

拟南芥 *AtcpSecA* 基因表达的特异性

李金萍, 李鹏丽, 于蕴卿, 王宁宁*

南开大学生命科学学院, 天津 300071

摘要: 前期研究表明 *AtcpSecA* 基因的突变使叶绿体发育缺陷, 内部缺少正常类囊体片层结构, 叶片呈黄白色。在此基础上我们进一步研究 *AtcpSecA* 基因的表达特异性, 并构建了 *AtcpSecA* 基因启动子与报告基因 *GUS* 的融合基因 *AtcpSecA::GUS*, 以农杆菌介导方法转化获得转基因拟南芥。*GUS* 组织化学染色结果表明, 在 *AtcpSecA::GUS* 转基因拟南芥的下胚轴、子叶、叶片、果柄等绿色组织中有很强的 *GUS* 活性, 而在根、花序和种荚等非绿色组织中几乎没有 *GUS* 活性。降低培养基中琼脂浓度转基因拟南芥中 *AtcpSecA::GUS* 基因的表达明显受抑制, 暗中则显著受到促进。

关键词: 拟南芥; *AtcpSecA* 基因; 启动子; 表达特异性

Expressional Characterization of *Arabidopsis AtcpSecA* Gene

LI Jin-Ping, LI Peng-Li, YU Yun-Qing, WANG Ning-Ning*

College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China

Abstract: We identified an *Arabidopsis* mutant with a T-DNA insertion in *AtcpSecA* gene. The mutant of *AtcpSecA* gene resulted in chloroplast development defects. The homozygous mutant lacked thylakoid lamella and showed albino phenotype. In order to study *AtcpSecA* gene expression pattern, we cloned the promoter of *AtcpSecA* gene and an expression vector containing the *AtcpSecA::GUS* fusion gene was constructed and introduced into *Arabidopsis* by *Agrobacterium*-mediated floral dip method. The strong *GUS* expression were observed in hypocotyls, cotyledon, leaves and pedicels, while weak *GUS* expression were observed in roots, inflorescence and siliques. The expression of *AtcpSecA::GUS* was suppressed when agar concentration was decreased, and dark treatment could increase the expression of *AtcpSecA::GUS*.

Key words: *Arabidopsis*; *AtcpSecA* gene; promoter; expression specificity

叶绿体自身可以编码 100 多个蛋白, 其余绝大多数叶绿体蛋白则是由核基因编码的 (Chi 等 2008)。核基因编码的叶绿体蛋白首先在胞质中合成前体, 然后通过叶绿体被膜运输到叶绿体中。SecA (cpSecA) 是叶绿体蛋白转运 Sec 途径中一个重要组分 (Di Cola 等 2005)。细菌中 SecA 在蛋白转运中的作用已经有很多的研究报道 (Duong 和 Wickner 1997; van der Wolk 等 1997), 豌豆 (Nakai 等 1994)、菠菜 (Berghfer 等 1995) 和玉米 (Voelker 等 1997) 等植物中也已经鉴定出相应的 SecA 编码基因。

我们的前期研究中曾获得叶片呈黄白色表型的拟南芥突变体, 并证明这是由于 T-DNA 插入造成 *AtcpSecA* 基因 (At4g01800) 被破坏导致的 (马媛媛 2006)。为深入研究拟南芥 *AtcpSecA* 基因的表达调控模式、及其在叶片发育过程中的功能, 我们根据 ABRC 国际数据库中已知的拟南芥序列信息, 从拟南芥基因组 DNA 中克隆了 *AtcpSecA* 基因的启动子

及部分编码序列, 并构建了该序列与报告基因 *GUS* 的融合基因双元表达载体。用农杆菌介导的花苞浸泡法转化拟南芥, 并以 *GUS* 组织化学染色方法, 初步研究了拟南芥不同组织器官和不同发育阶段的 *AtcpSecA* 基因的表达特异性, 以及琼脂浓度、黑暗处理等外界环境因子对 *AtcpSecA* 基因表达的调控。

材料与amp;方法

植物材料为拟南芥 (*Arabidopsis thaliana* L.) 生态型 ‘Colombia’, 为我们实验室保存。生长条件: 温度 (22±1) °C; 光周期 16 h 光 / 8 h 暗; 光照强度 75 μmol·m⁻²·s⁻¹。

大肠杆菌 DH5α 菌株用于基因克隆和感受态

收稿 2008-12-01 修订 2009-01-12

资助 国家“863”项目 (2007AA10Z105)、国家自然科学基金项目 (30670193) 和教育部“新世纪优秀人才支持计划”项目 (NCET-05-0224)。

