

水稻种子酵母双杂交体系的构建及种子特异表达蛋白 ONAC023 互作蛋白的鉴定

唐立群,黄世文,侯雨萱

(水稻生物学国家重点实验室/中国水稻研究所稻作技术研究与发展中心,浙江杭州 310006)

摘要:酵母双杂交是常用的蛋白-蛋白检测技术。以水稻受精 5 d 的幼嫩种子为材料,构建了适用于水稻种子发育相关蛋白的互作蛋白酵母双杂交筛选平台,cDNA 文库容量达到 1.1×10^6 ,平均插入大小约为 750 bp,开发了改良的酵母菌落 PCR 方法,用于文库插入片段的扩增,大大提高了筛选效率。NAC 是植物特有的一类转录因子,在植物发育、抗逆等多个方面发挥着重要功能。RT-PCR 结果显示,NAC 家族成员 ONAC023 在种子中特异表达,可能调控种子早期发育。以 ONAC023 为诱饵,成功地筛选到 21 个互作蛋白候选基因,其中包含 1 个 DNA binding protein,推测其可能是 ONAC023 蛋白复合物的成员。

关键词:水稻;酵母双杂交;种子发育;NAC

中图分类号: S511.035.1 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)09-0016-04

真核生物中的大部分蛋白都是以复合物的形式存在并工作。一些蛋白在不同的生长发育时期通过与不同的蛋白互作,形成蛋白复合物来行使不同的生物学功能,从而保证生物体高效运行。研究蛋白-蛋白之间的互作,进而找出功能蛋白复合物的其他成员,一直是生物学研究的重要内容。目前,常用的研究蛋白-蛋白互作的方法有酵母双杂交、免疫共沉淀、GST pull-down、双分子荧光互补等技术,其中以酵母双杂交方法应用最为广泛。酵母双杂交技术最早于 1989 年由 Fields 提出,其基本原理是酵母转录因子 GAL4 具有 BD、AD 2 个结构域,BD 与 AD 单独作用并不能激活转录反应,但当二者在空间上充分接近时,则呈现完整的 GAL4 转录因子活性并可激活 UAS 下游启动子,使启动子下游基因得到转录。因此,将要检测互作的 2 个蛋白分别与 BD、AD 融合表达,当这 2 个蛋白存在互作时,BD 才能与 AD 在空间上靠近,进而激活下游报告筛选基因的表达。相比其他蛋白互作检测技术,酵母双杂交具有众多优点:快速高效,无需提取或纯化目标蛋白质;在酵母活体内进行,一定程度上代表了真核生物细胞的活体状态;检测的结果可以是基因表达产物的积累效应,因而可检测存在于蛋白质之间的微弱或暂时的相互作用。此外,通过构建所需组织器官的酵母双杂交筛选文库,研究人员可以一次性筛选多个与“诱饵”互作的蛋白。目前,已有大量的商业化酵母双杂交系统试剂盒可供选择,其中 Clontech 公司最新的 Make Your Own “Mate & Plate™” Library System 因具有高效、简单、易操作的特点而被广泛使用。这一体系运用该

公司特有的 SMART cDNA 合成技术在合成的 cDNA 两端添加重组位点接头,然后将合成的 cDNA 与线性化的载体共转化到酵母菌株 Y187 中完成体内重组,得到酵母双杂交 cDNA 文库。该体系的另一个特点是利用酵母不同菌株的交配 (mating) 技术来筛选文库,操作简单易行。Kanneganti 等在研究水稻基因家族与胁迫相关的蛋白基因 *OsiSAP8* 功能时,发现其功能由 A20、AN1 这 2 个锌指域相互作用而对水稻生理功能进行调控^[1]。Menke 等运用酵母双杂交法研究烟草转录因子 WRKY1 功能,结果表明,其与烟草 HR-like 细胞的死亡密切相关^[2]。崔红军等在研究玉米的根部基因功能时也提及了这一技术^[3]。转录因子是一群能与基因 5' 端上游特定序列专一性结合,从而保证目的基因以特定的强度在特定的时间与空间表达的蛋白质分子。转录因子依据结构域的保守性可区分为数百个不同的家族,在生物体的生长发育过程中起着重要的调控作用。NAM、ATAF、CUC (NAC) 类转录因子是一类植物特有的家族,其所有成员在 N 端都含有 1 个保守的 DNA 结合结构域,在 C 端则各不相同^[4-7]。目前,关于 NAC 转录因子的功能研究已有大量报道^[8-9]。Zhu 等研究发现,番茄的 SINAC4 调控果实的成熟及类胡萝卜素的沉积^[10]。Hu 等发现,SNAC1 可以通过调控水稻保卫细胞的闭合来提高植株的耐旱性,可能是干旱反应的关键调控因子^[11]。过量表达 SNAC1 还能提升小麦、棉花的抗逆性^[12]。水稻是我国主要的粮食作物,开展水稻基因功能研究,了解水稻内部各个基因、基因与外界的互作关系,对于保障国家粮食安全意义重大。本研究利用改良的种子 RNA 提取方法得到高质量的总 RNA,采用 Make Your Own “Mate & Plate™” Library System 建立来源于水稻种子的酵母双杂交体系,成功筛选到 1 个种子中特异表达的 NAC 转录因子 ONAC023 的互作蛋白。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

