

研究报告 Original Papers

暗光环境对木薯叶片蛋白质组的影响

吕亚^{1,2}, 安飞飞¹, 李开绵¹, 陈松笔^{1,*}¹中国热带农业科学院热带作物品种资源研究所/农业部木薯种质资源保护与利用重点实验室, 海南儋州571737; ²云南省热带作物科学研究所, 云南景洪666100

摘要: 以木薯(*Manihot esculenta*)栽培种‘华南5号’(SC5)为研究材料, 利用双层黑塑料袋造成暗光环境, 木薯在暗光环境分别生长0、1、3、9 d和暗光环境9 d后见光4 h, 采用蛋白质组学方法, 揭示与光合作用相关的蛋白质表达水平变化。结果表明: 随着暗光环境处理天数的增加, 叶绿素总含量整体呈下降趋势; 以0 d暗光环境处理的木薯叶片蛋白质图谱为对照, 通过其他暗光环境处理共得到45个平均差异表达量为对照 ± 2.0 倍以上的蛋白质, 它们的生物学功能涉及光合作用、碳和能量代谢、结构、解毒、抗氧化等。而ATP合酶、核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(RuBisCO)活化酶、RuBisCO大亚基、磷酸核酮糖激酶前体、光系统I亚基及RuBisCO小亚基前体随着暗光环境处理天数延长而下调, 显示这些蛋白质的表达水平与光合作用强弱密切相关。

关键词: 木薯; 叶片; 暗光环境; 叶绿素含量; 蛋白质组

木薯(*Manihot esculenta*)为大戟科木薯属植物, 起源于热带美洲, 已有4 000多年栽培历史, 16~18世纪传入亚洲和大洋洲地区(Hillocks等2002; Onwueme 2002)。木薯和马铃薯(*Solanum tuberosum*)、甘薯(*Ipomoea batatas*)并称世界三大薯类作物, 在非洲、美洲和亚洲广泛种植。木薯块根淀粉含量高, 为20%~40%, 不仅是全球近8亿人的主要口粮(El-Sharkawy 2004; 姚庆荣等2007), 也是淀粉和酒精加工业的重要原料, 被认为是一种新型的可再生能源作物, 对全球能源利用及环境保护起着重要作用(黄洁2007)。木薯光合作用过程较复杂, 目前国内外对木薯光合作用的研究主要集中在各种光合生理指标的分析方面, 对于木薯高光效的蛋白质调控机理研究方面报导较少(左应梅2010)。光照是植物生长发育的必要条件, 是光合作用的主导因子和能量来源, 也是影响光合碳循环调节及叶片气孔导度的重要因素, 是形成叶绿素的重要条件(贺庭琪2013), 因此, 光照不足会导致植物叶片同化力的短缺, 限制光合碳同化, 影响光合作用的关键酶活性, 从而限制光合作用速度。另一方面, 光照强度过大会抑制光合作用, 导致叶片光合结构破坏; 而叶绿素是绿色植物进行光合作用的主要色素, 叶绿素含量同光合作用关系密切, 其含量在一定程度上反映植物同化物质的能力。叶绿素合成受环境等多种因素的影响, 光照强度是影响叶绿素合成的主要因子。一般认为, 高叶绿素含量有利于植物的光合作用, 对于基

粒数及基粒片层数目增加有相当大的作用(Anderson 1973)。光合作用关键酶包括核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶/加氧酶(ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, RuBisCO)、放氧复合体(oxygen evolving complex, OEC)和D1等, D1蛋白是光系统II (photosystem II, PSII)反应中心复合物中一个非常重要的蛋白质亚基, 在PSII反应中心中扮演着十分重要的角色, 是近年来光合作用研究的热点领域之一; 温度会诱导其构象发生变化, 从而抑制PSII的电子传递(安飞飞等2013)。OEC是植物叶绿体PSII的一个复合体, 位于类囊体膜的腔内侧, 是叶绿体光反应过程中氧化水分子释放出氧气所不可缺少的酶类, 在PSII供体侧光抑制区调节反应中心结合蛋白质D1交联产物的形成(Chen等2009)。目前, 关于木薯叶片在暗光环境处理后与光合作用和能量代谢相关的全蛋白质表达水平变化规律尚属空白, 有待进一步深入研究。叶片经暗光环境处理后, 参与和调节光合作用及能量代谢的蛋白质群有哪些, 以及这些蛋白质群的表达水平有什么变化规律? 本研究以木薯栽培种‘华南5号’为研究材料, 利用比较蛋白质组学技术探索经暗光

收稿 2017-04-06 修定 2017-05-04

资助 国家自然科学基金委员会与国际农业磋商组织(NSFC-CGIAR)国际合作重点项目(31361140366)、2012年海南省高层次创新创业人才启动基金(HLCT-HN2012-2)和“十二五”农村领域国家科技计划课题(2015BAD15B01)。

* 通讯作者(E-mail: songbichen@catas.cn)。

环境处理后的木薯叶片蛋白质组的变化规律,以期寻找与木薯高光效调控相关的关键因子,为木薯分子育种和品种改良提供理论参考依据。

材料与方法

1 试验材料

试验于2014年8月在农业部木薯种质资源保存与利用重点实验室和国家木薯种质资源圃进行。利用双层黑塑料袋造成暗光环境,木薯(*Manihot esculenta* Crantz)栽培种‘华南5号’(SC5)在暗光环境下生长0、1、3、9 d和暗光环境9 d后见光4 h,以木薯SC5在暗光环境下生长0 d为对照,每个处理3个重复,选取种植3个月后的盆栽木薯开展试验。

2 叶绿素含量的测定

参照孔祥生(2008) 95%乙醇直接提取法,称取木薯叶片0.1 g,剪碎,加10 mL 95%乙醇,提取至叶片无绿色为止;而后吸取叶绿素提取液入比色杯中,以95%乙醇为空白对照,在663和645 nm波长处测定吸光度值。

