

拟南芥根毛功能基因 *AtGDPD-Like3* 关键氨基酸位点鉴定

王 爽 程玉祥 夏德安*

(东北林业大学林木遗传育种国家重点实验室 哈尔滨 150040)

摘 要 *AtGDPD-Like3* 是编码甘油磷酸二酯磷酸二酯酶(GDPD)类似基因 拟南芥该家族基因 *AtGDPD-Like3* 突变体 shv3 存在严重的根毛发育缺陷。为了鉴定 *AtGDPD-Like3* 关键氨基酸位点 我们构建 S⁵³⁸A、V⁵⁵⁶A 和 D⁶²⁸A 单点突变 *AtGDPD-Like3* 分别转化 *atgdpdl3* 突变体并观察其恢复根毛缺陷程度。结果显示 V⁵⁵⁶A、D⁶²⁸A 位点突变 *AtGDPD-Like3*完全恢复 *atgdpdl3* 根毛生长缺陷表型 但 S⁵³⁸A 突变 *AtGDPD-Like3* 只是部分恢复根毛缺陷。这些结果表明 Ser⁵³⁸ 是 *AtGDPD-Like3* 较为关键的氨基酸位点 突变影响其蛋白质功能行使 同时暗示 *AtGDPD-Like3* 还存在其它的关键氨基酸位点。此研究结果为进一步探究 *AtGDPD-Like3* 蛋白功能行使的作用机制奠定了基础。

关键词 拟南芥 *AtGDPD-Like3* 关键氨基酸位点 点突变

中图分类号 :Q945.12 文献标志码 :A doi :10.7525/j.issn.1673-5102.2020.01.012

Identification of Key Amino Acid Sites in *AtGDPD-Like3*
with Role in *Arabidopsis* Root Hairs

WANG Shuang CHENG Yu-Xiang XIA De-An*

(State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding ,Northeast Forestry University ,Harbin 150040)

Abstract *AtGDPD-Like3* encode glycerophosphodiester phosphodiesterase-like(GDPD) proteins and shv3 , its family gene *AtGDPD-Like3* mutant , has serious root hair defects. To identify key amino acid sites in *AtGDPD-Like3* , we constructed S⁵³⁸A , V⁵⁵⁶A and D⁶²⁸A single site mutation of *AtGDPD-Like3* , which were expressed in *atgdpdl3* mutants , respectively. The results showed that *AtGDPD-Like3* with V⁵⁵⁶A or D⁶²⁸A mutation could completely restore root hairs growth defects of *atgdpdl3* , whereas , *AtGDPD-Like3* with S⁵³⁸A mutation partially restored root hairs growth defects. These indicate that Ser⁵³⁸ is the key amino acid site in *AtGDPD-Like3* , which affects function of its protein. Meanwhile , it implies other key amino acid sites in *AtGDPD-Like3*. The results of this study would lay a foundation for further exploring the functional mechanism of *AtGDPD-Like3* protein.

Key words *Arabidopsis thaliana* *AtGDPD-Like3* key amino acid locus point mutation

根毛是由植株根系表皮单细胞向外凸起形成的管状结构,是植物营养吸收的主要器官^[1]。根毛发育是细胞极性生长的一种极端类型——顶端生长,可在十几小时内向特定方向生长十几倍的细胞长度^[2~3]。这种顶端生长是一个复杂的过程,受到活性氧、钙离子浓度、磷脂肌醇、囊泡运

输、细胞骨架等诸多因素的精细调控^[4~7]。例如,活性氧的产生与定位能决定植物细胞的形态发生,活性氧含量的增加可改变细胞壁的刚性,促进了根毛的顶端生长^[8~9];上游信号激活根毛顶端质膜上的钙离子通道,调节钙离子内流,使胞内钙离子浓度增加,形成钙离子浓度梯度,从而调控根

基金项目 :国家自然科学基金(31570580)

第一作者简介 :王爽(1993—) ,女 ,硕士研究生 ,主要从事林木次生生长研究。

* 通信作者 E-mail :xiadean@126.com

收稿日期 :2019-04-24

Foundation item :Natural Scientific Foundation of China(31570580)

First author introduction :WANG Shuang(1993—) ,female ,master ,mainly engaged in tree secondary growth.

