中国科学 C辑:生命科学 2009 年 第 39 卷 第 2 期: 228 ~ 236
www.scichina.com life.scichina.com
《中国科学》杂志社
SCIENCE IN CHINA PRESS

红光下拟南芥光敏素调节基因的蛋白质鉴定与mRNA 分析

李旭†, 杨粤军†, 李妍, 王婕, 萧小鹃, 郭新红, 唐冬英, 刘选明*

湖南大学生命科学与技术研究院, 生物能源与生物材料研究中心, 长沙 410082

† 同等贡献

* 联系人, E-mail: sw_xml@hnu.cn

收稿日期: 2007-12-23; 接受日期: 2008-06-12

国家“985 工程” (批准号: 200501)、湖南省自然科学基金(批准号: 06FJ3152)、湖南省科技计划(批准号: 06FJ3152)、湖南省教育厅科研基金(批准号: 08B049)和国家自然科学基金(批准号: 30600368, 30770200 和 30871325)资助项目

摘要 光敏素是植物体内一种重要的光受体家族, 它们可介导植物对外界红光和远红光的应答, 在植物的生理发育过程中发挥重要作用. 基因芯片分析结果表明, PHYA 和 PHYB 在转导红光信号至光应答基因的过程中起关键作用. 为了获得与 PHYA, PHYB 相关的光应答基因, 本研究采用双向电泳技术比较分析了在持续红光下生长 7 天的拟南芥光敏素双突变体 *phyAphyB* 和野生型 col-4 幼苗的全蛋白图谱. 采用基质辅助激光解吸飞行时间串联质谱(MALDI-TOF-TOF)进行肽质谱指纹图谱分析, 成功鉴定到了 32 个差异蛋白点. 选取其中的 10 个蛋白点, 对应于 10 个不同的基因, 进行了 RT-PCR 分析, 并用 Q-PCR 对其中的 2 个基因表达情况进行了验证. 结果表明, 光敏素可能从 mRNA 水平或蛋白质水平来调节基因的表达. 蛋白质组学分析为寻找光敏素依赖基因提供了新的途径.

关键词
拟南芥
光敏素双突变体 *phyAphyB*
蛋白质组
RT-PCR
Q-PCR

植物能够感受光从而进行生理和发育上的调整, 并控制光形态建成[1,2]. 目前在植物中已发现的光受体主要有 3 类: 感受红光/远红光的光敏素家族, 蓝光/UVA受体隐色素以及向光素[3]. 其中对光敏素研究得较为充分, 先前的报道显示光敏素具有激酶活性[4~6]. 模式植物拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)基因组至少包含 5 种功能重叠和冗余的光敏素: PHYA, PHYB, PHYC, PHYD和PHYE[7~9]. PHYA和PHYB在介导远红光和红光对下胚轴延伸以及根的生长抑制作用中占主要地位[10~12]. 除了生长抑制以外, 光敏素还介导红光和远红光调节植物生理应答和细胞活性, 例如, 促进种子萌发、子叶扩展、参与去黄化发育过程, 并能参与生物钟的调节以及控制植物开花时间[13~18]. 先前的研究表明光敏素能够改变核质分配, 并与转录因子PIF3 相互作用[19]. 这就提出一种可能, 光敏素可能通过与转录因子的相互作用从而调控基因表达. 然而, 对于光敏素是否能通过调控基因转录后水平或翻译后修饰改变蛋白质水平的表达, 目前还不是很清楚. 光敏素进核的机制以及在细胞质中的作用还有待进一步研究. 另外, PHYA和PHYB可调控很多生理过程, 但其共同信号途径所知甚少.

本研究采用比较蛋白质组学方法研究了生长在持续红光下的拟南芥光敏素突变体 *PHYAPHYB* 与野生型的蛋白表达情况. 与野生型相比, 突变体在红光

下呈现出了不同的蛋白质表达谱.

1 材料与方法

1.1 植物生长条件和光源

实验材料拟南芥光敏素突变体 *phyAphyB* 和 col-4(WT)均为哥伦比亚生态型. 种子为美国加州大学洛杉矶分校林辰涛教授惠赠.

将种子播种在固体培养基上, 于黑暗下 4℃春化 4 天, 然后转移到人工气候培养箱持续红光下生长 7 天, 生长温度为 23~25℃(波长 660 nm, 半幅宽 20 nm). 红光光照强度用 Li-250 量子光度计测量(Li-Cor, Lincoln, NE).

1.2 拟南芥幼苗总蛋白的提取

取生长在红光光强(80±2) $\mu mol \cdot m^{-2} \cdot s^{-1}$ 下 7 天的拟南芥光敏素突变体 *phyAphyB* 和 col-4(WT)幼苗, 在液氮中研磨成粉末, 然后将粉末悬浮在含有 10% 三氯乙酸(TCA)和 0.3% DTT 的预冷丙酮溶液中, 在 –20℃冰箱沉淀过夜. 然后在 4℃条件下 34900×*g* 离心 1 h. 弃上清, 重悬沉淀于含 0.07% β-巯基乙醇的预冷丙酮溶液中, 4℃条件下 34900×*g* 离心 30 min, 弃上清, 重复一次, 最终得到的沉淀冷冻干燥后置–80℃下保存备用. 蛋白粉末先溶于裂解液(8 mol/L 尿素, 4% CHAPS, 40 mmol /L Tris 和 2 mmol/L PMSF)中, 振荡混匀, 30 min 后加入 2 倍量的样品溶解液(8 mol/L 尿素, 4% CHAPS, 2% pharmalyte 3~10, 1% DTT)混匀, 充分溶解, 18900×*g* 离心 10 min, 取上清液. 蛋白浓度通过 Bradford 试剂检测.

