

水稻及其他禾本科植物体内硅结合蛋白的免疫印迹检测*

史新慧 覃闯登 宋建兰 夏晓平 王 贺**

(中国农业大学资源与环境学院植物营养系, 植物-土壤相互作用教育部重点实验室, 北京 100094)

摘要 为了检测硅结合蛋白在水稻和禾本科植物体内的分布, 根据硅结合蛋白 (silica-binding protein 117, SBP117) 的氨基酸保守片段和天然抗原表位, 合成了 SBP117 的两个肽段做抗原, 与匙孔蚌血蓝蛋白载体偶联后免疫兔子, 获得了抗 SBP117 的专一性抗体. 蛋白质印迹和免疫印迹检测表明, SBP117 的抗体不仅能识别水稻硅结合蛋白, 而且与其他累积硅的禾本科植物中提取的硅结合蛋白有交叉反应, 但它不识别不累积硅的双子叶植物番茄叶中的蛋白质以及牛血清蛋白, 说明与 SBP117 同源的硅结合蛋白广泛存在于禾本科植物之中. 组织印迹法定位显示, SBP117 主要分布在水稻根茎叶的外表皮中, 在根和叶的维管组织中也有分布, 这与前人报道的硅在水稻体内的分布是一致的, 说明此蛋白质可能参与诱导和控制硅在植物体内的沉积.

关键词 硅, 水稻, 禾本科, 硅结合蛋白, 合成肽, 组织印迹

学科分类号 Q94

禾本科植物是典型的积累硅的植物, 以前人们并不了解硅的生理功能, 但是, 近几年来, 大量研究已经充分证明, 硅对保证植物的健康生长具有重要的作用. 硅可提高水稻的产量, 增加机械强度, 提高其对病虫害、干旱、盐害及重金属胁迫的抗性^[1-4]. 此外, 硅对人类健康也起着重要作用, 研究发现, 硅能促进人体骨骼的发育, 还能减少人们对食物中神经毒性元素铝的摄入, 防止早老性痴呆症^[5]. 然而, 硅在禾本科植物中的积累也降低了牲畜对秸秆饲料的消化率, 降低了麦秸等造纸原料的纸浆产率^[6]. 因此, 近年来, 人们迫切需要了解植物体内控制硅沉积的机制. 一方面, 希望通过分子遗传手段增加经济作物中硅的含量 (特别是含硅量低的双子叶植物), 这既可以培育出具有高产和抗逆作用的优良品种, 也可以增加人体对硅的摄入量; 另一方面, 又希望通过敲除或抑制硅沉积的基因, 培育出含硅量低的、适合于牲畜食用的禾本科饲料作物或造纸专用的植物品种^[7]. 因此, 阐明植物控制硅沉积的分子机制, 在作物抗逆性状的分子改良、畜牧业、造纸业及保健医学等方面具有重要的应用前景.

最近, 一些学者在低等海洋生物硅藻和海绵中发现了控制硅沉积的蛋白质和基因^[7-10], 但在高等植物中尚未发现控制硅沉积的蛋白质, Harrison 等^[11]和 Perry 等^[12]从芦苇叶片硅体中分离到蛋白质降解产生的各种氨基酸, 因而认为高等植物硅体中存在着控制硅沉积的蛋白质, 但她们并未获得完整的蛋

白质分子.

最近我们小组首次从水稻叶片的新鲜硅体中, 分离到一种与硅紧密结合的分子质量为 117 ku 的蛋白质, 称之为硅结合蛋白 (silica-binding protein 117, SBP117). 体外试验证明它具有与硅结合并诱导硅沉淀的能力. 通过 N 端测序和查询 NCBI 蛋白质数据库, 发现 SBP117 是一种未知功能的富脯氨酸蛋白家族的成员, 其蛋白质序列号为 AAO72557.1^[13]. SBP117 是以 PEPK 为基元组成的高度重复序列蛋白, 它的氨基酸组成与硅藻中发现的硅结合蛋白相似, 富含带正电荷的碱性氨基酸, 但其氨基酸排列顺序与之明显不同, 说明 SBP117 可能是一种禾本科植物所特有的控制硅沉积代谢的蛋白质. 但是它在组织中的分布及其与硅沉积的关系还不清楚, 为了进一步阐明此种蛋白质在植物体内硅代谢过程中的作用, 我们用合成肽制备了该蛋白质的抗体, 并对其在水稻体内和其他禾本科植物中的分布做了免疫印迹检测.

