

铜胁迫下小麦幼根转录组学及蛋白质组学研究

张黛静¹,王多多¹,董文²,马建辉¹,杨淑芳¹,张志娟¹,李春喜^{1*}
(1. 河南师范大学 生命科学学院,河南 新乡 453007; 2. 中国农村科技开发中心,北京 100045)

摘要: 为探讨外源铜胁迫对小麦幼根的影响,采用水培方法,测定 0~60 mg/L 不同质量浓度铜处理下小麦幼苗生长发育、转录组表达和蛋白质组表达的差异,探索其抵御重金属毒害的分子机制。结果表明:高质量浓度的铜影响小麦生长,随胁迫时间的延长,小麦幼苗萎蔫发黄,幼根生长受抑。小麦幼根转录组测序检测,共得到 2 283 个差异表达基因(DEGs),其中 826 个 DEGs 表达上调,1 457 个 DEGs 表达下调;将 DEGs 进行 KEGG pathway 注释,被注释到 31 个代谢途径中。双向电泳试验检测,小麦幼根中有 2 049 个蛋白质点,30 mg/L 铜处理 96 h 后,与对照(0 mg/L 处理)相比,约 130 个蛋白质点表达出现显著差异,其中 56 个丰度增加,74 个丰度降低;质谱鉴定部分差异表达蛋白,抗性蛋白如谷胱甘肽转移酶、27K 蛋白等在胁迫下表达上升,而生理代谢相关蛋白表达降低。

关键词: 小麦幼根;铜胁迫;转录组;蛋白组;差异表达

中图分类号: S512.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2015)04-0031-05

Transcriptomics and Proteomics Analysis in Root of Wheat under Copper Stress

ZHANG Daijing¹, WANG Duoduo¹, DONG Wen², MA Jianhui¹, YANG Shufang¹,
ZHANG Zhijuan¹, LI Chunxi^{1*}

(1. College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China;
2. China Rural Technology Development Center, Beijing 100045, China)

Abstract: In order to explore the influence of exogenous copper(Cu) on roots of wheat, the solution culture experiment was carried out to study the growth index, transcriptomics and proteomics differential expression of wheat root. The results indicated that the growth of wheat was inhibited significantly, the influence were closely related to Cu dose and time of treatment. The transcriptomics were analyzed, and 2 283 differential expression genes(DEGs) were detected, of which 826 DEGs up-regulated and 1 457 DEGs down-regulated significantly. All the DEGs were annotated by KEGG pathway to 31 metabolic pathways. About 2 049 differential expression proteins were detected by two-dimensional gel electrophoresis. After exposed to 30 mg/L Cu for 96 h, 130 protein spots showed significant changes, among which 56 spots up-regulated and 74 spots down-regulated. The mass spectrometry analysis of part differential expression proteins showed that the resistant proteins were up-regulated in wheat roots, such as GSTs and 27K protein, but the expression of physiological metabolism related proteins down-regulated trend after being exposed to 30 mg/L Cu.

Key words: wheat root; copper stress; transcriptomics; proteomics; differential expression

铜是植物生长发育的必需元素,它广泛参与植物生长发育过程中的多种代谢,对维持植物正常代谢及发育起着重要的作用^[1-2]。然而适合植物生长的铜含量范围很窄,过量的铜会影响植物的正常代

收稿日期:2014-11-19
基金项目:国家“十二五”科技支撑粮丰工程(2013BAD07B07,2012BAD04B07);河南省科技攻关重点项目(142102110056)
作者简介:张黛静(1974-),女,河南新乡人,副教授,博士,主要从事小麦栽培生理研究。E-mail:zjdai@163.com
* 通讯作者:李春喜(1964-),男,河南封丘人,教授,博士,主要从事小麦栽培生理研究。E-mail:13703731637@sina.com

谢,使得植株根系生长受到抑制,生长量下降,对植物产生严重的毒害作用^[3]。研究表明,长期在逆境条件下,植物体会在生理、生化、代谢、遗传等水平上发生一系列变化,以适应或抵抗逆境生存,即产生抗逆性^[4]。而随着分子生物学研究的深入,高通量基因组、转录组、蛋白质组学等研究方法的涌现,为作物抗性机制研究提供了新途径。

