

• 生物技术与方法 •

拟南芥表皮模式因子 EPFs 的表达纯化与功能鉴定

金竹萍, 李澄, 王磊, 裴雁曦

山西大学 生命科学学院 特色植物资源研究与利用山西省重点实验室, 山西 太原 030006

金竹萍, 李澄, 王磊, 等. 拟南芥表皮模式因子 EPFs 的表达纯化与功能鉴定. 生物工程学报, 2020, 36(4): 792–800.

Jin ZP, Li C, Wang L, et al. Prokaryotic expression, purification and functional identification of epidermal pattern factors in *Arabidopsis thaliana*. Chin J Biotech, 2020, 36(4): 792–800.

摘要: 气孔密度是影响农作物产量的重要形态学指标。文中以拟南芥气孔发育相关的表皮模式因子 (EPFs) 为研究对象, 构建原核表达载体并进行蛋白表达和纯化, 并与新型气体信号分子硫化氢 (H_2S) 建立联系。首先克隆基因 *AtEPF1*、*AtEPF2* 和 *AtEPFL9*, 构建 pET28a 表达载体; 然后对重组质粒 pET28a-*AtEPF1*、pET28a-*AtEPF2* 和 pET28a-*AtEPFL9* 进行酶切检测和测序, 结果显示重组载体构建成功; 分别转入大肠杆菌 BL21(DE3) 进行异丙基 β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导表达。优化后的表达条件: IPTG 诱导浓度分别为 0.5、0.3、0.05 mmol/L; 最适诱导温度分别为 28 °C、28 °C 和 16 °C; 最适诱导时间分别为 16 h、16 h 和 20 h; 经 Ni 琼脂糖凝胶柱纯化获得融合蛋白, 大小分别为 18 kDa、19 kDa 和 14.5 kDa 左右。将纯化到的 *AtEPF2* 和 *AtEPFL9* 蛋白分别处理拟南芥幼苗, 与对照相比, 其 H_2S 产率均有不同程度的变化, 且差异显著。即表皮模式因子 *AtEPFs* 影响植物内源 H_2S 信号的产生。为后续深入研究 H_2S 和 EPFs 对植物气孔发育影响的作用机制奠定基础, 对增加作物产量、增强植物抗逆性有重要意义。

关键词: 硫化氢, 气孔发育, 表皮模式因子, 载体构建, 蛋白纯化, 拟南芥

Prokaryotic expression, purification and functional identification of epidermal pattern factors in *Arabidopsis thaliana*

Zhuping Jin, Cheng Li, Lei Wang, and Yanxi Pei

Shanxi Key Laboratory of Research and Development Regional Plants, School of Life Sciences, Shanxi University, Taiyuan 030006, Shanxi, China

Abstract: Stomatal density is important for crop yield. In this paper, we studied the epidermal pattern factors (EPFs) related to stomatal development. Prokaryotic expression vectors were constructed to obtain EPFs. Then the relationship between EPFs

Received: June 27, 2019; **Accepted:** August 8, 2019

Supported by: National Natural Science Foundation of China (Nos. 31671605, 31672140).

Corresponding author: Yanxi Pei. Tel: +86-351-7018161; E-mail: peiyanxi@sxu.edu.cn

国家自然科学基金 (Nos. 31671605, 31672140) 资助。

网络出版时间: 2019-09-04

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20190904.1625.001.html>

and hydrogen sulfide (H_2S) was established. First, *AtEPF1*, *AtEPF2* and *AtEPFL9* were cloned and constructed to pET28a vectors. Then recombinant plasmids pET28a-*AtEPF1*, pET28a-*AtEPF2* and pET28a-*AtEPFL9* were digested and sequenced, showing successful construction. Finally, they were transformed into *E. coli* BL21(DE3) separately and induced to express by isopropyl β -D-galactoside (IPTG). The optimized expression conditions including IPTG concentration (0.5, 0.3 and 0.05 mmol/L), temperature (28 °C, 28 °C and 16 °C) and induction time (16 h, 16 h and 20 h) were obtained. The bands of purified proteins were about 18 kDa, 19 kDa and 14.5 kDa, respectively. In order to identify their function, the purified *AtEPF2* and *AtEPFL9* were presented to *Arabidopsis thaliana* seedlings. Interestingly, the H_2S production rate decreased or increased compared with the control, showing significant differences. That is, EPFs affected the production of endogenous H_2S in plants. These results provide a foundation for further study of the relationship between H_2S and EPFs on stomatal development, but also a possible way to increase the yield or enhance the stress resistance.

