

浙江大学 2025-2026 学年 夏 学期

《分子生物学及实验》实验报告

学生姓名：XXX 专业：生物科学（强基计划） 学号：_____

课程名称：分子生物学及实验 课程号：BIO2029M

同组学生姓名：XXX 指导老师：应颖慧

提交日期：2026 年 6 月 20 日

成绩	
评语	
评阅人	

水稻磷调控 SPX1 与 PHR2 蛋白互作

与分子生物学实验探究

摘要

磷是植物生长必需大量元素，SPX1-PHR2 是调控水稻缺磷响应的核心蛋白模块。为探究 *OsSPX1*、*OsPHR2* 基因在水稻根、叶组织的表达差异及二者蛋白互作关系，本实验以水稻幼苗为材料，综合运用 RNA 提取、逆转录、同源重组载体构建、RT-qPCR、酵母双杂交（Y2H）与双分子荧光互补（BiFC）系列分子生物学技术开展验证。结果显示，水稻叶片中 *OsSPX1* 与 *OsPHR2* 基因相对表达量显著高于根部，该表达规律与公共数据库参考数据存在差异；酵母双杂交筛选结果表明共转化 pGADT7-*OsSPX1* 与 pGBKT7-*OsPHR2C* 的酵母可在四缺筛选培养基正常生长，BiFC 荧光观察证实二者在烟草细胞核内存在荧光信号叠加，两种方法共同证明 SPX1 与 PHR2 存在直接蛋白互作。本实验完整搭建了水稻磷信号关键基因表达与蛋白互作验证体系，证实 SPX1-PHR2 互作调控通路在水稻中保守存在，同时发现 *OsSPX1* 组织表达模式与已有数据库结果存在出入，为后续深入解析水稻磷稳态调控机制、培育磷高效利用水稻品种提供实验依据与新思路。

关键词

磷信号，水稻，SPX1，PHR2，蛋白互作，RT-qPCR

Abstract

Phosphorus is an essential macronutrient for plant growth, and the SPX1-PHR2 complex acts as the core protein module regulating the phosphate starvation response in rice. To explore the differential expression of the OsSPX1 and OsPHR2 genes in rice root and leaf tissues, as well as the protein interaction between their encoded products, rice seedlings were used as experimental materials, and a suite of molecular biology techniques including total RNA extraction, reverse transcription, homologous recombination vector construction, RT-qPCR, yeast two-hybrid (Y2H) assay and bimolecular fluorescence complementation (BiFC) were adopted for functional verification. The results revealed that the relative expression levels of OsSPX1 and OsPHR2 were significantly higher in rice leaves than in roots, which was inconsistent with the reference data from public databases. Yeast two-hybrid screening demonstrated that yeast cells co-transformed with pGADT7-OsSPX1 and pGBKT7-OsPHR2C could grow normally on quadruple dropout selective medium. Fluorescence observation via BiFC further confirmed overlapping fluorescent signals of the two proteins in the nuclei of tobacco cells. Combined results from the two assays verified a direct physical interaction between SPX1 and PHR2 proteins. This experiment established a complete experimental system for analyzing the expression of key genes involved in rice phosphate signaling and verifying protein-protein interactions. It confirmed the conserved existence of the SPX1-PHR2 interaction regulatory pathway in rice, and meanwhile identified discrepancies between the tissue expression pattern of OsSPX1 and previously published database data. This study provides experimental evidence and novel insights for further dissecting the regulatory mechanism of phosphorus homeostasis and breeding rice varieties with high phosphorus utilization efficiency.

Keywords

phosphate signaling; *Oryza sativa*; SPX1; PHR2; protein-protein interaction; RT-qPCR

1 引言

磷（Phosphorus, P）是植物生长发育必需的大量元素，参与能量代谢、核酸合成、信号转导等关键生命过程，而土壤中可被植物直接吸收利用的有效磷含量极低，成为限制农业生产的重要因素。为应对缺磷胁迫，植物进化出一套精密的磷信号调控网络，其中以SPX-PHR模块为核心的转录调控机制是该通路的关键枢纽。

本文旨在根据该核心转录调控机制，运用分子生物学相关实验手段，对SPX1和PHR2蛋白在水稻幼苗根与叶部位的表达进行研究。同时进一步验证两者间的蛋白相互作用，植物组织细胞内作用位置定位。为深入理解植物磷稳态调控机制、培育高效利用磷素的作物品种提供理论基础。

1.1 植物磷信号途径和缺磷响应

SPX蛋白家族是植物体内关键的磷浓度感知元件，也是连接胞内磷稳态与下游信号通路的核心枢纽。植物中的SPX蛋白依据C端结构域组合可划分为四大类：仅包含SPX结构域、包含SPX和EXS结构域、具有SPX和主要促进者超家族结构域以及同时具有SPX和RING型锌指结构域，这种结构多样性决定了它们独特的生化功能和机制作用^[1]。在磷信号通路中，MYB-CC类转录因子PHR是缺磷响应基因的核心激活因子，该蛋白可特异性结合下游磷饥饿诱导基因（PSI genes）启动子上的P1BS顺式作用元件，启动基因转录，进而调控磷转运、磷分解代谢等相关过程。

同时SPX蛋白并非仅发挥单一的磷感知与转录抑制功能，还可作为多功能信号枢纽，参与磷素转运、激素信号交叉互作、氧化胁迫响应等多条通路的调控，将植物磷稳态调控与其他生理过程紧密联系起来^[2]。整体而言，以SPX蛋白为感知起点、PHR转录因子为执行核心的信号通路，调控着植物在不同磷环境下的响应模式。

1.2 植物 SPX1-PHR2 蛋白互作的研究进展

SPX1和PHR2蛋白是植物对磷元素缺乏响应的关键蛋白，研究表明，二者通过动态互作调控磷代谢与吸收途径。PHR2作为MYB-CC家族转录因子，是磷饥饿响应的核心激活因子，其功能的发挥依赖于对下游靶基因启动子中P1BS顺式元件的识别与结合，而SPX1蛋白则是其活性的直接负调控因子，二者的互作模式完全由胞内磷信号分子浓度决定。在磷充足的条件下，胞内高浓度的无机磷与磷酸肌醇结合SPX1蛋白的保守结构域，

