

doi:10.3788/gzxb20134205.0559

He-Ne 激光和增强 UV-B 辐射对小麦 TaRAN1 蛋白的影响

毛晓芳, 韩榕

(山西师范大学 生命科学学院, 山西 临汾 041004)

摘 要: 采用 He-Ne 激光($5 \text{ mW} \cdot \text{mm}^{-2}$)和增强 UV-B($10.08 \text{ kJ} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$)辐照‘ML7113’小麦幼苗, 6 天后提取各处理组小麦幼苗的总蛋白和 TaRAN1 蛋白, 用 SDS-PAGE 对其进行初步检测及 Western Blot 对目的蛋白进行鉴定, 并采用考马斯亮蓝法测量不同处理组的 TaRAN1 蛋白的含量以做进一步的比较分析. 结果表明: 增强 UV-B 辐射使小麦 TaRAN1 蛋白电泳条带加宽颜色加深且含量显著增加; 单独 He-Ne 激光处理, 蛋白电泳条带较窄颜色较淡且所测的蛋白含量明显减少, 表现出了抑制作用; 经 He-Ne 激光辐照和 UV-B 辐射复合处理后, 蛋白的含量明显低于 B 组而与对照组相差不明显. 说明增强 UV-B 辐射后, 小麦 TaRAN1 蛋白可能参与了植物的抗逆境反应.

关键词: He-Ne 激光; UV-B 辐射; TaRAN1 蛋白; 免疫印迹

中图分类号: Q682

文献标识码: A

文章编号: 1004-4213(2013)05-0559-5

Effects of He-Ne Laser and Enhanced Ultraviolet-B Radiation on TaRAN1 Protein in Wheat

MAO Xiao-fang, HAN Rong

(College of Life Science, Shanxi Normal University, Lin fen, Shanxi 041004, China)

Abstract: When the seedlings of wheat ‘ML7113’ were exposed to both He-Ne laser irradiation ($5 \text{ mW} \cdot \text{mm}^{-2}$) and enhanced UV-B radiated radiation ($10.08 \text{ kJ} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$). 6 days after the extraction of the wheat leaves the total protein and TaRAN1 of protein in each treatment group, identification of target proteins by SDS-PAGE of their conduct the preliminary test and Western Blot and Coomassie brilliant blue method to measure the protein content of four different treatment groups TaRAN1 to do further analysis. The results showed that, enhanced UV-B radiation makes wheat TaRAN1 protein electrophoresis band color deepened and contents increased significantly; Separate He-Ne laser processing, protein electrophoresis with narrow lighter in color and measured the protein content is significantly reduced, showing inhibition; With He-Ne laser irradiation and UV-B after radiation treatment, The protein content was significantly lower than the enhanced UV-B radiation treatment group, while no obvious difference with the control group. Explain the enhanced UV-B radiation, the wheat TaRAN1 protein may be involved in the anti-stress responses of plants.

Key words: He-Ne laser; UV-B radiation; TaRAN1 protein; Western Blot

0 引言

大气臭氧层变薄将导致到达地面的太阳紫外线

B 辐射 (Ultraviolet B radiation, UV-B, $\lambda = 280 \sim 320 \text{ nm}$) 增强, UV-B 辐射增强对地球生命系统有多方面的影响, 特别是植物系统对增强 UV-B 辐射有

基金项目: 国家自然科学基金项目 (No. 30671061) 和山西省自然科学基金项目 (No. 20081101) 资助

第一作者: 毛晓芳 (1987-), 女, 硕士, 主要研究方向为植物细胞学. Email: lfsxfmxf@163.com

导师 (通讯作者): 韩榕 (1962-), 教授, 博士, 主要研究方向为细胞生物学. Email: hhwrsl@yahoo.com.cn

收稿日期: 2012-07-19; 录用日期: 2012-09-26

明显响应. 作为生物有机体重要组分的蛋白质是 UV-B 辐射最为敏感的靶分子之一, 因而会受到 UV-B 辐射的影响, 而目前关于 UV-B 辐射对小麦 Ran 蛋白的影响研究尚少见报道. 随着科学技术的发展, 激光已被大量地应用于很多领域, 如环境监测^[1]、卫星通信^[2]等. 激光在植物研究方面的应用也较为广泛, 如微生物突变株诱变修复^[3]、细胞损伤及修复^[4]、提高酶的活性以及增强植物的抗氧化性^[5]等.

