

拟南芥磷脂酸荧光探针的构建及应用

马疏言¹, 郑月萍^{1,2}, 郑志富^{1,2}

(1. 浙江农林大学 现代农学院, 浙江 杭州 311300; 2. 浙江农林大学 油料作物种质创新与利用研究所, 浙江 杭州 311300)

摘要: 【目的】磷脂酸 (PA) 是甘油酯生物合成的前体, 又是参与植物生长发育调节和各种逆境响应的重要信使物质, 然而目前对植物细胞中 PA 含量动态变化的了解十分有限。本研究试图构建一种能有效监测植物细胞 PA 含量变化的荧光探针, 并用之测定盐碱胁迫过程中胞内 PA 含量的变化。【方法】将 Spo20p 蛋白中高度专一的 PA 结合域相对应的核苷酸序列与绿色荧光蛋白基因融合, 经遗传转化获得携带该融合基因的转基因拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 株系, 其表达受组成型启动子 UBQ10 驱动, 产生的融合蛋白成为专一结合 PA 的荧光探针。随后, 运用该荧光探针监测盐碱胁迫下胞内 PA 含量的变化。【结果】构建获得 7 个不同的纯合、单插入位点转基因拟南芥株系。实时荧光定量 PCR (RT-qPCR) 分析显示: 不同株系中融合基因的表达量存在差异。不同浓度外源 PA 处理试验显示: 随着表达量的升高, PA 探针可有效监测到 $2\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PA 处理根尖 10 min 后细胞中 PA 含量的变化; 而当 PA 探针表达量较低时, 对 PA 监测灵敏度显著下降, 表明在一定程度上荧光探针对于 PA 监测的灵敏度与其表达量相关联。运用 PA 荧光探针发现: 盐碱胁迫处理根尖 5 min 即可诱导质膜上或胞内 PA 的积累, 暗示 PA 在植物早期盐碱胁迫响应中可能产生重要作用。【结论】本研究构建了一种可对细胞内 PA 含量进行有效监测的荧光探针, 该探针可用于监测植物盐碱胁迫早期响应过程中胞内 PA 水平的变化, 从而为早期逆境响应研究提供新工具。图 7 表 1 参 36

关键词: 磷脂酸; 荧光探针; 转基因; 盐碱胁迫; 拟南芥

中图分类号: Q946.5

文献标志码: A

文章编号: 2095-0756(2024)01-0104-09

Generation and application of a fluorescent probe for phosphatidic acid in *Arabidopsis thaliana*

MA Shuyan¹, ZHENG Yueping^{1,2}, ZHENG Zhifu^{1,2}

(1. College of Advanced Agricultural Sciences, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China;

2. Institute for Oilseed Crop Germplasm Innovation and Utilization, Zhejiang A&F University, Hangzhou 311300, Zhejiang, China)

Abstract: [Objective] Phosphatidic acid (PA) serves as an important signal molecule involved in the regulation of plant growth and development and different responses to various stresses as well as a general precursor for glycerolipid biosynthesis. However, little is known thus far about the dynamic changes of PA in plant cells. This study attempted to construct a fluorescent probe that can effectively monitor the changes of PA in plant cells and use it to measure the changes of intracellular PA under saline-alkaline stresses. [Method] The corresponding nucleotide sequence for PA-specific binding domain within the Spo20p protein was fused to the green fluorescent protein gene. Transgenic *Arabidopsis thaliana* lines bearing the fusion gene under the control

收稿日期: 2023-06-08; 修回日期: 2023-07-27

基金项目: 国家自然科学基金青年基金资助项目 (32100209); 浙江省自然科学基金青年基金资助项目 (Q21C020003); 国家自然科学基金面上基金资助项目 (31871660)

作者简介: 马疏言 (ORCID: 0009-0007-5802-6691), 从事植物生理生化与代谢调控研究。E-mail: 1531861619@qq.com。通信作者: 郑志富 (ORCID: 0000-0002-8247-5629), 教授, 从事植物生化和代谢研究。E-mail: zzheng@zafu.edu.cn

of the constitutive promoter UBQ10 was then generated via genetic transformation. The resulting fusion protein constituted a fluorescent probe specifically binding to PA. Subsequently, this probe was employed to monitor the changes of cellular PA under saline-alkaline stresses. [Result] Seven transgenic *A. thaliana* lines homozygous for single insertion of the fusion gene was generated. Real time quantitative PCR (RT-qPCR) analysis showed that expression levels of the fusion gene varied among different lines. Experiments with various exogenous PA concentrations revealed that as the expression level of the PA probe increased, it could effectively monitor the changes of cellular PA in the root tips treated with $2\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ exogenous PA for 10 min, whereas this was not the case when the expression level of the probe was low, indicating that the sensitivity of the probe for PA detection is, to a certain degree, associated with its expression level. Based on this fluorescent PA probe, PA accumulation at the plasma membrane or in the intracellular space was evident in the root tips under saline-alkaline stresses for 5 min, implying that PA may play important roles in early plant responses to saline-alkaline stresses. [Conclusion] A fluorescence probe for effective monitoring of cellular PA was developed in this study. This probe can monitor the alterations in cellular PA level during early plant responses to saline-alkaline stresses, thereby providing a new tool to study early responses to various stresses. [Ch, 7 fig. 1 tab. 36 ref.]

