

DOI: 10.3724/SP.J.1006.2013.01952

## 拟南芥 G 蛋白 $\alpha$ 亚基 GPA1 互作蛋白铜离子结合蛋白 AtBCB 的鉴定及功能分析

张小红<sup>1</sup> 许鹏博<sup>1,2</sup> 郭萌萌<sup>1,2</sup> 徐兆师<sup>2</sup> 李连城<sup>2</sup> 陈明<sup>2,\*</sup> 马有志<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 西北农林科技大学生命科学院, 陕西杨凌 712100; <sup>2</sup> 中国农业科学院作物科学研究所 / 农作物基因资源与基因改良国家重大科学工程 / 农业部麦类生物学与遗传育种重点实验室, 北京 100081

**摘 要:** 拟南芥 G 蛋白复合体(异源三聚体包括  $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$  亚基)参与植物多个信号转导途径, G 蛋白复合体通过膜上的 G 蛋白偶联受体(GPCR)接受胞外信号后通过 3 个亚基将信号传递给下游效应器。目前, 有关植物 G 蛋白复合体的效应器及其信号传递途径的报道较少, 寻找新的 G 蛋白的效应器有助于阐明 G 蛋白复合体相关的信号转导途径。本研究以拟南芥 G 蛋白  $\alpha$  亚基 GPA1 为诱饵蛋白, 利用泛素分离系统筛选拟南芥 cDNA 文库, 获得一个与 GPA1 互作的铜离子结合蛋白 AtBCB。荧光双分子杂交(BiFC)试验证明, GPA1 与 AtBCB 的互作发生在细胞膜上。基因表达特性分析结果显示, GPA1 和 AtBCB 受金属铝胁迫的诱导表达。进一步以野生型拟南芥(WT)、GPA1 拟南芥突变体 *gpa1-4* 和 AtBCB 拟南芥突变体 *bcb* 为材料, 研究该基因对植物耐金属铝胁迫的功能, 结果显示, 在无胁迫情况下, 2 个突变体和 WT 根部的丙二醛含量无显著差异; 在 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{Al}^{3+}$  处理下, *gpa1-4* 突变体根部丙二醛含量显著( $P<0.05$ )低于 WT 低; *bcb* 根部丙二醛含量极显著( $P<0.01$ )高于 WT。对 3 个铝胁迫响应基因(苹果酸转运体基因 *AtALMT1*、半类型 ABC 转运蛋白基因 *ALSI* 和 ABC 转运蛋白基因 *ALS3*)的表达进行 Real-time PCR 分析, 比较它们在突变体和野生型之间的表达差异, 发现在有铝和无铝处理情况下, *ALSI* 和 *ALS3* 的表达水平在突变体和 WT 间均无显著差异; 在铝处理下, *gpa1-4* 中 *AtALMT1* 的表达量极显著高于 WT; 在 *bcb* 中的表达量显著低于 WT。以上结果表明, 植物通过细胞膜上的 G 蛋白  $\alpha$  亚基 GPA1 和铜离子结合蛋白 AtBCB 的相互作用调控下游基因 *AtALMT1* 的表达, 参与植物对铝胁迫的响应, 其中 GPA1 对铝胁迫耐受起负向作用, AtBCB 对铝胁迫耐受起正向作用。

**关键词:** G 蛋白; 泛素分离系统; 蛋白互作; 铝离子胁迫; 双分子荧光互补

## Characteristic and Function Analysis of a Copper Ion Binding Protein, AtBCB Interacting with G Protein $\alpha$ Subunit GPA1 in *Arabidopsis thaliana*

ZHANG Xiao-Hong<sup>1</sup>, XU Peng-Bo<sup>1,2</sup>, GUO Meng-Meng<sup>1,2</sup>, XU Zhao-Shi<sup>2</sup>, LI Lian-Cheng<sup>2</sup>, CHEN Ming<sup>2,\*</sup>, and MA You-Zhi<sup>2</sup>

<sup>1</sup> College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling 712100, China; <sup>2</sup> Institute of Crop Science, Chinese Academy of Agricultural Sciences / National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement / Key Laboratory of Biology and Genetic Improvement of Triticeae Crops, Ministry of Agriculture, Beijing 100081, China

**Abstract:** Heterotrimeric G protein, including three subunits of  $\alpha$ ,  $\beta$ , and  $\gamma$ , is involved in a lot of signaling pathways in plants. It receives extracellular signals via G-protein coupled receptor (GPCR) and transmits them to the downstream effectors by the three subunits. Till now, the downstream effectors and signaling pathway related to G-protein complexes have been rarely reported. Furthermore, identifying more novel G protein effectors would be helpful to elucidate signaling pathway associated with the G protein complex. In order to find some novel effectors, G protein  $\alpha$  subunit (GPA1) was used as a bait to screen interaction protein in *Arabidopsis* by the split-ubiquitin screening system in this study. One of the GPA1-interacting proteins was identified as copper ion binding protein, AtBCB. The interaction between GPA1 and AtBCB was verified on cell membrane by BiFC (bimolecular

本研究由国家自然科学基金项目(31271715)和国家高技术研究发展计划(863 计划)项目(2012AA10A309)资助。

\* 通讯作者(Corresponding author): 陈明, E-mail: chenming02@caas.cn, Tel: 010-82108750

第一作者联系方式: E-mail: zhxxh2493@126.com, Tel: 029-87032493

Received(收稿日期): 2013-04-07; Accepted(接受日期): 2013-06-09; Published online(网络出版日期): 2013-08-01.

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.1809.S.20130801.1725.005.html>

fluorescence complementation). The expressions of *GPA1* and *AtBCB* were confirmed to be induced by aluminium stress. To study the function of the two genes, we treated *Arabidopsis* mutant *gpa1-4* and *bcb*, in which *GPA1* and *AtBCB* were knocked out, with  $100\ \mu\text{mol L}^{-1}\ \text{Al}^{3+}$ , respectively, and then measured MDA (malonaldehyde) content in roots. The results showed that MDA content in both mutant and WT (wild type) under normal condition was no significant difference, but when exposed to  $100\ \mu\text{mol L}^{-1}\ \text{Al}^{3+}$  the content in *gpa1-4* was lower than that in WT ( $P < 0.05$ ), and it in *bcb* was higher than that in WT ( $P < 0.01$ ). Furthermore, the expression patterns of three responsive genes of *ALMT1*, *ALS1* and *ALS3* to aluminum toxicity were analyzed by Real-time PCR. The results showed that no matter the condition with or without aluminum stress, the expression of *ALS1* and *ALS3* appeared no significant difference in the mutants and WT. However, in the treatment with less than  $100\ \mu\text{mol L}^{-1}\ \text{Al}$  the expression level of *ALMT1* in *gpa1-4* was higher than that in WT, and the expression level of *ALMT1* in *bcb* was lower than that in WT. In short, GPA1 and AtBCB directly interact in the cell membrane, and regulate the expression of the downstream gene of *ALMT1*. In the tolerance process to aluminum stress in plants, GPA1 plays a negative role but AtBCB has positive effect.

