

两个拟南芥未知功能蛋白的亚细胞定位研究

崔永兰^{1*}, 王鹏程^{1,2}

(1. 上海师范大学生命与环境科学学院, 上海 200234; 2. 烟台大学体育学院, 山东烟台 264005)

摘要: 蛋白质的亚细胞定位对于深入了解该蛋白质所行使的生理功能具有重要意义。经生物信息学预测, 两个拟南芥未知功能基因 *At4g16410* 与 *Atlg18060* 编码蛋白含有叶绿体定位信息。我们分别克隆了这两个基因 5' 端长 199 bp 与 220 bp 的 DNA 片段, 与绿色荧光蛋白 (GFP) 基因构建重组表达载体 pMON530-cTP1-GFP 与 pMON530-cTP2-GFP, 经农杆菌介导转化拟南芥。两种转基因植株经激光共聚焦显微镜观察, GFP 荧光仅在叶绿体中观察到, 表明所克隆的两段 DNA 序列编码的多肽能够将 *At4g16410* 与 *Atlg18060* 编码蛋白质引导进入叶绿体, 确定这两个蛋白质均为叶绿体蛋白质。

关键词: 拟南芥; 叶绿体; 转运肽; 融合蛋白

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2009)02-0216-05

Study on Subcellular Localization of Two Expressed Proteins in *Arabidopsis thaliana*

CUI Yong-Lan^{1*}, WANG Peng-Cheng^{1,2}

(1. College of Life and Environment Science, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China;

2. College of Physical Education, Yantai University, Yantai, Shandong 264005, China)

Abstract: The information of protein subcellular localization is important to our understanding of a protein function. The proteins encoded by both *At4g16410* and *Atlg18060* were predicted to be the *Arabidopsis* chloroplast proteins. The 199 bp and 220 bp fragments of this two genes at the 5' end were cloned and fused with GFP to construct the binary vectors pMON530-cTP1-GFP and pMON530-cTP2-GFP for genetic transformation, respectively. Observed by a confocal laser-scanning microscopy, green fluorescent signals were localized in chloroplasts in transgenic *Arabidopsis* plants suggesting the 199 bp and 220 bp fragments encoding peptides targeted to chloroplast. The results suggest that *At4g16410* and *Atlg18060* encode two chloroplast proteins.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; Chloroplast; Transit peptide; Fusion protein

叶绿体是植物进行光合作用的细胞器。除光合作用外, 叶绿体还参与多种与植物生命活动相关的代谢过程, 如淀粉的储藏与转运, 氨基酸、核苷酸、脂类(糖脂、磷脂、硫脂)、四吡咯化合物(叶绿素类、细胞色素类)、萜类(胡萝卜素类、叶醇、醌类的侧链)和酚类的合成与降解^[1]。完成这些功能以及维持其结构需要大量不同种类的蛋白质。叶绿体发育或光合作用必需蛋白的突变或缺失将影响植物的光合作用甚至导致整个植物体生命的完结。在拟南芥中, 叶绿体蛋白质绝大部分由核基因编码, 叶绿体基因组仅编码 87 个蛋白质^[2], 而生物信息学分析表明, 核基因编码 4255 个叶绿

体蛋白质^[3], 这些蛋白质首先在细胞质中合成分子量较大的前体蛋白(precursor protein), 转运至叶绿体后加工成成熟蛋白, 从而行使其生物学功能。大多数核编码的叶绿体蛋白 N 末端具有转运肽(transitpeptide), 引导前体蛋白穿膜运输进入叶绿体。

近年来, 亚细胞蛋白质组学的兴起为阐明叶绿体的组成、蛋白质的功能提供了强有力的研究手段。到目前为止, 通过蛋白质组学分离的拟南芥叶绿体被膜、基质、类囊体膜以及类囊体腔等各个组份的蛋白质约有 1200 种^[3-9], 而真正通过实验验证的只有约 600 种。

