

农杆菌介导的 MpASR 蛋白在 洋葱表皮细胞的定位研究

刘海燕,冯冬茹,刘 兵,何炎明,王宏斌*,王金发

(有害生物控制与资源利用国家重点实验室,基因工程教育部重点实验室,中山大学生命科学学院,广州 510275)

摘要: 通过比较不同侵染液浓度、侵染时间、取材部位、预处理等条件下的转化效果,优化了农杆菌介导的洋葱鳞茎内表皮细胞转化系统,并且成功检测到大蕉 ASR 蛋白(MpASR)与 GFP 的融合蛋白在洋葱表皮细胞中的分布。

关键词: MpASR 蛋白;亚细胞定位;洋葱;内表皮细胞;绿色荧光蛋白;农杆菌

中图分类号: Q943

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2009)03-0218-05

Studies on Subcellular Localization of MpASR in Onion Epidermal Cells Mediated by *Agrobacterium*

LIU Hai-yan, FENG Dong-ru, LIU Bin, HE Yan-min, WANG Hong-bin*, WANG Jin-fa

(The State Key Laboratory of Biocontrol and Key Laboratory of Gene Engineering of The Ministry of Education,
School of Life Science, Sun Yat-sen University, Guangzhou 510275, China)

Abstract: The effects of several factors on onion (*Allium cepa* L.) epidermal cells transformation were studied, including concentration of infection solution, infection time, parts of material and pre-treatment. The transformation system for onion epidermal cells mediated by *Agrobacterium* was established. The location of MpASR from *Musa sapientum* fused with GFP in onion epidermal cells was detected successfully.

Key words: MpASR; Subcellular localization; Onion; Epidermic cell; GFP; *Agrobacterium*

蛋白质是生物学功能的主要执行者,亚细胞定位为深入理解蛋白质的生物功能提供重要的线索^[1]。农杆菌介导的植物悬浮细胞系、愈伤组织、原生质体和洋葱(*Allium cepa* L.)鳞茎叶表皮细胞等是研究植物蛋白质亚细胞定位的常用方法^[2-5]。因取材方便,操作简单,细胞结构明显且无叶绿体,结果便于观察等,洋葱鳞茎叶内表皮细胞成为研究蛋白质亚细胞定位的最方便遗传转化受体^[6-9]。

MpASR 蛋白是一类小分子碱性蛋白,能提高植物对逆境和外源 ABA 的耐受能力^[10]。不同来源的 ASR 蛋白具有高度保守的 C 端核定位信号肽^[6]。但不同植物中的 ASR 蛋白的亚细胞定位不同,暗示该蛋白可能具有多种功能和作用分子^[11]。ASR 蛋白是核定位蛋白,具 DNA-Binding 活性,起着类

似真核生物非组蛋白染色体蛋白的作用,在逆境胁迫时保护核 DNA 的稳定性^[12-13]; ASR 蛋白定位于细胞质中,通过感知逆境胁迫引起的细胞质内 Zn^{2+} 浓度变化,改变蛋白构象来应答逆境胁迫^[14]。为了研究大蕉(*Musa sapientum*)来源的 MpASR 蛋白的生理功能,本文在优化农杆菌 LBA4404 介导的洋葱表皮细胞转化体系的基础上,将大蕉 *Mpasr* 基因与绿色荧光蛋白基因(GFP)融合,构建植物表达载体并转化洋葱表皮细胞,对 MpASR 蛋白的亚细胞定位进行研究。

1 材料和方法

1.1 材料、试剂和仪器

洋葱(*Allium cepa* L.)球茎由广东省农业科学院

收稿日期:2008-06-19 接受日期:2009-01-23

基金项目:广东省自然科学基金项目(7003637);国家自然科学基金项目(30771235)资助

* 通讯作者 Corresponding author

蔬菜研究所提供,限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶 (Invitrogen 公司产品),大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 DH5 α ,农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株 LBA4404,质粒 pCAMBIA1302(本实验室保存),质粒 pCAMBIA1301-gfp-asr,DNA 快速回收试剂盒(鼎国公司产品)。测序工作由英骏上海公司完成。高渗培养基(MS + 蔗糖 30 g L⁻¹ + 甘露醇 0.4 mol/L + 琼脂 5.5 g L⁻¹,pH 5.8)。荧光共聚焦显微镜(Leica TCS-SP2)。

