

水稻叶绿体蛋白质在生长发育过程中的表达研究*

白 辉^{1)**} 王宪云^{2)**} 曹英豪²⁾ 李晓明²⁾ 李莉云²⁾ 陈 浩²⁾
刘丽娟²⁾ 朱健辉¹⁾ 刘国振^{1,2)***}

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

摘要 在植物中, 叶绿体是负责光合作用的细胞器, 对叶绿体内的各种生物过程人们已经积累了很多知识, 但对叶绿体蛋白质的表达还所知甚少. 为了解水稻叶绿体蛋白质在正常生长发育过程中的表达情况, 尝试基于抗体的水稻蛋白质组学策略. 选取了 10 个水稻叶绿体基因, 利用表达的蛋白质或合成的抗原决定簇片段制备了抗体, 用 Western blotting 检测了相应蛋白质在 5 个发育时期的根、茎、叶及穗组织中的表达. 发现 10 个蛋白质均在叶片中表达, 在根中不表达. 与原初反应相关的叶绿素 A/B 结合蛋白 1 和 2(CAB1 和 CAB2)、与电子传递相关的放氧增强蛋白 1(OEE1)及与活性氧清除相关的过氧还蛋白过氧化酶(2-CysP)和硫氧还蛋白(Trx)在茎中表达. 而在卡尔文循环中发挥作用的 Rubisco 活化酶(RCA)、甘油醛-3-磷酸脱氢酶(GAPDH)、果糖二磷酸醛缩酶(FBPA)和景天庚酮糖-1, 7-二磷酸酶(SBPase)蛋白质在茎中不表达. 在穗中, 这些蛋白质的表达时序不同, CAB2 和 2-CysP 在穗发育的全程表达, CAB1 和 OEE1 在中后期表达, 而卡尔文循环中的蛋白质只在中期表达. 有意思的是, 卡尔文循环中的蛋白质表达模式相似, 这一结果从蛋白质表达水平支持它们之间的相互衔接关系. 此外, 实验还揭示了可能的蛋白质修饰、二聚体及不同的转录本现象. 将目标基因的表达谱与转录谱进行比较, 发现二者间有一定的平行性, 但也有明显的区别. 以水稻叶绿体蛋白质为对象, 直观并相对定量地揭示了它们的表达模式, 为阐释其功能提供了信息, 也为基于抗体的水稻蛋白质组学策略提供了一个初步数据.

关键词 水稻, 叶绿体, 光合作用, 蛋白质表达谱, 基于抗体的蛋白质组学

学科分类号 Q5, Q7

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00173

绿色植物通过光合作用吸收太阳能, 同化二氧化碳和水, 制造有机物质并释放氧气. 光合作用的光反应发生在叶绿体内基粒片层膜上, 由光系统 I (PS I)、光系统 II (PS II)、细胞色素 b6f 复合物和 ATP 合成酶组成^[1]. 光合作用的暗反应发生在叶绿体基质中, 主要是通过卡尔文循环进行二氧化碳的固定, 卡尔文循环分为羧化、还原和二磷酸核酮糖的再生三个阶段, 由 11 种酶协同催化 13 个连续的反应^[2]. 在光合作用产生氧气的同时, 还会伴随活性氧(reactive oxygen species, ROS)的产生^[3], 在胁迫条件下, 过量 ROS 的产生会对细胞造成伤害^[4], 所以植物叶绿体中也存在着活性氧清除机制^[5]. 叶绿体基因除具有各自的生理功能外, 还可能主动或被动参与植物对生物和非生物胁迫的反应.

水稻(*Oryza sativa* L.) 既是世界上最重要的粮食作物之一, 也是植物生长发育、逆境反应等基础研究的模式植物^[6]. 可以说, 水稻叶绿体内的反应

是水稻产量的决定因素. 对叶绿体蛋白质表达的报道主要来自对逆境胁迫的调查. 在低温、盐和金属胁迫下, 水稻 Rubisco 活化酶(RuBisCo activase, RCA)、景天庚酮糖-1, 7-二磷酸酶(fructose-1, 6-bisphosphatase, SBPase)和 ATP 合酶 B 亚基(ATP synthase B chain, ATPsB)蛋白质降解增多^[7-9]. 在臭氧胁迫下, RCA、ATPsB 和果糖二磷酸醛缩酶(fructose-bisphosphate aldolase isozyme, FBPA)蛋白质呈下调表达^[10]. 在干旱胁迫 23 天的水稻叶片中, RCA、FBPA 和与活性氧清除相关的 2-Cys 过氧还蛋白过氧化酶(2-Cys peroxidoredoxin, 2-CysP)都表

* 国家自然科学基金(30670175, 30730007)和国家重点基础研究发展计划(973)(2007CB109201, 2006CB101705, 2006CB910105)资助项目.

