

外源氨基酸对拟南芥 EBP1 蛋白质合成影响的初步分析*

李婷婷[#], 宋丽梅[#], 于 峰^{**}

(湖南大学生物学院, 湖南长沙 410082)

摘要:【目的】探讨植物吸收外源氨基酸的种类以及这些氨基酸对植物体内 EBP1 蛋白质合成的影响。【方法】本研究建立如下体系: 在缺氮培养基中, 分别添加 16 种终浓度为 3 mmol/L 的氨基酸来处理拟南芥 Col-0。用可以恢复 Col-0 缺氮表型的氨基酸处理 35S::EBP1-GFP 报告植物后, 观察荧光信号并结合核糖体提取及蛋白质印迹法 (Western-blot) 检测 EBP1 在 mRNA 及蛋白水平的表达。【结果】精氨酸、丙氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、天冬氨酸和甘氨酸等 6 种氨基酸可以恢复 Col-0 的缺氮表型, 同时也表明建立的体系切实可行。荧光观察试验表明: 甘氨酸、丙氨酸、精氨酸和谷氨酰胺能促进 35S::EBP1-GFP 的荧光积累; 核糖体提取试验表明: 精氨酸、丙氨酸和甘氨酸能在翻译层面促进 EBP1 的蛋白质积累。Western-blot 试验表明: 丙氨酸和谷氨酰胺在蛋白水平上促进 EBP1 蛋白质的积累。【结论】精氨酸、丙氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、天冬氨酸和甘氨酸可作为潜在的有机氮源供植物吸收利用, 丙氨酸能同时在翻译和蛋白质层面促进 EBP1 的蛋白质积累。氨基酸被植物吸收后通过影响植物体内蛋白质的合成影响植物的生长发育。

关键词: 蛋白质合成; 缺氮; 氨基酸; 35S::EBP1-GFP

中图分类号: Q 591.2

文献标识码: A

文章编号: 1004-390X (2020) 04-0553-09

Preliminary Analysis of the Effect of Exogenous Amino Acids on the Synthesis of EBP1 Protein in *Arabidopsis thaliana*

LI Tingting, SONG Limei, YU Feng

(College of Biology, Hunan University, Changsha 410082, China)

Abstract: [Purpose] To investigate the types of exogenous amino acids absorbed by plants and the effect of these amino acids on the synthesis of EBP1 protein in plants. [Method] We established the following system, Col-0 were grown on the 1/2 nitrogen deficient medium amended with 16 kinds of amino acids (3 mmol/L), respectively. Then, we treated the report plant 35S::EBP1-GFP with the amino acids which could be used as potential organic nitrogen sources to observe their fluorescence signals and combined with ribosome extraction assay and Western-blot assay to detect the expression of EBP1 in mRNA level and protein level, respectively. [Result] There were the kinds of amino acids including arginine, alanine, asparagine, glutamine, asparagine and asparagine

收稿日期: 2019-12-04

修回日期: 2020-03-30

网络首发时间: 2020-07-24 08:05:20

*基金项目: 国家自然科学基金面上项目 (31871396, 31571444, 31900232); 国家自然科学基金青年项目 (31400232)。

作者简介: [#]对本文贡献等同, 为并列第一作者。李婷婷 (1995—), 女, 湖南娄底人, 在读硕士研究生, 主要从事植物分子生物学研究。E-mail: 1040942853@qq.com; 宋丽梅 (1988—), 女, 山东潍坊人, 博士后, 助理教授, 主要从事植物分子信号转导研究。

E-mail: songlimei@hnu.edu.cn

**通信作者 Corresponding author: 于峰 (1984—), 男, 湖南永州人, 博士, 教授, 主要从事植物分子信号转导研究。E-mail: feng_yu@hnu.edu.cn

网络首发地址: <https://kns.cnki.net/kcms/detail/53.1044.S.20200722.1516.001.html>



which could be used as potential organic nitrogen sources. It also showed that the established system was feasible. The fluorescence observation essay showed that glycine, alanine, arginine and glutamine could promote the fluorescence signals of *35S::EBP1-GFP*; the ribosome extraction essay showed that glycine, alanine and arginine significantly promoted the mRNA expression of EBP1; and the Western-blot essay showed that alanine and glutamine promoted the accumulation of EBP1 protein at the protein level. [**Conclusion**] Arginine, alanine, asparagine, glutamine, aspartic acid and glycine can be used as potential organic nitrogen sources for plant absorption and utilization. Moreover, alanine can promote the protein accumulation of EBP1 at the mRNA and protein levels. Exogenous amino acids regulate the growth and development of plants by affecting proteins synthesis.

Keywords: nitrogen deficiency; amino acid; *35S::EBP1-GFP*; protein synthesis

氮元素在自然界中广泛存在, 是植物生长发育最重要的大量元素之一。氮元素不仅是蛋白质、核酸及磷脂等生物大分子的重要组成部分; 同时也参与酶、叶绿素及植物激素等重要化合物的构成^[1]。氮元素缺乏会导致蛋白质等含氮物质的合成过程受限、叶绿素含量及光合速率下降、细胞分裂速度减慢以及细胞伸长受阻, 进而抑制植物的生长发育^[2]。

植物所利用的氮元素主要来自土壤或水中的可溶性有机氮化合物 (如尿素、氨基酸和多胺等) 及无机氮化合物^[3]。土壤中的氨基酸主要来源于腐烂生物体蛋白质及短肽的分解, 因此 L 型氨基酸是土壤中氨基酸的主要类型^[4-6]。与菌根 (包括外生菌根、丛枝菌根及杜鹃科菌根) 共生的植物及某些没有菌根的植物都能吸收氨基酸形式的有机氮^[7], 且植物根系吸收氨基酸的亲和力与土壤微生物相同^[8-10]。这些研究结果表明: 氨基酸是植物潜在的氮源。然而另有研究表明: 不具有菌根的植物可能无法吸收利用氨基酸。在失去菌根的情况下, 蔓越莓及桉树对甘氨酸、组氨酸、精氨酸和蛋白质 BSA 的利用能力显著降低^[11-12]。用 1~10 mmol/L 氨基酸处理烟草原生质体后, 发现所有氨基酸均对其有毒害作用^[13]。同时另一项研究表明: 以谷氨酰胺作为唯一氮源, 相较于有菌根的植物, 没有菌根的植物生长得更好, 且谷氨酰胺能与其他有毒害的氨基酸产生拮抗作用^[14-15]。少根紫萍在含谷氨酰胺、谷氨酸和天冬酰胺的培养基中能够正常生长, 而精氨酸、异亮氨酸和缬氨酸则会抑制其生长^[16]。显然, 植物利用有机氮的相关研究结论是相互矛盾的^[17]。

