

摘 要

1, 3, 4-三磷酸肌醇5/6-激酶(简称5/6-激酶)是磷酸肌醇代谢过程中的一种重要的调控酶。动物细胞中,它具有肌醇激酶和蛋白激酶双重活性,还能进行自身磷酸化,是一个从植物到人甚至线虫都保守的酶;而且5/6-激酶还是第一个鉴定出的与COP9信号体(简称CSN)互作的蛋白激酶,但它们互作的生物学意义还不清楚。植物细胞中,仅知道5/6-激酶是一种广泛存在的肌醇激酶,有关它的功能没有更多的报道。因此,研究5/6-激酶是否具有蛋白激酶的活性、是否与CSN互作,并参与植物的光形态建成,对揭示5/6-激酶的生物学功能,阐明植物光形态建成机理等方面具有重要的理论意义。

本文以拟南芥为材料,克隆了5/6-激酶的基因(命名为 *AtItpk-1*),并进行了原核表达(His 标签),纯化融合蛋白并制备了多克隆抗体。通过对 *AtItpk-1* 在不同光质下的表达分析,发现它受红光强诱导,说明 *AtItpk-1* 可能参与了植物对红光的应答。通过对 *AtItpk-1* 在拟南芥中的定位研究,发现 *AtItpk-1* 定位在细胞核中。

为了研究5/6-激酶在拟南芥中的生物学意义,对 *AtItpk-1* 的 T-DNA 插入突变体 *atitpk-1-1* 和 *atitpk-1-2* 进行了筛选和鉴定,并通过转基因技术获得了超表达 *AtItpk-1* 基因的转基因植株。表型分析表明,与野生型相比, *atitpk-1* 突变体表现为红光抑制下胚轴伸长,超表达植株则表现为红光促进下胚轴伸长。另外,当将 *AtItpk-1* 基因转到突变体 *atitpk-1-1* 中,下胚轴伸长便恢复到与野生型一样。这些结果表明拟南芥5/6-激酶 *AtItpk-1* 可能参与了红光下的光形态建成。

利用我们制备的有活性的 GST-*AtItpk-1* 融合蛋白,进行了自身磷酸化实验,发现 *AtItpk-1* 具有蛋白激酶的活性。这为进一步解释5/6-激酶在光形态建成中的可能作用提供了线索。

以 *fus6/CSN1-3-4* 为材料,利用 *AtItpk-1* 的抗体和 CSN4、CSN5 的抗体,进行了5/6-激酶和 CSN 的免疫共沉淀实验,结果发现拟南芥的5/6-激酶可以和 CSN 共沉淀。基于免疫共沉淀和 *AtItpk-1*、CSN 都是核蛋白的结果,我们认为在拟南芥中存在5/6-激酶和 CSN 互作的可能性。

本研究发现了拟南芥的5/6-激酶参与了红光下的光形态建成,这一作用可能是通过与 CSN 互作完成的,并且5/6-激酶在光形态建成中的功能可能是通过它的蛋白激酶活性来实现的。但是,植物的光形态建成是一个非常复杂的过程,5/6-激酶参与光形态建成的具体机制仍需要进一步探讨。

关键词 拟南芥, COP9 信号体, 1, 3, 4-三磷酸肌醇5/6-激酶, 蛋白激酶, 红光

Abstract

Inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase (5/6-kinase) is a key regulatory enzyme in the process of the inositol phosphate metabolism. In mammalian cells, the 5/6-kinase exhibits the activity of both inositol kinase and protein kinase, and is also reported to have the activity of autophosphorylation. It is conserved from plants to humans and is found even in *Entamoeba histolytica*. Moreover, the 5/6-kinase is also the first identified COP9 signalosome (CSN)-associated kinase in mammalian cells. But the biological function of their association still remains unclear. In plants, it is only reported that the 5/6-kinase is the ubiquitous inositol kinase. But there are not more reports on the function of this enzyme. So, the works that study if the 5/6-kinase exhibits the activity of protein kinase, and if it associates with CSN and then involves in plant photomorphogenesis will be significative for opening out the biological function of 5/6-kinase and elucidating the mechanism of plant photomorphogenesis.

In the research for the dissertation, we cloned the 5/6-kinase gene *Atltpk-1* from *Arabidopsis*. We also expressed the His-*Atltpk-1* protein in *E.coli*, obtained the purified fusion protein and prepared the anti-*Atltpk-1* antibody. In order to analyze the expression of *Atltpk-1* under different light quality, RT-PCR and Western blot were performed. The results indicated that the expression of *Atltpk-1* was strongly induced by red light, which suggested that *Atltpk-1* may be involved in the response of plant to red light. In addition, the study of localization showed that *Atltpk-1* is located in the nucleus in *Arabidopsis*.

In order to study the biological function of 5/6-kinase in *Arabidopsis*, two T-DNA insertion mutants of *Atltpk-1*, designated (by us) as *atltpk-1-1* and *atltpk-1-2*, were screened and identified. Also, the transgenic plants overexpressing *Atltpk-1* were generated by transgenic technology. The phenotypic results indicated when compared with wild-type plants, the *atltpk-1* mutants exhibit the phenotype that red light inhibits the elongation of hypocotyls, and the over-expression lines of *Atltpk-1* show the phenotype that red light promotes the elongation of hypocotyls. In addition, when the *Atltpk-1* gene was transformed into *atltpk-1-1* mutant, the length of hypocotyls was restored to that of the wild-type. These results suggested that the 5/6-kinase *Atltpk-1* may be involved in photomorphogenesis under red light in *Arabidopsis*.

Using the active GST-*Atltpk-1* fusion protein expressed by ourselves, the autophosphorylation assay was performed. The results showed that *Atltpk-1* has protein kinase activity, which can provide the clues for interpreting the possible function of 5/6-kinase in the photomorphogenesis.

The *fus6/CSN1-3-4* was used to do the co-immunoprecipitation (co-IP) of 5/6-kinase and CSN using the anti-*Atltpk-1*, anti-CSN4, and anti-CSN5 antibodies. The result showed that 5/6-kinase can co-immunoprecipitated with CSN in *Arabidopsis*. Based on co-IP and the result that both *Atltpk-1* and CSN were located in the nucleus, we think that it is possible for the association of 5/6-kinase and CSN in *Arabidopsis*.

In our research, it was found the 5/6-kinase may be involved in photomorphogenesis under red light in *Arabidopsis*, possibly via interaction with CSN. The role of 5/6-kinase in photomorphogenesis is possibly based on its activity of protein kinase. But the process of plant photomorphogenesis is very complex and the detailed mechanism for 5/6-kinase involving in photomorphogenesis still needs to study further.

Key words: *Arabidopsis*; COP9 signalosome; inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase; protein kinase; red light

缩略词

英文缩写	英文名称	中文名称
Acr	Acrylamide	丙烯酰胺
Atltpk-1	<i>Arabidopsis</i> inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase	拟南芥 1, 3, 4-三磷酸肌醇 5/6-激酶
AtITL1	<i>Arabidopsis</i> inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase-like protein 1	拟南芥 1, 3, 4-三磷酸肌醇 5/6-激酶类似物蛋白 1
AtITL2	<i>Arabidopsis</i> inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase-like protein 2	拟南芥 1, 3, 4-三磷酸肌醇 5/6-激酶类似物蛋白 2
AP	Alkaline phosphatase	碱性磷酸酯酶
BCIP	5-bromo-4-chloro-3-indolyl phosphate	5-溴-4-氯-3-吲哚磷酸甲苯胺蓝
Bis	N-N'-Methylene bisacrylamide	甲叉双丙烯酰胺
BSA	Bovine serum albumin	牛血清白蛋白
CDS	coding sequence	编码序列
CK2	Protein kinase CK2	蛋白激酶 CK2
co-IP	co-immunoprecipitation	免疫共沉淀
CSN	COP9 signalosome	COP9 信号体
DTT	Dithioerythritol	二硫苏糖醇
EB	Ethidium bromide	溴化乙锭
GFP	Green fluorescent protein	绿色荧光蛋白
GST	Glutathione-S-Transferase	谷胱甘肽硫转移酶
Ins(1,3,4)P ₃	Inositol 1,3,4-trisphosphate	1, 3, 4-三磷酸肌醇
Ins(1,3,4,5)P ₄	Inositol 1,3,4,5-tetraphosphate	1, 3, 4, 5-四磷酸肌醇
Ins(1,3,4,5,6)P ₅	Inositol 1,3,4,5,6-pentaphosphate	1, 3, 4, 5, 6-五磷酸肌醇
Ins(1,3,4,6)P ₄	Inositol 1,3,4,6-tetraphosphate	1, 3, 4, 6-四磷酸肌醇
Ins(1,4,5)P ₃	Inositol 1,4,5-trisphosphate	1, 4, 5-三磷酸肌醇
Ins(3,4,5,6)P ₄	Inositol 3,4,5,6-tetraphosphate	3, 4, 5, 6-四磷酸肌醇
InsP ₆	Inositol 1,2,3,4,5,6-hexaphosphate	1, 2, 3, 4, 5, 6-六磷酸肌醇
IP ₃ , InsP ₃	Ins(1,4,5)P ₃	1, 4, 5-三磷酸肌醇
IPTG	isopropylthio-β-o-galactopyranoside	异丙基-p-D-硫代半乳糖苷
Kan	Kanamycin	卡那霉素
NBT	p-nitroblue tetrazolium chloride	氯化硝基四氮唑蓝
PBS	phosphate-buffered saline	磷酸盐缓冲液
PKD	Protein kinase D	蛋白激酶 D

PMSF	Phenyl-methyl-sulfonyl-fluoride	苯甲基磺酰氟
PtdIns(4,5)P ₂	Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate	磷脂酰肌醇 4, 5 二磷酸
Rif	Rifampin	利福平
RL	Red light	红光
RNase A	Ribonuclease A	核糖核酸酶 A
SDS	Sodium dodecyl sulfate	十二烷基磺酸钠
Tris	Tris(hydroxy-methyl)-amino methane	三羟甲基氨基甲烷
WL	White light	白光
WT	Wild type	野生型
X-gal	5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galactoside	5-溴-4-氯-3-吲哚-D-半乳糖苷

独创性声明

本人声明所呈交的论文是我个人在导师指导下进行的研究工作及取得的科研成果。尽我所知，除了文中特别加以标注和致谢的地方外，论文中不包含其它人已经发表或撰写过的研究成果，也不包含为获得中国农业大学或其它教育机构的学位或证书而使用过的材料。与我一同工作的同志对本研究所做的任何贡献均已在论文中作了明确的说明并表示了谢意。

研究生签名：秦治翔

时间：2005年6月18日

关于论文使用授权的说明

本人完全了解中国农业大学有关保留、使用学位论文的规定，即：学校有权保留送交论文的复印件和磁盘，允许论文被查阅和借阅，可以采用影印、缩印或扫描等复制手段保存、汇编学位论文。同意中国农业大学可以用不同方式在不同媒体上发表、传播学位论文的全部或部分内容。

(保密的学位论文在解密后应遵守此协议)

研究生签名：秦治翔

时间：2005年6月18日

导师签名：王学军

时间：2005年6月20日

第一章 文献综述

1. 1 磷酸肌醇激酶的研究进展

植物生活在不断变化的环境中,必然会感受外界环境的变化(如光、温度、重力、水分等),随之作出相应的生理生化反应来适应环境,从而达到生长发育的目的。外界的刺激一般是通过一系列的步骤转换成胞内的信使分子,这些信使分子再通过其受体蛋白或蛋白质磷酸化,引起生理生化反应的启动与放大。植物细胞中的肌醇磷脂信号系统参与了植物细胞代谢、生理过程的许多方面。

早在20世纪50年代,Hokin等就观察到乙酰胆碱刺激胰脏中肌醇磷脂类的代谢(Hokin等,1953)。之后人们发现,某些特殊的磷酸肌醇类化合物与外部信号间存在着密切的联系。动物细胞中,肌醇磷脂循环在多种生长因子和激素调节细胞生长的信号转导途径中起核心作用。近年来的研究发现,植物细胞中也存在一个和动物细胞类似的肌醇磷脂信号转导系统。可见,磷酸肌醇代谢在动植物细胞中扮演着重要的角色。

1. 1. 1 1,4,5-三磷酸肌醇3-激酶

磷酸肌醇代谢在生物感受胞外刺激及信号转导中起着重要的作用。在这条代谢途径中,许多催化可溶性多磷酸肌醇的磷酸化和去磷酸化反应的激酶和磷酸酯酶参与了反应(Hanks and Quinn, 1991)。这些酶蛋白可以完成各种磷酸肌醇之间的转化,而且其中一些激酶还具有蛋白激酶的功能,它们通过磷酸化调控一些蛋白质包括转录因子的活性,进而调控下游基因的表达。

1,4,5-三磷酸肌醇3-激酶(即通常所说的肌醇多磷酸激酶,简称Ipk)在动物细胞的信号转导中起着非常重要的作用,它催化1,4,5-三磷酸肌醇的3-磷酸化,调节着Ins(1,4,5)P₃和Ins(1,3,4,5)P₄的水平(Communi等,1995)。Ins(1,4,5)P₃是关键的二级信使,它负责局部Ca²⁺的瞬时增加(Berridge and Irvine, 1989; Berridge, 1997)。有证据表明Ins(1,3,4,5)P₄本身也可以通过促进Ca²⁺扣押(sequestration)或与InsP₃互作促进胞内Ca²⁺库的释放来调节胞内Ca²⁺浓度(Morris等,1987)。也有证据表明Ins(1,3,4,5)P₄是一个直接的二级信使,使胞内Ca²⁺库释放Ca²⁺(Luckhoff and Clapham, 1992)。各种组织中,特异的Ins(1,3,4,5)P₄受体的发现进一步支持了Ins(1,3,4,5)P₄在肌醇磷酸信号途径中的作用(Cullen, 1998)。拟南芥的1,4,5-三磷酸肌醇3-激酶(AtIpk2B)是一个33kD的蛋白,它与动物以及酵母的同源性仅有25%,缺少钙调素的结合位点(Xia等,2003)。拟南芥的重组的AtIpk2B不仅能磷酸化Ins(1,4,5)P₃生成Ins(1,4,5,6)P₄,也可以生成Ins(1,3,4,5,6)P₅;而且还能磷酸化Ins(1,3,4,5)P₄,生成Ins(1,3,4,5,6)P₅;表明该酶为D3/D6位双重特异的磷酸肌醇激酶(Xia等,2003)。

1. 1. 2 1, 3, 4-三磷酸肌醇 5/6-激酶

1, 3, 4-三磷酸肌醇5/6-激酶（以下简称5/6-激酶）是磷酸肌醇代谢过程中的一种重要的酶，它催化1, 3, 4-三磷酸肌醇在5或6位磷酸化，生成两种四磷酸肌醇产物：1, 3, 4, 5-四磷酸肌醇（Ins (1, 3, 4, 5) P_4 ）和1, 3, 4, 6-四磷酸肌醇（Ins (1, 3, 4, 6) P_4 ），在动物中这两种产物的比例为1:3，在植物中两种产物的比例是3:1；同时，这也是包括植酸（Ins P_6 ）在内的多磷酸肌醇形成的第一步（Wilson and Majerus, 1997）。有证据表明，5/6-激酶是一种在动物、植物、甚至线虫中都比较保守的多功能酶（Field 等, 2000），动物中它不仅具有磷酸肌醇激酶活性，而且有蛋白激酶活性（Wilson 等, 2001）；但是植物中，目前只有磷酸肌醇激酶活性的报道，没有蛋白激酶活性的相关报道。另外，5/6-激酶也是一种多功能的肌醇激酶，在线虫（*E. histolytica*）中，Ins (1, 3, 4) 5/6-激酶以Ins (1, 3, 4) P_3 和Ins (1, 4, 5) P_3 作为底物（Field 等, 2000）。当以Ins (1, 4, 5) P_3 为底物时，产物只有Ins (1, 3, 4, 5) P_4 。最近的研究表明，人的5/6-激酶还具有3, 4, 5, 6-四磷酸肌醇（Ins (3, 4, 5, 6) P_4 ）1-激酶的活性，即以Ins (3, 4, 5, 6) P_4 为底物产生Ins P_6 （Yang 等, 2000）。

1997年，Wilson 等首次从拟南芥中克隆了1, 3, 4-三磷酸肌醇 5/6-激酶基因，并在大肠杆菌中表达了融合蛋白，经测定该蛋白具有1, 3, 4-三磷酸肌醇 5/6-激酶活性（Wilson 等, 1997）。1998年，Phillippy 在未成熟大豆中发现了各自独立的1, 3, 4-三磷酸肌醇 5-激酶和1, 3, 4-三磷酸肌醇 6-激酶活性（Brian 等, 1998）。2003年，Shi 等在玉米中发现了该酶基因，并发现该基因的缺失可以降低种子的植酸（Ins P_6 ）含量，使玉米可以更好地被动物消化（Shi 等, 2003）。同时，陈其军等（2003）又在拟南芥中克隆到一个5/6-激酶类似物基因，命名为 *AtITL1*；对其进行 Blast 分析发现：拟南芥中还存在一个5/6-激酶类似物基因，命名为 *AtITL2*。其中，*AtITL1* 的 mRNA 前体具有两种剪切方式，分别生成两种 mRNA 或相应的 cDNA，被分别命名为 *AtITL1a* 和 *AtITL1b*（陈其军等, 2003）。

下面综合近年来在哺乳动物等领域的研究资料，就5/6-激酶的生理生化特点概括如下：

1. 1. 2. 1 5/6-激酶具有多样化的肌醇激酶活性

真核细胞中最丰富的可溶性磷酸肌醇是1, 3, 4, 5, 6-五磷酸肌醇（Ins P_5 ）和六磷酸肌醇（Ins P_6 ），其生物合成的一条重要途径为：Ins (1, 4, 5) P_3 → Ins (1, 3, 4, 5) P_4 → Ins (1, 3, 4) P_3 → Ins (1, 3, 4, 6) P_4 → Ins (1, 3, 4, 5, 6) P_5 → Ins P_6 。5/6-激酶能够催化1, 3, 4-三磷酸肌醇（Ins (1, 3, 4) P_3 ）产生1, 3, 4, 6-四磷酸肌醇（Ins (1, 3, 4, 6) P_4 ）和1, 3, 4, 5-四磷酸肌醇（Ins (1, 3, 4, 5) P_4 ），是更高级形式的肌醇多磷酸盐（包括Ins P_4 异构体、Ins P_5 和Ins P_6 ）生物合成的关键调控酶之一（Verbsky 等, 2002；Stevenson-Paulik, 2002）。最近的研究表明，人的5/6-激酶还具有3, 4, 5, 6-四磷酸肌醇（Ins (3, 4, 5, 6) P_4 ）1-激酶活性（Yang 等, 2000），即以Ins (3, 4, 5, 6) P_4 为底物产生Ins (1, 3, 4, 5, 6) P_5 。玉米5/6-激酶同哺乳动物的一样，除具有Ins (1, 3, 4) P_3 5/6-激酶活性外，也有Ins (3, 4, 5, 6) P_4 1-激酶活性。此外，玉米5/6-激酶还可以磷酸化Ins (3, 5, 6) P_3 和Ins (1, 2, 5, 6) P_4 （Shi 等, 2003）。近年来，各种肌醇多磷酸（包括Ins (1, 3, 4) P_3 （Yang 等, 1999）、Ins (1, 3, 4, 5) P_4 （Irvine and Schell, 2001）、Ins (1, 3, 4, 6) P_4 （Irvine and Schell, 2001）、Ins (3, 4, 5, 6) P_4 （Zonia 等, 2002）、Ins P_5 （Lemtiri-Chlieh 等, 2000）

等)的生理生化功能开始得到阐明。

1. 1. 2. 2 5/6-激酶还具有蛋白激酶的活性,能够磷酸化转录因子

小牛脑 5/6-激酶能磷酸化参与胁迫反应的转录因子 c-Jun 和 ATF-2,这是肌醇激酶具有蛋白激酶活性的第一例报告,在此之前有研究表明以磷脂酰肌醇磷酸为底物的几个激酶具有蛋白激酶的活性(Wilson 等, 2001)。另外, 5/6-激酶还具有自身磷酸化的能力(Sun 等, 2002)。但是植物中 5/6-激酶是否具有蛋白激酶活性,还没有报道;如果有蛋白激酶活性,其靶分子是什么?这些都是有待于解决的问题。

1. 1. 2. 3 5/6-激酶与 COP9 信号体之间存在相互作用的关系

在纯化小牛脑 5/6-激酶过程中,发现 5/6-激酶与 COP9 信号体免疫共沉淀,表明细胞内的 5/6-激酶和 COP9 信号体存在一种相互作用的关系(Wilson 等, 2001)。进一步的研究发现, 5/6-激酶与 COP9 信号体的 CSN1 亚基结合,在 HEK293 细胞中超表达 5/6-激酶可以提高 COP9 信号体的 CSN5 亚基的含量(Sun 等, 2002)。COP9 信号体最初是美国耶鲁大学的邓兴旺实验室在研究光形态建成突变体过程中发现的(Wei 等, 1994)。COP9 复合物在哺乳动物和高等植物中是高度保守的(Wei 等, 1998)。5/6-激酶可能在哺乳动物中通过和 COP9 信号体相互作用参与信号转导过程。但目前仍不清楚植物的 5/6-激酶是否同哺乳动物一样与 COP9 信号体相互作用。

1. 1. 2. 4 5/6-激酶参与生物对逆境胁迫的反应

原生虫的 5/6-激酶基因的表达受热诱导(Verbsky 等, 2002),表明原生虫的 5/6-激酶参与了逆境胁迫反应。陈其军等对拟南芥 3 个 5/6-激酶类似物基因在正常和胁迫条件下的表达进行了 Northern blot 分析,结果表明,其中的 2 个基因可能分别以依赖于 ABA 和不依赖于 ABA 的方式参与对逆境胁迫的反应(陈其军等, 2003)。在盐处理的盐生植物冰草中也发现 5/6-激酶类似物的存在(在 GenBank 上的登录号为 BE037040)。哺乳动物的 5/6-激酶可以磷酸化转录因子 c-Jun 和 ATF-2,而后者还可被胁迫激活的 MAPK 蛋白激酶所磷酸化,称为依赖于 JNK/MAPK 的磷酸化途径。该 JNK/MAPK 蛋白激酶属于三个 MAPKs 亚类中的一类,受渗透胁迫、UV 射线和其它的胁迫条件诱导而激活(Davis, 2000; Pearson 等, 2001)。因此,在哺乳动物中 5/6-激酶和 JNK/MAPK 蛋白激酶共同调控转录因子 c-Jun 和 ATF-2 的活性,参与胁迫反应。

1. 2 植物光受体的研究进展

光是植物和其它一切生物赖以生存的能量来源;同时,光也是最重要的环境因子之一,在植物发育的整个过程中扮演着重要的角色,它可以作为一种环境信号参与调控植物的整个发育过程,即从种子萌发、幼苗生长到植物的生殖、衰老和休眠的各个阶段,从基因表达的分子水平到器官建成,光无所不在地起着信号开关的作用,使植物获得最大的生存和繁衍的优势。

