

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2011.01251

水稻突触融合相关蛋白基因(*OsKNOLLE*)在酵母中的异源表达及在非生物胁迫中的作用初探

王飞娟, 朱诚

中国计量学院生命科学学院, 浙江省生物计量及检验检疫技术重点实验室, 杭州 310018

摘要: 突触融合相关蛋白属于多功能蛋白家族SNARE(SolubleN-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor)的亚家族蛋白, 这类家族在植物的许多生理过程中都起着非常重要的作用。为探明水稻突触融合相关蛋白OsKNOLLE(Syntaxin-related protein KNOLLE)的功能, 文章从“中花 11”水稻根中克隆*OsKNOLLE*基因的CDS序列并构建到酵母表达载体pYX212 上, 同时转化酿酒酵母菌株BY4741。通过比较不同酵母转化子在多种非生物因子胁迫下的表型, 显示转*OsKNOLLE*酵母菌比对照菌适应逆境能力更强, 表明*OsKNOLLE*与盐、 Cu^{2+} 、 H_2O_2 、 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 胁迫相关, 推测*OsKNOLLE*在植物对逆境的耐性中发挥重要作用。本研究为*OsKNOLLE*基因的研究提供方法支持, 同时明确了其与不同非生物因子的相关性。

关键词: 水稻; 突触融合相关蛋白; 异源表达; 非生物胁迫; 功能分析

Heterologous expression of a rice syntaxin-related protein KNOLLE gene (*OsKNOLLE*) in yeast and its functional analysis in the role of abiotic stress

WANG Fei-Juan, ZHU Cheng

Zhejiang Provincial Key Laboratory of Biometrology and Inspection & Quarantine, College of Life Sciences, China Jiliang University, Hangzhou 310018, China

Abstract: Syntaxin-related protein KNOLLE, a multifunctional protein family belonging to the SNARE superfamily, plays an important role in many physiological processes in plants. In order to understand the function of the syntaxin-related protein KNOLLE (*OsKNOLLE*) in rice (*Oryza sativa*), the CDS sequence of *OsKNOLLE* gene isolated from a japonica rice cultivar “Zhonghua 11” was fused into an expression vector pYX212 and transformed into the *S. cerevisiae* strain BY4741 by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. The transformants with *OsKNOLLE* showed better survival abilities than the transformants with the empty vectors based on their phenotypes in responses to different abiotic stresses such as salt, Cu^{2+} , H_2O_2 , Cd^{2+} , and Hg^{2+} . These data suggests that *OsKNOLLE* plays a crucial role in re-

收稿日期: 2011-03-17; 修回日期: 2011-06-18

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(编号: Y3110334), 浙江省重点创新团队, 浙江省科技创新团队项目(编号: 2010R50028), “十一·五”国家科技支撑计划重点项目(编号: 2006BAK02A18)和国家重点基础研究发展规划(973 计划)项目(编号: 2002CB10804)资助

作者简介: 王飞娟, 博士, 讲师, 研究方向: 植物环境分子生理。Tel: 0571-87676187, E-mail: wfj0311@cjl.edu.cn

通讯作者: 朱诚, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 农产品安全与植物环境分子生理。E-mail: pzhuch@zju.edu.cn, pzhch@cjl.edu.cn

致谢: 感谢浙江大学王品美博士对酿酒酵母菌株和表达载体的惠赠。

网络出版时间: 2011-10-11 9:23:41

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20111011.0923.005.html>

6-His标签)。PCR反应体系为 25 μ L, 包括GC I 2 \times buffer 12.5 μ L, 10 mmol/L dNTP 1 μ L, 引物各 0.25 μ L, 模板cDNA 2 μ L, LA *Taq*酶 0.25 μ L, ddH₂O 8.75 μ L。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s; 65 $^{\circ}$ C(T_m) 45 s; 72 $^{\circ}$ C 1 min 20 s, 35 次循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min, 4 $^{\circ}$ C保温。

