

苧麻生长素结合蛋白 *BnABP1* 与 GFP 融合在烟草中的表达

黄妤^a, 周晶辉^a, 乔波^b, 赵燕^a, 张学文^{a*}

(湖南农业大学 a.生物科学技术学院; b.信息科学技术学院, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 运用已克隆的苧麻生长素结合蛋白 *BnABP1* 基因 cDNA 及植物表达载体 pCAMBIA1300-GFP, 构建了 35S 启动子控制的苧麻 *BnABP1* 基因编码区段与绿色荧光蛋白(GFP)基因融合表达重组体(pCAMBIA1300-GFP-*BnABP1*)。通过根癌农杆菌介导法将其转化烟草 WS38, 经抗性筛选和 PCR 检测获得了转基因烟草。对转基因烟草细胞进行荧光显微镜观察, 发现在细胞质膜和内膜系统上都有较强烈的荧光信号, 进一步证明苧麻生长素结合蛋白 ABP1 已结合在细胞的膜系统上。

关 键 词: 苧麻; 苧麻生长素结合蛋白 ABP1 基因 cDNA; 绿色荧光蛋白; 烟草转化

中图分类号: Q786 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2012)04-0381-04

Fusion expression of ramie auxin binding protein *BnABP1* and GFP in tobacco

HUANG Yu^a, ZHOU Jin-hui^a, QIAO Bo^b, ZHAO Yan^a, ZHANG Xue-wen^{a*}

(a.College of Bioscience and Biotechnology; b. Information Science and Technology Institute, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: The coding region of a cloned cDNA of Ramie auxin binding protein gene (*BnABP1*) was inserted into a plant expression vector pCAMBIA1300-GFP under the control of promoter *CaMV35S* to construct a green fluorescent protein (GFP) fusion expression vector. The recombinant plasmid named pCAMBIA1300-GFP-*BnABP1* was transformed into *Nicotiana tabacum* WS38 via *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation and transgenic tobacco was obtained by screening on antibiotic media and by PCR identification. The transgenic tobacco callus was detected under fluorescence microscope and the strongest green fluorescence signals were appeared in plasma membrane and inner membrane system. The results showed that Ramie auxin binding protein ABP1 was mostly concentrated in the membrane system of cell.

Key words: *Boehmeria nivea*; *BnABP1* cDNA; GFP; tobacco transformation

生长素参与植物生长和发育的诸多过程, 研究其作用机制对深入认识植物生长发育的生理过程有重要意义^[1-3]。目前已从玉米^[4]、陆地棉^[5]、辣椒^[6]、烟草^[7]等植物中分离出生长素结合蛋白 ABP1 (auxin-binding proteins)。有研究表明, ABP1 在植物生长素的运输过程中具有与生长素结合并转运到其他组织细胞的功能。笔者以苧麻(*Boehmeria*

nivea)^[8-9]为材料, 运用 RT-PCR, 克隆了苧麻生长素结合蛋白 ABP1 基因 cDNA(GenBank 登录号: EU195804), 并对其进行了表达分析^[10]。在此基础上将其与绿色荧光蛋白(green fluorescen protein, GFP)^[11-16]融合进行了烟草的遗传转化, 以此对目标蛋白进行标记, 更深入探讨该生长素调控的途径。将已克隆的苧麻生长素结合蛋白 ABP1 基因

收稿日期: 2012-04-07

基金项目: 湖南省自然科学基金项目(08JJ5020); 湖南省研究生创新基金项目(SCX1103)

作者简介: 黄妤(1982—), 女, 湖南长沙人, 博士研究生, 讲师, 主要从事植物分子生物学研究, hymf2006@163.com; *通信作者, xuewenzhang@hunau.net

cDNA, 亚克隆到 GFP 绿色荧光蛋白表达质粒 pCAMBIA1300-GFP 中, 构建了 *BnABP1* 与 GFP 融合表达载体 pCAMBIA1300-GFP-*BnABP1*。采用根癌农杆菌介导的烟草叶盘转化法进行了烟草的遗传转化。获得的转基因烟草采用荧光显微镜观察, 初步分析了苾麻生长素结合蛋白 *BnABP1* 在细胞中的定位和分布情况。

1 材料与方法

1.1 材料

烟草品种 WS38。烟草采用 MS+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA(MS₁)进行愈伤组织诱导和发芽, 采用 MS+ 0.05 mg/L NAA(MS₂)诱导生根。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) Top10 和根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404, 克隆的苾麻 *BnABP1* 基因 cDNA(pMD-*BnABP1*)质粒由湖南农业大学细胞生物学实验室保存, pCAMBIA1300-GFP 质粒由北京生命科学研究所以惠赠。