黑暗中生长的双子叶植物的幼苗下胚轴伸长、茎细长柔弱、顶端弯钩不伸直、叶片小且不扩展、缺乏叶绿素呈白色或黄色,叶绿体发育不正常,许多酶的活性也低;黑暗中生长的单子叶植物上胚轴或第一节间特别长、叶片卷紧不伸展,这就是所谓的暗形态建成,或称黄化现象。而在光下生长的植物,下胚轴弯钩伸直、叶片展开、叶绿体发育完善,表现出组织和器官建成等形态变化,即植物的光形态建成(Fankhauser and Chory, 1997; 张蜀秋, 2003)(图 1)。

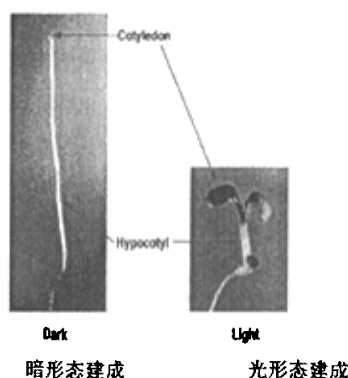


图1 拟南芥幼苗在光下和黑暗中生长的表型比较 (Wang and Deng, 2004)

进化过程中, 高等植物发展了一套极其精细的光信号接受系统和信号转导系统, 它可对光的有无、光的波长、强度的变化等作出适当的反应 (Fankhauser and Chory, 1997)。目前, 已知的植物光受体有三类: 光敏色素, 接收红光和远红光信号 (Butler 等, 1959; Quail 等, 1995; Fankhauser and Chory, 1997); 隐花色素或蓝光/紫外光-A 受体, 接收蓝光和 330-390nm 的紫外光 (Ahmad and Cashmore, 1993; Fankhauser and Chory, 1997); 紫外光-B 受体, 接收 280-320nm 的紫外光 (Fankhauser and Chory, 1997)。

1. 2. 1 光敏色素

早在40多年前, 美国实验室的科学家就发现了植物中的光信号受体, 为第1个发现的光受体分子, 他们把这种含有色素的分子称为光敏色素 (Butler等, 1959)。这样, 一门以研究光对植物的影响的学科-光形态发生学 (photomorphogenesis), 就迅速成为植物生理学的主要分支 (章东方等, 2003)。1983年, 有两个实验室分离并纯化出光敏色素蛋白; 1987年, 第1个光敏色素基因得到报道; 1989年, 植物中的光敏色素基因得到分离, 如从拟南芥中分离出5个光敏色素基因, 而从豌豆中则分离出2个光敏色素基因 (Quail等, 1995)。植物生物化学和分子遗传学研究的不断发展, 使得人们对植物光敏色素本质的认识也不断地深入。植物光敏色素是对不同波长光反应产生信号转导的光受体, 它可以在无活性和有活性形式之间转换以产生信号转导, 使植物发育与光环境相协调 (章东方等, 2003)。

在模式植物拟南芥中, 编码光敏色素脱辅基酶的基因有5个, 它们分别是光敏色素A (phyA), 光敏色素B (phyB), 光敏色素C (phyC), 光敏色素D (phyD) 和光敏色素E (phyE) (不同植物中发现的光敏色素基因的命名不完全一致) (Smith, 2000)。其中, 光敏色素A基因编码一个光不稳定的脱辅基蛋白 (PHYA), 它在白化苗中含量相对高一些, 当它转变成Pfr形式后便会很快消失掉 (Quail等, 1995)。其它四个基因编码的光敏色素蛋白含量则更低, 但它们是光稳定的 (Fankhauser and Chory, 1997)。不同类型的光敏色素在不同光条件下行使特定的功能, 如phyA主要在远红光控制幼苗下胚轴的伸长生长中起作用; 而phyB主要在红光抑制幼苗下胚轴生长中起作用 (Fankhauser and Chory, 1997; 张蜀秋, 2003)。现在已经从蓝藻、羊齿植物、裸子植物和许多被子植物中分

离鉴定出光敏色素基因和相关蛋白 (Pratt, 1995)。

光敏色素脱辅基酶蛋白是一个分子量约为120KD 的可溶性蛋白 (Fankhauser and Chory, 1997)。溶液中, 它以二聚体的形式存在, 即每个单体有2个明显的结构域, 它们中间通过1个易被蛋白酶降解的铰链区连接 (Fankhauser and Chory, 1997; 章东方等, 2003) (图2)。光敏色素的N-端结构域结合生色团, 它的作用是感应接受光; 其C-端结构域含有形成二聚体和其它生物活性所需的位点 (Jones and Edgerton, 1994; Quail等, 1995)。光敏色素分子中, 每个单体通过N-端结构域上的半胱氨酸结合一个生色团; 该生色团为线形的四吡咯 (tetrapyrrole) 分子, 它可以与半胱氨酸形成硫酯键 (Fankhauser and Chory, 1997)。每个光敏色素单体蛋白可以以两种稳定的形式存在, 吸收红光的形式 (pr), 是一种没有生物活性或生物活性不明确的形式; 和吸收远红光的形式 (pfr), 是一种在生物体内发挥功能的活性形式 (Andel等, 1996; Fankhauser and Chory, 1997)。pr和pfr两种形式之间的光转化牵涉到四吡咯生色团的可逆异构化作用, 异构化作用使蛋白质发生可逆的构型变化。

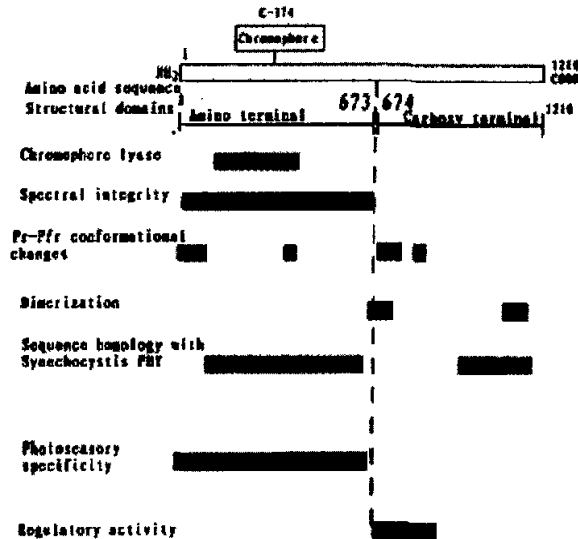


图2 植物光敏色素的结构和相关结构域的功能 (章东方等, 2003)

光转换反应有不同的中间体, pr 和pfr 形式之间的平衡在日光照射条件下需要几分钟时间。pr 形式的光敏色素最大吸收光谱为665nm, 接近叶绿素的最大吸收光谱 (红光), 但pfr形式的光敏色素吸收光谱的波长则更长, 为730nm (远红光)。两种形式的光敏色素吸收光谱重叠, 所以700nm 以下的光也能激活光敏色素的这两种形式 (Fankhauser and Chory, 1997)。日光条件下, pfr 形式占全部光敏色素的60%, 由于植物体内光合色素对红光的吸收而使树冠下群体中的pfr形式的光敏色素可低到仅占全部光敏色素的10% (章东方等, 2003) (图3), 使远红光和红光两者之间的比例下降。植物用光敏色素作为周围的感应器, 改变自己的生长、发育, 形成避免荫蔽症 (shade-avoidance response) (Smith, 1995; Parks等, 1996; Robson and Smith, 1996)。感应到低的远红光: 红光比率后, 避荫植物会表现出伸长生长加快, 如果条件允许便将会把叶片伸向

有日光的空间；如果条件不允许，避荫就表现为提早开花和结实，从而增强基因延续的几率 (Fankhauser and Chory, 1997)。避荫是从小草到大树的大多数被子植物采取的策略和主要的生态优势。光敏色素也为植物提供时间信号导致产生生物钟的时相，和其它信号一起确保在生命周期的合适时刻启动关键的发育步骤 (章东方等, 2003)。植物内在的24h周期节律(circadian rhythm)使发育与季节变化同步，例如开花和休眠的光周期调节等。

随着光环境的不断改变，植物对光也会产生不同的生理反应，根据不同反应的光生物学特征，可将光敏色素参与调节的反应分为低辐照度反应 (LFR)、极低辐照度反应 (VLFR) 和高辐照度反应 (HIR) (Fankhauser and Chory, 1997)。其中，低辐照度反应是指 $1 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ 的光强即可启动反应， $1000 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ 时达到饱和，通常所指的R/FR诱导的可逆反应即属于这类，这也是光敏色素介导反应的重要特征；极低辐照度反应是指可以被 10^{-4} – $10^{-2} \mu\text{mol}/\text{m}^2$ 的红光或远红光诱导，但红光反应不能被远红光所逆转 (张蜀秋, 2003)。高辐照度反应是指需要相对强的连续光照的反应，激活反应的光强大于 $10 \mu\text{mol}/\text{m}^2$ ，达到饱和的光强度比LFR要高100倍；它是波长、辐照强度和光照时间的综合作用，光照越强、光照时间越长，反应越大；该反应不是R/FR可逆反应，是连续红光或远红光反应 (Fankhauser and Chory, 1997；张蜀秋, 2003)。

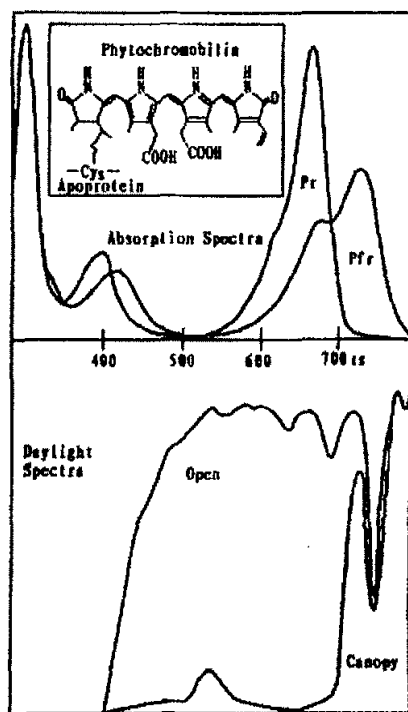


图 3 光敏色素吸收光谱和日光在开阔地带与树冠下的光谱图(章东方等, 2003)

1. 2. 2 隐花色素

高等植物的受蓝光调节的反应主要有向光性、抑制幼茎伸长、叶绿体迁移、刺激气孔张开和

调节基因表达；并且蓝光反应在400-500 nm区域呈现“三指状”（Fankhauser and Chory, 1997；常立和文国琴，2004）。隐花色素是吸收蓝光（400~500nm）和近紫外光（320~400 nm）而调节植物形态及新陈代谢变化和向光性反应的一类光敏受体（张蜀秋，2003）。其作用光谱的特征是在蓝紫光区有3个吸收峰（通常在450nm、420nm和480nm左右），在近紫外光区有一个峰（通常在370~380nm），大于500nm波长的光是无效的，这也是判断隐花色素介导的蓝光、紫外光反应的实验性标准（叶珍，2003）。不同植物对蓝光效应的作用光谱稍有差异（余淑文和汤章城，1998）。隐花色素在双子叶植物、单子叶植物、蕨类、藓类和藻类中都存在（Imaizumi等，2000；Ahmad and Cashmore, 1993；Batschauer, 1993；Guo等，1998；Imaizumi等，2002；Kanegae and Wada, 1998；Lin and Cashmore, 1996；Small等，1995）。多数植物中有多种隐花色素，如拟南芥有两种隐花色素基因，*CRY1*和*CRY2*（Hoffman等，1996；Ahmad and Cashmore, 1993）；番茄和大麦都有至少三种隐花色素基因，*CRY1a*、*CRY1b*和*CRY2*（Perrotta等，2000）；蕨类和藓类分别有五种和至少两种隐花色素基因（Imaizumi等，2000；Imaizumi等，2002；Kanegae and Wada, 1998）。目前，人们已清楚拟南芥隐花色素与光敏色素共同参与了光形态建成。例如，拟南芥隐花色素与光敏色素共同参与其脱黄化、基因的表达和光周期开花等生理反应，它们分别作为蓝光/UV-A和红光/远红光的受体（叶珍，2003）。

1. 2. 3 紫外光-B受体介导的紫外光-B反应

紫外光-B反应是细胞吸收280-320 nm波长的紫外光（UV-B）而引起的光形态建成反应，其最大效应在290-300nm波长范围。UV-B影响植物的许多过程，如光合作用、物质代谢、离子运输等过程，也能引起植物的叶面积减小、茎伸长抑制、作物产量下降、色素合成等形态变化（张蜀秋，2003）。但目前对这类反应的光受体的性质还不清楚。一个重要的反应是在一些植物中诱导类黄酮的生物合成，如高粱花色素苷积累的作用光谱峰在290nm、385nm、650nm，说明光敏色素、蓝光受体和UV-B受体都起作用，但除非先经UV-B光处理后，红光和蓝光才有效（张蜀秋，2003）。

1. 3 COP/DET/FUS蛋白及COP9信号体的研究进展

1. 3. 1 COP/DET/FUS蛋白的研究进展

用遗传筛选的办法鉴定了11个光形态建成的负调控因子（COP/DET/FUS蛋白）和1个正调控因子（HY5）（Wei and Deng, 1996）（图4）。HY5在光敏色素和隐花色素下游发挥作用，它的基因编码1个bZIP类转录因子（Wang and Deng, 2004），它的活性调控主要在蛋白水平上，需要COP/DET/FUS蛋白参与（Oyama等，1997；Osterlund等，2000）。COP/DET/FUS蛋白由4个具有生物活性的实体组成，即COP1、COP10、DET1和COP9信号体（CSN）。其中，DET1的功能与其它3个颇为不同，它可能参与了控制染色质重组和基因表达；而其它3组都可能参与了蛋白降解的调控（Pepper等，1994；Benvenuto等，2002；Schroeder等，2002）。COP10编码泛素的E2偶联酶（Suzuki等，2002）；而COP1可以作为泛素的E3连接酶，从而使目的蛋白（如HY5、LAF1和HYH）

降解 (Wang and Deng, 2004)。cop1突变体在黑暗中也表现在光下的表型 (图4, A)。细胞核中COP1能通过它的C端WD40重复序列直接与HY5互作而使得HY5被26S蛋白酶体降解, 通过降解HY5和其它光形态建成的正调控因子, COP1抑制了光形态建成 (Ang 等, 1998; Osterlund 等, 2000); 另外, COP1的N端有一个在泛素E3连接酶中保守的指环结构。而且, 近来有证据表明COP1可以作为光受体phyA的E3连接酶而导致它的消除以及随后的phyA信号的终止 (Seo 等, 2004)。

1. 3. 2 COP9 信号体的研究进展

cop/det/fus 突变体首先是在拟南芥中发现的, 它在植物的光形态建成方面有缺陷, 在黑暗条件下表现为在光下的表型 (Chory 等, 1989; Deng 等, 1991; Wei and Deng, 1992; Misera 等, 1994; Wei 等, 1994; Kwok 等, 1996) (图 5)。而 COP9 信号体 (简称 CSN) 是由 11 个基因中的 8 个基因的蛋白组成的八亚基复合体, 对动植物系统的生化研究表明 CSN 是高度保守, 并且定位在细胞核中, 组成它的八个亚基被分别命名为 CSN1-CSN8 (Wei and Deng, 2003) (表 1)。

CSN的分子量为450-550kDa。在一些系统中, 除了这个大的复合体外, 还有由几个亚基组成的小的复合体, 例如: 拟南芥 (Karniol等, 1999; Serino等, 1999; Wang等, 2002) 或果蝇 (Oron 等, 2002) 中, 有一小部分由CSN4和CSN7组成的250-300kDa的小复合体, 它独立于CSN1存在; 类似地, 在*S. pombe*的*csn1*和*csn2*突变体中, 有由CSN4和CSN5组成的分子量为300kDa的小复合体 (Mundt等, 2002)。而且, 在哺乳动物细胞中, 有CSN4, CSN5, CSN6, CSN7b和CSN8的定位于细胞质中的小的复合体 (Tomoda等, 2002)。但是, 目前这些小的CSN复合体的相关功能还不清楚。

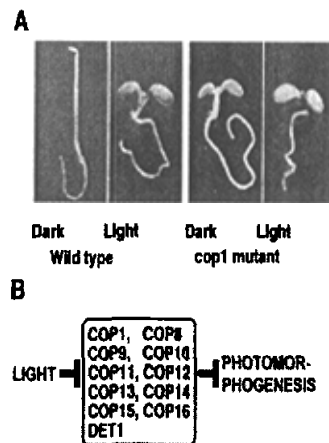


图 4 *cop1* 突变体的表型以及 COP/DET/FUS 蛋白在光形态建成中的推测的作用 (Wang and Deng, 2004)

A, 黑暗中生长的 *cop1* 突变体幼苗的表型, 与光下生长的野生型幼苗相似; B, 11 个光形态建成的负调控因子 (COP/DET/FUS 蛋白) 的作用, 光受体感受到光信号后传递给 COP/DET/FUS 蛋白, 使这些蛋白失活, 进而启动光形态建成。

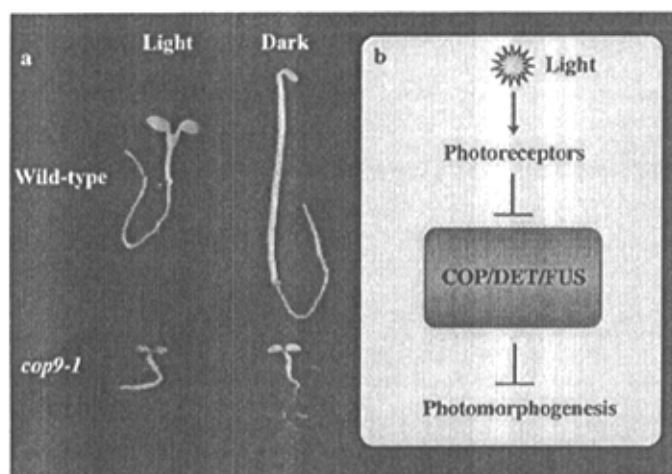


图 5 COP/DET/FUS 蛋白是拟南芥幼苗进行正确的光形态建成所必需的 (Serino and Deng, 2003)

a 拟南芥 *cop9-1* 突变体 (*cop9-1*, bottom) 表现的典型的组成型光形态建成, 表明它们在这一过程中起负调控的作用, 而光信号在被光受体感受后可以废除这种抑制。

表 1 CSN 亚基的组成 (Wei and Deng, 2003)

	Mammals	Arabidopsis	Drosophila	S. pombe	S. cerevisiae
CSN1	GPS1, mfh, Sgn1,	FUS6, COP11	Dch1	Caa1	CSN9
CSN2	Trip15, hAlien, Sgn2, COPS2	FUS12	Alien, Dch2		CSN10/RR12
CSN3	Sgn3, COPS3	FUS11	Dch3		CSN11/PC18
CSN4	Sgn4, COPS4	COP8, FUS4	Dch4		CSN12
CSN5	Jab1, COPS5	AJH1 AJH2	Dch5		RR11
CSN6	HVIP, Sgn6, COPS6	AtCSN6A AtCSN6B	Dch6		CSH1
CSN7	COPS7a, Sgn7 COPS7b,	CSN7i, FUS5 CSN7ii	Dch7		RPN5/NAS5
CSN8	hCOP9, Sgn8	COP9, FUS7			

在 CSN 复合体中, CSN1 在复合体的组合中起着关键的作用 (Wei and Deng, 2003)。拟南芥中, CSN1 的彻底丧失会引起 CSN8 的积累受阻, CSN5 从复合体中脱离, 以及 CSN4 和 CSN7 的水平显著降低 (Wang 等, 2002)。一些研究结果表明: 拟南芥的 CSN1 需要复合体完整以稳定它的积累 (Kwok 等, 1998; Tsuge 等, 2001; Wang 等, 2002)。但是, 在瞬时表达系统或 *S. pombe* 中, CSN1 能够独立于其它亚基而单独积累 (Wei and Deng, 2003)。

虽然 CSN 是在植物的光形态建成中发现的, 但是它的调控作用远不止这些。由于 CSN 的纯合突变体是早期致死的, 所以利用其转基因株系 (相当于 CSN 的功能部分丧失突变体) 来研究 CSN

的调控作用 (Peng 等, 2001a, b; Schwechheimer 等, 2001)。研究发现, *CSN* 的功能部分丧失突变体具有从对植物激素的应答改变到形态异常等多个表型 (图 6): 幼苗有不同的子叶数 (图 6 a, b); 成熟植株丧失顶端优势 (图 6 c, d); *CSN3* 或 *CSN4* 的功能降低导致叶形态的异常, 如缺乏对称性 (图 6 e) 或不正确的叶融合 (图 6 f); *CSN1*、*CSN3* 和 *CSN4* 的功能降低会引起同源异型转化 (图 6 g) 和辐射对称的改变 (图 6 h)。

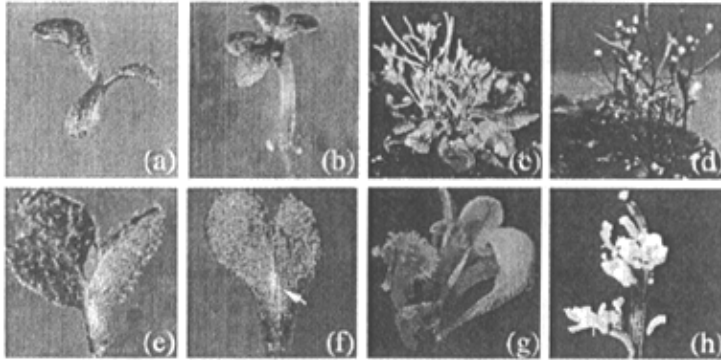


图 6 *CSN* 的功能部分丧失突变体的表型 (Serino and Deng, 2003)

如上所述的 *CSN* 的功能部分丧失突变体含有比野生型更高的泛素化的蛋白 (Peng 等, 2001a)。因此, 这些材料的一些表型便和泛素介导的蛋白降解过程的缺陷相关联。与这些数据相一致的是, 近来的一些报道表明 *CSN* 在泛素 E3 连接酶的活性调节方面起作用 (Azevedo 等, 2002; Liu 等, 2002; Schwechheimer 等, 2001; Schwechheimer 等, 2002)。在酶的级联反应中, E3 连接酶同 E1、E2 一样, 是底物泛素化以致于被 26S 蛋白酶体降解所必需的 (Pickart, 2001)。这个级联反应的组织是分等级的: 拟南芥中有 2 个 *E1* 基因, 36 个 *E2* 基因和数量更大的 *E3* 基因 (Bachmair 等, 2001; Gagne 等, 2002)。每个 E3 和一个或少数几个 E2 直接互作, 以结合 E2 的表面为依据, 又可以将 E3 分为 2 组: HECT (Homologous to E6-AP carboxyl terminus) 结构域的 E3 和指环结构域的 E3 (Pickart, 2001)。

