

橡胶树死皮(TPD)发生过程中胶乳蛋白质的泛素化

覃碧^{1,*}, 刘长仁², 杜磊³

¹中国热带农业科学院橡胶研究所农业部橡胶树生物学与遗传资源利用重点实验室, 海南儋州571737; ²海南大学农学院, 海口570228; ³三峡大学化学与生命科学学院, 湖北宜昌443002

摘要: 以健康和不同级别死皮(TPD)橡胶树为材料, 用Western blot分析橡胶树TPD发生过程中胶乳蛋白质泛素化水平的动态变化, 结果表明, 健康与TPD橡胶树胶乳蛋白质的泛素化水平存在显著差异, 其中2个蛋白的泛素化水平在TPD中显著升高, 而7个蛋白的泛素化水平在TPD中明显降低。这些蛋白可能在TPD发生过程中发挥重要调控作用。本文结果为进一步研究泛素化在橡胶树TPD发生过程中的作用提供依据, 同时也为揭示TPD发生的分子机制提供新的思路 and 观点。

关键词: 橡胶树; 死皮(TPD); 泛素化

Ubiquitination of Latex Protein during Tapping Panel Dryness (TPD) Process in *Hevea brasiliensis* Muell. Arg.

QIN Bi^{1,*}, LIU Chang-Ren², DU Lei³

¹Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Rubber Tree, Ministry of Agriculture, Rubber Research Institute, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Danzhou, Hainan 571737, China; ²College of Agriculture, Hainan University, Haikou 570228, China; ³College of Chemistry and Life Science, Sanxia University, Yichang, Hubei 443002, China

Abstract: In this study, the ubiquitination of the latex proteins from healthy and different degrees of tapping panel dryness (TPD) rubber trees (*Hevea brasiliensis*) was compared using Western blot. The result indicated that there was significant difference in the ubiquitination levels of latex proteins between healthy and TPD trees. In the TPD trees, the ubiquitination levels of 2 proteins were significantly increased, while 7 proteins were obviously decreased. These ubiquitinated proteins might play important roles in TPD. This research provides a base for further study on the roles of protein ubiquitination in TPD. Meanwhile it also provides a new perspective to elucidate the molecular mechanism involved in the TPD process.

Key words: *Hevea brasiliensis*; tapping panel dryness (TPD); ubiquitination

蛋白质的泛素化是真核细胞中一种非常重要的蛋白质修饰过程。在许多生命活动中蛋白质均可被泛素化途径修饰和降解, 包括细胞周期、信号转导、转录、逆境胁迫、生物及非生物抗性 (Craig等2009)。目标蛋白的泛素化需要ATP提供能量, 由3种酶参与完成, 包括泛素激活酶(ubiquitin-activating enzyme, E1)、泛素结合酶(ubiquitin-conjugation enzyme, E2)和泛素连接酶(ubiquitin ligase enzyme, E3) (Hershko和Ciechanover 1998), 泛素化修饰的蛋白可被26S蛋白酶体识别和降解。

天然橡胶是关系国计民生的基础产业和战略物资, 而巴西橡胶树是天然橡胶的主要来源。橡胶树死皮(tapping panel dryness, TPD)是天然橡胶生产中的一种剖面症状, 表现为割线局部或全部不排胶。TPD是一个世界性的难题, 给天然橡胶生产带来了严重的危害。近年来, 从生理生化

以及分子生物学的角度对橡胶树TPD发生的机制展开了广泛的研究, 并取得了一定进展, 但其发生机制尚不清楚。其中, Venkatachalam等(2007)和Li等(2010)先后通过抑制消减杂交技术(suppression subtractive hybridization, SSH)鉴定了一系列TPD相关基因, 这些基因涉及活性氧代谢、泛素-蛋白酶体途径、细胞程序性死亡及橡胶生物合成等途径。鉴于前人已有的研究结果以及泛素-蛋白酶体途径在植物生长发育和胁迫响应等方面的重要调控作用, 本研究以健康和不同级别TPD橡胶树为材料, 研究TPD发生过程中蛋白质泛素化水平的动态变化, 以揭示蛋白质泛素化修饰在TPD发生过程中

