

生长素结合蛋白与纤维素合成酶 在同一细胞中的标记与定位

陈宗星, 刘晓柱, 黄妤, 黄丽华, 张学文*

(湖南农业大学 生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128)

摘 要: 生长素通过其结合蛋白(ABP1)促进细胞纤维素合成并使细胞伸长生长。为探明 ABP1 与纤维素合成酶(CesA1)这 2 种蛋白质之间的相互关系, 分别对这 2 种蛋白质进行了荧光标记, 构建了绿色荧光蛋白(GFP)对 ABP1 融合标记以及青色荧光蛋白(CFP)对 CesA1 融合标记的 2 种载体。采用烟草叶片侵注法, 将 2 种重组体转入烟草叶片同一细胞进行瞬时表达。扫描激光共聚焦显微成像观察到转基因瞬时表达的烟草铺列细胞的细胞膜上有强烈两色荧光信号, 表明这 2 种蛋白集中在细胞膜上分布, 其分布区域存在明显的重叠。在细胞的内膜系统中绿色荧光信号相对较强, 青色荧光信号较弱, 表明内膜系统中也分布着一定量的 ABP1, 而纤维素合成酶在内膜系统中不会集中分布。在叶片铺列细胞间嵌合交错区可以观察到青色荧光的高亮点, 表明此处存在纤维素合成酶的高密度分布, 也说明在此部位有更多的纤维素合成。

关 键 词: 生长素结合蛋白; 纤维素合成酶; 荧光标记; 细胞定位

中图分类号: Q71

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2012)06-0602-05

Labeling and location of ABP1 and CesA1 in the same tobacco plant cell

CHEN Zong-xing, LIU Xiao-zhu, HUANG Yu, HUANG Li-hua, ZHANG Xue-wen*

(College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: The auxin binding protein (ABP1) is involved in the response to auxin signal to induce the elongation of plant cell. In order to understand the interaction between ABP1 and CesA1, two chimera expression vectors are constructed to label ABP1 with GFP and CesA1 with CFP respectively. Two recombinants are transformed into tobacco leaf for transient expression in the same epidermal cell via infiltration. Green and cyan florescent signals are observed in the same pavement cells of the infiltrated leaf region by confocal microscope analysis, indicating proteins ABP1 and CesA1 are accumulated and overlaying distributed in the cell membranes. But in the endomembranes, the green signals are strong while the cyan signals are week, demonstrating that it is ABP1 but not CesA1 which is also collectively distributed in the endomembranes system. Cyan florescent signals are observed in interdigitation area of the pavement cells, which indicates intensive distribution of CesA1 and more celluloses were synthesized in this area.

Key words: auxin binding protein 1; cellulose synthase 1; fluorescent labeling; localization

生长素(IAA)在植物的生长、发育过程中起着极其重要的作用^[1]。生长素信号传递从生长素与生长素受体的特异性结合开始, 因此对生长素受体的研究是探索生长素信号通路的关键。已有研究结果

显示, 生长素信号受体主要有 2 类, 一类是存在于细胞内的 TIR 受体(TIR1), 与生长素结合后, 发挥泛素连接酶的作用, 对转录抑制因子进行泛素化降解从而调控基因表达; 另一类是生长素结合蛋白

收稿日期: 2012-06-26

基金项目: 北京大学国家蛋白质与基因工程重点实验室开放项目

作者简介: 陈宗星(1986—), 女, 山东滨州人, 硕士研究生, 主要从事分子细胞生物学研究, zxc0914@yahoo.cn; *通信作者, xwzhang@hunau.edu.cn

(auxin binding protein1, ABP1), 介导细胞对生长素的快速响应过程^[2]。ABP1 作为生长素信号受体曾一度有所争议, 但随着有关生长素结合蛋白功能研究的逐步深入, ABP1 作为生长素受体的观点已普遍得到认同^[3]。ABP1 是一个相对分子质量为 2.2×10^4 的糖蛋白, 存在于所有植物细胞中, 在植物细胞伸长生长、细胞膜泡运输、细胞骨架与形态调节等方面发挥重要作用^[4]。

