

研究报告 Original Papers

叶片中GUS染色观测油体含量技术体系的建立

胡佳^{1,2}, 曾文婕², 刘春林^{1,2,*}¹湖南农业大学农学院, 长沙410128; ²湖南省作物种质创新和资源利用国家重点实验室培育基地, 长沙410128

摘要: 植物油体大致可以分为两种: 生殖器官(种子)中的油体和营养器官中的油体。营养器官中的油体数量相对少而小, 且分布弥散, 导致在已有的研究报道中, 有关营养器官中油体的研究很少。为了实现对叶片中油体进行方便有效的观察, 我们将生殖器官与营养器官这两种油体上共有的油体蛋白3 (Oleosin3)对应的启动子与GUS指示基因融合后转化到叶片积累油体的拟南芥突变体中, 经GUS染色成功观察到蓝色斑点。这一研究成功建立了可用于直观检测叶片中油体存在与否的技术体系, 为后续营养器官中油体形成机制的研究提供了有力的技术保障。

关键词: 叶片; 油体; 油体蛋白; GUS染色

植物油脂是人类食用油和生物能源的重要来源, 近年对油脂研究取得了重大进展(阳天泉等2013; 苑丽霞等2015)。作为油脂储存的基本单位, 油体是细胞中常见的一种细胞器(Fei等2008; Szymanski等2014), 由单层磷脂酸膜包裹, 膜表面有很多决定油体性质和功能的油体膜蛋白, 例如油体蛋白(oleosins, OLEs) (Deruyffelaere等2015)、油体钙蛋白(caleosin) (Shen等2016)、seipin蛋白(Cai等2015)等, 它们大多数都和维持油体的稳定相关。油体内部包裹着中性脂肪酸, 主要为甾醇酯(steroid esters, SEs)和三酰甘油(triacylglycerol, TAG) (Bartz等2007)。在种子中, 油体的主要生物学功能是为种子萌发和幼苗早期的生长发育提供能量和碳骨架, 保证植物的正常发育(Miquel等2014)。在营养生长阶段也会有微量油体的存在, 但是其结构和生物学功能与种子中相比有较大差异(Murphy 2012; Huang等2013)。在营养生长阶段, 油体主要和生物抗性相关, 参与多种抗性途径(Hara-Nishimura和Hatsugai 2011)。相对种子中油体, 叶片中的油体数量少且分散, 油体的体积也更小, 染色后在普通光学显微镜下很难观察, 这也是目前植物中以种子油体为主要研究对象的原因之一。为了有效地对叶片中油体开展研究, 急需建立一套能直接观测到叶片中油体存在的技术体系。通过对突变体进行筛选, 我们获得了叶片中高油体含量的突变体植株*hcob* (high content of oil body), 并发现该突变基因所合成蛋白为多梳蛋白抑制复合体2 (polycomb repressive complex2, PRC2)的功能基因, PRC2能够通过调节H3K27的

三甲基化水平控制下游基因的表达(Chen等2010)。以此突变体为实验材料, 本课题通过将油体蛋白合成基因*Oleosin3*的启动子构建到GUS指示基因的上游得到目的表达框, 然后通过农杆菌介导的浸花法将构建得到的表达框转化到野生型和*hcob*中, 获得转基因植株后通过GUS染色观察不同遗传背景拟南芥叶片中*Oleosin3*启动子的启动情况。染色结果发现, *hcob*突变体的叶片明显能够被染成蓝色, 说明叶片中油体的直接观测系统已成功建立。

材料与方法

1 材料

拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)哥伦比亚生态型Col-0、营养组织中高油体含量突变体*hcob*、根瘤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101、大肠杆菌DH5 α 和载体pBI101均由湖南农业大学植物发育与表观遗传调控实验室提供, 质粒DNA微量提取试剂盒和凝胶DNA微量回收试剂盒购自Magen公司。

