

AtRGS1-GFP 融合蛋白对 AtRGS1 细胞定位的研究

季芳芳^{1,2,*}, 陈云¹, 吴晓霞¹, 梁建生¹, 顾闽峰³

¹扬州大学生物科学与技术学院, 扬州 225009; ²盐城师范学院科技处, 江苏盐城 224002; ³江苏沿海地区农业科学研究所, 江苏盐城 224002

摘要:应用 Gateway 克隆技术构建了以 CaMV 35S 为启动子, 含 *AtRGS1-GFP* 融合基因的植物表达载体, 并分别用根癌农杆菌介导法和 PEG 介导法转化拟南芥野生型(Col)悬浮细胞系和幼苗叶片原生质体, 利用荧光显微镜观察 *AtRGS1-GFP* 融合基因在转化受体系统中的表达与定位。结果显示, 在含 *AtRGS1-GFP* 融合基因的转化细胞系中, GFP 绿色荧光在细胞膜(壁)上特异表达; 原生质体瞬时表达系统中, GFP 绿色荧光在细胞膜上强烈表达, 表明 AtRGS1 蛋白定位于细胞质膜上。

关键词: AtRGS1; GFP; 融合蛋白; 细胞定位; 拟南芥

Study of AtRGS1 Protein in Cellular Localization Using AtRGS1-GFP Fusing Protein

Ji Fang-Fang^{1,2,*}, Chen Yun¹, Wu Xiao-Xia¹, Liang Jian-Sheng¹, Gu Min-Feng³

¹College of Bioscience and Biotechnology, Yangzhou University, Yangzhou 225009, China; ²Science and Technology Office, Yancheng Teachers College, Yancheng, Jiangsu 224002, China; ³Institute of Agricultural Sciences in the Coastal Area in Jiangsu, Yancheng, Jiangsu 224002, China

Abstract: The recombination of plant expression vectors which express *AtRGS1-GFP* driven by CaMV 35S promoter were constructed using Gateway cloning technology. The vectors were introduced into cell suspension cultures by *Agrobacterium*-mediated transformation and into leaf protoplast by the polyethylene glycol (PEG)-mediated DNA uptake in *Arabidopsis thaliana*. The expression and localization of *AtRGS1-GFP* in transfected systems were studied by the fluorescence microscope. The results showed that the green fluorescence of GFP accumulated specifically in cell plasma membrane (wall) in cell suspension cultures which transformed with *AtRGS1-GFP*, and the green fluorescence of GFP accumulated intensively in plasma membrane in protoplast transient expression system, which suggesting that AtRGS1 was localized in plasma membrane.

Key words: AtRGS1; GFP; fusion protein; cellular localization; *Arabidopsis thaliana*

拟南芥 RGS 蛋白(AtRGS1)是 Chen 等于 2003 年发现的第一个植物 G 蛋白信号转导调节蛋白, 其 N 末端具有独特的类似于 G 蛋白耦联受体(G protein-coupled receptors, GPCRs)的 7 次跨膜(7TM)结构, C 末端具有保守的 RGS 结构域, 该结构域执行 GTP 酶活化蛋白(GTPase activating proteins, GAPs)功能, 能够显著促进 G α 亚基自身 GTP 水解酶活性, 加速活化态 G α 回到非活化状态, 从而终止或抑制植物 G 蛋白信号转导过程(Chen 等 2003)。由于 AtRGS1 在细胞分裂、糖信号转导等过程中具有调控作用(Chen 等 2003; Chen 和 Jones 2004; Chen 等 2006a, b; Johnston 等 2007; Willard 和 Siderovski 2004), 所以近年来, 其功能研究日益受到人们的关注。

