



百脉根 *Rac1* 蛋白多克隆抗体的制备与应用

柯丹霞, 张伟, 李祥永, 杨明影, 于小瑞, 朱涵雪, 王晓菲

(信阳师范学院 生命科学学院, 大别山农业生物资源保护与利用研究院, 河南信阳 464000)

摘要: *Rop* 基因在豆科植物与根瘤菌共生互作过程中发挥重要作用。该研究以模式豆科植物百脉根根系 cDNA 为模板, 扩增得到百脉根的 1 个 *Rop* 基因 (*Rac1*), 将其连接到原核表达载体 pET28a, 转化获得 *Rac1* 基因的大肠杆菌 BL21(DE3) 工程菌。优化 *Rac1* 蛋白诱导表达条件, 亲和吸附法纯化蛋白, 制备 *Rac1* 多克隆抗体, 并应用该抗体检测 *Rac1* 过表达转基因植株中 *Rac1* 蛋白的表达水平。结果显示: (1) 经双酶切和测序鉴定, 成功构建 pET28a-*Rac1* 原核表达载体。(2) *Rac1* 蛋白的最佳诱导表达条件为: IPTG 浓度 0.1 mmol/L、温度 20 °C、时间 6 h, 重组蛋白以可溶形式高效表达; 纯化的 *Rac1* 蛋白经 SDS-PAGE 检测, 目的条带大小为 25 kD 左右, 且条带清晰、单一无杂带。(3) Western blotting 显示, 制备的多克隆抗体能特异识别其对应的抗原, 且效价较高。(4) 通过农杆菌介导的毛根转化法获得 *Rac1* 过表达植株的阳性毛根, 提取阳性毛根总蛋白, Western blotting 分析显示过表达植株中 *Rac1* 蛋白表达量显著高于空载体对照, 从翻译水平证实过表达载体构建的有效性。该研究制备的 *Rac1* 多克隆抗体能够高效特异地检测来源于百脉根体内的 *Rac1* 蛋白, 这将为进一步开展 *Rac1* 在共生信号转导途径中的生物学功能研究提供有利工具。

关键词: 关键词: 百脉根; *Rac1*; 原核表达; 多克隆抗体

中图分类号: Q781; Q786 **文献标志码:** A

Polyclonal Antibody Preparation and Application of *Lotus japonicus Rac1* Protein

KE Danxia, ZHANG Wei, LI Xiangyong, YANG Mingying, YU Xiaorui,
ZHU Hanxue, WANG Xiaofei

(College of Life Sciences & Institute for Conservation and Utilization of Agro-bioresources in Dabie Mountains, Xinyang Normal University, Xinyang, Henan 464000, China)

Abstract: *Rop* gene plays an important role in the process of symbiotic interaction between legume and rhizobium. A *Rop* gene *Rac1* was amplified from the root cDNA of model legume *Lotus japonicus* and ligated to the prokaryotic expression vector pET28a. The engineering bacterium carrying *Rac1* gene in *E. coli* BL21 (DE3) was obtained. The expression conditions of *Rac1* protein was optimized, and the protein was purified by affinity chromatography. *Rac1* protein expression levels of overexpression plant were detected by using the prepared anti-*Rac1* polyclonal antibody. The results showed: (1) the prokaryotic expression vector of pET28a-*Rac1* was constructed successfully by double enzyme digestion and DNA sequencing. (2) The optimal expression condition was induction temperature at 20 °C, time at 6 h, and IPTG concentration at 0.1 mmol/L. The recombinant protein was high-efficiency expressed in the form of soluble protein. The

收稿日期: 2015-10-12; 修改稿收到日期: 2016-03-15

基金项目: 国家自然科学基金青年基金(31400213); 信阳师范学院青年科研基金(2014-QN-059); 信阳师范学院青年骨干教师资助计划(2015); 信阳师范学院“南湖学者奖励计划”青年项目

作者简介: 柯丹霞(1983—), 女, 博士, 讲师, 主要从事豆科植物与根瘤菌共生固氮分子生物学研究。E-mail: kdx_029@163.com

purified Rac1 protein was obtained by affinity chromatography and detected by SDS-PAGE. The band size was about 25 kD, and the bands were clear and single. (3) Western blotting analysis showed that the polyclonal antibody could specifically react with the corresponding antigen, and the titer was high. (4) Agrobacterium mediated transformation of hairy roots method was used to obtain the positive hairy roots of Rac1 overexpression plant. The total protein of positive hairy roots was extracted and detected by Western blotting. The results showed that the expression of Rac1 protein in the Rac1 overexpression plant was significantly higher than that in the empty vector control, which proved the construction of overexpression vector was effective from translation level. The results showed that the preparation of Rac1 polyclonal antibody could specificity detect the native Rac1 protein in *Lotus japonicus*, which will provide a powerful tool for the further study of the biological function of Rac1 in the symbiosis signal transduction pathway.