诱导其发生构象变化，能够与PHR2蛋白互作形成稳定复合物，占据PHR2的DNA结合区域，使其无法识别并结合P1BS元件。如下则为不同磷环境下SPX1与PHR2互作情况调控下游磷饥饿诱导基因的转录。

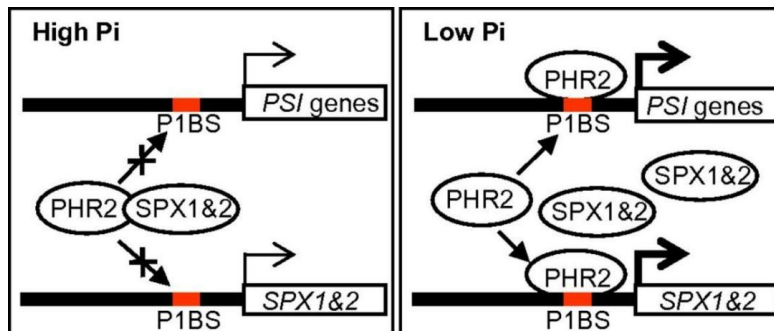


图 1. 水稻 SPX1/2 与 PHR2 蛋白互作响应胞内磷酸盐浓度的缺磷诱导转录激活模型^[3]。高磷条件下，SPX1/2 蛋白与 PHR2 转录因子互作使其无法与 P1BS 位点结合。低磷条件下，两者不互作，PHR2 可识别并结合 P1BS 位点，激活磷饥饿诱导（PSI）基因的表达。

近年研究对水稻SPX1-PHR2复合物的晶体结构解析，进一步从原子层面阐明了这一互作的分子机制。InsP6分子作为中间连接，同时与SPX1和PHR2的关键位点结合，诱导二者构象适配并形成稳定互作界面，这一过程直接阻碍了PHR2的DNA结合活性^[4]。

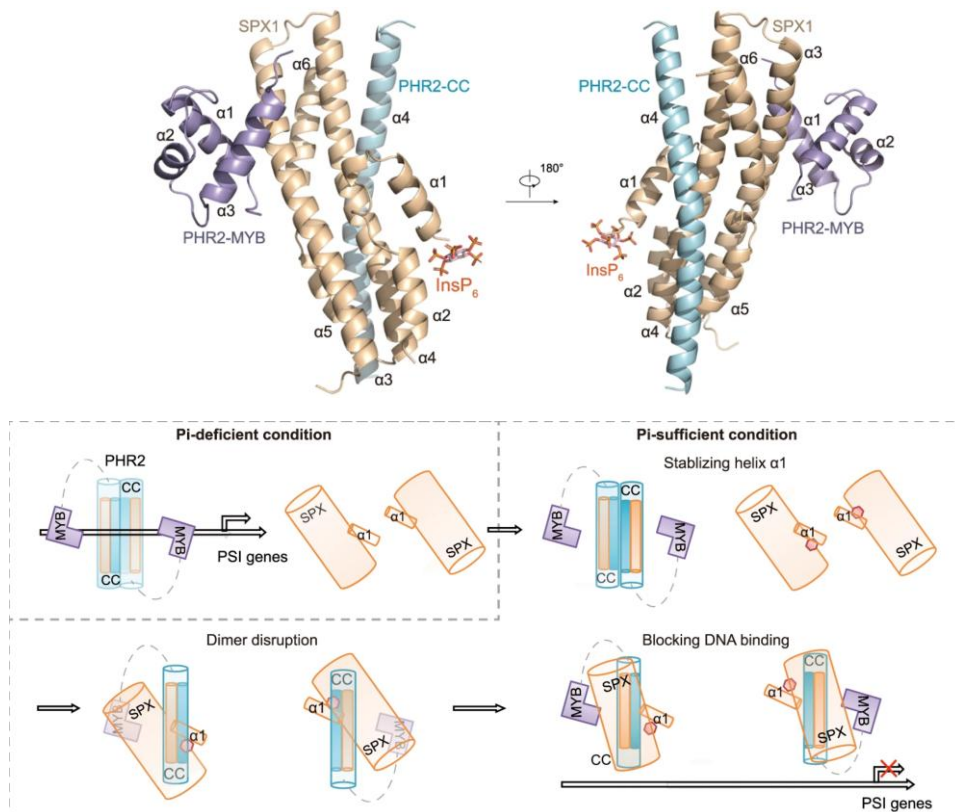


图 2. InsP 的晶体结构 6-SPX1-PHR2 复合物图示及 SPX1-PHR2 蛋白互作空间模型^[4]

1.3 主要实验技术原理

1.3.1 实时荧光定量 PCR

实时荧光定量 PCR (qPCR) 依托传统聚合酶链式反应的核酸体外扩增原理, 在反应体系中加入荧光基团, 随着 PCR 扩增循环不断进行, 目的基因片段呈指数级增长, 体系内荧光信号强度也会同步累积增强, 仪器可实时监测每一个循环的荧光信号变化并绘制扩增曲线; 通过对比样本荧光信号达到设定阈值时对应的循环数 (Ct 值), 结合已知浓度标准品构建的标准曲线, 便能精准对样本中的目标核酸模板进行定性分析与定量检测, 该技术兼具灵敏度高、特异性强、检测快速的特点, 被广泛应用于基因表达量分析、病原体检测、核酸拷贝数鉴定等领域。

1.3.2 分子克隆 (同源重组)

同源重组法分子克隆依托 DNA 片段间序列同源互补的特性实现载体与目的片段的精准拼接, 首先通过 PCR 扩增获得两端携带与线性化载体末端同源序列的目的基因片段, 再将线性载体和目的片段置于重组酶反应体系中, 重组酶可识别并催化同源序列发生配对、链交换与连接反应, 使目的片段无缝插入载体骨架形成完整重组质粒, 随后将重组产物转入感受态细胞进行扩增, 最终通过筛选、鉴定获得阳性克隆; 该方法无需限制性内切酶酶切位点限制, 操作简便、重组效率高、片段连接精准。

