

Construction and Transformation of Recombinant Vector Consisting of GUS Gene and Zeta Class Glutathione S-Transferase 1 Promoter in *Arabidopsis thaliana*

Jiayan Jiang^{1*}, Wen Dong^{1*}, Chongrui Huang², Yi Peng¹, Lihua Huang¹, Chao Hu^{1#}

¹College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha Hunan

²International College, Hunan Agricultural University, Changsha Hunan

Email: #2283342390@qq.com

Received: Feb. 16th, 2019; accepted: Mar. 1st, 2019; published: Mar. 11th, 2019

Abstract

Based on the homology comparison, glutathione transferases (GSTs) in plants are distributed into different classes, which are known to play different roles in plant growth and development. Among GSTs, the function of zeta class GSTs (GSTZ) is not well characterized. Here, the promoter sequence of *AtGSTZ1* gene was isolated from *Arabidopsis*, and a fusion expression vector of *AtGSTZ1* promoter and GUS gene was constructed and introduced into *Arabidopsis* by *A. tumefaciens*-mediated transformation. Histochemical staining of *Arabidopsis* indicated the *AtGSTZ1* promoter drove the GUS expression in *Arabidopsis*. The results lay the foundation for analyzing expression pattern of *AtGSTZ1*.

Keywords

Glutathione S-Transferases, *AtGSTZ1* Gene, Promoter, GUS

拟南芥 *AtGSTZ1* 基因启动子与 GUS 重组载体的构建及转化

蒋嘉彦^{1*}, 董文^{1*}, 黄崇瑞², 彭怡¹, 黄丽华¹, 胡超^{1#}

¹湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南 长沙

²湖南农业大学国际学院, 湖南 长沙

Email: #2283342390@qq.com

*第一作者。

#通讯作者。

文章引用: 蒋嘉彦, 董文, 黄崇瑞, 彭怡, 黄丽华, 胡超. 拟南芥 *AtGSTZ1* 基因启动子与 GUS 重组载体的构建及转化[J]. 植物学研究, 2019, 8(2): 158-164. DOI: 10.12677/br.2019.82021

收稿日期: 2019年2月16日; 录用日期: 2019年3月1日; 发布日期: 2019年3月11日

摘要

在植物中, 根据序列的同源性将谷胱甘肽转移酶(Glutathione S-transferases, GSTs)分为不同的种类。这些不同种类的谷胱甘肽转移酶在植物生长和发育中发挥着不同的功能。相对于其他种类的谷胱甘肽转移酶, Zeta类谷胱甘肽转移酶(GSTZ)的功能尚需进一步鉴定。本研究克隆了拟南芥*AtGSTZ1*基因启动子, 并将该启动子与GUS表达载体重组。重组载体采用农杆菌介导法转化拟南芥。GUS组织化学染色结果表明, *AtGSTZ1*基因启动子驱动了GUS基因在拟南芥中表达。实验结果为进一步研究*AtGSTZ1*的表达特征奠定了基础。

关键词

谷胱甘肽转移酶, *AtGSTZ1*基因, 启动子, GUS

Copyright © 2019 by author(s) and Hans Publishers Inc.

This work is licensed under the Creative Commons Attribution International License (CC BY).

<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>



Open Access

1. 引言

在植物中, 谷胱甘肽转移酶(Glutathione S-transferases, GSTs)可分为8类, 如tau (GSTU)、phi (GSTF)、theta (GSTT)、lambda (GSTL)、zeta (GSTZ)、脱氢抗坏血酸还原酶(DHAR)、微粒体GST和四氯代氢醌脱卤素酶(TCHQD) [1] [2]。各种类型的GSTs在植物生长发育中发挥着重要的功能。一些类型的GSTs能有效消除杀虫剂和除草剂等物质对植物的毒性[3]。有些GSTs的表达响应逆境胁迫, 并且其过量表达会提高植物对逆境胁迫的耐受性; 有些GSTs的表达还受到细胞分裂素、生长素、茉莉酸、水杨酸等的诱导[4] [5] [6]。此外, GSTs还可能参与了植物器官衰老等过程[1]。相对于其他类型的GSTs, 植物中编码GSTZ的基因相对较少。拟南芥中编码GSTZ的基因只有两个, 即*AtGSTZ1*和*AtGSTZ2* [7]。*AtGSTZ2*几乎不表达[7]。目前关于GSTZ的研究不多。有研究者发现, 水稻中GSTZ过表达会增加水稻种子在低温时的发芽率, 并且抗冻性不同的水稻中GSTZ酶活有差异[8] [9]。这些结果说明GSTZ对植物的生长也有重要的影响。

