科学通报 2020 年 第 65 卷 第 2-3 期: 174 ~ 184
论 文
《中国科学》杂志社
SCIENCE CHINA PRESS

稻谷人工老化后种胚异构天冬氨酸动态监测与总蛋白差异表达分析

魏毅东[1,2,3†], 谢鸿光[1,2,3†], 刁丽蓉[1,2,3], 王进兰[1,2,3], 吴方喜[1,2,3], 罗曦[1,2,3], 何炜[1,2,3], 潘丽燕[1,2,3], 谢华安[1,2,3*], 张建福[1,2,3*]

1. 福建省农业科学院水稻研究所, 福州 350019;
2. 农业农村部华南杂交水稻种质创新与分子育种重点实验室/福州(国家)水稻改良分中心/福建省物种质创新与分子育种省部共建国家重点实验室培育基地/杂交水稻国家重点实验室华南研究基地/福建省作物分子育种工程实验室/福建省水稻分子育种重点实验室, 福州 350003;
3. 水稻国家工程实验室, 福州 350003

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: huaanxie@163.com; jianfzhang@163.com

2019-08-05 收稿, 2019-09-15 修回, 2019-09-16 接受, 2019-12-16 网络版发表
国家重点研发计划(2017YFD0100100)、福建省种业创新工程项目(fjzycxny2017001)、福建省科学技术厅省属公益类科研院所专项(2018R1101013-4, 2018R1021-9)、福建省农业科学院创新团队项目(STIT2017-1-1)和福建省农业科学院科研项目(YC2016-16)资助

摘要 蛋白质中天冬氨酸和天冬酰胺自发形成的异构天冬氨酸残基是组织细胞中常见的蛋白质共价损伤. 在前人的研究中, PIMT1介导的种子寿命提高, 很可能是由于修复了种胚中因老化处理而过量累积的含异构天冬氨酸(isoaspartyl, isoAsp)蛋白, 维持了种胚的活性. 然而, 异构天冬氨酸蛋白甲基转移酶(protein *L*-isoaspartyl methyltransferase, PIMT)对于水稻种子活力的作用机制, 仍然不甚明确. 本研究利用RNAi干扰技术获得了稳定的*OsPIMT1*的低表达株系. 种子经人工老化后, 结果表明*OsPIMT1*的低表达影响种子发芽活力. 随后对种胚中含异构天冬氨酸的蛋白进行动态检测, 结果显示在未吸胀和吸胀过后的种子中, 种胚中的*OsPIMT1*的表达都能降低isoAsp的累积. 而RNAi株系中*OsPIMT1*的低表达导致isoAsp的过度积累, 进而影响种子活力. 同时利用老化5 d后的水稻种胚蛋白进行双向电泳, 分析RNAi干扰种子老化过程中异构天冬氨酸过度积累对于种胚蛋白的影响, 鉴定到与种子老化相关的氧化胁迫相关蛋白、糖酵解以及热激蛋白分子伴侣等蛋白. 为进一步研究*OsPIMT1*表达对于种子老化后细胞各代谢途径的影响奠定了基础.

关键词 水稻, 异构天冬氨酸蛋白甲基转移酶, 双向电泳, 种子活力, 差异表达

我国是世界上最大的稻米生产和消费国, 水稻作为我国主要的粮食作物, 它的稳定生产对国家粮食安全具有十分重要的意义. 然而, 在储藏过程中由于陈化变质和霉变等问题造成每年几十亿斤稻米的损失, 约占总储量的3%. 这不仅影响到国家粮食安全, 也对食品安全造成很大的威胁[1,2]. 随着分子生物学技术的发展, 从生物化学与分子生物学技术入手研究和解决水稻耐储藏问题, 将为创制和培育耐储藏的水稻新品种提供技术支撑和保障.

种子在储藏过程中老化是细胞多种作用的结果, 包括: 酶活性的变化、细胞膜损伤、DNA与储藏RNA的损伤、脂肪与糖类的代谢等. 研究认为细胞中蛋白自发的共价损伤是引发老化的根本原因[3,4]. 老化可以看作是生物体内保护系统与其在老化过程中不断积累

引用格式: 魏毅东, 谢鸿光, 刁丽蓉, 等. 稻谷人工老化后种胚异构天冬氨酸动态监测与总蛋白差异表达分析. 科学通报, 2020, 65: 174–184
Wei Y D, Xie H G, Diao L R, et al. Dynamic detection of isoaspartyl contents and expression analysis of total embryo proteins under artificial aging of seeds for rice (in Chinese). Chin Sci Bull, 2020, 65: 174–184, doi: 10.1360/TB-2019-0239

© 2019《中国科学》杂志社

的损伤相抗衡的一场战斗. 一般情况下, 损伤蛋白质能够通过重新合成来修复. 然而, 一些情况下生物体需要在无法进行蛋白质合成的情况下修复损伤蛋白质[3,5~7]. 植物的种子就是处于一种低新陈代谢和低物质供给的条件下, 这意味着蛋白质合成几乎停止. 为了在老化条件下保持相对稳定的状态, 植物种子必须利用一种低资源和能量损耗的方式来修复损伤, 而不需要重新合成蛋白质[6,8,9].

蛋白质中天冬氨酸和天冬酰胺自发形成的异构天冬氨酸(isoaspartyl, isoAsp)残基是组织细胞中常见的蛋白质共价损伤. 这种损伤蛋白会在老化种子中大量存在, 并可能影响种子的寿命和活力[7,10]. 生物体内已经形成了一系列针对自发共价损伤的高效修复机制. 以异构天冬氨酸蛋白甲基转移酶(protein *L*-isoaspartyl methyltransferase, PIMT)修复含异天冬氨酸的蛋白为例, 肽链上的天冬氨酸β羧基和天冬酰胺β酰胺基常会自发的脱水和脱氨, 形成一种不稳定的中间体, 随后α氨酰基断裂, 形成isoAsp结构, 从而导致蛋白异构失活(图1). PIMT是isoAsp修复反应的关键酶, 它能以S-腺苷甲硫氨酸(S-adenosyl methionine, SAM)作为甲基供体, 将甲基添加到isoAsp的α羧基上, 使得isoAsp向正常的Asp转化, 进而修复蛋白质异构.

植物种子中大量存在PIMT蛋白, 其可能与种子活力有关[7,11,12]. Ogé等人[6]和Verma等人[8]首次明确拟南芥PIMT对于种子耐储性和寿命具有重要的功能; Verma等人[8]也证实了PIMT含量与鹰嘴豆种子活力有关. 异构天冬氨酸蛋白PIMT对于水稻种子活力的作用机制, 仍然不甚明确. 为了进一步探究isoAsp过度积累对于种子活力的影响机理, 拟利用RNAi干扰技术获得*OsPIMT1*的低表达株系, 并对人工老化后的水稻种子活力进行动态监测, 结合老化过程中isoAsp动态变化以及双向电泳分析, 以期初步解析OsPIMT1影响种子活力的作用机制.

