

Ar⁺介导玉米 DNA 水稻不同 pH 条件下 蛋白水解酶的表达

姬生栋, 岳春晖, 袁 召, 陈 鹏, 王知丰, 侯磊磊, 王海莎, 朱德来
(河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007)

摘要: 利用离子束介导技术, 对水稻豫粳 6 号种子进行 Ar⁺照射处理, 然后用玉米基因组 DNA 介导液进行转化处理。采用复性电泳技术对其幼苗叶片在不同 pH 下的蛋白水解酶瞬时表达情况进行了分析。结果表明, 不同 pH 条件下各处理蛋白水解酶表达存在明显差异。与对照相比, Ar⁺介导玉米 DNA 的水稻幼苗叶片在 pH 4.5 条件下检测到 1 条 129 kD 的新酶带, 缺失 41、97、192 kD 的 3 条酶带; 在 pH 7.0 时检测到 1 条 167 kD 的新酶带, 缺失 1 条 67 kD 的酶带; 在 pH 8.5 条件下缺失 1 条 61 kD 的酶带, 并且在 192~234 kD 检测到 1 条活性较强的亮带区。这表明, Ar⁺介导玉米 DNA 的水稻在蛋白质表达水平上产生显著差异, 这可能是玉米 DNA 片段进入受体水稻细胞并引起受体基因表达改变的结果。

关键词: 离子束介导; 水稻; 蛋白水解酶; 玉米 DNA

中图分类号: S511 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2010)04-0009-04

Analysis of Proteinases in Rice with Maize DNA Mediated by Ar Ion Beam

Ji Sheng-dong, YUE Chun-hui, YUAN Zhao, CHEN Peng, WANG Zhi-feng, HOU Lei-lei,
WANG Hai-sha, ZHU De-lai

(College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: The seeds of rice Yujing 6 were irradiated by Ar ion beam, and then were transferred with maize genome DNA. The proteinases of rice leaves were analysed by renaturation electrophoresis in different pH. The results showed that the expression of proteinases had changed obviously. Compared to the control, a new proteinase (129 kD) was present and three proteinases (41, 97 and 192 kD) were absent in condition of pH 4.5, a new proteinase (167 kD) present and one (67 kD) absent in condition of pH 7.0, while a new proteinase (61 kD) absent in condition of pH 8.5. Besides, a proteinase with strong activity covered the area of 192 kD—234 kD molecular weight was detected. The obvious diversity of proteinase expression indicated that the maize DNA may have been transferred into the rice, and changed the gene expression of rice.

Keywords: Ion Beam; Rice; Proteinases; Maize DNA

水稻是世界上分布最广、最重要的粮食作物之一, 其遗传育种一直受到广泛重视。传统的水稻育种常常受到有限的种质资源限制而很难取得突

破^[1]。离子束生物技术是遗传育种的新方法, 在水稻诱变育种与介导转基因方面已取得一系列进展, 它能打破传统物种间的界限, 避免远缘杂交的不亲

收稿日期: 2009-10-29

基金项目: 河南省自然科学基金项目(092300410082); 河南师范大学应用科学基金资助(2008Y02)

作者简介: 姬生栋(1963-), 男, 河南沁阳人, 高级实验师, 硕士生导师。主要从事水稻分子育种研究。E-mail: jisd99@126.com

和性,促进远缘基因之间的交流^[2]。1991年安徽省农业科学院利用离子束介导技术,将高光效的C₄植物玉米基因组DNA导入光合效率较低的C₃植物水稻早粳213种胚细胞获得成功^[3]。杨剑波等^[4]利用该技术将GUS基因成功引入受体水稻细胞并实现瞬时表达。倪大虎等^[5]也利用该技术将抗菌肽Shiva A基因导入水稻明恢63成熟种胚中,经PCR检测,外源基因已整合到水稻基因组中。河南师范大学生命科学学院实验室于2000年开始水稻分子育种研究,用离子束介导技术将玉米DNA片段转入水稻,培育出了能够稳定遗传的水稻新材料和新品系^[69]。蛋白水解酶复性电泳技术是SDS-PAGE电泳后去除SDS使蛋白质复性的一种电泳方法^[10],可保持酶生物学特性,适用于酶的结构、性质及其作用的研究。在我国该技术首先应用于小麦研究^[11,12],目前用于水稻的研究不多^[13]。本试验采用复性电泳技术对Ar⁺介导玉米DNA水稻幼苗的蛋白水解酶的表达情况进行分析,探讨离子束介导远缘DNA的水稻在蛋白水解酶表达水平上的差异,旨在为水稻离子束介导育种提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

