

拟南芥含 MATH 结构域基因 *AtSb3* 的表达分析

余媛^a, 赵莺婕^b, 郭磊^a, 刘春林^{a*}

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

摘 要: 利用 RT-PCR 的方法检测了 *AtSb3* 在拟南芥的表达情况; 在构建 *AtSb3* 基因启动子与 GUS 融合表达载体并获得拟南芥转化子的基础上, 用组织化学染色方法对 *AtSb3* 基因在拟南芥中的表达进行了研究。RT-PCR 的结果表明: 只在拟南芥根中检测到 *AtSb3* 的表达, 在茎、叶、花和果荚中均检测不到 *AtSb3* 的表达。GUS 组织化学染色结果显示: 在刚萌动的种子中, *AtSb3* 主要在胚根部位表达, 其他部位不表达; 在种子萌发后的子叶展开期, *AtSb3* 在根尖部位表达, 其他部位不表达; 在 4~5 叶期幼苗中, *AtSb3* 在地上部分没有表达, 只在主根和各级侧根的根尖部位表达; 在根尖部位, *AtSb3* 基因在根冠与分生区细胞结合部位, 以及伸长区和根毛区的表达量高, 而在分生区与伸长区之间存在一段不表达的区域。

关 键 词: 拟南芥; *AtSb3* 基因; 反转录聚合酶链反应(RT-PCR); 组织化学染色; 组织定位

中图分类号: Q786 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2013)05-0489-06

Analysis of the expression of *AtSb3* gene containing MATH domains in *Arabidopsis thaliana*

SHE Yuan^a, ZHAO Ying-jie^b, GUO Lei^a, LIU Chun-lin^{a*}

(a.College of Agronomy; b.College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: RT-PCR were used to investigate the expression of *AtSb3* in *Arabidopsis thaliana*, and the vector with *AtSb3* gene promoter and GUS fusion expression cassette was constructed to obtain the transgenic lines of *Arabidopsis thaliana*, based on which the tissue localization of *AtSb3* gene expression was investigated by histochemical staining. The results of RT-PCR showed *AtSb3* gene was expressed only in root, not in the stem, leaf, flower and silique. The results of GUS staining showed that in seeds at early germinating stage, *AtSb3* gene was only expressed in radicle. In cotyledon expansion period after seed germination, *AtSb3* gene expression was only detected in root tip, not in other parts of the plant. In 4 to 5 leaf stage seedling, *AtSb3* was not expressed in aboveground parts but in taproots and lateral roots. In the root tip, GUS staining was heavier in conjunction region of the root cap and meristematic zone, as well as in elongation zone and root hair, which indicated expression level of *AtSb3* gene was higher in these parts; GUS staining in the region between meristematic zone and elongation zone was not observed.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; *AtSb3* gene; reverse transcription polymerase chain reaction(RT-PCR); histochemical staining; tissue localization

安眠蛋白(Merprin)与肿瘤坏死因子受体相关
因子(TRAF)C端同源结构域(Merprin and TRAF-C

homology domain, 简称MATH结构域)由7~8个反向
平行的 β -折叠组成, 它能介导蛋白质之间的相互作

收稿日期: 2013-04-12

基金项目: 国家自然科学基金项目(31071455)

作者简介: 余媛(1987—), 女, 湖南衡阳人, 硕士研究生, 主要从事作物基因工程与细胞工程研究, syuanyuan1212@126.com; *通信作者, liuc1100@126.com

用^[1-2], 参与植物与真菌的共生作用^[3]。

拟南芥中含有71个MATH 结构域蛋白^[3], 其根部1个含MATH/TRAF结构域蛋白参与细胞质膜对真菌的应答反应, 并且与苜蓿属植物的成瘤作用和蛋白质降解过程密切相关^[4]。

本课题组已经从拟南芥基因组中筛选到1个编码含有2个连续MATH结构域的基因, 命名为*AtSb3*。该基因与在油菜中克隆的6个含有MATH结构域的基因中的一个具有很高的同源性^[8]。为了揭示*AtSb3*基因的功能, 笔者采用RT-PCR和GUS组织化学定位的方法对*AtSb3*基因的时空表达模式进行研究, 获得该基因在拟南芥中的组织特异性表达, 旨在为进一步研究*AtSb3*基因的功能及油菜中同源的含MATH结构域基因的功能提供依据。