启动子是一段位于基因5'端的能够被RNA聚合酶及反式作用因子识别和结合的DNA序列, 是调控基因表达的重要顺式元件[10]。对启动子表达特征进行分析有助于揭示相应基因的功能和表达模式。目前常用的分析启动子表达特征的方法是将启动子与报告基因如GUS基因融合, 构建成目的启动子驱动的报告基因植物表达载体, 再转化植物细胞, 通过检测转基因植物中报告基因的表达特征, 从而确定目的启动子的表达特征[11] [12]。

本实验克隆了拟南芥*AtGSTZ1*基因启动子, 并构建了该启动子驱动的报告基因表达载体, 将重组载体转入拟南芥中, 获得了稳定遗传的转基因株系。GUS组织化学染色结果表明, *AtGSTZ1*基因启动子驱动了GUS基因在拟南芥中表达。

2. 材料与方法

2.1. 实验材料

拟南芥哥伦比亚、质粒载体pCambia1301、大肠杆菌DH5 α 和根癌农杆菌GV3101由细胞生物学实

实验室保存。DNA 提取、质粒提取和凝胶回收试剂盒均购自天根生化科技有限公司。内切酶 *Pst*I 和 *Nco*I、PCR 所需试剂均购自 Takara 公司。ClonExpress II 重组试剂盒从 Vazyme 公司购买。

2.2. 植物的培养和生长条件

拟南芥种子用消毒液(20% 84 消毒液和 0.1% Triton100)处理 10 min 后, 于超净工作台上用无菌水清洗 4~5 次, 然后播种于 MS 培养基上。4℃ 黑暗处理 3 d 后, 于培养室中培养 7 d, 再移栽至营养土(东北黑土与蛭石 1:1 混合)中生长。实验材料的培养温度为 22℃, 光周期为 16 h 光照/8 h 黑暗, 光照强度为 150 $\mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ 。

2.3. *AtGSTZ1* 基因启动子的克隆

取生长 1 周的拟南芥幼苗, 采用 DNA 提取试剂盒提取拟南芥 DNA。根据 Genebank 中拟南芥 *AtGSTZ1* 基因和载体 pCAMBIA1301 序列设计引物 Forward 1: 5'-TCCTCTAGAGTCGACCTGCAGGAAGCTCATGTGCTCAT-3' (下划线处为酶切位点 *Pst*I) 和 Reverse 1: 5'-TTACCCTCAGATCTACCATGGGATAAACAAGGAATTTGTTG-3' (下划线处为酶切位点 *Nco*I), 以提取的 DNA 为模板, PCR 扩增 *AtGSTZ1* 基因启动子。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测后, 切胶回收并纯化。

2.4. *AtGSTZ1* 基因启动子与 GUS 融合表达载体的构建

将含 pCAMBIA1301 质粒的大肠杆菌接种于含卡那霉素(50 mg/l)的 LB 液体培养基中培养过夜, 采用质粒提取试剂盒提取 pCAMBIA1301。PstI 和 NcoI 双酶切 pCAMBIA1301, 凝胶电泳检测酶切结果后, 切胶回收并纯化酶切产物。酶切后的载体与克隆的 *AtGSTZ1* 基因启动子经 ClonExpress II 试剂盒重组后, 再热激转化至大肠杆菌 DH5 α 中, 菌落 PCR 检测重组载体。重组载体于华大基因公司进行测序。测序正确的重组质粒命名为 GSTZ1-GUS (图 1)。采用电击转化法将重组载体转入农杆菌 GV3101 中, 菌落 PCR 检测阳性克隆。

