

水稻强弱势籽粒核酸和蛋白质含量的差异

黄升谋* 邹应斌

湖南农业大学水稻科学研究所, 长沙 410128

提要 水稻抽穗当天, 强势粒(上部一次枝梗籽粒)子房中总RNA、mRNA含量都高于弱势粒(下部二次枝梗籽粒), 蛋白质含量却低于弱势粒。抽穗后第5天, 强势粒子房中总RNA含量仍然高于弱势粒, mRNA含量两者差异不大, 蛋白质含量依然低于弱势粒。抽穗后0~5 d, 强势粒子房中总RNA、mRNA含量变化不大, 蛋白质含量下降显著; 弱势粒子房中总RNA含量上升显著, mRNA含量、蛋白质含量变化不大。抽穗当天和抽穗后第5天, 强势粒子房中有一些小分子rRNA带出现; 弱势粒则相反, 小分子rRNA基本上看不见。

关键词 强势粒; 弱势粒; 总RNA; mRNA; 蛋白质

Difference of Nucleic Acid and Protein Contents in Superior Grains and Inferior Grains of Rice

HUANG Sheng-Mou*, ZOU Ying-Bin

Rice Research Institute, Hunan Agricultural University, Changsha 410128

Abstract In the heading day of rice, the contents of the total RNA, mRNA in the superior grains (upper primary branches grains) ovaries were higher than that in the inferior grains (lower secondary branches grains) ovaries, whereas, protein content lower than that of it. In the fifth day after heading, the contents of the total RNA in the superior grains ovaries were still higher than that in the inferior grains ovaries, the difference of the mRNA contents was not significant, protein contents lower than that of it. From the first day to the fifth day after heading, the contents of the total RNA, mRNA in the superior grains ovaries varied little, protein content declined significantly, the contents of the total RNA in the inferior grains ovaries increased, mRNA and protein contents varied little. There were small molecule rRNA in the superior grains ovaries in the heading day and the fifth day after heading, but could hardly be seen in the inferior grains ovaries.

Key words superior grains; inferior grains; total RNA; mRNA; protein

水稻强弱势粒的结实率和充实度差异很大, 有的达25%左右^[1]。由于弱势粒结实率和充实度较低, 限制了水稻高产潜力的发挥。因此, 不少学者从植物激素及与籽粒灌浆有关的酶等方面对强弱势粒进行了一些生理生化特性的研究^[2~11], 揭示了强弱势粒的结实率和充实度差异的一些生理原因。然而, 关于强弱势粒核酸和蛋白质代谢差异的研究尚未见报道。一般认为生理差异主要是由于基因的差异和基因表达的数量和质差异即核酸和蛋白质含量和种类差异造成的。据此, 本文通过剥取水稻子房, 测定其中总RNA、mRNA和蛋白质含量, 并采用甲醛-琼脂糖凝胶电泳技术, 检测强弱势粒中核酸的组成差异, 以揭示水稻强弱势粒结实率和充实度差异的原因。

材料与方法

实验材料为水稻(*Oryza sativa*)品种两优培九(培矮64s/9311)。于单穗抽穗当天、第5天各取整齐一致的200穗, 分别剥取强势粒(上部3个一次枝梗上抽穗当天开花的籽粒)和弱势粒(下部3个二次枝梗上除去顶粒后的籽粒)的子房, 立即投入液氮中, 置于-70℃冰箱保存。

收稿 2003-01-03 修定 2003-11-13

资助 国家“九五”重点攻关项目(99-022)、湖南省自然科学基金(01JJY2035)和湖北省教育厅中青年自然科学基金(2002)项目。

* 现在湖北孝感学院工作(湖北孝感 432100), E-mail: huangsmou@yahoo.com.cn.

总RNA的提取按Qiagen公司的RNeasy Plant Mini kit的说明书进行。先取100 mg样品放入液氮中研磨并匀浆, 后加入450 μ L的胍基硫氢酸缓冲液, 并涡旋振荡, 使核酸酶变性失活, 以得到完整的核酸。把样品液移入 QIAshredder 旋转柱中, 在20 $^{\circ}$ C下以18 000 $\times g$ 离心2 min, 上清液中加入225 μ L的乙醇, 提供硅胶膜束缚核酸的条件, 把样品加入到含有硅胶膜的RNeasy mini 旋转柱中, 总RNA吸附到硅胶膜上, 用缓冲液洗脱去各种污染物。最后用无核糖核酸酶的水把总RNA从RNeasy mini 旋转柱中洗脱下来。用DU-640核酸蛋白分析仪测定其含量和纯度, 以甲醛-琼脂糖凝胶电泳法对其进行电泳, BIO-RAD Gel Doc 1000凝胶成像系统照相。