1.3 双向凝胶电泳

双向凝胶电泳参照文献[20]方法进行. 在 450 μg 蛋白样品中加入水化液(6 mol/L 尿素, 2 mol/L硫尿, 2% CHAPS, 3 mg/mL DTT, 0.5% IPG缓冲液(pH 3~10), 痕量溴酚蓝)充分混合至总体积为 450 μL, 将IPG干胶条(pH 3~10, 24 cm)放入胶条槽, 在IPGphor电泳仪上水化和等电聚焦. 在 20℃条件下自动进行, 总电压时间为 69890 Vh, 其中水化在 30 V低电压进行 13 h, 然后 500 V下进行 1 h, 1000 V 下进行 1 h, 最后稳定在 8000 V下进行. 等电聚焦结束后取出胶条, 加入平衡液A(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.8, 6 mol/L尿素, 30%甘油, 2%SDS, 1%DTT, 痕量溴酚蓝)室温平衡 15 min, 然后于平衡液B中(50 mmol/L Tris-HCl, pH 8.8, 6 mol/L尿素、30%甘油、2%SDS、2.5%碘乙酰胺、痕量溴酚蓝)平衡 15 min. 将平衡后的 IPG 干胶条移至第二向 10%分离胶上端, 并在酸性端加低分子质量 SDS 标准蛋白质, 排净气泡, 用 0.5%的琼脂糖凝胶封固胶条. 先用 2.5 W/胶恒功率电泳, 30 min 后换用 15 W/胶恒功率电泳.

1.4 蛋白质染色与图像分析

按照文献[21]方法对凝胶进行银染, 银染后的凝胶通过 UTA-1100 扫描仪适配器获取图像, 用 PDQuest7.1 通过分析软件对图像进行背景消减、斑点检测、匹配和获取斑点位置坐标等. 数字化信号相对于总信号进行均一化. 统计学分析证实了实验的高度重复性.

1.5 蛋白质的原位酶解

从双向电泳凝胶上切取 1.8 倍以上的差异蛋白质点(经*t*-test统计分析, $P<0.05$)按照文献[22, 23]方法, 还原烷基化, 然后用胰蛋白酶消化. 简要过程如下: 先用双蒸水将蛋白质点洗 3 次, 用 15 mmol/L $K_3Fe(CN)_6$ 和 50 mmol/L $Na_2S_2O_3$ 脱色; 然后加入 50 μL还原溶液(10 mmol/L DTT/100 mmol/L NH_4HCO_3), 置 37℃保温 1 h, 室温冷却后, 去掉过量的液体, 迅速加入烷基化试剂(55 mmol/L碘乙酰胺/100 mmol/L NH_4HCO_3), 室温下暗处放置 30 min, 吸走多余的液体, 冷冻干燥. 取少量酶解工作液(0.02 g/L胰蛋白酶, 25 mmol/L NH_4HCO_3, 10% ACN)于胶块中, 37℃水浴消化过夜. 脱盐(ZipTipTM column, Millipore, Bedford, MA, USA)后的蛋白质进行质谱分析.

1.6 MADLI-TOF-TOF 肽质指纹图分析及数据搜索

参照文献[24]中的方法, 将酶解后的肽片段点样于质谱点样板上, 置于空气中自然风干. 使用美国应用生物系统公司的STR-MALDI-TOF质谱仪对制备好的样品进行分析, 激光波长 337 nm. 采用反射/延迟抽出模式, 得到肽质量指纹图PMF和LIFT. 离子源加速电压 1 为 25 kV, 加速电压 2 为 8 kV, 脉冲宽度 3 ns, 离子延迟提取 500 ns, 真空度 0.53×10^{-7} kPa, 质谱信号单次扫描累加 100 次, 正离子测定, 质谱使用基质

峰和胰蛋白酶自动降解片段离子峰做为内部标准校正. 获得的混合物肽片段数据通过 Expasy 在中国的镜像站点 CBI(http://www.pku.edu.cn)的 Peptident 软件进行查询. 查询条件: 肽质谱指纹图中的肽片段质量控制在 800~4000 kD, 表观 pI 的误差范围为±0.5(pH 单位), 表观 Mr 的误差范围为±2%, 肽片段分子量最大容许误差控制在±0.5, 酶解片段不完全选择为 2 个, 物种来源选择拟南芥, 离子选择$[M+H]^+$和 AVERAGE, 半胱氨酸选择为脲甲基半胱氨酸(Carbamidomethyl-Cys), 被选择的片段峰信号均应较强, 为基线宽度的 1 倍以上.

1.7 RT-PCR 分析

用植物RNA提取试剂盒提取光敏素突变体 *PHYAPHYB* 和col-4 的总RNA, 取 2 μg总RNA逆转录成cDNA[25]. 选取 8 个蛋白质点对应的基因做半定量RT-PCR分析, 并对其中的 2 个进行定量分析. cDNA 稀释 10 倍, 取 1 μL于 20 μL PCR反应体系. RT-PCR 均重复 3 次以上, 图中给出的为具有代表性的电泳图. SYBR green 序列检测试剂盒 (Invitrogen, USA), Taq 聚合酶, 正反向引物被用于iCycler iQ(stratagene)检测系统的定量分析. 定量PCR在Mx3000p (Stratagene)上进行, 反应程序为: 95℃, 10 min; 95℃, 30 s, 55℃, 30 s, 72℃, 30 s, 40 个循环; ACT2 的表达水平被用作均一化的内参. 半定量和定量的引物如下:

*Act2*F
(5′-CACTGTGCCAATCTACGAGGGT-3′)
*Act2*R
(5′-CACAAACGAGGGCTGGAACAAG-3′)
*CAB2*F
(5′-TAAGGCTACCGACCCAGAGG-3′)
*CAB2*R
(5′-CAGTAGCGATGGCTTGAACG-3′)
#75 (AT1G20020)F
(5′-GATAAGCAGAGAACAAGCGAAC-3′)
#75 (AT1G20020)R
(5′-AATCAAACCAGTCAATACCGTC-3′)
#52 (AT4G33010)F
(5′-GGTTTTATTGGAGCGGATGTGTG-3′)
#52 (AT4G33010)R
(5′-GTGCTGTCTTCTCGGGTTGTG-3′)
#58 (AT5G67360)F
(5′-GGAGCACCGTTACGAGCTACAC-3′)
#58 (AT5G67360)R
(5′-AACCACCGAGCCAACAGACT-3′)
#84 (AT1G19570)F
(5′-CAAGTGGGTGACTGATTCCGAC-3′)
#84 (AT1G19570)R
(5′-AGCTCAACAAGCAAGGCATGTT-3′)
#11 (AT3G08030)F
(5′-CTTGCTACTCATCTGTGGTGCT-3′)
#11 (AT3G08030)R
(5′-TGTTTTCTTCATGTCGGTTTTC-3′)
#118 (AT2G22780)F
(5′-ACCTCCTTGCTCGTTCACTCA-3′)
#118 (AT2G22780)R
(5′-GCATCACCTCGTAGACCCCTG-3′)
#73 (AT3G63140)F
(5′-CAATGGCAAGGATTTGGATACTGT-3′)
#73 (AT3G63140)R
(5′-GTGAGGAGGTTGTTCGGTGGACT-3′)
#34 (AT5G17710)F
(5′-CACTCTCTCGCCGAGCTTCTCTC-3′)
#34 (AT5G17710)R
(5′-CCTCAGCACTGGCATTTTCATTC-3′)
#28 (AT1G16880)F
(5′-TTGTTTATGACTGTGAGACGAA-3′)
#28 (AT1G16880)R
(5′-GCTTTACTTGACACTATGAATGC-3′)
#53 (AT2G26080)F
(5′-TTATCTTGCCAATCTCGTAT-3′)
#53 (AT2G26080)R
(5′-CAGCAGTGTTCTTGAATCCT-3′)

2 结果与讨论

2.1 双向电泳和凝胶图像分析

我们提取了持续红光下 7 天大小幼苗全蛋白质组, 通过双向电泳(蛋白上样量为 450 μg)得到了蛋白质表达图谱. 在相同实验条件下, 制备 6 块胶, 3 块野生型, 3 块突变体. 通过严格一致的操作程序得到了重复性很高的拟南芥光敏素突变体 *phyAphyB* 和野生型 col-4 的幼苗全蛋白双向电泳图谱(图 1), 通过 PDQuest 软件对蛋白点进行匹配, 并与背景进行均一化. 幼苗蛋白质点多数分布在偏酸性区域(pH 4~8), 分子量 20~80 kD 范围内, 在 pH 5~7, 分子量 24~70 kD 范围内尤为集中. 通过分析发现, 突变体

phyAphyB 和野生型 col-4 共有 67 个差异蛋白质点, 质谱共鉴定到 32 个蛋白点, 分别对应 30 个不同的基因, 其中点 84 与 86 为同一蛋白, 点 9 和 70 为同一蛋白, 它们可能是相同基因由于不同的翻译后修饰导致的. 图 1 中给出的是具有代表性的双向电泳图, 鉴定到的蛋白点用数字标出.

2.2 蛋白质的功能分类与亚细胞定位

鉴定到的蛋白按功能分成 7 类(图 2): 代谢相关蛋白(34.4%), 能量相关蛋白(6.3%), 具绑定或辅助功能的蛋白(18.8%), 抗胁迫和毒素类蛋白(15.6%), 储存蛋白 (6.3%), 蛋白质合成、修饰、运输类蛋白(3.1%), 和未知蛋白(15.6%). 我们也依据亚细胞定位对这些蛋白进行了分类(图 2(B)), 超过 40%的蛋白定位在叶绿体和线粒体中. 另外还有 21.9%的蛋白未定位. (表 1, 图 2).

2.3 红光下 PHYAPHYB 突变影响了基因蛋白水平的积累

在鉴定到的 32 个蛋白中, 有 15 个蛋白点(26, 14, 1, 55, 52, 53, 18, 37, 34, 73, 75, 62, 13, 28 和 33)在 *phyAphyB* 缺失后其积累程度下降. 17 个蛋白点(118, 102, 9, 70, 66, 63, 111, 86, 84, 81, 58, 117, 2, 115, 11, 83 和 5)表达水平在 *phyAphyB* 突变体中表现出更高程度的积累(表 1).

甘氨酸脱羧酶(GDC)是植物初级代谢、光呼吸和一碳代谢中的重要酶. 拟南芥基因组中包含 2 个(GDC)P-蛋白基因[26], AtGLDP1(at4g33010)和AtGLDP2 (at2g26080), 对应我们鉴定到的 52 和 53 号蛋白. 与野生型相比, *phyAphyB* 突变体中这 2 个蛋白的表达水平下降. 据报道, 这 2 个P-蛋白基因的同时敲除会导致植株在非光响应环境下无法存活[27]. 该蛋白在