**Keywords:** G protein; Split-ubiquitin system; Protein interaction; Aluminium ion stress; BiFC

G 蛋白复合体是一个异源三聚体, 由  $\alpha$ 、 $\beta$  和  $\gamma$  亚基组成。目前, 拟南芥中发现一个  $\alpha$  亚基 GPA1, 一个  $\beta$  亚基 AGB1, 3 个  $\gamma$  亚基 AGG1、AGG2 和 AGG3<sup>[1]</sup>。G 蛋白信号传导途径广泛存在于动植物体内, 主要由 G 蛋白偶联受体(G-protein coupled receptor, GPCR)接受外界信号, 再将信号通过  $\alpha$ 、 $\beta$  或者  $\beta\gamma$  二聚体传递给下游的效应器, 最终引起细胞产生一系列生理生化的应答反应。研究表明, G 蛋白参与植物对光<sup>[2-4]</sup>、激素<sup>[5-6]</sup>和糖<sup>[7]</sup>等信号的传导, 也参与对离子通道的调控<sup>[1,5,8]</sup>以及对病原菌的防卫反应<sup>[9]</sup>等过程。寻找 G 蛋白的互作蛋白, 对于发现新的 G 蛋白的效应器以及揭示 G 蛋白相关的信号途径具有重要意义。Lapik 等<sup>[10]</sup>用酵母双杂交方法筛选出一个与 G 蛋白  $\alpha$  亚基互作, 并参与调控种子萌发和早期幼苗发育的蛋白因子 AtPirin。Assmann 等<sup>[11]</sup>发现, GPCR 受体蛋白 GCR1 与 GPA1 互作, 并调控 ABA 的信号传导过程。GPA1 与磷脂酶 D(PLD)的互作依赖于 PLD 蛋白中的 DRY 氨基酸序列的存在, 并依赖于二者的互作调节彼此的活化状态<sup>[12]</sup>。利用反向 Ras 拯救系统<sup>[13-14]</sup>, 苑国良<sup>[15]</sup>发现 GPA1 与一个质膜定位的蛋白 AtXB31 互作, 并可能参与 Xcc8004 病原菌的信号调控过程。Kaufman 等<sup>[16]</sup>研究发现, GPA1 可以和拟南芥的预苯酸水解酶 PD1 互作并激活 PD1, 从而激活其自身苯丙氨酸的合成途径, 使拟南芥在低剂量 UV 下免受损伤。Friedman 等<sup>[17]</sup>通过遗传学方法发现, ARD1 与 G 蛋白  $\beta$  亚基 AGB1 互作, 并参与下胚轴的发育过程。Tsugama 等<sup>[18]</sup>发现 AGB1 与蛋白磷酸酶 PP2C52 互作。目前, 有关植物 G 蛋白复合体的效应器及其信号传递途径的报道较少。同时, G 蛋白复合体成员参与植物对金属离子胁迫的应答还未见报道。

G 蛋白的 3 个亚基中, G 蛋白  $\alpha$  亚基不仅可以和膜上接受信号的 GPCR 类蛋白结合, 并将信号传递

给下游的效应器, 同时也具有 GTP 的水解酶活性, 影响  $\beta$  和  $\gamma$  亚基的活性, 因此, 在 G 蛋白相关信号途径中, G 蛋白  $\alpha$  亚基发挥重要的作用。本实验以拟南芥 G 蛋白  $\alpha$  亚基 GPA1 为诱饵, 通过泛素分离系统<sup>[19]</sup>筛选拟南芥 cDNA 文库, 获得一个 GPA1 的互作蛋白-铜离子结合蛋白 AtBCB, 对 GPA1 参与植物对铝胁迫的应答反应机制进行初步分析, 为阐明 G 蛋白途径在调控植物胁迫应答过程中的作用模式提供了新的线索。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 野生型拟南芥(Columbia 生态型, WT)由本实验室保存, 拟南芥 G 蛋白  $\alpha$  亚基 GPA1 (AT2G26300)突变体 *gpa1-4* 和 AtBCB (AT5G20230)的突变体 *bcb* 购于 *Arabidopsis* Biological Resource Center (ABRC)。

1.1.2 菌株和载体 酵母菌株 NMY51、pDHB1 质粒和 pPR3N 质粒购于 Dualsystems Biotech 公司, GFP、YFP<sup>N</sup> 和 YFP<sup>C</sup> 质粒以及拟南芥 cDNA 文库由本实验室保存。

1.1.3 试验试剂 限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购于 Promega 公司; X- $\alpha$ -gal 购于 Sigma 公司; 其他化学药品为国产分析纯试剂。引物合成和测序由北京三博远志生物技术有限责任公司完成。

### 1.2 利用泛素分离系统筛选拟南芥 cDNA 文库

通过 PCR 方法扩增 *GPA1* 的全长 CDS 序列, 并将其克隆到诱饵载体 pDHB1。泛素分离系统筛选文库的方法及酵母转化所用培养基的配制均按 Dualsystems Biotech 公司 hunter 系统操作说明书 (<http://www.dualsystems.com/>, P01601-P01629)。先将诱饵载体 pDHB1-GPA1-Cub 单独转入 NMY51 酵母细胞, 再将 cDNA 文库质粒转入含诱饵载体

pDHB1-GPA1-Cub 的酵母感受态细胞, 将转化产物涂于选择性平板 SD/-Trp-Leu-His-Ade (含  $1.5 \text{ mmol L}^{-1}$  3-AT)。挑取选择性平板上的单克隆重新点于含 X- $\alpha$ -gal 的选择性平板, 观察报告基因 *LacZ* 的表达活性。提取 3 个报告基因(*His*<sup>+</sup>、*Ade*<sup>+</sup>和 *LacZ*<sup>+</sup>)均为阳性的酵母单克隆质粒, 转入大肠杆菌 TOP10 (TIANGEN, 北京), 选取阳性克隆菌送至三博远志生物技术公司测序, 并对结果进行 Blast 比对分析。

### 1.3 利用泛素分离系统验证 GPA1 与 AtBCB 互作

对阳性克隆进行测序和 Blast 比对分析, 获得一个 GPA1 的互作蛋白 AtBCB。将 *AtBCB* 的全长 CDS 序列克隆到捕获载体 pPR3N。将诱饵载体 pDHB1-GPA1-Cub 和捕获载体 pPR3N-NubG-BCB 共同转化到 NMY51 酵母感受态细胞中, 分别涂于 SD/-Trp-Leu 和 SD/-Trp-Leu-His-Ade (含  $1.5 \text{ mmol L}^{-1}$  3-AT) 选择性平板,  $30^\circ\text{C}$  培养 3~5 d。从 SD/-Trp-Leu-His-Ade 选择性平板上挑取 3 个单克隆, 分别培养至 OD<sub>600</sub> 等于 0.6~0.8 后, 取  $1 \mu\text{L}$  点于含  $40 \text{ mg L}^{-1}$  的 X- $\alpha$ -gal 选择性平板 SD/-Trp-Leu-His-Ade (含  $1.5 \text{ mmol L}^{-1}$  3-AT), 观察报告基因 *LacZ* 的表达活性。同时设置对应的阴性对照试验。

### 1.4 GPA1 和 AtBCB 的亚细胞定位和双分子荧光互补(BiFC)

将 GPA1 和 AtBCB 与 GFP 融合表达, 构建 35S::GPA1-GFP 和 35S::BCB-GFP 亚细胞定位载体。将 GPA1 与 YFP<sup>N</sup>, AtBCB 与 YFP<sup>C</sup> 融合表达, 构建成 35S::GPA1-YFP<sup>N</sup>和 35S::BCB-YFP<sup>C</sup> 双分子荧光互补