1 材料与方法

1.1 硅结合蛋白抗体的制备

1.1.1 SBP117 两条多肽的合成及纯化. 根据

*国家自然科学基金资助项目(30170175 和 30471304).

** 通讯联系人.

Tel: 010-62733942, Fax: 010-62731016

E-mail: wanghe@cau.edu.cn

收稿日期: 2004-11-02, 接受日期: 2004-12-30

SBP117的氨基酸全长序列, 利用 DNASTar 软件分析获得表面抗原性最强的氨基酸序列信息, 选择其中第 58 位至第 71 位的 14 个氨基酸残基, 即 PKPKPKPHPKPTPK (称为 pep1) 和其中高度重复的保守氨基酸序列 PEPKPEPKPEPKPEPK (称为 pep2) 2 个具有抗原决定簇的片段, 用固相法对其进行了人工合成(西安美联生物科技有限公司). 合成时出于与载体蛋白偶联反应的需要, 在羧基端人为地加入一个在靶蛋白相应序列中本不存在的 Cys 残基, 利用它作为接头把合成肽偶联于载体蛋白上. 合成肽经过制备性高效液相层析进行纯化, 用质谱对纯度进行鉴定.

1.1.2 合成肽与匙孔蠍血蓝蛋白的偶联与纯化. 合成肽属于小分子肽段, 一般称为半抗原, 免疫原性较弱, 需偶联到一种蛋白质载体上以提高其免疫原性, 参考 Mumby 和 Gilman^[14]的方法, 将合成肽与匙孔蠍血蓝蛋白偶联后, 免疫家兔而制得抗血清. 具体步骤如下: 将 25 g 购买的匙孔蠍血蓝蛋白 (KLH) 干粉溶于 0.5 ml 水中, 稀释得 10 g/L KLH 溶液 (含 33 mmol/L pH 7.4 的磷酸缓冲液, 45 mmol/L 氯化钠, 40 mmol/L 蔗糖), 偶联一条多肽需 0.25 ml KLH 溶液. 磁力搅拌器上剧烈搅拌下加入 25 μ l 含有 0.75 mg MBS 的二甲基亚砜 (DMSO), 继续磁力搅拌 30 min. 装填一只柱床体积为 20 ml 的 Sephadex G-25(细)层析柱, 用 pH 7.4 的 PBS 平衡后将 KLH 溶液上样, 即开始收集洗脱液, 每管收集 0.5 ml, 通过洗出液的 A_{280} 检测 KLH-MBS 的洗脱过程, 从柱上洗脱下来峰值最高的即为 KLH-MBS 缀合物, 层析的目的是从样品中除去未缀合的 MBS 以及 DMSO. 称取 1 mg 合成肽用 40 μ l 已脱气的 PBS (pH 7.4) 溶解, 把收集到的 KLH-MBS 组分与已溶解的合成肽混合, 通氮气 2 min, 盖上盖, 磁力搅拌 3 h, 然后冷冻保存.

1.1.3 抗体制备. 由中国科学院遗传与发育研究所动物中心协助制备抗体. 取 1 ml 偶联合成肽作抗原, 与等体积完全福氏佐剂混合, 充分乳化后, 多点皮下注射家兔, 以后每隔两周用弗氏不完全佐剂与多肽乳化后免疫兔子. 3 次免疫后一周耳静脉采血, 测定其效价. 耳免疫一次一周后动脉放血, 分离血清, -20°C 冷冻保存. 取免疫前的血清作为阴性对照.

