

中国百种杰出学术期刊
中国精品科技期刊
中国科协优秀期刊
中国科学院优秀科技期刊
新中国 60 年有影响力的期刊
国家期刊奖

ISSN 1000-0933
CN 11-2031/Q

生态学报

Acta Ecologica Sinica

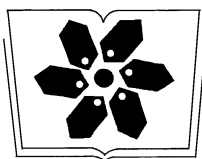
(Shengtai Xuebao)

第 30 卷 第 22 期
Vol.30 No.22
2010



中国生态学学会
中国科学院生态环境研究中心
科学出版社

主办
出版



中国科学院科学出版基金资助出版

生态学报

(SHENGTAI XUEBAO)

第 30 卷 第 22 期

2010 年 11 月 (半月刊)

目 次

高温对水稻叶片蛋白质表达的影响·····	曹云英,段 骅,王志琴,等 (6009)
茶园间作柑桔杨梅或吊瓜对叶蝉及蜘蛛类群数量和空间格局的影响·····	叶火香,崔 林,何迅民,等 (6019)
鼠尾藻生长与生殖的权衡·····	张树宝,唐永政,王志芳,等 (6027)
不同氮素水平下超高产夏玉米冠层的高光谱特征·····	陈国庆,齐文增,李 振,等 (6035)
近 100 年植被破坏侵蚀环境下土壤质量退化过程的定量评价 ·····	郑粉莉,张 锋,王 彬 (6044)
毛乌素沙地南缘沙漠化临界区域土壤养分的空间异质性·····	邱开阳,谢应忠,许冬梅,等 (6052)
CO ₂ 浓度倍增对干旱胁迫下黄瓜幼苗膜脂过氧化及抗氧化系统的影响 ·····	李清明,刘彬彬,艾希珍 (6063)
小兴安岭阔叶红松林粗木质残体空间分布的点格局分析·····	刘妍妍,金光泽 (6072)
光照对鄂东南 2 种落叶阔叶树种幼苗生长、光合特性和生物量分配的影响 ·····	杨 莹,王传华,刘艳红 (6082)
不同耕作和覆盖方式对紫色丘陵区坡耕地水土及养分流失的影响·····	林超文,罗春燕,庞良玉,等 (6091)
黄土残塬沟壑区流域次生植被物种分布的地形响应·····	王盛萍,张志强,张建军,等 (6102)
农村土地经营权流转对区域景观的影响——以北京市昌平区为例·····	刘 同,李 红,孙丹峰,等 (6113)
基于农户响应的北方农牧交错带生态改善策略·····	徐建英,柳文华,常 静,等 (6126)
滨岸不同植物配置模式的根系空间分布特征·····	仲启铖,杜 钦,张 超,等 (6135)
三江平原小叶章湿地剖面土壤微生物活性特征·····	杨桂生,宋长春,宋艳宇,等 (6146)
不同水分处理对湿地松幼苗生长与根部次生代谢物含量的影响·····	李昌晓,魏 虹,吕 茜,等 (6154)
生活污水慢渗生态处理对土壤及杨树生长的影响·····	白保勋,杨海青,樊 巍,等 (6163)
玉米连作及其施肥对土壤微生物群落功能多样性的影响·····	时 鹏,高 强,王淑平,等 (6173)
茶园 4 种半翅目主要害虫与其捕食性天敌的关系·····	周夏芝,毕守东,柯胜兵,等 (6183)
采煤塌陷地不同施肥处理对土壤微生物群落结构的影响·····	李金岚,洪坚平,谢英荷,等 (6193)
典型区域果园表层土壤 5 种重金属累积特征·····	杨世琦,刘国强,张爱平,等 (6201)
工业园区氮代谢——以江苏宜兴经济开发区为例·····	武娟妮,石 磊 (6208)
公路绿化带对路旁土壤重金属污染格局的影响及防护效应——以山西省主要公路为例·····	王 慧,郭晋平,张芸香,等 (6218)
奥运期间北京 PM _{2.5} 、NO _x 、CO 的动态特征及影响因素 ·····	曾 静,廖晓兰,任玉芬,等 (6227)
新疆绿洲农田土壤-棉花系统 9 种矿质元素生物循环特征 ·····	韩春丽,刘 娟,张旺锋,等 (6234)
甘肃省黄土高原旱作玉米水分适宜性评估·····	姚小英,蒲金涌,姚茹莘,等 (6242)
基于粪便 DNA 的马鹿种群数量和性比 ·····	田新民,张明海 (6249)
专论与综述	
水生态功能分区研究中的基本问题·····	唐 涛,蔡庆华 (6255)
土壤水分遥感监测研究进展·····	杨 涛,官辉力,李小娟,等 (6264)
中国北方气候暖干化对粮食作物的影响及应对措施·····	邓振镛,王 强,张 强,等 (6278)
问题讨论	
城市物质流分析框架及其指标体系构建·····	陈 波,杨建新,石 焱,等 (6289)
研究简报	
湖南会同不同退耕还林模式初期碳密度、碳贮量及其空间分布特征 ·····	田大伦,尹刚强,方 晰,等 (6297)

期刊基本参数:CN 11-2031/Q * 1981 * m * 16 * 300 * zh * P * ¥70.00 * 1510 * 32 * 2010-11

高温对水稻叶片蛋白质表达的影响

曹云英^{1,2}, 段 骅², 王志琴², 刘立军², 杨建昌^{2,*}

(1. 南通大学生命科学学院, 南通 226007; 2. 扬州大学江苏省作物遗传生理重点实验室, 扬州 225009)

摘要:为明确高温对耐热性不同水稻品种叶片蛋白质表达的影响,以耐热性不同的2个籼稻品种双桂1号(不耐热)和黄华占(耐热)为材料,分别于苗期、减数分裂期及抽穗(始穗后0—10 d)和灌浆早期(始穗后11—20 d)进行高温处理,之后取材并采用双向凝胶电泳技术研究高温对不同水稻品种叶片蛋白质表达的影响。结果表明,高温胁迫导致叶片中蛋白质的变化呈4种状况:新蛋白质的产生,一些蛋白质表达量上调,一些蛋白质的表达被抑制,一些蛋白质表达量下调。蛋白质表达变化在两品种以及4个处理时期的表现不同,总体表现为在热敏感品种中表达谱发生变化的蛋白质总数高于耐热品种。质谱分析表明,差异蛋白质主要涉及光合作用和信号转导,该类蛋白质在热敏感品种中表现为不表达或表达量下降,而在耐热品种则表现为有新诱导的蛋白质的产生或表达量上调,表明参与光合作用和信号转导的蛋白质在水稻耐热机制中发挥了重要作用。