1.2.3 *OsKNOLLE* 基因的鉴定及表达载体构建

将回收纯化的 *OsKNOLLE*-6His 的 PCR 产物与 pMD19 T 载体(TaKaRa 公司)相连(4.5 μ L PCR 产物 + 0.5 μ L T 载体 + 5 μ L Solution I), 用热激法将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 。挑取阳性克隆, 经 PCR 验证及测序鉴定正确后, 采取碱裂解法提取重组质粒(pMD19 *OsKNOLLE*-6His)。接着对重组质粒和 pYX212 质粒分别进行双酶切(*Bam*H 和 *Hind* III 酶), 跑电泳回收目的条带, 再用 T4 连接酶将 *OsKNOLLE*-6His 与 pYX212 质粒相连, 获得表达载体 pYX212 *OsKNOLLE*-6His。再次转化大肠杆菌 DH5 α , 挑取阳性克隆进行 PCR 验证和测序比较, 提取重组质粒 pYX212 *OsKNOLLE*-6His。本实验构建 *OsKNOLLE*-6His 基因在酵母中的表达载体流程见图 1。

1.2.4 酵母转化及重组子筛选

提取的重组质粒pYX212 *OsKNOLLE*-6His通过双酶切(*Bam*H 和 *Hind* III)鉴定正确后, 采用醋酸锂的方法^[12]转化酿酒酵母BY4741, 期间采用两种对照(无菌水为阴性对照, pYX212 空载体为阳性对照)。转化菌株在 30 $^{\circ}$ C条件下培养于添加有组氨酸, 亮氨酸, 甲硫氨酸的无氨基氮源培养基(YNB)后, 再通过尿嘧啶的缺失来筛选重组子, 在此基础上再次提取酵母质粒并进行*Bam*H 与 *Hind* III 的双酶切来验证重组子。

1.2.5 *OsKNOLLE* 蛋白在酿酒酵母中的功能分析及蛋白质表达水平验证

重组酵母菌株(转有目的基因的实验组与对照组)单菌落于YNB中, 30 $^{\circ}$ C摇床中培养至OD₆₀₀ = 1.0 时, 将其菌液分别稀释 10⁻⁴、10⁻⁵, 取 5 μ L 在含有不同非生物胁迫因子的YNB固体培养基中 30 $^{\circ}$ C培养数天, 通过表型来推测其与非生物因子(如高温、盐、Cu²⁺、H₂O₂、Cd²⁺、Hg²⁺胁迫)的相关性, 实验中每