表达载体。采用基因枪轰击法<sup>[20]</sup>将 35S::GFP 对照质粒、35S::GPA1-GFP 和 35S::BCB-GFP 单独转入洋葱表皮细胞; 将 35S::GPA1-YFP<sup>N</sup> 和 35S::BCB-YFP<sup>C</sup> 及阴性对照组合分别共同转化洋葱表皮细胞。 $25^\circ\text{C}$  黑暗培养 12~16 h 后于 Zeiss LSM700 激光共聚焦显微镜下观察。每个转化重复 3 次。

### 1.5 *gpa1-4* 和 *bcb* 纯合突变体鉴定

将订购的 *gpa1-4* 和 *bcb* 突变体种子分别用 75% 的酒精消毒处理 5 min, 用 0.5% 的次氯酸钠灭菌处理 10 min, 再用高压灭菌的蒸馏水洗涤 3 次。将无菌的种子在  $4^\circ\text{C}$ , 黑暗条件下春化 4 d。用牙签将春化后的种子点播在 MS 固体培养基上, 在培养室培养(16 h 光照/8 h 黑暗;  $22^\circ\text{C}$ ) 10 d 后, 将突变体的苗子移栽到装有营养土的花盆中培养至成熟。移栽 14 d 后, 取单株的叶片, 按照植物基因组 DNA 提取试剂盒(TIANGEN, 北京)的操作说明提取 DNA, 采用“三引物法”<sup>[21]</sup>进行纯合突变体的鉴定。利用 T-DNA Primer Design (<http://signal.salk.edu/tdnaprimers.2.html>)设计突变体鉴定引物(表 1)。取鉴定为纯合突变体的植株叶片, 按照植物总 RNA 提取试剂盒(TIANGEN, 北京)的操作说明书提取总 RNA, 采用 RT-PCR 的方法分析 *GPA1* 和 *AtBCB* 在 WT 和突变体中的表达情况。

### 1.6 *GPA1* 和 *AtBCB* 的表达分析

将 WT 的种子按照 1.5 的方法消毒处理和春化后, 按照改进的 Murphy 等<sup>[22]</sup>方法进行铝离子胁迫处理。将 5 层滤纸平铺于直径 15 cm 的培养皿中, 一层纱布平铺在五层滤纸上面, 向培养皿中加入适量 1/6 MS 液体培养基(MS 培养基的无机盐成分和

表 1 引物序列  
Table 1 Primer sequences

引物名称 Primer name	基因座位 Gene locus	正向引物 Forward primer (5'-3')	反向引物 Reverse primer (5'-3')
<i>AtBCZ</i> <sup>a</sup>	At5g20230	AGTTTCCACCGACTGATGTTG	TGATTCACGTCGATCAGACAC
<i>GPA1</i> <sup>a</sup>	At2g26300	TAAAGCTTCGTTTATGCAGCC	ATCGCTAAGTCTTTTGTCCCG
<i>LB</i>	—	ATTTTGCCGATTTTCGGAAC	—
<i>GPA1</i> <sup>b</sup>	At2g26300	GATACTGATGAGAATACACAGGCTGCTG	ATTGGCATGAATGACTGGAACATAGCTC
<i>AtBCB</i> <sup>b</sup>	At5g20230	TGATACGGAATGGACGAGACCTATGG	CTTCTGATACAACTGCCACATCATGCC
<i>ALMT1</i>	At1g08430	CGACAGTGGTGATTGGAGGAGTCAG	AAGTTAGAGGCAAGGAGAGAATGTAGATC
<i>ALS1</i>	At5g39040	TCGTAACGTAACAACCTGCGCTTATAGG	AGTCCTAGCTTCAGAGTCTCATCGAC
<i>ALS3</i>	At2g37330	TTCATGGTCTCTGTGCGCCGTTAC	CGTTGAGGAGGACGAGCAAGAAC
<i>ACTIN2/8</i>	At3g18780	GAAATCACAGCACTTGCACC	AAGCCTTTGATCTTGAGAGC

<sup>a</sup>: 突变体 *gpa1-4* 和 *bcb* 鉴定引物; <sup>b</sup>: RT-PCR 引物。

<sup>a</sup>: primers for identification of homozygous mutants of *gpa1-4* and *bcb*; <sup>b</sup>: RT-PCR primers.

B5 培养基的有机成分各稀释 6 倍), 待滤纸和纱布被营养液完全浸透后, 将春化后的种子用无菌牙签直接点播于纱布上, 将培养皿转移到培养室培养(16 h 光照/8 h 黑暗; 22℃)10 d, 将带有幼苗的纱布取出于含 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  的 1/6 MS 液体培养基(pH 4.0)中处理 10 h, 每 2 h 取一次根部样品, 提取 RNA, 并用相对定量 PCR 方法分析铝离子胁迫处理不同时间下 *GPA1* 和 *AtBCB* 在 WT 中的表达情况。

### 1.7 铝离子胁迫处理下丙二醛含量测定

将 WT、*gpa1-4* 和 *bcb* 的种子按照 1.6 的方法培养 10 d, 将带有幼苗的纱布取出在无菌蒸馏水中洗涤 3 次, 置含铝离子(终浓度为 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$ )和不含铝离子的 1/6 MS 液体培养基(pH 4.0)中处理 8 h 后, 测定根部丙二醛(MDA)含量<sup>[23]</sup>。

### 1.8 铝离子胁迫相关基因的变化

将 WT、*gpa1-4* 和 *bcb* 的种子按照 1.7 的方法用 100  $\mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  胁迫处理 8 h, 提取根部总 RNA。依照 cDNA 第一链合成试剂盒(TIANGEN, 北京)的操作说明, 取 5  $\mu\text{g}$  总 RNA 合成 cDNA 第一链, 将 cDNA 原液稀释 5 倍后作为模板待用。实时荧光定量 PCR 反应总体积为 20  $\mu\text{L}$ , 其中含 2  $\mu\text{L}$  稀释后的 cDNA 模板, 10  $\mu\text{mol L}^{-1}$  正反向引物(表 1)各 0.5  $\mu\text{L}$ , 2 $\times$ SuperReal PreMix Plus 10  $\mu\text{L}$  和 50 $\times$ Rox Reference Dye (TIANGEN, 北京) 1  $\mu\text{L}$ , 无 RNase ddH<sub>2</sub>O 6  $\mu\text{L}$ 。将配制好的 PCR 反应管置 ABI7500 荧光定量 PCR 仪上, 按照 95℃ 15 min, 95℃ 15 s, 60℃ 20 s, 72℃ 32 s, 共 40 个循环的程序进行 PCR。分别检测在铝离子处理和不处理情况下, WT、*gpa1-4* 和 *bcb* 材料中铝离子胁迫下相关基因的表达情况。