* Corresponding author E-mail :xiadean@126.com

Received date :2019-04-24

毛顶端生长^[10~11]。

甘油磷酸二酯磷酸二酯酶(*GDPD*)催化甘油磷酸二酯水解成甘油-3-磷酸和相应的醇类,在原核生物和真核生物的各种生理过程中起着重要作用^[12]。拟南芥 *GDPD* 基因家族可分为 *GDPD* 和 *GDPD-Like*(*GDPDL*)两个亚族。*AtGDPDL* 基因家族包括 7 个成员(*AtGDPDL1-7*),与传统的拟南芥 *GDPD* 不同,拟南芥 *GDPDL* 包含两个非典型 *GD- PD* 结构域^[13]。此外,研究显示 *AtGDPD-Like3* 基因在拟南芥的根毛组织中高丰度表达,其次是叶柄,下胚轴和幼叶。该基因的表达与拟南芥的根毛形态发生密切相关,是根毛伸长所必须的。在 *AtGDPD-Like3* 和 *AtGDPD-Like1* 双突变体 *shv3svl1* 中,细胞壁分析显示结晶纤维素含量减少致使细胞壁组分发生改变,导致严重的根毛细胞发育缺陷^[14~15]。然而,影响 *AtGDPD-Like3* 蛋白功能行使的关键氨基酸位点尚不清楚。

在本研究中,对 *AtGDPD-Like3* 保守的氨基酸序列位点分析,推测出 Leu⁵²¹、Ser⁵³⁸、Leu⁵⁴⁴、Val⁵⁵⁶、Glu⁶²¹、Asp⁶²⁸可能是 *AtGDPD-Like3* 蛋白行使功能的关键位点。进一步我们创制 *AtGDPD-Like3* 的 Ser⁵³⁸、Val⁵⁵⁶、Asp⁶²⁸单点突变型,基于遗传转化策略验证其能否恢复 *atgapdl3* 突变体根毛缺陷表型,筛选 *AtGDPD-Like3* 蛋白质的功能关键位点,为进一步探究 *AtGDPD-Like3* 蛋白功能行使的作用机制奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

野生型拟南芥是 Col-0 生态型,*AtGDPDL3* 基因 T-DNA 插入株系 SALK_137845 购自 ABRC(Ohio State University, USA)。

植物总 RNA 提取试剂 pBIOZOL Reagent 购自 Bioflux 公司,植物基因组 DNA 快速提取试剂购自 Bioteke 公司,pMD18-T 载体、cDNA 第一链合成试剂 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA eraser 和 MutanBEST Kit 试剂盒购自 TaKaRa 公司。高保真 DNA 聚合酶 KOD-Plus 购自 Toyobo 公司,胶内 DNA 回收试剂盒 Silica Bead DNA Gel Extraction Kit 购自 Thermo Scientific。pGWB2 载体购自 Invitrogen 公司,基因引物合成以及 DNA 测序也由 Invitrogen 公司完成。anti-FLAG 鼠单克隆抗体购自 AbMART 公司,HRP 标记的羊抗鼠 IgG 二抗购自 Abcam 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 *AtGDPD-Like3* 氨基酸序列分析

AtGDPD-Like3 基因信息从拟南芥 TAIR10 数据库中获取(<https://www.arabidopsis.org/>),NCBI-BLAST 检索、获取其同源基因推测氨基酸序列,用 BioEdit 比对分析保守氨基酸序列。

1.2.2 植物总 RNA、基因组 DNA 提取和 cDNA 第一链合成

植物总 RNA 的提取和 cDNA 第一链的合成参照试剂盒的提取步骤依次进行。用一步法植物基因组 DNA 快速提取试剂提取植物基因组 DNA。

1.2.3 PCR 扩增和氨基酸位点突变

PCR 扩增体系 20 μL :13.5 μL ddH₂O,2 μL dNTPs(2 mmol \cdot L⁻¹),2 μL 10 \times Taq Buffer,上下游引物(10 mmol \cdot L⁻¹)各 0.5 μL ,cDNA 模板 1 μL ,Taq DNA 聚合酶 1 μL 。PCR 反应程序:预变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 3 min,变性 94 $^{\circ}\text{C}$ 30 s,引物退火温度 56 $^{\circ}\text{C}$,延伸 30 s。T-DNA 鉴定和 *ACTIN2* 基因扩增分别为 30 和 25 个循环。氨基酸位点突变的制备参见 MutanBEST Kit 所提供的方法。

1.2.4 T-DNA 插入基因突变体鉴定

提取待鉴定的植株基因组 DNA 作模板,使用 SALK_137845-LP 和 SALK_137845-RP、SALK_137845-LP 和 LBb1、LBb1 和 SALK_137845-RP 三对引物进行交叉 PCR 扩增,对 T-DNA 插入突变体进行鉴定;从琼脂糖胶上回收扩增的 DNA 片段,连接 pMD18-T 载体,对插入片段克隆测序。试验中所用引物及序列参见表 1。