3 木薯叶片全蛋白质的提取、分离及差异蛋白质的质谱鉴定

按Chen等(2006)苯酚抽提法提取木薯叶片蛋白质,溶解后用Bradford试剂盒进行定量,后参照Chen等(2006)双向电泳技术进行全蛋白质的分离。采用Delta2D软件比对不同时间点叶片全蛋白质图谱,对平均差异表达量在2.0倍以上的蛋白质进行标记。

用刀片从胶中切取差异蛋白质点,大小约1~2 mm,经双蒸水(double-distilled water, ddH₂O)清洗,加入200 μL脱色液(25 mmol·L⁻¹ NH₄HCO₃和500 mL·L⁻¹乙腈)在超声波中脱色 5 min,后用胰蛋白酶

(Promega)液(1 μg胰蛋白酶溶解于100 μL 25 mmol·L⁻¹ NH₄HCO₃)酶解,置于37°C水浴过夜。取出过夜的样品,2 795×g离心10 s,按顺序将样品点到Anchorchip标靶上,置入质谱仪(Bruker)中扫描,获取差异蛋白质点的基质辅助激光脱附电离飞行时间质谱(matrix-assisted laser desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry, MALDI-TOF-TOF-MS/MS)图谱。利用在线程序Mascot (<http://www.matrixscience.com>, 2.2.03版)和NCBI数据库(分类学:绿色植物Viridiplantae)中寻找与二级质谱图匹配最好的多肽。利用英国Sanger中心在线工具软件Pfam HMM (<http://pfam.sanger.ac.uk/search>)分析未知功能蛋白质的功能结构域。

4 与光合作用相关蛋白质表达水平验证

参照Carvalho等(2008)的方法对蛋白质RuBisCO、OEC及D1的表达水平进行分析。称取0.5 g木薯叶片,经丙酮沉淀后进行蛋白质印迹(western blot)分析。

实验结果

1 木薯叶片叶绿素含量变化

由图1可知,随着暗光环境处理天数的增加,叶绿素a的含量呈下降趋势,叶绿素b的含量基本不变,反而有上升趋势,总叶绿素含量整体呈下降趋势。叶绿素a及总叶绿素含量的差异达到显著性水平。

2 木薯叶片蛋白质的分离及差异蛋白质分布

采集暗光环境处理后的木薯功能叶片,经过蛋白质的提取、定量、双向电泳分离及考马斯亮蓝染色,得到了重复性较好的5个暗光环境处理的叶片全蛋白质双向电泳图谱(图2)。以木薯SC5在

