

百脉根小 GTPase 激活蛋白的鉴定及突变体分离

黄蓓 周思瑜 李荣 张忠明

华中农业大学生命科学技术学院/农业微生物学国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 以豆科植物百脉根为材料, 利用蛋白质相互作用技术、基因表达分析和突变体表型观察研究了小 GTPase 激活蛋白 RacGAP1 和 RacGAP3 在侧根及根瘤发育中的功能。结果表明: 百脉根小 GTPase 激活蛋白 RacGAP1 和 RacGAP3 能与 ROP6^{CA} 相互作用, RacGAP1 和 RacGAP3 基因主要在根微管组织中表达, 在接种根瘤菌后呈下调表达趋势。RacGAP1 在侧根及根瘤原基中无表达; RacGAP3 则能在侧根及根瘤基部表达。RacGAP1 和 RacGAP3 的 LORE1 插入突变体表型观察显示, 纯合突变体与 Gifu 野生型共生表型无明显差异, 但 RacGAP1 突变体植株开花后, 花朵枯萎掉落不结荚, 而杂合体与野生型无差异, 表明 RacGAP1 可能参与调控花粉发育过程, 而 RacGAP3 在早期共生过程中可能起负调控作用。

关键词 百脉根; 小 GTP 酶激活蛋白; 早期共生阶段; 结瘤

中图分类号 Q 939.9 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2017)02-0053-06

在高等动、植物中存在着大量的小 G 蛋白(一般分子质量在 20~40 ku 之间), 具有 GTPase 酶活性, 几乎参与和调节细胞的所有生命活动。在植物中存在一类特殊的小 G 蛋白 ROP(Rho-related GTPase of plants)并参与调控细胞极性、生长和形态发育, 植物与微生物互作、细胞骨架和囊泡运输等^[1-3]。ROP 在水解 GTP 的过程中分为结合 GTP 和 GDP 2 种状态, 通过氨基酸关键位点突变可使 ROP 锁定在激活(constitutively active, CA)或者失活(dominant negative, DN)状态^[4]。RopGAPs 或称 RacGAPs(GTPase activating proteins), 是一类小 GTPase 激活蛋白, 特异地与 ROP 绑定 GTP 形式结合并增强其水解活性^[5]。在拟南芥和烟草中, RopGAPs 参与植物适应缺氧胁迫和花粉管的顶端生长等^[6-7]。其中拟南芥中的 RopGAP4 在缺氧胁迫反应机制中起着类似可变电阻的作用, 与 ROP 形成了一个负反馈调控循环, 调控着细胞内 H₂O₂ 含量的动态平衡^[8]; RopGAP2 在空间上限制花粉管顶端 ROP 的信号, 从而影响花粉管的极性生长^[9]。在豆科植物百脉根(*Lotus japonicus*)中发现一些根瘤特异表达的小 GTPase^[10]。在蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)中, 接种根瘤菌后

MtROP3、*MtROP5* 和 *MtROP6* 表达量上调, 而 *MtROP8* 表达量剧烈下降^[11], 而 *MtROP10* 是根毛极性生长和根瘤菌诱导根毛变形所必需的, 同时控制着根瘤菌入侵^[12]。前期研究发现, 百脉根 ROP6 能与结瘤因子受体 NFR5 相互作用, 参与调控根瘤菌侵染和根瘤发育^[13], 同时参与调控网格蛋白囊泡的形成并介导结瘤因子受体复合物的内吞作用^[14]。然而小 G 蛋白作为分子开关, 与其对应的 Rop-GAP、RopGEF 和 RhoGDI 作为一个调控体系共同发挥功能。本研究通过百脉根数据库比对, 鉴定出 3 个 ROP6 激活蛋白基因, 分别命名为 *RacGAP1*、*RacGAP2*(另文发表)、*RacGAP3*; 利用 Pull-down、组织化学染色、时空表达分析、突变体鉴定及表型观察研究 *RacGAP1* 和 *RacGAP3* 在侧根及根瘤发育中的功能, 为确定植物与根瘤菌之间的相互作用奠定研究基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

