

水稻花粉蛋白质组学研究简报

戴绍军^{1,2} 陈涛涛¹ 王台¹

¹ 中科院植物研究所 光合作用与环境分子生理学重点实验室 分子与发育生物学研究中心

(E-mail: twang@ibcas.ac.cn)

² 东北林业大学 生命科学学院 (E-mail: daishaojun@hotmail.com)

植物花粉(雄配子体)是高度退化的两细胞或三细胞生物体。成熟花粉落到柱头上后,通过极性生长的花粉管将精细胞送入胚囊完成受精作用。花粉发育和萌发过程的功能特异性不仅是影响植物繁殖和进化的关键因素,而且对于改良作物的性状具有重要意义。因此,花粉功能特异性研究一直是植物科学研究领域的热点问题之一。近年来,在国家自然科学基金、中科院知识创新工程方向性项目和“973”项目的支持下,我们实验室与中科院遗传与发育生物学研究所分子和发育生物学重点实验室,以及北京基因组研究所的研究人员合作,建立了获得大量成熟水稻花粉的方法和花粉蛋白质组学研究的技术平台,并在《Proteomics》(2006年第8期)上率先报道了水稻成熟花粉的蛋白质组成和功能类群特征。本文对其中部分研究结果进行简要介绍。

研究方法

在水稻开花时迅速收集成熟花粉,通过 I_2 -KI染色和DAPI染色验证花粉品质,然后利用扫描电镜和透射电镜观察花粉表面和内部的结构特征。通过等渗洗脱的方式提取花粉外被/细胞壁相关和可释放蛋白(PRP)、花粉内在蛋白(PIPs),以及花粉外被蛋白质(PCPs)。利用SDS-PAGE和2-DE分离蛋白质,并应用MALDI-ToF MS, nanoESI-Q-ToF MS/MS和CapLC-ESI-Q-ToF MS/MS三种不同类型的质谱仪进行蛋白质分析,利用m/z moverz和MassLynx 3.5等软件对质谱数据处理后,通过Matrix Science网站(<http://www.matrixscience.com>)提供的引擎进行数据库搜索,实现蛋白质鉴定。进而通过NCBI网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)等相关生物信息学网站进行蛋白质功能的分析和预测。

研究结果与讨论

水稻成熟花粉的形态特征

细胞学研究表明水稻成熟花粉为三核花粉(图1A),直径约38-42 μm 。在近极面有单一圆形直径为3.5-4.0 μm 的萌发孔(图1B, C)。花粉外壁层和柱状层中分布有直径0.02-0.03 μm 的微孔道(图1D)。整个花粉壁厚0.8-1.2 μm ,比玉米(花粉壁厚1.3-1.5 μm)等其它禾谷类作物的花粉壁薄很多。花粉内部富含线粒体、高尔基体、内质网和淀粉粒(图1E, F)。

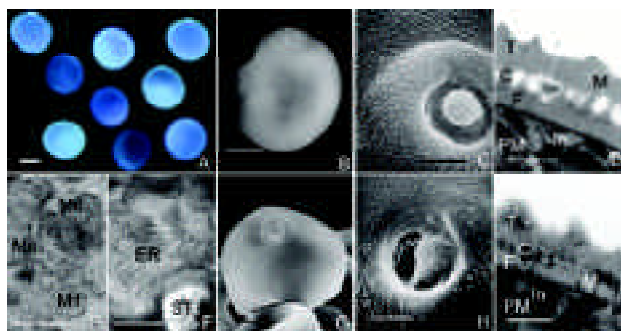


图1. 水稻成熟花粉形态特征

A: 用DAPI染色的成熟花粉,可见两个生殖核和一个营养核; B: 成熟花粉在扫描电镜下的赤道面观; C: 花粉圆形具孔盖的萌发孔; D: 花粉壁的超微结构; E: 花粉内部超微结构,可见富含线粒体; F: 花粉内部超微结构,可见富含内质网和淀粉粒; G: 用洗脱液洗脱后花粉的近极面观,可见萌发孔盖位置偏移; H: 洗脱后花粉萌发孔盖偏移,出现缝隙; I: 洗脱后花粉壁微孔道中出现高电子密度物质,花粉外壁表面模糊。Mit: 线粒体; ER: 内质网; ST: 淀粉粒; T: 外壁外层; C: 柱状层; F: 底层; M: 微孔道; PM: 质膜; In: 内壁。

花粉不同组分蛋白质的分离

我们通过用等渗溶液洗脱的方法将花粉蛋白质分成PRPs和PIPs两个组分(图2)。另外,利用快速洗脱的方式获得了PCPs组分。使用OsRad21-3 (AY371038,水稻细胞核定位)、PM ATPase (PMA2,烟草细胞膜定位)和Beta-1, 4-木聚糖酶(玉米花粉外被定位)三种标志蛋白质对这三种蛋白质组分进行的Western杂交分析表明,我们成功地分离了这三种组分(图3)。