水稻品种日本晴种植于中国水稻研究所试验田,取受精

收稿日期:2014-05-07

基金项目:国家科技支撑计划(编号:2012BAD19B03);国家转基因生物新品种培育专项(编号:2011ZX08010-005);中国农业科学院科技创新工程。

作者简介:唐立群(1987—),女,湖南东安人,硕士,从事水稻基因功能研究。E-mail:liquntang2013@126.com。

通信作者:侯雨萱,博士,助理研究员,从事水稻基因功能研究。E-mail:hoyuxuan@caas.cn。

5 d 的种子作为材料。酵母菌株 Y187 与 Y2HGold 以及载体 pGBKT7、pGADT7 - Rec、Make Your Own “Mate & Plate™” Library System、Yeastmaker™ Yeast Transformation System 2 均购自 Clontech 公司。RNA 提取试剂 Trizol 购自上海鼎国生物技术有限公司。

1.2 RNA 的提取和反转录

取自然受精 5 d 的种子,采用 SDS - Trizol 法抽提总 RNA,简要步骤如下:将 200 mg 种子材料置于 1.5 mL 离心管中,加 300 μ L SDS RNA extraction buffer (50 mmol/L pH 值为 8.0 Tris - HCl,150 mmol/L LiCl,5 mmol/L EDTA,1% SDS),用塑料研磨棒磨成匀浆后,加入等体积苯酚:氯仿(1:1)混合液抽提,取上清加入 1 mL Trizol 抽提 RNA。总 RNA 样品用 2 μ L DNAaseI (宝生物大连工程有限公司)37 $^{\circ}$ C 处理 30 min 后热灭活。用 NanoDrop2000 分光光度计测量 RNA 的 $D_{260\text{nm}}/D_{280\text{nm}}$ 、 $D_{260\text{nm}}/D_{230\text{nm}}$ 值及浓度,电泳检测 RNA 的质量。RT - PCR 所用 cDNA 的反转录方法参照 ReverTra Ace qPCR RT 的试剂盒说明书[东洋纺(上海)生物科技有限公司]。

1.3 酵母双杂交 cDNA 文库的构建

取 2 μ g RNA 为模板,参照 Clontech 试剂盒的要求,反转录成双链 cDNA,LD - PCR 扩增双链 cDNA,并用 CHROMASPIN™ TE - 400Column 纯化,去除小于 400 bp 的片段。将 5 μ g cDNA 与 3 μ g pGADT7rec 载体参照 Yeastmaker™ Yeast Transformation System 2 试剂盒的要求转入酵母 Y187 菌株中。经 SD/-Leu 平板筛选获得阳性转化子,再用 freezing medium 收集菌体,得到 freezing medium 酵母悬浮液,将文库的悬浮液分装在 2 mL 无菌离心管中,置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱中长期保存。

