

项目编号:

“筹政基金”

大学生见习研修计划申请书

课题名称: 拟南芥种子中特异表达的

AtPARP3 蛋白的多聚 ADP-核糖化作用活性的检测

申请人: 陈威

院 系: 生命科学院

指导教师: 葛晓春

填表日期: 2014/3/12

复旦大学教务处制表

填写说明

1. 填写本申请书之前请先完成网上申请。网上信息不全者，不作评审。
2. 本申请书由申请人自行下载填写，请在填写之前阅读附件《致学生函》和《FDUROP 著政项目日历》，同时请指导教师（以下简称导师）阅读《致导师函》。
3. “申请人信息”及“导师信息”须填写完整。填写后须经导师过目。此部分信息不全者，不作评审。

FDUROP 尊重并保护导师及学生的个人隐私，不会公布除工作需要以外的个人信息。

4. 纸质版申请书的“个人声明”处应有学生本人手写签名，“导师推荐意见”由申请人导师填写。“推荐专家意见”由导师以外的一位具有副教授以上职称的教师填写。此两项必须手写完成。其余部分可电子文本录入。
5. 申请人须阅读《FDUROP 项目财务制度》，并填写《FDUROP 课题预算表》。《FDUROP 课题财务日志》在正式立项后开始填写。
6. 本申请书电子版（WORD 文档）发送至 fdurop@fudan.edu.cn，纸质版一式二份（原件和复印件），及本人成绩单（由院系教务员打印，并复印一份），交至**本部综合楼 221 室**信箱（**此页说明及所有附件不交!**）。申请书递交时间为 2014 年春季学期第 3 周。

- 附件：**
1. 致学生函
 2. 致导师函
 3. FDUROP 著政项目日历
 4. **FDUROP 项目财务制度**

联系我们：

电子邮箱：fdurop@fudan.edu.cn

FDUROP 网站：<http://www.fdurop.fudan.edu.cn/>

论坛：<http://bbs.fudan.edu.cn/>日月光华站 FDUROP 版

人人网公共主页：复旦 FDUROP

新浪微博：复旦著政望道

二、 导师信息

注：1. 以上内容需请导师过目并确认无误。

2. 页面不足可加页填写。

姓名	葛晓春	工号	22739
出生年月	1970年9月	职称	PI 副教授
单位	复旦大学生物化学与分子生物学系		
办公室电话	021-65643672	手机	13918508698
电子邮箱	xcge@fudan.edu.cn		
个人主页（或个人介绍网页链接）	http://life.fudan.edu.cn/s/84/t/296/3f/0b/info16139.htm		
导师简介 （包括研究方向、成果、论文等）	<p>主要研究方向：生物化学与植物分子生物学。拟南芥与水稻中抗环境胁迫相关蛋白质的功能研究及环境因素胁迫下的植物生殖发育研究拟南芥及水稻中抗生物胁迫及非生物胁迫信号途径中相关蛋白质的功能；分离鉴定植物中与 ADP 核糖修饰作用相关的蛋白质及研究 ADP 核糖化对蛋白质功能的调节作用；干旱胁迫影响作物产量的机制。</p> <p>2001 年至今，先后主持国家自然科学基金项目面上项目 4 项，2005 年荣获教育部留学人员基金；2006 年获上海市上海市浦江人才计划资助，目前主持国家自然科学基金 2 项，还承担科技部国家重大转基因项目两个子项目的工作任务。出版译著《蛋白质结构与功能入门》（主编）及《植物生理学》（参编）两部。在同领域有影响的国际刊物上以第一作者或通讯作者身份发表文章数十篇。</p>		
导师所在实验室/教研室/课题组介绍	课题组现有一名副教授，一名科研助理，两名博士，四名研究生和一名本科生。		
简述选择该导师的理由	葛老师拥有扎实的学术功底和丰富的实验经验，在生物化学和植物分子生物学研究领域发表过多篇影响因子较高的论文；其课题组进行植物抵抗逆境胁迫的相关蛋白质的功能和机理的研究，这也正是我非常感兴趣的。葛老师能对我的实验和研究思路给予非常细致的指导，这对我的学习和科学研究都有着非常大的帮助。		