1.3.2 酵母双杂 Y2H

酵母双杂交技术基于转录因子的功能拆分原理开展实验, 转录因子通常包含 DNA 结合域与转录激活域, 两个结构域单独存在时均无法启动下游报告基因表达, 只有二者在空间上靠近并重新结合才能恢复转录活性; 实验中将待研究的两种蛋白分别与这两个结构域融合表达, 若两种蛋白在酵母细胞内发生相互作用, 就会带动两个结构域靠近组装为完整转录因子, 进而激活报告基因转录表达, 通过观察报告基因的表型即可判断蛋白间是否存在互作, 该技术可在活细胞内筛选并验证蛋白相互作用。

1.4 本实验的研究目的

本实验旨在基于现有植物体内磷信号途径与缺磷响应研究, 选取水稻作为研究对象, 探究水稻对缺磷响应的关键蛋白 SPX1 和 PHR2 在根与叶部位的表达差异, 以及蛋白作用部位。综合采取多种分子生物学实验手段如实时荧光定量 PCR、酵母双杂交技术和双分子荧光互补等, 多角度对 SPX1 和 PHR2 蛋白的表达、互作进行探究。同时依托此实验流

程，对常规分子生物学实验如质粒的提取、同源重组和重组质粒的转化进行训练，熟悉实验原理和实验流程。

2 材料与方法

2.1 实验材料

分别含有pGADT7-Rec、pGBKT7和pGBKT7-Lam质粒的大肠杆菌

水稻幼苗（取根组织和叶组织）

DH5 α 感受态细胞

Y2HGold感受态细胞

EHA105菌株

5~7周本氏烟草

2.2 实验方案

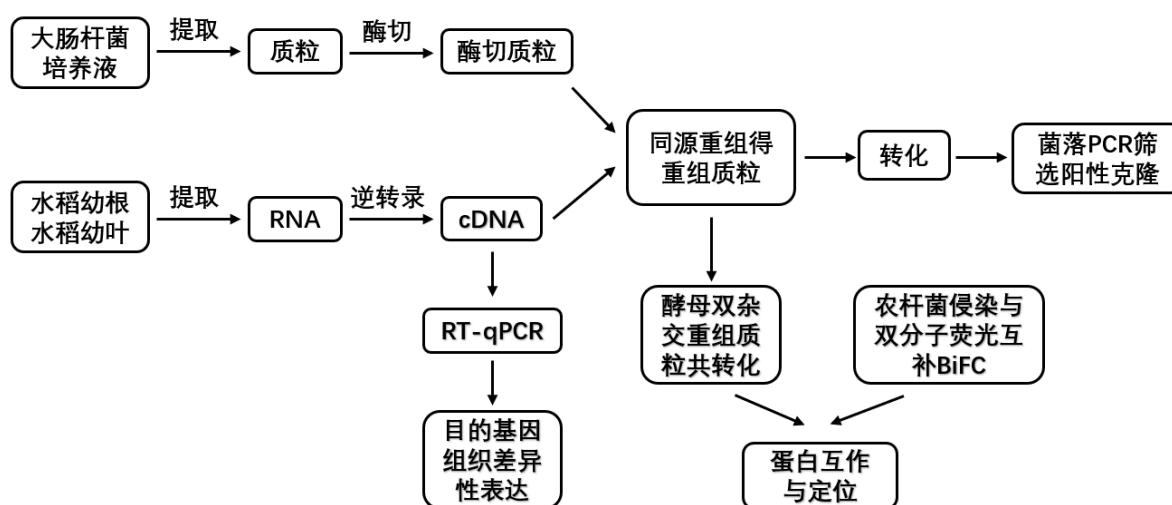


图 2. 水稻 *SPX1* 基因差异表达与 *SPX1*-*PHR2* 蛋白互作实验流程图

2.3 实验方法

2.3.1 水稻总 RNA 提取与鉴定及逆转录

RNA提取：分别取适量剪碎后（约1cm小段）的水稻幼嫩叶片（40~60mg）和根组织（80~120mg），液氮冷冻后使用组织研磨仪对样品研磨。再选取TIANGEN牌RNA Easy Fast植物组织RNA快速提取试剂盒，按照说明书规范步骤完成对组织样品总RNA的提取。

将得到的RNA样品进行Nanodrop测定浓度和琼脂糖凝胶电泳检测质量，检测是否存在gDNA污染或降解。

逆转录：将提取的水稻总RNA按照HiScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (+gDNA wiper)试剂盒说明书取1 μ g在0.2ml的RNase-free离心管中配制逆转录体系，先在42℃进行2min以去除基因组DNA，再混合10 $\times$ RT Mix加入到含2 μ l酶的PCR管中，全程冰上操作完成cDNA合成反应液配制。用移液器轻轻吹打混匀后使用PCR仪进行逆转录反应程序，50℃下15min，85℃下2min，最后降温至4℃完成逆转录反应。

2.3.2 酵母双杂载体质粒的提取

选取 pGBKT7-Lam 质粒作为阳/阴性对照载体，大肠杆菌培养液作为原料提取载体质粒 pGBKT7、pGADT7-Rec，使用 TIANprep Mini Plasmid Kit 试剂盒并按照说明书规范步骤对大肠杆菌菌液的质粒进行提取和纯化。将提取得到的 3 份载体质粒样品进行 Nanodrop 测定浓度。随后选取 Thermo Scientific FastDigest EcoRI and NdeI 试剂盒完成提取质粒 pGBKT7、pGADT7-Rec 的酶切处理，将得到的 3 个酶切前 pDNA 和 2 个酶切后 pDNA 进行琼脂糖凝胶电泳，观测酶切情况。

