

研究报告

Research Report

杂交鹅掌楸胚性能力获得磷酸化蛋白质组探讨

李春映² 殷梓苒² 陈金慧^{1,2} 施季森^{1,2} 甄艳^{1,2*}

1 南京林业大学, 南方现代林业协同创新中心, 南京, 210037; 2 南京林业大学, 林木遗传与生物技术省部共建教育部重点实验室, 南京, 210037

* 通信作者, zhenyan@njfu.edu.cn

摘要 为了探索胚性能力获得过程中的蛋白质磷酸化作用, 本研究利用杂交鹅掌楸未成熟种子诱导的胚性和非胚性愈伤组织为材料, 通过2-DE技术分离蛋白质, Pro-Q磷酸化蛋白质染色, 软件Imagemaster 6.0来检测蛋白质的差异表达。利用质谱鉴定得到了41个差异表达蛋白质。这些蛋白质参与愈伤组织胚性能力的获得, 如eukaryotic release factor1影响着细胞的伸长和径向细胞分裂, EF-hand域蛋白有助于胚性干细胞分裂和维持, Ca²⁺离子信号结合蛋白、Sec14p类磷酸酰肌醇转运家族蛋白参与细胞极性和器官形态建成, Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 调控基因的转录激活及染色质重塑因子介导胚形态建成和器官发生等, 为体胚发生过程中体细胞胚性能力获得提供科学依据。

关键词 杂交鹅掌楸(*Liriodendron hybrid*), 胚性能力, 磷酸化蛋白质组, 质谱

Study on Phosphoproteome in the Acquisition of Embryogenic Ability in *Liriodendron Hybrid*

Li Chunying² Yin Ziyi² Chen Jinhui^{1,2} Shi Jisen^{1,2} Zhen Yan^{1,2*}

1 Co-Innovation Center for Sustainable Forestry in Southern China, Nanjing Forestry University, Nanjing, 210037; 2 Key Laboratory of Forest Genetics & Biotechnology of the Ministry of Education, Nanjing Forestry University, Nanjing, 210037

* Corresponding author, zhenyan@njfu.edu.cn

DOI: 10.13271/j.mpb.018.000001

Abstract In order to study the function of protein phosphorylation molecular in the acquisition of embryogenic ability, the embryogenic and non-embryogenic calli were used as the experimental materials in this study. The proteins were separated by two-dimensional electrophoresis, and stained by Pro-Q. Imagemaster 6.0 was used to detect the differential expression of proteins. The 41 differential proteins were identified by mass spectrometry. These proteins are involved in the acquisition of callus embryogenicity, such as eukaryotic releasing factor 1 affecting cell elongation and radial cell division, EF-hand domain protein contributes to the maintenance of embryonic stem cell division, Ca²⁺ ion signaling protein, the Sec14p-like phosphatidylinositol transport family protein involved in cell polarity and organ morphogenesis, and the transcriptional activation of the RNA polymerase II transcriptional subunit mediator-regulated gene by chromatin remodeling factors mediates embryo morphogenesis and organogenesis, etc.. These provide scientific basis for the acquisition of somatic embryogenic ability during somatic embryogenesis.

Keywords *Liriodendron hybrid*, Embryogenic ability, Phosphoproteome, Mass spectrometry

杂交鹅掌楸(*Liriodendron hybrid*)是中国育种专家 楸(*Liriodendron chinense*)和北美鹅掌楸(*Liriodendron tulipifera*)杂交选育获得的(叶金山和王章荣, 2002, 林

基金项目: 本研究由国家高技术研究发展 863 计划项目(2013AA102705)和江苏省政府优势学科建设项目(PAPD)共同资助

引用格式: Li C.Y., Yin Z.Y., Chen J.H., Shi J.S., and Zhen Y., 2020, Study on phosphoproteome in the acquisition of embryogenic ability in *Liriodendron hybrid*, Fenzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding), 18(1): 1-10 (李春映, 殷梓苒, 陈金慧, 施季森, 甄艳, 2020, 杂交鹅掌楸胚性能力获得磷酸化蛋白质组探讨, 分子植物育种, 18(1): 1-10)

业科学, 38(4): 67-71)。杂交鹅掌楸具有重要的经济和绿化价值, 其生长速度快、耐病虫害, 木材质量好, 树形高大美观。但是杂交鹅掌楸种子生命力弱, 发芽率低, 是濒危树种之一。

体细胞胚胎发生是大规模造林的一种潜在的育种策略。尽管南京林业大学林木育种实验室已经开展了大量的杂交鹅掌楸体胚发生的研究, 并在工厂化生产中取得了重大的进展, 但仍然存在体细胞胚性能力获得频率比较低的问题。因此, 体细胞转变成胚性细胞是体细胞发生的关键。体细胞转变成胚性细胞过程中涉及一些基因的关闭表达, 一些基因的启动表达及细胞激素水平的改变。通常情况下, 体细胞胚胎发生的第一步是去分化, 即培养基上诱导外植体形成愈伤组织。愈伤组织一般分为胚性愈伤组织和非胚性愈伤组织, 胚性愈伤组织具有分化成体胚的能力, 而非胚性愈伤组织则不具有再生能力。虽然关于胚性细胞的生理和结构标记物的研究已有很多研究(Namasivayam et al., 2006), 但这些标记并不存在着广泛性。

蛋白质是生命活动的直接参与者, 蛋白质组学是研究蛋白质表达、功能强有力的工具。目前已有更多关于植物体胚发生研究的蛋白质组学研究(Bian et al., 2010)。玉米胚性愈伤组织和非胚性愈伤组织的差异蛋白质学研究及棕榈胚性能力获得的蛋白质组学研究已鉴定到一些参与胚性潜能获得的蛋白质(Silva et al., 2014)。蛋白质磷酸化是蛋白质翻译后修饰最重要的一种, 参与多种细胞生物过程, 如细胞周期, 凋亡, 代谢, 增殖和发育等。此外, 据预测生物体内在每一时刻所有蛋白质约有三分之一发生磷酸化(Kweon and Andrews, 2013)。因此, 蛋白质磷酸化对植物发育起着重要的作用。本研究利用 Pro-Q 磷酸蛋白特异染色结合串联质谱法分析了胚性愈伤和非胚性愈伤组织磷酸化蛋白质的差异表达。