Key words: *Lotus japonicas*; Rac1; prokaryotic expression; polyclonal antibody

Rop 蛋白通过与各种调控因子的相互作用参与植物体内多种生命活动,包括调控细胞的极性生长、发育与形态建成、内膜运输等过程^[1-5]。Rop 还参与植物的生物与非生物胁迫以及激素信号转导等途径^[6-9]。Rop 与上下游效应蛋白之间的调节机制在植物中保守存在^[10]。质膜上的鸟苷酸交换因子(GEF)首先激活 Rop 小 GTPase,处于活化态的 Rop 可以与下游特定的靶蛋白相结合,激活 Rop 依赖的信号途径,进而执行不同的生理功能。最后,激活的 Rop 在鸟苷酸活化蛋白(GAP)和鸟苷酸抑制解离因子(GDI)的作用下,恢复非活化状态,Rop 蛋白又可以开始新一周期的循环过程。

Rop 蛋白的踪迹首先从豌豆花粉管尖端质膜中被发现,并且豌豆花粉管的伸长受到 Rop1 抗体的抑制,表明 Rop 蛋白参与调控花粉管伸长^[11]。抗体杂交结果显示拟南芥 Rop4 位于伸长的根毛尖端^[2]。GAP 只在花粉管侧翼加速 Rop 蛋白的 GTP 水解,使 Rop 处于失活状态,而 GDI 将非活化的 Rop 由侧翼重新运回到顶点,失活的 Rop 再次被 GEF 激活,研究人员从蛋白水平证实 Rop 及其上下游活性调节子通过复杂的调节方式共同维持细胞的极性生长^[12-14]。

近年来大量的证据表明,Rop 基因在豆科植物与根瘤菌共生互作过程中发挥重要作用。苜蓿(*Medicago*)是另一种重要的模式豆科植物。在紫花苜蓿(*Medicago sativa*)接种根瘤菌的根系中检测到 Rop 类基因的表达,这是 Rop 基因参与共生互作过程的第一个证据^[15]。蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*)中的 3 个 Rop 基因,MtRop3、MtRop5 和 MtRac1 受根瘤菌诱导表达量明显增加^[16]。大豆(*Glycine max*)Rop 类基因 RabA2 特异表达于接种根瘤菌的根毛中,接种后的基因沉默植株根毛变形、侵染线起始和根瘤形成都被完全抑制^[17]。以上

结果从转录水平对豆科植物中 Rop 基因的功能进行了研究。Lei 等^[18]从翻译水平证实蒺藜苜蓿 MtRop10 蛋白的定位及其在根毛顶端的活性受到根瘤菌结瘤因子的调控,这二者之间的相互作用是蒺藜苜蓿根毛变形和卷曲所必须的。

模式豆科植物百脉根(*Lotus japonicus*)中也分离得到 2 个 Rop 基因,LjRop6 和 LjRac1 基因受根瘤菌诱导,接种根瘤菌后基因表达量明显升高,LjRop6 的 RNAi 植株接种后根瘤菌的早期侵染被抑制,结瘤数目也相应减少^[19]。最新研究发现,Lj-Rac1 过表达植株能够促进百脉根结瘤^[20]。因此,百脉根中的 Rop 基因在共生结瘤过程中也发挥着重要功能。目前,关于百脉根中 Rop 的研究主要集中于转录水平,而关于翻译后 Rop 蛋白质的研究报道很少。本实验通过构建原核表达载体,分离纯化 Rac1 重组蛋白,制备 Rac1 多克隆抗体,利用该抗体对 Rac1 过表达转基因植株阳性毛根总蛋白中 Rac1 蛋白的含量进行检测,为从翻译水平分析 Rac1 在百脉根与根瘤菌共生结瘤过程中的生物学功能奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