2.3.3 酵母双杂重组质粒的构建

将逆转录得到的组织样品 cDNA 按照 2 $\times$ Rapid Taq mix 试剂盒规范操作，完成两管 PCR 反应体系的构建，并分别在退火温度为 56℃ 和 58℃ 进行 *PHR2C* 和 *SPX1* 目的 cDNA 片段的扩增。扩增后的样品进行琼脂糖凝胶电泳，确定扩增情况。再使用 TIANquick Midi Purification Kit 试剂盒按照操作步骤完成酶切处理后 pGBKT7、pGADT7-Rec 质粒、扩增后 cDNA 片段的纯化回收。最后根据 ClonExpress II One Step Cloning 说明配制重组反应体系，并确保载体与插入片段摩尔比为 1:2，最后 PCR 仪 37℃ 反应 30min 后降至 4℃，完成 *SPX1* 基因插入 pGADT7-Rec 质粒和 *PHR2C* 基因插入 pGADT7-Rec 质粒的重组质粒构建。

2.3.4 荧光实时定量 PCR (RT-qPCR)

按照ChamQ SYBR Color qPCR Master Mix (Without ROX)试剂盒操作流程，将先前水稻根与叶分别提取并制备获得的cDNA样品稀释10倍，再在冰上配制qPCR反应体系，做好标记。选取OsACT1基因作为内参基因，OsSPX1基因作为探究对象，分别在根和叶

来源的cDNA中进行qPCR操作。将配制的反应体系在96孔qPCR平板中加样，放入qPCR仪内，启动程序进行扩增。

2.3.5 重组质粒的转化与菌落 PCR

重组质粒的转化：选取DH5 α 菌株作为感受态细胞，按照DH5 α 化学感受态细胞试剂盒说明书规范操作进行感受态细胞的复苏、pGADT7-OsSPX1和pGBKT7-OsPHR2C质粒的分别转化。向将初步转化的产物离心管中加入400 μ l LB培养液(不含抗生素)，混匀后置于37 $^{\circ}$ C，200rpm摇床中复苏45~60min。再5,000rpm离心2min，弃掉350 μ l上清，用剩余培养基将菌体重悬后，均匀涂布在含相应抗生素的LB固体培养基平板上。倒置平板，做好标记，37 $^{\circ}$ C过夜培养。

菌落PCR：观察两个质粒转化后各自的涂布平板菌落生长情况，用白色吸头各挑取4个单克隆放入PCR管内，反复吸打混匀后弃去吸头，盖好管盖，做好标记。PCR反应管放入PCR仪内，启动程序进行扩增。扩增结束后分别取10 μ l的PCR反应产物进行琼脂糖凝胶电泳，记录结果。

2.3.6 酵母双杂交

参考Matchmaker $^{\circledR}$ Gold Yeast Two-Hybrid System User Manual进行酵母双杂交实验操作，选取pGADT7-Rec质粒、pGBKT7质粒及其分别构建的OsSPX1基因、OsPHR2C基因质粒和pGADT7-RecT、pGBKT7-53、pGBKT7-Lam作为原料，Y2Hgold为实验所用的酵母细胞。按照分组操作将培养液分别涂布于DDO（二缺）和QDO（四缺）筛选培养基，28~30 $^{\circ}$ C倒置培养4-6天。平板生长4-6天之后，及时拍照记录酵母细胞生长情况。

2.3.7 农杆菌侵染与双分子荧光互补（BiFC）

选取转化相应载体后表达SPX1-GFP、PHR2-YN、SPX1-YC和YC (YFPC)的农杆菌重悬制备，用10 mL 1/2 MS basal medium重悬后离心收集菌体。再重悬后测得吸光度OD600，计算体积调整菌液吸光值在0.8左右。选取完全展开的从上至下2-4片烟草叶片，用注射器在叶片背面轻轻扎几个小孔，再用去掉针头的注射器抽取0.5ml左右的菌液，在烟草叶背面注射菌液至扩散到几乎整个叶片。继续培养2-3 d，取叶片，背面朝上制片，用于观察亚细胞定位情况，使用荧光显微镜观察烟草叶片（背面）中的荧光融合蛋白的亚细胞定位。

3 实验结果

3.1 水稻叶片和根 RNA 的提取与逆转录

本实验首先选取水稻幼苗的叶片和根部提取RNA后，对得到的样品RNA采用NanoDrop光度计测定了浓度，根部提取的RNA为476.7ng/μl，A260/A280比值为2.05，叶片提取的RNA为920.4ng/μl，A260/A280比值为2.15，初步判断提取的样品合理且纯度较高。得到的样品再进行琼脂糖凝胶电泳，如图3A可见样品得到的18S rRNA与28S rRNA条带均十分清晰，并且可观察到较浅的5S rRNA条带。表明RNA提取结果理想，能够进行后续逆转录得到cDNA 等操作。