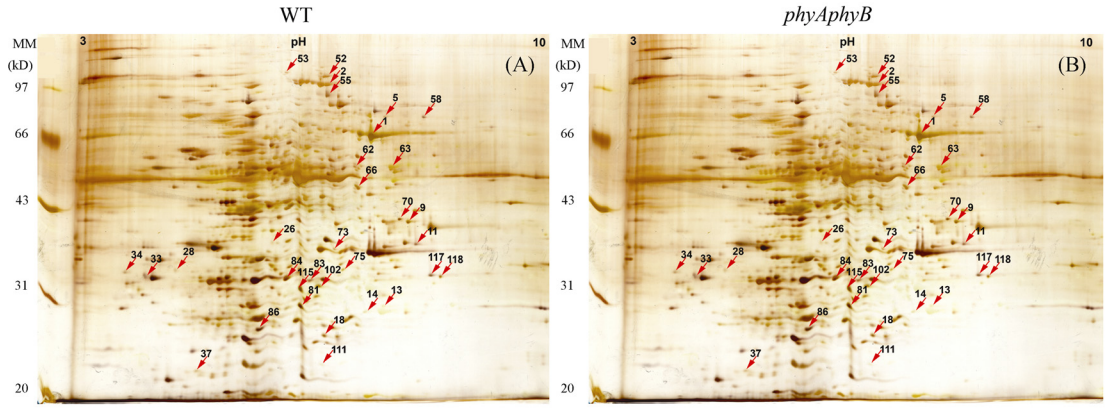


图 1 红光下野生型与光敏素突变体蛋白质组学比较

持续红光(80 μmol·m^{-2}·s^{-1})下 7 天大小的拟南芥野生型和突变体幼苗全蛋白质银染胶, 双向电泳图(A)为蛋白质分子量, 箭头指出的是在野生型和突变体之间变化的蛋白点, P <0.05

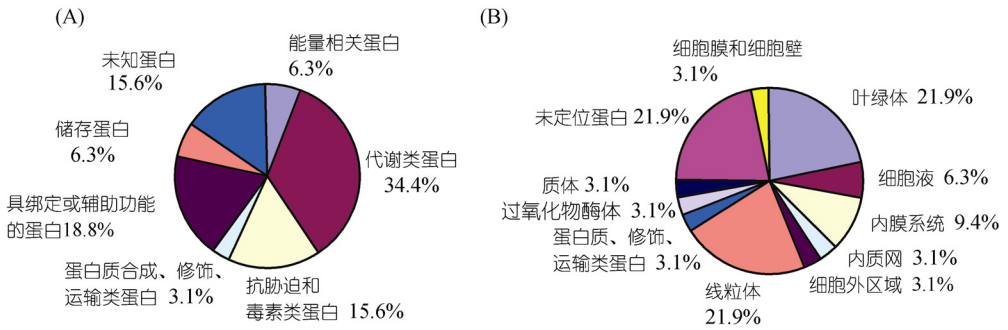


图 2 蛋白质的功能分类和亚细胞定位

(A) 功能分类; (B) 亚细胞定位

表 1　红光下拟南芥野生型与突变体*phyAphyB*之间差异表达的蛋白[a)]

蛋白点	登录号	蛋白名称	比率 *phyAphyB* /WT	分子量/等电点		覆盖率 (%)	蛋白定位
				测量值	计算值		
能量蛋白							
26	AT4G26530	果糖二磷酸醛缩酶	0.20	38555/5.65	38294/5.53	39	未知
118	AT2G22780	假定的苹果酸脱氢酶前体	9.31	37841/8.11	37466/8.06	41	过氧化物酶体
代谢蛋白							
14	AT1G70410	碳酸酐酶	0.22	28737/6.66	30836/7.11	21	未知
1	AT3G09260	Beta-葡糖苷酶	0.27	60348/6.95	59721/6.91	34	内质网
55	AT1G68560	Alpha-木糖苷酶	0.47	102961/6.31	102400/6.76	25	细胞膜和细胞壁
102	AT1G54870	短链脱氢酶类似物	6.50	37084/8.78	36765/8.75	33	叶绿体
52	AT4G33010	假定的甘氨酸脱氢酶	0.58	113822/6.51	112926/6.98	27	线粒体
9	AT2G30970	天冬氨酸转移酶	1.92	48069/8.36	47758/8.34	54	线粒体
70	AT2G30970	天冬氨酸转移酶	1.87	48069/8.36	47758/8.34	26	线粒体
66	AT5G46290	3-氧酰 l-[酰基载体蛋白] 合成酶 I	2.12	50895/6.52	50414/8.15	42	叶绿体
63	AT4G13930	甘氨酸羟甲基转移酶	1.82	52141/6.8	51718/7.25	33	细胞质
53	AT2G26080	甘氨酸脱氢酶	0.32	114672/6.18	113777/6.63	15	线粒体
18	AT2G47730	谷胱甘肽转移酶 (GST6)	0.47	29270/8.5	29232/8.93	26	叶绿体
抗胁迫和毒素蛋白							
111	AT3G58450	胁迫蛋白	1.82	22584/6.09	22371/6.51	16	未知
37	AT3G11630	2-半胱氨酸脱氢酶 BAS1	0.53	29188/6.92	29092/7.56	23	未知
86	AT1G19570	脱氢抗坏血酸还原酶	2.29	23740/5.56	23641/5.79	38	线粒体
84	AT1G19570	脱氢抗坏血酸还原酶	2.76	23740/5.56	23641/5.79	39	线粒体
81	AT1G07890	L-抗坏血酸过氧化氢酶 1 (APX1)	2.33	27788/5.85	27561/6.03	55	细胞质
蛋白质合成、修饰、运输蛋白							
58	AT5G67360.1	枯草杆菌蛋白酶类似前体 r	1.93	80050/5.91	79416/6.30	18	细胞外区
绑定或辅助功能蛋白							
34	AT5G17710	EMB1241, Co-伴侣 grpE 家族蛋白类似物	0.31	35756/4.57	35721/4.25	24	叶绿体
73	AT3G63140	mRNA 绑定蛋白	0.28	44074/8.54	43930/8.73	36	质体
75	AT1G20020	铁氧化还原蛋白	0.40	41484/8.51	41168/8.50	18	叶绿体
2	AT1g56070	延伸因子 EF-2	4.10	95098/5.89	93892/6.16	23	未知
62	AT4G16155	二氢硫辛酰胺脱氢酶 2	0.45	60564/7.29	60146/7.66	28	叶绿体, 细胞质
117	AT1G18080	鸟嘌呤核苷酸绑定蛋白亚基 beta-42	12.02	36124/7.62	35748/7.80	25	异源三聚 G-蛋白复合体
储存蛋白							
13	AT1G03880	12S 种子贮存蛋白 CRB 前体	0.09	50869/6.62	50559/6.99	20	内膜系统
115	AT5G44120	12S 种子贮存蛋白(CRA1)	2.40	41178/6.62	52596/7.88	16	内膜系统
未分类蛋白							
28	AT1G16880	尿苷酰转移酶相关蛋白	0.00	31446/4.98	31295/4.74	34	Ch 叶绿体
33	AT3G27590	表达蛋白	0.46	10324/11.87	10330/12.37	29	线粒体
11	AT3G08030	表达蛋白	1.80	34907/7.18	39066/7.63	29	内膜系统
83	AT3G16430	Jacalin 血凝集蛋白家族	3.30	32213/5.86	32234/6.24	25	未知
5	AT5G47380	假定蛋白 At5g47380	5.21	77350/9.53	70151/10.02	22	未知

