



拟南芥多聚 ADP 核糖聚合酶 I 的 原核表达与活性检测

张海磊,吴 巧,葛晓春*

(复旦大学 生命科学学院,上海 200433)

摘要:采用 RT-PCR 技术获得了拟南芥多聚 ADP 核糖聚合酶 [poly(ADP-ribose) polymerase, PARP] PARP1 基因的全长 cDNA, 转入原核表达载体 pET32a 并转化宿主菌 Origami(DE3), 加入终浓度为 0.3 mmol/L IPTG, 在 16 °C 下诱导可获得较多的可溶重组蛋白。纯化 TRX-PARP1, 在反应液中加入 NAD⁺ 和断裂 DNA, 通过 SDS-PAGE 凝胶电泳和 Western blotting 分析, TRX-PARP1 分子量可随着时间的延长逐渐增大, 产生向上的弥散, 表明蛋白质连上了 ADP 核糖分子; 与此对比, 作为参照的标签蛋白 TRX 无此现象。实验结果显示原核表达拟南芥 PARP1 能够催化自身多聚 ADP 核糖化修饰, 为深入研究植物多聚 ADP 核糖聚合酶的功能奠定了基础。

关键词:拟南芥;翻译后修饰;多聚 ADP 核糖聚合酶;原核表达

中图分类号:Q786

文献标志码:A

Prokaryotic Expression and Enzymatic Assay of *Arabidopsis* Poly(ADP-ribose) Polymerase

ZHANG Hailei, WU Qiao, GE Xiaochun*

(School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai, 200433, China)

Abstract: In order to study the enzymatic activity of *Arabidopsis* poly(ADP-ribose) polymerase 1 (PARP1), the cDNA fragment of PARP1 was amplified using Reverse-Transcription PCR method from *Arabidopsis* seedlings treated by bleomycin. The cDNA sequence was cloned into prokaryotic expression vector pET32 and the resultant pET32a-PARP1 plasmid was transformed into *Escherichia coli* host strain Origami(DE3). IPTG was added into the culture to a final concentration of 0.3 mmol/L to induce expression at 16 °C for 20 h. The recombinant protein TRX-PARP1 was purified and then assayed for enzymatic activity with the substrate NAD⁺ and broken DNA in the reaction buffer. TRX-PARP1 protein band shifted upwardly in a time course on SDS-PAGE gel. Western blotting using anti-PARP1 antibody further confirmed that the molecular mass of TRX-PARP1 increased gradually, due to the linkage of ADP ribose molecules onto the protein. In contrast, the fusion tag protein Thioredoxin (TRX) did not show any change in mobility. These data demonstrated that *Arabidopsis* PARP1 produced in *E. coli* has auto-modification activity, which facilitates the functional study of PARP1 in *Arabidopsis*.

Key words: *Arabidopsis*; posttranslational modification; poly(ADP-ribose) polymerase; prokaryotic expression

收稿日期:2014-02-14;修改稿收到日期:2014-04-14

基金项目:国家自然科学基金(31070232,31170169)

作者简介:张海磊(1985—),男,硕士,主要从事植物生理和分子生物学研究。E-mail:zhangbiol@gmail.com

*通信作者:葛晓春,博士,教授,博士生导师,主要从事植物生理和分子生物学研究。E-mail:xcge@fudan.edu.cn

多聚 ADP 核糖化[poly(ADP-ribisyl)ation]修饰是一种稀有的翻译后修饰方式,该修饰由多聚 ADP 核糖聚合酶[poly(ADP-ribose) polymerase, PARP]催化^[1]。PARP 与断裂 DNA 结合后被激活,将细胞内 NAD⁺裂解为 ADP 核糖和尼克酰胺两部分,然后将 ADP 核糖基团转移至受体蛋白上。PARP 反复催化将导致在靶蛋白质上形成线性或带分支的多聚 ADP 核糖链^[1-2]。多聚 ADP 核糖[poly(ADP-ribose), PAR]带负电,使得被修饰靶蛋白的电化学性质发生改变;除了改变靶蛋白的特性外,PAR 还与宏域(macro domain)家族蛋白质具有亲和结合力^[3],因此,在 DNA 修复过程中,发生多聚 ADP 核糖化修饰的蛋白质通过 PAR 募集宏域蛋白质,如 XRCC1 和 DNA 连接酶等 DNA 修复相关因子^[4],从而参与 DNA 修复反应。多聚 ADP 核糖化修饰是可逆的,靶蛋白上的 PAR 能被多聚 ADP 核糖糖苷水解酶[poly(ADP-ribose) glycohydrolase, PARG]水解^[5-6]。