百脉根 MG-20 种子、百脉根中生根瘤菌 MAFF303099 由华中农业大学农业微生物国家重点实验室根瘤菌分子生物学实验室提供。原核表达载体 pET28a、大肠杆菌菌株 DH5a 和 BL21(DE3)由本实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 百脉根总 RNA 提取及 cDNA 合成 百脉根 MG-20 根部组织总 RNA 提取参照《分子克隆实验指南》所述方法进行^[21],以提取所得总 RNA 为模板,按照 Takara 公司试剂盒操作说明合成 cDNA,得到的 cDNA 第一链,置-20℃保存,备用。

1.2.2 原核表达载体构建 根据 NCBI 网站公布的 *Rac1* 基因序列(GenBank 登录号 Z73961.1),用 Primer Premier 5.0 软件设计构建 *Rac1* 原核表达载体的上游引物(5'-ACGCGTCGATGAGTGCT-TCCA-3')和下游引物(5'-GGAATTCACTCA-CAATATTGAG-3'),下划线分别为 *Sal*I 和 *Eco*RI 酶切位点。以合成的 cDNA 第一链为模板进行 PCR 扩增,PCR 反应体系为 2.5 μ L 10 \times PCR Buffer,4 μ L 2.5 mmol/L dNTP,1 μ L 上游特异性引物(10 μ mol/L),1 μ L 下游特异性引物(10 μ mol/L),1 μ L cDNA 第一链模板,0.25 μ L *ExTaq* DNA 聚合酶,用 ddH₂O 补足体积到 25 μ L。PCR 反应程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 产物利用琼脂糖电泳检测后,切胶回收 PCR 目的片段,再经双酶切后,酶切产物连接到表达载体 pET28a 上,转入大肠杆菌 DH5a,酶切和测序鉴定阳性克隆。

1.2.3 目的蛋白诱导表达及可溶性分析 将构建好的 pET28a-Rac1 重组质粒转入表达菌株 BL21(DE3)中;挑取单菌落于 Kana(50 μ g/mL)的 LB 液体培养基中,37 $^{\circ}$ C、250 r/min 过夜培养;过夜培养物以 1%的接种量转接入新鲜培养基中,以 37 $^{\circ}$ C、250 r/min 培养至 OD₆₀₀ 值达 0.5~0.6 时,分别加入 IPTG 至终浓度为 0.1、0.25 和 0.5 mmol/L,置于 20、28 和 37 $^{\circ}$ C 摇床中培养,2、4 和 6 h 分别取样 5 mL;收集 1.5 mL 菌体,加入上样缓冲液重悬菌体,沸水浴 5~10 min;将制备好的全蛋白样品进行 SDS-PAGE 电泳,未重组载体 pET28a 作为对照,所有条件保持一致。

融合蛋白成功诱导表达后,收集剩余菌体,每管加入 600 μ L PBS 缓冲液,加 ddH₂O 定容至 1 L。缓冲液(pH 7.4)组成为 140 mmol/L NaCl、2.7 mmol/L KCl、10 mmol/L Na₂HPO₄ 和 1.8 mmol/L KH₂PO₄。离心管置于冰水混合物中,超声波破碎细胞 4~6 次,每次 10 s,间隔 1 min,静置 10 min;4 $^{\circ}$ C、12 000 r/min 高速离心 15 min,上清和沉淀等比例取样,分别加入上样缓冲液,沸水浴 5~10 min 后进行 SDS-PAGE 电泳。

1.2.4 融合蛋白的纯化 收集诱导菌体,PBS 洗涤 1 次后,再用 PBS 重悬,置于冰浴中超声波破碎至液体透明;12 000 r/min、4 $^{\circ}$ C 离心 15 min,取上清;加入经 1 \times PBS 平衡的 Ni 柱,混合均匀;万向摇床上冰浴振荡 2 h;4 $^{\circ}$ C 离心后弃上清,用 1 \times PBS 洗涤 Ni 柱 2~3 次,洗脱杂蛋白;用含 20~

