科学通报 2011 年 第 56 卷 第 18 期：1440 ~ 1447
论 文 www.scichina.com csb.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE CHINA PRESS

转烟酰胺合酶基因甘蓝型油菜盐碱胁迫下叶片蛋白质差异的研究

孔芳[①②], 毛善婧[①], 杜坤[①], 吴冕[①], 周晓燕[①], 储成才[③], 王幼平[①*]

① 扬州大学生物科学与技术学院, 扬州 225009;
② 安徽工程大学生物与化学工程学院, 芜湖 241000;
③ 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101
* 联系人, E-mail: wangyp@yzu.edu.cn

2011-03-30 收稿, 2011-05-16 接受
江苏高校优势学科建设工程项目、科技部国际合作项目(2021)、国家转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX08004-002B)和安徽工程大学引进人才科研启动基金(2010YQQOO7)资助

摘要 盐胁迫是危害农作物的主要非生物胁迫之一. 为了能从蛋白质水平揭示盐胁迫下油菜耐盐的分子遗传机制, 采用 IEF/SDS-PAGE 双向凝胶电泳技术对转 *OsNAS1* 基因的甘蓝型油菜在碱性盐胁迫下(20 mmol/L Na_2CO_3)的幼叶蛋白进行了分离. 通过银染显色, 获得了分辨率和重复性较好的双向电泳图谱, PDQuest 软件在分子量 20~75 kD, 等电点 4~7 范围内, 发现表达量变化 2 倍以上的点有 12 个. 对这 12 个蛋白质点采用 MALDI-TOF-MS 进行肽质谱指纹图分析, 有 11 个蛋白点得到了可靠的鉴定, 其中有 5 个差异蛋白可能与耐盐性有关, 分别是二氢硫辛酸脱氢酶、谷胱甘肽-S-转移酶、过氧化物酶、20S 蛋白酶体β亚基以及核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/氧化酶, 它们参与了物质能量代谢、蛋白质降解以及细胞防卫等过程, 推测转 *OsNAS1* 基因的甘蓝型油菜的耐盐性可能与这些生理生化代谢有关. 研究结果为揭示转基因油菜耐盐机理提供了理论依据.

关键词
甘蓝型油菜
烟酰胺合酶基因
盐胁迫
差异蛋白质

油菜是重要的油料作物, 是国产食用植物油的第一大来源, 目前我国食用油脂的缺口很大, 自给率只有 40%左右[1]. 扩大油菜种植面积、提高油菜产量已成为我国油菜生产的当务之急. 但是土壤盐碱化日趋严重, 联合国粮农组织的调查结果显示, 全球 6%的陆地面积遭受着土壤盐渍化的侵蚀, 20%的灌溉农业受到不同程度的盐害威胁, 造成农作物的大幅度减产, 如何有效地对盐碱地进行合理利用已成为众多国家所密切关注的热点问题[2]. 研究表明, 很多逆境耐受功能基因的鉴定都是依据它们在胁迫条件下的表达变化结合基因的性质来完成的, 如渗透调节剂合成关键酶基因、离子转运载体和抗氧化酶基因以及一些调控基因表达的转录因子等[3]. 在盐胁迫条件下, 植物可通过对离子的选择性吸收、外排和区域化从而建立一种维持细胞内生理代谢所要求的离子稳态. 烟酰胺合酶基因(nicotianamine synthase, *NAS*), 即盐胁迫诱导表达的基因, 已证实在植物铁离子吸收中具有重要作用. 它催化合成的产物烟酰胺(NA), 不仅是植物铁载体的合成前体, 而且参与植物体内铁离子的转运、分配和贮存的活动, 由于它对其他一些重金属离子也能起到转运的功效, 因而显示出较强的金属耐受作用, 表现出一定的植物修复功能[4]. 目前在许多植物体中已克隆出 *NAS* 基因, 如大麦、小麦、燕麦、水稻、玉米、番茄和拟南芥等[5~8].

近年来, 人们利用蛋白质组学技术分析了水稻、小麦、玉米、大豆和葡萄等作物中的蛋白质在盐胁迫条

英文版见: Kong F, Mao S J, Du K, et al. Comparative proteomics analysis of *OsNAS1* transgenic *Brassica napus* under salt stress. Chinese Sci Bull, 2011, 56, doi: 10.1007/s11434-011-4585-x

件下的变化规律, 发现了一些参与光合作用、呼吸作用、蛋白质代谢、信号转导等过程的蛋白质在响应盐胁迫过程中的表达特征, 为进一步分析作物耐盐机制提供了新的信息[9]. 本文采用农杆菌介导油菜下胚轴转化方法, 将巴西旱稻(*Oryza sativa* cv. IAPAR 9)根中克隆的 *OsNAS1* 基因导入甘蓝型油菜中, 对阳性植株进行筛选, 并从蛋白质组学方面研究转基因植株 T_2 代对盐碱胁迫的响应.

