

DOI: 10.11931/guihaia.gxzw201601028

包曙光,魏情情,刘智康,等. 拟南芥醛还原酶编码基因 At3g04000 表达模式分析及过量表达转基因植株获得 [J]. 广西植物, 2016, 36(6):698-706
BAO SG, WEI QQ, LIU ZK, et al. Expression pattern analysis of *Arabidopsis* aldehyde reductase encoding gene At3g04000 and generation of overexpression plants [J]. Guihaia, 2016, 36(6):698-706

拟南芥醛还原酶编码基因 At3g04000 表达模式分析及过量表达转基因植株获得

包曙光, 魏情情, 刘智康, 聂祥, 门淑珍*

(南开大学 生命科学学院 植物生物学和生态学系, 天津 300071)

摘要: 植物体内的 α, β -不饱和活性醛类化合物对植物细胞具有毒害作用, 清除这些 α, β -不饱和活性醛类化合物对于植物细胞维持正常的生命活动至关重要。前人研究报道通过体外酶活测定和异源瞬时表达鉴定拟南芥 At3g04000 基因编码的蛋白为 NADPH 依赖的叶绿体醛还原酶 (*Arabidopsis* NADPH-dependent chloroplastic aldehyde reductases, AtChLADRs), 推测其在清除叶绿体中长链 (≥ 5) α, β -不饱和醛类物质中具有重要的功能。该研究主要构建了拟南芥 At3g04000 基因的表达模式分析载体 ProAt3g04000:GUS、亚细胞定位分析载体 At3g04000-EGFP 和过量表达载体 At3g04000-OE, 并获得了转基因拟南芥, 并通过实时定量 PCR 分析了 At3g04000 基因在拟南芥不同组织中的转录水平。结果表明: 拟南芥 At3g04000 基因在幼苗中的转录水平最高, 在莲座叶、茎生叶、花序和角果中均有较高的转录水平; 而在根部和茎秆中的转录水平较低。通过对 ProAt3g04000:GUS 转基因植株的 GUS 染色分析可知, At3g04000 基因在子叶、莲座叶和萼片的维管组织和保卫细胞中均有较强的表达, 在根的维管组织中有较弱的表达。通过共聚焦显微镜对 At3g04000-EGFP 转基因植株的观察和分析发现, At3g04000 不是定位于叶绿体中, 而是定位在细胞质和细胞核中。该研究结果为深入研究拟南芥醛还原酶编码基因 At3g04000 的功能奠定了基础。

关键词: 拟南芥, α, β -不饱和醛, 醛还原酶, At3g04000, 表达模式, 过量表达

中图分类号: Q943.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2016)06-0698-09

Expression pattern analysis of *Arabidopsis* aldehyde reductase encoding gene At3g04000 and generation of overexpression plants

BAO Shu-Guang, WEI Qing-Qing, LIU Zhi-Kang, NIE Xiang, MEN Shu-Zhen*

(Department of Plant Biology and Ecology, College of Life Sciences, Nankai University, Tianjin 300071, China)

Abstract: Reactive aldehyde, especially α, β -unsaturated aldehyde compounds are toxic to plant cells. Therefore, elimination of α, β -unsaturated aldehyde compounds is vital for plant cells to maintain normal life activities. In previous reports, the *Arabidopsis* At3g04000 gene was identified as encoding a NADPH-dependent chloroplastic aldehyde reductases (AtChLADRs) by enzyme activity assay *in vitro* and subcellular localization analyse in spiderwort cells. And it was proposed

收稿日期: 2016-01-18 修回日期: 2016-03-04

基金项目: 国家自然科学基金(31570247, 91417308, 91017009, 31460453); 天津市自然科学基金(12JCZDJC23200); 国家基础学科人才培养基金南开大学生物学人才培养基地(J1103503) [Supported by the National Science Foundation of China (31570247, 91417308, 91017009, 31460453); the Natural Science Foundation of Tianjin (12JCZDJC23200); Funds for National Basic Science Personnel Training (J1103503)].