80 mmol/L 咪唑的 PBS 洗脱液再次洗脱 Ni 柱上的杂蛋白;用含 100~500 mmol/L 咪唑的 PBS 洗脱目的蛋白,置万向摇床冰浴振荡 10 min;4 $^{\circ}$ C 离心后收集上清;重复洗脱 2 次,将 3 次收集的上清经透析液(20 mmol/L Tris-HCl,50 mmol/L NaCl)透析后,再通过蔗糖浓缩,样品经 SDS-PAGE 电泳检测,纯化的融合蛋白样品分装后置-70 $^{\circ}$ C 贮存,备用。

1.2.5 重组蛋白抗体的制备及检测 配制 SDS-PAGE 胶时,积层胶上方不插梳子,预留 1 cm 宽的空间点样。制备好的蛋白样品电泳、染色、脱色后,切下目标蛋白凝胶条带,用蒸馏水彻底清洗。在研钵中加入适量生理盐水,充分研磨凝胶至无颗粒状物质,将制备好的抗原与弗氏完全佐剂等体积混合,制备成“油包水”乳状液。首次注射前,取未免疫新西兰大白兔耳静脉血 3~5 mL,制成血清作为空白对照。第 1 次注射抗原 1 mg,经背部皮下多点注射免疫。初次免疫后 2 周,将抗原与弗氏不完全佐剂等体积充分混匀,进行第二次加强免疫,抗原剂量增加到 1.5 mg。之后每隔 2 周加强免疫 1 次,方法剂量同二免。3 次加强免疫后,耳静脉采血并分离血清,Western blotting 检测多克隆抗体效价。电泳后的蛋白胶先转膜,4 $^{\circ}$ C 封闭过夜后,Rac1 多克隆抗体作为一抗(1:1000)室温孵育 2 h,辣根过氧化物酶标记的羊抗兔 IgG 作为二抗(1:2 000,碧云天)室温孵育 1 h;最后使用化学发光显色试剂盒 Beyo-ECL Plus(碧云天)进行显色,并利用化学发光成像系统(Protein Simple)记录结果。

当抗体效价达到要求时,兔心脏穿刺采血,收集血清,分装于-70 $^{\circ}$ C 贮存备用。若抗体效价不理想,可继续加强免疫 1 次。

1.2.6 转基因阳性毛根 Rac1 蛋白的检测 利用发根农杆菌介导的毛根转化法获得百脉根 Rac1 过表达转基因阳性毛根,具体方法参照参考文献^[22],将鉴定的阳性毛根剪下 3~5 cm,平铺于含 300 mg/mL 羧苄霉素的 MS 固体培养基上,进行阳性毛根的扩繁培养,1 周继代 1 次,继代 3~5 次,用于 Rac1 蛋白的检测分析。

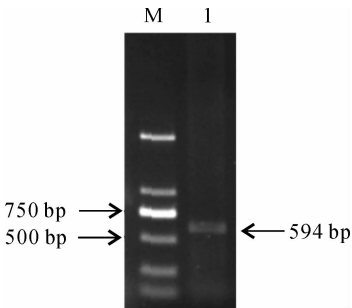
在 10 mL 蛋白抽提缓冲液中加入 1 片蛋白酶抑制剂药片(Roche),于冰上放置,待药片溶解后充分混匀,现配现用。缓冲液(pH 8.0)组成为 50 mmol/L Tris-MES、0.5 mol/L sucrose、1 mmol/L MgCl₂、10 mmol/L EDTA 和 5 mmol/L DTT。收集扩繁的 Rac1 过表达和空载体转化植株阳性毛根各 0.1 g,于盛有液氮的研钵中研磨成粉

状,迅速转移粉末至离心管中,粉末与抽提缓冲液等体积混合,于斡旋器上涡旋混匀,再于冰上放置 10 min;4 ℃、12 000 r/min 离心 20 min 收集上清,加入上样缓冲液,沸水浴保温 5~10 min,样品进行 SDS-PAGE 电泳及 Western blotting 检测。

2 结果与分析

2.1 重组表达载体的构建

用设计的引物扩增百脉根 *Rac1* 基因,扩增产物大小为 594 bp,与预期结果一致(图 1)。测序结果表明,本研究扩增获得的百脉根 *Rac1* 基因全长 594 bp,编码 197 个氨基酸,利用在线软件预测该蛋白分子量为 20 kD 左右。扩增产物经 *Sal1* 和 *EcoR1* 双酶切,连入表达载体 pET28a 上。重组质粒经酶切获得大小约 5.3 kb 的载体片段和 594 bp 左右的插入片段(图 2)。由于重组蛋白含有组氨酸标签,利用在线软件预测重组蛋白分子量为 25 kD 左右,较 *Rac1* 蛋白分子量大。进一步的测序结果也证实 *Rac1* 基因的原核表达载体构建成功。