此外, 绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)融合蛋白表达技术已广泛应用于活细胞或生

物体基因表达和蛋白质定位的研究(Chalfie 等 1994)。GFP 作为一种标记物, 与其他蛋白质标记物相比, 一个突出的优点在于其与靶蛋白耦合形成的融合蛋白既有荧光又有靶蛋白原有的正常功能和定位特征(Chalfie 等 1994; Davis 和 Vierstra 1998; Stewart 2001)。本文通过采用 Gateway 克隆技术, 将已获得的拟南芥 *AtRGS1* 与 *GFP* 基因融合, 利用 GFP 的示踪作用, 研究 *AtRGS1-GFP* 基因在拟南芥野生型(Columbia, Col)悬浮细胞系和幼苗叶原生质体体系中的表达, 分析 AtRGS1 蛋白在细胞中的定位情况, 为进一步研究拟南芥 AtRGS1 在植物生长发育过程中的调节机制建立基础。

收稿 2008-05-23 修订 2008-10-29

资助 国家自然科学基金(30370731)和江苏省高校自然科学基金项目(04KJB180157)。

* E-mail: ycjiff@163.com; Tel: 0515-88258236

材料与方法

拟南芥野生型(*Arabidopsis thaliana*, Columbia, Col)种子由我校植物生长发育与蛋白质组学研究实验室提供。以无菌苗叶片为材料, 参照 Chen 等 (2006a) 的方法建立拟南芥悬浮细胞系。AtRGS1 全长 cDNA 由本实验室制备并保存 (Chen 等 2006a, b)。

植物表达载体 pK7FWG2 (Kan^r、Sp^r) 由美国北卡罗莱那大学 Alan Jones 教授惠赠。该质粒含 CaMV 35S 启动子、Gateway box (attR1-CmR-ccdB-attR2, Gateway 克隆所特有) 的基因组合片段及增强型 GFP 基因 (*EGFP*), Gateway box 与 GFP 的 N 端相连。

AtRGS1-GFP 融合基因植物表达载体构建时, 根据 AtRGS1 的 ORF (At3g26090) 与 GatewayTM TOPO cloning 要求设计引物, 引物序列为: 引物 1, 5' att att atc gat atg gcg agt gga tgt gct 3'; 引物 2, 5' att agt cga cat acc ggg act act gca tct 3'。PCR 反应条件为: 94 5 min; 94 1 min, 58 1 min, 72 1 min, 40 个循环; 72 延伸 10 min。按照 GatewayTM TOPO Cloning 操作手册, 将 AtRGS1 基因片段经 TOPO 克隆导入载体 pENTR/D-TOPO, 选取阳性菌落提取质粒 DNA, 再经 LR 重组反应亚克隆到 pK7FWG2 (pENTR/D-TOPO、GatewayTM TOPO Clone 试剂盒及 LR Clonase 均购自 Invitrogen 公司)。

根癌农杆菌浸染悬浮细胞系及 Western blotting 鉴定时, 采用 Bechtold 和 Pelletier (1998) 冻融法将重组质粒 pK7FWG2 转化农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101 (Rif^r、Gent^r) 感受态, 设 pK7FWG2 (只含 GFP) 转化农杆菌作对照; 再按照 Kościńska 和 Wypijewski (2001) 方法将重组农杆菌

浸染悬浮细胞系, 48 h 后, 荧光显微镜 (Olympus BX 51 TRF) 观察 GFP 表达情况; 7 d 后, 收集并提取重组农杆菌转化系 (含 *AtRGS1-GFP* 融合基因)、对照 (只含 GFP 基因) 和空白对照 (正常悬浮细胞系) 的细胞总蛋白。10% SDS-PAGE 电泳分离, 然后转膜 (NC, Amersham 公司)、漂洗、封闭, 一抗 GFP 抗体 (Santa cruz 公司) 孵育、洗膜、显色。

拟南芥原生质体制备及瞬时表达: 以三周龄无菌苗叶片为材料, 参照 Abel 和 Theologis (1994) 方法制备原生质体 (cellulase R-10 和 macerozyme R-10 购自日本 Yakult Honsha 公司); PEG4000 (Fluka 公司) 将重组质粒 pK7FWG2 导入原生质体, 16 h 后荧光显微镜观察 GFP 瞬时表达。