2 方法

2.1 拟南芥生长

营养土拌匀后, 将种子播种在装有营养土的小钵中, 用保鲜膜密封保湿, 放于4°C避光保存3 d, 转移到光照培养室3 d后揭膜, 定期浇灌水和1/4MS营养液。

收稿 2016-09-21 修定 2016-12-08

资助 国家自然科学基金(31571707)。

* 通讯作者(E-mail: liucl100@126.com)。

2.2 引物设计

通过Tair网站(<https://www.arabidopsis.org/>)查询*Oleosin1*和*Oleosin3*的完整基因序列,并在它们对应编码框的3'端设计荧光定量PCR (qPCR)的引物。另外,选取*Oleosin3*基因ATG前2 050 bp作

为启动子区域设计引物进行启动子扩增。根据pBI101载体上的*GUS*基因序列设计转基因植株检测引物和检测*GUS*基因表达情况的引物。引物设计所用软件为Premier Primer 5,引物序列如表1所示。

表1 文中使用的引物

Table 1 Primers used in present work

引物名称	序列(5'→3')	用途
qOLEPSIN1F	GGATTTACAAGTACGCAACGGGA	表达分析
qOLEPSIN1R	AGTACGGTACACGGTCATGTTCCC	表达分析
qOLEPSIN3F	CGGCGTATGGCTGATGCGGTA	表达分析
qOLEPSIN3R	CCCGGCTCATGGGTCTCAGTCA	表达分析
qGUSF	CACACCGATAACCATCAGCG	表达分析
qGUSR	ATCCAGCCAT GCACACTGATA	表达分析
GUSF	GCGGCGATTTGGAAACGGCA	转基因检测
GUSR	GAAGATCCCTTTCTTGTTAC	转基因检测
OLEOSIN3GUSF	CCCAAGCTTGAGCATCTAGTCGAATGTGTATATATT	载体构建
OLEOSIN3GUSR	GCTCTAGAGTCGATTGATATGATATAAAAATAAAAAG	载体构建
Actin2F	CTTGACCAAGCAGCATGAA	内参基因
Actin2R	CCGATCCAGACACTGTACTTCCTT	内参基因

2.3 片段扩增与pBI101-OLE3p:GUS载体构建

用CTAB法提取野生型拟南芥Col-0叶片的DNA,并以此作为模板用OLEOSIN3GUSF/OLEOSIN3GUSR为引物扩增*Oleosin3*基因的启动子。切胶回收后连接pEASY亚克隆载体,并转化大肠杆菌DH5 α ,菌落PCR检测后选阳性克隆送公司测序。用HindIII/XbaI双酶切测序结果匹配的pEASY-OLE3p质粒及pBI101载体,切胶回收后用T₄连接酶16°C连接过夜,连接后进行大肠杆菌DH5 α 的转化。菌落PCR检测呈阳性的菌株用质粒提取试剂盒提取质粒,并用HindIII/XbaI进行酶切验证。

2.4 拟南芥遗传转化及转基因植株检测

将构建成功的质粒pBI101-OLE3p:GUS转化根瘤农杆菌GV3101,挑取正确的单菌落于加有庆大霉素(30 mg·L⁻¹)、卡那霉素(50 mg·L⁻¹)、利福平(100 mg·L⁻¹)的10 mL YEB培养基中,28°C,200 r·min⁻¹培养36 h,然后将菌液扩大至50 mL,待菌液浓度达到OD₆₀₀为0.8左右时,用浸花法分别转化*hcob*和Col-0,暗处理24 h后转至光照培养室生长。待种子成熟后用含有卡那霉素(30 mg·L⁻¹)的1/2MS

培养基进行筛选,2周后将抗性植株转至装有营养土的小钵中生长,待植株生长2周后用CTAB法提取植株DNA进行PCR检测,检测呈阳性的为T₁代转基因植株。

2.5 RNA提取和转录水平的荧光定量PCR分析

选生长至30 d健康的叶片为实验材料,在下午3:00取样后液氮迅速冷冻,用Trizol法提取RNA(Liu等2016)。以2 μ g RNA为模板反转录得到cDNA,待cDNA稀释至5 ng· μ L⁻¹后取3 μ L进行荧光定量PCR (qPCR)分析。qPCR程序为:预变性95°C 4 min;变性95°C 30 s;退火和延伸60°C 30 s,40个循环。溶解曲线设置为从60°C升到95°C,0.05°C·s⁻¹。qPCR结果以Actin2做内参用相对C_t值计算方法进行计算。