三、 课题开题报告

一. 课题的目的和意义

多聚 ADP-核糖化作用是一种翻译后蛋白修饰作用，通过多聚 ADP-核糖聚合酶（PARP）的催化，不断地将底物 NAD⁺的 ADP-核糖基团转移到靶蛋白上，最终在靶蛋白上形成多聚 ADP-核糖（PAR），这一修饰作用广泛存在于除少数酵母以外的所有真核生物中，与 DNA 修复、转录调控等众多生物学过程有关。AtPARP3 是存在于拟南芥中的一个植物特异性的 PARP 蛋白，为拟南芥中存在的 PARP 蛋白家族三个成员之一（其他两个成员分别为 AtPARP1 和 AtPARP2），仅在种子中表达，但目前对其生理生化功能了解较少。本研究旨在通过体内体外检测 AtPARP3 的多聚 ADP 核糖化作用的活性来确定该蛋白是否具有相应的酶活性，研究结果将为深入研究 AtPARP3 在 NAD⁺代谢过程中的作用及利用拟南芥的 PARP 三突变体来研究 DNA 修复及植物细胞死亡调控机制提供基础。

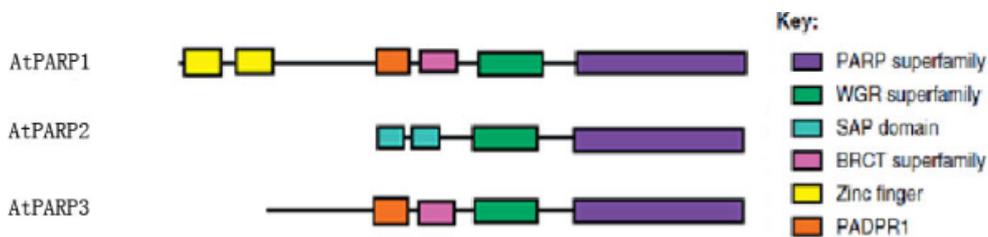
二. 课题研究现状

动物中对 PARP 的研究起步较早。目前发现人类中 PARP 蛋白家族有 17 个成员，参与 DNA 修复，染色质结构重塑，基因转录调节，细胞分裂，细胞凋亡等细胞生物学过程^[1,2]。这些成员均具有 PARP 催化结构域，但不是所有成员都具有聚 ADP-核糖化活性，如 HsPARP9 和 HsPARP13 就不具有酶活性^[3,4]。人类中 HsPARP1, HsPARP2, HsPARP3 被发现涉及 DNA 损伤反应的修复过程^[5]，这些蛋白均拥有依赖 DNA 的聚 ADP-核糖化作用的活性且能以自身为底物进行修饰^[6,7,8]。

在植物中对 PARP 的研究起步较晚，了解也相对较少。在模式植物拟南芥中，只发现了三种 PARP 蛋白，AtPARP1, AtPARP2, AtPARP3，这三个蛋白的相对分子量分别为 111.2kDa, 72.2kDa, 91.4kDa。拟南芥中的 AtPARP1 和 AtPARP2 与哺乳动物中 PARP 蛋白在氨基酸序列上具有高度相似性，表明它们在功能上可能与动物中的相似。我们实验室之前已经确认这两个蛋白均具有依赖 DNA 的聚 ADP-核糖化的活性，且均受基因毒剂（DNA 断裂剂）的诱导，同时 AtPARP1、AtPARP2 均具有自我修饰的活性，会导致其泳动率发生变化，从而可通过 SDS-PAGE 电泳检测出来，但 AtPARP3 是否具有此活性，目前还是未知的。突