## 2 结果与分析

### 2.1 利用泛素分离系统筛选 GPA1 的互作蛋白

采用泛素分离系统筛选拟南芥 cDNA 文库, 获得一个阳性克隆, 测序和 NCBI blast 比对分析结果显示, 该基因为 *AtBCB* (AT5G20230)。用 *GPA1* 和 *AtBCB* 的基因全长进行酵母双杂互作验证(图1)发现, *GPA1*-Cub 和 NubG-BCB 以及相对应的对照分别共转化 NMY51 酵母感受态细胞后, 均可在缺陷型(SD/-Trp-Leu)培养基上正常生长, 只有 *GPA1*-Cub 和 NubG-BCB 可在含有 X- $\alpha$ -gal 的缺陷型(SD/-Trp-Leu-His-Ade+1.5 mmol L<sup>-1</sup> 3-AT)培养基上正常生长并显蓝, 其余的对照组均不能生长

(图1), 说明转入 *GPA1*-Cub 与 NubG-BCB, 使 3 个报告基因(His<sup>+</sup>Ade<sup>+</sup>LacZ<sup>+</sup>)均正常表达, *GPA1* 和 *AtBCB* 二者存在相互作用。有研究<sup>[24-25]</sup>表明, *AtBCB* 含有一个铜离子结合结构域, 并受铝离子胁迫的诱导表达。

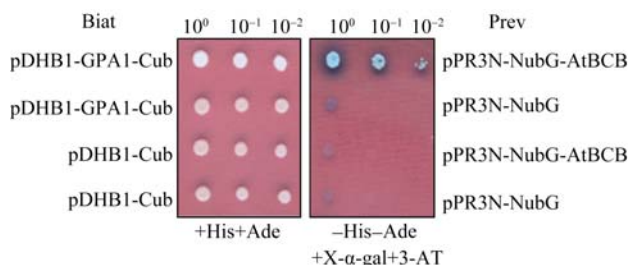


图 1 用泛素分离系统验证 GPA1 与 AtBCB 的相互作用

Fig. 1 Identification of interaction of GPA1 and AtBCB by split-ubiquitin system

*GPA1*-Cub 和 *AtBCB*-NubG 及阴性对照共转化酵母感受态细胞, 左图为 SD/-Trp-Leu 选择性培养基生长结果; 右图为 SD/-Trp-Leu-His-Ade+1.5 mmol L<sup>-1</sup> 3-AT+40 mg L<sup>-1</sup> X- $\alpha$ -gal 选择性培养基生长结果。10<sup>0</sup>, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup> 代表不同的稀释浓度。

*GPA1*-Cub and *AtBCB*-NubG were co-transformed into yeast competent cells. Left: yeasts grown on SD/-Trp-Leu; Right: yeasts grown on SD/-Trp-Leu-His-Ade+1.5 mmol L<sup>-1</sup> 3-AT+40 mg L<sup>-1</sup> X- $\alpha$ -gal. 10<sup>0</sup>, 10<sup>-1</sup>, 10<sup>-2</sup>: different concentration gradients.

### 2.2 GPA1 与 AtBC 的亚细胞定位及双分子荧光互补

利用生物信息学数据库(SoftBerry, <http://linux1.softberry.com/berry.phtml>)预测 *GPA1* 和 *AtBCB* 在细胞中的定位显示, 二者均定位于细胞膜上(*AtBCB* score 6.3; *GPA1* score 5.9)。在激光共聚焦显微镜下观察 35S::GPA1-GFP 和 35S::BCB-GFP 的亚细胞定位, 发现只转化对照质粒 35S::GFP 的细胞(图2-A), 绿色荧光分布于洋葱表皮细胞的细胞膜、细胞质及细胞核中。分别转化 35S::GPA1-GFP (图2-B)和 35S::BCB-GFP (图2-C)融合蛋白的洋葱表皮细胞, 均只在细胞膜上观察到绿色荧光, 说明 *GPA1* 与 *AtBCB* 二者均分布于细胞膜上, 与软件预测和文献报道结果一致<sup>[26]</sup>。35S::GPA1-YFP<sup>N</sup>和 35S::BCB-FP<sup>C</sup> 共轰击洋葱表皮细胞后, 在细胞膜上观察到强烈的黄色荧光(图2-F), 说明 *GPA1* 与 *BCB* 在细胞膜上发生了相互作用, 这与 *GPA1* 和 *AtBCB* 都定位于细胞膜上相一致。

### 2.3 纯合突变体的鉴定

提取突变体单株叶片的 DNA, 用“三引物法”鉴定纯合突变体(图3-A, B)。其中, WT 中只能用

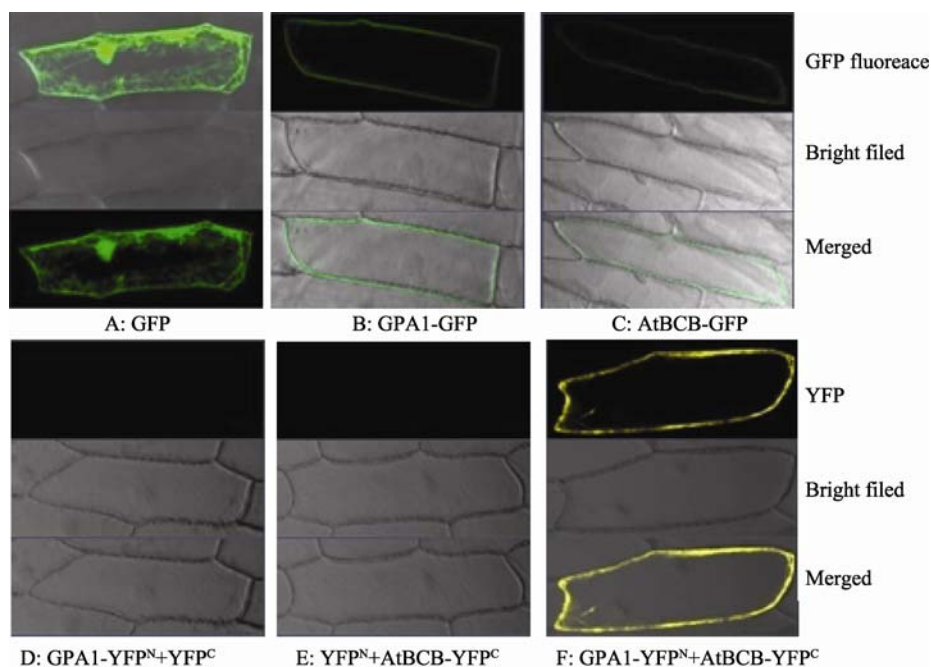


图 2 GPA1 与 AtBCB 的亚细胞定位及双分子荧光互补

Fig. 2 Subcellular localization and bimolecular fluorescence complementation (BiFC) of GPA1 and AtBCB

A: GFP 质粒对照; B 和 C: 分别为 GPA1 和 AtBCB 的亚细胞定位; D 和 E: BiFC 的阴性对照; F: GPA1 和 AtBCB 的互作验证。

A is GFP control; B and C are subcellular localization of GPA1 and AtBCB, respectively; D and E are negative controls of BiFC; F is BiFC result between GPA1 and AtBCB.