除酵母外,真核生物都有多个 PARP 基因。拟南芥中有 3 个 PARP: PARP1、PARP2 和 PARP3^[7]。拟南芥 PARP1 与动物中的 PARP1 在一级结构上高度相似,它有 3 个独立的结构域:1 个 DNA 结合区域、1 个自我修饰区域和 1 个催化区域。DNA 结合域由 3 个锌指(zinc finger)基序组成,作用是与 DNA 结合并且参与 PARP1 同源二聚体的形成^[8-9]。自我修饰结构域上的某些谷氨酸残基可作为 ADP 核糖的受体,被催化结构域修饰。值得注意的是,除了谷氨酸残基以外,自我修饰结构域外的某些赖氨酸残基也能被修饰^[10]。由于蛋白质上连上了多个 ADP 核糖,使得靶蛋白质的分子量增加,电泳时泳动率发生改变。

动物中 PARP 的靶蛋白有 30 个以上,但是已发现的植物中 PAPR 靶蛋白却很少。动物中蛋白质过度多聚 ADP 核糖修饰是有害的,一方面靶蛋白被修饰失去原有的功能;另一方面 PAR 本身是一种死亡信号^[11]。在拟南芥中通过基因沉默降低 PARP 的表达,可使植株对氧化、高光照等非生物胁迫的耐受性增强^[12]。PARP 化学抑制剂处理拟南芥后,能够提高它们在胁迫条件下的生物量和增强抗性^[13]。

目前对植物中 PARP 基因功能了解非常少,其体内功能和分子机制的深入研究需要从检测酶活性入手。因此,寻找一种易于操作的系统得到 PARP 蛋白并进行活性测定就显得十分必要。本研究采用

经典的原核表达手段,在大肠杆菌中表达并纯化得到了具有催化多聚 ADP 核糖化反应活性的拟南芥 PARP1 重组蛋白,从而为深入了解 PARP 的功能和作用机制提供条件。

1 材料和方法

1.1 材料

拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)为 Columbia 生态型(Col-0)。将种子用 70% 乙醇消毒后,播种在 1/2 MS 培养基上。光照培养箱培养,2 周后取幼苗用博来霉素(Invitrogen 公司)处理,然后液氮速冻待用。

1.2 方法

1.2.1 PARP1 基因 PCR 检测与 CDS 序列的扩增

拟南芥幼苗用博莱霉素处理后在液氮中研磨,用 Trizol Plus(Takara 公司)提取总 RNA。提取的 RNA 经 DNase I(Takara 公司)处理后,用反转录酶(Takara 公司)反转录。根据 PARP1 的 cDNA 序列信息,设计定量 PCR 引物 qPARP1_F(5'-AGC-CTGAAGGCCGGTAACA-3') 和 qPARP1_R(5'-GCTGTCTCAGTTGGCTGCCG-3')。内参基因 *Actin2* 的引物为 qACT2_F(5'-ATCGGTG-GTTCCATTCTTGCTTC-3') 和 qACT2_R(5'-TG-GACCTGCCTCATCATACTCG-3')。使用 Takara 公司 SYBR[®] Premix Ex *Taq*TM(Tli RNaseH Plus)试剂盒进行 PCR 扩增,反应在 ABI 7500 荧光定量 PCR 仪上进行。PCR 扩增程序为:95 °C 预变性,30 s;95 °C,5 s,58 °C,34 s,40 个循环。用 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 方法计算基因相对表达值。为了扩增 PARP1 基因全长 cDNA,根据 PARP1 基因全长 cDNA 序列信息,在起始密码子上游与终止子下游附近序列设计正向引物(5'-TAAAACCAGAACATCTACAAAGCC-3')和反向引物(5'-GTTCGTTTACTCTTTGTGTC-GCAT-3')。用保真度较高的 Prime STAR DNA 聚合酶(Takara 公司)进行扩增。

1.2.2 原核表达克隆的构建 将目的条带割胶回收后,用 5' 端分别带有 *Sac* I 和 *Not* I 限制性酶切位点的引物 PARP1-Sac I(5'-GGAGCTCATG-GCAAGGCCACATA-3') 和 PARP1-Not I(5'-GGCGGCCGCTCATCTCTTGCTTA-3') 再次扩增,回收大小正确的条带,用 *T*₄ DNA 连接酶(Takara 公司)连接到 pCR-Blunt II(Invitrogen 公司)载体,转化大肠杆菌 DH5 α ,挑选单菌落,摇菌并抽提质粒,测序。得到序列正确的克隆后,抽提