1.2.5 植物表达载体构建及拟南芥遗传转化

植物表达载体的构建采用 Gateway 系统^[16]。拟南芥遗传转化采用浸花法^[17],选用达到 8 周龄拟南芥用于遗传转化。

1.2.6 蛋白质 Western 印迹分析

拟南芥转基因植株体内 FLAG-融合蛋白质水平检测采用 Western 免疫印迹法^[18]。提取植物组织蛋白质用于 SDS-APGE,将 SDS-胶中蛋白电转移至聚偏二氟乙烯膜(PVDF)上,用 5% 脱脂奶粉 TBST 4 $^{\circ}\text{C}$ 封闭过夜。然后加入 1:2 000 稀释的 anti-FLAG 鼠单克隆抗体于室温下孵育 1 h 30 min,TBST 洗膜 3 次后,加入 1:2 500 稀释的 HRP 标记的羊抗鼠 IgG 二抗于室温下孵育 1 h, TBST 洗膜 3 次后,用 ECL 化学发光显色液进行显色。

表 1 所用引物及序列
Table 1 Primer sequences used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence(5′—3′)	用途 Use
SALK_137845-LP	TGCTGGGAAGCTTTTCTCACTTT	T-DNA 鉴定 T-DNA determination
SALK_137845-RP	CAGTAAACGTCGCTTTTAGCTCCA	
LBB1	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT	
CDS-up	CACCATGCGAGGTTATTACGAGCTTC	全长 CDS 扩增 Amplification of full length CDS
CDS-down	TCACAGAAGTAGAAGAGAGGCAAG	
mF	CTTATCGTCGTCATCCTTGTAACTACTTTTAGGTTTTTACTTTGAGC	FLAG 融合 Fusion of FLAG tag
mR	GATTACAAGGATGACGACGATAAGCCATGGCCAACGCTCACTGGTG	
S538A-up	GTCATGATTACAGGCAACAAACAG	S ⁵³⁸ A 单点突变 S ⁵³⁸ A site mutation
S538A-down	CTTTGTGGCTGTACTATTGCTG	
V556A-up	GAGACTGCCTACAAAGTTGAAG	V ⁵⁵⁶ A 单点突变 S ⁵⁵⁶ A site mutation
V556A-down	GTACTGGCTCTGCTTCTTGAAC	
D628A-up	CATATGCCTTCTTTGCTGATGC	D ⁶²⁸ A 单点突变 D ⁶²⁸ A site mutation
D628A-down	GTTGAGATAAAACTCATTTCTG	
AtGDPDL3-RT-up	TGCTGGGAAGCTTTTCTCACTTT	转基因鉴定 Determination of transgene
AtGDPDL3-RT-down	CAGTAAACGTCGCTTTTAGCTCCA	
ACTIN-up	CCCAGTGTTGTGGTAGGCCAAGAC	ACTIN 内参基因 Internal control gene ACTIN
ACTIN-down	CATAGCGGAGAGTTAAAGTGCTC	

1.2.7 拟南芥根毛形态观察及量化统计

对 1/2MS 培养基上生长 7 天的拟南芥幼苗，用体式显微镜观察其根毛表型。根毛长度和密度的统计均取来胚轴与根交界处自上而下 4 mm 区间的所有根毛。数据统计采用使用 SPASS 统计软件进行，采用单因素方差分析。

2 结果与分析

2.1 AtGDPD-Like3 单突变位点选择

鉴定 *AtGDPD-Like3* 基因 T-DNA 插入突变体时，以 SALK_137845 植株基因组 DNA 为模板，用引物 SALK_137845-LP 和 SALK_137854-RP 未扩增出目标带，而 SALK_137845-RP 和 LBB1 扩增出

目标带，两者表明 T-DNA 插入在该基因区域，DNA 测序显示插入位点在 At4g26690 第 7 个外显子 260 bp 处。RT-PCR 分析显示未检测到 *AtGDPD-Like3* 基因转录产物，因此 SALK_137845 是 *AtGDPD-Like3* 基因敲除突变体。

AtGDPD-Like3 编码 759 个氨基酸，含有 GDPD-Like 结构域。选用大豆、毛果杨、油菜、甘蓝、高粱、玉米等 22 个物种的 *AtGDPD-Like3* 同源基因，推测氨基酸序列一致性比对显示 Leu⁵²¹、Ser⁵³⁸、Leu⁵⁴⁴、Val⁵⁵⁶、Glu⁶²¹、Asp⁶²⁸ 是保守氨基酸位点（图 1）。这些氨基酸位点可能是 GDPD-Like 结构域功能的关键位点。基于此，我们选取其中的 3 个保守位点 Ser⁵³⁸、Val⁵⁵⁶、Asp⁶²⁸ 作为突变的目标，验证其位点的分子功能。