1 结果与分析

1.1 鹅掌楸胚性愈伤组织和非愈伤组织

未成熟的杂交鹅掌楸种子诱导产生两种愈伤组织(图 1), 其中一种愈伤组织结构紧密, 柔软, 成白色或淡黄色, 具有再生完整植株的能力, 即胚性愈伤组织; 另一种结构疏松, 透明, 水分大, 色泽褐, 不具有再生完整植株的能力, 即非胚性愈伤组织。进一步对两种愈伤组织进行了悬浮培养, 胚性愈伤组织

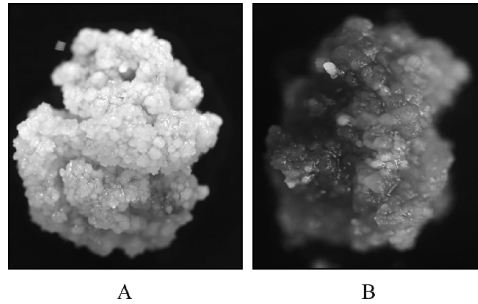


图 1 杂交鹅掌楸胚性与非胚性愈伤组织
注: A: 胚性愈伤组织; B: 非胚性愈伤组织

Figure 1 Embryogenic callus and non-embryogenic callus of *Liriodendron* hybrid

Note: A: Embryogenic callus; B: Non-embryogenic callus

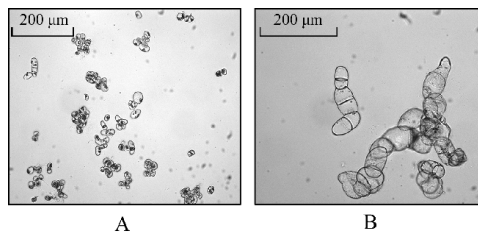


图 2 杂交鹅掌楸胚性愈伤组织和非胚性组织的悬浮培养细胞
注: A: 胚性悬浮细胞; B: 非胚性悬浮细胞

Figure 2 Suspension culture cells of embryogenic callus and non-embryogenic callus of *Liriodendron* hybrid

Note: A: Embryogenic suspension cells; B: Non-embryogenic suspension cells

小, 细胞内填充物饱满, 而非胚性愈伤组织大, 细胞内空洞(图2)。

1.2 磷酸化 Pro-Q 图谱

2-DE 用于分离杂交鹅掌楸胚性愈伤和非胚性愈伤组织的蛋白质, 所获得的双向电泳胶利用 Pro-Q DPS 染色法建立杂交鹅掌楸胚性愈伤和非胚性愈伤组织磷酸化蛋白质图谱。Pro-Q 染色的凝胶采用 Typhoon Trio 扫描, 获得杂交鹅掌楸胚性愈伤和非胚性愈伤组织代表性图谱(图 3)。Typhoon Trio 扫描所获得的图谱利用 Imagemaster 软件分析, 对胚性愈伤组织图谱中出现而非胚性愈伤组织图谱中未出现的蛋白质点, 及与非胚性组织比较胚性愈伤组织中高表达的蛋白质点进行质谱分析。质谱共分析了 70 个蛋白质点, 其中鉴定得到了 41 个蛋白质(图 4)。

杂交鹅掌楸是快速生长的阔叶树, 属于木兰科。杂交鹅掌楸的基因组与蛋白质组的信息相对较少, 在一定程度上限制了蛋白质的鉴定。南京林业大学的施季森教授和陈金慧教授已开展了杂交鹅掌楸的基因组测序计划, 这有利于今后更好地开展杂交鹅

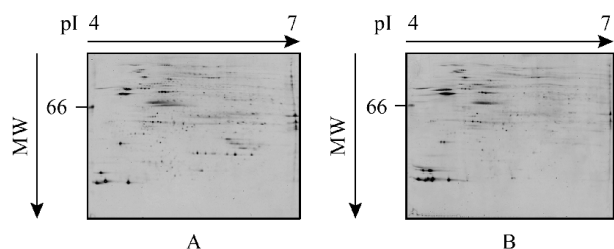


图3 杂交鹅掌楸胚性与非胚性愈伤组织磷酸化 Pro-Q 图谱
注: A: 胚性愈伤组织 Pro-Q 图谱; B: 非胚性愈伤组织 Pro-Q 图谱

Figure 3 Pro-Q map of phosphorylation of embryogenic and non-embryogenic callus *Liriodendron* hybrid

