

叶绿体基因编码蛋白质在水稻叶片 生长过程中的表达研究*

兰金苹¹⁾ 李莉云¹⁾ 贾霖¹⁾ 曹英豪^{1, 2)} 白辉²⁾

陈浩¹⁾ 刘胜南¹⁾ 吴琳²⁾ 刘国振^{1)**}

(¹⁾ 河北农业大学生命科学学院, 保定 071001; ²⁾ 中国科学院北京基因组研究所, 北京 101300)

摘要 叶绿体是绿色植物把光能转化为化学能的重要细胞器。目前, 多种植物的叶绿体基因组序列已经获得, 对叶绿体内发生的各种生物学过程人们也已经有了相当深入的了解, 但对叶绿体基因编码蛋白质的表达还所知甚少。用蛋白质印迹实验系统地检测了 15 个叶绿体基因编码蛋白质在水稻叶片不同生长时期的表达。其中 7 个与光合作用相关蛋白质的表达具有相似的模式, 其表达量随叶片生长而增加, 一般在孕穗期、开花期达到最高峰, 在成熟期叶片下降, 这种模式与水稻生长对光合作用的需求有明显相关性。4 个与 DNA 复制相关的 RNA 聚合酶在苗期叶片中表达量达到最高, 说明这些聚合酶在较早时期发挥作用。4 个 NADH 脱氢酶蛋白质的表达呈 2 种不同的模式, 其中亚基 2 和 4 在种子萌发后的早期叶片中就达到最高峰, 亚基 5 和 7 的最高峰出现在中后期, 反映了它们之间功能上的不同。实验结果直观且相对定量地揭示了叶绿体编码蛋白质的表达与叶片生长之间的关联关系, 为深入了解其功能提供了重要的线索。

关键词 水稻, 叶绿体, 蛋白质表达谱, 基于抗体的蛋白质组学

学科分类号 Q5, Q7, Q816

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00028

叶绿体是绿色植物把光能转化为化学能的重要细胞器, 是植物进行光合作用的主要场所。叶绿体是半自主性细胞器, 含有相对独立的遗传系统, 能进行自我复制。据推测, 叶绿体中的蛋白质数目有几千个, 约占植物总蛋白数目的 10%~25%^[1], 其中绝大部分是由核基因编码, 并在细胞质核糖体上合成, 然后转运到叶绿体中, 只有少数是由叶绿体基因编码, 并在叶绿体的核糖体上翻译。1986 年, 烟草的叶绿体基因组测序完成^[2], 至今, 在基因组数据库中已经有近百个叶绿体基因组数据, 包括水稻、玉米和拟南芥等, 对叶绿体基因组序列分析表明, 预测的叶绿体基因组编码蛋白质在 100 个左右^[3]。

在不同的逆境条件下, 叶绿体及其编码蛋白质会发生不同的形态和生理变化。利用烟草对叶绿体的 NADH 脱氢酶(NDH)的功能进行了研究, 发现在低温下光系统 II (photosystem II, PSB)的最大光合

效率急剧下降, 但是在 NDH 突变体中 PSB 驱动的传递速率比野生型中低, 暗示 NDH 依赖的环电子流具有保护光系统不受低温损伤的功能^[4]。用活性氧(ROS)处理黄瓜叶片, 可见到 1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶(RuBisCO)大亚基的降解产物, 这种降解会被 ROS 的清除剂抑制, 而 FeSO₄ 会刺激这种降解, 表明活性氧对 RuBisCO 大亚基有直接的破坏作用^[5]。用百脉根研究干、热对叶绿体的影响, 发现在二种逆境共同作用下, 光系统 I 的活性下降及 D2 蛋白质的降解^[6]。用臭氧处理大豆幼苗, 发现与光系统 I/II 相关蛋白质表达下降, 而

* 国家自然科学基金资助项目(30670175, 30730007)和国家重点基础研究发展计划(973)资助项目(2007CB109201, 2006CB101705)。

** 通讯联系人。

Tel: 0312-7528787, E-mail: gzhliu@genomics.org.cn

收稿日期: 2011-01-15, 接受日期: 2011-04-06

与抗氧化及碳代谢相关的蛋白质表达升高^[7]. 另外, 叶绿体也可作为生物反应器高效表达外源基因, 甚至表达疫苗和药物蛋白质等^[8-9].

水稻是世界上最重要的粮食作物之一, 发生在叶绿体内的反应是决定水稻产量的关键因素之一. 近年来, 关于水稻叶绿体的研究也涉及到逆境反应. 用双向电泳(2-demensional gel electrophoresis, 2DE)分析重金属或碱金属等环境污染物处理水稻叶片的蛋白质变化, 鉴定了 33 个差异表达的蛋白质, 其中发现 RuBisCO 发生了明显变化, 另外过氧化物歧化酶及活性氧相关的蛋白质也发生了变化, 表明这些重金属的影响首先发生在光合作用系统中^[10]. 用 2DE 分离低温处理的水稻幼苗蛋白质, 经质谱鉴别了 41 个差异表达的蛋白质, 用 TargetP 软件预测分析发现其中 43.9% 的蛋白质定位在叶绿体中, 暗示叶绿体蛋白质组对抵抗低温逆境有重要作用^[11]. 用 CO₂ 处理水稻幼苗, 对叶片蛋白质的分析鉴定了 57 个差异表达蛋白质, 其中 21 个与光合作用相关^[12]. 用 H₂O₂ 处理水稻幼苗, 鉴定了 89 个差异表达蛋白质, 其中有 28 个属于光合作用功能类^[13]. 光合作用相关蛋白质在逆境处理过程中发生变化的数目较多, 说明光合作用在水稻的逆境反应中发挥着重要作用. 水稻的 zebra-necrosis(zn)突变体产生黄绿相间的条斑叶, 图位克隆后, 确定这是一个类囊体膜结合的蛋白质, 该蛋白质的功能是决定叶绿体早期的形态发生^[14]. 但是, 用双向电泳结合质谱分析, 其中主要鉴别的是定位在叶绿体中的蛋白质^[15], 而对叶绿体基因编码蛋白质的研究关注较少. 实际上, 了解叶绿体编码蛋白质的表达规律, 对了解叶绿体的形态建成、在逆境中的功能以及外源蛋白质的表达等方面都具有重要的意义. 近年来, 在人的蛋白质组学研究中, Uhlen 等^[16]提出了基于抗体的蛋白质组学策略, 这种策略也可用于分析植物不同组织中的蛋白质表达, 以便了解其功能.