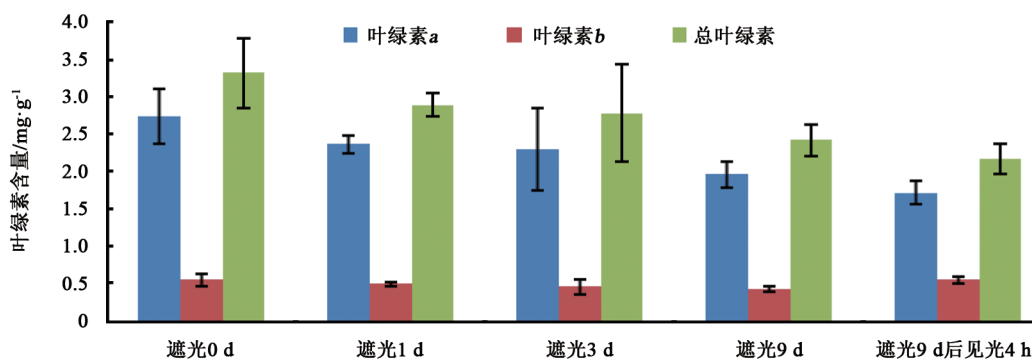


图1 暗光环境处理后木薯SC5叶片叶绿素含量

Fig.1 Chlorophyll contents of SC5 cassava leaves under dark environments

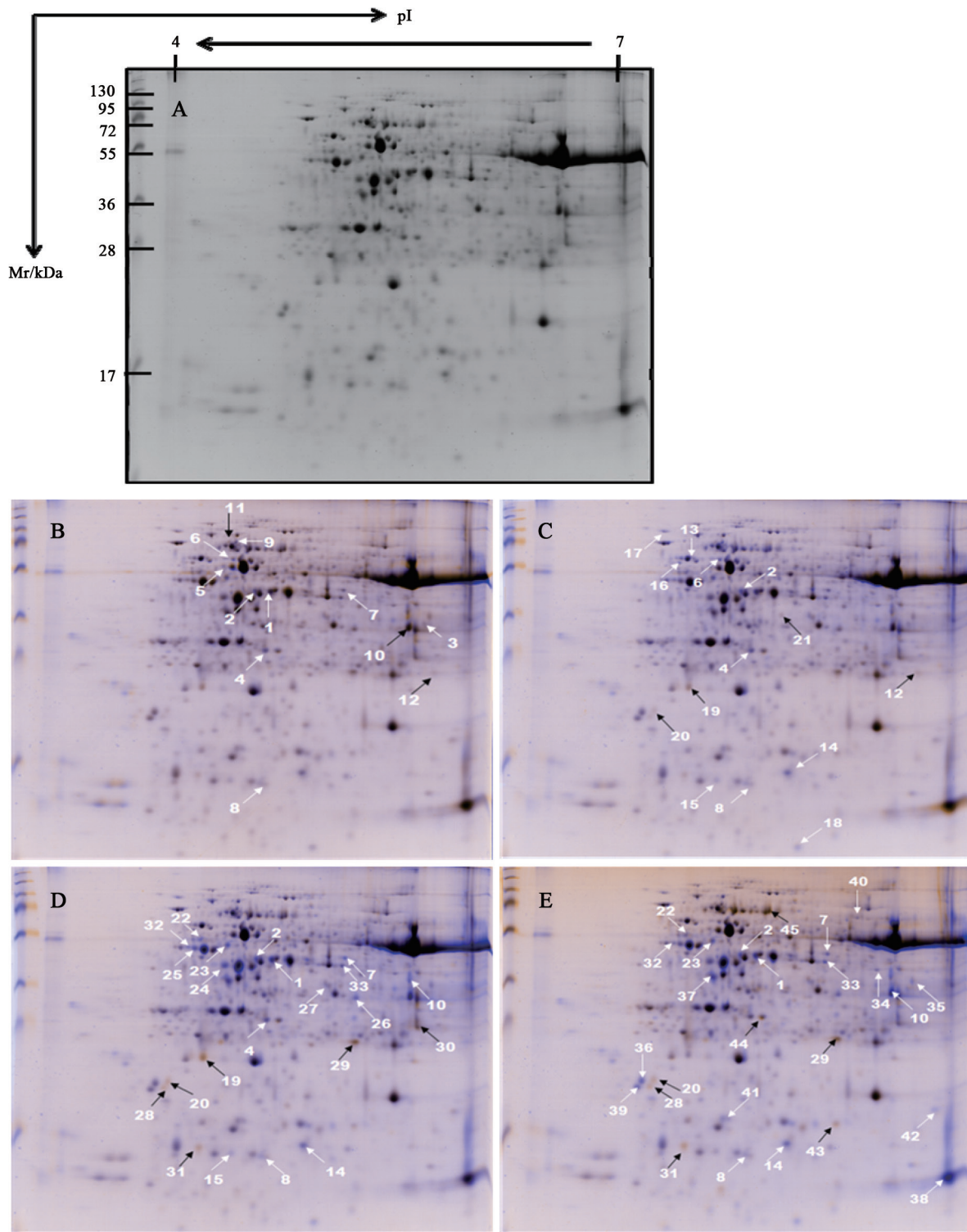


图2 暗光环境处理后的木薯SC5叶片蛋白质双向电泳图谱

Fig.2 Coomassie-stained 2-D gel protein profiles of SC5 cassava leaves after dark treatments

Mr: 蛋白质分子量标准(marker), 图4同; pI: 蛋白质等电点(isoelectric point)。A: 以SC5叶片在暗光环境处理0 d的蛋白质双向电泳图谱为对照; B: 暗光环境处理1 d的叶片差异蛋白质在图谱中的分布; C: 暗光环境处理3 d后的叶片差异蛋白质在图谱中的分布; D: 暗光环境处理9 d后的叶片差异蛋白质在图谱中的分布; E: 暗光环境处理9 d后见光4 h的叶片差异蛋白质在图谱中的分布。黑色箭头表示上调, 白色箭头表示下调。

暗光环境0 d生长为对照, 经过Delta2D软件分析3次生物学重复的双向电泳图谱, 发现45个平均差异表达量在2.0倍以上的蛋白质点。木薯SC5叶片在暗光环境处理1 d后的差异蛋白质点为12个(3个上调, 9个下调), 在暗光环境处理3 d后的差异蛋白质点为14个(4个上调, 10个下调), 在暗光环境处理9 d后的差异蛋白质点为22个(6个上调, 16个下调), 在暗光环境处理9 d后见光4 h的差异蛋白质点为26个(7个上调, 19个下调)。

3 差异蛋白质的鉴定结果及功能分类

经过MALDI-TOF-TOF-MS/MS技术结合NCBI数据库搜索, 成功地鉴定并匹配出37个蛋白质, 其中点3、5、9、16、17、18、19、31未得到成功匹配; 其功能、NCBI登记号、理论等电点/分子量、平均差异表达量见于表1。这些差异蛋白质群的功能涉及光合作用、碳和能量代谢、解毒和抗氧化、结构、分子伴侣、HCN代谢、防御系统、蛋白质合成、氨基酸代谢等。在暗光环境处理1、3、9 d和暗光环境处理9 d后见光4 h的叶片差异蛋白质点中, 鉴定到涉及光合作用的蛋白质分别为0、0、4、6个, 涉及碳和能量代谢的蛋白质分别为2、2、3、3个, 涉及结构蛋白质分别为2、1、4、4个, 这些与光合作用相关且差异表达较显著的蛋白质主要包括RuBisCO活化酶(点24、25、32、34)、RuBisCO大亚基(点33)、RuBisCO小亚基前体(点35)、磷酸核酮糖激酶前体(phosphoribulokinase precursor) (点37)、PSI亚基(点38)。这些与光合作用相关的蛋白质, 随着暗光环境处理天数的增加全部下调表达。与碳和能量代谢相关的差异表达较显著的蛋白质主要包括碳酸酐酶(carbonic anhydrase) (点12、29)、ATP合酶CF1小亚基(点8)、ATP合酶 β 亚基(点40)、乙醇脱氢酶(alcohol dehydrogenase) (点27), 这些与碳代谢相关的蛋白质中, 碳酸酐酶随着暗光环境处理天数的增加上调表达, 其余蛋白均下调表达。与结构相关差异表达较显著的蛋白质主要包括肌动蛋白(actin) (点1、2)、 β -微管蛋白(β -tubulin) (点22)、 α -微管蛋白(点23), 这些与结构相关的蛋白质随着暗光环境处理天数的增加均下调表达。图3显示不同暗光环境处理差异蛋白质点的关系统计, 其中ATP合酶CF1小亚基(点8)和肌动蛋白-1 (点2)

为不同暗光处理共有的下调差异表达蛋白质; 随着暗光处理时间延长, 不同暗光处理间特有差异表达蛋白质增多, 尤其是见光处理4 h后, 差异表达蛋白质达到12个, 主要包括与光合作用、能量代谢和防御系统相关的蛋白质。

4 与光合作用相关蛋白质表达水平验证

利用western blot技术验证下调表达蛋白质RuBisCO、OEC及D1, 结果显示, 暗光环境处理后, 随着处理天数的增加RuBisCO和OEC的表达水平逐渐下降, D1的表达水平是先升高后下降, 这与双向电泳比对的结果基本一致(图4)。