1.2 抗血清效价的测定

参考 Nawkes 等^[15]的方法, 分别以人工合成的 pep1 和 pep2 两条多肽为抗原, 用 TBST 分别稀释

1、 10^{-1} 、 10^{-2} 、 10^{-3} 、 10^{-4} 、 10^{-5} 、 10^{-6} 倍, 对应的蛋白量为 2 μ g, 0.2 μ g, 20 ng, 2 ng, 200 pg, 20 pg, 2 pg. 剪 3 条硝酸纤维素膜 (NC 膜), 依次点上 2 μ l 上述稀释液, 室温干燥, 用含 5% 脱脂奶粉的 TBST (50 mmol/L Tris-HCl, 200 mmol/L NaCl, pH 7.4, 0.01% Tween-20) 缓冲液室温封闭 1 h, 然后在室温下用 1:100 稀释的一抗孵育 2 h, 经 TBST 清洗 3 $\times$ 15 min 后, 用工作浓度为 1:100 的碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG 二抗孵育 1 h, 用 TBST 清洗干净后, 将膜转入新鲜配置的 NBT/BCIP 显色液反应体系中显色 30 min 至条带出现, 根据抗原的稀释倍数计算抗血清的效价.

1.3 硅结合蛋白的制备

提取方法见文献[13], 将新鲜的植物叶片或根切碎并用液氮冷冻, 然后用高速组织捣碎机捣碎, 匀浆液经反复低速离心和 1.5% Triton X-100 水溶液及丙酮漂洗, 除去悬浮的细胞质污染物, 得到粗硅体. 再用不同孔径的筛网分级和 1.5% Triton X-100 水溶液及丙酮漂洗, 除去细胞壁杂质, 得到纯净的新鲜硅体. 用 10 mol/L 浓度的氟化氢溶解硅体, 再用透析袋充分透析除去可溶性硅, 冷冻干燥得到总的硅结合蛋白.

1.4 蛋白质电泳及免疫印迹分析

参考 Laemmli^[16]的方法, 用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶 (SDS-PAGE) 电泳分离硅结合蛋白, 然后将蛋白质电转移到 PVDF (聚乙烯二氟) 膜上 (50 V 转移 2 h), 转移效果用丽春红染色鉴定. 用 TBST 洗尽丽春红后, 用封闭液封闭 1 h, 然后在室温下用一抗孵育 2 h, 一抗为工作浓度为 1:2 500 的 pep2 多克隆抗体, 经 TBST 清洗后, 用工作浓度为 1:500 碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG 二抗孵育 1 h, 最后用 TBST 清洗. 将 PVDF 膜转入新鲜配置的显色体系中显色 30 min 至条带出现.

1.5 各种禾本科植物体内硅结合蛋白的点印迹分析

为了进一步验证水稻硅结合蛋白抗体的专一性以及检测其他禾本科植物体内是否存在类似蛋白, 我们用免疫印迹方法对不同植物来源的蛋白质进行了分析, 方法如下: 剪 4 条 NC 膜, 依次将 pep1、pep2、各种硅结合蛋白 (水稻叶、稻壳、小麦叶、小麦壳、大麦叶、大麦壳、高粱叶、高粱根、竹子叶、芦苇叶、玉米叶)、番茄叶可溶蛋白、牛血清蛋白 (BSA) 依次点到 NC 膜上, 每个样品点 2 μ l, 相当于 2 μ g 蛋白质. 其中一条 NC 膜用氨基黑染色以检测其总蛋白质含量, 另外两条 NC 膜分别用稀

释度为 1:500 的抗 pep1 和抗 pep2 的多克隆抗体为一抗, 碱性磷酸酶标记的羊抗兔抗体为二抗, 检测硅结合蛋白的存在, 其中一条 NC 膜用免疫之前的兔血清代替一抗作为阴性对照处理。