小 G 蛋白 (small G protein) 基因家族包括 Ras、Rab、Rho、Arf 和 Ran 亚家族, 在基因表达、细胞骨架重组、微管的形成以及囊泡和核孔运输机制等方面具有重要的调控作用, 被认为是重要的信号调控分子开关^[6-8]. 小 G 蛋白 Ran 是一种主要分布于细胞核内的蛋白质, 分子量大约为 25 kD^[9], 是细胞中含量最丰富的小 G 蛋白. 人们对动物 Ran 蛋白的功能研究比较多, 它是一种重要的细胞分裂调控因子, 参与调控细胞周期中各个时期的许多生命活动. 如动物 Ran 蛋白在细胞分裂间期定位于核内, 调控核胞质转运、复制、转录加工与运输; 在细胞分裂中后期, 集中在微管和纺锤体上, 调控微管与纺锤体组装; 细胞分裂末期又回到细胞核内, 调控核膜装配^[10-12]. 植物 Ran 与动物 Ran 类似, 可能是一种重要的植物细胞分裂调控因子, 参与调控植物细胞周期中各个时期的许多生命活动, 调控植物细胞核膜重建与装配、DNA 复制、RNA 转录与加工运输、核胞质转运、微管和纺锤体的组装等多种功能^[13].

关于 Ran 的功能研究, 在人体和动物体中得到的研究结果比较多, 在植物中, Ran 的功能研究还处于初级阶段. 由于 Ran 基因的重要作用, 引起了科学工作者的广泛关注, 人们在 Ran 的生理功能、作用方式和表达模式等几个方面取得了一些研究进展. 然而关于植物 Ran 蛋白功能研究报道较少, 其增强 UV-B 辐射和 He-Ne 激光对 Ran 蛋白影响的研究报道更较少, 因此本研究以不同处理组的小麦幼苗叶片为研究对象, 对小麦细胞核内的 Ran 蛋白进行分离提取及含量的测定, 并做 western-blot 对该蛋白进行鉴定, 以确定 He-Ne 激光和增强 UV-B 辐射对小麦幼苗蛋白质代谢及功能的影响, 为进一步研究该蛋白功能奠定了基础.

1 材料和方法

1.1 材料

供试材料为 'ML7113' (Triticum aestivum) 小麦品种, 其种子由山西省农科院小麦研究所提供.

1.2 种子萌发

选取籽粒饱满、大小均匀的小麦种子, 5% 次氯

酸钠消毒 30 min, 清水漂洗. 培养于盛有湿滤纸的培养皿内, 50 粒/皿, 每组 3 次重复, 25℃ 培养至种子露白时待处理.

1.3 种子处理

1.3.1 UV-B 辐射处理

UV-B 发生用 UV-B 灯 (南京华强, 30 W, 297 nm), 将其垂直悬于培养皿的上方, 通过调整 UV-B 灯与植物培养皿之间的距离来控制并同时测量 UV-B 辐射的强度. 剂量采用 $10.08 \text{ kJ} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{d}^{-1}$, 相当于臭氧下降 20%、UV-B 增强 40% 的强度 (RAF = 2.0). 每天处理 8h, 然后转入暗处培养, 共处理 6 天.

1.3.2 He-Ne 激光辐照处理

He-Ne 激光器 (南京激光仪器厂) 波长为 632.8 nm, 选用较大刺激效应剂量 $5 \text{ mW} \cdot \text{mm}^{-2}$, 2 min, 25℃, 激光辐照处理安排在夜间进行, 以排除杂光影响, 激光处理后立即转入暗处 25℃ 培养.

1.3.3 处理设置

共设对照 (CK)、UV-B 处理 (B)、激光处理 (L)、UV-B 和激光复合处理 (BL) 4 组, 各处理方法如表 1 所示.

