

扩张蛋白在旱稻根的免疫组化定位 及对旱稻抗旱性的表达分析*

高英 陈乃芝 熊艳梅 王学臣**

中国农业大学生物学院植物生理生化国家重点实验室, 北京 100094

摘要 扩张蛋白是一类细胞壁非酶蛋白, 在植物发育进程中起着重要作用. 本实验以旱稻为材料, 通过 AtEXP1 抗体对扩张蛋白在旱稻根中的定位及可能的作用机制进行了探讨. 研究表明扩张蛋白参与了旱稻根系的生长发育, 且更可能是促进了侧根、不定根的生长. 利用 *OsEXP3* 基因特异性片段, 即部分 3'-UTR 片段作为探针模板, 通过 Northern 杂交技术对其在 4 种抗旱性不同的旱稻以及干旱胁迫条件下的表达特性进行了分析. 结果显示: *OsEXP3* 基因受到干旱胁迫的正调控, 且其表达量与旱稻的抗旱性呈现正相关. 由此推测, 在干旱胁迫条件下, 扩张蛋白很可能是通过促进侧根与不定根的生长发育来提高旱稻的抗旱性.

关键词 旱稻 扩张蛋白 *OsEXP3* 免疫组织化学定位 干旱

扩张蛋白是一类细胞壁非酶蛋白, 具有松弛细胞壁的功能^[1,2]. 它由 3 类多基因家族编码, 分别命名为 α -expansin, β -expansin, γ -expansin. 每类扩张蛋白基因家族又有很多的基因成员¹⁾.

研究发现, 每一个扩张蛋白基因在高度特定的位点和高度特定的细胞类型中表达, 其表达在时间、空间上受到严格的调控^[3], 它们是由组织特异性表达的^[4], 且在植物生长发育过程中, 不同的扩张蛋白很可能在不同类型的细胞中发挥着不同的作用^[5]. 扩张蛋白在植物整个发育进程中, 如形态建成、果实成熟及脱落等方面起着重要作用^[3,6]. 然而扩张蛋白对根系生长发育的作用机制报道较少.

由于蛋白免疫组化定位研究可间接了解逆境响应基因的功能^[7], 同时由于旱稻比水稻能节约用水, 研究旱稻的抗旱机理有重要的意义, 而根系又是研究抗旱机制的重要组成部分, 因此本实验选择以旱稻根系作为材料对扩张蛋白的抗旱机制进行了初步探讨. 首先通过蛋白免疫组化定位方法对扩张

蛋白在旱稻根中的表达部位作了鉴定, 并利用 AtEXP1 抗体对扩张蛋白在根系生长发育进程中的作用进行了研究. 同时由于 *OsEXP3* 基因只在根中表达^[8], 所以本实验选择 *OsEXP3* 基因作为研究在根中表达的扩张蛋白的代表基因. 并对该基因在干旱条件下的表达特性进行了分析, 为研究扩张蛋白基因在干旱胁迫条件下对旱稻根系生长发育的可能作用机理提供一些理论依据.

1 材料及方法

1.1 材料及试剂

旱稻 IRAT109、旱稻毫格劳、旱稻 297、旱稻 2 号(4 种旱稻的抗旱性不同 IRAT109~毫格劳>旱稻 297>旱稻 2 号)由中国农业大学作物学院王化琪教授赠送; AtEXP1 抗血清由本实验室熊艳梅提供; 山羊抗兔 IgG-AP, NBT/BCIP 染色试剂盒购自华美生物工程有限公司; olig(dT₁₈)、引物、dNTP 购自上海生工生物工程有限公司; Taq 酶、RNase inhibitor、M-MLV RT 购

2005-08-23 收稿, 2005-10-25 收修改稿

* 国家重点基础研究发展规划(批准号: G1999011700, 2003CB114307)和国家自然科学基金(批准号: 30370129)资助项目

** 通讯作者, E-mail: xcwang@cau.edu.cn

1) <http://expansins/other species>

自华美生物工程有限公司；玻璃奶 DNA 回收试剂盒购自博大生物试剂公司；Trizol 试剂购自 GIBCOBRL 公司；探针标记试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司； α - 32 P-dCTP 购自亚挥生物工程公司；尼龙膜、硝酸纤维素膜购自 Amersham 公司；其他药品均为国产分析纯。