2.6 转基因叶片和种子GUS染色观察

在下午3:00选取开花后20 d (20 DAF)的T₁代植株果荚和生长至30 d的T₂代转基因植株莲座叶,放于GUS染液中进行抽真空,直至叶片和果荚沉入染液底部。取出后37°C染色过夜,酒精脱色后用体视显微镜观察染色情况(Müller等2016)。

实验结果

1 *Oleosin1*和*Oleosin3*在*hcob*叶片中的表达量高于野生型

油体蛋白(oleosins)是在生殖器官与营养器官中两种油体上共有的油体膜蛋白,在拟南芥中有5个同源序列。在筛选得到叶片中高油体含量的突

变体*hcob*后,我们用*Oleosin1*和*Oleosin3*为研究目标在生长至30 d的突变体叶片中进行了转录水平分析。分析结果发现,在突变体中,*Oleosin1*和*Oleosin3*基因的表达量明显高于野生型(图1)。说明在叶片中,*Oleosins*家族基因的转录水平可以直接反应油体含量的高低。

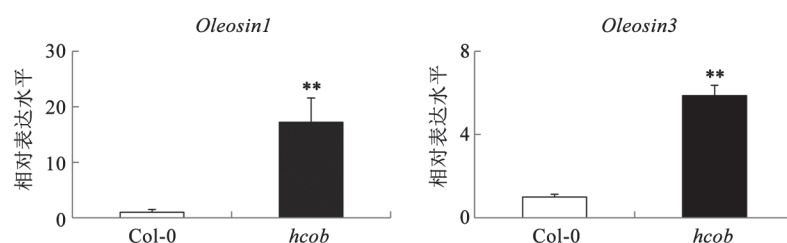


图1 叶片中油体蛋白基因*Oleosin1*和*Oleosin3*的转录水平分析

Fig.1 Transcription levels analysis of *Oleosin1* and *Oleosin3* in leaves

油体蛋白基因*Oleosin1*和*Oleosin3*在同时期野生型Col-0和突变体*hcob*叶片中的qPCR检测结果。**表示在 $P < 0.01$ 水平有显著差异。

2 构建得到pBI101-OLE3p:GUS表达载体

在得到*Oleosins*家族基因的表达水平可以直接反应油体含量的高低这一结果以后,我们利用*Oleosins*家族基因的启动子作为信号,和*GUS*基因融合以后希望通过GUS染色水平直观反应出油体含量的高低。首先,我们选取*Oleosin3*启动子为目

的片段,以野生型拟南芥DNA为模板扩增得到了预期大小的DNA片段(图2-A),将测序结果和原序列比对后选取了正确的亚克隆菌株进行目的载体的连接,对连接转化后得到的阳性菌株分别进行PCR验证和酶切验证(图2-B),验证结果正确,载体构建成功。