1 材料与方法

1.1 *OsPIMT1*干扰转基因材料的创制

根据*OsPIMT1*保守区设计一段165 bp序列作为RNAi的靶标, 利用带酶切位点的引物(正向: 5′-ACGGTACCACTAGTGCACCGACTGTGGTCAAGC-3′; 反向: 5′-AAGGATCCGAGCTCGGGCTGTCGAAATAGGGAG-3′. 其中下划线部分为两个串联的酶切位点)进行PCR扩增, 将扩增产物经过两次酶切连接后构建于通用RNAi载体PTCK303. 详细载体构建方法参考Wang等人[13]描述的流程. 利用农杆菌介导的水稻转化法将相关载体转入粳稻品种日本晴中.

1.2 转基因材料的分子检测

提取转基因植株叶片DNA进行PCR鉴定, PCR体系(10 μL)为2× DreamTaq PCR Master Mix 5 μL, 引物终浓度0.3 μmol/L, 模版1 μL, 加nuclease-free water补齐至10 μL. PCR检测引物为: 正向: 5′-GGGCTGTCG-

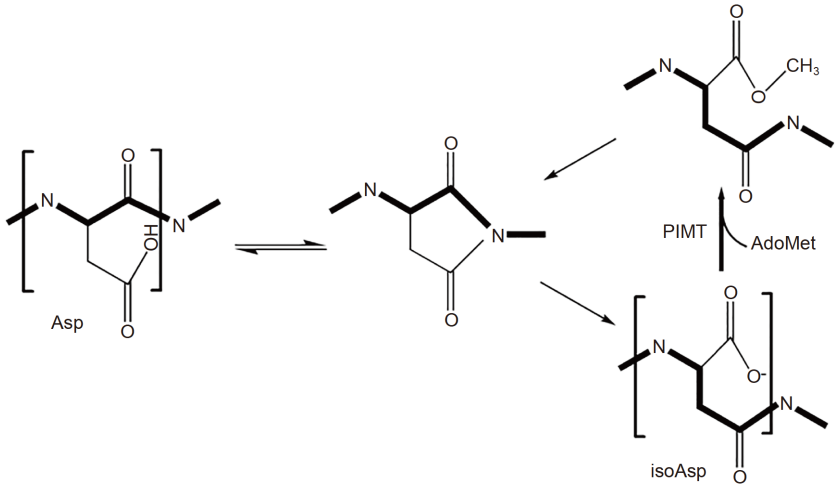


图 1 异天冬氨酸的自发形成与PIMT修复机制. 粗线表示肽链骨架, 细线箭头表示自发反应, 粗体箭头表示酶促反应
Figure 1 Spontaneous formation of isoAsp and PIMT-related repair mechanism. Bond line, backbone of peptide; narrow arrow, spontaneous reaction; bond arrow, enzymatic reaction

AAATAGGGAG-3′; 反向5′-TGAAAATCTCGAAA-CAGCCGT-GTCATAGTC-3′. PCR程序为: 94°C预变性5 min, 35个扩增循环(包含94°C变性30 s, 55°C退火30 s, 72°C延伸1 min), 最后72°C延伸5 min, 将PCR产物进行琼脂糖电泳.

RNAi转基因材料进行种胚*OsPIMT1*表达量检测. 方法为: 手工切取水稻种胚, 利用Trizol提取种胚RNA, 利用ReverTra Ace qPCR RT Master Mix with gDNA Remover(Toyobo)进行gDNA的清除与cDNA第一链的合成. 荧光定量引物分别为: *OsPIMT1*基因正向5′-ATGCGTGCTCTGGATGT-3′及反向5′-GAAGTAAC-CAACTCTGGGATA-3′; 内参基因*actin*正向5′-CGGCACTTCTTTGGACAT-3′及反向5′-ACGCC-TAAGCCTGCTGGTT-3′. 将合成的cDNA稀释20倍后进行荧光定量分析, 反应体系按FastStart Universal SYBR Green Master(ROCHE)厂商说明书推荐体系进行, 仪器为ABI7500荧光定量PCR仪, 溶解曲线和数据分析利用仪器自带的7500 Software v2.0.6进行分析.

1.3 种子老化处理

新收获的稻谷在42°C烘箱中干燥2 d来平衡水分和破除休眠. 人工老化按照Zeng等人[14]方法进行, 其中有部分改动, 具体如后续描述. 日本晴和RNAi株系的种子在42°C, 88%相对湿度(RH)的老化箱(BINDER GmbH, 德国)中放置5和15 d. 将样品置于铺有3层滤纸的培养皿中于温度 28°C、相对湿度 RH70%、光照与黑暗交替14 h/10 h的培养箱中进行发芽. 短时发芽率(SG)为发芽4 d后统计用以评估发芽整齐度, 整体发芽率(TG)为统计10 d后所有种子的发芽率, 种子的长时发芽率(LG)=TG−SG.

1.4 isoAsp含量的液相色谱分析

种胚蛋白提取按照Ogé等人[6]方法进行. 简述如下: 40个种胚加入4 mL提取液(100 mmol/L HEPES, pH 7.5, 500 mmol/L EDTA, 100 mmol/L DTT, 300 mmol/L sucrose, 1% 蛋白酶抑制剂)进行研磨. 匀浆转入5 mL离心管中, 22000×*g* 4°C离心10 min. 上清过滤顶部油脂层后加入65%过硫酸铵于4°C静置1 h. 蛋白经过20000×*g* 4°C离心15 min后沉淀, 并用500 μL 100 mmol/L HEPES, pH 7.5溶解. 蛋白浓度采用 Zor和Selinger[15]的方法定量.

异构天冬氨酸蛋白含量使用 ISOQUANT Isoaspartate Detection Kit(Promega, 美国)进行反应, 按照产品说明书进行优化后进行HPLC检测. HPLC检测使用安捷伦1200配合紫外检测器, 20 μL蛋白以1 mL/min流速在流动相(90% 50 mmol/L磷酸盐缓冲液pH 6.2和10%甲醇)经过C18反向柱(250 mm×4.6 mm, 5 μm)分离并用紫外检测器(280 nmol/L)检测. 老化种子胚中所含isoAsp的量由下式计算:

$$C_{\text{isoAsp}}(\text{mol mg}^{-1}) = (C_2 \times S_1) / (S_2 \times C_1), \quad (1)$$

式中, S_1为待测样品的峰面积, S_2为标准样品的峰面积, C_1为待测样品的蛋白浓度(mg/mL), C_2为isoAsp标准样品的浓度(mol/mL).

1.5 水稻种胚总蛋白提取的优化

(ⅰ) 裂解液-酚法提取种胚总蛋白. 将种子脱壳, 去胚乳, 液氮研磨, 分别向干粉中加入水溶性蛋白提取液(100 mmol/L Tris-HCl, pH 8.0; 1:100蛋白抑制剂; 20 mmol/L DTT)或含SDS的多组分蛋白提取液(水溶性提取液中加入1.5%SDS); 混合充分, 冰上静置15 min. 4°C 35000×*g*离心25 min, 上清加入蔗糖至终浓度15%, 加入等体积Tris-苯酚. 漩涡振荡1 h(振荡10 min, 冰上超声5 min, 期间要摇匀), 静置片刻待分层后, 4°C 35000×*g*, 离心25 min. 取上层酚相, 加入5倍体积预冷的甲醇-醋酸铵(0.1 mol/L), 混匀, 置于−20°C, 沉淀蛋白3 h. 离心后用预冷的甲醇(含0.07% *β*-巯基乙醇)和90%丙酮(含0.07% *β*-巯基乙醇)洗涤两次. 真空冷冻干燥机干燥2 h.