1.6 硅结合蛋白的组织印迹定位

参考 Ye 和 Varner^[17]的方法, 将数层滤纸放到平滑坚实的台面上, 其上放一张 NC 膜. 用双面刀片切下一块 0.2~2 mm 厚的平整的组织片 (新鲜水稻根、茎、叶), 用镊子将新鲜组织切片转移到 NC 膜上, 当切片与膜接触之后, 要避免其滑动, 防止产生不清晰的涂抹印迹, 放一小片不吸水的硫酸纸或玻璃纸于切片上面, 防止在 NC 膜上产生手指印迹 (也可带橡胶手套操作), 用手指以适当的力量垂直向下按压切片, 以组织切片不变形为宜, 持续 30 s, 用镊子轻轻移去硫酸纸和切片, 用热的流动空气使 NC 膜上的印迹干燥. 然后一条膜用氨基黑

染总蛋白, 另一条 NC 膜用稀释度为 1:500 的 pep2 的多克隆抗体为一抗孵育 2 h, 再与 1:500 稀释度的碱性磷酸酯酶连接的羊抗兔 IgG 第二抗体温育, 用新鲜配置的 NBT/BCIP 显色液显色. 对照用含 5% 脱脂奶粉的 TBST 代替一抗. 组织印迹结果用 Leica 多功能显微镜观察照相。

2 结 果

2.1 SBP117 两条多肽的合成及纯化

用固相法合成 SBP117 的 pep1 和 pep2 两条多肽, 经制备性高效液相色谱纯化后, 分别用质谱和 HPLC 对其纯度进行了测定, 见图 1a 所示. 质谱测定 pep2 的相对分子质量为 1 927.15, 与预测的理论相对分子质量 1 927.52 大小完全相符, 高效液相色谱分析显示, 样品的纯度达到 98% 以上 (图 1b), 这完全符合制备抗体的要求。

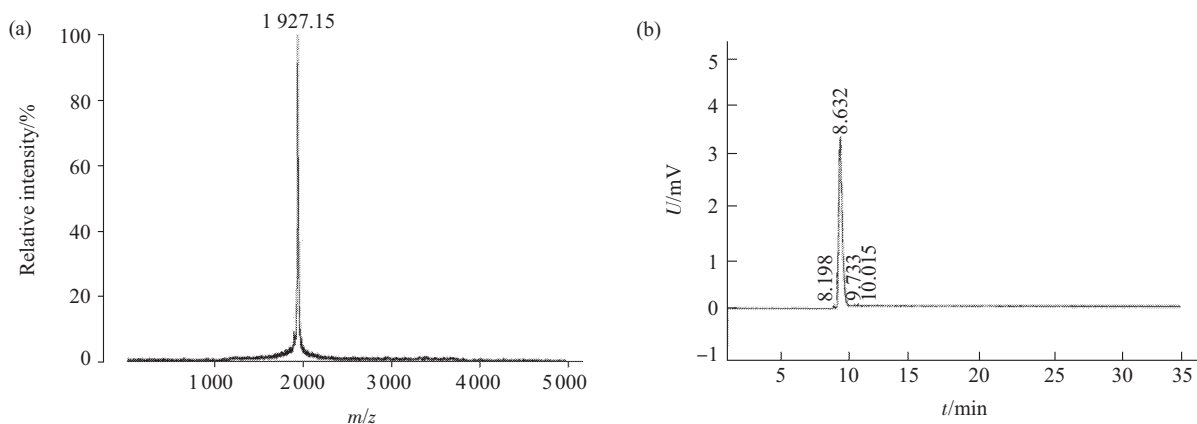


Fig.1 Mass spectrum (a) and HPLC analysis (b) of peptide 2
17 amino acid residues.

