

棉花纤维素合酶复合体蛋白的分离与鉴定

李先良^{1,2}, 李傲¹, 彭良才¹, 夏涛^{1*}

(1.华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室/生物质与生物能源研究中心/植物科学技术学院/生命科学技术学院, 武汉 430070; 2.荆楚理工学院生物工程学院, 湖北 荆门 448000)

摘要: 选用开花后 24 d 的棉纤维提取原生质膜, 用 Triton X-100 溶解后通过纤维素合酶 1 (*Gossypium hirsutum* cellulose synthase1, GhCESA1) 抗体进行免疫共沉淀 (Co-Immunoprecipitation, Co-IP), 以聚丙烯酰胺凝胶电泳 (Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis, SDS-PAGE) 分离免疫共沉淀的产物, 用液相色谱-质谱联用仪 (Liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) 进行鉴定。结果表明, 棉纤维纤维素合酶复合体可能存在 68 种蛋白, 其中包括 8 种纤维素合酶 (Cellulose synthase, CESA), 它们涵盖了棉纤维初生壁和次生壁 2 种类型纤维素合酶。这说明在次生壁形成的细胞中存在 2 种类型 CESA。本研究也表明复合体中存在非 CESA 蛋白。

关键词: 棉纤维; 纤维素合酶; 复合体; 次生壁

中图分类号: S562:Q814 **文献标志码:** A

文章编号: 1002-7807(2013)02-0129-06

Characterization of the Cellulose Synthase Complex in Cotton

LI Xian-liang^{1,2}, LI Ao¹, PENG Liang-cai¹, XIA Tao^{1*}

(1. National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement and National Centre of Plant Gene Research / Biomass and Bioenergy Research Centre / College of Plant Science and Technology / College of Life Science and Technology, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China; 2. College of Bioengineering, Jingchu University

中除了 CESA 蛋白以外,还有非 CESA 蛋白对纤维素合成是必需的^[7]。蔗糖合酶能为纤维素合酶提供底物,即尿苷二磷酸葡萄糖(Uridine diphosphate glucose, UDPG),现有实验证明它是完整复合体组成部分^[8]。细胞骨架为复合体在膜上滑动提供支持,实验表明,复合体沿着细胞骨架排列的方向双向滑动,细胞骨架解聚会引起复合体在膜上的不规则分布^[9]。虽然目前对纤维素合酶复合体已有以上了解,但对于一个具有正常纤维素合成功能的复合体应包含哪些组成蛋白还不完全清楚。

发现复合体组成蛋白的途径之一是筛选纤维素合成突变体,分离突变基因,然后验证基因产物与复合体的关系。目前,已发现许多基因影响纤维素的合成,如 *KORRIGAN*^[10-13], *KOBITO*^[14-15]。但还未有证据证明它们是复合体的组成部分。用 CESA 蛋白筛选 cDNA 文库可以得到一些与 CESA 相互作用的蛋白。Gu 等通过酵母双杂交的方法筛选到 1 个与拟南芥 *CesA6* 相互作用的蛋白 (Cellulose synthase interactive protein1, CSI1),该蛋白的突变可导致细胞伸长障碍和纤维素减少^[16];但不清楚该蛋白在复合体中的具体作用。通过 RNA 干扰技术 (RNA interfere, RNAi) 筛选到影响导管次生壁形成的蛋白 *Ted6* 和 *Ted7*, 通过免疫共沉淀和双分子荧光技术证实 *Ted6* 与一个纤维素合酶存在相互作用^[7]。同样,该蛋白在复合体中的具体作用及如何影响次生壁形成还不清楚。通过免疫共沉淀的方法纯化活性复合体,然后通过质谱进行鉴定,可以发现复合体的组成蛋白,这一方法的主要障碍在于纯化活性复合体。但是,纯化的复合体不能合成晶体纤维素,不代表纯化的蛋白不是复合体的组成部分。这是因为:纯化的蛋白是复合体的一部分,这些蛋白不是以复合体的形式存在,所以不能合成晶体纤维素。但这些蛋白的集合应包含复合体的组成蛋白。Song 利用这种方法分离并鉴定了杨树的复合体组成蛋白^[18]。棉纤维作为一种特异化的合成纤维素的细胞,其复合体的组成更能体现作为合成纤维素复合体的特征。本研究用棉纤维 CESA1 为抗体进行免疫共沉淀,将沉淀蛋白通过 SDS-PAGE 分离,将分离蛋白通过 LC-MS 鉴定,希望揭示棉花