1.2 材料处理

早稻毫格劳种子经筛种及表面消毒后，用水浸泡 1 d，置于两层湿润滤纸上，在 25℃ 暗培养。待种子长出侧根、不定根，且长到 1—2 cm 长时取材。主根分别取 0—5 mm，5—10 mm，10—15 mm 区段，侧根和不定根取 0—5 mm 区段，在 4℃ 条件下固定 2 h。

4 种稻作种子经筛种及表面消毒后，用水浸泡 1 d，置于两层湿润滤纸上，在 30℃ 黑暗培养箱催芽。待主根长到约 2—3 cm 长时进行如下处理：对照(直接剪取根)、干旱(将材料置于滤纸上自然风干 1 h 后取根)及干旱后复水(将材料干旱 1 h 后再复水 2 h 后取根)。取材后速冻于液氮中，待提取 RNA。

1.3 实验方法

1.3.1 蛋白免疫组织细胞化学定位方法 按文献[8]进行操作。

1.3.2 AtEXP1 抗体处理早稻根系 (1) 早稻毫格劳种子经筛种及表面消毒后，用水浸泡 1 d，置于垫有两层湿润滤纸的培养皿上，在 25℃ 组培室培养，待主根长到约 2 cm 长时，用 AtEXP1 抗体稀释液浸泡根约 10 h，后恢复为处理前生长条件，2.5 d 后观

察分析。(2) 按上述方法对早稻毫格劳进行浸种、催芽，在 25℃ 组培室培养，待刚长出侧根、不定根时，用 AtEXP1 抗体稀释液浸泡根约 12 h，然后恢复为处理前生长条件，4 d 后观察分析。

1.3.3 早稻根总 RNA 提取及反转录 按 Trizol 试剂盒说明书和 M-MLV 反转录酶说明书进行。

1.3.4 引物设计 根据 Gen Bank 中登录的水稻 *OsEXP3* cDNA 序列(登录号为 U30479)，设计特异引物 p1 和 p2，序列如下：

p1: 5'-gtcgccccgtccaactggttc-3' p2: 5'-aattg-gtgggcaaacattca-3'

1.3.5 Northern 杂交 约 20 μ g 总 RNA 经 1.2% 琼脂糖甲醛变性凝胶电泳后转到 Hybond-N⁺ 尼龙膜上，80℃ 烘烤 2 h 固定。*OsEXP3* 3'-UTR 270 bp DNA 片段经 α - 32 P-dCTP 标记后作为探针进行 Northern 杂交(探针标记参照 TaKaRa 公司的 Random Primer DNA Labeling Kit Ver. 2 说明书)。在 Church 缓冲液中(0.25 mol · L⁻¹ Na₂HPO₄ pH 7.2, 1 mmol · L⁻¹ EDTA, 7% SDS, 1% BSA)和 65℃ 条件下进行预杂交和杂交，用高严紧的 SSC 溶液洗杂交膜(2 × SSC, 0.5% SDS, 1 × SSC, 0.5% SDS)后，进行放射自显影，-80℃ 曝光 3 d。

2 结果及分析

2.1 扩张蛋白在早稻根的免疫定位

由根系横切结构看出：主根 0—5 mm 区段(图 1

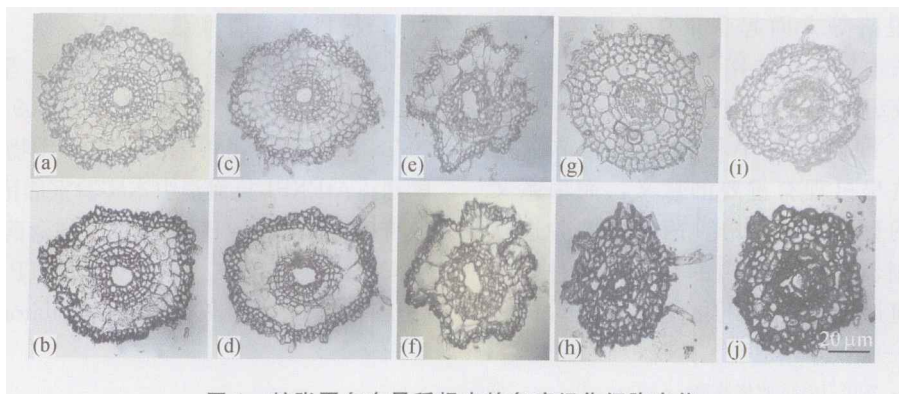


图 1 扩张蛋白在早稻根中的免疫组化细胞定位

(a) 和 (b) 主根 0—5 mm 的区段；(c) 和 (d) 主根 5—10 mm 的区段；(e) 和 (f) 主根 10—15 mm 的区段；(g) 和 (h) 侧根 0—5 mm 区段；(i) 和 (j) 不定根 0—5 mm 区段上行用未免疫的兔血清处理，作为对照；下行用免疫的抗 AtEXP1 的兔血清处理(所有图片均为横切图片，厚度为 10 μ m)

(a)和(b))已接近主根伸长区末端,主根5—10mm区段(图1(c)和(d))已到根毛区,主根10—15mm区段(图1(e)和(f))已到更上端的成熟区.蓝紫色呈色部位即为扩张蛋白表达的部位.