百脉根 *Lotus japonicus* Gifu 种子来自华中农业大学农业微生物学国家重点实验室。根瘤菌 *Mesorhizobium loti* MAFF303099 及 *M. loti* MAFF303099/

收稿日期: 2016-05-13

基金项目: 国家自然科学基金项目(31370278); 国家重点基础研究发展计划“973”项目(2010C126502)

黄蓓, 硕士研究生, 研究方向: 豆科植物与根瘤菌共生固氮。E-mail: 913275535@qq.com

通信作者: 张忠明, 教授, 研究方向: 共生固氮。E-mail: zmzhang@mail.hzau.edu.cn

pHC60 由中国科学院华南植物园吴国江研究员馈赠, 于-80℃超低温冰箱保存备用。百脉根 LORE1 插入突变体株系 P2153 和 30050134 来自于百脉根逆转录转座子 LORE1 插入突变体库(<http://www.kazusa.or.jp/lotus/LORE1/index.html>)。

1.2 试验方法

1) 体外 Pull-down。具体方法参照文献[16-17]。将 ROP6^{CA} 和 GAPs 分别构建于原核表达载体 pET28a 和 pGEX-4T-1 上, 经过在大肠杆菌中原核表达、提取、纯化蛋白等过程, 得到纯化的带 His 标签的 ROP6^{CA} 和带 GST 标签的 GAPs。将纯化好的带 His 标签的 ROP6^{CA} 蛋白和带有 GST 标签的 GAPs 蛋白置于 GST 柱内与冰上孵育。1~2 h 后用清洗缓冲液充分清洗, 取不同洗脱次数的样品跑 SDS-PAGE 胶分离结合在树脂上的蛋白, 转膜, 用抗 His 标签的抗体通过 Western blot 检测分离的蛋白。

2) 组织化学染色试验。通过百脉根数据库(<http://www.kazusa.or.jp/lotus/index.html>) 比对分别获得 2 个 *RacGAPs* 基因起始密码子上游 3 kb 启动子序列, 构建到 DX2181G 载体上, 得到重组质粒 *RacGAP1Pro*::GUS, *RacGAP3Pro*::GUS。然后通过农杆菌介导的毛根转化得到阳性植株, 种植到体积比为 1:1 的蛭石与珍珠岩基质中, 接种带有绿色荧光标记的根瘤菌 MAFF303099/pHC60, 分别取接种后不同时期的根染色观察。

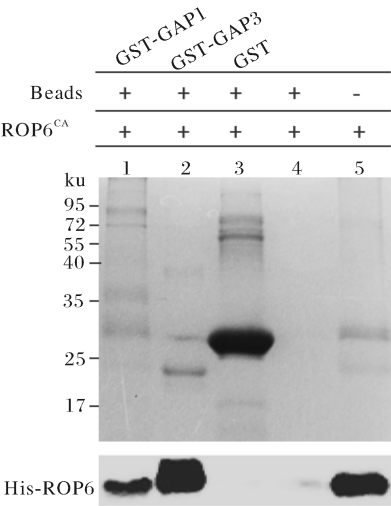
3) 时空表达分析。使百脉根 *Gifu* 的种子萌发并盆栽培育, 具体方法参照文献[13]。待第 1 片真叶长出后接种根瘤菌 *M. loti* MAFF303099, 收取接种后不同时间的根并采用 Trizol(Invitrogen) 法抽提总 RNA。实时荧光定量 RT-PCR 用的是 One-step SYBR Prime Script RT reagent Kit(Takara) 试剂盒, 以及 Roche Light Cycler apparatus 荧光定量 PCR 仪, 定量方法采用相对定量法。

4) 突变体鉴定。采用 PCR 的方法进行鉴定, 取插入位点上下游各 1 kb 的侧翼序列, 选择特异性高的区域分别设计上游引物 F 和下游引物 R, LORE1 内部已有设计好的特异性引物 P2。取 3 片幼嫩叶片用 CTAB 法抽提基因组, 分别用 F 与 R 引物、F 与 P2 引物进行 PCR。百脉根是二倍体, 若 F 与 R、F 与 P2 均有条带则植株为杂合体, 若只有 F 与 P2 有条带则植株为纯合体, 若只有 F 与 R 有条带则植株为野生型。