收稿日期: 2008-03-28, 修回日期: 2008-05-07。

基金项目: 上海市教委资助项目(06DZ016)。

作者简介: 崔永兰(1974-), 女, 博士, 讲师, 从事植物功能基因组学方面的研究。

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

蛋白质的亚细胞定位信息对于深入了解该蛋白质的功能具有重要意义。利用基因的转运肽或 cDNA 与绿色荧光蛋白(GFP)融合研究蛋白质的亚细胞定位已有报道,如基因 FZL^[10]、APG2^[11]、AT5G48790^[12]等基因编码蛋白被成功定位于叶绿体。近年来,与叶绿体发育或光合作用相关的一些主要蛋白质相继被发现并报道,但数量仍然非常有限。为了寻找其他与叶绿体发育及光合作用相关的基因,我们通过反向遗传学途径,研究生物信息学预测的核基因组编码的未知功能基因 *Atlg18060* 与 *Atlg16410*。本研究对这两个蛋白的亚细胞定位进行实验验证,为进一步深入了解这两个蛋白的生物学功能奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) Col-0 生态型,由本实验室种植。培养室条件为:22℃,16 h 光照/8 h 黑暗,光通量密度 110 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,湿度约为 30%。

1.1.2 菌株、质粒与 cDNA 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 菌株由本实验室提供,农杆菌 ASE 菌株、含 GFP 基因的质粒 pEGFP 与植物双元表达载体 pMON530 为中国科学院上海植物生理生态研究所黄海研究员惠赠,基因 *Atlg16410* 与 *Atlg18060* 的全长 cDNA 克隆购自日本生物资源中心 RIKEN BRC (<http://www.brc.riken.jp/lab/epd/Eng/>)。

1.1.3 试剂 各种生化试剂和酶分别购自上海生工公司、大连宝生物公司和 Sigma 公司。

1.1.4 引物合成 包含基因 *Atlg16410* N 端转运肽片段的 5' 端引物序列为: GC GGT ACC ATGACGATGA TGTCTCTCCC(下划线表示引入 *Kpn* I 酶切位点), 3' 端引物序列为: GTCCATGGCTCTTTCAACGTTGCTGTT(下划线表示引入 *Nco* I 酶切位点); 包含基因 *Atlg18060* N 端转运肽片段的 5' 端引物序列为: GC GGT ACC ATG ATG GTC TCA CTA GCT(下划线表示引入 *Kpn* I 酶切位点), 3' 端引物序列为: GTCCATGGCTAAATCTC ATCTGCTGCA(下划线表示引入 *Nco* I 酶切位点)。GFP 内部引物序列 5' 端为: GTA AAC GGC CAC AAG TTC AGC G; 3' 端为: GAT GCC GTT CTT CTG CTT GTC G。

1.2 方法

1.2.1 质粒提取、DNA 片段克隆与重组质粒鉴定 参照分子克隆实验指南^[13]进行。

1.2.2 DNA 片段回收 采用 BioDev 公司的胶回收试剂盒,按其说明书进行操作。

1.2.3 农杆菌介导拟南芥的转化 采用浸花法^[14]进行转化。

1.2.4 转基因 T₀ 代种子筛选 种子用 70% 乙醇 + 0.01% Triton X-100 混合液浸泡 10 min, 无菌水冲洗 4 次,用 Top agar(0.1% 琼脂水溶液)均匀涂布在含卡那霉素(50 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$)的 PNS 固体培养基上,4℃ 春化 2~3 d 后,移入培养室培养。

1.2.5 转基因植株的 PCR 检测 以筛选出来的具卡那霉素抗性的 T₁ 代植株的总 DNA 为模板,采用 GFP 引物进行 PCR 扩增。

1.2.6 转基因植株的激光扫描共聚焦显微镜观察 用激光扫描共聚焦显微镜(LSM 5 Pascal, Zeiss)观察叶肉细胞中 GFP 的表达,采用 40 倍油镜进行观察,激发光波长为 488 nm,带通 BP 为 505~530 nm,长通 LP 为 560 nm。