那么, *CSN* 以及前面叙述的 *COP1*、*COP10* 又是怎样参与光形态建成的呢? 遗传学和生化的证据表明 *CSN*、*COP1* 和 *COP10* 相互作用以诱导光形态建成的正调控因子, 如: *HY5*、*HYH* 和 *LAF1* 等的降解 (Holm 等, 2002; Osterlund 等, 2000)。另外, 有证据表明 *CSN* 与 26S 蛋白酶体的盖子亚复合体具有相似的结构 (Moon 等, 2004; Seeger 等, 1998; Uhle 等, 2003); 而 *COP1* 是一个具有指环结构域的 E3 连接酶, *COP10* 为 E2 偶联酶 (Suzuki 等, 2002); 这样它们参与光形态建成可以用下图来解释 (图 7):

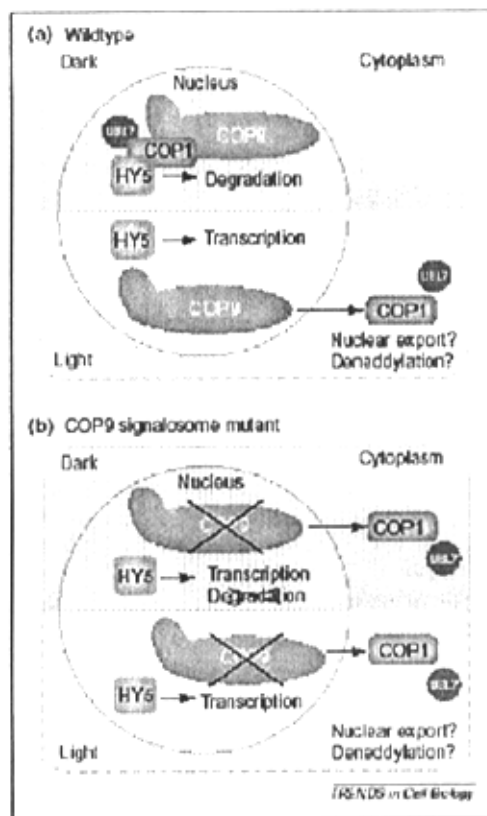


图7 COP/DET/FUS蛋白参与植物的光形态建成 (Schwechheimer and Deng, 2001)

a: 光下, 野生型的 COP1 位于细胞质中, HY5 正常转录, 调节光形态建成的进行; 黑暗中, COP1 从细胞质中进入细胞核中, 与 CSN 互作, 降解 HY5, 使得光形态建成不能正常进行。

b: *csn* 突变体中, 无论是在光下还是在黑暗中, COP1 都位于细胞质中, 不能进到细胞核中, 这样就无法与 CSN 互作, HY5 不被降解, 光形态建成正常进行, 于是表现出黑暗和光下相同的表型。

1. 4 与 COP9 信号体互作的蛋白激酶的研究进展

与 CSN 互作的蛋白激酶活性最初是在从血红细胞中纯化 CSN 复合体时发现的 (Seeger 等, 1998; Wei and Deng, 2003)。CSN 的制备物 (preparation) 可以磷酸化 c-Jun (Ser63 and Ser73)、I κ B α 、NF- κ B 前体、p105 以及在体外还可以磷酸化肿瘤抑制子 p53 (Ser149, Thr150, Thr155) (Bech-Otschir 等, 2001; Seeger 等, 1998)。这种磷酸化作用并不来自于 CSN 本身, 因为 CSN 本身也是磷酸化的对象 (Henke 等, 1999)。另外, 这种激酶活性可以被酸性黄所抑制。后来在纯化小牛脑 5/6-激酶过程中, 发现 5/6-激酶可以与 COP9 信号体免疫共沉淀, 表明细胞内的 5/6-激酶和 COP9 信号体存在一种相互作用的关系 (Wilson 等, 2001)。并且 5/6-激酶展现的底物范围、特征和与 CSN 互作的蛋白激酶很相像, 也可以被酸性黄所抑制 (Sun 等, 2002)。这些数据表明 5/6-

激酶很可能就是与CSN互作的蛋白激酶之一。5/6-激酶与CSN互作的亚基是CSN1（即CSN的最大亚基）（Sun 等，2002）。除此以外，蛋白激酶CK2（CK2）和蛋白激酶D（PKD）也被证实与CSN互作，它们可以磷酸化c-Jun和p53。CK2结合CSN3和CSN7，PKD则结合CSN3；而且它们都能磷酸化CSN的亚基，CK2磷酸化CSN2、CSN7，PKD磷酸化CSN7（Uhlé等，2003）。另外，还发现了其它的CSN亚基的互作蛋白（表2）。

表 2 CSN 亚基的互作蛋白（Wei and Deng, 2003）

Subunits	Interacting proteins	References
CSN1	Inositol 1,3,4-triphosphate 5/6 kinase	(Sun et al. 2002)
	eIF3c/NIP1, subunit of translation initiation factor 3	(Karniol et al. 1998)
	RPN6 (AtS9), proteasome lid non-ATPase subunit	(Kwok et al. 1999)
CSN2	ICSBP, interferon consensus sequence binding protein	(Cohen et al. 2000)
	Cullin 1 (CUL1), SCF complex core component	(Lyapina et al. 2001, Schwechheimer et al. 2001)
	CUL2	(Yang et al. 2002)
	DAX-1, COUP-TFI, ecdysone receptor (nuclear receptors)	(Dressel et al. 1999, Altincicek et al. 2000)
	TR, thyroid hormones receptor	(Lee et al. 1995)
CSN3	IKK γ , I κ B kinase complex component	(Hong et al. 2001)
	COP10, ubiquitin-conjugating enzyme variant	(Suzuki et al. 2002)
	Int-6/eIF3e, subunit of translation initiation factor 3	(Hoareau Alves et al. 2002)
CSN4	COP10, ubiquitin-conjugating enzyme variant	(Suzuki et al. 2002)
CSN5	c-Jun, transcription activation domain	(Claret et al. 1996)
	p27 ^{Kip1} , cyclin-dependent kinase inhibitor	(Tomoda et al. 1999)
	Bcl3, member of the I κ B multigene family	(Dechend et al. 1999)
	LFA-1, integrin adhesion receptor	(Bianchi et al. 2000)
	rLHR, lutropin/choriogonadotropin receptor precursor	(Li et al. 2000)
	MIF, cytokine, macrophage migration inhibitor factor	(Kleemann et al. 2000)
	PR, progesterone receptor	(Chauchereau et al. 2000)
	SRC-1, steroid receptor coactivator	
	p53, tumor suppressor	(Bech-Otschir et al. 2001)
	HIF-1 α , hypoxia-inducible factor-1	(Bae et al. 2002)
	Smad4, TGF- β signaling pathway common effector	(Wan et al. 2002)
	HPO, hepatopoietin	(Lu et al. 2002)
	TRC8, RING-finger membrane protein	(Gemmill et al. 2002)
	PGP9.5, member of ubiquitin C-terminal hydrolase	(Caballero et al. 2002)
	GLHs, germ-line RNA helicases	(Smith et al. 2002)
CSN6	Vpr, HIV-1 protein	(Mahalingam et al. 1998)
	Rbx1/Roc1/Hrt1, SCF RING protein component	(Lyapina et al. 2001, Schwechheimer et al. 2001)
CSN7	Int-6/eIF3e, subunit of translation initiation factor 3	(Hoareau Alves et al. 2002)
	Int-6/eIF3e, subunit of translation initiation factor 3	(Hoareau Alves et al. 2002, Yahalom et al. 2001)
	PMF-1, polyamine-modulated factor	(Y. Wang et al. 2002)
CSN8	eIF3c/NIP1, subunit of translation initiation factor 3	(Karniol et al. 1998)
	COP10, ubiquitin-conjugating enzyme variant	(Suzuki et al. 2002)

很多证据表明CSN在控制植物发育的许多方面的信号过程起着关键的作用（Peng 等，2001a, b），这些过程包括对植物激素（如生长素，Schwechheimer 等，2001）、环境胁迫以及真菌和病毒等病原菌（Azevedo 等，2002；Liu 等，2002）的细胞水平的应答。各种遗传学研究证明CSN处于多重信号输入和控制细胞分化的特异过程的下游调控级联反应的连接点上（Steinbergand Chamovitz, 2004）。CSN在结构上与26S蛋白酶体的盖子和真核细胞的翻译起始因子eIF3相似（Kim 等，2001），在生化功能上与泛素依赖的蛋白降解相关（Steinbergand Chamovitz, 2004）。证据

表明与COP9互作的蛋白激酶在CSN控制的这些细胞过程中起着重要的作用,例如CSN依赖的磷酸化调节着泛素依赖的转录因子的降解(Berse等,2004;Steinberg and Chamovitz,2004)。但是,对于不同的转录因子,CSN依赖的磷酸化的作用却是不同的。下面以c-Jun和p53为例,说明CSN依赖的磷酸化是怎样调节泛素依赖的转录因子的降解的。

c-Jun是AP-1转录复合体的组分之一,而AP-1转录复合体则是许多细胞因子基因的一个调节子,它激活后应答环境胁迫、辐射和生长因子(Dunn等,2002)。胁迫下,c-Jun的N端磷酸化(主要是Ser63 and Ser73)会使它稳定,不被蛋白酶体降解,最终导致AP-1转录活性的增加(Steinberg and Chamovitz,2004)。而其C端的磷酸化则会下调c-Jun的转录活性。CSN依赖的磷酸化是AP-1信号的正调控因子,因为它的磷酸化发生在c-Jun的N端(Seeger等,1998),是稳定c-Jun,使其不被蛋白酶体降解。而且酸性黄和其它已知的抑制子可以诱导c-Jun在Hela细胞中的降解,这些抑制子可以抑制与CSN互作的蛋白激酶的活性;这表明激酶活性对于c-Jun的稳定有作用

(Steinberg and Chamovitz,2004)。另外一个例子也可以证明CSN依赖的磷酸化调节c-Jun的信号途径:在Hela细胞中,hCSN2的超表达以及随后增加的CSN水平可以稳定c-Jun和增加AP-1的活性(Naumann等,1999)。

而CSN依赖的磷酸化是肿瘤抑制子p53的负调控因子,导致它的降解(Sharpless等,2002)。正常的生长条件下,p53被蛋白酶体连续的降解保持在一个很低的水平;而当细胞遭受胁迫时,p53就会被激活并且稳定下来(Steinberg and Chamovitz,2004)。另外,CSN在结合p53时,会特异地调节p53的Ser149、Thr150和Thr155的磷酸化。突变分析表明Thr155的磷酸化对于p53的稳定是至关重要的。CSN介导的Thr155的磷酸化参与了正常条件下p53低水平的维持(Bech-Otschir等,2001)。

既然与CSN互作的蛋白激酶活性对于不同的转录因子具有相反的作用,而且这两个转录因子本身处于复杂的调控机制中,那么可以想到CSN的功能也是复杂的(Steinberg and Chamovitz,2004)。而且c-Jun和p53可能是竞争性的结合CSN,进而被与CSN互作的蛋白激酶磷酸化,导致各自不同的命运,或者稳定下来或者被降解掉(Steinberg and Chamovitz,2004)。这种作用方式可以用下面的模型来概括(图8):

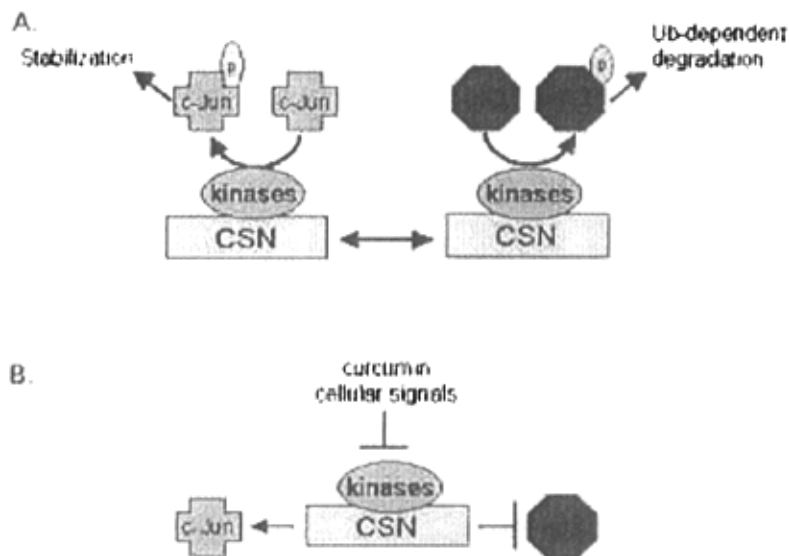


图8 CSN是p53的负调控因子，而是c-Jun的正调控因子 (Steinbergand Chamovitz, 2004)

该模型表明与CSN互作的蛋白激酶活性通过促进p53的降解而起抑制作用；通过稳定c-Jun而起促进作用。A，正常条件下，与CSN互作的蛋白激酶活性处于一个平衡状态；B，在特殊的细胞条件下，诸如肿瘤细胞或者激酶抑制子酸性黄存在下，蛋白激酶活性就会被抑制，这样它对p53的抑制作用就得不到发挥，同时诱导了c-Jun的抑制。根据这个模型，蛋白激酶活性的抑制会导致细胞程序化死亡的增加（稳定p53），并且通过降解c-Jun增加了血管发生（angiogenesis）（Pollmann 等，2001）。

1. 5 总结

综上所述，1, 3, 4-三磷酸肌醇 5/6-激酶是磷酸肌醇代谢过程中的一种重要的酶，它催化1, 3, 4-三磷酸肌醇在 5 或 6 位的磷酸化，生成两种四磷酸肌醇产物：Ins (1, 3, 4, 5) P₄和 Ins (1, 3, 4, 6) P₄。动物细胞中，它不仅具有磷酸肌醇激酶活性，而且有蛋白激酶活性，还能进行自身磷酸化，是一个保守的多功能酶。植物细胞中，仅知道它是一种广泛存在的肌醇激酶，有关 5/6-激酶的功能没有更多的报道。

光是植物生长、发育必不可少的环境因子，光受体是感受光的第一个元件，它与下面的一系列元件组成了一套极其精细的光信号接受和信号转导系统，使植物表现出光形态建成等特征。光形态建成是植物生长、发育的重要环节，COP9 信号体在植物光形态建成中起着极其重要的调节作用。而且，除了光形态建成外，CSN 还在控制植物发育的其它信号过程中起重要的作用。有证据表明 CSN 在结构上与 26S 蛋白酶体的盖子相似，在生化功能上参与了泛素依赖的蛋白降解。CSN

正是通过这个功能,与 COP1、COP10 相互作用参与了植物的光形态建成。实验表明,与 CSN 互作的蛋白激酶在 CSN 控制的许多细胞过程中起着重要的作用,例如 CSN 依赖的磷酸化调节着泛素依赖的转录因子的降解。哺乳动物细胞中,1,3,4-三磷酸肌醇 5/6-激酶是第一个鉴定出的与 CSN 互作的蛋白激酶,它们的互作亚基为 CSN1。有证据表明与 CSN 互作后,5/6-激酶的肌醇激酶活性受到了很大程度的抑制,表明与 CSN 互作后行使的激酶活性为蛋白激酶活性。但是,目前还不清楚它们在动物细胞中互作的生物学意义。

1.6 本课题的研究意义

1,3,4-三磷酸肌醇5/6-激酶是磷酸肌醇代谢过程中的一种重要的酶,动物细胞中,它具有肌醇激酶和蛋白激酶双重活性,还能进行自身磷酸化,是一个保守的多功能酶;植物细胞中,仅知道它是一种广泛存在的肌醇激酶,有关它的功能没有更多的报道。因此,研究5/6-激酶在植物中的生物学功能具有重要的意义。

哺乳动物细胞中,5/6-激酶是最早发现的一个与CSN互作的蛋白激酶,它们的互作通过CSN1完成。由于CSN在控制植物光形态建成等过程中起关键的作用,与CSN互作的蛋白激酶又在CSN控制的细胞过程中起作用,以及目前植物中还没有与CSN互作的蛋白激酶的报道,所以研究植物中的5/6-激酶是否具有蛋白激酶活性、是否与CSN互作,并参与植物的光控生长发育,对揭示5/6-激酶的生物学功能,阐明植物光形态建成机理等方面具有重要的理论意义。

第二章 拟南芥 1, 3, 4-三磷酸肌醇 5/6-激酶基因 *AtItpk-1* 的表达特性和亚细胞定位研究

磷酸肌醇代谢在生物感受胞外刺激及信号转导中起着重要的作用。在这条代谢途径中,许多催化可溶性多磷酸肌醇的磷酸化和去磷酸化反应的激酶和磷酸酯酶参与了反应(Hanks and Quinn, 1991)。这些酶蛋白可以完成各种磷酸肌醇之间的转化,其中一些激酶还具有蛋白激酶的功能,它们通过磷酸化调控一些蛋白质包括转录因子的活性,进而调控下游基因的表达(Hanks and Quinn, 1991)。

1, 3, 4-三磷酸肌醇5/6-激酶(简称5/6-激酶)是磷酸肌醇代谢过程中的一种重要的酶,它催化1, 3, 4-三磷酸肌醇在5或6位磷酸化,生成两种四磷酸肌醇产物,这是包括植酸(InsP_4)在内的多磷酸肌醇形成的第一步(Wilson and Majerus, 1997)。有证据表明,5/6-激酶是一种在动物、植物、甚至线虫中都比较保守的多功能酶(Field 等, 2000),它不仅能够磷酸化1, 3, 4-三磷酸肌醇,还具有3, 4, 5, 6-四磷酸肌醇($\text{Ins}(3, 4, 5, 6)\text{P}_4$) 1-激酶的活性,即以 $\text{Ins}(3, 4, 5, 6)\text{P}_4$ 为底物产生 InsP_5 (Yang 等, 2000);在线虫(*E. histolytica*)中, $\text{Ins}(1, 3, 4)$ 5/6-激酶还可以以 $\text{Ins}(1, 3, 4)\text{P}_3$ 和 $\text{Ins}(1, 4, 5)\text{P}_3$ 作为底物(Field 等, 2000)。

植物中5/6-激酶的首次报道是在1997年,Wilson等从拟南芥中克隆了1, 3, 4-三磷酸肌醇5/6-激酶基因,并在大肠杆菌中表达了融合蛋白,经测定该蛋白具有1, 3, 4-三磷酸肌醇5/6-激酶活性(Wilson 等, 1997)。1998年,Phillippy在未成熟大豆中发现了各自独立的1, 3, 4-三磷酸肌醇5-激酶和1, 3, 4-三磷酸肌醇6-激酶活性(Brian等, 1998);2003年,Shi等在玉米中发现了该酶基因(Shi等, 2003)。同时,陈其军等(2003)在拟南芥中克隆到一个5/6-激酶类似物基因,命名为*AtITL1*;对其进行Blast分析发现:拟南芥中还存在一个5/6-激酶类似物基因,命名为*AtITL2*(陈其军等, 2003)。可见,5/6-激酶是一种在植物中广泛存在的肌醇激酶。但是,植物中有关5/6-激酶的功能没有更多的报道。所以,研究拟南芥中5/6-激酶的生物学功能具有重要的意义。

为了研究5/6-激酶的功能,我们克隆了它的基因,命名为*AtItpk-1*,并将该基因融合His标签进行原核表达,制备了多克隆抗体;利用RT-PCR和Western blot方法研究了*AtItpk-1*在不同光质下的表达特点;用Western blot研究了*AtItpk-1*蛋白的器官表达模式;构建*AtItpk-1*-GFP载体,转入野生型拟南芥,通过融合蛋白的稳定表达观察*AtItpk-1*在拟南芥中的亚细胞定位。

2. 1 材料与方法

2. 1. 1 实验材料

2. 1. 1. 1 植物材料

野生型拟南芥(生态型为Columbia型)。

2. 1. 1. 2 质粒载体

pGEM-T (Promega); PESP₂, pET-30a, pBI121 均为本实验室保存。

2. 1. 1. 3 工具酶及分子量标准

各种限制性内切酶、RNase A、Taq DNA 聚合酶、T₄ DNA 连接酶购自 Promega、Takara、华美、鼎国、原平皓等生物工程公司。蛋白分子量标准购自欣经科等公司。

2. 1. 1. 4 试剂盒

蛋白纯化试剂盒购自 QIAGEN, 玻璃奶回收试剂盒为天为时代公司产品。

2. 1. 2 常用培养基和溶液的配制

2. 1. 2. 1 培养基配制

LB 培养基 (1 升): 蛋白胨 10g, 酵母提取物 5g, NaCl 10g, pH7.0 (固体培养基每升加 15g 琼脂粉), 高压灭菌。

MS 培养基 (1 升): MS 大量元素、微量元素、20 g 蔗糖, 8 g 琼脂, pH5.8。

YEB: 牛肉浸膏 5g, 酵母提取物 1g, 胰蛋白胨 5g, 蔗糖 5g, MgSO₄ 7H₂O 0.5g, NaOH 调 pH 至 8.0, 加水定容至 1L。

2. 1. 2. 2 溶液的配制

EB 储备液 (10mg/ml): 1g EB 溶于 100ml 水中, 4℃避光保存。

RNaseA (10mg/ml): 称取 0.1g RNaseA 溶于 10 ml 10mM Tris · HCl (pH7.5), 15mM NaCl 中, 100℃煮沸 15min, 冰浴冷却, -20℃保存备用。

氨苄青霉素 (Amp) 贮液 (100mg/ml): 100mg Amp 溶于 1ml 0.4M NaOH 中, -20℃保存。

TE: 含 10mM Tris · HCl (pH8.0), 1mM EDTA (pH8.0), 高压灭菌。

5×TBE: Tris 54g, 硼酸 27.5g, 0.5M EDTA (pH8.0) 20ml, 加水定容至 1 升。

10×TAE: Tris 48.4g, 冰醋酸 11.42ml, 0.5M EDTA (pH8.0) 20ml, 加水定容至 1 升。

6×DNA Loading Buffer: 0.25%溴酚蓝, 40%甘油水溶液, 4℃保存。

渗入缓冲液: 0.5×MS、0.5 mg/L VB₆、0.044 μM 6-BA、0.03% silwet L-77。

蛋白提取 buffer: 10mM Tris HCl, 0.02% NaN₃, 0.001% PMSF, pH8.0。

考马斯亮兰 G-250 染液: 将 100mg 的考马斯亮兰 G-250 溶于 50ml、95%的乙醇中, 加入 120ml、85%的磷酸, 用水稀释到 1L。

2. 1. 3 试剂配制

2. 1. 3. 1 质粒 DNA 的提取

溶液 I: 50mM Tris · HCl (pH7.5), 10mM EDTA (pH8.0), 高压灭菌。

溶液 II: 0.2M NaOH, 1%SDS, 分别配制 0.4M NaOH 和 2% SDS 的贮液, 使用时以 1:1 比例混合。

溶液 III: 1.32M 醋酸钾 (pH4.8), 高压灭菌。

2. 1. 3. 2 His 标签的原核表达及蛋白纯化

(1) 非变性条件下:

裂解 buffer (1L):

50mM NaH_2PO_4 6.9g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (MW 137.99)
300mM NaCl 17.54g NaCl (MW 58.44)
10mM imidazole 0.68g imidazole (MW 68.08)
NaOH 调 pH 为 8.0

洗涤 buffer (1L):

50mM NaH_2PO_4 6.9g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (MW 137.99)
300mM NaCl 17.54g NaCl (MW 58.44)
20mM imidazole 1.36g imidazole (MW 68.08)
NaOH 调 pH 为 8.0

洗脱 buffer (1L):

50mM NaH_2PO_4 6.9g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (MW 137.99)
300mM NaCl 17.54g NaCl (MW 58.44)
250mM imidazole 17.00g imidazole (MW 68.08)
NaOH 调 pH 为 8.0

(2) 变性条件下:

裂解 buffer

buffer A (1L):

100mM NaH_2PO_4 13.8g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (MW 137.99)
10mM Tris Cl 1.2g Tris base (MW 121.1)
6 M GuHCl 573g guanidine hydrochloride
NaOH 调 pH 为 8.0

buffer B (1L):

100mM NaH_2PO_4 13.8g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (MW 137.99)
10mM Tris Cl 1.2g Tris base (MW 121.1)
8M urea 480.5g (MW 60.06)
NaOH 调 pH 为 8.0

洗涤 buffer

buffer C (1L):

100mM NaH_2PO_4 13.8g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (MW 137.99)
10mM Tris Cl 1.2g Tris base (MW 121.1)
8M urea 480.5g (MW 60.06)

HCl 调 pH 为 6.3

洗脱 buffer

buffer D (1L):

100mM NaH_2PO_4 13.8g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (MW 137.99)

10mM Tris Cl 1.2g Tris base (MW 121.1)

8M urea 480.5g (MW 60.06)

HCl 调 pH 为 5.9

buffer E (1L):

100mM NaH_2PO_4 13.8g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ (MW 137.99)

10mM Tris Cl 1.2g Tris base (MW 121.1)

8M urea 480.5g (MW 60.06)

HCl 调 pH 为 4.5

2. 1. 3. 3 ELISA 法测定抗体的效价

(1) 包被缓冲液: 0.05M、pH9.6 的碳酸盐缓冲液。

(2) 抗体稀释液: 1L PBS+1mL Tween-20+1g 明胶。

(3) 洗液: 1L PBS+1mL Tween-20。

(4) 终止液: 0.2M H_2SO_4 。

2. 1. 3. 4 Western blot

(1) Acr-Bis (29:1) 30% w/v

29g Acr, 1g Bis, 加入重蒸水定容至 100ml, 过滤, 避光 4℃ 保存。

(2) 分离胶 buffer (4×)

1.5mol/L Tris-HCl (pH8.0) 0.4% (w/v) SDS

45.4g Tris, 10ml 10%SDS, 浓 HCl 约 10ml, 调 pH 至 8.8, 用重蒸水定容至 250ml。 (3)

浓缩胶 buffer (4×)

0.5mol/L Tris-HCl (pH6.8) 0.4% (w/v) SDS

15.15g Tris, 10ml 10%SDS, 浓 HCl 约 10ml, 调 pH 至 6.8, 用重蒸水定容至 250ml。

(4) 上样 buffer (2×)

0.25mol/L Tris-HCl (pH6.8), 4% SDS, 20%甘油, 痕量溴酚兰

50ml 浓缩胶 buffer (4×), 4g SDS, 20ml 甘油, 2mg 溴酚兰, 用重蒸水定容至 100ml。

(5) Tris-甘氨酸电泳 buffer (10×) 1000ml

800ml 重蒸水加热溶解 2g SDS, 加入 30.2g Tris 碱, 144g 甘氨酸, 重蒸水定容至 1000ml。

(6) 考马斯亮兰染液 R250

225ml 重蒸水溶解 1.25g 考马斯亮兰 R250, 225ml 甲醇, 50ml 冰醋酸

(7) 转移 buffer

- 750ml 重蒸水溶解 3.03g Tris, 14.4g 甘氨酸, 200ml 甲醇, 加水定容至 1000ml。
- (8) TBS (10×)
750ml 重蒸水溶解 12.12g Tris, 88g NaCl, HCl 调节 pH 至 8.0, 重蒸水定容至 1000ml。
- (9) TBST (1×)
100ml TBS (10×), 0.5ml Tween-20 (0.05% v/v), 重蒸水定容至 1000ml。
- (10) 封闭液
0.3g BSA (3% w/v) 溶于 10ml TBST 中。
- (11) AP 缓冲液 (10×)
80ml 重蒸水溶解 0.59g NaCl, 0.102g MgCl₂, 1.212g Tris-HCl, HCl 调 pH 至 9.5, 重蒸水定容至 100ml。
- (12) NBT 母液
10ml 70% 二甲基甲酰胺溶解 0.5g NBT。
- (13) BCIP 母液
10ml 100% 二甲基甲酰胺溶解 0.5g BCIP。
- (14) 丽春红染色液
0.1g 丽春红溶于 5ml 乙酸, 加入重蒸水定容至 100ml。
- (15) 12% SDS-PAGE 凝胶电泳分离胶的配制 (10ml):
3.3ml 水, 4ml 30% 丙烯酰胺, 2.5ml 1.5M Tris (pH8.8), 0.1ml 10% SDS, 0.1ml 10% 过硫酸铵, 4 μ l TEMED。
- (16) 5% SDS-PAGE 凝胶电泳浓缩胶的配制 (5ml)
3.4ml 水, 0.83ml 30% 丙烯酰胺溶液, 0.63ml 1M Tris (pH6.8), 50 μ l 10% SDS, 50 μ l 10% 过硫酸铵溶液, 5 μ l TEMED。

2. 1. 4 实验方法

2. 1. 4. 1 RNA 的提取与纯化

取 200mg 约 2 周龄的野生型幼苗提取总 RNA, 提取步骤按 Gibicol 的 TRIzol Reagent 的产品说明书进行。之后用无 RNase 的胰 DNaseI 消化半小时, 80℃ 灭活 10 分钟。

2. 1. 4. 2 反转录及 PCR 扩增

2. 1. 4. 2. 1 反转录

- (1) 由工作液浓度计算加入 2 μ gRNA 的体积及加入所需水的体积 (7.5 μ l-RNA 的体积)。
- (2) 加入 oligodT。
- (3) 取出一 80℃ 下保存的 RNA, 熔化后离心, 按计算体积加入, 混匀离心。
- (4) 水浴锅或 PCR 仪上 68℃ 变性 15 分钟, 取出后迅速置于冰上冷却, 以免形成二级结构。
- (5) 第 4 步进行中在一个离心管中加入 dNTP、5×RTbuffer、M-MLV、RNasin, 离心混匀, 备用。
- (6) 将第五步中的混液加到 4 的离心管中, 混匀离心。
- (7) PCR 仪上 (水浴锅中) 42℃ 1 小时。
- (8) 95℃ 变性 5 分钟, 以灭活 M-MLV。

(9) 取出置于冰上, 之后离心混匀, -20°C 保存。

2. 1. 4. 2. 2 PCR 扩增

用于 PCR 扩增的上游引物序列为: 5' -CAGGATCCATGTCAGATTCAATCCAGGAAAG-3', 下游引物序列为 5' -ACCGAGCTCTCAGACATGATTCTTCTTAGTG-3' (加框的部分为人为引入的 *Bam*II 和 *Sac*I 酶切位点)。PCR 体系如下:

10×PCRbuffer 2.5 μl ; dNTPs(10mmol/l) 0.5 μl ;

Forward primer(10 $\mu\text{mol/l}$) 1 μl ; Reverse primer(10 $\mu\text{mol/l}$) 1 μl ;

cDNA(products of RT) 1 μl ; 5U/ μl Tag 0.5 μl ; H₂O 19.5 μl ; Total:25 μl 。

扩增反应在 GeneAmp 9700PCR 仪进行, 循环程序如下: 94°C , 30s; 55°C , 30s; 72°C , 1min; 30cycles; 72°C , 5min。

2. 1. 4. 3 扩增产物的回收及克隆

RT-PCR 扩增产物从琼脂糖凝胶中的回收、纯化, 使用天为时代公司的离心柱法 DNA 回收纯化试剂盒。有关方法参见说明书。将回收的扩增产物连到 pGEM-T 载体上转化大肠杆菌, 挑取阳性克隆, 提取质粒, 经质粒 PCR 及酶切鉴定后, 送交公司测序。序列正确后再将其克隆到 PESP₂ 载体上, 备用。

2. 1. 4. 4 质粒的提取

碱裂解法少量提取质粒 DNA (参见分子克隆 26 页):

(1) 将单菌落接种于 3ml 含相应抗生素的 LB 培养基中, 37°C 摇菌过夜。

(2) 12,000rpm 离心 30sec, 集菌。加 200 μl 溶液 I (含 RNaseA 100 $\mu\text{g/ml}$), 振荡悬浮菌体。

(3) 200 μl 新配制的溶液 II, 颠倒混匀。

(4) 溶液澄清后立即加入预冷的 200 μl 溶液 III, 混匀后冰上放置 5~10min。

(5) 4°C 、12,000 rpm 离心 15min, 取上清, 加 0.7 倍异丙醇混匀。

(6) 12,000rpm 离心 10 min, 70%乙醇洗涤沉淀, 抽干后溶于适量水或 TE, -20°C 保存备用。

2. 1. 4. 5 His 标签的原核表达及纯化

2. 1. 4. 5. 1 诱导表达

(1) 取 10ml 液体 LB 培养基, 加入相应的抗生素 (kan 1/1000), 挑取单菌落, 37°C 摇床过夜。

(2) 取过夜的菌液, 按 1:50 的比例, 加入到含有相应抗生素的 LB 培养基中, 37°C 继续培养至 OD₆₀₀ 为 0.5-0.7。

(3) 取 1ml 菌液, 准备 SDS-PAGE 分析用 (作为对照), 其余加 IPTG 诱导 (终浓度为 1mM) 4 小时; 取 1ml 菌液用作 SDS-PAGE 分析, 其余 4000g 离心 20 分钟。

(4) 收集的菌在液氮中速冻, 贮存于 -20°C , 或直接进行下一步裂解。

2. 1. 4. 5. 2 非变性条件下的裂解纯化

(5) 若菌是 -20°C 贮存的, 则需要在冰上放置 15 分钟缓缓解冻, 之后按 2-5ml/g 湿重的比例加入冰冷的裂解 buffer, 若是直接收集的菌则直接加入相应比例的裂解 buffer 进行裂解。

(6) 在裂解 buffer 中加入溶菌酶, 终浓度为 1mg/ml, 冰上放置 30 分钟。

(7) 冰上超声, 超声 5 秒、间隔 10 秒, 共 30 次, 功率为 280W。

(8) 如果裂解液很粘稠, 则加入 RNase A (终浓度为 10 $\mu\text{g/ml}$) 和 DNase I (终浓度为 5 $\mu\text{g/ml}$),

冰上放置 10—15 分钟。

(9) 4℃、10000g 离心 20—30 分钟，收集上清，取一部分进行 SDS-PAGE 分析，其余部分进行下一步纯化。

(10) 取 1ml 50% 的 Ni-NTA slurry，加到 4ml 澄清的裂解液中，4℃摇床上轻摇 1 小时，以使二者充分混和。

(11) 将上述混和物上柱，封闭下管口以免溶液流出。

(12) 待溶液平衡好，打开下管口的开关，收集流出溶液，进行 SDS-PAGE 分析。

(13) 用 4ml wash buffer 洗涤 2 次，并收集流出液，进行 SDS-PAGE 分析。

(14) 用 0.5ml 的 elution buffer 洗脱 4 次，收集每次的流出液，这些流出液即为纯化的目的蛋白。取出一部分进行 SDS-PAGE 分析。

2. 1. 4. 5. 3 变性条件下的裂解纯化

(5) 按 5ml/g 湿重的比例加入 buffer B，室温下于摇床上轻摇 15—60 分钟或者用枪尖轻轻吹打裂解细胞，要避免气泡。

(6) 室温、10000g 离心 20—30 分钟，收集上清，取一部分用作 SDS-PAGE 分析，其余部分进行下一步纯化。

(7) 取 1ml 50% 的 Ni-NTA slurry，加到 4ml 澄清的裂解液中，室温摇床上轻摇 15—60 分钟，以使二者充分混和。

(8) 将上述混和物上柱，封闭下管口以免溶液流出。

(9) 待溶液平衡好，打开下管口的开关，收集流出溶液，进行 SDS-PAGE 分析。

(10) 用 4ml buffer C 洗涤 2 次，收集流出液，进行 SDS-PAGE 分析。

(11) 用 buffer D 洗脱蛋白 4 次，每次 0.5ml，之后再 用 buffer E 洗脱 4 次，每次 0.5ml。收集每次的流出液，这些流出液即为纯化的目的蛋白。取出一部分进行 SDS-PAGE 分析。

2. 1. 4. 6 多克隆抗体的制备

如果纯化的蛋白杂带非常少，则可以直接注射兔子产生多克隆抗体(每只兔子至少 2mg 蛋白)；但如果杂带很多的话，则要进行进一步处理，如下：

(1) 纯化的蛋白跑 SDS-PAGE 制备电泳，之后将 SDS-gel 放入预冷的 0.25M KCl、1mM DTT 溶液中，5 分钟。

(2) 重蒸水洗 5 分钟。

(3) 放入预冷的重蒸水(含 1mM DTT)中，1 小时。

(4) 切下目的条带。

(5) 用电洗脱仪洗脱蛋白，或者将切下的胶条装入透析袋，在水平电泳槽中电泳(电泳 buffer 可以是 TAE，也可以另选) 40—60 分钟。

(6) 将洗脱好的蛋白用紫外法测定蛋白浓度，留一部分用来测定效价，其余的免疫兔子(中科院遗传所制作)。

2. 1. 4. 7 多克隆抗体的纯化及检测

2. 1. 4. 7. 1 抗体的纯化

(1) 跑两块胶，每板上 500μL 蛋白。

- (2) 100V 转膜, 90—120 分钟。
- (3) 丽春红显色后, 剪下条带, 洗涤干净后用 3% 的 BSA 封闭 1 小时。
- (4) PBST 洗 3 遍, 放入含有 1ml 血清和 3%BSA 的 10mlPBST 中, 于冰上结合 3—4 小时, 并在摇床上摇动。
- (5) 用 PBST 洗去血清, 洗 3 次, 每次 10 分钟。
- (6) 将膜剪碎, 放到离心管内, 用 pH2.5、100mM (1 次 1ml) 的甘氨酸洗 3—4 次, 每次不超过 2 分钟, 剧烈摇晃离心管。
- (7) 洗下的抗体与 pH8.0、1M 的 Tris-HCl 混合至 pH 介于 7—8 之间。
- (8) 加入 0.2% 的 NaN₃, 用 PBS 透析抗体。
- (9) 分装抗体, 液氮中速冻后放于 -80℃ 冰箱中保存。
- (10) 若抗体很稀, 用 PEG20000 浓缩。

2. 1. 4. 7. 2 抗体效价的测定 (ELISA 法)

(1) 抗原的包被

将免疫原 (留下来的少部分蛋白) 按一定比例稀释后 (稀释液为包被缓冲液), 包被到酶标板上, 每孔 100μL, 设两个重复。将酶标板放入湿盒 (即托盘, 内有用水浸湿的滤纸), 4℃ 冰箱中放置至少 12 小时或者 37℃ 温箱中温育 2 小时。

(2) 加抗血清

将酶标板从湿盒中取出, 倒掉包被液, 加洗液洗 3 次, 每次 200μL, 间隔 1 分钟。之后用毛巾包裹, 用力摔打, 使洗液甩干净。

用抗体稀释液将取好的阴、阳性血清按 10 的倍数稀释, 之后加到酶标板中, 每孔 100μL, 放入湿盒, 于 37℃ 温箱中温育 30 分钟。

(3) 加酶标二抗

取出酶标板, 按上述方法洗板。同样用抗体稀释液将酶标二抗按 1: 1000 稀释, 之后加到酶标板中, 每孔 100μL, 放入湿盒, 于 37℃ 温箱中温育 30 分钟。

(4) 反应的显色与终止

洗板, 将氢供体 (TMB) 和底物 (过氧化物) 1: 1 混好, 每孔加 100μL, 显色 10—15 分钟, 之后加 50μL 的终止液终止反应。在酶标仪上测定数值, 波长为 450nm。

2. 1. 4. 7. 3 抗体特异性检测 (Western blot)

- (1) 装好电泳系统, 加入电极 buffer, 上样。10/15 孔 2mm 样品最多上样 36/28 μl。
- (2) 稳压 200V, 至溴酚蓝刚刚跑出分离胶, 约需 1—1.5 小时。
- (3) 卸下胶板, 染色, 室温染 1—2 小时, 沸水脱色。
- (4) 剪与胶等大的 NC 膜, 四张滤纸, 将 NC 膜, 滤纸和海绵浸入转移 buffer 中, 至少 5 分钟。
- (5) 按 (-) 黑板—海绵—滤纸—胶块—NC 膜—滤纸—海绵—红板 (+) 装好, 除尽气泡。
- (6) 4℃, 100V 转移 1 小时。
- (7) 取出 NC 膜, 浸入 10ml 封闭液中, 37℃ 1—1.5 小时。
- (8) 倒出封闭液, 4℃ 可保存 2 周。
- (9) 按效价加入一抗于 10ml TBST 中, 37℃ 1 小时。倒出一抗, 4℃ 可保存 2 周, 20ml TBST 清洗 10 分钟 3 次。

(10) 加入二抗于 10ml TBST 中, 37℃ 1 小时, 倒出二抗, 4℃ 可存 2 周, 20ml TBST 洗 10 分钟 3 次。

(11) 加入 10ml AP buffer, 66 μ l NBT 母液, 33 μ l IBCIP 母液, 混匀现色 2—5 分钟至条带出现, 取出 NC 膜, 置于 20ml 重蒸水中, 终止反应并清洗 2—3 次。

(12) 晾干, 保存于保鲜膜中。

2. 1. 4. 8 RT-PCR 分析

(1) 提取各材料的 RNA, 用 DNA 酶 I 消化混有的 DNA, 之后反转录。

(2) 以 β -tubulin 基因为内标, 其上游引物为: 5' -CGTGGATCACAGCAATACAGGCC-3', 下游引物为 5' -CCTCCTGCACCTTCCACTTCGTCTTC-3', 通过不同的循环数和模板量调整扩增效果, 最终使得各材料扩增出的 β -tubulin 基因的量一样。

(3) 使用调整好的模板量和循环数对目的基因 *AtItpk-1* 进行扩增, 上游引物为 5' -CAGGATCCATGTCAGATTCAATCCAGGAAAG-3'、5' -ACCGAGCTCTCAGACATGATTCTTCTTAGTG-3' 为下游引物; 比较目的条带的亮度。

2. 1. 4. 9 总蛋白的提取、蛋白浓度的测定

2. 1. 4. 9. 1 总蛋白的提取

(1) 取 0.1g 植物材料, 液氮中磨碎, 加入 0.2ml 蛋白提取 buffer, 静置 5min。

(2) 5000 转/min, 室温下离心 10min。

(3) 取上清, 加入等体积上样 2 $\times$ buffer, 沸水 5min。

2. 1. 4. 9. 2 蛋白浓度的测定 (考马斯亮兰法)

(1) 标准曲线的制作: 先将 BSA 配成 1mg/ml 的标准蛋白溶液, 然后分别取 0、0.01、0.02、0.04、0.06、0.08 和 0.1ml 的标准蛋白溶液, 不够的加水补充到 0.1ml。

(2) 样品做一定的稀释后也取 0.1ml。

(3) 分别往各试管中加入 5ml 考马斯亮兰 G-250 染液, 每加一管, 立即混匀。

(4) 加完后显色 2—5min, 在分光光度计上测定各样品在 595nm 处的光吸收值 A_{595} 。

2. 1. 4. 10 *AtItpk-1*-GFP 载体的构建

(1) 将用 *Bam*HI 和 *Sac*I 酶切的 *AtItpk-1* 片段连到 T 载体上, 送去测序。

(2) 序列正确后, 连接到 pBI121 上。

(3) 进行质粒 PCR 和酶切鉴定, 正确后转化农杆菌。

2. 1. 4. 11 农杆菌转化

(1) 农杆菌感受态的制备

① 挑取农杆菌 GV3101 单菌落接种至 2 mL YEB 液体培养基 (含 Rif 125 μ g/mL) 中, 28℃ 振荡培养过夜。

② 将过夜培养物 5 mL 接种于 50 mL 的 YEB 液体培养基中, 28℃ 200 rpm 振荡培养至 OD600 为 0.5 左右。

③ 5 000 g, 4℃ 离心 5 min, 收集菌体。

④ 于冰上加入 10 mL 0.15 M 的 NaCl 溶液悬浮细胞。

⑤ 5000 g, 4℃ 离心 5 min, 收集菌体。

⑥ 加入 1 mL 预冷的 20 mmol/L CaCl₂ 重悬。

⑦ 200 μ L 每管分装。液氮中冻 1 min 后置于-70℃保存备用。

(2) 重组质粒对农杆菌的转化

① 取 200 μ L 感受态细胞, 加入 1 μ g 表达载体质粒 DNA, 冰浴 30 min。

② 液氮中冻 1 min。37℃热激 5 min。

③ 加入 1 mL 的 YEB 液体培养基, 28℃ 振荡培养 4 h, 10 000 g 离心 30 s, 加入 100 μ L 的 YEB 重悬细胞。

④ 菌液涂布于含 100 μ g/mL Kan 和 125 μ g/mL 的 Rif 抗生素的 YEB 固体选择培养基平板上, 28℃培养过夜。

(3) 阳性农杆菌的鉴定

① 挑选转化的单菌落接种至 2 mL YEB 液体培养基 (含抗生素: 终浓度为 125 μ g/mL 的 Rif, 100 μ g/mL 的 Kan) 中, 28℃振荡培养过夜。

② 碱裂解法提质粒, 进行 PCR 和酶切鉴定分别 (参见 2.2.8 和 2.2.9)。

2.1.4.12 农杆菌介导的拟南芥转化

(1) 农杆菌的准备

① 接种阳性农杆菌 GV3101 于 10 mL YEB 培养基 (含 100 μ g/mL Rif, 100 μ g/mL Kan) 中, 28℃ 200 rpm 振荡培养过夜。