2 结果与分析

2.1 RacGAPs 与 ROP6^{CA} 蛋白在体外的相互作用

为了证实百脉根 RacGAPs 是否与 ROP6^{CA} 相互作用, 分别在大肠杆菌中表达和纯化 GST-GAP1、GST-GAP3 和 His-ROP6^{CA} 融合蛋白, 在体外进行 Pull-down 及 Western blot 检测。结果表明: RacGAP1 和 RacGAP3 都能与 ROP6^{CA} 相互作用(图 1), 与前期酵母双杂交结果一致^[15], 说明百脉根 RacGAP1 和 RacGAP3 都具有激活小 G 蛋白 ROP6 的功能。



RacGAPs 和 ROP6 的体外蛋白相互作用。被 GST 柱拉下来的蛋白质通过 SDS-PAGE 胶分离(A), 用 HRP 偶联的抗 His 的抗体进行免疫印迹(B)。1. GST-Beads-GAP1 结合 His-ROP6^{CA} 蛋白; 2. GST-Beads-GAP3 结合 His-ROP6^{CA} 蛋白; 3. GST-Beads-GST 结合 His-ROP6^{CA} 蛋白; 4. Beads 结合 His-ROP6^{CA} 蛋白; 5. His-ROP6^{CA} 蛋白。In vitro protein-protein interaction assay between RacGAPs and ROP6. Proteins pull-down by GST-Beads were separated on SDS-PAGE (A) and immunoblotted with HRP-conjugated anti-His antibody (B). 1. GST-Beads-GAP1 plus His-ROP6^{CA} protein; 2. GST-Beads-GAP3 plus His-ROP6^{CA} protein; 3. GST-Beads-GST plus His-ROP6^{CA} protein; 4. Beads plus His-ROP6^{CA} protein; 5. His-ROP6^{CA} protein.

图 1 RacGAP1、RacGAP3 与 ROP6^{CA} 体外蛋白相互作用

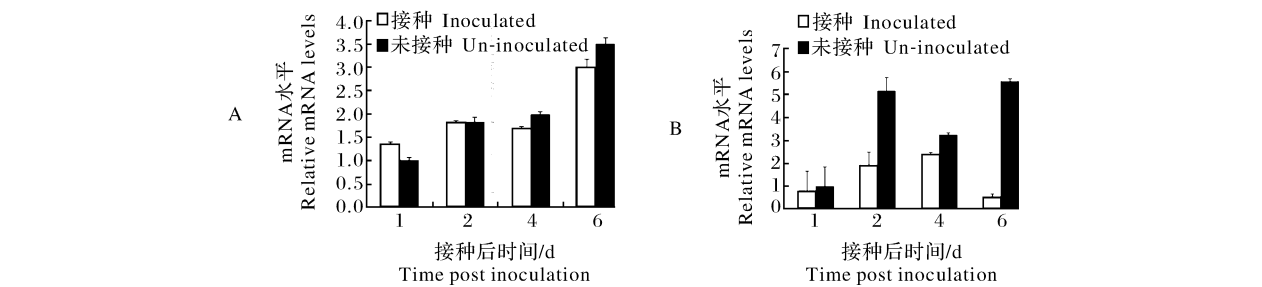
Fig.1 Interaction of RacGAP1 and RacGAP3 with ROP6^{CA} in vitro

2.2 实时荧光定量 PCR 检测 RacGAPs 基因的表达

为了研究 *RacGAP1* 和 *RacGAP3* 基因是否参与百脉根与根瘤菌的共生过程, 利用实时荧光定量 PCR 检测它们在不同时间段接种和不接种根瘤菌

条件下, *RacGAP1* 和 *RacGAP3* 基因在根中的表达水平。结果显示: 6 d 之内接种和不接种根瘤菌 *RacGAP1* 基因表达没有差异(图 2A); 接种 2 d

RacGAP3 基因受到抑制, 接种 6 d 抑制效果更加明显(图 2B)。表明 *RacGAP3* 基因在早期共生过程中可能起负调控作用。



RacGAP1(A)和 *RacGAP3*(B)接种 *M. loti* 根瘤菌前后的表达水平, *ATPase* 作为内参对照。The expression patterns of *RacGAP1* (A) and *RacGAP3*(B) were investigated by quantitative RT-PCR before and after *M. loti* inoculation. *ATPase* was used as an internal control.