免疫结果表明,扩张蛋白在主根0—5mm及5—10mm区段的表皮细胞,外皮层细胞的细胞壁有大量表达;在内皮层细胞,围绕中柱鞘的细胞,及韧皮部和木质部细胞的细胞壁也有表达;而在主根0—5mm及5—10mm区段皮层薄壁细胞的细胞壁均没有表达.5—10mm区段的表达量相对于0—5mm区段的表达量小;在10—15mm区段,只有主根表皮细胞和外皮层细胞有表达,在其他结构中均没有表达.不同于主根,扩张蛋白在侧根和不定根的整个横切结构均有大量表达(图1).

2.2 扩张蛋白对早稻幼根生长发育的作用

本实验对两个发育阶段的幼根进行了抗体处理,即没有长出侧根、不定根,主根长到约2cm长的幼根和刚长出侧根、不定根的幼根.用1:50比

例稀释的AtEXP1抗血清处理两种根系后,密切观察了根系的生长发育变化.

考虑到未免疫的兔血清会对根系的生长有一定影响,从而会对实验结果造成一定影响,所以本实验设了两个对照:水处理和未免疫的兔血清处理两种.将主根长2cm的毫格劳稻苗置于各种处理液中,在25℃组培室放置10h,后恢复到处理前生长条件,即在湿润滤纸上继续培养,2.5d后记录结果.由图2看出:早稻毫格劳根系经免疫的兔血清处理后,侧根、不定根的生长从根的数目和长度上均受到了抑制,说明AtEXP1抗体抑制了侧根、不定根的生长.同样对刚长出侧根和不定根的根系进行扩张蛋白抗体处理,处理时间为12h,后恢复为处理前条件,4d后观察结果.该结果(图3)显示了与图2相似的结果:AtEXP1抗体在一定程度上抑制了侧根、不定根的生长.以上结果说明扩张蛋白对侧根、不定根的生长有一定促进作用.

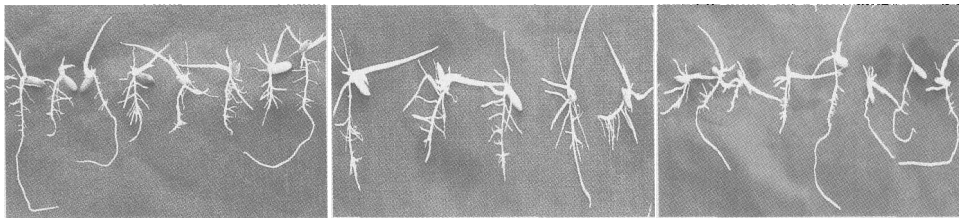


图2 扩张蛋白对未长出侧根、不定根时期早稻幼根的作用

左为未长出侧根、不定根的稻根(对照1);中为在1:50比例水稀释的未免疫兔血清中生长的稻根(对照2);右为在1:50比例水稀释的免疫兔血清中生长的稻根(处理组)