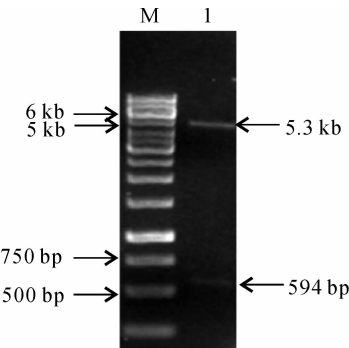


M. DL2000;1. PCR 扩增产物

图 1 *Rac1* 目的片段的 PCR 扩增

M. DL2000; 1. Product of PCR amplification

Fig. 1 PCR amplification of *Rac1* gene



M. 1kb DNA ladder;1. 重组质粒酶切产物

图 2 重组质粒 pET28a-*Rac1* 酶切鉴定

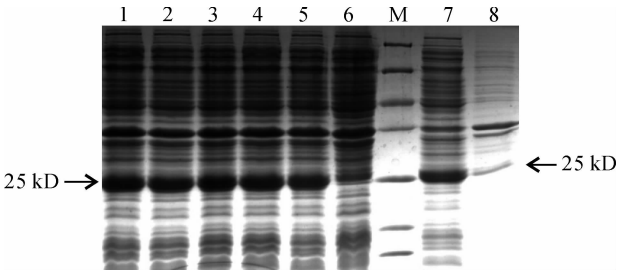
M. 1kb DNA ladder; 1. Product of recombinant plasmid digested with *Sal1* and *EcoR1*

Fig. 2 Identification of the recombinant pET28a-*Rac1* plasmid digested with *Sal1* and *EcoR1*

2.2 重组蛋白的表达与纯化

重组表达载体转化到表达菌 BL21(DE3)中,诱导后经 SDS-PAGE 分析,在 25kD 左右有明显的表达条带,其大小与预测的重组蛋白分子量大小相符(图 3),说明重组蛋白诱导表达成功。为了获得最大可溶性目的蛋白产量,获得 pET28a-*Rac1* 表达菌株最佳诱导条件,诱导温度 20 ℃,诱导时间 6 h, IPTG 浓度 0.1 mmol/L, SDS-PAGE 电泳分析目的蛋白在大肠杆菌 BL21(DE3)中以上清形式大量存在(图 3)。

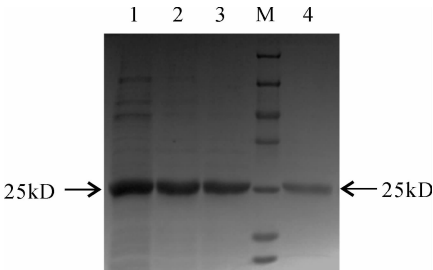
目的蛋白含 6×His 纯化标签,可以经金属螯合亲和层析吸附于 Ni-NTA 树脂层析柱,冲洗除去非特异吸附的杂蛋白后,将目的蛋白洗脱,透析浓缩。每一步骤分别取样, SDS-PAGE 检测。结果显示透析浓缩后的目的蛋白在 25 kD 左右,条带清晰且单一无杂带,表明重组蛋白被高效纯化(图 4)。



1~5. 诱导表达重组菌体蛋白;6. 诱导表达空载体菌体蛋白;
M. 蛋白 marker;7. 诱导菌株超声波破碎后的上清;
8. 诱导菌株超声波破碎后的沉淀

图 3 *Rac1* 重组蛋白诱导表达的 SDS-PAGE 分析
1~5. Induced cells containing pET28a-*Rac1*; 6. Induced cells containing pET28a; M. Protein marker; 7. Soluble protein from induced cells containing pET28a-*Rac1*; 8. Insoluble protein from induced cells containing pET28a-*Rac1*

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of the expression of *Rac1* recombinant protein