Keywords: hydrogen sulfide, stomatal development, epidermal pattern factor, vector construction, protein purification, *Arabidopsis thaliana*

气孔是由 2 个保卫细胞包围而成的开孔，多存在于叶片和茎，是植物表皮所特有的结构。气孔密度直接决定植物叶片进行光合作用的效率和作物产量，因此是农业生产中一个很重要的形态学指标。有资料表明，气孔的产生早于植物的维管、根、种子和花等其他组织器官，充分说明了气孔在植物的生长发育中的重要作用^[1]。气孔的发育遵循“单细胞间隔”原则，由植物的原表皮细胞开始，以不均等间隔分裂的方式组成了叶片表皮细胞的关键部分^[2-3]。研究发现，在模式植物拟南芥中表皮模式因子 (Epidermal pattern factors, EPFs) 家族基因编码细胞分泌型的、富集半胱氨酸的短肽，它们的生物功能大多被证明为调节气孔的发育及植物的生长^[4-5]。其中已经明确功能的是，EPF1 与 EPF2 在气孔发育调节中为负调控因子，EPFL9 为正调控因子^[6-8]，即 EPF1 和 EPF2 抑制气孔发育，而 EPFL9 促进气孔的发育。气孔的发育在形态学上表现为气孔数目和保卫细胞大小两个方面，决定着植物体光合与呼吸时 CO_2 和 O_2 的进出速度，从而调节植物对逆境胁迫的响应，最终影响农作物产量^[9]。

硫化氢 (Hydrogen sulfide, H_2S) 是近年来备受瞩目的一种新型气体信号分子，参与动植物体内很多生理过程，执行非常重要的生理功能。我们的前期研究发现， H_2S 通过与其他植物激素相

互作用，共同调节气孔运动，参与植物对干旱胁迫的响应^[10-17]。在实验过程中，同时发现 H_2S 处理对植物气孔的数目和大小也有影响。因此， H_2S 和 EPFs 在调控植物气孔发育中的作用有相似之处。本研究构建拟南芥表皮模式因子编码基因 *AtEPF1*、*AtEPF2* 和 *AtEPFL9* 的原核表达载体，经诱导表达纯化得到融合蛋白。将纯化到的蛋白分别处理拟南芥幼苗，测定其体内的 H_2S 产率变化，为后续开展气体信号 H_2S 和 EPFs 对拟南芥叶片气孔发育调节机制的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 实验材料

拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*, Col-0) 植株，原核表达载体 pET28a (Kan 抗性)，大肠杆菌菌株 DH5 α 及 BL21(DE3) 菌株，由实验室保存。

1.1.2 主要试剂

实验过程中所用反转录试剂盒 (5 \times All-In-One RT MasterMix(abm))、琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、提质粒试剂盒、限制性内切酶 (*Bam*H I / *Nhe* I)、Ligation-Free Cloning System (abm)、甘油、胰蛋白胨、氯化钠、酵母提取物、琼脂粉、卡那霉素 (Kan)、异丙基 β -D-硫代半乳糖苷 (IPTG)、引物合成等，均购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

1.1.3 主要仪器与设备

PCR 基因扩增仪 (杭州博日 TC-96/G/H9(b))、凝胶成像系统仪 (BIO-RAD 1708195)、高速离心机 (安徽中科中佳 HC-2062)、无菌操作工作台 (北京京仪 VS-1300L-U)、紫外分光光度计 (上海尤尼柯 UV-2100)、核酸电泳仪 (北京六一仪器厂 DYY-8C)、恒温振荡器 (太华 THZ-C)、压力蒸汽灭菌锅 (上海博迅 YXQ-LS-70A)、电热恒温水浴锅 (恒宇 XMTD-8222)、超声破碎仪 (宁波新芝 JY88-IIN) 等。

1.2 方法

1.2.1 *AtEPF1*、*AtEPF2* 和 *AtEPFL9* 基因的克隆及 pET28a 载体的双酶切

以 4 周龄的野生型拟南芥叶片为实验材料, 采用异硫氰酸胍/苯酚法提取 RNA, 用反转录试剂盒得到 cDNA。根据 NCBI 数据库提供的 *AtEPF1* (At2g20875)、*AtEPF2* (At1g34245) 和 *AtEPFL9* (At4g12970) 序列, 设计两端分别含有 *Bam*H I 和 *Nhe* I 酶切位点的引物, 引物序列见表 1。

首先, 以反转录得到的拟南芥 cDNA 为模板, 克隆 *AtEPF1*、*AtEPF2* 和 *AtEPFL9* 基因。经琼脂糖凝胶电泳检测克隆产物, 检测正确后切胶回收。同时, 将 pET28a 载体质粒用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Nhe* I 37 °C 双酶切处理 3 h, 得到线性化载体产物。琼脂糖凝胶电泳检测正确后, 切胶回收待用。

1.2.2 pET28a-*AtEPF1*、pET28a-*AtEPF2* 和 pET28a-*AtEPFL9* 重组质粒表达载体的构建

分别取目的基因 (*AtEPF1*、*AtEPF2* 和 *AtEPFL9*) 2 μL、双酶切线性化载体片段 (pET28a) 6 μL 和无缝连接酶 (5×ligation-free cloning master mix) 2 μL。再把目的基因 (*AtEPF1*、*AtEPF2* 和 *AtEPFL9*) 分别与双酶切线性化载体片段和无缝连接酶轻轻混匀, 冰上放置 30 min, 得到连接产物。

把连接后的产物用热激法转化大肠杆菌 DH5α, 培养过夜, 挑选菌落进行 PCR 鉴定, 将大小正确的条带切胶回收, 测序检测。

1.2.3 pET28a-*AtEPF1*、pET28a-*AtEPF2* 和 pET28a-*AtEPFL9* 原核表达载体的诱导表达

1) 提取重组质粒 pET28a-*AtEPF1*、pET28a-*AtEPF2* 和 pET28a-*AtEPFL9*, 分别转化于 BL21 感受态细胞中。37 °C 培养过夜后, 分别挑选单菌落在 LB 液体培养基 (Kan 抗性) 中, 37 °C、180 r/min 振荡培养过夜。