1 材料与方法

(ⅰ) 外植体准备. 甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)品种为"扬油 6 号", 由江苏里下河地区农科所提供. 甘蓝型油菜种子进行表面消毒, 将种子置于 70%的乙醇中 30~60 s, 接着用 2%的次氯酸钠处理 15 min, 最后用无菌水冲洗 3 次, 滤纸吸干后置于 MS 固体培养基上, 并在 24 h 光照条件下(16 h/8 h, 光照/黑暗, 1300 lx)培养, 4~7 d 后取幼嫩的下胚轴, 并切成 1 cm 左右的外植体, 置于预培养基(B_0)(表 1)光照(24 h, 1300 lx)培养 3 d.

(ⅱ) 质粒和菌株. 大肠杆菌菌株: DH5α, 质粒载体如图 1. 农杆菌菌株为 LBA4404.

(ⅲ) 农杆菌介导的遗传转化. 挑取带有 *OsNAS1* 基因的农杆菌单菌落于 2 mL LB 液体培养基中, 振荡(28℃)培养 16 h 后, 再转入 25 mL LB 培养基中扩大培养 4~5 h. 待农杆菌菌液培养至 $A_{600\ nm}$ 达 0.6 停止培养, 离心后用液体 MS 重悬菌体备用以侵染下胚轴外植体. 将培养 3 d 的外植体从预培养基(B_0)中挑取出来, 加入准备好的菌体 MS 重悬液中, 共培养 20~30 min, 侵染后弃去菌体重悬液, 并用灭菌滤纸吸干外植体上残留的菌液后, 夹取浸染后的下胚轴置于培养基(B_1)中 28℃条件下共培养 3 d(不见光). 之后转移到分化筛选培养基(B_2)进行培养, 并且每 2 周继代 1 次. 待愈伤组织生长出幼苗后, 将其移入生根培养基(B_3)上生长, 待其长出根后, 再移入培养基(1/2 MS)中壮苗(表 1). 本实验中主要以 MS 为基础培养基, 不同生长阶段的组织培养基的配方见表 1.

表 1 用于油菜转化的培养基成分

培养基类型	培养基成分
预培养基(B_0)	MS + 1.0 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/L 6-BA, pH 5.8
共培养培养基(B_1)	MS + 0.1 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/L 6-BA + 5.0 mg/L $AgNO_3$, pH 5.8
分化筛选培养基(B_2)	MS + 0.1 mg/L 2,4-D + 1.0 mg/L 6-BA + 5.0 mg/L $AgNO_3$ + 10 mg/L Kan + 500 mg/L Cef, pH 5.8
生根培养基(B_3)	MS + 0.3 mg/L NAA + 10 mg/L Kan + 500 mg/L Cef, pH 5.8
壮苗培养基	1/2 MS, pH 5.8

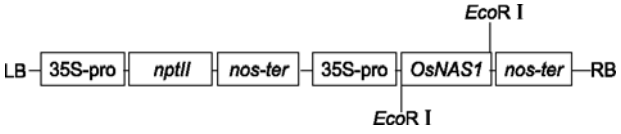

图 1 目的基因 *OsNAS1* 载体示意图

LB, 左边界; RB, 右边界; *npt II*, 卡那霉素抗性基因; nos-ter, nos 终止子; *OsNAS1*, 烟酰胺合酶基因; 35S-pro, 35S 启动子

(ⅳ) 阳性转化植株(T_0)和 T_1 代的获得及分子鉴定. 采用 CTAB 法[10]提取再生苗叶片基因组 DNA, 并进行 PCR 鉴定. 根据载体中目的基因片段设计引物(由上海生工合成): 5′-CAGGAAGTGATGGAGCATCAG-3′; 5′-TCGTGCACCATCAGCACGTTA-3′. 程序为 94℃预变性 5 min, 94℃变性 30 s, 55℃复性 30 s, 72℃延伸 1 min, 共 30 个循环. 反应后分别取 5 μL 扩增产物在 1.0%琼脂糖凝胶中进行电泳检测, 预期 PCR 产物为 750 bp, 从而确定转基因阳性植株. 将阳性苗移入温室中, 定期施肥, 春化处理后, 植株于 4~5 月间相继开花, 经套袋自交后结实. 随机选取部分阳性苗自交结实的油菜种子(T_1 代), 于当年 10 月中旬继续播入土壤, 待其萌发生长为较大植株后, 剪取部分叶片采用 CTAB 法提取 DNA, 并进行 PCR 鉴定, 鉴定为阳性的自交结实.