纤维素合酶复合体的组成。

1 材料和方法

1.1 材料

棉花材料为陆地棉华棉 99, 常规大田种植,取开花后 (Day post anthesis, DPA) 24 d 的棉纤维。

1.2 试剂

CESA1 抗体为南京金斯瑞生物科技有限公司制备,蛋白质 Marker 购自 Genscript 公司,预染蛋白质 Marker 购自 Fermentas 公司, Mops 购自 Biosharp 公司,蛋白酶抑制剂 PMSF、Pepstain A、Leupeptin、Protein A 购自 Sigma 公司。

1.3 方法

1.3.1 棉纤维原生质膜的提取。在液氮中将 24 d 棉纤维 20 g 磨成粉末,加入 Mops buffer (pH 7.5, 含 1% PMSF, 0.1% Pepstain A, 0.1% Leupeptin) 60 mL, 搅拌直至形成匀浆,将匀浆转移至离心管,在 4 °C 条件下 3000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 将上清液通过装有 2 层纱布的滤器过滤,滤液在 4 °C 条件下、1.0×10⁵ g 离心 30 min, 所得沉淀即原生质膜。

1.3.2 免疫共沉淀。将上述沉淀用 Mops buffer 重悬,通过匀浆器匀浆后加入 2% Triton X-100, 在 4 °C 下混合 1 h, 使原生质膜溶解。然后在 4 °C 下、1.0×10⁵ g 离心 20 min, 取上清液按 1 : 150 (V/V) 加入 CESA1 抗体, 于 4 °C 下混合 1 h, 然后按每 500 μL 体系加入 40 μL Protein A, 混合 1 h, 4 °C, 3000 r·min⁻¹ 离心 3 min, 用移液枪小心移上清液, 然后加入含 2% Triton X-100 的 Mops buffer, 上下颠倒离心管混匀后冰上静置, 4 °C, 3000 r·min⁻¹ 离心 3 min; 用此法重复 3 次, 洗去沉淀中非特异结合蛋白, 然后用不含 Triton X-100 的 Mops buffer 洗 2 次。沉淀加入 40 μL Loading buffer。

1.3.3 SDS-PAGE 及 western-blotting。上述样品加入 Loading buffer 后, 再加入 5% β- 巯基乙醇, 70 °C 水浴 5 min, 100 °C 水浴 5 min。离心取上清液备用。将样品点入 10% 聚丙烯酰胺凝胶进样孔中, 待溴酚蓝带到达凝胶底部时取出凝胶, 加入染色液染色 3 h, 然后加入脱色液。Western-blotting 操作步骤同范建文章^[19]。

1.3.4 通过液相色谱和质谱联用仪 (LC-MS) 鉴

定复合体蛋白。切下上述通过 SDS-PAGE 分离的蛋白胶条带,用含 50% (V/V) 乙腈和 25 mmol·L⁻¹ 碳酸氢铵溶液处理蛋白胶条带以使蛋白胶条带脱色。蛋白胶条带经脱水干燥后,加入包含 10 ng·μL⁻¹ 胰蛋白酶的碳酸氢铵溶液,于 37 °C 处理 12 h,使蛋白质水解成肽段。水解肽段复合物通过含 50% (V/V) 乙腈和 0.5% (V/V) 甲酸的溶液抽提,提取物通过氮吹仪吹干,然后加入含 5% (V/V) 乙腈和 0.1% (V/V) 甲酸重悬,用于 LC-MS 分析。