1 材料和方法

1.1 材 料

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) 采用 Col-0(哥伦比亚野生型), 由湖南农业大学植物代谢调控实验室提供。种植后的拟南芥 4 °C 春化 3 d 后, 置于 22 °C 的长光照(光照 16 h, 黑暗 8 h) 培养室中生长。GUS 染色材料用 75%乙醇消毒后铺于 1/2MS 培养基^[9]上, 培养皿呈竖直摆放, 拟南芥种子萌发后在培养基上垂直生长。

1.2 方 法

1.2.1 *AtSb3* 基因表达的检测

用 Trizol 试剂盒(购自 Invitrogen 公司)分别提取生长状况良好的拟南芥的根、茎、叶、花、果荚的 RNA; 经过 Fermentas 公司的 RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒反转录成 cDNA, 反转录的产物用拟南芥的内参基因 *Actin2* 检测质量及调节目标基因起始模板量。

Actin2 检测引物为 *Actin2*-F(5'-ATGGCTGAG GCTGATGATATTCAAC-3')和 *Actin2*-R(5'-TCTC AGCACCAATCGTGATGACTTG-3'), 预期的扩增目标片段的长度为 766 bp。 *AtSb3* 基因的 RT-PCR 检测引物为 *AtSb3*-F(5'-CACATGCACTTCCAATC TTCCTATA-3'), *AtSb3*-R(5'-AACGGAGACTATG

TTTGTCACAGAG-3'), 预期的扩增目标片段的长度为 287 bp。

1.2.2 *AtSb3* 基因启动子的克隆

根据TAIR网站(<http://www.arabidopsis.org/>)上公布的*AtSb3*基因序列, 取ATG上游到上1个基因UTR序列的最后1个碱基之间的1 690 bp片段作为启动子区, 采用Primer Premier5软件设计启动子扩增引物对AT54pro101-F/AT54pro101-R, 并在正向引物的5'端加Hind 酶切位点, 在反向引物的5'端加上BamHI 酶切位点。

AT54pro101-F的序列为5'-CCCAAGCTTGGG AGGTTTGGTATCTTACATAAAAAA-3'(下划线示Hind 酶切位点); AT54pro101-R的序列为5'-CG GGATCCCGATTTTGAGATCTTTTTTGT-3'(下划线示BamH 酶切位点)。

参照CTAB法^[10]提取拟南芥基因组DNA。以此为模板, 用Takara公司的高保真酶扩增*AtSb3*基因的启动子, 回收目的片段, 并克隆到pMD19-T载体(购自大连宝生物TAKARA公司)中, 转化大肠杆菌DH5α(购自湖南农业大学植物代谢调控实验室保存), 提取质粒, 酶切验证后送长沙博尚生物技术有限公司测序。

1.2.3 *AtSb3* 基因启动子与 GUS 融合载体的构建

用HindIII和BamHI双酶切分别酶切测序正确的重组pMD19-T质粒和pBI101载体(购自大连宝生物TAKARA公司), 电泳后分别回收目标片段, 将回收的1 690 bp左右的启动子片段与经双酶切的pBI101载体片段, 用Fermentas公司T₄连接酶连接, 构建*pAtSb3pro101::GUS*质粒, 并转化大肠杆菌DH5α, PCR验证阳性单菌落, 提取质粒进行双酶切验证, 并保存菌液。从重组大肠杆菌DH5α分离目标融合质粒*pAtSb3pro101::GUS*, 利用冻融法将融合质粒转化到农杆菌GV3101(湖南农业大学植物代谢调控实验室保存)中。

用PCR检测农杆菌转化子的融合质粒, 融合质粒的检测引物为: *pAtSb3*-F(5'-CCCAAGCTTGGG AGGTTTGGTATCTTACATAAAAAA-3'); *pAtSb3*-R(5'-CCGCATAATTACGAATATCTGCATC-3')。