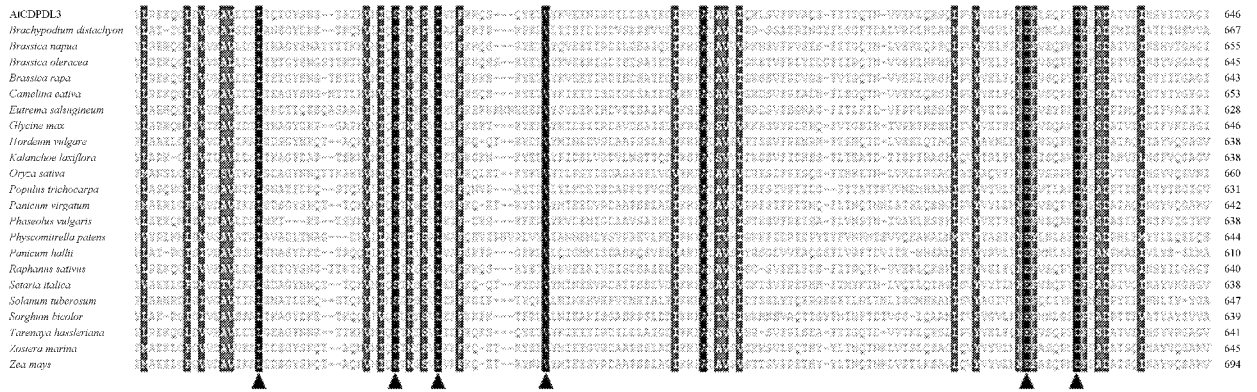


图 1 *AtGDPD-Like3* 及其同源蛋白氨基酸序列比对
Fig. 1 Amino acid sequence alignment of *AtGDPD-Like3* and its homologous proteins

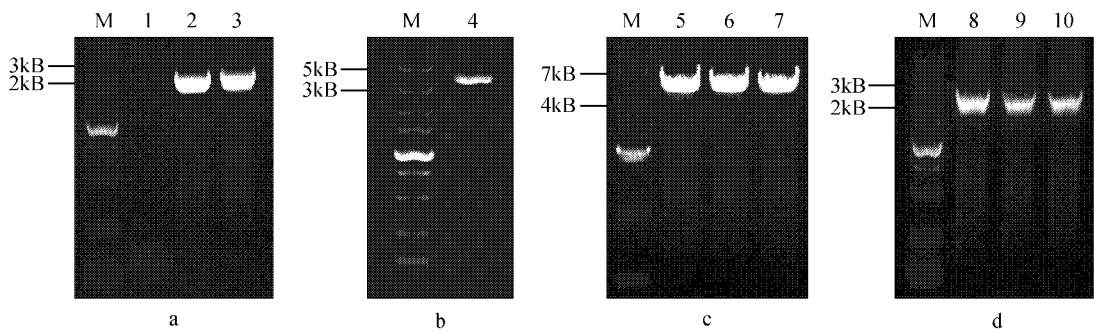


图 2 *AtGDPD-Like3* 单点 $S^{538}A$ 、 $V^{556}A$ 和 $D^{628}A$ 突变的载体构建 M. Marker ;a. 1 ~ 3 ,FLAG-tag + N 端信号肽片段 ;FLAG-tag + *AtGDPD-Like3*(去除信号肽部分) ;FLAG-*AtGDPDL3* ;b. 4 pENTR/SD/D-FLAG-*AtGDPDL3* ;c. 5 ~ 7 pENTR/SD/D-FLAG-*AtGDPDL3*- $S^{538}A$ 、 $V^{556}A$ 、 $D^{628}A$ 线性片段 ;d. 8 ~ 10 pENTR/SD/D-FLAG-*AtGDPDL3*- $S^{538}A$ 、 $V^{556}A$ 、 $D^{628}A$ 重组质粒 PCR 鉴定

Fig.2 Construction of vectors of single site mutations $S^{538}A$, $V^{556}A$ and $D^{628}A$ in *AtGDPD-Like3* , respectively a. 1 - 3 , N-terminal signal peptides plus FLAG fragment ,FLAG-*AtGDPDL3* without signal peptides and FLAG-*AtGDPDL3* ;b. 4 , pENTR/SD/D-FLAG-*AtGDPDL3* ;c. pENTR/SD/D-FLAG-*AtGDPDL3*- $S^{538}A$, $V^{556}A$ and $D^{628}A$ fragments ;d. 8 - 10 PCR determination of pENTR/SD/D-FLAG-*AtGDPDL3*- $S^{538}A$, $V^{556}A$ and $D^{628}A$ plasmids