1.2 植物表达载体的构建

在 *gfp* 基因 ORF 的两端设计分别带有 *Hind*III 酶切位点的 Forward 引物,和去除终止密码子,且带有嵌套的 *Eco*RI-*Nco*I 酶切位点的 Reverse 引物。根据 *Mpasr* 基因的 ORF 序列设计分别带有 *Eco*RI 酶切位点的 Forward 引物 5'-CCCAAGCTTATG-GCCGAGGAGAAGCACCA-3',以及带有 *Bam*HI 酶切位点的 Reverse 引物 5'-CATGCCATGGAATTCAAAGAGG-TGGTGGTGAT-3'。将两端分别带有 *Hind*III 和 *Eco*RI + *Nco*I 酶切位点的 *gfp* 基因 ORF 的 PCR 产物,以及两端分别带有 *Eco*RI 和 *Bam*HI 酶切位点的 *Mpasr* 基因 ORF 的 PCR 产物连接至 pMD18-Tsimple 载体,并克隆至大肠杆菌 DH5 α ,经酶切及测序鉴定。鉴定序列无误的克隆用两端酶切位点对应的限制性内切酶进行酶切及回收,回收片段依次连接至 pRI35ST 载体上。PRI35ST 作为中间载体并提供 CaMV35S 启动子。连接后的质粒命名为 PRI35S-gfp-asr。将该质粒用 *kpn*I + *Pst*I(pRI35ST 载体上的)双酶切,酶切产物用 DNA 快速回收试剂盒回收长为 1.7 kb 的片段。同时用 *Kpn*I + *Pst*I 双酶切 pCAMBIA1301 质粒,回收载体片段,并与回收

的 1.7 kb 的片段相连,即完成质粒的构建(图 1)。我们将该质粒命名为 pCAMBIA1301-gfp-asr。用电转法将连接产物转化进农杆菌 LBA4404,用菌液 PCR 和质粒酶切双重鉴定法进行鉴定,将阳性克隆送至英骏公司测序。

1.3 转化条件的优化

将携带 pCAMBIA1302 质粒的农杆菌菌株接种至 50 ml YEB 液体培养液中(含有 50 mg ml⁻¹ 卡那霉素,125 mg ml⁻¹ 链霉素和 100 mmol/L 乙酰丁香酮),28 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。培养物于 2 800 \times g 离心 10 min 收集菌体,并重悬于 MS 液体培养基(含 10 mmol/L MgCl₂,100 mmol/L 乙酰丁香酮)中,使 OD₆₀₀ 在 1.0 左右。

选取新鲜、生长状况良好的洋葱,除去外面的 3~4 层鳞片,将鳞茎在 75% 乙醇中浸泡 10 min,用无菌水洗涤 3 次。用无菌解剖刀十字形切开洋葱球茎,取球茎内部的较新鲜肥厚的鳞片,在内表皮(凹面)用刀片划出面积为 1 cm² 的小方块,用镊子将小方块撕下,贴近叶肉的一面朝下,平铺于含高渗培养基的培养皿内。将预培养后的洋葱内表皮置于 MS 液体培养基重悬的菌液,20 min 后夹起表皮一角,稍滤干菌液,平铺于 MS 固体培养基上,以光周期 16 h/8 h,25 $^{\circ}$ C 共培养。16 h 后,取出洋葱内表皮小块,用干净的液体 MS 培养基稍稍晃动洗涤以去除附着的农杆菌,压片法制片,于荧光共聚焦显微镜下观察、拍照。

为了优化转化条件,分别比较了不同的侵染菌液浓度(OD₆₀₀=0.2、0.6、1.0、1.5)和不同的感染时间(3 min、5 min、10 min、15 min、20 min、25 min、30 min)的组合,以及不同部位鳞茎叶内表皮(球茎