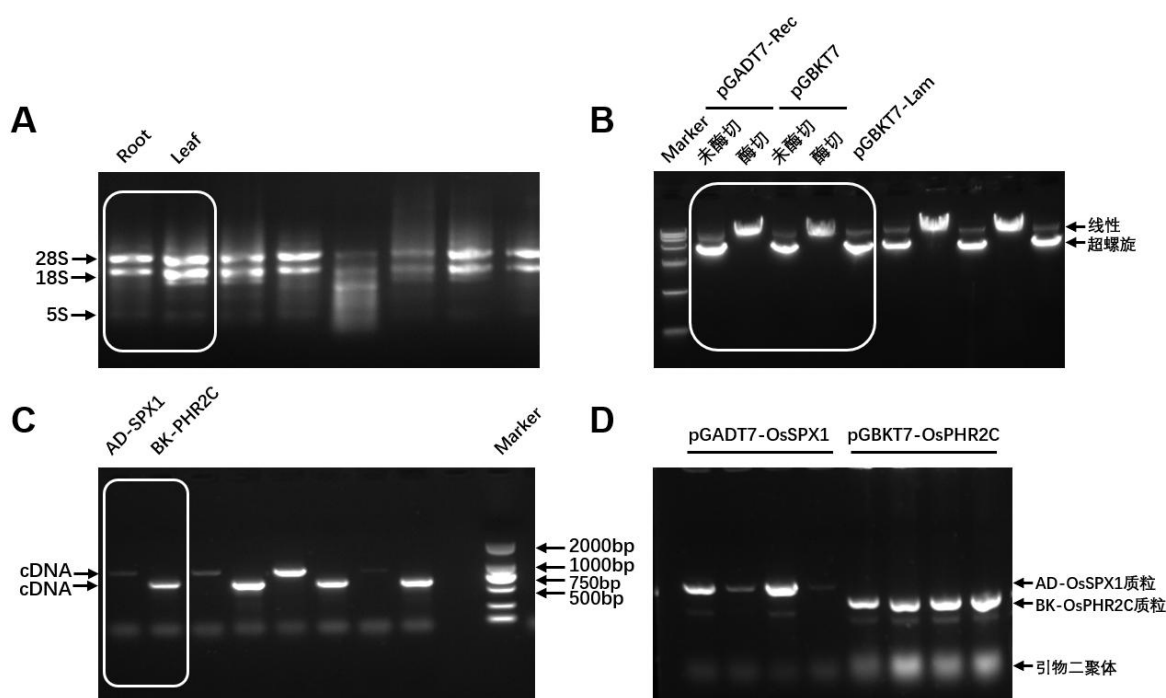


图3. 琼脂糖凝胶电泳综合图

(A) 根部和叶片RNA提取结果图；(B) 酶切与未酶切的质粒电泳图；

(C) cDNA电泳结果图；(D) 转化后单菌落PCR电泳结果图

3.2 酵母双杂载体质粒的提取

使用大肠杆菌培养液提取得到载体质粒pGBKT7、pGADT7-Rec，并使用内切酶EcoRI、NdeI对载体质粒酶切。将未酶切与酶切后的两种载体质粒和pGBKT7-Lam质粒进行琼脂糖凝胶电泳，可见结果如图3B。未酶切的质粒均呈现出两条条带，这是由于环状质粒呈现线性、超螺旋等不同结构，展现出不同的迁移速率，实验结果理想且符

合预期。而酶切后的质粒均呈现出明显的一条条带且高于未酶切的质粒条带，这是酶切后的质粒均开环呈一条线性DNA，结构单一且迁移速率更慢。表明载体质粒均能正确地酶切，可适用于后续的重组质粒构建。

3.3 酵母双杂重组质粒的构建与鉴定

通过纯化的样品RNA逆转录得到cDNA后，选取目的基因*SPX1*和*PHR2C*的引物进一步分别对目标基因进行PCR扩增，再对扩增后的cDNA进行琼脂糖凝胶电泳，结果如图3C，可见*SPX1*基因呈现较浅的条带，而*PHR2C*基因条带更加清晰明显。且*SPX1*条带位于约1000bp处，*PHR2C*条带位于500~750bp间，这与*SPX1*基因片段的930bp，*PHR2C*基因片段的630bp实际是相符合的，表明cDNA扩增结果很好，符合实验预期，可用于后续的重组质粒构建。

3.4 目的基因在水稻叶片和根中的差异表达

本次实验本组选取*OsSPX1*作为目的基因，*OsACT1*作为内参基因，探究水稻幼根与幼叶中*SPX1*基因转录水平差异，同时选取其他小组的*PHR2*基因作图。根据RT-qPCR结

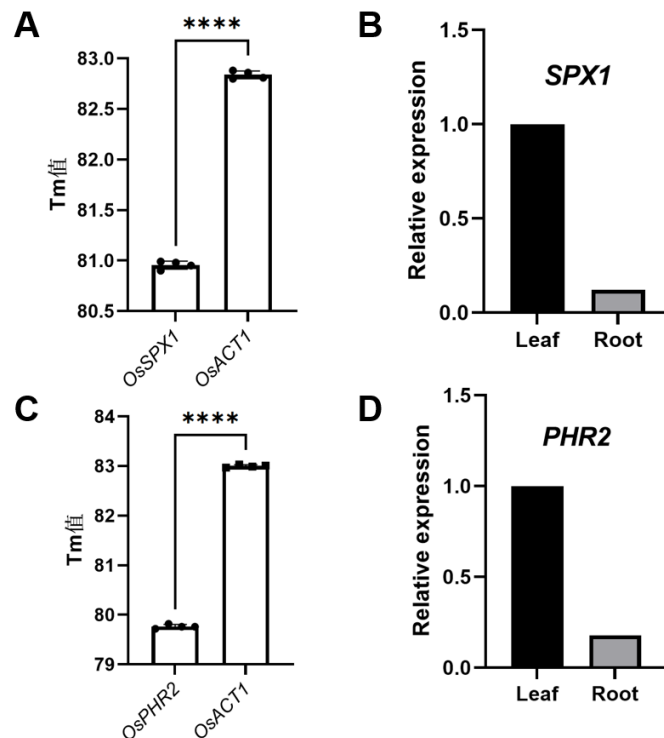


图4. *SPX1*、*PHR2*基因RT-qPCR综合结果作图

(A、C) *OsSPX1*、*OsPHR2*基因分别与内参基因Tm值比较；

(B、D) *OsSPX1*、*OsPHR2*基因在根、叶组织中相对差异表达量

果（附录-表2），分别分析*OsSPX1*、*OsPHR2*两基因在水稻幼根和幼叶中表达情况。首先绘制两基因与内参基因扩增过程中Tm值（图4A、图4C）柱状图可见，每组基因的Tm值均十分接近，并且与内参基因组之间存在显著差异，表明扩增结果理想，得到的产物是扩增的目的产物，可以使用结果进一步进行组织差异表达分析。计算并完成相对差异表达结果（图4B、图4D）可知，叶组织表达的SPX1和PHR2都显著高于根组织，实验结果理想且符合预期。

3.5 酵母双杂验证 SPX1-PHR2 蛋白互作

本实验为了进一步验证SPX1和PHR2蛋白间的互作，首先将先前得到的酶切质粒进行*OsSPX1*和*OsPHR2*基因的无缝连接得到重组质粒，随后将重组质粒转化到感受态DH5 α 菌株中，再涂布到含抗生素的平板上，得到培养结果（图5）。可见得到许多单个菌落，并且菌落大小均一，形态颜色一致，无杂菌污染。再分别挑去4个单菌落进行菌液PCR，琼脂糖电泳结果（图3D）可见，*OsSPX1*、*OsPHR2*基因连接的重组质粒均出现明显条带，可见扩增结果好，能得到重组质粒进一步提取用于酵母双杂交实验。



