

奈婕菲,程玉祥. 一个杨树 GDSL 基因组织表达的特性及其在拟南芥异源的表达[J]. 江苏农业科学,2014,42(3):16-18.

一个杨树 GDSL 基因组织表达的特性 及其在拟南芥异源的表达

奈婕菲,程玉祥

(东北林业大学/林木遗传育种国家重点实验室,黑龙江哈尔滨 150040)

摘要:GDSL 酯酶为脂肪水解酶家族的一个分支,参与植物生长发育和防御反应等多种功能。半定量 RT-PCR 分析结果显示,毛果杨 GDSL 酯酶基因 *Potri. 002G253400* 在顶端茎组织中高丰度特异性表达;构建 *Potri. 002G253400 - GFP* 融合的植物表达载体,转化模式植物拟南芥并获得其过量表达的转基因株系 7 个;激光共聚焦显微镜检测结果显示,GFP 荧光蛋白高丰度表达于转基因植株根的细胞壁区域,说明 *Potri. 002G253400* 蛋白可能定位于细胞壁。

关键词:毛果杨;拟南芥;GDSL 酯酶;载体构建;转基因

中图分类号:S792.110.4 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)03-0016-03

GDSL 酯酶是脂肪水解酶超家族的一个亚家族,它具有广泛的底物特异性和专一性,能够水解多种酯类物质^[1]。它因具有 GDS(L)保守区域(pfam,PF00657)简称 GDSL,其中 G、D 和 S 分别代表甘氨酸、天冬氨酸和丝氨酸等氨基酸残基^[2]。近年来,人们从水稻、向日葵、拟南芥和玉米等多种植物体内分离出 GDSL 酯酶,并鉴定出它具有脂肪酯水解酶活性^[3]。植物 GDSL 酯酶是一个多基因家族,在 12 个不同的植物物种内发现 GDSL 酯酶成员超过 1 100 个,如苔藓、葡萄、高粱、水稻、拟南芥和杨树基因组各存在 57、96、130、144、108、126 个 GDSL 家族成员^[4-5]。GDSL 酯酶参与植物发育、形态发生、次级代谢合成及多种防御反应^[6-8]。最近,Dharmawardhana 等报道了杨树茎由初级到次级生长转变中转录组变化模式^[9],一个 GDSL 基因 *Potri. 002G253400* 是逐渐降低转录组聚类成员之一,这一信息初步暗示它可能参与了杨树茎的初级生长。本研究通过半定量 RT-PCR 手段鉴定 *Potri. 002G253400* 在不同木质化程度茎节中转录表达模式,构建 *Potri. 002G253400* 融合绿色荧光蛋白基因 *GFP* 的植物表达载体,在拟南芥中过量表达 *Potri. 002G253400 - GFP* 并分析该蛋白细胞内的定位情况。这为今后解析 GDSL 酯酶在杨树茎初级生长中的作用提供了理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 以温室生长至 3 个月的毛果杨为试验材料,从顶端向基部分别取其第 1 至第 6 茎节、第 9 茎节、成熟叶、老叶各组织,用于基因表达分析。用于外源基因遗传转化的植物材料为野生型拟南芥(col-0)。

收稿日期:2013-11-02

基金项目:国家高技术研究发展计划(编号:2013AA102702)。

作者简介:奈婕菲(1986—),女,黑龙江齐齐哈尔人,硕士研究生,主要从事林木遗传育种研究。E-mail:naijiefei@163.com。

通信作者:程玉祥(1972—),男,教授,主要从事林木分子遗传学研究。E-mail:chengyuxiang@nefu.edu.cn。

1.1.2 载体、菌株和培养基 pENTR/SD/D-TOPO(Invitrogen 公司)和 pGWB5 用于转基因植物表达载体构建,转化菌株为大肠杆菌 TOP10 和 DH5 α ,大肠杆菌和 GV3101 农杆菌分别用 LB 和 YEP 培养基培养,转基因拟南芥在含 50 mg/L 卡那霉素的 1/2MS 培养基上筛选。