2 结果与分析

2.1 亚细胞定位双元表达载体的构建

利用 *Kpn* I 和 *Eco* R I 限制性内切酶对 pEGFP 进行酶切,获得包含 GFP 基因的 750 bp 片段,将其插入到经相同限制性内切酶酶切的质粒 pMON530 中,构建成用于叶绿体定位的双元载体 pMON530-GFP(图 1:A,B)。

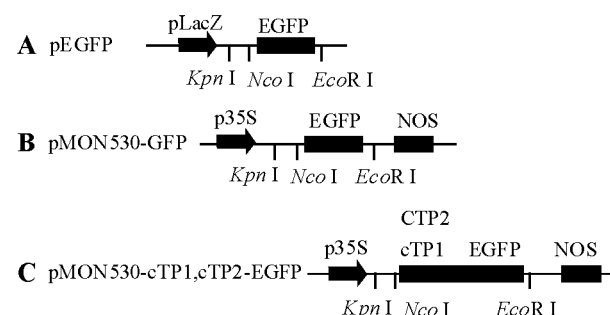


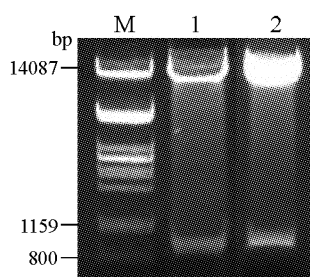
图 1 亚细胞定位表达载体 pMON530-cTP1、cTP2-GFP 的构建

Fig. 1 Construction of the expression vectors pMON530-cTP1 and cTP2-GFP

2.2 *Atlg18060* 及 *Atlg16410* 基因编码蛋白亚细胞定位表达载体的构建

我们通过 TargetP (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>) 预测,发现未知功能基因 *Atlg16410* 编码蛋白质的 N-端 46aa 具有转运肽结构;未知功能基因 *Atlg18060* 编码蛋白质的 N-端 29aa 具有转运肽结构。以 *Atlg16410* 及 *Atlg18060* 基因全长 cDNA^[15,16] 为模板,PCR 扩增一段包含转

运肽的 DNA 序列,长度分别为 199 bp 与 220 bp,分别命名为 cTP1 与 cTP2。cTP1、cTP2 与 pMD18-T Vector 连接,构建 T-A 克隆。cTP1、cTP2 质粒经过 *Kpn* I 和 *Noc* I 双酶切与用相同酶切过的载体 pMON530-GFP 连接,构建成表达载体 pMON530-cTP1、cTP2-GFP (图 1: C),该表达载体经 *Kpn* I 与 *EcoR* I 双酶切验证,结果表明插入 DNA 片段大小正确(图 2)。



M. DNA 标准分子量; 1. pMON530-cTP1-GFP 双酶切/*Kpn* I + *EcoR* I; 2. pMON530-cTP2-GFP 双酶切/*Kpn* I + *EcoR* I
M. λ DNA/Pst I Marker; Lane 1. pMON530-cTP1-GFP/*Kpn* I + *EcoR* I; Lane 2. pMON530-cTP2-GFP/*Kpn* I + *EcoR* I

图 2 二元表达载体 pMON530-cTP1、cTP2-GFP 的酶切验证

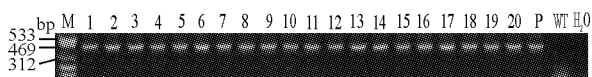
Fig. 2 Examination of the binary vectors pMON530-cTP1 and cTP2-GFP