为了对水稻叶绿体基因编码蛋白质的表达有所了解, 我们制备了 15 个叶绿体基因编码蛋白质特异的抗体, 包括与光合作用相关的蛋白质、与 RNA 复制相关的蛋白质及与 NADH 脱氢酶相关的蛋白质, 利用 Western blotting 调查了这些蛋白质在水稻叶片不同生长时期的表达, 揭示了许多有意

义的叶绿体编码蛋白质表达特征.

1 材料与方法

1.1 材料

所用水稻品种为 93-11(*Oryza sativa* L.ssp.indica), 苗期在室内培养, 大田栽培于河北农业大学标本园(河北保定). 取苗期(高度分别为 1、2、5、10 和 15 cm)地上部、分蘖期、孕穗期、开花期和成熟期的叶片, 液氮速冻后保存于-70℃ 备用.

1.2 多克隆抗体

水稻叶绿体编码蛋白质特异的抗体由北京华大蛋白质研发中心有限公司制备, 根据 BEPITOPE 软件对候选基因编码的蛋白质进行抗原决定簇的预测, 选出抗原决定簇峰值较高的片段后, 用 BLASTP 对水稻蛋白质库进行唯一性检测后选出目标多肽, 合成多肽偶联后免疫家兔制备多抗.

1.3 水稻蛋白质的提取及 Western blotting 检测

水稻蛋白质提取和 Western blotting 检测按参考文献[17]进行, 以针对 HSP 蛋白质的检测作为等量加样的内标^[18].

1.4 Western blotting 数据采集与分析

用 ImageMaster 2D Platinum 软件, 扫描采集 X 光片上的 Western blotting 图像信号, Western blotting 实验至少重复 3 次, 根据信号强度平均值和方差绘制折线图, 比较其相对强度.

1.5 叶绿体编码基因的转录分析

从水稻 MPSS (massively parallel signature sequencing) 网站(<http://mpss.udel.edu/rice/>)^[19]下载数据, 从中选择了生长 14 天(苗期)和 60 天(分蘖期)的叶片数据, 从中搜索并统计目标基因的转录信息, 按每千万条 MPSS 标签进行归一化, 并绘制柱形图进行相对比较.

2 结 果

2.1 目标基因的选择

根据水稻叶绿体基因组序列图谱(图 1)和基因注释^[20], 选取了叶绿体基因组中 7 个与光合作用相关的基因, 包括 Photosystem I (PSA)的 P700 蛋白辅基 A1 编码基因(*psa-a1*, Osp1g00330)和 A2(*psa-a2*, Osp1g00340), Photosystem II (PSB)蛋白质亚基 D1 的编码基因 (*psb-d1*, Osp1g00110)和 D2(*psb-d2*,

Osp1g00170), ATP 合成酶 CF1 的 α 和 β 亚基编码基因 (*atp- α* , Osp1g00310; *atp- β* , Osp1g00410), 以及 RuBisCO 大亚基编码基因(*rbcL*, Osp1g00420); 4 个与叶绿体 DNA 复制相关的基因, 分别是 RNA 聚合酶 β 、 β' 、 β'' 和 α 亚基的编码基因(*rpo- β* , Osp1g00240; *rpo- β'* , Osp1g00250; *rpo- β''* , Osp1g00260; *rpo- α* , Osp1g00660); 还有 NADH 脱氢酶的 2、4、5、7 亚基编码基因(*ndh-2*, Osp1g00810; *ndh-5*, Osp1g00880; *ndh-4*, Osp1g00910 和 *ndh-7*, Osp1g00970). 详细的基因名称、Locus 编号、分子质量和在叶绿体基因组上的位置等列于表 1 和图 1, 水稻各时期的叶片状态见图 2.

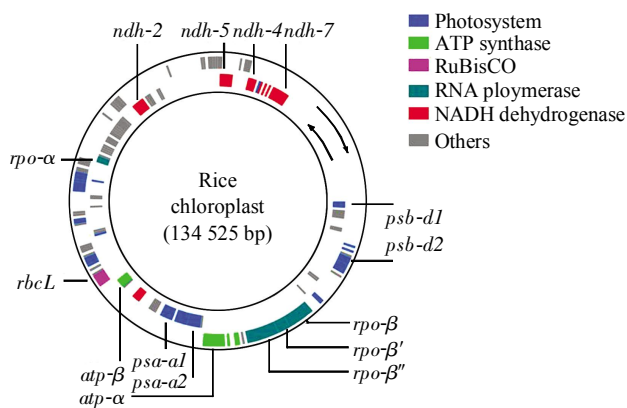


Fig. 1 Map of rice chloroplast genome illustrating the location and categories of encoded genes