ErbB3-binding protein 1 (以下简称 EBP1) 是

受体酪氨酸激酶 ErbB (erythroblastic leukemia viral oncogene homolog) 家族的磷酸化底物, 是一种在动植物进化上都十分保守的 DNA 和 RNA 结合蛋白, 调控动植物生长发育和应激反应等^[18]。马铃薯块茎生长早期, 蔗糖诱导 EBP1 快速表达。通过过表达或沉默 EBP1 在马铃薯发育正常的前提下调节其叶片和块茎的生长, 从而调节马铃薯的产量。EBP1 影响器官生长的细胞基础表明: EBP1 促进分生组织细胞的增殖, 产生更多但更小的细胞。在有丝分裂后的细胞中, EBP1 促进细胞的生长, 最终形成更大的细胞^[19]。本课题组前期研究发现: 在拟南芥中, EBP1 与受体激酶 FERONIA (FER) 相互作用后调控细胞生长^[20]。本研究拟利用 *35S::EBP1-GFP* 作为报告植物, 进一步分析外源氨基酸对植物体内蛋白质合成的影响。

1 材料与方法

1.1 试验试剂

PMSF (货号: 4100745-0005) 购自生工生物工程上海有限公司; 蛋白酶抑制剂 (货号: B14 001) 和磷酸酶抑制剂 (货号: B15001) 购于 Selleck Chemicals; RNase inhibitor (货号: N251A) 和 SYBR Premix Taq kit (货号: SQ121) 均购于一诺唯真生物公司; Thermo 逆转录试剂盒 (货号: K168) 购自赛默飞公司; 其他生化试剂为国产分析纯。

1.2 植物材料及培养

植物材料: 野生型拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* L.) Columbia-0 生态型 (Col-0), *35S::EBP1-GFP* 植物材料由中南大学生命科学学院李驰宇老师提供。培养条件: 光周期为 16 h 光照/8 h 黑暗, 温

度 (22 ± 4) °C, 光照强度为 80 μmol/(m²·s)。

1.3 方法

1.3.1 Col-0 子叶对不同氨基酸的响应表型

将拟南芥 Col-0 种子在 75% 酒精里消毒 5 min, 无菌水冲洗 1 次, 然后加入 15% 次氯酸钠消毒 5 min, 无菌水冲洗 4 次, 将消毒好的种子置于 4 °C, 春化 3 d。将春化好的种子点种于正常 1/2 MS 固体培养基 (CK)、完全缺氮 1/2 MS 固体培养基 (N-deficiency) 以及含有 3 mmol/L 16 种氨基酸 (表 1) 的缺氮 1/2 MS 固体培养基 (大量元素成分及含量: 18.685 4 mmol/L KCl、2.992 8 mmol/L CaCl₂·2H₂O、1.501 1 mmol/L MgSO₄·H₂O 和 1.249 2 mmol/L KH₂PO₄; 微量元素成分及含量: 0.005 mmol/L KI、0.100 3 mmol/L H₃BO₃、0.997 3 mmol/L MnSO₄·4H₂O、0.029 9 mmol/L ZnSO₄·7H₂O、0.001 0 mmol/L Na₂MoO₄·2H₂O、0.000 1 mmol/L GuSO₄·5H₂O 和 0.000 1 mmol/L CoCl₂·6H₂O; 有机成分及含量: 0.555 1 mmol/L 肌醇、0.004 1 mmol/L 烟酸、0.002 4 mmol/L VB₆、0.003 0 mmol/L VB₁ 和 0.026 6 mmol/L 甘氨酸; 铁盐成分及含量: 0.100 0 mmol/L FeSO₄·7H₂O 和 0.100 2 mmol/L Na₂-EDTA·2H₂O) 上, 水平放置在 22 °C 长日照培养箱中。使其生长 10 d, 然后拍照, 测量其鲜质量和干质量, 并进行叶绿素提取。试验重复 3 次。

表 1 16 种氨基酸
Tab. 1 The list of 16 amino acids

名称 Chinese name	英文缩写 abbreviation	名称 Chinese name	英文缩写 abbreviation
丙氨酸	Ala	组氨酸	His
精氨酸	Arg	异亮氨酸	Ile
天冬酰胺	Asn	亮氨酸	Leu
天冬氨酸	Asp	赖氨酸	Lys
半胱氨酸	Cys	蛋氨酸	Met
谷氨酰胺	Gln	脯氨酸	Pro
谷氨酸	Glu	苏氨酸	Thr
甘氨酸	Gly	缬氨酸	Val

1.3.2 干鲜质量测量

将每组处理取 100 株植物用电子天平称量并记录。然后将样品放置烘箱内, 105 °C 杀青 30 min, 5 °C 高温烘 24 h 至恒质量, 用电子天平称得干质量并记录。相对鲜质量=(试验组鲜质量/对照组鲜质量)×100%, 相对干质量=(试验组干质量/对照组干质量)×100%。试验重复 3 次。

1.3.3 叶绿素提取

剪取植株地上部分并称质量记录后放入 1.5 mL 离心管中, 离心管外包裹 1 层锡箔纸避光。加入 1 mL 80% 丙酮, 避光后放入 4 °C 冰箱过夜。将提取液分别在 645、663 和 470 nm 处测吸光值, 并利用公式计算: 叶绿素 a 色素含量: $C_a=12.21A_{663}-2.81A_{645}$, 叶绿素 b 色素含量: $C_b=20.13A_{645}-5.03A_{663}$, $C_c=(1\ 000A_{470}-3.27C_a-104C_b)/229$, 总叶绿素色素含量: $C=C_a+C_b+C_c$, 叶绿含量 (mg/g) = $n\cdot C\cdot N/W$ 。式中, n 为提取液体积; C 为总叶绿素色素含量; N 为稀释倍数; W 为样品鲜质量^[21]。试验重复 3 次。