Note: A: Pro-Q map of embryogenic callus; B: Pro-Q map of non-embryogenic callus

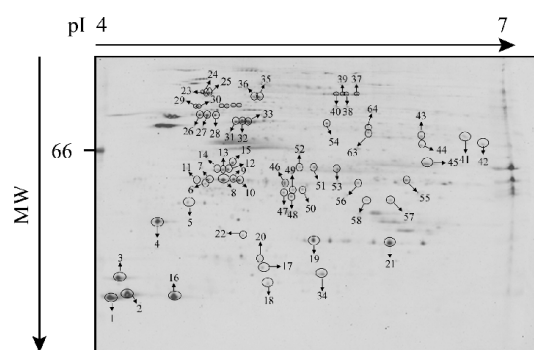


图4 鉴定的鹅掌楸胚性磷酸化蛋白质点

Figure 4 Identification of phosphorylated protein spots of *Liriodendron* hybrid

掌楸蛋白质组学研究。

1.3 磷酸化蛋白质的质谱鉴定分析

质谱鉴定得到 41 个蛋白质点,这些蛋白质在体细胞转变成胚性细胞过程中起着重要的作用(表 1)。本研究对其中部分蛋白质功能进行分析研究。

1.3.1 肽链释放因子

肽链释放因子(Peptide chain release factor 1),一般来说真核释放因子识别终止密码子后结合到核糖体上来促进多肽链和 tRNA 的酯键水解。有的证据表明 eukaryotic release factor1 除了参与翻译终止还有其它的功能,例如 Petsch 等(2005)首次研究拟南芥体内 eukaryotic release factor1 的功能,结果表明其影响着细胞的伸长和径向细胞分裂。Eukaryotic release factor 1-2, eRF1 基因家族的一个成员,其编码的蛋白质位于细胞质和细胞核中,在植物整个发育时期均表达,尤其在幼嫩的组织、根尖、微管组织和保卫细胞中大量表达。Zhou 等(2009)提供了支撑 eRF 1-2 新功能的证据,eRF 1-2 在植物生长和发育

过程中影响着拟南芥对葡萄糖和激素反应。

1.3.2 BTB/POZ domain-containing protein 分析

BTB/POZ 结构域是一种广泛分布于蛋白质 - 蛋白质相互作用的结构基元,并参与不同的生物学过程,包括转录调控,细胞骨架动态、离子通道组装和门控及目标蛋白质的泛素化。多项研究表明 BTB 域通过染色质构型的局部控制来调控基因的表达。激素处理的拟南芥 col-0 愈伤组织中克隆到 BTB cDNA 全长(in NCBI),BTB/TAZ 域蛋白质(BT1~BT5)仅仅发现在陆生植株中,BT1 是短暂存在的蛋白质,26S 蛋白酶降解的目标。此过程可能是 BT1 功能调控反馈调节的一部分。BT2 和 BT3 在雌性配子体和雄性配子体中起着重要的作用。BT2 也调节营养、胁迫和激素等多种反应,是拟南芥信号网络节点的一个关键部分。

1.3.3 氧化还原环境调控胚的发育

本研究中鉴定到氧化还原相关蛋白 glutaredoxin-C8-like、cysteine synthase、S-adenosylmethionine synthase 2-like isoform 1。Glutaredoxin (GRX)是一种调节细胞内氧化还原势的巯基氧化还原酶,与蛋白质翻译后修饰可能是细胞内氧化还原信号的重要机制,尤其是一些重要的蛋白质激酶和转录因子(Wu et al., 2017)。胚在发育过程中形成一套有效的抗氧化系统是胚正常生长发育及胚后生长所必需的。在胚发育过程中抗氧化酶的表达将会清除活性氧来减少细胞的氧化胁迫。体胚发生过程中培养基的氧化还原环境是影响体胚发生的一个重要的相关因子。在裸子植物和被子植物的体胚发生体系中,还原环境是胚起始所需要的,在此环境中细胞将活跃增殖;而氧化环境有益于胚胎发生的完成。白云杉体胚发生过程试验中通过添加外源的还原型 GST 和氧化型 GSST 来优化培养基,结果胚的产量比原来增加两倍,完全成熟的胚由原来的 22%增加到 70% (Belmonte et al., 2005)。通过改变氧化还原状态使得体胚表现为如正常的合子胚那样的形态,且则呈现出较高的成苗率。

本实验室鹅掌楸胚性和非胚性愈伤蛋白质组研究中在胚性愈伤组织中鉴定到肽 - 甲硫氨酸亚砷还原酶(MsrA),MsrA 具有还原蛋白质中被氧化的甲硫氨酸的相关功能,从而使得因 Met 氧化而丢失或减弱的蛋白质功能能够重新获得。这也进一步证实胚发育起始需要一个还原环境,这样有助于胚性细胞的增殖。

表 1 质谱鉴定
Table 1 Mass spectrometry

位点	蛋白名称	登录号	蛋白质评分	物种	理论值(MW/pI)
Spot No.	Protein name	Accession No.	Protein score	Species	Theoretical value (MW/pI)
Spot1	Similar to afadin- and alpha-actinin-binding protein-like isoform X2	XP_003573595.1	72	二穗短柄草	44 686.5/7.70
Spot2	Similar to NB-ARC domain containing protein	ABA95097.1	82	<i>Brachypodium distachyon</i> 粳稻组	161 982.6/8.14
Spot 3	Similar to PREDICTED: mitochondrial adenine nucleotide transporter ADNT1-like	XP_006654848.1	63	<i>Oryza sativa Japonica Group</i> 花药野生稻	38 942.2/9.40
Spot 4	Cold-regulated protein 15a	gi 30689052	84	<i>Oryza brachyantha</i> 拟南芥	13 443.8/6.62
Spot 5	PREDICTED: proteasome subunit alpha type-5-like isoform X1	gi 502121024	92	<i>Arabidopsis thaliana</i> 鹰嘴豆	26 179.0/4.69
Spot 6	Cold-regulated protein 15a	gi 30689052	94	<i>Cicer arrietinum</i> 拟南芥	13 443.8/6.62
Spot 9	USP family protein	gi 259490110	103	<i>Arabidopsis thaliana</i> 玉米	29 947.8/5.03
Spot 11	Peptide chain release factor 1	RF1_NITEC	76	<i>Zea mays</i> 亚硝化单胞菌属	40 481.6/5.52
Spot 12	Heat shock 70 kD protein	HSP70_MAIZE	388	<i>Nitrosomonas</i> 玉米	70 870.9/5.22
Spot 13	PREDICTED: glycine-rich RNA-binding protein RZ1C-like	gi 449449318	76	<i>Zea mays</i> 黄瓜	32 071.1/9.38
Spot 15	PREDICTED: BTB/POZ domain-containing protein	gi 460411781	83	<i>Cucumis sativus</i> 番茄	57 127.2/6.41
Spot 17	Similar to PREDICTED: pentatricopeptide repeat-containing protein At1g71490-like	XP_008648370.1	77	<i>Solanum lycopersicum</i> 玉米	76 679.2/8.53
Spot 18	PREDICTED: glutaredoxin-C8-like	gi 514765091	100	<i>Zea mays</i> 小米	14 619.7/6.82
Spot 19	Thermosome subunit beta	THSB_SULTO	78	<i>Setaria italica</i> 硫化叶菌	59 959.0/5.39
Spot 20	Similar to PREDICTED: myosin-15	XP_010447270.1	81	<i>Sulfolobus tokodaii</i> 亚麻荠 <i>Camelina sativa</i>	175 116.2/9.02