图 2 *RacGAP1* 和 *RacGAP3* 基因在接种后根中的表达

Fig.2 Expression of *RacGAP1* and *RacGAP3* in roots after rhizobial infection

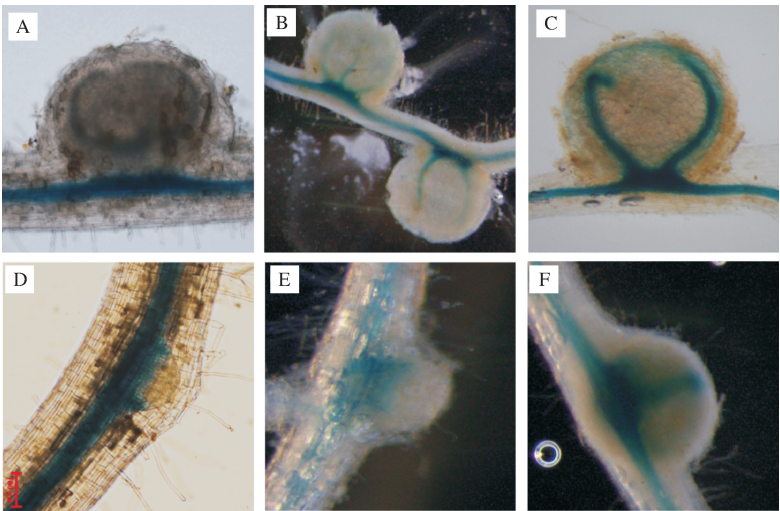
2.3 *RacGAPs* 基因在根瘤中的表达

前期在百脉根中发现 ROP6 能与结瘤因子受体 NFR5 和网格蛋白重链 CHC 相互作用并介导网格蛋白囊泡的形成^[13-14]。由于 ROP6^{CA} 与 *RacGAP1*、*RacGAP3* 都有相互作用, 本研究分别从百脉根基因组中克隆出 *RacGAP1* 和 *RacGAP3* 基因起始密码子上游 3 kb 的启动子序列, 与报告基因 *GUS* 构建转录融合子, 并通过毛根转化到百脉根中。利用组织化学染色方法检测 *RacGAPs* 基因在结瘤过程中的表达。结果显示: *RacGAP1* 和 *Rac-*

GAP3 主要在根柱鞘中表达, 其中 *RacGAP1* 在根瘤原基和早期根瘤中均无表达, 在成熟根瘤中则在维管束中表达(图 3A、B、C); 而 *RacGAP3* 在根瘤原基的基部表达, 其表达随着根瘤的发育而向维管束集中(图 3D、E、F)。

