

采用 GUS 标记技术研究钙调素在转基因烟草中的分布

陶文菁, 梁述平, 吕应堂*

(武汉大学发育生物学研究中心, 武汉 430072)

摘要: 为了监测钙调素(CaM)在植物细胞内的分布并探索其生物学功能, 将水稻CaM和GUS融合基因(*cam • gus*)分别置于35S启动子和花粉特异启动子LAT52-7控制下, 构建出载体pMD/CaM • GUS和pBI/LAT • CaM • GUS, 转化烟草(*Nicotiana glauca* cv. SR1), GUS染色结果显示, CaM • GUS融合蛋白广泛分布于植物根、茎、叶等组织, 根尖生长点细胞、根毛细胞、表皮毛细胞、气孔保卫细胞、维管束细胞的细胞质中融合蛋白含量较多。花粉粒中也分布着CaM, 并在萌发沟处表现出较高的浓度。保卫细胞和表皮毛细胞中CaM分布在相邻细胞连接处细胞膜内侧, 呈现出极性分布。研究结果表明, 细胞内CaM的不均匀分布可能与细胞功能相关。

关键词: GUS; 钙调素; 转基因烟草

中图分类号: Q942

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2003)03-0187-06

Calmodulin Distribution in the Transgenic Tobacco Using GUS Reporter Gene

TAO Wen-Jing, LIANG Shu-Ping, LÜ Ying-Tang*

(Key laboratory of the Ministry of Education for Plant Developmental Biology, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: In order to study the localization of calmodulin in the plant cell and its biological function, gene constructs containing the fusion gene (*cam • gus*) under the control of the 35S CaMV promoter or the pollen specific promoter LAT52-7 from tomato, were introduced into *Nicotiana glauca* cv. SR1 by leaf disc transformation respectively. GUS reaction show that in the transgenic line pMD/CaM • GUS, the fusion protein CaM • GUS was widely observed in roots, stems and leaves. And it had a higher levels throughout the cytosol of root meristem region, quiescence center cell, root hair cells, epidermal cells, and vascular cells. CaM was also detected in polar distribution style under the membrane of the joint site between 2 guard cells. In pBI/LAT • CaM • GUS transgenic line, CaM only localized in the cytoplasm of pollen grains, and a higher expression of CaM was detected at gemination zones. Our results show that CaM exhibits asymmetric distribution in the plant cells, which has a very tight relationship with cell biological function.

Key words: GUS; CaM; Transgenic tobacco

钙调素(Calmodulin, CaM)是细胞内Ca²⁺信号系统中的主要受体^[1]。CaM自身没有催化活性, 但当它与Ca²⁺结合后能改变一系列下游靶蛋白的活性, 参与植物生长发育、胁迫反应等众多生理生化过

程^[2]。动物中, CaM在细胞学上的定位和功能进行了较多的研究。Li等^[3]研究表明, CaM定位在HeLa细胞的细胞质中和细胞核上, 但有丝分裂时集中在有丝分裂器上, 在中心粒周围和细胞浆移动所形成

收稿日期: 2002-09-30, 修回日期: 2003-03-03。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(30070078)。

作者简介: 陶文菁(1975-), 女, 生物学博士研究生, 从事发育生物学研究。

* 通讯作者(Author for correspondence. E-mail: yingltu@whu.edu.cn)。

的细胞质沟中分布较多。纤维原细胞的血清学实验表明,胞内大多数钙调素是游离存在的,但加入血清后则不能移动^[4]。未经刺激的平滑肌细胞实验显示在低浓度 Ca^{2+} 下, CaM 以非依赖于 Ca^{2+} 形式与蛋白结合,但随着 Ca^{2+} 浓度升高, CaM 表现出复杂的细胞学定位,包括明显的由细胞质到细胞核的再分配^[5]。