mRNA的分离和纯化按Qiagen公司oligotexTM Kit说明书进行。在250 μ L的总RNA样品中加入250 μ L的OBB缓冲液和15 μ L的oligotex悬浮液并混合均匀, 在70 $^{\circ}$ C水浴中温育3 min, 室温下放10 min, 使mRNA的Poly-A与oligotex粒子杂交, 然后在20 $^{\circ}$ C下以18 000 $\times g$ 离心2 min, 以沉淀oligotex-mRNA复合物。用400 μ L的OW2缓冲溶液重新悬浮oligotex-mRNA并转移到一个小旋转柱中, 在20 $^{\circ}$ C下以18 000 $\times g$ 离心1 min, 重复此步骤1次。最后加OEB缓冲液于小旋转柱中, 在20 $^{\circ}$ C下以18 000 $\times g$ 离心1 min, 把mRNA从oligotex-mRNA中洗脱下来。用DU-640核酸蛋白分析仪测定其含量和纯度。

提取蛋白质时, 准确称取0.5 g样品, 放入研钵中, 加入2 mL 0.1 mol \cdot L⁻¹ NaOH, 研磨成匀浆, 转入到10 mL的离心管中, 再用6 mL 0.1mol \cdot L⁻¹ NaOH分3次洗涤研钵, 洗液一并转入到10 mL的离心管中, 用玻棒搅拌, 放置30 min, 此期

间间断搅拌数次, 以4 500 $\times g$ 离心15 min, 上清液转入到50 mL容量瓶中, 用蒸馏水定容至刻度, 摇匀, 得可溶性蛋白。沉淀用70%的乙醇浸泡30 min, 重复上述步骤, 得醇溶蛋白。

测定蛋白质含量时, 吸取0.1 mL提取液, 放入10 mL具塞刻度玻璃试管中, 加5 mL考马斯亮蓝G-250试剂, 混匀, 放置2 min, 置于10 mm光径的比色杯中, 于595 nm波长处用DU-640核酸蛋白分析仪测定OD值, 根据标准曲线计算出蛋白质的含量。

实验结果

1 强弱势籽粒总RNA、mRNA和蛋白质含量的变化

从表1可知, 提取的总RNA、mRNA纯度都达1.9以上, 达到了两者的纯度要求。水稻抽穗当天, 强势粒中总RNA、mRNA含量都高于弱势粒, 蛋白质含量却低于弱势粒。抽穗后第5天, 强势粒中总RNA含量仍然高于弱势粒, mRNA含量两者差异不大, 蛋白质含量依然低于弱势粒。抽穗后0~5 d, 强势粒总RNA、mRNA含量变化不大, 蛋白质含量下降显著, 弱势粒总RNA含量上升显著, mRNA含量、蛋白质含量变化不大。不论是强势粒还是弱势粒, 从抽穗到抽穗后5 d, 其总RNA、mRNA和蛋白质单粒含量都有显著的增加, 但其含量却并非总是同步增加。可见强弱势粒抽穗后基因表达活性增强或启动了新的基因表达, 同时也说明基因表达除受转录调节外, 可能还受RNA加工、运输, mRNA寿命、翻译效率等转录后调节控制。

2 总RNA的种类差异

植物总RNA包括rRNA、tRNA、mRNA和

表1 强弱势籽粒中总RNA、mRNA和蛋白质含量

Table 1 The contents of total RNA, mRNA and protein of the superior and inferior grains

籽粒	抽穗后时间/d	总RNA		mRNA		蛋白质含量/%
		纯度	含量/ μ g (100 mg) ⁻¹	纯度	含量/ μ g (100 mg) ⁻¹	
强势粒	0	1.98	48.9	1.90	0.43	3.8
	5	1.96	45.6	1.92	0.40	3.1
弱势粒	0	2.01	28.5	1.91	0.35	4.7
	5	1.98	36.6	1.96	0.38	4.2

核内小分子RNA。tRNA、mRNA和核内小分子RNA分子较小,含量较低,而rRNA分子较大,含量较高,其含量和种类反映了细胞蛋白质合成的状况。两优培九强弱势粒子房总RNA甲醛-琼脂糖凝胶电泳如图1所示:

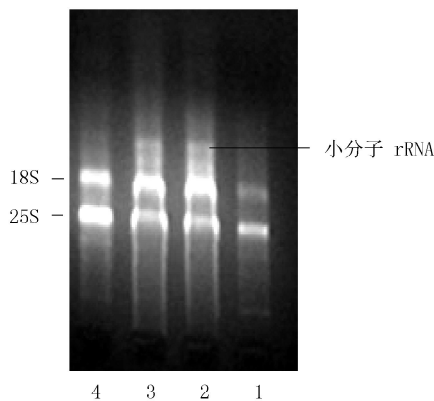


图1 强弱势粒子房中总RNA的
甲醛-琼脂糖凝胶电泳

Fig.1 The formaldehyde-agarose gel electrophoresis of the total RNA in the superior and inferior grains ovaries

