

光温敏雄性不育玉米 9417 雄穗幼穗期叶片 叶绿体蛋白质差异分析

郝勇锋, 李维平*, 王 帅, 姚 伟, 周丹平

(西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要: 为了研究玉米“两用系”9417 雄穗不育的分子机制, 以玉米光温敏雄性不育系 9417 的不育和可育 2 种状态的植株为材料, 利用 SDS-PAGE、质谱和生物信息学等技术, 对其幼穗分化敏感期叶片中叶绿体差异表达蛋白质组进行分离和鉴定。电泳图谱显示, 光温敏雄性不育、可育株在雄穗分化发育敏感时期叶绿体表达蛋白至少存在 4 条显著的差异条带, 其中 No. 1、No. 2 是可育株中存在而不育株缺失的条带; No. 3、No. 4 是不育株存在可育株中缺失的条带。质谱分析共鉴定出 4 种蛋白质: ① AOL_s00004g466、② luc7-like protein 3-like、③ putative T3SS effector EspN2-2、④ ABC transporter ATP-binding protein。可育株中 No. 1 为假定蛋白, No. 2 蛋白的 U1-snRNP 成分在 RNA 的加工和修饰中起介导自身与帽结合蛋白相结合的作用; 不育株中 No. 3 蛋白具 T3SS 效应, No. 4 蛋白在膜上 ATP 结合区域具单向转运底物的作用。叶绿体出现差异蛋白质, 可能与雄性败育、不育有关。

关键词: 玉米; 光温敏雄性不育; 叶绿体; 蛋白质组学

中图分类号: S513 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2013)01-0018-05

Differential Analysis of Leaf Chloroplast Protein in Young Spike of Thermo-photo-sensitive Male Sterile Maize Line 9417

HAO Yong-feng, LI Wei-ping*, WANG Shuai, YAO Wei, ZHOU Dan-ping

(College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling 712100, China)

Abstract: Taking thermo-photo-sensitive male sterile maize line 9417 as material, the chloroplast proteins in young leaves of male infertile and fertile plants were isolated and analyzed by means of SDS-PAGE, MS and bio-informatics technology. SDS-PAGE showed that there were at least four different bands between male sterile and fertile plants for chloroplast proteins at the sensitive period of young ear development, among which No. 1 and No. 2 bands presented in fertile plants, while No. 3 and No. 4 bands were expressed in sterile plants. Four proteins were identified by MS: AOL_s00004g466, luc7-like protein 3-like, putative T3SS effector EspN2-2 and ABC transporter ATP-binding protein. In fertile plants, No. 1 was a hypothetical protein, while U1-snRNP component of No. 2 had the function to mediate itself to associate with cap-binding complex in RNA procession and modification. In sterile plants, No. 3 protein had T3SS effect, and No. 4 protein had the effect to transport unidirectionally the substrates in the ATP-binding region of transmembrane. The difference of chloroplast proteins might be related to the male sterility and infertility.

Key words: maize; thermo-photo-sensitive male sterility; chloroplast; proteomics

收稿日期: 2012-07-18

作者简介: 郝勇锋(1984-), 男, 河南安阳人, 在读硕士研究生, 研究方向: 玉米蛋白质组学。E-mail: step3@163.com

* 通讯作者: 李维平(1956-), 男, 陕西西安人, 教授, 博士, 主要从事植物学及蛋白质组学研究。E-mail: wpli1369@163.com

植物雄性不育是自然界普遍存在的一种遗传现象。该遗传特性产生的杂种优势在农作物品种选育和推广上起到了重要作用。水稻和玉米是生产上广泛应用杂种优势进行新品种选育的作物种类,杂交种制种方式对制种质量好坏有很大影响。长期以来,玉米杂交种一直是人工去雄制种,利用雄性不育性制种方式来提高种子质量的方法一直未能得到有效改善。在实践上,从作物育种的三系法到二系法,利用雄性不育性育种的方法一直在不断地创新与改进,其遗传机制的研究也在如火如荼地进行,但水稻和玉米光敏核不育特性的遗传机制一直困扰着研究者。近来,有研究表明,在水稻光温敏核不育系不同染色体上发现了与不育相关的基因片段,并且对光温敏核不育系的不育基因进行了精细定位,但始终未能分离出具有说服力的光温敏核雄性不育基因^[1-2]。也有研究认为,在光温敏核不育系的基因组中可能不存在光温敏不育基因,只能定位出主效基因以及与其紧密相邻的感光或者感温基因^[2]。因此,今后还需通过图位克隆或功能克隆等新方法,来分离得到完整光温敏核雄性不育功能基因,或从蛋白质水平上加强对光温敏不育形成的关键蛋白的研究。