1.4 文库插入片段检测

在上述 SD/-Leu 平板上随机挑取 30 个单菌落,再用 YP-DA 液体培养基扩大培养,最后采用改良的酵母菌落 PCR 方法检测插入片段的大小分布,具体步骤如下:取 200 μ L 酵母培养液,离心收集菌体后加入 45 μ L sorbitol buffer 及 5 μ L Zymolyase (上海索莱宝生物科技有限公司),悬浮菌体后 37 $^{\circ}$ C 处理 2 h,然后加入 150 μ L 去离子水稀释,95 $^{\circ}$ C 处理 20 min,再置于冰上冷却 5 min,取 1 μ L 产物作为模板,用引物 PGADf、PGADr 进行 PCR 扩增,检测文库插入片段的大小(引物序列分别为 PGADf:5' - CTATTCGATGATGAAGATAC - CCCACCAAACCC - 3'; PGADr:5' - GTGAACCTGCGGGGTTT TTCAGTATCTACGAT - 3'),反应体系为:1 \times KOD Fx buffer,0.5 mmol/L dNTP 2.5 μ L,正反引物各 0.1 μ mol/L,KOD Fx enzyme 2 U,去离子水补足总体积至 50 μ L。扩增条件为:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 45 s,68 $^{\circ}$ C 延伸 3 min,扩增 35 个循环;68 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。反应结束后,用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5 ONAC023/pGBKT7 载体的构建及酵母转化

以水稻种子 cDNA 为模板,用 YONAC023f、YONAC023r 引物扩增出 ONAC023 的 759 bp 完整编码序列(YONAC023f:5' - CGGAATTCATGGCGATGACACCGCAGCT - 3'; YONAC023r:5' - CGGGATCCCTAGCCACCATGGTTTCTTT - 3'),PCR 产物纯化后经 EcoRI、BamHI 双酶切,连接克隆到 pGBKT7 载体上。将测序验证后的载体质粒按 Yeastmaker™ Yeast Trans-

formation System 2 试剂盒的要求转入到酵母 Y2HGold 菌株中,经 SD/-Trp 筛选,采用“1.4”中所述酵母菌落 PCR 方法验证阳性克隆。

1.6 酵母双杂交文库的筛选和互作蛋白基因的测定

参照 Clontech 公司 Matchmaker™ Gold Yeast Two - Hybrid System 的说明书完成文库和诱饵蛋白 ONAC023/pGBKT7 的交配,酵母杂合子悬浮在 10 mL 0.5 \times YPDA 培养基中,取 1 μ L 悬浮液稀释后涂在 SD/-Leu/-Trp 培养基中用于计算筛选效率,其余杂合子酵母菌全部涂在含 250 ng/mL Aba 的 SD/-Leu/-Trp 培养基上,对于初筛得到的阳性克隆重新转移到含 250 ng/mL Aba 及 40 μ g/mL x - α - Gal 的 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/培养基上进一步筛选,能在 4 d 内长出并显蓝色的单菌落即为互作的阳性克隆。采用“1.4”所述的酵母菌落 PCR 方法扩增出互作蛋白的基因序列,纯化后用 T7 引物测序即可得到基因序列。

2 结果与分析

2.1 来源于水稻种子 cDNA 文库的构建

采用 SDS - Trizol 抽提受精 5 d 的水稻种子总 RNA,此法能有效去除淀粉、储藏蛋白等杂质,提高抽提 RNA 的质量。由 $D_{260\text{nm}}/D_{280\text{nm}} = 1.86$ 、 $D_{260\text{nm}}/D_{230\text{nm}} = 1.91$ 可知,抽提的 RNA 质量较好,没有产生降解以及多聚糖的污染。图 1 是总 RNA 样品的琼脂糖凝胶电泳,可见水稻种子的 3 条带比较清晰,没有出现扩散、拖尾等降解情况,且 28S 条带明显比 18S 条带亮,进一步确定 RNA 质量适合文库的反转录要求。水稻种子总 RNA 反转录为单链 cDNA,再以单链 cDNA 为模板合成双链 cDNA,再将此 cDNA 过 Chromaspin TE - 400Column 柱子纯化,除去杂质、小片段 cDNA。由图 2 可知,纯化前 cDNA 的一些小片段已被有效去除。将纯化后的双链 cDNA 与载体 pGADT7 - Rec 共转化到酵母感受态细胞中完成体内同源重组。将 1 μ L 转化子分别稀释 10、100、1 000 倍并涂在 SD/-Leu 平板上,统计平板培养基上的酵母菌落数量(图 3),结果表明,文库的容量为 1.1×10^6 库的容量,转化结果较理想,可以满足下一步酵母双杂筛选的需要。为了检测文库插入片段的大小及重复性,笔者随机挑取 30 个文库转化子,通过酵母菌落 PCR 反应检测文库插入片段大小。电泳结果显示,插入片段平均大小约 750 bp(图 4)。