2.4 *RacGAPs* 基因在根毛和侧根原基中的表达

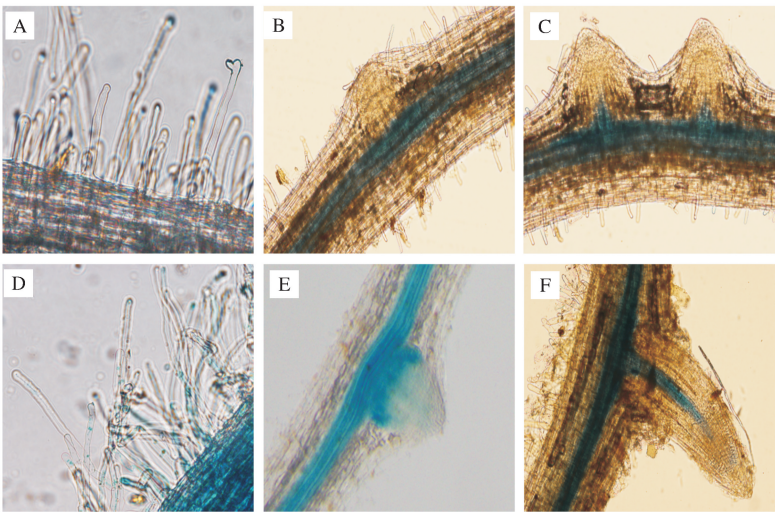
利用组织化学染色方法检测 *RacGAPs* 基因在接种前期的表达情况。结果显示: *RacGAP1* 在根毛中连续线状表达(图 4A), 在侧根原基形成初期不表达, 完全形成后在中柱基部表达(图 4B、C); 而



构建 *RacGAP1Pro*:: *GUS*/*RacGAP3Pro*:: *GUS* 克隆子, 包含 1 个 3 kb 的 *RacGAP1*/*RacGAP3* 基因启动子融合 *GUS* 编码区; 通过 *GUS* 染色检测转化的毛根中 *RacGAPsPro*:: *GUS* 的表达; A、B、C: *RacGAP1*; D、E、F: *RacGAP3*。Constructing *RacGAP1Pro*:: *GUS*/*RacGAP3Pro*:: *GUS* contained a 3 kb *RacGAP1*/*RacGAP3* gene promoter fused to the *GUS* coding region. Transgenic hairy roots expressing *RacGAPsPro*:: *GUS* were stained for *GUS* reporter activity. A、B、C: *RacGAP1*; D、E、F: *RacGAP3*.

图 3 *RacGAP1* 和 *RacGAP3* 基因在根瘤中的表达检测

Fig.3 Expression detection of *RacGAP1* and *RacGAP3* genes in root nodules



构建 *RacGAP1Pro* :: GUS/*RacGAP3Pro* :: GUS 克隆子, 包含 1 个 3 kb 的 *RacGAP1/RacGAP3* 基因启动子融合 GUS 编码区; 通过 GUS 染色检测转化的毛根中 *RacGAPsPro* :: GUS 的表达; A、B、C: *RacGAP1*; D、E、F: *RacGAP3*。Constructing *RacGAP1Pro* :: GUS/*RacGAP3Pro* :: GUS contained a 3 kb *RacGAP1/RacGAP3* gene promoter fused to the GUS coding region. Transgenic hairy roots expressing *RacGAPsPro* :: GUS were stained for GUS reporter activity. A、B、C: *RacGAP1*; D、E、F: *RacGAP3*.

图 4 *RacGAPs* 基因在根毛和侧根原基中表达

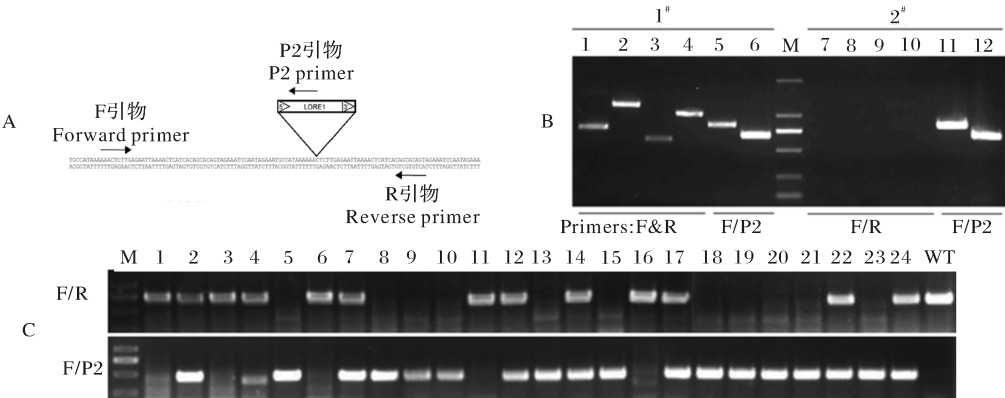
Fig.4 Expression of *RacGAPs* in root hair and lateral root primordia