关键词:高温;水稻;耐热性品种;叶片;蛋白质表达

Influence of protein expression in rice leaves under heat stress

CAO Yunying^{1,2}, DUAN Hua², WANG Zhiqin², LU Lijun², YANG Jianchang^{2,*}

1 College of Life Sciences, Nantong University, Nantong 226007, China

2 Key Laboratory of Crop Genetics and Physiology of Jiangsu Province, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China

Abstract: The global temperature has been continuously increasing in recent decades due to the explosion of population, the development of industries with emission of greenhouse gas, and excessive deforestation. High temperature in summer occurs more frequently and keeps longer in many regions of all over the world, leading to adverse effects on crop growth and development. Rice (*Oryza sativa* L.) is one of the most important staple food crops in China. The decrease in grain yield due to high temperature stress during the growth period has become a serious problem in rice production, especially in the Yangtze-Huaihe River Valley. Although effects of high temperatures on grain yield and quality have been studied, the mechanism involved in the injury of high temperature to rice growth is not understood. As proteomic approach is a new technique in plant stress physiology in recent years, this study investigated whether and how high temperature stress regulates protein expression in rice leaves. Two *indica* rice cultivars differing in heat tolerance, Shuanggui 1 (heat-sensitive) and Huanghuazhan (heat-tolerant), were pot-grown at Yangzhou University farm, Yangzhou, Jiangsu Province, China, and treated with high temperature stress at the stages of seedlings (during the 4th leaf, 38°C (day)/30°C (night)), meiosis (from 14 days before heading to the initial of heading, 35°C/25.6°C), heading (0—10 d after heading, 33.4°C/20.9°C) and early grain filling (11—20 d after heading, 33.4°C/20.9°C). The temperatures for controls were 25°C/20°C at the seedling stage, 32.7°C/25.6°C at meiosis, 29.9°C/20.9°C at the heading, and 29.9°C/20.9°C at the early grain filling stage. The protein expression in the leaf was observed by using two-dimensional gel electrophoresis with immobilized pH 4—7 gradients as the first dimension and sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) as the second dimension. The results showed that the changes in protein expressions under high temperature stress exhibited four statuses: some proteins were induced, some proteins were up-regulated, some proteins were inhibited, and

基金项目:国家自然科学基金项目(30671225, 30771274);江苏省自然科学基金项目(BK2009005);国家科技攻关计划项目(2006BAD02A13-3-2);南通市科技计划项目(AS2010017)

收稿日期:2010-04-05; 修订日期:2010-07-05

* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: jcyang@yzu.edu.cn

some proteins were down-regulated. Protein expressions varied with the treatment stages and the two cultivars. Among the four treatment stages, protein expressions induced by high temperature stress were the most at the early grain filling stage, followed by the seedling stage, the third at meiosis, and the least at the heading stage. Protein expressions were more in the heat-sensitive cultivar than in the heat-tolerant cultivar. The mass spectrometric analysis indicated that the differences in protein expressions were mainly those involved in photosynthesis and signal transduction, such as Os01g0791600, Os12g0291400, ankyrin-like protein, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (large subunit), Hypothetical protein OsI_22016, and Rubisco activase small isoform precursor. These proteins were inhibited or down-regulated in the heat-sensitive cultivar Shuanggui 1, but were induced or up-regulated in the heat-tolerant cultivar Huanghuazhan. The results suggest that proteins involved in photosynthesis and signal transduction play a major role in heat tolerance of rice. The possible regulatory mechanism of these proteins in rice leaves in response to high temperature was discussed.

Key Words: high temperature; rice; heat-tolerant cultivar; leaf; protein expression

由于温室效应加剧,全球气候变暖,高温热害在世界范围内频繁发生,严重影响了水稻的产量。我国是水稻生产和消费大国,一旦高温热害造成水稻大面积减产势必会影响粮食的安全生产。因此,了解高温对水稻生长发育的伤害机理及水稻对其适应机制显得尤其重要。

蛋白质组学研究是近年来发展起来的一种技术。环境胁迫可以引起植物体内蛋白质在种类和表达量上的变化,通过蛋白质组学可以揭示环境胁迫的伤害机制以及植物对环境的适应机制。如 Shen 等^[1]研究首次揭示了水稻叶鞘伤害信号应答过程中蛋白质的变化,发现伤害后至少有 10 个蛋白被诱导或上调,19 个蛋白被抑制或表达量下降,4 种蛋白质被证实与伤害反应直接相关。Zang 等^[2]报道,在水稻幼苗叶鞘基部中 26s 蛋白酶体调节亚基是一种渗透胁迫所产生的特定蛋白,同时渗透胁迫相关的蛋白大都存在于耐受胁迫的品种中。Majoul 等^[3]用蛋白质组学方法对热胁迫条件下六倍体小麦中水溶性蛋白组分的变化进行了研究,共鉴定出 42 个蛋白质点,其中部分为植物代谢途径中的酶,有 5 个热胁迫下高量表达的蛋白与一些小的热激蛋白存在相似性。目前,水稻蛋白质组学主要集中在对各个器官或组织蛋白质的基本表达模式的研究^[4-5],环境胁迫下水稻应答过程的比较蛋白质组学研究^[6-7]和亚细胞水平的蛋白质组研究^[8-9]等几个方面。与其它的逆境如盐胁迫^[10]、低温胁迫^[11]相比较,高温胁迫方面的研究还较少。

水稻在整个生长期经常会遭遇高温,在不同生育时期的高温胁迫下水稻可能会产生不同的响应,因此不可避免会影响蛋白质的表达。而叶片是水稻的主要光合器官,为水稻产量的形成提供了主要的物质基础。所以,高温胁迫必然影响叶片中蛋白质的表达。但是,不同时期的高温处理对水稻叶片蛋白质表达的影响及其品种间的差异目前尚未见报道。因此本研究以两个耐热性差异明显的水稻品种为材料,利用双向聚丙烯酰胺凝胶电泳与质谱分析相结合的方法,研究不同时期高温胁迫下水稻叶片的蛋白质表达的变化,揭示不同耐热品种应答高温胁迫的生理机制。

1 材料与方法

1.1 材料种植与处理

1.1.1 供试品种

供试品种为耐热型中粳品种黄华占和热敏感型中粳品种双桂 1 号。

1.1.2 种植方式

苗期种植方式是水培盆钵,营养液参照国际水稻研究所常规配方^[12],每 2d 更换 1 次营养液。减数分裂期及抽穗灌浆期种植方式见文献^[13-14],两试验均为土培盆钵,移栽前每盆施 2 g 尿素,磷酸二氢钾 (KH_2PO_4) 0.5 g 作基肥,移栽后 7 d 每盆施 0.5 g 尿素,穗分化期每盆施 0.6 g 尿素。其余管理按常规高产栽培。