1.3.4 根长抑制试验

将消毒后并春化 3 d 的 Col-0 种子点种于 1/2 MS 固体培养基上, 垂直放置在 22 °C 长日照培养箱中, 使其生长 3 d 后将幼苗移放到含有 3 mmol/L 不同氨基酸的缺氮 1/2 MS 固体培养基中, 正常生长 4 d 后进行根长观察及统计。试验重复 3 次。

1.3.5 EBP1 蛋白响应氨基酸试验

Col-0 在正常固体 1/2 MS 培养基生长 4 d 后移至缺氮固体 1/2 MS 培养基生长 3 d。每组称取 0.1 g 生长了 7 d 的拟南芥幼苗, 置于含有缺氮 1/2 MS 液体培养基的 1.5 mL 离心管中 (试验组含 3 mmol/L 不同氨基酸), 置于光照培养箱处理 6 h, 去除反应液进行蛋白提取。蛋白提取试剂为 150 mmol/L NaCl、10 mmol/L MgCl₂、50 mmol/L HEPES (pH 7.5)、10 mmol/L KCl、5 mmol/L EDTA、1% Tritonx-100、10% 甘油、1% PMSF 和 1% Cocktail, Western-blot 检测。使用 β -actin (CMC, 货号: AT 0004) 检测上样平衡, 使用 EBP1 抗体检测 EBP1 的蛋白量。

1.3.6 荧光观察试验

将消毒后并春化 3 d 的 35S::EBP1-GFP 种子点种于 1/2 MS 固体培养基上, 垂直放置在 22 °C 长日照培养箱中。将生长 7 d 的拟南芥幼苗置于含有 1/2 MS 液体培养基的 1.5 mL 离心管中 (试验组含 3 mmol/L 不同氨基酸), 置于光照培养箱处理 12 h 后, 利用激光共聚焦显微镜进行荧光观察, 激发光为 488 nm。所有荧光图片均采用相同参数进行激光共聚焦扫描。

1.3.7 核糖体密度梯度离心试验

核糖体密度梯度离心方法参照文献^[22]所述。将消毒后并春化 3 d 的 Col-0 种子点种于 1/2 MS

固体培养基上,垂直放置在 22 ℃ 长日照培养箱中,使其生长 4 d 后,试验组移至含有 3 mmol/L 不同氨基酸的 1/2 MS 固体培养基中,对照组移至正常 1/2 MS 固体培养基中。生长 4 d 后,分别称取 0.5 g 幼苗。将幼苗研磨成细粉后加入提取液 (0.2 mol/L Tris-HCl, pH=7.5; 50 mmol/L KCl; 25 mmol/L MgCl₂, CHX 50 μg/mL, CRD 50 μg/mL, RNA 酶抑制剂 400 U/mL, Cocktail 10 μL, PMSF 10 μL), 样品抽提 1 h 后, 12 000 r/min, 4 ℃ 离心 15 min。取上清加入提前铺制好的蔗糖梯度 (10%~60%) 离心管中。30 000 r/min, 4 ℃, 离心 4 h 后将蔗糖各组分依次取出。每组平均分成 2 份,一份用于 A_{260 nm} 处的吸光值测定,另一份用于 RNA 的提取。

1.3.8 核糖体 RNA 的提取

在已经移入 750 μL 蔗糖组分的 1.5 mL 离心管中加入等体积的 TRIZOL 溶液,充分混匀。取 1 mL 混合物到新离心管中,并加入 200 μL 氯仿,充分颠倒混匀。静置 10 min 后,4 ℃, 12 000 r/min 离心 10 min。小心吸取中间透明的氯仿层到新的 1.5 mL 离心管中,不要吸到上下杂质。加入等体积 (约 600 μL) 的异丙醇溶液。−20 ℃ 过夜沉淀后,4 ℃, 12 000 r/min 离心 10 min。去上清,用 75% 酒精洗 2 次。去上清并风干。加入适量的 ddH₂O 溶解核糖体 RNA 并保存于 −80 ℃。

1.3.9 核糖体 RNA 逆转录及 qRT-PCR 分析

利用 Takara 逆转录试剂盒 (RR047A, Takara) 对核糖体 RNA 进行 DNA 消化及逆转录使之成为 cDNA。通过定量 PCR 定量 *EBP1* 在转录水平上的表达量。以拟南芥 *β-actin* (AT3G18780) 作为内参。

1.4 数据分析

采用 GraphPad Prism 7.0 进行数据整理、作图,用 SPSS 17.0 中的 one-way ANOVA 进行不同氨基酸处理下待测指标间的差异性检验, LSD 多重比较。所有数据处理均做标准误差分析。P<0.05 具有统计学意义。