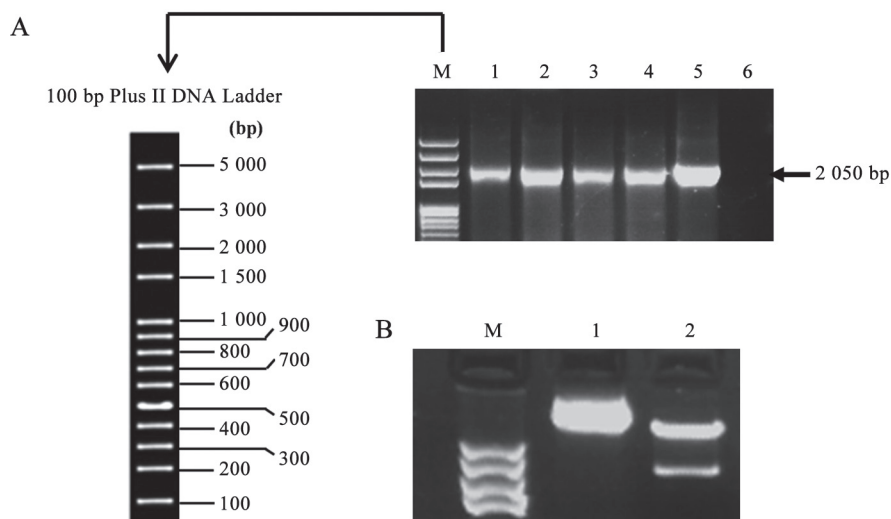


图2 *Oleosin3*启动子扩增和pBI101-OLE3p:GUS表达载体酶切验证

Fig.2 *Oleosin3* promoter amplification and the restriction endonuclease verification of the construct pBI101-OLE3p:GUS

A: *Oleosin3*启动子扩增结果,其中1~5为以拟南芥野生型DNA为模板扩增结果,大小为2 050 bp,6为阴性对照,M为100 bp plus DNA marker的分子量标准,如图A左侧所示;B: pBI101-OLE3p:GUS载体HindIII和XbaI酶切结果,1为未酶切pBI101-OLE3p:GUS质粒电泳结果,2为pBI101-OLE3p:GUS质粒用HindIII和XbaI酶切后结果。M为100 bp plus DNA marker。

3 筛选得到含有目的基因的转基因植株

将构建得到的载体通过浸花法对野生型和突变体拟南芥进行农杆菌的转化后,收到的种子经

过卡那霉素筛选得到了抗性植株(图3-A)。将抗性苗转移至营养土中正常生长2周以后通过DNA检测,证明抗性苗为转基因植株(图3-B)。

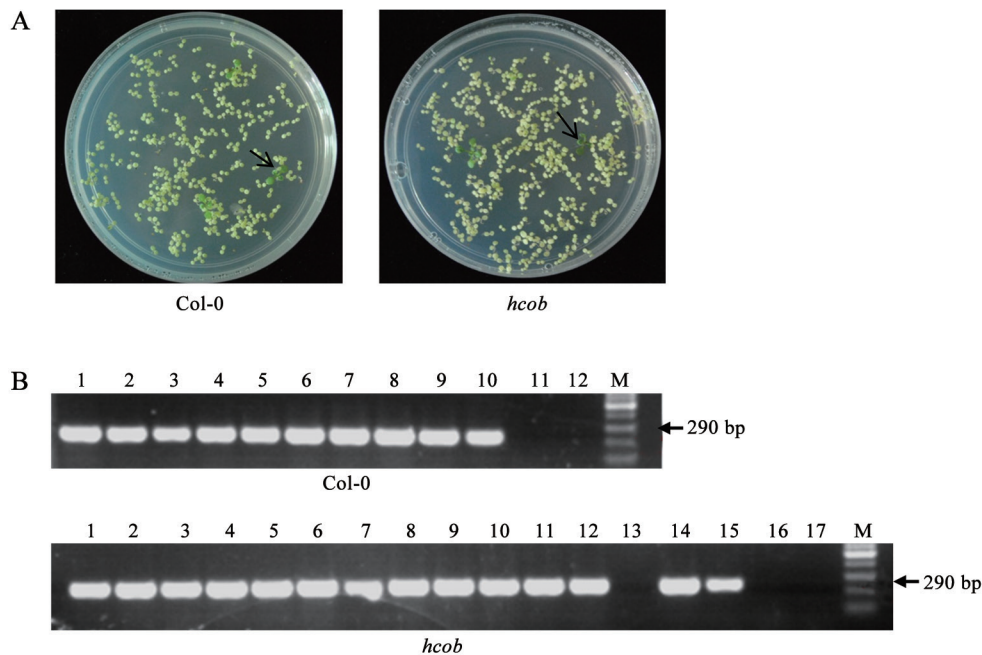


图3 拟南芥转基因植株筛选和分子验证

Fig.3 The antibiotic selection of transgenic plants and corresponding molecular verification