续表 1

Continuing table 1

位点	蛋白名称	登录号	蛋白质评分	物种	理论值(MW/pI)
Spot No.	Protein name	Accession No.	Protein score	Species	Theoretical value (MW/pI)
Spot 22	1,2-dihydroxy-3-keto-5-methylthiopentene	gi 88909691	82		24 543.1/5.56
Spot 27	Similar to PREDICTED: filament-like plant protein 6	XP_010479192.1	80	亚麻荠 <i>Camelina sativa</i>	120 599.3/4.85
Spot 30	Similar to metal ion binding protein	gi 482559215	81	天南星拟南芥亚种 <i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	142 751.9/6.62
Spot 32	Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein	gi 186478664	81	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	61 887.3/7.86
Spot 33	Probable histone-lysine N-methyltransferase ATXR3	XP_010657340.1	80	葡萄 <i>Vitis vinifera</i>	253 401.6/6.40
Spot 34	Peptide chain release factor 1	RF1_NITEC	76	亚硝化单胞菌 <i>Nitrosomonas eutropha</i>	40 481.6/5.52
Spot 35	Heat shock protein 70	gi 527187624	424	金钱草 <i>Genlisea aurea</i>	71 617.3/5.06
Spot 36	Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 37f	gi 502138932	524	拟南芥 <i>Arabidopsis thaliana</i>	73 801.0/5.11
Spot 39	PREDICTED: putative nuclear matrix constituent protein 1-like protein-like	gi 470103738	79	胡枝子 <i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	126 116.6/5.33
Spot 43	RecName: Full=Alcohol dehydrogenase	gi 113436	299		42 173.3/6.61
Spot 44	Cytosolic phosphoglycerate kinase 2	gi 317373795	92	向日葵 <i>Helianthus annuus</i>	42 438.7/6.93
Spot 45	Vinculin	VINC_CHICK	71	原鸡 <i>Gallus gallus</i>	125 052.2/5.43
Spot 46	Alpha-S1-casein	CASA1_SHEEP	82	绵羊 <i>Ovis arie</i>	24 347.4/5.32
Spot 47	Similar to NAD(P)-binding rossmann-fold protein	XP_013448875.1	279	藜藜苜蓿 <i>Medicago truncatula</i>	35 016.1/8.88
Spot 50	Putative lactoylglutathione lyase, chloroplast	gi 473822509	81	乌拉尔图小麦 <i>Triticum urartu</i>	38 571.9/6.50

续表 1
Continuing table 1

位点 Spot No.	蛋白名称 Protein name	登录号 Accession No.	蛋白质评分 Protein score	物种 Species	理论值(MW/pI) Theoretical value (MW/pI)
Spot 52	PREDICTED: isoflavone reductase homolog	gi 449438299	191	黄瓜 <i>Cucumis sativus</i>	33 738.8/6.92
Spot 53	Similar to PREDICTED: pyruvate dehydrogenase E1 component subunit beta-3, chloroplastic-like	EIMS47073.1	85	沟酸浆 <i>Erythranthe guttata</i>	43 928.3/6.22
Spot 54	PREDICTED: enolase-like	gi 470134388	192	胡枝子 <i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	48 251.6/5.76
Spot 55	AAA domain-containing protein 3, ATPase family	gi 413923550	76	玉米 <i>Zea mays</i>	72 021.6/9.36
Spot 56	Cysteine synthase, putative	gi 223548214	226	蓖麻 <i>Ricinus communis</i>	34 435.1/5.50
Spot 57	Soluble inorganic pyrophosphatase	gi 474111691	207	乌拉尔图小麦 <i>Triticum urartu</i>	33 393.0/6.26
Spot 59	PDI-like 1-1 isoform 2	gi 508724435	77	可可 <i>Theobroma cacao</i>	55 416.1/4.90
Spot 60	Similar to PREDICTED: ABC transporter B family member 19-like	XP_008669709.1	74	玉米 <i>Zea mays</i>	168 539.3/8.80
Spot 61	Protein disulfide isomerase 2 precursor	gi 192912964	87	油棕 <i>Elaeis guineensis</i>	56 763.7/4.74
Spot 63	PREDICTED: S-adenosylmethionine synthase 2-like isoform 1	gi 470103854	390	胡枝子 <i>Fragaria vesca</i> subsp. <i>vesca</i>	43 477.9/5.66
Spot 64	Endo-1,4-beta-glucanase	gi 347466577	106	毛果杨 <i>Populus trichocarpa</i>	55 210.5/5.67