ABP1 在细胞膜上调节细胞生长的快速响应。针对生长素引起的细胞快速伸长生长, 曾提出了细胞壁酸化(超极化)假说, 认为生长素结合 ABP1 后激活了细胞膜上的质子泵, 它将更多的质子泵出细胞, 使细胞壁酸化松弛, 因而细胞得以伸长^[4]。Christopher 等^[5]以烟草叶片切离细胞为材料进行的研究表明, 生长素致细胞伸长不涉及细胞壁的酸化; Helene 等^[6]以烟草为材料, 通过不同抗体的结合, 证实生长素致细胞伸长及细胞壁酸化与质子泵致酸化引起细胞伸长作用不同。因此以超极化理论解释生长素对细胞伸长生长的调控具有局限性。

在植物细胞的伸长过程中必然涉及到植物细胞壁的合成, 高等植物细胞壁的主要成分纤维素是由分布于细胞膜上的纤维素合成酶(cellulose synthase, CesA)复合体向外合成纤维多糖而形成的, 在模式植物拟南芥中揭示了其纤维素合成酶基因家族具有 10 个成员, 其中 CesA-1 蛋白在植物初生壁形成的全部过程中都有表达^[7]。

植物细胞伸长过程涉及其细胞壁合成的增速以及细胞膜泡运输加快, 因此, 研究生长素响应的细胞伸长生长, 应加强对生长素响应信号受体分子与细胞壁纤维素合成、细胞的膜泡运输的关联性研究。

为了解生长素结合蛋白 ABP1 与纤维素合成酶 CesA1 这 2 种蛋白在细胞中的相互关系, 笔者以绿色荧光蛋白(GFP)与青色荧光蛋白(CFP)分别标记 ABP1 和 CesA1, 构建了植物表达载体 pEGAD-EGFP-ABP1 与 pWM101-CesA1-CFP, 采用根癌农杆菌进行烟草叶片侵注, 在烟草叶表皮细胞实现了同一细胞内 2 种蛋白的瞬时表达, 显微共聚焦观察了这 2 种蛋白的定位及其分布。现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

E. coli InVα F'菌株、LBA4404 菌株、p19 菌株由北京大学瞿礼嘉教授提供; 质粒 pEGAD-EGFP、pWM101-CFP、pMDTM-18-T-ABP1、pMDTM-18-T-CesA1 由湖南农业大学细胞生物研究室保存, 重组质粒 pEGAD-EGFP-ABP1、pWM101-CesA1-CFP 自行构建保存, 工具酶均使用 Fermentas 公司的产品。烟草品种为 WS38。

1.2 方法

1.2.1 引物的设计及合成

根据 pMDTM-18-T-ABP1、pMDTM-18-T-CesA1 中 *ABP1*、*CesA1* 基因序列分别设计 *CesA1* 上下游引物, 并在 *ABP1* 的引物的上下游分别加上 *EcoRI*、*XhoI* 的酶切位点及保护碱基, 在 *CesA1* 的引物的上下游分别加上 *Sall*、*SacI* 的酶切位点及保护碱基, 为了不影响后续基因 *CFP* 的表达, 在设计 *CesA1* 下游引物时删除了 *CesA1* 的终止密码。引物由北京六合华大基因科技股份有限公司合成。序列如下:
ABP1 : aF1 ,CCGGAATTCATGGCTCGTCATGTTTTAGTCGTAG ;aR1 ,CCGCTCGAGAAGTTCGTCTTTCCATGATGTGGT。*CesA* : cF1 ,CGAGCTCATGGATACTAAAGGGAGGCTAGT ;cR1 ,ACGCGTCGACCTCGCAGTCCAACCCGCAC。

1.2.2 *ABP1* 基因及 *CesA1* 基因的 PCR 扩增

以 aF1、aR1 为引物, 质粒 pMDTM-18-T-ABP1 为模板, 扩增 *ABP1* 基因。*Taq* 酶反应体系: 10×*Taq* Buffer 2.5 μL, Mg²⁺ 2 μL, dNTP Mixture(10 mmol/L) 1 μL, aF1 引物 1 μL, aR1 引物 1 μL, 模板 1 μL, *Taq* Polymerase 0.5 μL, 灭菌蒸馏水 17 μL, 总体积 25 μL。按下列循环参数进行 PCR 扩增: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 50 s, 56 °C 退火, 72 °C 延伸 50 s, 共 30 个循环, 72 °C 总延伸 10 min, 反应结束后终止程序。取 5 μL 上样 1%琼脂糖凝胶检测。