(ⅱ) TCA-酚法提取种胚总蛋白. 将种子脱壳, 去胚乳, 液氮研磨, 干粉中迅速加入TCA提取液(10%TCA; 90%丙酮; 0.07% β-巯基乙醇). 4°C, 35000×*g*离心25 min, 弃上清, 加入20 mL预冷的丙酮(含0.07% β-巯基乙醇)洗涤, 稍微振荡均匀, 置于−20°C冰箱至少3 h. 重复此洗涤步骤3次. 将沉淀真空冷冻干燥, 制成蛋白质干粉, 并加入预冷的30%蔗糖溶液(含4% β-巯基乙醇)和等体积Tris-苯酚, 后续同上一节(i)的步骤.

(ⅲ) 裂解液-TCA法提取种胚总蛋白. 将种子脱壳, 去胚乳, 液氮研磨, 干粉分别加入水溶性蛋白提取液或含SDS的多组分蛋白提取液(成分同(i)), 混合充分, 冰上静置15 min分层后, 35000×*g*, 4°C离心25 min, 将上清于超声仪超声5 min. 上清加上3倍体积含13.3% TCA的冰丙酮溶液, 放置−20°C沉淀蛋白3 h或过夜. 在4°C, 35000×*g*离心30 min, 弃上清. 用预冷的丙酮(含0.07% *β*-

巯基乙醇)和90%丙酮(含0.07% β-巯基乙醇)分别洗涤两次, 4°C, 35000×*g*, 离心25 min. 真空冷冻干燥机干燥2 h.

1.6 双向电泳与生物信息学分析

蛋白双向电泳实验参照本实验已发表流程[16], 并进行细微改动. 选择pH 3~10的17 cm IPG预制胶条, 种胚总蛋白上样量为1 mg/胶体. 聚焦程序如表1.

将第一向的胶条经过平衡后转移至已制备好的10%的聚丙烯酰胺凝胶上部, 使用低熔点琼脂糖封胶液凝固后, 将凝胶转移至电泳槽. 胶条每块凝胶电流10 mA, 电泳30 min, 待样品完全走出IPG胶条, 浓缩成一条线后, 加大电流至每块凝胶20 mA, 待溴酚蓝指示剂达到底部边缘时, 停止电泳.

将跑完的双向电泳胶按进行高灵敏度胶体考马斯亮蓝染色. 简略步骤如下: 将完成第二向SDS-PAGE电泳的凝胶用ddH_2O清洗3遍, 加入固定液(40%乙醇, 10%乙酸), 将浸泡在固定液中的胶体放置于脱色摇床中轻摇30 min. 将固定好的凝胶放入染色盘中, 加入染色液(硫酸铵 8%, 磷酸 0.96%, 0.08% 考马斯亮蓝G250, 20%甲醇), 将染色盘放在摇床上, 染色30 min.

考染后的胶用Bio-rad GS800光密度扫描仪扫描. 采用二维凝胶分析软件ImageMaster 2D Platinum以及PDquest读取分析图像数据. 将差异蛋白质点标记并切下, 进行MALDI-TOFTOF质谱分析.

采用GENEONTOLOGY在线平台(http://geneontology.org)对差异蛋白进行基因本体(geneontology, GO)聚类分析, 在京都基因与基因组百科数据库(Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes, KEGG)中进行生物通路分析.

2 结果

2.1 RNAi株系分子检测与老化分析

将RNAi转基因材料T0代植株进行PCR检测(图2(a)), 选取阳性转基因植株扩繁. 经过多代种植结合分子检测, 选取了10个株系进行后续分析. 将新收获的RNAi材料种子进行种胚*OsPIMT1*荧光定量检测. 结果表明, *OsPIMT1*在RNAi材料种胚中的表达量都显著下调, 仅为对照的8.9%~17.3%(图2(b)), 可以作为后续*OsPIMT1*功能分析的材料.

随机选取3个株系Ri1~Ri3的稻谷进行人工老化实验. 在老化5 d后, RNAi材料种子的整体发芽率(TG)略有下降但无显著变化. 但与日本晴相比, Ri1~Ri3的短时发芽率(SG)都显著下降(图3), SG反映发芽整齐度以及种子发芽活力. 老化15 d后, 与日本晴相比, Ri1~Ri3的整体发芽率(TG)下降显著, 且短时发芽率(SG)降低为10%以下(图3). 这表明RNAi材料在长时间老化条件下整体的发芽活力与成苗速度大幅降低. 以上结果表明*OsPIMT1*的低表达影响种子在人工老化条件下的发芽活力, 且在5 d时已出现种子活力变化.

表 1 等电聚焦设置

Table 1 Settings of isoelectric focusing procedure

步骤	电压 (V)	升压速度	时间	功能
水化			12 h(17°C)	
S1	250	慢速	25 min	除盐
S2	1000	快速	2 h	除盐
S3	8000	线性	5 h	升压
S4	8000	快速	40000 h	聚焦
S5	500	快速		保持

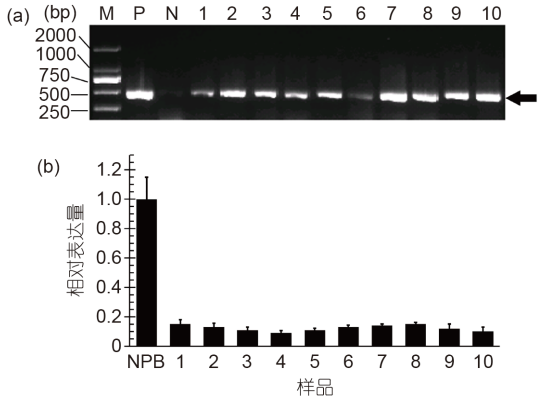


图 2 *OsPIMT1* RNAi转基因株系的分子检测. (a) *OsPIMT1* RNAi转基因植株的PCR检测. M, DNA marker; P, 阳性质粒; N, 日本晴; 1~10表示*OsPIMT1* RNAi转基因植株; 箭头表示目的条带. (b) 种胚*OsPIMT1*荧光定量PCR分析. NPB, 日本晴; 1~10表示*OsPIMT1* RNAi转基因植株; 误差线表示标准差

Figure 2 Molecular analysis of *OsPIMT1* RNAi transgenic lines. (a) PCR analysis of *OsPIMT1* RNAi transgenic plants. M, DNA marker; P, positive plasmid; N, Nipponbare; 1−10, *OsPIMT1* RNAi transgenic plants; arrow, target band. (b) Real-time quantitative PCR of *OsPIMT*1 in embryo. NPB, Nipponbare; 1−10, *OsPIMT1* RNAi transgenic plants; error bars indicate standard deviation (SD)