DNA 进行双酶切,与带有 *Sac* I 和 *Not* I 粘性末端的 pET32a 载体连接,转化 DH5a 感受态细胞,挑单菌落摇菌并抽提质粒,酶切鉴定确认克隆 pET32a-PARP1 构建完成。

1.2.3 重组蛋白的预表达 得到的 pET32a-PARP1 质粒用于转化表达宿主菌 Origami(DE3) 感受态细胞,挑单菌落,摇菌至 OD₆₀₀ 为 0.8 时加入 IPTG 至终浓度为 0.3 mmol/L。然后在 16 ℃ 继续培养 20 h。离心收集菌体,重悬后超声仪破碎。最后利用 SDS-PAGE 电泳检测目的蛋白的表达。

1.2.4 重组蛋白的纯化 在上述表达条件下扩大菌体培养量,收集菌体并超声破碎,离心收集上清,利用 HisPur Ni-NTA 亲和介质进行纯化。上样缓冲液(10 mmol/L Tris pH 7.8,1% Triton X-100,5 mmol/L 咪唑,500 mmol/L 氯化钠,0.1% PMSF),洗涤缓冲液(10 mmol/L Tris pH 7.8,1% Triton X-100,70 mmol/L 氯化钾,35 mmol/L 咪唑,0.1% PMSF),洗脱缓冲液(10 mmol/L Tris pH 7.8,1% Triton X-100,70 mmol/L 氯化钾,300 mmol/L 咪唑,0.1% PMSF)。纯化的 Trx-PARP1 在缓冲液(20 mmol/L Tris pH 7.5,50 mmol/L 氯化钠,7.5 mmol/L 氯化镁,0.2 mmol/L 二硫苏糖醇)和 10 μmol/L 超声断裂的 DNA 中透析。

1.2.5 PARP1 的活性分析 将反应缓冲液分成若干等分,每 100 μL 反应液加入约 15 μg TRX-PARP1 或 3 μg TRX,并加入终浓度为 0.2 mmol/L 的 NAD⁺ 起始反应。在不同时间点加入预冷的丙酮终止反应,然后用 SDS-PAGE 分析样品,考马斯亮蓝染胶。

1.2.6 Western blotting 分析 于反应后的融合蛋白 TRX-PARP1 样品中加入 3 倍体积的预冷丙酮,终止反应。12 000 g 离心 15 min,取沉淀加入 20 μL 的 1×SDS-PAGE 上样缓冲液混匀,沸水浴 8 min,离心取上清。再将样品稀释 100 倍,取 15 μL 进行 SDS-PAGE 分析,然后转至硝酸纤维素膜上。转膜完成后,用少量去离子水清洗 2 次,放入封闭液中封闭 1 h,之后用 10 mL TBST 缓冲液(20 mmol/L Tris-HCl pH 7.5,150 mmol/L NaCl,0.05% Tween 20)洗涤 10 min,重复 3 次,在膜上加入 TBST+兔抗 PARP1 抗体(1:100 稀释),室温孵育 1 h。之后用 TBST 缓冲液洗涤 3 次,每次 10 min。沥干 TBST 缓冲液后,加入羊抗兔 IgG 二抗(1:4000 稀释)浸没膜,室温再次孵育 1 h。然后 TBST 缓冲液清洗 10 min,重复 3 次,最后曝光。

2 结果与分析

2.1 PARP1 基因原核表达载体的构建

拟南芥 PARP1 基因在正常情况下表达水平较低,但受 DNA 损伤诱导。博莱霉素能够引起 DNA 断裂,提高 PARP1 基因转录水平(图 1)。为了便于扩增 PARP1 基因的 cDNA,用浓度为 10 μg/mL 博莱霉素处理 2 周大小的拟南芥幼苗。2 h 后提取总 RNA,进行反转录后扩增 PARP1 编码序列。琼脂糖电泳检测到目标条带(图 2),回收目标片段。设计带有 *Sac* I 和 *Not* I 酶切位点的引物,扩增 PARP1 蛋白的编码序列,克隆到中间载体,得到测序正确的克隆后,酶切后与带有同样粘性末端的 pET32a 相连,得到 pET32a-PARP1 表达载体(图 2)。

2.2 Trx-PARP1 重组蛋白的表达

将 pET32a-PARP1 转入 Origami(DE3) 表达宿

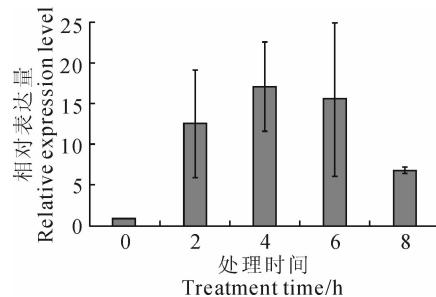


图 1 拟南芥 PARP1 基因受博莱霉素诱导后的相对表达

Fig. 1 The relative expression level of PARP1 in *Arabidopsis* after bleomycin induction