** 共同第一作者.

*** 通讯联系人.

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

收稿日期: 2010-04-05, 接受日期: 2010-05-25

达上调^[11]。生长 3 周的水稻 Java14 (含 Xa1 和 Xa13) 幼苗接种白叶枯病 3 天后, 感病反应中甘油醛 -3- 磷酸脱氢酶 (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, GAPDH)、放氧增强蛋白 1 (oxygen-evolving enhancer protein 1, OEE1) 和 2-CysP 蛋白表达下调, 而 ATPsB 蛋白在抗病和感病中均表现下调^[12]。但是, 人们对叶绿体蛋白质在正常生长发育过程中的表达关注不多。另外, 目前对水稻蛋白质表达的研究大都是基于双向电泳 - 质谱 (two-dimensional gel electrophoresis-mass spectrometry, 2DE-MASS) 的策略, 虽然这种策略可以对数据众多的蛋白质进行分析, 但很难对特定的靶蛋白进行系统分析。近年来, 在人的蛋白质组学研究中, Uhlen 等^[13]提出了基于抗体的蛋白质组学策略, 利用特定抗体分析不同组织中蛋白质表达, 以了解其功能。

为了对水稻生长发育过程中的叶绿体蛋白质表达有所了解, 并借此尝试基于抗体的水稻蛋白质组学策略, 本实验中, 我们利用体外表达的蛋白质片段或合成多肽做免疫原, 制备了 10 个水稻叶绿体蛋白质的多克隆抗体, 通过 Western blotting 调查

了这些蛋白质在水稻不同发育时期的表达, 揭示了许多有意义的叶绿体蛋白质表达特征。

1 材料与方法

1.1 材料

水稻品种 93-11、水稻 cDNA 文库、pET30a 和 pET30a-GST 表达载体、大肠杆菌 ER2566 和 BL21 菌株等由中国科学院北京基因组研究所保存。限制性内切酶 *EcoR* I、*Hind* III、*Bam*H I、*Xho* I、T4 DNA Ligase、Ex Taq DNA 聚合酶购自 TAKARA 公司。

1.2 水稻取材

在水稻苗期(地上部、地下部)、分蘖期(根、茎和叶)、孕穗期(剑叶、幼穗)、开花期(剑叶、穗子)、成熟期(剑叶、穗子)共 5 个时期 11 个部位分别取材, 冻存于 -70℃ 备用。

1.3 引物

根据 TIGR 数据库^[14-15]公布的靶基因目标序列, 利用 Primer CE 软件^[16], 设计了如下扩增用引物, 下划线是外加的酶切位点, 详细的扩增片段起止位点见表 1。

Tabel 1 List of primers used for PCR amplification

Locus	Forward primer	Reverse primer
Os09g17740.1	GGAATTCATGGCCGCGGCCACCATGGCGC	CCCAAGCTT CTCGCTGAAGATCTGCGAG
Os01g31690	GGAATTCATGGCAGCATCGCTCCAAGCCGC	CCCAAGCTTCTACTCGAGCTGCGGTACCACA
Os03g17070	GGAATTCATGGCGACGGCTATGATGGC	CCCAAGCTTTTACGCGGATGGGAGCACC
Os11g47970.4	GGAATTCCTCCCGGGATGTACAACA	CCCAAGCTTTCAGCTGGATGGCGCAGAAC
Os03g03720.1	GGAATTCATGGCCACACACGCAGCGCTC	CCCAAGCTTTTAGTTTTCTGACACTTTG
Os11g07020	GGAATTCATGGCGTCTGCTACTCTCC	CCCAAGCTTTTAGTAGACGTAGTTCTTGACGA
Os04g16680	CGGGATCCGGTGGTGGTAAGGCGGCGAGCCGGGCG	CCGCTCGAGATCAAGAAGAAGGAATTCATGAGT
Os02g33450	GGAATTCGTCATCTCTCTTCTTCTACCC	CCCAAGCTTTTAGATGGCCGCGAAGTAC

1.4 基因克隆及蛋白质表达纯化

以水稻 cDNA 文库质粒 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 将 PCR 产物与载体分别双酶切, 胶回收酶切产物, 连接、转化大肠杆菌, 重组子送北京华大基因研究中心测序验证后, 转化表达菌 ER2566 或 BL21, 按 1 : 100 的比例将过夜菌转接至 100 ml LB+Kan50+1%葡萄糖液体培养基中, 37℃ 振荡培养至 A₆₀₀ 为 0.6 ~ 0.8, 加入 0.1 mol/L 的 IPTG, 37℃ 震荡培养 3 h, 收菌后超声破碎, 用 Ni 柱进行蛋白质纯化, SDS-PAGE 分离后检测。

1.5 多克隆抗体制备

将纯化的融合蛋白或合成的多肽送北京华大蛋

白质研发中心有限公司免疫兔子, 耳静脉取血测效价, 效价达要求后颈动脉取血, 离心收集多抗血清。

1.6 水稻蛋白质的提取及 Western blotting 检测

水稻蛋白质提取方法和 Western blotting (WB) 检测按参考文献^[17]进行, 以针对 HSP 蛋白的检测作为等量加样的内标^[18], 将 WB 信号按相对强度分为 4 档, 与转录谱数据进行相对比较。

1.7 水稻叶绿体基因的 MPSS 和 EST 数据分析

从水稻 MPSS (massively parallel signature sequencing) 数据库 (<http://mpss.udel.edu/rice/>)^[19] 和 EST (expressed sequence tags) 数据库 (<http://www>.

ncbi.nlm.nih.gov/projects/dbEST/)^[20]分别获得水稻叶片、根、茎、穗子和种子等部位的转录数据,按表达强度分为4档,与WB结果进行比较.