对 CaM 细胞内的分布和功能研究,一般采用免疫组织化学方法和 RNA 原位杂交技术,或将细胞裂解后研究 CaM 分布及活性的变化。在这些研究方法中, CaM 可能在细胞固定过程中会从细胞内释放出来或重新分布,因此 CaM 分布会由于这些非正常的细胞生理环境而产生人为的假象。相比于以上方法, GUS (β -葡萄糖苷酶 (β -glucuronidase)) 染色利用酶和底物反应,对蛋白质进行组织细胞内的原位定位,减小了原有方法在处理材料过程中存在的不利因素,尽可能的消除假阳性。另外, GUS 染色由于具有检测方便、灵敏、快速等优点,现已广泛用于植物分子生物学和基因工程研究,并发挥着越来越重要的作用。

我们构建了分别带有 CaM 35S 启动子(花椰菜花叶病毒的启动子)和花粉特异启动子 LAT 52-7 的 CaM · GUS 融合基因载体,并通过农杆菌叶盘转化法将融合基因转入烟草 (*Nicotiana glauca* cv. SR I) 中,经过逐步抗性筛选,得到稳定转基因体系。通过 GUS 染色反应,观察 CaM 在根、茎、叶和花粉中的分布特点。

1 材料和方法

1.1 载体的构建

所有用于转化的载体都在 pBI101.1, pMD-1 和 pBS/LAT 52-7 的基础上构建而成。CaM 由吕应堂教授从水稻基因组文库中调出。pBI101.1 上带有 *gus* 基因但无启动子, pMD-1 带有 35S 启动子和多克隆位点, pBS/LAT 52-7 上克隆有来源于番茄的花粉特异启动子 LAT 52-7。经 *Nco* I 和 *Eco* R I 消化后的 pBI101.1 小片段,插入到同样双酶切后的 pBS (plasmid bluescript) 载体上得到中间载体 pBS/GUS。将 CaM 基因片段插入到 *Nco* I 单酶切的 pBS/GUS, 得到中间载体 pBS/CaM · GUS。Sal I 和 *Eco* R I 双酶切 pBS/CaM · GUS, 并将片段 CaM · GUS 插入到经 Sal I 和 *Eco* R I 双酶切后的 pMD-1 中, 构建到转化载体 pMD/CaM · GUS。 *Nco* I 和 *Eco* R I 消化后的 pBS/GUS 小片段插入到经同样双酶切后的质粒 pBS/LAT 52-7 中得到 pBS/LAT · GUS。将带有 *Nco* I 粘性末端的 CaM 基因片段插入到经 *Nco* I 单酶切后的 pBS/LAT · GUS 中, 得到中间载体 pBS/LAT · CaM · GUS。Sal I 和 *Eco* R I 双酶切 pBS/LAT · CaM · GUS, 并将产物连入到同样双酶切后的 pMD-1 上, 构建出载体 pBI/LAT · CaM · GUS。用于作为融合基因 CaM · GUS 对照的转化载体 pBI21, 仅带有 35S 启动子和其下游控制的 *gus* 基因。冻融法将 3 种质粒转入农杆菌 LBA 4404 (Agrobacterium tumefaciens strain

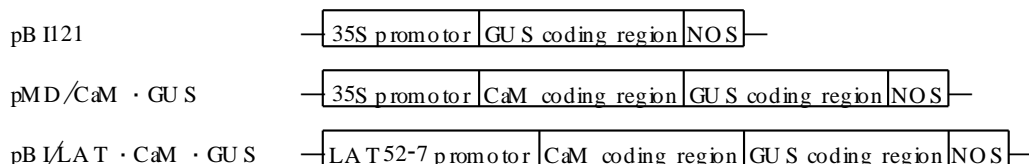


图 1 用于转化的载体结构

Fig. 1 Constructs used in transformation

LBA 4404)。用于转化的 3 种载体结构如图 1 所示。

1.2 植物转化和组织培养

烟草 (*Nicotiana glauca* cv. SR I) 种子于 70% 乙醇灭菌 0.5 min 后, 换至 4% NaClO 中处理 20 min, 无菌水清洗后将种子铺于培养基上 (1/2 MS 培养基, 0.3% 蔗糖, 0.6% ~ 0.7% 琼脂粉, pH 5.7 ~ 5.8), (25 ± 1) 生长, 光周期为 14 h 光照, 10 h 黑暗, 4 ~ 5 周后得到用于转化的烟草无菌苗。依照梁述平等^[6]的叶盘转化法, 于生芽培养基 (MS 培养基, 0.1 mg/L BAP, 1.0 mg/L NAA, 500 mg/L