随着植物分子遗传学研究的深入,从叶绿体细胞器角度对植物雄性不育性进行的研究也越来越多。叶绿体是光温敏雄性不育形成过程中承上启下的受体结构^[3],其中光敏色素是光周期的受体^[4-5]。叶绿体蛋白质方面,很多研究表明,PPR(pentatricopeptide repeat)蛋白家族与细胞质雄性不育的育性恢复相关^[6]。张维佳等^[7]研究发现,CMS 小麦小偃 6 号孕穗期叶绿体蛋白质组存在差异。李家洋等^[8]对高粱、玉米、甜菜的可育系与不育系叶绿体类囊体蛋白质分别进行单向电泳研究,发现图谱上出现的少量蛋白条带有深浅差异,表明可育、不育系叶绿体类囊体蛋白质存在量上的差异。陈学军等^[9]通过对榨菜幼苗期、抽薹期不育系和保持系叶绿体多肽进行 SDS-PAGE 电泳,发现不育系中均比保持系多出 1 个特异多肽。李继耕等^[5]在甜菜、玉米和高粱等叶绿体类囊体膜蛋白的研究中发现,可育系与不育系类囊体膜蛋白组在 32~35 kD 间组成有明显差异。范宝莉等^[10]对小麦 T 型细胞质雄性不育系以及保持系的苗期、分蘖期、拔节期、孕穗期叶绿体分析发现,各时期的蛋白质差异较大。由此推断,雄性不育性与叶绿体之间存在某种联系。

迄今为止,有关光温敏雄性不育基因的研究报道较多,但玉米光温敏雄性不育机制至今尚未研究透彻。本研究以雄性不育玉米 9417 为材料,通过对玉米叶绿体的分离,利用蛋白质组学技术比较玉米 9417

可育、不育株叶片叶绿体蛋白质组,试图找出不育、可育株差异蛋白,以探索叶绿体与雄性不育的关系,从分子水平上揭示玉米不育性形成的机制,同时为普通雄性核不育性材料的利用提供理论指导。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试材料为光温敏核不育玉米 9417,由李维平教授提供,其特点表现为:①春播(低温条件下)不育,夏播(高温条件下)可育;②雄性不育是由雄蕊雄花小穗的退化败育引起的,表现为小穗未分化发育,雄花彻底败育,不育性易于直观辨别,且表现出的光温敏不育性稳定遗传^[11]。春播 4 月 28 日播种,夏播 6 月 14 日播种,田间管理同普通大田。雄穗不育程度育性鉴定按照李竞雄等^[12]的 6 级标准进行。从植株开始散粉至结束,逐天调查单株育性。

1.2 样品采集

分别选取玉米光温敏雄性不育、可育植株,春、夏玉米取样时,分别挂牌记下叶龄余数和取样日期。根据叶龄余数和穗的长度确定幼穗的发育时期,根据雄穗大小,于幼穗刚开始孕育穗长不超过 5 cm 的时期(主要是Ⅳ期和Ⅴ期的幼穗)取可育株和不育株的叶片,分别随机取 5 株;使用塑料袋包住叶片,临时保存在放有冰袋的冰盒,同时称取质量,−80℃保存。

1.3 叶绿体蛋白提取

叶绿体的制备采用 Block 等^[13]的方法。叶绿体蛋白提取采用唐新科等^[14]的方法,蛋白定量采用 Bradford 方法^[15],利用已知浓度的牛血清蛋白(BSA)制标准曲线,然后对待测蛋白样品溶液的浓度进行定量测定。

1.4 叶绿体蛋白 SDS-PAGE 凝胶电泳

采用垂直板变性不连续 SDS-PAGE 凝胶电泳系统,选择 13%(m/v)的分离胶、5%(m/v)的浓缩胶,具体参考理查德 J 等^[16]的方法。上样量为 14 μL,采用稳压方式进行电泳,在浓缩胶时,恒压 150 V,待溴酚蓝迁移出浓缩胶时,换成 200 V 恒压电泳至结束,待溴酚蓝指示剂迁移至距凝胶板底部 0.5~1.0 cm 处停止电泳,电泳耗时 4.5~6.0 h。考马斯亮蓝染色 2~4 h 后进行脱色,之后使用凝胶成像系统记录。