a) 32 个蛋白点的积累水平在野生型和突变体之间呈现出显著的差异, 相对蛋白丰度由突变体中表达量与野生型表达量的比值表示

光呼吸中的重要作用、以及在 phyAphyB 敲除后其积累水平下降, 暗示它们有可能参与了光敏素介导的红光信号传导.

谷胱甘肽-S-转移酶 6(GST6, 蛋白点, 18)是植物GST基因家族 53 个成员中的一个, 参与了一些植物应激反应. 最新研究显示, FIP1, GST家族中的另一成员, 参与了PHYA介导的远红光下信号传导途径[28]. 这一发现表明, GST成员有可能参与光信号传导. GST6 的表达在红光下*phyAphyB*突变中下降. 我们推测光敏色素或其他光信号元件调节GST6 的表达. 可惜的是, 迄今为止, 没有任何关于GST成员参与红光信号传导途径分子水平的报道.

铁氧蛋白还原酶-NADP(+)还原酶(FNR2, 蛋白点, 75)参与电子转移, 具备NADPH脱氢酶活性. FNR2 蛋白水平在*phyAphyB*突变体中降低了 2.5 倍. 这与先前所报道的光通过光受体调控NADPH脱氢酶转录影响呼吸电子转移链一致[29,30].

2 种参与氨基酸代谢的蛋白(蛋白点, 63, 70/9), 在野生型和突变体中也表现出了不同程度的变化. 延伸因子EF-2 (蛋白点, 2)蛋白水平上调. 以往的研究表明, 在EF-2 功能缺失突变体中新的蛋白质合成受到阻碍, 特别是在冷胁迫中[31]. 增加的延伸因子能够促进蛋白质的合成. 腺嘌呤-核苷酸转换因子(蛋白点, 34), 类似于合作伴侣grpE家族蛋白, 这类蛋白能参与蛋白质的正确折叠或稳定. 它能避免变性蛋白的聚集, 并与其他因子相互作用促进蛋白质重新折叠[32,33]. PHYAPHYB的突变导致该蛋白表达水平的减少. 这些结果揭示了光信号传导途径中蛋白质的合成、修饰或降解的关键作用, 光敏素可能通过与这些因子的相互作用从而在转录后调控以及翻译后修饰中调节基因的表达.

异源三聚G-蛋白包含 3 个亚基: α, β和γ, 先前的研究表明该蛋白在光敏素A和光敏素B的下游行使其功能[34~36]. 最近的研究证实Gα过表达能够加强对红光的应答, 抑制了下胚轴的生长, 但这些表型依赖于PHYA和PHYB的功能[37]. 本实验鉴定到了Gβ亚基(蛋白点, 117), 由At1g18080 编码, 它的蛋白积累水平在光敏素突变的情况下增加了 12.02 倍. Gβ缺失突变体的部分去黄化幼苗呈现出短的下胚轴[38~40], 与红光下的*phyAphyB*突变体相反, 这说明光敏素与G-蛋白在对下胚轴延伸的调控中有可能呈现对抗效应. 结果表明光敏素可能通过抑制Gβ亚基的表达从而调节下胚轴的延伸. 最近的一些报道也揭示了光敏素与G-蛋白之间的联系, 如光敏素的缺失导致茉莉酸的过量生成[41], G-蛋白参与了茉莉酸信号调节, 是植物中茉莉酸途径直接或间接的增强子[42]. G-蛋白表达量在光敏素缺失时增加的这一现象, 将光敏素、G-蛋白和茉莉酸信号联系起来了, 当然, 这一假设还需要更进一步的研究. 定位在纤维素和细胞壁的α-木糖苷酶(蛋白点, 55)参与细胞壁的扩张和建成. 野生型中该酶蛋白质水平是突变体的 2 倍. 我们知道, 光刺激生长部分是由于细胞的扩张[43], 暗示细胞壁的生物合成是下胚轴延伸的决定因子之一. 光敏素可能通过调控细胞壁成分的合成从而控制植物生长. 另外, 细胞壁的生物合成也依赖于细胞内的碳源[44], 一些与碳源代谢相关的蛋白如: 葡糖苷酶(蛋白点, 1), 碳酸酐酶(蛋白点, 14), 果糖二磷酸醛缩酶(蛋白点, 26), 假定的苹果酸脱氢酶(蛋白点, 118)以及葡萄糖和核糖醇脱氢酶同源蛋白 1(蛋白点, 102)在野生型与光敏素突变体中呈现出了不同程度的改变. 这些蛋白表达水平的改变支持了红光下突变体与野生型下胚轴的差异.