1.3.4 Sec14p-like phosphatidylinositol transfer family protein 分析

Sec14p 是酵母 Phosphatidylinositol transfer proteins (PITPs) 蛋白, 调控脂代谢和膜转运之间的信号接口, 且在酵母和哺乳动物中功能分析较多。Vincent 等(2005)研究发现 AtSfh1p 是拟南芥 Sec14p-nodulin domain family 的成员之一, 其调控根毛发育的特异阶段发育。AtSfh1p 位于根毛质膜表面及富集在离散质膜域和根毛尖的细胞质中; 基因消除试验表明 AtSfh1p 在根毛极性扩增中有着重要的作用。AtSfh1p 可能是调控胞内和质膜上磷脂肌醇极性的标志性分子, 其作用在于调控生长根毛尖膜转运、钙信号和细胞骨架功能。Sec14p 域蛋白是植物极性化膜生长的调控因子。Sec14p 通路是一个信号级联反应, 涉及该反应的包括氧固醇结合蛋白质家族中一些蛋白质, 如 Kes 1p 和 ADP-核糖基化因子 GTP 激活蛋白质。ADP-核糖基化因子 GTP 激活蛋白质是酵母依赖于 Sec14p 途径高尔基体分泌功能的必要因子(Yanagisawa et al., 2002)。

体细胞去分化形成胚性愈伤组织, 其是无特定细胞形态的组织。胚性细胞需要细胞重编程, 即从无组织结构的组织进入细胞秩序化及组织重新构建。在细胞秩序化和组织重新构建中细胞极性化起着重要的作用。鹅掌楸胚性愈伤组织中鉴定到的 Sec14p 是否也参与了如拟南芥根毛中极性化调控及果蝇胚胎中细胞极性化及膜加成作用有待进一步证实。但是在愈伤组织再分化过程中细胞极性化建立及膜的加成对胚后生长是至关重要的。

1.3.5 Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 分析

Mediator 是一大类蛋白质复合物, 其结合 RNA polymerase II 并控制转录。系统进行比较 Mediator 的保守核心部分存在所有真核生物中。Mediator 结合 RNA polymerase II 对基础转录是至关重要的, 也调节转录的激活和抑制。Mediator 在进化过程中具有招募额外的种属特异亚基执行调控因子或是参与特定的信号途径的功能。前人研究推测 Mediator 是 RNA polymerase II 结合基因并随之激活预起始复合物的标志, Mediator 可能协调染色质修饰辅助因子的招募(Blazek et al., 2005)。Mediator of RNA polymerase II transcription subunit 1 (Human) 具有参与器官再生和动物胚胎后肢形态建成的功能。酵母和人类的 Mediator 研究已经有 20 多年了, 但与植物 Mediator 序

列相似性低, 因此一直无法通过生物信息学的方法鉴定植物 Mediator 的同源序列。有研究学者通过生物化学的方法鉴定了植物 Mediator 复合物。植物 Mediator 复合物预测由 34 个蛋白质亚基构成。通过拟南芥突变体发育畸形已鉴定到一些编码 Mediator 亚基的基因, 包括 MED8、MED14、MED5a、MED5b 和 MED25。有研究表明 MED25 参与调控茉莉酸甲酯和脱落酸反应信号, 其影响着赤甘蓝和灰霉病对异氧生物的易感性及对脱落酸的敏感性(Chen et al., 2012)。拟南芥功能丢失突变体研究表明 RNA polymerase II 招募冷调控 CBF 反应基因需要 MED16, MED2 和 MED14 亚基的参与, 这 3 个亚基是一些低温诱导基因表达所需要(Hemsley et al., 2014)。胚性愈伤组织再分化需要启动一些基因转录、翻译。Mediator 结合 RNA polymerase II 对基础转录是至关重要的, 且也调节转录的激活和抑制, 这对胚性愈伤的获得及胚后生长至关重要。

1.3.6 组蛋白修饰相关蛋白质

Histone methyltransferase 是组蛋白修饰酶(例: Histone-lysine N-methyltransferase 和 Histone-arginine N-methyltransferases), 其催化组蛋白的赖氨酸和精氨酸上一个, 两个或三个甲基的转移。甲基基团主要出现在组蛋白 H3 和 H4 特定的 Lys 和 Arg 位点。主要有两种组蛋白甲基转移酶存在, 即赖氨酸特异酶和精氨酸特异酶(甄艳等, 2016)。在这两种转移酶中 S-Adenosyl methionine (SAM) 作为辅助因子和甲基供体。在真核生物细胞中, 基因组浓缩成染色质(组蛋白质缠绕着 DNA 分子), 而组蛋白甲基转移酶可以打开染色质紧凑的结构, 即组蛋白甲基转移酶利用甲基对组蛋白赖氨酸和/或精氨酸位点进行修饰来解开染色质的紧密结构(Kouzarides, 2007)。因此, 组蛋白的甲基化有着重要的生物功能。染色质的表观遗传修饰决定着基因表达, 基因组的稳定性, 干细胞成熟, 细胞系的发育, 遗传印记, DNA 甲基化和细胞有丝分裂。杂交鹅掌楸愈伤组织蛋白质组中鉴定了 Histone-lysine N-methyltransferase ATXR3 (spot 33), 是一种组蛋白赖氨酸甲基转移酶; S-adenosylmethionine synthase 2-like isoform 1 (spot 63), S-adenosylmethionine synthase 合成 SAM 为甲基转移酶提供甲基或作为甲基转移酶的辅助因子。成熟的细胞脱分化成为愈伤组织是个复杂的过程, 虽然很多植物可以诱导脱分化形成胚性愈伤, 进而再分化形成完整的植株, 但是关于植物形成胚性愈伤能力的机制仍不清晰。

但植物离体条件培养下,在外源激素/胁迫条件下形成愈伤组织过程中必然涉及到大量的基因表达和沉默。除了DNA甲基化和去甲基化可通过控制基因的表达和沉默来实现对细胞的生长和分化的调控外,组蛋白修饰在基因表达调控方面也有重要的作用。