2) 预诱导菌株摸索蛋白诱导表达条件: 将培养的菌液按 1% 的比例接入含有 Kan 抗性的 LB 液体培养基中, 于 37 °C、180 r/min 条件下培养, 约 3–5 h 后, 紫外分光光度测得菌液的 OD_{600} 在 0.6–0.8 之间, 加 IPTG 至终浓度分别为 0、0.05、0.1、0.3、0.5、1、1.5 mmol/L, 分别在 16 °C 诱导培养 20 h、28 °C 诱导培养 16 h、37 °C 诱导培养 5 h 后取样。

表 1 引物序列

Table 1 The primer sequences

Primer name	Primer sequence (5'–3')	Restriction enzyme
<i>EPF1</i> -F	CAGCCATATGGCTAGCAGGCATTTACCAACATCCTCC	<i>Nhe</i> I
<i>EPF1</i> -R	GCTCGAATTCGGATCCTCAAGGGACAGGGTAGGACT	<i>Bam</i> H I
<i>EPF2</i> -F	CAGCCATATGGCTAGCATTTCGACGCCGCTAA	<i>Nhe</i> I
<i>EPF2</i> -R	GCTCGAATTCGGATCCTCAAGGGACAGGGTAGGACT	<i>Bam</i> H I
<i>EPFL9</i> -F	CAGCCATATGGCTAGCTCAAGACCTCGTTCTATCGAAA	<i>Nhe</i> I
<i>EPFL9</i> -R	GCTCGAATTCGGATCCTTATCTATGACAAACACATCTATAA	<i>Bam</i> H I

The single underlined sequences indicate restriction enzyme site.

3) 处理样品: 取不同温度和不同诱导浓度下 BL21(DE3)/pET28a-*AtEPF1*、BL21(DE3)/pET28a-*AtEPF2* 和 BL21(DE3)/pET28a-*AtEPFL9* 菌株的样品各 5 mL, 12 000 r/min 离心 1 min, 弃上清, 加入 0.1 mol/L 磷酸缓冲液 (1×PBS) 500 μL 重悬菌体沉淀, 超声波 (5 s/5 s) 破碎菌体, 12 000 r/min 离心 1 min, 取上清, 加入 5×上样缓冲液 (含有 β-巯基乙醇) 混匀, 100 °C 煮沸 8 min 使蛋白质变性, 12% SDS-PAGE 检测。

4) 筛选 EPF1、EPF2 和 EPFL9 蛋白诱导表达条件: 在 0、0.05、0.1、0.3、0.5、1、1.5 mmol/L IPTG 诱导浓度下, 16 °C、28 °C 和 37 °C 三种不同诱导温度条件下进行蛋白的诱导表达, 分别诱导 16、16、20 h 后取样品进行 SDS-PAGE 检测。最终筛选出诱导蛋白最适条件为: IPTG 诱导浓度分别为 0.5、0.3、0.05 mmol/L, 最适诱导温度分别为 28 °C、28 °C 和 16 °C, 最适诱导时间分别为 16、16 和 20 h。

1.2.4 *AtEPF1*、*AtEPF2* 和 *AtEPFL9* 蛋白的纯化

取构建好的 BL21(DE3)/pET28a-*AtEPF1*、BL21(DE3)/pET28a-*AtEPF2* 和 BL21(DE3)/pET28a-*AtEPFL9* 菌株在固体 LB 平板 (Kan 抗性) 上划线, 37 °C 倒置培养过夜; 挑取单菌落接种至 1 mL Kan 抗性 LB 液体培养基中, 180 r/min、37 °C 振荡培养过夜; 再取 100 μL 菌液接种至 100 mL Kan 抗性的液体 LB 培养基中, 180 r/min、37 °C 振荡培养约 3–5 h 后, 至 OD_{600} 在 0.6–0.8 之间, 分别加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mmol/L、0.3 mmol/L 和 0.05 mmol/L, 诱导温度分别为 28 °C、28 °C 和 16 °C, 诱导时间分别为 16、16 和 20 h。同时分别在相同的温度和诱导时间下设置对照组, 12 000 r/min 离心 1 min, 倒弃培养液上清, 留下菌体沉淀, 冰上放置待用^[18]。

将 5 mL 20 mmol/L 的咪唑加入到集菌管内, 吹吸沉淀, 直至成为均匀的乳白色液体。然后将其置于冰上超声破碎至透明状态; 12 000 r/min、

4 °C 离心 10 min, 弃掉沉淀; 用注射器吸取上清, 通过滤膜缓慢注入 Ni 琼脂糖凝胶柱, 静置 10 min, 使蛋白与 Ni 柱充分结合, 然后流出蛋白, 以上过程重复 3 次; 直至 Ni 琼脂糖凝胶柱中蛋白完全流出后, 用含梯度浓度的咪唑洗脱液 (浓度依次为 20、50、100、200、250、300、500 mmol/L) 洗脱蛋白。最终 *AtEPF1*、*AtEPF2* 和 *AtEPFL9* 蛋白能被洗脱下来的咪唑浓度为 200、100 和 200 mmol/L。