2.4 红光下 PhyA 与 PhyB 影响基因 mRNA 水平的表达

为了研究这些光敏素相关基因蛋白水平的变化是否由转录水平的改变导致, 我们选取了 8 个基因进行半定量分析(蛋白点, 11, 28, 34, 52, 53, 58, 73, 75, 84 和 118). 采用已被广泛研究的叶绿素a/b绑定蛋白2(CAB2)作为对照, 本研究的结果显示*CAB2* 的mRNA表达水平在*phyAphyB*突变体中明显下降, 这与先前的报告一致: 光敏素促进*CAB2* 的转录[45]. 挑选的 8 个基因蛋白质与mRNA的表达情况显示在图 3 中.

52 号蛋白点对应的基因, mRNA丰度在突变体中急剧下降, 与蛋白水平的改变一致. 先前的报道显示在黑暗下生长的幼苗暴露于红光 1 h后, AT4g33010 (蛋白点, 52)的表达量受*phyA*和 *phyB*上调[46]. 我们的实验结果显示该基因的表达在持续红光下也受到*phyA*和*phyB*的诱导. 此外, 我们选定At4g33010 做定量分析表明, 野生型中mRNA的水平是突变体的

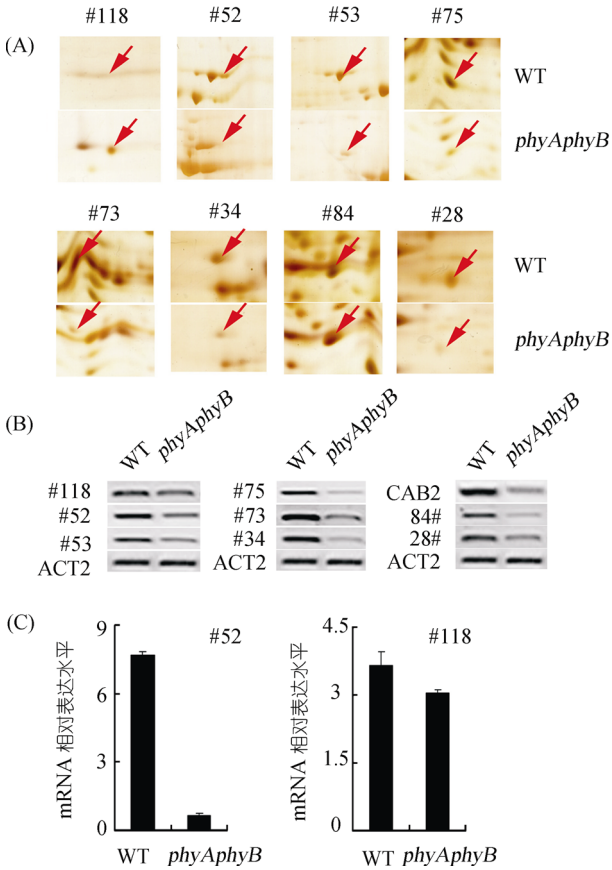


图 3　差异蛋白 mRNA 表达水平与蛋白表达水平的比较

(A) 双向电泳中差异蛋白点 118, 52, 53, 75, 73, 34, 84 及 28 的放大图谱; (B) 半定量分析差异蛋白 mRNA 相对表达情况. 以 *CAB2* 基因的表达情况作为对照; (C) 定量 PCR 分析蛋白点 52 和 118 在野生型和光敏素突变体中的表达情况

11.91 倍(图 3(C)). 还发现了一个mRNA绑定蛋白(At3g63140, 蛋白点, 73). 有趣的是, 它在菠菜中的同源体被认为是一种RNA核酸酶[47]. 基因微阵列研究结果发现这个基因受红光诱导(R/D g:1.999). 如图 3 所示, 其mRNA表达水平急剧下降, 这与突变体中减少的蛋白质丰度一致. 数据表明, 该基因表达受光敏色素调控. 28 号蛋白点仅在野生型中有表达, 在*phyAphyB*突变体中几乎检测不到, 其mRNA水平在突变体也下降. 此外, 蛋白点 34, 53, 58 和 75 对应的基因mRNA表达水平在*phyAphyB*突变体中明显下 降, 与蛋白质的变化情况一致. 有趣的是, 通过Softberry-NSITEP对这些基因启动子进行分析, 发现在蛋白点 52, 28 和 34 的 5′-UTR序列中存在G-box序列CACGTG—转录因子PIF3 目标元件的核心序 列[48]. 结果表明, 红光下光敏素有可能通过与转录因子 PIF3 相互作用而调控这些基因mRNA的表达.

然而, 也有一些基因 mRNA 的表达情况与蛋白质变化相反. 如蛋白点 11 号与 118 号, mRNA 水平在野生型与突变体间无变化, 但是蛋白水平在 *phyAphyB* 突变体中上调. 我们采用了定量 PCR 对 118 蛋白点对应的基因进行分析, 结果与半定量一致. 如图 3 所示, 蛋白点 84 号对应的基因启动子区也含有 G-box, 其蛋白表达在 phyAphyB 缺失后增加了近 3 倍, 与 mRNA 变化情况相反. 这些差异可能是由于 RNA 和蛋白质不同的稳定性以及更新速度所造成的, 也可能是通过翻译后修饰如磷酸化. 蛋白质等电点的改变等引起的变化. 这一推测支持了细胞质中光敏素可能行使的功能.