2.3 转基因植株的获得

将质粒 pMON530-GFP、pMON530-cTP1-GFP 与 pMON530-cTP2-GFP 分别导入农杆菌 ASE,采用农杆菌介导法转化拟南芥 Col-0 生态型。 T_0 代种子萌发经卡那霉素抗性筛选后,分别得到 T_1 代植株 28 棵、26 棵与 30 棵,经移栽后,转基因植株无肉眼可观察到的异常表型。

2.4 转基因植株的 PCR 检测

对筛选出来的 T_1 代植株采用 GFP 内部引物进行分子检测。在转基因 pMON530-cTP1-GFP、pMON530-cTP2-GFP 植株与转基因 pMON530-GFP 植株中,PCR 检测全部为阳性,图 3 为检测出的部分结果。



M. DNA 标准分子量; 1 ~ 10. pMON530-cTP1-GFP 转基因植株; 11 ~ 20. pMON530-cTP2-GFP 转基因植株; P. pEGFP 质粒作为阳性对照; WT. 野生型拟南芥作为阴性对照; H_2O 作为阴性对照

M. DNA Marker; lanes 1 - 10. pMON530-cTP1-GFP transgenic plants; lanes 11 - 20. pMON530-cTP2-GFP transgenic plants; p. Plasmid of pEGFP as positive control; WT. Wild type plant as negative control; H_2O as negative control