作者简介: 包曙光(1985-), 男(蒙古族), 内蒙古通辽市人, 博士研究生, 主要从事植物分子生物学研究, (E-mail) mindaguang3906@126.com。

*通讯作者: 门淑珍, 博士, 教授, 博士生导师, 主要从事植物固醇的研究, (E-mail) shuzhenmen@nankai.edu.cn。

to play important role in scavenging α,β -unsaturated aldehydes with more than 5 carbons ($C \geq 5$) in chloroplasts. To further analysis the roles of At3g04000 gene, we generated transgenic *Arabidopsis* plants expressing a ProAt3g04000:GUS for analysis of its expression pattern, a At3g04000-EGFP translational fusion for subcellular localization analysis, and 35S:At3g04000 for overexpression of At3g04000 gene. We also used quantitative real time PCR to investigate the transcription of At3g04000 gene during the developmental process of *Arabidopsis*. The results showed that the transcription of At3g04000 gene was detected in all examined tissues. The highest transcription level of At3g04000 gene was detected in *Arabidopsis* seedlings, relative high level of At3g04000 gene transcripts were also detected in rosette leaf, cauline leaf, inflorescence and silique, while in root and stem the transcription level of At3g04000 gene was very weak. The results of GUS staining in ProAt3g04000:GUS transgenic *Arabidopsis* plants were in consistency with the results of the quantitative real time PCR analysis. Strong GUS staining was found in vascular tissues and guard cells of cotyledon, rosette leaf and sepal, and weak GUS staining was found in vascular tissues of root. To analyze the subcellular localization of the At3g04000 gene encoded protein, the At3g04000-EGFP transgenic *Arabidopsis* seedling was observed by confocal microscopy. The results showed that At3g04000 gene encoded protein was not localized in chloroplast, but localized in cytoplasm and nucleus. This study provides tools for further study of the roles of At3g04000 gene in *Arabidopsis*.

Key words: *Arabidopsis*, α,β -unsaturated aldehyde, aldehyde reductase, At3g04000, expression pattern, overexpression

活性氧族(Reactive oxygen species, ROS)是植物有氧代谢过程中重要的副产物,对于植物生长发育过程起双重功效:低浓度 ROS 可以促进植物的生长发育,高浓度 ROS 对植物有氧化胁迫作用(Bolwell et al, 1995; 林植芳和刘楠, 2012; 田敏等, 2005)。正常情况下,植物体内 ROS 产生和清除处于平衡状态不会对细胞造成伤害。当外在或内在因素破坏了生物体内 ROS 含量的动态平衡状态时,生物体内过多的 ROS 将会损伤生物大分子,主要包括对蛋白质的损伤作用、对 DNA 和糖类的氧化损伤及脂质过氧化(Potikha et al, 1999; Halliwell, 2006; 张文玲等, 2000; 李冰冰等, 2005)。当植物遭受到外界生物或非生物胁迫时,ROS 含量会迸发(Jackson et al, 2001; Fath et al, 2002)。ROS 中的单线态氧和羟基自由基能与细胞膜组分中的多聚不饱和脂肪酸发生作用引发脂质的过氧化反应,产生大量含有羰基的中间产物(Burcham, 1998)。不饱和羰基化合物会扰乱细胞内的代谢平衡造成氧化胁迫,从而引起对细胞的毒害。其中醛类物质能破坏膜的完整性,引起细胞毒害(Esterbauer et al, 1991; Millar & Leaver, 2000; Yamauchi & Sugimoto, 2010)。活性醛参与了植物逆境胁迫下对细胞的毒害作用,影响植物正常的生长发育(Mano et al, 2005; Yin et al, 2010)。清除植物体内过多的活性醛类物质将会提高植物抵抗逆境的能力。Chen & Murata (2002)发现甜菜碱乙醛脱氢酶 BADH 能使细胞在干旱和高盐等逆境胁迫下维持渗透平衡从而提高植物抗逆性。张海玲等(2010)发现转乙醛脱氢酶基因(*ALDH*)番茄的抗逆