5 蛋白质相互作用生物调控网络的构建

为进一步揭示遮光处理后木薯叶片差异蛋白质群的调控功能, 本研究根据模式植物拟南芥蛋白质相互作用数据库, 使用STRING 10在线软件构建遮光处理后10类差异表达蛋白质群的生物互作调控网络来探究光合作用的分子机制。STRING 10是一种用来检索基因/蛋白质相互作用的在线分析软件(http://string-db.org/newstring.cgi/show_input_page.pl), 它运用数据库中已知蛋白质来预测蛋白质间相互作用网络。图5所示为利用4个遮光处理后的36个差异表达蛋白质构建的蛋白质间互作生物调控网络, 粗线指蛋白质相互作用较强。该网络含22个蛋白质节点, 每个节点含有的相互作用关系用连接线条表示, 一共有49种互作关系。其中连接线条最多的为10条, 最少的为1条。结果显示木薯叶片光合作用代谢的调控是一个非常复杂的过程, 是由众多蛋白质群协同作用的结果。在整个蛋白质间互作调控网络中, 互作较强的蛋白质主要为光合作用相关蛋白质(4)、碳代谢和能量代谢相关蛋白质(5)、排毒和抗氧化(4)和防御蛋白质(1)相关的蛋白质。与光合作用相关的蛋白质主要包括RuBisCo活化酶、RuBisCo大亚基、RuBisCo小亚基前体、PSI亚基; 与碳代谢和能量代谢相关的蛋白质主要包括ATP合酶CF1小亚基、ATP合酶 β 亚基、乙醇脱氢酶; 与排毒和抗氧化相关的蛋白质主要包括过氧化氢酶、超氧化物歧化酶; 防御系统相关的蛋白质主要包括质体醛缩酶。遮光处理后, 这些参与光合作用代谢的蛋白质群均下调表达, 进而降低了叶片中光合作用代谢水平。

表1 暗光环境处理后的木薯SC5叶片差异蛋白质鉴定

处理	数量	功能	序号	鉴定名称	NCBI登记号	理论等电点	分子量/kDa	差异量	表达	
暗光环境处理1 d	9	碳代谢与能量代谢相关	12	碳酸酐酶, 叶绿体	P16016	6.61	34.57	2.36±0.06	+	
			8	ATP合酶CF1小亚基, 忍冬	NP_054942	6.59	14.70	3.00±0.04	-	
		分子伴侣	6	伴侣蛋白前体, 豌豆	AAA66365	5.85	62.98	2.00±0.03	-	
			10	丙酮-羧裂解酶(EC 4.1.2.37), 木薯	S45682	6.15	29.50	3.73±0.06	+	
		HCN代谢	11	亚麻苦苷酶, 羊肚菌	AAB22162	5.52	61.37	∞±0.12	+	
			2	肌动蛋白-1	P23343	5.64	41.99	∞±0.04	-	
		氨基酸代谢	1	肌动蛋白, 板蓝根	AAW63030	5.31	41.82	∞±0.06	-	
			7	S-腺苷甲硫氨酸合酶2, 拟南芥	NP_192094	5.67	43.26	2.00±0.03	-	
			4	未命名蛋白产物, 木薯	CBC70131	5.31	27.67	2.00±0.03	-	
			12	碳酸酐酶, 叶绿体	P16016	6.61	34.57	4.74±0.06	+	
暗光环境处理3 d	10	碳代谢与能量代谢相关	8	ATP合酶CF1小亚基, 忍冬	NP_054942	6.59	14.70	3.00±0.04	-	
			14	HSP19 II类, 葡萄柚	AAP33012	8.01	11.14	2.00±0.06	-	
		分子伴侣	6	伴侣蛋白前体, 豌豆	AAA66365	5.85	62.98	∞±0.07	-	
			2	肌动蛋白-1	P23343	5.64	41.99	∞±0.04	-	
		氨基酸代谢	21	半胱氨酸合酶, 烟草	CAC12819	5.84	34.96	2.03±0.09	+	
			13	乙烯受体1, 甘蓝	O49230	7.98	82.24	∞±0.04	-	
		信号转导代谢	15	超氧化物歧化酶(Cu-Zn类), 叶绿体	O65175	6.17	22.08	2.00±0.06	-	
			20	30S核糖体蛋白S8, 叶绿体	Q2WGF1	11.18	14.52	2.57±0.09	+	
		蛋白质生物合成	未知	4	未命名蛋白产物, 木薯	CBC70131	5.31	27.67	2.00±0.03	-
				25	RuBisCO活化酶, 马蹄莲属杂交种	AAT12492	5.08	27.69	2.00±0.03	-
暗光环境处理9 d	20	光合作用相关	24	RuBisCO活化酶, 烟草	CAA78702	4.83	22.98	2.00±0.03	-	
			32	RuBisCO活化酶, 马蹄莲属杂交种	AAT12492	5.08	27.69	4.00±0.03	-	
		碳代谢与能量代谢相关	33	RuBisCO大亚基, 局部(叶绿体)	AFM94281	6.13	49.71	2.00±0.06	-	
			29	碳酸酐酶, 叶绿体	P16016	6.61	34.57	2.36±0.06	+	
		HCN代谢	27	乙醇脱氢酶, 蓖麻	XP_002525379	8.61	41.58	2.00±0.06	-	
			8	ATP合酶CF1小亚基, 菠菜	NP_054942	6.59	14.70	2.00±0.06	-	
		分子伴侣	30	丙酮-羧裂解酶, 木薯	S45682	6.15	29.50	2.96±0.04	+	
			10	丙酮-羧裂解酶, 木薯	S45682	6.15	29.50	2.00±0.06	-	
		氨基酸代谢	14	HSP19 II类, 葡萄柚	AAP33012	8.01	11.14	2.00±0.06	-	
			22	β-微管蛋白, 百脉根	AAV71172	5.03	46.89	8.00±0.06	-	
氨基酸代谢	23	α-微管蛋白3	CAA44861	5.09	49.56	4.00±0.06	-			
	2	肌动蛋白-1	P23343	5.64	41.99	∞±0.04	-			
	1	肌动蛋白, 板蓝根	AAW63030	5.31	41.82	∞±0.06	-			
	7	S-腺苷甲硫氨酸合酶2, 拟南芥	NP_192094	5.67	43.26	∞±0.06	-			

表1 (续)

