, 2007, 30 (3): 888-905.
- [38] CHEN Z, ZENG M J, SONG B A, et al. Dufulin activates HrBP1 to produce antiviral responses in tobacco [J]. *PLoS ONE*, 2012, 7 (5): e37944.
- [39] SINGH D K, MAXIMOVA S N, JENSEN P J, et al. FIBRILLIN4 is required for plastoglobule development and stress resistance in apple and *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2010, 154 (3): 1281-1293.
- [40] BOLLENBACH T J, SHARWOOD R E, GUTIERREZ R, et al. The RNA-binding proteins CSP41a and CSP41b may regulate transcription and translation of chloroplast-encoded RNAs in *Arabidopsis* [J]. *Plant Molecular Biology*, 2009, 69 (5): 541-552.
- [41] MIGUEL M D, CABEZAS J A, MARÍA N D, et al. Genetic control of functional traits related to photosynthesis and water use efficiency in *Pinus pinaster*, Ait. drought response: integration of genome annotation, allele association and QTL detection for candidate gene identification [J]. *BMC Genomics*, 2014, 15 (1): 464.
- [42] BAEK D, CHUN H J, KANG S, et al. A role for *Arabidopsis miR399f* in salt, drought, and ABA signaling [J]. *Molecules & Cells*, 2016, 39 (2): 111-118.
- [43] ALMAGRO L, GÓMEZ ROS L, BELCHINAVARRO S, et al. Class III peroxidases in plant defence reactions [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2009, 60 (2): 377-390.
- [44] DEL RÍO L A, SANDALIO L M, ALTOMARE D A, et al. Mitochondrial and peroxisomal manganese superoxide dismutase: differential expression during leaf senescence [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2003, 54 (384): 923-933.

(责任编辑:张震林)