1.2.4 浸花法转化拟南芥

参照 Floral dip 浸花法^[11]转化拟南芥。将带有重组质粒 *pAtSb3pro101::GUS* 的农杆菌 GV3101 接种至 YEB 液体培养基(1 g/L Yeast Extract、5 g/L Tryptone、5 g/L Beef Extract、0.493 g/L $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 、1 mmol/L KOH 调节 pH 至 7.0), 在 28 °C 的条件下活化并扩大, 5 000 r/min 室温离心后加入 10 mmol/L MgSO_4 悬浮细菌。如此操作 2 次之后加入 200 mmol/L AS(乙酰丁香酮), 室温放置 2 h。将处理好的菌液加入到 100 mL 渗透培养基(0.5 g Sucrose、0.22 g MS 0221、50 μL Silwet-77, 1 mol/L KOH 调节 pH 至 5.7)中, 混合均匀, 将生长大约 40 d 左右的带花序的拟南芥浸泡到渗透培养基中 1~2 min, 然后盖上塑料膜, 并移入 22 °C 的生长室中避光培养, 24 h 后揭开塑料膜, 按正常的光照培养(同 1.1)。

1.2.5 转化植株的筛选鉴定

待转化的植株成熟后, 收集种子(T_0 代)。将 T_0 代种子用 75% 的乙醇消毒 10~15 min, 用灭菌的蒸馏水清洗种子 2~3 遍后, 铺于含有 30 mg/L Kan 的 1/2MS 培养基^[9]筛选。4 °C 春化 3 d 后, 移入 22 °C 的生长室中生长。筛选生长 10 d 左右, 将得到的抗性苗移栽到蛭石中生长, 刚移入的抗性苗用塑料杯罩 1 周左右保湿。抗性苗在蛭石上生长 2 周左右, 采用引物 *pAtSb3-F* 和 *pAtSb3-R* 进行检测, 呈阳性的为 T_1 代转基因苗, 成熟后收集 T_1 代种子。同样铺于含有 Kan 的 1/2MS 筛选培养基^[9]上进行筛选, 通过连续的自交和 PCR 检测, 直到筛选出纯合的转化子, 用于下一步试验。

1.2.6 GUS 组织化学定位

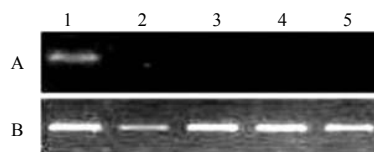
参照 Jefferson^[12-13] GUS 染色方法进行组织化学定位。取吸水萌发 24 h 的转基因拟南芥种子及在 1/2MS 培养基^[9]上生长 7 d 和 15 d 的转基因幼苗分别进行染色, 同时取生长时期相同的野生型拟南芥作为对照。染色步骤为: 加入 90% 的丙酮固定, 抽真空 15~20 min, 冰上放置 1 h, 吸去丙酮, 加入 GUS 染色液(0.04% X-Gluc, 50 mmol/L 磷酸钠缓冲液(pH 7.0), 2 mmol/L $\text{K}_4\text{Fe}(\text{CN})_6 \cdot 3\text{H}_2\text{O}$, 2 mmol/L $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$, 5 mmol/L EDTA, 0.1% TritonX-100),

37 °C 染色 3 h 左右, 70% 乙醇脱色, 直至植株的绿色全部褪去为止。在 Nikon SMZ1000 体式显微镜下观察 GUS 表达情况并拍照。

2 结果与分析

2.1 *AtSb3* 基因的表达

通过 RT-PCR 分析发现, *AtSb3* 基因的转录产物只在根中检测到, 而在茎、叶、花以及果荚中检测不到该基因的转录产物(图 1), 说明该基因只在根中特异性表达。



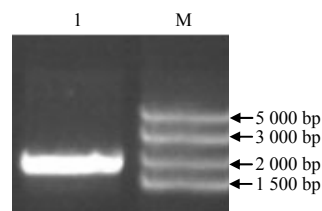
A 中 1~5 分别为拟南芥根、茎、叶、花、果荚中 *AtSb3* 基因转录产物的检测结果; B 中 1~5 分别为拟南芥根、茎、叶、花、果荚中 *Actin2* 内参基因转录产物的检测结果。

图 1 *AtSb3* 基因的 PCR 扩增结果

Fig.1 Results for PCR amplification of *AtSb3*

2.2 *AtSb3* 基因启动子的克隆

通过梯度 PCR 确定扩增引物 *AtSb3pro101-F*/*AtSb3pro101-R* 的最佳退火温度为 56 °C。PCR 扩增得到了约 1 700 bp 的产物(图 2)。将产物连接到 pMD19-T 载体测序, 测序结果与 NCBI 网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/index.html>)公布的结果进行比对, 同源性高达 100%, 表明 *AtSb3* 基因启动子序列已经完整克隆到 pMD19-T 载体, 可以用于下一步试验。