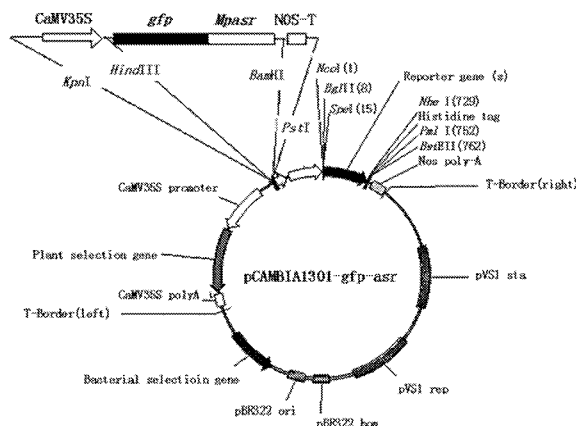


图 1 pCAMBIA1301-gfp-asr 结构示意图

Fig. 1 Structural diagram of pCAMBIA1301-gfp-asr

外中层、内层核心区),不同预培养时间等条件下的转化效果。在目镜 10 × 荧光显微镜下随机挑取 5 个视野进行观察,统计转化细胞与全部细胞的平均百分比。以上实验均重复 3 次。

2 结果和分析

2.1 转化体系的建立

农杆菌侵染液浓度和侵染时间是影响农杆菌介导的遗传转化效率的关键因素。表 1 显示了侵染液分别浓度为 $OD_{600}=0.2$ 、 0.6 、 1.0 和 1.5 ,侵染时间分别为 3 min、5 min、10 min、15 min、20 min、25 min、30 min 的转化效率。可见侵染液浓度为 $OD_{600}=0.6$,侵染时间为 20 min 的转化效率最好(表 1)。当侵染液浓度分别为 $OD_{600}=0.2$,侵染 3 min

时,洋葱表皮细胞几乎不被转化,只有细胞壁上的自发荧光(图版 I: A),说明侵染液浓度过低,侵染时间过短时的转化效果不明显。随着侵染液浓度升高和侵染时间延长,转化效率不断提高(图版 I: B);当侵染液浓度 $OD_{600}=0.6$,侵染 20 min 时,转化效果达到最佳(图版 I: C);随着侵染液浓度进一步提高和侵染时间延长,洋葱表皮细胞呈空泡化(图版 I: D),当侵染液浓度 $OD_{600}=1.0$,侵染 30 min 时,表皮细胞活力急剧下降,共培养 16 h 后在显微镜下空洞无核的死细胞明显增多(图版 I: E)。当侵染液浓度 $OD_{600}=1.5$,侵染时间达 15 min 以上时,在显微镜下多为空洞无核的死细胞,只在极少数存活细胞中可见绿色荧光(图版 I: E)。

表 1 不同转化时间与侵染液浓度下的转化率(%)

Table 1 Transformation rate (%) of onion epidermic cells under different inoculation time and concentrations

菌液浓度 Inoculation concentration (OD_{600})	侵染时间 Inoculation time (min)						
	3	5	10	15	20	25	30
0.2	0.8	1.0	2.3	4.5	7.0	7.8	11.0
0.6	2.1	6.0	12.8	19.0	34.0	23.0	17.0
1.0	5.2	20.0	23.0	13.0	11.1	4.7	3.5
1.5	4.1	3.3	1.0	0.2	0.3	0.2	0.1

采用农杆菌介导法进行遗传转化时,受体材料的选择对转化能否成功有很重要的影响。本实验中分别用洋葱鳞茎的外层叶(第 1~3 层)、中层叶(第 4~7 层)和内层叶(接近轴心部分)的内表皮细胞在侵染菌液浓度为 $OD_{600}=0.6$,侵染 20 min。结果表明(图 2),内层鳞茎叶的内表皮细胞转化效率很低(图版 I: F),中层最为理想(图版 I: G),外层内表皮细胞转化后在荧光显微镜下只能看到空洞的细胞结构(图版 I: H,I)。

以 MS 培养基对中层鳞茎叶内表皮细胞进行预培养 24 h 后,在侵染菌液浓度 $OD_{600}=0.6$,侵染 20 min 下进行转化。与未预处理的对照组相比,预