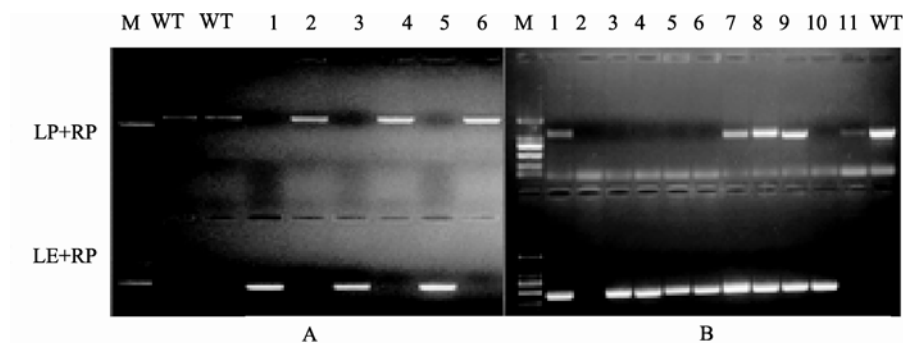


图 3 突变体纯合体鉴定

Fig. 3 Identification of homozygous mutants

A: *bcb* 纯合体鉴定; B: *gpa1-4* 纯合体鉴定; M 为 DL2000; LP 和 RP 为扩增目的基因的正反向引物; LB 为 T-DNA 插入的左边界引物; WT 为野生型, 其余为突变体。

A: verification of *gpa1-4* homozygous mutant; B: verification of *bcb* homozygous mutant; M: DL2000; LP and RP: forward and reverse primer of target genes; LB: left border primer of the T-DNA insertion; WT: wild type and others are mutants.

LP+RP 扩增出一条特异条带; 纯合突变体只能用 LB+RP 扩增出一条特异条带; 杂合突变体用 LP+RP 和 LB+RP 可分别扩增出一条特异条带。鉴定结果显示, *gpa1-4* 中共有 5 株为纯合突变体; *bcb* 中共有 3 株为纯合突变体。对鉴定为纯合突变体的植株进行 RT-PCR 分析(图 4), 结果显示, *gpa1-4* 和 *bcb* 纯合突变体中, *GPA1* 和 *AtBCB* 的转录受到抑制, 基因功能缺失。



图 4 GPA1 和 AtBCB 在突变体和 WT 中的表达分析

Fig. 4 RT-PCR analysis expression of GPA1 and AtBCB in WT and mutants

WT: 野生型; *gpa1-4*: GPA1 突变体; *bcb*: AtBCB 突变体; *Actin2/8* 基因为内标。

WT: wild type; *gpa1-4*: GPA1 mutant; *bcb*: AtBCB mutant; *Actin2/8*: internal standard.

## 2.4 铝胁迫下 *GPA1* 和 *AtBCB* 的表达

对于 WT, 随着铝处理时间的延长, *GPA1* 和 *AtBCB* 的表达量均上升, 在 8 h 达到最高值。在铝诱导下, *AtBCB* 的表达量在不同时间点均比 *GPA1* 高。*GPA1* 和 *AtBCB* 参与了植物对铝的应答反应 (图 5)。

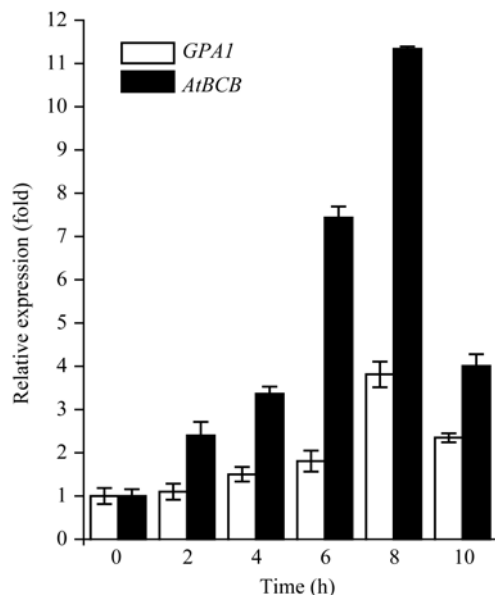


图 5 铝胁迫下 *GPA1* 和 *AtBCB* 的表达

Fig. 5 Relative expression level of *GPA1* and *AtBCB*  
*GPA1* 和 *AtBCB* 的表达倍数以 WT 未作铝处理时的值为基准计算。

The fold change of *GPA1* and *AtBCB* are relative value to the expression level of WT without aluminum treatment.

## 2.5 铝离子胁迫下膜脂过氧化程度

植物在受到金属铝胁迫时, 根的生长会受到抑制<sup>[27]</sup>, 根部细胞膜受损, 发生过氧化反应<sup>[28-29]</sup>。为了检测 WT、*gpa1-4* 和 *bcbl* 在受到铝离子毒害时, 根部细胞的质膜受损程度, 对这三种材料分别进行  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  胁迫处理后, 测定其根部丙二醛的含量, 丙二醛含量越高证明植物细胞受损越严重。在铝处理下, WT、*gpa1-4* 和 *bcbl* 三种材料根部的丙二醛含量均比没有铝处理时高。在没有铝时, 三种材料间根部的丙二醛含量没有差异; 在铝处理下, *gpa1-4* 根部的丙二醛含量比 WT 低 ( $P < 0.05$ ); *bcbl* 根部丙二醛含量比 WT 高 ( $P < 0.01$ ) (图 6)。说明在  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  处理下, 与 WT 相比, 突变体 *gpa1-4* 受铝离子的毒害作用小于 WT, 而突变体 *bcbl* 受铝离子的毒害作用大于 WT。

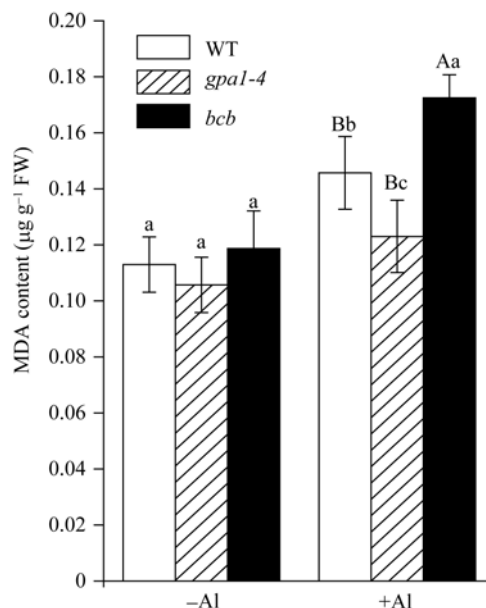


图 6 WT、*gpa1-4* 和 *bcbl* 根部丙二醛含量

Fig. 6 MDA content in whole root region of WT, *gpa1-4*, or *bcbl* lines

-Al 代表不用铝处理; +Al 代表用  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  处理 8 h。标以不同小写字母的柱值差异显著 ( $P < 0.05$ ); 标以不同大写字母的柱值差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

-Al and +Al represent without  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  treatment or with  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  treatment for 8 hours, respectively. Bars superscribed by different lowercase letters are significantly different at  $P < 0.05$  and those by different capital letters are significantly different at  $P < 0.01$ .