受体水稻为豫粳6号,由新乡市农业科学院提供。DNA供体为紫色糯玉米,由河南省农业科学院提供。

1.2 方法

1.2.1 玉米基因组DNA提取 采用CTAB法大量提取玉米基因组DNA^[14,15],用0.1×SSC缓冲液稀释为200 mg/L的DNA介导液,4℃保存备用。

1.2.2 水稻材料处理 水稻种子Ar⁺注入处理于郑州大学离子束生物工程重点实验室内进行。将水稻种子胚部朝上放入TITAN离子注入机中脉冲照射Ar⁺,照射能量为25 keV,剂量为3.0×10¹⁷ Ar⁺/cm²。随即将经Ar⁺注入和未经Ar⁺注入的水稻种子同时进行如下处理:

处理A:水稻种子+Ar⁺注入+玉米DNA(含玉米DNA的介导液浸种18 h);

处理B:水稻种子+Ar⁺注入(无菌双蒸水浸种18 h);

处理C(对照):水稻种子+无菌双蒸水(无菌双蒸水浸种18 h)。

1.2.3 材料培育与采集 各材料处理完成后,用无菌双蒸水冲洗干净,均匀摆于培养皿内,在恒温光照

培养箱内,30℃恒温培养。待幼苗长至一叶一心时,取幼叶(含叶鞘)制样,液氮研磨,用0.15 mol/L氯化钠溶液提取(1g新鲜材料加7 mL提取液),冰浴匀浆,4℃离心(12 000 r/min)15 min,吸取上清液分装于Eppendorf管中,-20℃保存。

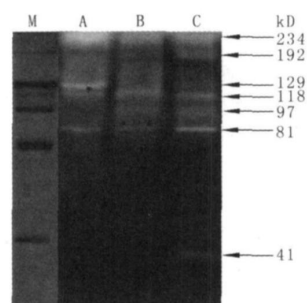
1.2.4 蛋白质复性电泳 复性电泳方法参考Neuhaus-Steinmetz等^[10]和徐存栓等^[16]的方法略有改动。电泳结束后,切下蛋白质Marker(分子量为43、66.2、97.4、130、200 kD)用考马斯亮蓝R250单独染色。剩余胶板进行洗涤、孵育(pH 4.5、pH 7.0、pH 8.5)、固定、染色和脱色,参照Laemmli的方法^[17]。

1.2.5 蛋白分子量计算 采用上海天能科技有限公司(Tanon)的数码凝胶图像系统软件分析。

2 结果与分析

2.1 pH 4.5条件下水稻叶片蛋白水解酶谱

由图1可知,在pH 4.5时,处理C中共检出41、81、97、118、129、234 kD 6条酶带(图1)。处理A共检测到81、118、129、234 kD 4条酶带,处理B检测到81、97、118、234 kD 4条酶带。处理A、处理B与对照C相比,都缺失41、192 kD 2条酶带,这说明Ar⁺注入对受体水稻影响较大,能抑制水稻幼苗叶片细胞中某些酸性蛋白水解酶的表达。处理A、处理B和处理C相比,多检出1条129 kD的新酶带,同时还缺失1条97 kD的酶带,这说明Ar⁺介导玉米DNA转化水稻,受体水稻细胞有新蛋白水解酶表达,同时某些蛋白水解酶的表达也被抑制。



M. Marker; A. 水稻种子+Ar⁺注入+玉米DNA; B. 水稻种子+Ar⁺注入; C. 水稻种子+无菌双蒸水。下同

图1 pH 4.5条件下水稻叶片蛋白水解酶图谱

2.2 pH 7.0条件下水稻叶片蛋白水解酶谱

从图2可以看出,在pH 7.0时,处理C中共检出67、97、118、192、234 kD 5条酶带(图2)。与处理B和处理C相比,处理A多检测到1条167 kD的新酶

带,可能是 Ar^+ 介导玉米 DNA 片段导入受体水稻细胞中并表达的结果。处理 A 和处理 B 与处理 C 相比,都缺失 1 条 67kD 的酶带,这可能由于 Ar^+ 辐射造成受体某些基因的损伤,从而抑制了受体水稻某些蛋白水解酶的表达。

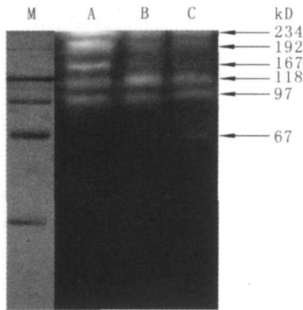


图 2 pH 7.0 条件下水稻叶片蛋白水解酶图谱

2.3 pH 8.5 条件下水稻叶片蛋白水解酶谱

由图 3 可以看出,在 pH 8.5 时,处理 C 共检出 61、81、118、192、234 kD 5 条酶带。处理 A 检测到 81 和 118 kD 2 条酶带,并且在 192~234 kD 之间还检测到 1 条活性较强的亮带区。处理 A 与处理 C 相比,缺失 1 条 61 kD 酶带,这说明 Ar^+ 介导玉米 DNA 片段转化水稻,引起受体水稻细胞碱性蛋白水解酶表达水平上的差异。处理 B 检测到 81、118、234 kD 3 条酶带,与处理 C 相比,缺失 61 和 192 kD 2 条酶带。这说明 Ar^+ 注入影响受体水稻蛋白水解酶表达。