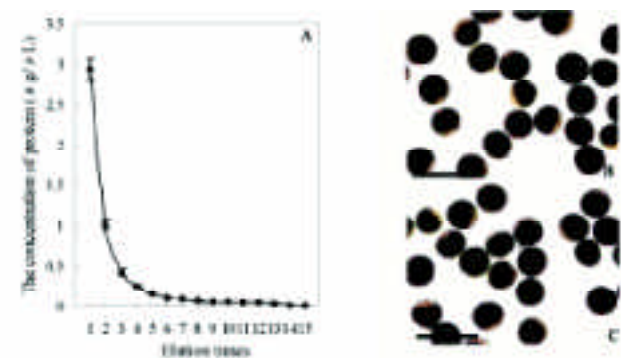


图2. 花粉洗脱过程中洗脱液蛋白质浓度变化曲线(A)和洗脱前(B)后(C)花粉的 I_2 -KI反应, bar=80 μm

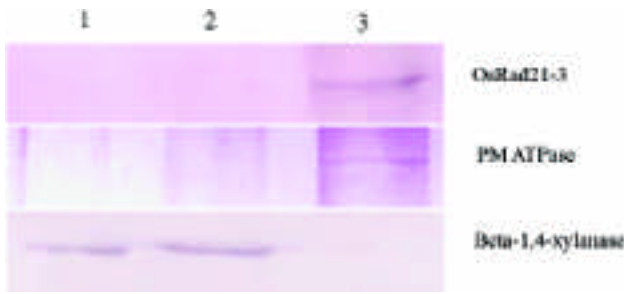


图 3. 对花粉 3 个蛋白质组分的 Western 杂交结果
通过 OsRad21-3 (细胞核定位)、PM ATPase (细胞膜定位) 和 Beta-1,4-xylanase (花粉外被蛋白) 三种标志蛋白质检测花粉外被相关蛋白质组分(泳道1)、花粉外被 / 细胞壁相关和可释放蛋白质组分(泳道2), 以及花粉内部蛋白质组分(泳道3) 的纯度。

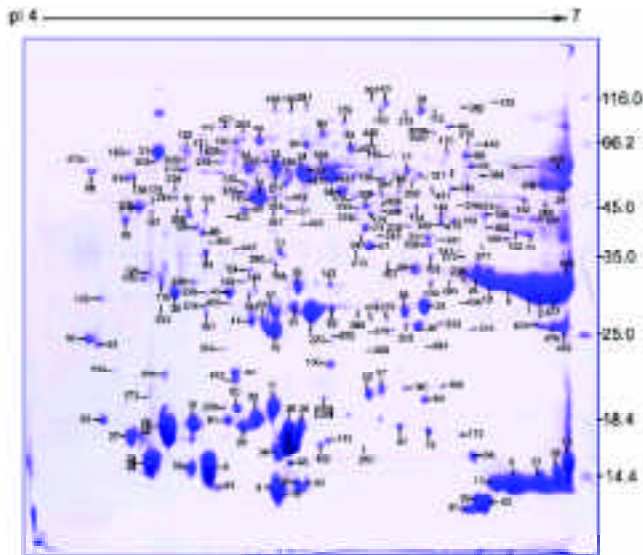


图 4. 花粉 PRPs 2DE (pH 4-7) 图谱
第一向等电聚焦用 pH 4-7 IPG 胶条进行, 第二向 SDS-PAGE 用 12.5% ExcelGel SDS 胶完成, 蛋白质分子量标准标在图的右侧, 等电点范围标在图顶端, 共检测到 478 ± 8 蛋白质斑点, 图中数字为经过质谱鉴定点的编号, 加方框的数字为通过 *de novo* 测序鉴定的新蛋白质。

将 PRPs 和 PIPs 蛋白质样品用 pH 3-10 IPG 进行等电聚焦, 然后用 12.5% SDS-PAGE 进行分离。在 2DE 胶上分别得到 PRPs 和 PIPs 样品的 556 ± 12 个蛋白质点和 631 ± 18 个蛋白质点。由于 PRPs 和 PIPs 样品在 pH 3-10 范围 2DE 胶上的点 70% 以上都分布在 pH 4-7 范围内, 我们进一步用 pH 4-7 范围的 IPG 对这两种样品进行分离。在 2DE 胶上分别得到 PRPs 和 PIPs 样品的 475 ± 8 个蛋白质点和 996 ± 27 个蛋白质点(图 4, 5)。另外, 通过 SDS-PAGE (1DE) 分离 PCPs 蛋白质, 共得到了 14 条稳定条带(图 6)。