取 2.5 μg(5 株为阳性植株, 1 株为阴性对照)基因组 DNA 进行 Southern 杂交. 基因组 DNA 用 *Bam*H Ⅰ完全消化, 酶切的 DNA 在 1.0%琼脂糖凝胶上电泳, 再转到尼龙膜上, 用地高辛标记 *OsNAS1* 基因, 进行杂交, 具体方法见文献[11].

(ⅴ) 转基因 T_1 代种子在盐胁迫条件下生长状况和生理指标的测定. 选取转基因植株(带 1 个拷贝)T_1 代的株系和"扬油 6 号"(对照)的种子, 经消毒处理后, 10 粒种子一组, 置于不同浓度(0, 10, 20, 30 mmol/L)的 Na_2CO_3 湿润的滤纸上, 观察其萌发出苗的情况, 并在 Na_2CO_3 处理 5 d 后进行生物量(鲜重)、过氧化氢酶(CAT)和过氧化物酶(POD)活性的测定. 同时根部用 TTC 方法进行根系活力的测定, 测定方法参见文献[12]. 实验重复 3 次.

(ⅵ) 叶片蛋白双向电泳及质谱分析. 对上述阳性 T_1 代种子和受体未转基因的种子在相同条件下生

长至 28 d 后, 在 20 mmol/L Na_2CO_3 盐胁迫条件下生长 9 d, 取其幼叶用无菌水冲洗并用滤纸吸干水分, 油菜叶片总蛋白的提取、含量测定以及双向电泳的方法参见我们实验室使用的方法[13]. 每个样品的电泳重复 3 次. 质谱分析及蛋白的鉴定利用 MASCOT 软件在网站(http://www.matrixscience.com)蛋白质数据库 MSDB, NCBinr 和 Swissport 中进行搜索.

2 结果

2.1 转化体(T_0 代)的获得和分子鉴定

油菜下胚轴外植体与农杆菌共培养 4 d 后, 移至筛选培养基上进行选择培养(图 2(a)), 每隔 2~3 周继代一次, 下胚轴细胞分裂旺盛, 切口末端易产生膨大突起, 陆续长出大小不一的愈伤组织, 有些还出现墨绿的芽体, 约 40~50 d 后愈伤组织分化出不定芽(图 2(b)). 有些不定芽为白色, 或初期为紫色随后逐渐转变为白色, 最终死亡; 有些不定芽为绿色, 可进一步伸长成苗. 将再生苗切下, 移入生根培养基上诱导生根, 在其生根后继续在 1/2 MS 培养基上进行壮苗(图 2(c)), 使根系更为发达, 同时也剔除一些因玻璃化但无法转为正常幼苗的植株. 对再生植株进行 *OsNAS1* 目的基因的检测, 未转化植株叶片 DNA 为阴性对照, 含有上述基因的质粒 DNA 为阳性对照. 结果表明, 转 *OsNAS1* 基因的植株, 均能扩增出 750 bp 大小的片段, 而阴性对照没有此条带(图略). 经 PCR 检测共获得阳性植株 50 棵, 并栽入土壤中, 开花后自交结实. 为了检测外源基因在油菜基因组中的整合情况, 选取经 PCR 鉴定为阳性苗, 用阴性苗作对照, 分别提取其 DNA, 经酶切后用 *OsNAS1* 基因作探针, 杂交结果如图 3 所示, 不同来源的植株表现出 *OsNAS1* 基因在油菜基因组中有不同的插入位点和不同的拷贝数.