2.2 多克隆抗体效价的检测

点印迹分析表明, pep1 多克隆抗体的效价达 $1:2 \times 10^4$ 以上, 而 pep2 抗体的效价更高, 达 $1:2 \times 10^5$ 以上 (图 2)。

2.3 SBP117 蛋白的免疫印迹检测

图 3 (1, 2) 分别为提取的水稻新鲜叶片总可溶蛋白和用 NH_4F 提取的水稻硅结合总蛋白的 SDS-PAGE 图谱, 可见二者没有重叠, 说明 NH_4F 提取的硅结合蛋白为硅体所特有, 未受到细胞可溶蛋白的污染, 在分子质量标准 16 ku 附近有一明显的主带, 这就是 SBP117 蛋白, 此外在其下面还有一微弱的 100 ku 的蛋白质条带 (图 3-2). 电转移至 PVDF 膜上之后, 用 pep2 多克隆抗体检测, 叶片总可溶蛋白没有免疫印记蛋白条带出现 (图 3-3),

NH_4F 提取的水稻硅结合总蛋白免疫印迹检测, 可

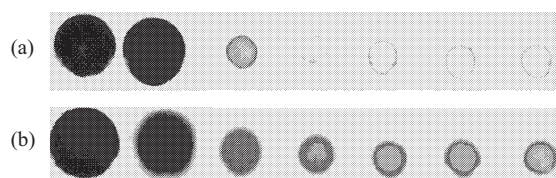


Fig.2 Dot-western analysis for titers of anti-serum against pep1 (a) and pep2 (b)

Both pep1 and pep2 are diluted with TBST by 10^0 , 10^{-1} , 10^{-2} , 10^{-3} , 10^{-4} , 10^{-5} , 10^{-6} , respectively. The proteins (2 μl) were spotted on PVDF membrane and the corresponding protein content is 2 μg , 0.2 μg , 20 ng, 2 ng, 200 pg, 20 pg, 2 pg. The membrane was blocked with 5% skimmed milk powder for 1 h followed by incubation in primary antibody at a dilution of 1:100 in TBST. Alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG used as a secondary antibody (dilution 1:100) and NBT and BCIP were used for color development.

见在 117 ku 之处有一明显的染色条带(图 3-4 箭头), 说明 pep2 抗体能专一性地识别 SBP117, 可用于硅结合蛋白免疫组化定位。

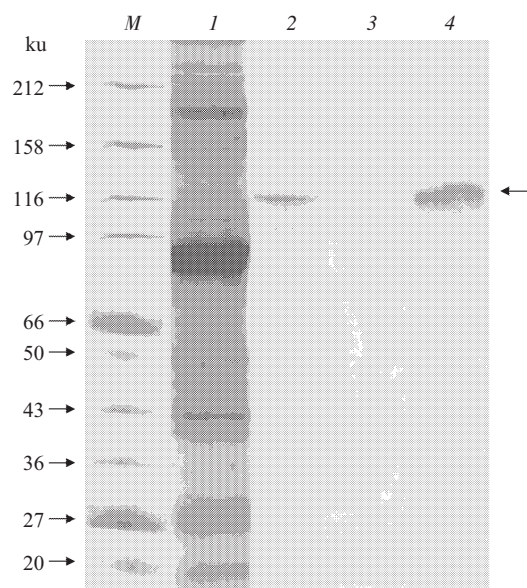


Fig.3 SDS-PAGE and Western blot detection of SBP117 in total extracted proteins from rice silicon bodies and in total soluble proteins from fresh leaves

M: protein molecular mass markers. Total soluble proteins (25 μ g of protein) from rice fresh leaves and total silicon binding proteins (2 μ g of protein) extracted by NH_4F were either stained by Coomassie blue (lanes 1 and 2) or blotted onto PVDF membrane and immunostained with the antiserum against pep2 (dilution 1:2500) (lanes 3 and 4). Silicon binding proteins (4 μ g of protein) (lane 4) were used. The arrow in (4) denotes the SBP117.