## 2.6 铝离子胁迫下相关基因表达变化

研究表明, 拟南芥苹果酸转运体蛋白 ALMT1, 半类型 ABC 转运蛋白 ALS1 和 ABC 转运蛋白 ALS3 对拟南芥耐受铝离子毒害具有重要作用<sup>[30-32]</sup>。本研究用  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  对 WT、*gpa1-4* 和 *bcbl* 三种材料进行处理, 采用相对定量 PCR 法检测 ALMT1、ALS1 和 ALS3 的在 3 种拟南芥材料中表达的变化 (图 7、图 8 和图 9)。结果显示, 在铝胁迫处理下, ALMT1 在 3 种材料中的表达量均有所提高, 其中, ALMT1 在 *gpa1-4* 中的表达量比 WT 高 ( $P < 0.01$ ); 在 *bcbl* 中的表达量比 WT 低 ( $P < 0.05$ ) (图 7)。在有铝和无铝情况下, ALS1 和 ALS3 的表达量在 3 种材料间均无显著差异 (图 8 和图 9)。

## 3 讨论

G 蛋白复合体介导的细胞信号传导是真核生物中最保守的信号传导机制之一<sup>[33]</sup>, 筛选拟南芥 G 蛋白  $\alpha$  亚基 GPA1 的互作蛋白有助于更好地理解胞外到胞内的信号传导过程。利用经典的酵母双杂交系统 (GAL4 系统或者 LexA 系统) 筛选文库, 通常筛选



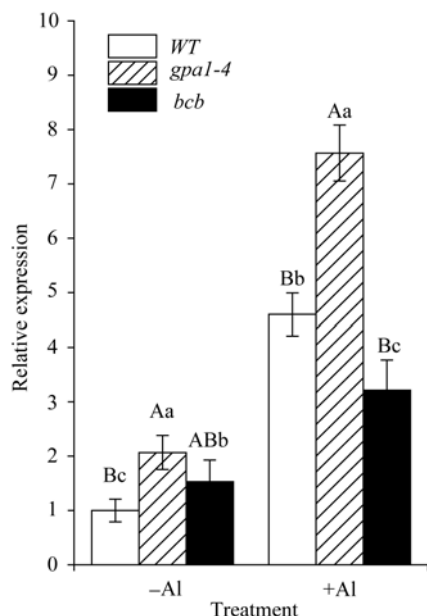


图7 *ALMT1* 在铝胁迫下的相对表达量

**Fig. 7 Relative expression level of *ALMT1* under aluminum stress**  
目标基因的表达倍数是以 WT 在不加铝时为基准计算。-Al 表示不加铝处理; +Al 表示用  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  处理 8 h。标以不同小写字母的柱值差异显著 ( $P < 0.05$ ); 标以不同大写字母的柱值差异极显著 ( $P < 0.01$ )。

The expression fold of the target genes is relative to the expression level of WT without Al treatment. -Al and +Al represent without  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  treatment or with  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  treatment for 8 hours. Bars superscribed by different lowercase letters are significantly different at  $P < 0.05$  and those by different capital letters are significantly different at  $P < 0.01$ .

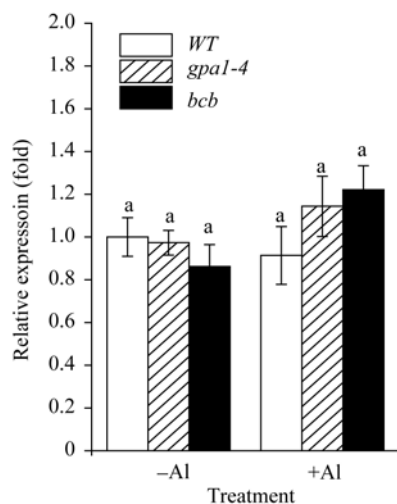


图8 *ALS1* 在铝胁迫下的相对表达量

**Fig. 8 Relative expression level of *ALS1* under aluminum stress**

目标基因的表达倍数是以 WT 在不加铝处理时为基准计算。-Al 表示不加铝处理; +Al 表示用  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  处理 8 h。小写字母 a 表示差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

The expression fold change of the target genes is relative to the expression level of WT without Al treatment. -Al and +Al represent without  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  treatment or with  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  treatment for 8 hours. Bars superscribed by different lowercase letters are significantly different at  $P < 0.05$ .

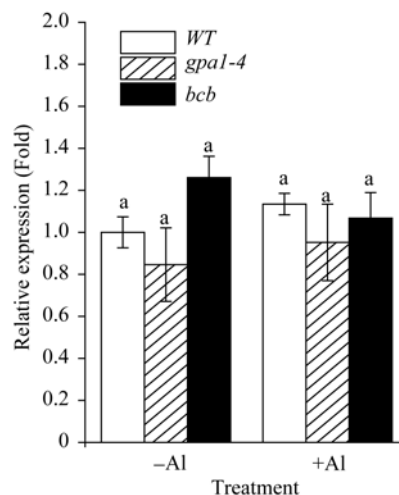


图9 *ALS3* 在铝胁迫下的相对表达量

**Fig. 9 Relative expression level of *ALS3* under aluminum stress**

目标基因的表达倍数是以 WT 在不加铝时为基准计算。-Al 表示不加铝处理; +Al 表示用  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  处理 8 h。

小写字母 a 表示差异不显著 ( $P > 0.05$ )。

The expression fold change of the target genes is relative to the expression level of WT without Al treatment. -Al and +Al represent without  $100 \mu\text{mol L}^{-1}$   $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  treatment or with  $\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  treatment for 8 hours. Bars superscribed by different lowercase letters are significantly different at  $P < 0.05$ .

到的都是在细胞核中具有相互作用的蛋白,对筛选膜蛋白的互作蛋白具有一定的局限性。本研究通过膜蛋白筛选系统-泛素分离系统筛选拟南芥 cDNA 文库并对阳性克隆进行验证,发现 GPA1 与 AtBCB 存在相互作用(图1)。对该互作的 BiFC 验证确认二者在细胞膜上发生相互作用(图2-D),这与二者的亚细胞定位结果一致(图2-B, C)。Van 等<sup>[24]</sup>对 AtBCB 的氨基酸序列分析发现,其 N 端的 23 个氨基酸包含大量疏水性残基,可形成一个  $\alpha$  螺旋结构;C 端的 20 个疏水性残基可形成一个  $\beta$  折叠层结构;铜离子结合区域(24~127 氨基酸)为核心区域,总共 104 个氨基酸,该区域与拟南芥质体蓝素蛋白的铜离子结合区的氨基酸序列同源性较高,其中与铜离子直接结合的氨基酸残基(His<sup>50</sup>、Cys<sup>115</sup>和 His<sup>120</sup>)保持一致;在核心区域与 C 端间为脯氨酸富集区(128~176 氨基酸),该区域仅含 7 种氨基酸,除 Asp<sup>174</sup>外,均为非极性氨基酸。Adman 等<sup>[34]</sup>对铜离子结合蛋白进行 X 晶体衍射分析,发现这类蛋白可作为电子载体参与多种途径。GPA1 可能是通过与 AtBCB 互作,影响 AtBCB 的电子载体活性,从而调控 AtBCB 相关的信号过程。