1.1.3 试剂 NA 提取试剂 pBIOZOL Reagent 购自 Bioflux 公司,DNA Marker、dNTP、PrimeScript RT reagent Kit with gDNA eraser 试剂盒购自 TaKaRa 公司,质粒提取试剂盒购于 Promega 公司,LR Clonase 购自 Invitrogen 公司,卡那霉素、庆大霉素等药品购自 Sigma 公司。

1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取和 cDNA 的合成 材料经过液氮速冻后研碎至粉末,用 pBIOZOL 悬浮粉末后装入 1.5 mL 离心管中,0.1 g 样品加入 0.5 mL 的 pBIOZOL,具体操作步骤参照 pBIOZOL plant total RNA Extraction Reagent 说明书。提取的 RNA 用不含核糖核酸酶的水溶解,测定其浓度和纯度。总 cDNA 合成使用 PrimeScript RT reagent Kit with gDNA eraser 试剂盒,操作步骤参照其说明书。

1.2.2 *Potri. 002G253400* 基因引物 用 Primer 5.0 设计 *Potri. 002G253400* 半定量 PCR 引物,序列为 UP:5'-GAT-TATCCAACCCACAGACCAAC-3'和 DN:5'-GGCTAACTC-CGCAGGAACACAAC-3',片段扩增长度为 333 bp。*Potri. 002G253400* 基因 CDS 全长片段扩增引物为 cds-UP:5'-CACCATGTCAATTCCTAGGATTTTTC-3'和 cds-DN:5'-GAGCTTGGCATCCAGGCCA-3',扩增片段长度为 1 110 bp。

1.2.3 PCR 扩增 以所用毛果杨样品的 cDNA 为模板,半定量和全长 CDS 的 PCR 扩增体系均为 20 μ L,上下游引物各 0.5 μ L,1.0 μ L 模板,1.0 μ L *Taq* DNA 聚合酶,2.0 μ L dNTP,2.0 μ L 10 \times Buffer,13 μ L 水。PCR 反应程序:95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,62 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸(半定量和 CDS PCR 延伸分别为 30、90 s),半定量和全长 CDS 的 PCR 扩增循环分别为 25、33 次。

1.2.4 植物表达载体构建 采用 Gateway 技术构建载体,取 25 ng pENTR/SD/D-TOPO 载体和 15 ~ 30 ng *Potri.*

002G253400 基因片段相连接,反应体系为 5 μ L,反应时间 2 h。取 1 μ L 连接产物转化 TOPO10 感受态细胞,操作参见说明书。用 *cds* - UP 和 *cds* - DN 基因引物 PCR 扩增鉴定含 *Potri. 002G253400* 融合质粒菌落,并进行 DNA 测序确认。取 30 ng pENTR/SD/D - TOPO - *Potri. 002G253400* 和 120 ng pGWB5 载体进行 LR 反应,反应体系 2.5 μ L,反应时间 8 ~ 12 h。取 1 μ L 反应产物转化 DH5 α 感受态细胞,PCR 鉴定含 pGWB5 - *Potri. 002G253400* 菌落,重组质粒转化 GV3101 农杆菌。

1.2.5 拟南芥遗传转化 拟南芥遗传转化沾染法参见文献[10]。

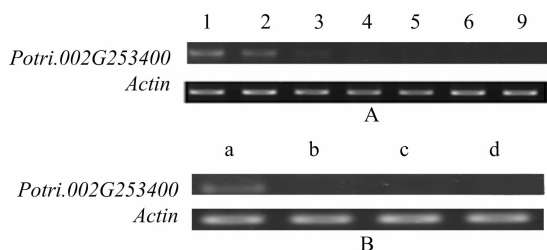
1.2.6 基因组 DNA 提取 拟南芥基因组 DNA 提取方法参见文献[11]。