Key words: phosphatidic acid; fluorescent probe; transgene; saline-alkaline stress; *Arabidopsis thaliana*

磷脂酸 (phosphatidic acid, PA) 是一种常见的细胞甘油磷脂, 也是最简单的膜脂之一^[1]。几乎所有生物体内都会产生 PA, 包括酵母^[2]、动物^[3] 和植物^[4] 等。在植物中 PA 的合成主要包括 2 种方式: 第 1 种是从头合成途径, 3-磷酸甘油先后在 3-磷酸甘油酰基转移酶和溶血磷脂酸脂酰基转移酶的作用下发生连续 2 步酰化反应生成 PA, 这也是 PA 合成的主要途径^[5]; 第 2 种是磷脂的降解途径, 磷脂降解又可分为 2 种, 一种是磷脂酶 D 通过水解某些结构磷脂直接生成 PA^[6-9], 另一种是磷脂酶 C 通过水解磷脂酰肌醇生成二脂酰甘油^[10], 继而后经二脂酰甘油激酶磷酸化生成 PA^[11]。PA 作为一种结构膜脂, 磷酸基团头部能够以“静电/氢键开关模型”的方式与蛋白质结合^[12]。在该模型中, PA 结合蛋白中带正电荷的碱性氨基酸残基^[13-17], 可以吸引磷脂双分子层上的负电荷, 并通过静电作用影响膜环境, 继而与 PA 头部的磷酸基团形成氢键, 产生一个稳定的蛋白质结合位点。PA 这种携带负电荷并且在生理条件下呈圆锥体的独特分子构型^[18], 使得 PA 结合蛋白的结构域能够特异性的与其结合, 保证了生物膜结构的稳定和功能的发挥。除了作为膜脂的一个结构成分以及甘油脂合成的前体物质, PA 还是一个关键信号分子, 在多种生物学过程中发挥重要作用。正常条件下, 行使信号功能的 PA 含量甚微; 在植物应答各种生物与非生物胁迫过程中 PA 水平则会迅速升高, 但这种积累往往是短暂的。这说明生物体拥有一套严格控制信号分子 PA 含量的机制, 这对调节 PA 信号传递强度、维持细胞物质与能量代谢的动态平衡至关重要^[19-22]。

尽管 PA 拥有多种功能, 但目前对于细胞内 PA 含量的动态变化仍知之甚少, 这主要受 PA 检测手段的限制。过去主要采用诸如薄层层析、高效液相色谱和放射性同位素标记等理化手段对其含量进行测定^[23]。近年来, 质谱分析技术的应用使得对包括 PA 在内的各种脂质的测定更准确和高效^[24-25]。然而, 这些理化手段都只能对组织器官中 PA 总量与种类进行定量或定性分析, 无法捕捉细胞内 PA 的动态与瞬时变化信息。通常认为, 内质网上的 PA 含量相对较高, 这有助于促进磷脂和三酰甘油的合成^[26-27]; 而质膜和细胞器中行使信号功能的 PA 含量甚微。显然, 采用理化测定会掩盖胞内 PA 的真实变化。因此, 亟需开发一种能可视化分析细胞内 PA 的工具。

大量研究表明: 生物体中 PA 结合蛋白种类繁多, 这些蛋白中的 PA 结合域 (phosphatidic acid binding domains, PABD) 结构亦存在差异。其中一些 PABD 因与 PA 结合专一性强, 被用来开发多种 PA 探针^[28-33]。酵母蛋白 Spo20p 中的 PA 结合域已被证实具有极强的专一性^[33], 只结合 PA 而不结合其他磷脂。目前基于这一 PABD 所开发的 PA 探针在医学研究中应用广泛, 但在植物中的应用却有限^[34]。因此, 本研究旨在构建基于 Spo20p 中的 PABD 的植物 PA 荧光探针, 为剖析植物早期应答逆境胁迫的细胞分子机制提供新工具。

1 材料与方法

1.1 植株培养

1.1.1 土壤基质的培养 将拟南芥 *Arabidopsis thaliana* 种子置于含有湿润滤纸的培养皿中, 4 ℃ 冰箱内避光放置 3 d 后将其点播在湿润的土壤基质上 ($V_{\text{营养土}}:V_{\text{蛭石}}:V_{\text{珍珠岩}}=3:1:1$)。将播种后的盆栽用透明塑料盖覆盖, 置于 24~25 ℃ 室温、50%~60% 湿度、14 h 光照/10 h 黑暗的植物培养箱中培养, 7 d 后揭去塑料盖间苗。

1.1.2 培养基的培养 将拟南芥种子进行消毒, 加入适量灭菌过的蒸馏水, 在 4 ℃ 冰箱内避光放置 3 d, 点播在 1/2 MS 培养基上, 置于植物培养间中培养。

1.2 PA 荧光探针的构建

1.2.1 pSY06-*GFP-PABD* 载体的构建 酵母蛋白 Spo20p 中存在一个高度专一的 PA 结构域 (PABD), 该 PABD 由 40 个氨基酸残基构成, 只结合 PA 而不结合其他磷脂^[33-34], 因此, 本研究选择该 PABD 与荧光蛋白融合, 构建 PA 荧光探针。根据 PAPD 核苷酸序列^[33] 设计引物 (表 1) 进行 PCR 扩增, 获得与该 PABD 相对应的 DNA 片段; 同时 PCR 扩增获得 *GFP* 基因编码区序列。随后, 利用无缝克隆试剂盒 (生工), 将 *GFP* 和 *PABD* 片段克隆至植物表达载体 pSY06 的限制性内切酶位点 *Kpn* I 和 *Pst* I 之间, 获得重组质粒 pSY06-*GFP-PABD*。*PABD* 连接至 *GFP* 基因编码区的 3'端, 构成 *GFP-PABD* 融合基因, 该融合基因的表达由组成型启动子 UBQ10 驱动。重组质粒中的插入片段经菌落 PCR、*Kpn* I 和 *Pst* I 双酶切以及测序验证正确后, 采用热激法将质粒转化至农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* GV3101, 用于后续拟南芥遗传转化。