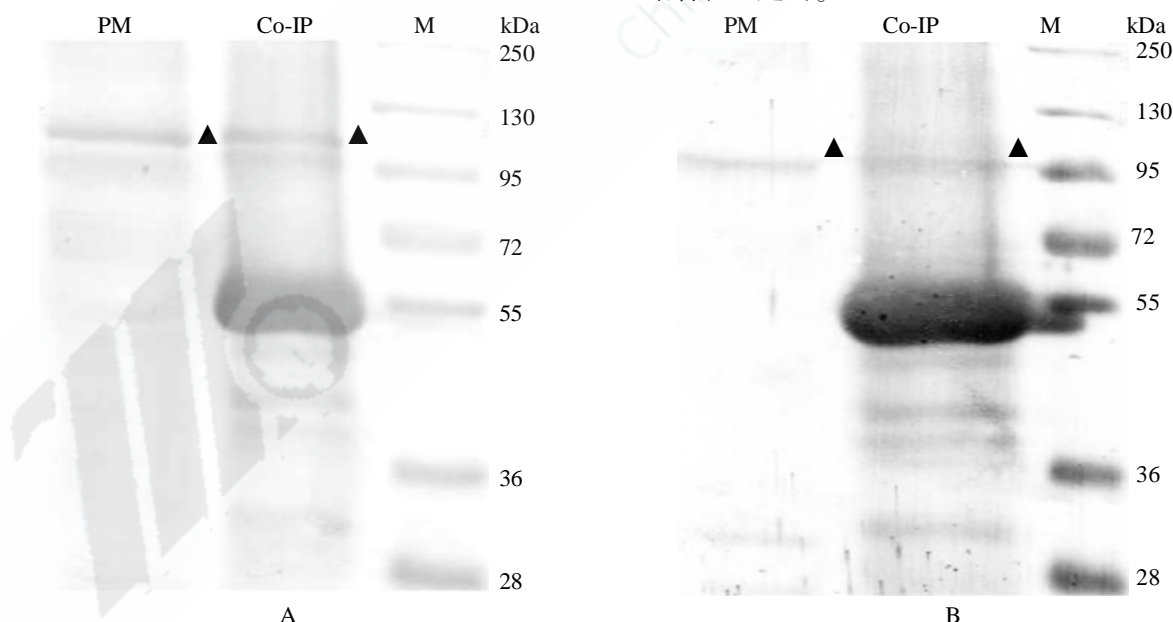
LC-MS 中液相色谱为 LC-20AD 系统,质谱为 LTQ Orbitrap 系统。色谱柱为 C18 反相柱,样品以 20 μL·min⁻¹ 注入色谱柱中,然后用 5%~45% 流动相(流动相 A 为包含 5% 乙腈的 0.1% 甲酸溶液,流动相 B 为包含 95% 乙腈的 0.1% 甲酸溶液)线性梯度洗脱,洗脱时间为 90 min。分离样品注入质谱仪,质谱仪喷雾电压设定为 1.8 kV。质谱鉴定出来的肽段通过软件 Sequest (ThermoFisher, Version 28) 进行比对分析,Sequest 软件参数设定如下:肽段最低检测限为 50 μg·mL⁻¹,质谱检出最低分子量为 1 Da。分析得到的蛋白通过

Peptide prophet algorithm^[20-21] 的方法计算该蛋白概率。概率大于 95% 的蛋白可被认为是复合体蛋白。

2 结果与分析

2.1 免疫共沉淀效果的检测

免疫共沉淀的目的是分离复合体蛋白,因此,有必要通过 Western-blotting 检测沉淀蛋白中是否存在复合体蛋白。免疫共沉淀中所用的抗体是 CESA1 抗体,因此,首先检测免疫共沉淀中是否存在 CESA1,然后检测沉淀中是否存在其它已经被证实为复合体成员的蛋白,在此选定的是棉花蔗糖合酶 SuSy。可以看出,通过 CESA1 抗体沉淀下来的蛋白中包含 CESA1 (图 1 A) 和蔗糖合酶(图 1 B)。沉淀中包含 CESA1,证明 CESA1 和抗体特异性结合。有报道^[8]已证明蔗糖合酶是复合体的一部分,因此,在免疫沉淀的蛋白中存在蔗糖合酶说明免疫共沉淀的方法是可靠的。通过 TMHMM serve 2.0 预测 SuSy 为非跨膜蛋白,而在原生质膜中也能检测到它,说明该蔗糖合酶很有可能是和某种膜蛋白(很有可能是 GhCESA1) 结合在一起的。



免疫沉淀抗体为 CESA1 (U58283) 抗体, A 的检测抗体(一抗)为 CESA1 抗体, B 的检测抗体为 SuSy (258489633) 抗体; PM 为原生质膜; 图 1A 中三角形所示为 GhCESA1 条带, 图 1B 图中三角形所示为 GhSuSy 条带。

The antibody for precipitating the complex is the antibody of CESA1 (U58283); The antibody for detection of targeted protein is the antibody of CESA1 (u58283) in figure 1A; The antibody for detection of targeted protein is the antibody of SuSy (258489633) in figure 1B; PM stands for plasma membrane; The triangles indicate the locations of the targeted proteins.