A: 拟南芥浸花后所得种子在含有浓度为 $30 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 卡那霉素的1/2MS培养基上筛选结果,抗性植株如箭头所示; B: 抗性植株分子检测结果。上图为以野生型拟南芥为遗传背景的抗性植株检测结果,1~10为抗性植株,11为Col-0野生型,12为空白对照。下图为以突变体*hcob*型拟南芥为遗传背景的抗性植株检测结果,1~15为抗性植株,16为Col-0野生型,17为空白对照。M为100 bp plus DNA marker。

4 *Oleosin3*启动子在突变体和野生型叶片中具有不同的启动能力

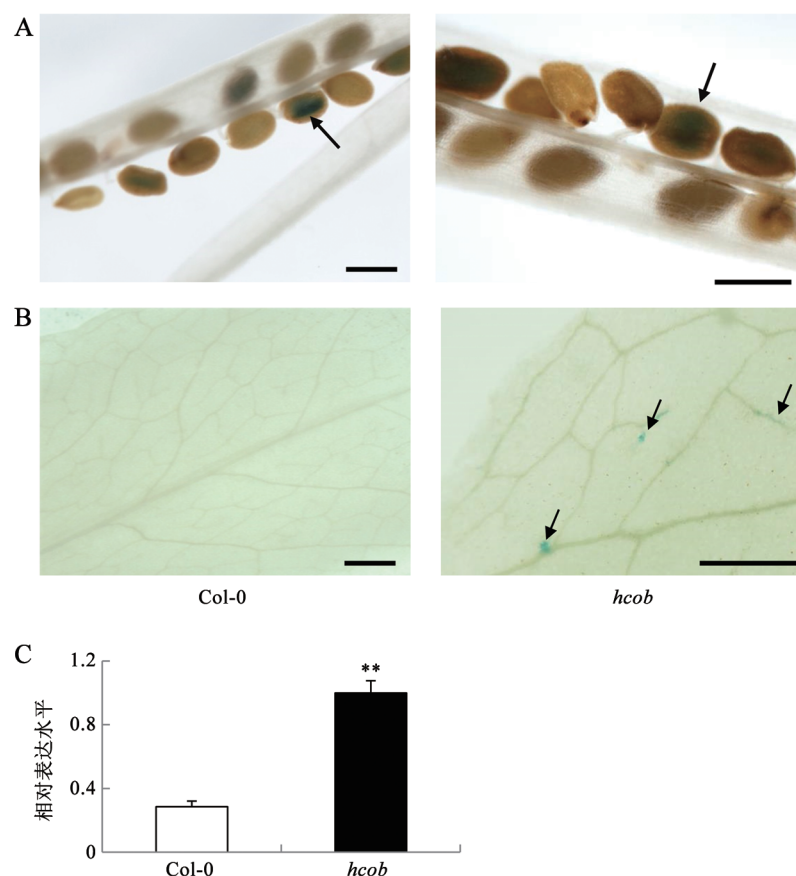
通过对开花后20 d的 T_1 代植株的种子进行GUS染色发现,野生型和突变体转基因部分种子能被染成蓝色,且染色较深(图4-A箭头所示),说明目的基因在转基因植株中能够被正确地表达,且*Oleosin3*这种合成油体蛋白的基因在种子中都有较高的表达量,但是由于GUS染色的不敏感性,很难判断出这类基因在野生型和突变体种子中表达量的差异。确定转基因植株可用以后,在 T_2 代选取生长至30 d的转基因植株莲座叶进行GUS染色,染色发现,在叶片中以突变体为背景的转基因叶片染色结果明显强于以野生型为背景的染色强度(图4-B箭头所示)。说明*Oleosin3*基因启动子在突变体中的启动能力大于野生型。