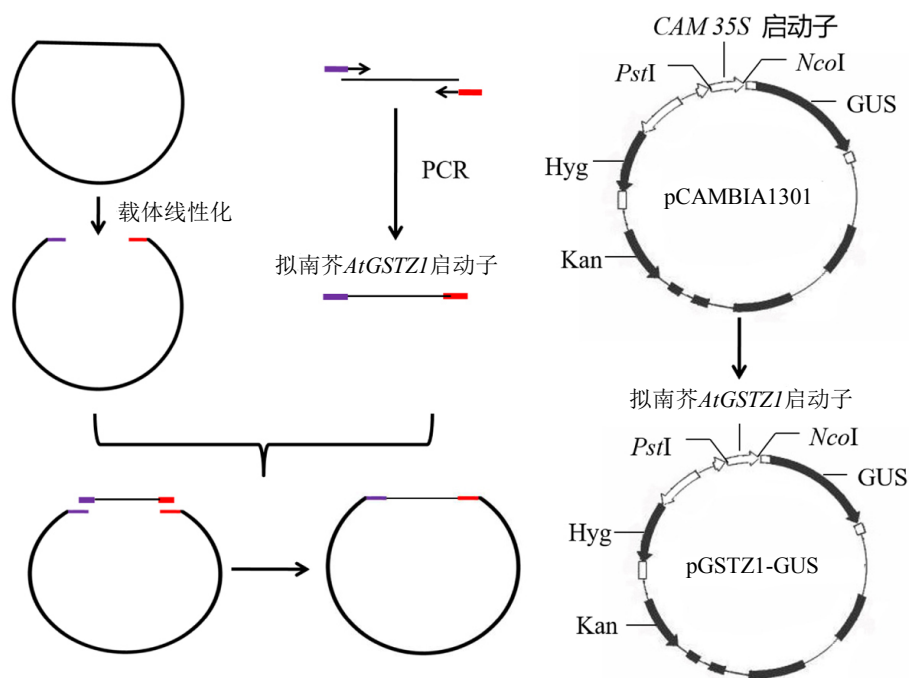


Figure 1. Schematic diagram of pGSTZ1-GUS vector
图 1. pGSTZ1-GUS 表达载体示意图

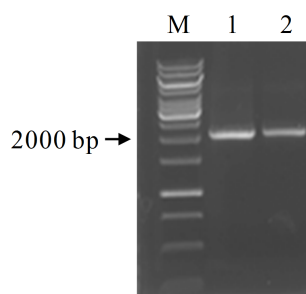
2.5. 拟南芥的遗传转化及鉴定

将含重组载体 pGSTZ1-GUS 的农杆菌接种于含卡那霉素(50 mg/l)、庆大霉素(50 mg/l)和利福平(50 mg/l)的 YEB 液体培养基中, 28℃振荡培养 2 d, 5000 g 离心 2 min, 收集菌体。菌体悬浮于含 0.02% Silwet-L77 和 0.01% 6-BA 的 5%蔗糖溶液中, 用于侵染拟南芥。拟南芥的转化采用浸花法[13]。单株收集转化植株种子, 将其培养在含潮霉素(25 mg/l)的 MS 培养基上, 筛选潮霉素抗性植株。潮霉素抗性植株移栽至营养土中继续生长一段时间后, 取叶片提取 DNA。以叶片 DNA 为模板, Forward 2 (5'-GTCTAGTGTC GTCGTCGTCGT-3') 和 Reverse 2 (5'-TAGAACGGTTTGTGGTTAATCA-3')为引物, PCR 进一步鉴定转基因植株, 同时采用组织化学法检测转基因植株中 GUS 的表达。GUS 染色按照刘佩琳等的方法进行[14]。将材料放入 1.5 ml 的 Eppendorf 管中, 加入 GUS 染色液, 37℃保温过夜, 叶片用体积分数 75%乙醇脱色, 照相记录结果。