表 1 相关引物序列

Table 1 Sequence of related primers

用途	引物名称	引物序列(5'→3')
<i>PABD</i> 基因合成	ZYP301	CCTGCTAATTTCAAGGCTAATTCATTGCTGTTTCGCTCGAGATCTGAGTCCGGACTGCAGGTTGGATCCGGTACCGAGCT
	ZYP302	GAAGACGTGATAGGCTACATGTGAAGCTTAAATCCTTGAGGAATAAAATCCACAAACAACCTTCACCCAAA
	ZYP303	TGCTTCCTGAACAATTGTCCATTCTAGATTCTGTCTTGTTGATATCAAGACCTGCTAATTTCAAGGCTAA
	ZYP304	GTACCCAAGCTTCACATGTAGCCTATCACGTCTTCTGCTTCCTGAACAATTGTCC
	ZYP305	CACAAACAACCTTCACCCAACTGTCTGGTTCGATGACGCCACTAAGACTAGTTAAGGTACCGGCGTAATCATGGTC
<i>PABD</i> 基因克隆	ZYP308	TCCGGACTCAGATCTCGAGC
	ZYP309	AGCTATAGTTCTAGATCTAGATTAAGTCTTAGTGCGCTC
<i>GFP</i> 基因克隆	ZYP306	TATCGATGGCGCCAGCTGAGGATGGTGAGCAAGGGCGA
	ZYP307	AGATCTGAGTCCGGACTTGTACAGCTCGTCCATCCGGACTCAGATCTCGAGC
转基因拟南芥鉴定	MSY01	TGGTGTAGTTTCTAGTTTGTGCG
	MSY02	TCATCATGACAGATCTGCGC
表达量分析	ZYP389	GACCACTACCAGCAGAACACC
	ZYP390	CTTGTCAGCTCGTCCATGC

1.2.2 拟南芥的遗传转化、筛选及鉴定 以哥伦比亚野生型拟南芥 (WT) 为植物材料, 利用农杆菌花序侵染法转化拟南芥。将获得的 T₁ 代拟南芥种子进行表面消毒, 均匀铺在含有草铵膦 (10 mg·L⁻¹) 和特美汀 (50 mg·L⁻¹) 的 1/2 MS 筛选培养基上进行筛选。将具有除草剂抗性的阳性苗移栽到土壤中继续培养, 3 周后提取叶片 DNA 并设计引物 (表 1) 进行 PCR 鉴定, 对 T₂ 和 T₃ 代转基因株系进行除草剂抗性的遗传分析, 最终筛选得到纯合单插入位点转基因株系。

1.3 转基因拟南芥中目的基因表达量分析

以在 1/2 MS 培养基中生长 7 d 的转基因拟南芥根系作为测定材料, 使用高纯度 RNA 提取试剂盒 (全

式金) 提取 RNA 并对其进行纯度检测和浓度测定。取等量 RNA, 使用反转录试剂盒 (翌圣) 进行单链 cDNA 的合成。选择拟南芥肌动蛋白基因 *Actin* 为内参基因, 设计引物 (表 1) 进行实时荧光定量 PCR (RT-qPCR), 并对数据采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 法进行分析。

1.4 PA 荧光探针转基因拟南芥的表型观察

将野生型和转基因株系种子点播在 1/2 MS 方形培养基上, 竖直培养 6 d 后, 挑选长势均匀一致的幼苗 (每个基因型, 20 株), 分别转移至含有 0 和 50 mmol·L⁻¹ NaCl 的 1/2 MS 固体培养基中继续竖直培养, 7 d 后观察表型。

1.5 PA 荧光探针灵敏度分析

将在 1/2 MS 方形培养基上竖直培养 6 d 的幼苗分别浸泡在含有 0、2 和 10 μmol·L⁻¹ PA 的 1/2 MS 液体培养基中, 依次处理 5、10、15 和 20 min 后, 利用荧光显微镜 (ZEISS, Axio Imager 2) 对拟南芥根尖分生区 PA 的分布进行观察并拍照。

1.6 盐碱胁迫下根尖 PA 的检测

将含 PA 荧光探针的拟南芥转基因株系种子点播在 1/2 MS 方形培养基上, 竖直培养 6 d, 选择均匀一致的幼苗分别浸泡在含有 100 mmol·L⁻¹ NaCl、10 mmol·L⁻¹ NaHCO₃ 和兼含两者的 1/2 MS 液体培养基中, 处理 5、10 和 15 min 后用荧光显微镜观察根尖分生区 PA 的分布。

2 结果与分析

2.1 PA 荧光探针的设计及其转基因拟南芥的获得

如图 1 所示: 该载体以 pSY06 为骨架, 由 35S 启动子驱动植物选择标记基因——草铵膦抗性基因 (*bar*) 的表达, 而 *GFP-PABD* 融合基因的表达则由 UBQ10 启动子驱动。



图 1 pSY06-*GFP-PABD* 载体图
Figure 1 Vector diagram of pSY06-*GFP-PABD*

采用农杆菌花序侵染法将 *GFP-PABD* 融合基因转入拟南芥, 获得 T₁ 代转基因种子。对 T₁ 代幼苗进行草铵膦 (10 mg·L⁻¹) 抗性筛选与 PCR 鉴定, 获得 56 个含融合基因的独立转基因株系。随后, 对相应株系的 T₂ 代幼苗 (每个株系约 300 株) 继续进行草铵膦除草剂抗性筛选。卡方测验显示: 符合 3(阳性苗数):1(阴性苗数) 分离规律的株系共 8 个, 这些株系为含单插入位点的转基因株系。再对 T₂ 代各个株系不同植株的自交后代 (T₃ 代) 进行除草剂抗性筛选, 最终获得 7 个纯合、单插入位点转基因拟南芥株系, 分别为 8-1、11-1、13-12、25-5、42-4、48-1 和 53-1。