2.2 *OsPIMT1*干扰植株的异构天冬氨酸定量分析

PIMT酶以S-腺苷甲硫氨酸(SAM)作为甲基供体修复异天冬氨酸(isoAsp), 将其修复为正常的天冬氨酸同

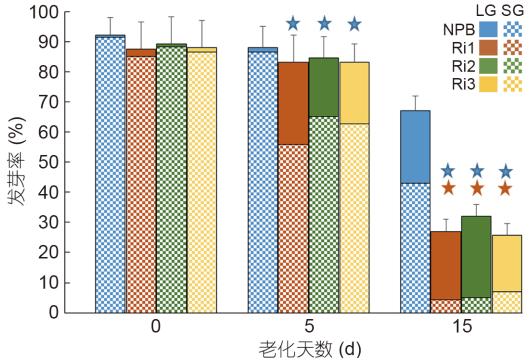


图 3 人工老化下*OsPIMT1* RNAi 种子活力分析. TG, 整体发芽率(发芽10 d后统计发芽率); SG, 短时发芽率(发芽4 d后统计发芽率); 长时发芽率LG=TG−SG; NPB, 日本晴; Ri1~Ri3: *OsPIMT1*干扰株系; 星号表示与相同老化天数野生型(NPB)相比, TG(红色)或SG(蓝色)具有显著性差异(P<0.05); 误差线表示标准差

Figure 3 Assessment of *OsPIMT1* RNAi seed vigor after artificial aging. TG, total germination rate (germination percentage calculated after 10 d imbibition); SG, short period germination percentage (germination percentage calculated after 4 d imbibition). LG, long period germination percentage is calculated by TG–SG. NPB, Nipponbare; Ri1−Ri3: *OsPIMT1* RNAi lines. Asterisk denotes a statistical significant difference (student's *t*-test, P<0.05) of SG (blue) and TG (red) between WT (Nipponbare) and RNAi lines. Error bars indicate standard deviation (SD)

时生成S-腺苷-*L*-高半胱氨酸(S-adenosyl-*L*-homocysteine, SAH). 高效液相色谱技术能够定量SAH, 从而测得蛋白质样品中的异天冬氨酸含量. 通过比较SAH谱图发现, 1 μmol/L的SAH的峰面积S_{SAH}=20.12, 保留时间为4.18 min, 而1 μmol/L isoAsp标准样经过修复后产生的SAH, 其保留时间为4.27 min, 进样峰面积S_{isoAsp}=18.01(图4). 反应效率=S_{isoAsp}:S_{SAH}≥89.5%, 说明反应中isoAsp修复效率较高, 可用于后续定量分析.

随后, 利用HPLC检测老化种子种胚中isoAsp含量. 在未老化时, Ri1种胚isoAsp比野生型日本晴略高, 而在老化5 d时, Ri1中isoAsp上升较快, 随着老化时间的延长, 二者的差异增大(图5(a)). 这表明, 种胚isoAsp水平与*OsPIMT1*的表达量有关, 且在老化过程中, Ri1株系比日本晴的isoAsp累积程度更大. 我们利用老化5 d的稻谷进行吸胀实验, 分析isoAsp在种子吸胀后的动态变化. 结果表明, 在浸种8 h后, 日本晴种胚isoAsp快速下降, 而Ri1材料中下降较为缓慢, 二者含量差异最大; 而在16 h后, 二者差异下降, 且日本晴中isoAsp仅下降约10%(与8 h相比), 这可能说明其isoAsp恢复到接近本

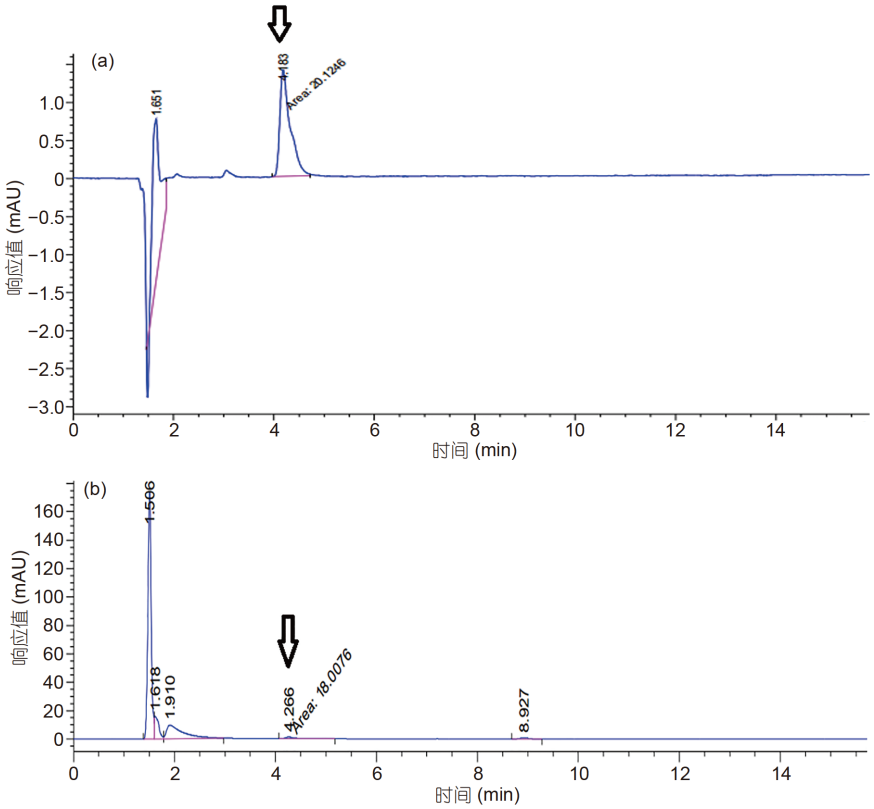


图 4 isoAsp定量体系的验证. (a) SAH 标准样品; (b) PIMT反应后的isoAsp 标准样品. 箭头指示为SAH峰

Figure 4 Verification of isoAsp determination analysis. (a) SAH standard sample; (b) isoAsp standard sample after PIMT reaction. Arrows indicate SAH peak of HPLC

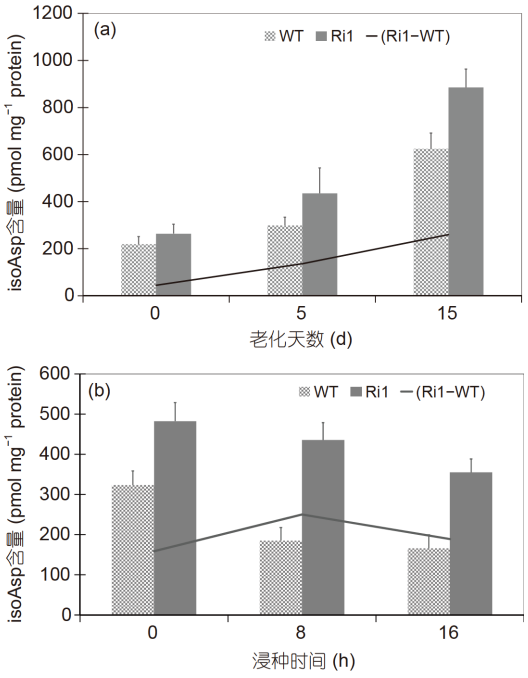


图 5 人工老化后isoAsp含量动态检测. (a) 人工老化后种胚中isoAsp含量; (b) 吸胀后老化5 d种子胚中isoAsp 含量. 误差线为标准差

Figure 5 Dynamic monitor of isoAsp contents after artificial aging. (a) isoAsp contents of embryo after artificial aging; (b) isoAsp contents of 5-d-aging rice seed embryo after imbibition. Error bars indicate standard deviation (SD)

底水平(图5(b)). 此外, RNAi材料种胚中的isoAsp始终维持较高水平(图5(b)), 这可能是影响发芽率的原因. 综上所述, 在未吸胀和吸胀过后的种子中, 种胚*OsPIMT1*的表达都能降低isoAsp的累积, 而RNAi干扰株系中, *OsPIMT1*的低表达导致了isoAsp的过度积累, 进而影响种子活力.