* 通讯作者 (E-mail: wangnn@nankai.edu.cn; Tel: 022-23504096)。

细胞的制作。根癌农杆菌GV3101菌株用于拟南芥的遗传转化。以上菌株均为本实验室保存。

携带 *GUS* 和 *hpt* 基因的双元表达载体 pCAMBIA1301 用于启动子与 *GUS* 融合基因的植物表达载体构建。

限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、用于 PCR 的 DNA 聚合酶、高保真聚合酶 *pfu* 及 DNA 回收试剂盒均购自宝生物(TaKaRa)公司;引物由上海生物工程公司代为合成;潮霉素(hygromycin)购自 Roche 公司;其他生化试剂均为国产分析纯。

以野生型拟南芥的基因组 DNA 为模版,用引物对 SecA_Pro1(5'-GAA TTC TGC GAA TGG ATG AGG AGT TTG-3', 粗体部分为引入的 *EcoRI* 酶切位点)和 SecA_Pro2(5'-ATC CAT GGA TTC TCC TTT CTG AGC-3', 粗体部分为引入的 *NcoI* 酶切位点)扩增 *AtcpSecA* 启动子。PCR 反应条件如下: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 60 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。将反应后的 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,回收目的 DNA 片段。然后连入 TA 克隆载体 pMD18-T Vector, 16 °C, 连接反应 0.5~2 h 或过夜,并转化大肠杆菌 DH5 α 。

将测序后正确的 *AtcpSecA* 基因启动子的 TA 克隆质粒经 *EcoRI/NcoI* 双酶切,回收 1 kb *AtcpSecA* 基因启动子片段,用 T4 DNA 连接酶,同经 *EcoRI/NcoI* 双酶切双元载体 pCAMBIA1301 DNA 获得的 11 kb 片段相连接,并转化大肠杆菌 DH5 α ,在含有 50 mg·L⁻¹ 卡那霉素的 LB 培养基上筛选转化子。

提取阳性转化子的质粒进行酶切鉴定(参考内切酶的使用说明书)。大肠杆菌质粒的提取采用 SDS 碱裂解法,药品的配置及具体操作步骤参考《分子克隆试验指南》(第三版)(Sambrook 和 Russell 2002)。

大肠杆菌 DH5 α 和农杆菌 GV3101 感受态细胞的制备与转化采用氯化钙法,转化分别采用热激法和冻融法,药品的配置及具体操作步骤参考《分子克隆试验指南》(第三版)(Sambrook 和 Russell 2002)。

采用农杆菌介导的花苞浸泡法(Tague 2001)转化拟南芥,获得的种子经过 40 mg·L⁻¹ 潮霉素抗性筛选,抗性植株转土培养并进行分子检测与鉴定。

基因组 DNA 的提取和转基因植株的 PCR 鉴定时,取 50 mg 拟南芥 T₁ 代植物的叶片,置于液氮中

速冻。采用 SDS 法提取叶片核基因组 DNA,具体操作参考 Dellaporta 等(1983)的方法。取 1 μ L 提取的基因组 DNA 做为模板,用 *AtcpSecA::GUS* 的特异性引物 PGUS1 (5'-TCG CGA TCC AGA CTG AAT GCC-3') 和 SecAF-1 (5'-CTC GAG CCC GGG ATG GTG TCT CCA CTC TGC GAC TCT-3') 进行 PCR,检测拟南芥基因组中外源片段的插入情况。PCR 反应程序: 94 °C 5 min; 94 °C 30 s, 58 °C 30 s, 72 °C 60 s, 30 个循环; 72 °C 10 min。

GUS 组织染色参照 Blume 和 Grierson (1997) 文中的方法进行。染色时间为 5 h, 脱色处理后使用 EPSON PERFECTION1260 型扫描仪记录结果。

植物材料的总蛋白浓度的测定参考 Bradford (1976) 文中的方法;采用 Jefferson 和 Wilson (1991) 文中的方法测定 *AtcpSecA::GUS* 转基因拟南芥的 *GUS* 荧光活性。

检测环境因子对转基因拟南芥中 *GUS* 表达影响时,将 *AtcpSecA::GUS* 转基因拟南芥种子用 10% 的安提福明溶液表面消毒后,均匀铺在 1/2MS 固体培养基(30 mg·L⁻¹ 潮霉素, 0.75% 琼脂, pH 5.8) 平板上。萌发生长到 1 周苗龄后进行如下处理。

