

麦类作物学报
Journal of Triticeae Crops
ISSN 1009-1041, CN 61-1359/S

《麦类作物学报》网络首发论文

题目: 小麦 m^6A 结合蛋白编码基因TaECT3 的克隆与功能分析
作者: 王嘉宽, 石婷瑞, 马宇航, 马羽彤, 周芮西, 李增林
收稿日期: 2025-03-03
网络首发日期: 2025-07-09
引用格式: 王嘉宽, 石婷瑞, 马宇航, 马羽彤, 周芮西, 李增林. 小麦 m^6A 结合蛋白编码基因TaECT3 的克隆与功能分析[J/OL]. 麦类作物学报.
<https://link.cnki.net/urlid/61.1359.S.20250708.1341.002>



网络首发: 在编辑部工作流程中, 稿件从录用到出版要经历录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿等阶段。录用定稿指内容已经确定, 且通过同行评议、主编终审同意刊用的稿件。排版定稿指录用定稿按照期刊特定版式(包括网络呈现版式)排版后的稿件, 可暂不确定出版年、卷、期和页码。整期汇编定稿指出版年、卷、期、页码均已确定的印刷或数字出版的整期汇编稿件。录用定稿网络首发稿件内容必须符合《出版管理条例》和《期刊出版管理规定》的有关规定; 学术研究成果具有创新性、科学性和先进性, 符合编辑部对刊文的录用要求, 不存在学术不端行为及其他侵权行为; 稿件内容应基本符合国家有关书刊编辑、出版的技术标准, 正确使用和统一规范语言文字、符号、数字、外文字母、法定计量单位及地图标注等。为确保录用定稿网络首发的严肃性, 录用定稿一经发布, 不得修改论文题目、作者、机构名称和学术内容, 只可基于编辑规范进行少量文字的修改。

出版确认: 纸质期刊编辑部通过与《中国学术期刊(光盘版)》电子杂志社有限公司签约, 在《中国学术期刊(网络版)》出版传播平台上创办与纸质期刊内容一致的网络版, 以单篇或整期出版形式, 在印刷出版之前刊发论文的录用定稿、排版定稿、整期汇编定稿。因为《中国学术期刊(网络版)》是国家新闻出版广电总局批准的网络连续型出版物(ISSN 2096-4188, CN 11-6037/Z), 所以签约期刊的网络版上网络首发论文视为正式出版。

小麦 m⁶A 结合蛋白编码基因 *TaECT3* 的克隆与功能分析

王嘉宽, 石婷瑞, 马宇航, 马羽彤, 周芮西, 李增林

(西北农林科技大学生命学院, 陕西杨凌 712100)

摘要: *N*⁶-甲基腺苷(m⁶A)作为真核生物 RNA 中最丰富的表观转录修饰类型,通过动态的“写入-擦除-阅读”机制调控植物生长发育及逆境响应。其中,ECT 家族蛋白作为 m⁶A 阅读结合蛋白,通过识别 m⁶A 修饰位点参与 RNA 代谢调控。为明晰小麦 *TaECT3* 作为 m⁶A 结合蛋白响应逆境胁迫的机理,本研究从小麦 Fielder 材料中克隆到 *TaECT3* 基因 CDS 全长,对其进行生物信息学分析。结果表明:*TaECT3* 基因的编码区(CDS)长度为 1 854 bp,编码 617 个氨基酸,其编码蛋白含有一个 ECT 家族蛋白典型的 YTH 保守结构域。*TaECT3* 蛋白分子量为 66.93 kD,等电点为 6.48,是亲水性稳定蛋白。其二级结构以无规则卷曲(79.74%)和 α -螺旋(13.45%)为主,三级结构模拟显示该蛋白具有 m⁶A 结合口袋。系统进化分析揭示小麦 *TaECT3* 与 大麦 *HvECT3*、高粱 *SbECT3* 和 短柄草 *BdDF3A* 之间有较近的亲缘关系,暗示它们之间可能功能保守。EMSA 实验显示 *TaECT3* 重组蛋白特异性结合 m⁶A 修饰 RNA;亚细胞定位其可能位于细胞膜;qRT-PCR 分析表明,高温(37 °C, 6 h)和 PEG8000 模拟干旱(15%, 6 h)处理后,小麦 Fielder 中 *TaECT3* 的表达显著上调和下调。本研究揭示了小麦 *TaECT3* 作为 m⁶A 结合蛋白可能参与高温与干旱胁迫响应。

关键词: 小麦; *TaECT3*; m⁶A 结合蛋白; 基因克隆; 亚细胞定位; EMSA

中图分类号: S512.1; S330

文献标识码: A

Cloning and Functional Analysis of *TaECT3* Gene Encoding m⁶A-Binding Protein in Wheat

WANG Jiakuan, SHI Tingrui, MA Yuhang, MA Yutong, ZHOU Ruixi, LI Zenglin

(College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: *N*⁶-methyladenosine(m⁶A), the most abundant epitranscriptomic modification in eukaryotic RNA, regulates plant growth, development, and stress responses through a dynamic “writer-eraser-reader” regulatory mechanism. Among these regulators, ECT family proteins act as m⁶A reader by recognizing m⁶A-modified sites to participate in RNA metabolism regulation. To investigate whether *TaECT3* acts as an m⁶A reader protein in stress responses, this study cloned the coding sequence (CDS) of *TaECT3* gene from a wheat cultivar Fielder and conducted comprehensive bioinformatics analyses. Results revealed that the CDS of *TaECT3* spans 1 854 bp, encoding a 617-amino acid protein containing the characteristic YTH domain conserved in ECT family members. The *TaECT3* protein exhibits a molecular weight of 66.93 kD and a predicted isoelectric point of 6.48, demonstrating intrinsic hydrophilicity and thermodynamic stability. Secondary structure prediction revealed a predominance of random coils(79.74%) and α -helices(13.45%), while tertiary structure modeling confirmed the presence of a typical m⁶A-binding pocket. Phylogenetic analysis revealed that *TaECT3* exhibits close evolutionary relationship to the ECT proteins of *HvECT3*, *SbECT3*, and *BdDF3A* from barley, sorghum, and brachypodium, respectively. Electrophoretic mobility shift assay(EMSA) confirmed

