

文章编号:1001-5132 (2010) 03-0001-05

拟南芥 *AtGLR1.3* 和 *AtGLR3.3* 启动子的 *GUS* 基因融合表达

陈庆¹, 叶放¹, 宁永强¹, 丁沃娜², 朱世华^{2*}

(1.宁波大学 生命科学与生物工程学院, 浙江 宁波 315211; 2.宁波大学 科学技术学院, 浙江 宁波 315211)

摘要: 用启动子融合 *GUS* 基因的方法, 研究了 *AtGLR1.3* 和 *AtGLR3.3* 基因在拟南芥植株的组织表达. 结果表明: 这 2 个基因分别在植株的不同组织和器官内表达, 具有组织表达的特异性, 其中 *AtGLR1.3* 主要在根部的皮层和托叶着生部位表达; *AtGLR3.3* 主要在植株的维管组织中表达, 尤其在根部、胚轴和叶的维管组织中. 从这 2 个基因分别在皮层和维管组织中表达, 推测它们的功能与 Ca^{2+} 吸收和转运相关.

关键词: 拟南芥; 启动子; 基因表达; 谷氨酸受体

中图分类号: Q344^{+.4}

文献标识码: A

在动物体内, 离子通道型谷氨酸受体(ionotropic glutamate receptors, iGluRs)作为门控离子通道, 介导多数的兴奋性神经传递^[1]. 但是在不具有神经系统的植物中也发现有类似结构的基因存在, 如在拟南芥中发现了 20 个与动物 *iGluRs* 基因序列有同源性的 *AtGLRs* 基因家族^[2], 这 20 个基因被分为 3 个亚族 *AtGLR1*、*AtGLR2* 和 *AtGLR3*^[3-4]. 相继的研究初步揭示了植物 *AtGLRs* 基因的一些功能: *AtGLRs* 可能参与光信号的传导^[2]; 与植物 Ca^{2+} 的吸收和转运相关^[5], 进一步研究发现可能与细胞内钙离子浓度调控及钙信号相关^[6-7], 参与受 Ca^{2+} 调控的气孔运动^[8]; 能调控或参与 C/N 的代谢, 并通过调控 ABA 的生物合成来控制种子的萌发^[9]; 能调控根尖分生组织的分裂与凋亡过程, 从而影响根系的生长发育^[10].

但是对于植物的离子通道型谷氨酸受体基因功能研究总体上还相当单薄, 对于拟南芥 20 个 *AtGLRs* 基因的时空表达也缺乏全面的研究和描述. 笔者利用启动子融合 *GUS* 基因的方法, 分别在亚族 *AtGLR1* 和 *AtGLR3* 中选 *AtGLR1.3* 和 *AtGLR3.3* 作为代表, 研究了这 2 个基因的时空表达, 为下一步功能的研究提供线索.

1 材料与方法

1.1 植物材料和培养条件

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) Columbia 生态型. 培养条件为 22 ℃, 75% 湿度, 光照 16 h; 培养基 MS.

1.2 菌株、载体和生化试剂

大肠杆菌 Top10、根瘤农杆菌 EHA105 和载体

收稿日期: 2010-03-30. 宁波大学学报(理工版)网址: <http://3xb.nbu.edu.cn>

基金项目: 浙江省自然科学基金重点项目(Z306401); 宁波市自然科学基金(2006A610074).

第一作者: 陈庆(1982-), 男, 山东菏泽人, 在读硕士研究生, 主要研究方向: 植物分子生物学. E-mail: cqlp123@163.com

*通讯作者: 朱世华(1963-), 男, 浙江宁波人, 博士/教授, 主要研究方向: 植物遗传学及植物分子生物学. E-mail: zhushihua@nbu.edu.cn

pBI101.3 为本实验室保存, pUCm-T Vector 载体购自大连宝生物公司. 各种抗生素、质粒抽提试剂盒以及割胶回收试剂盒均购自上海生工公司. 各种限制性内切酶、*Taq* 酶、T4 连接酶和 DNA mark 均购自大连宝生物公司.