图 3 pMON530-cTP1、cTP2-GFP 转基因植株 PCR 检测

Fig. 3 PCR analysis of the pMON530-cTP1 and cTP2-GFP transgenic plants

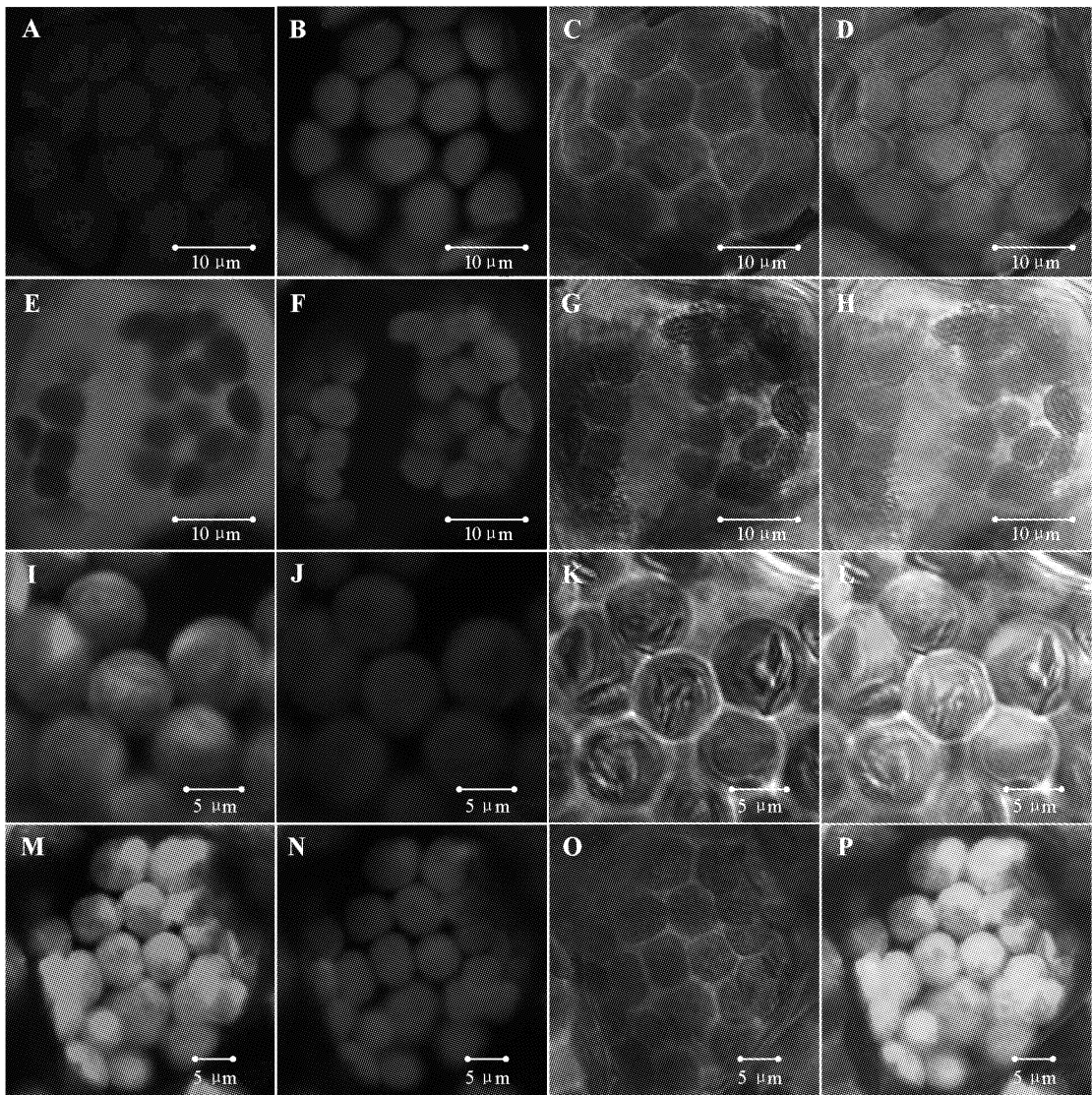
2.5 报告基因 GFP 表达

对 PCR 检测阳性的植株用激光共聚焦显微镜观察其叶肉细胞中 GFP 的表达情况,结果显示在 488 nm 的激发光下,野生型 Col-0 在大于 560 nm 处出现叶绿素自发荧光(红色),在 GFP 发射光波段 505 ~ 530 nm 没有荧光信号(图 4: A, B, D),而 pMON530-GFP 转基因植株在该波段, GFP 荧光(绿色)在细胞质中呈弥散状分布(图 4: E, F, H)。在 pMON530-cTP1-GFP 与 pMON530-cTP2-GFP 转基因植株中, GFP 荧光信号与叶绿素自发荧光信号共定位于叶绿体中(图 4: I, J, L 与 M, N, P)。图 4: C, G, K, O 则显示了野生型与转基因拟南芥植株叶肉细胞在微分干涉差显微镜(DIC)下观察到的相应形态。该结果表明基因 *At4g16410* 编码蛋白的 N 端 46aa 与 *At1g18060* 编码蛋白的 N 端 29aa 能够将这两个蛋白质引导进入叶绿体。从而判断这两个蛋白质为核基因编码的叶绿体蛋白质。

3 讨论

蛋白质在细胞器中的定位对于阐明其功能具有重要意义。虽然预测拟南芥中有 4000 多种叶绿体蛋白质,但真正通过实验验证的尚不足二分之一^[17]。本文采用预测的叶绿体转运肽与绿色荧光蛋白融合的方法研究 *At4g16410* 与 *At1g18060* 基因编码蛋白质的亚细胞定位,成功地将这两个蛋白定位于叶绿体中,为进一步阐明其在叶绿体发育及光合作用中所担负的生理功能奠定了基础。

At4g16410 基因编码一条 185aa 组成的多肽链,分子量为 20407 D,等电点为 9.76 (http://www.expasy.ch/tools/pi_tool.html)。通过转膜螺旋预测分析显示 *At4g16410* 编码蛋白质存在 3 个跨膜结构 (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TMHMM/>) (图 5)。根据该蛋白等电点大于 8.8、氨基酸长度与所含有的转膜螺旋数之比小于 100、同时含有预测的叶绿体转运肽等特性推测该蛋白为叶绿体被膜蛋白^[18]。*At1g18060* 基因编码蛋白含 226aa,分子量为 25198.14 D,等电点为 9.68,通过转膜螺旋预测分析显示该蛋白不含跨膜结构,推测可能为叶绿体基质蛋白。为进一步确定这两个蛋白定位于叶绿体的具体部位还需要分离叶绿体的各个亚结构组份蛋白并制备相应的抗体进行免疫印迹实验。