1.1.3 高温处理

(1) 苗期处理

于人工气候箱中生长的小苗长至4叶期时进行高温处理,6 d后结束处理。处理温度为38℃(8:00—17:00)/30℃(17:00—8:00),以25℃/20℃为对照,光照强度 $500\ \mu\text{mol}\ \text{m}^{-2}\ \text{s}^{-1}$,相对湿度为75%—80%,每天光照12 h。

(2) 减数分裂期处理

当主茎穗进入减数分裂期(参照丁颖^[15]的划分法,根据解剖幼穗确定)时,将室外的试验盆钵移至玻璃温室内进行高温处理,至始穗期(自10%植株开始抽穗)结束处理,并移至室外继续生长。玻璃房内安装生物灯照明,以补充光源,使光强基本保持与室外一致。高温处理期间玻璃房内的日均温度为35.0℃/25.6℃(白天/夜间),以室外温度(32.7℃/25.6℃)为对照(CK)。相对湿度42%—92%,CO₂浓度与室外一致,为385—392 $\mu\text{mol}/\text{mol}$ 。

1.1.4 抽穗和灌浆早期处理

抽穗期将生长于室外整齐一致(10%抽穗)的稻株移至玻璃温室内进行高温处理,处理后再移至室外继续生长。10%植株开始抽穗至抽穗后10 d(抽穗期,T1)和抽穗后11—20 d(灌浆早期,T2)分2个时段进行高温处理,日均温度为33.4℃/20.9℃,以室外温度(29.9℃/20.9℃)为对照(CK)。相对湿度34%—95%,CO₂浓度与室外一致,为382—396 $\mu\text{mol}/\text{mol}$ 。

1.2 方法

1.2.1 取样

高温处理结束后,分别取苗期展开叶、减数分裂期心叶下第1展开叶、抽穗和灌浆早期剑叶,置液氮中冷冻后于-70℃冰箱中保存用于蛋白质的提取。

1.2.2 蛋白质的提取

蛋白质的提取参照Granier^[16]的方法采用TCA/丙酮法。称取冷冻叶片1.0—2.0 g,液氮研磨成粉末,将样品按1:4加入提取介质[0.03 mol/L Tris-HCl (pH 8.8),0.1 mmol/L EDTA (pH 8.0),0.5 mmol/L MgCl₂,0.6 mmol/L 抗坏血酸,1% PVP,1% 甘油,0.02% β -巯基乙醇],4℃,15 000 g,离心15 min,取上清液。加入4—6倍体积10%三氯乙酸溶液(丙酮作溶剂,含0.07% β -巯基乙醇),混匀,-20℃静置1 h以上。4℃,15 000 g,离心15 min,沉淀用80%冷丙酮3—6 mL洗涤3次,最后用冷丙酮-乙醚液(体积比为1:1)洗涤,沉淀经真空干燥,-70℃冰箱保存备用。

1.2.2 双向电泳

双向电泳(一向固相pH梯度等电聚焦和二向SDS-PAGE)参照Görg等^[17]的方法并稍作修改。蛋白质提取物用水化液(7 mol/L 尿素,2 mol/L 硫脲,4% CHAPS,0.001% 溴酚蓝,用前加入65 mmol/L DTT和0.2%两性电解质)充分溶解,12 000 r/min离心10 min。蛋白质含量采用Bradford方法^[18]测定。350 μL 蛋白质水化液(约含蛋白质约为1000 μg)加入IPG strip持胶槽内,将IPG非线性干胶条pH 4—7(11cm)去保护膜,胶面朝下,轻轻置入持胶槽中,覆盖一层矿物油盖好持胶槽盖子,置于IPGphor等电聚焦仪的电极板上,被动水化12—13 h,再在17℃下自动进行聚焦10.5 h,其中经过250 V 0.5 h、1 000 V 1 h,到达8 000 V 4 h,最后稳定在8 000 V 5 h。

等电聚焦结束后,迅速取出带样品的IPG胶条分别用平衡缓冲液A[6 mol/L 尿素,2% SDS,20% 甘油,2% DTT,0.05 mol/L Tris-HCl(pH 8.8)]、平衡缓冲液B(6 mol/L 尿素,2% SDS,20% 甘油,2.5% 碘乙酰胺,0.05 mol/L pH 8.8 Tris-HCl)各平衡15 min。将平衡后IPG的胶条移至SDS-PAGE(12% T, 2.6% C)胶面上端,并在其一侧加上低分子量的标准蛋白质,排净气泡,用1%琼脂糖凝胶封闭,20℃循环水冷却,用每块胶5 mA恒流电泳至溴酚蓝前沿移出IPG胶条后,换用每块胶20 mA恒流电泳直至溴酚蓝到达距胶底边约1 cm处。

电泳结束后,小心取下凝胶,切角作记号,用水洗3次,每次5 min,后放入考马斯亮蓝染色液Bio safe coomassie(购自BIO-RAD公司)至摇床上不断摇动,染色过夜,倾去染色液,再用水洗30 min至背景呈无色。用扫描仪(UMAX Powerlook III)将考染显色凝胶扫描获取图像,用PDQuest 2-DE v 7.3软件(Bio-Rad

Hercules, CA, USA) 对图像进行分析(背景消减、斑点检测、匹配和获取斑点位置坐标等)。

1.2.3 蛋白质点胶内消化

参照 Peng 等^[19]的方法略作修改,挖取差异蛋白质点,在 1:1 的 30 mmol/L 铁氰化钾和 100 mmol/L 硫代硫酸钠混合液中脱色;56℃ 条件下于 100 mmol/L NH₄HCO₃ (含 10 mmol/L DTT) 溶液中还原 1 h, 100 mmol/L NH₄HCO₃ (含 55 mmol/L) 碘乙酰胺溶液烷基化 1 h; 用 12.5 ng/μL 胰岛素酶缓冲液(含 0.05mol/L NH₄HCO₃, 0.005mol/L CaCl₂) 4℃ 下水化 30—45min, 并在 37℃ 下,用不含胰蛋白酶的消化液 5—25μL 消化过夜。分别用 0.05 mol/L 碳酸氢铵溶液、含 5% 三氟乙酸的 50% 乙腈和乙腈萃取酶切产物,并真空干燥。真空干燥样品加 3 μL 0.5% 三氟乙酸溶液混匀用于质谱分析。