图 1 Western-blotting 检测免疫沉淀蛋白

Fig. 1 Detection of precipitation proteins by Western-blotting

2.2 复合体蛋白的分离

如图 2, Antibody+proteinA 是在 Mops buffer 中加入 CESA1 抗体和 Protein A 后的沉淀上样, 以此为对照。Co-IP 是在原生质膜经溶膜后的上清液中加入 GhCESA1 抗体和 Protein A 后的沉淀上样, 与对照相比, 免疫共沉淀可以产生差异

蛋白条带。这些差异蛋白条分子量大多在 100~130 kDa, 而棉花纤维素合酶分子量均位于这一范围, 且纤维素合酶是复合体的主体部分, 这些蛋白在分离的复合体蛋白中丰度较高, 因此, 这些条带很有可能是棉花纤维素合酶蛋白。

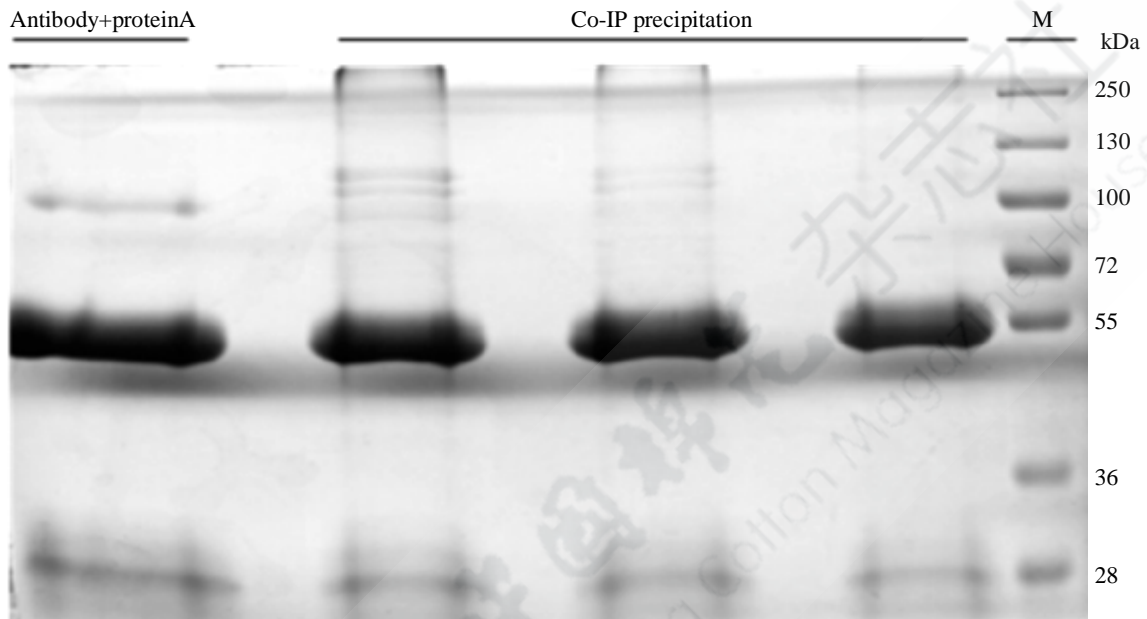


图 2 SDS-PAGE 分离免疫共沉淀纯化的复合体蛋白

Fig. 2 Isolations of precipitation proteins by SDS-PAGE

2.3 复合体蛋白的鉴定

取 PAGE 胶除抗体条带 (45~60 kDa) 之外的部分, 进行 LC-MS 鉴定。通过肽段比对数据库 Swissprot 共获得概率大于 95% 的蛋白 68 个。