1.3 植物基因组 DNA 提取和 PCR

取 1~2 片拟南芥的嫩叶放在 1.5 mL 的离心管中, 加入 200 μ L 的 TPS (100 mmol·L⁻¹ Tris-Cl pH 8.0, 10 mmol·L⁻¹ EDTA, 1 mol·L⁻¹ KCl) 抽提液并捣碎, 然后 75 °C 水浴 20 min, 15 000 r·min⁻¹ 离心 5 min, 取上清液 120 μ L 到新的离心管中并加入等体积的异丙醇, 摇匀, 12 000 r·min⁻¹ 离心 10 min, 倒掉上清液, 沉淀用 70% 的乙醇清洗, 12 000 r·min⁻¹ 离心 5 min. 待乙醇挥发干净溶于 20 μ L 超纯水或者 TE 中, 1% 琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的质量与浓度.

PCR 反应体系: 10 \times *La* buffer (含 MgCl₂) 5 μ L, dNTP (2.5 mM) 2 μ L, 上游引物(10 μ M) 1 μ L, 下游引物(10 μ M) 1 μ L, 模板 DNA (50~100 ng) 2 μ L, *La Taq* (5 U· μ L⁻¹) 0.3 μ L, ddH₂O 38.7 μ L, 总体积 50 μ L.

PCR 反应条件: 94 °C 预变性 4 min, 94 °C 变性 45 s, 58 °C 退火 45 s, 72 °C 延伸 90 s, 最后 72 °C 延伸 10 min.

1.4 引物设计及 Promoter::GUS 双元表达载体构建

从 www.arabidopsis.org 网站下载 *AtGLR1.3* 和 *AtGLR3.3* 基因的相关序列进行分析后设计引物, 并在 5' 加限制性内切酶位点接头. 启动子扩增引物分别是: GLR1.3U: 5'-GATCaagcttCGTTTGCTGCTTTTAGTCA-3', GLR1.3L: 5'-GGTTggatccAAAACAATTGTTGTGATG TGGT-3', GLR3.3U: 5'-TTAGgtcgacTATGTCATTCTAGTAGTTAACCCCTA-3', GLR3.3L: 5'-ACATggatccCTTAAAGCTAAAATTG GACC-3'. 将 *ATGLR1.3* 启动子的 PCR 产物克隆到 pUCm-T Vector 后, 与 pBI101.3 分别用 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切后连接成表达载体 p*AtGLR1.3*::*GUS*. *AtGLR3.3* 启动子的 PCR 产物克隆到 pUC m-T Vector 后, 与 pBI101.3 分别用 *Sal* I 和 *Bam*H I 双酶

切后连接成表达载体 p*AtGLR3.3*::*GUS*, 然后测序检查.

1.5 水稻愈伤组织基因枪转化瞬时表达检测

挑选直径为 1~3 mm 的水稻 *Kasalath* 品种愈伤组织, 在 NB 培养基上培养 4 d, 将愈伤组织转到 NBO 培养基(NB 基本培养基中加入 0.256 mol·L⁻¹ 甘露醇和 0.256 mol·L⁻¹ 山梨醇)上, 并使之在平板中央聚集成一直径约为 2.5 cm 的圈, 培养 4~6 h, 进行基因枪轰击, 将轰击后的愈伤组织在 NBO 培养基上继续培养 5 d, 然后用 GUS 染液染色以检测载体的表达活性.