1 克隆的目的片段; M 100 bp Plus Marker。

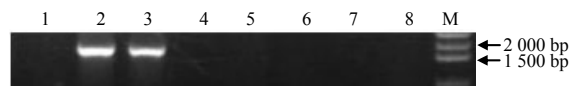
图 2 *AtSb3* 启动子区的 PCR 扩增结果

Fig.2 PCR amplification of *AtSb3* promoter

2.3 重组质粒菌落 PCR 及双酶切验证

用 *Hind*III 和 *Bam*HI 双酶切含 *AtSb3* 基因启动子序列的 pMD19-T 和 pBI101 载体, 经 T_4 连接酶

连接形成的重组融合质粒 *pAtSb3pro101::GUS* , 通过热激法转化大肠杆菌 DH5 α 。随机挑取单菌落进行 PCR 检测融合质粒, 以获得阳性克隆, PCR 结果见图 3。



1 空白对照; 2 阳性对照; 3 阳性克隆的PCR结果; 4~8 阴性克隆的PCR结果; M 100 bp Plus Marker。

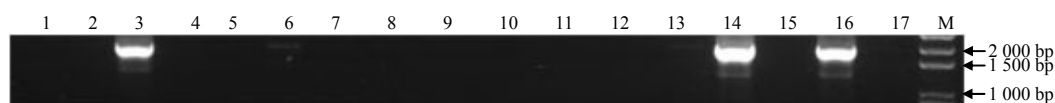
图3 菌落PCR检测结果

Fig.3 Results of PCR test of colonies

扩大培养经 PCR 检测为阳性的克隆, 并提取质粒, 用 *Hind*III 和 *Bam*HI 进行双酶切验证, 结果酶切得到 1 条约 1 700 bp 左右的条带(图 4), 与预期的 1 690 bp 的目的条带相符, 说明 *AtSb3* 基因的启动子全长 *GUS* 融合表达载体构建成功。

2.4 *pAtSb3pro101::GUS* 转基因植株的 PCR 检测

通过浸花法获得的 T_0 代种子在 30 mg/L Kan 抗



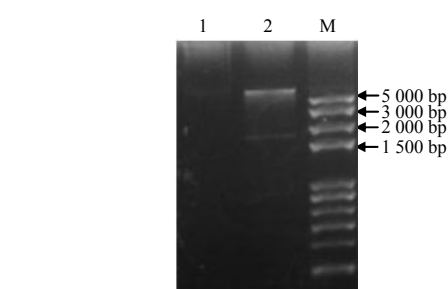
1 空白对照; 2 阴性对照; 3 阳性对照; 4~13、15、17 未能转入 *pAtSb3pro101::GUS* 的抗性苗的检测结果; 14、16 转入了 *pAtSb3pro101::GUS* 的抗性苗的PCR结果; M 100 bp Plus Marker。

图5 抗性苗的PCR检测结果

Fig.5 The PCR test result of Kan-resistant plants

2.5 GUS 组织化学染色

为了研究 *AtSb3* 基因的表达模式, 通过 GUS 组织化学染色发现, 在转基因种子刚萌动时期, 染色部位主要在胚根, 并且集中在胚根的最顶端部分(图 6-1, 彩版见封三), 在其他部位, 如胚芽和胚轴



1 未酶切的重组载体; 2 *Hind*III和*Bam*HI双酶切重组载体; M 100 bp Plus Marker。

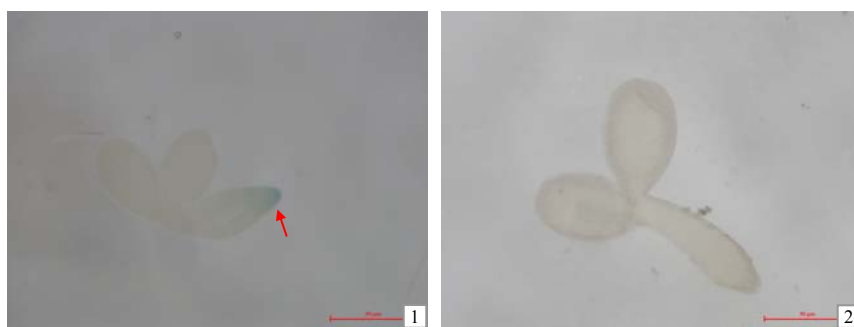
图4 重组质粒 *pAtSb3pro101::GUS* 的酶切验证

Fig.4 Identification of recombinant plasmid *pAtSb3pro101::GUS* by restriction enzyme digestion