Carbenicillin, 300 mg/L Kanamycin, 3% 蔗糖, 0.6% ~ 0.7% 琼脂粉, pH 5.7 ~ 5.8), 生根培养基 (MS 培养基, 含 200 mg/L Carbenicillin, 100 mg/L Kanamycin, 1.0% 蔗糖, 0.6% ~ 0.7% 琼脂粉, pH 5.7 ~ 5.8) 上筛选得到第一代转基因烟草 (T_0 代植株)。将所有小苗移栽至蛭石中进行 1 ~ 2 周的过渡生长后, 移栽至土壤中在自然条件下生长。分单株收获 T_0 代转基因烟草的种子, 并在含有 300 $\mu\text{mol/L}$ Kan 的 MS 培养基中进行筛选, 得到有 Kan 抗性的 T_1 代转基因植株。通过 GUS 染色反应挑选出融合

蛋白表达量高的植株移至土壤,植株开花成熟后收获种子,继续在Kan平板上筛选得到纯合的 T_2 代转基因烟草。组织培养、过渡生长和种子筛选条件均同于无菌苗生长条件。BAP、NAA、Carbenicillin及Kanamycin都从Gibco公司购得。

1.3 GUS组织化学检测

GUS组织化学分析按照Jefferson(1987)^[7]所述方法进行,所进行的实验都以 T_2 代纯合转基因烟草为实验材料。撕取烟草叶片下表皮,浸入GUS染色反应缓冲液中(5.0 mmol/L PBS (pH 7.0), 5.0 mmol/L K-fericyanide, 5.0 mmol/L K-ferrocyanide, 微量 Triton X-100, 0.1% X-glucuronide), 37℃ 孵育 24 h,挑取下表皮平铺在滴有无X-glucuronide的缓冲液的载玻片上,压片观察。采用徒手切片得到0.5 mm厚的茎横切片,进行同样的GUS反应并镜检观察。对于花粉GUS观察,则取开花当天的花药于含有15%蔗糖的BK培养基中挤出花粉,800~1000 r/min离心收集花粉。在BK培养基中清洗花粉2次,将花粉悬浮于GUS染色反应缓冲液中,37℃ 孵育 24 h,吸取花粉悬浮液,压片观察。以上所有细胞学观察都在Olympus IX70倒置荧光显微镜上进行,小苗的检测在Olympus SZX12体式荧光显微镜下进行。

2 结果

pMD/CaM·GUS转基因烟草和pB1121转基因烟草在根、茎、叶组织中能检测到GUS靛蓝色反应,而pBI/LAT·CaM·GUS转基因烟草的根、茎、叶都未检测到GUS靛蓝色反应。开花后pBI/LAT·CaM·GUS转基因烟草的花粉被检测到有GUS靛蓝色反应,而其他组织并未检测到GUS靛蓝色反应;所有pMD/CaM·GUS转基因烟草和pB1121转基因烟草的花粉都没有GUS靛蓝色反应,结果说明了LAT52-7启动子花粉表达的特异性。

茎表皮GUS染色结果显示,pMD/CaM·GUS转化植株茎表皮细胞的GUS靛蓝色反应多发生在茎表皮细胞边缘(图版I:A),pB1121转化植株茎表皮细胞被染成靛蓝色(图版I:B)。pMD/CaM·GUS转化植株茎表皮毛细胞的着色明显强于pB1121转化植株,并且在前者的表皮毛细胞内GUS染色呈现出极性分布,即相邻2个表皮毛细胞连接处的细胞膜内侧染色最深,而pB1121转化植株的表皮毛细胞染色浅,且比较均匀。转基因烟草