2.3 种胚蛋白的双向电泳分析

为了进一步探究isoAsp过度积累对于种胚的影响, 我们拟采用双向电泳方法对老化过后的RNAi株系进行差异蛋白质组学分析. 为了能提取杂质少, 含量高且完整的水稻种胚蛋白, 尝试了不同的蛋白提取法. 我们比较了5种蛋白提取方法, 分别是: (1) TCA-酚抽提; (2) SDS提取液-酚抽提; (3) 水溶性提取液-酚抽提; (4) SDS提取液-TCA沉淀; (5) 水溶性提取液-TCA沉淀. 蛋白电泳结果表明不含SDS的水溶性提取液所提取的水稻种胚蛋白条带不均一, 存在明显的偏向性, 且蛋白含量偏低(图6(a)). 因此后续选择带有SDS提取液的提取法以及TCA-酚抽提进行双向电泳预实验. 根据双向电泳的结果, 无论是SDS提取液-酚抽提或TCA-酚抽提法, 所

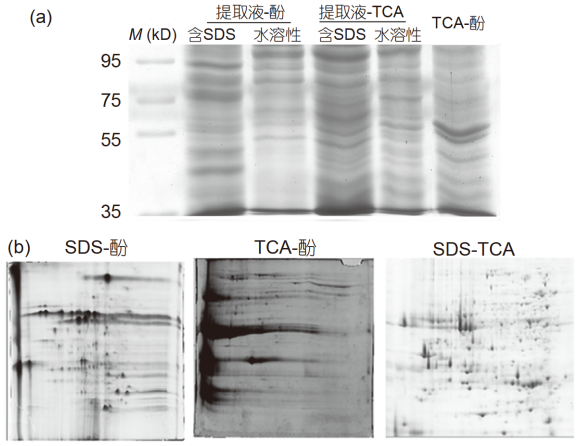


图 6 不同方法提取的水稻种胚蛋白的比较. (a) 5种不同提取法的SDS-PAGE; (b) 3种不同提取法的双向电泳图

Figure 6 Comparison of rice embryo proteins using different extraction methods. (a) SDS-PAGE of five different protein extraction methods; (b) two-dimensional electrophoresis of three different extraction methods

得样品横条纹较多, 体系干扰较大, 且TCA-酚抽提法蛋白损伤较多, 因此二者无法用于双向电泳分析(图6(b)). 采用SDS-TCA法提取水稻种胚蛋白效果较好, 此方法容易提取到小分子蛋白, 蛋白点较多, 蛋白分离效果好, 无横条纹(图6(b)), 适合后续双向电泳分析.

由于在老化处理的早期阶段, 野生型日本晴与RNAi材料的种子发芽活力已发生差异. 我们以老化5 d的日本晴与RNAi种子为研究材料, 以较优的SDS-TCA法提取水稻种胚总蛋白. 通过差异蛋白比对分析发现二者存在33个差异表达蛋白点(图7). 对差异表达的蛋白点进行MALDI-TOF/TOF质谱鉴定, 分析数据库检索

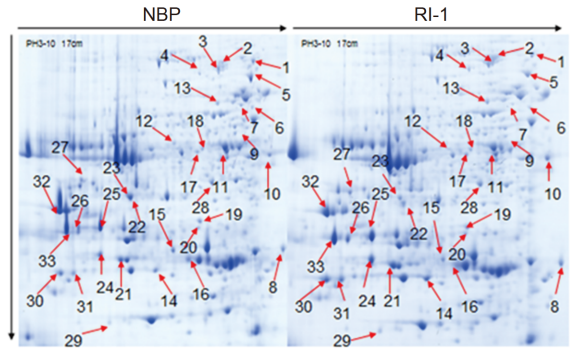


图 7 (网络版彩色)老化5 d水稻种胚总蛋白双向电泳图. NPB, 日本晴; Ri-1, *OsPIMT1* RNAi plant; 箭头(1~33)表示差异蛋白点

Figure 7 (Color online) Two-dimensional electrophoresis of embryo total protein of 5-d-aging rice seed embryos. NPB, Nipponbare; Ri-1, *OsPIMT1* RNAi plant; arrow (1−33), differential protein spots

得到结果如表2.

2.4 差异蛋白的GO与KEGG分析

对鉴定的33个蛋白点经过生物学过程GO富集，差异蛋白主要可分为3类，其中新陈代谢相关过程占55.6%，细胞进程占22.2%，应激反应占14.8%. 这可能预示着老化过程中，种胚细胞受到外界环境变化引起物质的合成与分解以及能量代谢来保护和维持细胞活性(图8(a)). 应激反应的蛋白包含了热休克蛋白和其他分子伴侣蛋白，以及钙网织蛋白. 其中钙网织蛋白能参

表 2 差异蛋白的MALDI-TOF/TOF分析及数据库查询结果[a)]

Table 2 List of MALDI-TOF/TOF result and database query of differential proteins

蛋白编号	登录号	理论分子量(Da)	变化	水稻中匹配	蛋白名称
1	gi|18855040	93044	D	OS06G0716700	Heat shock protein 90
2	gi|49388337	83028	D	OS02G0530600	Poly [ADP-ribose] polymerase 3
3	gi|40538891	97232	U	OS05G0405000	Cytosolic pyruvate orthophosphate dikinase (PPDK)
4	gi|1020415	92664	U	OS01G0172400	Phospholipase D alpha 1
5	gi|39104468	80449	D	OS09G048210	Heat shock protein 81-2
6	gi|5679684	66456	D	OS09G0249700	Phosphatase 2A regulatory A subunit
7	gi|52075907	68711	D	OS06G0662000	Putative vacuolar proton-ATPase
8	gi|54290888	27905	U	OS06G0341300	Putative Late embryogenesis abundant protein D-34
9	gi|22758324	61097	D	OS10G0462900	Mitochondrial chaperonin-60
10	gi|34393218	48450	U	OS07G0246200	Calreticulin
11	gi|15823775	51821	D	OS09G0553200	UDP-glucose pyrophosphorylase UDPase
12	gi|13236672	53435	D	OS03G0757900	UDP-glucose 6-dehydrogenase 3
13	gi|13324798	63138	U	OS03G0712700	Phosphoglucomutase
14	gi|20208	56610	U	OS03G0427300	Glutelin type-A 3
15	gi|540535	36665	D	OS01G0686800	Guanine nucleotide-binding protein subunit beta-like protein A
16	gi|41469581	63845	D	OS03G0663800	Putative globulin (with alternative splicing)
17	gi|13959	55532	U	OS05G0553000	ATP synthase subunit beta
18	gi|29367605	53860	U	OS11G0455500	Adenosylhomocysteinase
19	gi|10140741	35888	D	OS10G0478200	Malate dehydrogenase
20	gi|42407716	58352	D		Hypothetical protein
21	gi|20219	56841	U	OS10G0400200	Glutelin type-A 2
22	gi|108707889	36997	D	OS03G0322900	Late embryogenesis abundant protein 1
23	gi|4760553	41445	U	OS06G0486800	Formate dehydrogenase 1
24	gi|20227	57239	U	OS02G0268300	Glutelin type-B 4
25	gi|968996	36641	U	OS08G0126300	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
26	gi|47848293	36716	U	OS02G0601300	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3
27	gi|19071621	41835	U	OS03G0168100	Late embryogenesis abundant protein
28	gi|49388607	42196	U	OS02G0169300	Phosphoglycerate kinase
29	gi|5360230	25365	U	OS05G0574500	GTP-binding nuclear protein Ran-2
30	gi|20232	56929	U	OS02G0249800	Glutelin type-B 1
31	gi|20212	56589	U	OS02G0249600	Glutelin type-B 2
32	gi|786178	39141	U	OS01G0905800	Aldolase C-1
33	gi|47848293	36716	U	OS02G0601300	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase 3