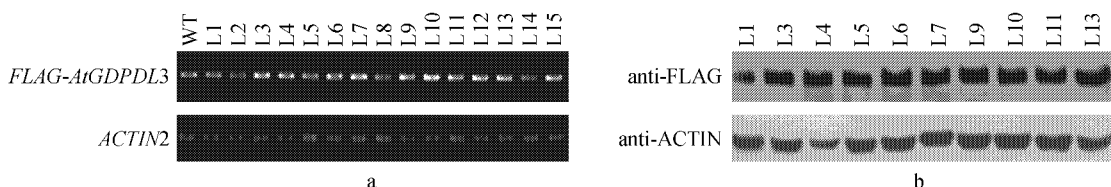


图 3 *FLAG-AtGDPDL3-S^{538}A*、 $V^{556}A$ 、 $D^{628}A$ 和 *FLAG-AtGDPDL3* 转基因分子鉴定 a. 转基因植株转录水平鉴定 b. 转基因植株蛋白质含量鉴定 ,ACTIN 蛋白质量作为定量内标蛋白 ;WT. 野生型拟南芥 ;L1-4、L5-8、L9-11 和 L12-15 分别为 *FLAG-AtGDPDL3-S^{538}A*、 $V^{556}A$ 、 $D^{628}A$ 和 *FLAG-AtGDPDL3* 转基因植株

Fig.3 Molecular identification of the transgenes of *FLAG-AtGDPDL3-S^{538}A*、 $V^{556}A$ 、 $D^{628}A$ 和 *FLAG-AtGDPDL3* a. Detection of transgenic plants on the transcriptional level ;b. Determination of transgenic plants on the protein level using the ACTIN protein as a control ;WT. Wild-type *Arabidopsis* ;L1-4 ,L5-8 ,L9-11 and L12-15 indicate the *FLAG-AtGDPDL3-S^{538}A* , $V^{556}A$, $D^{628}A$ and *FLAG-AtGDPDL3* transgenic plants respectively

2.2 $S^{538}A$ 、 $V^{556}A$ 和 $D^{628}A$ 单位点突变的构建

实验采用重叠 PCR 策略 ,将 FLAG 标签短肽融合在 *AtGDPD-Like3* 信号肽之后。以拟南芥 cDNA 为模板 ,分别用 CDS-up/mR 和 mF/CDS-down 两对引物进行 PCR 扩增 ,得到的产物(图 2a 泳道 1 ~ 2)混合作为模板 ,再用 *AtGDPD-Like3* 基因 CDS-up/down 引物进行扩增 ,得到 *FLAG-AtGDPDL3* 片段(图 2 泳道 3)。将之连接到 pENTR/SD/D-TOPO 载体上(图 2b) ,测序表明 FLAG 短肽序列融合在 *AtGDPD-Like3* 信号肽和 GDPD-Like 结构域之间。

以 pENTR/SD/D-*FLAG-AtGDPDL3* 质粒为模板 ,分别用 3 对单点突变引物 $S^{538}A$ -up/down、 $V^{556}A$ -up/down 和 $D^{628}A$ -up/down 进行扩增 ,得到 $S^{538}A$ 、 $V^{556}A$ 和 $D^{628}A$ 单点突变 *FLAG-AtGDPDL3* 线性片段(图 2c)。经末端磷酸化处理后自身环化 ,转化 TOP010。对菌落进行 PCR 鉴定 ,得到的片段

与目标片段大小相符(图 2d) ,测序结果显示除指定位点突变外无其它位点碱基突变。用 LR 重组反应将 pENTR/SD/D-TOPO 载体上这 4 种 *FLAG-AtGDPDL3* 片段重组到 pGWB2 植物表达载体。将其转化 GV3101 农杆菌 ,用于拟南芥 *atgdpdl3* 突变体功能互补实验。