收稿 2012-12-24 修定 2013-02-27

资助 中国热带农业科学院橡胶研究所人才项目(RC201204)。

* 通讯作者(E-mail: qinbi126@163.com; Tel: 0898-23301174)。

的作用,为进一步阐明橡胶树TPD发生的分子机制提供新的观点和依据。

材料与方法

巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.)品种‘PR107’采自中国热带农业科学院实验农场十二队。以健康(排胶正常)、2级TPD(死皮长度为2 cm至割线的1/4)和5级TPD(死皮长度为割线的3/4至全线)橡胶树为实验材料,分别取其新鲜胶乳用于Western blot分析。

取30 mL新鲜胶乳于4 °C下16 500×g离心1 h后,取C-乳清直接用于Western blot分析。蛋白质浓度用Bradford试剂盒(上海碧云天生物技术有限公司)定量测定。取30 μg蛋白样品,以12%的SDS-PAGE凝胶电泳分离。Western blot参照Towbin等(1979)和史敏晶等(2009)的方法进行。SDS-PAGE电泳结束后,将凝胶中的蛋白质转移至0.2 μm PVDF膜(Bio-Rad)上,50 mA低温转移12 h,转移电极缓冲液含20 mmol·L⁻¹ Tris碱、150 mmol·L⁻¹甘氨酸和20%甲醇(V/V);一抗为抗泛素的抗体(Sigma, 稀释倍数为1:100)(兔抗,多克隆抗体),二抗为碱性磷酸酶标记的羊抗兔二抗(Pierce, 稀释倍数为1:2 000),抗体在37 °C孵育2.5 h,BCIP/NBT显色1~2 min。

实验结果

1 健康与TPD橡胶树胶乳蛋白质的提取与分离

提取等量的健康与TPD橡胶树胶乳蛋白,经12% SDS-PAGE电泳分离,考马斯亮蓝染色。结果显示,提取的胶乳蛋白质条带清晰,质量较好,可进一步用于Western blot分析(图1)。比较健康和不同级别TPD橡胶树胶乳蛋白质带型发现,两者中一些蛋白的表达丰度存在显著差异,其中一个大约20 kDa的蛋白(命名为P20)在TPD树中明显富集(图1,黑色箭头所示),而5个蛋白在TPD树中的表达丰度明显下降,包括P47(约47 kDa)、P30(约30 kDa)、P17(约17 kDa)、P13(约13 kDa)、P12(约12 kDa)(图1,白色箭头所示)。

2 TPD发生过程中胶乳蛋白质的泛素化水平动态变化

等量的健康与不同级别TPD橡胶树胶乳蛋白质经12%的SDS-PAGE电泳分离后,以抗泛素蛋白作为抗体,通过Western blot方法检测蛋白质泛素

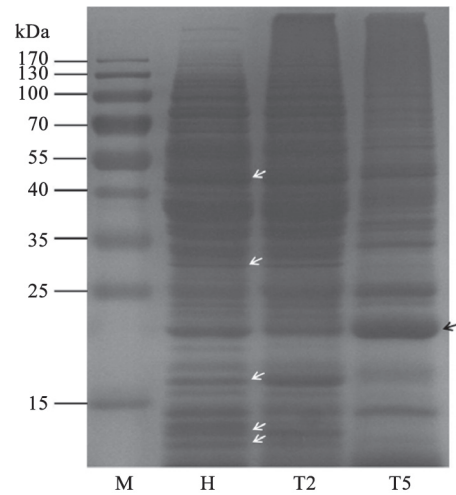


图1 健康与TPD橡胶树胶乳蛋白质的SDS-PAGE电泳检测结果

Fig.1 The latex proteins from healthy and TPD rubber trees were detected by SDS-PAGE

M: 蛋白分子量标准; H: 健康树; T2: 2级TPD树; T5: 5级TPD树。白色箭头所示为健康树中表达丰度高于TPD树的蛋白; 黑色箭头所示为TPD树中表达丰度高于健康树的蛋白。