1.2.7 绿色荧光蛋白 GFP 检测 绿色荧光蛋白 GFP 的激光共聚焦观察方法参见文献[12]。

2 结果与分析

2.1 杨树 *Potri. 002G253400* 基因表达特性

以毛果杨第 1 至第 6 茎节、第 9 茎节各 cDNA 为模板,进行半定量 RT - PCR,结果显示,*Potri. 002G253400* 基因转录水平在第 1 茎节处最高,其次为第 2、第 3 茎节,第 4 至第 6、第 9 茎节中观察不到。此外,使用内参基因 *Actin* 作为半定量 RT - PCR 内标,*Actin* 基因扩增数据显示第 1 至第 6、第 9 茎节各样品 cDNA 模板浓度基本相等(图 1 - A)。这个结果表明 *Potri. 002G253400* 基因在顶端组织中大量转录表达。笔者进一步在幼茎、老茎、成熟叶和老叶中检测 *Potri. 002G253400* 基因转录表达水平,结果显示,在成熟叶中该基因的转录表达水平很低(图 1 - B)。说明 *Potri. 002G253400* 基因高丰度表达在毛果杨的顶端分生组织。



1、2、3、4、5、6、9—第 1 至第 6、第 9 茎节; a、b、c、d—幼茎、老茎、成熟叶、老叶

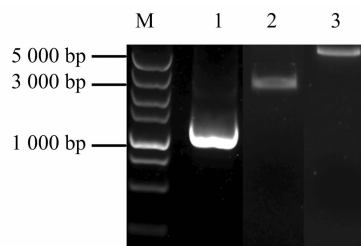
图1 毛果杨 *Potri.002G253400* 基因组组织表达结果

2.2 融合 *Potri. 002G253400* - GFP 植物表达载体构建

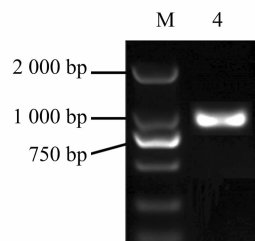
以毛果杨幼茎 cDNA 为模板,用 *cds* - UP 和 *cds* - DN 引物 RT - PCR 扩增得到约 1.1 kb 的片段(图 2 - A),该片段长度与 *Potri. 002G253400* 基因理论长度基本吻合。将该 DNA 片段连接到 pENTR/SD/D - TOPO 载体上,融合质粒 pENTR/SD/D - TOPO - *Potri. 002G253400* 约为 3.7 kb(图 2 - A),初步表明目的 DNA 片段已连接到 pENTR/SD/D - TOPO 载体上。将该质粒进行 DNA 测序,结果表明 pENTR/SD/D - TOPO 载体上 DNA 片段为 *Potri. 002G253400* 全长 *cds* 片段。

通过 LR 反应将 pENTR/SD/D - TOPO 载体上的 *Potri. 002G253400* 片段同源重组到 pGWB5 植物表达载体上,融合

质粒 pGWB5 - *Potri. 002G253400* 电泳检测结果如图 2 所示。以该质粒 DNA 为模板,用 *Potri. 002G253400* 引物进行 PCR 扩增,得到的 1.1 kb 特异条带与目标基因片段大小相符(图 2 - B)。由于 pGWB5 载体上融合报告基因 *GFP*,这样构建了 C 端融合 *GFP* 的 *Potri. 002G253400* - *GFP* 基因。把 pGWB5 - *Potri. 002G253400* 质粒转化 GV3101 农杆菌,用于 *Potri. 002G253400* 基因遗传转化拟南芥试验。



A



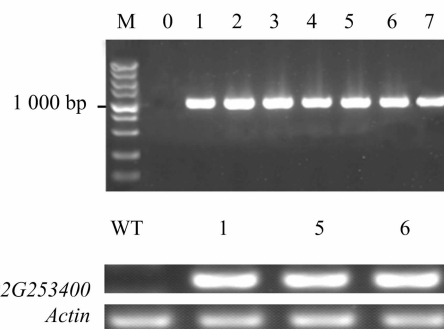
B

M—DNA Maker; 1—*Potri.002G253400*基因cds片段;
2—pENTR/SD/D-TOPO-*Potri.002G253400*;
3—pGWB5-*Potri.002G253400*; 4—扩增产物