1.5 蛋白质胶内酶切后 MALDI-TOF-MS 分析

采用李维平等^[17]的方法进行胶内酶切。MALDI-TOF-MS 质谱分析在西北大学进行。模式设置为线性,激光源波长为 355 nm 波长,采用正离子及自动获取数据模式进行数据采集,PMF 质量图谱扫描范围设置为 400~5 000 Da。

1.6 蛋白质鉴定

对获得的肽指纹图谱(PMF),通过 GPS(Applied Biosystems,USA)提供的 Mascot Search 软件在 <http://www.matrixscience.com> 网站进行蛋白质数据检索。参数设置参考螺旋网^[18],将较为可信的肽序列片段录入到输入框进行检索、鉴定。

2 结果与分析

2.1 叶绿体蛋白 SDS-PAGE 凝胶电泳图谱分析

提取玉米光温敏雄性可育、不育株叶片叶绿体蛋白,使用 13%(*m/v*)的聚丙烯酰胺凝胶,电泳图谱见图 1。从图 1 中可以看出,光温敏雄性不育株与可育株叶片叶绿体蛋白的电泳图谱中出现了差异蛋白条带,将差异蛋白条带标记为 No. 1、No. 2、No. 3、No. 4。No. 1、No. 2 属于雄性可育株叶绿体中不存在而不育株没有出现的差异蛋白条带;No. 3、No. 4 是雄性不育株叶绿体存在而可育株未出现的差异蛋白条带,表明玉米幼穗孕育分化穗长不超过 5 cm 的时期,光温敏雄性不育株和可育株叶片叶绿体表达出的蛋白质存在差异。

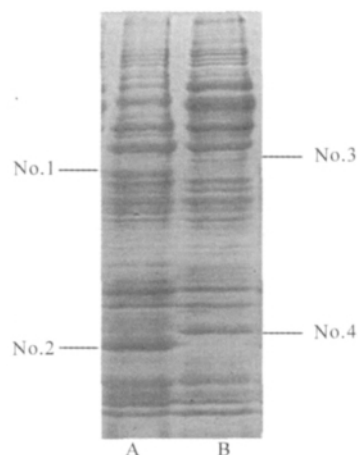


图 1 玉米光温敏雄性可育株 A、不育株 B 叶片叶绿体蛋白 SDS-PAGE 电泳图谱

2.2 叶绿体差异蛋白的肽质量指纹图谱分析

经由质谱测定而获得肽质量指纹图谱(PMF),由于每种蛋白质的 PMF 都是特异性的,因此可用来对蛋白质进行鉴定。此方法通量高、速度快,是经典的蛋白质鉴定方法。叶绿体差异蛋白条带的 PMF 图谱见图 2,由图 2 可见,质谱信号基线平稳, m/z (质荷比)均在预置的检测范围,且峰型明显,强度大,分辨率好。