1~3. 纯化的目的重组蛋白;M. 蛋白 marker;
4. 透析浓缩后的目的蛋白

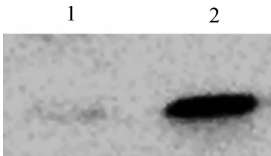
图 4 *Rac1* 纯化蛋白的 SDS-PAGE 分析
1-3. Purified *Rac1* protein; M. Protein marker;
4. Target protein after dialyzed and concentrated
Fig. 4 SDS-PAGE analysis of purified *Rac1* recombinant protein

2.3 多克隆抗体的制备与检测

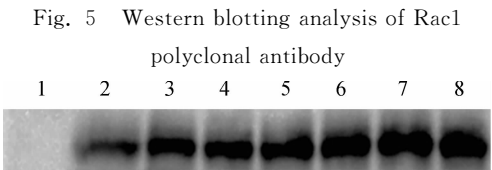
将目的蛋白条带切下,液氮研磨后加入佐剂免疫新西兰大白兔,制备 Rac1 多克隆抗体。利用 Western blotting 检测制备抗体的效价与特异性,结果显示原核表达的融合蛋白与多克隆抗体杂交显示单一条带,与免疫前抗血清杂交没有条带出现,一抗均为 1 : 1 000 稀释,说明制备的 Rac1 多克隆抗体达到理想效价,可以开展后续试验。未重组表达载体的菌体蛋白作为阴性对照,与多克隆抗体以及免疫前抗血清都没有杂交出任何条带,说明该抗体具有较高的特异性(图 5)。

2.4 转基因阳性毛根 Rac1 蛋白的检测

为了从蛋白水平检测过表达植株中 Rac1 蛋白的表达量,本实验提取阳性毛根总蛋白,利用制备的 Rac1 多克隆抗体进行 Western blotting 杂交分析。由图 6 可以看出,阳性毛根过表达提取蛋白杂交条带在 20kD 左右,与预测蛋白分子量大小一致,而阴性对照(未重组表达载体 pET28a 的菌体蛋白)没有目的条带出现;阳性毛根中过表达植株毛根与空载体 p1302G 植株相比,Rac1 蛋白的表达量明显升高,由此说明,目的基因已完整整合到百脉根根部基因组中,且 Rac1 蛋白也得到过量表达。



1. 未重组表达载体的菌体蛋白;2. 诱导后的目的蛋白
图 5 Rac1 多克隆抗体的 Western blotting 分析
1. Induced cells containing pET28a; 2. Total protein from induced cells containing pET28a-Rac1



1. 未重组表达载体的菌体蛋白;
2. 对照植株阳性毛根中的 Rac1 蛋白;
3~8. 过表达植株阳性毛根中的 Rac1 蛋白

图 6 转基因阳性毛根 Rac1 蛋白的 Western blotting 分析

1. Induced cells containing pET28a; 2. Rac1 protein in transgenic positive hairy root of control plant;
3-8. Rac1 protein in transgenic positive hairy root of over-expression plant

Fig. 6 Western blotting analysis of Rac1 protein in transgenic positive hairy root

3 讨 论

近年来,研究人员已经从多种豆科植物中分离并鉴定出 *Rop* 家族基因,并证实 *Rop* 基因参与豆科植物与根瘤菌共生结瘤信号传递途径。目前,关于豆科植物中 *Rop* 基因功能的研究主要集中于转录水平,关于翻译后 *Rop* 蛋白质的相关研究报道较少。在前期工作中,笔者通过薄板层析和放射自显影技术检测了百脉根 *Rop6* 蛋白的 GTP 酶活,证实野生型的 *Rop6* 能够水解 GTP,自身具有微弱的 GTP 酶活,且 *Rop6* 的相互作用蛋白 *NFR5*(结瘤因子受体蛋白)并不影响其 GTP 酶活性^[22]。随后,利用酵母双杂交技术筛选到百脉根 *Rop6* 的相互作用蛋白 *Clathrin heavy chain*(网格重链蛋白),证实二者形成复合物参与根瘤菌的侵染过程^[23]。而在水稻中也证实 *Rop* 同系物 *OsRac1* 能够和 *MAPK6*、*Hsp90* 和 *RACK1* 等多个蛋白形成复合物,从而将天然免疫信号传递到下游^[24]。因此在豆科植物中开展这些方面的研究包括鉴定 *Rop* 蛋白的生化功能,明确 *Rop* 蛋白的生物学功能,寻找与之相互作用的新蛋白,建立并完善参与结瘤信号传递的蛋白调控网络等是非常有意义的^[25]。