2.2 T_1 代种子的获得和在盐胁迫条件下种子生理及萌发状态的观察

选取经 Southern 杂交证明为 1 个拷贝的阳性苗



图 2 农杆菌介导油菜下胚轴为外植体的转化过程

(a) 农杆菌侵染的下胚轴; (b) 愈伤组织的形成和出芽; (c) 幼苗生根; (d) 阳性苗的移栽

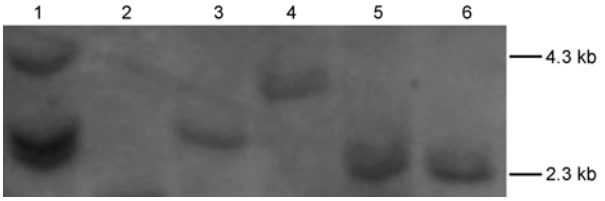

图 3　转 *OsNAS1* 基因再生植株的 Southern 杂交鉴定
1, 3~6, 部分转基因阳性植株; 2, 非转基因植株

自交结实的油菜种子, 种入温室花盆中, 待其萌发生长后, 剪取叶片采用CTAB法提取DNA, 并进行PCR鉴定, 鉴定为阳性的植株自交结实, 获得 T_1 代种子, 阴性的去除. 随机选取上述转基因植株 T_1 代不同株系的种子和“扬油 6 号”对照的种子, 经消毒处理后, 置于不同浓度(0, 10, 20, 30 mmol/L)的 Na_2CO_3 湿润的滤纸上, 5 d 后观察其萌发出苗的情况. 在 10 mmol/L Na_2CO_3 浓度下, 转基因后代种子和对照相比, 具有较好的生长势, 一旦种子露白萌发生长迅速, 子叶很快就变绿; 而对照组生长明显滞后, 子叶伸出后迟迟未从黄色变为绿色, 且无须根的生成. 在 20 mmol/L Na_2CO_3 浓度下非转基因的种子生长明显受阻, 而阳性植株的种子可以正常生长, 但也有部分出现黄化现象. 在 30 mmol/L Na_2CO_3 浓度下非转基因种子基本上不能萌发, 转基因种子可以萌发, 但生长受阻. 从生物量的累积来看, 转基因种子和非转基因种子随着 Na_2CO_3 浓度的上升, 其鲜重呈下降的趋势, 但转基因种子较非转基因种子的鲜重要大(图 4(a)).

对上述处理材料进行 CAT, POD 酶活性和根系活力的测定, 转基因 T_1 代植株的 CAT 酶和 POD 酶的活性随着 Na_2CO_3 浓度的上升均呈上升趋势, 均高于对照“扬油 6 号”. 在 20 mmol/L Na_2CO_3 条件下酶的活性达到最高(图 4(b)和(c)). 根系活力随着 Na_2CO 浓度的上升表现出下降的趋势, 但转基因材料根系活力要大于非转基因材料(图 4(d)).

2.3　转 *OsNAS1* 基因 T_2 代油菜叶片蛋白质差异的研究

根据上述不同浓度 Na_2CO_3 分析结果, 选用转基因油菜 T_1 代和对照组的种子在盆栽条件下生长 28 d 后, 用 20 mmol/L Na_2CO_3 进行盐胁迫处理 9 d, 进行叶片全蛋白质组双向电泳分析, 在相同条件下进行 3 次重复

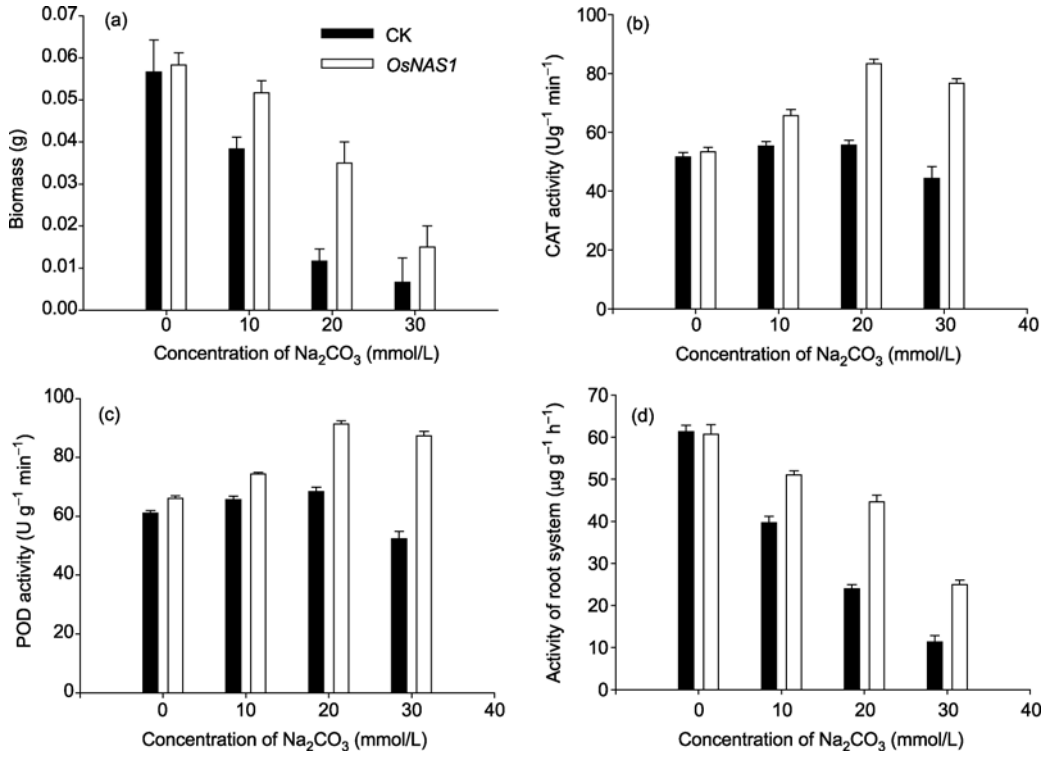

图 4　不同浓度 Na_2CO_3 处理转 *OsNAS1* 和非转基因油菜种子生理指标的变化
(a) 生物量; (b) 过氧化氢酶; (c) 过氧化物酶; (d) 根系活力