表 1 各处理组的设置及处理程序

Table 1 Establishment and procedure of different treatment

Treatment	Light (h/d)	UV-B radiation (h/d)	He-Ne laser irradiation (min/d)	Dark culture (h/d)
CK	8	-	-	16
B	8	8	-	16
L	8	-	2	16
BL	8	8	2	16

1.4 植物总蛋白的抽提

参考马立安的方法^[13], 略作修改: 取 6 d 小麦幼苗 1 g, 放入已预冷的研钵中, 加 5 mL 植物蛋白提取液 (25 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, 20 mmol/L NaCl, 1 mmol/L PMSF, 1 mmol/L Benzamide, 2 μg/mL Aprotinin), 于 12 000 r/min, 离心 30 min, 收集上清 (可溶性总蛋白) 置于冰上备用.

1.5 Western Blot 鉴定

参考赵雅坤等的方法^[14], 上清蛋白经 12.5% SDS-PAGE 分离后, 将蛋白电泳条带转至硝酸纤维素膜, 用丽春红检测电转移效果, 之后用含 5% BSA 的 TBS (pH 7.4) 将转印膜于室温摇动温育 1h 进行封闭, 封闭后的转印膜在室温下用一抗孵育 2 h 平缓摇动, 用 TBST 漂洗 3 次, 每次 10 min, 接着用辣根过氧化物酶标记的山羊抗兔血清作为二抗 (1:1 000) 将膜在室温下温育 2 h, 再用 TBST 漂洗 3 次, 每次 10 min, 以蛋白质用 ECL 化学发光试剂盒

检测(按 ECL 说明书进行),X 胶片曝光、显影、定影。

1.6 TaRAN1 蛋白的提取

1.6.1 原生质体的制备

参考刘炜等方法^[15],略有改动。取 6 日龄小麦幼苗第一片真叶,蒸馏水冲洗干净,用双面刀片将其切成 0.5mm 的小碎块,置于酶解液中在(26±1)℃ 中暗解 3 h 左右,中间每隔 0.5 h 震荡一次。材料与酶解液之比为 1:5(W/V)。酶解液组成为 1.5% 纤维素酶 R-10(celulaseR-10, Japan), 0.1% 果胶酶(pectinase, Fluka)溶于标准液中配置而成。标准溶液成分为:5 mmol/LCaCl₂·2H₂O, 0.5 mol/L 甘露醇, 0.5 mmol/LKH₂PO₄, 2 mmol/L MgSO₄, 3 mmol/L 2-氮吗啉乙烷磺酸(MES, Sigma), pH 调至 5.6。待酶解完成后用 280 目尼龙网过滤除去未酶解完全的叶肉组织碎片,500 r/min 离心 5min 后收集纯化原生质体,弃去上清后(用 PEM 缓冲液悬浮沉淀与不用 PEM 悬浮以作对比),常温静置以备用。

1.6.2 TaRAN1 蛋白的粗提

参考费一楠等方法^[16,17],略有改动。向原生质体中加入含有 0.5% Triton X-100 的 CSK 缓冲液(100 mmol/L KCl, 3 mmol/L MgCl₂, 1 mmol/L EGTA (pH8.0), 10 mmol/L PIPES (pH6.8), 300 mmol/L蔗糖, 1.2 mmol/L PMSF, 20 mmol/L DTT),振荡混匀后,静置 7 min。120 g 离心 10 min,弃上清液。用 CSK 缓冲液重悬沉淀,120 g 离心 10 min,冰浴条件下匀浆、离心,收集沉淀,反复 2~3 次,直至核充分纯化,核沉淀用 50% 的甘油,-20℃ 下保存。用考马斯亮兰法测蛋白的含量,选用 4% 浓缩胶,12.5% 分离胶,100 V 恒压下进行 SDS-PAGE(约 3 h 左右)。

2 结果与分析

2.1 总蛋白 SDS-PAGE 分析及 TaRAN1 蛋白的 Western Blot 鉴定

小 G 蛋白 Ran 是一种主要分布于细胞核内的蛋白质,分子量大约为 25kD^[9]。在 20.1 KDa 和 31 KDa 之间可以清晰地得到一条主带(图 1),如箭头所示,经 Quantity One 凝胶系统软件分析,主带分子量为 25 KDa 左右(图 2),切取 Ran 主带胶用于 Western Blot 转膜鉴定目的蛋白,免疫印迹分析显示,小麦可溶性蛋白中的 Ran 发生免疫反应,且只在 25 KDa 处出现单一杂交带(图 3)。