2.3 点突变的 *AtGDPD-Like3* 转化 *atgdpdl3* 突变体

用浸花法对 *atgdpdl3* 突变体植株进行转化后 ,获得转 *FLAG-AtGDPDL3-S^{538}A*、 $V^{556}A$ 和 $D^{628}A$ 、*FLAG-AtGDPDL3* 抗性植株 4、4、3 和 4 株系。以转基因植株 cDNA 为模板 ,用引物 *AtGDPDL3*-RT-up/down 进行半定量 RT-PCR 分析 ,结果显示 *FLAG-AtGDPDL3* 基因及其 $S^{538}A$ 、 $V^{556}A$ 和 $D^{628}A$ 单点突变形 ,在转基因植株中转录水平均较高(图 3a)。用 FLAG 抗体对转录水平高的转基因植株进行免疫印迹 ,结果显示 *FLAG-AtGDPDL3-S^{538}A*、 $V^{556}A$ 、 $D^{628}A$ 和 *FLAG-AtGDPDL3* 表达量均较高

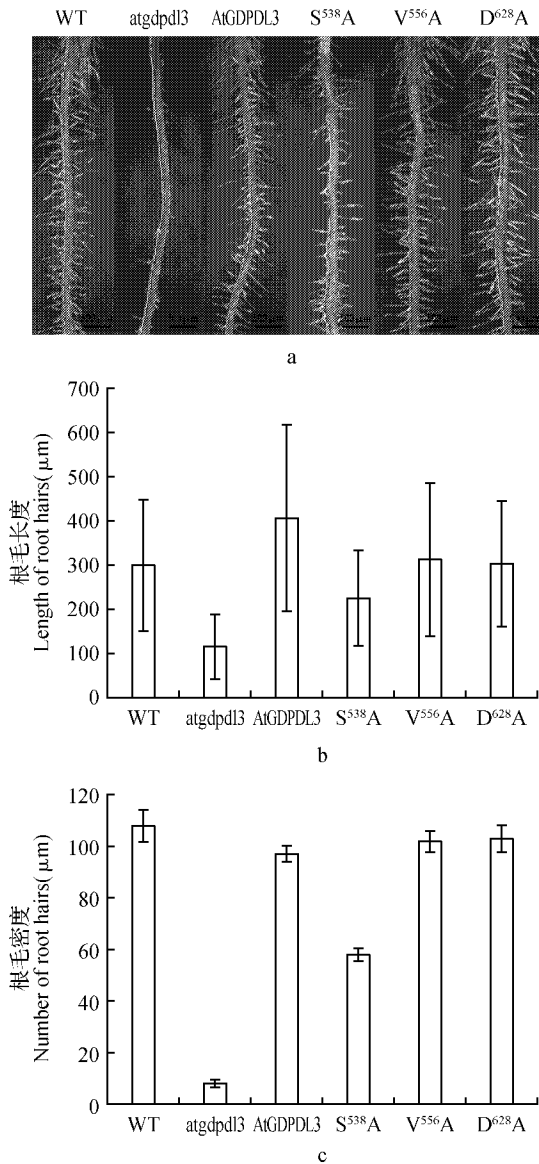


图4 *AtGDPD-Like3* 的 *Ser⁵³⁸*、*Val⁵⁵⁶*、*Asp⁶²⁸* 位点对根毛表型的作用 a. WT、*atgdpd3* 突变体、*FLAG-AtGDPDL3*；*FLAG-AtGDPDL3-S⁵³⁸A*、*-V⁵⁵⁶A* 和 *-D⁶²⁸A* 转基因植株根毛图 b. 统计分析各植株根毛平均长度 c. 统计分析各植株根毛平均密度

Fig.4 Roles of *Ser⁵³⁸*, *Val⁵⁵⁶* or *Asp⁶²⁸* of *AtGDPD-Like3* in root hair phenotypes a. Root hair photos of WT, *atgdpd3* mutants, *FLAG-AtGDPDL3* and *FLAG-AtGDPDL3-S⁵³⁸A*, *-V⁵⁵⁶A* and *-D⁶²⁸A* transgenic plants; b. Statistical analysis of root hair length in WT and transgenic plants; c. Statistical analysis of root hair density in WT and transgenic plants

(图 3b)。这表明 *FLAG-AtGDPDL3-S⁵³⁸A*、*-V⁵⁵⁶A*、*-D⁶²⁸A* 和 *FLAG-AtGDPDL3* 在 *atgdpd3* 突变体植株中均正常表达 这些材料用于接下来的根毛表型分析。

2.4 单点突变 *AtGDPD-Like3* 对 *atgdpd3* 根毛缺陷表型恢复程度分析

在培养基上垂直培养 7 天后显微观察根毛生

长情况显示(图 4a), T-DNA 插入突变体 *atgdpd3* 几乎不长根毛, 表现根毛缺陷; *FLAG-AtGDPDL3* 转入 *atgdpd3* 突变体, 能够完全恢复根毛缺陷表型; 转入 *FLAG-AtGDPDL3-S⁵³⁸A*、*-V⁵⁵⁶A* 和 *-D⁶²⁸A* 对根毛缺陷恢复效果之间明显不同, *S⁵³⁸A* 突变 *FLAG-AtGDPDL3* 是部分程度地恢复根毛缺陷, 而 *V⁵⁵⁶A* 和 *D⁶²⁸A* 突变 *FLAG-AtGDPDL3* 却完全恢复根毛缺陷表型。