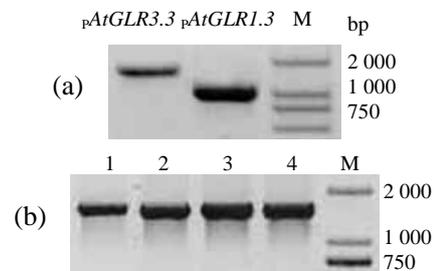
1.6 根瘤农杆菌介导转化野生型拟南芥及 GUS 组织化学染色

用电击法将表达载体转入到根瘤农杆菌后, 采用花序浸润法将构建好的表达载体转入到拟南芥植株, 卡那霉素抗性筛选得到 T₀ 转基因植株, 对 T₁ 和 T₂ 转基因阳性的植株进行 GUS 组织化学染色分析.

2 结果

2.1 启动子的克隆及载体的构建

利用 PCR 扩增后克隆到 *AtGLR1.3* 和 *AtGLR3.3* 的启动子长度分别为 1 011 bp (-39~ -1 049) 和 1 600 bp (-37~ -1 636) (图 1(a)), 利用双元载体 pBI101.3 分别构建了启动子融合 *GUS* 基因的 p*AtGLR1.3*::*GUS* 和 p*AtGLR3.3*::*GUS* 载体(图 2).



(a)为 *AtGLR1.3* 和 *AtGLR3.3* 启动子的 PCR 产物; (b)为转基因植株内的 *GUS* 基因检测, 其中 1 和 2 是转 p*AtGLR1.3*::*GUS* 的植株, 3 和 4 是 p*AtGLR3.3*::*GUS* 的植株

图 1 PCR 检测

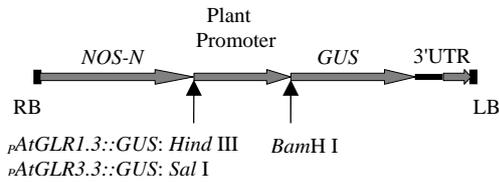
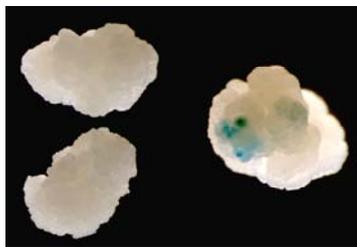


图 2 载体 *pAtGLR1.3::GUS* 和 *pAtGLR3.3::GUS* 的构建和 T-DNA 区域结构

构建 *pAtGLR1.3::GUS* 和 *pAtGLR3.3::GUS* 二元载体分别用基因枪轰击水稻愈伤组织, 可以发现转化的水稻愈伤组织可被染色(图 3), 说明构建的



左是对照, 右为转 *pAtGLR1.3::GUS*

图 3 *pAtGLR1.3::GUS* 载体在水稻愈伤组织中的表达

表达载体具有完整的表达活性.

2.2 转基因拟南芥植株的获得

用电转化的方法把构建的表达载体转化到农杆菌中, 然后在链霉素($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)和卡那霉素($50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的 YEP 平板上培养, 然后用花序浸润法浸染野生型的拟南芥, 收获的种子在含有 $50 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 卡那霉素的 MS 固体培养基上筛选转染成功的植株, 并用 *GUS* 特异的引物进行 PCR 验证, 能扩增出相应条带的(图 1(b)), 证实系转基因成功的植株. 在转 *pAtGLR1.3::GUS* 和 *pAtGLR3.3::GUS* 的植株中分别筛选到 5 或 6 株转基因植株. 再继续培养获得 T_1 、 T_2 植株用于 *GUS* 染色.

2.3 基因的表达

将转基因植株在 MS 平板上正常培养 10 d, 然后整株在 *GUS* 染液中染色 24 h 时用于根、叶、胚轴等染色观察; 待植株长到 6 周左右取花和果实染



(a)



(b)