进行培养基的琼脂浓度变化处理时,将 1 周苗龄的转基因拟南芥幼苗分别转移到琼脂浓度 0.30%、0.75% 和 1.00% 的 1/2MS 固体培养基(pH 5.8) 上,在光周期 16 h 光/8 h 暗、光照强度 75 μ mol·m⁻²·s⁻¹ 和温度(22 \pm 1) °C 的状态下生长 48 h 后进行 *GUS* 组织化学染色和 *GUS* 荧光活性测定。

持续黑暗处理(dark treatment, DT)时,将 1 周苗龄的转基因拟南芥幼苗转移到 1/2MS 固体培养基(0.75% 琼脂, pH 5.8) 上,持续黑暗 72 h 处理后进行 *GUS* 组织化学染色和 *GUS* 荧光活性测定。正常光照下的相同生长状态的转基因幼苗作为对照。

实验结果

1 *AtcpSecA::GUS* 融合基因表达载体的构建

将克隆到的 1 058 bp 的拟南芥 *AtcpSecA* 基因 5' 端上游序列(包含 ATG 上游 653 bp 启动子序列和 ATG 下游 399 bp 的编码序列)引入到双元表达载体 pCAMBIA1301 的 *EcoRI* 和 *NcoI* 位点之间,替换 CaMV 35S 启动子(见材料与方法)。提取阳性克隆的 DNA,经 *EcoRI/NcoI* 双酶切,酶切产物通过琼脂糖凝胶电泳分析,质粒被 *EcoRI* 和 *NcoI* 双酶切为 1

kb 和 11 kb 的 2 条 DNA 片段, 与预期结果吻合。*AtcpSecA::GUS* 融合基因序列经序列测定结果正确, 将此表达载体命名为 *pAtcpSecA::GUS* (图 1)。该载体带有潮霉素筛选标记, 用于转化过程中转基

因植株的筛选。采用冻融法将载体 *pAtcpSecA::GUS* 转入农杆菌 GV3101 中, 经卡那霉素、硫酸庆大霉素和利福平筛选阳性转化子, 再经过菌裂解 PCR 及质粒 DNA 酶切进行鉴定。

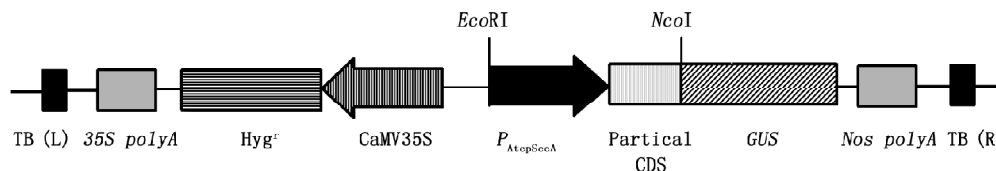


图 1 植物表达载体 *pAtcpSecA::GUS* 基本结构示意图

Fig.1 Diagram of the vector *pAtcpSecA::GUS*

TB (L)和 TB (R)分别表示 T-DNA 的左、右边界。

2 *AtcpSecA::GUS* 转基因植株的获得

采用农杆菌介导的花苞浸泡法, 以 *pAtcpSecA::GUS* 转化拟南芥, 收获的种子经过潮霉素 ($40 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 抗性筛选, 抗性植株转土培养, 获得转化植株; 提取这些转化植株的基因组 DNA, 用 *AtcpSecA::GUS* 的

特异性引物 PGUS1 和 SecAF-1 进行 PCR 检测, 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分析, 能够确定外源基因已经整合到拟南芥基因组中的有 7 株。T₁ 代再次进行抗性筛选和 PCR 鉴定的结果表明, 外源基因能够在转基因拟南芥中稳定遗传 (图 2)。