性明显高于对照,转基因植物体内的活性醛类物质所造成的氧化胁迫明显下降。Mano et al (2005)在烟草中过量表达拟南芥的 2-烯醛还原酶基因(2-*ALKENAL REDUCTASE*, *AER*)明显减少强光诱导的氧化胁迫,提高植物抗逆性。吴茜等(2015)在烟草中过量表达拟南芥 *AER* 基因明显提高了烟草抗旱能力。 α,β -不饱和活性醛类物质可以通过与氨基反应形成希夫碱化合物(Schiff base adducts),对细胞造成毒害(Yamauchi et al, 2008)。因此,去除植物体内 α,β -不饱和的活性醛类物质有助于植物解除活性醛造成的氧化损伤。

哺乳动物细胞中去除 α,β -不饱和活性醛的代谢途径已有报道(Uchida, 2003; Yamauchi et al, 2011),包括(1)醛脱氢酶,氧化醛类物质转变为羧酸盐类化合物(Sellin et al, 1991);(2)醛-酮还原酶,催化醛转变为醇类物质(Kolb et al, 1994; Burczynski et al, 2001);(3)谷胱甘肽-S-转移酶(GST)途径(Hartley et al, 1995);(4)NADPH 依赖的链烯基氧化还原酶,催化含有 α,β -不饱和的活性醛类物质的氢化作用(Dick et al, 2001)。关于植物体内去除不饱和活性醛类物质代谢途径的研究相对较少。Yamauchi et al (2011)在拟南芥中筛选到 NADPH 依赖的链烯基氧化还原酶 At1g23740。此外,还在拟南芥中分别筛选到 NADPH 依赖且定位于细胞质的醛还原酶(At2g24190 和 At3g61220)和定位于叶绿体的一个醛-酮还原酶(At2g37770)及 2 个醛还原酶(At1g54870 和 At3g04000)。其中, At3g04000 具有去除长链(≥ 5) α,β -不饱和醛和饱

和醛的醛还原酶活力,并以紫鸭跖草(*Tradescantia reflexa*)叶片为材料利用瞬时转化技术鉴定拟南芥醛还原酶 At3g04000 定位于叶绿体。然而,关于 At3g04000 表达模式的分析和在拟南芥稳定表达株系中亚细胞定位模式的研究尚未见有报道。本研究通过实时定量 PCR 检测了 At3g04000 基因在拟南芥不同组织的转录水平。构建了 At3g04000 基因的启动子与 GUS 报告基因的融合载体,并且获得了转基因拟南芥 ProAt3g04000:GUS。通过 GUS 染色分析了拟南芥醛还原酶 At3g04000 的表达模式。构建了 At3g04000 全长基因(-927~+933)与 GFP 基因融合的亚细胞定位分析载体。以 At3g04000-EGFP 转基因拟南芥作为材料,检测了拟南芥醛还原酶 At3g04000 在拟南芥体内的亚细胞定位模式。另外,构建了拟南芥醛还原酶 At3g04000 过量表达载体,并且获得了纯合的过量表达转基因拟南芥。

1 材料与方法

1.1 植物材料

所用的拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)为哥伦比亚型(Col-0),种子由本实验室保存。拟南芥培养在人工气候室内,温度设定为 22 ℃,湿度设定为 60%,设定光照为 16 h、8 h 黑暗。分别采集野生型拟南芥的根、幼苗、莲座叶、茎生叶、茎秆、花序和角果用于 At3g04000 基因表达模式的分析。采集四周龄的野生型和过量表达植株的莲座叶用于过量表达植株的转录水平分析。植物材料采集后立即于液氮中速冻,-80 ℃冰箱冻存备用。

1.2 主要试剂

RNA 提取试剂盒、反转录试剂盒和 SYBR[®] Premix Ex Taq[™] 试剂盒均购自 TaKaRa 生物公司。引物订购和测序反应均由华大生物有限公司完成。限制性内切酶购自 Thermo 公司。其它试剂购自上海生工生物有限公司。