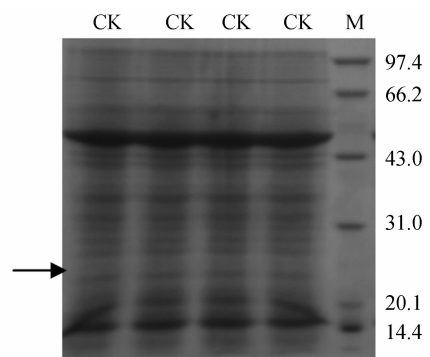


图 1 细胞总蛋白的电泳图谱

Fig. 1 Cells of total protein electrophoresis protein

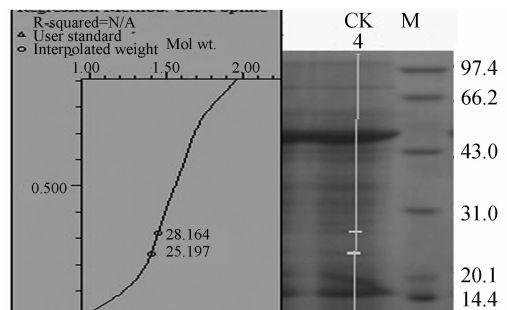


图 2 总蛋白凝胶分析图

Fig. 2 Total protein gel analysis diagram

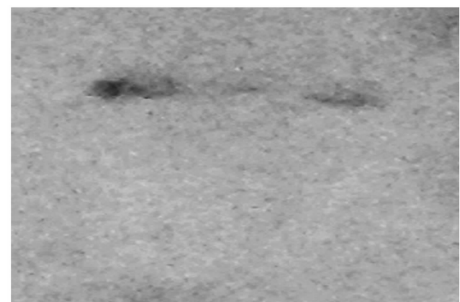


图 3 TaRAN1 蛋白免疫印迹分析图

Fig. 3 TaRAN1 Western blot analysis in Figure

2.2 SDS-PAGE 分析细胞核内的 Ran 蛋白

图 4 为添加 PEM 缓冲液和不添加 PEM 缓冲液时提取的 Ran 蛋白电泳图。1-4 泳道添加了 PEM 缓冲液,5-8 泳道没有添加 PEM 缓冲液。从图中明显可看出添加 PEM 缓冲液的蛋白条带多且清晰,电泳效果较好。说明在提取过程中添加适量的 PEM 缓冲液更有利于蛋白的提取。

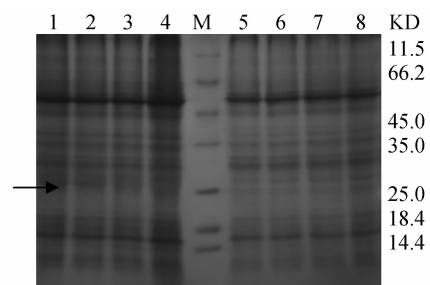


图 4 TaRAN1 蛋白的电泳图谱(CK 组)

Fig. 4 TaRAN1 protein electrophoresis (CK group)

2.3 He-Ne 激光与增强 UV-B 辐射对小麦 TaRan 蛋白的 SDS-PAGE 分析

小麦叶片 Ran 蛋白的 SDS-PAGE 分析结果(图 5)表明,经 UV-B 辐射处理(B)的小麦叶片中 Ran 蛋白条带最宽条带较多,颜色较深且清晰.与对照组(CK)相比,而复合处理组(BL)的蛋白条带较宽且清晰.

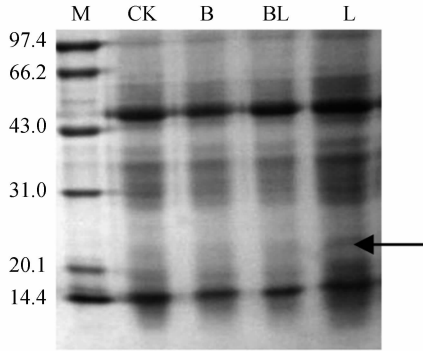


图 5 不同处理组 TaRAN1 蛋白电泳图谱

Fig. 5 Different treatment group protein electrophoresis

2.4 不同提取方法对蛋白含量的影响

由图 6 可知:提取原生质体后添加 PEM 缓冲液则提取出的蛋白的含量明显多于没有添加 PEM 缓冲液所提取的蛋白含量,与电泳的效果相吻合,进一步说明在提取目的蛋白时添加 PEM 缓冲液更有利于蛋白的提取,为后续提取不同处理组中的核蛋白提供较好的方法.