1.2.5 *AtEPF2* 和 *AtEPFL9* 蛋白对拟南芥 H₂S 产率的影响

野生型拟南芥种子消毒后播种于 1/2MS 培养基表面, 直立培养 2 周后分别加入 5 mL 的 *AtEPF2* 和 *AtEPFL9* 蛋白 (浓度为 0.2 μg/μL), 轻轻晃动以使拟南芥幼苗充分浸润在蛋白液体中。咪唑洗脱液为对照处理, 分别在处理 1、3、5、7、9、10、30 min 时取样, 测定幼苗的 H₂S 产率, H₂S 产率测定方法参照文献[10]。

1.2.6 数据统计与分析

所述试验均重复 3 次, 利用 WPS Office 统计并汇总数据, 结果用 $\bar{x} \pm s$ 表示。通过 SPSS Statistics 软件进行单因素比较, $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 分别为差异显著和差异极显著 (不同字母代表统计结果不在相同水平)。利用 SigmaPlot10.0 软件作图。

2 结果与分析

2.1 目的基因 *AtEPF1*、*AtEPF2* 和 *AtEPFL9* 的克隆

以 4 周苗龄的叶片为材料, 提取总 RNA, 反转录为 cDNA。按照表 1 设计的引物进行 PCR 反应, 克隆得到目的基因 *AtEPF1*、*AtEPF2* 和 *AtEPFL9*。结果如图 1 所示, *AtEPF1*、*AtEPF2* 和 *AtEPFL9* 的大小分别为 252 bp、285 bp、213 bp 图 1A–1C)。

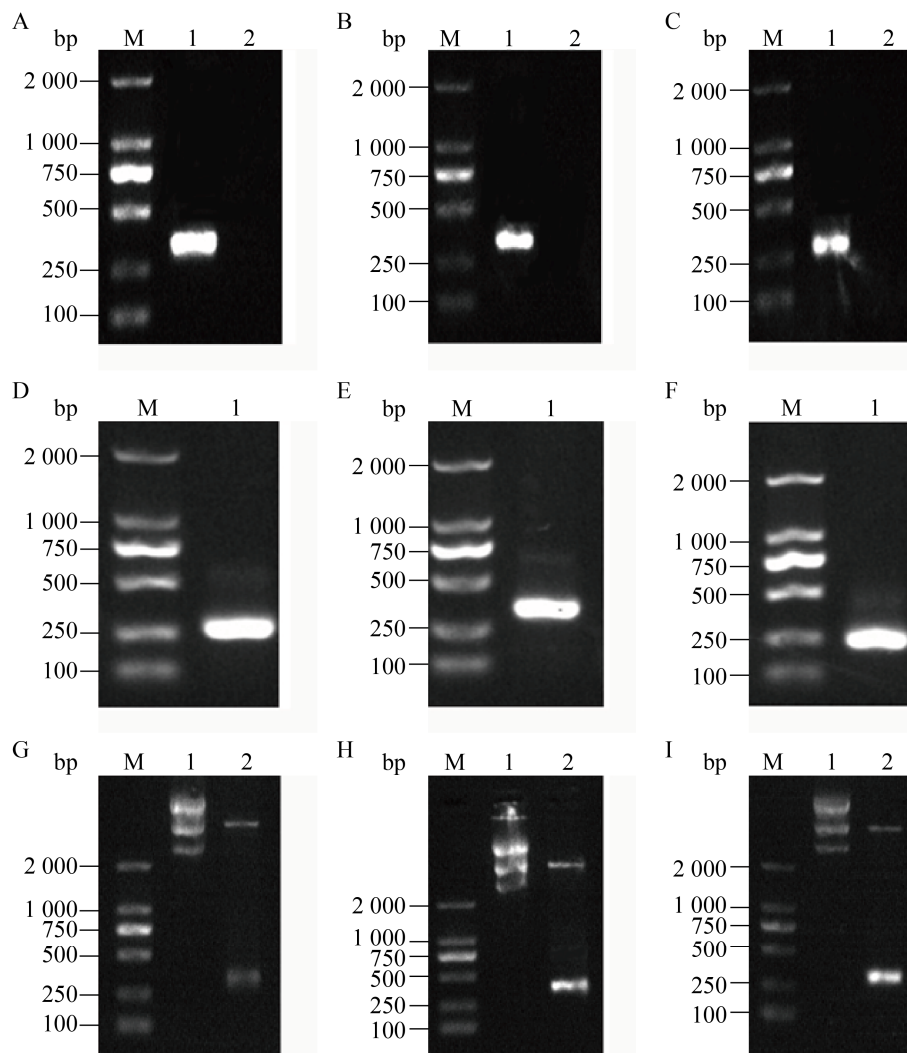


图1 pET28a-*AtEPF1*、pET28a-*AtEPF2* 和 pET28a-*AtEPFL9* 重组质粒的构建

Fig. 1 Construction of recombinant plasmids of pET28a-*AtEPFs*. (A–C) PCR amplification of *AtEPF1*, *AtEPF2* and *AtEPFL9* genes. 1: amplification of the gene *AtEPF1*, *AtEPF2* and *AtEPFL9* genes; 2: negative control; M: marker. (D–F) PCR amplification of DH5α/pET28a-*AtEPFs*. 1: PCR identification of DH5α/pET28a-*AtEPFs*; M: marker. (G–I) Double enzyme digestion of DH5α/pET28a-*AtEPFs* plasmids. 1: pET28a-*AtEPFs* recombinant plasmids; 2: pET28a-*AtEPFs* was double digested; M: marker.