(a)为 *AtGLR1.3*; (b)为 *AtGLR3.3*; 从左到右依次上排为幼苗整株、叶、主根成熟区、根尖; 下排为胚轴、托叶、花、角果

图 4 *AtGLR1.3* 和 *AtGLR3.3* 启动子融合 *GUS* 基因在拟南芥不同组织内的表达

色进行观察,结果如图4所示。

从图4可以看出, *AtGLR1.3* 和 *AtGLR3.3* 分别在植株的不同组织内表达。*AtGLR1.3* 主要在根部表达,在根部的成熟区有较高的表达,表达部位主要是皮层,但在根尖不表达;在胚轴内没有见到表达,但托叶着生部位有少许表达;在花中只有花丝和花药的连接部位有少量表达,在叶、花和果实中均没有发现表达。

AtGLR3.3 在整个植株的维管组织中都能发现有表达。在根部和胚轴内主要在维管束表达,幼叶中也主要在维管部位表达,此外在根尖的伸长区也有表达。在托叶着生部位表达强度比较高,在花托、萼片、花丝等花器中有表达,但在花瓣内没有见到表达;在角果与果柄连接处有较强的表达,甚至在果皮上也能见到表达。

3 讨论

在动物体内,离子通道型谷氨酸受体作为门控离子通道,介导多数的兴奋性神经传递,在神经细胞中通过与配体谷氨酸和甘氨酸结合,诱导 Ca^{2+} 、 K^+ 和 Na^+ 信号离子进入到细胞内,引起膜电位的改变^[1]。在生物进化过程中,植物不再具有动物的神经系统,但植物仍能通过根尖吸收相应的离子。

植物体的谷氨酸受体(GLRs)被推测为植物的离子通道,并可能与 Ca^{2+} 的吸收和转运相关^[11],但确切的功能还没有得到直接的实验证据支撑。植物吸收土壤中的矿物质等离子与根尖的皮层组织相关,维管组织是植物运输矿物质的通道。因此 *AtGLR1.3* 主要在根尖皮层表达和 *AtGLR3.3* 主要在植株维管组织表达,暗示它们的功能可能分别与 Ca^{2+} 的吸收和转运相关。

在拟南芥中有 20 个 GLRs 基因的 *AtGLRs* 基因家族,Chiu 等^[4]通过分子系统聚类分析,发现它们分成 3 簇,为进一步了解 *AtGLRs* 的簇是否能代表它们的功能蛋白的分类,用 RT-PCR 对这 20 个

AtGLRs 基因进行器官的表达谱分析。第 1 簇和第 3 簇的 *AtGLRs* 基因在叶、根、花和果实中都表达,但第 2 簇的 *AtGLRs* 的 9 个基因中有 5 个在 8 周的拟南芥根中是特异表达,总体上这 20 个基因都能在根中表达,但是没有发现簇基因的器官专一性表达,不同簇基因之间表达有重叠。利用 *AtGLR1.1*、*AtGLR2.1* 和 *AtGLR3.1* 的启动子融合 *GUS* 的转基因方法,发现 *AtGLR1.1* 能在幼苗的托叶着生部位和叶缘中表达,在根部主要在表皮和皮层组织中表达,而在维管和根尖部位不表达,*AtGLR2.1* 集中在根部表达,但在成熟的叶、花和果实中没有表达。*AtGLR3.1* 的表达主要在叶和根的维管组织、花器、果实和种子中表达,显示 *AtGLRs* 的表达有组织或细胞的特异性,但能否代表簇的意义可能还需要对更多此类基因的启动子进行研究。

实验的 *AtGLR1.3* 主要在根部的表皮与皮层表达,在托叶着生部位有少许表达,这与 *AtGLR1.1* 基因表达相似。*AtGLR3.3* 主要在叶和根的维管组织、花器和果实中表达,这与 *AtGLR3.1* 的表达相似,说明同簇的基因表达可能具有组织的特异性。

目前对于 *AtGLRs* 功能研究很多没有得到直接的实验证据。在动物体内,由 4 或 5 个相同的 iGluR 亚单位聚合形成同聚体离子通道,或者不同的亚单位间聚合形成异聚体离子通道起作用^[12]。因此,拟南芥的 20 个 *AtGLRs* 也可能彼此之间形成同聚体或者异聚体离子通道,对于这些基因时空表达的详细研究有助于离子通道模式的推测,并能提供基因功能研究的线索和可行的方法。