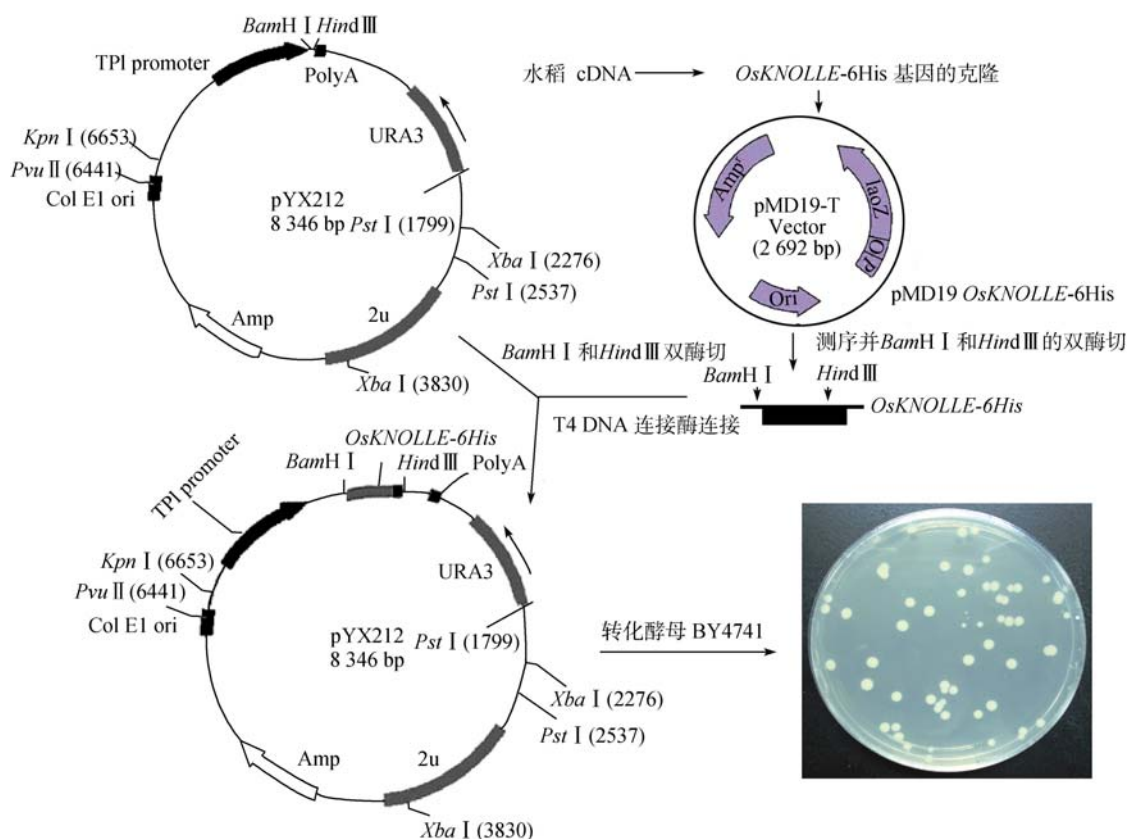


图 1 酵母中表达载体构建及转化流程图

种胁迫分别进行 3 个重复。酵母总蛋白采用凯基酵母蛋白提取试剂盒来提取, Bradford 法定量后进行 Western blotting 验证。

将等体积的蛋白样品与样品缓冲液混合于 Eppendorf 管中, 置于 95℃ ~ 100℃ 加热 5 min 后, 立即在冰上, 随后进行实验或 -20℃ 储存以便再次使用。SDS-PAGE 电泳时蛋白上样量为 50 μg, 胶浓度为 12.5%, 转膜系统为 Bio-Rad 小型 Western blotting 转移仪。组氨酸标签抗体为抗 His 标签鼠单克隆抗体 (1:2000, CW0082, CWBIO), 同时进行对照实验, 内参为抗 β-tubulin 鼠单克隆抗体 (1:2000, T 5186, Sigma), 实验结果采用凯基加强型 ECL 检测试剂盒进行检测。

2 结果与分析

2.1 OsKNOLLE 蛋白的结构序列分析

通过 TargetP 对 OsKNOLLE 蛋白的转运肽进行分析和预测, 发现其不存在转运肽(数据结果未提供), 为胞浆蛋白。并利用 TMHMM 在线软件对 OsKNOLLE 蛋白的跨膜结构域进行预测分析, 结果发现其存在一个跨膜结构域(图 2A)。因此 OsKNOLLE 蛋白可能在细胞质中合成前体蛋白后进入其他细胞器, 再经过蛋白质加工后成为成熟蛋白质而发挥作用。鉴于上述原因, 跨膜结构域的预测对于充分了解蛋白质功能和其在细胞中的作用位点等具有重要意义。

同样, 通过 ProtScale 预测 OsKNOLLE 蛋白氨基酸序列的亲水/疏水性, 结果与 TMHMM 预测一致, 该蛋白多肽链中最强疏水值为 4.078, 而最强亲水值只有 -3.244, 整条链有明显的疏水性区域, 因此具有跨膜结构域(图 2B)。

2.2 OsKNOLLE 基因的克隆及酵母表达载体的构建

以水稻 cDNA 为模板, 采用特异性引物(具 6 个组氨酸标签)PCR 扩增 *OsKNOLLE-6His* 基因, 大小为 954 bp。

通过酵母质粒的提取和 *Bam*H 酶与 *Hind* 的双酶切进行验证是否构建成功。测序结果表明 *OsKNOLLE* 的第 530 个碱基与数据库有所不同, 存在一个氨基酸的差异, 由谷氨酸变异为甘氨酸(与数