处理	数量	功能	序号	鉴定名称	NCBI登记号	理论等电点	分子量/kDa	差异量	表达
暗光环境处理9 d后 见光4 h	25	解毒和抗氧化	28	半胱氨酸过氧化物酶样蛋白, 侧柏	AAT08751	4.93	21.86	$\alpha \pm 0.14$	+
			15	超氧化物歧化酶(Cu-Zn类), 叶绿体	O65175	6.17	22.08	4.00±0.06	-
	蛋白质生物合成	20	30S核糖体蛋白S8, 叶绿体	Q2WGF1	11.18	14.52	6.18±0.09	+	
		26	质醛缩酶, 烟草	BAA77603	6.38	42.82	4.00±0.06	-	
	未知	4	未命名蛋白产物, 木薯	CBC70131	5.31	27.67	2.00±0.03	-	
		32	光合作用相关	RuBisCO活化酶, 马蹄莲杂品种	AAT12492	5.08	27.69	$\alpha \pm 0.06$	-
	25	光合作用相关	33	RuBisCO大亚基, 局部(叶绿体)	AFM94281	6.13	49.71	5.00±0.06	-
			34	RuBisCO活化酶, 马蹄莲属杂种	AAT12492	5.08	27.69	2.00±0.06	-
	37	未知	35	RuBisCO小链前体, 木薯	AAF06098	8.33	20.41	2.00±0.06	-
			37	磷酸核糖激酶前体, 拟南芥	AAG50797	5.71	44.46	2.00±0.06	-
	38	未知	38	PSI VII亚基, 黑松	NP_042492	6.68	9.01	2.00±0.06	-
			29	碳酸酐酶, 叶绿体	P16016	6.61	34.57	2.49±0.06	+
	8	碳代谢与能量代谢相关	8	ATP合酶CF1小量亚基, 忍冬	NP_054942	6.59	14.70	5.00±0.06	-
			40	ATP合酶亚基 β , 线粒体	P29685	6.31	60.33	2.00±0.06	-
	22	未知	22	β -微管蛋白, 百脉根	AAV71172	5.03	46.89	4.00±0.06	-
			23	α -微管蛋白3	CAA44861	5.09	49.56	2.00±0.06	-
	2	未知	2	肌动蛋白-1	P23343	5.64	41.99	$\alpha \pm 0.04$	-
			1	肌动蛋白, 板蓝根	AAW63030	5.31	41.82	$\alpha \pm 0.06$	-
	14	未知	14	HSP19 II类, 葡萄柚	AAP33012	8.01	11.14	2.00±0.06	-
			10	丙酮-羧裂解酶, 木薯	S45682	6.15	29.50	2.00±0.06	-
	44	未知	44	抗坏血酸过氧化物酶2, 木薯	AAAX84679	5.31	27.67	2.01±0.14	+
			43	过氧化物酶D (II型) A链, 欧洲山杨	ITP9_A	5.56	17.43	3.12±0.14	+
	28	未知	28	半胱氨酸过氧化物酶样蛋白, 侧柏	AAT08751	4.93	21.86	$\alpha \pm 0.14$	+
			36	过氧化物酶, 菜豆	CAC17803	5.18	28.62	2.00±0.06	-
	39	未知	39	半胱氨酸过氧化物酶样蛋白, 风信子	AAT08751	4.93	21.86	2.00±0.06	-
			7	S-腺苷甲硫氨酸合酶2, 拟南芥	NP_192094	5.67	43.26	4.00±0.06	-
	20	氨基酸代谢	20	30S核糖体蛋白S8, 叶绿体	Q2WGF1	11.18	14.52	5.02±0.09	+
			45	β -葡糖苷酶, 木薯	CAA64442	5.80	63.10	2.37±0.09	+
	41	未知	41	预测蛋白, 毛癣菌	XP_002325568	9.02	26.95	4.00±0.04	-
			42	保守假蛋白, 蓖麻	EEF25206	9.91	30.77	3.00±0.04	-

表中差异量数据表示为“平均值±标准差”, “ ∞ ”表示无穷大, “+”表示上调, “-”表示下调。

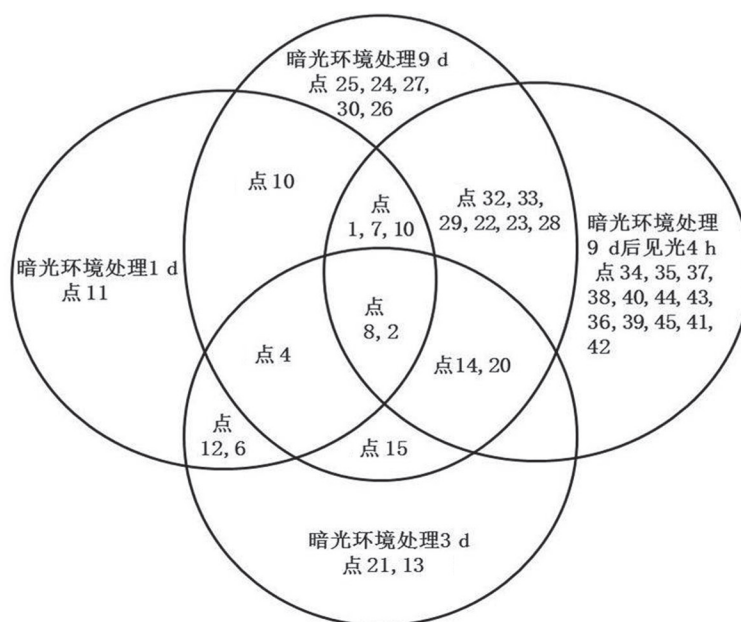


图3 不同暗光环境处理差异蛋白质点关系统计

Fig.3 The relationship of differential protein spots after different dark treatments

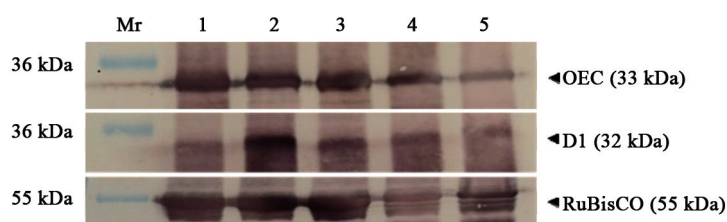


图4 木薯SC5叶片OEC、D1和RuBisCO在不同暗光环境中的表达水平

Fig.4 The expressions of OEC, D1 and RuBisCO extracted from SC5 cassava leaves under dark treatments