对生长至30 d的野生型和突变体转基因植株莲座叶进行RNA提取和qPCR验证后发现,突变体

中GUS基因的表达水平明显高于野生型(图4-C),说明*Oleosin3*基因启动子在突变体叶片中的启动能力大于野生型叶片,与GUS染色实验结果相符合,实验结果确凿可信。

讨 论

近年来对oleosins的研究主要集中在种子胚中,而在营养器官中的研究还比较少。通过本课题组研究发现,*Oleosin1*和*Oleosin3*在野生型拟南芥中都只有微弱的表达,甚至不能通过GUS染色观察到对应启动子的启动情况。但是在叶片油体含量较高的突变体*hcob*中,我们发现*Oleosin1*和*Oleosin3*都有很高的表达水平,并且GUS染液能够对*Oleosin3*启动子启动GUS基因表达植株的叶片进行染色,但是对应的*Oleosin1*启动子启动GUS基因表达植株的叶片不能被染色。所以在后期实验中,我们将以*Oleosin3*基因启动子启动GUS基因表

图4 *Oleosin3*启动子在不同背景拟南芥中启动能力Fig.4 The promoting activity of *Oleosin3* promoter in different *Arabidopsis* background

A: *Oleosin3*启动子在野生型Col-0和突变体*hcob* 20 DAF发育时期种子中的表达情况, GUS染色结果如箭头所示, 标尺=0.5 mm; B: *Oleosin3*启动子在野生型Col-0和突变体*hcob*生长至30 d时叶片中的表达情况, 染色部分如箭头所示, 标尺=3 mm; C: *GUS*基因在不同遗传背景转基因植株中表达水平的分子检测。 **表示在 $P<0.01$ 水平有显著差异。

达的表达框为工具, 实现对叶片中油体含量高低的直观观察。选择两类油体共有的油体蛋白基因来指示油体的存在, 有明显的优势, 因为通过对种子的染色, 可以明确了解表达框是否工作, 如果种子染色后蓝色很深, 而叶片染色没有蓝斑点, 说明叶片中没有或者只有微量的油体; 相反, 如果叶片上有蓝色斑点, 则说明叶片中存在较多的油体。

作为种子中油体表面的主要膜蛋白, OLEs在种子中被大量合成, 但是由于染色过程中, 果荚和种皮将子叶阻隔在里面, GUS底物很难均匀渗透到每颗种子中, 导致染色结果不均一(图4-A)。为使底物能均匀进入种子内部, 划破果荚与反复抽真空或许可以解决这一问题。

参考文献

Bartz R, Li WH, Venables B, Zehmer JK, Roth MR, Welti R, Ander-

son RG, Liu P, Chapman KD (2007). Lipidomics reveals that adiposomes store ether lipids and mediate phospholipid traffic. *J Lipid Res*, 48 (4): 837-847

Cai Y, Goodman JM, Pyc M, Mullen RT, Dyer JM, Chapman KD (2015). *Arabidopsis* seipin proteins modulate triacylglycerol accumulation and influence lipid droplet proliferation. *Plant Cell*, 27 (9): 2616-2636

Chen DH, Molitor A, Liu CL, Shen WH (2010). The *Arabidopsis* PRC1-like ring-finger proteins are necessary for repression of embryonic traits during vegetative growth. *Cell Res*, 20 (12): 1332-1344

Deruyffelaere C, Bouchez I, Morin H, Guillot A, Miquel M, Froissard M, Chardot T, D'Andrea S (2015). Ubiquitin-mediated proteasomal degradation of oleosins is involved in oil body mobilization during post-germinative seedling growth in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol*, 56 (7): 1374-1387

Fei W, Shui G, Gaeta B, Du X, Kuerschner L, Li P, Brown AJ, Wenk MR, Parton RG, Yang H (2008). Fld1p, a functional homologue of human seipin, regulates the size of lipid droplets in yeast. *J Cell Biol*, 180 (3): 473-482