Table 1 List of chloroplast encoded genes and related information

Category	Gene name	Locus number	Brief annotation	M/ku
Photosystem	<i>psa-a2</i>	Osp1g00330	Photosystem I P700 apoprotein A2	83
	<i>psa-a1</i>	Osp1g00340	Photosystem I P700 apoprotein A1	83
	<i>psb-d1</i>	Osp1g00110	Photosystem II protein D1	39
	<i>psb-d2</i>	Osp1g00170	Photosystem II protein D2	40
ATP synthase	<i>atp-α</i>	Osp1g00310	ATP synthase CF1 α chain	56
	<i>atp-β</i>	Osp1g00410	ATP synthase CF1 β chain	54
RuBisCO	<i>rbcL</i>	Osp1g00420	RuBisCO large chain	53
RNA polymerase	<i>rpo-β</i>	Osp1g00240	RNA polymerase β chain	122
	<i>rpo-β'</i>	Osp1g00250	RNA polymerase β' chain	78
	<i>rpo-β''</i>	Osp1g00260	RNA polymerase β'' chain	174
	<i>rpo-α</i>	Osp1g00660	RNA polymerase α chain	39
NADH dehydrogenase	<i>ndh-2</i>	Osp1g00810	NADH dehydrogenase subunit 2	57
	<i>ndh-5</i>	Osp1g00880	NADH dehydrogenase subunit 5	83
	<i>ndh-4</i>	Osp1g00910	NADH dehydrogenase subunit 4	83
	<i>ndh-7</i>	Osp1g00970	NADH dehydrogenase subunit 7	46

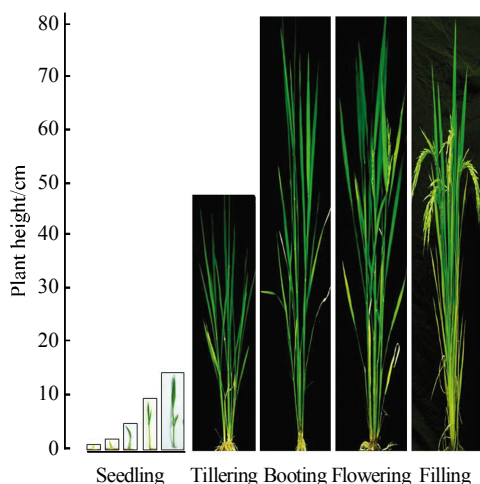


Fig. 2 Photos of rice leaves at different growth stages

2.2 光合作用相关蛋白质的表达分析

采集水稻不同生长阶段的叶片, 包括苗期株高为 1、2、5、10 和 15 cm 的地上部、分蘖期和孕穗期的展开叶片、开花期和成熟期的剑叶, 提取总蛋白进行 Western blotting 检测(图 3), 结果发现, 针对光合系统 I 和 II 的 4 种蛋白质特异的抗体均可检测到分子质量在 83 ku 左右的主带, 另外在 PSA-A2、PSA-A1 和 PSB-D1 中还有分子质量较低的弱带, 针对 2 种 ATP 合成酶亚基的抗体可检测到 50 ku 的条带, 针对 RuBisCO 大亚基(RBCL)的 Western blotting 分析可见 60 ku 左右的条带. 综合这 7 种蛋白质的表达可以看出, 它们的表达模式很