1.3 主要方法

1.3.1 RNA 提取和 cDNA 的合成 拟南芥总 RNA 的提取按照 TaKaRa 生物公司 RNA 提取试剂盒说明书进行。取 2 μg 不同组织的总 RNA 用于反转录反应,合成的 cDNA 于-20 ℃保存备用。

1.3.2 At3g04000 基因的启动子、开放阅读框和全长基因(-927~+933)的克隆 通过拟南芥数据库(www.arabidopsis.org)获得 At3g04000 基因的完整

信息。选取起始密码子(ATG)上游 927 bp 作为该基因的启动子。采用 Primer Premier 5.0 软件设计 At3g04000 基因的启动子、开放阅读框和全长基因序列(-927~+933)的特异引物,附加所需的限制性内切酶位点(表 1)。以 3 周龄拟南芥莲座叶的 DNA 为扩增 At3g04000 基因启动子和全长基因(-927~+933)的模板。以幼苗总 RNA 反转录合成的 cDNA 为扩增 At3g04000 基因开放阅读框的模板。

1.3.3 表达载体构建和拟南芥转化 通过酶切连接的方法分别构建了 At3g04000 表达模式分析载体、亚细胞定位分析载体和基因过量表达载体(图 2)。(1)利用 *Kpn* I 和 *Spe* I 限制性内切酶对扩增得到的 At3g04000 基因的启动子产物和 pGreen II-0229-GUS 载体进行酶切反应。通过 T4 连接酶的连接作用将 At3g04000 基因的启动子序列连接到 pGreen II-0229-GUS 载体中,获得了 At3g04000 基因表达模式的分析载体 ProAt3g04000:GUS。(2)利用 *Kpn* I 和 *Spe* I 限制性内切酶将扩增得到的 At3g04000 全长基因(-927~+933)产物和 pGreen II-0229-EGFP 载体进行酶切反应。通过 T4 连接酶的连接作用将 At3g04000 全长基因(-927~+933)连接到 pGreen II-0229-EGFP 载体中,获得了 At3g04000 基因亚细胞定位的分析载体 At3g04000-EGFP。(3)利用 *Xba* I 和 *Spe* I 限制性内切酶对扩增得到的 At3g04000 基因的开放阅读框产物和过量表达载体 pBA002 分别进行酶切反应。通过 T4 连接酶的连接作用将 At3g04000 基因的开放阅读框序列连接到过量表达载体 pBA002 中,获得了带有 CaMV35S 启动子的过量表达植物载体 At3g04000-OE。

将测序正确的 At3g04000 基因表达模式分析载体、亚细胞定位分析载体和过量表达载体分别转入农杆菌菌株 C58C1 中。采用花苞浸泡法将 3 个表达载体分别转化到拟南芥中。

1.3.4 At3g04000 基因过量表达植株转录水平分析 提取 4 周龄的野生型和过量表达植株莲座叶的总 RNA 且反转录为 cDNA。用半定量 RT-PCR 方法鉴定过量表达植株中 At3g04000 基因的转录水平。

1.3.5 At3g04000 基因表达模式和蛋白质亚细胞定位的分析 (1)ProAt3g04000:GUS 植株的 GUS 染色分析:将 ProAt3g04000:GUS 转基因植株的不同组织分别置入配置好的 GUS 染色液中,37 ℃保温过夜。将染色好的植物组织置于固定液(乙醇:乙酸=3:1)中固定脱色 2 h,然后用透明剂进行透明处理。