1.2.4 质谱分析及数据库查询

采用 ABI 公司 MALDI-TOF/TOF 质谱仪对目标蛋白质点进行肽质量指纹分析。基质选用 α-4-羟基肉桂酸固体,用含 0.1% 三氟乙酸的 50% 乙腈制成饱和液。取 2μL 基质与 2μL 样品混匀,取 3μL 混合液点在不锈钢靶上,空气中自然干燥后,推入离子源中待测,采用反射模式、正离子谱测定,离子源加速电压 1 为 25.00kV,加速电压 2 为 21.00kV, N₂ 激光波长为 337nm,脉冲宽度为 3ns,质谱信号单次扫描累加 100 次。

通过 Mascot 查询 NCBI 蛋白质数据库,然后再在 SwissPort 数据库中进一步搜索未匹配到的诱导蛋白,以确定诱导蛋白的类型,分析其在逆境适应性反应中的可能作用。在搜索之前,肽片段分子量最大容许误差范围为 0.2 Da,物种来源选择水稻(*Oryza sativa*)。对于检索结果的确定,要求蛋白质得分需达显著水平,序列覆盖度大于 20%。

2 结果

2.1 不同时期高温处理下叶片蛋白质的双向电泳图谱的构建与差异比较

图 1 为黄华占和双桂 1 号对照(A、C)和高温处理(B、D)在①苗期、②减数分裂期、③抽穗和④灌浆早期叶片蛋白质的双向电泳图谱。由扫描仪获取 2D 胶考染后的图象后,用 PDQuest 2-DE 软件进行分析时,当表达量差异达到 2 倍时即认为具有显著性,即该蛋白点为上调点(图中红色字母所示,相对于对照或处理为下调点)。不能匹配的差异蛋白点即为特异点,即被抑制的蛋白点(相对于对照或处理为新增的蛋白点),也有新诱导的蛋白点(图中蓝色字母所示,相对于对照或处理为不表达的蛋白点)的产生。据此在不同时期双向电泳图谱上标上相应的特异点和上调点(图 1)。

通过比较不同时期高温处理后水稻叶片蛋白质的表达情况(图 1、表 1),发现各处理时期黄华占品种变

表 1 不同时期高温对叶片 2-DE 胶蛋白质点 PDQuest 比较分析

Table 1 PDQuest comparative analysis of 2-DE gel protein spots subjected to high temperature at different stages

时期 Stage	品种 Cultivar	处理 Treatment	诱导蛋白 Induced protein	上调蛋白 Up-regulated protein
苗期 At seedlings stage	黄华占 Huanghuazhan	CK	5	2
		T	12	0
	双桂 1 号 Shuanggui 1	CK	8	8
		T	13	0
减数分裂期 At meiosis stage	黄华占 Huanghuazhan	CK	1	14
		T	0	1
	双桂 1 号 Shuanggui 1	CK	1	6
		T	10	0
抽穗期 At the heading stage	黄华占 Huanghuazhan	CK	0	1
		T	4	2
	双桂 1 号 Shuanggui 1	CK	3	3
		T	0	10
灌浆早期 At early grain filling stage	黄华占 Huanghuazhan	CK	8	3
		T	0	14
	双桂 1 号 Shuanggui 1	CK	11	12
		T	0	3

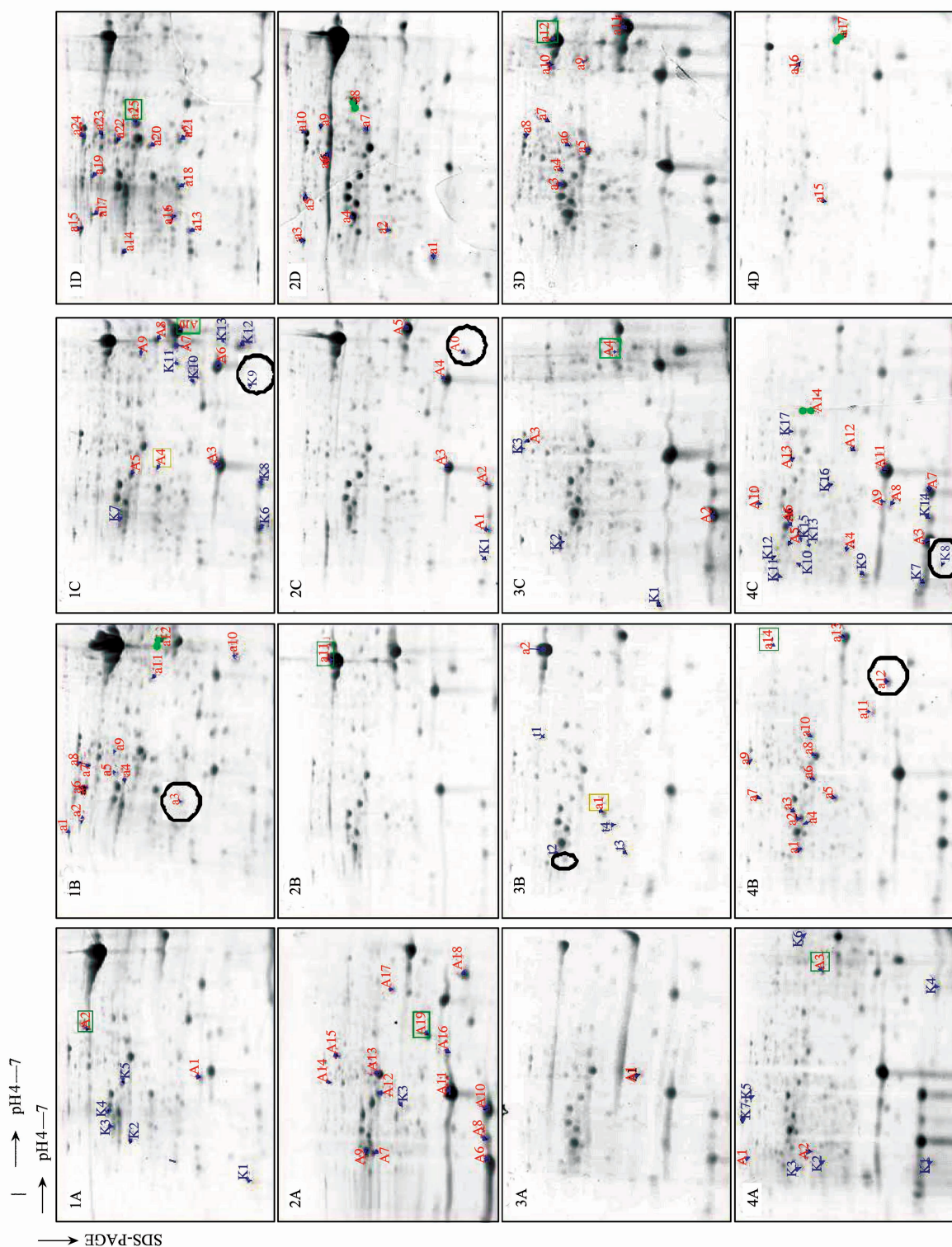


图 1 不同时期高温下水稻叶片的双向凝胶电泳图谱
Fig. 1 The 2-D image of leaf protein of rice with high temperature at different stage