相近, 在苗期 1 cm 时几乎都检测不到表达, 在 2~5 cm 时大部分蛋白质开始表达, 在 10~15 cm

时表达均达到较高的水平, 并都在孕穗期和开花期叶片中达到峰值, 在成熟期叶片中则明显下降。

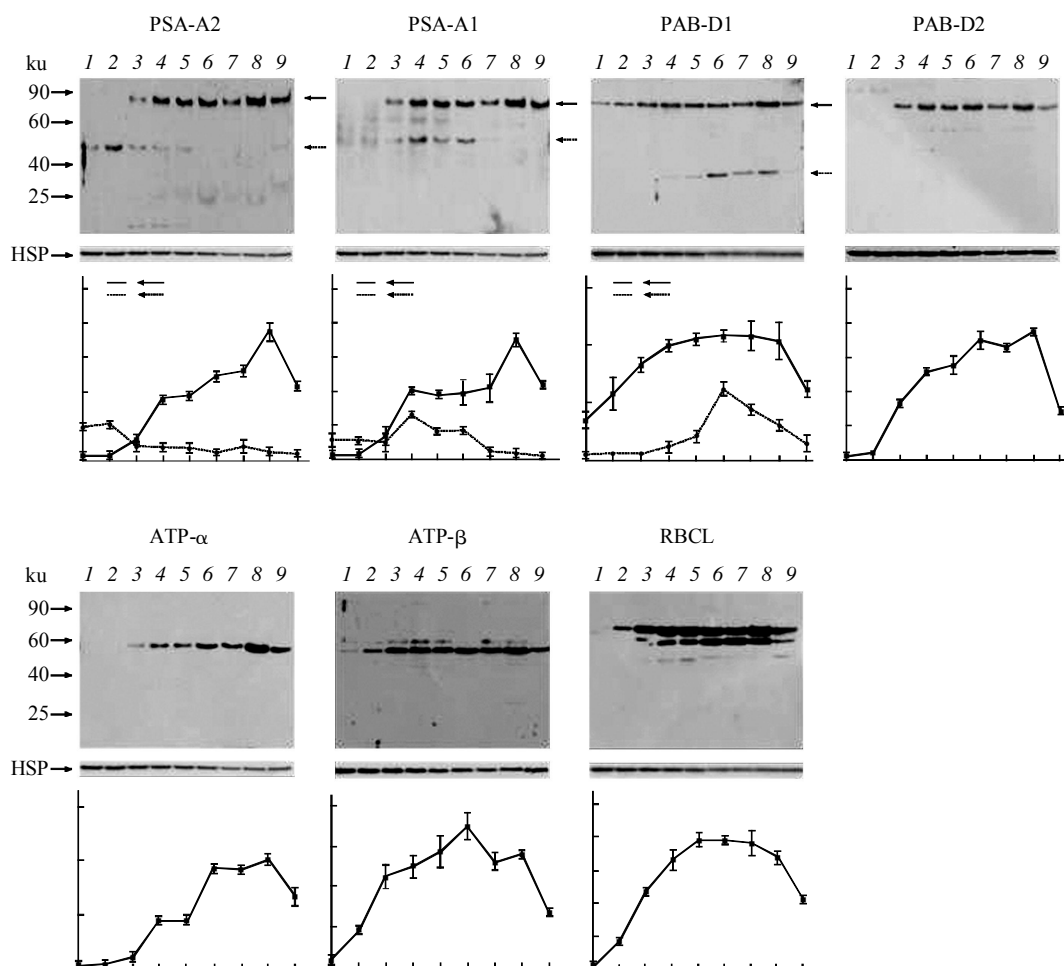


Fig. 3 Expression analysis of rice chloroplast-encoded photosynthesis-related proteins by Western blotting

1~5: Protein samples were isolated from shoots at seedling stage in plant height of 1, 2, 5, 10 and 15 cm (1~5), leaves at stages of tillering (6), booting (7), flowering (8) and filling (9), respectively.

2.3 RNA 聚合酶的表达分析

4 种 RNA 聚合酶(RPO-β、RPO-β'、RPO-β''和 RPO-α)在叶片中的表达分析(图 4)发现, 4 种抗体检测的蛋白质条带模式相近, 在水稻苗期蛋白质表达量逐渐增多直至最高峰, 苗期以后蛋白质表达量逐渐减少, 到成熟期蛋白质表达量最少, 但检测条带的表观分子质量均与预期分子质量不符, 其中原因目前还难以明确, RPO-β'蛋白质还有一条较低分子质量的条带, 在苗期时表达量较少, 到孕穗期和开花期时表达量较高, 成熟期有所下降。

2.4 NADH 脱氢酶的表达分析

用抗体分析 4 种 NADH 脱氢酶蛋白质 (NDH-2、NDH-5、NDH-4 和 NDH-7)的表达(图 5), 发现其条带的表观分子质量分别约为 40、40、83 和 40 ku, 与预期分子质量相符。亚基 NDH-2 和 NDH-4 的表达模式相近, 种子萌发后在幼苗早期株高仅为 1 cm 时蛋白质的表达量就达到最高峰, 随着叶片的生长, 蛋白质的表达量逐渐降低, 到叶片成熟期表达量很少甚至几乎检测不到。而亚基 NDH-5 和 NDH-7 蛋白质的表达模式相近, 苗期小

于 2 cm 时蛋白质几乎不表达, 大于 5 cm 时开始逐渐增加, 到分蘖期时表达量最高, 到成熟期很少甚至没有, 值得注意的是 NDH-7 除了主带外, 在苗期 1 cm 和 2 cm 时分子质量较高的位置还有一条较

浅的带, 这条带在 5 cm 时就消失了, NDH-7 的 2 条带间似乎有关联关系, 可能是该蛋白质的不同表达形式.

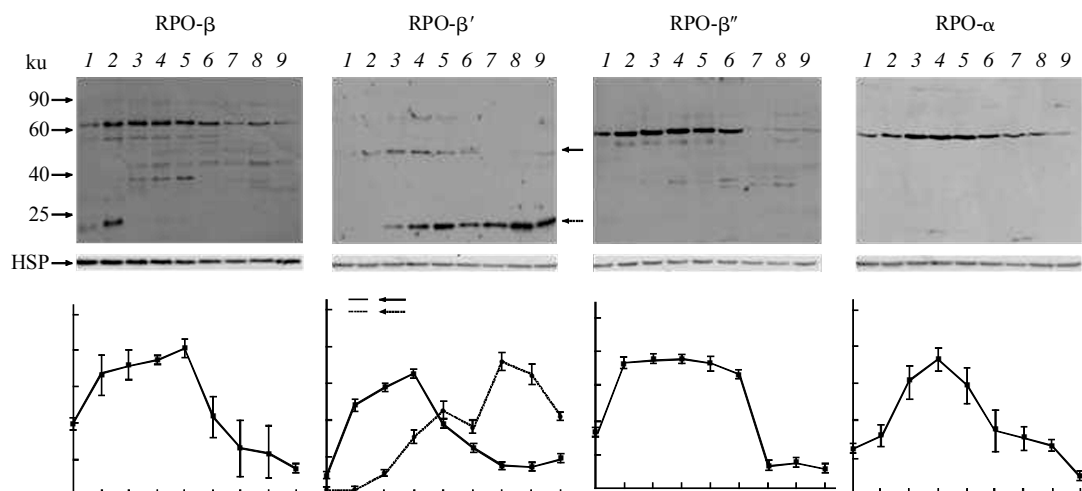


Fig. 4 Expression analysis of rice chloroplast-encoded RNA polymerase proteins by Western blotting

1~5: Protein samples were isolated from shoots at seedling stage in plant height of 1, 2, 5, 10 and 15 cm (1~5), leaves at stages of tillering (6), booting (7), flowering (8) and filling (9), respectively.