染色质结构的全基因调控与细胞的分化和去分化有着密切的关系。在哺乳动物细胞中,分化的细胞具有封闭的染色质结构,而多能去分化的细胞具有开放的染色质结构(Gaspar-Maia et al., 2011)。植物细胞具有很强的能力诱导分化细胞生成无特定细胞形态的多能干细胞,即愈伤组织;依赖于细胞的分化状态,植物基因组的染色质状态可能发生了被动态修饰(Ikeuchi et al., 2013)。已有一些证据表明组蛋白修饰的基因组重编程在植物细胞去分化中起着重要的作用,*clf*和*sun*双突变和*emf2*单突变具有降低叶片外植体形成愈伤的能力,这可能是因为H3K27me3蛋白质的积累是消除叶片身份的必需因子;相反,在叶子向愈伤过渡中PcG成员的突变体通过胚性调控因子的激活导致分化的细胞丢失身份,如*LEC1*、*LEC2* (*LEAFY COTYLEDON*) *FUSCA3* (*FUS3*) (He et al., 2012)。组蛋白去乙酰化也是拟南芥子叶外植体愈伤形成所需要的,*HDA9*或*HDT1*遗传突变表明降低了愈伤形成的能力,可能是由于他们在调控生长素和胚性及分生组织发育信号中的作用(Lee et al., 2016)。

2 讨论

植物需要很好的灵活性来适应外界环境的变化。植物在生长发育和形态方面的灵活性反应是通过自身的能力不断在根尖和芽尖的干细胞群产生新的器官,因此植物保持了从已分化的成熟组织中再生成完整植物的潜势。体胚发生是植物再生能力最好的体现,单个细胞获得正确的信号后可以起始胚胎发生并成长为新的植株。依据愈伤组织磷酸化蛋白质组研究鉴定的这些蛋白质参与了愈伤组织胚性能力的获得,Eukaryotic release factor1影响着细胞的伸长和径向细胞分裂;EF-hand域蛋白(EF-hand-containing protein, polcalcin)有助于胚性干细胞分裂的维持;胚在发育过程中形成一套有效的抗氧化系统是胚正常生长发育及胚后生长所必需的,在胚发育过程中抗氧化酶的表达将会清除活性氧来减少细胞的氧化胁迫。体胚发生过程中培养基的氧化还原环境是影响体胚发生的一个重要的相关因子,一个还原环境有助于(Methionine sulfoxide reductase, glutaredoxin-C8-like)促进鹅掌楸胚性细胞增殖;Ca²⁺离子

信号结合蛋白、Sec14p类磷酸酰肌醇转运家族蛋白参与细胞极性和器官形态建成,在愈伤组织再分化过程中细胞极化建立及膜的加成对胚后生长是至关重要的,染色质重塑因子是调控基因转录激活和抑制的重要因子,在鹅掌楸愈伤组织中所鉴定的Mediator of RNA polymerase II transcription subunit是调控基因转录激活的染色质重塑因子,其介导胚形态建成和器官发生,这对胚性愈伤的获得及胚后生长至关重要;植物细胞具有很强的能力诱导分化细胞生成无特定细胞形态的多能干细胞,即愈伤组织;依赖于细胞的分化状态,组蛋白修饰在基因表达调控方面有重要的作用,染色质结构的全基因调控与细胞的分化和去分化有着密切的关系。结合前期鹅掌楸胚性能力的蛋白质组研究(Zhen et al., 2015)及本次鹅掌楸胚性能力磷酸化蛋白质组研究绘制鹅掌楸愈伤胚性能力获得的模式(图5)。

3 材料与方法

3.1 试验材料

杂交鹅掌楸(*Liriodendron hybrid*)胚性愈伤组织来源于南京林业大学杂交鹅掌楸未成熟的种子(陈金慧教授实验室提供)。

3.2 样品制备

胚性与非胚性愈伤组织中加入少量的PVPP液氮研磨,之后迅速倒入3倍体积的10%TCA/丙酮中混匀,于-20℃过夜,之后离心(4℃, 12 000 g) 20 min弃上清,加入3倍体积的100%丙酮重悬沉淀,-20℃下摇匀1 h;离心(12 000 g, 4℃) 45 min弃上清,重复2次;沉淀于室温风干后加裂解液(7 mol/L urea, 2 mol/L thiourea, 2% (w/v) 3-((3-cholamidopropyl) dimethylammonio)-1-propanesulfonate (CHAPS), 1% (w/v) DTT and 2% (v/v) Pharmalyte pH 3~10),室温裂解2 h,离心(12 000 g/min, 4℃) 1 h收集上清液,用2-D Quant Kit (GE Healthcare)进行蛋白定量,分装于-70℃备用。

3.3 双向电泳

第一步等点聚焦:首先蛋白质样品溶解在水化液(8 mol/L urea, 2% CHAPS, 20 mmol/L DTT, a trace of bromophenol blue, and 0.5% (v/v) immobilized pH gradient (IPG) Buffer (pH值为3~10))中,之后用线性pH值为4~7 IPG胶条水化及聚焦过夜。等点聚焦仪的程序:6 h 30 V (step); 6 h 60 V (step); 1 h 200 V