2.2 不同转基因株系 PA 荧光探针表达量的分析

为了明确不同转基因株系 PA 荧光探针表达量的差异, 对上述 7 个转基因株系进行了目的基因的表达量测定。RT-qPCR 结果 (图 2) 显示: 当将转基因株系 8-1 中融合基因的相对表达量设为参考值 “1”, 其余 6 个株系 (11-1、13-12、25-5、42-4、48-1 和 53-1) 的相对表达量分别为 1.74、15.91、0.72、1.06、1.69 和 1.52。株系 13-12 的 PA 探针的表达量最高, 是其他株系的 9~22 倍, 为 PA 探针高表达转基因株系; 相应地, 将株系 48-1 作为 PA 探针低表达材料。

2.3 PA 荧光探针拟南芥生长发育的影响

为了明确 PA 荧光探针的表达是否会对植物生长发育产生影响, 比较分析了野生型拟南芥和不同转基因株系在整个生长发育周期的表型差异。土培生长实验显示: 野生型与转基因拟南芥株系的叶片生长无明显差异, 高表达转基因株系 (13-12) 与低表

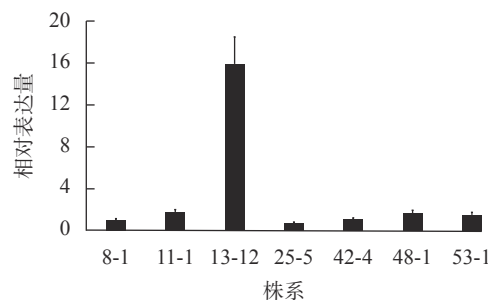
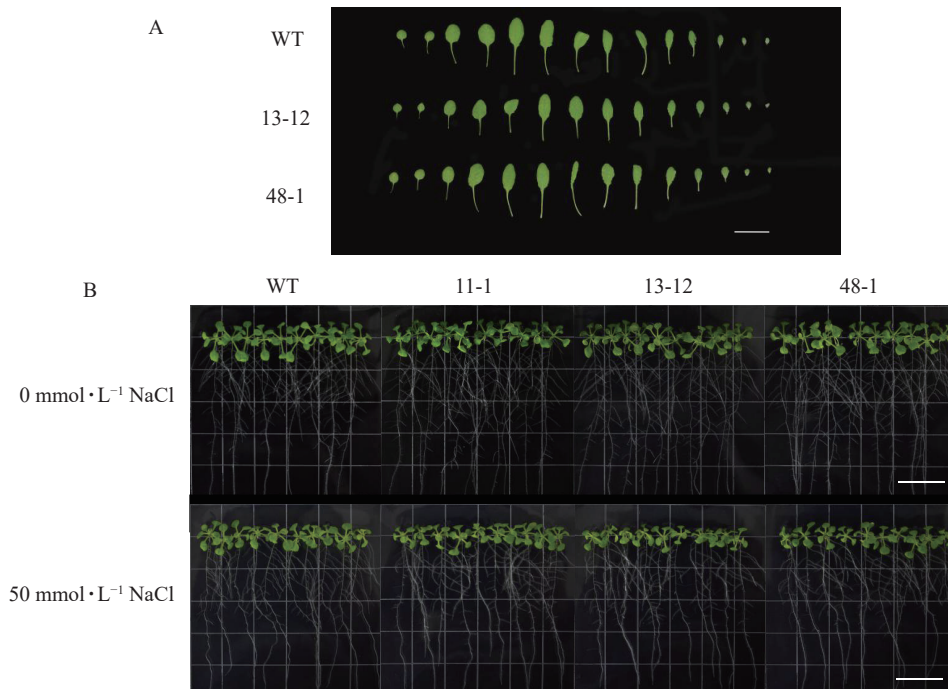


图 2 不同转基因拟南芥株系中 *GFP-PABD* 融合基因的相对表达量

Figure 2 Relative expression level of the *GFP-PABD* fusion gene in transgenic *A. thaliana* lines

达转基因株系(48-1)之间亦无可见表型差异(图3A)。另外,在含有0和50 mmol·L⁻¹ NaCl的1/2 MS培养基中生长时,野生型与不同转基因株系之间也未表现出生长速率的差异(图3B)。这些结果说明:在一定范围内PA荧光探针的表达不会影响拟南芥的正常生长发育,这一特性有助于合理解释特定条件下胞内PA变化对植物生长发育产生的影响。



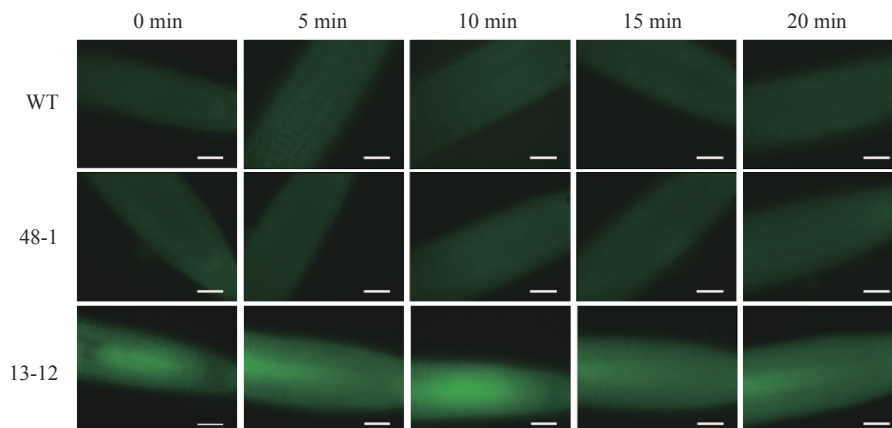
A. PA荧光探针转基因株系13-12和48-1与野生型(WT)拟南芥地上部的表型比较,标尺为2 cm; B. PA荧光探针转基因株系11-1、13-12和48-1与野生型(WT)拟南芥,在1/2 MS培养基以及含50 mmol·L⁻¹ NaCl的1/2 MS培养基中培养13 d后的表型比较,标尺为2 cm。