为了准确地显示这些遗传材料根毛表型的差异, 对胚轴与根交界处起自上而下 4 mm 区间所有根毛长度和密度进行了量化统计(图 4:b~c)。*FLAG-AtGDPDL3*、*FLAG-AtGDPDL3-V⁵⁵⁶A*、*FLAG-AtGDPDL3-D⁶²⁸A* 转基因植株与野生型相比, 根毛长度和密度几乎一致。没有明显差异, 而 *FLAG-AtGDPDL3-S⁵³⁸A* 转基因植株根毛平均长度减少了 25%, 根毛平均密度减少了 46%。这表明 *V⁵⁵⁶A*、*D⁶²⁸A* 位点突变不影响 *AtGDPD-Like3* 恢复 *atgdpd3* 根毛缺陷表型, 换言之 *Val⁵⁵⁶*、*Asp⁶²⁸* 位点不是 *AtGDPD-Like3* 蛋白质的关键位点。相反, *S⁵³⁸A* 突变 *AtGDPD-Like3* 只是部分恢复 *atgdpd3* 突变体根毛缺陷表型, 表明 *Ser⁵³⁸* 位点是 *AtGDPD-Like3* 一个较为关键的位点。

3 讨论

根毛是植物重要器官之一, 负责植物从土壤中吸收水份和矿质营养^[19]。Jones 等^[20]采用突变体策略鉴定出多个参与拟南芥根毛发育的重要基因, 其中 *RHM4* 是本研究的 *AtGDPD-Like3* 基因。在这里我们鉴定 *AtGDPD-Like3* 一个新的 T-DNA 插入突变体(SALK_137845), 该突变体 *atgdpd3* 根毛生长严重缺陷, 与 *rh4* 突变体表型一样, 实验转入 *FLAG-AtGDPDL3* 完全恢复 *atgdpd3* 根毛缺陷, 显示该基因对拟南芥根毛发育的功能。

在鉴定 *AtGDPD-Like3* 关键位点时, 实验采用融合标签短肽 FLAG 策略。FLAG 短肽含 8 个氨基酸, 通常不影响目标蛋白质正常结构和功能, 却方便用其肽抗体(anti-FLAG)分析目标蛋白质表达量。 *AtGDPD-Like3* 的 N 端含有信号肽, C 端存在 GPI 锚^[9]。为了不破坏 GPI 锚, 确保 FLAG-*AtGDPDL3* 细胞内正确定位, 实验把 FLAG 短肽融合在 *AtGDPD-Like3* 的 N 端信号肽之后。

用能否恢复 *atgdpd3* 根毛缺陷策略, 实验鉴定 *AtGDPD-Like3* 保守氨基酸位点 *Ser⁵³⁸*、*Val⁵⁵⁶* 和 *Asp⁶²⁸* 对根毛缺陷恢复效果。其中 *Ser⁵³⁸* 突变的

AtGDPD-Like3 只能部分恢复根毛缺陷,表明该位点是 AtGDPD-Like3 关键位点。它位点 GDPD-Like 结构域上,很可能是该酶活性依赖的重要位点。今后可以分析 Ser⁵³⁸突变的 AtGDPD-Like3 酶学相关动力学性质,了解它是如何影响 AtGDPD-Like3 的。

此外,实验结果还表明 AtGDPD-Like3 存在其它的关键位点。由于 AtGDPD-Like3 包含两个 GDPD-Like 结构域^[8],这两个结构域的功能是否冗余还不清楚。本实验的 Ser⁵³⁸突变位于第二个 GDPD-Like 结构域,第一个 GDPD-Like 结构域也可能行使作用。在本研究中只鉴定 AtGDPD-Like3 保守的 3 个单位点的作用,对于其他位点是否影响 AtGDPD-Like3 功能没有涉及。今后我们将采用双位点或多位点同时突变策略,来确定它们对 AtGDPD-Like3 行使功能的作用。