对于纤维素合酶复合体的结构和组成, 已有很多文献根据当时的研究结果提出了许多复合体的结构模型^[22-24]。在这些结构模型中, CESA 是复合体的主体。本研究在通过免疫共沉淀分离的复合体蛋白中, 发现存在 8 个 CESA 蛋白, 通过与拟南芥 CESA 蛋白比对发现, CESA 1, CESA 2, CESA 4, CESA 7, CESA 8 与拟南芥次生壁 CESA 同源度高, 而 CESA 3, CESA 5, CESA 6 与拟南芥初生壁 CESA 同源度高。在杨树次生壁加厚的木质部细胞中, 发现存在 2 种类型的 CESA^[18]。这 2 类不同的 CESA 是分别由初生壁和次生壁 CESA 抗体通过免疫共沉淀分离的, 据此作者认为在次生壁中存在 2 种类型的复合体, 它们共同在次生壁细胞壁加厚时期发挥作用。开花后 24 d 的棉纤维处于典型的次生壁形成期, 在通过 CESA1 抗

体分离的复合体中发现初生壁 CESA 蛋白, 这再次说明在次生壁形成期的细胞中, 存在 2 种不同类型 CESA。

在复合体结构模型中, 除了 CESA 蛋白以外, 还存在其它非 CESA 蛋白。本研究通过 LC-MS 鉴定出非 CESA 蛋白。根据这些蛋白在复合体中的作用, 可将其划分为 2 类, 第一类是复合体中相对固定的组成部分, 第二类只是在某个特定时期与某个复合体成员存在短暂的相互作用。第一类蛋白包括: 为 CESA 合成纤维素提供底物尿苷二磷酸葡萄糖 (UDPG) 的蛋白, 为复合体在膜上滑动提供方向的细胞骨架蛋白及对合成产物进行加工的纤维素内切酶 (KORRIGAN)。已有报道证明拟南芥中的 CESA 蛋白是被磷酸化的^[25-26], 因此认为, 棉花中 CESA 也有可能被磷酸化。CESA 在被磷酸化的过程中, 与对应的激酶存在短暂的相互作用, 这样就有可能随着 CESA 一起沉淀分离出来。按照以上的分类方法, 激酶应属于第二类蛋白。

3 讨论

基于对纤维素合酶复合体的研究,复合体中应包含的蛋白可分为以下三类:CESA 家族, SuSy 家族及细胞骨架类蛋白。在本研究和对杨树复合体的研究中,均发现存在以上三类蛋白,说明通过这种方法鉴定复合体组成是可靠的。纤维素内切酶(KORRIGAN)的作用是在纤维素合成过程中切去引物,目前尚无证据表明它是复合体的一部分,在杨树和棉花的复合体中均发现它的存在,说明 KORRIGAN 很有可能作为复合体的一部分在纤维素合成过程中发挥作用。除了这些蛋白种类外,还有些类别的蛋白在杨树和棉纤维的复合体鉴定中均出现,包括磷酸化及去磷酸化、热激蛋白、蛋白降解、氧化还原、水通道蛋白等类别。但是,棉花复合体的鉴定结果中存在与脂类代谢相关、与合成三磷酸腺苷(Adenosine Triphosphate, ATP)相关的蛋白,这些蛋白在杨树复合体鉴定结果中并未出现。

植物细胞壁从初生壁到次生壁的发育过程中,纤维素的结晶度和聚合度(Degree of polymerization, DP)增加^[27-29],与此相伴的是 CESA 发生改变,即 CESA 家族不同成员在从初生壁到次生壁的表达发生改变。纤维素的结晶度和聚合度与 CESA 有关联,初生壁中的 CESA 构成一种类型的复合体有助于合成低结晶度和低聚合度的纤维素,次生壁中的 CESA 构成另一种类型的复合体合成高结晶度和高聚合度的纤维素。棉纤维作为一种特殊的细胞,在次生壁时期大量合成纤维素,使纤维素在细胞壁中的含量高达 95% 以上。本研究在纤维素合酶复合体中鉴定出 8 种 CESA。这有可能存在以下情况:(1)8 种 CESA 存在于不同类型的复合体中,但不同的复合体中均包含 GhCESA1;(2)有些 CESA 与 GhCESA1 是通过原生质膜连在一起的,它们以这种形式被分离出来;(3)8 种不同的 CESA 存在于同一个复合体中。但是,无论哪种情况,均证实在开花后 24 d 的棉纤维中存在 2 种类型的 CESA 蛋白。