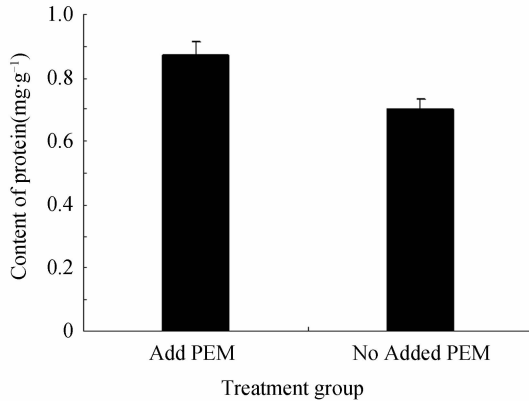


图 6 不同方法提取蛋白含量的比较

Fig. 6 Different extraction methods protein content of the comparison

2.5 He-Ne 激光与增强 UV-B 辐射对小麦 TaRan1 蛋白含量的影响

从图 7 可知,不同处理组小麦幼苗蛋白含量有明显的差异.与对照组(CK)相比,增强 UV-B 辐射处理(B)使小麦叶片蛋白质含量明显提高,高于对照 37.3%,差异极显著($P < 0.01$)说明它能促进蛋白的合成;单独 He-Ne 激光处理组(L)使叶片蛋白质含量明显低于 B 组 42%,差异极显著($P < 0.01$);复合处理组(BL)的小麦叶片蛋白含量低于 B 组

25%,差异显著($P < 0.05$).蛋白含量的变化与电泳效果相吻合,由此说明增强 UV-B 辐射能促使小麦核内 Ran 蛋白的合成,推测 Ran 蛋白可能与植物的抗逆性有关.

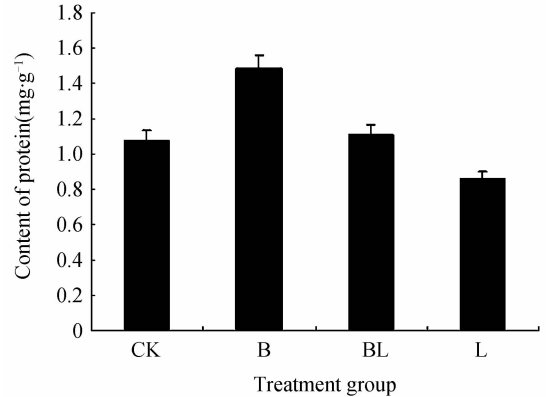


图 7 不同处理组 TaRAN1 蛋白含量的比较

Fig. 7 Different treatment group TaRAN1 protein content of the comparison

3 讨论

蛋白质不仅是生物体的重要组成部分,而且作为生物催化反应的酶类在生理生化代谢中起着重要作用.蛋白质的最大吸收峰正好在 UV-B 辐射范围内,因此增强 UV-B 辐射将会对蛋白质产生较大的影响^[18].近年来,人们不断发现植物中小 G 蛋白家族的新成员,也不断揭示小 G 蛋白的新功能,许多植物特有的信号途径和功能需要小 G 蛋白这个重要的分子开关来完成,这使它越来越成为人们研究的热点问题.而小 G 蛋白中的 Ran 以与 GTP 或 GDP 结合的形式存在于细胞中,活性的 RanGTP 依靠 GTP 水解活性水解成无活性的 RanGDP,这种 RanGTP 到 RanGDP 的转换,起着分子开关的作用^[19].