1: 木薯SC5叶片蛋白质在暗光环境处理时间0 d的表达水平作为对照; 2: 木薯SC5叶片蛋白质在暗光环境处理时间1 d的表达水平; 3: 木薯SC5叶片蛋白质在暗光环境处理时间3 d的表达水平; 4: 木薯SC5叶片蛋白质在暗光环境处理时间9 d的表达水平; 5: 木薯SC5叶片蛋白质在暗光环境处理9 d后见光4 h的表达水平。

讨 论

1 暗光环境对木薯叶片叶绿素含量的影响

据前人报道,光照强度是影响叶绿素合成的主要因子,叶绿素含量随着光照强度的降低而减少。本研究结果表明,随着暗光环境天数的增加,叶绿素 a 和总叶绿素含量减少,而叶绿素 b 含量基本不变,反而有上升趋势,这是由于植株通过增加叶绿素 b 的相对含量来增加对蓝紫光的吸收,这种能力与暗光环境程度呈正相关,是对暗光环境的适应性表现(杨渺等2004)。叶绿素是绿色植物进

行光合作用的主要色素,叶绿素含量同光合作用的关系十分密切,其含量在一定程度上能反映植物同化物质的能力(Austin和Webber 2005)。但先前很少有报道涉及从叶片全蛋白质水平来解释产生这些变化的机理。本研究通过采用双向电泳结合MALDI-TOF-TOF-MS/MS法,获得在暗光环境处理条件下与光合作用、碳和能量代谢相关的差异蛋白质群以及这些蛋白质群表达水平的变化,探索差异蛋白质群的变化规律以及木薯高光效调控相关的关键蛋白质因子。

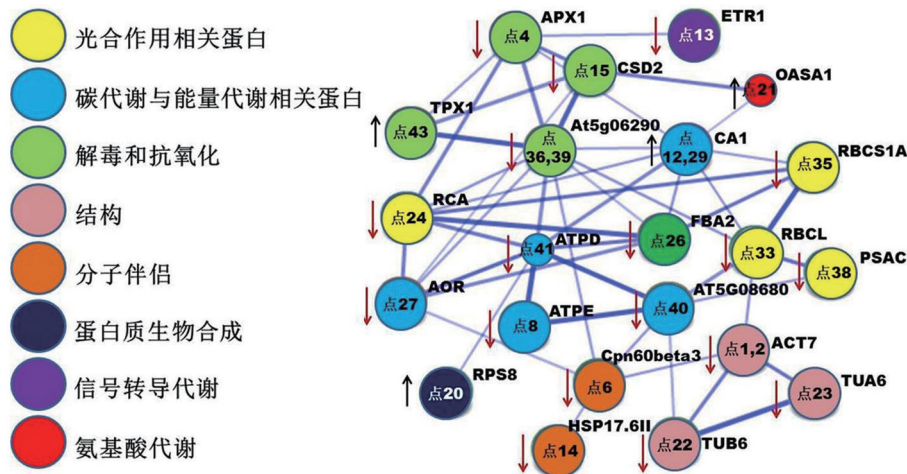


图5 差异蛋白质间相互作用的生物调控网络

Fig.5 Biologically regulated network of differential protein-protein interaction

黑色箭头代表蛋白质表达上调, 红色箭头代表蛋白质表达下调。

2 暗光环境条件下木薯叶片光合作用、碳和能量代谢的蛋白质调控

光合作用可分为光反应和暗反应两个阶段。这两个阶段的反应条件都需要酶的催化, 在光反应阶段的关键酶是ATP合酶, 它的偶联因子CF1-F0结构类似于线粒体ATP合酶。CF1同样由5个亚基组成 $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ 的结构。CF0嵌在膜中, 由4个亚基构成, 是质子通过类囊体膜的通道, 并且催化ATP的合成。固碳作用实质上是一系列的酶促反应。生物界有几种固碳方法, 主要是卡尔文循环。这一系列的酶促反应关键酶主要包括RuBisCo、核酮糖激酶、磷酸甘油醛脱氢酶等。RuBisCo是由8个大亚基和8个小亚基组成的酶, 作为无机碳进入生态系统的关键酶, 在光合作用中催化 CO_2 吸收反应(Kapralov等 2012)。RuBisCo活化酶是近年发现可以调节RuBisCo活性的酶, 它能使RuBisCo在植株体内达到最大活化程度, 而且还具有ATP水解酶的活性(韩鹰等2000)。本研究发现, 随着暗光环境天数的增加, 首先下调表达的蛋白质是ATP合酶CF1小亚基, 随后是RuBisCo活化酶, 最后是RuBisCo大亚基、核酮糖-1,5-二磷酸羧化酶小亚基前体、磷酸核酮糖激酶前体、PSII亚基、ATP合酶 β 亚基和乙醇脱氢酶。这些蛋白质的下调表达首先影响到光反应阶段, 随后影响到暗反应阶段, 导致光合效率下降, 因此, 这些蛋白质可能是影响光合作用的关键因子。碳酸酐酶在植物催化光合作用

过程中催化可逆的 CO_2 水合反应, 促进 CO_2 向Ru-BisCo扩散。在 C_4 植物中, 碳酸酐酶为磷酸烯醇丙酮酸(phosphoenolpyruvate, PEP)羧化酶提供有效无机碳源, 而在 C_3 植物中主要促进无机碳的扩散(郭敏亮和高煜珠1989)。在本研究中, 暗光环境处理后碳酸酐酶显著上调表达, 提高光合效率, 表明它可以提高植物对逆境的适应能力。