2 结果与分析

2.1 拟南芥对不同氨基酸的响应

当氮素供应不足时,植物子叶表现为叶面积缩小,叶片发黄发白,甚至干枯,进而导致植物生物量降低,这些都是植物缺氮的典型表现^[4]。

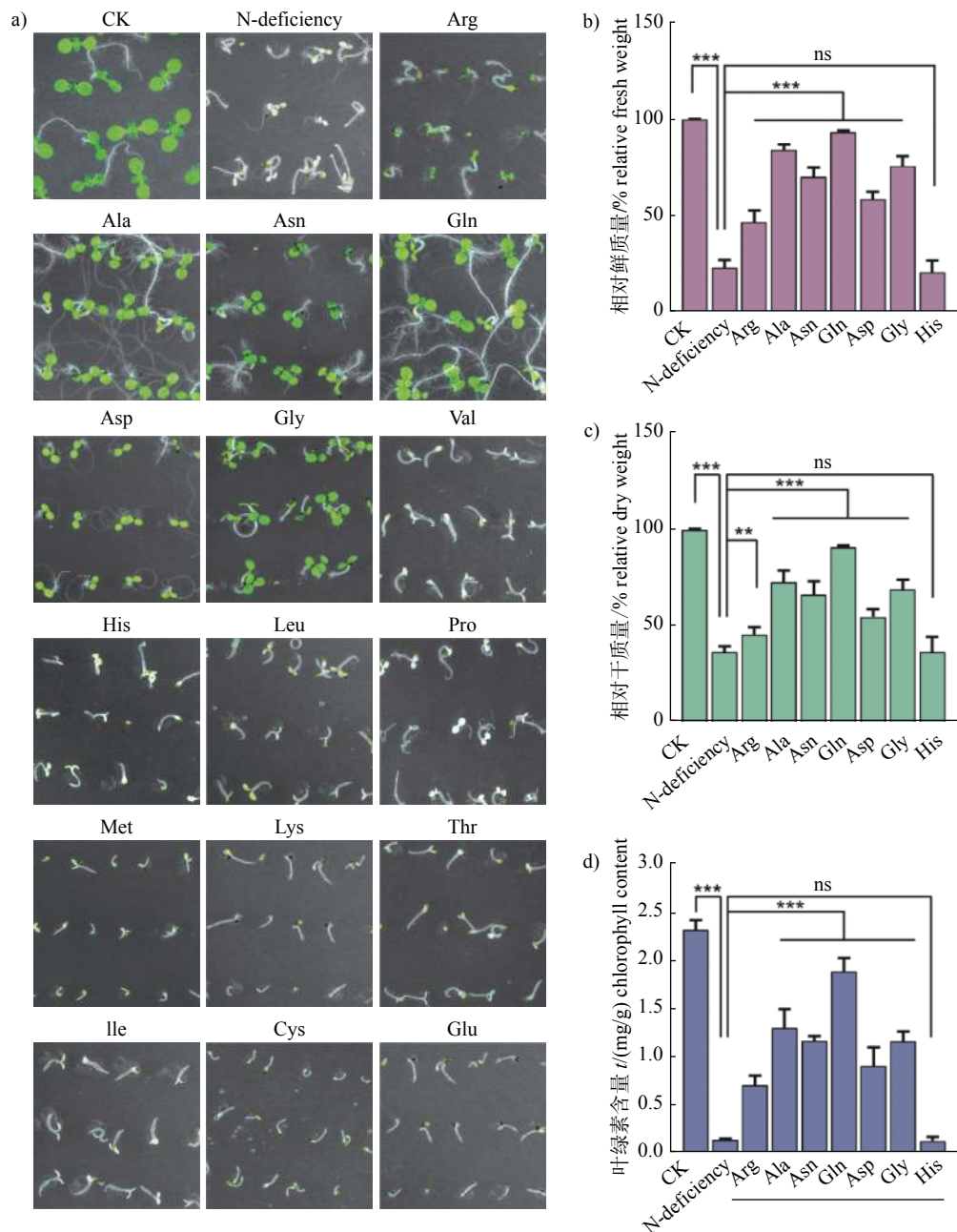
观察发现:缺氮处理后,Col-0 的鲜质量、干质量及叶绿素含量均显著低于 CK。而添加氨基酸后,与缺氮处理相比,除了 Arg、Ala、Asn、Gln、Asp 以及 Gly 这 6 种氨基酸能使由缺氮导致 Col-0 发白的子叶恢复成绿色外,其他 10 种氨基酸均不能恢复。Col-0 对可吸收的 6 种氨基酸的响应程度不一致。其中,对 Gln 最敏感,Ala、Asn、Gly 和 Asp 次之,Arg 敏感性最低 (图 1a)。选取上述 6 种能恢复 Col-0 子叶绿色的氨基酸及 1 种不能恢复的氨基酸组氨酸 (His) 处理 Col-0,测定其鲜质量、干质量及叶绿素含量。结果表明:与缺氮处理相比,加入 Arg、Ala、Asn、Gln、Asp 和 Gly 后 Col-0 的鲜质量及干质量均显著增加 (P<0.05),相反 His 处理差异不显著 (P>0.05)。叶绿素含量与鲜质量及干质量这两项指标类似,Arg、Ala、Asn、Gln、Asp 和 Gly 处理后均显著增加 (P<0.05),而 His 处理对其无影响 (P>0.05) (图 1b~d)。由此可见,本研究新建立的系统切实可行,且 Arg、Ala、Asn、Gln、Asp 和 Gly 可作为潜在的有机氮源被拟南芥吸收利用。

2.2 氨基酸对拟南芥根系的影响

所有的细胞活动都需要协调营养代谢,根是吸收和响应营养物质的主要组织,当氮素供应不足会导致植物根系伸长以寻找土壤中的氮元素^[23]。本试验研究发现:缺氮处理后,Col-0 主根长度显著高于未处理 (P<0.05),并伴有侧根发生 (图 2a),与前期研究报道的试验结果一致^[24]。研究发现:添加不同氨基酸对植物根长的影响不一致 (图 2a、b)。添加 Gln 后,Col-0 根系显著缩短 (P<0.05),且趋向于恢复至未处理条件下 (Mock) 的根长,而对 Ala 和 Asn 表现不敏感; Gly 和 Asp 显著促进 Col-0 根系伸长 (P<0.05)。此外,添加 Arg 后,Col-0 根长显著缩短,且短于 Mock (P<0.05),但子叶发育正常。而添加另外 7 种氨基酸后,Col-0 根长显著缩短且出现子叶发育不正常的现象,表明这些氨基酸可能抑制植物的生长。以上试验结果表明:不同氨基酸对植物根系生长的作用存在差异。当氮素供应不足时,植物可能通过根系吸收 Gln 作为氮源来维持正常的生长发育。

2.3 氨基酸促进 35S::EBP1-GFP 的荧光积累

前期研究表明: *AtEBP1-GFP* 即使通过 35S 强启动子启动表达也无法在除保卫细胞外的其他



注: a) 不同氨基酸处理拟南芥 Col-0 表型; b)-d) 不同氨基酸处理下, Col-0 的鲜质量、干质量及叶绿素含量。数据以 mean±SD (n=3) 表示, 统计学方法为 one-way ANOVA (单因素方差分析), * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, ns 表示无显著性差异; 下同。
Note: a) phenotypic analysis of *Arabidopsis* Col-0 treatment with different amino acid; b)-d) the relative fresh weight, relative dry weight and chlorophyll content of different genotypes grown under different amino acids. Values are means±SD (n=3) from three independent experiments. Asterisks above bars indicate significant differences using one-way ANOVA, * $P<0.05$, ** $P<0.01$, *** $P<0.001$, ns showed no significant difference; the same as below.