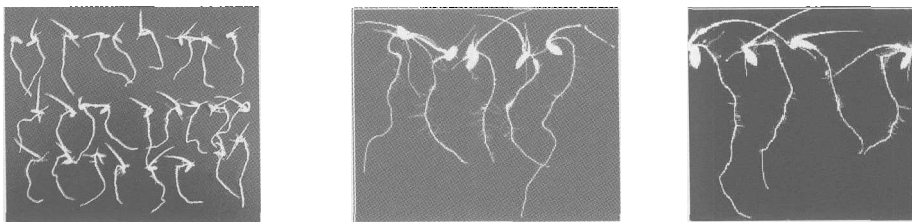


图3 扩张蛋白对已长出侧根、不定根时期早稻幼根的作用

左为处理前的带有侧根、不定根的幼根;中为继续在水里生长的稻根(对照1);右为在1:50比例水稀释免疫兔血清中生长的稻根

2.3 早稻根 OsEXP3 基因的表达

首先以早稻根总RNA反转录产物cDNA为模板,扩增270bp OsEXP3基因特异性片段即部分

3'-UTR序列,并测序鉴定.测序结果表明 OsEXP3 3'-UTR部分序列与原序列完全一致,表明我们克隆的基因片段是我们需要的目的片段,且表明该基因在

早稻根中是表达的。我们以此片段作为 Northern 杂交的探针模板。

图 4 显示, 将生长 3 d 的稻苗干旱胁迫 1 h, *OsEXP3* 基因的表达量较对照明显增加, 且 4 种稻

作呈现出相似的结果, 说明该基因的表达受到干旱的诱导。干旱胁迫后再复水表达量又基本回复到对照水平, 这说明该蛋白对稻苗在干旱胁迫条件下的正常生长起着重要的作用。

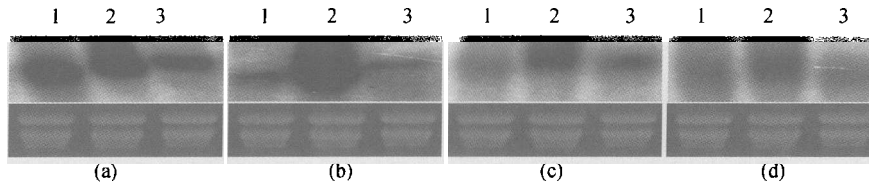


图 4 4 种早稻 *OsEXP3* 基因在干旱胁迫及复水后的 mRNA 表达分析

(a) IRAT109; (b) 毫格劳; (c) 早稻 297; (d) 早稻 2 号. 1. 3 d 苗的根(对照); 2. 干旱 1 h; 3. 干旱 1 h 后又复水 2 h

图 5 为 *OsEXP3* 基因的 Northern 杂交分析图。由于 4 种早稻总 RNA 上样量不太一致, 使得 *OsEXP3* 基因在 4 种早稻的表达差异难以判断。为了避免判断上的误差, 我们通过 AlphaImager 2200 凝胶分析仪对总 RNA 和 mRNA 作了进一步量化分析 (图 6)。由两图我们可以看出, 在抗旱性最强的早稻 IRAT109 和毫格劳根中 mRNA 表达量最大, 在抗旱性较差的早稻 297 根中 mRNA 表达量较少, 在抗旱性最差的早稻 2 号根中 mRNA 表达量最少, 进一步说明 *OsEXP3* 参与了早稻抗旱性的调控作用。

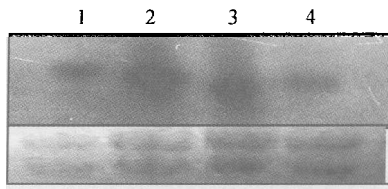


图 5 *OsEXP3* 基因在 4 种早稻 3 d 苗根中的表达分析

1. 早稻 IRAT109; 2. 早稻毫格劳; 3. 早稻 297; 4. 早稻 2 号

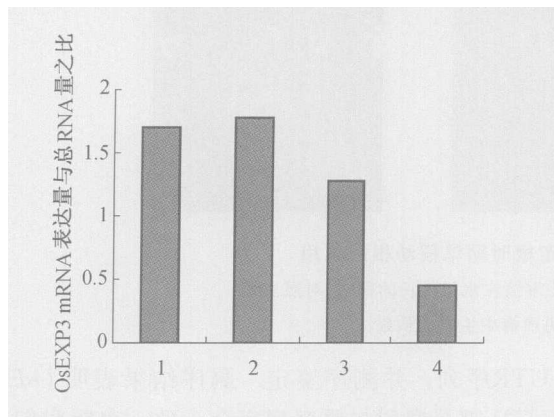


图 6 对 *OsEXP3* 基因在 4 种早稻 3 d 苗根中 mRNA 表达的量化分析 (对图 5 的量化分析)