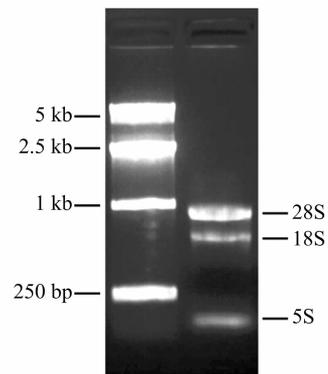
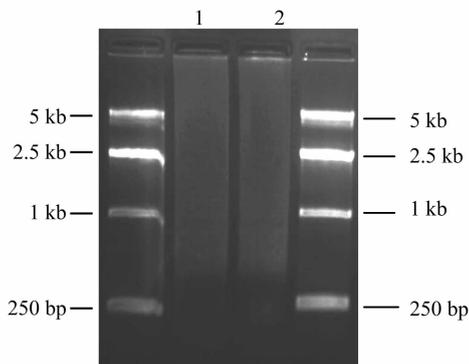


图1 SDS-Trizol法提取的高质量水稻种子总RNA

2.2 ONAC023 是一个种子特异表达转录因子

通过对水稻 140 个 NAC 基因家族成员的公共表达谱数



泳道1: 纯化前cDNA; 泳道2: 纯化后cDNA

图2 纯化前、纯化后的合成水稻种子双链cDNA

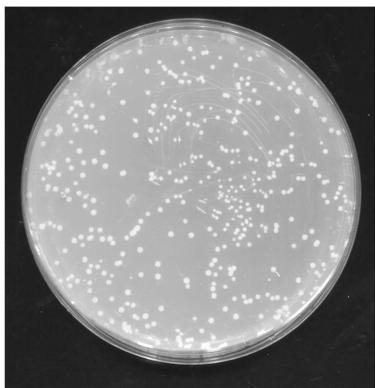


图3 SD/-Leu 培养基上生长的cDNA文库菌落

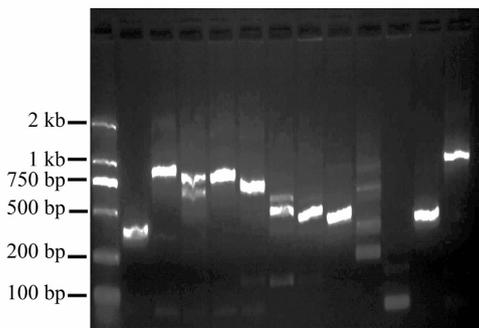
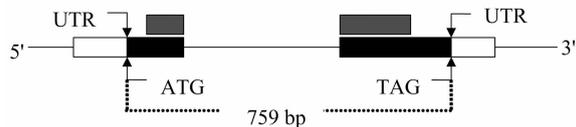


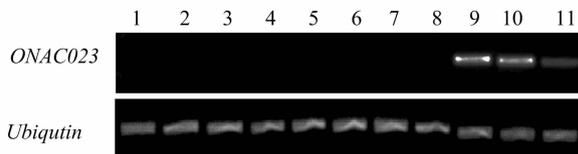
图4 酵母菌落 PCR 检测 cDNA 文库中部分插入片段的大小

据进行分析,笔者发现了1个种子特异表达转录因子 ONAC023(图5)位于水稻2号染色体上,基因座 LOC_Os02g12310 包含2个外显子、1个内含子,CDS全长759 bp。NCBI上的 conserved domain 检索显示,12~143位氨基酸是一个保守的 NAM 结构域。为了验证 ONAC023 的种子特异表达模式,笔者分别以愈伤、根、茎、叶、叶鞘、幼穗、受精3 d种子、受精7 d种子、受精15 d种子的cDNA为模板,进行 RT-PCR 扩增检测其时空表达模式。如图6所示,ONAC023 仅在种子中表达,其中在受精3 d时表达量最高,在受精15 d的种子中最为微弱,在其他组织中并没有检测到扩增信号。因此笔者认为,ONAC023 是一个种子特异表达的 NAC 类转录因子,这样的表达模式也暗示着 ONAC023 可能在种子发育的早期行使重要功能。