百脉根中的另一个 *Rop* 家族基因 *Rac1* 被证实受根瘤菌诱导增强表达,基因过表达显著增加植株结瘤数目^[20]。该研究从转录水平初步证实 *Rac1* 基因可能正调控共生互作过程,但到目前为止关于其蛋白质相关的研究还未有报道。本研究鉴于原核表达系统培养条件简单、基因操作容易、从构建到产物纯化周期短等优点,构建了 *Rac1* 原核重组表达载体,转化大肠杆菌 BL21(DE3),实现了该基因的原核表达。某些情况下,大肠杆菌表达的蛋白质不能有效正确折叠,部分蛋白会形成不溶性的包涵体。本研究通过优化诱导条件,获得重组蛋白的最佳诱导条件,在诱导温度 20℃、诱导时间 6 h、IPTG 浓度 0.1 mmol/L 条件下,目的蛋白在大肠杆菌 BL21(DE3)中以上清形式大量存在,由此获得了大量可溶性蛋白。本研究使用镍柱结合亲和吸附 His 标签纯化目的蛋白,适宜浓度咪唑洗脱,透析浓缩最终获得高纯度 *Rac1* 融合蛋白,为深入研究百脉根 *Rac1* 的反应动力学、催化特性等生化功能奠定了基础。

揭示百脉根 *Rac1* 的生物学功能,从翻译水平入手更具现实意义,免疫学技术是研究蛋白质表达水平的有效方法,因此本研究以高纯度目的蛋白作为抗原,免疫兔后获得 *Rac1* 多克隆抗体,Western

blotting 显示获得的抗体特异性好,背景低。利用 Rac1 多克隆抗体检测转基因阳性毛根中 Rac1 的蛋白表达水平,从翻译水平证实过表达载体构建的有效性。通过实验手段证实 Rac1 蛋白的过量表达能够增加转基因植株的结瘤数目。因此,本研究中

Rac1 多克隆抗体的制备不仅将为今后开展 Rac1 蛋白在不同生长发育时期和不同组织内的蛋白表达谱以及蛋白定位等方向的研究奠定基础,也将为进一步明确 Rac1 在豆科植物与根瘤菌共生结瘤信号传递途径中的生物学功能提供有利的工具。

参考文献:

[1] LI H, WU G, *et al.* *Arabidopsis* Rho-related GTPases; differential gene expression in pollen and polar localization in fission yeast [J]. *Plant Physiology*, 1998, **118**(2): 407-417.

[2] JONES M A, SHEN J J, FU Y, *et al.* The *Arabidopsis* Rop2 GTPase is a positive regulator of both root hair initiation and tip growth [J]. *The Plant Cell*, 2002, **14**(4): 763-776.

[3] MUCHA E, HOEFLE C, HÜCKELHOVEN R, *et al.* RIP3 and AtKinesin-13A - a novel interaction linking Rho proteins of plants to microtubules [J]. *European Journal of Cell Biology*, 2010, **89**(12): 906-916.

[4] YANG G, GAO P, ZHANG H, *et al.* A mutation in MRH2 kinesin enhances the root hair tip growth defect caused by constitutively activated ROP2 small GTPase in *Arabidopsis* [J]. *PLoS One*, 2007, **2**(10): e1074.

[5] BLOCH D, LAVY M, *et al.* Ectopic expression of an activated RAC in *Arabidopsis* disrupts membrane cycling [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2005, **16**(4): 1 913-1 927.

[6] GU Y, WANG Z, YANG Z. ROP/RAC GTPases; an old master regulator for plant signaling[J]. *Current Opinion Plant Biology*, 2004, **7**(5): 527-536.

[7] ONO E, WONG H L, KAWASAKI T, *et al.* Essential role of the small GTPase Rac in disease resistance of rice [J]. *Proceedings of National Academy of Sciences of the United State of American*, 2001, **98**(2): 759-764.

[8] FUJIWARA M, UMEMURA K, KAWASAKI T, *et al.* Proteomics of RacGTPase signaling reveals its predominant role in elicitor-induced defense response of cultured rice cells [J]. *Plant Physiology*, 2006, **140**(2): 734-745.