A: 黄华占对照; B: 黄华占高温处理; C: 双桂1号对照; D: 双桂1号高温处理; 1: 苗期; 2: 减数分裂期; 3: 抽穗期; 4: 灌浆早期; 红色字母A或a表示表达量上调的蛋白; 蓝色字母K或k表示新诱导的蛋白; 下标数字是指两个品种在同一时期高温处理和对照之间变化显著的蛋白点之间的排列

化的蛋白点数均少于双桂 1 号品种。不同处理时期比较,灌浆早期处理结束时变化的蛋白质点数最多(两品种合计,为 51 个,图 1-4),苗期次之(48 个,图 1-1),减数分裂处理再次之(33 个,图 1-2),抽穗期处理最少(23 个,图 1-3)。且各处理时期两品种新诱导或被抑制的蛋白质及蛋白质的表达量上调与下调表现不尽一致,如灌浆早期处理结束时两品种均表现为一些蛋白质被抑制,一些蛋白质表达量上调,一些蛋白质下调,而无新诱导的蛋白质的产生,但在耐热品种黄华占中被抑制及表达量下调的蛋白质少,表达量上调的蛋白质多;苗期两品种表现为既有被抑制的蛋白质,也有新诱导的蛋白质或表达量下调的蛋白质;减数分裂期及抽穗期处理结束时两品种表现不同,有的只有被抑制的蛋白质,或新诱导的蛋白质的产生或二者兼有。表明两品种在不同时期高温下蛋白质的表达情况不同。

2.2 不同时期高温处理下叶片差异蛋白质的表达分析

根据蛋白质双向电泳的结果,从表达谱中选取 6 个峰度较高且两品种差异明显的点,并在胶上挖取这些点进行胶内消化,然后用 MALDI-TOF 质谱仪进行质谱分析,每个蛋白质就可以得到自己特异的肽质量指纹图谱(PMF)(图 2),图 3 是部分质谱的差异点的放大图。根据蛋白质的 PMF 与网上的数据库进行检索和比对。其中有 3 个蛋白质得到鉴定(A0、K9、t2),有 3 个蛋白质为功能未知的假设蛋白(a3)或相应的基因(a12、K8)(表 2)。进一步对这两个蛋白质对应的基因进行 BLAST,根据 BLAST 结果确定,点 a12 为核酮糖二磷酸羧化酶大亚基前体的类似物,点 a3 为假定未特征化蛋白,其功能未知(表 3)。

根据质谱鉴定结果,可将所鉴定的蛋白点归纳为以下 3 类功能:

- (1)与光合代谢有关 核酮糖二磷酸羧化酶(Rubisco)大亚基前体类似物(点 a12), Rubisco 小链(点 K8), Rubisco 大亚基(点 K9), Rubisco 活化酶小体前体(点 t2)。
- (2)与信号转导有关 锚蛋白样蛋白(ankyrin-like protein)(点 A0)。
- (3)未知功能的蛋白质(点 a3)。

表 2 不同时期高温处理水稻叶片差异蛋白的 PMF 数据库检索的鉴定结果

Table 2 Differentially expressed proteins in rice leaf subjected to high temperature at different stages identified by PMF query						
蛋白点 Protein spot	登录号 Accession number	蛋白质名称 Protein name	来源 Origin	分子量/等电点 MW (kDa)/ pI	序列覆盖率 Sequence Coverage/%	Mascot 得分 Mascot score
a12	NP_001044494	Os01g0791600	<i>Oryza sativa</i> (Japonica Group)	23.0/8.24	35	112
K8	NP_001066606	Os12g0291400	<i>Oryza sativa</i> (Japonica group)	19.7/8.87	44	103
A0	BAD22084	ankyrin-like protein	<i>Oryza sativa</i> (Japonica Group)	21.1/5.97	43	60
K9	NP_039391	ribulose- 1, 5-bisphosphate carboxylase/oxygenase large subunit	<i>Oryza sativa</i> (Japonica Group)	53.4/6.22	25	111
a3	EEC80169	Hypothetical protein OsI _22016	<i>Oryza sativa</i> (Indica group)	29.2/5.63	26	69
t2	AAX95414	Rubisco activase small isoform precursor	<i>Oryza sativa</i> (Japonica Group)	52.4/5.59	31	81

表 3 对未知功能蛋白以及 hypothetical protein 进行 Blast 的结果

Table 3 Blasting results of the unknown functional proteins and the hypothetical protein				
蛋白点 Protein spot	同源蛋白 Homologous Protein	同源蛋白氨基酸残基数 Number of Residues of Homologous Protein	BLAST 得分 BLAST Score	同源蛋白登录号 Accession of Homologous Protein
a12	Os01g0791600 protein	205	425	Q0JIM0
K8	Ribulose bisphosphate carboxylase small chain	175	332	Q2Q7J7