图3 野生型拟南芥与3个PA荧光探针转基因株系的表型比较

Figure 3 Phenotypic comparison between wild type and three transgenic lines of *A. thaliana* bearing PA fluorescent probe

2.4 荧光探针监测PA的灵敏度

随着荧光探针表达量的增加,细胞内的荧光强度也会增强,这会导致PA检测的信噪比下降;相反,荧光探针表达量过低则会影响PA检测的灵敏度。为了获得检测灵敏度和信噪比都较高的PA荧光探针,用不同浓度的外源PA处理荧光探针表达量存在差异的转基因株系,进而在荧光显微镜下观察根尖PA的积累情况。结果(图4~6)显示:野生型拟南芥在有、无外源PA处理下,根尖细胞自发荧光的

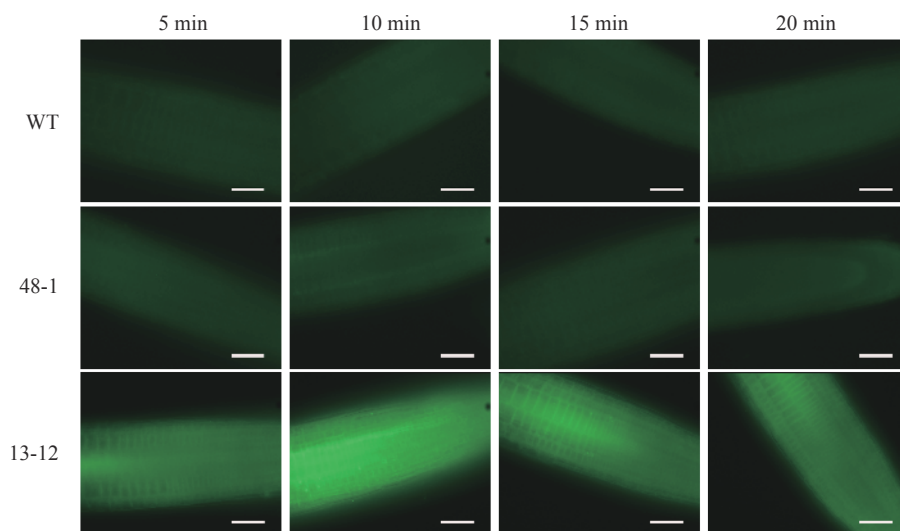


将在1/2 MS培养基中培养了6 d的野生型(WT)拟南芥、含有PA荧光探针的低表达量转基因株系(48-1)和高表达量转基因株系(13-12),分别在无外源PA的1/2 MS液体培养基中依次处理0、5、10、15和20 min后,用荧光显微镜观测拟南芥根尖分生区PA的分布。标尺为50 μm。

图4 无外源PA处理下PA探针在野生型和2个转基因拟南芥株系根尖中荧光强度的差异分析

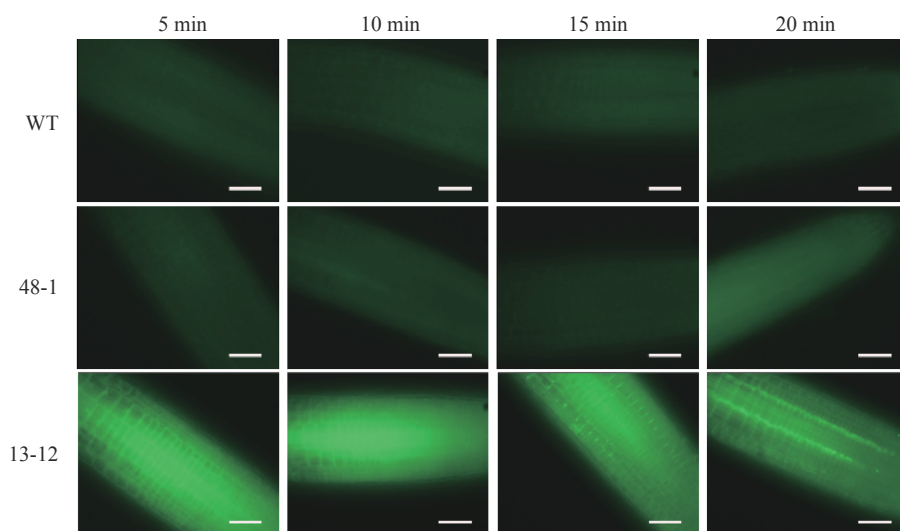
Figure 4 Analysis of discrepancy in fluorescent intensity of PA probe between wild type and two transgenic lines of *A. thaliana*