收稿日期: 2025-03-03

修回日期: 2025-04-21

基金项目: 西北农林科技大学博士启动经费(2452023033)

第一作者 E-mail: 18971021289@163.com(王嘉宽); shitingrui@nwfau.edu.cn(石婷瑞)

通讯作者 E-mail: lizenglin@nwfau.edu.cn(李增林)

that recombinant TaECT3 specifically binds m⁶A-modified RNA. Subcellular localization analysis suggested its potential membrane localization. qRT-PCR revealed significant regulation of *TaECT3* expression in wheat cultivar Fielder under high-temperature (37 °C, 6 h) and PEG8000-simulated drought (15%, 6 h) stress conditions, compared to the control. This study demonstrates TaECT3 functions as an m⁶A reader and participates in response to heat and drought stresses in wheat.

Keywords: Wheat; TaECT3; m⁶A reader protein; Gene cloning; Subcellular localization; EMSA

逆境胁迫是制约小麦 (*Triticum aestivum* L.) 产量与品质提升的重要环境因素。随着全球气候变化加剧, 极端灾害的频发对小麦生产构成严峻挑战, 威胁全球粮食安全^[1]。作为中国最主要的粮食作物之一, 小麦产量约占全国粮食总产量的 20%^[2]。传统育种技术虽在抗逆品种选育中取得巨大成效, 但其效率受限于对小麦逆境响应分子网络及关键调控因子的认知不足^[3]。因此, 揭示小麦抗逆的分子机制并挖掘核心调控元件, 对实现精准分子设计育种和保障粮食安全具有重要意义。

近年来, 表观转录组学 (epitranscriptomics) 的快速发展为解析植物逆境调控机制提供了新视角^[4]。其中, N⁶-甲基腺苷 (m⁶A) 作为真核生物 mRNA 中含量最丰富的化学修饰, 通过动态可逆的“写入-擦除-阅读”机制调控 RNA 代谢 (如剪接、稳定性及降解), 进而影响植物的生长发育和逆境响应^[5-6]。m⁶A 修饰的生物学功能依赖于甲基转移酶 (writer)、去甲基化酶 (eraser) 和甲基化结合蛋白 (reader), 而含 YT521-B Homology (YTH) 结构域的蛋白家族是已知最主要的 m⁶A 结合蛋白, 该结构域在真核生物中广泛存在, 主要功能是识别并结合 m⁶A 这一常见 RNA 表观遗传修饰, 从而调控 RNA 的代谢过程^[7]。在植物中, YTH 家族成员 (如拟南芥中的 ECT2/3/4 和水稻 CPSF30L) 可通过其保守的 YTH 结构域识别 m⁶A 修饰位点, 进而调控胁迫相关基因 (如 *DREB2A*、*RD29B*) 的表达水平, 显著增强植物对干旱、高盐等逆境的耐受性^[8-11]。例如, 拟南芥 ECT8 通过结合 m⁶A 修饰的 mRNA, 招募 DCP5 介导靶标 RNA 的降解, 从而维持盐胁迫下的细胞稳态^[12]。这些研究表明, m⁶A 修饰可能通过精准调控胁迫信号通路关键节点的 RNA 代谢, 成为植物抗逆性的“分子开关”^[13]。

尽管 m⁶A 调控网络在模式植物中的功能逐渐清晰, 但其在小麦这一复杂六倍体作物中的研究仍处于起步阶段。小麦基因组庞大且存在多倍

体冗余性^[14], 其 m⁶A 修饰的动态调控机制及靶向基因的分子路径尚未明确^[15-17]。解析小麦 m⁶A 结合蛋白的功能及其调控网络, 不仅可加快作物表观转录学研究进展, 还可为基因编辑技术靶向优化 m⁶A 调控元件、培育抗逆新品种提供理论依据^[18]。

近年来, 西北农林科技大学生物信息学与系统生物学实验室在开发 m⁶A 预测工具以及探究植物中的 m⁶A 修饰功能方面取得了重要进展^[19-22]。本研究以小麦为试验材料, 对小麦 ECT 家族中的 *TaECT3* 基因进行了胁迫表达分析, 对该基因编码的蛋白质进行了生物信息学解析及亚细胞定位, 纯化了 TaECT3 蛋白并进行了 EMSA 实验, 进一步验证 TaECT3 蛋白的 m⁶A 结合蛋白属性。本研究不仅为深入理解小麦 ECT 家族基因在胁迫响应中的作用机制提供了重要信息, 也为小麦抗逆性分子育种提供了新的思路和理论依据。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料为六倍体小麦品种 Fielder 及本氏烟草, 均由西北农林科技大学生物信息学与系统生物学实验室培养。

1.2 植物材料处理

将小麦种子清洗消毒后置于放有湿润滤纸的培养皿中, 每个培养皿 5 粒, 转入培养箱中培养, 光照强度 10 000 Lx, 光周期为 16 h 光照/ 8 h 黑暗, 温度 22 °C, 湿度 62%。幼苗长至二叶期时进行不同胁迫处理 (于 37 °C 培养箱中进行高温处理, 用 15% PEG8000 进行干旱处理), 每个处理设置 3 个生物学重复, 处理 6 h 后挑选培养皿中长势相同的幼苗取样, 液氮速冻后保存于 -80 °C 冰箱。

1.3 *TaECT3* 基因的克隆与载体构建

采用 Eastep[®] Super Total RNA Extraction Kit (普洛麦格, 北京) 提取 Fielder 小麦二叶期叶片

总 RNA, 使用 All-in-One First-Strand Synthesis MasterMix(百时美, 江苏)合成 cDNA 第一链。用 Primer 5.0 软件设计特异性扩增引物 *TaECT3*-F1/R1(表 1), 以 cDNA 为模板, 扩增 *TaECT3* 编码区, 得到含有 *TaECT3* 基因 CDS 的全长序列, 使用 HiPure Gel Pure DNA Mini Kit(Magen, 广州)回收目的片段。利用带有同源臂的同源重组引物(表 1), 通过同源重组反应将 *TaECT3* 连接到 pMALMCS 载体, 转化至 DH5 α 感受态细胞, 测序成功后即可得到 MBP-*TaECT3* 表达载体, 用于蛋白纯化。利用带有同源臂的同源重组引物(表 1), 通过同源重组反应将 *TaECT3* 连接到 pCHF70 载体, 转化至 DH5 α 感受态细胞, 测序成功后即可得到 35S::EYFP-*TaECT3* 的重组质粒, 可用于亚细胞定位。