图2 载体构建的电泳检测结果

2.3 *Potri. 002G253400* - GFP 转基因拟南芥分析

将上述农杆菌转化拟南芥,筛选获得 7 株抗卡那霉素的抗性植株。提取各株系基因组 DNA 作为模板,用 *Potri. 002G253400* 基因引物扩增,得到 *Potri. 002G253400* 目的 DNA 片段(图 3),结果表明 *Potri. 002G253400* 基因已转入拟南芥基因组,然后笔者分析了拟南芥基因组转入的 *Potri. 002G253400* 基因转录表达。RT - PCR 分析结果如图 3 所示,未转入 *Potri. 002G253400* 基因的野生型拟南芥中没有扩增出特异条带,而转基因植株中扩增出很亮的特异条带,且大小与 *Potri. 002G253400* 片段大小吻合。这表明转入到拟南芥基因组的 *Potri. 002G253400* 呈现出高丰度的转录表达。



a—基因组DNA的PCR扩增; b—RT-PCR 扩增; M—DNA marker;
0—野生型; 1~7—7个独立的转基因株系

图3 *Potri.002G253400* 转基因拟南芥植物鉴定结果

由于转入基因是 *Potri. 002G253400 - GFP*, 所以笔者通过激光共聚焦显微镜检测转基因拟南芥中 GFP 蛋白荧光信号, 荧光信号集中在转基因拟南芥根组织的细胞膜或细胞壁区域

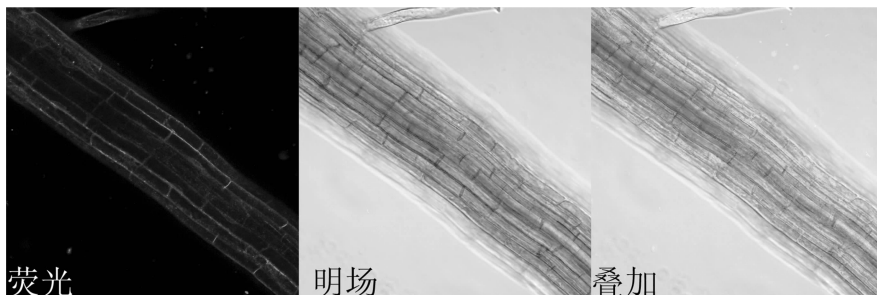


图4 *Potri.002G253400* 转基因拟南芥 GFP 荧光蛋白检测结果

3 结论与讨论

GDSL 酯酶基因家族成员广泛存在于植物界, 其功能为参与生长发育、形态发生和防御反应等。例如, 拟南芥 GDSL 酯酶 GLIP1 作为植物免疫力调节因子在植物抗病上起重要作用, GLIP2 转录表达被水杨酸、茉莉酸和乙烯信号所诱导^[3,13]。本研究结果表明, *Potri. 002G253400* 基因转录表达水平随毛果杨茎从初级到次级生长转变而逐渐降低, 且在成熟叶中转录水平也很低, 这种特异的组织表达模式暗示其功能可能与杨树茎的初级生长相关。植物 GDSL 酯酶家族成员组织表达模式存在冗余性与特异性, 如拟南芥 EXL1 只在花蕾中表达^[14], 油菜 GDSL 基因 *BnLIP2* 只在根中表达^[15], 而番茄 GDSL1 只在果皮表达强烈^[16]。此外, 笔者运用 GFP 荧光蛋白分子检测技术发现, *Potri. 002G253400* 蛋白很可能定位在杨树的细胞壁上。细胞壁是由木聚糖、纤维素、半纤维素以及果胶构成的复杂糖类物质, 这些成分物质中存在大量的酯键。尽管还没有鉴定出 *Potri. 002G253400* GDSL 酯酶水解底物, 然而可基于其细胞壁定位推测它很可能参与细胞壁合成或作用细胞壁成分物质的水解修饰。笔者将利用 *Potri. 002G253400* 过量表达遗传材料进一步探讨该 GDSL 酯酶在杨树茎初级生长中的作用以及其作用与细胞壁的关系。