2.2 DH5α/pET28a-*AtEPF1*、DH5α/pET28a-*AtEPF2* 和 DH5α/pET28a-*AtEPFL9* 的菌液 PCR

将 1.2.2 方法中所得含有 pET28a-*AtEPF1*、pET28a-*AtEPF2* 和 pET28a-*AtEPFL9* 的 DH5α 菌株进行 PCR 鉴定, 结果如图 1 所示。成功克隆到目的基因 *AtEPF1*、*AtEPF2* 和 *AtEPFL9*, 分别与预期大小一致 (图 1D–1F)。

2.3 pET28a-*AtEPF1*、pET28a-*AtEPF2* 和 pET28a-*AtEPFL9* 重组质粒的双酶切检测

按照提质粒试剂盒的使用说明, 分别提取 DH5α/pET28a-*AtEPF1*、DH5α/pET28a-*AtEPF2* 和 DH5α/pET28a-*AtEPFL9* 菌株的重组质粒。将回收到的重组质粒用限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Nhe* I 在 37 °C 条件下酶切 3 h, 结果如图 1 所示。重组

质粒经酶切得到目的片段的大小分别与 *AtEPF1*、*AtEPF2* 和 *AtEPFL9* 基因一致 (图 1G–1I)。结合 2.2 的检测结果, 说明重组载体 pET28a-*AtEPF1*、pET28a-*AtEPF2* 和 pET28a-*AtEPFL9* 构建成功。

2.4 *AtEPF1*、*AtEPF2* 和 *AtEPFL9* 蛋白的纯化

按照 1.2.3 中筛选到的最适诱导表达蛋白条件, 诱导 BL21(DE3)/pET28a-*AtEPF1*、BL21(DE3)/pET28a-*AtEPF2* 和 BL21(DE3)/pET28a-*AtEPFL9* 表达蛋白。按照 1.2.4 的纯化蛋白步骤, 分别纯化到 *AtEPF1*、*AtEPF2* 和 *AtEPFL9* 蛋白。但大小与预期不一致 (图 2A–2C), 分别约为理论计算值的 2 倍。经 Ni 琼脂糖凝胶柱纯化获得融合蛋白, 大小分别为 18 kDa、19 kDa 和 14.5 kDa 左右。

2.5 *AtEPF1*、*AtEPF2* 和 *AtEPFL9* 蛋白的生物信息学分析

通过 ProtScale 在线软件分别对 *AtEPF1*、*AtEPF2* 和 *AtEPFL9* 蛋白亲疏水特性进行分析, 得到其蛋白亲疏水性预测图 (图 3A–3C), 正值的氨基酸表明具有疏水性, 负值的氨基酸表明具有亲水性。正值越大, 则蛋白质的疏水性越强; 负值越小, 则蛋白质的亲水性越强。分析发现, *AtEPF1* 和 *AtEPF2* 蛋白亲疏水特性趋势一致, *AtEPFL9* 蛋白氨基酸负值数目远远多于正值数

目, 即 *AtEPFL9* 蛋白亲水性较强。这与在实验过程中纯化 *AtEPFL9* 蛋白时, 菌体沉淀较易破碎, 上清溶液中蛋白浓度较高相一致。

通过在线 SWISS MODEL 软件, 对 *AtEPF1*、*AtEPF2* 和 *AtEPFL9* 蛋白三维结构进行模拟, 同源建模预测结果 100%, 如图 3D–3F 所示。分析发现, *AtEPF1* 和 *AtEPF2* 的结构是类似的, 这与 *AtEPF1* 和 *AtEPF2* 在植物气孔发育过程中的功能一致相吻合, 进一步印证了蛋白质的“结构决定功能”的事实。

2.6 *AtEPF2* 和 *AtEPFL9* 蛋白处理后拟南芥的 H_2S 产率测定

在用 *AtEPF2* 和 *AtEPFL9* 蛋白处理拟南芥后, 测定了不同处理时间 H_2S 的产率, 结果如图 4 所示。(1) 以咪唑洗脱液为对照, 用 *AtEPF2* 蛋白处理拟南芥后, 在处理时间为 1、3、5、7、10 min 时, 与对照相比, 拟南芥的 H_2S 产率均有不同程度的下降, 且有显著性差异。而在处理时间为 30 min 时, 与对照相比, 拟南芥的 H_2S 产率没有明显变化。(2) 以咪唑洗脱液为对照, 用 *AtEPFL9* 蛋白处理拟南芥后, 在处理时间为 1、3、5、7、10 min 时, 与对照相比, 拟南芥的 H_2S 产率均有不同程度的上升, 且有显著性差异。而在处理时间为 30 min 时, 与对照相比, 拟南芥的 H_2S 产率没有明显变化。