1.4 生物信息学分析

用 WheatOmics 1.0 数据库和 MG2C 2.1 分析小麦 *TaECT3* 基因在基因组中的拷贝数和染色体定位; 用 SPMA 和 SWISS-MODEL 分析蛋白质二级、三级结构; 用 Expasy 分析蛋白质等电点与蛋白分子质量; 用 NCBI 数据库中的 Conserved Domains Database 预测分析蛋白保守结构域; 用 DNAMAN 6.0 进行多序列比对; 用 MEGA 11 构建系统发育进化树。

1.5 *TaECT3* 蛋白的亚细胞定位

利用在线软件 DeepLoc 2.0 预测 *TaECT3* 蛋白的亚细胞定位。利用 1.3 部分的方法构建了表达载体 35S::EYFP-*TaECT3*, 35S::EYFP 空载体作为对照, 随后将它们转入 GV3101 感受态细胞中。菌落 PCR 验证阳性后摇菌, 28 °C 培养 16 h 后注射烟草叶片, 暗处理 1 d、培养 2 d 后在激光共聚焦显微镜下观察荧光信号。

1.6 *TaECT3* 蛋白的诱导及分离纯化

1.6.1 *TaECT3* 蛋白的诱导

利用 1.3 部分的方法构建了表达载体 MBP-*TaECT3*, 随后将它们转入原核表达菌株 BL21 感受态细胞中。将转化成功的重组菌株单菌落接入到 5 mL 含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中, 37 °C, 200 r·min⁻¹ 振荡过夜培养。将过夜培养的菌液按 1:100 接入到 300 mL 含氨苄青霉素的 LB 液体培养基中继续振荡培养 3~6 h 至 OD_{600} = 0.6 左右, 加入终浓度为 0.1 mmol·L⁻¹ 的 IPTG, 在 16 °C、80 r·min⁻¹ 条件下继续诱导培养 20 h。取过夜诱导菌液, 多次离心收集菌体

后, 加入 1×PBS 缓冲液重悬, 煮沸 10 min, 利用 12% SDS-PAGE 电泳检测融合蛋白的诱导表达情况。检测时以未加 IPTG 诱导菌液作为阴性对照。

1.6.2 *TaECT3* 蛋白的纯化

确认诱导成功后, 加入 1×PBS 缓冲液于离心收集的菌体中重悬菌体。加入蛋白酶抑制剂, 超声破碎至菌液清澈后离心收集上清。通过 Dextrin Beads(Coolaber, 北京)纯化蛋白。在上样前将上清用滤膜过滤, 重力柱经 ddH₂O 润洗和平衡液平衡; 上样时保证样品与介质充分接触, 收集流出液反复上样增加结合效率; 洗杂液洗去蛋白杂质后, 洗脱液洗脱收集蛋白。SDS-PAGE 检测纯化样品。

1.7 *TaECT3* 的凝胶迁移实验分析

利用 UGU^{m6}AA、UGUAA 作为 EMSA 检测探针^[23]。按顺序加入探针、*TaECT3* 蛋白和结合缓冲液, 混匀后, 在 22 °C 的 PCR 仪中孵育 20 min。加样前先预电泳, 然后电泳 50 min。取与 EMSA 胶大小相近的尼龙膜在转膜装置中以 380 mA 恒流转膜 30 min, 保持尼龙膜湿润, 立即进行紫外交联 1 min。将交联后的尼龙膜放入含有 50 mL BSA 封闭缓冲液的容器中, 室温下在侧摆摇床上缓慢摇动, 封闭 45 min。再加入适量的辣根过氧化物酶(HRP)标记抗体, 室温震荡孵育 30 min。最后去除酶联物稀释液, 用 PBST 洗涤缓冲液洗膜 2 次, PBS 缓冲液洗膜 1 次, 每次室温轻微震荡 7 min。配置显色剂, 均匀加至膜上进行曝光检测。

1.8 *TaECT3* 实时荧光定量 PCR 分析

用 Primer 5.0 设计 qRT-PCR 特异性引物(表 1), 并在 NCBI Primer-BLAST 进行特异性验证, 以 *TaELF* 为内参基因。用 Taq SYBR Green qPCR Premix(百时美, 江苏)进行荧光定量 PCR 分析, 反应体系: 1×Taq SYBR Green qPCR Premix 10 μ L, cDNA 2 μ L, 上下游引物各 0.4 μ L, ddH₂O 7.2 μ L。反应程序: 95 °C 30 s, 95 °C 10 s, 60 °C 30 s, 40 个循环。采用 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 计算基因相对表达量。

2 结果与分析

2.1 *TaECT3* 基因的克隆及序列分析

以小麦叶片 cDNA 为模板, 对 *TaECT3* 基因的 CDS 序列进行扩增, 扩增产物在 2 000 bp 左右(图 1)。经测序该目标序列全长 1 854 bp, 编码

表 1 本实验所用引物
Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence(5'-3')	用途 Purpose
TaECT3-F1	ATGGCAGCCGCCGCCGCCGCC	基因克隆 Gene cloning
TaECT3-R1	TCAGCAGCCATTTGCGACAGCCAA	
TaECT3-F2	GATGGCAGCCGCCGCCGCCGCC	蛋白纯化 Protein purification
TaECT3-R2	GCAGCCATTTGCGACAGCCAA	
TaECT3-F3	ATGGCAGCCGCCGCCGCCGCC	亚细胞定位 Subcellular localization
TaECT3-R3	TCAGCAGCCATTTGCGACAGCCAA	
RT-TaECT3-F1	CTGAGCAGTGGGCAAATCCT	实时荧光定量 PCR Quantitative real-time PCR
RT-TaECT3-R1	ATGTCACCATAGGCACCAGC	
RT-TaELF-F1	CAGATTGGCAACGGCTACG	
RT-TaELF-R1	CGGACAGCAAAACGACCAAG	

TaECT3-F2/R2 分别由 *Bam*H I 和 *Eco*R I 酶切,均不携带酶切位点;TaECT3-F3/R3 分别由 *Bam*H I 和 *Xba*I 酶切,均保留酶切位点。
TaECT3-F2/R2 were digested with *Bam*H I and *Eco*R I, neither carried restriction sites; TaECT3-F3/R3 were digested with *Bam*H I and *Xba*I, with both restriction sites retained.