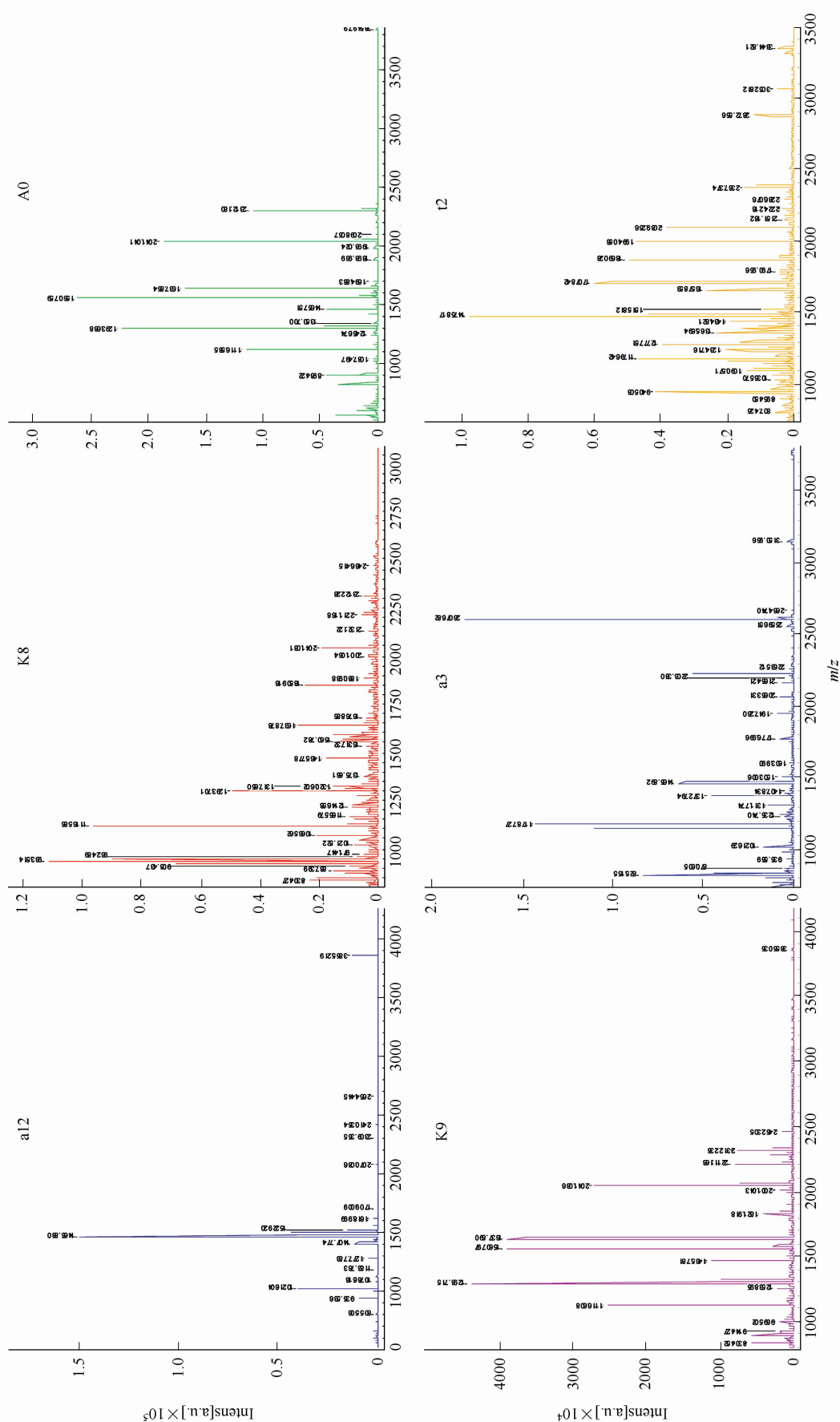


图 2 质谱鉴定的差异蛋白斑点的肽质量指纹图谱

Fig. 2 Peptide mass fingerprinting of protein spot t2 of Huanghuazhan under heat stress at the heading stage

3 讨论

根据质谱分析结果,本研究已鉴定两类蛋白质的功能。

3.1 与光合代谢有关

本研究发现 4 个与光合作用代谢相关的蛋白在高温处理下发生了显著的变化。分别为核酮糖二磷酸羧化酶(Rubisco)大亚基前体类似物(点 a12)及 Rubisco 大亚基(点 K9),这二者属于 Rubisco 大亚基家族,具有核酮糖二磷酸羧化酶活性;后者是与金属结合的蛋白质,能够有选择性地与 Mg^{2+} 相互作用。另外还有 Rubisco 活化酶小链(点 K8)及 Rubisco 活化酶小体前体(点 t2),前者属于 Rubisco 小亚基家族,位于质体中,参与 CO_2 的固定;后者属于 Rubisco 活化酶家族,位于质体及叶绿体基质中,与 ATP 及核苷酸结合的蛋白质,选择性地与 ATP 相互作用,为细胞提供能量和磷酸盐。

Rubisco 是一个双功能酶,它既可催化羧化反应,又可催化加氧反应,是调节植物光合过程中的 CO_2 固定和光呼吸、决定净光合作用的一个关键酶。此外,Rubisco 是植物体内含量最丰富的蛋白质,约占叶中可溶性蛋白的 50%,因而 Rubisco 的降解将与植物光合作用直接相关。前人研究表明,光合作用是植物细胞中对热最敏感的反应^[20]。高温导致 Rubisco 降解^[21],且大小亚基降解程度热敏感品种大于耐热品种^[22]。Peng 等^[23]在水稻和 Rui 等^[24]在小麦叶片暗诱导衰老过程中也发现 Rubisco 发生裂解,产生 50 kDa 的降解条带。此外,在水分胁迫条件下,研究者发现海岸松针叶^[25]中 Rubisco 大亚基的表达量上调。本研究也证实了这个结论,即高温胁迫下,造成 Rubisco 发生裂解,6 个点中有 4 个均与之有关(a12、K8、K9、t2)。且不同品种间比较,双桂 1 号高温处理后这两个蛋白质(K8、K9)不表达了,黄华占表达量增加(a12)或表现为新增蛋白点(t2)。这与高温胁迫下导致水稻叶片光合速率下降,黄华占品种下降较少,双桂 1 号下降较多相一致(图 4)。高温下,黄华占新增的 Rubisco 活化酶小体前体或 Rubisco 大亚基前体类似的蛋白质表达量增加,说明对黄华占对自身起到一定的保护作用。表明高温胁迫对光合作用产生破坏,造成 Rubisco 大、小亚基断裂,使 Rubisco 酶活性下降^[26],从而造成热敏感品种的光合速率明显下降。

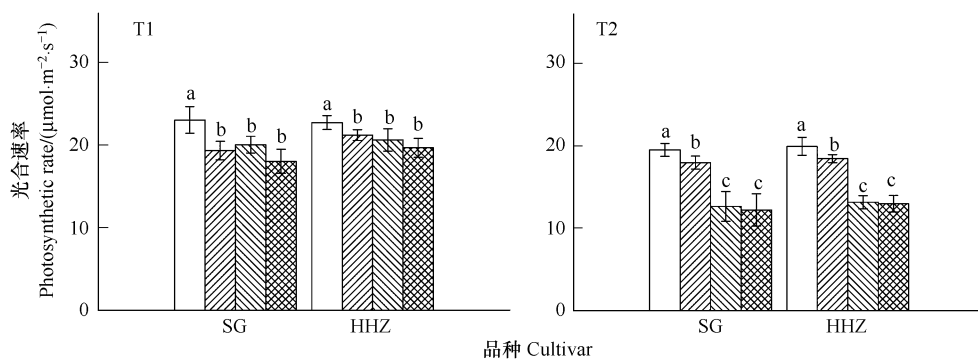


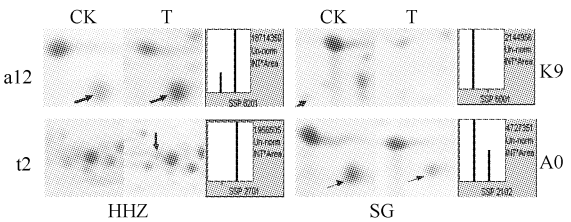
图 4 抽穗期高温对剑叶光合速率的影响

Fig. 4 Effect of high temperature at heading stage on the photosynthetic rate of the flag leaf