最新的一些研究结果表明,Ran 还参与植物的抗逆反应. TaRAN1 基因受各种胁迫处理的诱导表达,15% PEG, 200 Mm NaCl 和低温处理发现 TaRAN1 表达水平有明显的增加趋势,并且超表达植株对胁迫的耐受能力有明显提高,这说明 TaRAN1 可能参与了盐,干旱和低温胁迫等胁迫信号应答的相应机制^[1].史胜青等人曾报道,干旱、PEG 和 NaCl 胁迫明显诱导梭梭 RAN1 基因的表达,并且,该基因在中、轻度胁迫时表达水平最强.这可能与 RAN 作为信号调控蛋白有关,中、轻度胁迫下,小 G 蛋白 HaRAN1 通过调节蛋白质和 RNA 分子通往核内外的运输^[1,7,20].而 Miyamoto 等报道在哺乳动物细胞中由于外界胁迫(热激,氧化胁迫,紫外照射)会导致向核内的运输受阻,并伴随着胞质

中的 Ran 含量增加,RanGTP/GDP 梯度的瓦解^[21]。据报道,野生型水稻的 OsRan2 在细胞周期的前期能够将微管蛋白运出核,然而在低温胁迫下,OsRan2 这一功能受到影响或发生一定程度缺失,于是可以观察到微管蛋白在低温时主要定位于核内,而过表达 OsRan2 能够在一定程度上弥补这一功能缺失,能够将微管蛋白正常运出核。所以在充足的核外微管蛋白下,纺锤体能够正常建成,也能够发生核膜正常重建,细胞周期才能够在低温下正常进行,植株才表现出耐低温胁迫。因此,低温胁迫下,OsRan2 影响了微管蛋白的核质运输从而最终影响了细胞周期的顺利进行^[22]。

4 结论

研究发现:He-He 激光辐照后,经考马斯亮蓝法测定小麦叶片中的 Ran 蛋白含量明显降低,则说明抑制了该蛋白的合成;增强 UV-B 辐射后,SDS-PAGE 分析结果发现,Ran 蛋白质谱条带清晰较宽且颜色较深,说明增强 UV-B 辐射能促进该蛋白的合成,故推测它可能参与了植物的抗逆境反应,受逆境诱导可能是和参与逆境应答物质的转运有关。