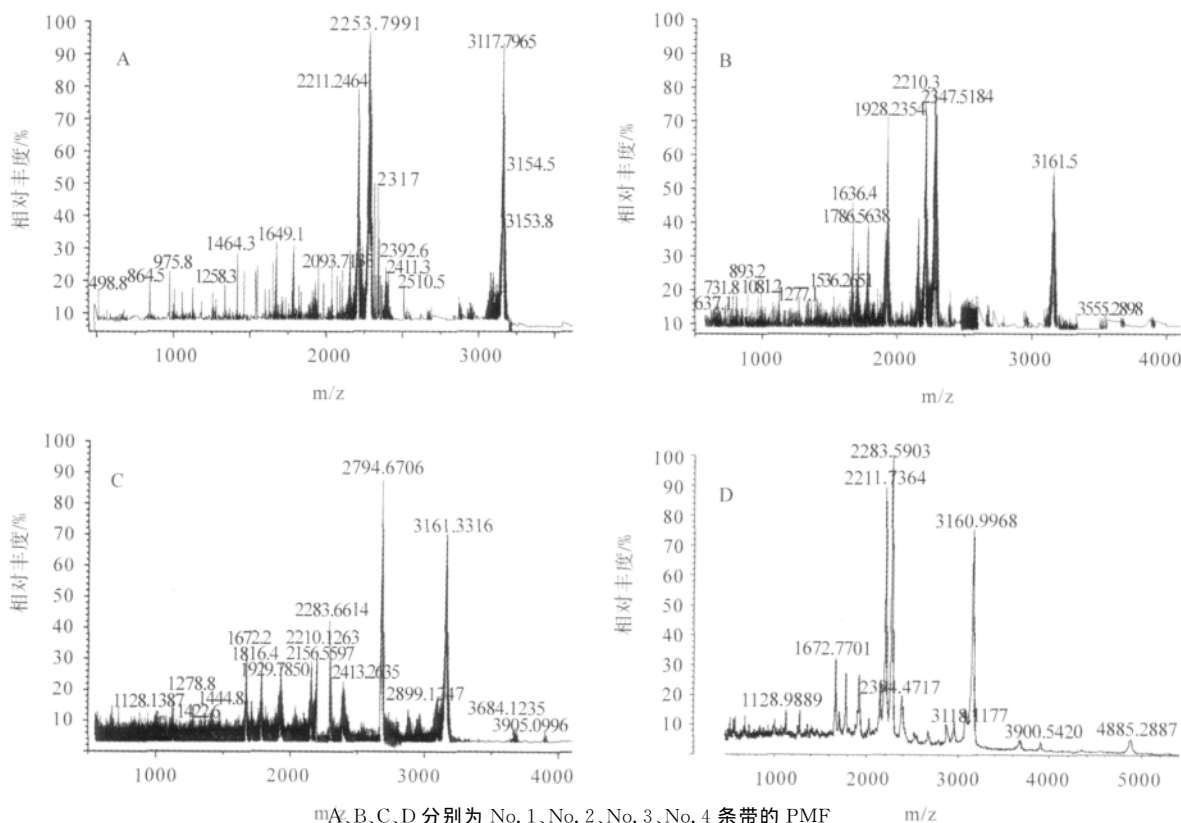


图 2 叶绿体差异蛋白的 PMF 图谱

2.3 叶绿体差异蛋白条带的质谱鉴定结果

运用 MALDI-TOF-MS 对电泳图谱出现的

4 条差异条带进行质谱分析,获得 4 幅肽指纹图谱。4 幅肽指纹图谱经 Mascot 软件数据库检索,在各差异

条带中分别成功鉴定出 1 种可靠性较好的蛋白(表 1)。一般把鉴定出的蛋白序列覆盖率小于 15%或匹配的肽段小于 5 个的匹配结果定义为不可靠^[19]。

从表 1 可以看出,检出蛋白质的得分很高,均在 90 以上,而其多肽的覆盖率在 35%~63%,肽段匹配数均大于 5,表明检出蛋白质的准确性好、可靠度较高。

表 1 叶绿体差异蛋白条带的质谱鉴定结果

编号	NCBI 登录号	蛋白质名称	分子量/kDa	等电点	匹配数	序列覆盖率/%	分数
1	gi 345570992	AOL_s00004g466	94 987	5.50	28	35	96
2	gi 340377705	luc7-like protein 3-like	54 200	10.09	24	42	90
3	gi 377880431	T3SS effector EspN2-2	66 388	7.15	14	30	98
4	gi 124263097	ABC transporter ATP-binding protein	29 502	9.18	16	63	138

2.4 叶绿体差异蛋白的生物信息学分析

从可育株叶绿体蛋白差异条带鉴定出 2 种蛋白质,其中 AOL_s00004g466 蛋白是玉米中的一种假定蛋白,目前国内外研究较少,还没有关于其机制功能或与其他蛋白相互作用的报道,因此其相关特性、功能还不清楚。luc7-like protein 3-like(Luc7)蛋白仅在多种低等生物中检索匹配出结果,得到肽序列片段匹配的生物有 *P. Troglodytes*、*H. Sapiens*、*C. lupus familiaris*、*B. Taurus*、*R. norvegicus*、*X. Laevis*、*D. Rerio*、*S. Scrofa*、*O. cuniculus* 等。关于 Luc7 蛋白的功能与作用,目前国内外研究还不多,仅知道 Luc7 蛋白在 RNA 的加工和修饰中有介导合成的作用。

从不育株叶片叶绿体差异蛋白条带鉴定出 2 种蛋白质,其中差异蛋白 T3SS effector EspN2-2 是一种具有 T3SS 效应的结构域蛋白。目前,对 T3SS 效应研究得较多,而对单个 EspN2-2 蛋白研究得较少。Jorge Galán 等^[20]对 T3SS 作用机制的最新研究发现,T3SS 是一类多肽,其作用是将外源蛋白送进真核细胞中;这些细胞器首先在病原体中被发现,基因组扫描显示,它们在很多细菌和真核生物中均存在,并指出该类型细胞器可输送不同的蛋白,引起各种动物和植物的重要疾病,对动植物来说是共生的或致病的。ATP-binding cassette transporter (ABC 转运蛋白)蛋白是一类跨膜蛋白家族,它可以在 ATP 结合区域利用 ATP 水解作用参与一定的生物学过程,如参与 RNA 和 DNA 修复翻译易位以及单向转运底物,在细胞内、外膜转运离子、糖、氨基酸、脂类、固醇、甾醇以及药物等一些代谢产物^[21]。