SG: 双桂 1 号;HHZ: 黄华占;T1: 抽穗期(花后 0—10 d)高温胁迫;T2: 灌浆早期(花后 11—20 d)高温胁迫;同一品种内不同字母表示在 $P = 0.05$ 水平上差异显著

3.2 与信号转导有关

本研究中双桂 1 号经高温胁迫后叶片锚蛋白样蛋白(ankyrin-like protein)(A0)表达量明显下降,而黄华占品种无明显变化。该蛋白是与信号转导受体相结合的锚蛋白。研究表明锚蛋白不仅作为调节因子参与植物防卫反应,还参与物质的识别和运输以及参与植物的发育调控^[27-28]。表明高温下热敏感品种中该类蛋白



的缺乏或稀少,导致信号转导途径受阻,最终受伤害严重。

研究表明高温胁迫下通常能诱导热激蛋白的产生,从而提高植物忍耐高温的能力。Nover 等^[29]在番茄细胞培养物中鉴定了 48 种热休克蛋白,并研究了耐热性与热激蛋白的关系。Albernathy 等^[30]认为小麦种子早期吸涨过程的耐热性的变化与热激蛋白的合成有关。本研究中未能鉴定到前人报道的与热激蛋白相关的蛋白,原因可能与所用材料、高温处理条件以及鉴定的点数太少,或与光合代谢有关的蛋白质占的比例太高有关。He 等^[31]在以欧美 107 杨为研究对象,对其进行干旱与高温胁迫处理后,鉴定发现参与光合作用的蛋白质占 72%,本研究也证明了这一点。

References:

- [1] Shen S, Jing Y, Kuang T. Proteomics approach to identify wound-response related proteins from rice leaf sheath. *Proteomics*, 2003, 3 (4): 527-535.
- [2] Zang X, Komatsu S. A proteomics approach for identifying osmotic-stress-related proteins in rice. *Phytochemistry*, 2007, 68 (4): 426-437.
- [3] Majoul T, Bancel E, Tribot E, Hamida J B, Branlard G. Proteomic analysis of the effect of heat stress on hexaploid wheat grain: characterization of heat-responsive proteins from non-prolamins fraction. *Proteomics*, 2003, 4 (2): 505-513.
- [4] Ali G M, Komatsu S. Proteomic analysis of rice leaf sheath during drought stress. *Journal of Proteome Research*, 2006, 5(2): 396-403.
- [5] Nozu Y, Tsugita A, Kamijo K. Proteomic analysis of rice leaf, stem and root tissues during growth course. *Proteomics*, 2006, 6 (12): 3665-3670.
- [6] Yan S P, Zhang Q Y, Tang Z C, Su W A, Sun W N. Comparative proteomic analysis provides new insights into chilling stress responses in rice. *Molecular & Cellular Proteomics*, 2006, 5(3): 484-496.
- [7] Lee D G, Ahsan N, Lee S H, Kang K Y, Lee J J, Lee B H. An approach to identify cold-induced low-abundant proteins in rice leaf. *Comptes Rendus Biologies*, 2007, 330 (3): 215-225.
- [8] Heazlewood J L, Howell K A, Whelan J, Millar A H. Towards an analysis of the rice mitochondrial proteome. *Plant Physiology*, 2003, 132(1): 230-242.
- [9] Khan M M K, Komatsu S. Rice proteomics: Recent developments and analysis of nuclear proteins. *Phytochemistry*, 2004, 65 (12): 1671-1681.
- [10] Robert P, Timothy J F, Anthony L M, Nicholas V J H. An accurate and reproducible method for proteome profiling of the effects of salt stress in the rice leaf lamina. *Journal of Experimental Botany*, 2006, 57(5): 1109-1118.
- [11] Lee D G, Ahsan N, Lee S H, Lee J J, Bahk J D, Kang K Y, Lee B H. Chilling stress-induced proteomic changes in rice roots. *Journal of Plant Physiology*, 2009, 166(1): 1-11.
- [12] Mao D R. *Method for Plant Nutrition Studies*. Beijing: China Agricultural University Press, 2000: 16.
- [13] Cao Y Y, Duan H, Yang L N, Wang Z Q, Zhou S C, Yang J C. Effect of heat stress during meiosis on grain yield of rice cultivars differing in heat tolerance and its physiological mechanism. *Acta Agronomica Sinica*, 2008, 34(12): 2134-2142.
- [14] Cao Y Y, Duan H, Yang L N, Wang Z Q, Liu L J, Yang J C. Effect of high temperature during heading and early filling on grain yield and physiological characteristics in indica rice. *Acta Agronomica Sinica*, 2009, 35(3): 512-521.
- [15] Ding Y. *Rice Cultivation in China*. Beijing: Agriculture Press, 1961: 160-165.
- [16] Granier F. Extraction of plant proteins for two-dimensional electrophoresis. *Electrophoresis*, 1988, 9(11): 712-718.
- [17] Görg A, Obermaier C, Boguth G, Weiss W. Recent developments in two-dimensional gel electrophoresis with immobilized pH gradients: wide pH gradients up to pH 12, longer separation distances and simplified procedures. *Electrophoresis*, 1999, 20(425): 712-717.
- [18] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, 1976, 72(1/2): 248-254.
- [19] Peng X X, Ye X T, Wang S Y. Identification of novel immunogenic proteins of *Shigella flexneri* 2 α by proteomic methodologies. *Vaccine*, 2004, 22(21/22): 2750-2756.
- [20] Knaetzel J, Simpson D. Expression and organization of antenna proteins in the light-and temperature-sensitive barley mutant *chlorina*-104. *Planta*, 1991, 185(1): 111-123.
- [21] Herrmann B, Feller U. CO₂, light and temperature influence senescence and protein degradation in wheat leaf segments. *Physiologia Plantarum*, 1998, 103(3): 320-326.
- [22] Bose A, Tiwari B S, Chattopadhyay M K, Gupta S, Ghosh B. Thermal stress induces differential degradation of Rubisco in heat-sensitive and heat-tolerant rice. *Physiologia Plantarum*, 1999, 105(1): 89-94.