电泳, 得到蛋白斑点清晰的 2-DE 图谱, PD-Quest 软件分析发现, 总体蛋白的分布模式很相似, 在等电点 pH 4~7 之间和分子质量在 20.1~97.4 kD 范围内, 转基因株系和对照"扬油 6 号"的 2-DE 图谱上平均检测到 254 和 239 个蛋白质点. 选取质量较好、重复性高、表达量变化超过 2 倍以上的蛋白点 12 个做 MALDI-TOF-MS 分析, 如图 5 所示, 其中转基因油菜 T_2 代有 11 个蛋白出现明显的上调(U1~U5, U7~U12), 有 1 个蛋白(spot N6)是新表达的蛋白. 将 12 个差异显著的点使用 Matrix Science 网站的应用程序 Mascot (http://www.expasy.org/tools)软件搜索 NCBInr 数据库的 Green Plants, 将肽质量指纹谱数据与蛋白质数据库匹配, 如果 P<0.05, 则认为得到阳性鉴定, 否则视为未得到鉴定, 结果获得 11 个差异蛋白点(表 2).

3 讨论

烟酰胺合酶基因(*NAS*)被证实在高等植物的缺铁胁迫应答反应中起着关键作用[14,15]. 水稻中的 *OsNAS1* 基因是一种与铁代谢相关的盐碱胁迫诱导基因, 有 3 种表达模式, *OsNAS1* 基因是其中一种. 本研究将其导入油菜并获得卡那霉素抗性植株, 从 T_2 代植株中发现带有 *OsNAS1* 基因的植株在 20 mmol/L Na_2CO_3 条件下生长比非转基因植株好. 利用蛋白质组学技术研究盐碱胁迫下转 *OsNAS1* 基因植株叶片全蛋白, 旨在找到与耐盐碱胁迫相关的蛋白, 为更进一步了解 *OsNAS1* 基因转入油菜对植株体内发生的耐盐碱机理提供依据. 比较转基因植株和对照的蛋白图谱时发现, 转 *OsNAS1* 基因植株中的物质能量代谢、耐盐蛋白、解毒酶类、过氧化物酶类以及蛋白质降解类相关蛋白受到不同程度诱导上调表达, 可能是导致甘蓝型油菜导入 *OsNAS1* 基因从而提高其耐盐碱性增强的原因.

Spot U8 鉴定为核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/氧化酶(Rubisco), 这个蛋白在转基因 T_2 代植株经盐胁迫后表达量相对于对照上调. 研究表明, 核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/氧化酶参与植物耐热、盐胁迫、光呼吸、生长、糖代谢等多种生理反应[16]. Shen 等人[17]在水稻叶鞘蛋白的双向电泳分析中报道机械损伤后的 48 h 内, Rubisco 小亚基的表达量比损伤前呈上升趋势. Le 等人[18]对油菜用机械模拟害虫取食后, 油菜的同一植株同一叶片 Rubisco 小亚基前体的浓度比损伤前明显增加, 说明它在油菜的损伤抗逆生理过程中可能