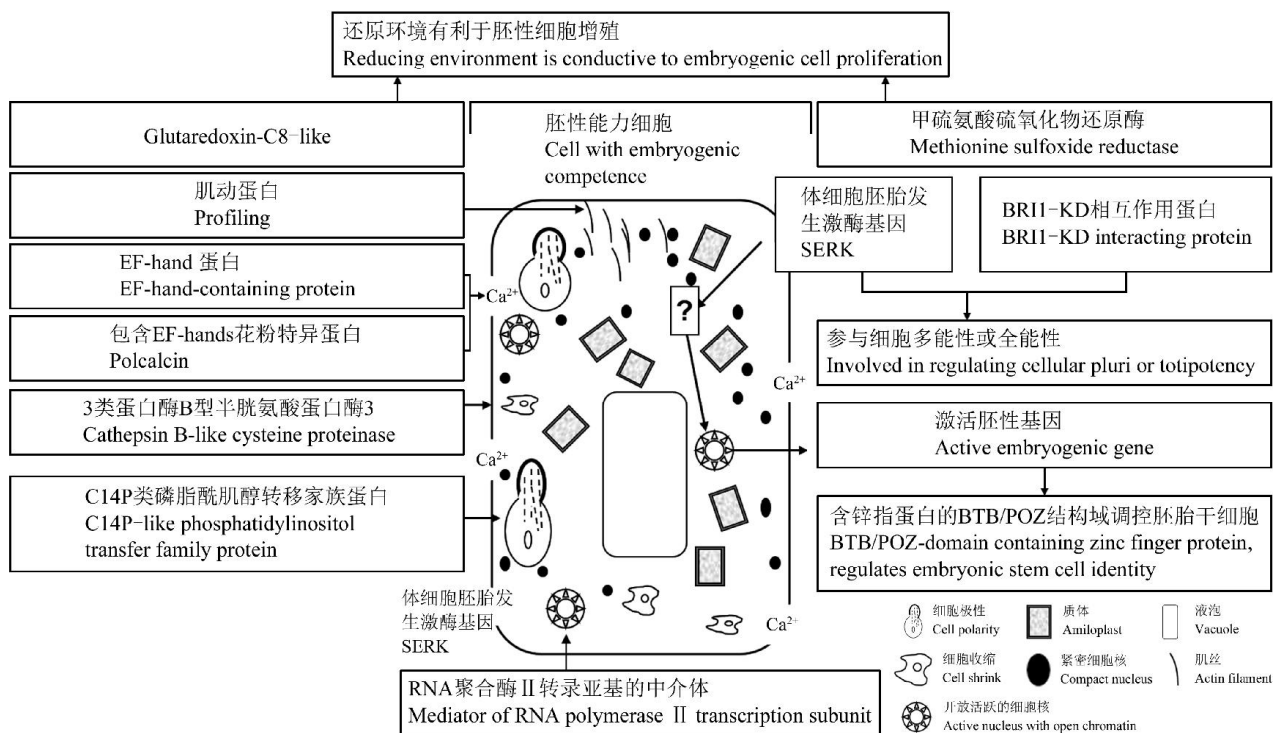


图5 鹅掌楸愈伤组织胚性能力获得的框架

Figure 5 Framework of embryogenic ability of *Liriodendron* hybrid callus

(step); 1 h 500 V (step); 1 h 1 000 V (step); 30 min 8 000 V (grad); 6 h 8 000 V (step), 聚焦时温度为 20℃。聚焦后进行蛋白质平衡。第二步垂直电泳: 平衡后的 IPG 胶条置于 12.5% 的 SDS-PAEG 垂直胶板上, 电泳系统为 Ettan Dalt twelve-gel system。垂直电泳程序设定为: 5 W/gel 30 min; 15 W/gel 5 h, 温度为 15℃。

3.4 Pro-Q DPS 染色、激光扫描

用去离子水将胶小心冲洗 2 次, 每次 10 min。室温条件下摇匀, 摇速 35 r/min。

第一步固定: 倒去废液, 加入 200 mL 固定液(50% (V/V) 甲醇、10% (V/V) 乙酸, 重复 2 次, 每次 10 min; 第二步水洗: 倒去固定液, 加入 250 mL 去离子水进行漂洗, 重复 2 次, 每次 15 min; 第三步染色: 倒去水洗液, 加入染色液(Pro-Q DPS (V/V)), 在黑暗条件下染色 150 min; 第四步脱色: 手戴干净手套轻按胶面弃掉废液, 每块胶加入脱色液 250 mL (50 mL 乙酸钠 pH=4.0)、150 mL 去离子水、50 mL 乙腈, 脱 4 次, 每次 30 min, 在黑暗条件下摇匀 30 min, 倒去脱色液。重复操作至少 3 次整个脱色时间 2 h; 第五步水洗: 手戴干净手套轻按胶面倒掉废液, 在黑暗条件下, 每块胶加 250 mL 去离子水洗 2 次, 每次 5 min。

利用 Typhoon TRIO (Variable Mode Imager) 进

行扫描, 设置数据激发峰和发射峰分别为 532 nm 和 580 nm, 分辨率为 100 μm。凝胶图片利用 Image Master™ 2D Platinum V6.0 软件进行分析。

3.5 胶内酶解及质谱分析

将制备胶对应差异抠出进行蛋白质的胶内酶解。冻干后的酶解样品, 取 2 μL 20% 乙腈复溶。取 1 μL 已溶解的样品, 直接点于样品靶上, 让溶剂常温下干燥后, 再取 0.5 μL 过饱和 CHCA 基质溶液(溶剂为 50% ACN 0.1% TFA)点至对应靶位上并自然干燥。样品靶经氮气吹净后放入仪器进靶槽并用串联飞行时间质谱仪(5800 MALDI-TOF/TOF, AB SCIEX)进行测试分析, 激光源为 355 nm 波长的 Nd:YAG 激光器, 加速电压为 2 000 V, 采用正离子模式和自动获取数据的模式采集数据, 一级质谱(MS)扫描范围为 800~4 000 Da, 选择信噪比大于 50 的母离子进行二级质谱(MS/MS)分析, 每个样品点上选择 8 个母离子, 二级质谱(MS/MS)累计叠加 2 500 次, 碰撞能量 2 000 V, CID 关闭。

3.6 数据分析

利用 Mascot 搜索引擎对质谱获得的 MS 片段和 MS/MS/离子进行 NCBI 非冗余数据库检索。单离子同位素片段质量容忍度为 ±0.4 Da; 胰蛋白酶漏切: 1;

蛋白质固定化修饰: carbamidomethylation (C); 可变修饰: acetylation (protein N-term), oxidation (M); 物种分类: 绿色植物。鉴定的标准为总离子值大于 99, 匹配肽序列最小覆盖率为 10%。