光合放氧是高等植物PSII的特有功能(于勇等2001), 放氧复合体OEC是植物叶绿体PSII的一个复合体, 位于类囊体膜的腔内侧, 是叶绿体光反应过程中氧化水分子释放出氧气所不可缺少的。在构成PSII反应中心的基本框架中, D1蛋白是一种重要组分(Ort 1996), 其构象的变化会抑制PSII的电子传递。本研究利用western blot对参与光合作用的蛋白质RuBisCo、OEC及D1在暗光处理后的木薯叶片中的表达水平变化进行分析, 结果显示, 随着暗光环境处理天数的增加RuBisCo和OEC的表达水平逐渐下降, 导致光合效率下降, 这与双向电泳比对的结果一致; D1的表达水平是先升高后下降, 表明它可以提高植物对逆境的适应能力。因此, 这些蛋白质也可能是影响光合作用的关键因子。

3 暗光环境处理对木薯叶片其他蛋白质相关通路的影响

肌动蛋白是真核生物中普遍存在的一种古老的蛋白质, 是构成细胞骨架的主要成分, 是细胞外表形态、组织和正常生长的基础。在细胞中与之

结合的蛋白质调控下, 肌动蛋白微丝的长度、极性、稳定性和三维结构处于动态变化之中, 并将肌动蛋白纤维与细胞浆和细胞膜的其他成分相连接, 从而调节肌动蛋白的理化状态, 藉以完成多种细胞功能, 包括细胞分裂、细胞运动、内吞作用、成核作用、细胞信号传导、重力感应以及多种细胞运动, 如顶端生长、细胞器运动等生物学作用。在调节细胞各项生命进程的蛋白与被调节产生的各种细胞功能之间, 肌动蛋白似乎起到了一种不可替代的联系纽带的作用(刘曦等2010)。本研究中鉴定了多个与结构相关的蛋白质, 这些蛋白质随着暗光环境处理天数的增加均下调表达, 如肌动蛋白、 β -微管蛋白、 α -微管蛋白, 这表明在暗光环境条件下, 细胞内的许多代谢活动受到影响, 如重力感应、物质运输等。

一些与蛋白质合成和氨基酸代谢相关的蛋白也随着暗光环境天数的增加显著下调, 如30S核糖体蛋白S8 (30S ribosomal protein S8)、*S*-腺苷甲硫氨酸合成酶2 (*S*-adenosylmethionine synthase 2), 表明暗光环境处理后细胞内的许多蛋白质和氨基酸合成也受到影响。通过本研究发现遮光对一些与解毒和抗氧化相关的蛋白质产生了影响, 如半胱氨酸过氧化物酶样蛋白(2-Cys peroxiredoxin like protein)、抗坏血酸过氧化物酶2 (ascorbate peroxidase 2)和超氧化物歧化酶(superoxide dismutase)。在遮光条件下, 体内解毒和抗氧化反应的蛋白发生了变化, 表明植株在胁迫条件下对胁迫的不良条件作出应答响应, 减少胁迫对植株造成伤害, 这些蛋白表达的显著变化, 能有助于植株更好地抵抗胁迫环境。

本研究还发现暗光环境处理对一些与分子伴侣、HCN代谢、防御系统和氨基酸代谢相关的蛋白质产生影响, 如HSP19 II类、伴侣蛋白前体(chaperonin precursor)、丙酮-氰醇裂解酶(acetone-cyanhydrin lyase)、亚麻苦苷酶(linamarase)、 β -葡萄糖苷酶(β -glucosidase)、质醛缩酶(plastidic aldolase)。虽然中国热带农业科学院联合中国科学院等利用高通量测序技术(Roche/454或Solexa)开展木薯野生祖先种*M. esculenta* ssp. *flabellifolia* (W14)与栽培品种*M. esculenta* ssp. *esculenta* (KU50)比较基因组学研究, 完成了W14和KU50的

全基因组草图, 发现野生祖先种和栽培种分别含有34 483和38 845个基因(Wang等2014), 但绝大多数基因的功能验证尚未完成, 所以对这些差异蛋白的功能还难于深入探讨。本研究通过全蛋白质水平对木薯叶片光胁迫条件下不同时间点蛋白质组日变化进行了研究, 找到了一些与高光效相关的蛋白质, 为将来木薯高光效对产量影响的深入研究提供理论依据。

参考文献

- An FF, Fang J, Li GH, Jian CP, Li KM (2012). Comparison of leaves proteome and chlorophyll fluorescence of cassava cv. SC8 and its tetraploid mutants. *Sci Agr Sin*, 46 (19): 3978–3987 (in Chinese with English abstract) [安飞飞, 凡杰, 李庚虎, 简纯平, 李开绵(2013). 华南8号木薯及其四倍体诱导株系叶片蛋白质组及叶绿素荧光差异分析. *中国农业科学*, 46 (19): 3978–3987]
- Anderson JM (1973). Composition of the photosystems and chloroplast structure in extreme shade plants light-dependent reversal of dark-chilling induced changes in chloroplast structure and arrangement of chlorophyll-protein complexes in bean thylakoid membranes. *Biophys Acta*, 325: 573–585
- Austin J II, Webber AN (2005). Photosynthesis in *Arabidopsis thaliana* mutants with reduced chloroplast number. *Photosynth Res*, 85 (3): 373–384
- Carvalho LJC, Lippolis J, Chen S, de Souza CRB, Vieira EA, Anderson JV (2012). Characterization of carotenoid-protein complexes and gene expression analysis associated with carotenoid sequestration in pigmented cassava (*Manihot Esculenta* Crantz) storage root. *Open Biochem J*, 6: 116–130
- Chen S, Gollop N, Heuer B (2009). Proteomic analysis of salt-stressed tomato (*Solanum lycopersicum*) seedlings: effect of genotype and exogenous application of glycinebetaine. *J Exp Bot*, 60 (7): 2005–2019
- Chen SB, Glazer I, Gollop N, Cash P, Argo E, Innes A, Stewart E, Davidson I, Wilson MJ (2006). Proteomic analysis of the entomopathogenic nematode *Steinernema feltiae* IS-6 IJs under evaporative and osmotic stresses. *Mol Biochem Parasitol*, 145 (2): 195–204
- El-Sharkawy MA (2004). Cassava biology and physiology. *Plant Mol Biol*, 56 (4): 481–501
- Guo ML, Gao YZ (1989). Carbonic anhydrase of plant. *Plant Physiol Commun*, (3): 75–80 (in Chinese) [郭敏亮, 高煜珠(1989). 植物的碳酸酐酶. *植物生理学通讯*, (3): 75–80]
- Han Y, Chen G, Wang Z (2000). The progresses of studies on Rubisco activase. *Chin Bull Bot*, 17 (4): 306–311 (in Chinese with English abstract) [韩鹰, 陈刚, 王忠(2000). Rubisco活化酶的研究进展. *植物学通报*, 17 (4): 306–311]
- He TQ (2013). Comparative proteomics of *Manihot esculenta* leaves under different light conditions (Master's thesis). Haikou: Hainan University (in Chinese with English abstract) [贺庭琪(2013).