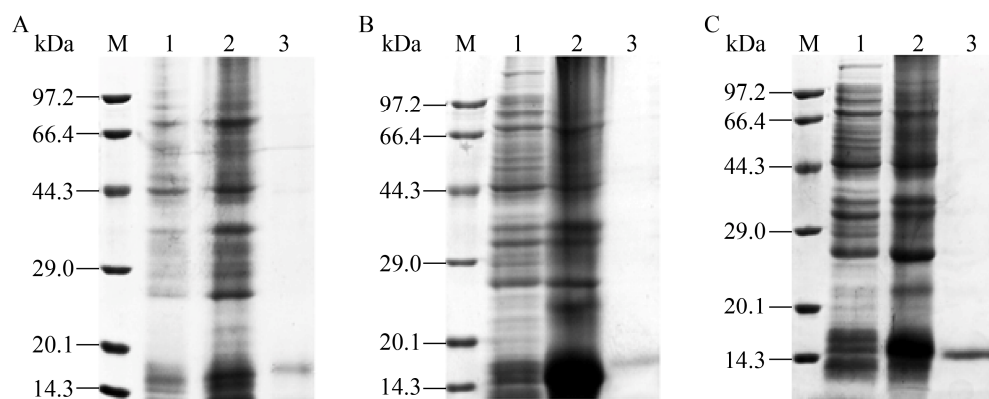


图 2 SDS-PAGE 分析大肠杆菌中 *AtEPF1*、*AtEPF2* 和 *AtEPFL9* 蛋白的表达纯化

Fig. 2 SDS-PAGE analysis of the expression and purification of *AtEPF1* (A), *AtEPF2* (B) and *AtEPFL9* (C) in *E. coli*. 1: the total protein without IPTG induction; 2: the total protein with IPTG induction; 3: the purified recombinant protein.

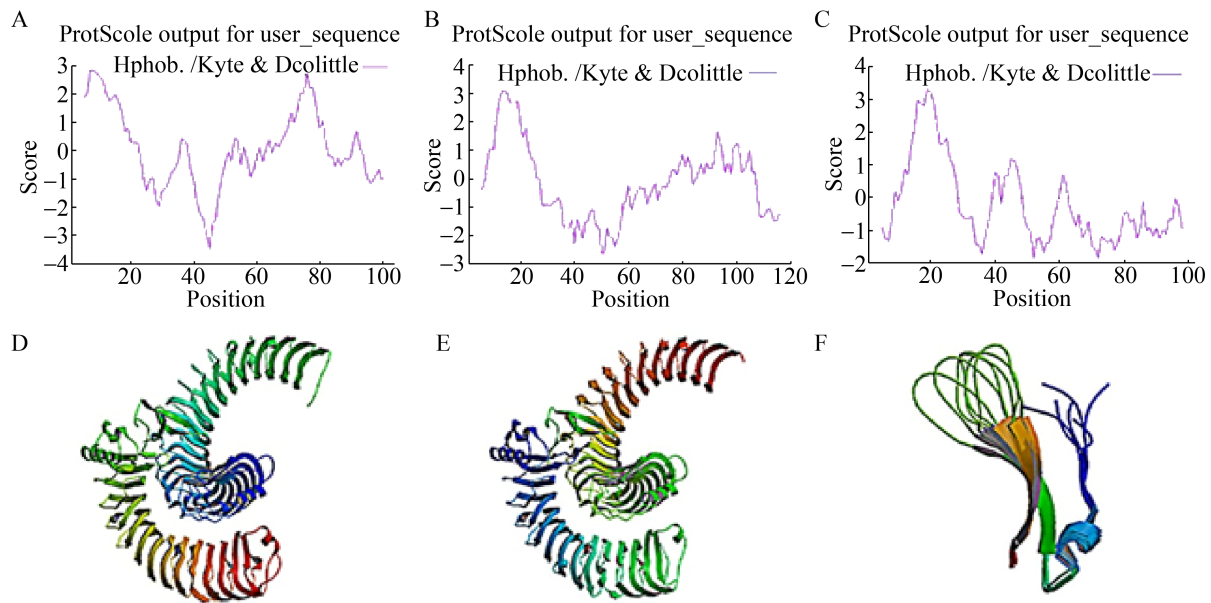


图3 AtEPF1、AtEPF2和AtEPFL9蛋白的生物信息学分析

Fig. 3 Bioinformation analysis of AtEPF1, AtEPF2 and AtEPFL9. (A–C) The hydrophilic and hydrophobic plots of AtEPF1, AtEPF2 and AtEPFL9. (D–F) The tertiary structure of AtEPF1, AtEPF2 and AtEPFL9.