以 cF1、cR1 为引物, 质粒 pMDTM-18-T-CesA1 为模板, 扩增 *CesA1* 基因。*Taq* 酶反应体系: 10×*Taq* Buffer 2.5 μL, Mg²⁺ 2 μL, dNTP Mixture(10 mmol/L)

1 μL , cF1 引物 1 μL , cR1 引物 1 μL , 模板 1 μL , *Taq* Polymerase 0.5 μL , 灭菌蒸馏水 17 μL , 总体积 25 μL 。按下列循环参数进行 PCR 扩增: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 50 s, 50 $^{\circ}\text{C}$ 退火 2 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 3.5 min, 共 30 个循环, 72 $^{\circ}\text{C}$ 总延伸 10 min, 反应结束后终止程序。取 5 μL 上样 1% 琼脂糖凝胶检测。

1.2.3 融合表达载体的构建及扩繁

用 *EcoRI*、*XhoI* 双酶分别消化 *ABPI* 的 PCR 扩增产物和质粒 pEGAD-EGFP, 用 *SalI*、*SacI* 双酶

分别消化 *CesA1* 的 PCR 扩增产物和质粒 pWM101。37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜已完全切开, 次日用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 用胶回收试剂盒回收目的片段。

将酶切产物置于连接反应体系中进行连接(16 $^{\circ}\text{C}$, 反应 16 h)这样即在质粒 pEGAD-EGFP 的多克隆位点处插入了 *ABPI* 基因, 在质粒 pWM101-CFP 的多克隆位点处插入了 *CesA1* 基因, 重组质粒的重组 DNA 区段如图 1 所示。

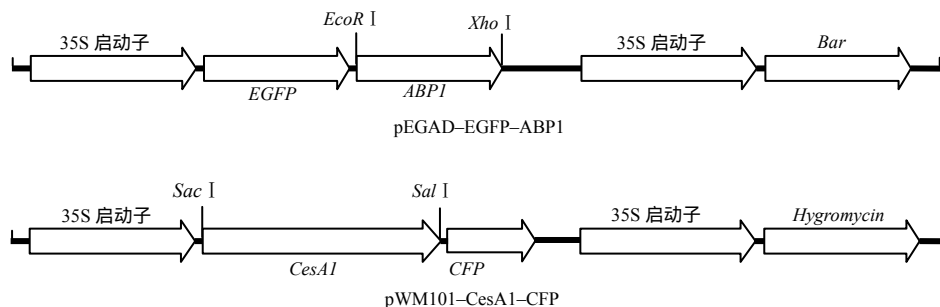


图 1 *ABPI* 和 *CesA1* 构建的 T-DNA 区段

Fig. 1 The of Ti plasmid vectors of *ABPI* and *CesA1* chimera labeling

将上述连接产物转化 *E. coli* InV α F' 感受态细胞, 涂布于卡那霉素(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的固体 LB 培养基上, 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。次日随机挑取 8 个单菌落, 以 20 μL 去离子水悬浮细胞, 取 4 μL 菌进行直接的菌落 PCR 验证。挑选一个阳性菌接种到 20 mL 卡那霉素(50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。取 2 mL 转化菌液, 按照质粒提取试剂盒说明书提取质粒。所得质粒交由上海美吉生物医药科技有限公司测序。

1.2.4 转化农杆菌并进行烟草叶片侵注

将得到的质粒电激转化根癌农杆菌 LBA4404。转化菌接种到 YEB 固体培养基上筛选(卡那霉素 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、利福平 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、硫酸链霉素 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$)2 d。从平板上随机挑取 8 个单菌落, 以 20 μL 去离子水悬浮细胞, 同样取 4 μL 做菌落 PCR。能扩增出目的条带的菌加入含有利福平、硫酸链霉素和卡那霉素的 20 mL 的 YEB 培养基中, 28 $^{\circ}\text{C}$ 、48 h 摇床培养。