[9] TAO L Z, CHEUNG A Y, NIBAU C, *et al.* RAC GTPases in tobacco and *Arabidopsis* mediate auxin-induced formation of proteolytically active nuclear protein bodies that contain AUX/IAA proteins[J]. *The Plant Cell*, 2005, **17**(8): 2 369-2 383.

[10] YANG Z. Small GTPase: Versatile signaling switches in plants [J]. *The Plant Cell*, 2002, **14** (Suppl): S375-388.

[11] LIN Y, YANG Z. Inhibition of pollen tube elongation by microinjected anti-Rop1Ps antibodies suggests a crucial role for Rho-type GTPases in the control of tip growth[J]. *The Plant cell*, 1997, **9**(9): 1 647-1 659.

[12] KLAHRE U, BECKER C, SCHMITT A C, *et al.* Nt-RhoGDI2 regulates Rac/Rop signaling and polar cell growth in tobacco pollen tubes [J]. *The Plant Journal*, 2006, **46** (6): 1 018-1 031.

[13] KLAHRE U, KOST B. Tobacco RhoGTPase ACTIVATING PROTEIN1 spatially restricts signaling of RAC/Rop to the apex of pollen tubes [J]. *The Plant cell*, 2006, **18**(11): 3 033-3 046.

[14] KOST B. Spatial control of Rho (Rac-Rop) signaling in tip-growing plant cells[J]. *Trends in Cell Biology*, 2008, **18** (3): 119-127.

[15] SZÜCS A, DORJGOTOV D, ÖTVÖS K, *et al.* Characterization of three RopGTPase genes from alfalfa (*Medicago sativa*, L.) [J]. *Biochimica Etbiophysica Acta*, 2006, **1** **759**(1/2): 1 080-1 115.

[16] LIU W, CHEN A, LUO L, *et al.* Characterization and expression analysis of *Medicago truncatula* ROP GTPase family during the early stage of symbiosis [J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2010, **52**(7): 639-652.

[17] BLANCO F A, MESCHINI E P, *et al.* A small GTPase of the Rab family is required for root hair formation and preinfection stages of the common bean-Rhizobium symbiotic association[J]. *The Plant Cell*, 2009, **21**(9): 2 797-2 810.

[18] LEI M, WANG Q, LI X, *et al.* The small GTPase ROP10 of *Medicago truncatula* is required for both tip growth of root hairs and nod factor-induced root hair deformation [J]. *The Plant Cell*, 2015, **27**(3): 806-22.

[19] KE D, FANG Q, CHEN C, *et al.* Small GTPase ROP6 interacts with NFR5 and is involved in nodule formation in *Lotus japonicus* [J]. *Plant Physiology*, 2012, **159**(1): 131-143.

[20] 柯丹霞, 李祥永, 等. 百脉根小 G 蛋白 Rac1 基因的克隆与功能分析[J]. 西北植物学报, 2015, **35**(12): 2 365-2 372.

KE D X, LI X Y, *et al.* Functions of small GTPase Rac1 in nodulation process in *Lotus japonicas* [J]. *Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica*, 2015, **35**(12): 2 365-2 372.

[21] J. 莎姆布鲁克. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 等译. 北京: 科学出版社, 2005.

[22] 柯丹霞. 小 G 蛋白 ROP6 在百脉根结瘤信号途径中功能及作用机制的研究[D]. 武汉: 华中农业大学, 2012.

[23] WANG C, ZHU M, DUAN L, *et al.* *Lotus japonicus* clathrin heavy Chain1 is associated with Rho-Like GTPase ROP6 and involved in nodule formation[J]. *Plant Physiology*, 2015, **167**(4): 1 497-1 510.

[24] THAO N P, CHEN L, NAKASHIM A, *et al.* RAR1 and HSP90 form a complex with Rac/Rop GTPase and function in innate-immune responses in rice [J]. *The Plant Cell*, 2007, **19**(12): 4 035-4 045.

[25] 柯丹霞, 李祥永. 结瘤信号途径中相关调控蛋白的研究进展[J]. 信阳师范学院学报(自然科学版), 2015, **28**(4): 621-626.

KE D X, LI X Y. Research progress of key regulatory proteins in nodulation pathway[J]. *Journal of Xinyang Normal University(Natural Science Edition)*, 2015, **28**(4): 621-626.

(编辑: 宋亚珍)