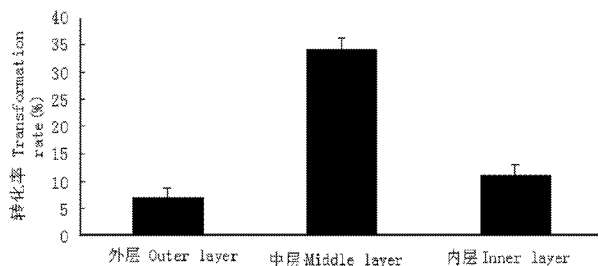


图 2 洋葱不同部位鳞茎叶表皮细胞的转化效率

Fig. 2 Transformation rate of epidermic cells in different layers of onion bulb

处理组的转化效率没有明显差异,表明在农杆菌介导的洋葱鳞茎叶内表皮细胞的转化中,预处理并非必需的。

通过比较不同条件下的转化效果,我们确定的优化转化条件为:球茎中层鳞茎叶内表皮为受体材料,不进行预培养处理,感染菌液浓度 $OD_{600}=0.6$,感染 20 min,感染后共培养时间 16 h。

2.2 MpASR 蛋白质亚细胞定位

在侵染菌液浓度 $OD_{600}=0.6$,侵染 20 min 的转化条件下,将分别含有 pCAMBIA1301-gfp-asr 质粒和 pCAMBIA1302 质粒的农杆菌 LBA4404,转化洋葱表皮细胞,经 16 h 共培养后观察。结果表明,携带 *gfp* 基因的 pCAMBIA1302 由于不含定位信号肽,因此普遍存在于细胞核和细胞质中(图版 I: J)。而转入了 pCAMBIA1301-gfp-asr 质粒的洋葱表皮细胞能表达 GFP::ASR 融合蛋白,在质膜和细胞核上都有明显绿色荧光,而细胞质则没有(图版 I: K)。

3 讨论

目前洋葱表皮细胞的遗传转化均采用粒子轰

击转化方法^[15],但需要昂贵的实验设备(基因枪)和实验成本高,且操作复杂限制了它的应用。农杆菌转化系统与其他基因转化系统相比,实验成本低,不需要特殊仪器,且操作简单^[7]。

农杆菌侵染液浓度和侵染时间是影响其介导的遗传转化效率的关键因素。本研究确定侵染液浓度为 $OD_{600}=0.6$,侵染时间为 20 min 的转化效率最好。侵染液浓度过低,侵染时间过短,转化效果不明显。而侵染液浓度过高,时间过长,洋葱鳞茎叶内表皮细胞活力急剧下降,共培养后在显微镜下空洞无核的死细胞明显增多,推测侵染液浓度过高,侵染时间过长造成表皮组织软腐而导致细胞死亡。在此转化条件下,中层鳞茎叶的内表皮细胞转化效率最为理想,这是因为外层鳞茎叶的内表皮细胞接近衰老,脱水相对严重,较多无核的死细胞;中层鳞茎叶内表皮细胞排列整齐,大小介于完全伸展和紧密排列之间,细胞结构完整;内层鳞茎叶的内表皮细胞排列十分致密,细胞也相对较小。由于菌液与细胞接触面积小降低了鳞茎叶内层表皮细胞的转化效率,而且致密排列的细胞在一定程度上阻止了农杆菌进入细胞间隙,从而影响了转化效果。本研究还优化了其他转化参数,并成功转化洋葱表皮细胞。

利用优化的转化体系,对 MpASR 蛋白进行了亚细胞定位研究,结果显示 ASR::GFP 融合蛋白分布于细胞质膜和细胞核内。推测 MpASR 蛋白的定位信号肽具有质膜和细胞核定位功能,亦可能是 MpASR 蛋白在细胞质膜中合成后,在核定位信号肽的作用下,经过转运过程到达细胞核。因此,下一步将对 MpASR 蛋白的定位信号区进行缺失突变和荧光动态跟踪研究,以明确该蛋白的合成和可能的转运过程,既而对其生理功能进行研究。