2 结 果

2.1 目标基因的选择

根据 KEGG pathway(<http://www.genome.jp/kegg/pathway.html>)中光合作用及报道的 ROS 清除相关基因,选取了光合作用途径中与原初反应相关的 CAB1 (chlorophyll A/B binding protein 1)、CAB2

(chlorophyll A/B binding protein 2)^[21],与电子传递相关的 OEE1 以及与光合磷酸化相关的 ATPsB^[22],卡尔文循环途径中碳固定相关的 RCA、GAPDH、FBPA 和 SBPase^[23-24],活性氧清除相关的 2-CysP 和硫氧还蛋白(thioredoxin, Trx)^[3, 25]共 10 个基因,各基因名称、Locus 编号、分子质量等列于表 2,编码蛋白在叶绿体中的定位和在代谢途径中的分布见 Apel 等^[4]的报道(图 S1, 见网络版附录, http://www.pibb.ac.cn/cn/ch/common/view_abstract.aspx?file_no=20100173&flag=1).

Table 2 List of chloroplast genes and related information

Gene name	Locus number	Gene annotation	M/ku	Antigen	Fragment/Peptide
CAB1	Os09g17740.1	Chlorophyll A-B binding protein	28	Expressed protein	140AA(1~140)
CAB2	Os03g39610.1	Chlorophyll A-B binding protein	28	Synthesized peptide	SIWYGPDPRPKYLGPFS
OEE1	Os01g31690	Oxygen-evolving enhancer protein 1	35	Expressed protein	333AA(1~333)
ATPsB	Os03g17070	ATP synthase B chain	23	Expressed protein	211AA(1~211)
RCA	Os11g47970.4	AAA-type ATPase family protein	40	Expressed protein	178AA(61~238)
GAPDH	Os03g03720.1	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	47	Expressed protein	444AA(1~444)
FBPA	Os11g07020	Fructose-bisphosphate aldolase isozyme	42	Expressed protein	388AA(1~388)
SBPase	Os04g16680	Fructose-1,6-bisphosphatase	42	Expressed protein	180AA(21~201)
2-CysP	Os02g33450	2-Cys peroxiredoxin	28	Expressed protein	162AA(101~262)
Trx	Os07g29410	Thioredoxin	32	Synthesized peptide	GSGRSKTARFLRRRRRGAV

2.2 目标蛋白质的表达及抗体制备

以水稻 cDNA 文库质粒为模板,用设计的引物进行 PCR 扩增,结果表明,扩增产物的大小符合预期(数据未附),将表达质粒转入大肠杆菌菌株, IPTG 诱导表达后 SDS-PAGE 分离,图 1a 所

示为在大肠杆菌中 8 个蛋白质的表达以及纯化结果,它们的纯度在 90%以上,浓度约为 1~1.5 g/L,可以满足制备抗体的要求.为了验证抗体的特异性和结合强度,用抗体对重组抗原进行了 WB 检测(图 1b),结果表明,所制备的抗体均能特异地识别重组抗原.

2.3 水稻电子传递及光合磷酸化相关蛋白质的表达谱分析

用 CAB1 和 CAB2 抗体检测蛋白质表达, WB 可检测到与预期分子质量接近的特异性条带,它们的表观分子质量均在 28 ku 左右(图 2a, 2b). 二种蛋白质表达模式相近,都在叶片、茎和穗子中表达,在根部检测不到表达,值得注意的是,在抽穗期幼穗中,可检测到 CAB1 的表达,但检测不到 CAB2 的表达,说明在穗中 CAB1 的表达较早,而 CAB2 出现在较晚的时期.除了主带之外,在 CAB1 和 CAB2 高表达的叶片组织中还检测到低分子质量弱带.用 OEE1 抗体可检测到与预期分子质量(35 ku)相符的条带,其在叶片、茎和后期的穗子中表达,而在根部和早期穗子中没有检测到表达(图 2c).用 ATPsB 抗体检测蛋白质表达, Western blotting 结果(图 2d)可见在叶片中的主带与预测分

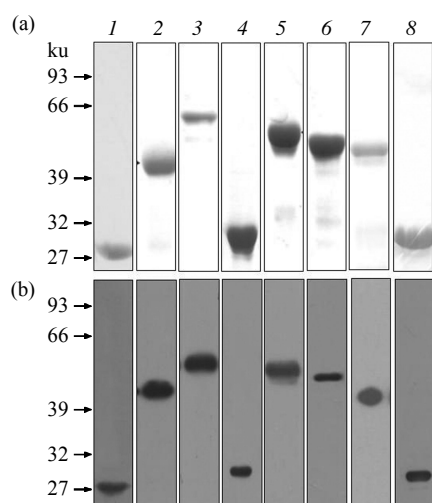


Fig. 1 The purification and Western blotting detection of *E. coli* expressed rice proteins

(a) Purified proteins were separated by SDS-PAGE and stained by Coomassie blue. (b) Western blotting detection of *E. coli* expressed recombinant proteins by corresponding antibodies. 1: CAB1; 2: OEE1; 3: ATPsB; 4: RCA; 5: GAPDH; 6: FBPA; 7: SBPase; 8: 2-CysP.