的蛋白质由 617 个氨基酸组成。通过 WheatOmics 1.0 数据库对该基因在小麦基因组中的拷贝数和染色体定位进行预测,结果显示该基因定位于小麦 5D 染色体 508 975 113~508 979 213 区间,在 ABD 基因组各有一个拷贝,另外 2 个拷贝分别位于 5A 染色体 618 006 335~618 003 177 和 5B 染色体 616 944 382~616 941 243(图 2)。通过 Expsasy ProtParam 在线软件分析该蛋白分子式为 C₂₉₄₆H₄₅₁₁N₈₀₇O₉₅₁S₁₅,原子总数为 9 230,分子量为 66.93 kD,等电点为 6.48。其脂肪系数为 59.53%,总平均亲水性为-0.721,预测为亲水性蛋白,不稳定系数为 32.28,预测为稳定蛋白。

2.2 TaECT3 蛋白的生物信息学分析

2.2.1 TaECT3 蛋白的结构预测

SOPMA 在线软件对 TaECT3 蛋白二级结构的预测结果(图 3)显示,其结构组分以无规则卷曲为主(占比 79.74%),少量 α-螺旋(13.45%)及 β-折叠(6.81%),表明该蛋白可能具有较高的

结构柔性 与 动态构象变化特性。基于 SWISS-MODEL 平台的三级结构分析构建的模型与二级结构预测一致。

2.2.2 TaECT3 蛋白的序列比对及系统进化树分析

利用 DNAMAN 6.0 对小麦 TaECT3 及其同源蛋白进行 Clustal W 多序列比对。结果(图 4)显示,TaECT3 蛋白第 380~516 位氨基酸区域含高度保守的 YTH 结构域。基于 MEGA 11 邻接法构建系统进化树(图 5),发现小麦 TaECT3 与高粱 SbECT3、大麦 HvECT3 及短柄草 Bd-DF3A 聚为一支,暗示可能存在功能保守性。