表 1 本文中用到的引物
Table 1 Primers used in this study

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence	用途 Use
At3g04000-F1- <i>Kpn</i> I	CGGGTACCGCAGCTCTTCTCGGTGAC	克隆启动子 Cloning promoter
At3g04000-R1- <i>Bam</i> H I	CTCGGATCCACTGTTAGGTAGATTTTACTATA	克隆启动子 Cloning promoter
At3g04000-F2- <i>Xba</i> I	TTGCTCTAGAATGGCTGCAGCGTCATCAGTTTC	克隆开放阅读框序列 Cloning open reading frame
At3g04000-R2- <i>Spe</i> I	GCGACTAGTTTACAAGAGACAGCCACCATTAGCC	克隆开放阅读框序列 Cloning open reading frame
At3g04000-F3- <i>Kpn</i> I	CGGGTACCGCAGCTCTTCTCGGTGAC	克隆全长基因(-927~+933) Cloning genomic sequence(-927~+933)
At3g04000-R3- <i>Bam</i> H I	CAGGGATCCGGCTGCCGCCAAGAGACAGCCACCATTAGC	克隆全长基因(-927~+933) Cloning genomic sequence(-927~+933)
At3g04000-F4	ATGGCTGCAGCGTCATCAGTTTC	转录水平分析 Transcription analysis
At3g04000-R4	TTACAAGAGACAGCCACCATTAGCC	转录水平分析 Transcription analysis
At3g04000_qF	TGCTAGAGAAGCTGCCAATAGG	实时定量 PCR Real time RT-PCR
At3g04000_qR	AGCCGTGTATGAGCCATAGTTT	实时定量 PCR Real time RT-PCR
ACTIN2-qF	TGGGATGAACCAGAAGGATG	内参基因 Housekeeping gene
ACTIN2-qR	AAGAATACCTCTCTGGATTGTGC	内参基因 Housekeeping gene
At3g04000-F5	GCGAGCTCTTCTCGGTGAC	鉴定 ProAt3g04000;GUS 转基因植株 Verification of ProAt3g04000;GUS
GUS-R	ACCAACGCTGATCAATTCCAC	鉴定 ProAt3g04000;GUS 转基因植株 Verification of ProAt3g04000;GUS
At3g04000-F4	ATGGCTGCAGCGTCATCAGTTTC	鉴定 At3g04000-EGFP 转基因植株 Verification of At3g04000-EGFP
EGFP-R	GTCGTCCTTGAAGAAGATGCT	鉴定 At3g04000-EGFP 转基因植株 Verification of At3g04000-EGFP
35S-F	CCACGTCTTCAAAGCAAGTG	鉴定 At3g04000-OE 转基因植株 Verification of At3g04000-OE
At3g04000-R4	TTACAAGAGACAGCCACCATTAGCC	鉴定 At3g04000-OE 转基因植株 Verification of At3g04000-OE

注: 下划线标识引入的酶切位点。 Note: Restriction site is underlined.

将透明好的植物材料置于显微镜下观察和拍照。

(2) At3g04000 基因的实时定量 PCR 分析: 以拟南芥的不同组织总 RNA 反转录得到的 cDNA 作为模板, 以持家基因 *ACTIN2* 基因为内参, 进行实时定量 PCR 反应。用 Primer Premier 5.0 软件设计 At3g04000 基因的特异引物作为扩增引物(表 1)。扩增程序如下: 预变性 94 °C 2 min; 变性 94 °C 10 s, 退火 60 °C 10 s, 延伸 72 °C 20 s, 40 个循环。每个反应进行 3 次技术重复。(3) At3g04000 蛋白的亚细胞定位分析: 以转基因拟南芥 At3g04000-EGFP 的 T2 代幼苗的子叶作为实验材料, 置于共聚焦显微镜下观察和拍照。

2 结果与分析

2.1 拟南芥 At3g04000 基因的启动子、开放阅读框和全长基因(-927~+933)的克隆及转基因植株的获得

根据拟南芥数据库中的基因信息, At3g04000 基因的开放阅读框为 816 bp, 编码了 272 个氨基酸。以野生型拟南芥的 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增分别获得 At3g04000 基因的启动子和全长基因(-927~+933)的扩增产物(图 1)。以野生型拟南芥幼苗总 RNA 反转录得到的 cDNA 为模板, 通过 PCR 扩增获得 At3g04000 基因开放阅读框的扩增产