pB1121维管组织和疏导组织未被染成靛蓝色(图版I:H),而pMD/CaM·GUS转化植株维管组织和疏导组织都有较深的GUS靛蓝色反应(图版I:H)。

叶片下表皮GUS染色结果显示,pMD/CaM·GUS和pB1121转化植株的叶片表皮细胞和气孔保卫细胞都被染成靛蓝色(图版I:C,D)。pMD/CaM·GUS转化植株保卫细胞着色比表皮细胞深,而pB1121转化植株保卫细胞着色与表皮细胞深浅一致或更浅。pMD/CaM·GUS转化植株保卫细胞内靛蓝色出现不均匀分布,组成一个气孔的两个保卫细胞连接处染色较深,细胞内其它区域染色较浅(图版I:C),而pB1121转化植株的保卫细胞内靛蓝色分布比较均匀。

根的GUS染色结果显示pB1121转化植株的根尖、维管束都被染成明显的靛蓝色(图版I:H右边植株);pMD/CaM·GUS转化植株的根冠最外层细胞、静止中心细胞、分生区域细胞、根毛细胞都被染成靛蓝色(图版I:G),而根冠内层细胞未被染成靛蓝色。其中静止中心细胞、分生区域细胞及根毛细胞着色最深,并且根毛细胞内呈现出不连续的靛蓝色分布,根冠最外层细胞内分布着靛蓝色颗粒状物质。维管组织仅在纵向相邻的两个细胞连接边缘呈现靛蓝色。

普通光学显微镜下可见3种转基因烟草的花粉粒呈圆球形,3条萌发沟贯穿于花粉粒两极。花粉的GUS染色检测结果表明,pBI/LAT·CaM·GUS转化植株的整个花粉粒都有被染成靛蓝色(图版I:E),高倍镜下可观察到花粉粒中的细微颗粒,花粉粒中央区域着色较浅,周围部位着色较深,萌发沟处靛蓝色更深一些。花粉粒染色较浅的中央区域,而pB1121(图版I:F)和pMD/CaM·GUS(图片未展示)2个转化株系的花粉粒GUS染色检测无靛蓝色反应。

3 分析和讨论

CaM是细胞内结合 Ca^{2+} 的保守蛋白,参与调节生物的生长发育和新陈代谢,在钙信号系统中发挥着极为重要的作用^[2]。CaM的亚细胞定位直接与其调控功能相关。CaM一般分布于细胞质中,有些与细胞膜相连^[8,9],有的则定位于细胞核^[10]。将CaM基因置于35S启动子或花粉特异启动子LAT52-7控制下转入烟草中,对于研究CaM在细胞内的定位、分布变化及其在信号转导途径中的调控功能具有非常重要的意义。

植物 CaM 在细胞内的不均匀分布与 CaM 的生物学功能是密切相关^[2, 11, 12]。GU S 蛋白在对照转基因烟草 pB II21 保卫细胞内均匀分布,而在转基因烟草 pMD/CaM · GU S 中融合蛋白 CaM · GU S 却集中在细胞两端,并且 CaM · GU S 在转基因烟草 pBI/LAT · CaM · GU S 花粉粒图片中也分布于细胞质中。pB II21 和 pMD/CaM · GU S 两个转基因株系中,细胞内颜色分布差异说明本实验选用的 CaM 可能是非亲核性或非核定位性的,它主要在细胞质中发挥着调控功能。

表皮毛细胞分泌粘液和水分,保护茎叶;同时能敏锐感受外界环境变化并迅速作出反应。pMD/CaM · GU S 转化植株表皮毛细胞内, CaM 主要分布在相邻两个表皮毛细胞连接处的细胞膜内侧。CaM 的这种极性分布说明, CaM 可能参与了表皮毛细胞与环境之间、细胞与细胞之间的信号转导过程。保卫细胞的运动调节着气孔的开闭,以防止不必要的水分蒸发,同时使植物保持较高的光合效率。已有研究表明, ABA 诱导气孔保卫细胞胞质 Ca^{2+} 浓度的升高导致了气孔关闭^[13]。pMD/CaM · GU S 转化植株保卫细胞内 CaM 主要分布在两个保卫细胞连接处,这说明 CaM 可能参与了保卫细胞间的信号传递过程。当外界环境发生变化时,通过 Ca^{2+} /CaM 信号转导途径使保卫细胞协调性做出反应,调节气孔开闭。植物的茎主要负责物质纵向运输, CaM 主要分布在维管组织,说明 CaM 可能与纵向上的物质运输或信号转导相关。