成熟花粉的蛋白质组特征

利用 3 种不同类型的质谱仪, 我们共鉴定了在水稻成熟花粉中表达的 322 种蛋白质。其中, 75 种蛋白质具有两个以上的同工型 (isoform), 占全部鉴定蛋白质的 23%。以肌动蛋白(AAO38821)和 α -微管蛋白(BAC82430) 为代表, 进行 Western 杂交, 确认了蛋白质同工型在 2DE 胶上的分布情况(图 5w, x)。在鉴定的蛋白质中, 242 种蛋白质 (75%) 已经具有功能注释, 我们通过功能结构域的相似性分析进一步确认了它们的功能; 其余 80 种蛋白质 (25%) 在数据库中是未知的蛋白质或推测的蛋白质, 我们通过在 NCBI 数据库中进行 PHI and PSI-BLAST 分析, 确定了其中 45 种蛋白质的保守功能结构域, 从而推测了它们的功能; 另外 35 种在搜索中没有找到任何功能结构域, 被我们划分到了未知功能的种类中。基于这些分析, 我们将全部鉴定的蛋白质分为 15 个主要的功能类群(图 7)。其中, 参与信号转导 (10%)、细胞壁重塑和代谢 (11%)、蛋白质代谢 (14%) 以及糖类和能量代谢 (25%) 的蛋白质被高度代表。并且很多是首次被在成熟花粉中得到鉴定的具有重要功能的蛋白质, 包括蛋白激酶、受体激酶相互作用蛋白、GDP 解聚抑制因子、含有 C2 结构域蛋白质和亲环蛋白等参与信号转导的蛋白质, eIF4A、线粒体加工肽酶、UFD1 和 AAA⁺ ATP 酶等参与蛋白质合成、装配和降解的蛋白质, 以及逆糖基化多肽、似纤维素合酶 OsCSLF7 等参与细胞壁重塑和代谢的蛋白质等。生物信息学分析表明, 在我们鉴定的蛋白质中有 11% 的蛋白质功能未知并且不含有任何已知的功能结构域。另外, 我们利用从头测序技术鉴定了 5 种新蛋白质。这些首次在水稻花粉中被鉴定的蛋白质、未知功能蛋白质和新蛋白质在水稻花粉萌发过程中的生物学功能值得进一步研究。

参考文献

1. Shao jun Dai, Lei li, Taotao Chen, Kang Chong, Yongbiao Xue, Tai Wang. Proteomic analyses of *Oryza sativa* mature pollen reveal novel proteins associated potentially with pollen germination and tube growth. *Proteomics*, 2006, 6: 2504-2529.