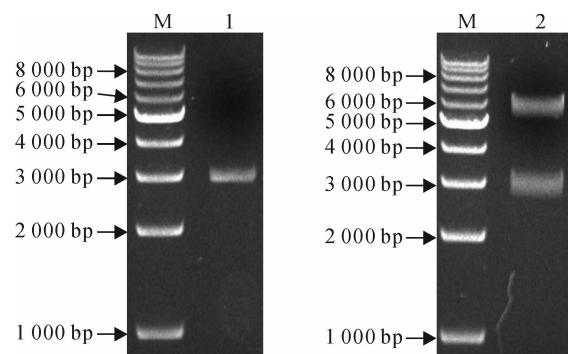


图 2 PARP1 基因 cDNA(左)的扩增结果和 pET32a-PARP1 质粒双酶切产物(右)

M. DNA 分子量标准;1. 目的基因 PARP1 的 cDNA 片段;

2. pET32a-PARP1 重组质粒经过 *Sac* I 和 *Not* I 酶切的产物

Fig. 2 Cloned cDNA of PARP1 gene(left panel) and restriction digestion of pET32a-PARP1 plasmid(right panel)

M, DNA molecular weight standard;1. cDNA of PARP1

gene;2. Digested pET32a-PARP1 plasmid

主菌中,当培养物 OD₆₀₀ 达 0.8 时,加入 IPTG 至终浓度为 0.3 mmol/L,在不同的诱导温度表达目标蛋白,通过 SDS-PAGE 电泳比较细菌裂解液中上清与沉淀中的 TRX-PARP1 蛋白含量。结果表明,当诱导温度为 16 ℃,诱导时间为 20 h 时,上清中有较多的分子量大小为 130 kD 左右的 TRX-PARP1 目的蛋白。虽然大部分融合蛋白以不可溶的包涵体形式存在,但是仍然有足够的 TRX-PARP1 融合蛋白留在上清中(图 3),可以用于目的蛋白纯化并进行活性分析。

2.3 TRX-PARP1 重组蛋白及标签蛋白 TRX 的纯化

在上述条件下扩大培养菌体,同时为了排除标签蛋白 TRX 对重组蛋白活性的贡献,用 pET32a 空载体转化表达宿主菌,利用与 TRX-PARP1 表达条件一致的条件表达标签蛋白 TRX,最后用 His-Pur Ni-NTA 亲和介质分别纯化这 2 个蛋白。为了去除洗脱缓冲液中的咪唑等杂质,将从亲和介质上洗脱下来的 TRX-PARP1 重组蛋白与标签蛋白 TRX 在反应缓冲液中透析。PARP1 理论等电点为 8.8,为了避免透析过程中出现沉淀失活,把透析缓冲液 pH 调到 7.5,以远离等电点,同时选择在 4 ℃ 条件下透析。最后经过 SDS-PAGE 胶检测,确认得到了符合活性测定要求的标签蛋白 TRX 和 TRX-PARP1 重组蛋白(图 4)。

2.4 TRX-PARP1 重组蛋白的活性测定

拟南芥 PARP1 具有 3 个结构域,催化结构域

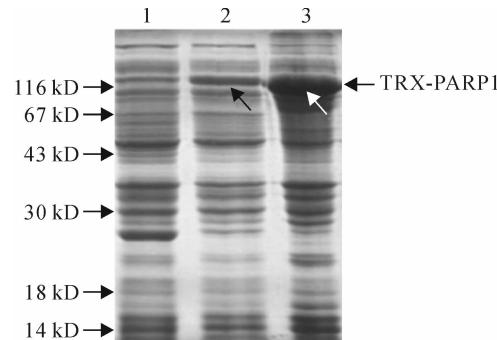


图 3 TRX-PARP1 重组蛋白表达产物的 SDS-PAGE 电泳分析

1. IPTG 诱导前总蛋白;2.3. 分别为 16 ℃ 时, IPTG 诱导后的可溶蛋白与不溶蛋白;黑色和白色箭头分别指示可溶与不可溶目标蛋白

Fig. 3 SDS-PAGE electrophoresis analysis of the expression product of TRX-PARP1

1. Whole cell lysate without IPTG induction; 2,3. Soluble and insoluble expression products, respectively, after IPTG induction at 16 ℃; The black and white arrows indicate soluble and insoluble target protein, respectively