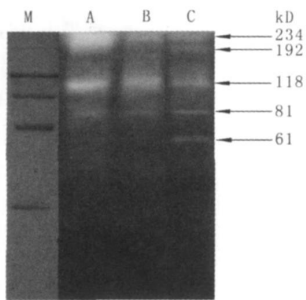


图 3 pH 8.5 条件下水稻叶片蛋白水解酶图谱

2.4 不同 pH 条件下水稻叶片蛋白水解酶表达差异比较

在 pH 4.5、pH 7.0 和 pH 8.5 条件下,各处理之间蛋白水解酶表达存在显著差异。61 kD 酶带仅在 pH 8.5 条件下检测到,这表明此酶是一种碱性蛋白水解酶。97 kD 酶带在 pH 4.5 和 pH 7.0 条件下检测到,而在 pH 8.5 条件下缺失,且在 pH 7.0 时酶活性强于 pH 4.5 时,说明这种酶属于中性偏

酸性蛋白水解酶。81 kD 酶带在酸性和碱性条件下检测到,而在中性条件下缺失,说明这条酶带分别属于不同的蛋白水解酶。67 kD 酶带仅在 pH 7.0 条件下检测到,说明这是一种中性蛋白水解酶。 Ar^+ 介导玉米 DNA 的水稻幼苗叶片在 pH 4.5 条件下检测出 129 kD 新酶带,在 pH 7.0 条件下检测到 1 条 167 kD 新酶带(图 1、图 2),说明在酸性和中性条件下,离子束介导玉米 DNA 的水稻幼苗叶片有新蛋白水解酶表达。在 pH 8.5 条件下,检测到 192~234 kD 活性较强的亮带区,且 118 kD 酶活显著强于处理 C 和处理 B,这说明 Ar^+ 介导玉米 DNA 已经影响受体水稻幼苗叶片蛋白水解酶的表达。

3 讨论

低能离子束具有质量、能量和电荷 3 种作用势,在离子注入过程中能引起受体 DNA 的损伤^[18],但同时又能诱导和激发受体细胞对其受损 DNA 分子的修复,从而实现外源 DNA 与受体基因的重组与遗传^[19]。经 Ar^+ 照射的处理 A、处理 B 与处理 C 相比,在酸性条件下缺失 41 kD 和 192 kD 2 条酶带,在中性和碱性条件下分别缺失 67 kD 和 61 kD 2 条酶带,说明 Ar^+ 注入对受体水稻细胞蛋白水解酶表达等生理活动有较大影响。这可能是 Ar^+ 辐射对受体基因造成损伤,从而使一些蛋白水解酶的表达受到抑制。

中科院等离子所李红等对离子束介导紫玉米全 DNA 转化水稻早粳 213 获得的 8 个玉米稻株系进行 RAPD 分析,结果表明,外源 DNA 导入受体细胞并引起受体基因组发生显著变化^[20]。本试验从蛋白水解酶表达水平进行分析,在离子束介导玉米 DNA 的水稻幼苗叶片中,pH 4.5 条件下检测到 1 条 129 kD 新酶带;pH 7.0 时检测到 1 条 167 kD 新酶带;pH 8.5 条件下,在 192~234 kD 检测到 1 条活性较强的亮带区。这说明离子束介导外源 DNA 能引起受体水稻幼苗叶片在蛋白表达水平上的差异,这是受体基因表达改变的结果。新蛋白水解酶的出现,可能是由于玉米 DNA 片段已经整合到水稻基因组中并瞬时表达的结果,也有可能是外源 DNA 进入受体水稻细胞后,引起了受体基因调控机制改变,从而引起水稻幼苗细胞内蛋白水解酶种类和活性发生变化。在 pH 4.5 时,97 kD 酶带在处理 B 和处理 C 中检测到,而在处理 A 中未检测到,这可能是外源玉米 DNA 进入受体水稻细胞,使水稻某些基因沉默表达的结果^[21]。这些现象出现的原因,还需要进一步通过相关的分子生物学