图5. 重组质粒转化培养生长图

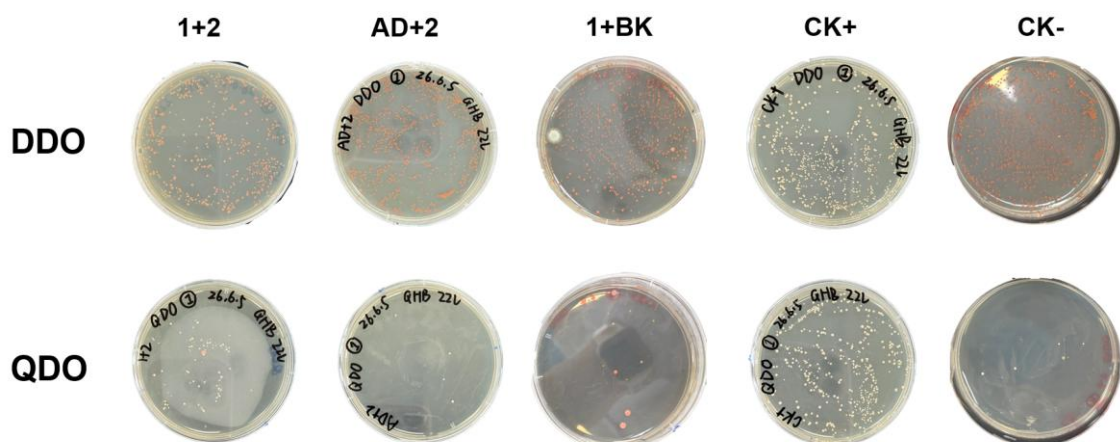


图6. 酵母共转化培养结果

将不同质粒转化的Y2HGold感受态细胞涂布培养在DDO培养基（-Trp-Leu）和QDO培养基（-Trp-Leu-His-Ade）中，得到菌落生长情况（图6）。其中把pGADT7-OsSPX1质粒记为1，pGBKT7-OsPHR2C为2，AD、BK分别代表pGADT7-Rec、pGBKT7。根据培养结果可知，阳性对照组CK+在两个培养基上都长出大量单菌落，而阴性对照组CK-在DDO培养基上长出大量单菌落，在QDO培养基上仅长出零星几个单菌落。1+BK与AD+2组结果均与阴性对照组一致，说明单独的重组质粒产物是无法使酵母细胞在QDO培养基上生长。而1+2重组质粒共转化后的酵母细胞在两个培养基中均长出大量单菌落，表明SPX1与PHR2能相互作用，符合已有文献的蛋白互作结论。

3.6 荧光双分子互补 BiFC 验证 SPX1-PHR2 蛋白互作

在烟草叶片中分别转染一定量携带SPX1-GFP、SPX1-YC、PHR2-YN和YC的农杆菌处理3天左右，取小片背侧叶片在显微镜下观察（图7）。

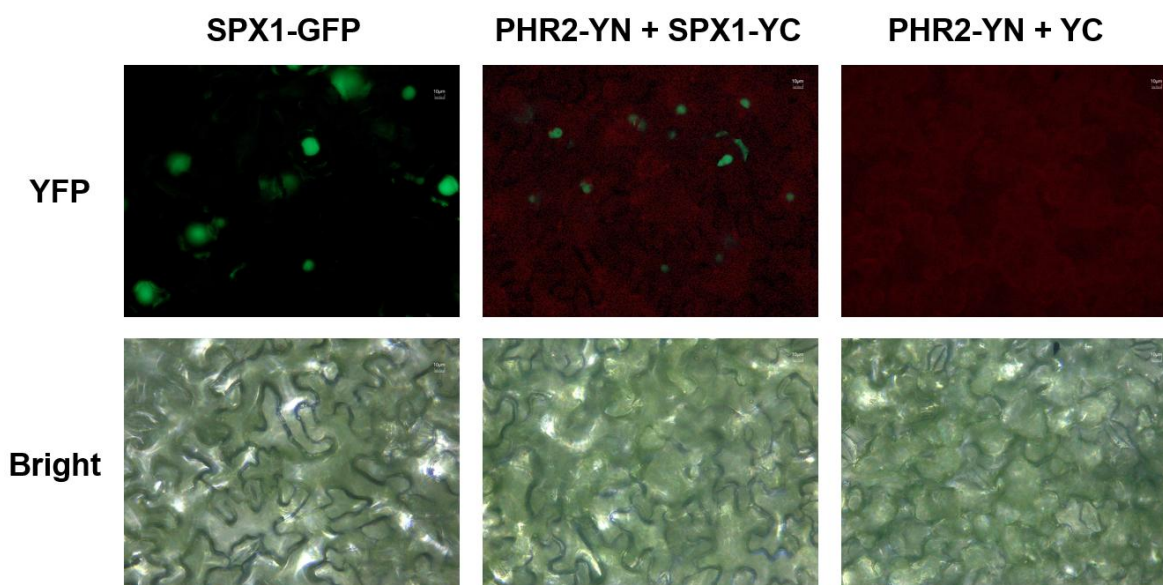


图7. 农杆菌侵染与双分子荧光互补结果

可见，含SPX1-GFP的农杆菌侵染叶片细胞可观察到较多荧光，表明SPX1蛋白作用位置在细胞核里。PHR2-YN+YC组未观察到绿色荧光，表明单独的PHR2蛋白上的YN分子无法与YC分子结合激发产生荧光；而SPX1-YC+PHR2-YN组观察到明显的绿色荧光位于细胞核，验证了SPX1和PHR2蛋白之间存在相互作用，这与酵母双杂交实验结果互为验证，充分说明了SPX1蛋白与PHR2蛋白间互作。