能够将 ADP 核糖转移到自我修饰结构域上,对自身进行多聚 ADP 核糖化修饰。多聚 ADP 核糖的修饰会导致自身分子量的增加。在 TRX-PARP1 活性检测液中加入 NAD⁺ 底物,反应不同时间后加入丙酮终止反应,然后经过 SDS-PAGE 分析 TRX-PARP1 泳动情况。结果(图 5)表明,TRX-PARP1 蛋白在加入 NAD⁺ 后,在 130 kD 左右的 TRX-PARP1 主带逐渐变得模糊,呈现出向上的弥散,时

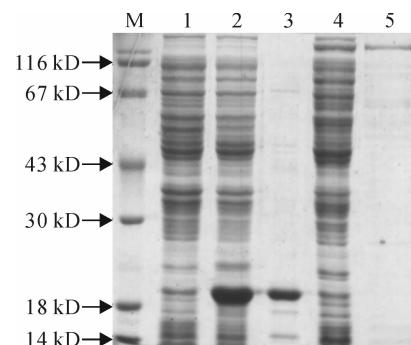


图 4 TRX-PARP1 融合蛋白与其标签蛋白 TRX 纯化后的 SDS-PAGE 电泳分析

M. 蛋白质分子量标准;1. 未经 IPTG 诱导的含 pET32a 质粒宿主菌 Origami(DE3) 的总蛋白;2. 含 pET32a 质粒表达菌体经 IPTG 诱导后的可溶蛋白;3. 纯化的 TRX 蛋白;4. 含 pET32a-PARP1 质粒表达菌体经 IPTG 诱导后的可溶蛋白;5. 纯化的 TRX-PARP1 蛋白

Fig. 4 SDS-PAGE electrophoresis analysis of purified

TRX-PARP1 fusion protein and TRX tag protein

M. Protein molecular weight standard; 1,2. Total soluble extracts in Origami(DE3) containing pET32a plasmid before and after IPTG induction, respectively; 3. Purified TRX protein; 4. Total soluble extracts in Origami(DE3) containing TRX-PARP1 plasmid after IPTG induction; 5. Purified TRX-PARP1 protein

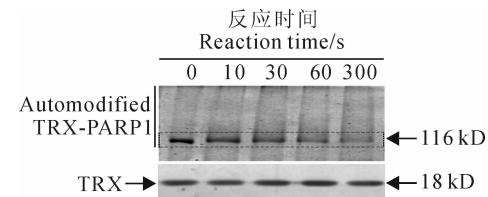


图 5 PARP1 活性的 SDS-PAGE 电泳分析

TRX-PARP1(上)和 TRX(下)分别与 NAD⁺ 孵育不同时间后,取反应产物经 SDS-PAGE 电泳分析分子量的变化。红框中显示由于蛋白质发生了自修饰而导致 TRX-PARP1 条带逐渐向上模糊

Fig. 5 SDS-PAGE electrophoresis analysis of the enzymatic activity of TRX-PARP1

After incubation with NAD⁺ for different time periods, the reaction products of TRX-PARP1 (upper panel) and TRX (lower panel), respectively, were subjected to SDS-PAGE analysis. The red frame highlights the upward smear of TRX-PARP1 band due to the auto-modification activity of the protein

间越长,主带越模糊,而向上扩散越严重,出现凝胶阻滞现象;以同样的条件进行反应,作为标签蛋白的TRX的分子量和条带都没有明显变化(图5)。由此可见,PARP1发生了多聚ADP核糖修饰,引起分子量增加。以上结果表明,大肠杆菌中表达的PARP1具有自我修饰活性,能够催化多聚ADP核糖修饰反应。

2.5 Western blotting分析TRX-PARP1重组蛋白的活性

为了进一步证实PARP1催化自身的多聚ADP核糖化反应,用PARP1抗体检验反应前后PARP1分子量变化。Western blotting结果表明,随着多聚ADP核糖化反应的进行,共价结合在PARP1上的多聚ADP核糖基团逐渐增大,导致PARP1的分子量逐渐增大,出现凝胶阻滞现象(图6)。随着PARP1上结合的多聚ADP核糖基团增大,PARP1与它的抗体的亲和力减弱,表现为越向上弥散的PARP1呈现越弱的免疫信号。推测PARP1与它的抗体的结合位点被多聚ADP核糖屏蔽,阻碍了二者的结合,多聚ADP核糖基团越大,屏蔽越严重;另外也可能由于多聚ADP核糖基团带负电,随着负电荷的增加,抗原-抗体亲和力受到干扰而逐渐减弱。以上结果表明,PARP1确实能够催化自身的多聚ADP核糖化反应。