子质量(23 ku)相符, 但也有几条分子质量较大但信号较弱的条带(36~40 ku). 有意思的是, 除叶片外的所有组织中, 均没有 23 ku 条带, 而是在 60 ku 左右有一组较高分子质量的条带.

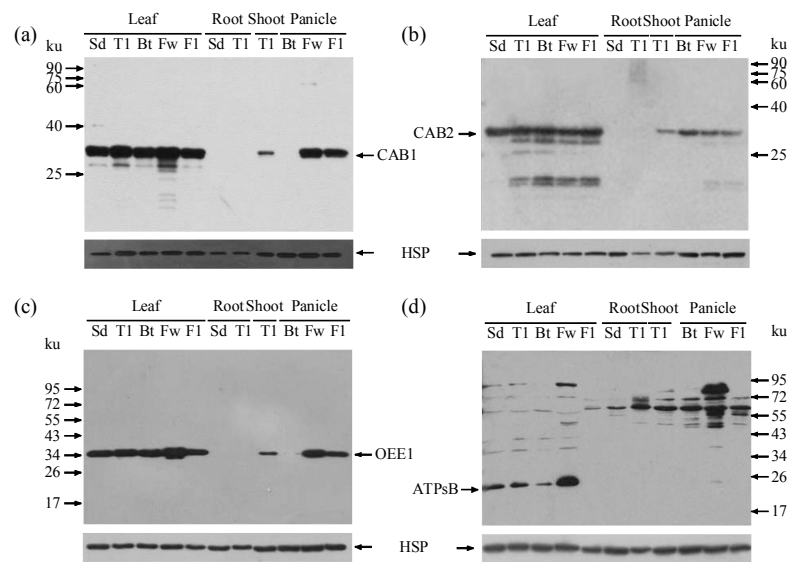


Fig. 2 The Western blotting detection of CAB1, CAB2, OEE1 and ATPsB proteins
(a) CAB1. (b) CAB2. (c) OEE1. (d) ATPsB. Sd: Seedling stage; Tl: Tillering stage; Bt: Booting stage; Fw: Flowering stage; Fl: Filling stage.

2.4 水稻碳固定相关蛋白质的表达

用 RCA、GAPDH、FBPA 和 SBPase 抗体检测蛋白质表达(图 3), WB 都可检测到与预期分子质量相近的条带, 其表观分子质量分别为 42、47、42 和 42 ku(图 3a~d). 从图 3 可明显地看出它们的表达模式几乎完全相同, 主要都是在叶片和开花

期穗子中表达. 除主带外, 在 RCA 高表达的组织中还有分子质量较高的弱带, GAPDH 抗体可在多个组织中检测到分子质量约 60 ku 的条带, 用 SBPase 抗体可在开花期穗子中检测到分子质量稍大的条带.

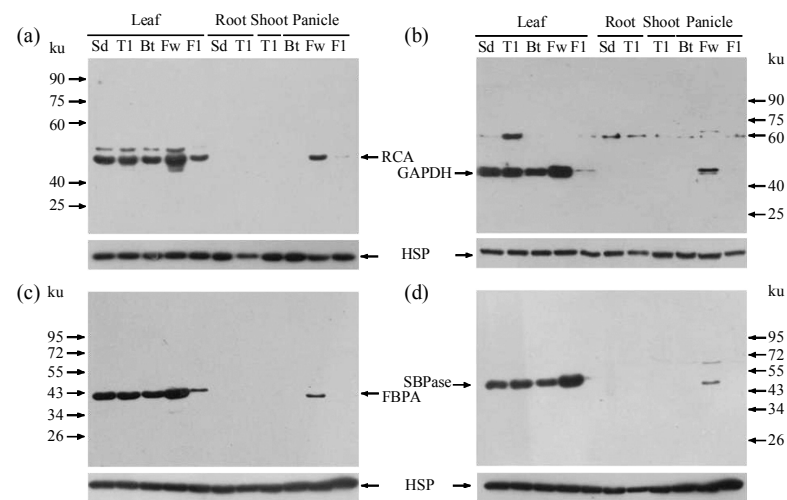


Fig. 3 The Western blotting detection of RCA, GAPDH, FBPA and SBPase proteins
(a) RCA. (b) GAPDH. (c) FBPA. (d) SBPase. Sd: Seedling stage; Tl: Tillering stage; Bt: Booting stage; Fw: Flowering stage; Fl: Filling stage.

2.5 水稻抗氧化相关蛋白质的表达谱分析

用 2-CysP 抗体检测, WB(图 4a)可见与预测的

蛋白质分子质量相符(28 ku)的主带, 该蛋白质在除根以外的参试组织中均有表达, 此外, 在叶片中有

一条分子质量约 50 ku 的条带. Trx 抗体可在水稻成株期叶片中识别约 30 ku 的主带(图 4b), 而在其

他组织中没有清晰的信号, 表明该蛋白质只能在成株期叶片中发挥功能.