Richards 等<sup>[25]</sup>研究发现,AtBCB 受铝离子的诱导表达,且在铝处理下,与氧化胁迫相关的 *GST*、*PER*

和 *CAB* 等基因的表达量也呈上升趋势。本研究中, 野生型拟南芥在经过  $100 \mu\text{mol L}^{-1} \text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  处理后, *GPA1* 和 *AtBCB* 的表达量上升(图 5), 说明 *GPA1* 和 *AtBCB* 均参与了植物对铝的应答过程。用铝处理 *AtBCB* 过表达植株, 其根部 MDA 的含量明显低于 WT 对照植株<sup>[26,29]</sup>, 表明 *AtBCB* 参与了铝离子胁迫对植物体造成的氧化胁迫应答。Joo 等<sup>[35]</sup>将 WT 和 *gpa1-4* 置  $700 \times 10^{-9}$  臭氧环境中 3 h 后, 转入正常生长环境培养 24 h, 发现 WT 的叶片上出现明显的受臭氧氧化损伤的斑块, 而 *gpa1-4* 的叶片上未见明显的损伤, 这表明突变体 *gpa1-4* 在抵抗氧化胁迫方面比 WT 强。本研究中, WT、*gpa1-4* 和 *bcb* 三种材料对  $100 \mu\text{mol L}^{-1} \text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  的耐受能力不同, *gpa1-4* 细胞膜受损程度较低, 其根部 MDA 含量比 WT 和 *bcb* 低; 而 *bcb* 根部的 MDA 含量最高, 细胞膜受损严重(图 6), 说明在拟南芥对铝的耐受作用中, *GPA1* 起负向作用; *AtBCB* 起正向作用。

目前, 关于植物抵抗铝毒害的作用机制尚不清楚, 但有研究表明, 苹果酸转运体基因 *ALMT1* 的突变体在  $500 \mu\text{mol L}^{-1} \text{AlCl}_3$  处理下, 根部出现明显的生长抑制现象<sup>[30]</sup>; 转小麦 *ALMT1* 基因的大麦植株不论是在 pH 4.0 的营养液还是酸性土壤中, 对铝的耐受性均明显提高<sup>[36]</sup>。在本研究中, 用  $100 \mu\text{mol L}^{-1} \text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$  处理 WT、*gpa1-4* 和 *bcb*, 3 种材料中 *ALMT1* 的表达水平具有显著差异(图 7)。在 *gpa1-4* 中, 由于 *ALMT1* 的表达量较高, *ALMT1* 可转运更多的苹果酸螯合铝离子, 降低铝对植物的毒害, 从而使 *gpa1-4* 受铝毒害作用小, 根部细胞膜的过氧化损伤程度较小, 丙二醛含量较低; 与此相反, *bcb* 中 *ALMT1* 的表达量在 3 种材料中较低, 受铝毒害作用较大, 根部丙二醛的含量较高(图 6), *GPA1* 和 *AtBCB* 参与拟南芥对铝的应答反应, 可能是通过间接地调控 *ALMT1* 的转录来发挥作用。Larsen 等<sup>[32,37]</sup>发现, 突变体 *als3* 和 *als1* 在  $25 \mu\text{mol L}^{-1} \text{AlCl}_3$  处理下, 根的生长均受抑制, 但根部铝的积累总量无明显差异。在 *als3* 中铝主要积累在根尖; 在 WT 中铝从根尖到根成熟区都有积累<sup>[31]</sup>。本研究中, 有铝或无铝情况下, *ALS1* 和 *ALS3* 在 WT、*gpa1-4* 和 *bcb* 三者中的表达量均无明显差异(图 8 和图 9), 这表明 *GPA1* 和 *AtBCB* 不是通过影响铝在植物体内的再分布来应答铝的胁迫。

此外, 通常都是将植物置酸性(pH 4.0)环境下来研究植物对铝胁迫的耐受性, Iuchi 等<sup>[38]</sup>发现, 拟南

芥中对酸性环境的应答有关键作用的转录因子 STOP1 也参与植物对铝的应答过程, 并调控 *ALMT1* 的转录水平。本研究中, 在无铝处理时, *ALMT1* 在 3 种材料中的表达也有差异(图 7), 推测可能是受酸性(pH 4.0)培养环境的影响。Van 等<sup>[24]</sup>发现, 将拟南芥黑暗处理 48 h 后, *AtBCB* 的表达量显著升高。Xia 等<sup>[39]</sup>在水稻中已经发现了一个铝的转运体基因 *Nrat1*。*GPA1* 和 *AtBCB* 的互作是否影响植物对酸性环境的应答和光信号的传递, 以及拟南芥中是否存在铝的转运体尚有待进一步研究。

## 4 结论

*GPA1* 与 *AtBCB* 定位于细胞膜上, 并在细胞膜上发生直接的相互作用。植物对铝胁迫的耐受作用中, *GPA1* 起负向作用, *AtBCB* 起正向作用。对铝胁迫应答有重要作用的基因 *AtALMT1*, 其转录受 *GPA1* 负调控; 受 *AtBCB* 正调控。植物通过细胞膜上的 G 蛋白  $\alpha$  亚基 *GPA1* 和铜离子结合蛋白 *AtBCB* 的相互作用影响了下游基因苹果酸转运体基因 *AtALMT1* 的表达, 调控植物对铝胁迫的响应。

## References

- [1] Chakravorty D, Trusov Y, Zhang W, Acharya B R, Sheahan M B, McCurdy D W, Assmann S M, Botella J R. An atypical heterotrimeric G-protein gamma-subunit is involved in guard cell  $\text{K}^+$ -channel regulation and morphological development in *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 2011, 67: 840–851
- [2] Warpeha K M, Upadhyay S, Yeh J, Adamiak J, Hawkins S I, Lapik Y R, Anderson M B, Kaufman L S. The GCR1, GPA1, PRN1, NF-Y signal chain mediates both blue light and abscisic acid responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 2007, 143: 1590–1600
- [3] Botto J F, Ibarra S, Jones A M. The heterotrimeric G-protein complex modulates light sensitivity in *Arabidopsis thaliana* seed germination. *Photochem Photobiol*, 2009, 85: 949–954
- [4] Fox A R, Soto G C, Jones A M, Casal J J, Muschietti J P, Mazzella M A. Cry1 and GPA1 signaling genetically interact in hook opening and anthocyanin synthesis in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 2012, 80: 315–324
- [5] Wang X Q, Ullah H, Jones A M, Assmann S M. G protein regulation of ion channels and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* guard cells. *Science*, 2001, 292: 2070–2072
- [6] Mudgil Y, Uhrig J F, Zhou J, Temple B, Jiang K, Jones A M. *Arabidopsis* N-MYC downregulated-like 1, a positive regulator