强度无明显差别。另外,在不同浓度外源 PA 处理下,荧光探针低表达的转基因株系 (48-1) 的根尖分生区的 PA 含量变化未能被捕捉到。相反,对于荧光探针高表达的转基因株系 (13-12), 2 和 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ PA 分别处理 10 和 5 min 后,其根尖分生区细胞的胞内或质膜上的 PA 积累清晰可见 (图 5)。当外源 PA 浓度低时,随着处理时间延长,细胞中 PA 积累减少 (图 5),这很可能是因为作为甘油酯合成前体物质的 PA 已被转化为其他物质。而当外源 PA 浓度升至 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时,处理 10、20 min 后依然可见细胞中的 PA 呈点状分布 (图 6)。这些结果说明:荧光探针表达量较高的转基因株系 (13-12) 可被用于监测细胞中 PA 含量的变化。



将在 1/2 MS 培养基中培养了 6 d 的野生型 (WT) 拟南芥、含有 PA 荧光探针的低表达量转基因株系 (48-1) 和高表达量转基因株系 (13-12), 分别在含 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 外源 PA 的 1/2 MS 液体培养基中依次处理 5、10、15 和 20 min 后, 用荧光显微镜观测拟南芥根尖分生区 PA 的分布。标尺为 50 μm 。

图 5 外源 PA (2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理下 PA 荧光探针对 PA 监测灵敏度的分析
Figure 5 Sensitivity analysis of PA fluorescent probe monitoring PA under treatment with 2 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ exogenous PA



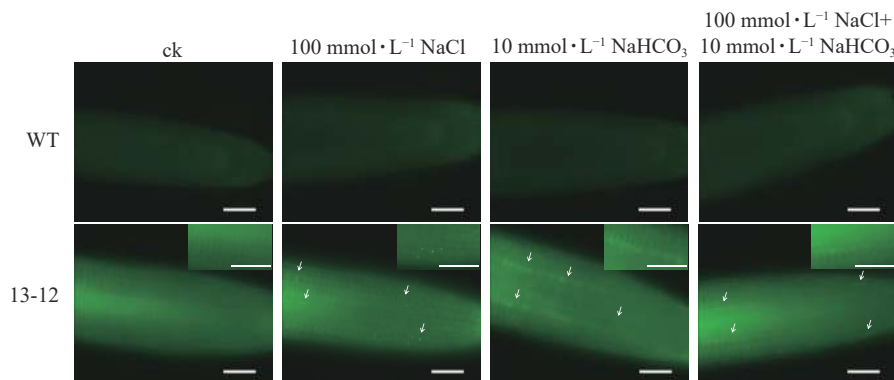
将在 1/2 MS 培养基中培养了 6 d 的野生型 (WT) 拟南芥、含有 PA 荧光探针的低表达量转基因株系 (48-1) 和高表达量转基因株系 (13-12), 分别在含 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 外源 PA 的 1/2 MS 液体培养基中依次处理 5、10、15 和 20 min 后, 用荧光显微镜观测拟南芥根尖分生区 PA 的分布。标尺为 50 μm 。

图 6 外源 PA (10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 处理下 PA 荧光探针对 PA 监测灵敏度的分析
Figure 6 Sensitivity analysis of PA fluorescent probe monitoring PA under treatment with 10 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ exogenous PA

2.5 荧光探针检测盐碱胁迫下拟南芥根尖 PA 的含量变化

为了进一步验证 PA 荧光探针的实用性, 利用荧光探针表达量较高的转基因株系 (13-12) 检测盐碱胁迫条件下根尖细胞中 PA 含量的变化。结果显示: 盐、碱单独或混合处理转基因株系, 5 min 后即可在根

尖分生区细胞中观察到 PA 的点状分布 (图 7)。因此推断,本研究构建的 PA 荧光探针可用于监测逆境条件下植物细胞中 PA 含量的变化。另外,盐碱胁迫可快速诱导 PA 积累这一现象表明在植物早期逆境响应中 PA 发挥某种重要作用。



将在1/2 MS方形培养基上培养6 d的野生型(WT)拟南芥和高表达量转基因株系(13-12)的幼苗,分别用ck(无胁迫)、100 mmol·L⁻¹ NaCl、10 mmol·L⁻¹ NaHCO₃以及100 mmol·L⁻¹ NaCl和10 mmol·L⁻¹ NaHCO₃的混合溶液处理5 min后,在荧光显微镜下观测拟南芥根尖分生区PA的分布。标尺为50 μm。

图 7 单独或混合盐碱胁迫下 PA 在转基因拟南芥根尖分生组织中的分布

Figure 7 Distribution of PA in the root tip meristem of a transgenic *A. thaliana* line bearing PA sensor under saline and alkaline stresses, alone or in combination

3 讨论

已知 PA 在植物生长发育与逆境响应过程中发挥重要作用,但由于缺乏 PA 的可视化分析工具,对细胞中 PA 含量动态变化的了解十分有限。这一方面限制了 PA 作用机制的研究,另一方面给评估基因工程手段操控植物细胞 PA 含量变化所产生的实际应用效果带来困难。因此,本研究将酵母蛋白 Spo20p 中对 PA 高度专一的结合域与荧光蛋白融合,成功构建了可对细胞内 PA 进行可视化检测的荧光探针。

为了使荧光探针适用于监测整个生长周期不同组织细胞中的 PA 水平,选择组成型表达启动子 UBQ10 驱动 *GFP-PABD* 融合基因的表达。研究发现:植物细胞中 PA 的检测灵敏度与 PA 荧光探针的表达量密切相关,表达量较高的荧光探针可有效检测到外源 PA 处理带来的胞内 PA 水平的变化,而表达量较低的探针检测效果则相反。如 13-12 株系中 PA 荧光探针的表达量高于其他株系,该株系经 2 μmol·L⁻¹ 外源 PA 处理 10 min,其根尖细胞中 PA 的点状分布即可被观察到,这也说明外源 PA 能够被拟南芥根尖快速吸收,继而与 PA 荧光探针结合。鉴于已有研究中常用浓度高于 10 μmol·L⁻¹ 的外源 PA 检测 PA 探针的灵敏度^[35],本研究中构建的荧光探针可有效监测到 2 μmol·L⁻¹ 外源 PA 处理所带来的细胞内 PA 含量的变化,推测基于 13-12 转基因株系的 PA 荧光探针具有较高的 PA 检测灵敏度。