化水平的动态变化。结果表明,随着TPD症状的加重,总蛋白的整体泛素化水平明显降低(图2); TPD树中有7个蛋白的泛素化水平明显低于健康树,包

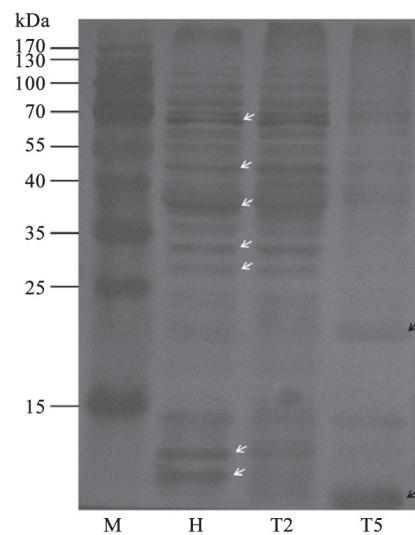


图2 Western blot检测健康与TPD橡胶树中的蛋白质泛素化水平

Fig.2 Analysis of the levels of protein ubiquitination in healthy and TPD rubber trees by Western blot

M: 蛋白分子量标准; H: 健康树; T2: 2级TPD树; T5: 5级TPD树。白色箭头所示是健康树中泛素化水平明显高于TPD树的蛋白; 黑色箭头所示是TPD树中泛素化水平明显高于健康树的蛋白。

括P70 (约70 kDa)、P47、P38 (约38 kDa)、P34 (约34 kDa)、P30、P13、P12 (图2, 白色箭头所示); 而5级TPD树中个别蛋白的泛素化水平显著高于健康树, 包括P20和P9 (约9 kDa) (图2, 黑色箭头所示)。这些结果表明, 蛋白泛素化途径参与了橡胶树的TPD发生过程, 而在健康与TPD树中泛素化水平存在显著差异的蛋白可能在橡胶树的TPD发生过程中具有重要的调控作用。

讨 论

蛋白质泛素化是真核生物中最重要的翻译后修饰方式之一, 近年来的研究表明, 蛋白质泛素化广泛地参与植物生长发育的各个环节, 如激素合成、感知和下游信号转导(Santner和Estelle 2010; Tan和Zheng 2009; Vierstra 2009)、植物形态建成(Henriques等2009; Hoecker 2005; Sawa等2007; Schwager等2007)、自交不亲和(Hua和Kao 2006; Stone等2003)、抗病(Dielen等2010)和逆境反应(Feussner等1997)等。蓝兴国等(2010)以抗泛素蛋白作为抗体, 通过Western blot方法研究羽衣甘蓝授粉过程中柱头蛋白质的泛素化, 结果表明, 蛋白质泛素化特异性地参与了自花授粉后引起的自交不亲和反应过程。在橡胶树中, 前人从基因转录水平鉴定了一系列基因在健康与TPD橡胶树中的差异表达, 其中Venkatachalam等(2007)和Li等(2010)的研究均鉴定到泛素化途径相关基因(包括编码泛素、E2、E3及26S蛋白酶体的基因)在健康与TPD树中差异表达。Sookmark等(2002)通过2D-SDS-PAGE方法鉴定了3个蛋白, 即P15 (15 kDa)、P22 (22 kDa)和P29 (29 kDa)在TPD树中明显富集; 进一步测序验证的结果表明, P15和P22分别为REF (Hev b1)和SRPP (Hev b3), 二者为橡胶生物合成过程中的重要蛋白, P29为patatin-like protein family。本研究直接从基因最终的产物即蛋白质水平出发, 进一步验证蛋白质泛素化在橡胶树TPD发生过程中的调控作用, 发现P20蛋白在TPD树中明显富集, 而且该蛋白在TPD树中的泛素化水平也显著高于健康树。P20与Sookmark等(2002)鉴定的P22 (即SRPP)分子量相近, 可能是同一个蛋白, 由于我们是根据蛋白分子量标准估计分子量, 可能会存在一定偏差。SRPP是橡胶生物合成过程中的重要蛋