a) D是下调，U是上调

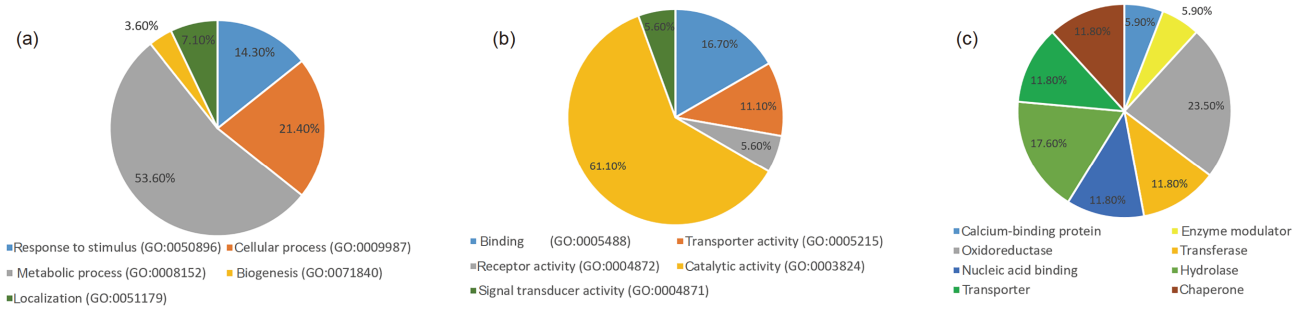


图 8 鉴定蛋白点的GO分析. (a) 生物学功能; (b) 分子功能; (c) 蛋白分类
Figure 8 Gene ontology of identified proteins. (a) Biological process; (b) biological process; (c) protein classification

与分选和标记错误折叠的蛋白，防止其被转运到高尔基体内进行加工. 分子功能GO富集结果显示，催化活性蛋白占61.1%, 结合活性占16.7%, 转运活性占11.1%, 受体活性和信号转导活性各占5.6%. 这表明种胚细胞中信号转导与物质运输仍然活跃，即外界信号和能量物质的交换仍在进行(图8(b)). 在蛋白分类GO中，氧化还原酶占23.5%, 而水解酶占17.6%, 也印证了生物学过程GO中的结果(图8(c)). 同时, 应该注意的是, 两种与氧化胁迫有关的酶也显著上调. 一个是与膜结构中的磷脂分子降解的磷脂酶PLD，另一个是参与植物体内甲酸分子分解的甲酸脱氢酶，这表明老化过程会引起胚中氧化还原反应的应答.

通过KEGG代谢通量分析, 富集到新陈代谢通路、碳代谢通路、次生代谢物合成、光合作用碳固定、糖酵解、氨基酸合成等(表3). 随后我们通过整合各代谢途径的关联酶，发现可以将KEGG富集途径中的酶类分成两种: 酶类I是糖酵解中重要的酶类，如磷酸甘油酸激酶(phosphoglycerate kinase)、3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)、果糖二磷酸醛缩酶(fructose-bisphosphate aldolase)、磷酸葡萄糖变位酶(Phosphoglucomutase); 酶类II为固碳与碳运输的重要酶类丙酮酸磷酸二激酶(pyruvate phosphate dikinase, PPDK)和苹果酸脱氢酶(malate dehydrogenase)等. 应该注意，酶类I是固碳反应的下游酶类(可逆反应酶)，负责将碳转变为六碳分子(葡萄糖与果糖，图9(a, b)). 两种酶类都是在能量代谢、淀粉合成、氨基酸碳骨架代谢中重要的酶类(图9(b))，这可能预示着，在种子老化过程中，碳源作为能量代谢和物质代谢的重要组成部分，其变化是种子老化过程中最重要的方面.

3 讨论

稻谷在人工老化过程中，异构天冬氨酸过度积累会引起整个蛋白组发生变化. 利用老化5 d后的水稻种胚蛋白进行双向电泳分析，研究RNAi材料老化过程中异构天冬氨酸过度积累对于种胚蛋白的影响. 与前人

表 3 鉴定蛋白点的KEGG分析
Table 3 KEGG analysis of identified proteins

序号	名称	索引号	检索蛋白数	背景蛋白数	*P*值
1	Metabolic pathways	osa01100	14	1573	8.75378×10^{-11}
2	Carbon fixation in photosynthetic organisms	osa00710	6	73	1.53254×10^{-10}
3	Carbon metabolism	osa01200	7	235	3.5075×10^{-9}
4	Glycolysis	osa00010	5	123	1.687×10^{-7}
5	Biosynthesis of secondary metabolites	osa01110	7	848	1.69106×10^{-5}
6	Biosynthesis of amino acids	osa01230	4	207	5.57268×10^{-5}
7	Amino sugar and nucleotide sugar metabolism	osa00520	3	111	1.98992×10^{-4}
8	Starch and sucrose metabolism	osa00500	3	159	5.57284×10^{-4}