据库中登陆号为 gi|115455187 的蛋白相比较)。

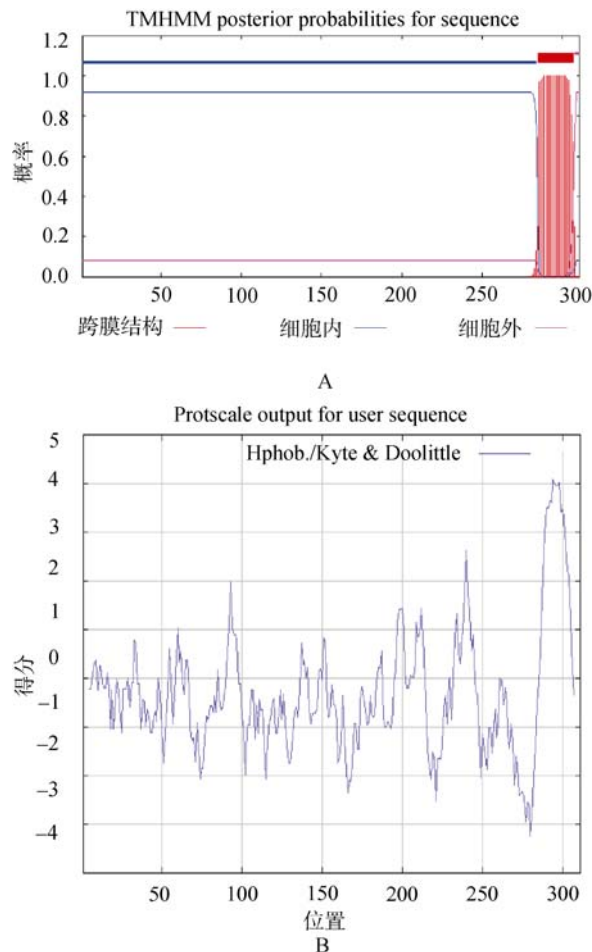


图 2 OsKNOLLE 蛋白的结构分析

A: OsKNOLLE 蛋白跨膜结构域的预测; B: OsKNOLLE 蛋白亲水/疏水性的预测, 横坐标为蛋白质氨基酸残基的序号, 纵坐标为残基的疏水-亲水特性, 正值表示疏水, 负值表示亲水。

2.3 多种非生物因子胁迫下酵母重组子的表型分析

采用醋酸锂的方法将重组质粒 pYX212 *OsKNOLLE-6His* 转入酿酒酵母 BY4741, 双酶切验证重组酵母质粒(酵母中质粒提取量少, 本实验通过将其转入大肠杆菌 DH5α 高效复制后再提取相关质粒), 电泳结果中存在目的基因 *OsKNOLLE* 和 pYX212 质粒 DNA, 表明酵母转化实验构建正确(图 3)。比较分析重组酵母菌于不同非生物因子胁迫下的表型中(图 4), 发现转有目的基因的重组酵母菌在不同胁迫下比对照酵母菌(即转空载体)具有更强的生活力, 如盐、 Cu^{2+} 、 H_2O_2 、 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 胁迫, 特别是 Hg^{2+} 、

Cd^{2+} 胁迫, 因此推断*OsKNOLLE*在很多逆境下可保护生物体免受伤害。同时对重组酵母菌中

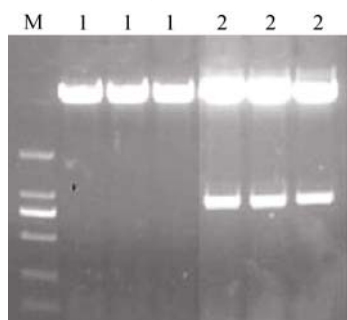


图 3 重组酵母菌株转化结果的验证
M: Marker2000; 1: 空载体; 2: pYX212-*OsKNOLLE*。

OsKNOLLE 的表达情况进行了分析, 表明 *OsKNOLLE* 确实在重组酵母中得到了高水平的表达, 如图 5。

3 讨论

生物与非生物胁迫下响应基因或蛋白质的鉴定是了解植物对特定逆境下的适应机制及分子响应机制时最基本和最有利的工具。从已有报道来看, 此类研究主要集中在不同条件下植物蛋白表达谱的研究上, 并发现了许多与基因突变、发育、逆境、植物与微生物相关的蛋白(或基因), 但是进一步证明这些蛋白(或基因)的功能和蛋白质-蛋白质相互作用研究还比较欠缺^[14-16]。本研究利用分子克隆技术扩增水稻*OsKNOLLE*基因的CDS序列, 通过在酿酒酵母中的异源表达对其功能进行分析鉴定。在多种

不同的非生物因子胁迫下, 如盐、 Cu^{2+} 、 H_2O_2 、 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 胁迫下, 转有*OsKNOLLE*基因的重组酵母菌比对照组(转空载体)具有更强的生活力, 推测其对逆境的抵抗能力更强。