3　结论

差异蛋白显示了光受体突变后引起的最终改变. 我们选取这些差异蛋白检测它们对应的 mRNA 水平, 证实这些改变是否发生在转录或是转录后水平. 我们的观察暗示, 光敏素介导了红光对基因 mRNA 及蛋白水平表达的调控. 至此, 许多假定的信号成员已被陆续发现, 但是它们分子水平的功能还不是很清楚. 对于光敏素是如何感受光, 将光信号转变为基因和蛋白表达的变化, 以及这些改变是否是植物响应外界光环境的变化而作出的生理上的修饰, 我们不得而知. 本研究提供了 *phyA* 和 *phyB* 影响蛋白表达的总的图谱, 促进了红光下幼苗蛋白质组学的研究.

致谢　在此特别感谢加州大学洛杉矶分校林辰涛教授对此工作的指导. 感谢湖南师范大学梁宋平教授对质谱技术的支持.

参考文献

1　Moller S G, Whitelam G C. The cell biology of phytochrome signaling. New Phytol, 2000, 154: 553—590[DOI]

2 Montgomery B L, Lagarias J C. Phytochrome ancestry: sensors of bilins and light. Trends Plant Sci, 2002, 7: 357—366[DOI]
3 Casal J J. Phytochromes, cryptochromes, phototropin: photoreceptor interaction in plants. Photochem Photobiol, 2000, 71: 1—11[DOI]
4 Yeh K C, Lagarias J C. Eukaryotic phytochromes: light-regulated serine/threonine protein kinases with histidine kinase ancestry. Proc Natl Acad Sci USA, 1998, 95: 13976—13981[DOI]
5 Yeh K C, Wu S H, Murphy J T, et al. A cyanobacterial phytochrome two-component light sensory system. Science, 1997, 277: 1505—1508[DOI]
6 Reed J W. Phytochromes are pripatetic kinases. Curr Opin Plant Biol, 1999, 5: 393—397[DOI]
7 Clack T, Mathews S, Sharrock R A. The phytochrome apoprotein family in Arabidopsis is encoded by five genes: The sequences and expression of PHYD and PHYE. Plant Mol Biol, 1994, 25: 413—427[DOI]
8 Quail P H, Boylan M T, Parks B M, et al. Phytochromes: Photosensory perception and signal transduction. Science, 1995, 268: 675—680[DOI]
9 Rockwell N C, Su Y S, Lagarias J C. Phytochrome structure and signaling mechanisms. Annu Rev Plant Biol, 2006, 57: 837—858[DOI]
10 Nagatani A, Reed J W, Chory J. Isolation and initial characterization of Arabidopsis mutants that are deficient in phytochrome A. Plant Physiol, 1993, 102: 269—277
11 Whitelam G C, Johnson E, Peng J, et al. Phytochrome a null mutants of Arabidopsis display a wild-type phenotype in white light. Plant Cell, 1993, 5: 757—768[DOI]
12 Correll M J, Kiss J Z. The roles of phytochromes in elongation and gravitropism of roots. Plant Cell Physiol, 2005, 46(2): 317—323[DOI]
13 Casal J J, Sánchez R A. Phytochromes and seed germination. Seed Sci Res, 1998, 8: 317—329
14 Neff M M, Volkenburgh E V. Light-stimulated cotyledon expansion in Arabidopsis seedlings. Plant Physiol, 1994, 104: 1027—1032
15 Nemhauser J, Chory J. Photomorphogenesis, in: The Arabidopsis Book. Washington: American Society of Plant Biologists, 2002.
16 Wang H, Deng X W. Phytochrome Signaling Mechanism. In: The Arabidopsis Book. Washington: American Society of Plant Biologists, 2002
17 Guo H, Yang H, Mockler T C, et al. Regulation of flowering time by Arabidopsis photoreceptors. Science, 1998, 279: 1360—1363[DOI]
18 Somers D E, Devlin P F, Kay S A. Phytochromes and cryptochromes in the entrainment of the Arabidopsis circadian clock. Science, 1998, 282: 1488—1490[DOI]
19 Lim R Y, Fahrenkrog B. The nuclear pore complex up close. Curr Opin Cell Biol, 2006, 18: 342—347[DOI]
20 Bjellqvist B, Pasquali C, Ravier F, et al. A nonlinear wide-range immobilized pH gradient for two-dimensional electrophoresis and its definition in a relevant pH scale. Electrophoresis, 1993, 14: 1357—1365[DOI]
21 Blum H, Beier H, Gross H J. Improved silver staining of plant proteins, RNA and DNA in polyacrylamide gels. Electrophoresis, 1987, 8: 93—99[DOI]
22 Gharahdaghi F, Weinberg C R, Meagher D A, et al. Mass spectrometric identification of proteins from silver-stained polyacrylamide gel: a method for the removal of silver ions to enhance sensitivity. Electrophoresis, 1999, 20: 601—605[DOI]
23 Chen P, Xie J Y, Liang S P. Identification of protein spots in silver-stained two dimensional gels by MALDI-TOF mass peptide map analysis. Acta Biochem Biophy Sin, 2000, 32: 387—391
24 Gobom J, Schuerenberg M, Mueller M, et al. Alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid affinity sample preparation, A protocol for MALDI-MS peptide analysis in proteomics. Anal Chem 2001, 73: 434—438[DOI]
25 Mockler T C, Yu X H, Shalitin D, et al. Regulation of flowering time in Arabidopsis by K homology domain proteins. Proc Natl Acad Sci USA, 2004, 101: 12759—12764[DOI]
26 Bourguignon J, Merand V, Rawsthorne S, et al. Glycine decarboxylase and pyruvate-dehydrogenase complexes share the same dihydrolipoamide dehydrogenase in pea leaf mitochondria evidence from mass-spectrometry and primary-structure analysis. Biochem J, 1996, 313: 229—234
27 Engel N, Daele K V D, Kolukisaoglu U N, et al. Deletion of glycine decarboxylase in Arabidopsis is lethal under nonphotorespiratory conditions. Plant Physiol, 2007, 144: 1328—1335[DOI]
28 Chen I C, Huang I, Liu M J, et al. Glutathione S-transferase interacting with Far-Red insensitive 219 is involved in phytochrome