- 木薯叶片应答不同光照处理的比较蛋白质组学初步研究(硕士论文). 海口: 海南大学]
- Hillocks RJ, Thresh JM, Bellotti A (2002). *Cassava: Biology, Production and Utilization*. London: CABI Publishing
- Huang J (2007). *High Yield Cultivation Techniques of Cassava*. Haikou: Shanhu Press (in Chinese) [黄洁(2007). 木薯丰产栽培技术. 海口: 三环出版社]
- Kapralov MV, Smith JAC, Filatov DA (2012). Rubisco evolution in C_4 eudicots: an analysis of amaranthaceae *Sensu lato*. *PLoS ONE*, 7 (12): e52974
- Kong XS (2008). *Plant Physiology Experimental Techniques*. Beijing: China Agriculture Publishing Press (in Chinese) [孔祥生(2008). 植物生理学实验技术. 北京: 中国农业出版社]
- Liu X, Zhang SF, Wang C (2010). Research progress of plant actin function. *Biotechnol Bull*, (3): 13–14 (in Chinese with English abstract) [刘曦, 张少斌, 汪澈(2010). 植物肌动蛋白的研究进展. 生物技术通报, (3): 13–14]
- Onwueme IC (2002). *Cassava in Asia and the Pacific*. In: Hillocks RJ, Thresh JM, Bellotti A (eds). *Cassava: Biology, Production and Utilization*. London: CABI Publishing
- Ort DR (1996). Energy transduction in oxygenic photosynthesis: an overview of structure and mechanism. In: Staehelin LA, Arntzen CJ (eds). *Photosynthesis III*. Berlin: Springer-Verlag
- Wang WQ, Feng BX, Xiao JF, Xia ZQ, Zhou XC, Li PH, Zhang WX, Wang Y, Møller BL, Zhang P, et al (2014). Cassava genome from a wild ancestor to cultivated varieties. *Nat Commun*, 5: 5110
- Yang M, Mao K, Gou WL, Zhao B (2004). Effects of shading stress on chlorophyll content. *J Sichuan Grassl*, (3): 20–22 (in Chinese) [杨渺, 毛凯, 苟文龙, 赵波(2004). 遮荫胁迫对叶绿素含量的影响. 四川草原, (3): 20–22]
- Yao QR, Guo YL, Guo AP, Guo JC, Li KM, He LK (2007). Current situation and development prospect of genetic engineering in cassava breeding. *J Anhui Agr Sci*, 35 (6): 1636–1637 (in Chinese with English abstract) [姚庆荣, 郭运玲, 郭安平, 郭建春, 李开绵, 贺立卡(2007). 木薯基因工程育种研究现状与展望. 安徽农业科学, 35 (6): 1636–1637]
- Yu Y, Weng J, Xu C (2001). The progress in the investigation on the structure and function of the extrinsic proteins of photosystem II. *Plant Physiol J*, 27 (6): 441–450 (in Chinese with English abstract) [于勇, 翁俊, 徐春和(2001). 植物光系统II放氧复合体外周蛋白结构和功能的研究进展. 植物生理学报, 27 (6): 441–450]
- Zuo YM (2010). *The research on the photosynthetic physioecological characteristics of cassava* (PhD thesis). Haikou: Hainan University (in Chinese with English abstract) [左应梅(2010). 木薯光合特性的生理生态研究(博士论文). 海口: 海南大学]

Effect of dark environment on cassava leaf proteome

LÜ Ya^{1,2}, AN Fei-Fei¹, LI Kai-Mian¹, CHEN Song-Bi^{1,*}

¹Tropical Crops Genetic Resources Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences / Key Laboratory of Ministry of Agriculture for Germplasm Resources Conservation and Utilization of Cassava, Danzhou, Hainan 571737, China; ²Yunnan Institute of Tropical Crops, Jinghong, Yunnan 666100, China

Abstract: The expression changes of photosynthesis-related proteins were determined using proteomic method extracted from the leaves of cassava (*Manihot esculenta*) ‘South China No. 5’ (SC5), covering with double black plastic bags to create a dark environment, under 0, 1, 3 and 9 days dark environments and 9 day dark environments plus light condition for 4 hours. The results show that the total chlorophyll contents of SC5 cassava leaves decreased with the increase of treated days under dark environment. A total of 45 differential expression proteins were found to change significantly with larger than ± 2.0 times variation intensity at 4 dark treatments (1, 3, 9 days and 9 days plus 4 hours light) compared to 0 day. These differential proteins were identified to involve in photosynthesis, carbohydrate and energy metabolism, structure, detoxification and antioxidation, etc. However, the expressions of ATP synthase, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCo) activase protein, RuBisCo large subunit, phosphoribulokinase precursor, photosystem I subunit and RuBisCo small chain precursor down-regulated with the increase of treated days under dark environment.

Key words: *Manihot esculenta*; leaf; dark environment; chlorophyll content; proteome

Received 2017-04-06 Accepted 2017-05-04

This work was supported by the NSFC-CGIAR International (Regional) Cooperation and Exchange Programs (Grant No. 31361140366), the Initial Fund of High-level Creative Talents in Hainan Province (Grant No. HLCT-HN2012-2), and National Science and Technology Infrastructure Program (Grant No. 2015BAD15B01).

*Corresponding author (E-mail: songbichen@catas.cn).