变体的研究表明 AtPARP1 和 AtPARP2 在 DNA 损伤修复，对生物和非生物胁迫的反应等生理过程中均扮演重要角色^[9]。

与 AtPARP1 和 AtPARP2 相比，AtPARP3 有其独特性。首先，微阵列信息和 EST 数据的研究和组织化学染色的结果表明 AtPARP3 在种子中特异性表达，因此可能在种子萌发过程中发挥重要的作用^[10,11]。对一级结构的分析发现 AtPARP3 在氨基酸组成上与 AtPARP1、AtPARP2 差异甚大，在 PARP 催化结构域上的一些关键氨基酸位点发生了变异，例如 AtPARP1 和 AtPARP2 催化域中均存在的 HYE 催化三联体位点，在 AtPARP3 中第一位组氨酸被半胱氨酸取代，第二位酪氨酸被缬氨酸取代，这些改变会产生何种影响目前还不清楚^[9]。此外，从蛋白质结构域组成上来看，AtPARP3 与 AtPARP1 的结构较为相似，两者均具有 PADPR1、BRCT、WGR、PARP 催化结构域，但 AtPARP1 在 N 端还有一个 DNA 结合结构域 DBD，包含两个锌指结构。AtPARP2 与 AtPARP3 的结构域组成差别较大，除了 WGR 和 PARP 催化结构域均存在，AtPARP2 在 N 端还有两个 SAP 结构域，被认为是与 DNA 或 RNA 结合的结构域。三个蛋白的结构域组成如下图^[12]：



改自 Briggs A G, Bent A F, Trends in plant science, 16(7): 372-380, 2011

Hashida 等人发现 AtPARP3 的表达与种子的贮存和生命力的维持有关，但具体生理生化机制尚不清楚^[11]。另外 Hunt 等人发现 NAD⁺的水平调节与种子的萌发相关，而种子特异表达的 AtPARP3 可能具有的多聚 ADP-核糖活性能参与 NAD⁺的调节^[13]；此外，推测种子中因活性氧自由基 ROS 累积造成 DNA 损伤，其在萌发过程中的修复可能需要 AtPARP3 的参与^[11]，因为 DNA 修复过程涉及多聚 ADP-核糖化作用^[9]。因此，AtPARP3 是否具有催化多聚 ADP 核糖化修饰活性，对于解释其体内功能特别重要，但目前却没有相关的证据证明其体内体外具有这样的活性，本研究致力于解决这一问题。

参考文献:

1. Damours D, Desnoyers S, Dsilva I, et al. Poly (ADP-ribosyl) ation reactions in the regulation of nuclear functions[J]. *Biochemistry. Journal*, 1999, 342: 249-268.
2. Schreiber V, Dantzer F, Ame J C, et al. Poly (ADP-ribose): novel functions for an old molecule[J]. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 2006, 7(7): 517-528.
3. Kleine H, Poreba E, Lesniewicz K, et al. Substrate-assisted catalysis by PARP10 limits its activity to mono-ADP-ribosylation[J]. *Molecular cell*, 2008, 32(1): 57-69.
4. Till S, Diamantara K, Ladurner A G. PARP: a transferase by any other name[J]. *Nature structural & molecular biology*, 2008, 15(12): 1243-1244.
5. Amé J C, Spenlehauer C, de Murcia G. The PARP superfamily[J]. *Bioessays*, 2004, 26(8): 882-893.
6. Citarelli M, Teotia S, Lamb R S. Evolutionary history of the poly (ADP-ribose) polymerase gene family in eukaryotes[J]. *BMC evolutionary biology*, 2010, 10(1): 308.
7. Augustin A, Spenlehauer C, Dumond H, et al. PARP-3 localizes preferentially to the daughter centriole and interferes with the G1/S cell cycle progression[J]. *Journal of cell science*, 2003, 116(8): 1551-1562.
8. Hassa P O, Haenni S S, Elser M, et al. Nuclear ADP-ribosylation reactions in mammalian cells: where are we today and where are we going?[J]. *Microbiology and Molecular Biology Reviews*, 2006, 70(3): 789-829.
9. Lamb R S, Citarelli M, Teotia S. Functions of the poly (ADP-ribose) polymerase superfamily in plants[J]. *Cellular and Molecular Life Sciences*, 2012, 69(2): 175-189.
10. Becerra C, Puigdomenech P, Vicent C M. Computational and experimental analysis identifies Arabidopsis genes specifically expressed during early seed development[J]. *BMC genomics*, 2006, 7(1): 38.
11. Rissel D, Losch J, Peiter E. The nuclear protein Poly (ADP - ribose) polymerase 3 (AtPARP3) is required for seed storability in Arabidopsis thaliana[J]. *Plant Biology*, 2014.
12. Briggs A G, Bent A F. Poly (ADP-ribosyl) ation in plants[J]. *Trends in plant science*, 2011, 16(7): 372-380.
13. Hunt L, Holdsworth M J, Gray J E. Nicotinamidase activity is important for germination[J]. *The Plant Journal*, 2007, 51(3): 341-351.