3 结论与讨论

亚细胞蛋白质组学研究是近年来蛋白质组学研究中的一个热点,蛋白质组分析已成为在亚细胞水平鉴定植物功能蛋白的有力工具。SDS-PAGE 凝

胶电泳的分辨率低于双向电泳,可分析出的差异蛋白较少,但其对 pH 值和温度变化较稳定,几乎无电渗作用,重复性好^[23],因此,本试验采用 SDS-PAGE 凝胶电泳。

试验中使用了光温敏雄性不育玉米 9417 雄穗白色突变体进行研究,白色突变体是良好的遗传材料,由于玉米 9417 表现为雄穗小穗白化败育、无花药、无花粉^[11],因此,选择其叶片叶绿体蛋白进行研究。叶绿体具有光合以及合成一些氨基酸的功能,说明其含有某些特殊功能蛋白质,叶绿体中的大部分蛋白质都是在细胞核中翻译,在细胞质中合成,然后被转运到叶绿体^[24]。叶绿体构造复杂,因此,叶绿体中蛋白转运途径更为复杂^[24]。试验中鉴别出的 4 种差异蛋白,具体哪些是核基因组编码合成而后转运至叶绿体,哪些是叶绿体自身基因编码而表达的,以及其在叶绿体细胞器中的具体定位,都还有待进一步的研究和分析,但差异蛋白的出现,已揭示出它们有可能在叶绿体正常形成或功能发挥方面有重要作用,是参与叶绿体功能作用的功能蛋白。

蛋白质的变化直接影响到细胞的分化和发育过程。某些蛋白如酶和代谢调节物,是雄穗发育分化进程中的重要影响物质,其在生殖组织器官发育过程中的不足会使得小孢子营养不良或者生理代谢紊乱进而出现不发育或败育^[25]。在不育株中分离出的特异性蛋白都涉及参与物质的转运,有报道称这 2 种蛋白和动植物致病性相关。如人体中一些特定的 ABC 转运蛋白,在多种药耐性的肿瘤细胞中存在过量表达的现象,可能直接或间接导致多种遗传疾病^[22]。从不育株中分离出的 T3SS 家族蛋白,作用是将外源蛋白送进真核细胞中;ABC 转运蛋白可提供运输过程中所需的 ATP,表明它们很可能是叶绿体中的膜蛋白,起运输作用。这 2 种蛋白从不育株叶片中分离出来,则说明不育株在雄穗长度不超过 5 cm 的分化敏感期,其叶片叶绿体中这 2 种蛋白质

大量表达并发挥功能作用,向叶绿体细胞器运输一些致病物质,致使叶绿体不能合成或不能合成足够的营养或调节物转运到雄穗中,这可能是光温敏雄性不育机制复杂化的原因所在。

在玉米蛋白质数据库中,4 个差异蛋白条带的 PMF 图谱没有得到匹配,仅 ABC transporter ATP-binding protein 家族在水稻(*Oryza sativa*)蛋白质数据库中检测得到匹配,其余主要在低等绿色植物或微生物及人类蛋白质数据库中检索匹配出差异蛋白,说明非模式植物的玉米叶片叶绿体蛋白质组学方面的研究还较少,其蛋白质数据库还很很不完善;另一方面也表明鉴定出的蛋白极有可能是玉米中尚未研究报道的新蛋白,这为进一步在基因水平上研究玉米雄性不育性的形成机制提供了有益的信息与启示。

本研究利用蛋白质组学研究方法对光温敏玉米 9417 幼穗分化期叶片叶绿体蛋白进行研究,在 SDS-PAGE 凝胶电泳中分离出 4 条差异蛋白条带,并从中分别鉴定出 1 个可靠度较高的蛋白,鉴定出的 4 个蛋白均未在玉米中有过相关研究。同时,在幼穗期(雄穗长度小于 5 cm)出现差异蛋白,其功能作用可能涉及玉米光温敏雄性核不育育性转换机制,目前只能说这些蛋白质可能与雄性不育有关,但是这些差异蛋白是如何调控育性的尚不清楚。