2.3 TaECT3 蛋白亚细胞定位

本研究通过 DeepLoc 2.0 在线软件预测显示 TaECT3 蛋白可能定位于细胞膜。为验证该预测

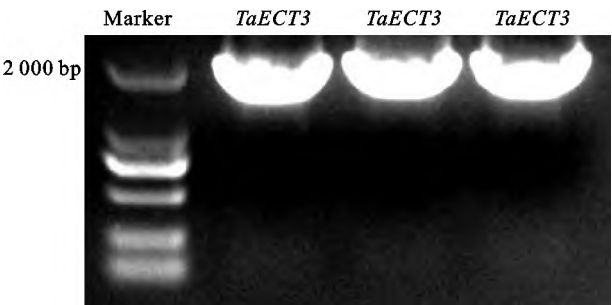


图 1 TaECT3 基因克隆
Fig. 1 Cloning of TaECT3

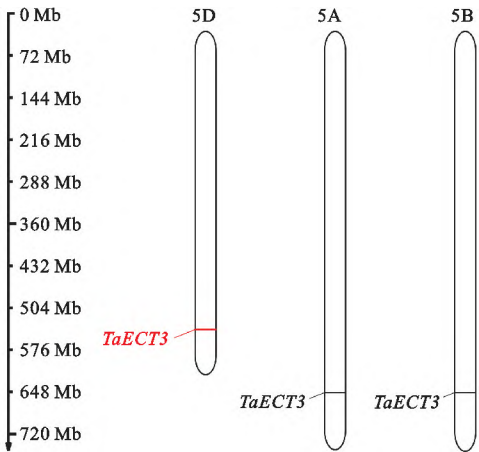


图 2 TaECT3 基因染色体定位
Fig. 2 Chromosome location of TaECT3

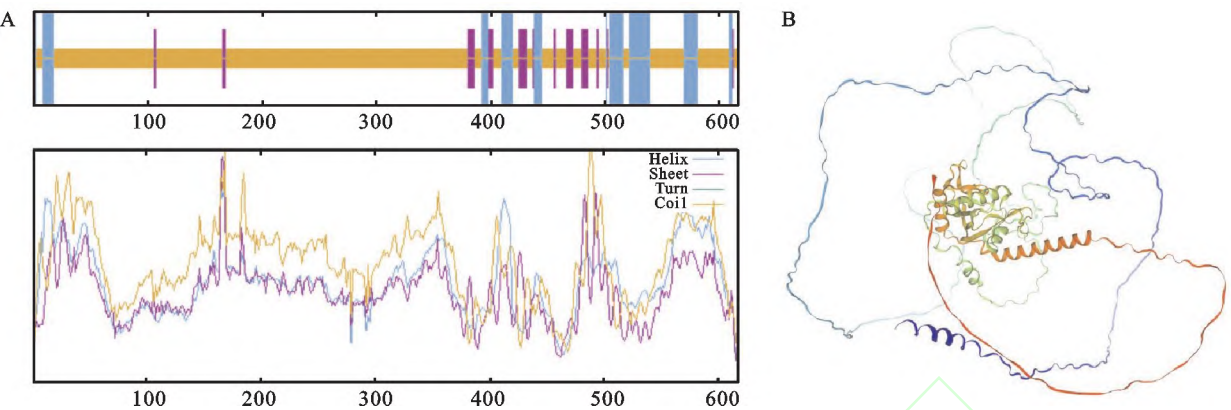
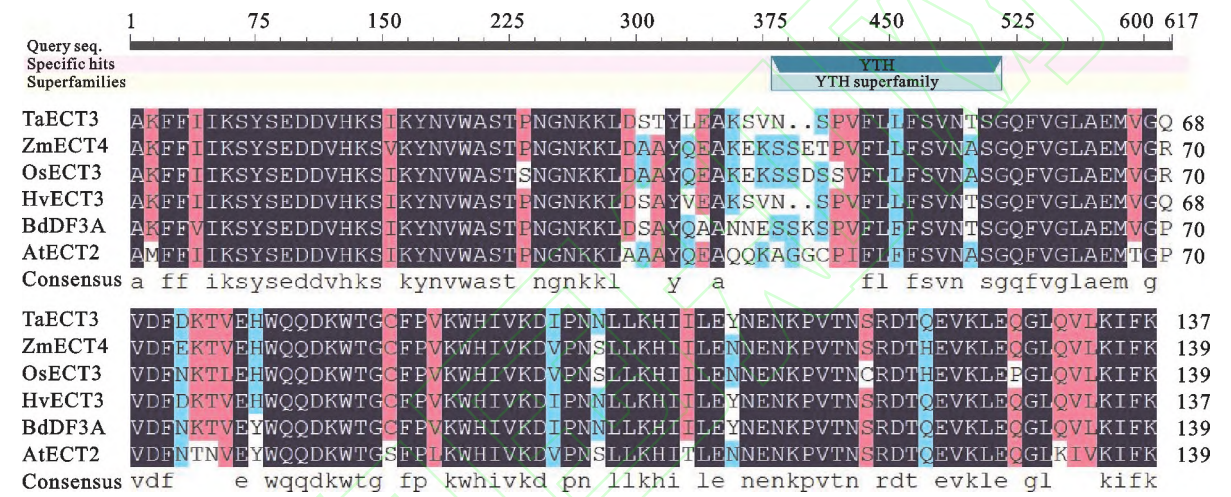


图 3 预测 TaECT3 蛋白的二级结构(A)和三级结构(B)

Fig. 3 Prediction of the secondary(A) and tertiary structures(B) of TaECT3



Ta: 小麦; Zm: 玉米; Os: 水稻; Hv: 大麦; Bd: 二穗短柄草; At: 拟南芥。

Ta: *Triticum aestivum* L.; Zm: *Zea mays* L.; Os: *Oryza sativa* L.; Hv: *Hordeum vulgare* L.; Bd: *Brachypodium distachyon* L.; At: *Arabidopsis thaliana* L..

图 4 TaECT3 蛋白保守结构域及 YTH 结构域序列比对

Fig. 4 Conserved structural domains and sequence alignment of YTH domain of TaECT3

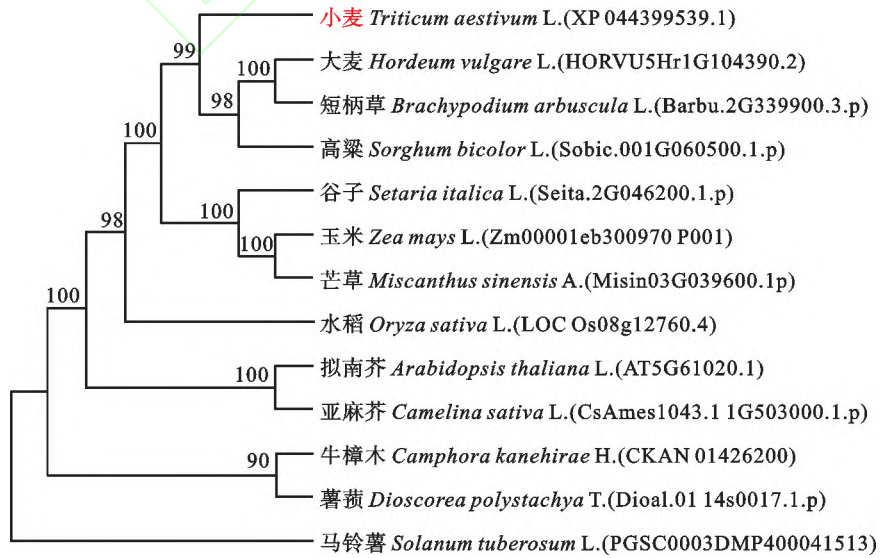


图 5 TaECT3 蛋白及其他同源蛋白的进化树分析

Fig. 5 Phylogenetic tree of TaECT3 protein with other homologous ECT proteins

∴

结果,构建了 EYFP 荧光蛋白融合表达载体,通过农杆菌介导法瞬时转化本氏烟草表皮细胞,同时设置 35S∶EYFP 空载体作为阴性对照。荧光显微观察显示,空载在细胞核和细胞膜区域均检

测到绿色荧光信号(图 6),证实瞬时转化系统有效。而 35S∶EYFP-TaECT3 转化组中,荧光信号特异地富集于细胞膜区域(图 6),表明 TaECT3 蛋白定位于细胞膜。