小麦是重要的粮食作物之一。近年来,关于重金属铜对小麦生理生化影响的研究已有很多,但多集中在生理生化水平。其离子毒害的机制研究、生理水平变化和基因表达变化相关性仍处于探讨阶段^[5-6]。鉴于此,研究了不同质量浓度铜胁迫下,小麦幼苗生长发育、基因表达(转录组学)和蛋白质表达(蛋白质组学)的差异,探索其抵御重金属毒害的分子机制,以期作为作物抗重金属胁迫的理论研究和改良小麦重金属耐性提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 试验设计

供试小麦为矮抗 58。首先用 1.0 g/L 的 HgCl_2 浸泡消毒 6 min,用蒸馏水冲洗干净,并浸泡过夜。然后挑取籽粒饱满、大小均匀一致的种子,置于有湿润滤纸的培养皿($\Phi = 12\text{ cm}$)中,每个培养皿中约 100 粒,水培预培养 192 h,待小麦长出第 2 片幼叶后,将幼苗转至装有 Hoagland 营养液的烧杯中进行重金属处理。

采用 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 配制铜溶液,以离子计,设 7 个质量浓度,分别为 0(对照)、10、20、30、40、50、60 mg/L。每个处理设 3 个重复,于光照 12 h、黑暗 12 h 条件下进行幼苗处理。具体参数设置:湿度 75%、温度 18℃、光照强度 $250\text{ }\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,并通入氧气。各处理分别于营养液中生长 48 h、96 h、144 h、192 h 时取样测定或冷冻保存于 $-80\text{ }^\circ\text{C}$ 超低温冰箱待测。

1.2 测定指标及方法

1.2.1 转录组学分析 小麦幼根总 RNA 提取采用大连宝生物有限公司 RNAiso Plus 试剂盒法,并进行 RNA 完整性检测,然后反转录为 mRNA, mRNA 合成第 1 链 cDNA 和第 2 链 cDNA。并用 WEGO 软件对所有 Unigene 做 GO (gene ontology) 功能分类统计,从宏观上认识基因功能分布特征^[7]。然后根据 KEGG 数据库进一步得到 Unigene 的代谢途径注释^[8]。

1.2.2 蛋白质组学分析 2-DE 电泳后银染显色,蛋白质数据采用基质辅助激光解吸电离飞行时间串联质谱仪(MALDI-TOF/TOP MS)分析,利用 Matrixscience 公司的 Mascot 软件搜索本地数据库,寻找匹配的相关蛋白质,NCBI 数据库中查询蛋白功能。