② 按 1:50 的比例转接至 200 mL 含有相同抗生素的 YEB 培养基中扩大培养至 OD600 为 1.2-1.6。

③ 5000 g 离心 15 min, 收集菌体。重悬于渗入缓冲液, 调节 OD600 至 0.8。

(2) 转化

① 将 200 mL 悬浮阳性农杆菌的渗入缓冲液 (infiltration buffer) 置于小烧杯中。

② 将拟南芥的花盆用纱网或封口膜封住盆口, 将花盆倒置于小烧杯口上, 使植株浸入渗入缓冲液中, 移入密封容器中, 抽真空 (50 Kpa) 10min。

③ 缓慢放气后取出花盆, 侧置于托盘中, 盖上塑料薄膜。

④ 第二天取下塑料薄膜, 直立放于托盘中, 浇透水。

⑤ 于温室中继续培养, 收获种子 (T1)。

2.1.4.13 阳性苗的筛选

将 T1 代种子种在含 50 μ g/ml 的 kan 板上, 大约 10 天后将阳性苗移至土中。2 周后取叶片提取 DNA, 用 35S 的引物进行进一步鉴定。步骤如下:

2.1.4.13.1 少量法提取 DNA

(1) 植物材料 (根、茎、叶片等) 0.4-0.6 g, 液氮碾磨, 加入 DNA 提取 Buffer 1.5-1.6 mL, 抽提 15 min, 可以适当加热。

(2) 将抽提液分装于两个 eppendorf 管中, 加入 0.5 (0.4 mL) 倍苯酚 (Tris 饱和酚), 轻轻混匀, 抽提 5-10 min, 9 000 g 离心 10 min。

(3) 吸取上清, 加入 0.5 (0.4 mL) 倍氯仿, 轻轻混匀, 抽提 10-15 min, 12 000 g 离心 8 min。

(4) 收集上清, 加入等体积异丙醇 (总体积约为 1.5 mL), 混匀, 此时可见白色絮状 DNA 沉淀, 12 000 g, 室温下离心 15 min, 吸去上清。。

(5) 70%乙醇洗涤沉淀一次。

(6) 于 37℃烘箱烘干沉淀。

- (7) 沉淀溶于适量 TE, 加入 RNaseA 使终浓度为 50 $\mu\text{g/mL}$, 37°C 消化 30-60 min。
- (8) 等体积苯酚-氯仿, 氯仿各再抽提一次。
- (9) 上清加入 1/10 倍体积的 3 M NaAc (pH 5.2) 和 2-2.5 倍体积预冷无水乙醇, 混匀后于 -20°C 放置 30 min, 12 000 g, 4°C 离心 15 min, 弃去上清。
- (10) 70% 乙醇洗涤沉淀一次, 干燥后溶于适量 TE 或水中。
- (11) 0.7-0.8% 琼脂糖凝胶上检测总 DNA, 剩余 DNA 样品保存于 -20°C 备用。

2. 1. 4. 13. 2 PCR 鉴定

体系同上一章, 引物为 35S 引物, 上游引物序列为: 5' -CAGATGGTTAGAGAGGCTTACGCAG-3'; 下游引物序列为: 5' -AGAGGAAGGGTCTTGCGAAGGATAG-3'。循环程序如下: 94°C, 30s; 54°C, 30s; 72°C, 1min; 30cycles; 72°C, 5min。

2. 1. 4. 14 confocal 下观察 GFP 的发光

撕取经 PCR 鉴定为阳性的 2 周龄幼苗的下表皮, 用毛笔轻轻去掉叶肉细胞, 在 Zeiss LSM510 confocal 下观察融合蛋白的发光情况, 同时以转 GFP 空载体的幼苗作对照。其中, 激发光为 488nm, 接收 505-530 nm 的信号。

2. 2 结果与分析

2. 2. 1 拟南芥 1,3,4-三磷酸肌醇 5/6-激酶基因 *AtItpk-1* 的克隆

根据 *AtItpk-1* 的登录号 (At5g16760) 从 www.Arabidopsis.org 得到 cDNA 序列 (该序列与基因组序列完全一致, 即该基因没有内含子), 设计引物、扩增得到全长 (960bp)。其中, 为方便后边使用, 引物含有人为引入的 *Bam*HI 和 *Sac*I 酶切位点。将 PCR 产物进行 *Bam*HI 和 *Sac*I 酶切, 连到 T 载体上, 送去测序。序列正确后, 将其连到 pET-30a 载体上作原核表达或 PESP₂ 载体上备用。

2. 2. 2 融合的 His-*AtItpk-1* 蛋白的诱导表达及纯化

将测序正确的 *AtItpk-1* 序列连到表达载体 pET-30a 上, 转化大肠杆菌, 经质粒 PCR 和酶切鉴定均正确后, 进行原核表达 (图 2-1)。*AtItpk-1* 蛋白含 319 个氨基酸, 分子量为 36.2KD。

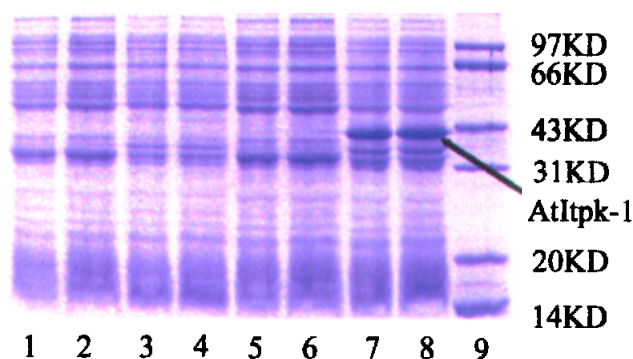


图 2-1 His-AtItpk-1 融和蛋白的诱导表达

泳道 1-4 为空载体 pET-30a 的表达，其中，1、2 为未加 IPTG 诱导，3、4 为加 IPTG 诱导 4 小时；泳道 5-8 为 His-AtItpk-1 的表达（融和蛋白的分子量约为 37KD），5、6 未加 IPTG 诱导，7、8 为加 IPTG 诱导 4 小时；泳道 9 为蛋白 Marker。AtItpk-1 蛋白的位置用箭头表示。

将诱导出的融合蛋白 His-AtItpk-1 过 Ni 柱纯化，分别收集洗脱溶液（图 2-2）。由于纯化的蛋白效果不好，所以在合并含有目的蛋白的溶液后进行浓缩，将浓缩的蛋白再次电泳，从 PAGE 胶上切下目的蛋白，用电洗脱仪进行洗脱。洗脱下的蛋白即为纯的目的蛋白，送与遗传所动物中心制备多克隆抗体。

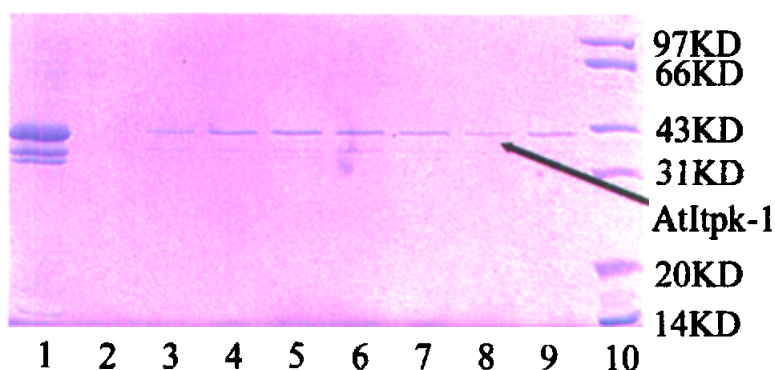


图 2-2 His-AtItpk-1 融和蛋白的纯化

泳道 1 为诱导表达的蛋白，泳道 2-9 为洗脱下的目的蛋白，泳道 10 为蛋白 Marker。AtItpk-1 蛋白的位置用箭头表示。

2. 2. 3 AtItpk-1 多克隆抗体的纯化及检测

拿到抗血清后，用 ELISA 检测其效价（表 2-1，图 2-3）。

表 2-1 ELISA 方法测定抗血清的效价 (450nm)

	10^3	10^4	10^5	10^6	10^7	10^8
1	1.83	0.305	0.056	0.033	0.034	0.009
2	1.926	0.293	0.044	0.039	0.026	0.011
3	1.823	0.318	0.048	0.036	0.022	0.012

注: 包被抗原的浓度为 $100 \mu\text{g/ml}$, 图中各数值均为抗血清的 OD 值减去阴性血清的 OD 值

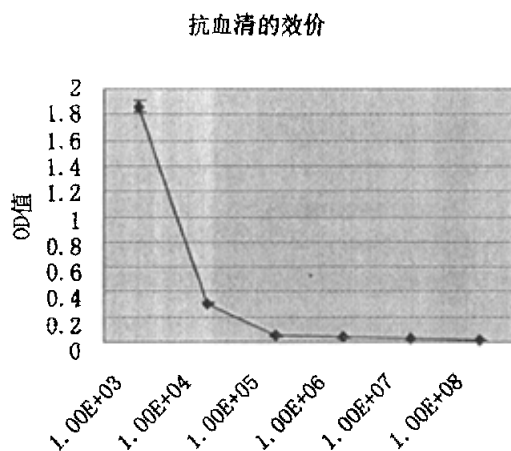


图 2-3 抗血清效价

从上述结果可以看到, 抗血清的效价为 10^5 。之后按照 Olmsted (1981) 所述的方法对抗血清进行纯化, 纯化的抗体用 Western blot 检测其特异性 (图 2-4)。

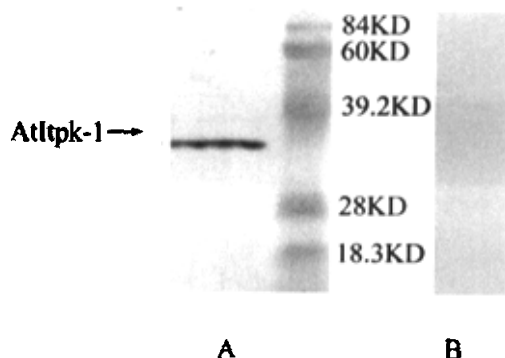


图 2-4 Western blot 检测抗 *AtItpk-1* 的多克隆抗体的特异性

图 A 的一抗为纯化的 *AtItpk-1* 抗体 (1: 1000), 其中 A1 是野生型拟南芥的总蛋白, A2 是预染蛋白 Marker; 图 B 的一抗是阴性血清。AtItpk-1 蛋白的位置用箭头表示。

图 2-4 的结果表明纯化后的抗体特异性很好，可以用来进行下一步的实验。

2. 2. 4 *AtItpk-1* 在不同光质下的表达分析

为了研究 *AtItpk-1* 在不同光质下的表达特点，我们运用 RT-PCR 技术和 Western blot 技术分别从 RNA 水平和蛋白水平进行分析。结果显示：*AtItpk-1* 基因在 RNA 和蛋白水平上的表达均受红光的强诱导，也受白光诱导，但诱导程度与红光相比要弱。我们分析 *AtItpk-1* 受白光较弱的诱导可能是因为白光中有红光的原因。

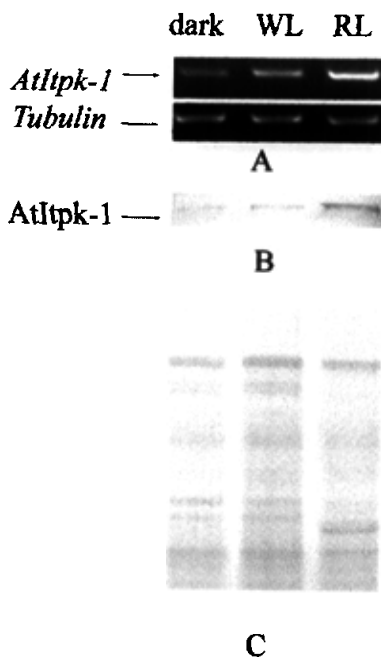


图 2-5 不同光质下 *AtItpk-1* 基因的表达分析

A 为半定量 PCR 分析，野生型拟南芥在黑暗 (dark)、白光 (WL) 和纯红光 (RL) 下的表达情况；幼苗在黑暗中生长 9 天，或先在黑暗中生长 7 天再在白光或红光下诱导 2 天。B 为 Western blot 结果，一抗为 *AtItpk-1* 的多抗 (1:1000)；C 为转膜后立春红显色的结果，确认上样量 (15 μg 蛋白/泳道)。*AtItpk-1*、*Tubulin* 基因和 *AtItpk-1* 蛋白的位置用箭头表示。

2. 2. 5 *AtItpk-1* 蛋白的器官表达模式检测

为了研究 *AtItpk-1* 蛋白的器官表达模式，我们分别提取拟南芥的果荚、花、根、茎、叶以及全株的总蛋白，用 Western blot 技术进行检测 (图 2-6)。结果表明：*AtItpk-1* 蛋白广泛存在于所检测的拟南芥各个器官中，是一个遍在蛋白。

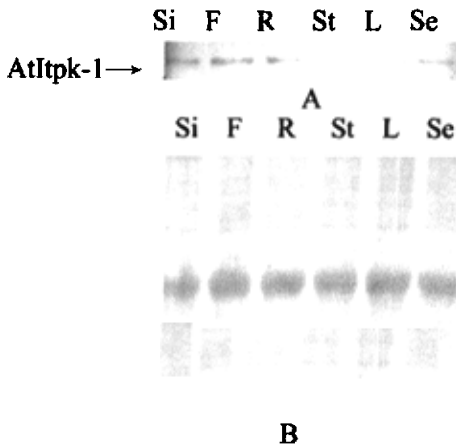


图 2-6 *AtItpk-1* 蛋白的器官表达模式分析

其中, A 为 Western blot 结果, 一抗为 *AtItpk-1* 的多抗 (1: 1000); Si、F、R、St、L、Se 分别表示果荚、花、根、茎、叶以及全株, B 为转膜后立春红显色的结果, 以确认上样量 (30 μ g 蛋白/泳道)。 *AtItpk-1* 蛋白的位置用箭头表示。

2. 2. 6 *AtItpk-1*—GFP 融合蛋白在拟南芥保卫细胞中的定位

2. 2. 6. 1 *AtItpk-1*—GFP 载体的构建

将序列正确的 *AtItpk-1* 片段连接到 pBI121 上, 经质粒 PCR 和酶切鉴定 (图 2-7) 后, 转化农杆菌。阳性菌斑再进行质粒 PCR 和酶切鉴定, 鉴定正确后用真空渗入法转化拟南芥。

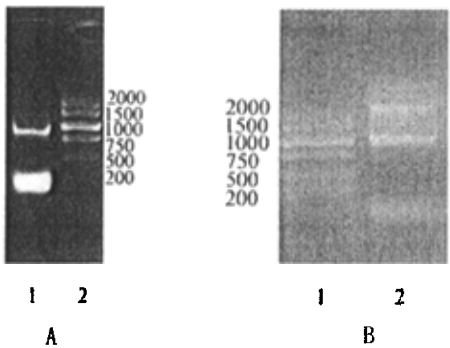


图 2-7 *AtItpk-1*—GFP 的质粒 PCR 和酶切鉴定

其中 A 为质粒 PCR 鉴定, B 为酶切鉴定 (*AtItpk-1* 片段长 960bp)。

2. 2. 6. 2 转基因苗的 PCR 检测

T1 代转基因苗先在 50 μ g/ml 的 kan 板上筛选, 之后用 PCR 进行鉴定 (图 2-8)。引物序列以 35S 为模板设计。

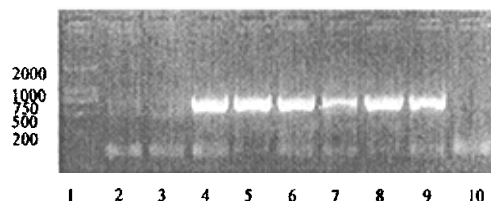


图 2-8 部分 *AtItpk-1*-GFP 转化拟南芥植株的检测结果

其中，泳道 1 为 DNA Marker，泳道 2-9 为转基因植株 PCR 扩增结果，4-9 为阳性（片段长约 750bp）。泳道 10 为未转基因植株 PCR 扩增结果。

2. 2. 6. 3 *AtItpk-1*-GFP 融合蛋白在拟南芥保卫细胞中的定位

撕取阳性幼苗的下表皮，观察保卫细胞中该融合蛋白的定位情况（图 2-9）。从图中可以看出空的 GFP 只存在于细胞质中（图 2-9, A），而 *AtItpk-1*-GFP 融合蛋白则主要存在于细胞核中（图 2-9, B）。由此可知，*AtItpk-1* 蛋白定位在细胞核中。

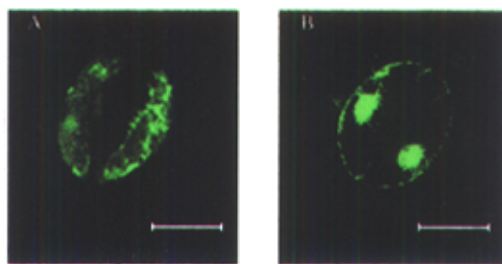


图 2-9 *AtItpk-1* 的定位

其中 A 为没有连接 *AtItpk-1* 的 GFP 的定位；B 为 *AtItpk-1*-GFP 融合蛋白的定位。

2. 3 讨论

2. 3. 1 *AtItpk-1* 基因的表达受红光强诱导，暗示它可能参与了植物对红光的应答

1, 3, 4-三磷酸肌醇 5/6-激酶是磷酸肌醇代谢过程中的一种重要的酶。有证据表明，5/6-激酶是一种在动物、植物、甚至线虫中都比较保守的多功能酶（Field 等，2000）。哺乳动物细胞中，5/6-激酶具有肌醇激酶和蛋白激酶双重活性；植物中，5/6-激酶是一种广泛存在的肌醇激酶，但有关该酶的功能还没有得到阐明。为了研究拟南芥中 5/6-激酶的生物学功能，我们对 *AtItpk-1* 基因在白光和红光下的表达特性作了分析，结果发现 *AtItpk-1* 基因的表达受红光强诱导，这可能暗示该基因参与了植物对红光的应答。光是植物生长、发育不可或缺的因子之一，因此研究 *AtItpk-1* 基因在白光和红光中的作用对揭示 5/6-激酶在植物中的生物学功能有重要的意义。

2. 3. 2 *AtItpk-1* 蛋白是一个广泛存在于拟南芥各个器官中的遍在蛋白

在研究拟南芥5/6-激酶的生物学功能之前,对其在各个器官中的表达进行检测是重要的。我们运用Western blot技术对该蛋白在拟南芥的果荚、花、根、茎、叶以及全株中作了检测,结果发现*AtItpk-1*存在于所检测的所有器官中,是一个遍在蛋白。这是否意味着该蛋白在植物中的功能是广泛存在而且是基本的,通过进一步的功能分析可以得到验证。

2. 3. 3 *AtItpk-1* 蛋白是一个核蛋白

在做 *AtItpk-1* 的定位之前,我们将它的氨基酸序列进行了分析,并没有发现它有核定位信号。当我们将 *AtItpk-1* 融合 GFP, 检测融合蛋白在保卫细胞中的定位时,发现融合蛋白定位在细胞核中。由于 GFP 蛋白只在细胞质中表达,所以融合蛋白的核定位表明 *AtItpk-1* 是一个核蛋白。我们认为没有任何核定位信号的 *AtItpk-1* 定位到细胞核中可能是通过它与一个核蛋白互作实现的。那么鉴定与 *AtItpk-1* 互作的核蛋白可能为揭示 5/6-激酶在植物中的功能提供线索。

第三章 *At/tpk-1* 的突变体及超表达植株的表型鉴定及互补分析

由于 *AtItpk-1* 的表达受红光强诱导, 所以我们推测该基因产物可能参与了植物对红光的应答。为了研究 *AtItpk-1* 在红光反应中的功能, 我们要来了 *AtItpk-1* 的突变体并且制作了该基因的超表达植株, 准备从基因缺失和超表达两方面来研究 *AtItpk-1* 基因在红光下的作用, 这对揭示 5/6-激酶在植物中的生物学功能有重要的意义。

3. 1 材料与方法

3. 1. 1 植物材料

拟南芥: 野生型、突变体以及超表达植株 (生态型均为 Columbia 型)。

3. 1. 2 质粒载体

表达载体: 真核表达载体 pBI121 和 pCambia 1391 由本实验室提供。

3. 1. 3 实验所需试剂配制

同上一章。

3. 1. 4 实验方法

3. 1. 4. 1 纯合突变体的筛选: 提取经 kan 筛选为阳性的幼苗的 DNA, 根据 www.arabidopsis.org 上提供的 LP、RP 和 LBa1 引物, 进行 PCR 扩增。若由 LBa1 和 LP 或 RP 扩增出目的带, 而 LP 和 RP 未扩增出带, 则表明该植株为纯合的突变体。

3. 1. 4. 2 表型分析

3. 1. 4. 2. 1 红光处理

(1) 将表面灭菌的突变体 (*atitpk-1-1* 和 *atitpk-1-2*)、野生型和超表达 (T_{31} 、 T_{32} 、 T_{33}) 种子种在同一个 MS 平板上 (MS 盐+0.8%琼脂, 不加糖和有机物)。

(2) 4℃春化 4 天, 白光下诱导萌发 2 小时, 之后转到不同光质下处理 4-5 天。

(3) 连续的红光处理使用的光辐照度为 $25 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$, 参考 Moller 等的报道 (2003); 平板水平放置。

(4) 纯的红光由 40W 的 Philips 红色荧光灯管加一层滤光片 (PG501/3, 联邦德国; 童哲, 1989) 产生。

(5) 第 8、9 天时，从红光下拿出平板，统计下胚轴长度并照相。

3. 1. 4. 2. 2 黑暗和白光处理

(1) 上述材料的种子表面灭菌，4℃春化 4 天，白光下诱导萌发 2 小时，之后转到黑暗下或仍在白光下生长 4-5 天。

(2) 连续的光处理使用的光辐照度为 $30 \mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$ ；平板水平放置。

(3) 第 8、9 天时拿出平板，统计下胚轴长度并照相。三种处理的温度均为 21℃。

3. 1. 4. 3 互补实验

(1) 将序列正确的 *AtItpk-1* 片段连接到 pCAMBIA 1391 上，转化其中一个突变体 *atitpk-1-1*。

(2) 以 35S 为启动子启动该基因在突变体中的表达。

(3) 同时，将没有连接 *AtItpk-1* 片段的 pCAMBIA 1391 也转入突变体 *atitpk-1-1* 中作为对照。

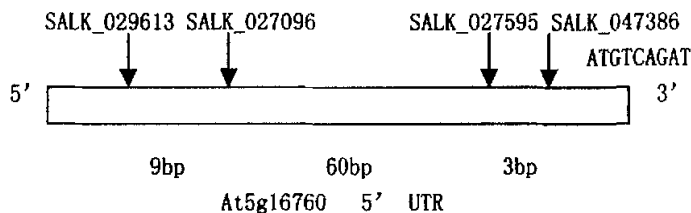
(4) T1 代阳性苗用 hygromycin 和 kanamycin 双重抗性筛选，同时用 35S 引物作分子检测。