RacGAP3 在根毛中点状表达(图 4D), 在侧根原基中有明显表达; *RacGAP3* 从中柱鞘分裂形成突起开始表达于侧根基部(图 4E), 随着侧根原基的发育和成熟, 其于侧根中柱中表达(图 4F)。表明 *RacGAP3* 基因可能参与侧根的形成和发育。

2.5 *RacGAPs* 基因 LORE1 插入突变体的分离与鉴定

利用 *RacGAP1* 和 *RacGAP3* 基因组序列, 在

百脉根逆转录转座子 LORE1 插入突变体库中对比出 P2153(*RacGAP1*) 和 30050134(*RacGAP3*) 2 个突变体, 其中 P2153 的插入位点在 *RacGAP1* 基因的第 1 个外显子中; 30050134 插入在 *RacGAP3* 基因第 1 个外显子 260 bp 处, 插入位点示意图见图 5A。为了确保鉴定的准确性, 在 *RacGAP1* 基因中设计了 4 条引物: F1、F2、R3、R4。通过 F1/R3、F1/R4、F2/R3、F2/R4 四种组合, 以及 F1、P2、F2、P2



A. 鉴定所用引物位置; B. *RacGAP1* 突变体的 PCR 鉴定, 1[#] 是杂合体, 2[#] 是纯合体; C. *RacGAP3* 突变体的 PCR 鉴定, 泳道 5、8、9、10、13、15、18、19、20、21、23 是纯合体, 泳道 2、4、7、12、14、17、22、24 是杂合体, 泳道 1、3、6、11、16 是野生型; WT: 野生型对照; M: DL2000 marker。A. Position of primers for identification; B. Identification of *RacGAP1* mutant by PCR; 1[#] was heterozygote and 2[#] was homozygote; C. Identification of *RacGAP3* mutant by PCR; Line 5, 8, 9, 10, 13, 15, 18, 19, 20, 21 and 23 were homozygotes; Line 2, 4, 7, 12, 14, 17, 22 and 24 were heterozygotes and line 1, 3, 6, 11, 16 were wild type; WT: Wild type as control; M: DL2000 marker.

图 5 *RacGAPs* 突变体的鉴定

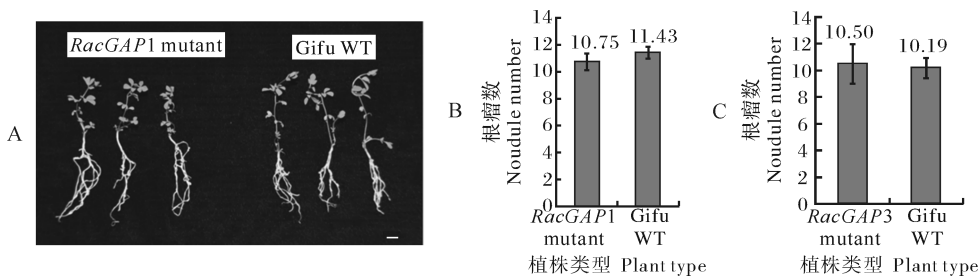
Fig.5 Identification of *RacGAPs* mutant

两种组合,从 P2153 突变体中鉴定出 1 株杂合体 (1[#])和 1 株纯合体 (2[#])植株(图 5B)。在 *RacGAP3* 基因中设计了 1 对引物,利用 F/R 和 F/P2 两对引物组合,从 24 株 30050134 突变体中鉴定出 11 株纯合体、8 株杂合体和 5 株野生型植株(图 5C)。