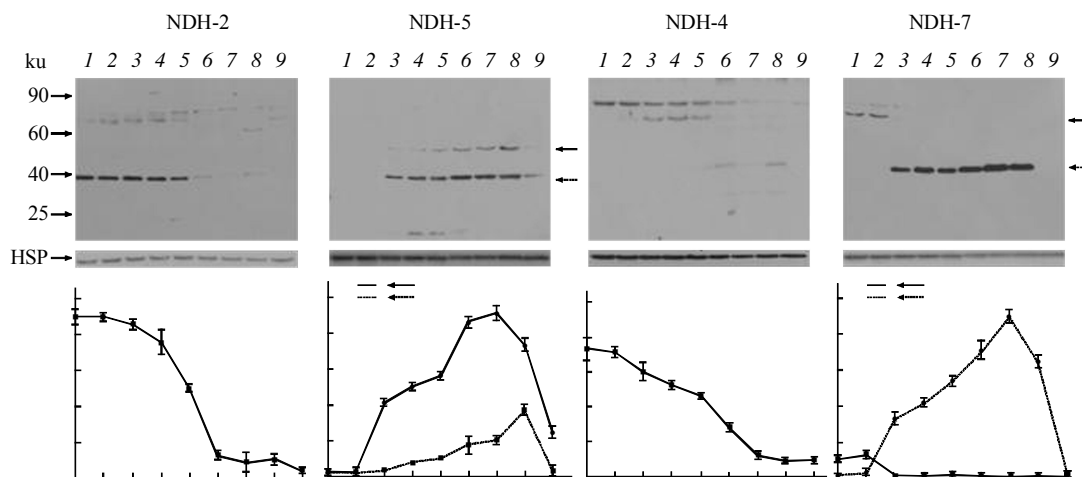


Fig. 5 Expression analysis of rice chloroplast-encoded NADH dehydrogenase by Western blotting

1~5: Protein samples were isolated from shoots at seedling stage in plant height of 1, 2, 5, 10 and 15 cm (1~5), leaves at stages of tillering (6), booting (7), flowering (8) and filling (9), respectively.

2.5 叶绿体编码基因的转录分析

为了将目标蛋白质的表达信息与转录信息进行比较, 从水稻 MPSS 网站下载了数据, 从中选择了生长 14 天(苗期)和 60 天(分蘖期)叶片的 MPSS 数

据, 合计获得苗期叶片的 MPSS 标签数为 730 万条, 分蘖期叶片的 MPSS 标签数为 1 104 万条. 从中搜索并统计 15 个目标基因的转录信息, 按每千万条 MPSS 标签进行归一化后绘制柱形图(图 6).

从图 6 可见, 在苗期和分蘖期叶片中, *rbcL*、*rpo-β''*、*rpo-α* 和 *ndh-7* 的相对转录水平较高, 其他基因的转录水平几乎检测不到。比较两个时期的转

录, 都是苗期的转录信号低于分蘖期。这种表达模式与蛋白质表达数据相吻合。

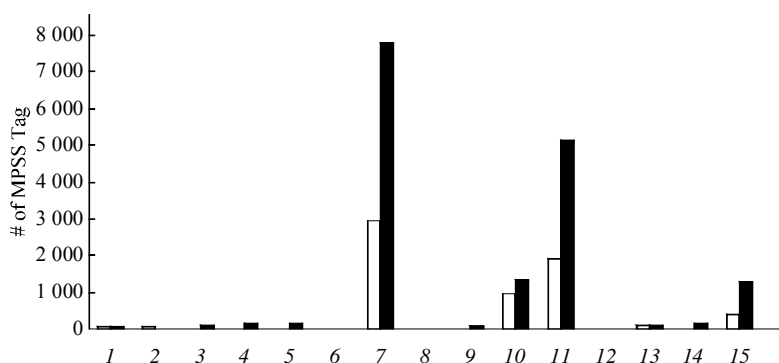


Fig. 6 Transcriptional analysis of chloroplast-encoded genes

of MPSS Tag: Number of MPSS Tags per 10 million tags for each gene collected from rice MPSS database (<http://mpss.udel.edu/rice/>). 1: *psa-a1*; 2: *psa-a2*; 3: *pab-d1*; 4: *pab-d2*; 5: *atp-α*; 6: *atp-β*; 7: *rbcL*; 8: *rpo-β*; 9: *rpo-β'*; 10: *rpo-β''*; 11: *rpo-α*; 12: *ndh-2*; 13: *ndh-5*; 14: *ndh-4*; 15: *ndh-7*. □: Seedling stage; ■: Tilling stage.