3. 结果与分析

3.1. 拟南芥 *AtGSTZ1* 基因启动子的克隆

根据 NCBI 中 *AtGSTZ1* 基因和载体 pCAMBIA1301 序列, 设计引物, 以拟南芥叶片 DNA 为模板, PCR 扩增 *AtGSTZ1* 启动子, 获得了 2000 bp 大小的预期带(图 2)。



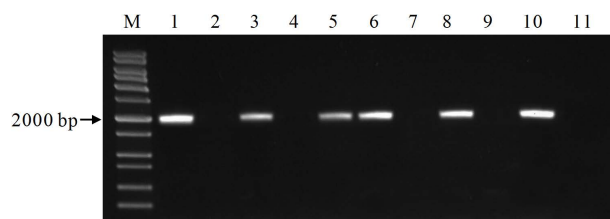
注: M 为 DNA 分子量标准, Line1~2 为 *AtGSTZ1* 启动子片段

Figure 2. PCR amplification of *AtGSTZ1* promoter

图 2. *AtGSTZ1* 启动子的扩增

3.2. pGSTZ1-GUS 表达载体的构建

AtGSTZ1 启动子驱动的 GUS 表达载体 pGSTZ1-GUS 的构建如图 1 所示。pCAMBIA1301 经 PstI 和 NcoI 酶切后, 与克隆的 *AtGSTZ1* 启动子连接重组。重组后的载体转化大肠杆菌 DH5 α 。随机挑选单菌落进行 PCR 检测, 部分转化菌中检测到了大小为 2000 bp 的预期带(图 3)。培养含预期条带的转化菌, 提取质粒进行测序。测序结果表明, *AtGSTZ1* 启动子按正确的方向与 pCAMBIA1301 进行了连接, 说明 pGSTZ1-GUS 表达载体构建成功。



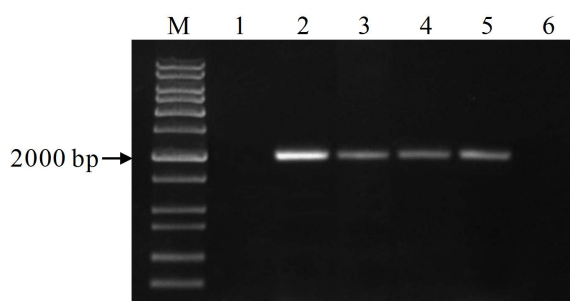
注: M 为 DNA 分子量标准, Line 1 为阳性对照, Line 2 为阴性对照, Line 3~11 为不同菌落模板

Figure 3. Identification of colonies by PCR

图 3. 菌落 PCR 检测重组菌

3.3. 转基因拟南芥的筛选和鉴定

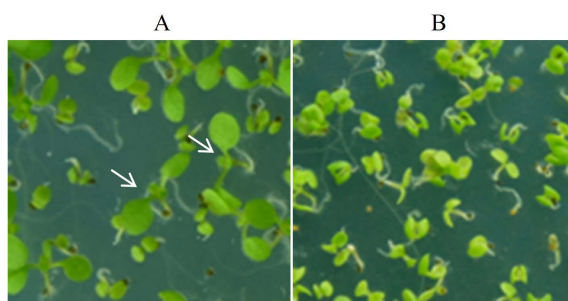
将 pGSTZ1-GUS 表达载体通过电击法转入根癌农杆菌 GV3101 后, 随机挑取单菌落, 进行菌落 PCR 反应, 电泳结果显示, 部分菌中扩增出约 2000 bp 的目的带(图 4), 而对照农杆菌中没有预期带的出现, 说明表达载体已经成功转入农杆菌 GV3101。培养含 pGSTZ1-GUS 表达载体的农杆菌, 采用农杆菌介导的浸花法转化拟南芥。转化植株的种子在含潮霉素的 MS 培养基上培养, 非转基因幼苗会因潮霉素的作用而不会长出真叶, 转基因植株因对潮霉素具有抗性而正常生长(图 5)。选择生长正常的植株移栽至营养土中。提取转化植株叶片 DNA, 采用 PCR 法对转基因植株进行分子鉴定。结果表明, 潮霉素抗性植株中均能扩增出预期带(图 6), 说明目的带已转入至拟南芥基因组中。