A ~ D. 野生型拟南芥 Col-0 (A 为 GFP 荧光; B 为叶绿素荧光; C 为 DIC 照片; D 为 A、B、C 叠加图); E ~ H. 拟南芥 pMON530-GFP 转基因植株 (E 为 GFP 荧光; F 为叶绿素荧光; G 为 DIC 照片; H 为 E、F、H 叠加图); I ~ L. 拟南芥 pMON530-cTP1-GFP 转基因植株 (I 为 GFP 荧光; J 为叶绿素荧光; K 为 DIC 照片; L 为 I、J、K 叠加图); M ~ P. 拟南芥 pMON530-cTP2-GFP 转基因植株 (M 为 GFP 荧光; N 为叶绿素荧光; O 为 DIC 照片; P 为 M、N、O 叠加图)

A ~ D. Wild type *Arabidopsis* Col-0 (A. GFP; B. Chlorophyll; C. DIC; D. Overlapping); E ~ H. pMON530-GFP transgenic plants (E. GFP; F. Chlorophyll; G. DIC; H. Overlapping); I ~ L. pMON530-cTP1-GFP transgenic plants (I. GFP; J. Chlorophyll; K. DIC; L. Overlapping). M ~ P. pMON530-cTP2-GFP transgenic plants (M. GFP; N. Chlorophyll; O. DIC; P. Overlapping)

图 4 野生型与转基因拟南芥植株叶肉细胞 DIC 及荧光图像

Fig. 4 DIC and fluorescence detected in the *Arabidopsis* mesophyll cells of wild type and transgenic plants

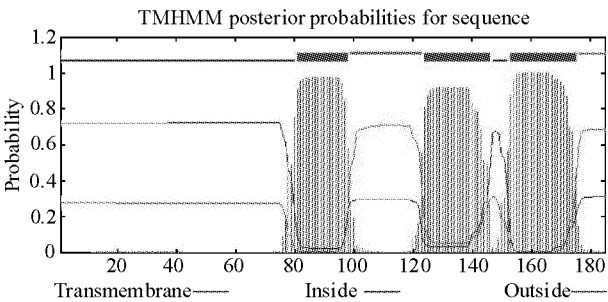


图 5 *At4g16410* 编码蛋白质的转膜螺旋结构预测

Fig. 5 Prediction of transmembrane helices in protein encoded by *At4g16410*

通过研究,确定未知功能基因 *At4g16410* 与 *At1g18060* 编码蛋白质定位于叶绿体中,为阐明其功能奠定了基础。购买这两个基因的 T-DNA 插入突变体或通过反向遗传学构建基因敲除突变体都将进一步揭示这两个基因编码蛋白质在叶绿体发育及光合作用过程中的具体作用。

参考文献:

[1] 吴相玉,吴光耀,赵进东. 叶绿体的分子生物学[M]//余叔文,汤章城. 植物生理与分子生物学. 第 2 版. 北京:科学出版社, 1999:155 - 170.