3 讨 论

蛋白质的存在及表达量的变化与其功能密切相关, 对水稻叶绿体基因编码蛋白质的表达研究有助于其功能的阐释。本实验比较了 15 个叶绿体基因编码蛋白质在水稻苗期、分蘖期、孕穗期、开花期和成熟期叶片中的表达情况, 发现这些蛋白质的表达呈现出有规律的模式。

第一种表达模式是蛋白质表达量随叶片生长逐渐升高, 在生长后期达到最高峰。在水稻种子露白后, 苗期生长的前期主要依靠种子中贮存的养分, 后期逐步实现靠光合作用生存, 在分蘖期、孕穗期、开花期, 叶片已经充分展开, 并呈深绿色, 光合作用系统高效运行, 为水稻生长提供充足的养分, 在成熟期, 叶片中的营养要逐步向生殖器官转移, 叶片绿色转浅、转黄。与光合作用相关的蛋白质毫无例外地都表现为这种模式, 它们随叶片生长呈现从无到有、从少到多、又从多到少的变化规律, 其表达模式与叶片生长的状态相当吻合。此前, 我们已经注意到在卡尔文循环中的叶绿体蛋白质 RCA、GAPDH、FBPA 和 SBPase 等也表现类似的模式^[15]。

第二种表达模式是幼苗早期表达量少, 随着水稻的生长, 蛋白质表达量迅速上升, 在幼苗后期就实现最高表达, 在后续的生长过程中逐步下降。RNA 聚合酶的 4 个亚基均表现为这种模式, 说明

它们在苗期就基本完成了蛋白质的积聚, 为光合作用相关蛋白质的合成做好了准备。另外, NDH 亚基 5 和亚基 7 也表现为这种模式, 说明这二种亚基功能发挥主要在苗期实现。

第三种表达模式是在种子露白后表达量就表现为最高, 以后逐步降低, NDH-2 和 NDH-4 二个亚基的表达属于这种模式, 根据这种现象可以推测, 该类蛋白质在苗期甚至种子萌发期有重要功能, 其大量表达是种子萌发并实现从自养到光合作用生长的必要条件, 进一步的遗传实验将有助于其功能的阐释。

有报道表明, PSA 反应中心 P700 结合的蛋白质 PSA-A1、PSA-A2, PSB 反应中心的 D1、D2 蛋白质都是以异二聚体的形式存在, 具有高度疏水性^[21]。Western blotting 结果表明(图 3), 在 PSA-D1 和 PSA-D2 中除分子质量约 40 ku 的条带外, 还能检测到分子质量约 80 ku 的条带, 可能是其二聚体形式, 有意思的是, 在苗期叶片中, 以可能的单体成分为主, 随着叶片生长及光合作用增强, 可能的二聚体形式增加, 暗示在成株期二聚体为主要功能形式。叶绿体 ATP 合酶是能量合成过程中的关键酶, 其主要功能是控制类囊体腔内质子流出, 该酶表达量的改变都会影响叶绿体光能转化能力^[22], 在玉米叶片转绿过程中, 就发现有 ATPase 的多个亚基的表达量发生变化^[23]。从 Western blotting 结果可

以看出(图 3), 随着光合作用的增强, ATP 合酶 CF1 的 α 和 β 亚基的表达量也随之增加. RuBisCO 是叶绿体光合作用暗反应中的关键酶, 在绿色植物中的含量非常丰富, 在 C4 植物中约占叶片可溶性蛋白总量的 20%~30%, 而在 C3 植物中约占 50% 以上^[24], 其活力对光合速率有着决定性作用. Western blotting 结果表明, RuBisCO 从苗期开始迅速上升, 在开花期达到最高峰, 到成熟期含量下降, 其模式与植株对光合作用的整体需求一致. 据报道, 在水稻叶片自然衰老过程中, RuBisCO 大亚基的降解速率加快^[25].

叶绿体基因组的转录由 3 种 RNA 聚合酶负责, 一种是质体基因组编码的 RNA 聚合酶(plastid-encoded RNA polymerase, PEP), 其他二种是核基因编码的(nucleus-encoded RNA polymerases, NEP). 对拟南芥和菠菜种子萌发过程的研究表明, PEP 和 NEP 在种子中都预先存在, 用 Tagetin 特异地抑制 PEP 的活性会影响种子的有效萌发, 说明 PEP 在光合作用开始前就已经有活性了. 在种子萌发后的幼苗期, PEP 的表达也呈明显提高^[26-27]. 本实验中, 可以观察到 4 种 RPO 在苗期的快速提高, 说明在水稻种子萌发后, 在幼苗生长阶段有 RNA 聚合酶的大量表达, 为后续的水稻生长提供必需的蛋白质, 而在叶片生长后期, 随着叶片的衰老, 光合作用蛋白质减少, RNA 聚合酶的表达也减少甚至不再表达.

对叶绿体 NAD(P)H 脱氢酶不同亚基及复合体的组成已经有详细的报道^[28]. NADH 脱氢酶参与平衡电子传递链氧化还原状态以及在抵御光氧化胁迫过程起着重要作用^[29-30]. 在叶片处于强光、高氧和光氧化等胁迫下, NADH 脱氢酶亚基表达量和酶活力都会升高, 说明它们对逆境反应有贡献^[30-31]. 本实验中, 揭示了在叶片正常生长时, NADH 脱氢酶亚基的变化情况(图 5), 有意思的是, 亚基 2 和 4 的表达模式相近, 在幼苗早期时表达量很高, 而亚基 5 和 7 在苗期表达量较少, 孕穗期表达量最高, 这种表达量的区别可能暗示了它们的功能差异, 另外不同的亚基间也可能发生功能的互补.

我们还尝试进行了蛋白质表达数据与转录数据的对应比较, 利用 MPSS 转录数据可以进行几个基因间相对转录量的比较, 而蛋白质表达数据目前没有定量, 不能进行蛋白质间的比较, 比较转录水平较高的基因, 都是分蘖期叶片中的信号高于苗期叶片中信号, 与蛋白质的表达模式是平行的. 显然,

本实验获得了更为全面的蛋白质表达数据, 与其功能的相关性更为直接、准确.