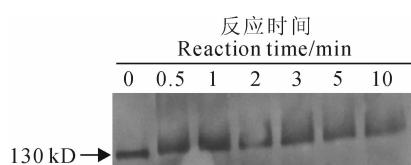


图6 Western blotting分析TRX-PARP1的活性
TRX-PARP1与NAD⁺孵育不同时间后,
取反应产物用PARP1抗体进行检测

Fig. 6 Western blotting analysis of the poly(ADP-ribosyl)ation activity of TRX-PARP1
After incubation with NAD⁺ for different time periods,
the TRX-PARP1 protein was detected by anti-PARP1 antibody

3 讨 论

为了深入研究植物PARP1基因功能,尝试通过原核表达来获得具有多聚ADP核糖聚合酶活性的拟南芥PARP1。在催化多聚ADP核糖化反应过程中,PARP先将底物NAD⁺裂解为尼克酰胺和ADP核糖两部分,因此,在测定酶活时,有的方法通过测定反应时释放的尼克酰胺的量来检测植物PARP的活性^[14],但这种方法比较间接。通过观察

PARP1自身多聚ADP核糖化反应前后分子量和凝胶迁移率的变化,可以直观地了解其酶活性,而且实验系统比较简单,几乎所有分子生物学实验室都能进行,实验重复性也较强。除了本实验中用到的Origami(DE3)宿主菌,还尝试了利用BL21(DE3)作为宿主菌来表达PARP1基因,但没能表达出的目标蛋白。Origami(DE3)是Novagen公司改造过的利于外源蛋白正确折叠的宿主菌,PARP1基因能在Origami(DE3)中表达,说明正确的折叠对PARP1基因的表达很重要。拟南芥PARP1基因作为最重要的PARP成员,它的体外表达与对其酶活性的研究将为深入研究PARP的功能奠定基础。

参与DNA损伤修复是动物PARP1基因的一个重要功能。研究发现,拟南芥PARP1转录受基因毒剂诱导^[15],它在正常情况下表达水平较低,而在基因毒剂诱导下表达出现显著的上升,提示植物PARP1基因可能参与DNA损伤修复。除了PARP1蛋白自身,PARP1还能多聚ADP核糖化修饰组蛋白H1、H2等^[16-18]。PAR带负电荷,能够中和组蛋白上的正电荷,从而使组蛋白与DNA解离变得松弛,有利于DNA修复蛋白接近DNA损伤的位点从而行使修复功能。

PARP活性的激活需要维持在适当水平。NAD⁺在细胞内起到维持氧化还原状态的作用,同时它也是一个能量代谢的中间物。当细胞出现严重的DNA损伤时,PARP1会被过度激活,消耗大量的NAD⁺,NAD⁺的合成需要ATP为前体,所以最终导致ATP的大量消耗。在能量衰竭的情况下,细胞就会发生死亡。本研究表明,拟南芥PARP1消耗NAD⁺速率较快,在10 s就有明显的泳动速率变化,据此推测体内PARP1的过度激活会消耗大量的NAD⁺。PARP1合成的PAR是一种死亡信号^[11],能够激发细胞编程性死亡,所以需要及时被多聚ADP核糖水解酶解。现有研究发现,通过RNA干扰技术沉默植物PARP1基因或是使用PARP抑制剂能够降低NAD⁺的消耗从而维持细胞的能量平衡,增强植物对干旱和氧化等胁迫的耐受性、减少胁迫造成的细胞死亡^[12]。另外,PARP基因可能调节细胞内的氧化还原状态,其表达与活性与GSH在细胞内的积累和定位有关^[19]。

虽然本研究报道了PARP1自身进行多聚ADP核糖化修饰,但是能被PARP1多聚ADP核糖化修饰的靶蛋白不仅局限在它自身,动物中就已经发现30个以上的靶蛋白,包括转录因子、DNA修复蛋

白、细胞核结构蛋白等。多聚 ADP 核糖化的修饰导致靶蛋白结构的改变,最终导致蛋白与蛋白相互作用、蛋白与 DNA 相互作用、酶活性或者亚细胞定位的变化^[20-21]。例如,组蛋白 H1、H2A 和 H2B 的多聚 ADP 核糖化修饰影响它们与 DNA 的结合,p53 的多聚 ADP 核糖化修饰阻碍它与核输出蛋白的相互作用^[22-23]。另外,PARP1 还能够多聚 ADP 核糖化修饰细胞核因子以及核酶^[22,24]。最近有文献报道拟南芥 PARP 的活性与生长发育有关,抑制 PARP 的活性能够影响细胞周期相关基因的表达、影响初级和次级代谢途径、细胞内氧化还原状态以及能量平衡^[13,25]。