在拟南芥中发现复合体分子量为 840 kDa^[30],比仅由 6 个 CESA 构成的复合体的分子量大。因此,复合体中除了 CESA 外,还存在其它非 CESA 蛋白。虽然通过不同手段获得的证据在说明哪条

途径提供 CESA 底物尿苷二磷酸葡萄糖(UDPG)的问题上还相互矛盾^[24],但蔗糖合酶很可能通过与 CESA 的非共价结合成为复合体的组成部分^[8]。本研究中,复合体中发现 4 种蔗糖合酶,说明存在这种可能:不同的 CESA 与不同蔗糖合酶结合。CESA 是一个跨膜蛋白,在细胞膜上分布有一定规律,CESA 作为复合体的主体在膜上是滑动的,在滑动的过程中合成纤维素。CESA 在合成后到定位于原生质膜的过程及纤维素微纤丝在细胞膜表面有方向的沉积和排列是由微管为主体的细胞骨架蛋白所介导的。本研究中发现许多微管及相关蛋白,这为研究微管蛋白在纤维素合成中的作用奠定了基础。

复合体的形成、转运及膜定位是一个动态的过程,这决定了通过免疫共沉淀的方法分离到的复合体处在某一个动态过程,而处在动态过程中的复合体组成有可能是不同的,因此,分离到的复合体不可能是均一的。另外,原生质膜也可能使分离的复合体在结构和组成不均一。因此,许多非 CESA 蛋白出现在免疫共沉淀分离的复合体中,还需要进一步的实验验证它们是否为复合体的组成部分。但是,这些结果为深入探索复合体的结构和组成提供了线索。

参考文献:

- [1] PEAR J, Kawagoe Y, Schreckengost W, et al. Higher plants contain homologs of the bacterial genes encoding the catalytic subunit of cellulose synthase[J]. Proceedings of the National Academy of Science, 1996, 93(22): 12637-12642.
- [2] ARIOLI T, Peng L, Betzner S, et al. Molecular analysis of cellulose biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. Science, 1998, 279(5351): 717-720.
- [3] KIMURA S, Laosinchai W, Itoh T, et al. Immunogold labeling of rosette terminal cellulose-synthesizing complexes in the vascular plant *Vigna angularis*[J]. Plant Cell, 1999, 11(11): 2075-2086.
- [4] HERTH W. Arrays of plasma-membrane 'rosettes' involved in cellulose microfibril formation in *Spirogyra*[J]. Planta, 1983, 159(4): 347-356.
- [5] TAYLOR N G, Howells R M, Huttly A K, et al. Interactions among three distinct Cesa proteins essential for cellulose synthesis[J]. Proceedings of the National Academy of Science, 2003, 100(3): 1450-1455.