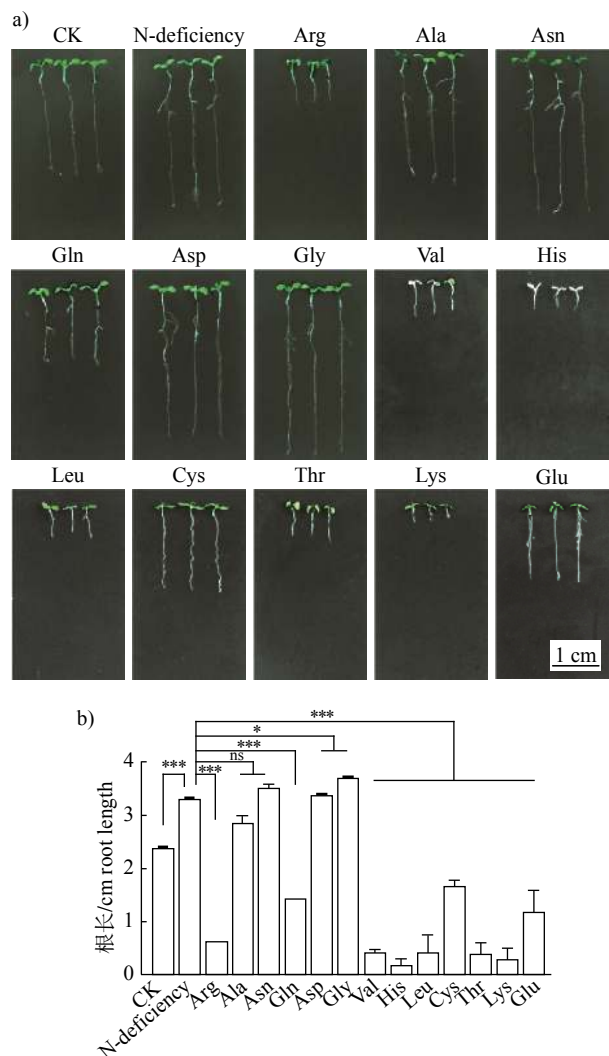
图 1 拟南芥对不同氨基酸的响应
Fig. 1 Response of exogenous amino acids in *Arabidopsis*

细胞中检测到绿色荧光^[24]。由图 3 所示: 35S::EBP1-GFP 未处理时, 只能在根中检测到微弱的荧光信号, 与前期研究报道一致^[24]。添加 Gly 和 Ala 后, 在其细胞核中检测到强烈的荧光信号; 而 Gln 和 Arg 处理后, 35S::EBP1-GFP 的荧光大

量聚集在细胞膜上。综上所述, Gly、Ala、Arg 和 Gln 能促进 35S::EBP1-GFP 的荧光积累。

2.4 氨基酸调节 EBP1 的翻译

由图 4 可知: 与未处理相比, Gly、Arg 及 Ala 显著促进 EBP1 mRNA 的表达; 而 Gln 处理



注：a) 不同氨基酸处理下的根长表型；b) 根长统计。
Note: a) root length phenotypic analysis of *Arabidopsis* Col-0 treatment with different amino acids; b) the statistics of root length.

图 2 氨基酸对 Col-0 根系的影响

Fig. 2 Effect of amino acids on the root length in Col-0

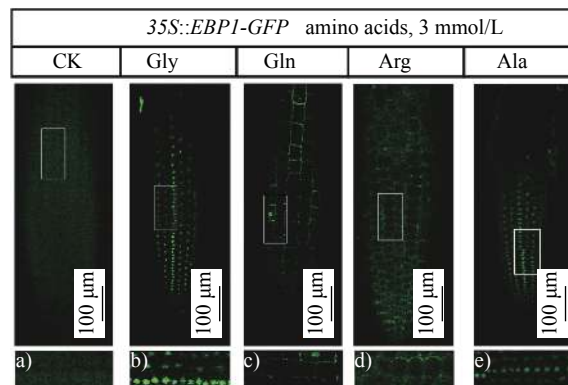
后 *EBP1* mRNA 的相对表达量较未处理无显著差异。综上所述，Gly、Arg 和 Ala 能在翻译层面促进 *EBP1* 的蛋白质积累。

2.5 氨基酸促进 EBP1 蛋白质的积累

Western-blot 试验结果 (图 5) 表明：与未处理相比，缺氮处理后，*EBP1* 蛋白量降低。添加 Ala 及 Gln 后，*EBP1* 蛋白量增加；Gly 对 *EBP1* 蛋白量没有影响；而 Arg 和 Asn 处理后其蛋白量比缺氮处理略低。综上所述，Ala 和 Gln 在蛋白水平上促进 *EBP1* 蛋白质的积累。

3 讨论

氨基酸在动植物中的功能多样，它不仅是蛋



注：a)-e) 白色方框放大部位。所有荧光图片均采用相同参数进行激光共聚焦扫描。

Note: a)-e) the enlarged part of the white box. All the fluorescence images were scanned with the same parameters.