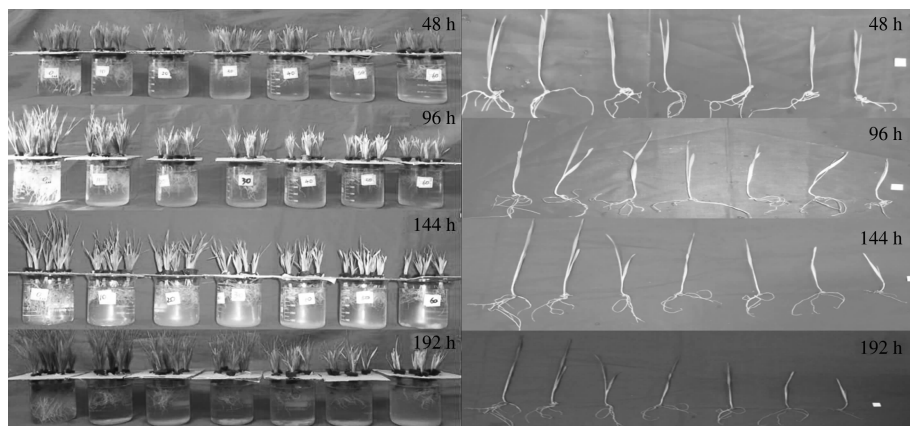
1.3 数据处理

采用 Excel 2003 及 SPSS 11.5 统计软件进行相关数据分析。

2 结果与分析

2.1 铜胁迫下小麦幼苗的变化

每隔 48 h,对不同质量浓度铜处理下的小麦幼苗进行观察和图片采集。生长 48 h,各处理间小麦长势基本相同;根长差别较大,对照根长明显大于其他处理。96 h,对照和 10 mg/L 铜处理下的小麦长势好,根较长。144 h,各处理间株高差距增大,对照和 10、20 mg/L 铜处理下的幼苗株高增加,对照小麦根部出现生长点,30 mg/L 以上铜处理幼苗生长停止,叶子失绿,所有铜处理均无生长点且幼根缩短。192 h,处理间幼苗生长差异持续加大,对照中幼根生长点出现须根,铜处理下幼根无生长点,根部缩短发黄,40~60 mg/L 铜处理的幼苗大部分发黄,60 mg/L 铜处理下的幼叶失绿、萎蔫,根部最为粗短,幼苗基本失水枯死(图 1)。



自左向右铜离子质量浓度为 0、10、20、30、40、50、60 mg/L

图 1 铜胁迫对小麦幼苗群体(左)及个体(右)生长的影响

综上,30 mg/L 铜离子质量浓度为小麦幼根受抑制的转折点,因此,将 30 mg/L 的铜离子质量浓度作为转录组学和蛋白组学分析的浓度。

2.2 铜胁迫下小麦幼根转录水平的变化

2.2.1 转录组数据输出与序列组装 对小麦幼根对照组和铜处理组的 RNA 样本进行测序,测序结果分别得到原始测序序列 34 909 414、3 155 367 条,数据总量

大于 12 G,过滤掉 Dirty Reads,小麦幼根对照和铜处理测序文库中分别含有 32 682 715、29 085 249 条 Clean Reads,占总量的 93.62% 和 92.17%,用于转录组拼接。将测序序列拼接成转录组,用作参考序列,取每个基因中最长转录本作为单一序列基因,共得到 115 742 个(图 2)。

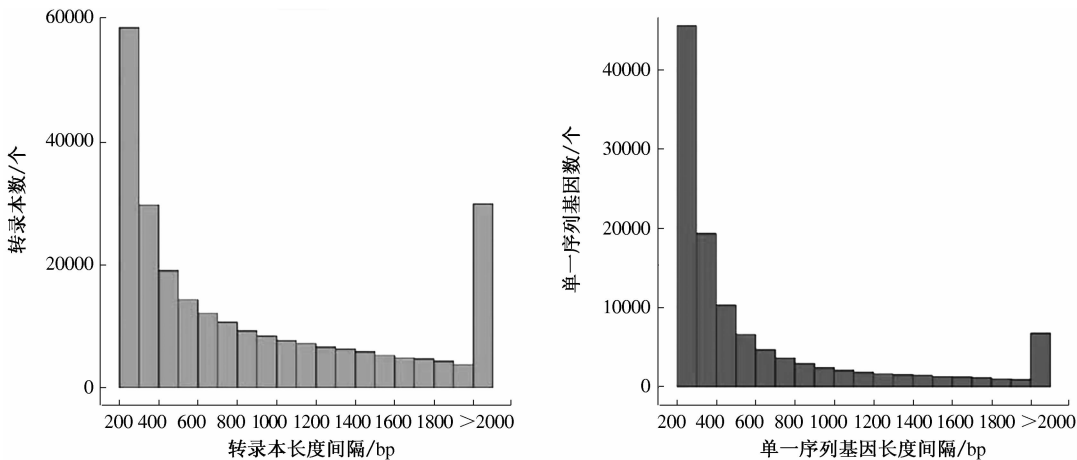
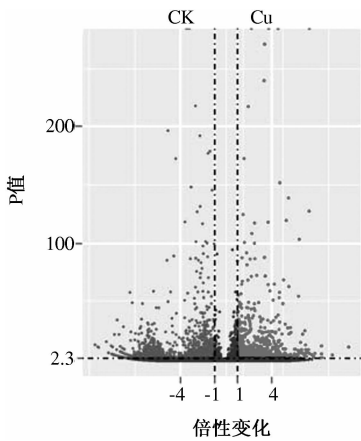


图 2 拼接转录本长度及拼接所得 Unigene 长度分布

2.2.2 差异表达基因的筛选及功能注释 经基因表达量注释和比较分析(图 3),共检测到 2 283 个 DEGs,其中表达显著上调 826 个,显著下调 1 457 个($P < 0.05$)。