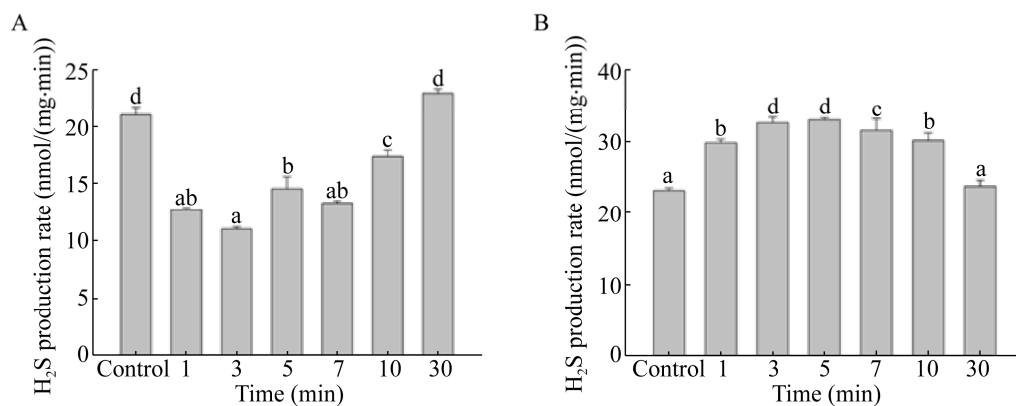


图4 AtEPF2和AtEPFL9蛋白处理对拟南芥H₂S产率的影响

Fig. 4 Effects of AtEPF2 (A) and AtEPFL9 (B) proteins on H₂S production rate in *Arabidopsis thaliana*. Different letters indicated significant differences among treatments (one way ANOVA, $P < 0.05$).

3 讨论

气孔是地球上任何植物不可缺少的重要组成部分。在众多粮食作物中，如大麦、玉米、高粱等，它们通过气孔实现气体交换，进行光合作用来制造有机物。因此，气孔发育、气孔数目和气

孔大小是提高农作物产量的一个重要的形态学指标。构建拟南芥气孔发育基因 *AtEPF1*、*AtEPF2* 和 *AtEPFL9* 原核表达载体及开展后续一系列研究，为进行基础农作物气孔发育的研究建立了良好的开端。同时，这也为 H₂S 调控气孔发育增强农作物光合作用来提高产量提供了一种可能的途径。

在克隆得到目的基因时, *AtEPF1* 和 *AtEPF2* 基因的大小与预期大致吻合, *AtEPFL9* 基因的大小略大于理论值 (图 1C)。分析发现, 由于 *AtEPFL9* 片段较小, 而琼脂糖凝胶电泳时所加的染料分子量较大, 会对 *AtEPFL9* 基因的电泳结果略有影响。通过碱基数目换算氨基酸数目公式, 理论上得到的 *AtEPF1*、*AtEPF2* 和 *AtEPFL9* 表达后的融合蛋白大小约为 9.13 kDa、10.34 kDa、7.7 kDa。而 SDS-PAGE 显示表达后的融合蛋白大小约为 18 kDa、19 kDa、14.5 kDa。虽然 *AtEPF1*、*AtEPF2* 和 *AtEPFL9* 蛋白与 pET28a 载体上的 His 标签蛋白进行融合表达, 但 His 标签蛋白的大小约为 0.6 kDa, 理论上不足以影响 SDS-PAGE 结果。通过在线 SWISS MODEL 软件, 对 3 种蛋白三维结构进行模拟, deepview 分析了蛋白表面电荷分布情况, 发现 3 个蛋白表面的正电荷和负电荷均分别集中分布在蛋白的两端, 这意味着 *AtEPF1*、*AtEPF2* 和 *AtEPFL9* 蛋白在 SDS-PAGE 过程中, 极易通过电荷之间“异性相吸”原理, 形成二聚体或多聚体。因此, SDS-PAGE 检测结果显示的蛋白大小与理论计算值相比, 可能为多聚体形式。

EPFs 家族属于多肽类激素^[5], 因此用纯化得到的 *AtEPF2* 和 *AtEPFL9* 融合蛋白处理拟南芥幼苗。在处理时间分别为 1、3、5、7、10 min 时, 与对照相比, 它们的 H₂S 产率均有不同程度的变化, *EPF2* 和 *EPFL9* 分别抑制和促进 H₂S 的产生 (图 4)。而处理时间延长至 30 min 时, H₂S 产率与对照组相比无显著变化。这说明 *AtEPF2* 和 *AtEPFL9* 蛋白作为多肽类激素, 调节植物体内 H₂S 的产生, 且只在短时间内发挥作用, 随着处理时间的延长作用逐渐消失。我们已经知道, *EPF1* 和 *EPF2* 在调控气孔发育中均表现为抑制作用^[5]且两种蛋白的三维结构 (图 3D 和 3E) 极其类似。但在实验过程中, 与 *EPF2* 不同的是, *EPF1* 蛋白的纯化遇到各种各样的困难, 这可能与 *EPF1*

本身表达很少, 且 *EPF1* 蛋白极易以包涵体的形式存在有关。但从理论上推测, *EPF1* 的作用应当与 *EPF2* 类似, 也可能抑制植物体内 H₂S 的产生。

EPF1、*EPF2* 和 *EPFL9* 蛋白是 EPFs 家族中功能较为明确的分泌型多肽激素, 它们调节叶片气孔的生长与发育^[5], 然而其更深层次的作用机理尚不明确。本研究表达纯化这 3 种蛋白, 为深入研究它们的生物学功能奠定了基础^[19]。令人兴奋的是, 初步研究结果表明, EPFs 融合蛋白显著调控植物体内 H₂S 信号的生物合成。因此, 进一步深入研究 EPFs 和 H₂S 对植物气孔发育的作用机制, 对农业实践中增加作物产量、增强植物抗性有重要意义。