性筛选培养基上筛选得到抗性苗。抗性苗经过 PCR 检测, 共获得转基因苗 2 株(图 5)。继续进行 Kan 抗性筛选与 PCR 检测, 筛选得到纯合的 T_3 代含 *pAtSb3pro101::GUS* 表达框的转基因材料。纯合材料用于 GUS 组织化学染色检测。

中则没有, 表明在种子萌动时期 *AtSb3* 基因主要在胚根的最顶端部分表达。

在萌发后 2 片子叶展开期的幼苗期, 染色部位也主要在根部的根尖(图 7-1, 彩版见封三), 而在其他部位, 如茎和子叶中则没有, 说明在子叶期 *AtSb3*



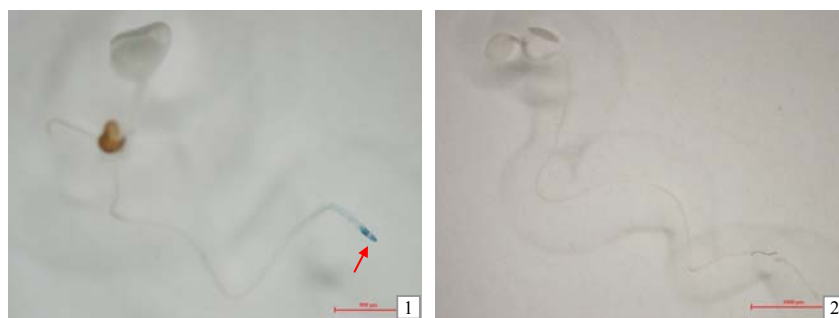
箭头所指为GUS染色部位, 下同; 1 萌发24 h的转基因种子; 2 萌发24 h的野生型种子。

图6 萌动期种子中 *AtSb3* 的表达定位

Fig.6 GUS histochemical localization of *AtSb3* gene expression in germinating seeds

基因主要在根尖中表达。在转基因拟南芥 4~5 叶期的幼苗中,染色部位主要在主根和各级侧根根尖部位(图 8-1,彩版见封三),而在茎和幼叶中都没有染上色,说明 *AtSb3* 基因在地上部位没有表达,*AtSb3* 基因启动子驱动 GUS 基因只在拟南芥根部特异表达。生长 7 d 的幼苗的根尖局部放大图(图 9-1,彩版见封三)显示,在成熟根的根冠和根尖分生区结

合部及伸长区细胞的染色非常深,说明 *AtSb3* 基因表达量高;从根部的伸长区细胞到成熟区细胞的颜色变浅,说明 *AtSb3* 基因表达量低;在分生区与伸长区细胞之间的结合部没有颜色,则说明 *AtSb3* 基因在这段区域不表达。此外,*AtSb3* 基因在根毛中也有表达(图 9-2,彩版见封三)。



1 生长 7 d 的转基因幼苗; 2 生长 7 d 的野生型幼苗。

图7 子叶展开期幼苗中*AtSb3*的表达定位

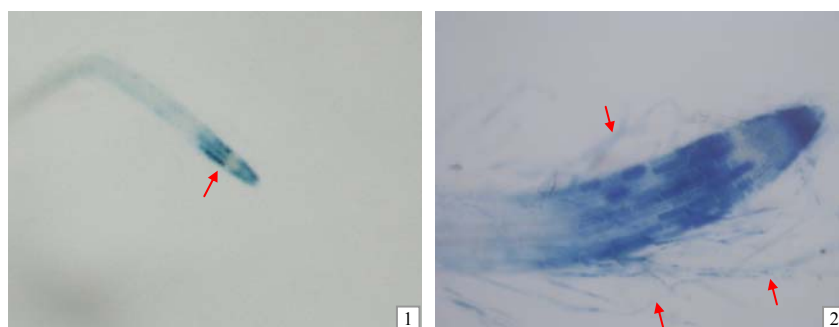
Fig.7 GUS histochemical localization of *Atsb3* gene expression in seedlings at cotyledon expansion stage