- [23] Peng X X, Peng S B. Degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in naturally senescing rice leaves. *Acta Phytobiologica Sinica*, 2000, 26(1): 46-52.
- [24] Rui Q, Xu L L. Degradation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase in wheat leaves during dark-induced senescence. *Acta Botany Sinica*, 2004, 46(2): 137-141.
- [25] Costa P, Bahrman N, Frigerio J M, Kremer A, Plomion C. Water-deficit-responsive proteins in maritime pine. *Plant Molecular Biology*, 1998, 38(4): 587-596.
- [26] Xu Q Z, Huang B R. Morphological and physiological characteristics associated with heat tolerance in creeping bentgrass. *Crop Science*, 2001, 41(1): 127-133.
- [27] Hajheidari M, Abdollahian-Noghabi M, Askari H, Heidari M, Sadeghian S Y, Ober E S, Salekdeh G H. Proteome analysis of sugar beet leaves under drought stress. *Proteomics*, 2005, 5(4): 950-960.
- [28] Leung K C, Li H Y, Mishra G, Chye M L. ACP4 and ACP5, novel Arabidopsis acyl-CoA-binding proteins with kelch motifs that bind oleoyl-CoA. *Plant Molecular Biology*, 2004, 55(2): 297-309.
- [29] Nover L, Scharf K D. Synthesis, modification and structural binding of heat-shock proteins in tomato cell cultures. *European Journal of Biochemistry*, 1984, 139(2): 303-313.
- [30] Albermthy R H, Thiel D S, Petersen N S, Helm K. Thermotolerance is developmentally dependent in germinating wheat seed. *Plant Physiology*, 1989, 89(2): 569-576.
- [31] He C Y, Zhang J G, Duan A G, Zheng S X, Sun H G, Fu L H. Proteins responding to drought and high-temperature stress in *Populus × euramericana* cv. '74/76'. *Trees*, 2008, 22(6): 803-813.

参考文献:

- [5] 胡海燕, 庄杰云, 柴荣耀, 吴建利, 樊叶杨, 郑康乐. 水稻对不同小种稻瘟菌抗性差异表达基因的鉴定. *中国水稻科学*, 2007, 21(1): 1-6.
- [6] 门淑珍, 刘博林. 小麦显性雄性核不育材料后代不育株与可育株不同器官的蛋白质比较研究. *作物学报*, 2001, 27(1): 117-122.
- [12] 毛达如. 植物营养研究方法. 北京: 中国农业大学出版社, 2000: 16.
- [13] 曹云英, 段骅, 杨立年, 王志琴, 周少川, 杨建昌. 减数分裂期高温胁迫对耐热性不同水稻品种产量的影响及其生理原因. *作物学报*, 2008, 34(12): 2134-2142.
- [14] 曹云英, 段骅, 杨立年, 王志琴, 刘立军, 杨建昌. 抽穗和灌浆早期高温对耐热性不同籼稻品种产量的影响及其生理原因. *作物学报*, 2009, 35(3): 512-521.

2008 年度生物学科总被引频次和影响因子前 10 名期刊★

(源于 2009 年版 CSTPCD 数据库)

排序 Order	期刊 Journal	总被引频次 Total citation	排序 Order	期刊 Journal	影响因子 Impact factor
1	生态学报	8956	1	生态学报	1.669
2	应用生态学报	7979	2	植物生态学报	1.656
3	植物生态学报	3742	3	应用生态学报	1.632
4	西北植物学报	3584	4	生物多样性	1.474
5	JOURNAL OF INTEGRATIVE PLANT BIOLOGY	3460	5	生态学杂志	1.276
6	植物生理学通讯	3187	6	植物学通报	1.058
7	生态学杂志	3148	7	西北植物学报	1.046
8	遗传学报	2142	8	植物生理与分子生物学 学报	1.034
9	植物生理与分子生物学学报	1855	9	遗传学报	0.887
10	昆虫学报	1580	10	遗传	0.835

★《生态学报》2008 年在核心版的 1868 种科技期刊排序中总被引频次 8956 次,全国排名第 2;影响因子 1.669,全国排名第 14;第 1~8 届连续 8 年入围中国百种杰出学术期刊;中国精品科技期刊

编辑部主任: 孔红梅

执行编辑: 刘天星 段 靖

生 态 学 报
(SHENGTAI XUEBAO)
(半月刊 1981 年 3 月创刊)
第 30 卷 第 22 期 (2010 年 11 月)

ACTA ECOLOGICA SINICA
(Semimonthly, Started in 1981)
Vol. 30 No. 22 2010

编 辑	《生态学报》编辑部 地址:北京海淀区双清路 18 号 邮政编码:100085 电话:(010)62941099 www.ecologica.cn shengtaixuebao@rcees.ac.cn	Edited by	Editorial board of ACTA ECOLOGICA SINICA Add:18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China Tel:(010)62941099 www.ecologica.cn Shengtaixuebao@rcees.ac.cn
主 编	冯宗炜	Editor-in-chief	FENG Zong-Wei
主 管	中国科学技术协会	Supervised by	China Association for Science and Technology
主 办	中国生态学会 中国科学院生态环境研究中心 地址:北京海淀区双清路 18 号 邮政编码:100085	Sponsored by	Ecological Society of China Research Center for Eco-environmental Sciences, CAS Add:18, Shuangqing Street, Haidian, Beijing 100085, China
出 版	科 学 出 版 社 地址:北京东黄城根北街 16 号 邮政编码:100717	Published by	Science Press Add:16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China
印 刷	北京北林印刷厂	Printed by	Beijing Bei Lin Printing House, Beijing 100083, China
发 行	科 学 出 版 社 地址:东黄城根北街 16 号 邮政编码:100717 电话:(010)64034563 E-mail:journal@cspg.net	Distributed by	Science Press Add:16 Donghuangchenggen North Street, Beijing 100717, China Tel:(010)64034563 E-mail:journal@cspg.net
订 购	全国各地邮局	Domestic	All Local Post Offices in China
国外发行	中国国际图书贸易总公司 地址:北京 399 信箱 邮政编码:100044	Foreign	China International Book Trading Corporation Add:P. O. Box 399 Beijing 100044, China
广告经营 许 可 证	京海工商广字第 8013 号		



ISSN 1000-0933
CN 11-2031/Q

国内外公开发行

国内邮发代号 82-7

国外发行代号 M670

定价 70.00 元