3. 1. 4. 4 RT-PCR、少量法提取 DNA、超表达植株的产生以及 Western blot 的方法同上一章。

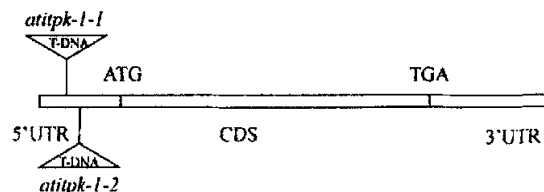
3. 2 结果与分析

3. 2. 1 突变体插入位点的分析

为了研究 *AtItpk-1* 基因的功能，我们从 www.arabidopsis.org 上搜索了该基因 (At5g16760) 的 T-DNA 插入突变体，发现目前共有 4 个，均为 5' UTR 插入突变体 (图 3-1, A)。于是，我们从 The Salk Institute Genomic Analysis Laboratory (SIGnAL) 实验室购买了其中的两个，分别命名为 *atitpk-1-1* 和 *atitpk-1-2* (图 3-1, B)。



A *AtItpk-1* 基因的 T-DNA 插入突变体示意图



B 两个 T-DNA 插入突变体模式图，其中 *atitpk-1-1* 和 *atitpk-1-2* 分别指 SALK_029613 和 SALK_027595。

图 3-1 *AtItpk-1* 基因的 T-DNA 插入突变体分析

3. 2. 2 纯合突变体的筛选

首先，我们将得到的种子在含 $50 \mu\text{g/ml}$ 的 kan 板上筛选，之后再利用 www.arabidopsis.org 上提供的引物进行进一步筛选。

从图 3-2 可以看出，泳道 2、5、11 为纯合突变体，9 为野生型，10 为杂合体。

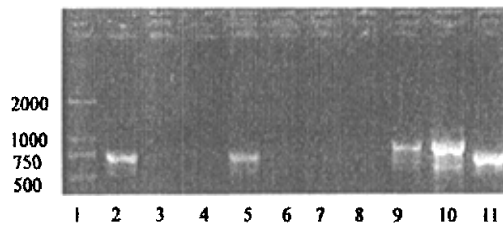


图 3-2 T-DNA 插入突变体的部分 PCR 检测结果

泳道 1 为 DNA Marker，泳道 2-11 为突变体植株的 PCR 扩增结果，其中，基因组引物 (LP、RP) 扩增的片段长约 950bp，Lba1 与 RP 扩增的片段长约 750bp。

3. 2. 3 超表达植株的筛选

T1 代转基因苗先在 $50 \mu\text{g/ml}$ 的 kan 板上筛选，之后用 PCR 进行鉴定 (图 3-3)。引物仍以 35S 为模板设计。共得到 4 个超表达株系，选三个株系进行下一步实验。

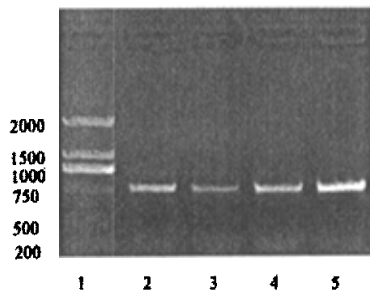


图 3-3 超表达植株的检测结果

其中，泳道 1 为 DNA Marker，泳道 2-5 为转基因植株 PCR 扩增结果 (片段长约 750bp)。

3. 2. 4 突变体和超表达植株 RNA 水平和蛋白水平的检测

两个纯合突变体均为第二代 (要来的种子按 T_0 代算)。转基因的超表达株系为 T_0 代，即鉴定的 T_1 代幼苗收的 T_2 以及 T_2 代种子都在 $50 \mu\text{g/ml}$ 的 kan 板上筛选，之后进行 RNA 水平和蛋白水平的检测 (图 3-4)。

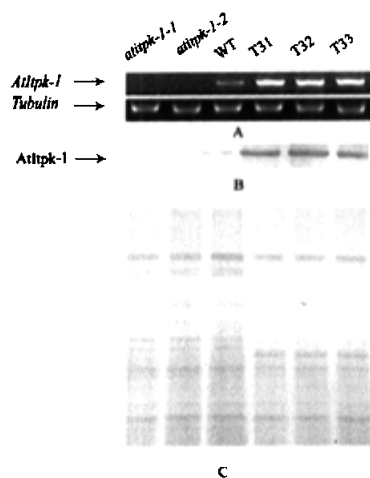


图 3-4 突变体和超表达植株的 RNA 水平和蛋白水平的检测

A 为 RT-PCR 结果，其中，*atitpk-1-1* 和 *atitpk-1-2* 为两个突变体，WT 为野生型，T31、T32、T33 为三个超表达株系；B 为 Western blot 结果，一抗为 *AtItpk-1* 的多抗 (1: 1000)；C 为转膜后立春红显色的结果，以确认上样量 (15 µg 蛋白/泳道)。*AtItpk-1*、*Tubulin* 基因和 *AtItpk-1* 蛋白的位置用箭头表示。

检测结果表明突变体植株在 RNA 和蛋白水平上确实没有表达；而超表达植株在 RNA 和蛋白水平上有比野生型高的表达。所以，我们就可以利用这些材料作进一步的表型分析。

3. 2. 5 表型分析

将两个 T-DNA 插入突变体、三个超表达株系以及野生型分别放入红光、白光或黑暗下处理，5 天后发现白光和黑暗处理的三类材料没有明显的差异 (图 3-5, A、B)；只有在红光下，突变体的下胚轴才比野生型的短，超表达株系的下胚轴则比野生型的长 (图 3-5, C) 并且统计学分析表明差异显著 ($P_{atitpk-1-1}=0.00192<0.01$, $P_{atitpk-1-2}=0.026204<0.05$, $P_{T31}=0.006146<0.01$, $P_{T32}=0.012969<0.05$, $P_{T33}=0.006145<0.01$; 图 3-5, D)。

这个表型实验表明：与野生型相比，T-DNA 插入突变体表现为红光抑制下胚轴伸长，而超表达植株则表现为红光促进下胚轴伸长。

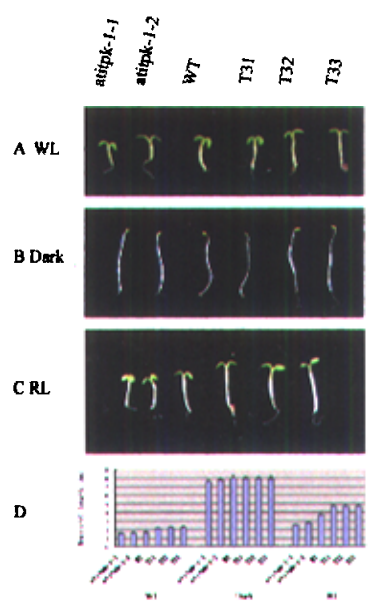


图 3-5 突变体、超表达和野生型的表型分析

A 为白光 (WL) 下三类材料的表现; B 为黑暗下三类材料的表现; C 为红光 (RL) 下三类材料的表现; D 为统计分析的结果 (单因素方差分析)。

3. 2. 6 互补实验

为了确证上述表型是由 *AtItpk-1* 基因引起的, 我们将由 35S 驱动的 *AtItpk-1* 基因转到其中一个突变体 *atitpk-1-1* 中; 同时, 为了观察表型的变化是否是由转化本身引起的, 我们也在 *atitpk-1-1* 中转了没有连接 *AtItpk-1* 基因的 pCambia 1391 空载体 (图 3-6)。实验表明: 当在红光下分析这些转有 *AtItpk-1* 基因的突变体时, 短的下胚轴表型便恢复到野生型 (图 3-6, A); 而转有 pCambia 1391 空载体的突变体则表现为原有表型, 这说明表型的变化不是由转化本身引起的, 而是因为 *AtItpk-1* 基因重新发挥了作用。

另外, 我们对材料的背景作了检测, Western blot 结果表明 *AtItpk-1* 基因在 *atitpk-1-1* 突变体中确实得到了表达, 且蛋白表达量与野生型的相当 (图 3-6, C); 而 pCambia 1391 空载体也确实转到了 *atitpk-1-1* 突变体中 (图 3-6, E)。

互补实验的结果表明: *atitpk-1-1* 在红光下的表型是由 *AtItpk-1* 基因的缺失引起的。由于下胚轴是一个衡量植物对光应答水平的重要器官, 所以 *AtItpk-1* 的突变体和超表达植株在红光下的表型表明 *AtItpk-1* 参与了红光下的光形态建成。

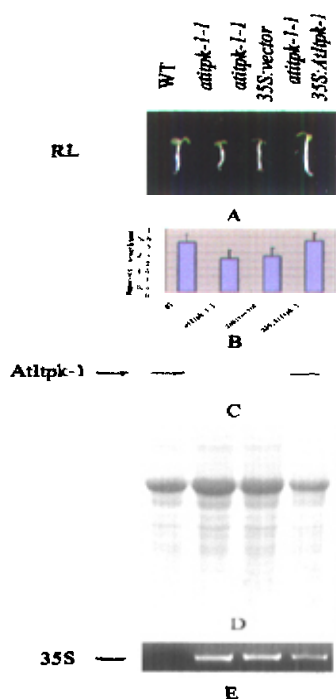


图 3-6 *AtItpk-1* 的互补

A 为四类材料: WT、*atitpk-1-1*、*atitpk-1-1* 35S: vector 和 *atitpk-1-1* 35S: *AtItpk-1* 在红光下的表型, 其中, *atitpk-1-1* 35S: vector 表示在 *atitpk-1-1* 突变体中转入由 35S 驱动的空载体; 而 *atitpk-1-1* 35S: *AtItpk-1* 则表示在 *atitpk-1-1* 突变体中转入由 35S 驱动的 *AtItpk-1* 基因。B 为四类材料在红光下胚轴长度的统计分析, 每个群体统计 120 棵苗。C 为 Western blot 结果, 一抗为 *AtItpk-1* 的多抗 (1:1000); D 为转膜后立春红显色的结果, 以确认上样量 (20 μ g 蛋白/泳道)。E 为 PCR 结果, 确认转基因水平, 引物以 35S 为模板设计, *AtItpk-1* 蛋白的位置用箭头表示。

3. 3 讨论

光是植物和其它一切生物赖以生存的能量来源, 在植物发育过程中扮演重要的角色。植物的光形态建成是植物生长、发育的必经阶段和重要环节。进化过程中, 植物发展了一套极其精细的光信号接受系统和信号转导系统, 能对光的有无、光的波长、强度的变化等作出适当的反应 (Fankhauser and Chory, 1997)。红光下产生的光信号由光敏色素接收 (Butler 等, 1959; Quail 等, 1995; Fankhauser and Chory, 1997), 之后传递给下游的作用因子, 如: ELF3、PIF3 等, 进而传递给光形态建成的负调控因子 CSN; CSN 将信号传递给 HY5 等光形态建成的正调控因子, HY5 等通过调节下游的调控基因或直接调节光形态建成的功能基因而表现出植物的光形态建成 (图 3-7)。

哺乳动物和植物细胞中, 1, 3, 4-三磷酸肌醇 5/6-激酶是一个调控磷酸肌醇代谢的酶。迄今, 还没有它参与光形态建成的报道。因而, 它是以怎样的方式参与光形态建成的? 是通过调节磷酸

肌醇代谢来参与还是另有其它的方式？以及它参与光形态建成的途径是什么？是以依赖于 CSN 的方式还是不依赖于 CSN 的方式？这些都是有待于进一步探讨的问题。

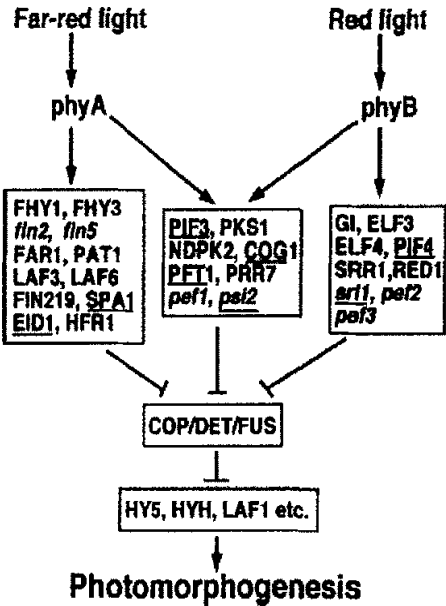


图 3-7 光敏色素介导的光信号通路的遗传模型 (Wang and Deng, 2004)

第四章 AtItpk-1 的自身磷酸化活性分析

既然表型实验表明 *AtItpk-1* 参与了红光下的光形态建成, 那么它是以怎样的方式参与到光形态建成中的呢? 哺乳动物细胞中, 有证据表明一些催化各种磷酸肌醇相互转化的酶蛋白也具有蛋白激酶的功能, 它们通过磷酸化调控一些蛋白质包括转录因子的活性, 进而调控下游基因的表达 (Hanks and Quinn, 1991)。在小牛脑和人的细胞中, 5/6-激酶除了肌醇激酶活性外, 还具有蛋白激酶的活性, 能磷酸化转录因子 c-Jun、ATF-2 和 p53, 这是肌醇激酶具有蛋白激酶活性的第一例报告 (Wilson 等, 2001)。另外, 5/6-激酶还具有自身磷酸化的能力 (Sun 等, 2002)。

我们通过对 *AtItpk-1* 的氨基酸序列分析, 发现这一序列中有很多的磷酸化位点, 这就暗示我们植物中的 5/6-激酶可能也具有蛋白激酶的活性。为了回答这一问题, 我们表达了有活性的 GST-*AtItpk-1* 融合蛋白, 通过自身磷酸化实验验证植物中的 5/6-激酶是否也具有蛋白激酶的活性。

4. 1 材料与方法

4. 1. 1 质粒载体

表达载体: 原核表达载体 pGEX-4T-1 由本实验室提供。

4. 1. 2 实验所需试剂配制

激酶反应 buffer: 25mM Tris, pH7.5, 1mM MgCl₂, 1mM EGTA, 1mM DTT。

其它溶液的配制同前几章。

4. 1. 3 实验方法

4. 1. 3. 1 自身磷酸化分析

蛋白的自身磷酸化分析主要参考 Yang 等所述的方法 (2001)。步骤如下:

(1) 将纯化后的 GST-*AtItpk-1* 融合蛋白 (1.5 μg) 和 12.5 μCi [γ -³²P]ATP 在激酶反应 buffer 中 30°C 温育 30 min。

(2) 用蛋白上样 buffer 终止反应。

(3) 跑 SDS-PAGE 电泳。

(4) 5% 的三氯乙酸和 1% 的焦磷酸钠洗凝胶, 直到洗涤溶液中几乎检测不到放射性。

(5) 制备干胶。

(6) 压片、洗片。

4. 1. 3. 2 载体的构建、蛋白的诱导表达方法同第二章；纯化用 Pharmacia Biotech 提供的试剂盒，方法也同第二章。

4. 2 结果与分析

4. 2. 1 AtItpk-1 的氨基酸序列分析

首先，我们将 AtItpk-1 的氨基酸序列提交到 <http://cn.expasy.org/prosite>，分析其蛋白结构域，结果发现该序列中有 7 个酪蛋白激酶 II 的磷酸化位点，5 个蛋白激酶 C 的磷酸化位点，1 个依赖于 cAMP 和 cGMP 的蛋白激酶磷酸化位点，1 个酪氨酸激酶磷酸化位点，1 个 N 端糖基化位点，3 个 N 端肉豆蔻酰化位点。

然后，我们再将 AtItpk-1 的氨基酸序列提交到 <http://cn.expasy.org/tools>，预测其可能的磷酸化位点，结果发现有 15 个磷酸化位点为丝氨酸残基，3 个为酪氨酸残基，1 个苏氨酸残基。这些结果暗示 AtItpk-1 有可能是一个蛋白激酶。

4. 2. 2 GST 与 GST-AtItpk-1 融合蛋白的自身磷酸化分析

首先，我们构建了 GST-AtItpk-1 原核表达载体，在大肠杆菌中诱导表达了融合蛋白（同时表达了 GST 蛋白作为对照），并对 GST 和 GST-AtItpk-1 融合蛋白进行了纯化。其次，我们利用纯化后的蛋白作了自身磷酸化分析。

为了准确分析 GST-AtItpk-1 融合蛋白的激酶活性，在进行磷酸化分析的同时，作了上样量的确认。图 4-1 A 表明，GST 的上样量要比 GST-AtItpk-1 融合蛋白的高，这样就可以排除磷酸化是由上样量的不同引起的。两个阴性对照分别是 GST 蛋白（图 4-1，B1）和变性条件下纯化的 GST-AtItpk-1 融合蛋白（图 4-1，B3）。结果表明只有在正常条件下纯化的 GST-AtItpk-1 融合蛋白才具有自身磷酸化活性，GST 和变性的 GST-AtItpk-1 融合蛋白都没有磷酸化活性，说明重组的 AtItpk-1 具有自身磷酸化活性，是一个蛋白激酶。

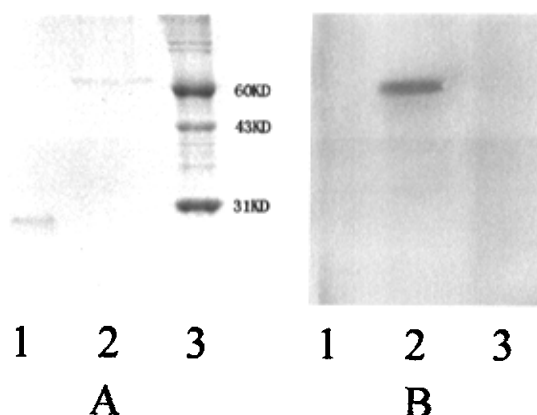


图 4-1 GST-AtItpk-1 融合蛋白的自身磷酸化分析

A, GST 与 GST-AtItpk-1 融合蛋白的 SDS-PAGE 结果, A1, 纯化的 GST 蛋白 (大约 26 KD); A2, 纯化的 GST-AtItpk-1 融合蛋白 (大约 62KD); A3, 蛋白 Marker。B, GST 与 GST-AtItpk-1 融合蛋白的自身磷酸化结果, B1, 纯化的 GST 蛋白; B2, 正常条件下纯化的 GST-AtItpk-1 融合蛋白; B3, 变性条件下纯化的 GST-AtItpk-1 融合蛋白。

4. 3 讨论

在小牛脑和人的细胞中, 5/6-激酶具有蛋白激酶的活性, 能磷酸化参与胁迫反应的转录因子 c-Jun 和 ATF-2 (Wilson 等, 2001) 以及肿瘤抑制子 p53 (Sun 等, 2002); 另外, 5/6-激酶还具有自身磷酸化的能力 (Sun 等, 2002)。植物中, 只有 5/6-激酶具有肌醇激酶活性的报道, 还没有该酶具有蛋白激酶活性的报道。通过自身磷酸化实验, 我们发现拟南芥的 5/6-激酶也具有蛋白激酶的活性 (图 4-1)。

哺乳动物细胞中, 有证据表明一些催化各种磷酸肌醇相互转化的酶蛋白也具有蛋白激酶的功能, 它们通过磷酸化调控一些蛋白质包括转录因子的活性, 进而调控下游基因的表达 (Hanks and Quinn, 1991)。小牛脑中, 当 5/6-激酶行使蛋白激酶的功能时, 该酶的肌醇激酶活性受到了很大程度的抑制 (Sun 等, 2002), 说明 5/6-激酶的两激酶活性会相互牵制。也许 5/6-激酶的重要性正是体现在它位于磷酸肌醇信号转导和蛋白激酶活性调节的交叉点上。当 5/6-激酶行使肌醇激酶的功能时, 它调控磷酸肌醇信号转导通路, 生成的磷酸肌醇作为信使参与生物感受胞外刺激及信号转导 (图 4-2); 当 5/6-激酶行使蛋白激酶的功能时, 它通过磷酸化调控一些蛋白质包括转录因子的活性, 进而调控下游基因的表达。

目前, 还没有磷酸肌醇参与植物光形态建成的报道, 而且磷酸肌醇参与的信号转导途径与植物光形态建成是两条颇为不同的信号转导途径, 前者通过与受体偶联的 G 蛋白和 PLC 发挥作用 (图 4-2), 而后者通过 CSN 和 HY5 等行使功能 (图 3-7)。

虽然, 我们还没有找到可以被 AtItpk-1 磷酸化的底物, 但是, 我们通过自身磷酸化实验证实了拟南芥 5/6-激酶具有蛋白激酶的活性。鉴于磷酸肌醇参与的信号转导途径与植物光形态建成途径有所不同, 我们推测 5/6-激酶参与红光下的光形态建成可能是基于它的蛋白激酶活性。进一

步的研究主要是寻找可以被 5/6-激酶磷酸化的底物。

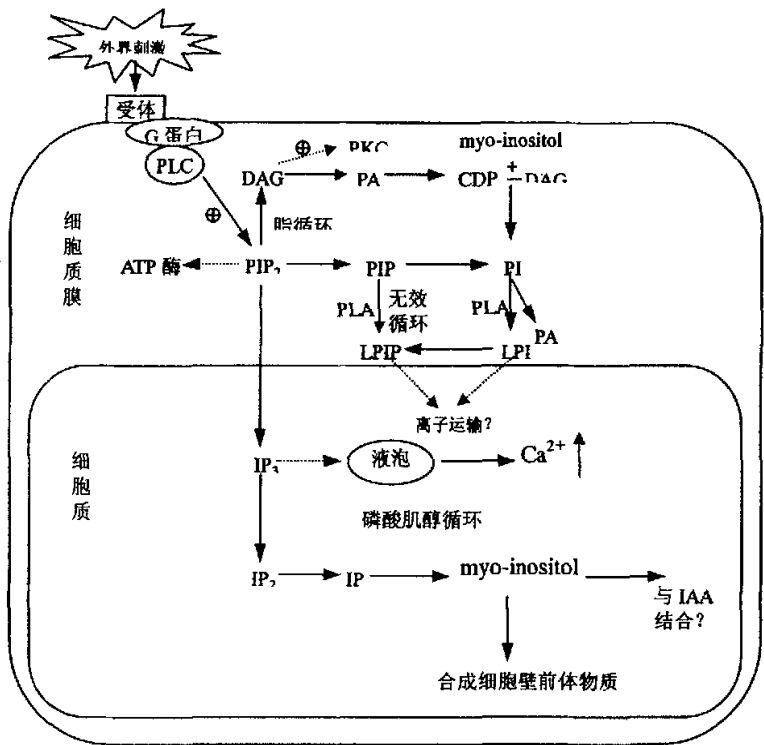


图 4-2 植物细胞肌醇磷脂信息传递系统的代谢途径(陈思学, 1996)

第五章 *AtItpk-1* 与 COP9 信号体的免疫共沉淀分析

表型实验表明拟南芥 5/6-激酶 *AtItpk-1* 参与了红光下的光形态建成, 自身磷酸化实验表明 *AtItpk-1* 具有蛋白激酶的活性, 所以我们推测 *AtItpk-1* 参与红光下的光形态建成可能是基于它的蛋白激酶活性。小牛脑和人细胞中的研究表明: 5/6-激酶可以与 COP9 信号体 (CSN) 免疫共沉淀, 表明细胞内的 5/6-激酶和 COP9 信号体存在一种相互作用的关系 (Wilson 等, 2001); 进一步的研究还发现它们的互作亚基是最大的亚基 CSN1 (Sun 等, 2002); 而且 5/6-激酶也是第一个鉴定出的与 CSN 互作的蛋白激酶 (Steinberg and Chamovitz, 2004; Wilson 等, 2001)。