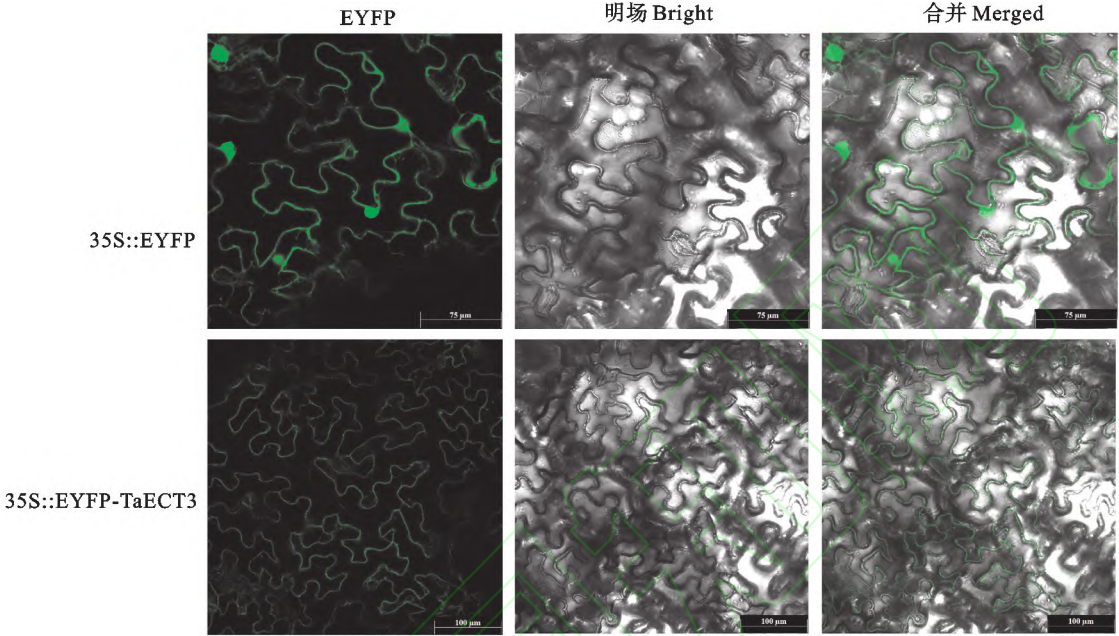


图 6 TaECT3 蛋白亚细胞定位
Fig. 6 Subcellular localization of TaECT3 protein

2.4 TaECT3 m⁶A 结合蛋白的鉴定

2.4.1 TaECT3 原核表达和蛋白纯化

通过纯化出的 TaECT3 蛋白进行 EMSA 检测 TaECT3 是否可以结合 m⁶A 修饰的 RNA,明确 TaECT3 是否具有 m⁶A 结合蛋白的功能。通过构建 MBP-TaECT3 原核表达载体,在 16 °C 条件下经 0.1 mmol · L⁻¹ IPTG 诱导表达后,SDS-PAGE 电泳分析显示在 100~140 kD 处出现目标条带(107 kD),与预期分子量相符。经重力柱纯化获得 MBP-TaECT3 融合蛋白(图 7)。

2.4.2 凝胶迁移实验

为证明 TaECT3 蛋白与 m⁶A 修饰 RNA 的特异性结合能力,采用生物素标记的 UGU^{m⁶}AA (含 m⁶A 修饰)和 UGUAA(未修饰)探针进行凝胶迁移分析。结果表明 m⁶A 修饰探针与 MBP-TaECT3 蛋白共孵育后出现明显的迁移阻滞带,而未修饰探针及 MBP 对照组均未观察到结合现象(图 8)。表明 TaECT3 蛋白可以特异识别 m⁶A 修饰位点,确证其作为 m⁶A 结合蛋白功能。

2.5 胁迫处理下小麦TaECT3 的表达分析

采用 qRT-PCR 技术检测非生物胁迫对 TaECT3 基因表达的影响。以 TaELF 基因作为内参进行标准化处理。结果表明,15% PEG8000 模拟干旱胁迫,TaECT3 表达量显著下调;37 °C 高温胁迫处理后 TaECT3 基因显著上调表达(图 9)。表明TaECT3 可能参与小麦对干旱和高温等逆境胁迫的响应。