1.2 方法

1.2.1 pCAMBIA1300-*BnABP1* 的构建及工程根癌农杆菌的获得

通过 BioEdit 软件分析苾麻 *BnABP1* 基因中的酶切位点, 结合 pCAMBIA1300 载体上的多克隆位点, 考虑基因片段的融合表达, 目的片段大小约为 600 bp, 在克隆载体 pMD-*BnABP1* 的上、下游分别引入 *Kpn I* 和 *Xba I* 核酸限制内切酶的酶切位点, 设计引物: 上游引物 P1, 5'-CGGGGTACC ATGGGTTGGTCTTCGATTCC-3'; 下游引物 P2, 5'-TGCTCTAGACAGTTCATCC-TTTTGATGTG-3'。通过 PCR 将目的片段从 pMD-*BnABP1* 质粒上释放, 将其定向克隆到植物表达载体 pCAMBIA1300-GFP 的 35S 启动子下游, 构建了绿色荧光蛋白植物表达载体 pCAMBIA1300-GFP-*BnABP1*。将此表达载体转化至 *E. coli* Top10 感受态细胞中, 并进行筛选及酶切检测, 采用冻融法将构建正确的表达载体转化农杆菌 LBA4404。

1.2.2 农杆菌共培养叶盘法转化烟草 WS38

将烟草 WS38 无菌苗幼嫩健壮叶片去主脉, 剪

成 0.8 cm × 0.8 cm 的叶盘, 在 MS₁ 培养基上预培养 2 d。工程农杆菌用 YEB 液体培养基摇瓶培养至 OD₆₀₀=0.6~1.0, 将 50 mL 培养物 12 000 r/min 离心收集细菌, 用 1/2 MS 液体培养基悬浮细菌, 使 OD₆₀₀=0.5~0.6。将预培养的叶盘取出, 浸泡在农杆菌菌液中, 190 r/min、28 °C 摇床上共培养 10 min, 放置于顶层置滤纸的培养基上, 暗处共培 3 d。洗涤后将转基因材料接种到含有潮霉素和羧苄青霉素的培养基上, 25 °C、16 h 光照, 8 h 黑暗交替培养, 抑制农杆菌的生长, 同时筛选具有抗性的转基因愈伤组织。

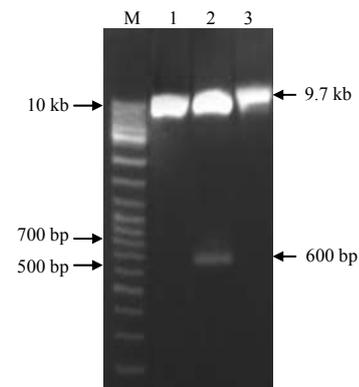
1.2.3 苾麻 *BnABP1* 基因转化烟草愈伤组织的检测

分别取同龄及大小相差不大的转基因及未转基因烟草的愈伤组织, 制备为原生质体, 置荧光显微镜下, 利用 GFP 观察生长素结合蛋白 ABP1 在细胞中的定位情况, 并拍照记录。

2 结果与分析

2.1 植物表达载体的构建及其检测分析

对构建的 GFP 植物表达载体 pCAMBIA1300-GFP-*BnABP1* 按流程进行重组构建后, 转化大肠杆菌 *E. coli* Top10, 转化细菌经过菌落 PCR 扩增检测, 阳性细菌再分离质粒, 采用相关的限制性内切酶酶切分析(图 1), 证实构建的表达载体结构与预期一致。将重组质粒采用液氮冻融法转化根癌农杆菌



M DNA Marker; 1 pCAMBIA1300-GFP 对照质粒双酶切; 2 pCAMBIA1300-GFP-*BnABP1* 双酶切出现预期带; 3 pCAMBIA1300-GFP-*BnABP1* 单酶切。