- of auxin transport in a G protein-mediated pathway. *Plant Cell*, 2009, 21: 3591–3609
- [7] Huang J, Taylor J P, Chen J G, Uhrig J F, Schnell D J, Nakagawa T, Korth K L, Jones A M. The plastid protein thylakoid formation 1 and the plasma membrane G-protein GPA1 interact in a novel sugar-signaling mechanism in Arabidopsis. *Plant Cell*, 2006, 18: 1226–1238
- [8] Assmann S M, Fan L M, Zhang W, Chen J G, Taylor J P, Jones A M. Absciscic acid regulation of guard-cell  $K^+$  and anion channels in G beta- and RGS-deficient Arabidopsis lines. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105: 8476–8481
- [9] Llorente F, Blanco C A, Rodriguez C S, Jorda L, Molina A. ERECTA receptor-like kinase and heterotrimeric G protein from Arabidopsis are required for resistance to the necrotrophic fungus *Plectosphaerella cucumerina*. *Plant J*, 2005, 43: 165–180
- [10] Lapid Y R, Kaufman L S. The Arabidopsis cupin domain protein AtPirin1 interacts with the G protein alpha subunit GPA1 and regulates seed germination and early seedling development. *Sci STKE*, 2003, 15: 1578–1590
- [11] Assmann S M, Pandey S. The Arabidopsis putative G protein-coupled receptor GCR1 interacts with the G protein alpha subunit GPA1 and regulates abscisic acid signaling. *Plant Cell*, 2004, 16: 1616–1632
- [12] Zhao J, Wang X. Arabidopsis phospholipase D alpha 1 interacts with the heterotrimeric G-protein alpha-subunit through a motif analogous to the DRY motif in G-protein-coupled receptors. *Sci Signal*, 2004, 279: 1794–1800
- [13] Broder Y C, Katz S, Aronheim A. The ras recruitment system, a novel approach to the study of protein–protein interactions. *Curr Biol*, 1998, 8: 1121–1130
- [14] Hubsman M, Yudkovsky G, Aronheim A. A novel approach for the identification of protein–protein interaction with integral membrane proteins. *Nucl Acids Res*, 2001, 29: e18
- [15] Yuan G-L(苑国良). Characterizing Arabidopsis G Protein Interactors by Reverse Ras Recruitment System. PhD Dissertation of Shandong Agricultural University, 2009 (in Chinese with English abstract)
- [16] Kaufman L S, Warpeha K M, Gibbons J, Carol A, Slusser J, Tree R, Durham W. Adequate phenylalanine synthesis mediated by G protein is critical for protection from UV radiation damage in young etiolated *Arabidopsis thaliana* seedlings. *Plant Cell Environ*, 2008, 31: 1756–1770
- [17] Friedman E J, Wang H X, Jiang K, Perovic I, Deshpande A, Pochapsky T C, Temple B R S, Hicks S N, Harden T K, Jones A M. Aci-reduction dioxygenase1 (ARD1) is an effector of the heterotrimeric G protein beta subunit in Arabidopsis. *J Biol Chem*, 2011, 286: 30107–30118
- [18] Tsugama D, Liu H, Liu S, Takano T. Arabidopsis heterotrimeric G protein  $\beta$  subunit interacts with a plasma membrane 2C-type protein phosphatase, PP2C52. *Biochim Biophys Acta (BBA)-Mol Cell Res*, 2012: 2254–2260
- [19] Stagljar I, Korostensky C, Johnsson N, te Heesen S. A genetic system based on split-ubiquitin for the analysis of interactions between membrane proteins *in vivo*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 5187–5192
- [20] Takumi S, Otani M, Shimada T. Effect of six promoter-intron combinations on transient reporter gene expression in einkorn, emmer and common wheat cells by particle bombardment. *Plant Sci*, 1994, 103: 161–166
- [21] Li M(李敏), Yang S(杨双), Ruan Y-Y(阮燕晔), Fan J-J(樊金娟), Zhang L-J(张立军). PCR identification Arabidopsis T-DNA mutant of *atsuc3*. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), 2006, 42(1): 91–94 (in Chinese)
- [22] Murphy A, Taiz L. A new vertical mesh transfer technique for metal-tolerance studies in Arabidopsis–ecotypic variation and copper-sensitive mutants. *Plant Physiol*, 1995, 108: 29–38
- [23] Ono K, Yamamoto Y, Hachiya A, Matsumoto H. Synergistic inhibition of growth by aluminum and iron of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) cells in suspension culture. *Plant Cell Physiol*, 1995, 36: 115–125
- [24] Van Gysel A, Van Montagu M, Inzé D. A negatively light-regulated gene from *Arabidopsis thaliana* encodes a protein showing high similarity to blue copper-binding proteins. *Gene*, 1993, 136: 79–85
- [25] Richards K D, Schott E J, Sharma Y K, Davis K R, Gardner R C. Aluminum induces oxidative stress genes in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 1998, 116: 409–418
- [26] Ezaki B, Sasaki K, Matsumoto H, Nakashima S. Functions of two genes in aluminium (Al) stress resistance: repression of oxidative damage by the AtBCB gene and promotion of efflux of Al ions by the *NtGDII* gene. *J Exp Bot*, 2005, 56: 2661–2671
- [27] Kochian L V. Cellular mechanisms of aluminum toxicity and resistance in plants. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1995, 46: 237–260
- [28] Ezaki B, Gardner R C, Ezaki Y, Matsumoto H. Expression of aluminum-induced genes in transgenic Arabidopsis plants can ameliorate aluminum stress and/or oxidative stress. *Plant Physiol*, 2000, 122: 657–666
- [29] Ezaki B, Katsuhara M, Kawamura M, Matsumoto H. Different mechanisms of four aluminum (Al)-resistant transgenes for Al

- toxicity in Arabidopsis. *Plant Physiol*, 2001, 127: 918–927
- [30] Hoekenga O A, Maron L G, Piñeros M A, Cançado G M, Shaff J, Kobayashi Y, Ryan P R, Dong B, Delhaize E, Sasaki T. AtALMT1, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in Arabidopsis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2006, 103: 9738–9743
- [31] Larsen P B, Geisler M J, Jones C A, Williams K M, Cancel J D. ALS3 encodes a phloem-localized ABC transporter-like protein that is required for aluminum tolerance in Arabidopsis. *Plant J*, 2004, 41: 353–363
- [32] Larsen P B, Cancel J, Rounds M, Ochoa V. Arabidopsis ALS1 encodes a root tip and stele localized half type ABC transporter required for root growth in an aluminum toxic environment. *Planta*, 2007, 225: 1447–1458
- [33] Hamm H E. The many faces of G protein signaling. *J Biol Chem*, 1998, 273: 669–672
- [34] Adman E T. Structure and function of copper-containing proteins. *Curr Opin Struct Biol*, 1991, 1: 895–904
- [35] Joo J H, Wang S, Chen J, Jones A, Fedoroff N V. Different signaling and cell death roles of heterotrimeric G protein  $\alpha$  and  $\beta$  subunits in the Arabidopsis oxidative stress response to ozone. *Plant Cell*, 2005, 17: 957–970
- [36] Delhaize E, Ryan P R, Hebb D M, Yamamoto Y, Sasaki T, Matsumoto H. Engineering high-level aluminum tolerance in barley with the ALMT1 gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 15249–15254
- [37] Larsen P B, Degenhardt J, Tai C Y, Stenzler L M, Howell S H, Kochian L V. Aluminum-resistant Arabidopsis mutants that exhibit altered patterns of aluminum accumulation and organic acid release from roots. *Plant Physiol*, 1998, 117: 9–17
- [38] Iuchi S, Koyama H, Iuchi A, Kobayashi Y, Kitabayashi S, Kobayashi Y, Ikka T, Hirayama T, Shinozaki K, Kobayashi M. Zinc finger protein STOP1 is critical for proton tolerance in Arabidopsis and coregulates a key gene in aluminum tolerance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104: 9900–9905
- [39] Xia J, Yamaji N, Kasai T, Ma J F. Plasma membrane-localized transporter for aluminum in rice. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2010, 107: 18381–18385