根是植物吸收水分和营养的主要器官。CaM 在根冠细胞和根毛细胞中大量分布,说明 CaM 可能参与了细胞与外界、细胞与细胞之间的信号传递过程,满足根冠细胞和根毛细胞敏锐感受外界环境变化的需要,使植物迅速有效地对外界刺激作出反应。根冠最外层细胞直接与土壤或培养基接触具有较强的分泌功能,能分泌一种高度水合的多糖保护根尖并使根尖易于在土壤中推进,这层细胞着色较深,表明 CaM 可能与分泌途径相关。CaM 在分裂中心细胞内分布较多,可能因为分裂中心的细胞保持着旺盛的分裂能力,细胞内需要大量信号分子来完成生理生化反应。已有研究表明 CaM 参与了细胞周期活动^[3],并且与 CaM 相关的激酶在根冠和生长点也存在着类似分布^[14, 15]。

花粉的 GU S 染色表明整个花粉粒都染成靛蓝色,而花粉粒萌发沟处靛蓝色更深,可能因为 Ca^{2+} 和 CaM 在花粉粒水合及花粉管生长过程中会逐渐

向萌发孔集中,从而呈现出极性分布,这种特殊分布说明 CaM 可能参与了花粉管萌发, CaM 介导的 Ca^{2+} 信号转导途径与植物有性生殖以及物质运输过程密切相关^[16, 17]。陈绍荣等^[18, 19] RNA 原位杂交和免疫组织化学的实验结果,证明了 CaM mRNA 和 CaM 在花药发育过程中主要分布于花粉萌发孔中,并且有明显的时空变化。

我们的研究表明, CaM 主要分布在生长活跃、代谢旺盛的组织细胞中,细胞内 CaM 的极性分布与细胞的生理生化功能密切相关。CaM 在植物的生长发育和对外界环境变化作出的应激反应中,起着非常重要的作用。

参考文献:

- [1] David Chin, Anthony R Means. Calmodulin: a prototypical calcium sensor[J]. *Trends in Cell Biol*, 2000, 10: 322—328.
- [2] Wayne A S, Hillel F. Calmodulin as a versatile calcium signal transducer in plants[J]. *New Phytologist*, 2001, 151: 35—66.
- [3] Li C J, Hein R, Lu P, et al. Dynamic redistribution of calmodulin in HeLa cells during cell division as revealed by a GFP-calmodulin fusion protein technique[J]. *J Cell Sci*, 1999, 112: 1567—1577.
- [4] Gough A H, Taylor D L. Fluorescence anisotropy imaging microscopy maps calmodulin binding during cellular contraction and locomotion[J]. *J Cell Biol*, 1993, 121: 1095—1107.
- [5] Luby-Phelps K, Hori M, Phelps J M, et al. Ca^{2+} -regulated dynamic compartmentalization of calmodulin in living smooth muscle cells[J]. *J Biol Chem*, 1995, 270: 21532—21538.
- [6] 梁述平, 汪杏芬, 吕应堂. 钙调素依赖型蛋白激酶在植物开花调控中的作用[J]. *中国科学*, 2001, 3(4): 306—312.
- [7] Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W. Gus fusion: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plant[J]. *EMBO J*, 1987, 6: 3901—3907.
- [8] Collinge M, Trewavas, A J. The location of calmodulin in the pea plasma membrane[J]. *J Biol Chem*, 1989, 264: 8865—8872.
- [9] Fraichard A, Perotti E, Gavin O, et al. Subcellular localization, distribution and expression of calmodulin in *Zea mays* roots[J]. *Plant Sci*, 1996, 118: 157—165.
- [10] Zielinski R N. Calmodulin and calmodulin-binding