A-mediated signaling in Arabidopsis. Plant Physiol, 2007, 143: 1189—1202[DOI]

29 Escobar M A, Franklin K A, Svensson A S, et al. Light regulation of the Arabidopsis respiratory chain. Multiple discrete photoreceptor responses contribute to induction of type Ⅱ NAD(P)H dehydrogenase genes. Plant Physiol, 2004, 136: 2710—2721.[DOI]

30 Lintala, Minna, Allahverdiyeva, et al. Structural and functional characterization of ferredoxin-NADP-oxidoreductase using knock-out mutants of Arabidopsis. Plant J, 2007, 49: 1041—1052

31 Guo Y, Xiong L, Ishitani M, et al. An Arabidopsis mutation in translation elongation factor 2 causes superinduction of CBF/DREB1 transcription factor genes but blocks the induction of their downstream targets under low temperatures. Proc Natl Acad Sci USA, 2002, 99: 7786—7791[DOI]

32 Hohfeld J, Jentsch S. GrpE-like regulation of the hsc70 chaperone by the anti-apoptotic protein BAG-1. Embo J, 1997, 16(20): 6209—6216[DOI]

33 Bukau B, Horwich A L. The Hsp70 and Hsp60 chaperone machines. Cell, 1998, 92(3): 351—366[DOI]

34 Ma H, Yanofsky M F, Meyerowitz E. Molecular cloning and characterization of GPA1, a G protein α -subunit gene of Arabidopsis thaliana. Proc Natl Acad Sci USA, 1990, 87: 3821—3825[DOI]

35 Weiss C A, Garnaat C W, Mukai K, et al. Isolation of cDNAs encoding guanine nucleotide-binding protein β -subunit homologues from maize (ZGB1) and Arabidopsis (AGB1). Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 9554—9558[DOI]

36 Kunkel T, Neuhaus G, Batschauer A, et al. Functional analysis of yeast-derived phytochrome A and B phycocyanobilin adducts. Plant J, 1996, 10: 625—636[DOI]

37 Okamoto H, Matsui M, Deng X W. Overexpression of the heterotrimeric G-protein α -subunit enhances phytochrome-mediated inhibition of hypocotyl elongation in Arabidopsis. Plant Cell, 2001, 13: 1639—1651[DOI]

38 Ullah H, Chen J G, Young J C, et al. Modulation of cell proliferation by heterotrimeric G protein in Arabidopsis. Science, 2001, 292: 2066—2069 [DOI]

39 Ullah H, Chen J G., Temple B, et al. The β-Subunit of the Arabidopsis G protein negatively regulates auxin-induced cell division and affects multiple developmental processes. Plant Cell, 2003,15: 393—409[DOI]

40 Wang H X, Weerasinghe R R, Perdue T D, et al. A golgi-localized hexose transporter is involved in heterotrimeric G protein-mediated early development in Arabidopsis. Mol Biol Cell, 2006, 17: 4257—4269[DOI]

41 Zhai Q, Li C B, Zheng W, et al. Phytochrome chromophore deficiency leads to overproduction of jasmonic acid and elevated expression of jasmonate-responsive genes in Arabidopsis. Plant Cell Physiol, 2007, 48(7): 1061—1071[DOI]

42 Trusov Y, Rookes J E, Chakravorty D, et al. Heterotrimeric G-proteins facilitate arabidopsis resistance to necrotrophic pathogens and are involved in jasmonate signaling1. Plant Physiol, 2006, 140: 210—220[DOI]

43 Neff M M, Volkenburgh E V. Light-stimulated cotyledon expansion in Arabidopsis seedlings. Plant Physiol, 1994, 104: 1027—1032

44 Derbyshire P, Findlay K, McCann M C. et al. Cell elongation in Arabidopsis hypocotyls involves dynamic changes in cell wall thickness. J Exp Bot, 2007, 58: 2079—2089[DOI]

45 Karlin-Neumann, George A, Sun L, et al. Expression of light-harvesting chlorophyll a/b-protein genes is phytochrome-regulated in etiolated Arabidopsis thaliana seedlings. Plant Physiol, 1988, 88(4): 1323—1331[DOI]

46 Tepperman J M, Hwang Y S, Quail P H. phyA dominates in transduction of red-light signals to rapidly responding genes at the initiation of Arabidopsis seedling de-etiolation. Plant J, 2006, 48: 728—742[DOI]

47 Shlomit Y R, Merav H, Gadi S. Polynucleotide phosphorylase functions as both an exonuclease and a poly(A) polymerase in spinach chloroplasts. Mol Cell Biol, 2001, 21: 5408—5416[DOI]

48 Martinez-Garcia J F, Huq E, Quail P H. Direct targeting of light signals to a promoter element-bound transcription factor. Science, 2000, 288: 859—863[DOI]