横坐标代表基因在 CK 处理中表达倍性变化;纵坐标代表基因表达量变化的统计学显著程度。其中,右侧虚线以上的点表示表达上调基因,共 826 个;左侧虚线以上的点表示表达下调基因,共 1 457 个

图 3 不同处理间基因差异表达分析

GO 是国际标准化基因功能分类体系。运用 GO 富集分析每个组合 DEGs,同源对比结果显示,DEGs 集中分布在 55 个 GO 条目中。

KEGG pathway 富集注释结果显示:得到的单一序列基因中,9 696 个被注释于 KEGG 数据库,得到 257 个 DEGs,这些 DEGs 被注释到 31 个代谢途径

中。其中,富集 DEGs 较多的代谢途径为:次生代谢产物合成、核糖体合成相关、碳代谢、氨基酸合成相关、糖酵解和糖质新生、氧化磷酸化(26 条)以及细胞内吞作用等。这些代谢途径均与生命活动密切相关,例如,与代谢细胞色素外源性物质 P450 相关的 DEGs 为分布在细胞内质网和线粒体内膜上的一种末端加氧酶,其作用为参与内源性物质和环境化合物等外源性物质的代谢及激素合成过程^[9]。

2.3 铜胁迫下小麦幼根蛋白质组分析

2.3.1 转录组数据输出与序列组装 双向电泳结果表明,在对照和 30 mg/L 铜处理下,小麦幼根共检测出 2 049 个蛋白质点(图 4)。与对照相比,30 mg/L 铜胁迫 96 h 后,130 个蛋白质点表达出现显著性差异($P < 0.05$,且光密度值产生 2 倍以上变化),其中蛋白质丰度增加的有 56 个,蛋白质丰度降低的有 74 个。

2.3.2 蛋白质鉴定及功能分析 对图 4 中部分差异蛋白质进一步做 MALD TOF/TOF MS 分析和功能鉴定。结果表明,重金属铜胁迫下,小麦幼根蛋白质的响应涉及生理代谢、抗性、调节等各个方面,还有一些蛋白功能未知。其中,抗性蛋白在铜胁迫下表达丰度增加,如谷胱甘肽转移酶^[10](GSTs, Group ID:1629),说明 GSTs 在重金属逆境中起重要防御作用;27K 蛋白(Group ID:1783),探究其功能是小麦的一种主要免疫原和保护性抗原^[11]。而与生理

代谢相关蛋白,例如果糖激酶 (FRK, Group ID: 1313)、推测的磷酸丙酮酸二激酶 (PPDK, Group ID: 171)、组氨醇磷酸氨基转移酶 (HPAT, Group ID:

1476)等,随着铜胁迫时间的增加,蛋白质表达下降。

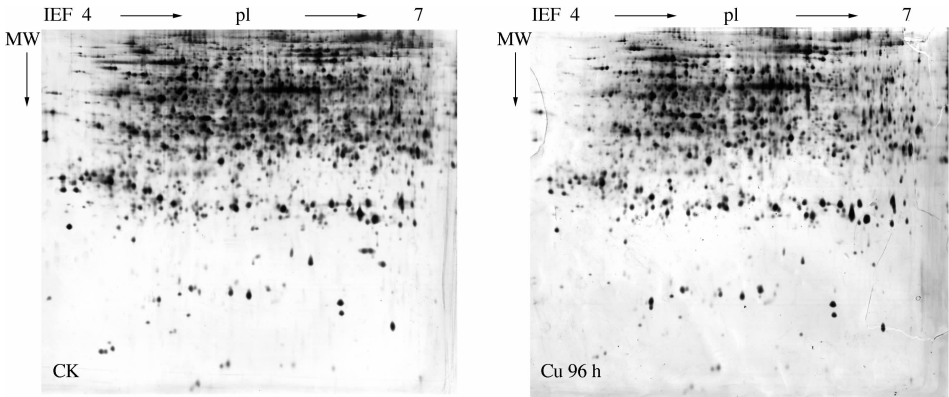


图 4 铜胁迫下小麦幼根 2-DE 分离结果

3 结论与讨论

本试验通过转录组学和蛋白质组学技术分析小麦幼根的变化,其结果显示了植物在重金属逆境中,转录水平和翻译水平的一致性:其差异均表现在代谢、物质合成、糖酵解等生命活动各个环节。