需要指出的是,PA 荧光探针使用过程中,样品处理时间的延长和观察光源的增强均会使植物细胞造成某种损伤,导致细胞产生自发荧光,从而降低 PA 检测的信噪比。因此在实验过程中,需尽量缩短植物样本的制片时间及荧光观察的时间,以提高观察结果的真实性。

盐碱地中盐和碱是 2 种共存但不同的非生物胁迫,共同影响植物的正常生长发育。利用本研究构建的 PA 荧光探针发现:盐胁迫处理 5 min 就会造成 PA 在细胞中的积累,这与已有的研究结果一致^[22, 36]。同时,碱胁迫和盐碱混合胁迫也会快速诱导 PA 的积累。因此,为了全面了解植物早期逆境响应机制,有必要监测早期细胞中 PA 含量的动态变化。本研究开发的 PA 荧光探针为这些方面的研究提供了重要技术支撑。

4 结论

本研究成功构建了一种基于酵母蛋白 Spo20p 中 PA 结合域的荧光探针,可有效监测植物细胞中 PA 含量变化。应用该探针发现盐碱胁迫可快速诱导拟南芥根尖细胞质膜上和胞内 PA 的积累,这一结果

表明 PA 在植物对盐碱胁迫早期应答过程中发挥重要作用。

5 参考文献

- [1] ZHUKOVSKY M A, FILOGRANA A, LUINI A, *et al.* Phosphatidic acid in membrane rearrangements [J]. *Febs Letters*, 2019, **593**(17): 2428 – 2451.
- [2] CONNERTH M, TATSUTA T, HAAG M, *et al.* Intramitochondrial transport of phosphatidic acid in yeast by a lipid transfer protein [J]. *Science*, 2012, **338**(6108): 815 – 818.
- [3] WANG Ziqing, ZHANG Feng, HE Jingquan, *et al.* Binding of PLD2-generated phosphatidic acid to KIF5B promotes MT1-MMP surface trafficking and lung metastasis of mouse breast cancer cells [J]. *Developmental Cell*, 2017, **43**(2): 186 – 197.
- [4] CRADDOCK C P, ADAMS N, BRYANT F M, *et al.* PHOSPHATIDIC ACID PHOSPHOHYDROLASE regulates phosphatidylcholine biosynthesis in *Arabidopsis* by phosphatidic acid-mediated activation of CTP: PHOSPHOCHOLINE CYTIDYLYLTRANSFERASE activity [J]. *The Plant Cell*, 2015, **27**(4): 1251 – 1264.
- [5] ATHENSTAEDT K. Phosphatidic acid biosynthesis in the model organism yeast *Saccharomyces cerevisiae*-a survey [J/OL]. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2021, **1866**(6): 158907[2023-05-30]. doi:10.1016/j.bbalip.2021.158907.
- [6] WANG Xuemin, DEVAIAH S P, ZHANG Wenhua, *et al.* Signaling functions of phosphatidic acid [J]. *Progress in Lipid Research*, 2006, **45**(3): 250 – 278.
- [7] SELVY P E, LAVIERI R R, LINDSLEY C W, *et al.* Phospholipase D: enzymology, functionality, and chemical modulation [J]. *Chemical Reviews*, 2011, **111**(10): 6064 – 6119.
- [8] TAN Weijuan, YANG Yicong, ZHOU Ying, *et al.* DIACYLGLYCEROL ACYLTRANSFERASE and DIACYLGLYCEROL KINASE modulate triacylglycerol and phosphatidic acid production in the plant response to freezing stress [J]. *Plant Physiology*, 2018, **177**(3): 1303 – 1318.
- [9] XING Jingjing, ZHANG Liang, DUAN Zhikun, *et al.* Coordination of phospholipid-based signaling and membrane trafficking in plant immunity [J]. *Trends in Plant Science*, 2021, **26**(4): 407 – 420.
- [10] ARISZ S A, TESTERINK C, MUNNIK T. Plant PA signaling via diacylglycerol kinase [J]. *Biochimica et Biophysica Acta-Molecular and Cell Biology of Lipids*, 2009, **1791**(9): 869 – 875.
- [11] de JONG C F, LAXALT A M, BARGMANN B O, *et al.* Phosphatidic acid accumulation is an early response in the Cf-4/Avr4 interaction [J]. *The Plant Journal*, 2004, **39**(1): 1 – 12.
- [12] KOOIJMAN E E, TIELEMAN D P, TESTERINK C, *et al.* An electrostatic/hydrogen bond switch as the basis for the specific interaction of phosphatidic acid with proteins [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2007, **282**(15): 11356 – 11364.
- [13] ZHANG Wenhua, QIN Chunbo, ZHAO Jian, *et al.* Phospholipase D α 1-derived phosphatidic acid interacts with ABI1 phosphatase 2C and regulates abscisic acid signaling [J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 2004, **101**(25): 9508 – 9513.
- [14] YAO Hongyan, WANG Geliang, GUO Liang, *et al.* Phosphatidic acid interacts with a MYB transcription factor and regulates its nuclear localization and function in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2013, **25**(12): 5030 – 5042.
- [15] SAGARAM U S, EL-MOUNADI K, BUCHKO G W, *et al.* Structural and functional studies of a phosphatidic acid-binding antifungal plant defensin MtDef4: identification of an RGFRRR motif governing fungal cell entry [J/OL]. *PLoS One*, 2013, **8**(12): e82485[2023-05-30]. doi:10.1371/journal.pone.0082485.
- [16] CAO Chunyan, WANG Peipei, SONG Hongdi, *et al.* Phosphatidic acid binds to and regulates guanine nucleotide exchange factor 8 (GEF8) activity in *Arabidopsis* [J]. *Functional Plant Biology*, 2017, **44**(10): 1029 – 1038.
- [17] CHOUDHURY S R, PANDEY S. Phosphatidic acid binding inhibits RGS 1 activity to affect specific signaling pathways in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Journal*, 2017, **90**(3): 466 – 477.
- [18] KOOIJMAN E E, CHUPIN V, de KRUIJFF B, *et al.* Modulation of membrane curvature by phosphatidic acid and lysophosphatidic acid [J]. *Traffic*, 2003, **4**(3): 162 – 174.
- [19] TESTERINK C, MUNNIK T. Molecular, cellular, and physiological responses to phosphatidic acid formation in plants [J]. *Journal of Experimental Botany*, 2011, **62**(7): 2349 – 2361.
- [20] LIN Feng, ZHENG Junming, XIE Yanhua, *et al.* Emerging roles of phosphoinositide-associated membrane trafficking in