突触融合相关蛋白是植物体正常生长和维持细胞内部环境平衡的需要, 不仅介导囊泡整合过程, 而且与许多信号途径密切联系, 在植物的许多生理过程中都起着非常重要的作用^[4,17]。Sokolovsi等^[18]研究发现, 植物SNAREs可通过调节 Ca^{2+} 信号途径间接影响ABA信号对 K^+ 和 Cl^- 通道的调控作用或通过 Ca^{2+} 通道参与其他信号途径。又如R- SNAREs的AtVAMP71家族介导转运囊泡与液泡的融合, 而在Yehoram等人的盐胁迫实验中证明, 含 H_2O_2 的囊泡与液泡的融合会对植物造成伤害, 同时植物的囊泡运输相关调节基因也参与了对非生物胁迫的响应, 如AtVAMP71的缺失突变体可以减少这种毒害^[19,20]。

转运肽是指游离于核糖体上合成的蛋白质的N端信号, 此类蛋白质在基质游离核糖体上合成后, 可在转运肽的引导下定位到不同细胞器, 并在形成有功能的空间构象后再发挥具体功能。一般认为跨膜结构域固着在细胞膜上起“锚定”作用, 是膜内在蛋白与膜脂相互结合的部分, 由20个左右的疏水氨基酸残基组成, 其中主要为 α 螺旋。因此转运肽和跨膜结构域的预测与分析是正确认识和理解蛋白质功能和性质的基础。通过对*OsKNOLLE*蛋白的结构分析和预测, 发现其不存在转运肽, 但存在跨膜

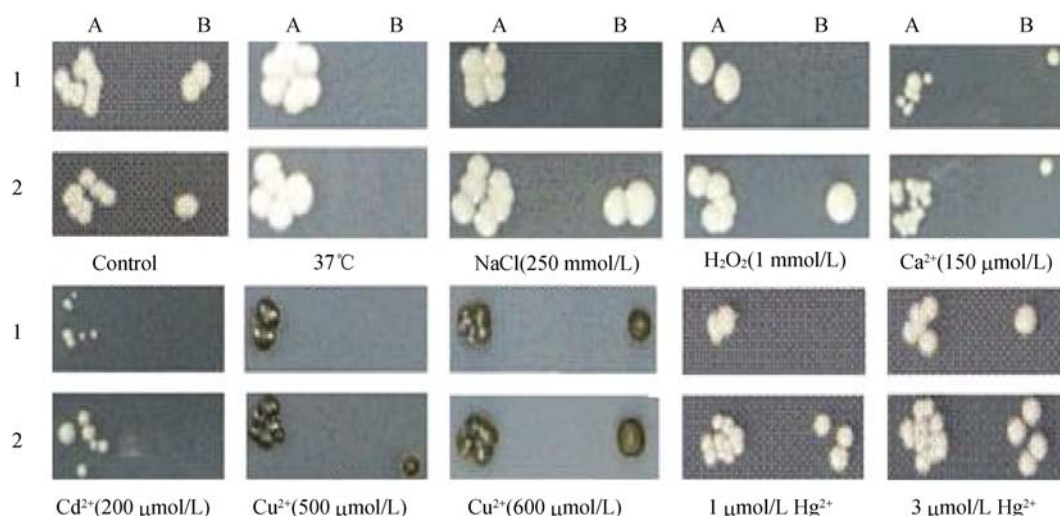


图 4 重组酵母菌在不同逆境条件下的表型分析

数字分别表示不同酵母菌：1，空载体；2，pYX212-OsKNOLLE；字母分别表示酵母菌的不同稀释倍数(起始 $OD_{600\text{ nm}}=1.0$)：A， 10^{-4} ；B， 10^{-5} 。