与动物 PARP 相比,目前人们对植物 PARP 蛋

白的认识还十分有限,尤其是植物中 PARP 的靶蛋白所知甚少,目前已知的只有组蛋白 H1、H2A 和 H2B 以及在病原菌感染时一个被多聚 ADP 核糖修饰的未知蛋白^[26],更多的靶蛋白还有待于发现。为了识别更多的 PARP 靶蛋白,Western blotting 及免疫共沉淀(Co-IP)是常用的实验手段。这时就需要多聚 ADP 核糖抗体,目前多聚 ADP 核糖的商业化抗体所使用的抗原多为哺乳动物 PARP 合成的多聚 ADP 核糖。原核表达拟南芥 PARP1 合成的 PAR 可以用来制备特异性更强的植物 PAR 抗体。另外,一旦发现新的 PARP 靶蛋白,可以利用本实验方法来体外验证该靶蛋白能否被 PARP1 修饰。

参考文献:

- [1] AMÉ J C, SPENLEHAUER C, DE MURCIA G. The PARP superfamily[J]. *Bioessays*, 2004, **26**(8): 882-893.
- [2] ALTHAUS F R, RICHTER C. ADP-ribosylation of proteins. Enzymology and biological significance[J]. *Journal of Biochemistry, Molecular Biology and Biophysics*, 1987, **37**: 1-237.
- [3] KARRAS G I, KUSTATSCHER G, BUHECHA H R, et al. The macro domain is an ADP-ribose binding module[J]. *EMBO Journal*, 2005, **24**(11): 1 911-1 920.
- [4] HUBER A, BAI P, DE MURCIA J M, et al. PARP-1, PARP-2 and ATM in the DNA damage response: functional synergy in mouse development[J]. *DNA Repair (Amst)*, 2004, **3**(8-9): 1 103-1 108.
- [5] D'AMOURS D, DESNOYERS S, D'SILVA I, et al. Poly(ADP-ribosyl)ation reactions in the regulation of nuclear functions[J]. *Biochemical Journal*, 1999, **342**(Pt2): 249-268.
- [6] SLADE D, DUNSTAN M S, BARKAUSKAITE E, et al. The structure and catalytic mechanism of a poly(ADP-ribose) glycohydrolase [J]. *Nature*, 2011, **477**(7 366): 616-620.
- [7] LAMB R S, CITARELLI M, TEOTIA S. Functions of the poly(ADP-ribose) polymerase superfamily in plants[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2012, **69**(2): 175-189.
- [8] LANGELIER M F, RUHL D D, PLANCK J L, et al. The Zn3 domain of human poly(ADP-ribose) polymerase-1 (PARP-1) functions in both DNA-dependent poly(ADP-ribose) synthesis activity and chromatin compaction[J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, **285**(24): 18 877-18 887.
- [9] PION E, ULLMANN G M, AMÉ J C, et al. DNA-induced dimerization of poly(ADP-ribose) polymerase-1 triggers its activation[J]. *Biochemistry*, 2005, **44**(44): 14 670-14 681.
- [10] ALTMAYER M, MESSNER S, HASSA P O, et al. Molecular mechanism of poly(ADP-ribosyl)ation by PARP1 and identification of lysine residues as ADP-ribose acceptor sites[J]. *Nucleic Acids Research*, 2009, **37**(11): 3 723-3 738.
- [11] ANDRABI S A, KIM N S, YU S W, et al. Poly(ADP-ribose) (PAR) polymer is a death signal[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2006, **103**(48): 18 308-18 313.
- [12] DE BLOCK M, VERDUYN C, DE BROUWER D, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase in plants affects energy homeostasis, cell death and stress tolerance[J]. *The Plant Journal*, 2005, **41**(1): 95-106.
- [13] SCHULZ P, NEUKERMANS J, VAN DER KELEN K, et al. Chemical PARP inhibition enhances growth of *Arabidopsis* and reduces anthocyanin accumulation and the activation of stress protective mechanisms[J]. *PLoS One*, 2012, **7**(5): e37287.
- [14] TIAN R, CHEN D, DAI Y. Assaying poly(ADP-ribose) polymerase activity in plants by polarographic method[J]. *Chinese Science Bulletin*, 1999, **44**(20): 1 883-1 887.
- [15] CHEN I P, HAEHNEL U, ALTSCHMIED L, et al. The transcriptional response of *Arabidopsis* to genotoxic stress-a high-density colony array study (HDCA)[J]. *Plant Journal*, 2003, **35**(6): 771-786.