本实验制备了 15 个叶绿体编码蛋白质的抗体, 其中约一半抗体检测信号的分子质量与预期相符, 而其余抗体检测的表观分子质量与预期不符. 对表观分子质量与预期不符的原因, 我们推测有几种可能: a. 目标蛋白质以聚合体或修饰状态存在, 造成表观分子质量大于理论分子质量, 如 PSB-D1、PSB-D2 的理论分子质量为 40 ku 左右, 但都能检测到 80 ku 的条带, 说明检测的信号很可能是二聚体; b. 蛋白质以降解的形式存在, 造成表观分子质量低于理论值, 如 RPO- β 的理论分子质量为 122 ku, RPO- β' 的理论分子质量为 174 ku, 但检测条带的分子质量均为 60 ku 左右; c. 抗体的非特异性杂交结果, 根据序列分析, 我们设计的多肽抗原在水稻蛋白质组中是特异的, 但仍不能完全保证抗体的特异性. 用所制备的抗体对水稻根的蛋白质进行检测, 均没有明显的信号, 从一定程度上佐证了本实验所制备抗体的特异性. 今后, 我们可以通过质谱、超表达或 RNAi 水稻材料的目标蛋白分析等进一步验证所制备抗体的特异性.

本实验制备的抗体也可用于检测不同逆境处理条件下、叶绿体表达系统中不同诱导条件下或不同叶绿体突变体中蛋白质的表达变化等. 本实验也为基于抗体的水稻蛋白质组学策略提供了进一步的数据, 显然, 利用这一策略可对特定细胞器编码蛋白质进行系统研究. 逐步积累获得每个叶绿体基因编码蛋白质对应的抗体, 可以更全面地开展水稻叶绿体蛋白质的表达和功能的研究, 为揭示叶绿体在水稻正常生长及逆境应答等生命活动中的功能提供依据.

参 考 文 献

- [1] Van Wijk K. Proteomics of the chloroplast: Experimentation and prediction. *Trends Plant Sci*, 2000, **5**(10): 420-425
- [2] Shinozaki K, Ohme M, Tanaka M, *et al.* The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: its gene organization and expression. *EMBO J*, 1986, **5**(9): 2043-2049
- [3] Cui L, Veeraraghavan N, Richter A, *et al.* ChloroplastDB: The chloroplast genome database. *Nucleic Acids Res*, 2006, **34**(Database Issue): 692-696
- [4] Li X, Duan W, Meng Q, *et al.* The function of chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase in tobacco during chilling stress under low irradiance. *Plant Cell Physiol*, 2004, **45**(1): 103-108
- [5] Nakano R, Ishida H, Makino A, *et al.* *In vivo* fragmentation of the large subunit of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase by reactive