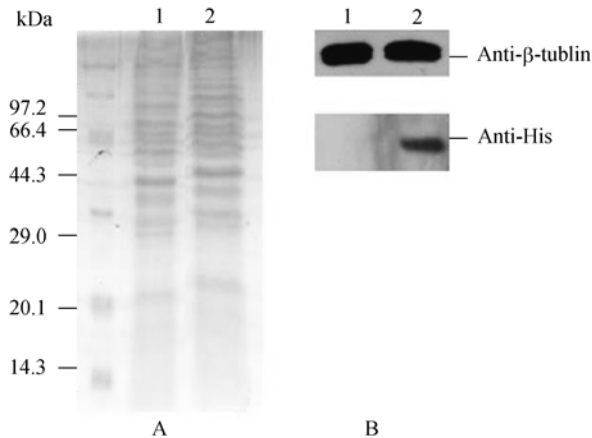


图 5 重组酵母菌的蛋白质表达水平分析

A：重组酵母菌总蛋白表达情况分析；B：酵母菌中OsKNOLLE蛋白的表达水平验证。1：空载体；2：pYX212-OsKNOLLE。

结构域。由此推断 OsKNOLLE 蛋白在经过翻译后修饰等蛋白质加工后成为成熟蛋白质，再进入其它细胞器发挥作用。

综上所述，将OsKNOLLE蛋白作用于减轻非生物因子胁迫的机理推测如下：(1)OsKNOLLE蛋白可以维持膜融合的正常结构从而减轻毒害；(2)参与植物的信号传导和对逆境的防御机制，或通过调节相关基因的表达减轻伤害；(3)OsKNOLLE蛋白通过调节小泡运输，或通过跨膜进入其它细胞器发挥作用，将有毒的代谢产物排出细胞等，从而减轻植物体受不利因素的干扰，在本实验中重组酵母菌在重金属胁迫下效果最明显，究其原因可能是其参与 Cd^{2+} 、 Hg^{2+} 的转移和清除的作用，从而降低毒害。随着研究的进一步的深入，如通过水稻转基因工作等，我们会更全面的了解这类蛋白在植物生长发育中的作用，为阐明植物耐重金属机制、重金属污染治理和植物修复提供科学依据。

参考文献(References):

- [1] Baker AJM. Metal tolerance. *New Phytol*, 1987, 106(1): 93–111. [DOI](#)
- [2] Clemens S. Molecular mechanisms of plant metal tolerance and homeostasis. *Planta*, 2001, 212(4): 475–486. [DOI](#)
- [3] Hall JL. Cellular mechanisms for heavy metal detoxification and tolerance. *J Exp Bot*, 2002, 53(366): 1–11. [DOI](#)
- [4] Feng H, Chen C, Wang YQ, Qiu JL, Chu CC, Du XH. Plant SNAREs and their biological functions. *Hereditas*, 2009, 31(5): 471–478. [DOI](#)
- [5] Lipka V, Dittgen J, Bednarek P, Bhat R, Wiermer M, Stein M, Landtag J, Brandt W, Rosahl S, Scheel D, Llorente F, Molina A, Parker J, Somerville S, Schulze-Lefert P. Pre- and postinvasion defenses both contribute to nonhost resistance in *Arabidopsis*. *Science*, 2005, 310(5751): 1180–1183. [DOI](#)
- [6] Bao YM, Wang JF, Huang J, Zhang HS. Cloning and characterization of three genes encoding Qb-SNARE proteins in rice. *Mol Genet Genomics*, 2008, 279(3): 291–301. [DOI](#)
- [7] Geelen D, Leyman B, Batoko H, Di Sansabastiano GP, Moore I, Blatt MR. The abscisic acid-related SNARE homolog NtSyr1 contributes to secretion and growth: Evidence from competition with its cytosolic domain. *Plant Cell*, 2002, 14(2): 387–406. [DOI](#)
- [8] Collins NC, Thordal-Christensen H, Lipka V, Bau S, Kombrink E, Qiu JL, Hückelhoven R, Stein M, Freialdenhoven A, Somerville SC, Schulze-Lefert P. SNARE-protein-mediated disease resistance at the plant cell wall. *Nature*, 2003, 425(6961): 973–977. [DOI](#)
- [9] Leshem Y, Golani Y, Kaye Y, Levine A. Reduced expression of the v-SNAREs AtVAMP71/AtVAMP7C gene family in *Arabidopsis* reduces drought tolerance by suppression of abscisic acid-dependent stomatal closure. *J Exp Bot*, 2010, 61(10): 2615–2622. [DOI](#)
- [10] Benschop JJ, Mohammed S, O’Flaherty M, Heck AJR, Slijper M, Menke FLH. Quantitative phosphoproteomics of early elicitor signaling in *Arabidopsis*. *Mol Cell Proteomics*, 2007, 6(7): 1198–1214. [DOI](#)
- [11] Bao YM, Liu YH, Xu DQ, Huang J, Wang ZF, Wang JF, Zhang HS. Preparation, characterization and application of rice Qb-SNARE protein OsNPSN11 polyclonal antibody. *Hereditas*, 2010, 32(9): 961–965. [DOI](#)
- [12] Wang FJ, Zeng B, Sun ZX, Zhu C. Relationship between proline and Hg^{2+} -induced oxidative stress in a tolerant rice mutant. *Arch Environ Contam Toxicol*, 2009, 56(4): 723–731. [DOI](#)
- [13] Gietz RD, Woods RA. Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method. *Method Enzymol*, 2002, 350: 87–96. [DOI](#)
- [14] Yan SP, Tang ZC, Su WA, Sun WN. Proteomic analysis of salt stress-responsive proteins in rice root. *Proteomics*,