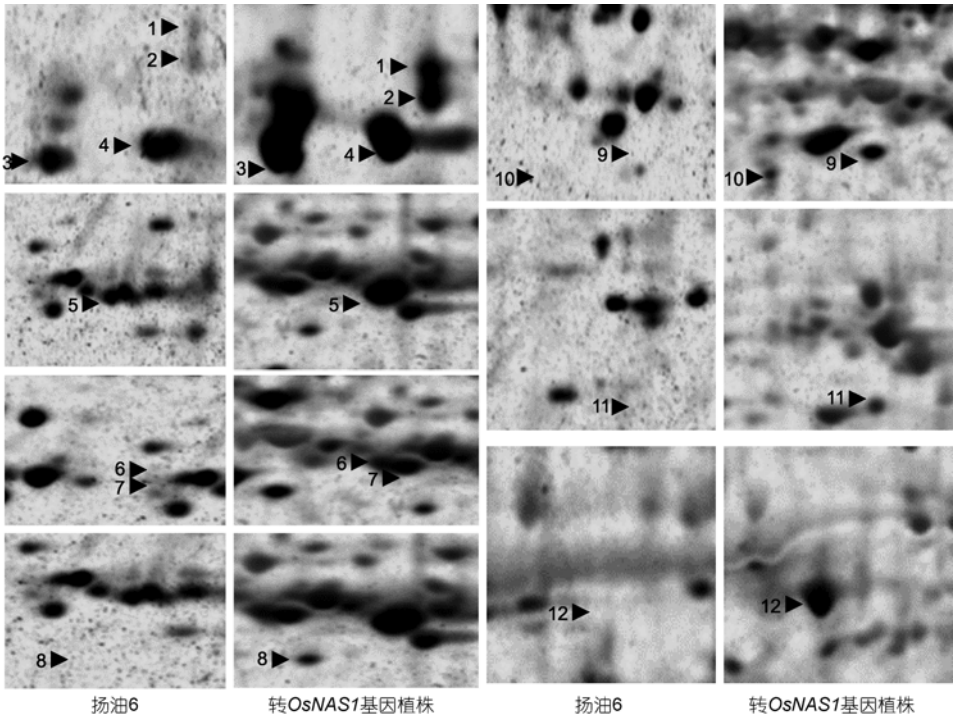

图 5 转 *OsNAS1* 基因 T_2 代植株与扬油 6 号(对照)经盐胁迫处理后蛋白点差异放大图

1~12, 与非转基因植株(对照)相比, 转 *OsNAS1* 基因植株在盐胁迫条件下上调 2 倍以上蛋白质点

表 2 转 *OsNAS1* 基因 T_2 代中差异表达蛋白 PMF 数据库检索的鉴定结果 a)

蛋白点	蛋白名称(物种来源)	理论分子量 (kD)	理论等电点 (pH)	序列覆盖度 (%)	NCBI 检索号
U2	假定的蛋白 F8D20.220(*Arabidopsis thaliana*)	31.7	9.02	22	gi|77270522
U3	推测的反转录转座子蛋白 Ty3-gypsy 亚类(*Oryza sativa*)	269.2	8.54	10	gi|77556423
U4	假定的蛋白(*Oryza sativa*)	28.2	11.07	25	gi|77553162
U5	谷胱甘肽-S-转移酶(*Brassica napus*)	24.8	5.85	40	gi|87294807
N6	假定的二氢硫辛酰胺脱氢酶(*Oryza sativa*, *japonica* cultivar-group)	50.9	7.01	17	gi|50932201
U7	过氧化物酶(*Nicotiana tabacum*)	39.0	5.99	7	gi|14031049
U8	1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/氧化酶(*Brassica rapa*)	20.4	8.23	30	gi|17852
U9	20S 蛋白酶体β亚基(*Arabidopsis thaliana*)	63.3	5.93	29	gi|21617882
U10	ATP 合酶β亚基(chloroplast *Brassica napus*)	44.1	8.54	52	gi|8745523
U11	OSJNBa0029L02 (*Oryza sativa*)	20.7	9.77	51	gi|39546227
U12	肽基脯氨基酰异构酶(EC 5.2.1.8) ROC4 (*Arabidopsis thaliana*)	28.5	8.83	33	gi|20259872

a) 鉴定的蛋白包括谷胱甘肽-S-转移酶(glutathione *S*-transferase, GST, spot U5)、假定的二氢硫辛酰胺脱氢酶(dihydrolipoamide dehydrogenase, spot N6)、过氧化物酶(peroxidase, spot U7)、1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/氧化酶(ribulose bisphosphate carboxylase/oxygenase, spotU8)、20S 蛋白酶体β亚基(20S proteasome beta subunit, spotU9)、ATP 合酶β亚基(ATP synthase β-subunit, spotU10)、肽基脯氨基酰异构酶(peptidylprolyl isomerase, spotU12)和 4 个假定未知功能蛋白(spotU2, U3, U4, U11). 其中二氢硫辛酰胺脱氢酶是新发现的盐胁迫应答蛋白

也具有重要作用. 本研究结果也进一步从蛋白质水平上证明了植物在受到盐碱胁迫条件下 Rubisco 的表现上调.

Spot U9 被鉴定为 20S 蛋白酶体β亚基. 20S 蛋白酶体主要负责细胞内依赖于泛素的蛋白质降解途径[19]. 在细胞内依赖于 ATP 的 20S 蛋白酶体通过泛素-蛋白酶体途径快速地、选择性地降解结构异常的蛋白质, 阻止无功能的、具有潜在毒性的蛋白质聚集, 这个过程对于细胞抵抗逆境具有特殊防御作用[20]. 盐碱胁迫下蛋白酶体亚基表达量上调, 表明其在盐碱胁迫反应中的重要作用, 推测蛋白酶水解作用在防止细胞免受胁迫的伤害方面可能是一个自身监督系统, 它在逆境下对维持细胞的生存能力是不可缺少的.