物(图1)。用酶切连接的方法分别构建 At3g04000 基因的表达模式分析载体 ProAt3g04000:GUS、亚细胞定位分析载体 At3g04000-EGFP 和过量表达载体 At3g04000-OE(图2:A、B、C)。通过花苞浸泡法分别获得3个表达载体的转基因植株,并利用PCR对所获得的转基因植株进行鉴定,获得了转基因阳性植株(图2:D、E、F)。

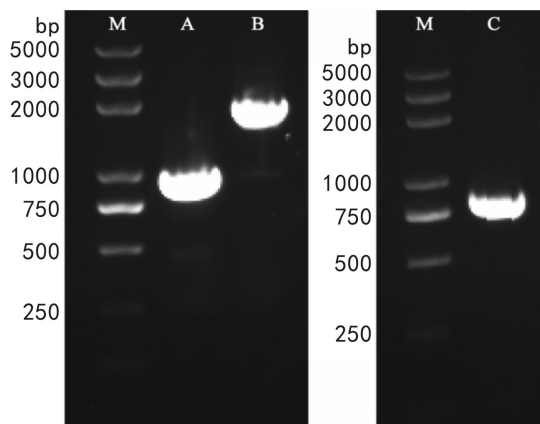


图1 拟南芥醛还原酶编码基因 At3g04000 启动子、全长基因(-927~+933)和开放阅读框 PCR 扩增产物的凝胶电泳结果 M. DNA 分子量标准; A. At3g04000 启动子的扩增产物; B. At3g04000 全长基因(-927~+933)的扩增产物; C. At3g04000 基因开放阅读框的扩增产物。

Fig. 1 PCR products of promoter, genomic sequences (-927 - + 933) and open reading frame of *Arabidopsis* aldehyde reductase encoding gene At3g04000 analyzed by agarose gel electrophoresis M. DNA marker; A. PCR products of At3g04000 promoter; B. PCR products of At3g04000 genomic sequence (-927-+933); C. PCR products of At3g04000 open reading frame.

2.2 At3g04000 基因表达模式的分析

为检测 At3g04000 基因的表达模式,分别以野生型拟南芥的根、幼苗、莲座叶、茎生叶、茎秆、花和角果为材料,对拟南芥不同组织中 At3g04000 基因的表达水平进行实时定量 PCR 检测。由图3可知,At3g04000 基因在所有检测组织中均有表达,但表达水平明显不同。At3g04000 基因在幼苗中的表达水平最高,在莲座叶、茎生叶、花序和角果中也均有较高的表达水平;At3g04000 基因在茎秆中的表达水平最低,在根中的表达水平也较低(图3)。

为了进一步检测 At3g04000 基因在不同组织表达的特异性,通过 GUS 组织化学染色法分析了 ProAt3g04000:GUS 转基因植株的不同组织中 At3g04000 基因的表达情况。分别将 ProAt3g04000:GUS 转基因植株的不同组织材料置于 GUS 染色液

中 37 °C 保温过夜。通过显微镜观察发现,ProAt3g04000:GUS 转基因植株的幼苗、莲座叶、花序中都有染色。在幼苗的整个子叶中都有强的染色,尤其在维管组织和保卫细胞中,而在根部维管组织中染色较弱;在莲座叶维管组织和保卫细胞中有强的染色;在花序中仅在萼片的维管组织和保卫细胞中有强的染色(图4)。

2.3 At3g04000 蛋白亚细胞定位的分析

为了检测 At3g04000 蛋白的亚细胞定位模式,以 At3g04000-EGFP 转基因拟南芥幼苗的子叶为材料分析 At3g04000 的亚细胞定位模式。通过共聚焦显微镜观察可知,At3g04000 并不定位于叶绿体中,而是定位在细胞质和细胞核中(图5)。