将这 2 个菌及 1 个辅助细菌 p19 分别活化, 挑

取单菌落, 28 $^{\circ}\text{C}$ 摇菌 20 h 左右, 收集菌体, 用转化 Buffer(10 mmol/L MgCl_2 , 10 mmol/L Mes, 150 $\mu\text{mol}/\text{L}$ As)混合 3 种菌体, 调节其 OD_{600} 至 0.5~0.1, 3 种菌的比例约为 2:2:1, 室温放置 3 h。将这 3 种菌的混合液用除去针头的注射器, 从下表面注入烟草叶片组织。用记号笔对注射叶片的部位进行划线标记。

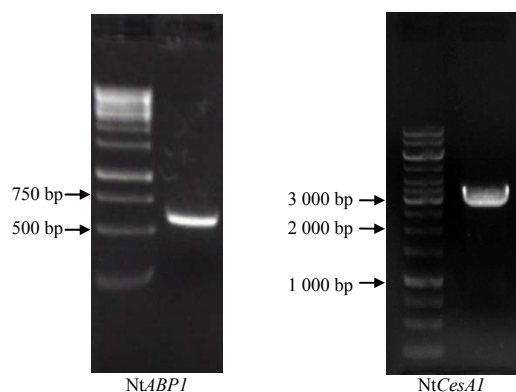
1.2.5 瞬时表达观察

侵注的烟草经黑暗 24 h 放置后, 置于人工气候箱正常光照生长, 48 h 后将标记部位叶片剪下, 做成临时装片。在扫描激光共聚焦显微镜下对叶背面铺列细胞进行荧光观察。

2 结 果

2.1 *ABPI* 和 *CesA1* 基因的获得

从已有的质粒 pMDTM-18-T-*ABPI*、pMDTM-18-T-*CesA1* 直接设计引物扩增得到了预期大小的 DNA(图 2), *ABPI* 的有效片段为 564 bp, *CesA1* 的有效片段为 3 273 bp。克隆后测序, 序列没有碱基突变。

图2 PCR扩增验证 *ABP1* 和 *CesA1* 的 cDNAFig.2 The PCR to verify *ABP1* and *CesA1* cDNA

2.2 构建植物表达载体

按照载体构建方案,将获得的 *ABP1* 和 *CesA1* cDNA 片段克隆到 Ti 质粒,构建成融合表达载体 pEGAD-EGFP-*ABP1* 和 pWM101-*CesA1*-CFP,载体经测序验证后转化 LBA4404 菌株,抗性筛选出的菌落又经过菌落 PCR 验证,获得了转化的根癌农杆菌。

2.3 激光共聚焦显微观察结果

注射烟草叶背面,黑暗培养 24 h 后正常培养,48 h 取侵注部位叶盘进行显微共聚焦观察,EGFP 与 CFP 被激发出荧光,分别显示出 *ABP1*、*CesA1*。这 2 种荧光可以在同一个细胞中瞬时表达。

在铺列细胞细胞膜上观察到强烈的绿色荧光,说明 *ABP1* 大量分布在细胞膜上,细胞内的内膜系统也有一定弥散的信号分布(封三陈宗星图3-A),说明 *ABP1* 在内膜系统也有一定程度的分布,这与 *ABP1* 的合成及转运以及功能发挥的特性相一致。青色荧光的分布也在细胞膜上,表明 *CesA1* 在细胞膜上分布,细胞内的分布则不明显。青色荧光分布在铺列细胞的嵌合突出区和凹陷区有点式集中现象(封三陈宗星图 3-B 中箭头所指位置),说明在这些位点有纤维素合成酶高密度分布现象。青色荧光的高亮度点绿色荧光也较强(封三陈宗星图3-C中箭头所指位置),这说明了 *ABP1* 与 *CesA1* 在定位上有一定的相关性,这 2 种蛋白分布过程可能存在某种意义上的联系或相互作用,但是仅通过荧光标记

尚不能肯定两者的互作关系。

3 讨论

ABP1 瞬时表达在细胞膜上的定位,与黄好等的 *ABP1* 用 GFP 标记后转化烟草植株的稳定表达结果^[8]一致。植物细胞壁的主要成分是纤维素,其合成是由植物纤维素合成酶亚基(*CesA*)组成的纤维素合成酶复合体(Rosette)和其他酶共同完成的一个复杂过程^[9]。细胞伸长生长对生长素的响应是否有着更直接的关联,有待揭示 *ABP1* 与纤维素合成酶之间是否存在更直接的作用。