Spot U5 为谷胱甘肽-S-转移酶(Glutathione S-transferase, GST), 属解毒酶类. 还鉴定出 Spot U7 为过氧化物酶(Peroxidase, POD), 也与细胞防卫相关, 这 2 个蛋白都诱导上调. Yan 等人[21]研究发现水稻经盐胁迫后根、叶片中 POD, APX, CAT 表达量上调. Roxas[22]发现用转基因烟草过量表达 GST 一定条件下可以防止氧化损伤, 提高幼苗在盐胁迫条件下生长. Gupta 等人[23]研究发现, 在烟草中对 POD 进行过量表达能保护叶片和叶芽免受氧化胁迫的伤害. Lagrimini 等人[24]对转基因烟草的研究发现, 对烟草中 POD 进行反向抑制的植株表现为早花和花芽萎蔫. 游向荣[25]利用蛋白质组学研究发现, 龙眼成花逆转花芽中 POD 下调表达, 自由基产生和清除失去平衡, 使活性氧累积, 花芽细胞受到氧化损伤, 使正常成花受到抑制, 并加速了逆转花芽的衰老脱落. 本研究通过蛋白质组学和生理指标的测定都发现在盐碱胁迫条件下, 转 *OsNAS1* 基因植株中 POD 酶活性上调, 这也进一步证明通过 POD 酶活性上调能够保证细胞内活性氧维持在较低水平, 避免 ROS 的毒害作用, 从而可以保持良好的耐盐机能.

Spot U10 鉴定为 ATP 合酶β亚基, ATP 合酶广泛分布于线粒体内膜和叶绿体类囊体膜上, 参与氧化磷酸化与光合磷酸化反应, 在跨膜质子动力势的推动下合成 ATP, 是高等植物能量代谢的关键酶之一[26]. 张欣欣等人[27]从水稻根 cDNA 文库中筛选出与碳酸盐逆境相关的基因——水稻线粒体 ATP 合成酶 6 kD 亚基基因, 并证明该基因与碳酸盐逆境有关. 研究表明, 某些盐生植物能将渗入胞内的无机离子大量转运到液泡中, 从而降低细胞渗透势, 避免了浓度过高的无机离子对细胞质中各种代谢过程的干扰. 而非盐生植物则不具备这些特性[28]. 本研究中, 随着盐胁迫处理的诱导, 转基因 T_2 代中 ATP 合酶β亚基的表达量明显上调, 推测这个点可能参与了盐胁迫下根部的离子转运, 降低细胞渗透势, 从而提高材料的耐盐性.

Spot N6 被鉴定为二氢硫辛酸脱氢酶(dihydrolipoyl dehydrogenase, DLDH), 是转基因植株在盐碱胁迫后新表达的差异蛋白. 二氢硫辛酸脱氢酶属黄素蛋白氧化还原酶家族, 也是"丙酮酸脱氢酶系"多酶复合体中不可缺少的组成部分. 在盐碱胁迫下, 植物体基础代谢有关酶的活性必定受到影响, 为维持胁迫条件下的体内稳态, 植物需要产生一定的防御机制, 如离子转运、氧自由基的清除、渗透势的生成等. 这些过程都需要植物体自身提供额外的能量, 二氢硫辛酸脱氢酶是整个能量代谢途径中的基础酶类. 本实验在盐碱胁迫处理后, 该点呈现明显的上调趋势, 推断可能是由于转基因材料受到盐碱胁迫处理, 为维持体内稳态而产生额外的能量, 二氢硫辛酸脱氢酶的上调表达可促进这种能量代谢.

Spot U12 被鉴定为肽基脯氨异构酶(peptidyl-prolylisomerases, PPIase), 脯氨酸为亚氨基酸, 多肽链中肽酰-脯氨酸间形成的肽键有顺反 2 种异构体, 空间构象不同, 旋转异构是蛋白质折叠反应的限速步骤之一, 在体内被 PPIase 所催化, PPIase 催化加速肽基脯氨酸的顺反异构化, 在蛋白质的折叠/解折叠中起重要作用, 它也可能参与蛋白质复合物的组装/解组装、蛋白质运输及调节蛋白质活性[29]. 本研究中转基因 T_2 代的 PPIase 受盐胁迫后上调表达, 有可能是植物在盐碱胁迫下启动的特有蛋白, 并参与了胁迫下叶片中异常蛋白的降解及蛋白质折叠的起始过程, 使靶蛋白肽基脯氨酰发生顺/反或反/顺构型的正常转变, 有可能对形成具有生物功能活性的空间结构起着一定作用.

通过质谱鉴定还检测到 4 个盐碱胁迫后表达上调的未知功能蛋白, 由于对未知蛋白的信息了解有限, 它们在盐碱胁迫中的表达变化与植物化学防御机制的关系还需要进行深入研究. 总之, 本研究中检测到的这些差异蛋白在盐碱胁迫过程中可能起重要作用, 今后将结合串联质谱技术、Edman 降解测序技术以鉴定出更多蛋白, 进一步明确这些蛋白在转基因植株在非生物因子胁迫中的作用.