1. 早稻 IRAT109; 2. 早稻毫格劳; 3. 早稻 297; 4. 早稻 2 号

3 讨论

扩张蛋白是多基因家族编码蛋白, 而且每一个扩张蛋白基因通常在高度特定的位点和高度特定的细胞类型中表达^[4]。Lee 等克隆了在大豆根中特异表达的基因 *GmEXP1*, 通过 Northern 杂交和原位杂交表明它在根快速延长的区段, 即根尖表达量很大, 而在根延长停止的区段, 即根的成熟区表达量很少, 说明扩张蛋白与根的生长过程密切相关^[6]。Cho 等报道, 水稻扩张蛋白主要在初生根的根尖表达, 并集中在在表皮, 正在分化的维管柱及围绕中柱鞘的细胞; 正在分化的侧根原基和不定根原基也有表达^[8]。本实验采用蛋白免疫组化定位技术对扩张蛋白在早稻根的表达部位作了研究, 结果表明扩张蛋白在主根伸长区段的表皮和外皮层有大量表达, 在内皮层、围绕中柱鞘的细胞及维管组织也有表达, 而在皮层薄壁细胞没有表达; 在主根根毛区段的表达量较伸长区段的表达量减少; 而在主根完全成熟区段只在表皮和外皮层有少量表达。这与 Lee 和 Cho 的结果相一致。根的生长必然涉及根表皮细胞的细胞壁结构变化, 而扩张蛋白大量表达在主根伸长区的表皮细胞, 这与扩张蛋白促进细胞壁松弛增大的功能相吻合, 也进一步说明其对根生长的作用; 次生根由初生根成熟区的中柱鞘细胞发育而来^[9], 本研究表明扩张蛋白在中柱鞘细胞有表达。Cho 等研究表明正在分化的侧根原基和不定根原基有扩张蛋白表达, 这些结果表明扩张蛋白在中柱鞘细胞的表达似乎是为次生根的发育奠定生理基础。而维管组织细胞是细胞壁较特殊的细胞, 其细胞壁

较厚, 扩张蛋白在此表达可能有助于细胞壁的松弛增大.

本实验对扩张蛋白在侧根和不定根的表达部位作了鉴定, 结果发现扩张蛋白表达于整个侧根和不定根的细胞结构, 这暗示了扩张蛋白对侧根、不定根生长发育的重要性. 由于扩张蛋白是细胞壁蛋白, 如果用扩张蛋白的抗体处理正在生长发育的幼根, 可能会对扩张蛋白功能起到短期的抑制作用, 进而可以进一步鉴定扩张蛋白对根系生长发育的作用, 为扩张蛋白在干旱胁迫条件下对早稻根系生长发育的可能作用机制提供一些理论线索. 因此我们利用 AtEXP1 抗体对扩张蛋白在根系生长发育进程中的作用进行了探讨, 结果也表明扩张蛋白对侧根、不定根生长发育的促进作用.

我们对 *OsEXP3* 基因的 Northern 杂交分析表明, 早稻 *OsEXP3* 基因的表达受到干旱胁迫诱导, 而干旱后再复水, 表达量又回降到对照水平, 且在 4 种抗旱性不同的早稻表达量不同, 即在抗旱性强的早稻中表达量多, 而在抗旱性相对差的早稻中表达量少. 由这些结果我们推测 *OsEXP3* 基因参与了早稻抗旱性的调控作用, 蛋白免疫结果提示 *OsEXP3* 基因很可能是通过促进侧根、不定根的生长发育来提高早稻的抗旱性.

参 考 文 献

- 1 Cosgrove D J. Loosening of plant cell walls by expansins. *Nature*, 2000, 407: 321—326
- 2 Cosgrove D J. Expansive growth of plant cell walls. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2000, 38(1—2): 109—124
- 3 Cosgrove D J. New genes and new biological roles for expansins. *Current Opinion Plant Biology*, 2000, 3(1): 73—78
- 4 Woo C J, Thorne E T, Sharp R E, et al. Modification of expansin transcript levels in the maize primary root at low water potentials. *Plant Physiology*, 2001, 126: 1471—1479
- 5 Li Y, Darley C P, Ongaro V, et al. Plant expansins are a complex multigene family with an ancient evolutionary origin. *Plant Physiology*, 2002, 128: 854—864
- 6 Lee D K, Ahn J H, Song S K, et al. Expression of an expansin gene is correlated with root elongation in soybean. *Plant Physiology*, 2003, 131: 985—997
- 7 Mrttila S, Tenhola T, Mikkonen A. A barley (*Hordeum vulgare*) protein, HVA, is abundant in protein storage vacuoles. *Planta*, 1996, 199 (3): 602—611
- 8 Cho H T, Kende H. Tissue localization of expansins in deepwater rice. *Plant Journal*, 1998, 15: 805—812
- 9 Malamy J E, Benfey P N. Organization and cell differentiation in lateral roots of *Arabidopsis thaliana*. *Development*, 1997, 124: 33—44