注: M 为 DNA 分子量标准, Line 1 为阴性对照, Line 2~6 为不同菌落模板

Figure 4. Identification of GV3101 colonies by PCR

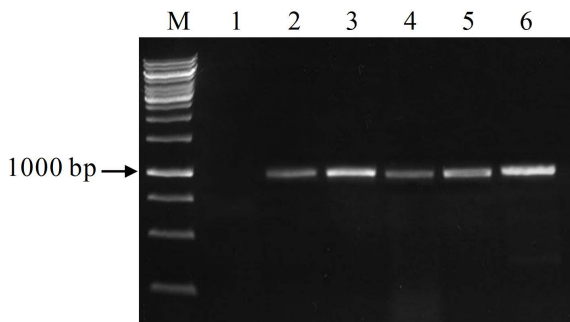
图 4. 菌落 PCR 检测重组菌 GV3101



注: A 箭头所示为转基因潮霉素抗性植株, B 为非转基因对照植株

Figure 5. Hygromycin resistance of transgenic plant

图 5. 转基因幼苗的潮霉素抗性



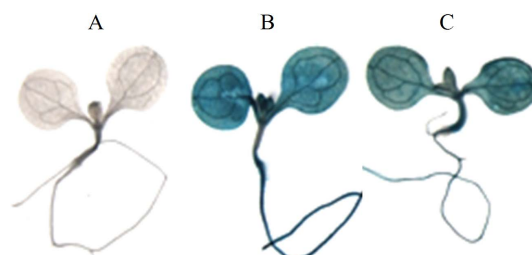
注: M 为 DNA 分子量标准, Line 1 为对照植株, Line 2~6 为转基因植株

Figure 6. PCR identification of transgenic Arabidopsis

图 6. 转基因拟南芥的 PCR 鉴定

3.4. 转基因拟南芥的 GUS 染色鉴定

为了检测 *AtGSTZ1* 启动子是否能驱动 GUS 的表达,对 T2 代转基因植株中的 GUS 表达进行了检测,结果见图 7。由图 7 可以看出, GUS 在转基因植株的根、子叶和下胚轴中都表达,说明 *AtGSTZ1* 启动子能驱动 GUS 在转基因植株中表达。



注: A 为阴性对照植株, B 为阳性对照植株, C 为转基因植株

Figure 7. Stain identification of GUS

图 7. GUS 染色检测结果

4. 结论与讨论

启动子是调控基因表达的重要元件[10]。对其功能进行研究,有助于进一步了解基因表达与调控的机制。启动子对其下游基因没有选择性。因此,可以将目的启动子与易检测的报告基因相连后,再转化植物细胞,通过观察转基因植物中报告基因的表达来研究启动子的功能[11][12]。目前常采用的报告基因是 GUS 基因。GUS 基因来自于大肠杆菌,编码 β -葡萄糖苷酸酶;在 GUS 酶氨基末端融合其它基因编码的蛋白不会改变 GUS 的活性;并且绝大多数植物细胞内不存在 GUS 基因[12]。 β -葡萄糖苷酸酶可分解 5-溴-4-氯-3-吡啶葡萄糖苷酸,使之产生无色的吡啶衍生物,此产物经过氧化二聚化作用形成不溶解的 5,5-二溴-4,4'-二氯深色的靛蓝色物质,使得具有 GUS 活性的部位呈现蓝色,所以很容易观察启动子的表达特征[15]。

本实验构建了拟南芥 *AtGSTZ1* 基因启动子与 GUS 融合表达载体,经测序检测,证实启动子与 pCambia1301 按正确的方向连接。采用农杆菌介导法将重组载体转化拟南芥,通过潮霉素抗性筛选和分子检测,证明重组分子已转入拟南芥中。GUS 染色结果表明, *AtGSTZ1* 基因启动子能驱动 GUS 基因在拟南芥中表达。实验结果为深入研究拟南芥 *AtGSTZ1* 基因的表达特征奠定了基础。