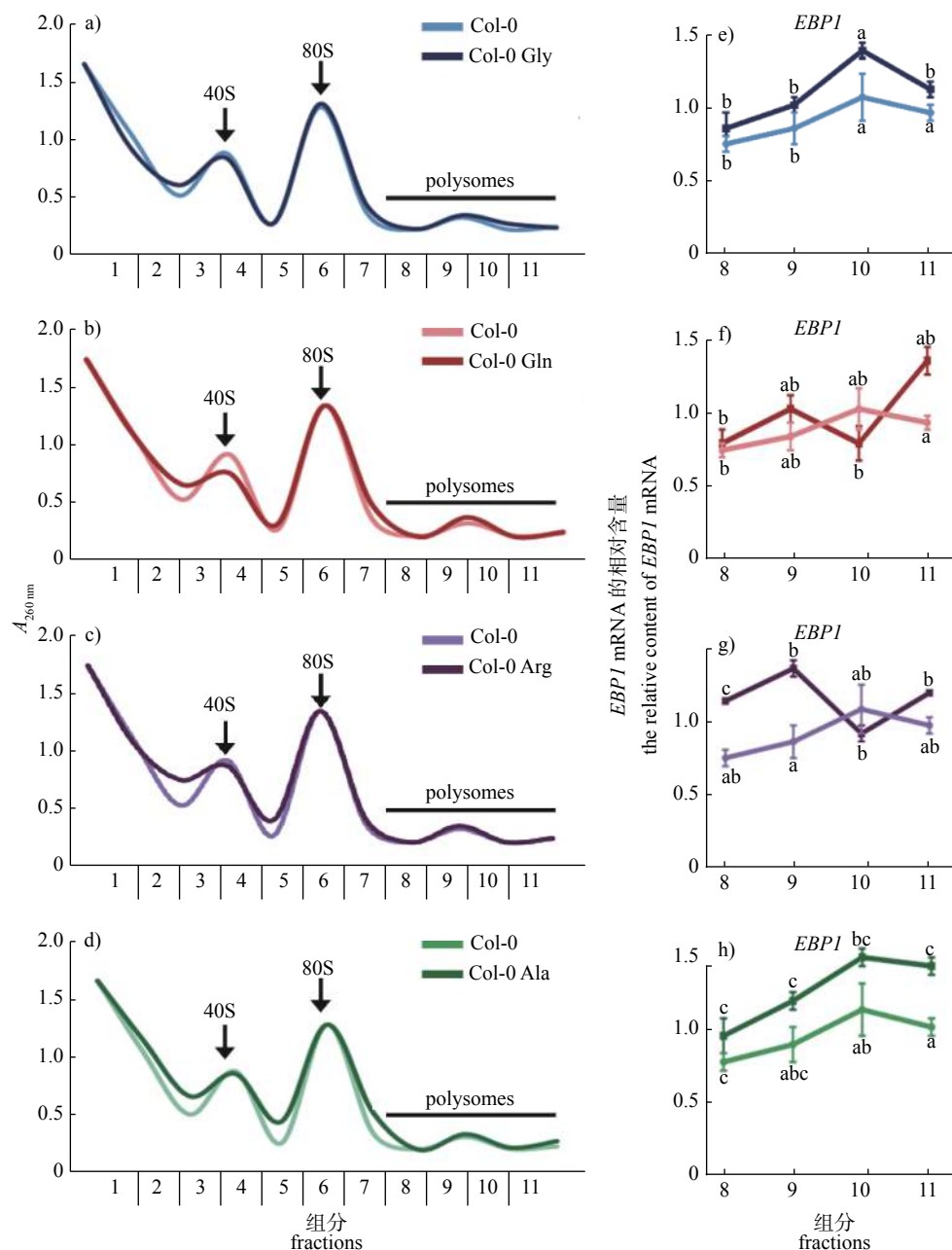
图 3 氨基酸诱导 35S::EBP1-GFP

Fig. 3 Amino acid induced 35S::EBP1-GFP

白质和其他含氮化合物合成的重要前体，还参与体内主要代谢途径的调控。当氨基酸不足时，体内多种机制参与调节维持体内平衡，包括快速停止蛋白质合成，加快氨基酸的转运与合成，以及加强自噬作用^[4]。

本研究发现：当氮素供应不足时，拟南芥 Col-0 能够吸收利用外源氨基酸，且不同氨基酸对植物生长发育的影响存在差异，其中精氨酸、丙氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、天冬氨酸和甘氨酸能恢复 Col-0 的缺氮表型。除丙氨酸为非极性疏水氨基酸外，其他 5 种氨基酸均为极性亲水氨基酸。显然，氨基酸的极性与其是否能作为植物的有机氮源可能无关。尽管本研究证实了拟南芥能吸收氨基酸作为有机氮源，然而，目前拟南芥采用何种特定的氨基酸受体识别并将外源氨基酸转运至体内仍有待研究。

蛋白质合成是一个复杂的、需要能量和严格控制的过程，在细胞生长、增殖以及分化中起着重要作用。雷帕霉素的靶标蛋白 (the target of rapamycin, TOR) 属于磷脂酰肌醇-3 激酶相关激酶，具有丝氨酸和苏氨酸激酶活性，在进化上十分保守。TOR 在整合应激、营养和能量等相关信号以及调节蛋白质的合成过程中发挥关键作用，参与调节细胞生长与增殖，调控细胞周期及自噬^[25-26]。在哺乳动物中，mTOR (the mammalian target of rapamycin) 由 2 个具有不同功能的复合物组成，分别为 mTORC1 及 mTORC2^[27]。mTORC1 通过各种下游效应因子正调控细胞生长所需要的蛋白



注: a)-c) Gly、Gln、Arg 和 Ala 处理拟南芥 Col-0, 各核糖体组分在 $A_{260\text{nm}}$ 处的吸光度值曲线。核糖体 40S、80S 以及多聚核糖体 (polysomes) 已在图中标记; e)-h) qRT-PCR 检测各处理组多聚核糖体组分中 *EBP1* 的 mRNA 含量。 β -actin 用作内参基因。

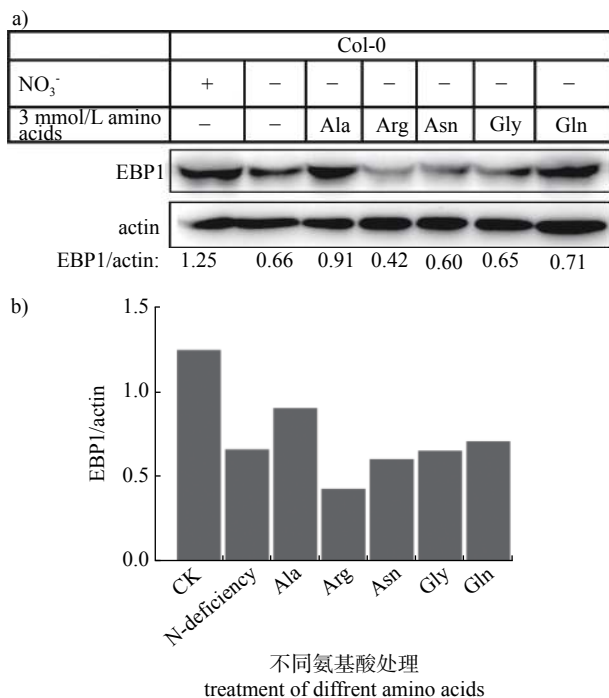
Note: a)-c) *Arabidopsis* Col-0 treated with Gly, Gln, Arg and Ala, the absorbance curve of each ribosome component at $A_{260\text{nm}}$. 40S, 80S and polyribosome components are shown in the diagram; e)-h) qRT PCR was used to detect the mRNA of *EBP1* in the polyribosome components of each treatment group. β -actin is used as a reference gene.