3.1 铜对小麦生理代谢产生的影响

大量研究证明,重金属逆境影响植物代谢,对光合作用、呼吸作用、糖代谢,蛋白质合成、离子吸收等各个方面产生影响^[12]。通过 KEGG pathway 富集分析发现,差异表达的 2 283 个 DEGs 涉及植物生长发育的各个方面。小麦幼根细胞中活性氧代谢相关基因、核糖体蛋白基因及细胞色素外源性物质 P450 受铜胁迫诱导表达量增加,而细胞壁和脂肪酸合成相关基因等表达量下降。以核糖体为例,核糖体是生物体细胞内蛋白质合成的主要场所,核糖体 RNA 基因的表达会受环境的改变而发生改变,参与逆境胁迫的调控^[13]。在细胞发育、衰老和逆境胁迫等方面能发挥调控作用^[14]。本研究发现,对照小麦幼根细胞内核糖体蛋白上调 DEGs 为 15 个,铜胁迫处理下细胞内核糖体蛋白上调表达为 115 个,且伴随有诱导内质网蛋白加工和 RNA 降解相关基因表达上调,说明铜胁迫使根部细胞诱导核糖体蛋白大量表达。这与 Kawasaki 等^[15]研究水稻盐胁迫初期核糖体蛋白诱导上调表达结果一致。也有研究发现,细胞分化时,多数核糖体蛋白持续下调表达,也存在部分核糖体蛋白呈现先下调后上调的趋势^[16]。

3.2 铜胁迫下小麦抗性增加

大量研究表明,重金属胁迫下作物抗性提高。以 GSTs 为例,本研究表明,铜胁迫下 GSTs 等抗性

蛋白质表达升高,这与 Smith 等^[17]研究铜胁迫下拟南芥种子 GSTs 在 mRNA 和蛋白质水平的响应以及 Roth 等^[18]研究镉胁迫下拟南芥幼根中 *GSTFs2* 和 *GSTFs6-9* 表达上调结论一致。研究表明,GSTs 基因中的 *AtGSTU17* 和 *LbGSTI* 以及 GSH-Px(谷胱甘肽过氧化物酶)基因中 *BnGPXI* 的表达,在抗性方面发挥着重要作用^[19-20]。本试验发现,铜胁迫下的 13 个 GSTs 可能参与上述过程,其差异表达基因显著上调。说明上述 GSTs 在小麦抵御重金属毒害中发挥了积极的作用。试验说明,铜胁迫提高了小麦幼根抗性蛋白质活性,增强机体抵御逆境的能力,从而达到保护的作用。

3.3 蛋白质表达与基因表达的一致性

小麦在重金属铜胁迫下,不但通过基因调节生理生化过程,降低体内金属的有效性,而且在蛋白质组水平上也会产生适应性反应。本研究中,重金属胁迫下,PPDK、FRK、HPAT 等蛋白表达丰度下降。研究报道,PPDK 是 C4 植物光合途径主要涉及的关键酶^[21];FRK 在植物基础代谢中催化果糖的磷酸化,从而影响糖酵解的过程^[22],FRK 还可以作为植物的己糖感受器和信号分子,通过影响植物生活周期来调控代谢和生长发育^[23];HPAT 在组氨酸生物合成途径中催化咪唑丙酮醇磷酸转化为组氨醇磷酸^[24]。说明重金属铜对小麦幼苗光合代谢、糖酵解、氨基酸合成等方面产生不同程度的影响。

参考文献:

[1] 潘瑞炽,董恩得. 植物生理学[M]. 北京:北京高等教育出版社,1995.
[2] Ouzounidou G, Lamporová M, Moustaksa M, et al. Responses of maize (*Zea mays* L.) plants to copper stress-