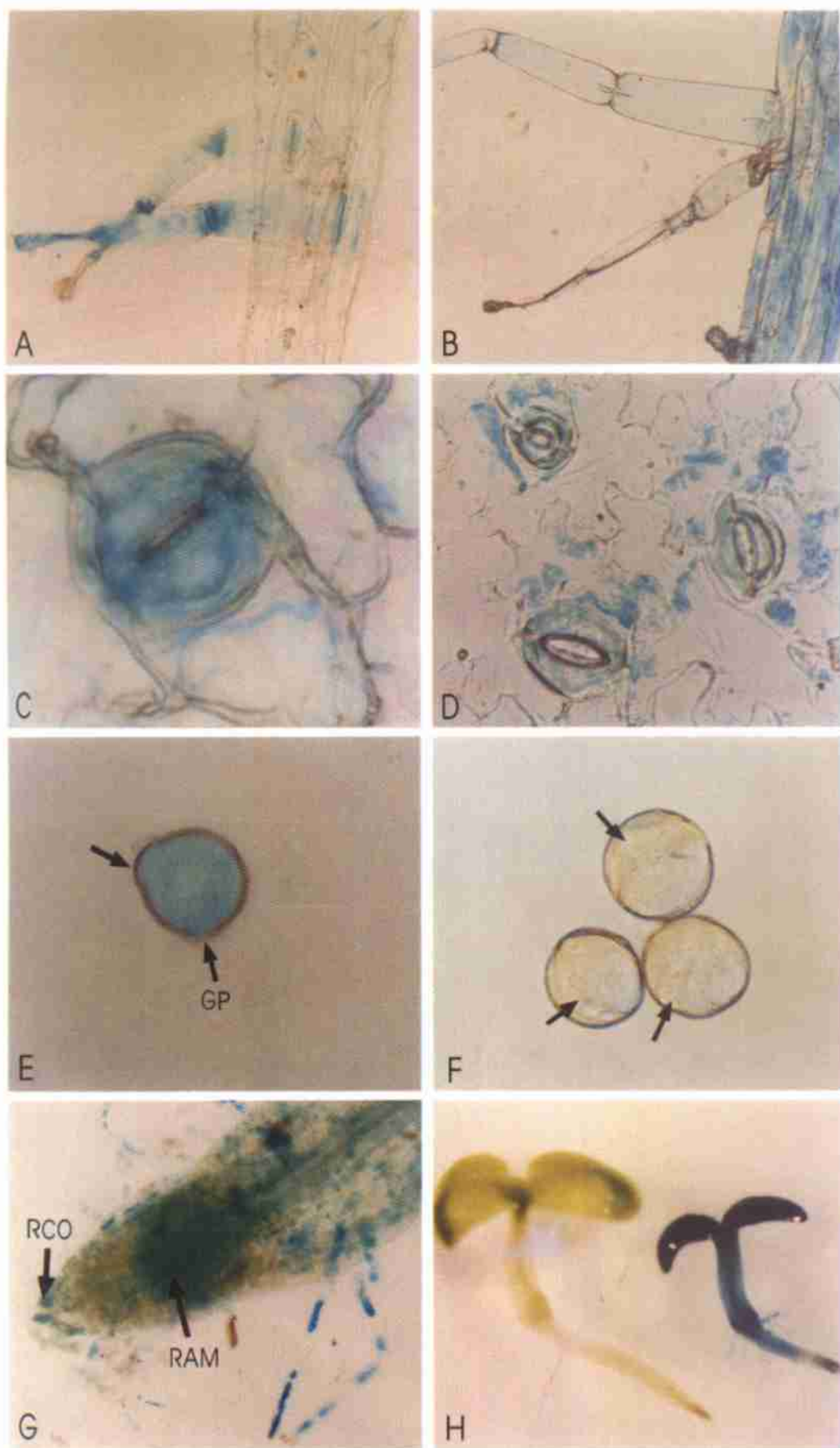
- proteins in plants[J]. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1998, **49**: 697—725
- [11] 周华林, 马力耕, 刘曼, 等. 转 SCaM-GFP 融合基因烟草中钙调素分泌特性的研究[J]. *植物学报*, 2001, **43** (12): 1300—1302
- [12] Dong A W, Xin H, Yu Y, *et al*. The subcellular localization of an unusual rice calmodulin isoform Os-CaM 61 depends on its prenylation status[J]. *Plant Mol Biol*, 2002, **48**: 203—210
- [13] McAinsh M R, Brownlee C, Hetherington A M. A basic acid-induced elevation of guard cell cytosolic Ca^{2+} precedes stomatal closure[J]. *Nature*, 1990, **343**(11): 186—188
- [14] Wang L, Liang S P, Lu Y T. Characterization physical location and expression of the genes encoding calcium/calmodulin-dependent protein kinase in maize (*Zea mays* L.) [J]. *Planta*, 2001, **213**: 556—564
- [15] Yang W N, Liang S P, Lu Y T. Immunohistochemical localization of Ca/calmodulin-dependent kinase in tobacco[J]. *Chinese Sci Bull*, 2001, **46**(3): 230—233
- [16] Tirlapur U K, Cresti M. Computer-assisted video image analysis of spatial variation membrane associated Ca^{2+} and calmodulin during pollen hydration, germination and tip growth in *Nicotiana tabacum* L [J]. *Ann Bot*, 1992, **69**: 503—508
- [17] Uday K, Tirlapur, Monica, *et al*. Confocal image analysis of spatial variations in immunocytochemically identified calmodulin during pollen hydration, germination and pollen tube tip growth in *Nicotiana tabacum* L. [J]. *Zygote*, 1994, **2**(Feb.): 63—68
- [18] 陈绍荣, 吕应堂, 杨弘远. 钙调素 mRNA 在烟草发育过程中的原位定位[J]. *科学通报*, 1998, **20**: 2202—2206
- [19] Chen S R, Han H M, Lu Y T, *et al*. *In situ* localization of Calmodulin mRNA and protein in the developing anthers and pistils in rice [J]. *植物学报*, 1998, **12**: 1087—1092