2.4 At3g04000 基因过量表达植株的获得及相对转录水平分析

为了研究 At3g04000 基因在拟南芥的生长发育过程中的作用,采用酶切连接的方法构建了 At3g04000 基因的过量表达载体 At3g04000-OE(图2:C)。通过农杆菌介导法将测序正确的过量表达载体转入拟南芥中并获得了 At3g04000-OE 转基因拟南芥的 T1 代种子。由于过量表达载体 pBA002 中有除草剂抗性基因,因此采用除草剂筛选获得了 T1 代抗性植株。通过 PCR 进行基因型鉴定进一步获得了转基因阳性植株(图2:F)。将不同转基因株系的 T2 代拟南芥种子播种于土中,用除草剂进行筛选。选择抗性苗与非抗性苗比例为 3 : 1 分离的株系作为继续筛选的材料。通过除草剂的筛选获得了纯合的 At3g04000-OE 转基因单拷贝株系。为了检验转基因植株中 At3g04000 转录水平的变化,采用半定量 RT-PCR 分析了转基因植株中 At3g04000 的相对转录水平,表明转基因株系 At3g04000-OE-1 #、5# 和 22 # 中 At3g04000 基因的表达量均明显的高于野生型(图6)。这表明获得的纯合 At3g04000-OE-1 #、5 # 和 22 # 株系是 At3g04000 基因过量表达转基因株系。

3 讨论

植物体内的有氧代谢过程会产生活性氧,此外当植物受到外界环境胁迫时也会有活性氧在细胞中大量累积(Asada, 1999; Thannickal & Fanburg, 2000; 薛鑫等, 2013)。活性氧的过量积累会造成植物体内脂质的过氧化,从而引起大量醛的累积(Burcham,

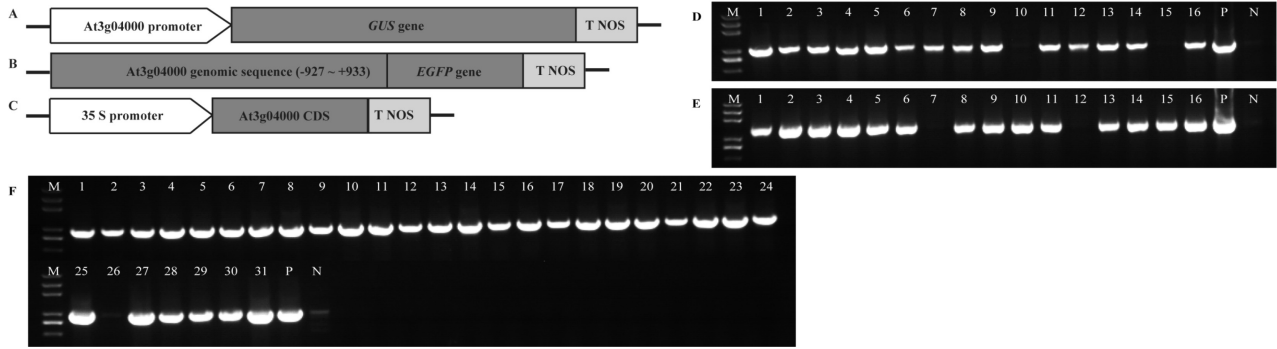


图 2 拟南芥醛还原酶编码基因 At3g04000 载体构建示意图和转基因植株 PCR 鉴定结果 A. 表达模式分析载体构建示意图; B. 亚细胞定位载体构建示意图; C. 过量表达载体的构建示意图; D. ProAt3g04000:GUS 转基因拟南芥 PCR 鉴定结果, 1-9、11-14 和 16# 为转基因阳性植株; M: DNA 分子量标准; P. 阳性对照; N. 阴性对照; E. At3g04000-EGFP 转基因拟南芥 PCR 鉴定结果, 1-6、8-11 和 13-16 为转基因阳性植株; M: DNA 分子量标准; P. 阳性对照; N. 阴性对照; F. At3g04000-OE 转基因拟南芥 PCR 鉴定结果, 1-25 和 27-31# 为转基因阳性植株; M. DNA 分子量标准; P. 阳性对照; N. 阴性对照。