实验结果

1 *AtRGS1* 基因的克隆与 *AtRGS1::GFP* 融合质粒的构建

利用 Gateway 克隆技术, 将目的基因 *AtRGS1* 替换植物表达载体 pK7FWG2 中的 Gateway box 基因组合片段, PCR 鉴定, 选取 LR 重组反应后的阳性菌落送上海生工公司测序。结果显示, 全序列长为 1 380 bp, 包含了全部的编码区序列, 与预期的相符; 将测得的 *AtRGS1* 序列与已公开的 *AtRGS1* 蛋白编码基因序列 (At3g26090) 比较, 同源性为 100%, 无碱基差异。新构建的 *AtRGS1-GFP* 融合基因植物表达载体命名为 *AtRGS1::GFP* 融合质粒, 其中 *AtRGS1* 与 GFP 蛋白的 N 端相连, *AtRGS1::GFP* 融合质粒及 pK7FWG2 质粒的 T-DNA 区域如图 1 所示。

2 *AtRGS1::GFP* 融合质粒转化拟南芥悬浮细胞和原生质体

通过冻融法将 *AtRGS1::GFP* 融合质粒导入农杆

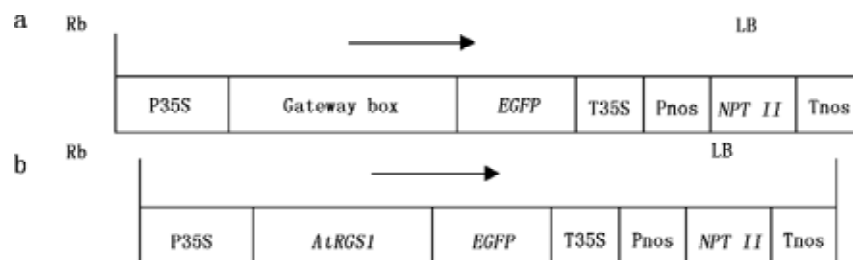


图 1 pK7FWG2 质粒(a)和 *AtRGS1::GFP* 融合质粒(b)的 T-DNA 区域

Fig.1 T-DNA region of vector pK7FWG2 (a) and fusion vector *AtRGS1::GFP* (b)

P35S: CaMV 35S 启动子; Gateway box: Gateway 克隆特有基因组合片段; *EGFP*: 增强型 GFP 基因编码序列; T35S: CaMV 35S 终止子; Pnos: nos 启动子; *NPT II*: 卡那霉素抗性基因编码序列; Tnos: nos 终止子; RB: T-DNA 右边界; LB: T-DNA 左边界。

菌 GV3101, 挑取菌落进行 *AtRGS1* 特异性引物的 PCR 鉴定, 再选取 PCR 扩增特异性条带较亮的阳性克隆, 转化构建好的拟南芥野生型 Col 悬浮细胞系; 利用 PEG 介导法将 *AtRGS1::GFP* 融合质粒转化现用现制的拟南芥幼苗叶片原生质体。

3 *AtRGS1* 蛋白的细胞定位

通过上述获得的转化细胞培养 48 h 后, 取适量样品用细胞悬浮培养基稀释后, 直接用荧光显微镜观测拍照。结果显示, *AtRGS1*-GFP 融合蛋白绿色荧光集中于细胞膜上表达, 而对照中的 GFP 绿色荧光分布于整个细胞, 由此推测 *AtRGS1* 蛋白分布于细胞膜(壁)上(图 2)。

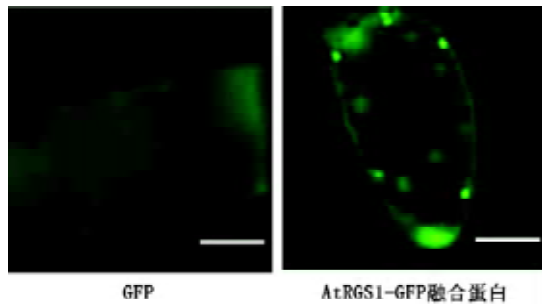


图 2 拟南芥悬浮细胞中 *AtRGS1* 蛋白的细胞定位

Fig.2 Cellular localization of *AtRGS1* protein in *Arabidopsis* suspension cells