图版说明

图版 I: CaM 在转基因烟草的细胞学定位。A, C. pMD/CaM • GUS 转基因烟草的表皮毛细胞、保卫细胞; E. pBI/LAT • CaM • GUS 转基因烟草花粉粒, 箭头所示为萌发孔(GP); B, D, F. pBI21 转基因烟草的表皮毛细胞、保卫细胞、花粉粒, 箭头所示为萌发孔(GP); G. pMD/CaM • GUS 转基因烟草根尖。箭头所示分别为根冠最外层(RCO, root cap)和根顶端分生区域(RAM); H. pMD/CaM • GUS 转基因烟草和 pBI21 转基因烟草幼苗时期 GUS 染色图片, 左边为 pBI21 转基因烟草, 右边为 pMD/CaM • GUS 转基因烟草。A, B 放大倍数 105 ×; C 放大倍数为 420 ×; D, E, F, G 放大倍数为 210 ×; H 在 Olympus SZX12 体式荧光显微镜下拍摄, 放大倍数为 5.2 ×

Explanation of plate

Plate I: Cellular distribution of CaM in transgenic tobacco. A, C. Epidermal cell and guard cell of pMD/CaM • GUS transgenic tobacco; E. Pollen grain from pBI/LAT • CaM • GUS transgenic tobacco. Germination pore is arrowed out; G. Root tip of pMD/CaM • GUS transgenic tobacco. Arrow heads to root cap and root apical meristem; B, D, F. Epidermal cell, guard cell and pollen grain of pBI21 transgenic tobacco. Germination pore is arrowed out; H. Seedling of pMD/CaM • GUS transgenic tobacco and pBI21 transgenic tobacco. Left one is pBI21 transgenic tobacco, right one is pMD/CaM • GUS transgenic tobacco. Magnification: A, B 105 ×; C 420 ×; D, E, F, G 210 ×; H was taken under the fluorescence Olympus SZX12 stereomicroscope system, 5.2 ×



陶文菁等: 图版 I

TAO Wen-Jing *et al*: Plate I