众所周知, COP9 信号体是植物光形态建成的负调控因子, 也是光控生长和发育的关键调控因子 (Kang 等, 2000; Chamovitz 等, 1996; Wei 等, 1994)。*csn* 突变体表现为光抑制下胚轴伸长, 包括红光、远红光、蓝光和白光 (Kang 等, 2000)。另外, 当将拟南芥的 CSN1 亚基的水稻同源基因、*rFUS6* 在拟南芥中超表达时, 超表达植株表现为红光促进下胚轴伸长的表型 (Kang 等, 2000)。这样, *CSN* 与 *AtItpk-1* 在红光下的表型是相似的, 这给了我们一个强烈的感觉: *AtItpk-1* 可能通过与 CSN 的关系参与红光下的光形态建成。

为了确定 *AtItpk-1* 是否也像动物中的那样与 CSN 存在一种相互作用的关系, 我们以 *fus6/CSN1-3-4* 为材料, 利用 CSN4、CSN5 和 *AtItpk-1* 的抗体做了 *AtItpk-1* 与 COP9 信号体的免疫共沉淀。

5. 1 材料与方法

5. 1. 1 实验材料

5. 1. 1. 1 植物材料

拟南芥: *fus6/CSN1-3-4* (Wassilewskija 生态型, 由美国耶鲁大学的魏宁博士提供)。

5. 1. 1. 2 试剂和试剂盒

蛋白酶抑制剂 cocktail 和免疫共沉淀试剂盒均购自 Sigma。

5. 1. 2 实验所需试剂及配制 (免疫共沉淀)

- (1) 裂解 buffer: 50mM Tris HCl, pH7.4, 150mM NaCl, 1 mM EDTA, 1% Triton X-100
- (2) 10×洗涤 buffer: 0.5M Tris HCl, pH7.4, 1.5M NaCl
- (3) 洗脱 buffer: 0.1M Glycine, pH3.5
- (4) 2×样品 buffer: 125 mM Tris HCl, pH6.8, 4% SDS, 20% (v/v) Glycerol, 0.004% bromophenol blue
- (5) 3×FLAG Peptide

(6) ANTI-FLAG M2-Agarose Affinity Gel

(7) Amino-terminal FLAG-BAP Fusion Protein

5. 1. 3 实验方法

5. 1. 3. 1 阳性苗的筛选

少量法提取 DNA 后, 进行 PCR 鉴定, 引物以 *FLAG* 和 *CSN1* 的序列设计, 上游引物为: 5' -CAAAGACGATGACGATAAAGCAGAGC-3'; 下游引物为: 5' -GCAGGTCGACAGTTTAGCAAACGAGATC-3'。

5. 1. 3. 2 co-IP

(1) 材料的裂解

①取一定量的植物材料, 液氮中磨碎, 加入裂解 buffer, 放置 15-30min。

②12000g 离心 10 分钟。

③将上清转移到一个预冷的 EP 管中。

(2) FLAG 融合蛋白的免疫共沉淀

①将 ANTI-FLAG M2 Affinity Gel 彻底重悬起来, 按 40 μ l/sample 的比例取珠子到一个新的 EP 管中。

②1000RPM 离心 5s, 为了使珠子沉到管底, 在加样前要放置 1-2min, 除去上清。

③用 0.5ml $\times$ 洗涤 buffer 洗 2 次以便彻底除去酒精。

④加入 200-1000 μ l 的细胞裂解溶液, 充分混匀, 在摇床上轻摇 2h, 如果想加大结合, 可以延长至过夜。

⑤1000RPM 离心 5s, 除去上清。

⑥用 0.5ml $\times$ 洗涤 buffer 洗 3 次。

(3) FLAG 融合蛋白的洗脱

①加 30 μ l $2\times$ 样品 buffer 于洗涤过的珠子中。

②煮沸 3min。

③1000RPM 离心 5s, 将上清转移到新的 EP 管中, 分装后用不同的特异性抗体检测其组成 (Western blot)。

5. 2 结果与分析

5. 2. 1 *fus6/CSN1-3-4* 材料的鉴定

fus6/CSN1-3-4 材料是在 *CSN1* 的突变体 *fus6* 中转入一个由 35S 启动的带有 FLAG 标签的 *CSN1*, 其最终的效果是相当于一个带有 FLAG 标签的 *CSN1* 弱的超表达材料 (wang 等, 2002; 2003)。由于植物的 *CSN1* 亚基都是和其它亚基组成 CSN 复合体, 所以当 *CSN1* 超表达时整个复合体的水平也得到了提高。FLAG 标签位于 *CSN1* 的 N 端, 以 *FLAG* 序列为模板设计上游引物, *CSN1* 序列为模板设计下游引物, 扩增出的片段可以检测带有 FLAG 标签的阳性苗 (图 5-1)。

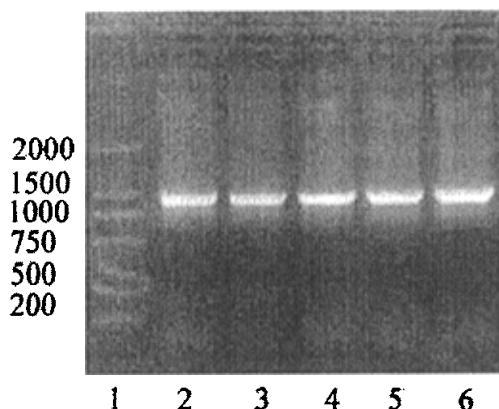


图 5-1 部分带有 FLAG 标签的阳性苗的鉴定

其中，泳道 1 为 DNA Marker，泳道 2—6 为带有 FLAG 标签的转基因植株 PCR 扩增结果（片段长约 1.4Kb）。

5. 2. 2 *AtItpk-1* 与 CSN 的免疫共沉淀 (co-IP)

我们以上述阳性苗为材料,提取总蛋白,用 CSN4、CSN5 和 *AtItpk-1* 的抗体进行了 5/6-激酶和 CSN 的免疫共沉淀实验。由于 CSN1 带有 FLAG 标签,所以当将 *fus6/CSN1-3-4* 的总蛋白提取物过带有 FLAG 单抗的珠子时,CSN1 就会被 FLAG 的单抗沉淀下来。因为拟南芥中 CSN1 和其它亚基形成 CSN 复合体,所以其它的亚基也会被沉淀下来(图 5-2)。

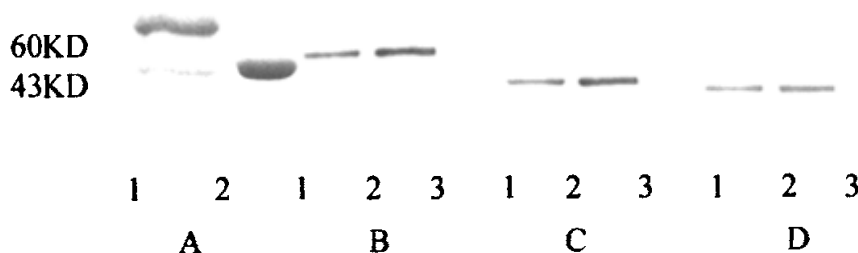


图 5-2 *AtItpk-1* 与 CSN 的免疫共沉淀 (co-IP)

图 A 是 SDS-PAGE 的结果, A1 为蛋白 Marker, A2 为 co-IP 的阳性对照 (一个 FLAG-BAP 的融合蛋白, 分子量为 49.3 KD, 在 PAGE 胶上的大小为 45-55 KD)。图 B 的一抗是 CSN4 的抗体 (1: 1500), B1 是 *fus6/CSN1-3-4* 的总蛋白 (CSN4 的分子量为 46 KD), B2 是被 FLAG 抗体沉淀下来的组分的 1/3, B3 是没有加一抗的阴性对照。图 C 的一抗是 CSN5 的抗体 (1: 2000), C1 是 *fus6/CSN1-3-4* 的总蛋白 (CSN5 的分子量为 39.6 KD), C2 是被 FLAG 抗体沉淀下来的组分的 1/3, C3 是没有加一抗的阴性对照。图 D 的一抗是 *AtItpk-1* 的抗体 (1: 1000), D1 是 *fus6/CSN1-3-4* 的总蛋白 (*AtItpk-1* 的分子量为 36.2 KD), D2 是被 FLAG 抗体沉淀下来的组分的 1/3, D3 是没有加一抗的阴性对照。

图 B 和 C 的结果说明 CSN4 和 CSN5 亚基被成功地沉淀下来, 而图 D 则说明 AtItpk-1 也存在于沉淀中, 表明 AtItpk-1 和 CSN 能够共沉淀, 进而暗示在拟南芥体内它们可能存在互作的关系。

5. 3 讨论

5. 3. 1 拟南芥的 5/6-激酶可能和 CSN 互作

众所周知, COP9 信号体不仅在植物的光控生长和发育中起关键的调控作用 (Kang 等, 2000; Chamovitz 等, 1996; Wei 等, 1994), 而且在控制植物发育的其它信号过程也起着关键的作用 (Peng 等, 2001a, b), 如对植物激素 (如生长素, Schwechheimer 等, 2001)、环境胁迫以及真菌和病毒等病原菌 (Azevedo 等, 2002; Liu 等, 2002) 的细胞水平的应答等。这些 CSN 介导的细胞过程对于植物和动物发育的许多方面都是很关键的, 说明 CSN 在细胞中的功能是基本和保守的。CSN 的总的亚基组成与 26S 蛋白酶体的盖子结构相似 (Glickman 等, 1998; Wei 等, 1998; Kang 等, 2000); 而且在生化功能上与泛素依赖的蛋白降解相关 (Steinbergand Chamovitz, 2004)。各种遗传学研究证明 CSN 处于多重信号输入和控制细胞分化的特异过程的下游调控级联反应的连接点上 (Steinbergand Chamovitz, 2004)。有证据表明与 COP9 互作的蛋白激酶在 CSN 控制的这些细胞过程中起着重要的作用, 例如 CSN 依赖的磷酸化调节着泛素依赖的转录因子的降解 (Berse 等, 2004; Steinbergand Chamovitz, 2004)。哺乳动物细胞中, 5/6-激酶是第一个鉴定出的与 COP9 互作的蛋白激酶 (Steinbergand Chamovitz, 2004; Wilson 等, 2001)。植物中, 我们的研究发现 5/6-激酶也具有蛋白激酶的活性; 另外, 免疫共沉淀实验说明拟南芥的 5/6-激酶可能和 CSN 互作 (图 2-4), 这样植物中的 5/6-激酶也可能是一个与 COP9 互作的蛋白激酶。

与免疫共沉淀的结果相一致, 拟南芥的 5/6-激酶和 CSN 具有相同的定位模式, 即都定位在细胞核中, 这使得它们的互作成为可能。另外, 当我们对 AtItpk-1 进行序列搜索时, 并未发现它有任何的核定位信号, 这是拟南芥的 5/6-激酶和动物细胞的 5/6-激酶在序列上的最大不同, 所以我们推测 AtItpk-1 可能是通过与某一个核蛋白互作而定位在细胞核中的。现在我们认为 CSN 就是那个核蛋白复合体, 它通过与 AtItpk-1 的互作使得没有核定位信号的 5/6-激酶定位到细胞核中。

另外, 从不同的水平来检测, 发现 CSN 为一个遍在蛋白, 存在于拟南芥的所有器官中 (Staub 等, 1996; Wei 等, 1994)。我们的结果表明, 拟南芥的 5/6-激酶也是一个遍在蛋白, 存在于检测的所有器官中, 这与 CSN 的器官表达模式相一致; 而且蛋白的表达量也与 CSN 的一致 (图 5-3), 这就为 5/6-激酶和 CSN 的互作提供了机会。

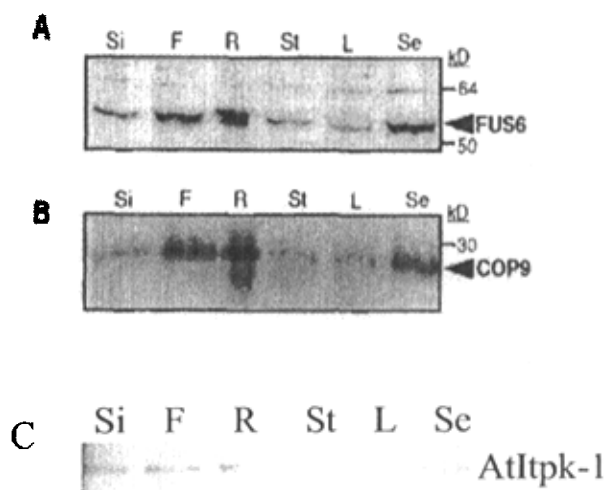


图 5-3 拟南芥的 5/6-激酶和 CSN 的器官表达模式比较

A, B 均引自 Staub 等 (1996) 的 Figure 4, 该图比较了 FUS6 蛋白和 COP9 蛋白的器官表达模式, 蛋白的上样量均为 $10\mu\text{g}$ /泳道; C 为拟南芥的 5/6-激酶 *AtItpk-1* 的器官表达模式, 蛋白的上样量均为 $30\mu\text{g}$ per lane.

5. 3. 2 拟南芥的 5/6-激酶可能通过与 CSN 互作来参与红光下的光形态建成

虽然, 动物中已经报道了 5/6-激酶和 CSN 互作, 但是至今互作的生物学意义还不清楚。我们的免疫共沉淀实验表明拟南芥的 5/6-激酶可能和 CSN 互作, 进一步的定位实验和器官表达模式的比较, 说明了拟南芥中存在它们互作的可能性。那么, 它们互作的生物学意义是什么? 研究拟南芥 5/6-激酶和 CSN 互作并参与植物的光控生长发育及其可能机制, 对揭示 5/6-激酶的生物学功能, 阐明植物光形态建成机理等方面具有重要的理论意义。

我们的实验表明: 红光下, 拟南芥 5/6-激酶的突变体 *atitpk-1* 表现短的下胚轴表型, 与野生型相比, *atitpk-1* 突变体表现红光抑制下胚轴伸长; 而超表达植株表现长的下胚轴表型, 说明 *AtItpk-1* 的超表达植株表现为红光促进下胚轴伸长。当将 *AtItpk-1* 基因转到其中一个突变体 *atitpk-1-1* 中, 短的下胚轴表型便恢复到野生型 (图 3-6, A), 而且转有 pCambia 1391 空载体 (对照) 的突变体仍表现为原有表型, 这说明表型的变化不是由转化本身引起的, 而是因为 *AtItpk-1* 基因重新发挥了作用。互补实验表明: 红光下, 短的下胚轴表型是由 *AtItpk-1* 基因引起的。由于下胚轴是一个衡量植物对光应答水平的重要器官, 所以 *AtItpk-1* 的突变体和超表达植株在红光下的表型表明 *AtItpk-1* 参与了红光下的光形态建成。

众所周知, *csn* 突变体表现为包括红光在内的光抑制下胚轴伸长的表型 (Kang 等, 2000)。当将拟南芥的 CSN1 亚基的水稻同源基因、*rFUS6* 在拟南芥中超表达时, 红光下, 与野生型相比, 转基因植株也表现红光促进下胚轴伸长的表型 (Kang 等, 2000)。由于我们的实验表明 *AtItpk-1* 可能与 CSN 互作, 所以表型的相似性给了我们一个强烈的感觉: *AtItpk-1* 可能通过与 CSN 互作来参与红光下的光形态建成。拟南芥中, 超表达 *rFUS6* (CSN1 亚基的水稻同源基因) 时, 表现为红

光促进下胚轴伸长的表型，这与 *AtItpk-1* 基因的超表达表型相一致；但当超表达拟南芥 CSN8 基因 *COP9* 时，并不表现与 *AtItpk-1* 基因的超表达相似的表型，这个结果暗示拟南芥 5/6-激酶参与红光下的光形态建成可能是通过与 CSN1 的作用完成的。在动物细胞中，5/6-激酶与 CSN 的互作亚基就是 CSN1 (Sun 等, 2002)。

这里存在一个问题：既然白光中也含有红光，为什么 *AtItpk-1* 的突变体和超表达植株只有在纯的红光下才有表型，白光下的表型却不明显？我们提供一种可能的解释：COP9 信号体是一个很广谱的光形态建成的调节因子，它的突变体对白光、红光、远红光以及蓝光均有反应，表现为光抑制下胚轴伸长；而 5/6-激酶的突变体 *atitpk-1* 则只对红光有反应（在远红光、蓝光下均没表型，结果未附），表明 *AtItpk-1* 可能只在 CSN 调节的某一特异的信号通路（即红光作用的信号通路）上起作用。而白光下，光敏色素（phytochromes）和隐花色素（cryptochromes）两种受体同时起作用，存在信号通路上的冗余，最终导致白光下没有明显的表型。

关于 *AtItpk-1* 是怎样与 CSN 互作、进而参与红光下的光形态建成的，有待于进一步探索。

结论

1. 以拟南芥为材料, 利用 RT-PCR 技术克隆了 1,3,4-三磷酸肌醇 5/6-激酶的基因, 命名为 *AtItpk-1*; 将 *AtItpk-1* 基因融合 His 标签进行原核表达, 纯化融合蛋白并制备了多克隆抗体。
2. 对 *AtItpk-1* 在不同光质下的表达做了分析, 发现它受红光强诱导, 说明 *AtItpk-1* 可能参与了植物对红光的应答; 构建 *AtItpk-1*-GFP 载体, 转入野生型拟南芥, 通过融合蛋白的稳定表达观察 *AtItpk-1* 在拟南芥中的定位, 结果发现 *AtItpk-1* 定位在细胞核中。
3. 对突变体 *atitpk-1-1*、*atitpk-1-2* 和超表达 *AtItpk-1* 的转基因植株进行表型分析, 结果发现 *atitpk-1* 突变体表现为红光抑制下胚轴伸长, 超表达植株则表现为红光促进下胚轴伸长的表型。另外, 当将 *AtItpk-1* 基因转到突变体 *atitpk-1-1* 中, 短的下胚轴表型便恢复到与野生型一样。这些结果表明拟南芥 5/6-激酶 *AtItpk-1* 可能参与了红光下的光形态建成。
4. 利用在大肠杆菌中诱导表达的有活性的 GST-*AtItpk-1* 融合蛋白, 进行了自身磷酸化实验, 发现 *AtItpk-1* 具有蛋白激酶的活性。
5. 以 *fus6/CSN1-3-4* 为材料, 利用 *AtItpk-1* 的抗体和 CSN4、CSN5 的抗体, 进行了 *AtItpk-1* 和 CSN 的免疫共沉淀实验, 结果发现拟南芥的 5/6-激酶可以和 COP9 信号体 (CSN) 共沉淀。
6. 发现了拟南芥 5/6-激酶 *AtItpk-1* 参与了红光下的光形态建成, 这一作用可能是通过与 CSN 互动而完成的, 并且 5/6-激酶在光形态建成中的功能可能是通过它的蛋白激酶活性来实现的。

参考文献

- 1 Ahmad M and Cashmore A R. *HY4* gene of *A.thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor. *Nature* 1993, 366: 162-166.
- 2 Anel F I I I, Lagarias J C, Mathies R A. Resonance raman analysis of chromophore structure in the lumi-R photoproduct. *Biochemistry* 1996, 35: 15997-16008.
- 3 Ang L H, Chattopadhyay S, Wei N, *et al.* Molecular interaction between COP1 and HY5 defines a regulatory switch for light control of Arabidopsis development. *Mol. Cell* 1998, 1: 213-222.
- 4 Azevedo C, Sadanandom A, Kitagawa K, *et al.* The RAR1 interactor SGT1, an essential component of *R* gene-triggered disease resistance. *Science* 2002, 295: 2073-76.
- 5 Bachmair A, Novatchkova M, Potuschak T, *et al.* Ubiquitylation in plants: a post-genomic look at a posttranslational modification. *Trends Plant Sci.* 2001, 6: 463-470.
- 6 Batschauer A. A plant gene for photolyase: An enzyme catalyzing the repair of UV-light-induced DNA damage [J]. *Plant J* 1993, 4: 705 - 709.
- 7 Bech-Otschir D, Kraft R, Huang X, *et al.* COP9 signalosome-specific phosphorylation targets p53 to degradation by the ubiquitin system. *EMBO J.* 2001, 20: 1630-1639.
- 8 Benvenuto G, Formiggini F, Laflamme P, *et al.* The photomorphogenesis regulator DET1 binds the amino-terminal tail of histone H2B in a nucleosome context. *Curr. Biol.* 2002, 12: 1529-1534.
- 9 Berridge M J. Elementary and global aspects of calcium signalling. *J Physiol.* 1997, 499: 291-306.
- 10 Berridge M J, and Irvine R F. Inositol phosphates and cell signalling. *Nature* 1989, 341: 197-205.
- 11 Berse M, Bounpheng M, Huang X H, *et al.* Ubiquitin-dependent degradation of Id1 and Id3 is mediated by the COP9 signalosome. *J Mol. Biol.* 2004, 343: 361-370.
- 12 Brian Q. P. Identification of Inositol 1,3,4-Trisphosphate 5-Kinase and Inositol 1,3,4,5-Tetrakisphosphate 6-Kinase in Immature Soybean Seeds. *Plant Physiol.* 1998, 116: 291-297.
- 13 Bulter W L, Norris K H, Siegelman H W, *et al.* Detection, assay, and preliminary purification of the pigment controlling photoresponsive development of plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 1959, 45: 703-708.
- 14 Chamovitz D A, Wei N, Osterlund M, *et al.* The COP9 complex, a novel multisubunit nuclear regulator involved in light control of a plant developmental switch. *Cell* 1996, 86: 115-121.
- 15 Chen Q J, Niu X G, Chai M F, *et al.* Isolation of an Arabidopsis gene encoding Ins(1,3,4)P₃ 5/6-kinase-like protein and involved in plant response to abiotic stresses. *Acta Botanica Sinica.* 2003, 45: 211-218.
- 16 Communi D, Vanweyenbergh V, and Erneux C. Molecular study and regulation of D-myo-inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase. *Cell Signal.* 1995, 7: 643-650.
- 17 Chory J, Peto C A, Feinbaum R, *et al.* *Arabidopsis thaliana* mutant that develops a light-grown plant in absence of light. *Cell* 1989, 58: 991-99.