标尺=10 μm 。

4 *AtRGS1*-GFP 融合蛋白的 Western blotting 印迹鉴定

为验证转化细胞中 *AtRGS1*-GFP 融合蛋白的存在, 采用 GFP 一抗对转化细胞蛋白提取物进行 Western blotting 印迹鉴定。已知 *AtRGS1* 分子量为 53 kDa, GFP 分子量为 27 kDa, *AtRGS1*-GFP 融合蛋白理论上应为 80 kDa。转化 *AtRGS1-GFP* 融合基因的细胞蛋白提取物, 经 SDS-PAGE 电泳, 转膜、杂交与显色, 发现在约 80 kDa 大小处, 有一条特异性条带显示(图 3), 证明 *AtRGS1-GFP* 融合基因在转化细胞中得到了正确表达。

5 *AtRGS1* 蛋白的原生质体定位

进一步用原生质体瞬时表达技术研究 *AtRGS1* 蛋白细胞水平的定位情况。结果显示, 对照中绿色荧光分布于整个原生质体, 而 *AtRGS1-GFP* 融合基因绿色荧光集中于原生质体细胞膜特异性表达(图 4)。结合图 2 的结果, 表明 *AtRGS1* 蛋白定位于拟

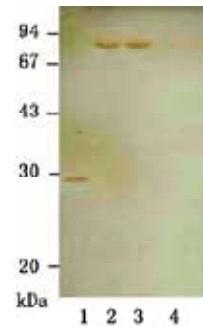


图 3 转化细胞中 *AtRGS1*-GFP 融合蛋白的 Western blotting 检测

Fig.3 Western blotting analysis of *AtRGS1*-GFP fusing protein in transformed cells

1: 对照; 2、3: 转化重组融合蛋白的细胞蛋白提取物; 4: 空白对照。

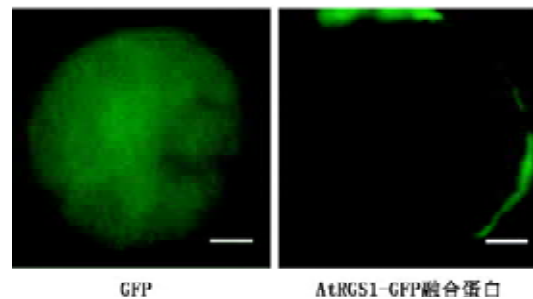


图 4 拟南芥叶肉原生质体中 *AtRGS1* 蛋白的原生质体定位

Fig.4 Protoplast localization of *AtRGS1* protein in *Arabidopsis* mesophyll protoplasts

标尺=5 μm 。

南芥细胞的质膜上。

讨 论

RGS 蛋白广泛存在于真菌、线虫及哺乳动物细胞中, 是一组大小不同、功能多样的蛋白质大家族, 作为 GTP 水解酶活化蛋白(GAPs), 负调节 G 蛋白介导的细胞信号转导(De Vries 等 2000)。迄今为止, 哺乳动物中已分离出 20 多种 RGS 蛋白, 进一步的研究发现, 不同的 RGS 蛋白调节不同的 G 蛋白信号转导, 这种功能特异性与 RGS 蛋白亚细胞水平的定位有关。RGS 除了定位于细胞质膜上, 也存在于细胞内其它类型(如高尔基体)的膜上, 大部分 RGS 蛋白在细胞中的分布有两个库: 胞质库和膜结合库, 且许多 RGS 可以从胞质中转运至膜上(De Vries 等 1996, 1998, 2000; Wylie 等 1999)。迄今,