2.4 抗体对其他禾本科植物硅结合蛋白的特异性检测

为了进一步确定所制备的免疫血清与 SBP117 免疫反应的特异性, 提取纯化了各种植物体内的硅结合蛋白, 用点印迹法检测各种硅结合蛋白对 pep1 和 pep2 多克隆抗体的交叉反应情况。结果显示 pep1 抗体与 pep2 抗体之间无任何交叉反应, 它们均能识别水稻硅结合蛋白, 但不识别牛血清蛋白, 也不识别不积累硅的双子叶植物番茄叶中的蛋白质(图 4), 这说明制备的两个多克隆抗体能特异性地识别水稻硅结合蛋白。

从图 5 可以看出, pep2 抗体不仅能识别水稻硅结合蛋白, 而且能很好地识别来源于其他禾本科植物的硅结合蛋白, 这些蛋白质来源于小麦叶、小麦壳、大麦叶、大麦壳、高粱叶、高粱根、竹子叶、芦苇叶和玉米叶, 这说明与 SBP117 结构相似

的同源蛋白广泛存在于禾本科植物之中, 这与禾本科植物都具有积累硅的能力是相吻合的, 也反映出禾本科植物积累硅具有系统发育的特征, 是这些植物长期共同进化的结果。

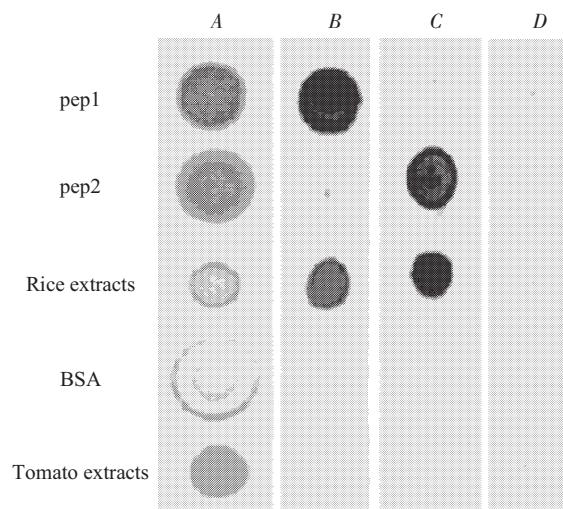


Fig.4 Immunoblot assay of different proteins (2 μ l equivalent to 2 μ g protein) using antisera raised against pep1 and pep2 (dilution 1:500)

A: stained by amino black to visualize the total proteins; B: immunoblotted by antiserum against pep1; C: immunoblotted by antiserum against pep2; D: omitting primary antibody as control. Rice extracts are the total proteins extracted from rice silicon bodies. Tomato extracts are the proteins extracted from tomato leaves.

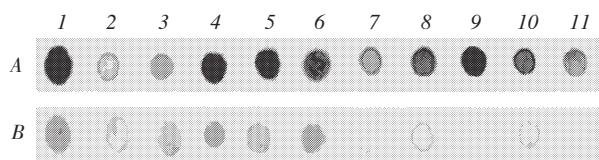


Fig.5 Immunoblot assay of silica-binding proteins (2 μ l equivalent to 2 μ g protein) from various grasses using antiserum raised against pep2 (dilution 1:500)

A: Protein dots immunoblotted by pep2 antiserum; B: Protein dots stained by amino black to visualize the total proteins. Protein dots from 1: rice leaves; 2: rice husk; 3: wheat leaves; 4: wheat husk; 5: barley leaves; 6: barley husk; 7: sorghum leaves; 8: sorghum roots; 9: bamboo leaves; 10: reed leaves; 11: maize leaves.

2.5 组织印迹

图 6 显示 SBP117 蛋白在水稻根茎叶中的分布情况。在根中, 它主要分布在外表皮及维管组织中(图 6d); 在茎中 SBP117 在外表皮细胞中有明显的积累, 而在维管束及其他茎组织中分布相对较少(图 6e); 在叶片中 SBP117 在表皮及维管束中有显

著的积累,而在叶肉细胞中分布很少(图 6f). 以上硅结合蛋白的分布模式与硅在水稻体内的分布是一

致的^[18,19],说明此蛋白质可能参与控制硅在植物体内的沉积.