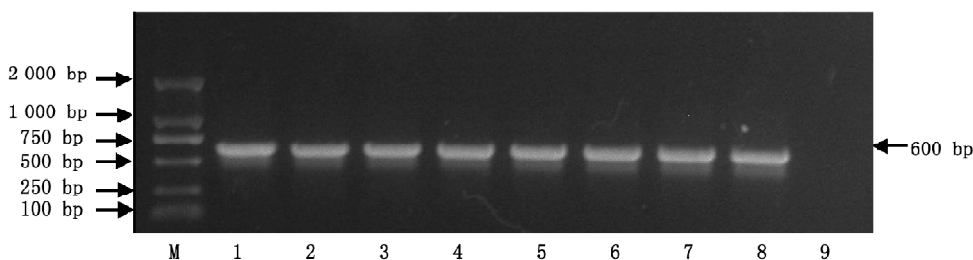


图 2 *AtcpSecA::GUS* 转基因拟南芥 T₁ 代植株的 PCR 鉴定

Fig.2 Identification of the T₁ *AtcpSecA::GUS* transgenic plants

泳道 M: DL2000 Marker; 泳道 1: *AtcpSecA::GUS* 质粒为模版的 PCR 的正对照; 泳道 2~8: *AtcpSecA::GUS* 转基因拟南芥 T₁ 代植株的基因组 DNA 为模版的 PCR 产物; 泳道 9: 用野生型拟南芥的基因组 DNA 为模版的负对照。

3 *AtcpSecA::GUS* 转基因拟南芥中 *AtcpSecA* 表达的组织以及发育特性

为了研究 *AtcpSecA* 在转基因拟南芥中的表达模式, 利用 GUS 组织化学染色的方法, 对 *AtcpSecA::GUS* 转基因拟南芥中 GUS 报告基因的表达进行了分析。分别选取 *AtcpSecA::GUS* 转基因拟南芥的黄花苗、1 周苗、2 周苗、成熟莲座叶、花茎以及花苞进行 GUS 染色。染色结果表明: 在 *AtcpSecA::GUS* 转基因拟南芥的黄花苗时期, 子叶中有极微弱的 GUS 活性 (图 3-a); 在光周期 16 h 光 / 8 h 暗条件下, 转基因拟南芥在子叶、叶片、下胚轴、莲座叶以及茎生叶等绿色组织中都有很强的

GUS 活性 (图 3-b~e), 而在根、花瓣和种荚等非绿色组织中没有 GUS 活性 (图 3-b~g)。

4 培养基中琼脂浓度对转基因拟南芥中 *GUS* 表达的影响

我们在前期研究中曾发现: 在拟南芥 *AtcpSecA* 基因的 T-DNA 插入突变体中, 叶片的气孔大多处于关闭状态 (马媛媛 2006), 因此推测 *AtcpSecA* 基因可能参与植物体的渗透调节过程。为了研究外界渗透势变化对 *AtcpSecA* 基因的表达的影响, 我们将 1 周苗龄的 *AtcpSecA::GUS* 转基因拟南芥幼苗分别转到琼脂浓度为 0.30%、0.75%、1.00% 的 1/2MS 培养基上培养 48 h。GUS 组织化学染色 (图 4-a) 和

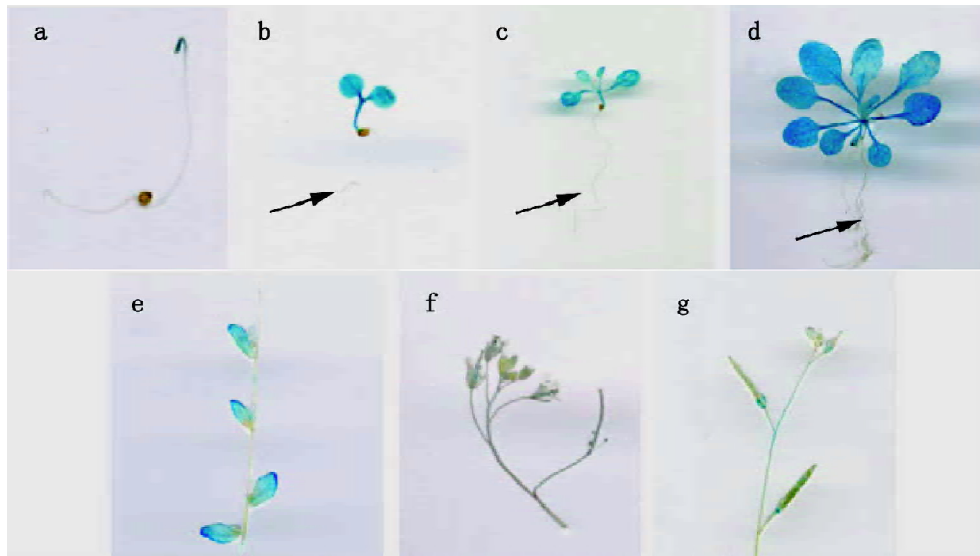


图3 不同苗龄苗中 *AtcpSecA::GUS* 转基因拟南芥的 GUS 染色

Fig.3 *GUS* expression of *AtcpSecA::GUS* recombinant transgene in the developing transgenic plants
a: 黄化苗; b: 1周苗; c: 2周苗; d: 成熟莲座叶; e: 茎生叶; f: 花苞; g: 种荚; 图b, c, d中的箭头指示处为根部的GUS染色情况。