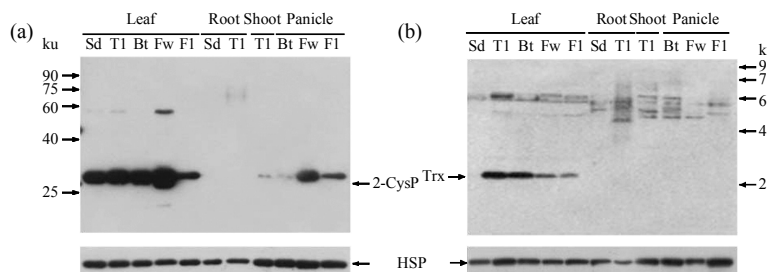


Fig. 4 The Western blotting detection of 2-CysP and Trx proteins

(a) 2-CysP. (b) Trx. Sd: Seedling stage; Tl: Tillering stage; Bt: Booting stage; Fw: Flowering stage; Fl: Filling stage.

2.6 目标基因的转录谱分析

为了将目标蛋白质的表达信息与转录信息进行比较, 我们从公布的水稻 MPSS 数据中搜索 10 个目标基因及对照基因 HSP 的转录数据, 共获得在水稻叶、根、茎、幼穗和成熟穗中表达的 9 797 837 条特征序列(signature sequences)(表 S1, 见网络版附录, http://www.pibb.ac.cn/cn/ch/common/view_abstract.aspx?file_no=20100173&flag=1), 从水稻 EST 数据库中获得了叶、根、茎、幼穗和成熟穗的 571 800 条表达 EST(表 S2, 见网络版附录, http://www.pibb.ac.cn/cn/ch/common/view_abstract.aspx?file_no=20100173&flag=1), 通过序列比对获得相应

基因的具体 EST 数目、WB 表达谱、MPSS 与 EST 结果对应列于图 5.从图 5 大致可以看出三者间有一定的平行性, 如所有基因在叶片中的较高程度的表达, 在根中几乎不表达, 但仔细对比, 三者也有明显区别, 如 Trx 和 CAB2 在 MPSS 数据中检测不到表达, 而 2-CysP 在 EST 数据中检测不到表达, MPSS 数据量约为 EST 数据总量的 17 倍, 其数据的可靠性应该高于 EST, 但对蛋白质的表达量而言, WB 数据显然以更为可靠和直观的方式展示了相对定量的表达结果. 当然, 三者的区别也有可能来自取样群体的不同、技术误差或基因转录与表达信号间的不相关性^[26].

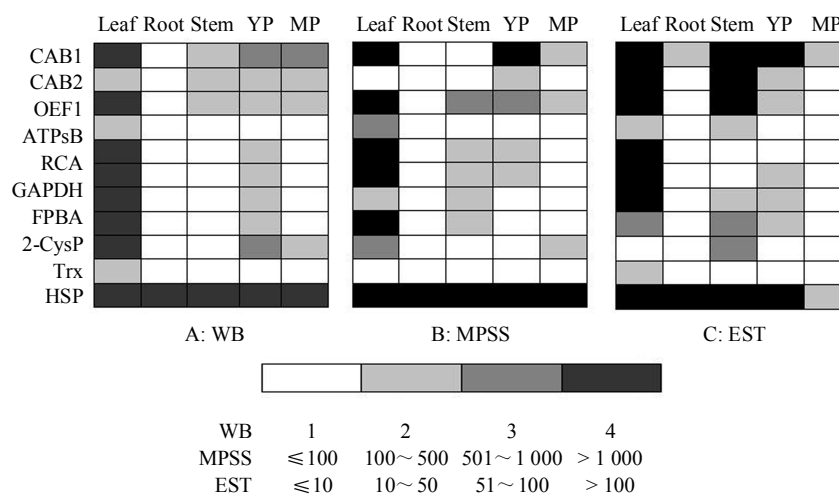


Fig. 5 Pattern comparison among Western blotting, MPSS and EST data

YP: Young panicle; MP: Mature panicle.

3 讨 论

对水稻叶绿体蛋白质的研究有助于其功能的阐释, 本研究中, 我们以 10 个叶绿体蛋白质为对象, 利用制备的特异抗体, 用 WB 分析比较了目标蛋白在 5 个水稻发育时期 11 种水稻组织中的表达, 并与 MPSS 和 EST 数据进行了比较。

实验系统地了解了这些叶绿体蛋白质的表达模式, 发现 10 个蛋白质均在叶片中表达, 且随着水稻的生长发育, 在叶片的表达有一定的上升趋势, 一般在开花期叶片中达到最高, 在灌浆期的叶片中表达下降, 与水稻叶片生长的形态特征相符。在根中, 这些蛋白质都不表达。与原初反应相关的 CAB1 和 CAB2、与电子传递相关的 OEE1 及与活性氧清除相关的 2-CysP 和 Trx 蛋白在茎中表达, 而在卡尔文循环中发挥作用的 RCA、GAPDH、FBPA 和 SBPase 蛋白在茎中不表达。在穗中, 这些蛋白质表达时序不同, CAB2 和 2-CysP 在穗发育的全程表达, CAB1 和 OEE1 在中后期表达, 而卡尔文循环中的蛋白质只在中期表达。