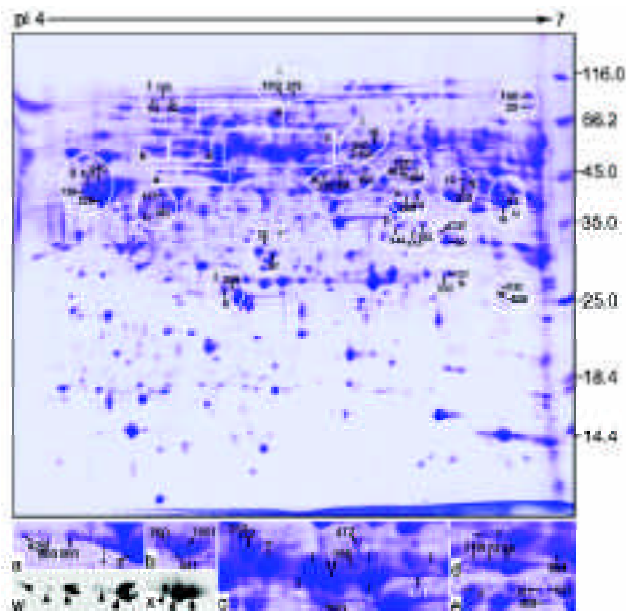


图 5. 花粉 PIPs 2DE (pH 4-7) 图谱

第一向等电聚焦用 pH 4-7 IPG 胶条进行,第二向 SDS-PAGE 用 12.5% ExcelGel SDS 胶完成,蛋白质分子量标准标在图的右侧,等电点范围标在图顶端,共检测到 996 ± 27 蛋白质斑点,图中数字为部分经过质谱鉴定具有 isoform 蛋白质点编号。a, actin AAO38821 isoforms (spots 4,3,629,803 和 991); b, beta-tubulin BAC82430 isoforms (spots 250, 441 和 1001); c, UDP-glucose pyrophosphorylase AAF62555 (11,189,204 和 520) 和 vacuolar acid invertase AAF87246 (7,17,22,155,317 和 472); d, putative H⁺-transporting ATP synthase NP_916591 (492 和 515) 和 ATP synthase beta chain Q01859 (58,172,319 和 994); e, dnaK-type molecular chaperone BiP T03581 (61 和 214) 和 putative vacuolar proton-ATPase A subunit BAD27610 (371,409 和 541); f, vacuolar proton-ATPase BAD45853 (92,93 和 100); g, vacuolar acid invertase AAF87245 (113,138,228 和 990); h, beta-tubulin BAC82430 (441 和 1001); i, putative isoamylase-type starch debranching enzyme XP_450961 (276 和 1003); j, UMP/CMP kinase A XP_479205 (60 和 306); k, expressed protein related to glutamine amidotransferase class II AAT76419 (90 和 332); l, putative Myo-inositol-1-phosphate synthase NP_921086 (19,158 和 380); m, putative mitochondrial ATP synthase beta chain NP_916979 (149,154 和 235); n, Putative adenosylmethionine-8-amino-7-oxononanoate aminotransferase AAQ14479 (137,463 和 464); o, reversibly glycosylated polypeptide CAA77235 (74 和 286); p, putative NADPH-thioredoxin reductase XP_467446 (183,373 和 344); q, putative aldehyde dehydrogenase XP_475772 (124 和 202); r, peroxidase 78 precursor CAH69320 (32 和 473); s, superoxide dismutase [Mn] AAA62657 (107 和 230); t, putative subtilisin-like proteinase BAD35473 (258 和 862); u, putative glyceraldehydes 3-phosphate dehydrogenase CAD79700 (18 和 67); v, voltage-dependent anion channel XP_450604 (532 和 626); w, actin 的 western 杂交结果; x, tubulin 的 western 杂交结果。

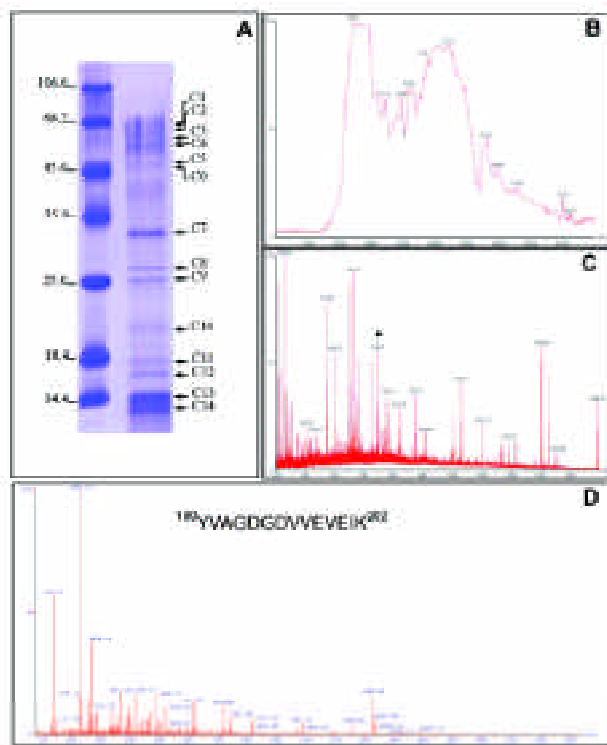


图 6. 通过 SDS-PAGE 分离和 LC MS/MS 鉴定花粉外被蛋白质组分

A: 花粉外被蛋白质的 SDS-PAGE 图谱。左侧泳道为蛋白质分子量标准,右侧泳道为通过乙酰洗脱得到的花粉外被蛋白质,标出 14 条得到鉴定的条带; B: 条带 C9 酶切产物的色谱图; C: 梯度洗脱 15 min 到 55 min 区段的质谱图,全部双电荷和三电荷峰都进行了质谱分析; D: C 中 m/z 764.83 双电荷的母离子的串联质谱图; 匹配的多肽经过数据库搜索被鉴定为 Putative expansin OsEXPB13 (AAL24476)。

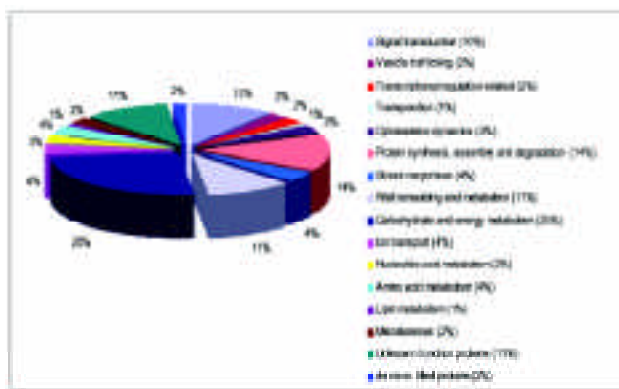


图 7. 成熟花粉中已鉴定蛋白质的功能分类

依据蛋白质的功能结构域信息并参照 GO 分类标准,在成熟花粉中鉴定的全部 322 种蛋白质被分为 15 个功能类群和新发现蛋白质。每一类群蛋白质数量占全部蛋白质数量的百分比被标在图中。