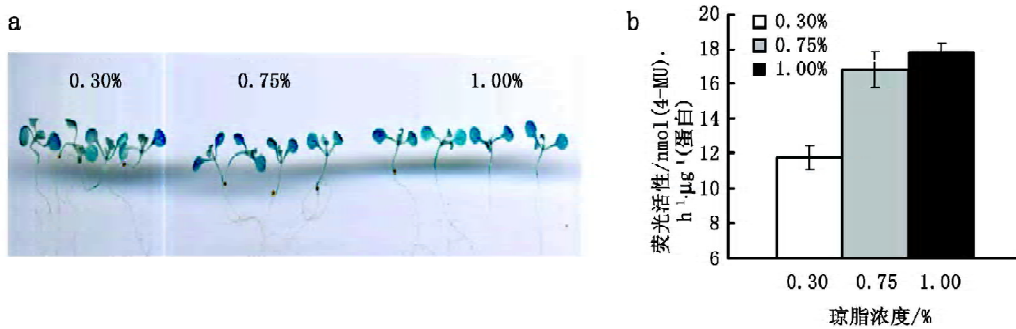


图4 不同浓度琼脂对 *AtcpSecA::GUS* 转基因拟南芥中 *AtcpSecA* 表达的影响

Fig.4 Effects of agar of different concentration on the *AtcpSecA::GUS* expression in the transgenic seedlings
a: GUS 组织化学染色; b: GUS 荧光活性。

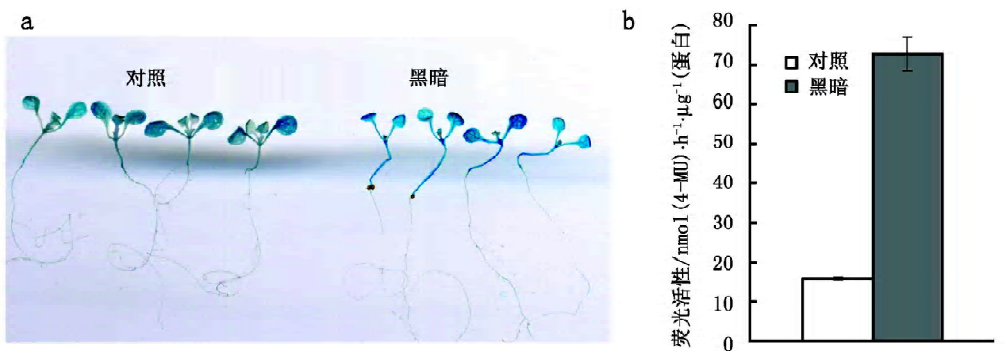


图5 暗处理对 *AtcpSecA::GUS* 转基因拟南芥中 *AtcpSecA* 表达的影响

Fig.5 Effect of dark treatment on the *AtcpSecA::GUS* expression in the transgenic seedlings
a: GUS 组织化学染色; b: GUS 荧光活性。

GUS荧光活性测定(图4-b)结果表明:降低琼脂浓度至0.30%,可以明显的抑制 *AtcpSecA::GUS* 转基因拟南芥中 *GUS* 基因的表达;而增加琼脂浓度至1.00%,对 *GUS* 基因的表达影响不大(图4)。

5 黑暗处理对转基因拟南芥中 *GUS* 表达的影响

将1周苗龄的 *AtcpSecA::GUS* 转基因拟南芥幼苗黑暗处理 72 h, 可以观察到拟南芥叶片变黄, 下胚轴明显伸长, 真叶生长缓慢。GUS 组织化学染色(图 5-a)和荧光活性测定的结果(图 5-b)表明, 暗处理后转基因拟南芥中的GUS染色明显加深, 这暗示暗中 *AtcpSecA* 基因的表达显著受到促进(图 5)。

讨 论

AtcpSecA::GUS 转基因拟南芥 GUS 染色结果证明我们克隆到的 *AtcpSecA* 基因启动子序列具有启动子活性, 因此可以采用GUS组织化学染色的方法, 在转基因拟南芥中研究 *AtcpSecA* 基因的表达特异性。