- oxygen species in an intact leaf of cucumber under chilling-light conditions. *Plant Cell Physiol*, 2006, **47**(2): 270–276
- [6] Sainz M, Diaz P, Monza J, *et al.* Heat stress results in loss of chloroplast Cu/Zn superoxide dismutase and increased damage to Photosystem II in combined drought-heat stressed *Lotus japonicus*. *Physiol Plant*, 2010, **140**(1): 46–56
- [7] Ahsan N, Nanjo Y, Sawada H, *et al.* Ozone stress-induced proteomic changes in leaf total soluble and chloroplast proteins of soybean reveal that carbon allocation is involved in adaptation in the early developmental stage. *Proteomics*, 2010, **10**(14): 2605–2619
- [8] Grevicht J, Daniell H. Chloroplast genetic engineering: Recent advances and future perspectives. *Critical Reviews in Plant Sciences*, 2005, **24**(2): 83–107
- [9] Daniell H. Henry Daniell: chloroplast genetic engineering. *Biotechnol J*, 2006, **1**(1): 31–33
- [10] Hajduch M, Rakwal R, Agrawal G K, *et al.* High-resolution two-dimensional electrophoresis separation of proteins from metal-stressed rice (*Oryza sativa* L.) leaves: drastic reductions/fragmentation of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase and induction of stress-related proteins. *Electrophoresis*, 2001, **22**(13): 2824–2831
- [11] Cui S, Huang F, Wang J, *et al.* A proteomic analysis of cold stress responses in rice seedlings. *Proteomics*, 2005, **5**(12): 3162–3172
- [12] Bokhari S A, Wan X Y, Yang Y W, *et al.* Proteomic response of rice seedling leaves to elevated CO₂ levels. *J Proteome Res*, 2007, **6**(12): 4624–4633
- [13] Wan X Y, Liu J Y. Comparative proteomics analysis reveals an intimate protein network provoked by hydrogen peroxide stress in rice seedling leaves. *Mol Cell Proteomics*, 2008, **7**(8): 1469–1488
- [14] Li J, Pandeya D, Nath K, *et al.* ZEBRA-NECROSIS, a thylakoid-bound protein, is critical for the photoprotection of developing chloroplasts during early leaf development. *Plant J*, 2010, **62**(4): 713–725
- [15] 白 辉, 王宪云, 曹英豪, 等. 水稻叶绿体蛋白质在生长发育过程中的表达研究. *生物化学与生物物理进展*, 2010, **37**(09): 988–995
Bai H, Wang X, Cao Y, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2010, **37**(9): 988–995
- [16] Uhlen M, Ponten F. Antibody-based proteomics for human tissue profiling. *Mol Cell Proteomics*, 2005, **4**(4): 384–393
- [17] Wang Y S, Pi L Y, Chen X, *et al.* Rice XA21 binding protein 3 is a ubiquitin ligase required for full Xa21-mediated disease resistance. *Plant Cell*, 2006, **18**(12): 3635–3646
- [18] 陈 浩, 李莉云, 白 辉, 等. 水稻 U-Box 蛋白质在不同发育时期的表达分析. *生物化学与生物物理进展*, 2009, **36**(9): 1208–1214
Chen H, Li L, Bai H, *et al.* *Prog Biochem Biophys*, 2009, **36**(9): 1208–1214
- [19] Nakano M, Nobuta K, Vemaraju K, *et al.* Plant MPSS databases: Signature-based transcriptional resources for analyses of mRNA and small RNA. *Nucleic Acids Res*, 2006, **34** (Database issue): D731–735
- [20] Ranbeson L A, K. J R. Chloroplast genome of plant. In: Henry R J ed. *Plant Diversity and Evolution: Genotypic and Phenotypic Variation in High Plant*. UK: CABI publishing, 2005: 45–48
- [21] Nelson N, Yocum C F. Structure and function of photosystems I and II. *Annu Rev Plant Biol*, 2006, **57**: 521–565
- [22] He F, Samra H S, Johnson E A, *et al.* C-Terminal mutations in the chloroplast ATP synthase gamma subunit impair ATP synthesis and stimulate ATP hydrolysis. *Biochemistry*, 2008, **47**(2): 836–844
- [23] Lonosky P M. A Proteomic analysis of maize chloroplast biogenesis. *Plant Physiology*, 2004, **134**(2): 560–574
- [24] Feller U, Anders I, Mae T. Rubiscolytics: fate of Rubisco after its enzymatic function in a cell is terminated. *J Exp Bot*, 2008, **59**(7): 1615–1624
- [25] 李 瑞, 周 玮, 李 丽, 等. 水稻叶片自然衰老过程中 Rubisco 大亚基的含量变化. *中国水稻科学*, 2009, **23**(5): 555–558
Li R, Zhou W, Li L, *et al.* *Chin J Rice Sci*, 2009, **23**(5): 555–558
- [26] Demarsy E, Courtois F, Azevedo J, *et al.* Building up of the plastid transcriptional machinery during germination and early plant development. *Plant Physiol*, 2006, **142**(3): 993–1003
- [27] Shiina T, Tsunoyama Y, Nakahira Y, *et al.* Plastid RNA polymerases, promoters, and transcription regulators in higher plants. *Int Rev Cytol*, 2005, **244**: 1–68
- [28] Peng L, Yamamoto H, Shikanai T. Structure and biogenesis of the chloroplast NAD(P)H dehydrogenase complex. *Biochim Biophys Acta*, 2010, doi:10.1016/j.bbabi.2010.10.015
- [29] Casano L M, Zapata J M, Martin M, *et al.* Chlororespiration and poisoning of cyclic electron transport. Plastoquinone as electron transporter between thylakoid NADH dehydrogenase and peroxidase. *J Biol Chem*, 2000, **275**(2): 942–948
- [30] Casano L M, Martin M, Sabater B. Hydrogen peroxide mediates the induction of chloroplastic Ndh complex under photooxidative stress in barley. *Plant Physiol*, 2001, **125**(3): 1450–1458
- [31] Wang P, Duan W, Takabayashi A, *et al.* Chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase in tobacco leaves functions in alleviation of oxidative damage caused by temperature stress. *Plant Physiol*, 2006, **141**(2): 465–474

Expression Profiling of Chloroplast-encoded Proteins in Rice Leaves at Different Growth Stages*

LAN Jin-Ping¹⁾, LI Li-Yun¹⁾, JIA Lin¹⁾, CAO Ying-Hao^{1,2)}, BAI Hui²⁾,
CHEN Hao¹⁾, LIU Sheng-Nan¹⁾, WU Lin²⁾, LIU Guo-Zhen^{1)**}

¹⁾ College of Life Sciences, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China;

²⁾ Beijing Institute of Genomics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 101300, China)

Abstract Chloroplast is the critical organelle for transforming light energy into chemical energy in plant. At present the whole genome sequences of chloroplast of many plants have been released and the knowledge about biological processes in chloroplast has been accumulated. However, limited information regarding the expression of chloroplast-encoded proteins is available. Fifteen chloroplast genes were selected from chloroplast-encoded proteins and the expression profiling in different stages of rice leaves were investigated by Western blotting. The results indicated that the expression patterns of 7 photosynthesis-related proteins are similar and the expression level increase steadily as leaves grow taller. Until the booting and flowering stages, the expression reached the highest-level, and then decreased at filling stage. The correlation between the expression of photosynthesis-related proteins and the photosynthesis was observed. The expression levels of 4 RNA polymerase related to DNA replication were at their highest-level at seedling stage, which indicated that they perform their functions during the early stage. However, 4 NADH dehydrogenase exhibited two kinds of expression patterns. Subunit-2 and -4 reached their highest-level when the leaves were 1cm in length during seedling stage. While, subunit-5 and -7 reached theirs in middle and later stage of seedling. The results implied their different functions during seedling stages. Taking together, this experiment revealed the expression patterns of rice chloroplast-encoded proteins in rice leaves at different growth stages and the correlation between the proteins and the growing process in a direct and relative quantitative way, and provided significant information for further research of their function.

Key words rice, chloroplast, protein profiling, antibody-based rice proteomics

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2011.00028

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30670175, 30730007) and National Basic Research Program of China (2007CB109201, 2006CB101705).

**Corresponding author.

Tel: 86-312-7528787, E-mail: gzhliu@genomics.org.cn

Received: January 15, 2011 Accepted: April 6, 2011