参 考 文 献

- [1] Feng Y , Xu P , Li B S , et al. Ethylene promotes root hair growth through coordinated EIN3/EIL1 and RHD6/RSL1 activity in *Arabidopsis*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America , 2017 , 114(52) : 13834 – 13839.
- [2] Wan Z Y , Chai S , Ge F R , et al. *Arabidopsis* PROTEIN S-ACYL TRANSFERASE4 mediates root hair growth[J]. Plant Journal 2017 90(2) : 249 – 260.
- [3] Cole R A , Fowler J E. Polarized growth maintaining focus on the tip[J]. Current Opinion in Plant Biology 2006 9(6) : 579 – 588.
- [4] Diet A , Link B , Seifert G J , et al. The *Arabidopsis* root hair cell wall formation mutant *lrx1* is suppressed by mutations in the *RHM1* gene encoding a UDP-L-rhamnose synthase [J]. The Plant Cell 2006 18(7) : 1630 – 1641.
- [5] Ovecka M , Lang I , Baluška F , et al. Endocytosis and vesicle trafficking during tip growth of root hairs[J]. Protoplasma 2005 226(1 – 2) : 39 – 54.
- [6] Yoo C M , Quan L , Cannon A E , et al. AGD1 , a class 1 ARF-GAP acts in common signaling pathways with phosphoinositide metabolism and the actin cytoskeleton in controlling *Arabidopsis* root hair polarity[J]. The Plant Journal 2012 69(6) : 1064 – 1076.
- [7] Kusano H , Testerink C , Vermeer J E M , et al. The *Arabidopsis* Phosphatidylinositol Phosphate 5-Kinase PIP5K3 is a key regulator of root hair tip growth[J]. The Plant Cell , 2008 20(2) : 367 – 380.
- [8] Takeda S , Gapper C , Kaya H , et al. Local positive feedback regulation determines cell shape in root hair cells [J]. Science 2008 319(5867) : 1241 – 1244.
- [9] Noctor G , Foyer C H. Intracellular redox compartmentation and ROS-related communication in regulation and signaling[J]. Plant Physiology 2016 171(3) : 1581 – 1592.
- [10] Carol R J , Dolan L. Building a hair tip growth in *Arabidopsis thaliana* root hairs[J]. Philosophical Transactions of the Royal Society B : Biological Sciences , 2002 , 357 (1422) : 815 – 821.
- [11] Zhang Y , Xiao Y Y , Du F , et al. *Arabidopsis* VILLIN4 is involved in root hair growth through regulating actin organization in a Ca²⁺-dependent manner[J]. New Phytologist 2011 190(3) : 667 – 682.
- [12] Tommassen J , Eigelmeier K , Cole S T , et al. Characterization of two genes *glpQ* and *ugpQ* encoding glycerophosphoryl diester phosphodiesterases of *Escherichia coli* [J]. Molecular and General Genetics , 1991 , 226(1 – 2) : 321 – 327.
- [13] Cheng Y X , Zhou W B , El Sheery N I , et al. Characterization of the *Arabidopsis* glycerophosphodiester phosphodiesterase(GDPD) family reveals a role of the plastid-localized AtGDPD1 in maintaining cellular phosphate homeostasis under phosphate starvation[J]. The Plant Journal 2011 66(5) : 781 – 795.
- [14] Hayashi S , Ishii T , Matsunaga T , et al. The glycerophosphoryl diester phosphodiesterase-like proteins SHV3 and its homologs play important roles in cell wall organization[J]. Plant and Cell Physiology 2008 49(10) : 1522 – 1535.
- [15] Yeats T H , Somerville C R. A dual mechanism of cellulose deficiency in *shv3svl1*[J]. Plant Signaling & Behavior 2016 11(9) : e1218108.
- [16] Xu R Q , Li Q Q. Protocol : streamline cloning of genes into binary vectors in *Agrobacterium* via the Gateway® TOPO vector system[J]. Plant Methods 2008 4 : 4.
- [17] Clough S J , Bent A F. Floral dip : a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*[J]. The Plant Journal 1998 16(6) : 735 – 743.
- [18] Hnasko T S , Hnasko R M. The western blot[M]. // Hnasko R. ELISA : methods and protocols. New York : Humana Press 2015 : 87 – 96.
- [19] Canales J , Contreras-López O , Álvarez J M , et al. Nitrate induction of root hair density is mediated by TGA1/TGA4 and CPC transcription factors in *Arabidopsis thaliana*[J]. The Plant Journal 2017 92(2) : 305 – 316.
- [20] Jones M A , Raymond M J , Smirnov N. Analysis of the root-hair morphogenesis transcriptome reveals the molecular identity of six genes with roles in root-hair development in *Arabidopsis*[J]. The Plant Journal , 2006 , 45 (1) : 83 – 100.