- I. Growth, mineral content and ultrastructure of roots [J]. Environmental and Experimental Botany, 1995, 35 (2):167-176.
- [3] Sheldon A R, Menzies N W. The effect of copper toxicity on the growth and root morphology of Rhodesgrass (*Chloris gayana* Knuth.) in resin buffered solution culture [J]. Plant and Soil, 2005, 278:341-349.
- [4] Tong Y P, Kneer R, Zhu Y G. Vacuolar compartmentalization: A second-generation approach to engineering plants for phytoremediation [J]. Trends in Plant Science, 2004, 9:7-9.
- [5] Gerald K. Cell and molecular biology [M]. Hoboken of America: John Wiley & Sons Ltd. Publication, 2011.
- [6] Mounolou J C, Jakob H, Slonimski P P. Mitochondrial DNA from yeast "petite" mutants: Specific changes in buoyant density corresponding to different cytoplasmic mutations [J]. Biochem Biophys Res Commun, 1966, 24 (2):218-224.
- [7] Ye J, Fang L, Zheng H, et al. WEGO: A web tool for plotting GO annotations [J]. Nucleic Acids Res, 2006, 34:293-297.
- [8] Kanehisa M, Araki M, Goto S, et al. KEGG for linking genomes to life and the environment [J]. Nucleic Acids Res, 2008, 36:480-484.
- [9] Johansson I, Lngelman-Sundberg M. Genetic polymorphism and toxicology-with emphasis on cytochrome P450 [J]. Toxicological Sciences, 2011, 120(1):1-13.
- [10] Runarsdottir A, Mannervik B. A novel quasi-species of glutathione transferase with high activity towards naturally occurring isothiocyanates evolves from promiscuous low-activity variants [J]. Journal of Molecular Biology, 2010, 401(3):451-464.
- [11] Masumi K, Makiko S, Nobuko K, et al. Isolation and molecular cloning of a major wheat allergen, Tria Bd 27K [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2009, 73:85-92.
- [12] 唐咏, 王萍萍, 张宁. 植物重金属毒害作用机理研究现状 [J]. 沈阳农业大学学报, 2006, 37(4):551-555.
- [13] 张今今, 王跃进. mRNA 差异显示技术克隆中国葡萄属野生种核糖体 RNA 基因 [J]. 西北植物学报, 2005, 25(11):2163-2167.
- [14] McIntosh K B, Bonham-Smith P C. The two ribosomal protein L23A genes are differentially transcribed in *Arabidopsis thaliana* genome [J]. NRC Research Press, 2005, 48:443-454.
- [15] Kawasaki S, Borchert C, Deyholos M, et al. Gene expression profiles during the initial phase of salt stress in rice [J]. Plant Cell, 2001, 13:889-905.
- [16] Bevolt M, Leffers H. Down regulation of ribosomal protein mRNAs during neuronal differentiation of human NTERA2 cells [J]. Differentiation, 2000, 66:81-92.
- [17] Smith A P, DeRidder B P, Guo W J, et al. Proteomic analysis of *Arabidopsis* glutathione S-transferases from benoxacor- and copper-treated seedlings [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2004, 279:26098-26104.
- [18] Roth U, Von R L E, Clemens S. Proteome changes in *Arabidopsis thaliana* roots upon exposure to Cd²⁺ [J]. Journal of Experimental Botany, 2006, 57:4003-4013.
- [19] Crsizar J, Vary Z, Horvath E, et al. Role of glutathione transferases in the improved acclimation to salt stress in salicylic acid-hardened tomato [J]. Acta Biologica Szegediensis, 2011, 55(1):67-68.
- [20] 胡茂龙, 龙卫华, 高建芹, 等. 橄榄型油菜谷胱甘肽过氧化物酶基因克隆和非生物胁迫下的表达 [J]. 中国油料作物学报, 2011, 22(4):331-337.
- [21] 侯爱菊, 徐德昌. 植物高光效基因工程育种 [J]. 中国生物工程杂志, 2005, 25(9):19-23.
- [22] Granot D. Role of tomato hexose kinase [J]. Funct Plant Biol, 2007, 34:564-570.
- [23] Rolland F, Baena-Gonzalez E, Sheen J. Sugar sensing and signaling in plants: Conserved and novel mechanisms [J]. Annual Review of Plant Biology, 2006, 57:675-709.
- [24] Mizuguchi H, Hayashi H, Hirotsu I M K, et al. Characterization of histidinol phosphate aminotransferase from *Escherichia coli* [J]. Biochim Biophys Acta, 2003, 1674 (1/2):321-324.