2.6 *RacGAPs* 突变体表型观察及分析

通过盆栽结瘤试验,观察突变体植株的共生表型。当接种根瘤菌后 5~7 d,突变体与野生型植株相比,根瘤菌入侵根毛、侵入线和根瘤原基形成都没

有明显变化(结果未显示)。当接种根瘤菌后 21 d,突变体植株的长势、株高、根长、侧根数等与野生型都没有差异(图 6A),根瘤发育状态、结瘤数与野生型相比也没有显著性差异(图 6B、C)。然而,通过对 *RacGAP1* M1 代纯合体和杂合体植株生长过程的观察,发现在相同条件下,纯合体植株开花后,花朵枯萎掉落不结荚;而杂合体植株则结荚率达 90% 以上,果荚发育壮实,种子饱满,与野生型植株无异。表明 *RacGAP1* 可能与植物种子育性和发育相关。



A.*RacGAP1* 和野生型的表型(标尺为 1 cm); B.*RacGAP1* 和野生型接种 *M. loti* 根瘤菌 3 周后的结瘤数; C.*RacGAP3* 和野生型接种 *M. loti* 根瘤菌 3 周后的结瘤数。A.Phenotype of *RacGAP1* mutant and wild type(Scale bars is 1 cm); B.The number of nodules were collected 3 weeks after *M. loti* inoculation and there was no significant difference between *RacGAP1* mutant and wild type; C.The number of nodules were collected 3 weeks after *M. loti* inoculation and there was no significant difference between *RacGAP3* mutant and wild type.

图 6 *RacGAPs* 突变体的结瘤表型
Fig.6 Nodulation phenotypes of *RacGAPs* mutant

3 讨 论

ROP 作为植物中唯一的小 G 蛋白类胞外信号分子调控多种生理过程,包括调控豆科植物中根瘤的发育。而 RopGAPs 作为 ROP 的激活蛋白,其功能也是多种多样的,在花粉管生长、缺氧胁迫反应、植物与微生物互作等方面都担任着重要角色。本研究证实 ROP6^{CA} 与 *RacGAP1* 和 *RacGAP3* 在体外有相互作用,该结果与前期酵母双杂交研究结果一致^[15],说明百脉根 *RacGAP1* 和 *RacGAP3* 都具有激活小 G 蛋白 ROP6 的功能。组织化学染色、时空表达分析结果显示 *RacGAP1* 和 *RacGAP3* 基因主要在根微管组织中表达,*RacGAP1* 在侧根及根瘤原基中均无表达;而 *RacGAP3* 则能在侧根及根瘤基部表达,在接种根瘤菌后呈下调表达趋势。结合 *RacGAP3* 突变体表型与野生型无显著差异,猜测可能是 *RacGAPs* 之间存在基因冗余现象,当 1 个 *RacGAP* 突变后,其他 *RacGAPs* 会发挥类似功能。*RacGAP1* 纯合突变体植株开花后,花朵枯萎掉落

不结荚,而杂合突变体与野生型无异,该现象暗示着 *RacGAP1* 可能影响植物生殖和育性;*RacGAP1* 可能参与调控花粉发育过程,而 *RacGAP3* 则可能参与调控根分生组织的维持,并在早期共生过程中可能起负调控作用。

参 考 文 献

[1] BLOCH D, LAVY M, EFRAT Y, et al. Ectopic expression of an activated RAC in *Arabidopsis* disrupts membrane cycling [J]. *Mol Biol Cell*, 2005, 16: 1913-1927.
[2] BERKEN A. ROPs in the spotlight of plant signal transduction [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2006, 63: 2446-2459.
[3] GU Y, WANG Z, YANG Z T, et al. A RHOse by any other name: a comparative analysis of animal and plant Rho GTPases [J]. *Cell Res*, 2006, 16: 435-445.
[4] VETTER I R, WITTINGHOFER A. The guanine nucleotide-binding switch in three dimensions [J]. *Science*, 2001, 294: 1299-1304.
[5] BAKER M J, PAN D, WELCH H C. Small GTPases and their guanine-nucleotide exchange factors and GTPase-activating

proteins in neutrophil recruitment[J]. Current opinion in hematology,2016,23: 44-54.

[6] FU Y,LI H,YANG Z B. The ROP2 GTPase controls the formation of cortical fine F-actin and the early phase of directional cell expansion during *Arabidopsis* organogenesis [J]. Plant cell,2001,14: 777-794.