细线代表内含子序列,黑色方框代表外显子序列,深灰色方框代表NAM保守结构域

图5 ONAC023 基因结构简图



1—愈伤;2—根;3—茎;4—叶;5—叶鞘;6—早期幼穗(1~2 cm);7—中期幼穗(3~5 cm);8—后期幼穗(约15 cm);9—受精3 d的种子;10—受精7 d的种子;11—受精15 d的种子

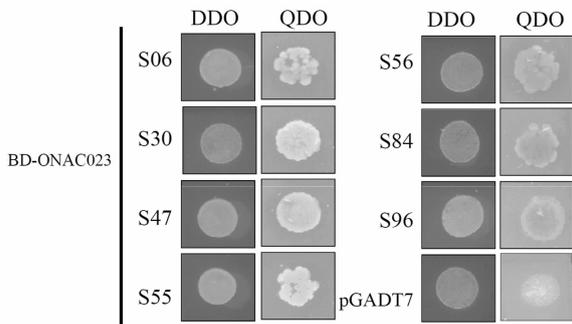
图6 RT-PCR 检测 ONAC023 在水稻不同组织器官中的表达模式

2.3 ONAC023 互作蛋白的筛选

为了验证 ONAC023 是否存在自激活,将构建好的 BD-ONAC023 与 pGADT7 空载体转化到 Y2HGold 菌株中。结果显示,BD-ONAC023 与 pGADT7 成功共转化的菌落并不能在含有 Aba(250 ng/mL)的 QDO 培养基上存活,表面 ONAC023 不存在自激活特性。采用酵母交配(mating)的筛选策略,笔者将表达 BD-ONAC023 诱饵蛋白的 Y2HGold 菌株以及包含种子 cDNA 文库的 Y187 菌株混合培养 24 h,再将酵母杂合子均匀涂布在 SD/-Leu/-Trp/Aba(250 ng/mL)平皿上,进行第1轮初筛选,初筛选共得到97个阳性单菌落。为验证初步筛选结果,每个阳性单菌落被挑到更高筛选压的 SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/Aba(250 ng/mL)/X-α-Gal 平皿上进行筛选,能够在2 d内长出显蓝色的菌落即被认为是与 ONAC023 互作的阳性克隆,生长速度与蓝色深浅则作为互作强度的判断依据。第2轮高压筛选排除61个假阳性克隆(图7)。为了得到这些互作蛋白的基因序列,笔者采用酵母菌落 PCR 方法扩增出 cDNA 片段。扩增带型一致的克隆被认为是同一基因,只挑选其中1个,将 PCR 产物纯化后进行测序。经 Blast 序列比对,最终筛选到21个与 ONAC023 互作的蛋白基因,具体基因 ID 及功能注释如表1所示。这些互作的蛋白包括储藏蛋白质如谷蛋白、Cupin 蛋白,具有分子伴侣功能的异构酶 peptidyl-prolyl cis-trans isomerase 以及一些与代谢相关的酶类,如烯醇酶 Enolase、乙醇脱氢酶等。

3 结论与讨论

高质量的 RNA 是构建 cDNA 文库的第一步,直接影响文库构建的质量。因发育的种子中含有大量的淀粉及储藏蛋白质,采用常规的 Trizol 法分离得到的 RNA 往往含有大量的多糖及蛋白成分,多糖与 RNA 被乙醇共沉淀后影响 RNA 的溶解及后续的克隆操作。本研究采用改良的 SDS-Trizol 法,利用 SDS 和酚仿混合物多次抽提,去除大量的淀粉、蛋白污染,然后再沿用传统的 Trizol 法提取得到纯净的 RNA,可以用于各种分子克隆操作。作为广泛使用的蛋白-蛋白互作研究方法,酵母双杂交是一项常规性的操作^[13-14]。本研究在商业化