作者贡献

李春映是本研究的执行人, 完成了论文初稿的写作; 殷梓苡完成论文的修改; 陈金慧提供了本研究的实验材料准备工作; 施季森给予实验设计建议; 甄艳提出实验想法, 设计实验及指导研究、完成文章的修改和定稿。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家高技术研究发展 863 计划项目 (2013AA102705) 和江苏省政府优势学科建设项目 (PAPD) 共同资助。

参考文献

- Belmonte M.F., Donald G., Reid D.M., Yeung E.C., and Stasolla C., 2005, Alterations of the glutathione redox state improve apical meristem structure and somatic embryo quality in white spruce (*Picea glauca*), *J. Exp. Bot.*, 56(419): 2355-2364
- Bian F.H., Zheng C.X., Qu F.N., Gong X.Q., and You C.R., 2010, Proteomic analysis of somatic embryogenesis in *Cyclamen persicum* Mill., *Plant Mol. Biol. Rep.*, 28(1): 22-31
- Blazek E., Mittler G., and Meisterernst M., 2005, The mediator of RNA polymerase II, *Chromosoma*, 113(8): 399-408
- Chen R., Jiang H., Li L., Zhai Q., Qi L., Zhou W., Liu X., Li H., Zheng W., Sun J., and Li C., 2012, The Arabidopsis mediator subunit MED25 differentially regulates jasmonate and abscisic acid signaling through interacting with the MYC2 and ABI5 transcription factors, *Plant Cell*, 24(7): 2898-2916
- Gaspar-Maia A., Alajem A., Meshorer E., and Ramalho-Santos M., 2011, Open chromatin in pluripotency and reprogramming, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, 12(1): 36-47
- He C., Chen X., Huang H., and Xu L., 2012, Reprogramming of H3K27me3 is critical for acquisition of pluripotency from cultured Arabidopsis tissues, *PLoS Genet.*, 8(8): e1002911
- Hemsley P.A., Hurst C.H., Kaliyadasa E., Lamb R., Knight M.R., De Cothi E.A., Steele J.F., and Knight H., 2014, The Arabidopsis mediator complex subunits MED16, MED14, and MED2 regulate mediator and RNA polymerase II recruitment to CBF-responsive cold-regulated genes, *Plant Cell*, 26(1): 465-484
- Ikeuchi M., Sugimoto K., and Iwase A., 2013, Plant callus: mechanisms of induction and repression, *Plant Cell*, 25(9): 3159-3173
- Kouzarides T., 2007, Chromatin modifications and their function, *Cell*, 128(4): 693-705
- Kweon H.K., and Andrews P.C., 2013, Quantitative analysis of global phosphorylation changes with high-resolution tandem mass spectrometry and stable isotopic labeling, *Methods*, 61(3): 251-259
- Lee K., Park O.S., Jung S.J., and Seo P.J., 2016, Histone deacetylation-mediated cellular dedifferentiation in Arabidopsis, *J. Plant Physiol.*, 191: 95-100
- Namasivayam P., Skepper J., and Hanke D., 2006, Identification of a potential structural marker for embryogenic competency in the *Brassica napus* spp. *oleifera* embryogenic tissue, *Plant Cell Rep.*, 25(9): 887-895
- Petsch K.A., Mylne J., and Botella J.R., 2005, Cosuppression of eukaryotic release factor 1-1 in Arabidopsis affects cell elongation and radial cell division, *Plant Physiol.*, 139(1): 115-126
- Silva R.d.C., Travassos Carmo L.S., Luis Z.G., Silva L.P., Scherwinski-Pereira J.E., and Mehta A., 2014, Proteomic identification of differentially expressed proteins during the acquisition of somatic embryogenesis in oil palm (*Elaeis guineensis* Jacq.), *J. Proteomics*, 104: 112-127
- Vincent P., Chua M., Nogue F., Fairbrother A., Mekeel H., Xu Y., Allen N., Bibikova T.N., Gilroy S., and Bankaitis V.A., 2005, A Sec14p-nodulin domain phosphatidylinositol transfer protein polarizes membrane growth of *Arabidopsis thaliana* root hairs, *J. Cell Biol.*, 168(5): 801-812
- Wu Q., Yang J., Cheng N., Hirschi K.D., White F.F., and Park S., 2017, Glutaredoxins in plant development, abiotic stress response, and iron homeostasis: From model organisms to crops, *Environ. Exp. Bot.*, 139: 91-98
- Yanagisawa L.L., Marchena J., Xie Z.G., Li X.M., Poon P.P., Singer R.A., Johnston G.C., Randazzo P.A., and Bankaitis V.A., 2002, Activity of specific lipid-regulated ADP ribosylation factor-GTPase-activating proteins is required for Sec14p-dependent Golgi secretory function in yeast, *Mol. Biol. Cell*, 13(7): 2193-2206
- Zhen Y., Li C., Chen J.S., Chen Q., and Shi J., 2015, Proteomics of embryogenic and non-embryogenic calli of a *Liriodendron hybrid*, *Acta Physiol. Plant.*, 37(10): 211
- Zhen Y., Zheng X.H., and Shi J., 2016, DNA methylation and histone modification regulation of plant cellular differentiation, *Jiayinzuxue Yu Yingyong Shenwuxue (Genomics and Applied Biology)*, 35(11): 3194-3198 (甄艳, 郑秀化, 施季森, 2016, 植物细胞分化过程中 DNA 甲基化及组蛋白修饰调控研究, *基因组学与应用生物学*, 35(11): 3194-3198)
- Zhou X.J., Cooke P., and Li L., 2010, Eukaryotic release factor 1-2 affects Arabidopsis responses to glucose and phytohormones during germination and early seedling development, *J. Exp. Bot.*, 61(2): 357-367