三. 课题主要内容和基本思路

为了检测 AtPARP3 催化蛋白质多聚 ADP-核糖化的活性,我们计划一方面通过在大肠杆菌中异源表达 AtPARP3 蛋白,分离纯化后在体外进行多聚 ADP-核糖化活性检测实验,另一方面利用表达的蛋白制备抗体,体内检测 AtPARP3 的表达水平及可能具有的自我修饰活性。

主要实验步骤如下:

1.表达载体的构建:

构建表达载体(从萌发的种子中提取总 RNA,设计相应引物扩增 PARP3 的 cDNA,连入载体 PCR-Blunt,测序确定后,酶切,连接入不同的表达载体)

2.确定最佳表达条件

利用构建好的表达载体转化不同的大肠杆菌宿主,涂布培养后摇菌,在合适的诱导条件下用 IPTG 诱导表达后超声裂解细胞离心取上清,SDS-PAGE 电泳分析表达情况(以未诱导时的总蛋白相应条带作为对照),以此确定最佳的表达条件。

3.大量表达纯化目的蛋白及制备相应的多克隆抗体

- 根据确定的最佳表达条件大量表达 PARP3 蛋白后,裂解细胞离心获得的上清液用滤膜过滤后过相应的亲和层析柱,洗脱纯化的蛋白在 1xPBS 缓冲液中 4 度透析过夜,SDS-PAGE 检测纯度。
- 进行空载体的转化表达纯化后的蛋白用于后续实验对照。
- 将纯化出来的蛋白送公司制备多克隆抗体。

4.AtPARP3 体外活性检测

活性检测的基本原理依据 PARP 家族蛋白特有的自我聚 ADP-核糖化作用的活性。向 PAR 反应缓冲液中加入 NAD^+ 作为反应底物,断裂 DNA 双链作为反应诱导物,再加入加入适量纯化的蛋白一定温度下反应分别 0, 1, 5, 15, 30, 60 分钟后加入预冷的丙酮终止反应,-20 度静置沉淀蛋白后离心去上清,SDS-PAGE 电泳分析,若有多聚 ADP-核糖活性,则随着反应时间增加,相应的位置会向上形成弥散的条带。

5.AtPARP3 体内活性检测

三组野生型拟南芥种子分别在不作任何处理,一定浓度基因毒剂博来霉素处

理，一定浓度博来霉素+多聚 ADP-核糖化作用抑制剂 3-AB 处理的条件下，于 1/2MS 培养基中萌发，提取萌发材料的总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳后，进行 western blot，用制备的多克隆抗体杂交，再用二抗显色，观察条带的深浅及弥散的情况，分析 AtPARP3 的表达水平及自我修饰活性。

难点：

1. 本实验需异源表达蛋白，需尝试使用不同的载体系统与宿主系统的组合以及不同的诱导表达条件以确定最佳的表达条件以获得高效表达蛋白。
2. AtPARP3 蛋白因其结构和表达的特殊性，可能需要在特定的反应条件下才能检测到其活性，因此活性检测试验需摸索不同的反应条件如温度、pH、离子浓度、反应时间等。
3. 体内检测 AtPARP3 的活性。