- plant stress responses [J]. *Journal of Genetics and Genomics*, 2022, **49**(8): 726 – 734.
- [21] ZHOU Xueyan, LI Jianfang, WANG Yiqiao, *et al.* The classical SOS pathway confers natural variation of salt tolerance in maize [J]. *New Phytologist*, 2022, **236**(2): 479 – 494.
- [22] LI Wenyu, SONG Tengzhao, WALLRAD L, *et al.* Tissue-specific accumulation of pH-sensing phosphatidic acid determines plant stress tolerance [J]. *Nature Plants*, 2019, **5**(9): 1012 – 1021.
- [23] RUSTEN T E, STENMARK H. Analyzing phosphoinositides and their interacting proteins [J]. *Nature Methods*, 2006, **3**(4): 251 – 258.
- [24] IVANOVA P T, MILNE S B, MYERS D S, *et al.* Lipidomics: a mass spectrometry based systems level analysis of cellular lipids [J]. *Current Opinion in Chemical Biology*, 2009, **13**(5/6): 526 – 531.
- [25] OLIVEIRA T G, CHAN R B, TIAN Huasong, *et al.* Phospholipase D2 ablation ameliorates Alzheimer's disease-linked synaptic dysfunction and cognitive deficits [J]. *Journal of Neuroscience*, 2010, **30**(49): 16419 – 16428.
- [26] CARMAN G M, HAN G S. Regulation of phospholipid synthesis in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* [J]. *Annual Review of Biochemistry*, 2011, **80**: 859 – 883.
- [27] ATHENSTAEDT K, DAUM G. Phosphatidic acid, a key intermediate in lipid metabolism [J]. *European Journal of Biochemistry*, 1999, **266**(1): 1 – 16.
- [28] BOHDANOWICZ M, SCHLAM D, HERMANSSON M, *et al.* Phosphatidic acid is required for the constitutive ruffling and macropinocytosis of phagocytes [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2013, **24**(11): 1700 – 1712.
- [29] KASSAS N, TRYOEN-TÓTH P, CORROTTE M, *et al.* Genetically encoded probes for phosphatidic acid [J]. *Methods in Cell Biology*, 2012, **108**: 445 – 459.
- [30] JULKOWSKA M M, MCLOUGHLIN F, GALVAN-AMPUDIA C S, *et al.* Identification and functional characterization of the *Arabidopsis* Snf 1-related protein kinase SnRK 2.4 phosphatidic acid - binding domain [J]. *Plant, Cell & Environment*, 2015, **38**(3): 614 – 624.
- [31] FERRAZ-NOGUEIRA J P, DÍEZ-GUERRA F J, LLOPIS J. Visualization of phosphatidic acid fluctuations in the plasma membrane of living cells [J/OL]. *PLoS One*, 2014, **9**(7): e102526[2023-05-30]. doi:10.1371/journal.pone.0102526.
- [32] KASSAS N, TANGUY E, THAHOUY T, *et al.* Comparative characterization of phosphatidic acid sensors and their localization during frustrated phagocytosis [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2017, **292**(10): 4266 – 4279.
- [33] NAKANISHI H, de LOS SANTOS P, NEIMAN A M. Positive and negative regulation of a SNARE protein by control of intracellular localization [J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2004, **15**(4): 1802 – 1815.
- [34] PLATRE M P, NOACK L C, DOUMANE M, *et al.* A combinatorial lipid code shapes the electrostatic landscape of plant endomembranes [J]. *Developmental Cell*, 2018, **45**(4): 465 – 480.
- [35] LI Teng, XIAO Xingkai, LIU Qingyun, *et al.* Dynamic responses of PA to environmental stimuli imaged by a genetically encoded mobilizable fluorescent sensor [J/OL]. *Plant Communications*, 2022, **4**(3): 100500[2023-05-30]. doi: 10.1016/j.xplc.2022.100500.
- [36] MUNNIK T, MEIJER H J G, TER RIET B, *et al.* Hyperosmotic stress stimulates phospholipase D activity and elevates the levels of phosphatidic acid and diacylglycerol pyrophosphate [J]. *The Plant Journal*, 2000, **22**(2): 147 – 154.