- 2005, 5(1): 235–244. [DOI](#)
- [15] Chitteti BR, Peng HH. Proteome and phosphoproteome differential expression under salinity stress in rice (*Oryza sativa*) roots. *J Proteome Res*, 2007, 6(5): 1718–1727. [DOI](#)
- [16] Shri M, Kumar S, Chakrabarty D, Trivedi PK, Mallick S, Misra P, Shukla D, Mishra S, Srivastava S, Tripathi RD, Tuli R. Effect of arsenic on growth, oxidative stress, and antioxidant system in rice seedlings. *Ecotox Environ Safe*, 2009, 72(4): 1102–1110. [DOI](#)
- [17] Jürgens G. Membrane trafficking in plants. *Annu Rev Cell Dev Biol*, 2004, 20(1): 481–504. [DOI](#)
- [18] Sokolovski S, Hills A, Gay RA, Blatt MR. Functional interaction of the SNARE protein NtSyp121 in Ca^{2+} channel gating, Ca^{2+} transients and ABA signalling of stomatal guard cells. *Mol Plant*, 2008, 1(2): 347–358. [DOI](#)
- [19] Leshem Y, Melamed-Book N, Cagnac O, Ronen G, Nishri Y, Solomon M, Cohen G, Levine A. Suppression of *Arabidopsis* vesicle-SNARE expression inhibited fusion of H_2O_2 -containing vesicles with tonoplast and increased salt tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103(47): 18008–18013. [DOI](#)
- [20] Mazel A, Leshem Y, Tiwari BS, Levine A. Induction of salt and osmotic stress tolerance by overexpression of an intracellular vesicle trafficking protein AtRab7 (AtRabG3e). *Plant Physiol*, 2004, 134(1): 118–128. [DOI](#)

• 科学新闻 •

花粉管导向控制机制的研究取得重要进展

植物从水生向陆生进化过程中, 精细胞丧失了运动能力, 需要依靠花粉管把它递送到雌配子体--胚囊中与卵子融合, 完成受精。花粉管导向是一个精确调控的雌-雄配子体细胞相互识别的过程。胚囊释放吸引信号, 花粉管接收信号后作出定向生长的反应。到目前为止, 吸引信号已经被初步鉴定为一类分泌性质的小肽分子, 但是花粉管对吸引信号的响应机制还是未知的。中国科学院遗传与发育生物学研究所杨维才研究员带领的研究团队首次发现了一个控制花粉管响应的因子, 命名为 POD1。POD1 同时控制花粉管响应和早期胚胎形态建成。通过遗传分析, 结合亚细胞定位和转基因实验、细胞组分超速分离、酵母双杂交和荧光双分子互补等手段, 该团队深入研究了 POD1 控制花粉管导向的分子机理。研究发现, POD1 是一个定位在内质网腔中的蛋白, 并与内质网中参与质量控制的关键因子钙网蛋白 CRT3 相互作用。并且, POD1 控制内质网腔中含有 HDEL 定位信号的蛋白在内质网中的滞留。这项工作首次揭示了内质网蛋白在花粉管响应过程中的关键作用, 并为下一步分离其它控制花粉管响应的因子提供了新的切入点。这一工作表明, 内质网蛋白在控制植物细胞-细胞间相互作用过程中可能是一个关键的控制节点。

上述研究结果于 2011 年 9 月 28 日在线发表于国际著名杂志 *The Plant Cell*。杨维才实验室的助研李红菊为该论文的第一作者。本研究得到了科技部重大研究计划项目和国家自然科学基金委的资助。

引自中国科学院遗传与发育生物学研究所网站