创新点：

AtPARP3 在种子萌发的过程中发挥作用，但是其是否具有多聚 ADP-核糖化作用目前尚未确认。本实验同时从体外和体内两方面对 AtPARP3 的活性进行检测，若能检测到 AtPARP3 的多聚 ADP-核糖化作用的活性，将是首次证明 AtPARP3 是具有该催化活性的蛋白质。

四. 课题研究进展计划

2014 年 3 月~2014 年 5 月，构建不同载体系统的融合蛋白表达载体；

2014 年 5 月~2014 年 7 月，探索不同

2014 年 7 月~2014 年 9 月，大量表达纯化目的蛋白，制备多克隆抗体；

2014 年 9 月~2015 年 3 月载体系统与宿主系统的组合以确定最佳表达条件；，体内体外活性检测实验。

五. 预期成果：

确定 AtPARP3 是否具有多聚 ADP-核糖化作用。

本人郑重声明：所呈交的申请报告是本人在导师指导下独立工作所取得的成果。除加注说明的引用内容外，本文不包含任何其他个人或集体的研究成果。

学生签名： 陈威 日期： 2014 年 3 月 15 日

四、 课题经费预算

FDUROIP
课题预算表

项目类型： <input checked="" type="checkbox"/> 著政 <input type="checkbox"/> 望道 <input type="checkbox"/> 曦源 <input type="checkbox"/> 上海大学生创新活动计划 <input type="checkbox"/> 国家大学生创新性实验计划		学生姓名	陈威
序号	费用事项	费用信息	费用预算 (元)
1	RNA 提取试剂盒		200
2	反转录酶 (100U)		100
3	引物合成费用		50
4	限制性内切酶及 T4 连接酶, 各 100U		600
5	测序		200
6	PCR 相关试剂 (套装, 100U)		400
7	原核表达培养用酵母粉 (500g)		150
8	原核表达培养用蛋白胨 (500g)		280
9	制备多克隆抗体		5000
10	蛋白 SDS-PAGE 电泳		200
	合计		7180

注：填写办法请参照附件《FDUROIP 项目财务制度》，不够可加页。

五、 推荐意见

I 导师推荐意见（请您在写推荐意见之前阅读《致导师函》，并手写意见。）

陈威同学大二进入本实验室以来，参加了拟南芥 ADP-核糖化修饰课题相关的工作。他独立地从拟南芥中克隆了 AtPARP3 的启动子片段，将它连入了报告系统并进行了拟南芥转基因工作，获得了阳性植株并对该基因在拟南芥中的表达部位进行了分析。

陈威同学对实验有较高悟性，理论基础扎实且动手能力强，他能主动关注并阅读课题相关文献，积极与导师讨论，有较强的提出问题和解决问题的能力，他在前期研究工作基础上提出了课题的研究思路，所得结果对于回答 AtPARP3 究竟是否具备与其它 PARPs 同样的活性和解释其体内功能有极大帮助，该课题工作量和难度适中，相信他可以独立完成该项目的研究工作，特此郑重推荐。

导师： 葛晓春

2014 年 3 月 15 日

II. 推荐教师意见（请您手写）

陈威同学于大三上学期选修了我开设的遗传学课程，上课认真听讲，下课积极思考，并最终取得了教好的成绩（A）。从平时上课及课后完成的作业情况来看，他有着扎实的基础，较强的独立思考和查找阅读文献的能力。

此外，陈威同学在葛老师的课题组实习了将近一年时间，对相关技术已有所了解。他所申请的检测 AtPARP3 体内体外活性的实验，设计合理，内容适当，有较强的独立性和创新性。因此特此推荐他申请“薯政基金”。

推荐老师：林娟

2014 年 3 月 14 日