4 讨论

4.1 水稻叶片和根 RNA 的提取与逆转录

本实验提取的水稻叶片和根部RNA电泳结果均可以明显观察到28S和18S rRNA条带，根部略微可达到预期的28S:18S=2:1结果，但是叶部的RNA条带无法观察到明显的比例关系。可能是由于叶部位表达的RNA总量较高导致条带较亮，条带强度观察存在误差；同时观察到叶片中18S条带下方紧接着存在一条颜色较浅的条带，可能是部分杂带，也可能是操作过程中部分18S rRNA发生降解，导致整体观察到的比例关系并不明显。

观察到其他小组的条带也存在上述杂带和比例不明显的情况，可能是实验方法有待改进。可以改进方案，提前灭活内源性的RNase，实验过程中注意口罩和手套的佩戴并规范操作，避免引入外源RNase污染。

4.2 酵母双杂重组质粒的构建与鉴定

逆转录得到cDNA电泳结果中，*PHR2C*条带清晰明显，但*SPX1*条带较浅。可能原因是组织中内源基础转录水平低，所含的*SPX1*的mRNA转录本含量较少，导致逆转录扩增的cDNA含量也较少。要解决这个问题可以选择延长*SPX1*组的扩增反应循环数，扩增得到更多的cDNA拷贝；也可以选择缺磷条件下的植物根或叶组织，其*SPX1*基因转录本更多，能扩增出更多cDNA。还有可能是*SPX1*的mRNA稳定性不高，反复冻融和实验操作中发生部分降解，可检测mRNA稳定性。用放线菌素D处理阻断新转录，检测两个基因mRNA的降解速率，判断*SPX1*是否mRNA半衰期更短。

而菌落PCR结果（图3D）中，pGADT7-OsSPX1质粒扩增电泳结果在第一、三泳道条带明显，第二、四泳道条带较浅，尤其是第四泳道难以观察到条带。本组认为可能是在挑选单菌落的时候所选取的菌落含量不一致，导致条带出现差异；也可能是该菌落自身所含pGADT7-OsSPX1质粒转化含量较低。要明确具体原因，改进方案可采取挑取培养基表面部分未长出菌落的培养基进行菌落PCR再电泳，作为阴性对照，明确该条带较浅是否为阴性结果，还是转化较少所导致的。

此外，实验过程中还应注意操作规范，逆转录的引物使用前是否解动完全并混匀，以及提取得到的样品mRNA是否吹打混匀，避免实验操作不规范导致的扩增cDNA含量较低。

4.3 目的基因在水稻叶片和根中的差异表达

本次实验通过RT-qPCR结果知水稻幼叶中表达的*OsSPX1*和*OsPHR2*基因显著高于幼根中的表达，但是查阅ePlant水稻基因组数据可视化平台，得到*OsSPX1*和*OsPHR2*基因不同部位和组织的表达量热图（图8）可知，水稻幼苗根中的*OsSPX1*基因表达量高于幼叶中表达量；而水稻幼苗根中的*OsPHR2*基因表达量低于幼叶中表达量。

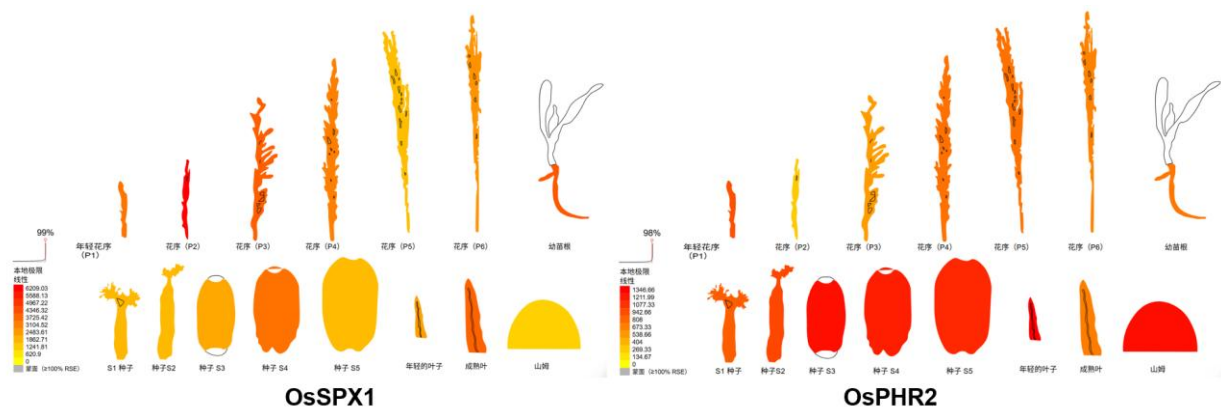


图8. *SPX1*、*PHR2*基因部位差异表达热图

实验得到的*OsSPX1*基因幼根、幼叶表达量差异与在线平台结果相反，考虑到实验操作问题，本组对本课程其他小组的*SPX1*基因RT-qPCR结果进行处理分析（图9），根

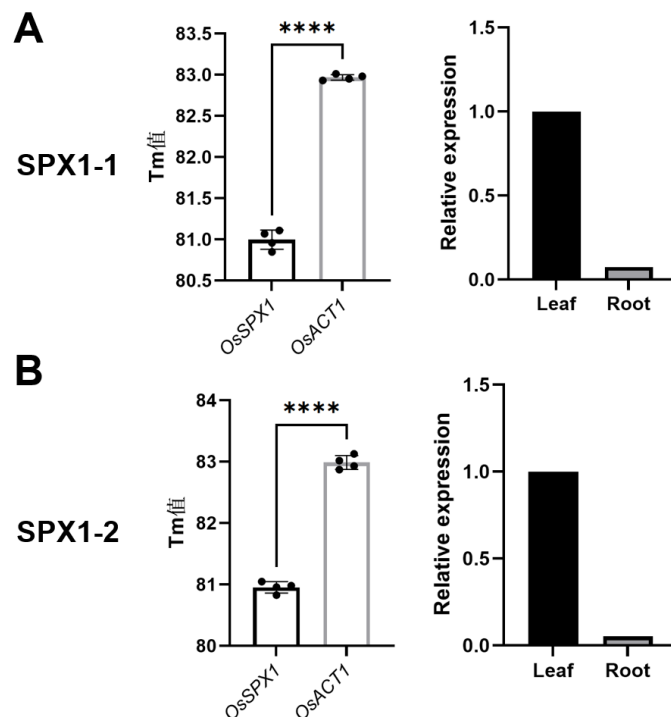


图9. 其他两小组*SPX1*基因RT-qPCR综合结果作图

（A）（B）两图分别代表两不同的小组结果作图

据其他组结果可见，幼根部表达的*SPX1*基因依旧低于幼叶部，由此可排除实验操作造成的差异。若要进一步探究具体的表达差异，可选取不同生长期龄的水稻苗进行RT-qPCR实验，同时线上基因组表达还需分析更多的组织样本的转录本数据，得到更全面的表达差异热图，避免单一或少量数据集带来的偏差。