- Hara-Nishimura I, Hatsugai N (2011). The role of vacuole in plant cell death. *Cell Death Differ*, 18 (8): 1298–1304
- Huang NL, Huang MD, Chen TL, Huang AH (2013). Oleosin of sub-cellular lipid droplets evolved in green algae. *Plant Physiol*, 161 (4): 1862–1874
- Liu B, Berr A, Chang C, Liu C, Shen WH, Ruan Y (2016). Interplay of the histone methyltransferases SDG8 and SDG26 in the regulation of transcription and plant flowering and development. *Biochim Biophys Acta*, 1859 (4): 581–590
- Miquel M, Trigui G, d'Andréa S, Kelemen Z, Baud S, Berger A, Deruyffelaere C, Trubuil A, Lepiniec L, Dubreucq B (2014). Specialization of oleosins in oil body dynamics during seed development in *Arabidopsis* seeds. *Plant Physiol*, 164 (4): 1866–1878
- Murphy DJ (2012). The dynamic roles of intracellular lipid droplets: from archaea to mammals. *Protoplasma*, 249 (3): 541–585
- Müller CJ, Valdés AE, Wang G, Ramachandran P, Beste L, Uddenberg D, Carlsbecker A (2016). Phabulosa mediates an auxin signaling loop to regulate vascular patterning in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 170 (2): 956–970
- Shen Y, Liu M, Wang L, Li Z, Taylor DC, Li Z, Zhang M (2016). Identification, duplication, evolution and expression analyses of caleosins in *Brassica* plants and *Arabidopsis* subspecies. *Mol Genet Genomics*, 291 (2): 971–988
- Szymanski J, Brotman Y, Willmitzer L, Cuadros-Inostroza Á (2014). Linking gene expression and membrane lipid composition of *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 26 (3): 915–928
- Yang TQ, Xu RH, Liu AZ (2013). Cloning and characterization of diacylglycerol acyltransferase gene (*NtDGAT2*) from tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). *Plant Physiol J*, 49 (1): 81–88 (in Chinese with English abstract) [阳天泉, 徐荣华, 刘爱忠(2013). 烟草二脂酰甘油酰基转移酶基因(*NtDGAT2*)的克隆与功能分析. *植物生理学报*, 49 (1): 81–88]
- Yuan LX, Mao X, Gao CY, Zhang L, Xue JA, Yang ZR, Li RZ (2015). Seed-specific over-expression of a diacylglycerol acyltransferase 1 gene (*VgDGATI*) increase seed oil accumulation in *Camelina sativa*. *Plant Physiol J*, 51 (5): 668–678 (in Chinese with English abstract) [苑丽霞, 毛雪, 高昌勇, 张莉, 薛金爱, 杨致荣, 李润植(2015). 种子特异表达二酰甘油酰基转移酶基因(*VgDGATI*)提高亚麻荠种子油脂积累. *植物生理学报*, 51 (5): 668–678]

The establishment of oil body content determination system with GUS staining observation in leaves

HU Jia^{1,2}, ZENG Wen-Jie², LIU Chun-Lin^{1,2,*}

¹College of Agriculture, Hunan Agriculture University, Changsha 410128, China; ²Hunan Provincial Key Laboratory of Crop Germplasm Innovation and Utilization, Changsha 410128, China

Abstract: Oil bodies can be roughly divided into seed oil body and vegetative oil body in plant. In vegetative organs, oil body was poorly reported because of the less, smaller and dispersion of the oil body in vegetative organs. In order to realize the convenient and effective observation of oil bodies in leaf, the promoter of the gene coding for oil body protein Oleosin3 which exists on both reproductive and vegetative oil bodies was fused with *GUS* gene, and then the cassette was transformed into the *Arabidopsis thaliana* mutant that can accumulate oil bodies in leaves. By GUS staining, blue spots were observed in mutant leaves. The result indicated that the visual detection technology system for oil body observation in leaf was successfully established, which would provide powerful technical support for the follow-up study of oil body formation mechanism in vegetative organs.

Key words: leaf; oil body; oleosins; GUS staining

Received 2016-09-21 Accepted 2016-12-08

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31571707).

*Corresponding author (E-mail: liucl100@126.com).