DDO: SD/-Leu/-Trp培养基; QDO: SD/-Leu/-Trp/-His/-Ade/-Aba+(250 ng/mL)/X- α -Gal培养基。

图7 酵母双杂交筛选到的ONAC023互作蛋白克隆

表1 ONAC023 互作蛋白基因列表

ID	TIGR ID	功能注释
S06	LOC_Os03g14450	enolase
S11	LOC_Os03g19380	calvin cycle CP12
S16	LOC_Os08g04690	expressed protein
S20	LOC_Os03g14530	S10/S20 domain containing ribosomal protein
S21	LOC_Os06g37080	L - ascorbate oxidase precursor
S24	LOC_Os07g01620	dirigent
S26	LOC_Os06g10660	lys M domain - containing GPI - anchored protein I precursor
S30	LOC_Os01g55630	glutelin
S33	LOC_Os08g03640	60S acidic ribosomal protein PO
S42	LOC_Os02g52290	peptidyl - prolyl cis - trans isomerase
S47	LOC_Os05g01050	DNA binding protein
S49	LOC_Os11g41130	vacuolar protein sorting associated protein 26
S55	LOC_Os07g09060	aldehyde dehydrogenase
S56	LOC_Os10g26060	glutelin
S60	LOC_Os04g35300	SLLI
S66	LOC_Os01g19840	60S ribosomal
S70	LOC_Os03g25350	LTPL36 protease inhibitor
S83	LOC_Os03g46770	RNA recognition motif
S84	LOC_Os02g38920	glyceraldehyde - 3 - phosphate dehydrogenase
S88	LOC_Os01g55690	glutelin
S96	LOC_Os04g36760	enzyme of the cupin superfamily

试剂盒的基础上,对操作程序进行了优化。对于阳性克隆的基因序列进行测定,商品化试剂盒推荐的是从阳性杂合子菌落中提取质粒,然而因其拷贝数低、酵母破壁困难等因素,从酵母中一般只能得到微量的质粒,无法满足测序所需。因此,要将酵母中提取到的质粒重新转化到大肠杆菌中繁殖,以期得到测序所需的模板量,这一操作流程需要4~5 d,费时费力。本研究重新设计了特异的载体多克隆位点两段的引物序列,利用改良的酵母菌落PCR方法,以阳性克隆的酵母菌落为模板,直接扩增出基因序列,PCR产物纯化后直接用T7引物测序即可,一般在12 h内可以完成全部扩增及纯化流程,大大提高了效率。在酵母菌落PCR操作过程中,发现某些传统的酵母破壁方法如沸水加热破壁、SDS破壁以及单纯的破壁酶都不具备良好的重复性。破壁酶结合加热破壁可以有效破除酵母细胞壁,确保质粒释放到溶液中。本研究还将破壁后的反应液稀释数倍以减少酵母破壁后一些次生代谢物的影响。RT-PCR结果显示,ONAC023在种子中特异表达,且在种子发育的早期表达量要高于后期。通过对水稻早期种子的

cDNA 酵母双杂交文库进行筛选,本研究寻找到21个可能与ONAC023互作的蛋白,包括储藏蛋白质如谷蛋白、Cupin蛋白,分子伴侣以及一些与代谢相关的酶类,其中1个DNA binding蛋白(LOC_Os05g01050)与ONAC023有强烈互作。LOC_Os05g01050编码1个含有135个氨基酸的蛋白,其中46~106位氨基酸是一个保守的DNA binding结构域,可能具有转录因子的特性。已有大量报道显示,转录因子一般都是通过与多个蛋白形成复合物来启动下游基因的转录,如NF-Y类转录因子就是与其他2个转录因子以异源三聚体复合物的形态工作^[15]。因此,我们推测LOC_Os05g01050可能是ONAC023蛋白复合物的成员。公共表达谱数据库检索发现,LOC_Os05g01050是一个组成型表达的基因,其功能尚无报道。本研究结果为研究ONAC023在种子发育中的功能奠定了坚实的基础,尤其是具有转录因子特性的DNA binding蛋白LOC_Os05g01050将是研究的重点。但考虑到酵母双杂交结果存在假阳性的缺点,仍需要其他独立的蛋白-蛋白互作技术,如免疫共沉淀或GST pull down等来进一步验证这些互作结果。

参考文献:

- [1] Kanneganti V, Gupta A K. Overexpression of OsSAP8, a member of stress associated protein (SAP) gene family of rice confers tolerance to salt, drought and cold stress in transgenic tobacco and rice [J]. *Plant Molecular Biology*, 2008, 66(5): 445 - 462.
- [2] Menke F L, Kang H G, Chen Z X, et al. Tobacco transcription factor WRKY1 is phosphorylated by the MAP kinase SIPK and mediates HR-like cell death in tobacco [J]. *Molecular Plant - microbe Interactions*; MPMI, 2005, 18(10): 1027 - 1034.
- [3] 崔红军, 张军杰, 黄玉碧. 玉米根部酵母双杂交cDNA文库的构建及评价[J]. *分子植物育种*, 2008, 6(1): 161 - 164.
- [4] Xie Q, Frugis G, Colgan D, et al. Arabidopsis NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development [J]. *Genes & Development*, 2000, 14(23): 3024 - 3036.
- [5] Duval M, Hsieh T F, Kim S Y, et al. Molecular characterization of AtNAM; a member of the Arabidopsis NAC domain superfamily [J]. *Plant Molecular Biology*, 2002, 50(2): 237 - 248.
- [6] Ernst H A, Olsen A N, Larsen S, et al. Structure of the conserved domain of ANAC, a member of the NAC family of transcription factors [J]. *EMBO Reports*, 2004, 5(3): 297 - 303.
- [7] Olsen A N, Ernst H A, Leggio L L, et al. NAC transcription factors: structurally distinct, functionally diverse [J]. *Trends in Plant Science*, 2005, 10(2): 79 - 87.
- [8] Souer E, Vanhouwelingen A, Kloos D, et al. The no apical meristem gene of petunia is required for pattern formation in embryos and flowers and is expressed at meristem and primordia boundaries [J]. *Cell*, 1996, 85(2): 159 - 170.
- [9] Aida M, Ishida T, Fukaki H, et al. Genes involved in organ separation in Arabidopsis; an analysis of the cup-shaped cotyledon mutant [J]. *The Plant Cell*, 1997, 9(6): 841 - 857.
- [10] Zhu M, Chen G, Hu Z, et al. A new tomato NAC (NAM/ATAF1/2/CUC2) transcription factor, SINAC4, functions as a positive regulator of fruit ripening and carotenoid accumulation [J]. *Plant Cell Physiol*, 2014, 55: 119 - 135.

蒋景龙,李丽,王崇英. 外源 H_2O_2 影响山黧豆初生根蛋白表达研究[J]. 江苏农业科学,2014,42(9):20-25.

外源 H_2O_2 影响山黧豆初生根蛋白表达研究

蒋景龙¹, 李丽¹, 王崇英²

(1. 陕西理工学院生物科学与工程学院, 陕西汉中 723001; 2. 兰州大学生命科学学院, 甘肃兰州 730000)

摘要:以山黧豆(*Lathyrus sativus* L.)幼苗为试验材料,施加 H_2O_2 处理山黧豆初生根,然后检测初生根中 H_2O_2 含量变化,并采用双向电泳与质谱鉴定技术,对初生根中蛋白质表达的变化进行分析。结果显示:施加 H_2O_2 处理引起了内源 H_2O_2 水平的产生与积累;利用双向电泳技术,共获得了 850~900 个蛋白质点,并检测到 70 个蛋白质表现出显著的差异表达,其中 43 个蛋白发生上调,21 个蛋白发生下调,新出现 6 个蛋白。对 15 个蛋白点 MALDI-TOF-MS/MS 质谱鉴定结果表明,呼吸代谢、蛋白折叠、信号转导及细胞防御等方面的蛋白参与了山黧豆初生根对 H_2O_2 的应答反应。这些蛋白的发现将有助于进一步揭示根对氧化胁迫的应答及 H_2O_2 作用机制。