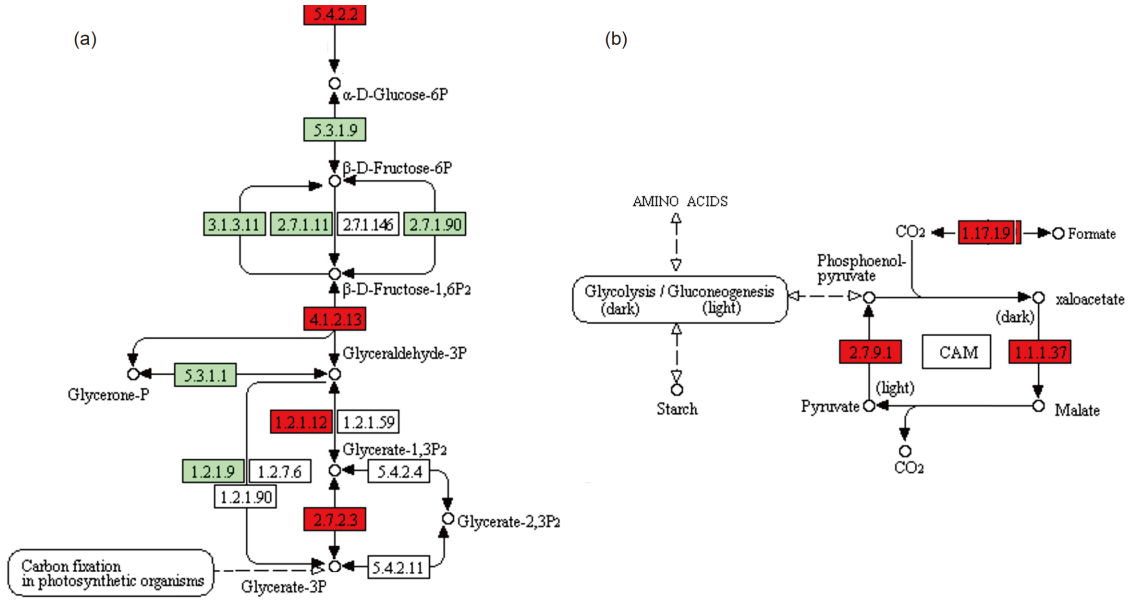


图 9 碳代谢相关KEGG汇总图. (a) 糖酵解与异生代谢图; (b) 固碳作用与其他代谢关系图. 红色表示鉴定的酶: 磷酸甘油酸激酶(EC 2.7.2.3)、3-磷酸甘油醛脱氢酶(EC 1.2.1.12)、果糖二磷酸醛缩酶(EC 4.1.2.13)、磷酸葡萄糖变位酶(EC 5.4.2.2)、丙酮酸磷酸二激酶(EC 2.7.9.1)、苹果酸脱氢酶(EC 1.1.1.37)

Figure 9 KEGG pathway of carbon mechanism. (a) Glycolysis and gluconeogenesis; (b) carbon fixation and other pathway. Identified proteins were marked in red: Phosphoglycerate kinase (EC 2.7.2.3), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (EC 1.2.1.12), fructose-bisphosphate aldolase (EC 4.1.2.13), phosphoglucomutase (EC 5.4.2.2), pyruvate phosphate dikinase (EC 2.7.9.1), and malate dehydrogenase (EC 1.1.1.37)

的结果类似, 在老化过程中, 我们鉴定到与氧化胁迫相关的酶, 如磷脂酶D以及甲酸脱氢酶. 其中磷脂酶D在老化过程中引起磷脂分子的降解, 从而降低了种子的活性, 通过抑制其活性能够提高拟南芥种子寿命与储藏性[17]. 甲酸脱氢酶虽然没有直接的证据表明其与种子活力相关, 但在高盐条件下发芽的小麦种子中也发现其表达显著上调[18]. 而在大豆的高温老化后, 甲酸脱氢酶也发生了显著上调[19], 这表明在老化过程中种子内的一碳代谢物甲酸含量可能增加. 因此需要甲酸脱氢酶清理有毒害的甲酸, 后续可进一步验证其与种子活力的关系. 值得注意的是, 热激蛋白和其他分子伴侣都是与非生物胁迫重要的应激蛋白, 参与维持细胞蛋白空间结构, 在RNAi干扰的种胚中大量表达, 而蛋白质的异构天冬氨酸化直接的后果就是引起蛋白质空间构象的改变[3]. 我们推测种子老化过程中蛋白空间构象发生破坏, 因此需要热激蛋白以及其他分子伴侣来修复这些异构蛋白.

有趣的是, 在KEGG代谢通路分析过程中, 大部分的代谢途径中都富集到了2类酶: 酶类I是糖酵解中多个反应的分解酶, 酶类II为固碳与碳运输的重要酶类. 两个生物学途径通过糖异生作用进行关联, 可以看成是碳源合成与分解的逆过程. 在前人的研究中, 发现玉米储藏性相关的QTL中, 有8个基因与糖酵解相关, 预示着糖酵解途径在老化过程中的重要作用[20]. 在甜菜种子老化研究中, 鉴定到29个与老化相关的蛋白点, 其中与糖酵解有关的两个酶3-磷酸甘油醛脱氢酶(glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase)和果糖二磷酸醛缩酶(fructose-bisphosphate aldolase)[21], 它们与本研究中鉴定到的酶为同工酶. Yang等人[22]发现, 在水稻种子萌发过程中, 糖酵解的相关酶果糖激酶(fructokinase)和磷酸葡萄糖变位酶(phosphoglucomutase)都会发生显著的上调. 而Kim等人[23]也发现种子萌发过程中果糖二磷酸醛缩酶(fructose-bisphosphate aldolase)、果糖激酶(fructokinase)也都发生显著上调. 这些发现都与本研究中结果一致, 这可能说明种子的萌发力和活力与能量和物质的快速转移能力有关. 以上结果为进一步研究OsPIMT1表达对于种子老化后细胞各代谢途径的影响奠定了基础.

参考文献

1 Zeng D L. Screened of storability germplasm of rice and research on genetic and breeding (in Chinese). Doctor Dissertation. Beijing: Chineses Academy of Agricultural Sciences, 2002 [曾大力. 水稻耐贮藏种质的筛选及遗传育种研究. 博士学位论文. 北京: 中国农业科学院, 2002]

2 Xu H B, Wei Y D, Lian L, et al. Comparative analysis of artificial aging and natural aging with rice seeds (in Chinese). Mol Plant Breed, 2013, 11: 552−556 [许惠滨, 魏毅东, 连玲, 等. 水稻种子人工老化与自然老化的分析比较. 分子植物育种, 2013, 11: 552−556]

3 Clarke S. Aging as war between chemical and biochemical processes: Protein methylation and the recognition of age-damaged proteins for repair. Ageing Res Rev, 2003, 2: 263–285

4 Li C, Clarke S. A protein methyltransferase specific for altered aspartyl residues is important in *Escherichia coli* stationary-phase survival and heat-shock resistance. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 9885–9889

5 Rajjou L, Debeaujon I. Seed longevity: Survival and maintenance of high germination ability of dry seeds. C R Biol, 2008, 331: 796–805

6 Ogé L, Bourdais G, Bove J, et al. Protein repair l-isoaspartyl methyltransferase1 is involved in both seed longevity and germination vigor in *Arabidopsis*. Plant Cell, 2008, 20: 3022–3037

7 Mudgett M B, Clarke S. Characterization of plant *L*-isoaspartyl methyltransferases that may be involved in seed survival: Purification, cloning, and sequence analysis of the wheat germ enzyme. Biochemistry, 1993, 32: 11100–11111

8 Verma P, Kaur H, Petla B P, et al. *PROTEIN l-ISOASPARTYL METHYLTRANSFERASE2* is differentially expressed in chickpea and enhances seed vigor and longevity by reducing abnormal isoaspartyl accumulation predominantly in seed nuclear proteins. Plant Physiol, 2013, 161: 1141–1157

9 Châtelain E, Satour P, Laugier E, et al. Evidence for participation of the methionine sulfoxide reductase repair system in plant seed longevity. Proc Natl Acad Sci USA, 2013, 110: 3633–3638