[7] KLAHRE U,KOST B. Tobacco RhoGTPase activating protein 1 spatially restricts signaling of RAC/Rop to the apex of pollen tubes[J]. Plant cell,2006,18: 3033-3046.

[8] BAXTER-BURRELL A, YANG Z B, SPRINGER P S, et al. RopGAP4-dependent Rop GTPase rheostat control of *Arabidopsis* oxygen deprivation tolerance[J]. Science, 2002, 296: 2026-2028.

[9] HWANG J U,VERNOUD V,SZUMLANSKI A, et al. A tip-localized RhoGAP controls cell polarity by globally inhibiting Rho GTPase at the cell apex[J]. Curr Biol, 2008, 18: 1907-1916.

[10] YUKSEL B, MEMON A R. Legume small GTPases and their role in the establishment of symbiotic associations with Rhizobium spp[J]. Plant signaling & behavior, 2009, 4(4): 257-260.

[11] LIU W, CHEN A, LUO L, et al. Characterization and expression analysis of *Medicago truncatula* ROP GTPase family during the early stage of symbiosis[J]. J Integr Plant Biol, 2010, 52: 639-652.

[12] LEI M J, WANG Q, LI X L, et al. The small GTPase ROP10 of *Medicago truncatula* is required for both tip growth of root hairs and nod factor-induced root hair deformation[J]. Plant cell, 2015, 27(3): 806-822.

[13] KE D, FANG Q, CHEN C, et al. The small GTPase ROP6 interacts with NFR5 and is involved in nodule formation in *Lotus japonicus*[J]. Plant physiology, 2012, 159: 131-143.

[14] WANG C, YU H, LUO L, et al. A nodules with activated defense 1 is required for maintenance of rhizobial endosymbiosis in *Medicago truncatula* [J]. New phytologist, 2016, doi: 10.1111/nph.14017.

[15] 李荣. 百脉根小 GTPase ROP6 激活蛋白 GAP 的分离和鉴定 [D]. 武汉: 华中农业大学, 2013.

[16] ZHU H, CHEN T, ZHU M, et al. A novel ARID DNA-binding protein interacts with SymRK and is expressed during early nodule development in *Lotus japonicus*[J]. Plant physiology, 2008, 148(1): 337-347.

[17] ZHANG Z, QUICK M K, KANELAKIS K C, et al. Characterization of a plant homolog of Hop, a cochaperone of Hsp90[J]. Plant physiology, 2003, 131(2): 525-535.

Characterization of small GTPase activating protein
and isolation of mutant in *Lotus japonicas*

HUANG Bei ZHOU Siyu LI Rong ZHANG Zhongming

College of Life Science & Technology/State Key Laboratory of Agricultural Microbiology ,
Huazhong Agricultural University ,Wuhan 430070, China

Abstract Two genes (*RacGAP1* and *RacGAP3*) in *Lotus japonicus* were identified to explore the function of small GTPase activating protein during symbiotic process. Results of pull-down assay showed that both *RacGAP1* and *RacGAP3* are able to interact with ROP6^{CA}. The result of analyzing transcription showed that *RacGAP1* and *RacGAP3* were expressed mainly in vascular system of roots and down-regulated expressed after being inoculated with *Mesorhizobium loti*. Promoters of the two genes were fused with *GUS* reporter and separately transferred into *L. japonicus* by hair roots transformation. The results showed that *RacGAP3* was expressed in lateral root primordia and nodule primordia, but there was no expression of *RacGAP1* in both primordia. *RacGAP1* and *RacGAP3* LORE1 insertion mutant didn't show any defects about nodulation. However, homozygous plants of *RacGAP1* exhibited severe defects in reproduction with withered flowers and fewer pods in comparison with the wild-type. It is indicated that *RacGAP1* may be involved in flower development and *RacGAP3* may negatively regulate the early symbiotic process in *L. japonicus*.

Keywords *Lotus japonicas*; RacGAPs protein; early symbiotic process; nodulation