1 生长 15 d 的转基因幼苗; 2 生长 15 d 的野生型幼苗。

图8 4~5叶期幼苗中*AtSb3*的表达定位

Fig.8 GUS histochemical localization of *Atsb3* gene expression in seedlings at 4 to 5 leaf-stage



1~2 局部放大的转基因幼苗的根尖。

图9 根尖部位*AtSb3*的表达定位

Fig.9 GUS histochemical localization of *AtSb3* gene expression in root tip

3 结论与讨论

动物中含 MATH 结构域的基因的研究开展得较早,此类基因在哺乳动物的生长发育、衰老及免

疫功能等方面起着重要的作用^[2,11-14]。关于植物中含 MATH 结构域基因的研究还不多,在对模式植物拟南芥^[3-4]以及油菜^[8]等部分经济作物上开展的相

关 MATH 结构域基因的功能的研究表明,含 MATH 结构域的基因在抗逆性、生长发育、品质形成等诸多方面可能发挥重要作用。

笔者通过进行氨基酸序列比对发现, *AtSb3* 基因来源于拟南芥中 MATH 结构域基因家族,属于含双 MATH 结构域的基因,其具体功能未知。本研究利用 RT-PCR 和 GUS 组织化学染色方法证实 *AtSb3* 基因只在拟南芥的根中表达,在其他组织中不表达; *AtSb3* 基因在拟南芥成熟根的根冠与分生区细胞的结合部位、伸长区细胞以及根毛中都有较高的表达,说明该基因表达有组织倾向性,似乎在根部细胞生长替换活跃的部位表达明显。

本研究通过 RT-PCR 分析发现拟南芥 *AtSb3* 基因为根特异性表达基因。进一步的组织化学染色分析发现,拟南芥 *AtSb3* 基因只在拟南芥的根尖部分表达,预示着该基因可能在拟南芥的抗性或者根的生长发育等方面起着一定的调控作用,今后可以侧重这方面的研究。

参考文献:

- [1] Uren A G, Vaux D L. TRAF proteins and meprins share a conserved domain [J]. Trends Biochem Sci, 1996, 21: 244-245.
- [2] Sunnerhagen M, Pursglove S, Fladvad M. The new MATH: Homology suggests shared binding surfaces in meprin tetramers and TRAF trimers[J]. FEBS Lett, 2002, 530(13): 1-3.
- [3] Tatjana P, Bationa S, Pham H G, et al. Association of *Piriformospora indica* with *Arabidopsis thaliana* roots represents a novel system to study beneficial plant-microbe interactions and involves early plant protein modifications in the endoplasmic reticulum and at the plasma membrane[J]. Physiologia Plantarum, 2004, 12(2): 465-477.
- [4] Oelmüller R, Peškan B T, Shahollari B, et al. MATH domain proteins represent a novel protein family in *Arabidopsis thaliana*, and at least one member is modified in roots during the course of a plant-microbe interaction[J]. Physiologia Plantarum, 2005, 124(2): 152-166.
- [5] 潘刚,周永明.甘蓝型油菜遗传转化的研究进展[J].中国油料作物学报, 2003, 25(3): 90-98.
- [6] 徐颖,刘鸿雁.能源植物的开发利用与展望[J].中国农学通报, 2009, 25(3): 297-300.
- [7] 官春云.中国油菜产业发展方向[J].粮食科技与经济, 2011, 36(2): 5-6.
- [8] 彭琦,胡燕,杜培粉,等.甘蓝型油菜种子不同发育时期SSH文库的构建[J].作物学报, 2009, 35(9): 1576-1583.
- [9] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bio assays with tobacco tissue cultures[J]. Physiologia Plantarum, 1962, 15(3): 473-497.
- [10] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. Nucleic Acids Res, 1980, 8: 4321-4325.
- [11] Clough S J, Bent A F. Floral dip: A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*[J]. The Plant Journal, 1998, 16(6): 735-743.
- [12] Jefferson R A, Burgess S M, Hirsh D. Beta-Glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1986, 83(22): 8447-8451.
- [13] Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W. GUS fusions: Beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants[J]. The EMBO Journal, 1987, 6(13): 3901-3907.

责任编辑: 罗 维
英文编辑: 罗 维