参考文献

- [1] Yamamoto K, Yamaguchi M, Okabe S. Direct visualization of cell movement in the embryonic olfactory bulb using green fluorescent protein transgenic mice: evidence for rapid tangential migration of neural cell precursors [J]. *Neuro Sci Res*, 2005, 51: 199-214.
- [2] Rizzuto R, Brini M, Pizzo P, et al. Chimeric green fluorescent protein as a tool for visualizing subcellular organelles in living cells [J]. *Curr Biol*, 1995, 5: 635-642.
- [3] Hanson M R, Kohler R H. GFP imaging: Methodology and application to investigate cellular compartmentation in plants [J]. *J Exp Bot*, 2001, 52(356): 529-539.
- [4] von Arnim A G, Deng X W, Stacey M G. Cloning vectors for the expression of green fluorescent protein fusion proteins in transgenic

plants [J]. *Gene*, 1998, 221(1): 35-43.

- [5] Guo S Q(郭书巧), Hang J(黄骥), Jiang Y(江燕). Cloning and expression analysis of rice C2H2 type Zn-finger protein gene *RZF71* [J]. *Hereditas(遗传)*, 2007, 29(5): 607-613.(in Chinese).
- [6] Zheng S, Henken B, Yul K. The development of a reproducible *Agrobacterium tumefaciens* transformation system for garlic (*Allium sativum* L.) and transgenic garlic resistant to beet armyworm (*Spodoptera exigua* Hübner) [J]. *Mol Breed*, 2004, 14: 293-307.
- [7] Eady C, Davis S, Catanach A, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of leek (*Allium porrum*) and garlic (*Allium sativum*) [J]. *Plant Cell Rep*, 2005, 24: 209-215.
- [8] Zheng S J, Khurstaleva L, Henken B, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of *Allium cepa* L.: The production of transgenic onions and shallots [J]. *Mol Breed*, 2001, 7: 101-115.
- [9] Eady C C, Weld R J, Lister C E. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation and transgenic-plant regeneration of onion (*Allium cepa* L.) [J]. *Plant Cell Rep*, 2000, 19(4): 376-381.
- [10] Yang C Y, Chen Y C, Jauh G Y, et al. A lily ASR protein involves abscisic acid signaling and confers drought and salt resistance in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2005, 139: 836-846.
- [11] Wang C, Liao S, Huang Y E, et al. Characterization of a desiccation-related protein in lily pollen during development and stress [J]. *Plant Cell Physiol*, 1998, 39(12): 1307-1314.
- [12] Maskin L, Frankel N, Gudesblat G, et al. Dimerization and DNA-binding of ASR1, a small hydrophilic protein abundant in plant tissues suffering from water loss [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 352: 831-835.
- [13] Gilad A, Amitai-Zeigerson H, Bar-Zvi D. ASR1, a tomato water stress-regulated gene: Genomic organization, developmental regulation and DNA-binding activity [J]. *Acta Hort*, 1997, 447: 441-453.
- [14] Kalifa Y, Gilad A, Konrad Z, et al. The water- and salt-stress-regulated *Asr1* (abscisic acid stress ripening) gene encodes a zinc-dependent DNA-binding protein [J]. *Biochem J*, 2004, 381: 373-378.
- [15] Eady C C, Reader J, Davis S, et al. Inheritance and expression of introduced DNA in transgenic onion plants (*Allium cepa*) [J]. *Ann Appl Biol*, 2003, 142(2): 219-224.

图版说明

图版 I

A~E. 不同转化条件下洋葱表皮细胞转化效果。侵染菌液浓度(OD_{600})、侵染时间分别为 0.2、3 min; 0.6、10 min; 0.6、20 min; 0.6、25 min; 1.0、30 min;

F~H. 不同来源的表皮细胞组织的转化。F、G、H 分别为内层、中层、外层鳞茎叶;

J. pCAMBIA1302 所携带的 *GFP* 基因的表达产物在洋葱表皮细胞中的定位;

K. 带核定位信号的 *GFP::ASR* 融合蛋白在洋葱表皮细胞中的定位。

红色箭头指示转化或定位效果。

Explanation of plate

Plate I

A ~ E. Transformation effects of onion epidermic cells under inoculation concentration and time combination, $OD_{600}=0.2$ for 3 min (A), 0.6 for 10 min (B), 0.6 for 20 min (C), 0.6 for 25 min (D), 1.0 for