ABP1 是第一个在植物中发现的具有末端 KDEL 序列(The sequence Lys-Asp-Glu-Leu)的蛋白质,该序列是一个内质网定位信号^[10]。*ABP1* 尽管具有 KDEL 信号序列,但荧光标记定位及免疫杂交分析都表明其在质膜上有更多分布,而在内质网上的分布较少,表明植物 KDEL 信号调控蛋白细胞内的定位并非决定性的。*ABP1* 很可能是在高尔基体上形成小泡后,受其他因素的控制可以分泌到质膜的外表面^[11]。

关于细胞膜泡运输与生长素信号的关联,Cross 提出了细胞膜循环假说,该假说认为,分布在细胞膜上的 *ABP1* 结合生长素后,抑制网格蛋白(clathrin)的集聚,因此使膜泡的内吞过程受阻,膜泡的运输更倾向外排,并由此将结合在膜泡上的生长素极性运输蛋白 PIN 向生长素浓度高的方向集中^[12]。在 *ABP1* 分泌过程中,如果细胞壁的前体物质与定位在质膜或高尔基体上的 *ABP1* 相互作用,就可能对细胞壁的合成进行调控^[13]。

通过对纤维素合成酶和生长素结合蛋白的荧光标记,显示了 2 种蛋白都在细胞上定位、分布有一定的相关性,*ABP1* 集中的细胞膜部位纤维素合成酶也分布较多。但纤维素合成酶在铺列细胞间的嵌合位点有高度集中的分布点,可能与该区域形态建成过程中合成更多的细胞壁纤维素相一致。

参考文献:

- [1] Ottoline Leyser. The power of auxin in plants[J]. Plant

- Physiology, 2010, 154 : 501–505 .
- [2] Nihal Dharmasiri, Sunethra Dharmasiri, Mark Estelle. The F-box protein TIR1 is an auxin receptor[J]. Nature, 2005, 435 : 441–445 .
- [3] Shi Jinghua, Yang Zhenbiao . Is ABP1 an auxin receptor yet? [J] . Molecular Plant, 2011, 4(4) : 635–640 .
- [4] Alexandre Thomas, Ivan Paponov, Catherine Perrot Rechenmann . Auxin binding protein 1 : Functional and evolutionary aspects[J] . Trends Plant Sci, 2010, 15 : 436–446 .
- [5] Christopher, Elizabeth . Evidence that auxin-induced growth of tobacco leaf tissues does not involve cell wall acidification[J] . Plant Physiol, 1998, 118 : 557–564 .
- [6] Helene Barbier-Brygoo, Genevieve Ephritikhine, Dieter Klämbt, et al . Functional evidence for an auxin receptor at the plasmalemma of tobacco mesophyll protoplasts [J] . Proc Natl Acad Sci USA, 1989, 86 : 891–895 .
- [7] Staffan Persson, Alexander Paredez, Andrew Carroll, et al. Genetic evidence for three unique components in primary cell wall cellulose synthase complexes in *Arabidopsis* [J] . PNAS . 2007, 104 (39) : 15566–15571 .
- [8] 黄妤,周晶辉,乔波,等 . 苎麻生长素结合蛋白 *BnABP1* 与 GFP 融合在烟草中表达[J] . 湖南农业大学学报:自然科学版, 2012, 38(4) : 381–384 .
- [9] 周晓馥,王景余,王兴智 . 植物纤维素合成酶基因的研究进展[J] . 遗传, 2002, 24(3) : 376–378 .
- [10] 刘进平 . 生长素受体与信号转导机制研究进展[J] . 生物技术通报, 2007(3) : 22–30 .
- [11] Timpte C . Auxin binding protein1 : Curiouser and curiouser[J] . Trends in Plant Science, 2001, 6(12) : 586–590 .
- [12] Cross J W . Cycling of auxin-binding protein through the plant cell : Pathways in auxin signal transduction[J]. New Biol, 1991, 3(8) : 813–819 .
- [13] Xu Tongda, Alan M Jones, Yang Zhenbiao, et al . Cell surface and rho GTPase-based auxin signaling controls cellular interdigitation in *Arabidopsis*[J] . Cell 2010, 143 : 99–110 .

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 罗 维