只有少数RGS蛋白在胞内得到了精确定位, 对于RGS蛋白在亚细胞水平上的定位还知之甚少。

拟南芥AtRGS1是哺乳动物RGS的第一个植物同源基因。其编码的蛋白AtRGS1由459个氨基酸组成, 氨基酸249~459组成的C末端存在高度保守RGS功能结构域。已有的研究发现, AtRGS1具有GAPs蛋白活性, 能够与G α 亚基互作, 加速GTP水解, 调节植物G蛋白信号转导, 调节糖信号转导, 且可能是D-葡萄糖的一个受体蛋白(Chen等2003; Chen和Jones 2004; Johnston等2007), 但其详细的生理功能还知之甚少。本文采用GFP融合蛋白表达技术, 初步研究AtRGS1在细胞内定位的结果表明, AtRGS1定位于细胞的质膜上(图2、4)。AtRGS1作为一种膜蛋白, 其在植物生长发育过程中的调节作用尚需进一步研究。

参考文献

- Abel S, Theologis A (1994). Transient transformation of *Arabidopsis* leaf protoplasts: a versatile experimental system to study gene expression. *Plant J*, 5 (3): 421~427
- Bechtold N, Pelletier G (1998). *In planta Agrobacterium*-mediated transformation of adult *Arabidopsis thaliana* plants by vacuum infiltration. *Methods Mol Biol*, 82: 259~266
- Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, Ward WW, Prasher DC (1994). Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 263: 802~805
- Chen JG, Jones AM (2004). AtRGS1 function in *Arabidopsis thaliana*. *Methods Enzymol*, 389: 338~350
- Chen JG, Willard FS, Huang JR, Liang JS, Chasse SA, Jones AM, Siderovski DP (2003). A seven-transmembrane RGS protein that modulates plant cell proliferation. *Science*, 301: 1728~1731
- Chen Y, Ji FF, Xie H, Liang JS (2006a). Overexpression of the regulator of G-protein signalling protein enhances ABA-mediated inhibition of root elongation and drought tolerance in *Arabidopsis*. *J Exp Bot*, 57 (9): 2101~2110
- Chen Y, Ji FF, Xie H, Liang JS, Zhang JH (2006b). The regulator of G protein signaling proteins involve in sugar and abscisic acid signaling in *Arabidopsis* seed germination. *Plant Physiol*, 140: 302~310
- Davis SJ, Vierstra RD (1998). Soluble, highly fluorescent variants of green fluorescent protein (GFP) for use in higher plants. *Plant Mol Biol*, 36: 521~528
- De Vries L, Elenko E, Hubler L, Jones TLZ, Farquhar MG (1996). GAIP is membrane-anchored by palmitoylation and interacts with the activated (GTP-bound) form of G α_i subunits. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93: 15203~15208
- De Vries L, Elenko E, McCaffery JM, Fischer T, Hubler L, McQuistan T, Watson N, Farquhar MG (1998). RGS-GAIP, a GTPase-activating protein for G α_i heterotrimeric G proteins, is located on clathrin-coated vesicles. *Mol Biol Cell*, 9: 1123~1134
- De Vries L, Zheng B, Fischer T, Elenko E, Farquhar MG (2000). The regulator of G protein signaling family. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 40: 235~271
- Johnston CA, Taylor JP, Gao YJ, Kimple AJ, Grigston JC, Chen JG, Siderovski DP, Jones AM, Willard FS (2007). GTPase acceleration as the rate-limiting step in *Arabidopsis* G protein-coupled sugar signaling. *Proc Natl Acad Sci USA*, 104 (44): 17317~17322
- Kościana E, Wypijewski K (2001). Electroporated intact BY-2 tobacco culture cells as a model of transient expression study. *Acta Biochim Pol*, 48 (3): 657~661
- Stewart CN Jr (2001). The utility of green fluorescent protein in transgenic plants. *Plant Cell Rep*, 20: 376~382
- Willard FS, Siderovski DP (2004). Purification and *in vitro* functional analysis of the *Arabidopsis thaliana* regulator of G-protein signaling-1. *Methods Enzymol*, 389: 320~338
- Wylie F, Heimann K, Le TL, Brown D, Rabnott G, Stow JL (1999). GAIP, a G α_{i-3} -binding protein, is associated with Golgi-derived vesicles and protein trafficking. *Am J Physiol Cell Physiol*, 276: C497~C506