关键词:山黧豆;过氧化氢;初生根;双向电泳;质谱鉴定

中图分类号: Q945.78 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)09-0020-06

过氧化氢(H_2O_2)是生物体内各种生理代谢的副产物,可以通过有氧代谢过程(如线粒体的呼吸、叶绿体的光合作用和过氧化物酶体)不断产生,也是活性氧(reactive oxygen species, ROS)中最稳定的一种,一直被认为是对细胞产生毒性的代谢物,在过去的 10 年里引起了极大的关注^[1]。当植物遭受各种各样的环境胁迫(如干旱、缺氧、高温、低温等)及生物胁迫(如细菌侵入)时, H_2O_2 含量迅速升高,胁迫较为严重时,产生的过量 H_2O_2 会对细胞产生毒害作用,如引起细胞膜脂的过氧化、蛋白质及核酸的降解、细胞凋亡甚至死亡^[2]。然而,随着研究的逐渐深入,人们发现 H_2O_2 与其他的 ROS 分子如超氧阴离子($O_2^{\cdot-}$)、过羟基自由基(HO_2^{\cdot})、单线态的氧(1O_2)或羟自由基($\cdot OH$)不同, H_2O_2 属于非激发态的 ROS,半衰期很长,并且不携带电荷^[3],因此在生物体内 H_2O_2 可以作为一种稳定的信号分子,在很多信号转导过程中扮演重要角色,如诱导气孔关闭,参与根的向地性生长、侧根的发育、细胞壁木质化、细胞程序性死亡以及花粉管和柱头相互作用等^[4],成为了当今细胞与分子生物学研究的热点。

Joo 等的研究表明, H_2O_2 参与了植物根的向地性生长过程,且 H_2O_2 可能是生长素调节信号途径的下游元件^[5]。Li 等研究发现, H_2O_2 与生长素相互作用能够诱导黄瓜、绿豆的不定根生长^[6-7]。Ishibashi 等用 H_2O_2 喷施大豆叶片后发现外源 H_2O_2 引起了叶片气孔的快速关闭,防止水分过度蒸发,并诱导了可溶性糖的合成,增强了渗透调节能力,从而提高了大豆的干旱抗性^[8]。

近几年,越来越多的研究者开始选择通过施加外源 H_2O_2 的方法来研究它对植物生长发育的影响。Wan 等用外源 H_2O_2 处理水培 12 d 苗龄的水稻 6 h,然后分析水稻叶片生理生化反应,并采用蛋白质组学方法研究水稻叶片对 H_2O_2 处理引起的蛋白质水平变化,结果发现了 144 个差异表达的蛋白;对其中 129 个差异表达蛋白进行质谱鉴定,结果表明细胞防御、氧化还原、信号转导、蛋白合成与降解、光合、呼吸与糖类和能量代谢方面的蛋白参与了水稻叶片对 H_2O_2 的应答^[9]。然而,外源 H_2O_2 处理水培植物的过程中首先受到氧化胁迫和发生防御变化的应该是根部。因此,本试验采用双向电泳和质谱分析相结合的蛋白质组学方法,研究幼苗期山黧豆的初生根在外源 H_2O_2 处理过程中蛋白质表达的变化,为揭示 H_2O_2 的作用机制及初生根对 H_2O_2 的应答反应奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

挑选籽粒饱满、无损坏的山黧豆种子,用自来水冲洗 3

收稿日期:2013-12-02

基金项目:陕西省自然科学基金研究计划(编号:2014JQ3113);陕西理工学院科研基金(博士启动基金)(编号:SLGQD13-11)。

作者简介:蒋景龙(1980—),男,山东枣庄人,博士,讲师,主要从事信号分子 H_2O_2 对植物生长发育及抗逆性影响研究。E-mail: jiangjinglong511@163.com。

[11] Hu H H, Dai M Q, Yao J L, et al. Overexpressing a NAM, ATAF, and CUC (NAC) transcription factor enhances drought resistance and salt tolerance in rice[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(35): 12987-12992.

[12] Saad A S, Li X, Li H P, et al. A rice stress-responsive NAC gene enhances tolerance of transgenic wheat to drought and salt stresses [J]. Plant Science: an International Journal of Experimental Plant Biology, 2013, 203-204(204): 33-40.

[13] Moon Y H, Kang H G, Jung J Y, et al. Determination of the motif re-

sponsible for interaction between the rice APETALA1/AGAMOUS-LIKE9 family proteins using a yeast two-hybrid system [J]. Plant Physiology, 1999, 120(4): 1193-1203.

[14] Singh R, Lee M O, Lee J E, et al. Rice mitogen-activated protein kinase interactome analysis using the yeast two-hybrid system [J]. Plant Physiology, 2012, 160(1): 477-487.

[15] Petroni K, Kumimoto R W, Gnesutta N, et al. The promiscuous life of plant NUCLEAR FACTOR Y transcription factors [J]. The Plant Cell, 2012, 24(12): 4777-4792.