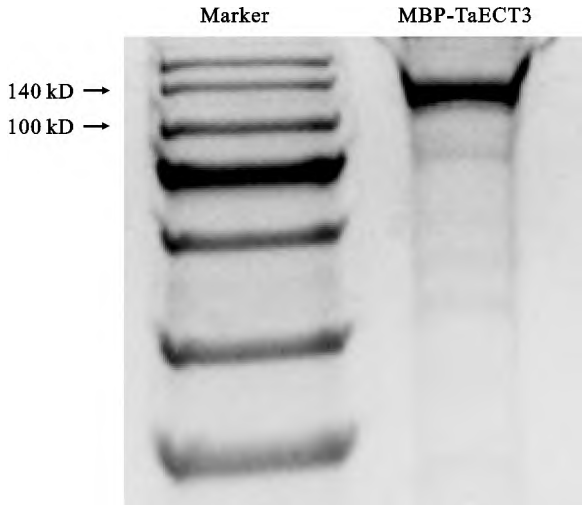


图 7 TaECT3 蛋白表达产物的检测

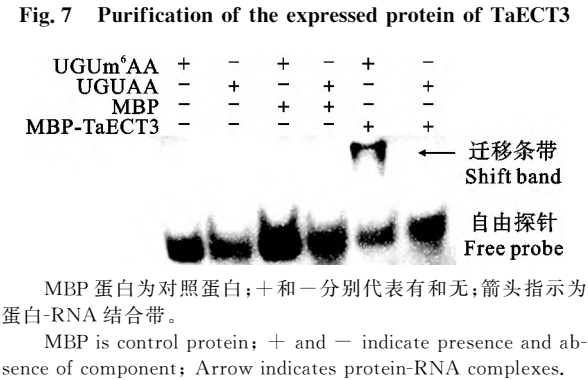


图 8 TaECT3 蛋白结合 m⁶A 修饰探针

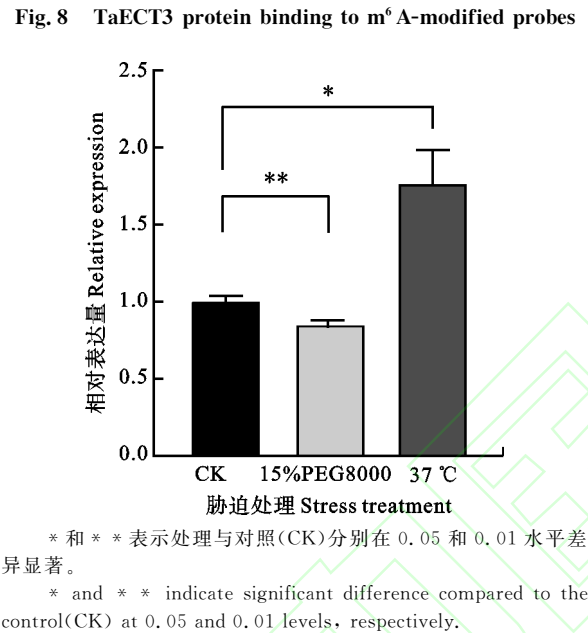


图 9 干旱和高温处理下TaECT3 基因的表达



3 讨论

为应对多种非生物胁迫,植物进化出复杂的分子调控网络。m⁶A 修饰作为真核生物 mRNA 最丰富的表观遗传标记之一,调控 RNA 稳定性、翻译效率、剪接加工等过程^[24]。其中,ECT 家族蛋白作为 m⁶A 结合蛋白的核心成员,其功能机制逐渐成为研究热点。本研究以小麦品种 Fielder 为材料,成功克隆出TaECT3 基因,通过生物信息学分析揭示其编码蛋白具有典型 YTH 结构域,初步暗示 TaECT3 可能作为 m⁶A 结合蛋白发挥作用。多序列比对与系统进化分析表明,TaECT3 在禾本科物种间呈现显著保守性。值得注意的是,qRT-PCR 分析证实高温(37 °C)和模拟干旱(15% PEG8000)胁迫调控TaECT3 的表达,说明其可能参与小麦逆境应答过程。通过原

核表达成功纯化 MBP-TaECT3 融合蛋白,并利用 EMSA 实验首次证实该蛋白特异性结合 m⁶A 修饰的 RNA 探针,从分子水平确证 TaECT3 的 m⁶A 结合蛋白功能。此外,亚细胞定位实验显示 TaECT3 特异性定位于细胞膜,推测其可能通过调控膜结合 RNA 代谢或激活细胞质内抗逆相关基因的表达实现胁迫响应功能。

系统进化分析显示,TaECT3 与高粱、大麦等禾本科物种的 ECT 蛋白的亲缘关系较近,暗示在植物界特别是禾本科植物中功能较为保守^[25]。小麦 TaECT3 蛋白具有特异性结合 m⁶A 修饰 RNA 的能力,所含有的 YTH 结构域在拟南芥 ECT2/3/4^[26]、CPSF30L^[27] 和水稻 YTH07^[28] 同样存在。ECT2/3/4 在叶片生长、器官分化、表皮毛分叉中起作用,并在非生物胁迫 ABA 响应中依赖识别 m⁶A 发挥功能^[26]。CPSF30-L 通过识别 m⁶A 调控选择性多聚腺苷酸化(polyadenylation)影响开花,脱落酸响应及氮素代谢^[27,29]。YTH07 与 EHD6 蛋白互作共同靶向结合 m⁶A 修饰基因,通过形成相分离阻滞抽穗抑制基因 OsCOL4 的蛋白积累,解除对抽穗基因的抑制促进开花^[28]。小麦 ECT 家族中或许存在类似功能。值得注意的是,EMSA 实验显示 TaECT3 仅与 m⁶A 修饰的 RNA 探针结合,而未修饰探针无结合活性,这一特性与动物中 YTHDF 家族蛋白的识别模式一致^[30],表明 m⁶A 修饰的识别机制在真核生物界具有广泛保守性。

TaECT3 响应高温和干旱胁迫,说明其可能参与小麦逆境应答过程。在模式植物拟南芥中,ECT8 作为盐胁迫传感器特异性识别 m⁶A 修饰的 mRNA 以维持植物在胁迫状态下生理稳态^[12]。ECT8 还具有感知细胞内 ABA 浓度的功能,在 ABA 的诱导作用下ECT8 的表达量迅速升高,感受细胞内 ABA 浓度变化后通过在细胞质内产生液-液相分离,隔离 ABA 受体 mRNA,从而实现反馈调控 ABA 信号响应逆境胁迫^[31]。小麦特有的六倍体基因组复杂性可能赋予 TaECT3 更精细的调控层级,预测其可能通过结合胁迫相关 mRNA 的 m⁶A 修饰位点,调控 RNA 代谢过程(如稳定性或翻译效率),从而增强小麦的逆境适应能力。

本研究系统解析了小麦 TaECT3 的结构特征、进化关系及分子功能,证实其作为 m⁶A 结合蛋白在小麦逆境响应中的潜在作用。研究结果为解析六倍体作物表观转录调控网络提供了新线索,并为通过编辑 m⁶A 调控元件培育抗逆小麦品种奠定了

理论基础。未来研究需进一步整合多功能基因组学策略,挖掘*TaECT3*基因调控网络的关键节点,推动小麦分子设计育种的精准化与高效化。

参考文献:

- [1] FEKETE A. Natural hazards and climate change impacts on food security and rural-urban livelihoods in Mozambique: A bibliometric analysis and framework [J]. *Earth*, 2024, 5(4): 761.
- [2] 鲜宸杰. 中国小麦主产区高温和干旱遥感监测及胁迫响应研究[D]. 成都: 成都理工大学, 2022.
XIAN C J. Monitoring heat and drought stress of wheat in main wheat-producing areas of China based on remote sensing data [D]. Chengdu: Chengdu University of Technology, 2022.
- [3] 朱末, 闻竞, 徐晨, 等. 分子设计育种技术: 农业遗传改良中的潜力与挑战[J]. *玉米科学*, 2024, 32(10): 9.
ZHU M, WEN J, XU C, et al. Molecular design breeding technology: Potential and challenge in agricultural genetic improvement [J]. *Journal of Maize Sciences*, 2024, 32(10): 9.
- [4] 肖军, 鲁非, 邓炯, 等. 植物基因组与表观遗传学研究进展[J]. *植物生理学报*, 2023, 59(9): 1665.
XIAO J, LU F, DENG X, et al. Research progress of plant genomics and epigenetics [J]. *Plant Physiology Journal*, 2023, 59(9): 1665.
- [5] SEIGNEURIN-BERNY D, KARCZEWSKI C, DELAFORGE E, et al. ECT2 peptide sequences outside the YTH domain regulate its m⁶A-RNA binding [J]. *RNA Biology*, 2024, 21(1): 1.
- [6] 郭宇晴, 岳建英, 张天仪, 等. 拟南芥 m⁶A 甲基化结合蛋白对几种病毒侵染的影响[J/OL]. *分子植物育种*, 1-12. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20240524.1632.006.html>.
GUO Y J, YUE J Y, ZHANG T Y, et al. Effects of m⁶A binding proteins of *Arabidopsis thaliana* on infection of several viruses [J/OL]. *Molecular Plant Breeding*, 1-12. <http://kns.cnki.net/kcms/detail/46.1068.S.20240524.1632.006.html>.
- [7] ZHANG Z Y, THELER D, KAMINSKA K H, et al. The YTH domain is a novel RNA binding domain [J]. *The Journal of Biological Chemistry*, 2010, 285(19): 14701.
- [8] WANG J N, WANG F, KE J, et al. Inhibition of *METTL3* attenuates renal injury and inflammation by alleviating *TAB3* m⁶A modifications via IGF2BP2-dependent mechanisms [J]. *Science Translational Medicine*, 2022, 14(640): eabk2709.
- [9] HOU J J, ZHANG H, LIU J, et al. YTHDF2 reduction fuels inflammation and vascular abnormalization in hepatocellular carcinoma [J]. *Molecular Cancer*, 2019, 18(1): 163.
- [10] WANG F G, LIU Y Y, SHI Y Q, et al. SUMOylation stabilizes the transcription factor DREB2A to improve plant thermotolerance [J]. *Plant Physiology*, 2020, 183(1): 41.
- [11] LIU W S, THAPA P, PARK S W. RD29A and RD29B rearrange genetic and epigenetic markers in priming systemic defense responses against drought and salinity [J]. *Plant Science*, 2023, 337: 111895.
- [12] CAI Z H, TANG Q, SONG P Z, et al. The m⁶A reader ECT8 is an abiotic stress sensor that accelerates mRNA decay in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2024, 36(8): 2908.
- [13] WANG X, JIANG B C, GU L F, et al. A photoregulatory mechanism of the circadian clock in *Arabidopsis* [J]. *Nature Plants*, 2021, 7(10): 1397.
- [14] ELTAHER S, HASHEM M, AHMED A A M, et al. Effectiveness of *TaDreb-B1* and *I-FEH w3* KASP markers in spring and winter wheat populations for marker-assisted selection to improve drought tolerance [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2023, 24(10): 8986.
- [15] MOHAMED E A, AHMED A A M, SCHIERENBECK M, et al. Screening spring wheat genotypes for *TaDreb-B1* and *Fehw3* genes under severe drought stress at the germination stage using KASP technology [J]. *Genes*, 2023, 14(2): 373.
- [16] IQBAL A, BOCIAN J, PRZYBOROWSKI M, et al. Are TaNAC transcription factors involved in promoting wheat yield by cis-regulation of *TaCKX* gene family [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(4): 2027.
- [17] SHI C L, ZOU W L, LIU X P, et al. Programmable RNA N⁶-methyladenosine editing with CRISPR/dCas13a in plants [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2024, 22(7): 1867.
- [18] QIAO L Y, CHANG L F, KAI M X, et al. Exploring drought resistance genes from the roots of the wheat cultivar Yunhan 1818 [J]. *International Journal of Molecular Sciences*, 2024, 25(24): 13458.
- [19] SONG M G, ZHAO J W, ZHANG C J, et al. PEA-m⁶A: An ensemble learning framework for accurately predicting N⁶-methyladenosine modifications in plants [J]. *Plant Physiology*, 2024, 195(2): 1200.
- [20] HUANG W Y, HU X N, REN Y L, et al. IPOP: An integrative plant multi-omics platform for cross-species comparison and evolutionary study [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2023, 40(12): msad248.
- [21] ZHAO J W, ZHANG C J, LI S F, et al. Changes in m⁶A RNA methylation are associated with male sterility in wolfberry [J]. *BMC Plant Biology*, 2023, 23(1): 456.
- [22] MIAO Z Y, ZHANG T, XIE B, et al. Evolutionary implications of the RNA N⁶-methyladenosine methylome in plants [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2022, 39(1): msab299.
- [23] WEI L H, SONG P Z, WANG Y, et al. The m⁶A reader ECT2 controls trichome morphology by affecting mRNA stability in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell*, 2018, 30(5): 968.
- [24] LIU W S, SIKORA E, PARK S W. Plant growth-promoting rhizobacterium, *Paenibacillus polymyxa* CRI upregulates dehydration-responsive genes, RD29A and RD29B during priming drought tolerance in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 2020, 156: 146.
- [25] ZHOU Y, HU L F, JIANG L W, et al. Genome-wide identification and expression analysis of YTH domain-containing RNA-binding protein family in cucumber (*Cucumis sativus*) [J]. *Genes & Genomics*, 2018, 40(6): 579.
- [26] ARRIBAS-HERNÁNDEZ L, SIMONINI S, HANSEN M H, et al. Recurrent requirement for the m⁶A-ECT2/ECT3/ECT4 axis in the control of cell proliferation during plant organogenesis [J]. *Development*, 2020, 147(14): dev189134.
- [27] HUNT A G. CPSF30-L: A direct connection between mRNA polyadenylation and m⁶A RNA modification in plants [J]. *Molecular Plant*, 2021, 14(5): 711.
- [28] CUI S, SONG P Z, WANG C L, et al. The RNA binding protein EHD6 recruits the m⁶A reader YTH07 and sequesters OsCOL4 mRNA into phase-separated ribonucleoprotein condensates to promote rice flowering [J]. *Molecular Plant*, 2024, 17(6): 935.
- [29] SONG P Z, YANG J B, WANG C L, et al. *Arabidopsis* N⁶-methyladenosine reader CPSF30-L recognizes FUE signals to control polyadenylation site choice in liquid-like nuclear bodies [J]. *Molecular Plant*, 2021, 14(4): 571.
- [30] SHI Y L, FAN S Q, WU M G, et al. YTHDF1 links hypoxia adaptation and non-small cell lung cancer progression [J]. *Nature Communications*, 2019, 10(1): 4892.
- [31] WU X W, SU T T, ZHANG S Y, et al. N⁶-methyladenosine-mediated feedback regulation of abscisic acid perception via phase-separated ECT8 condensates in *Arabidopsis* [J]. *Nature Plants*, 2024, 10(3): 469.