参考文献

- [1] KAN Rui-feng, LIU Wen-qing, ZHANG Yu-jun, *et al.* Infrared absorption spectrometer of monitoring ambient methane[J]. *Acta Optica Sinica*, 2006, **26**(1): 67-70.
- [2] 阚瑞峰, 刘文清, 张玉钧, 等. 基于可调谐激光吸收光谱的大气甲烷监测仪[J]. *光学学报*, 2006, **26**(1): 67-70.
- [2] LIANG Bo, ZHU Hai, CHEN Wei-biao. Simulation of laser communication channel from atmosphere to ocean[J]. *Acta Optica Sinica*, 2007, **27**(7): 1166-1172.
- 梁波, 朱海, 陈卫标. 大气到海洋激光通信信道仿真[J]. *光学学报*, 2007, **27**(7): 1166-1172.
- [3] LIU Jian-long, LIU Jian-jun, YANG Jian-sheng. Study on the breeding of alkaline amylase producing strain by ultraviolet and He Ne laser compound mutation[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2006, **33**(1): 138-142.
- 刘建龙, 刘建军, 杨连生. 碱性淀粉酶菌株的紫外线和 He-Ne 激光复合诱变的研究[J]. *中国激光*, 2006, **33**(1): 138-142.
- [4] HAO Jin-hua, MA Xiao-li, WANG Xiao-hua, *et al.* Repair effects and damage of cell of wheat seedlings exposed to enhanced ultraviolet B radiation by He-Ne laser[J]. *Chinese Journal of Lasers*, 2007, **34**(11): 1594-1599.
- 郝金花, 马晓丽, 王小花, 等. He-Ne 激光对增强 UV-B 辐射小麦细胞损伤及修复效应[J]. *中国激光*, 2007, **34**(11): 1594-1599.
- [5] QI Z, YUE M, WANG X L. Laser pretreatment protects cells of broad bean from UV-B radiation damage[J]. *Journal of Photochemistry and Photobiology B-Biology*, 2000, **59**(6): 33-37.
- [6] WANG X, CHONG K. Current progress on the small GTPase gene superfamily in plants[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2005, **22**(1): 1-10.
- [7] YANG Z. Small GTPases versatile signaling switches in plants[J]. *Plant Cell*, 2002, **14**(15): 375-388.
- [8] VERNOUD V, HORTON A C, YANG Z, *et al.* Analysis of the small GTPase gene superfamily of A rabidopsis[J]. *Plant Physiol*, 2003, **131**(7): 1191-1208.
- [9] HAN Fang. Cloning the shrimp Ran gene expression and protein GTP binding activity[J]. *Journal of Jimei University (Natural Science)*, 2009, **15**(4): 1007-7405.
- 韩芳. 对虾 Ran 基因的克隆表达与蛋白质 GT 结合活性分析[J]. *集美大学学报*, 2009, **15**(4): 1007-7405.
- [10] ZHANG C M, HU GHES M, CLARKE P R. RanGTP stabilizes microtubule asters and inhibits nuclear assembly in *Xenopus* egg extracts[J]. *Cell Science*, 1999, **112**(14): 2453-2461.
- [11] ZHANG C M, CLARKE P R. Roles of Ran GTP and Ran GDP in precursor vesicle recruitment and fus ion during nuclear envelope assembly in a human cell free system[J]. *Current Biology*, 2001, **11**(4): 208-212.
- [12] ZHANG C M, HUTCHINS J R, MHIHUSSEER P, *et al.* Role of import inbet a in the control of nuclear envelope assembly by Ran[J]. *Current Biology*, 2002, **12**(6): 498-502.
- [13] MA L A. The Arabidopsis Ran2 a small GTP-binding protein antiserum preparation and FITC fluorescence tag[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2007, **26**(4): 439-442.
- [14] ZHAO Ya-kun, SHI Xian-ming, ZHANG Zhong-ming. Human interleukin-4 efficient transformation and expression in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplast[J]. *Journal of Huazhong Agricultural University*, 2006, **25**(2): 110-116.
- 赵雅坤, 史贤明, 张忠明. 人白介素 4 在衣藻叶绿体中的高效转化及表达[J]. *华中农业大学学报*, 2006, **25**(2): 110-116.
- [15] LIU W, SUN D L, WANG H. Influence of low temperature on spatial-temporal changes of Ca²⁺ in winter or spring wheat[J]. *Acta Botanica Sinica*, 2001, **43**(12): 1218-1223.
- [16] FEI Yi-nan, ZHANG Zhao, CAO Cong, *et al.* Tobacco suspension culture and the separation of the organelles[J]. *Journal of Capital Normal University*, 2007, **28**(2): 68-74.
- 费一楠, 张钊, 曹聪, 等. 烟草悬浮培养与细胞器的分离[J]. *首都师范大学学报*, 2007, **28**(2): 68-74.
- [17] PAUL F J, HANS J, MARTIN L, *et al.* Interphase chromosomes in Arabidopsis are organized as well defined chromocenters from which euchromatin loops emanate[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2002, **99**(22): 14584-14589.
- [18] BARBAT0R, FRIZ0 A, FRISO G. Degradation of the D1 protein of photosystem. II. reaction center by ultraviolet-B radiation requires the presence of functional manganese on the donorside[J]. *European Biochem*, 1995, **227**(3): 723-729.
- [19] MARSHALL M S. The effector interactions of p21ras[J]. *Trends Biochem. Science*, 1993, **18**(7): 250-254.
- [20] WLADIMIR L T, DAVID C B. Physical association of the NB-LRR resistance protein Rx with a Ran GTPase-activating protein is required for extreme resistance to potato virus X[J]. *The Plant Cell*, 2007, **19**(5): 1682-1694.
- [21] MIYAMOTO Y, SAIWAKI T, YAMASHITA J, *et al.* Cellular stresses induce the nuclear accumulation of importin a and cause a conventional nuclear import block[J]. *Journal of Cell Biology*, 2004, **165**(5): 617-623.
- [22] CHEN N, XU Y, WANG X, *et al.* OsRAN2, essential for mitosis, enhances cold tolerance in rice by promoting export of intranuclear tubulin and maintaining cell division under cold stress[J]. *Plant Cell Environment*, 2011, **34**(1): 52-64.