图 1 pCAMBIA1300-GFP-*BnABP1* 重组质粒的酶切分析

Fig.1 Enzymes digestion verify the pCAMBIA1300-GFP-*BnABP1* recombinant

LBA4404 经过 PCR 检测的阳性根癌农杆菌用于共培养转化。

2.2 根癌农杆菌载体浸染烟草

2.2.1 共培养结果

将烟草无菌苗叶片切割成 $0.8\text{ cm} \times 0.8\text{ cm}$ 的叶盘, 在农杆菌液中浸渍 $3 \sim 10\text{ min}$ 后, 置于无抗生素的培养基上共培养 3 d , 可观察到叶盘已经开始长大, 一些过于幼嫩、面积较小的叶片可能在操作中已死亡。这种叶盘呈水浸状或褐化, 可弃而不用。将得到的叶盘转入诱导培养基中诱导愈伤组织, 同时在该培养基中添加 500 mg/L 羧苄青霉素作为农杆菌抑制物和 50 mg/L 潮霉素作为转基因筛选。

2.2.2 诱导愈伤组织情况

叶盘转入 MS_2 培养基中约 1 周后, 可以观察到转基因苗叶盘明显长大, 叶盘边缘开始变白, 2 周以后, 叶盘几乎完全变白, 膨大变厚, 边缘有凹凸不平的突起(图 2)。继续培养至 3 周, 边缘突起变大, 开始产生绿色芽点。



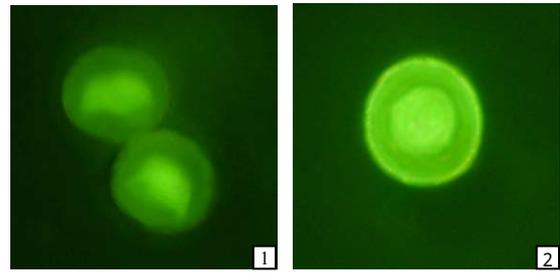
图 2 培养 3 周的叶盘愈伤组织

Fig. 2 The callus are induced from the leaf plates which cultured for 3 weeks

2.3 转基因植株中 *BnABP1* 细胞的定位情况

抗性筛选的烟草愈伤组织, 经诱导分化, 获得抗性转基因小苗。取其叶片进行 PCR 检测, 证实为阳性转基因植株。取转基因烟草愈伤组织制备游离细胞, 在荧光显微镜下观察, 以未转基因烟草组织为对照。结果发现转基因烟草愈伤组织细胞膜上荧光强烈, 荧光分布在细胞膜、内膜系统上。未转基因的对照愈伤组织细胞在 509 nm 光波诱导下, 能观察到绿色荧光, 但荧光比较微弱, 在细胞核上则比较集中。两相对比, 可以判断苜麻生长素结合蛋

白多集中于细胞膜上, 在核膜等内膜系统上也有分布(图 3)。



1 非转基因烟草细胞; 2 转基因烟草细胞。

图 3 烟草细胞荧光观察结果

Fig. 3 Fluorescence observation of separated callus cells of nontransgenic tobacco (1) and transgenic tobacco (2)

3 讨论

用 GFP 进行亚细胞定位简单易行^[17-28]。本研究中利用 GFP 诱发荧光特性在荧光显微镜下进行游离细胞荧光观察, 发现荧光信号在细胞膜部位最为强烈, 核膜等内膜系统也有明显信号, 表明苜麻生长素结合蛋白 ABP1 多集中于细胞的膜系统上。Macdonald H 等认为, 在植物细胞内有大量 ABP1 闲置在内质网上, 当受到生长素刺激后, ABP1 会从内质网上释放出来, 并被运输到原生质体外。ABP1 一旦被运转到细胞膜外侧, 便与原生质膜上的停泊蛋白作用, 暴露出生长素结合位点, 接受生长素信号并传递这一信号。另外一种推测是质膜外表面的 ABP1 在没有生长素存在的情况下不具有结合活性, 经生长素诱导后, ABP1 构象发生改变, 暴露出 BoxA 位点与生长素结合, 并迅速翻转移向细胞内, 保持其较高的结合活性, 这是生长素从质膜上开始信号转导的第一步^[19-20]。

近年来关于生长素的研究取得了较大进展。认为植物生长素信号途径至少包含 2 条相对独立的途径: 一是经细胞内受体 TIR 促进转录因子抑制蛋白 (Aux/IAA) 泛素化降解, 并由此调控一系列基因表达的信号途径^[21]; 二是生长素不涉及基因表达调控的快速响应信号途径, 但此途径目前仍只有片段性了解^[22]。在今后的工作中, 笔者拟利用烟草 BY2 细胞系和酵母细胞建立起研究生长素快速响应信号途径的细胞模型, 为揭示该信号途径发生的分子过程提供理论依据。

参考文献:

- [1] Shimomura S. Identification of a glycosylphosphatidylinositol-anchored plasma membrane protein interacting with the C-terminus of auxin-binding protein 1: A photo affinity cross linking study[J]. *Plant Mol Biol*, 2006, 60: 663-677.
- [2] David K M, Couch D, Braun N, et al. The auxin-binding protein 1 is essential for the control of cell cycle[J]. *Plant J*, 2007, 50: 197-206.
- [3] Jones A M, Prasad P V. Auxin-binding proteins and their possible roles in auxin-mediated plant growth[J]. *Biol Essay*, 1991, 14: 43-48.
- [4] Palme K. Auxin binding proteins from maize coleoptiles: Purification and molecular properties[C]// Roberts J A. Hormone Perception and Signal Transduction in Animals and Plants. Cambridge: CBL, 1995: 299-313.
- [5] 孙建波, 崔百明, 刘德兵, 等. 棉花生长素结合蛋白 *ABP 1* 基因 cDNA 的克隆及序列分析[J]. *棉花学报*, 2007, 19(4): 243-247.
- [6] Choi S-Y. Molecular cloning and expression of the hot pepper *ERabp1* gene encoding auxin-binding protein[J]. *Plant Mol Biol*, 1996, 32: 995-997.
- [7] 刘晓柱, 黄妤, 彭珍子, 等. 烟草 WS38 生长素结合蛋白基因 cDNA 的克隆及序列分析[J]. *湖南农业大学学报: 自然科学版*, 2010, 36(4): 388-391.
- [8] Kozłowski R, Batog J, Konczewicz W, et al. Enzymes in bast fibrous plant processing[J]. *Biotechnol Lett*, 2006, 28(10): 761-765.
- [9] Nishiyama Y, Kim U J, Kim D Y, et al. Periodic disorder along ramie cellulose micro-fibrils[J]. *Biomacromolecules*, 2003, 4(4): 1013-1017.
- [10] 黄妤, 刘峰, 郭清泉, 等. 苧麻生长素结合蛋白 *ABP1* 基因 cDNA 的克隆及表达[J]. *作物学报*, 2008, 34(8): 1358-1365.
- [11] Prasher D C, Eckenrode V K, Ward W W, et al. Primary structure of the *Aequorea victoria* green-fluorescent-protein [J]. *Gene*, 1992, 111: 229-233.
- [12] Hiroshi Morise, Osamu Shimomura, Frank H Johnson. Intermolecular energy transfer in bio luminescent system of *Aequorea*[J]. *Biochemistry*, 1974, 13: 2656-2662.
- [13] Chalfie M, Yu Y, Euskirchen G, et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression[J]. *Science*, 1994, 263: 802-805.
- [14] Pang S Z, Deboer D L, Wan Y, et al. An improved green fluorescent protein gene as a vital marker in plants [J]. *Plant Physiol*, 1996, 112: 893-900.
- [15] Jim Haseloff, Kirby R Siemering, Douglas C Prasher, et al. Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 1997, 94: 2122-2127.
- [16] Van West P, Reid B, Campbell T A. Green-fluorescent protein (GFP) as a reporter gene for the plant pathogenic oomycete *Phytophthora palmivora*[J]. *Fems Microbiol Lett*, 1999, 178(1): 71-80.
- [17] Stewart C N, Jr. The utility of green fluorescent protein in transgenic plants[J]. *Plant Cell Rep*, 2001, 20(5): 376-382.
- [18] Zimmer M. Green fluorescent protein(GFP): Applications, structure and related photo physical behavior[J]. *Chem Rev*, 2002, 102(3): 759-781.
- [19] Macdonald H. Auxin perception and signal transduction[J]. *Plant Physiol*, 1997, 100: 423-430.
- [20] Karine David, Eugenie Carnero-Diaz, Nathalie Leblanc, et al. Conformational dynamics underlie the activity of the auxin-binding protein, *Nt-abp1*[J]. *Biological Chemistry*, 2001, 276(37): 34517-34523.
- [21] Alexandre Tromas, Nils Braun, Philippe Muller, et al. The auxin binding protein 1 is required for differential auxin responses mediating root growth[J]. *Plos One*, 2009, 4(9): e6648.
- [22] Renate I, Dahlke, Hartwig Luether, et al. ABP1 an auxin receptor for fast responses at the plasma membrane[J]. *Plant Signaling & Behavior*, 2010, 5(1): 1-3.

责任编辑: 罗慧敏