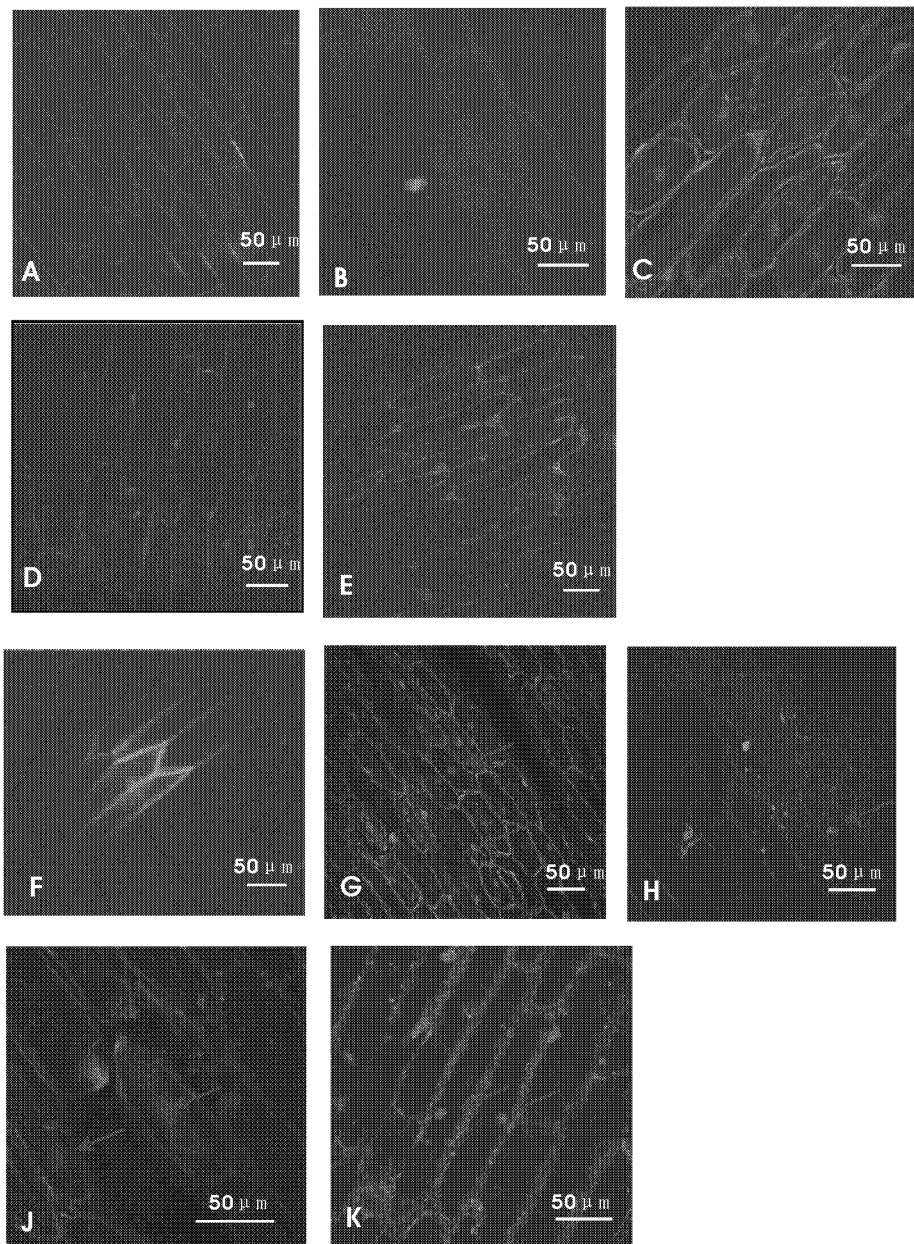
30 min (E);

F ~ H. Transformation effects in inner (F), middle (G), and outer (H) layer of onion epidermic cells;

J. Subcellular localization of GFP protein in onion epidermic cell;

K. Subcellular localization of GFP :: ASR protein in onion epidermic cell.

The red arrows show the localization of GFP protein.



刘海燕等: 图版 I

LIU Hai-yan, et al.: Plate I