10 Chen T, Nayak N, Majee S M, et al. Substrates of the *Arabidopsis thaliana* protein isoaspartyl methyltransferase 1 identified using phage display and biopanning. J Biol Chem, 2010, 285: 37281–37292

11 Mudgett M B, Clarke S. Hormonal and environmental responsiveness of a developmentally regulated protein repair *L*-isoaspartyl methyltransferase in wheat. J Biol Chem, 1994, 269: 25605−25612

12 Thapar N, Clarke S. Expression, purification, and characterization of the protein repair l-isoaspartyl methyltransferase from *Arabidopsis thaliana*. Protein Expr Purif, 2000, 20: 237–251

13 Wang Z, Chen C, Xu Y, et al. A practical vector for efficient knockdown of gene expression in rice (*Oryza sativa* L.). Plant Mol Biol Rep, 2004, 22: 409–417

14 Zeng D L, Qian Q, Yasukumi K. Study on storability and morphological index in rice (*Oryza sativa* L.) under artificial ageing. Acta Agron Sin, 2002, 28: 551−554

15 Zor T, Selinger Z. Linearization of the Bradford protein assay increases its sensitivity: Theoretical and experimental studies. Anal Biochem, 1996, 236: 302–308

16 Xue W, Mao X, Wei Y, et al. Proteomic analysis of blast-resistant near-isogenic lines derived from *japonica* rice, var. Yunyin, infected with *Magnaporthe oryzae*. Chin Sci Bull, 2014, 59: 4312–4322

17 Devaiah S P, Pan X, Hong Y, et al. Enhancing seed quality and viability by suppressing phospholipase D in *Arabidopsis*. Plant J, 2007, 50: 950–957

18 Fercha A, Capriotti A L, Caruso G, et al. Comparative analysis of metabolic proteome variation in ascorbate-primed and unprimed wheat seeds during germination under salt stress. J Proteomics, 2014, 108: 238–257

19 Ren C, Bilyeu K D, Beuselinck P R. Composition, vigor, and proteome of mature soybean seeds developed under high temperature. Crop Sci, 2009, 49: 1010–1022

20 Han Z, Ku L, Zhang Z, et al. QTLs for seed vigor-related traits identified in maize seeds germinated under artificial aging conditions. PLoS One, 2014, 9: e92535

21 Catusse J, Strub J M, Job C, et al. Proteome-wide characterization of sugarbeet seed vigor and its tissue specific expression. Proc Natl Acad Sci USA, 2008, 105: 10262–10267

22 Yang P, Li X, Wang X, et al. Proteomic analysis of rice (*Oryza sativa*) seeds during germination. Proteomics, 2007, 7: 3358–3368

23 Kim S T, Wang Y, Kang S Y, et al. Developing rice embryo proteomics reveals essential role for embryonic proteins in regulation of seed germination. J Proteome Res, 2009, 8: 3598–3605

Summary for “稻谷人工老化后种胚异构天冬氨酸动态监测与总蛋白差异表达分析”

Dynamic detection of isoaspartyl contents and expression analysis of total embryo proteins under artificial aging of seeds for rice

Yidong Wei[1,2,3†], Hongguang Xie[1,2,3†], Lirong Diao[1,2,3], Jinlan Wang[1,2,3], Fangxi Wu[1,2,3], Xi Luo[1,2,3], Wei He[1,2,3], Liyan Pan[1,2,3], Huaan Xie[1,2,3*] & Jianfu Zhang[1,2,3*]

[1] *Rice Research Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou 350019, China;*
[2] *Key Laboratory of Germplasm Innovation and Molecular Breeding of Hybrid Rice for South China, Ministry of Agriculture and Rural Affairs/Fuzhou Branch, National Rice Improvement Center of China/Incubator of National Key Laboratory of Germplasm Innovation and Molecular Breeding Between Fujian and Ministry of Sciences and Technology/Base of South China, State Key Laboratory of Hybrid Rice/Fujian Engineering Laboratory of Crop Molecular Breeding/Fujian Key Laboratory of Rice Molecular Breeding, Fuzhou 350003, China;*
[3] *National Rice Engineering Laboratory, Fuzhou 350003, China*
† These authors equally contributed to this work
* Corresponding authors, E-mail: huaanxie@163.com; jianfzhang@163.com

China is the largest rice producing and consuming country in the world. As the main food crop in China, the stable production of rice is of great significance to food security. However, in the process of rice storage, due to aging and mildew problems, billions of kilograms of rice are lost every year, accounting for about 3% of the total reserves of rice, which not only affects food security, but also poses a great threat to food security. With the development of molecular biology technology, researching and solving the problem of rice storage tolerance from the perspective of biochemistry and molecular biology technology will provide technical support and guarantee for the development and breeding of new rice varieties with storage tolerance.

Seed aging during storage is the result of various cellular functions, including changes in enzyme activity, cell membrane damage, DNA and stored RNA damage, fat and sugar metabolism, etc. It is believed that spontaneous covalent damage of proteins in cells is the fundamental cause of aging. Aging can be seen as a battle between the internal protection system of organisms and its accumulated damage during aging. In general, damaged proteins can be repaired by re-synthesis. However, in some cases, organisms need to repair damaged proteins without protein synthesis. The seeds of plants are in a condition of low metabolism and low material supply, which means that protein synthesis almost stops. To maintain a relatively stable state under aging conditions, plant seeds must use a low-resource and energy-depletion approach to repair damage, without requiring protein synthesis.

Spontaneous formation of isoaspartyl (isoAsp) residues from aspartic acid and asparagine in proteins are common covalent damage of proteins found in cells. Based on previous study, PIMT1-related seed longevity improvement is probably due to the repair of detrimental isoAsp-containing proteins that over accumulate in embryos when subjected to accelerated aging. However, the mechanism of Protein L-isoaspartyl methyltransferase (PIMT) on rice seed vigor is still unclear. In this study, *OsPIMT1* underexpression materials were generated by RNA interference, and the result of artificial aging shows that low expression of *OsPIMT1* reduced seed germination vigor. The short-time germination percentage of *OsPIMT1* RNAi transgenic seeds declined to less than 70% after 5-day of artificial aging, which indicated that seed vigor of *OsPIMT1* RNAi was impaired even at the early stage of artificial aging. Furthermore, dynamic changes of isoaspartyl containing proteins in embryo were detected, which indicated that *OsPIMT1* expression reduced the accumulation of isoAsp in both non-imbibed and imbibed seeds and the seed vigor loss was probably caused by overaccumulation of isoAsp-containing proteins in RNAi lines of *OsPIMT1* inhibition. At the same time, embryo proteins of 5-day-aging seeds were separated using two-dimensional electrophoresis to analyze the effect of overaccumulation of isoAsp-containing proteins in RNAi materials during aging. The proteins related to seed aging were identified, including the oxidative stress-related proteins, enzymes of glycolysis, and heat shock proteins. Geneontology and KEGG analysis were performed to enrich biological process and pathway of differential proteins. These results laid the foundation for further study of the role of *OsPIMT1* in the metabolic pathways of cells after seed aging.

rice, protein *L*-isoaspartyl methyltransferase (PIMT), two-dimensional electrophoresis, seed vigor, different expression

doi: 10.1360/TB-2019-0239