第1、2分别为抽穗当天强弱势粒子房中总RNA;第3、4分别为抽穗后第5天强弱势粒子房中总RNA。

由图1可知,总RNA降解较少,抽穗当天,强势粒子房中18S rRNA带较弱势粒浓,且18S带上方有一些小分子rRNA带出现;弱势粒则相反,18S rRNA带较淡,小分子rRNA基本上看不见。抽穗后第5天,强势粒子房中总RNA与抽穗当天相似,弱势粒子房中25S rRNA和18S rRNA带较浓,但小分子rRNA仍看不见。可见强势粒基因表达过程中小分子rRNA含量先于弱势粒增加,有利于核糖体的组装,从而有利于蛋白质的合成。

讨 论

从本文结果可知:(1)水稻强弱势粒基因表达即核酸和蛋白质的代谢存在着差异,抽穗当天,强势粒子房中总RNA、mRNA含量都高于弱势粒,并且有小分子rRNA出现,而弱势粒没有。这说明抽穗后,强势粒与籽粒灌浆有关的基因优先大量转录,翻译出与籽粒灌浆有关的蛋白质,所以强势粒灌浆较早,结实率和充实度较高;而弱势粒则相反,抽穗后,由于没有立即启

动与籽粒灌浆有关的基因转录,不能产生相应的功能蛋白质,所以弱势粒灌浆较晚,结实率和充实度较低。我们认为,强势粒之所以能优先启动与灌浆有关的基因表达,可能与其开花受精较早有关。强势粒抽穗当天即开花受精,受精启动了新的基因转录;而弱势粒开花受精晚7d左右,所以其启动与灌浆作用有关的基因表达较迟。这种基因表达的时序差异所导致的籽粒灌浆期营养差异可能是强弱势粒结实率和充实度差异的原因之一。(2)抽穗当天,强势粒总RNA、mRNA含量都高于弱势粒,蛋白质含量低于弱势粒;强弱势粒开花后第0~5天,总RNA、mRNA含量变化不大,蛋白质含量下降显著。这可能是由于开花受精(强势粒抽穗当天即开花受精,而弱势粒开花受精作用要晚7d左右)后,籽粒开始灌浆,碳水化合物大量进入,籽粒总RNA、mRNA和蛋白质含量相对下降,但以单粒计算的含量则增加。

参考文献

- 1 黄升谋, 邹应斌. 杂交水稻W₆₁₅₄₅/早特青结实率的研究. 湖南农业大学学报, 2001, 27(2): 87~88
- 2 顾世梁, 朱庆森, 杨建昌等. 不同水稻材料籽粒灌浆特性的分析. 作物学报, 2001, 27(1): 7~14
- 3 杨建昌, 彭少兵, 顾世梁等. 水稻结实期籽粒和根系中玉米素与玉米素核苷含量的变化及其与籽粒充实的关系. 作物学报, 2001, 27(1): 35~42
- 4 王志琴, 杨建昌, 朱庆森等. 亚种间杂交稻籽粒充实不良的原因探讨. 作物学报, 1998, 24(6): 782~786
- 5 杨建昌, 王志琴, 朱庆森等. ABA与GA对水稻籽粒灌浆的调控. 作物学报, 1999, 25(3): 341~347
- 6 杨建昌, 苏宝林, 王志琴等. 亚种间杂交稻籽粒灌浆特性及其生理研究. 中国农业科学, 1998, 31(1): 7~14
- 7 杨建昌, 刘立军, 王志琴. 稻穗颖花开花时间对胚乳发育的影响及其生理机制. 中国农业科学, 1999, 32(3): 44~51
- 8 Jenner CF, Siwed K, Hawker J.S. The synthesis of [¹⁴C] starch from [¹⁴C] sucrose in isolated wheat grains is dependent upon the activity of soluble starch synthase. Aust J Plant Physiol, 1993, 20: 329~335
- 9 Keeling PL, Bacon PJ, Holt DC. Elevated temperature reduces starch deposition in wheat endosperm by reducing the activity of soluble starch synthase. Planta, 1993, 191: 342~348
- 10 Nakamura Y, Yuki K, Park SY. Carbohydrate metabolism in the developing endosperm of rice grains. Plant Cell Physiol, 1989, 30(6): 833~839
- 11 Smith AM, Denyer K, Martin CR. What controls the amount and structure of starch in storage organs? Plant Physiol, 1995, 107: 673~677