4.4 SPX1 和 PHR2 蛋白互作结果

本实验通过酵母双杂交和BiFC共同验证了SPX1和PHR2蛋白间的相互作用，酵母双杂交结果较好（图6），但1+2同时处理的转化细胞接种在QDO培养基上长出的菌落数目略少于DDO培养基上长出的菌落数目，可能原因是存在部分感受态细胞转化的质粒可能是空载体或含量不均一，但整体而言不影响最终结论。要进一步探究两蛋白之间的互作还可选取Co-IP进行深入探究，将PHR2-FLAG和SPX1-MYC在烟草叶片中共同表达，然后使用抗FLAG抗体进行免疫沉淀，检测沉淀下来的复合物中同时存在SPX1-MYC，进一步说明SPX1与PHR2蛋白的互作。

5 结论与展望

本实验通过运用分子生物学相关技术，从质粒的提取开始，构建重组质粒，转化感受态细胞，成功制备并完成了水稻*OsSPX1*和*OsPHR2*基因提取和质粒构建，为后续的进一步探究SPX1与PHR2蛋白相互作用奠定了基础。整体而言，本实验结果很理想，符合实验预期。酵母双杂交和荧光双分子互补法（BiFC）实验成功证明了SPX1与PHR2之间的直接相互作用，为进一步了解水稻磷信号途径的分子机制提供了有力的支持。

在探究水稻不同部位的基因表达量中，实验结果表明*OsSPX1*基因在水稻幼叶部位表达量显著高于根部，这与现有相关数据结果存在偏差，可以作为切入点进一步确定水稻生长周期中，*OsSPX1*基因在不同部位的表达变化及机制，完善水稻不同生长阶段对P元素的需求。此外，根据现有的研究进展，后续研究可聚焦SPX与PHR蛋白家族是否对磷信号存在新的互作调控机制，以及对不同磷信号的响应和调控网络模式，进而为探索农作物高效对磷的利用，农业生产的可持续发展做出理论贡献。

6 附录:

附录-表1 逆转录反应体系

步骤	试剂 / 材料	用量
基因组DNA去除	Oligo(dT) ₂₃ VN (50 μM)	1 μl
	Random hexamers (50ng/μl)	1 μl
	4×gDNA wiper Mix	4 μl
	Total RNA (Leaf or Root, 每组两个样品)	1 μg
配制第一链cDNA合成 反应液	混合液	16 μl
	10×RT Mix	2 μl
	HiScript II Enzyme Mix	2 μl
第一链cDNA合成反应	反应程序	50°C 15 min; 85°C 2 min; 降温至 4°C

附录-表2 RT-qPCR反应原始数据与 ΔCt 计算

	Ct值	阈值	Tm值			AVE	根ΔCt	叶ΔCt
OsSPX1	23.764	0.1	82.8	叶	内参	23.732	5.9335	2.8965
	23.7	0.1	82.81					
	20.399	0.1	82.86	根	SPX1	20.392		
	20.385	0.1	82.88					
	26.758	0.1	80.95	叶	SPX1	26.6285		
	26.499	0.1	80.98					
	26.328	0.1	80.99	根	SPX1	26.3255		
	26.323	0.1	80.9					
OsPHR2	22.155	0.1	82.99	叶	内参	22.088	3.0735	0.594
	22.021	0.1	82.97					
	20.639	0.1	83.03	根	PHR2	20.634		
	20.629	0.1	83.01					
	22.688	0.1	79.76	叶	PHR2	22.682		
	22.676	0.1	79.82					
	23.688	0.1	79.76	根	PHR2	23.7075		
	23.727	0.1	79.72					

附录-表3 序列与引物信息

Y2H Primers	5'-3' sequences	Amplicon length	Backbone Vector	RE sites
BK-PHR2C-F	<u>tcagaggaggac</u> ctgcatATGGCAGTTGCTATACCTCGCCCTC	594+ 39bp	pGBKT7	NdeI + EcoRI
BK-PHR2C-R	<u>tcgacggatcccc</u> gggaattcTTATCTGTACCTGATTCTGTTTGT			
AD-SPX1-F	<u>gtaccagattac</u> gctcatATGAAGTTTGGGAAGAGCCTGAG	888+ 39bp	pGADT7- Rec	
AD-SPX1-R	<u>accactgcttgg</u> gtggaattcTCATTGCGGCCTGCTCAATCAC			

参考文献

[1]Ge, S., Yuan, K. & Lei, M. The SPX protein family in plants: from phosphate sensors to multifunctional signaling hubs. Stress Biology 6, 36 (2026).

[3]Zhu J, Lau K, Puschmann R et al (2019) Two bifunctional inositol pyrophosphate kinases/phosphatases control plant phosphate homeostasis. Elife 8:e43582.

[3] Wang, Z., Ruan, W., Shi, J., Zhang, L., Xiang, D., Yang, C., Li, C., Wu, Z., Liu, Y., Yu, Y., Shou, H., Mo, X., Mao, C., and Wu, P. (2014) Rice SPX1 and SPX2 inhibit phosphate starvation responses through interacting with PHR2 in a phosphate-dependent manner, Proc Natl Acad Sci U S A 111, 14953-14958.

[4] Zhou, J., Hu, Q., Xiao, X. et al. Mechanism of phosphate sensing and signaling revealed by rice SPX1-PHR2 complex structure. Nat Commun 12, 7040 (2021).