- 18 Cullen P.J. Bridging the GAP in inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate signalling. *Biochim. Biophys. Acta* 1998, 1436: 35-47.
- 19 Davis R J. Signal transduction by the JNK group of MAP kinases. *Cell* 2000, 103: 239-252.
- 20 Deng X W, Caspar T, Quail P H. *COP1*: a regulatory locus involved in light controlled development and gene expression in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 1991, 5:1172-82.
- 21 Fankhauser C. and Chory J. Light control of plant development. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 1997, 13: 203-229.
- 22 Field J, Wilson M P, Mai Z, *et al.* An *Entamoeba histolytica* inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase has a novel 3-kinase activity. *Mol.Biochem. Parasitol.* 2000, 108: 119-123.
- 23 Fu H, Reis N, Lee Y, *et al.* Subunit interaction maps for the regulatory particle of the 26S proteasome and the COP9 signalosome. *EMBO J.* 2001, 20: 7096-7107.
- 24 Gagne J M, Downes B P, Shiu S H, *et al.* The F-box of the SCF E3 complex is encoded by a diverse superfamily of genes in *Arabidopsis*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2002, 99: 11519-11524.
- 25 Glickman M H, Rubin D M, Coux O, *et al.* A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9 signalosome and eIF3. *Cell* 1998, 94: 615-623.
- 26 Guo H , Yang H , Mockler T C , *et al.* Regulation of flowering time by *Arabidopsis* photoreceptors [J] . *Science* 1998, 279: 1360 - 1363.
- 27 Hanks S K and Quinn A M. Protein kinase catalytic domain sequence database: identification of conserved features of primary structure and classification of family members. *Methods Enzymol.* 1991, 200: 38-62.
- 28 Henke W, Ferrell K, Bech-Otschir D, *et al.* Comparison of human COP9 signalosome and 26S proteasome lid. *Mol. Biol. Rep.* 1999, 26: 29-34.
- 29 Hoffman P D , Batschauer A , Hays J B. PHH1 , a novel gene from *Arabidopsis thaliana* that encodes a protein similar to plant blue2light photoreceptors and microbial photolyases[J] . *Mol. Gen. Genet.* 1996, 253: 259 - 265.
- 30 Hokin M R, Hokin L E. Enzyme secretion and the incorporation of 32P into phospholipides of pancreas slices. *J Biol Chem.* 1953, 203: 976.
- 31 Holm M, Ma L G, Qu L J, *et al.* Two interacting bZIP proteins are direct targets of COP1-mediated control of lightdependent gene expression in *Arabidopsis*. *Genes Dev.* 2002, 16: 1247-1259.
- 32 Imaizumi T , Kadota A , Hasebe M , *et al.* Cryptochrome light signals control development to suppress auxin sensitivity in the moss *Physcomitrella patens*[J] . *Plant Cell* 2002, 14: 373 - 386.
- 33 Imaizumi T, Kanegae T, Wada M. Cryptochrome nucleocyto-plasmic distribution and gene expression are regulated by light quality in the fern *Adiantum capillus-veneris* [J]. *Plant Cell* 2000, 12: 81 - 96.
- 34 Irvine R F and Schell M J. Back in the water: the return of the inositol phosphates. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* 2001, 2: 327-338.
- 35 Jones A M and Edgerton M D. The anatomy of phytochrome, a unique photoreceptor in plants. *Sem.*

- Cell Biol. 1994, 5: 295-302.
- 36 Kanegae T, Wada M. Isolation and characterization of homologues of plant blue-light photoreceptor (cryptochrome) genes from the fern *Adiantum capillus-veneris* [J]. Mol. Gen. Genet. 1998, 259: 345 - 353.
- 37 Kang D M, Wang X P, Cao K M, *et al.* A gain-of-function phenotype conferred by over-expression of functional subunits of the COP9 signalosome in *Arabidopsis*. Plant J. 2000, 23: 597-608.
- 38 Karniol B, Malec P, Chamovitz D A. *Arabidopsis* FUSCA5 encodes a novel phosphoprotein that is a component of the COP9 complex. Plant Cell 1999, 11:839-48.
- 39 Kim T-H, Hofmann K, von Arnim A G, *et al.* PCI complexes: pretty complex interactions in diverse signaling pathways. Trend Plant Sciences 2001, 6: 379-386.
- 40 Kwok S F, Piekos B, Mis'era S, *et al.* A complement of ten essential and pleiotropic *Arabidopsis* COP/DET/FUS genes is necessary for repression of photomorphogenesis in darkness. Plant Physiol. 1996, 110: 731-742.
- 41 Kwok S F, Solano R, Tsuge T, *et al.* *Arabidopsis* homologs of a c-Jun coactivator are present both in monomeric form and in the COP9 complex, and their abundance is differentially affected by the pleiotropic *cop/det/fus* mutations. Plant Cell 1998, 10: 1779-1790.
- 42 Lemtiri-Chlieh F, MacRobbie E A C, Brearley C A. Inositol hexakisphosphate is a physiological signal regulating the K⁺-inward rectifying conductance in guard cells. Proc Natl Acad Sci USA. 2000, 97: 8687-8692.
- 43 Li L and Deng X W. The COP9 signalosome: an alternative lid for the 26S proteasome? Trends Cell Biol. 2003, 13: 507-509.
- 44 Lin C, Cashmore A R. Cryptochrome and plant photomorphogenesis. In: W R Briggs, R L Heath, and E M Tobin, eds. Regulation of Plant Growth and Development by Light. Rockville M D: American Society of Plant Physiologists, 1996. 30-39.
- 45 Liu Y, Schiff M, Serino G, *et al.* Role of SCF ubiquitin-ligase and the COP9 signalosome in the N gene-mediated resistance response to *Tobacco mosaic virus*. Plant Cell 2002, 14: 1483-1496.
- 46 Lückhoff A, and Clapham D E. Inositol 1,3,4,5-tetrakisphosphate activates an endothelial calcium-permeable channel. Nature 1992, 355: 356-358.
- 47 Mis'era S, Müller A J, Weiland-Heidecker U, *et al.* The *FUSCA* genes of *Arabidopsis*: negative regulators of light responses. Mol. Gen. Genet. 1994, 244:242-52.
- 48 Moller S G, Kim Y S, Kunkel T, *et al.* PP7 is a positive regulator of blue light signaling in *Arabidopsis*. Plant cell 2003, 15: 1111-1119.
- 49 Moon J, Parry G, and Estelle M. The ubiquitin-proteasome pathway and plant development. Plant cell 2004, 16: 3181-3195.
- 50 Morris A P, Gallacher D V, Irvine R F, *et al.* Synergism of inositol trisphosphate and tetrakisphosphate in activating Ca²⁺-dependent K channels. Nature 1987, 330: 653-655.
- 51 Mundt K E, Liu C, Carr A M. Deletion mutants in COP9 signalosome subunits in fission yeast *Schizosaccharomyces pombe* display distinct phenotypes. Mol. Biol. Cell 2002, 13: 493-502.

- 52 Naumann M, Bech-Otschir D, Huang X, *et al.* COP9 Signalosome-directed c-Jun Activation/Stabilization Is Independent of JNK. *J Biol. Chem.* 1999, 274: 35297-35300.
- 53 Olmsted J B. Affinity purification of antibodies from diazotized paper blots of heterogeneous protein samples. *J Biol. Chem.* 1981, 256: 11955-11957.
- 54 Oron E, Mannervik M, Rencus S, *et al.* COP9 signalosome subunits 4 and 5 regulate multiple pleiotropic pathways in *Drosophila melanogaster*. *Development* 2002, 129: 4399-4409.
- 55 Osterlund M T, Hardtke C S, Wei N, *et al.* Targetted destabilization of HY5 during light-regulated development of Arabidopsis. *Nature* 2000, 405: 462-466.
- 56 Oyama T, Shimura Y, and Okada K. The Arabidopsis HY5 gene encodes a bZIP protein that regulates stimulus-induced development of root and hypocotyl. *Genes Dev.* 1997, 11: 2983-2995.
- 57 Parks B M, Quail P H, Hangarter R P. Phytochrome A regulates red-light induction of phototropic enhancement in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 1996, 110: 155-162.
- 58 Pearson G, Robinson F, Gibson T B, *et al.* Mitogen-activated protein (MAP) kinase pathways: regulation and physiological functions. *Endocrine Reviews* 2001, 22: 153-183.
- 59 Peng Z, Serino G, and Deng X W. Molecular characterization of subunit 6 of the COP9 signalosome and its role in multifaceted development processes in Arabidopsis. *Plant cell* 2001a, 13: 2393-2407.
- 60 Peng Z, Serino G, and Deng X W. A role of Arabidopsis COP9 signalosome in multifaceted developmental processes revealed by the characterization of its subunit 3. *Development* 2001b, 128: 4277-4288.
- 61 Pepper A, Delaney T, Washburn T, *et al.* DET1, a negative regulator of light-mediated development and gene expression in Arabidopsis, encodes a novel nuclear localized protein. *Cell* 1994, 78: 109-116.
- 62 Perrotta G, Ninu L, Flamma F, *et al.* Tomato contains homologues of Arabidopsis cryptochromes 1 and 2[J]. *Plant Mol. Biol.* 2000, 42: 765 - 773.
- 63 Pickart C M. Mechanisms underlying ubiquitination. *Annu. Rev. Biochem.* 2001, 70: 503-533.
- 64 Pollmann C, Huang X, Mall J, *et al.* The constitutive photomorphogenesis 9 signalosome directs vascular endothelial growth factor production in tumor cells. *Cancer Res.* 2001, 61: 8416-8421.
- 65 Pratt L H. Phytochromes-differential properties, expression patterns and molecular evolution. *Photochem. Photobiol.* 1995, 61: 10-21.
- 66 Quail P H, Boylan M T, Parks B M, *et al.* Photochromes: photosensory perception and signal transduction. *Science* 1995, 268: 675-680.
- 67 Robson P R H, and Smith H. Genetic and transgenic evidence that phytochromes A and B act to modulate the gravitropic orientation of Arabidopsis thaliana hypocotyls. *Plant Physiol.* 1996, 110: 211-216.
- 68 Schroeder D F, Gahrtz M, Maxwell B B, *et al.* Deetiolated 1 and damaged DNA binding protein 1 interact to regulate Arabidopsis photomorphogenesis. *Curr. Biol.* 2002, 12: 1462-1472.
- 69 Schwechheimer C and Deng X.W. COP9 signalosome revisited: a novel mediator of protein degradation. *Trends Cell Biol.* 2001, 11: 420-426.
- 70 Schwechheimer C, Serino G, Callis J, *et al.* Interactions of the COP9 signalosome with the E3

- ubiquitin ligase SCF^{TIR1} in mediating auxin response. *Science* 2001, 292: 1379-1382.
- 71 Schwechheimer C, Serino G, Deng X W. The COP9 signalosome and AXR1 are required for multiple E3 ubiquitin ligase-mediated processes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell* 2002, 14: 2553-2563.
- 72 Seeger M, Kraft R, Ferrell K, *et al.* A novel protein complex involved in signal transduction possessing similarities to 26S proteasome subunits. *FASEB J.* 1998, 12: 469-478.
- 73 Serino G and Deng X W. The COP9 signalosome: regulating plant development through control of proteolysis. *Annu. Rev. Plant Biol.* 2003, 54: 165-182.
- 74 Serino G, Tsuge T, Kwok S, *et al.* *Arabidopsis cop8* and *fus4* mutations define the same gene that encodes subunit 4 of the COP9 signalosome. *Plant Cell* 1999, 11:1967-80.
- 75 Sharpless N E and DePinho R A. p53: good cop/bad cop. *Cell* 2002, 110: 9-12.
- 76 Shi J, Wang H, Wu Y, *et al.* The Maize low-phytic acid mutant *lpa2* is caused by mutation in an inositol phosphate kinase gene. *Plant Physiol.* 2003, 131: 507-515.
- 77 Small D G, Min B , Lefebvre P A. Characterization of a *Chlamydomonas reinhardtii* gene encoding a protein of the DNA photolyase/ blue light photoreceptor family[J] . *Plant Mol. Biol.* 1995, 28: 443 - 454.
- 78 Smith H. Phytochromes and light signal perception by plants- an emerging synthesis [J]. *Nature* 2000, 407: 585 - 591.
- 79 Smith H. Physiological and ecological function within the phytochrome family. *Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol.* 1995, 46: 289-315.
- 80 Staub J M, Wei N and Deng X W. Evidence for FUS6 as a Component of the Nuclear-Localized COP9 Complex in *Arabidopsis*. *Plant cell* 1996, 8: 2047-2056.
- 81 Steinberg O H and Chamovitz D A. The COP9 signalosome: mediating between kinases signaling and protein degradation. *Curr. Protein Pept. Sci.* 2004, 5: 1-5.
- 82 Stevenson-Paulik J, Odom A R, York J D. Molecular and biochemical characterization of two plant inositol polyphosphate 6-/3-/5-kinases. *J Biol. Chem.* 2002, 277: 42711-42718.
- 83 Sun Y, Wilson M P, Majerus P W. Inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase associates with the COP9 signalosome by binding to CSN1. *J Biol. Chem.* 2002, 277: 45759-45764.
- 84 Suzuki G, Yanagawa Y, Kwok S F, *et al.* *Arabidopsis* COP10 is a ubiquitin -conjugatingenzyme variant that acts together with COP1 and the COP9 signalosome in repressing photomorphogenesis. *Genes Dev.* 2002, 16: 554-559.
- 85 Tomoda K, Kubota Y, Arata Y, *et al.* The cytoplasmic shuttling and subsequent degradation of p27Kip1 mediated by Jab1/CSN5 and the COP9 signalosome complex. *J. Biol. Chem.* 2002, 277: 2302-2310.
- 86 Tsuge T, Matsui M, Wei N. The subunit 1 of the COP9 signalosome suppresses gene expression through its N-terminal domain and incorporates into the complex through the PCI domain. *J Mol. Biol.* 2001, 305: 1-9.
- 87 Uhle S, Medalia O, Waldron R, *et al.* Protein kinase CK2 and protein kinase D are associated with

- the COP9 signalosome. *EMBO J.* 2003, 22: 1302-1312.
- 88 Verbsky J W, Wilson M P, Kisseleva M V, *et al.* The synthesis of inositol hexakisphosphate *J Biol. Chem.* 2002, 277: 31857-31862.
- 89 Wang H Y and Deng X W. Phytochrome Signaling Mechanism. In: Somerville C and Meyerowitz E, eds. *The Arabidopsis Book*. Washington: American Society of Plant Biologists, 2004, 1-28.
- 90 Wang X P, Feng S H, Nakayama N M, *et al.* The COP9 signalosome interacts with SCF^{UFO} and participates in *Arabidopsis* flower development. *Plant cell* 2003, 15: 1071-1082.
- 91 Wang X P, Kang D M, Feng S H, *et al.* The CSN1 N-terminal-dependent activity is required for *Arabidopsis* development but not for Rub1/Nedd8 deconjugation of cullins: a structure-function study of CSN1 subunit of COP9 signalosome. *Mol. Bio. Cell* 2002, 13: 646-655.
- 92 Wei N, Chamovitz D A, and Deng X W. *Arabidopsis* COP9 is a component of a novel signaling complex mediating light control of development. *Cell* 1994, 78: 117-124.
- 93 Wei N and Deng X W. The role of the COP/DET/FUS genes in light control of *Arabidopsis* seedling development. *Plant Physiol.* 1996, 112: 871-878.
- 94 Wei N and Deng X W. COP9: a new genetic locus involed in light-regulated development and gene expression in *Arabidopsis*. *Plant cell* 1992, 4: 1507-1518.
- 95 Wei N and Deng X W. The COP9 signalosome. *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2003, 19: 261-286.
- 96 Wei N, Tsuge T, Serino G, *et al.* The COP9 complex is conserved between plants and mammals and is related to the 26S proteasome regulatory complex. *Current Biology* 1998, 8: 919-922.
- 97 Wilson M P, and Majerus P W. Characterization of a cDNA encoding *Arabidopsis thaliana* inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997, 232: 678-681.
- 98 Wilson M P, Sun Y, Cao L, *et al.* Inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase is a protein kinase that phosphorylates the transcription factors c-Jun and ATF-2. *J Biol. Chem.* 2001, 276: 40998-1004.
- 99 Xia H J, Brearley C, Elge S, *et al.* *Arabidopsis* Inositol Polyphosphate 6-/3-Kinase Is a Nuclear Protein That Complements a Yeast Mutant Lacking a Functional ArgR-Mcm1 Transcription Complex. *Plant cell* 2003, 15: 449-463.
- 100 Yang X, Rudolf M, Carew M A, *et al.* Inositol 1,3,4-trisphosphate acts in vivo as a specific regulator of cellular signaling by inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate. *J Biol. Chem.* 1999, 274: 18973-18980.
- 101 Yang X, and Shears S B. Multitasking in signal transduction by a promiscuous human *Ins(3,4,5,6)P4* 1-kinase/*Ins(1,3,4)P3* 5/6-kinase. *Biochem. J.* 2000, 351: 551-555.
- 102 Yang K-W, Liu Y D, and Zhang S Q. Activation of a mitogen-activated protein kinase pathway is involved in disease resistance in tobacco. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001, 98: 741-746.
- 103 Zonia L, Cordeiro S, Tup J, *et al.* Oscillatory chloride efflux at the pollen tube apex has a role in growth and cell volume regulation and is targeted by inositol 3,4,5,6-tetrakisphosphate. *Plant Cell* 2002, 14: 2233-2249.
- 104 常立, 文国琴, 植物蓝光受体研究进展. *生物技术通讯*, 2004, 15: 160-171.
- 105 陈思学, 焦新之. 植物细胞的肌醇磷脂信息传递系统. *植物生理学通讯*, 1996, 30: 405-

- 413.
- 106 董哲, 光质纯度对幼苗光形态建成的影响. 植物生理学通讯, 1989, 2: 28-31.
- 107 叶珍, 隐花色素与植物的光形态建成. 四川农业大学学报, 2003, 21: 267-274.
- 108 余淑文, 汤章城. 植物生理与分子生物学(第二版) [M]. 北京: 科学出版社, 1998, 634.
- 109 章东方, 罗昭锋, 顾江涛, 等. 植物光受体的研究进展. 安徽农业科学, 2003, 31: 391-394.
- 110 张蜀秋, 植物的光控发育, 见: 武维华主编, 植物生理学, 科学出版社, 2003, 348-370.

致 谢

三年的求学生涯一晃而过，回顾这三年的求学历程，期间既有成功的喜悦也有失败的教训。三年，对于一个人的一生来说也许算不了什么，但是它却是我人生的一个转折点，因为它不但磨练了我的意志，而且记录了我从一个知之甚少的大学生成长到一个学会用脑子思考问题、学会用心去探索未来世界的人。我将永远珍惜并感谢这段生活，同时真心地感谢陪伴我走过这段历程的所有良师益友们：

首先，要感谢我的导师王学臣教授，他严谨的治学态度、不懈的科研追求，敏锐的思维，乐观向上的生活态度都深深地感染并影响了我，使我受益匪浅。导师的谆谆教诲，悉心指导我将永远铭记在心。同时，感谢师母陈珈教授对实验的帮助，使实验能够更好地完成。

其次，我想感谢我的师兄陈其军副教授，应该说科研上我的每一个进步都与师兄的悉心指导分不开。他的踏实、勤奋时时感召着我，催我奋进；他善良的人品也影响着我，教我做人。

感谢巩志忠教授对实验的指导和帮助。巩老师勤勉敬业和对科研工作认真、严谨的态度令人敬佩，他宽大的胸怀和平易近人的态度让人倍感亲切。应该说，他是我学习的榜样。

植物所童哲教授曾对实验进行了指导，使得实验能够顺利进行；耶鲁大学的邓兴旺教授和魏宁博士为实验提供种子，魏博士还提出良好的建议；本院叶德教授为文章作了修改，并为实验提出了宝贵的意见；北京市生命科学研究所的马力耕博士和北京大学的康定明博士也为实验提出过许多建议和意见，这里对他们的帮助表示衷心地感谢！

感谢植物系袁明教授、武维华教授、张大鹏教授、张蜀秋教授、李岩教授和韩玉珍教授等在每次的工作汇报中给予的宝贵意见。

感谢同级的柴茂峰同学在实验的进行过程中所给予的帮助和提出的宝贵意见；感谢师弟魏鹏程对实验的顺利进行给予的帮助；感谢师姐肖玉梅副教授、师兄陈苏、师姐钮旭光、陈敏、武玉叶、崔香环、师妹林慧琼和徐春英给予的帮助。感谢同级的高新起、李春光、祁碧菽、于中连、郝福顺、许守明、陈惠、唐江华等给予的帮助；感谢实验室安瑞、陈乃芝、陆平利、蔡敬辉、苏昭、张秀青、陈叶苗、倪世明、秦瑞英、谈峰、张娟、张宁等曾给予的帮助，并衷心地祝愿他们实验顺利，学有所成。

感谢同寝室的张志梅、何继红、戴艳同学在学习和生活上对我的帮助，她们给了我很多支持与鼓励，安慰和欢乐。也感谢其它实验室魏丽勤、陈智中、夏然、王霞等同学的帮助。

感谢张学琴副教授和闫红高级实验师给予的帮助。

感谢冯老师、方师傅为我们的实验工作提供的方便；也感谢两位李师傅的帮助。

最后，我想特别感谢我的爱人许艇博士，是他的爱和长久以来默默的支持和呵护伴我走过这三年痛并快乐着的岁月；特别感谢我亲爱的爸爸、妈妈和妹妹，我今天的成绩和他们的支持是分不开的。我将永远深爱着他们！并祝愿他们永远地健康、开心和快乐！

感谢所有支持和帮助过我的亲人和朋友们！

秦治翔

二零零五年六月

作者简历

姓名： 秦治翔

性别： 女

民族： 汉

出生年月： 1977 年 6 月 6 日

籍贯： 河北省

教育背景：

2002 年 9 月-2005 年 6 月，中国农大生物学院

研究方向：植物逆境分子生物学

论文题目：拟南芥 1, 3, 4-三磷酸肌醇 5/6-激酶在光形态建成中的功能研究

工作受 973 和国家自然科学基金资助。

1999 年 9 月-2002 年 6 月，中国农大作物学院

研究方向：棉纤维发育与品质改良

论文题目：棉纤维次生壁增厚起始相关基因的 cDNA 克隆与分析

工作受国家自然科学基金资助。

1995 年 9 月-1999 年 6 月，河北农大农学院生物技术专业

发表文章：

- (1) 秦治翔等“棉纤维次生壁增厚相关基因的 cDNA 克隆与分析”，作物学报，2003，29(6):860-866。
- (2) 许艇，秦治翔等“甲萘威 ELISA 方法的建立及初步应用”，应用与环境生物学报，2004，10(5): 569-572
- (3) 许艇，邵小龙，秦治翔等“杀虫剂西维因单克隆抗体的研制及鉴定”，免疫学杂志，2004，20(1): 61-64
- (4) Zhixiang Qin, et al. The *Arabidopsis* inositol 1,3,4-trisphosphate 5/6-kinase, AtItpk-1, is involved in plant photomorphogenesis under red light conditions, possibly via interaction with COP9 signalosome. Accepted by Plant Physiology and Biochemistry.