图4 Ala、Arg 和 Gly 调节 *EBP1* mRNA 的翻译效率

Fig. 4 Translation efficiency of *EBP1* mRNA regulated by Ala, Arg and Gly

质合成。mTORC1 通过磷酸化真核细胞起始因子 4E (eIF4E) 结合蛋白 1 (4E-BP1) 和 p70 核糖体 S6 蛋白激酶 1 (S6K1) 促进蛋白质合成。4E-BP1 的磷酸化使其与 eIF4E 解离, 失去对 eIF4E 的抑制作用, eIF4E 从而与 eIF-4A 和 eIF-4G 结合, 形成 eIF-4F 复合物, 并与 mRNA 帽结合, 促进

帽依赖性翻译起始^[28]。S6K 能磷酸化并激活 40S 核糖体蛋白 S6, 进而提高 5'端含有末端寡聚嘧啶 (5' tract of oligopyrimidine, 5'TOP) 的一类 mRNA 的翻译效率。5'TOP mRNA 占细胞内总 RNA 的 15%~20%, 编码多种蛋白质翻译所需成分, 如核糖体蛋白、延伸因子和 polyA 结合蛋白



注: a) EBP1 蛋白量, 以 β -actin 作为内参; b) 利用 image J 软件对图 5a 条带的灰度值测定。

Note: a) EBP1 protein was detected, and β -actin was used as reference protein; b) ImageJ was used to measure the gray value of Fig.5a.

图 5 氨基酸对 EBP1 蛋白的影响

Fig. 5 Effect of amino acids on EBP1 protein

等。氨基酸, 尤其是亮氨酸、谷氨酰胺和精氨酸, 对于激活 mTORC1 是必须的信号, 因为当氨基酸缺乏时, 生长因子等刺激并不能有效地激活 mTORC1。此外, mTORC1 的活性与细胞内的能量状态密切相关^[29]。动物中, 越来越多的研究证明氨基酸可以作为信号分子参与细胞信号转导过程^[30]。这让我们猜想到植物同样能够感受氨基酸, 并且有理由相信某些外源氨基酸不仅作为氮源, 而且作为一种信号分子参与到信号通路调节中来。

EBP1 主要在拟南芥分生组织中大量表达, 位于 TOR 的下游并部分依赖于 TOR 的活性, 受到蔗糖的诱导。低糖条件下, EBP1 沉默突变体的根系生长受到抑制。在人类细胞中, EBP1 与核糖核蛋白复合体中调节蛋白质合成的部分相互作用, 调控核糖体的生物合成及 mRNA 的翻译。拟南芥中, EBP1 同样与核糖体相关, 且 EBP1 的沉默阻碍了 rRNA 的加工^[31]。而本研究发现甘氨酸、丙氨酸、谷氨酰胺和精氨酸分别在 mRNA 和蛋白水平上促进 EBP1 的积累, 调控拟南芥 Col-0

的生长发育。这让我们推测其可能的机制是拟南芥 Col-0 感受氨基酸后, 激活 TOR 信号, 促进 EBP1 蛋白质的积累, 进一步调控核糖体的生物合成及 mRNA 的翻译, 从而调控拟南芥 Col-0 的生长发育。

4 结论

本研究利用 35S::EBP1-GFP 作为报告植物分析了外源氨基酸对植物体内 EBP1 蛋白质合成的影响, 发现氮素供应不足时, 不同氨基酸对拟南芥 Col-0 生长发育的影响不一致, 且精氨酸、丙氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、天冬氨酸和甘氨酸可作为潜在的有机氮源供植物吸收利用; 结合荧光观察、核糖体提取及 Western-blot 的试验结果, 说明丙氨酸能促进 EBP1 的蛋白质积累。氨基酸被植物吸收后影响植物体内 EBP1 蛋白质的合成从而影响植物的生长发育。

[参考文献]

- [1] EVANS J R. Photosynthesis and nitrogen relationships in leaves of C3 plants[J]. Oecologia, 1989, 78(1): 9. DOI: 10.1007/BF00377192.
- [2] MEI H S, THIMANN K V. The relation between nitrogen deficiency and leaf senescence[J]. Physiology Plant, 1984, 62: 157. DOI: 10.1111/j.1399-3054.1984.tb00364.x.
- [3] NÄSHOLM T, EKBLAD A, NORDIN A, et al. Boreal forest plants take up organic nitrogen[J]. Nature, 1998, 392(6679): 914. DOI: 10.1038/31921.
- [4] VIRTANEN A I, LINKOLA H. Organic nitrogen compounds as nitrogen nutrition for higher plants[J]. Nature, 1946, 158: 515. DOI: 10.1038/158515a0.
- [5] WRIGHT D E. Amino acid uptake by plant roots[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1962, 97(1): 174. DOI: 10.1016/0003-9861(62)90061-9.
- [6] FORSUM O, SVENNERSTAM H, GANETEG U, et al. Capacities and constraints of amino acid utilization in *Arabidopsis*[J]. New Phytologist, 2008, 179(4): 1058. DOI: 10.1111/j.1469-8137.2008.02546.x.
- [7] PERSSON J, NÄSHOLM T. Amino acid uptake: a widespread ability among boreal forest plants[J]. Ecology Letters, 2008, 4(5): 434. DOI: 10.1046/j.1461-0248.2001.00260.x.
- [8] SHOBERT C, KOMOR E. Amino acid uptake by *Ricinus communis* roots: characterization and physiological significance[J]. Plant Cell and Environment, 2006, 10(6): 493. DOI: 10.1111/j.1365-3040.1987.tb01827.x.
- [9] THEODORE K, DAVID A, RUSSELL K, et al. Non-mycorrhizal uptake of amino acids by roots of the alpine sedge *Kobresia myosuroides*: implications for the alpine nitrogen cycle[J]. Oecologia, 1996, 108(3): 488. DOI:

- 10.1007/bf00333725.
- [10] NÄSHOLM T, KIELLAND K, GANETEG U. Uptake of organic nitrogen by plants[J]. New Phytologist, 2009, 182(1): 31. DOI: [10.1111/j.1469-8137.2008.02751.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.2008.02751.x).
- [11] STRIBLEY D P, READ D J. The biology of mycorrhiza in the Ericaceae. VII: the relationship between mycorrhizal infection and the capacity to utilise simple and complex organic nitrogen sources[J]. New Phytologist, 1980, 86: 365. DOI: [10.1111/j.1469-8137.1980.tb01677.x](https://doi.org/10.1111/j.1469-8137.1980.tb01677.x).
- [12] TURNBULL M H, GOODALL R, STEWART G R. The impact of mycorrhizal colonisation upon nitrogen source utilization and metabolism in seedlings of *Eucalyptus grandis* hill ex maiden and *Eucalyptus maculata* hook[J]. Plant, Cell & Environment, 1995, 18: 1386. DOI: [10.1111/j.1365-3040.1995.tb00199.x](https://doi.org/10.1111/j.1365-3040.1995.tb00199.x).
- [13] BONNER C A, RODRIGUES A M, MILLER J A, et al. Amino acids are general growth inhibitors of *Nicotiana glauca* in tissue culture[J]. Physiologia Plantarum, 2006, 84(3): 319. DOI: [10.1111/j.1399-3054.1992.b04671.x](https://doi.org/10.1111/j.1399-3054.1992.b04671.x).
- [14] BONNER C A, WILLIAMS D S, ALDRICH H C, et al. Antagonism by L-glutamine of toxicity and growth inhibition caused by other amino acids in suspension cultures of *Nicotiana glauca*[J]. Plant Science (Shannon), 1996, 113(1): 43. DOI: [10.1016/0168-9452\(95\)04284-9](https://doi.org/10.1016/0168-9452(95)04284-9).
- [15] BONNER C A, JENSEN R A. Recognition of specific patterns of amino acid inhibition of growth in higher plants, uncomplicated by glutamine-reversible 'general amino acid inhibition'[J]. Plant Science, 1997, 130(2): 133. DOI: [10.1016/S0168-9452\(97\)00213-6](https://doi.org/10.1016/S0168-9452(97)00213-6).
- [16] BOLLARD E G. A comparative study of the ability of organic nitrogenous compounds to serve as sole sources of nitrogen for the growth of plants[J]. Plant and Soil, 1966, 25(2): 153. DOI: [10.1007/BF01347815](https://doi.org/10.1007/BF01347815).
- [17] EPSTEIN E, BLOOM J A. Mineral nutrition in plants: principles and perspectives[M]. 2nd ed. Sunderland, Mass: Sinauer Associates, 2005.
- [18] HUA Z, KRYSTYNA M M, MARTINDALE J L, et al. Post-transcriptional regulation of androgen receptor mRNA by an ErbB3 binding protein 1 in prostate cancer[J]. Nucleic Acids Research, 2010, 38(11): 3619. DOI: [10.1093/nar/gkq084](https://doi.org/10.1093/nar/gkq084).
- [19] HORVATH B M, MAGYAR Z, ZHANG Y, et al. EBP1 regulates organ size through cell growth and proliferation in plants[J]. European Molecular Biology Organization Journal, 2006, 25(20): 4909. DOI: [10.1038/sj.emboj.7601362](https://doi.org/10.1038/sj.emboj.7601362).
- [20] LI C Y, LIU X M, QIANG X N, et al. EBP1 nuclear accumulation negatively feeds back on FERONIA-mediated RALF1 signaling[J]. PLoS Biology, 2018, 16(10): e2006340. DOI: [10.1371/journal.pbio.2006340](https://doi.org/10.1371/journal.pbio.2006340).
- [21] LICHTENTHALER H K. Chlorophyll and carotenoids: pigments of photosynthetic membranes[J]. Methods Enzymol, 1987, 148: 350. DOI: [10.1016/0076-6879\(87\)48036-1](https://doi.org/10.1016/0076-6879(87)48036-1).
- [22] LI W, MA M, FENG Y, et al. EIN2-directed translational regulation of ethylene signaling in *Arabidopsis*[J]. Cell, 2015, 163: 670. DOI: [10.1016/j.cell.2015.09.037](https://doi.org/10.1016/j.cell.2015.09.037).
- [23] HUTCHINGS M J. The effects of environmental heterogeneity on root growth and root/shoot partitioning[J]. Annals of Botany, 2004, 94(1): 1. DOI: [10.1093/aob/mch111](https://doi.org/10.1093/aob/mch111).
- [24] ZHANG W K, SHEN Y G, HE X J, et al. Characterization of a novel cell cycle-related gene from *Arabidopsis*[J]. Journal of Experimental Botany, 2015, 56(413): 807.
- [25] RAI V K. Role of amino acids in plant responses to stresses[J]. Biologia Plantarum, 2002, 45(4): 481. DOI: [10.1023/a:1022308229759](https://doi.org/10.1023/a:1022308229759).
- [26] WULLSCHLEGER S, LOEWITH R, HALL M N. TOR signaling in growth and metabolism[J]. Cell, 2006, 124(3): 471. DOI: [10.1016/j.cell.2006.01.016](https://doi.org/10.1016/j.cell.2006.01.016).
- [27] KIM J, GUAN K L. Amino acid signaling in TOR activation[J]. Annual review of Biochemistry, 2011, 80(1): 1001. DOI: [10.1146/annurev-biochem-062209-094414](https://doi.org/10.1146/annurev-biochem-062209-094414).
- [28] RICHTER J D, SONENBERG N. Regulation of cap-dependent translation by eIF4E inhibitory proteins[J]. Nature, 2005, 433(7025): 477. DOI: [10.1038/nature03205](https://doi.org/10.1038/nature03205).
- [29] 秦正红. 自噬生物学与疾病基础卷[M]. 2版. 北京: 科学出版社, 2015.
- [30] LOEWITH R, JACINTO E, WULLSCHLEGER S, et al. Two TOR complexes, only one of which is rapamycin sensitive, have distinct roles in cell growth control[J]. Molecular Cell, 2002, 10(3): 457. DOI: [10.1016/s1097-2765\(02\)00636-6](https://doi.org/10.1016/s1097-2765(02)00636-6).
- [31] LOKDARSHI A, PAPDI C, PETTKÓ-SZANDTNER A, et al. ErbB-3 binding protein 1 regulates translation and counteracts 3 retinoblastoma related to maintain the root meristem[J]. Plant Physiology, 2020, 182(2): 919. DOI: [10.1104/pp.19.00805](https://doi.org/10.1104/pp.19.00805).

责任编辑: 何承刚