参考文献:

- [1] Akoh C C, Lee G C, Liaw Y C, et al. GDSL family of serine esterases/lipases [J]. *Progress in Lipid Research*, 2004, 43 (6): 534 - 552.
- [2] Brick D J, Brumlik M J, Buckley J T, et al. A new family of lipolytic plant enzymes with members in rice, arabidopsis and maize [J]. *FEBS Letters*, 1995, 377 (3): 475 - 480.
- [3] Lee D S, Kim B K, Kwon S J, et al. Arabidopsis GDSL lipase 2 plays a role in pathogen defense via negative regulation of auxin signaling [J]. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 2009, 379 (4): 1038 - 1042.
- [4] Beisson F, Gardies A M, Teissere M, et al. An esterase neosynthesized in post-germinated sun flower seeds is related to a new family of lipolytic enzymes [J]. *Plant Physiology and Biochemistry*, 1997, 35 (10): 761 - 775.
- [5] Ling H. Sequence analysis of GDSL lipase gene family in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Pakistan Journal of Biological Sciences*, 2008, 11 (5):

(图 4)。通过蛋白定位预测生物学软件 PSORT (<http://psort.hgc.jp/form.html>) 分析可知, *Potri. 002G253400* 蛋白最可能定位于细胞壁(0.820)上。

- 763 - 767.
- [6] Volokita M, Rosilio - Bami T, Rivkin N, et al. Combining comparative sequence and genomic data to ascertain phylogenetic relationships and explore the evolution of the large GDSL - lipase family in land plants [J]. *Molecular Biology and Evolution*, 2011, 28 (1): 551 - 565.
- [7] Zhang Z Y, Ober J A, Kliebenstein D J. The gene controlling the quantitative trait locus EPITHIOSPECIFIER MODIFIER1 alters glucosinolate hydrolysis and insect resistance in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2006, 18 (6): 1524 - 1536.
- [8] Agee A E, Surpin M, Sohn E J, et al. MODIFIED VACUOLE PHENOTYPE1 is an *Arabidopsis* myrosinase associated protein involved in endomembrane protein trafficking [J]. *Plant Physiology*, 2010, 152 (1): 120 - 132.
- [9] Dharmawardhana P, Brunner A M, Strauss S H. Genome - wide transcriptome analysis of the transition from primary to secondary stem development in *Populus trichocarpa* [J]. *BMC Genomics*, 2010, 11: 150.
- [10] Clough S J, Bent A F. Floral Dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Journal*, 1998, 16 (6): 735 - 743.
- [11] 徐平丽, 赵晋平, 孟静, 等. 一种适宜拟南芥 PCR 检测的 DNA 提取方法 [J]. *农业科学与技术: 英文版*, 2010, 11 (3): 41 - 42, 155.
- [12] Endo S, Pesquet E, Yamaguchi M, et al. Identifying new components participating in the secondary cell wall formation of vessel elements in zinnia and *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2009, 21 (4): 1155 - 1165.
- [13] Kwon S J, Jin H C, Lee S, et al. GDSL lipase - like 1 regulates systemic resistance associated with ethylene signaling in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2009, 58 (2): 235 - 245.
- [14] Schröder F, Lissio J, Müssig C. Expression pattern and putative function of EXL1 and homologous genes in *Arabidopsis* [J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2012, 7 (1): 22 - 27.
- [15] Ling H, Zhao J Y, Zuo K J, et al. Isolation and expression analysis of a GDSL - like lipase gene from *Brassica napus* L. [J]. *Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 2006, 39 (3): 297 - 303.
- [16] Girard A L, Mounet F, Lemaire - Chamley M, et al. Tomato GDSL1 is required for cutin deposition in the fruit cuticle [J]. *Plant Cell*, 2012, 24 (7): 3119 - 3134.