白, 该蛋白的泛素化水平提高可能会导致其被大量降解, 从而导致TPD树中橡胶生物合成能力下降, 最终出现TPD症状。但这还需要进一步对P20进行蛋白质谱进行测序加以确定。对健康与TPD树中泛素化水平存在显著差异的蛋白进行测序验证, 根据蛋白测序结果进一步克隆基因全长, 阐明基因功能, 解析基因编码蛋白的泛素化修饰与TPD之间的关系, 将有望揭示橡胶树TPD发生的分子机制。

参考文献

- 蓝兴国, 杨佳, 赵昕, 于凯, 李玉花(2010). 羽衣甘蓝授粉过程中柱头蛋白质的泛素化. 植物生理学通讯, 46: 228~230
- 史敏晶, 陈月异, 田维敏(2009). pH值对巴西橡胶树胶乳 β -1,3-葡聚糖酶结合黄色体膜的影响. 热带作物学报, 30: 891~896
- Craig A, Ewan R, Mesmar J, Gudipati V, Sadanandom A (2009). E3 ubiquitin ligases and plant innate immunity. J Exp Bot, 60 (4): 1123~1132
- Dielen AS, Badaoui S, Candresse T, German-Retana S (2010). The ubiquitin/26S proteasome system in plant-pathogen interactions: a never-ending hide-and-seek game. Mol Plant Pathol, 11: 293~308
- Feussner K, Feussner I, Leopold I, Wastermack C (1997). Isolation of a cDNA coding for an ubiquitin-conjugating enzyme UBC1 of tomato—the first stress-induced UBC of higher plants. FEBS Lett, 409: 211~215
- Henriques R, Jang IC, Chua NH (2009). Regulated proteolysis in light-related signaling pathways. Curr Opin Plant Biol, 12: 49~56
- Hershko A, Ciechanover A (1998). The ubiquitin system. Annu Rev Biochem, 67: 425~479
- Hoecker U (2005). Regulated proteolysis in light signaling. Curr Opin Plant Biol, 8: 469~476
- Hua Z, Kao TH (2006). Identification and characterization of components of a putative *Petunia S*-locus F-box-containing E3 ligase complex involved in S-RNase-based self-incompatibility. Plant Cell, 18: 2531~2553
- Li D, Deng Z, Chen C, Xia Z, Wu M, He P, Chen S (2010). Identification and characterization of genes associated with tapping panel dryness from *Hevea brasiliensis* latex using suppression subtractive hybridization. BMC Plant Biol, 10: 140
- Santner A, Estelle M (2010). The ubiquitin-proteasome system regulates plant hormone signaling. Plant J, 61: 1029~1040
- Sawa M, Nusinow DA, Kay SA, Imaizumi T (2007). FKF1 and GIGANTEA complex formation is required for day-length measurement in *Arabidopsis*. Science, 318: 261~265
- Schwager KM, Calderon-Villalobos LI, Dohmann EM, Willige BC, Knierer S, Nill C, Schwechheimer C (2007). Characterization

- of the *VIER F-BOX PROTEINE* genes from *Arabidopsis* reveals their importance for plant growth and development. *Plant Cell*, 19: 1163~1178
- Sookmark U, Pujade-Renaud V, Chrestin H, Lacote R, Naiyanetr C, Seguin M, Romruensukharom P, Narangajavana J (2002). Characterization of polypeptides accumulated in the latex cytosol of rubber trees affected by the tapping panel dryness syndrome. *Plant Cell Physiol*, 43: 1323~1333
- Stone SL, Anderson EM, Mullen RT, Goring DR (2003). ARC1 is an E3 ubiquitin ligase and promotes the ubiquitination of proteins during the rejection of self-incompatible *Brassica* pollen. *Plant Cell*, 15: 885~898
- Tan X, Zheng N (2009). Hormone signaling through protein destruction: a lesson from plants. *Am J Physiol Endocrinol Metab*, 296: E223~E227
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J (1979). Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci USA*, 76: 4350~4354
- Venkatachalam P, Thulaseedharan A, Raghothama K (2007). Identification of expression profiles of tapping panel dryness (TPD) associated genes from the latex of rubber tree (*Hevea brasiliensis* Muell. Arg.). *Planta*, 226: 499~515
- Vierstra RD (2009). The ubiquitin-26S proteasome system at the nexus of plant biology. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 10: 385~397