- [6] DESPREZ T, Juraniec M, Crowell E F, et al. Organization of cellulose synthase complexes involved in primary cell wall synthesis in *Arabidopsis thaliana* [J]. Proceedings of the National Academy of Science, 2007, 104(39): 15572-15577.
- [7] KUDLICKA K, Brown R M. Cellulose and callose biosynthesis in higher plants. I. Solubilization and separation of (1→3)- and (1→4)- β -glucan synthase activities from mung bean [J]. Plant Physiology, 1997, 115(2): 643-656.
- [8] SATOSHI F, Takahisa H, Koichi M. Sucrose synthase is an integral component of the cellulose synthesis machinery [J]. Plant Cell & Physiology, 2010, 51(2): 294-301.
- [9] PAREDEZ A R, Somerville C R, Ehrhardt D W. Visualization of cellulose synthase demonstrates functional association with microtubules [J]. Science, 2006, 312(5779): 1491-1495.
- [10] NICOL F, His I, Jauneau A, et al. A plasma membrane-bound putative endo-1,4- β -d-glucanase is required for normal wall assembly and elongation in *Arabidopsis* [J]. EMBO Journal, 1998, 17(19): 5563-5576.
- [11] LANE D R, Wiedemeier A, Peng L, et al. Temperature-sensitive alleles of rsw2 link the korrigan endo-1,4- β -glucanase to cellulose synthesis and cytokinesis in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2001, 126(1): 278-288.
- [12] SZYJANOWICZ J, McKinnon I, Taylor N G, et al. The irregular xylem 2 mutant is an allele of korrigan that affects the secondary cell wall of *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Journal, 2004, 37(5): 730-740.
- [13] ZUO Jian-ru, Niu Qi-wen, Nishizawa N, et al. Korrigan, an *Arabidopsis* endo-1,4- β -glucanase, localizes to the cell plate by polarized targeting and is essential for cytokinesis [J]. Plant Cell, 2000, 12(7): 1137-1152.
- [14] PAGANT S, Bichet A, Sugimoto K, et al. *KOBITO 1* encodes a novel plasma membrane protein necessary for normal synthesis of cellulose during cell expansion in *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2002, 14(9): 2001-2013.
- [15] LERTPIRIYAPONG K, Sung Z R. The elongation defective 1 mutant of *Arabidopsis* is impaired in the gene encoding a serine-rich secreted protein [J]. Plant Molecular Biology, 2003, 53(4): 581-595.
- [16] GU Ying, Kaplinsky N, Bringmann M, et al. Identification of a cellulose synthase associated protein required for cellulose biosynthesis [J]. Proceedings of the National Academy of Science, 2010, 107(29): 12866-12871.
- [17] ENDO S, Pesquet E, Yamaguchi M, et al. Identifying new components participating in these condary cell wall formation of vessel elements in *Zinnia* and *Arabidopsis* [J]. Plant Cell, 2009, 21(4): 1155-1165.
- [18] SONG D, Shen J, Li L. Characterization of cellulose synthase complexes in *Pouulus xylem* differentiation [J]. New Phytologist, 2010, 187(3): 777-790.
- [19] 范建, 刘绪, 范春芬, 等. 棉花纤维素生物合成相关蛋白的抗体制备 [J]. 棉花学报, 2012, 24(2): 106-113.
FAN Jian, Liu Xu, Fan Chun-fen, et al. Antibody preparation of proteins involved in cellulose synthesis in cotton fibers [J]. Cotton Science, 2012, 24(2): 106-113.
- [20] KELLER A, Nesvizhskii A I, Kolker E, et al. Empirical statistical model to estimate the accuracy of peptide identifications made by MS/MS and database search [J]. Analytical Chemistry, 2002, 74(20): 5383-5392.
- [21] NESVIZHSHKII A, Keller A, Kolker E, et al. A statistical model for identifying proteins by tandem mass spectrometry [J]. Analytical Chemistry, 2003, 75(17): 4646-4658.
- [22] PENG Liang-cai, Kawagoe Y, Hogan P. Sitosterol- β -glucoside as primer for cellulose synthesis in plants [J]. Science, 2002, 295(5552): 147-150.
- [23] SOMERVILLE C. Cellulose synthesis in higher plants [J]. Annual Review of Cell and Developmental Biology, 2006, 22: 53-78.
- [24] ENDLER A, Persson S. Cellulose synthases and synthesis in *Arabidopsis* [J]. Molecular Plant, 2011, 4(2): 1-13.
- [25] TAYLOR G. Identification of cellulose synthase AtCesA7 (IRX3) *in vivo* phosphorylation sites—a potential role in regulating protein degradation [J]. Plant Molecular Biology, 2007, 64(1/2): 161-171.
- [26] CHEN Shao-lin, Ehrhardt D W, Somerville C R. Mutations of cellulose synthase (CESA1) phosphorylation sites modulate anisotropic cell expansion and bidirectional mobility of cellulose synthase [J]. Proceedings of the National Academy of Science, 107(40): 17188-17193.
- [27] BLASCHEK W, Koehler H, Semler U. Molecular-weight distribution of cellulose in primary-cell walls [J]. Planta, 1982, 154(6): 550-555.
- [28] BARNETT J R, Bonham V A. Cellulose microfibril angle in the cell wall of wood fibres [J]. Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society, 2004, 79(2): 461-472.
- [29] MELLEROWICZ E J, Sundberg B. Wood cell walls: biosynthesis, developmental dynamics and their implications for wood properties [J]. Current Opinion in Plant Biology, 2008, 11(3): 293-300.
- [30] WANG Jian, Elliott J E, Williamson R E. Features of the primary wall CesaA complex in wild type and cellulose-deficient mutants of *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of Experimental Botany, 2008, 59(10): 2627-2637. ●