- [16] ADAMIETZ P, BREDEHORST R, HILZ H. ADP-ribosylated histone H1 from HeLa cultures. Fundamental differences to (ADP-ribose) n-histone H1 conjugates formed *in vitro* [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1978, **91**(2): 317–326.
- [17] OGATA N, UEDA K, HAYASHI O. ADP-ribosylation of histone H2B. Identification of glutamic acid residue 2 as the modification site [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 1980, **255**(16): 7 610–7 615.
- [18] MESSNER S, ALTMAYER M, ZHAO H, *et al.* PARP1 ADP-ribosylates lysine residues of the core histone tails [J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, **38**(19): 6 350–6 362.
- [19] PELLNY T K, LOCATO V, VIVANCOS P D, *et al.* Pyridine nucleotide cycling and control of intracellular redox state in relation to Poly (ADP-Ribose) Polymerase activity and nuclear localization of glutathione during exponential growth of *Arabidopsis* cells in culture [J]. *Molecular Plant*, 2009, **2**(3): 442–456.
- [20] HASSA P O, HOTTIGER M O. The diverse biological roles of mammalian PARPs, a small but powerful family of poly-ADP-ribose polymerases [J]. *Frontiers in Bioscience*, 2008, **13**: 3 046–3 082.
- [21] SCHREIBER V, DANTZER F, AME J C, *et al.* Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule [J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2006, **7**(7): 517–528.
- [22] KRAUS W L. Transcriptional control by PARP-1: chromatin modulation, enhancer-binding, coregulation, and insulation [J]. *Current Opinion in Cell Biology*, 2008, **20**(3): 294–302.
- [23] MENDOZA-ALVAREZ H, ALVAREZ-GONZALEZ R. Regulation of p53 sequence-specific DNA-binding by covalent poly(ADP-ribosylation) [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2001, **276**(39): 36 425–36 430.
- [24] MONACO L, KOLTHUR-SEETHARAM U, LOURY R, *et al.* Inhibition of aurora-B kinase activity by poly(ADP-ribosylation) in response to DNA damage [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, **102**(40): 14 244–14 248.
- [25] SCHULZ P, JANSSEUNE K, DEGENKOLBE T, *et al.* Poly(ADP-Ribose) polymerase activity controls plant growth by promoting leaf cell number [J]. *PLoS One*, 2014, **9**(2): e90322.
- [26] ADAMS-PHILLIPS L, BRIGGS A G, BENT A F. Disruption of poly(ADP-ribosylation) mechanisms alters responses of *Arabidopsis* to biotic stress [J]. *Plant Physiology*, 2010, **152**(1): 267–280.

封面植物介绍——裸茎碎米荠

裸茎碎米荠 (*Cardamine scaposa* Franch.) 隶属于十字花科 (Brassicaceae) 碎米荠属。多年生草本, 高 4 ~ 18 cm, 花葶状, 全株无毛。根状茎纤细, 匍匐生长。茎单一直立, 无叶。基生叶单一; 叶柄长 1 ~ 12 cm; 叶近于圆形或肾状圆形, 长 0.3 ~ 2.0 cm, 宽 0.5 ~ 3.0 cm, 基部心形, 边缘波状或全缘。无茎生叶。总状花序顶生, 具 2 ~ 10 朵花。果期花梗直立或上升, 长 1 ~ 4 cm, 基部的最长。萼片卵圆形或椭圆形, 长 3 ~ 4 mm, 宽 1.5 ~ 2.2 mm, 边缘膜质, 白色透明。花瓣白色, 倒卵形, 长 8 ~ 13 mm, 宽 5 ~ 7 mm, 顶端圆或微凹, 基部渐狭呈短爪。中间一对花丝长 4.5 ~ 8.0 mm, 基部略扩大; 外侧一对花丝长 2.5 ~ 4.5 mm; 花药狭长卵形, 长 1.5 ~ 1.8 mm; 花柱长 3.0 ~ 7.5 mm。每室具胚珠 8 ~ 14 个。长角果长 2.0 ~ 3.5 cm, 宽 1.2 ~ 1.7 mm; 光滑无毛。种子淡褐色, 长圆形, 长 2 ~ 3 mm, 宽 1.0 ~ 1.5 mm, 无翅。花期 4 ~ 6 月, 果期 6 ~ 7 月。

裸茎碎米荠是中国特有一种药用植物, 生长在海拔 1 400 ~ 2 900 m 的灌木丛和潮湿地带。分布于河北、内蒙古、陕西、山西和四川。

(图文由西北农林科技大学资环学院朱仁斌提供)