参考文献:

- [1] Dingledine R, Borges K, Bowie D, et al. The glutamate receptor ion channels[J]. *Pharmacological Rev*, 1999, 51: 7-61.
- [2] Lam H M, Chiu J, Hsieh M H, et al. Glutamate-receptor genes in plants[J]. *Nature*, 1998, 396:125-126.
- [3] Lacombe B, Becker D, Hedrich R, et al. The identity of plant glutamate receptors[J]. *Science*, 2001, 292:1486-1487.

- [4] Chiu J C, Brenner E D, DeSalle R, et al. Phylogenetic and expression analysis of the glutamate-receptor-like gene family in *Arabidopsis thaliana*[J]. Molecular Biology and Evolution, 2002, 19:1066-1082.
- [5] Kim S A, Kwak J M, Jae S K, et al. Overexpression of the *AtGluR2* gene encoding an *Arabidopsis* homolog of mammalian glutamate receptors impairs calcium utilisation and sensitivity to ionic stress in transgenic plants[J]. Plant and Cell Physiol, 2001, 42:74-84.
- [6] Dennison K L, Spalding E P. Glutamate-gated calcium fluxes in *Arabidopsis*[J]. Plant Physiol, 2000, 124:1511-1514.
- [7] Zhu Q, Nicholas R S, Edgar P S. Calcium entry mediated by *GLR3.3*, an *Arabidopsis* glutamate receptor with a broad agonist profile[J]. Plant Physiol, 2006, 142:963-971.
- [8] Cho D, Kim S A, Murata Y, et al. De-regulated expression of the plant glutamate receptor homolog *AtGLR3.1* impairs long-term Ca^{2+} -programmed stomatal closure[J]. Plant J, 2009, 58:437-439.
- [9] Kang J, Turano F J. The putative glutamate receptor 1.1 (*AtGLR1.1*) functions as a regulator of carbon and nitrogen metabolism in *Arabidopsis thaliana*[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100:6872-6877.
- [10] Li J, Zhu S H, Song X, et al. A rice glutamate receptor-like gene is critical for the division and survival of individual cells in the root apical meristem[J]. Plant Cell, 2006, 18:340-349.
- [11] Davenport R. Glutamate receptors in plants[J]. Ann Bot, 2002, 90:549-557.
- [12] Stern-Bach Y, Bettler B, Hartley M, et al. Agonist selectivity of glutamate receptors is specified by two domains structurally related to bacterial amino acid-binding proteins[J]. Neuron, 1994, 13:1345-1357.

Expression of *GUS*-fusion for *Arabidopsis AtGLR1.3* and *AtGLR3.3* Promoters

CHEN Qing¹, YE Fang¹, NING Yong-qiang¹, DING Wo-na², ZHU Shi-hua^{2*}

(1.Faculty of Life Science and Biotechnology, Ningbo University, Ningbo 315211, China;

2.College of Science and Technology, Ningbo University, Ningbo 315211, China)

Abstract: To experimentally study the expression of the genes, the promoters of *AtGLR1.3* and *AtGLR3.3* are cloned, and fused with *GUS* gene. The results give the expression pattern of the genes located in different tissues and organs. *AtGLR1.3* is mainly expressed in the root cortex and stipule formation sites, while the expression of *AtGLR3.3* is observed in the vascular tissue of entire seeding, especially in roots, hypocotyls and leaves. The experiment suggests the possibility that *AtGLR1.3* and *AtGLR3.3* may have participated in absorption and transportation of Ca^{2+} , respectively.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; promoter; gene expression; glutamate receptor gene

CLC number: Q344⁺.4

Document code: A

(责任编辑 史小丽)