参考文献:

- [1] 曹双河,张相岐,张爱民.光(温)敏雄性不育的调控机理和分子遗传学研究进展[J].植物学通报,2005,22(1):19-26.
- [2] 周飞捷,肖层林,刘爱民,等.水稻光温敏核不育系育性转换特性研究概述[J].作物研究,2009,23(5):300-305.
- [3] 左宝玉,童哲,姜桂珍.光周期对光敏核不育水稻叶绿体类囊体膜超分子结构的影响[J].植物学报,1996,38:337-341.
- [4] Tong Z, Wang T, Xu Y. Evidence for involvement of phytochrome regulation in male sterility of a mutant of *Oryza sativa* L[J]. Journal of Phytochemical Photobiology, 1990, 53: 161-164.
- [5] 李继耕.细胞质雄性不育性的分子机理[J].遗传,1992,4(2):37-40.
- [6] Lurin C, Andres C, Aubourg S, et al. Genome-wide analysis of *Arabidopsis* pentatricopeptide repeat proteins reveals their essential role in organelle biogenesis[J]. Plant Cell, 2004, 16(8): 2089-2103.
- [7] 张维佳,王艳,李雪梅,等.由不同细胞核背景引起的小麦细胞质雄性不育系(CMS)叶绿体蛋白质组的变化(简报)[J].分子细胞生物学报,2007,40(1):84-89.
- [8] 李家洋,李继耕.叶绿体类囊体膜多肽与细胞质雄性不育性[J].遗传学报,1986,13(6):430-436.
- [9] 陈学军,陈竹君,杜广晞,等.榨菜胞质雄性不育系和保持系叶绿体多肽电泳比较研究[J].浙江大学学报:农业与生命科学版,2001,27(1):88-88.
- [10] 范宝莉,王振英,陈宏,等.小麦 T 型细胞质雄性不育系、保持系蛋白质双向电泳比较研究[J].实验生物学报,2004,37(1):45-49.
- [11] 李维平,张文莉,田中民.玉米光温敏雄性不育系的选育策略[J].西北植物学报,2004,24(3):488-494.
- [12] 李竞雄,戴景瑞,许启凤,等.玉米雄花不孕性及其恢复性的遗传研究[J].作物学报,1963,2(4):339-364.
- [13] Block M A, Tewari A K, Albrieux C, et al. The plant S-adenosyl-L-methionine: Mg-protoporphyrin IX methyltransferase is located in both envelope and thylakoid chloroplast membranes[J]. Eur J Biochem, 2002, 269(1):240-248.
- [14] 唐新科,周平兰,谭爱武.菠菜叶绿体蛋白质的提取与分离[J].湘潭师范学院学报:自然科学版,2008,30(4):33-35.
- [15] John M, Walker. The protein protocols handbook [M]. 2nd ed. Totowa, NJ: Hunuma Press Inc, 2002: 15-21.
- [16] 理查德 J,辛普森.蛋白质与蛋白质组学实验指南[M].北京:科学出版社,2003:112-116.
- [17] 李维平,陈捷,彭宣宪,等.蛋白质组学[M].北京:中国农业出版社,2009:134-140.
- [18] 螺旋网. Mascot 检索软件在蛋白质质谱鉴定中的应用[EB/OL]. <http://www.helixnet.cn/bbs/thread-33985-1-1.html>, 2010.
- [19] 杨霞.高效棉酚降解菌株的筛选鉴定及其差异蛋白质组学研究[D].杭州:浙江大学,2010.
- [20] Jorge Galán, Hans Wolf-Watz. Protein delivery into eukaryotic cells by type III secretion machines[J]. Nature, 2006, 444: 567-573.
- [21] 赵胡,李裕红.植物 ABC 转运蛋白研究综述[J].海峡科学,2012(2):13-16.
- [22] Michael D, Yannick H, Giovanna C. The human ATP-binding cassette (ABC) transporter superfamily[J]. The Journal of Lipid Research, 2001, 42: 1007-1017.
- [23] 郭尧君.蛋白质电泳实验技术[M].北京:科学出版社,1999.
- [24] 朱琼枝,李秀敏.蛋白质进入叶绿体之连续步骤[J].中央研究院周报,2008(11):15-16.
- [25] 朱广廉,曹宗巽.花粉中的游离脯氨酸及其生理功能[J].植物生理学通讯,1985(4):7-12.