同时, 实验也揭示了许多蛋白质表达的重要特征。在本实验的目标基因中, CAB1 和 CAB2 蛋白是捕光复合体的组成元件, 是由核基因 *cab* 基因编码的同一家族的基因^[27], 实验结果揭示出二者具有相似的表达和修饰模式, 同时也清晰地展示了二者在拔节期幼穗中的表达区别。在 ATPsB 抗体的识别信号中(图 2d), 叶片和其他组织的表达模式明显不同, 为了探讨发生这种现象的原因, 我们对水稻基因组序列进行了分析, 发现该基因在水稻基因组中只有一个拷贝, 且在相邻序列中没有选择性拼接的证据, 所以目前只能推测这种现象不是由不同转录本引起的, 由此现象可以推测, ATPsB 依赖的光合磷酸化主要发生在叶片中, 在其他部位即使发生, 很可能与 ATPsB 相关的代谢过程也不相同。RCA 是一个核基因编码的有分子伴侣功能的 AAA+超家族的成员, 在水稻中有二个亚基, 是一个基因的二种拼接形式, 分子质量分别是 42 ku 和 47 ku^[28], 在本实验 WB 结果中显示了二条带, 分子质量与预测相吻合, 说明制备的抗体能同时识别同源的二个亚基。2-CysP 是植物叶绿体中高丰度表达的一种巯基过氧化物还原酶, 属于 Prx 家族, 是叶绿体过氧化物清除系统及调控 H₂O₂ 水平的关键因子^[25, 29-30], 在细胞中存在二聚体结构, WB 检测到了 2-CysP 在水稻叶片中的单体(25 ku)与二聚

体(50 ku)两种形式, 但以单体形式为主, 二聚体对应位置的条带比较弱。

卡尔文循环中碳固定相关的 4 种蛋白质具有几乎相同的表达模式, 这一结果一方面佐证了它们处于同一循环中的功能相关性及它们的前后衔接关系, 另一方面也清楚地表明了碳固定发生的组织部位, 这些蛋白质同时出现, 协同配合, 共同完成碳代谢过程。

本实验制备的抗体大都具有较好的特异性, 条带单一或主带清晰, 并与预测分子质量接近。这些抗体的获得将可用于相关研究, 如蛋白质定位、免疫共沉淀、检测逆境处理条件下蛋白质的表达变化等。随着更多叶绿体蛋白质对应抗体的积累, 我们可以更全面地开展水稻叶绿体蛋白质的研究。

本实验也为基于抗体的水稻蛋白质组学策略提供了初步数据, 结果直观且相对定量, 甚至可获得不同转录本、不同修饰状态及聚合体信息, 这一策略可对特定的生物过程相关蛋白质进行系统研究。基于传统的双向电泳-质谱的蛋白质组学策略, 已经获得了大量与发育、逆境抗性相关的蛋白质, 但是这种策略也有明显的限制, 如可分离鉴定的蛋白质数目有限, 并且可分离鉴定的主要是高丰度蛋白, 虽然可同时获得多个蛋白质的信息, 但很难对特定蛋白质的表达丰度、修饰情况有直观的了解, 再有, 因为分析成本很高, 很难对多个组织进行同步分析。相比而言, 基于抗体的蛋白质组学策略可以通过不断的积累, 以循序渐进的方式展开对生物全蛋白质组的分析。随着植物基因组序列和转录谱数据的积累, 相信基于抗体的蛋白质组学策略也会与传统的基于 2DE-MASS 的分析策略一样^[31], 为阐释基因功能和生物学过程机理做出贡献。

参 考 文 献

- [1] Knaff D B, Arnon D I. On two photoreactions in system II of plant photosynthesis. *Biochim Biophys Acta*, 1971, **2**(226): 400-408
- [2] Raines C A. The Calvin cycle revisited. *Photosynth Res*, 2003, **1**(75): 1-10
- [3] Mittler R, Vanderauwera S, Gollery M, *et al.* Reactive oxygen gene network of plants. *Trends Plant Sci*, 2004, **10**(9): 490-498
- [4] Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress, and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, **55**: 373-399
- [5] Ledford H K, Niyogi K K. Singlet oxygen and photo-oxidative stress management in plants and algae. *Plant Cell Environ*, 2005, **28**(8): 1037-1045
- [6] Voisenek L A, Bailey-Serres J. Plant biology: Genetics of high-rise