手段加以验证。焦焱等^[22]曾利用 RAPD 分析发现了离子束介导转基因小麦变异株系中的差异条带, 并利用 AFLP 分析方法证实此差异条带是变异株系的特征带。姬生栋等^[7,8]利用 AFLP 分子标记技术对离子束介导玉米 DNA 水稻变异后代进行分析, 检测到许多差异条带, 包括新增条带、缺失条带和目的条带, 这在分子水平上验证了离子束介导玉米 DNA 能引起受体水稻基因组 DNA 序列发生变化。利用离子束介导技术将外源 DNA 导入受体水稻细胞, 扩大了水稻的遗传基础, 对培育新的水稻品种、发掘优良基因提供了新的途径。

参考文献:

- [1] 秦代锦, 陈德西, 胡晓, 等. 水稻遗传转化研究进展[J]. 生物学杂志, 2008, 25(5): 5-9.
- [2] 黄群策, 李玉峰. 离子束生物技术在水稻育种中的应用前景[J]. 杂交水稻, 2002, 17(5): 5-8.
- [3] 余增亮. 离子束生物技术引论[M]. 合肥: 安徽科学技术出版社, 1999.
- [4] 杨剑波, 吴跃进, 余增亮, 等. 低能离子束介导外源基因进入水稻细胞研究[J]. 安徽农业科学, 1994, 21(3): 330-335.
- [5] 倪大虎, 向太和, 张素娣, 等. 应用低能离子束将抗菌肽 *Shiva A* 基因导入恢复系明恢 63 的研究[J]. 安徽农业科学, 2000, 28(4): 408-409, 419.
- [6] 姬生栋, 秦广雍, 耿飒, 等. 离子束介导玉米基因组 DNA 的水稻后代遗传性状研究[C] // 万建民, 刘录祥. 全国作物生物技术与诱变技术学术研讨会论文摘要集. 2005: 178-179.
- [7] 姬生栋, 陈鹏, 焦焱, 等. T5 代水稻变异株系 AFLP 分析和特异片段序列分析[J]. 河南农业科学, 2009(4): 22-25.
- [8] 姬生栋, 陈鹏, 王加传, 等. 离子束介导玉米 DNA 的水稻变异后代 AFLP 分析[J]. 核农学报, 2009, 23(2), 197-202.
- [9] Vassili J D, Pepper M S. Membrane proteases in focus [J]. Nature, 1994, 370: 14-15.
- [10] Neuhaus-Steinmetz U, Xu cun-shuan, Fracella F, *et al.* Heat shock response and cytotoxicity in C6 rat glioma cells: structure-activity relationship of different alcohols[J]. Molecular Pharmacology, 1994, 45: 36-41.
- [11] 姬生栋, 李金亭, 吉爱玲, 等. 小麦生育前期 POD 同工酶的动态变化[J]. 广西植物, 2000, 20(4): 361-366.
- [12] 姬生栋, 李吉学, 赵俊杰, 等. 低能离子束介导外源 DNA 转入小麦种胚中对小麦幼苗叶片蛋白水解酶酶谱的影响[J]. 麦类作物学报, 2001, 21(3): 5-8.
- [13] 王书玉, 姬生栋, 陈鹏, 等. 水稻豫粳 8 号蛋白水解酶复性电泳分析[J]. 中国种业, 2008(8): 40-42.
- [14] Jeff J Doyle, Jane I Joyle. Isolation of plant DNA from fresh tissue[J]. Focus, 1998, 12(1): 13-15.
- [15] Marry M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. Nucleic Acid Research 1980, 8(19): 4321-4325.
- [16] 徐存栓, 吉爱玲, 夏民, 等. 用复性电泳技术研究溶酶体蛋白水解酶的性质和活性[J]. 河南科学, 1998, 16(2): 184-191.
- [17] Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4[J]. Nature, 1970, 227: 680-685.
- [18] 宋道军, 姚建铭, 吴丽芳, 等. 离子注入对微生物细胞的刻蚀与对 DNA 的损伤及修复[J]. 遗传, 1999, 21(4): 37-40.
- [19] 黄国伟, 毛培宏, 金湘, 等. 低能离子注入介导外源 DNA 大分子转化的研究及应用[J]. 生物技术, 2008, 18(6): 86-89.
- [20] 李红, 吴丽芳, 宋道军, 等. 离子束介导玉米 DNA 导入水稻引起遗传变异的 RAPD 分析[J]. 激光生物学报, 1999, 8(4): 261-265.
- [21] Andrew Eamens, Ming-Bo Wang, Neil A Smith, *et al.* RNA silencing in plants: yesterday, today, and tomorrow[J]. Plant Physiol, 2008, 147(2): 456-468.
- [22] 焦焱, 谷运红, 李景原, 等. 离子束介导大豆 DNA 转化小麦后代高蛋白株的 RAPD 标记分析[J]. 西北植物学报, 2006, 26(9): 1878-1882.