- [2] Abdallah F, Salamini F, Leister D. A prediction of the size and evolutionary origin of the proteome of chloroplasts of *Arabidopsis* [J]. *Trends Plant Sci*, 2000, 5(4):141–142.
- [3] Friso G, Giacomelli L, Ytterberg A J, Peltier J B, Rudella A, Sun Qi, Wijk K J. In-depth analysis of the thylakoid membrane proteome of *Arabidopsis thaliana* chloroplasts: new proteins, new functions, and a plastid proteome database[J]. *Plant Cell*, 2004, 16(2): 478–499.
- [4] Kieselbach T, Bystedt M, Hynds P, Robinson C, Schroder W P. A peroxidase homologue and novel plastocyanin located by proteomics to the *Arabidopsis* chloroplast thylakoid lumen [J]. *FEBS Lett*, 2000, 480(2–3):271–276.
- [5] Schubert M, Petersson U A, Haas B J, Funk C, Schroder W P, Kieselbach T. Proteome map of the chloroplast lumen of *Arabidopsis thaliana* [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277(10):8354–8365.
- [6] Peltier J B, Emanuelsson O, Kalume D E, Ytterberg J, Friso G, Rudella A, Liberles D A, Soderberg L, Roepstorff P, Heijne G V, et al. Central functions of the lumenal and peripheral thylakoid proteome of *Arabidopsis* determined by experimentation and genome-wide prediction[J]. *Plant Cell*, 2002, 14(1):211–236.
- [7] Ferro M, Salvi D, Brugiere S, Miras S, Kowalski S, Louwagie M, Garin J, Joyard J, Rolland N. Proteomics of the chloroplast envelope membranes from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2003, 2(5):325–345.
- [8] Froehlich J E, Wilkerson C G, Ray W K, McAndrew R S, Osteryoung KW, Gage D A, Phinney B S. Proteomic study of the *Arabidopsis thaliana* chloroplastic envelope membrane utilizing alternatives to traditional two-dimensional electrophoresis [J]. *Proteome Res*, 2003, 2(4):413–425.
- [9] Kleffmann T, Russenberger D, Von Zychlinski A, Christopher W, Sjolander K, Gruissem W, Baginsky S. The *Arabidopsis thaliana* chloroplast proteome reveals pathway abundance and novel protein functions [J]. *Curr Biol*, 2004, 14(5):354–362.
- [10] Gao H B, Sage T L, Osteryoung K W. FZL, an FZO-like protein in plants, is a determinant of thylakoid and chloroplast morphology [J]. *PNAS*, 2006, 103(17):6759–6764.
- [11] Motohashi R, Nagata N, Ito T, Takahashi S, Hobo T, Yoshida S, Shinozaki K. An essential role of a TatC homologue of a Delta pH-dependent protein transporter in thylakoid membrane formation during chloroplast development in *Arabidopsis thaliana* [J]. *PNAS*, 2001, 98:10499–10504.
- [12] 王鹏程, 王晨, 米华玲, 周根余, 杨仲南. 拟南芥中一个未知功能蛋白的叶绿体亚细胞定位研究[J]. *植物学通报*, 2006, 23(3):249–254.
- [13] 吕星, 瞿祥虎译. 质粒及其在分子克隆中的应用[M]//黄培堂主译. *分子克隆实验指南*. 北京: 科学出版社, 2002: 2–138.
- [14] Clough S J, Bent A F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant J*, 1998, 16(6):735–743.
- [15] Seki M, Carninci P, Nishiyama Y, Hayashizaki Y, Shinozaki K. High-efficiency cloning of *Arabidopsis* full-length cDNA by biotinylated CAP trapper[J]. *Plant J*, 1998, 15(5):707–720.
- [16] Seki M, Narusaka M, Kamiya A, Ishida J, Ou M, Sakurai T, Nakajima M, Enju A, Akiyama K, Oono Y. Functional annotation of a Full-length *Arabidopsis* cDNA collection [J]. *Science*, 2002, 296(5565):141–145.
- [17] Heazlewood J L, Verboom R E, Tonti-Filippini J, Small L, Millar A H. SUBA: the *Arabidopsis* subcellular database [J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35:D213–D218.
- [18] Ferro M, Salvi D, Rolland H R, Vermaat T, Seigneurin-Berny D, Grunwald D, Garin J, Joyard J, Rolland N. Integral membrane proteins of the chloroplast envelope: Identification and subcellular localization of new transporters [J]. *PNAS*, 2002, 99(17):11487–11492.