- rice. *Nature*, 2009, **7258**(460): 959–960
- [7] Cui S, Huang F, Wang J, *et al.* A proteomic analysis of cold stress responses in rice seedlings. *Proteomics*, 2005, **12**(5): 3162–3172
- [8] 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, **13** (22): 2824–2831
- [9] Kim D W, Rakwal R, Agrawal G K, *et al.* A hydroponic rice seedling culture model system for investigating proteome of salt stress in rice leaf. *Electrophoresis*, 2005, **23**(26): 4521–4539
- [10] Agrawal G K, Rakwal R, Yonekura M, *et al.* Proteome analysis of differentially displayed proteins as a tool for investigating ozone stress in rice (*Oryza sativa* L.) seedlings. *Proteomics*, 2002, **8**(2): 947–959
- [11] Salekdeh G H, Siopongco J, Wade L J, *et al.* Proteomic analysis of rice leaves during drought stress and recovery. *Proteomics*, 2002, **9**(2): 1131–1145
- [12] Mahmood T, Jan A, Kakishima M, *et al.* Proteomic analysis of bacterial-blight defense-responsive proteins in rice leaf blades. *Proteomics*, 2006, **22**(6): 6053–6065
- [13] Uhlen M, Ponten F. Antibody-based proteomics for human tissue profiling. *Mol Cell Proteomics*, 2005, **4**(4): 384–393
- [14] Ouyang S, Zhu W, Hamilton J, *et al.* The TIGR rice genome annotation resource: improvements and new features. *Nucleic Acids Res*, 2007, **35**(Database issue): D883–887
- [15] Yuan Q, Ouyang S, Wang A, *et al.* The institute for genomic research Osal rice genome annotation database. *Plant Physiol*, 2005, **1**(138): 18–26
- [16] Cao Y, Sun J, Zhu J, *et al.* PrimerCE: Designing primers for cloning and gene expression. *Mol Biotech*, 2010, **46** (2): 113–117 (DOI: 10.1007/s12033-010-9276-3)
- [17] Wang Y, Pi L, Chen X, *et al.* Rice XA21 binding protein 3 is a ubiquitin ligase required for full Xa21-mediated disease resistance. *Plant Cell*, 2006, **12**(18): 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 Y, 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, Database issue(34): D731–735
- [20] Boguski M S, Lowe T M, Tolstoshev C M. dbEST——database for "expressed sequence tags". *Nat Genet*, 1993, **4**(4): 332–333
- [21] Forbush B, Kok B. Reaction between primary and secondary electron acceptors of photosystem II of photosynthesis. *Biochim Biophys Acta*, 1968, **2**(162): 243–253
- [22] Fredricks W W. Regulation of electron transport in photosynthesis. *Biochem Biophys Res Commun*, 1968, **4**(31): 582–587
- [23] Baldry C W, Walker D A, Bucke C. Calvin-cycle intermediates in relation to induction phenomena in photosynthetic carbon dioxide fixation by isolated chloroplasts. *Biochem J*, 1966, **3**(101): 642–646
- [24] Fridlyand L E, Scheibe R. Regulation of the Calvin cycle for CO₂ fixation as an example for general control mechanisms in metabolic cycles. *Biosystems*, 1999, **2**(51): 79–93
- [25] Konig J, Baier M, Horling F, *et al.* The plant-specific function of 2-Cys peroxiredoxin-mediated detoxification of peroxides in the redox-hierarchy of photosynthetic electron flux. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **8**(99): 5738–5743
- [26] Yin L, Tao Y, Zhao K, *et al.* Proteomic and transcriptomic analysis of rice mature seed-derived callus differentiation. *Proteomics*, 2007, **5**(7): 755–768
- [27] Demmin D S, Stockinger E J, Chang Y C, *et al.* Phylogenetic relationships between the chlorophyll a/b binding protein (CAB) multigene family: an intra- and interspecies study. *J Mol Evol*, 1989, **3**(29): 266–279
- [28] To K Y, Suen D F, Chen S C. Molecular characterization of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase in rice leaves. *Planta*, 1999, **1**(209): 66–76
- [29] Mittler R. Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance. *Trends Plant Sci*, 2002, **9**(7): 405–410
- [30] Wood Z A, Poole L B, Karplus P A. Peroxiredoxin evolution and the regulation of hydrogen peroxide signaling. *Science*, 2003, **5619**(300): 650–653
- [31] Agrawal G K, Jwa N S, Rakwal R. Rice proteomics: ending phase I and the beginning of phase II. *Proteomics*, 2009, **4**(9): 935–963

Expression Profiling of Rice Chloroplast Proteins During Growth and Development*

BAI Hui^{1)**}, WANG Xian-Yun^{2)**}, CAO Ying-Hao²⁾, LI Xiao-Ming²⁾, LI Li-Yun²⁾,
CHEN Hao²⁾, LIU Li-Juan²⁾, ZHU Jian-Hui¹⁾, LIU Guo-Zhen^{1,2)***}

⁽¹⁾ Beijing Institute of Genomics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 101300, China;

²⁾ College of Life Sciences, Agricultural University of Hebei, Baoding 071001, China)