基金项目

本论文由湖南农业大学创新性实验计划项目 XCX17066 和 XCX18102 支助。

参考文献

- [1] 胡廷章. 植物的谷胱甘肽转移酶家族[J]. 重庆三峡学院学报, 2004, 20(5): 121-124.
- [2] 宋新华. 植物体内的多功能蛋白酶-谷胱甘肽转移酶[J]. 山东科学, 2007, 20(3): 50-53.
- [3] Dixon, D.P., Skipsey, M. and Edwards, R. (2010) Roles for Glutathione Transferases in Plant Secondary Metabolism. *Phytochemistry*, 71, 338-350. <https://doi.org/10.1016/j.phytochem.2009.12.012>
- [4] Jain, M., Ghanashyam, C. and Bhattacharjee, A. (2010) Comprehensive Expression Analysis Suggests Overlapping and Specific Roles of Rice Glutathione S-Transferase Genes during Development and Stress Responses. *BMC Genomics*, 11, 73. <https://doi.org/10.1186/1471-2164-11-73>
- [5] 王光勇, 刘迪秋, 葛锋, 等. GSTs 在植物非生物逆境胁迫中的作用[J]. 植物生理学通讯, 2010, 46(9): 890-894.
- [6] 戚元成, 张世敏, 王丽萍, 等. 谷胱甘肽转移酶基因过量表达能加速盐胁迫下转基因拟南芥的生长[J]. 植物生理

与分子生物学学报, 2004, 30(5): 517-522.

- [7] Tsuchiya, T., Takesaw, T., Kanzaki, H. and Nakamura, I. (2004) Genomic Structure and Differential Expression of Two Tandem-Arranged GSTZ Genes in Rice. *Gene*, **335**, 141-149. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2004.03.020>
- [8] Takesawa, T., Ito, M., Kanzaki, H., Kameya, N. and Nakamura, I. (2002) Over-Expression of Glutathione S-Transferase in Transgenic Rice Enhances Germination and Growth at Low Temperature. *Molecular Breeding*, **9**, 93-101. <https://doi.org/10.1023/A:1026718308155>
- [9] Kim, S.-I., Andaya, V.C. and Tai, T.H. (2011) Cold Sensitivity in Rice (*Oryza sativa* L.) Is Strongly Correlated with a Naturally Occurring I99V Mutation in the Multifunctional Glutathione Transferase Isoenzyme GSTZ2. *Biochemical Journal*, **435**, 373-380. <https://doi.org/10.1042/BJ20101610>
- [10] 雒雅婧, 李杰, 张爽, 等. 植物启动子研究进展[J]. 北方园艺, 2015, 22(2): 186-189.
- [11] 袁思玮, 黄锐之, 罗红兵. GUS 报告基因在植物功能基因研究中的应用[J]. 作物研究, 2008, 22(31): 310-314.
- [12] 曾宪容, 易清明. GUS 基因-植物基因工程中重要的报道基因[J]. 生物学杂志, 1993, 51(1): 6-7.
- [13] Clough, S.J. and Bent, A.F. (1998) Floral Dip: A Simplified Method for *Agrobacterium* Mediated Transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Journal*, **16**, 735-743. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113x.1998.00343.x>
- [14] 刘佩琳, 支添添, 任春梅. 拟南芥 SSCD1 基因启动子与 GUS 重组载体的构建与转化[J]. 植物学研究, 2018, 7(3): 287-293.
- [15] 李新锋, 赵淑清. 转基因植物中报道基因 GUS 的活性检测及其应用[J]. 生命的化学, 2004, 24(1): 71-74.

知网检索的两种方式:

1. 打开知网页面 <http://kns.cnki.net/kns/brief/result.aspx?dbPrefix=WWJD>
下拉列表框选择: [ISSN], 输入期刊 ISSN: 2168-5665, 即可查询
2. 打开知网首页 <http://cnki.net/>
左侧“国际文献总库”进入, 输入文章标题, 即可查询

投稿请点击: <http://www.hanspub.org/Submission.aspx>
期刊邮箱: br@hanspub.org