Fig.6 Immunolocalization of SBP117 in rice roots, stems and leaves

(a), (b) and (c) show anatomical structure of rice roots, stems and leaves, respectively, which were stained with amino black to visualize the total proteins; (d), (e) and (f) show the distribution of SBP117 in the roots, stems and leaves proved with anti-pep2 antiserum (dilution 1:500); (g), (h) and (i) are omitted (the primary antibody were replaced with blocking solution). Alkaline phosphatase-conjugated goat anti-rabbit IgG used as a secondary antibody and NBT and BCIP were used for color development. Photo magnification for (a), (d) and (g): 40×; (b), (e) and (h): 10×; (c), (f) and (i): 20×. E: epidermis; C: cortex; V: vascular bundle.

3 讨 论

合成肽属于小分子肽段,一般称为半抗原,免疫原性较弱,需偶联到一种蛋白质载体上以提高其免疫原性.蛋白质印迹检测显示,用合成肽制备的 SBP117 蛋白抗体能专一性识别 SBP117,说明化学法合成短肽制备的抗体可用于蛋白质的免疫组织细胞化学分析.

免疫印迹法进一步证明,水稻 SBP117 的抗体还能与其他禾本科植物硅体中的蛋白质发生交叉反应,但不能与番茄叶蛋白反应,这说明,与 SBP117 相似的硅结合蛋白广泛存在于积累硅的禾本科植物之中,而在不积累硅的植物中可能并不存在,这说明硅在高等植物中的积累具有系统发育上的特征.这一分布特征与生物信息学查询结果是一

致的,李文彬^[13]用 Blastp 软件在 GenBank 中查询到多个与 SBP117 同源性达 70%~90%的硅结合蛋白,它们存在于水稻、小麦、玉米和甘蔗中.

蛋白质在体内的定位常常是与其功能相联系的,组织印迹检测发现 SBP117 蛋白在水稻根和叶的外表皮和维管组织中有较高的积累,在茎的外表皮中积累较多,而在其他部位分布很少,这与硅在水稻体内的分布是一致的^[18,19],说明此蛋白质可能参与诱导和控制硅在植物体内的沉积.

参 考 文 献

- 1 Epstein E. Silicon. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1999, **50**: 641~664
- 2 Ma J F, Miyake Y, Takahashi E. Silicons as a beneficial element for crop plants. In: Datonoff L, Kornedorfer G, eds. *Silicon in Agriculture*. New York: Elsevier Science, 2001. 17~39