我们前期工作的研究结果表明, 在拟南芥 *AtcpSecA* 基因的 T-DNA 插入突变后, 叶绿体发育会受阻、内部缺少正常的类囊体片层结构, 叶呈黄白色(马媛媛 2006)。Voelker 等(1997)在玉米中的研究也曾提到, *SecA* 的编码基因 *Tha1* 突变后, 叶绿体和叶的正常发育都受到影响。本文中, *AtcpSecA::GUS* 转基因拟南芥的叶片等绿色组织中都有很强的 GUS 染色, 这些结果进一步说明 *AtcpSecA* 在拟南芥的叶绿体和叶片的正常发育过程中可能起作用。

光是影响叶绿体生长发育的重要的环境因子(Apel 等 1983; Chinn 和 Silverthorne 1993), 本文中 *AtcpSecA::GUS* 转基因拟南芥幼苗经暗处理后, *GUS* 基因的表达水平明显上调(图5), 表明 *AtcpSecA* 是一个光响应基因, 这暗示 *AtcpSecA* 在叶绿体发育过程中的调控功能可能是通过响应光信号变化而实现的。

在我们前期研究中曾发现, 拟南芥 *AtcpSecA* 突变体叶上的气孔大多处于关闭状态(马媛媛 2006), 因此我们推测 *AtcpSecA* 基因可能在植物体的渗透调节过程中也有作用。本文结果又进一步表明, 降低培养基中的琼脂浓度, *AtcpSecA::GUS* 转基因拟南芥中 *GUS* 基因的表达会受到明显的抑制(图 4), 这暗示 *AtcpSecA* 基因表达可能与植物细胞的渗透

调节有关。

参考文献

- 马媛媛(2006). 大豆 *GmSARK* 基因的结构与功能分析及拟南芥两个衰老相关突变体的初步鉴定[博士学位论文]. 天津: 南开大学
- Sambrook J, Russell DW. 黄培堂译(2002). 分子克隆实验指南(第三版). 北京: 科学出版社
- Apel K, Gollmer I, Batschauer A (1983). The light-dependent control of chloroplast development in barley (*Hordeum vulgare* L.). *J Cell Biochem*, 23 (1-4): 181~189
- Berghfer J, Karnauchoff I, Herrmann RG, Klsgen RB (1995). Isolation and characterization of a cDNA encoding the SecA protein from spinach chloroplasts. *J Biol Chem*, 270: 18341~18346
- Blume B, Grierson D (1997). Expression of ACC oxidase promoter-GUS fusions in tomato and *Nicotiana plumbaginifolia* regulated by developmental and environmental stimuli. *Plant J*, 12: 731~746
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *J Anal Biochem*, 72: 248~254
- Chinn E, Silverthorne J (1993). Light-dependent chloroplast development and expression of a light-harvesting chlorophyll a/b-binding protein gene in the gymnosperm *Ginkgo biloba*. *Plant Physiol*, 103 (3): 727~732
- Chi W, Ma JF, Zhang D, Guo J, Chen F, Lu C, Zhang L (2008). The pentatricopeptide repeat protein DELAYED GREENING1 is involved in the regulation of early chloroplast development and chloroplast gene expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 147: 573~584
- Dellaporta SL, Wood J, Hicks JB (1983). A plant DNA miniprep: version II. *Plant Mol Biol Rep*, 1 (4): 19~21
- Di Cola A, Klostermann E, Robinson C (2005). The complexity of pathways for protein import into thylakoids: it's not easy being green. *Biochem Soc Trans*, 33: 1024~1027
- Duong F, Wickner W (1997). The SecDFyajC domain of preprotein translocase controls preprotein movement by regulating SecA membrane cycling. *EMBO J*, 16 (16): 4871~4879
- Jefferson RA, Wilson KJ (1991). The GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol Manual*, 14: 1~33
- Nakai M, Goto A, Nohara T, Sugita D, Endo T (1994). Identification of the SecA protein homolog in pea chloroplasts and its possible involvement in thylakoidal protein transport. *J Biol Chem*, 269: 31338~31341
- Tague BW (2001). Germ-line transformation of *Arabidopsis lasiocarpa*. *Transgenic Res*, 10: 259~267
- van der Wolk JPW, de Wit JG, Driessen AJM (1997). The catalytic cycle of the *Escherichia coli* SecA ATPase comprises two distinct preprotein translocation events. *EMBO J*, 16 (24): 7297~7304
- Voelker R, Mendel-Hartvig J, Barkan A (1997). Transposon-disruption of a maize nuclear gene, *thal*, encoding a chloroplast SecA homologue: *in vivo* role of cp-Sed in thylakoid protein targeting. *Genetics*, 145: 467~478