REFERENCES

- [1] Chen L, Hou SW. Molecular genetic control of plant stomatal development. *Sci Sin Vitae*, 2017, 47(8): 798–807 (in Chinese).
陈亮, 侯岁稳. 植物气孔发育的分子遗传调控. *中国科学: 生命科学*, 2017, 47(8): 798–807.
- [2] Lu JJ, He JJ, Zhou XS, et al. Homologous genes of epidermal patterning factor regulate stomatal development in rice. *J Plant Physiol*, 2019, 234–235: 18–27.
- [3] Li Y, Xu SS, Wang GX. Advance in stomatal development mechanism and its regulation of external and internal cues. *Chin Bull Life Sci*, 2018, 30(5): 491–499 (in Chinese).
李岩, 徐珊珊, 王根轩. 气孔发育机制及其内外调控因子的研究进展. *生命科学*, 2018, 30(5): 491–499.
- [4] Hua C, Zhou F, Chen QZ, et al. Plant peptide signal and posttranslationally modified small-peptide signals. *Hubei Agric Sci*, 2015, 54(15): 3585–3589 (in Chinese).
华春, 周峰, 陈全战, 等. 植物多肽信号及翻译后修饰小肽. *湖北农业科学*, 2015, 54(15): 3585–3589.
- [5] Richardson LGL, Torii KU. Take a deep breath: peptide signalling in stomatal patterning and differentiation. *J Exp Bot*, 2013, 64(17): 5243–5251.

- [6] Hunt L, Bailey KJ, Gray JE. The signalling peptide EPFL9 is a positive regulator of stomatal development. *New Phytol*, 2010, 186(3): 609–614.
- [7] Hunt L, Gray JE. BASL and EPF2 act independently to regulate asymmetric divisions during stomatal development. *Plant Signal Behav*, 2010, 5(3): 278–280.
- [8] Hepworth C, Caine RS, Harrison EL, et al. Stomatal development: focusing on the grasses. *Curr Opin Plant Biol*, 2018, 41: 1–7.
- [9] Hughes J, Hepworth C, Dutton C, et al. Reducing stomatal density in barley improves drought tolerance without impacting on yield. *Plant Physiol*, 2017, 174(2): 776–787.
- [10] Jin ZP, Shen JJ, Qiao ZJ, et al. Hydrogen sulfide improves drought resistance in *Arabidopsis thaliana*. *Biochem Biophys Res Commun*, 2011, 414(3): 481–486.
- [11] Jin ZP, Pei YX. Research progress on hydrogen sulfide signaling in plants. *Chin J Cell Biol*, 2013, 35(6): 880–888 (in Chinese).
金竹萍, 裴雁曦. 植物 H₂S 气体信号分子的生理功能研究进展. *中国细胞生物学学报*, 2013, 35(6): 880–888.
- [12] Pei YX. Gasotransmitter hydrogen sulfide in plants: stinking to high heaven, but refreshing to fine life. *Chin J Biochem Mol Biol*, 2016, 32(7): 721–733 (in Chinese).
裴雁曦. 植物中的气体信号分子硫化氢: 无香而立, 其臭如兰. *中国生物化学与分子生物学报*, 2016, 32(7): 721–733.
- [13] Jin ZP, Xue SW, Luo YN, et al. Hydrogen sulfide interacting with abscisic acid in stomatal regulation responses to drought stress in *Arabidopsis*. *Plant Physiol Biochem*, 2013, 62: 41–46.
- [14] Jin ZP, Fang HH, Zhang LP, et al. Physiological effects of hydrogen sulfide under drought stress in *Arabidopsis thaliana*. *J Shanxi Univ: Nat Sci Ed*, 2013, 36(1): 113–117 (in Chinese).
金竹萍, 方慧慧, 张丽萍, 等. 硫化氢对拟南芥在干旱胁迫条件下的生理影响. *山西大学学报: 自然科学版*, 2013, 36(1): 113–117.
- [15] Jin ZP, Pei YX. Physiological implications of hydrogen sulfide in plants: pleasant exploration behind its unpleasant odour. *Oxid Med Cell Longev*, 2015, 2015: 397502.
- [16] Cui WT, Shen WB. Physiological function and its molecular mechanism of hydrogen sulfide in plants. *Chem Life*, 2012, 32(4): 385–389 (in Chinese).
崔为体, 沈文飏. 植物中硫化氢的生理功能及其分子机理. *生命的化学*, 2012, 32(4): 385–389.
- [17] Wang R. Physiological implications of hydrogen sulfide: a whiff exploration that blossomed. *Physiol Rev*, 2012, 92(4): 791–896.
- [18] Chen DX, Li WW, Li SB, et al. Prokaryotic expression, purification of NteIF2 α and preparation and application of polyclonal antibody in *Nicotiana tabacum*. *J Agric Biotechnol*, 2017, 25(1): 50–57 (in Chinese).
陈德鑫, 李雯雯, 李思斌, 等. 烟草 NteIF2 α 的原核表达、纯化及多克隆抗体制备和应用. *农业生物技术学报*, 2017, 25(1): 50–57.
- [19] Matsubayashi Y, Sakagami Y. Peptide hormones in plants. *Annu Rev Plant Biol*, 2006, 57: 649–674.

(本文责编 陈宏宇)