- 3 Richmond K E, Sussman M. Got silicon? The non-essential beneficial plant nutrient. *Current Opinion in Plant Biology*, 2003, **6**: 268~272
- 4 Li W B, Shi X H, Wang H, *et al.* Effect of silicon on ultraviolet-B resistance of rice leaves. *Acta Bot Sin*, 2004, **46** (6): 691~697
- 5 Exley C, Korchazhkina O. The association of aluminium and beta amyloid in Alzheimer's disease. In: Exley C, eds. *Aluminium and Alzheimer's Disease*. The Netherlands: Elsevier Science, 2001. 421~433
- 6 Agbagla-Dohnani A, Noziere P, Gaillard-Martinie B, *et al.* Effect of silica content on rice straw ruminal degradation. *J Agri Sci*, 2003, **140**: 183~192
- 7 Kröger N, Deutzmann R, Sumper M. Polycationic peptides from diatom biosilica that direct silica nanosphere formation. *Science*, 1999, **286** (5442): 1129~1132
- 8 Kröger N, Lorenz S, Brunner E, *et al.* Self-assembly of highly phosphorylated silaffins. *Science*, 2002, **298** (5593): 584~586
- 9 Kröger N, Poulsen N, Sumper M. Biosilica formation in diatoms: Characterization of native silaffin-2 and its role in silica morphogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, **100** (21): 12075~12080
- 10 Cha J N, Galen D S, Morse D E, *et al.* Biomimetic synthesis of ordered silica structures mediated by block copolypeptides. *Nature*, 2000, **403**: 289~292
- 11 Harrison C C. Evidence for intramineral macromolecules containing protein from plant silicas. *Phytochemistry*, 1996, **41**: 37~42
- 12 Perry C C, Keeling-Tucker T. Model studies of colloidal silica precipitation using biosilica extracts from *Equisetum telmateia*. *Colloid Polym Sci*, 2003, **281**: 652~664
- 13 李文彬. 水稻体内硅的生理功能及沉积机理的研究:[硕士学位论文]. 北京: 中国农业大学, 2004
LI W B. Research on the physiological functions and deposition mechanisms of silicon in rice: [Master's academic dissertation]. Beijing: China Agricultural University, 2004
- 14 Mumby S M, Gilman A G. Synthetic peptide antisera with determined specificity for G protein α or β subunits. *Methods Enzymol*. 1991, **195**: 215~233
- 15 Nawkes R, Niday E, Gordon J. A dot-immunobinding assay for monoclonal and other antibodies. *Anal Biochem*, 1982, **119** (1): 142~147
- 16 Laemmli U K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 1970, **227** (259): 680~685
- 17 Ye Z H, Varner J E. Tissue-specific expression of cell wall proteins in developing soybean tissues. *Plant Cell*, 1991, **3**: 23~37
- 18 Kim S G, Kim K W, Park E W, *et al.* Silicon-induced cell wall fortification of rice leaves: a possible cellular mechanisms of enhanced host resistance to blast. *Phytopathology*, 2002, **92** (10): 1095~1103
- 19 Yoshida S, Ohnishi Y, Kitagishi K. Histochemistry of silicon in rice plant. II. Localization of silicon within rice tissues. *Soil Sci Plant Nutr*, 1962, **8** (1): 36~41

Immunoblot Detection of Silica-binding Protein in Rice and Other Gramineous Plants*

SHI Xin-Hui, QIN Chung-Deng, SONG Jian-Lan, XIA Xiao-Ping, WANG He**

(Department of Plant Nutrition, China Agricultural University,

Key Laboratory of Plant-soil Interactions, Ministry of Education, Beijing 100094, China)

Abstract In order to detect the distribution of silica-binding proteins in rice and other gramineous plants, specific polyclonal antibodies against a silica-binding protein from rice, namely SBP117, are successfully raised by synthesized peptides which are conjugated with Keyhole Limpet Hemocyanin and used as antigens to immunize rabbits. Western blot and the immunoblot results indicate that the antibodies not only can react with silicon-binding proteins of rice, but also can cross react with the proteins of other silicon-accumulated gramineous plants, while it does not react with the proteins of non-silicon accumulated dicotyledonous plants (such as tomato leaves) and BSA. These findings indicate that the homologous proteins of SBP117 are widely existed in the gramineous plants. Furthermore, tissue printing study shows that SBP117 is mainly located at the epidermis of roots, shoots and leaves as well as in the vascular bundle of the rice roots and leaves. The distribution of SBP117 in rice plants is coincided with the sites of Si accumulation in rice reported previously. Therefore it is concluded that the silicon-binding protein (SBP117) may be involved in the control of silicon deposition in rice plants.

Key words silicon, rice, gramineous plants, silica-binding protein, synthetic peptides, tissue-printing

*This work was supported by a grant from The National Natural Sciences Foundation of China (30170175 and 30471304).

**Corresponding author. Tel: 86-10-62733942, Fax: 86-10-62731016, E-mail: wanghe@cau.edu.cn

Received: November 2, 2004 Accepted: December 30, 2004