Abstract In plants, chloroplast is the key organelle for the photosynthesis, the knowledge about biological processes in chloroplast has been accumulated. However, limited information exists on the expression of chloroplast proteins. To investigate the expression profiling of rice chloroplast proteins in different growth and developmental stages and provide a pilot experiment for rice antibody-based proteomics. To address this questions, ten rice chloroplast genes were chosen and antibodies were generated using proteins expressed in *E. coli* or epitope peptides synthesized *in vitro* as immunogen, protein expression profiling were investigated by Western blotting for root, stem, leaf and panicles at five developmental stages. The results indicated that all chloroplast proteins tested were expressed in leaf, but not detectable in root. The photosynthesis primary reaction protein CAB1 and CAB2, the electron transport protein OEE1, and the ROS scavenging-related proteins 2-CysP and Trx were expressed in stem, but four carbon fixation proteins RCA, GAPDH, FBPA and SBPase, which involved in Calvin cycle, were not detected in stem. In panicle, the chloroplast proteins showed different expression patterns, CAB2 and 2-CysP were expressed at all stages during panicle growth and development, CAB1 and OEE1 were expressed at late stage, and the four proteins involved in Calvin cycle were expressed only in the middle stage. Interestingly, four proteins in Calvin cycle showed the same expression patterns, supporting their cohesive relationship. In addition, the data revealed possible clues of post-translational modification, dimer and different forms of transcripts. Comparison analysis between the profiling of gene transcription and translation revealed parallel phenomena; however, they are quite different at least in some instances. Taking together, this experiment revealed the expression patterns of rice chloroplast proteins in a direct and relative quantitative way, provided helpful information for better understanding their function and also provided a preliminary proof for the concept of a rice antibody-based proteomics strategy.

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

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2010.00173

*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, 2006CB910105).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

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

Received: April 5, 2010 Accepted: May 25, 2010

附录

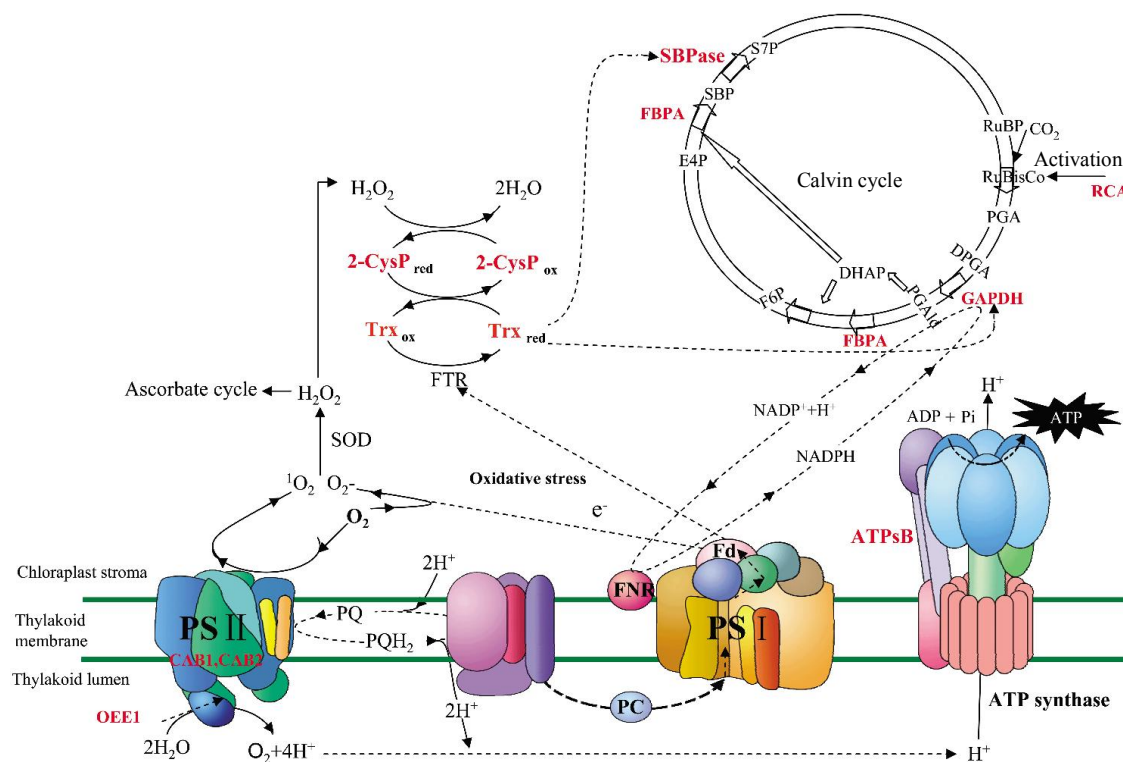


Fig. S1 The locations of target chloroplast proteins in photosynthesis and ROS-scavenging pathways
Target genes were highlighted by red letter.

Table S1 Number of MPSS signature tags of chloroplast proteins

	Leaf	Root	Stem	YP	MP
CAB1	8 213	1	7	3 151	2 229
CAB2	8	0	0	324	239
OEE1	9 306	0	546	746	896
ATPsB	4 846	0	28	5	6
RCA	17 794	0	269	116	83
GAPDH	7 825	0	412	228	26
FPBA	1 734	0	131	16	0
2-CysP	3 503	74	57	75	1 278
Trx	474	0	22	0	0
HSP	11 307	11 858	2 741	4 265	23 468

Table S2 Number of ESTs of chloroplast proteins

	Leaf	Stem	Root	YP	MP
CAB1	356	940	15	128	14
CAB2	104	158	4	31	1
OEE1	288	624	6	47	6
ATPsB	17	13	2	7	1
RCA	427	7	0	4	1
GAPDH	201	6	1	12	1
FPBA	524	50	2	10	6
2-CysP	82	58	0	12	0
Trx	14	7	0	1	0
HSP	235	105	293	282	39