参考文献

1 王汉中. 我国油菜产业发展的回顾与展望. 中国油料作物学报, 2010, 32: 300–302
2 李永智, 单风翔. 土壤盐渍化危害及治理途径浅析. 西部探矿工程, 2008, 8: 85–88
3 郝东风, 兰海燕, 陈邦党, 等. 新疆盐生植物耐盐基因 *NHX* 转化甘蓝型油菜及其耐盐性的初步研究. 生物技术通报, 2006, 3: 81–84
4 Wiren N V, Klair S, Bansal S, et al. Nicotianamine chelates both Fe III and Fe II. Implications for metal transport in plant. Plant Physiol, 1999, 119: 1107–1114
5 Suzuki K, Higuchi K, Nakanishi H, et al. Cloning of nicotianamine synthase in response to Fe nutrition status in Gramineae. Plant Soil, 1996, 178: 171–177
6 Herik A, Koch G, Mock H P, et al. Isolation, characterization and cDNA cloning of nicotianamine synthase from barley, a key enzyme for iron homeostasis in plants. Euro J Biochem, 1999, 265: 231–239
7 Ling H Q, Koch G, Baumlein H. Map based cloning of chleronerva a gene involved in iron uptake of higher plants encoding nicotianamine synthases. Proc Natl Acad Sci USA, 1999, 96: 7098–7103
8 Higuchi K, Tani K, Nakanishi H, et al. The expression of a barley HvNASl nicotianamine synthase gene promotor-gus fusion gene in transgenic tobacco is induced by Fe-deficiency in root. Biosci Biotech Biochem, 2001, 65: 1696–1697
9 石永丽, 贾媛, 戴绍军. 作物盐胁迫响应蛋白质组学研究. 哈尔滨师范大学自然科学学报, 2009, 25: 101–104
10 Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight DNA. Nucleic Acids Res, 1980, 8: 4321–4325
11 Wang Y P, Sonntag K, Rudloff E, et al. Production of fertile transgenic *Brassica napus* by *Agrobacterium*-mediated transformation of protoplasts. Plant Breed, 2005, 124: 1–4
12 汤章城. 现代植物生理学实验指南. 北京: 科学出版社, 1999
13 Kong F, Ge C L, Fang X P, et al. Characterization of seedling proteomes and development of markers to distinguish the *Brassica* A and C genomes. J Genet Genom, 2010, 37: 333–340
14 Becker R, Fritz E, Manteuffel R. Subcellular localization and characterization of excessive iron in the nicotianamine-less tomato mutant chloronerva. Plant Physiol, 1995, 108: 269–275
15 Pich A, Manteuffel R, Hillmer S, et al. Fe homeostasis in plant cells: Does nicotianamine play multiple roles in the regulation of cytoplasmic Fe concentration? Planta, 2001, 213: 967–976
16 董晓丽, 周集体, 杜翠红, 等. Rubisco 的分子生物学研究. 高技术通讯, 2001, 12: 95–97

17 Shen S, Jing Y, Kuang T. Proteomics approach to identify wound-response related proteins from rice leaf sheath. Proteomics, 2003, 3: 527–535
18 乐寅婷, 李梅, 陈倩, 等. 油菜叶片蛋白质组对机械损伤应答的初步分析. 植物生态学报, 2008, 32: 220–225
19 Smalle J, Vierstra R D. The ubiquitin 26S proteasome proteolytic pathway. Annu Rev Plant Biol, 2004, 55: 55–60
20 Goldgerg A L. Protein degradation and protection against misfolded or damaged proteins. Nature, 2003, 426: 895–899
21 Yan S P, Tang Z C, Su W A, et al. Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root. Proteomics, 2005, 5: 235–244
22 Roxas V P. Overexpression of glutathione S-transferase/glutathione peroxidase enhances the growth of transgenic tobacco seedlings during stress. Nat Biotechnol, 1997, 15: 988–991
23 Gupta A S, Webb R P, Holaday A S, et al. Overexpression of superoxide dismutase protects plants from oxidative stress (induction of ascorbate peroxidase in superoxide dismutase-overexpressing plants). Plant Physiol, 2002, 103: 1067–1073
24 Lagrimini L M, Bradford S, Rothstein S. Peroxidase-induced wilting in transgenic tobacco plants. Plant Cell, 1990, 2: 7–18
25 游向荣. 龙眼成花转变与成花逆转的差异蛋白质组学研究. 博士学位论文. 福州: 福建农林大学, 2009
26 Paul D. The ATP synthase——A splendid molecular machine. Annu Rev Biochem, 2003, 66: 717–749
27 张欣欣, 柳参奎. 水稻线粒体 ATP 合成酶小亚基基因的鉴定及解析. 分子植物育种, 2003, 1: 605–612
28 Hu Y, Fricke W, Schmidhalter U. Salinity and the growth of non-halophytic grass leaves: The role of mineral nutrient distribution. Funct Plant Biol, 2005, 32: 973–985
29 Lu K P, Liou Y C, Zhou X Z. Pinning down the proline-directed phosphorylation signaling. Trends Cell Bio1, 2002, 12: 164–172