Fig. 2 Schematic diagrams of constructed vector and PCR results of transgenic plants of *Arabidopsis* aldehyde reductase encoding gene At3g04000 A. Schematic diagram of the vector constructed for analyzing expression pattern of the At3g04000 gene; B. Schematic diagram of the vector constructed for analyzing subcellular of the At3g04000 gene; C. Schematic diagram of the vector for At3g04000 gene overexpression vector. D. PCR results of ProAt3g04000:GUS transgenic *Arabidopsis*, 1-9, 11-14 and 16 # are positive transgenic plants; M. DNA marker; P. Positive control; N. Negative control; E. PCR results of At3g04000-EGFP transgenic *Arabidopsis*, 1-6, 8-11 and 13-16 # are positive transgenic plants; M. DNA marker; P. Positive control; N. Negative control; F. PCR results of At3g04000-OE transgenic *Arabidopsis*, 1-25 and 27-31 # are positive transgenic plants; M. DNA marker; P. Positive control; N. Negative control.

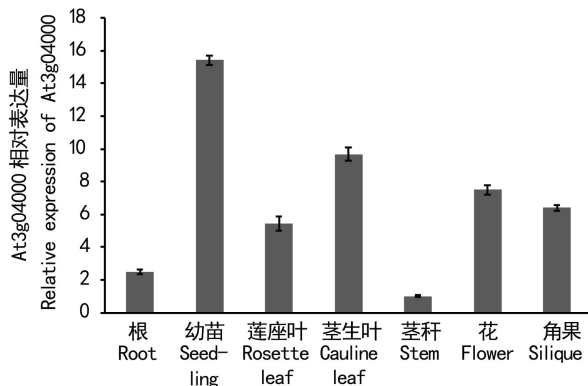


图 3 拟南芥 At3g04000 基因在拟南芥不同组织的表达水平
Fig. 3 Expression levels of At3g04000 gene in various *Arabidopsis* tissues

1998)。在逆境胁迫下植物体内醛的过量积累是引起植物伤害的重要因素之一 (Mano et al, 2005; Yin et al, 2010)。清除植物体内过量积累的醛类物质有利于解除植物所受到的毒害和提高抗逆性 (张海玲等, 2010; 吴茜等, 2015)。植物体内的 α, β -不饱和的活性醛是一类对细胞产生毒害的醛类物质 (Yamauchi et al, 2011)。因此清除植物体内的 α, β -不饱和的活性醛有利于解除细胞受到的毒害。Yamauchi et al (2011) 通过体外酶活测定实验和瞬时表达技术鉴定了 At3g04000 是一个 NADPH 依赖的定位于叶

绿体的拟南芥醛还原酶。然而, 本研究通过实时定量 PCR 检测和 GUS 染色分析可知: At3g04000 基因不仅在拟南芥的子叶、莲座叶和萼片中有表达, 而且在根部也有明显的表达。因此推测: At3g04000 基因可能并不仅仅定位于叶绿体。

本研究主要构建了拟南芥醛还原酶编码基因 At3g04000 的表达模式分析载体、亚细胞定位载体和过量表达载体。通过农杆菌介导的转化方法分别获得了转基因的拟南芥植株。GUS 染色分析和实时定量 PCR 检测的结果都表明 At3g04000 基因在拟南芥的根部有表达。尽管 At3g04000 在拟南芥根部表达的水平较低, 然而表达模式的分析结果却暗示着 At3g04000 并不仅仅定位在叶绿体。为了确定 At3g04000 基因的亚细胞定位, 采用酶切连接的方法将 At3g04000 全长基因 (-927 ~ +933) 与绿色荧光蛋白 (GFP) 编码基因融合构建了亚细胞定位表达载体 At3g04000-EGFP。以 At3g04000-EGFP 转基因拟南芥幼苗的子叶作为观察材料分析了 At3g04000 亚细胞定位模式。本研究表明, At3g04000 并不定位于叶绿体中, 而是定位于细胞质和细胞核。

Yamauchi et al (2011) 是以紫鸭跖草为材料采用瞬时表达技术证明 At3g04000 定位于叶绿体。他们用于亚细胞定位的表达载体中的启动子为 CaMV35S 启动子, 而且只选择了 At3g04000N 端的 124 个氨基

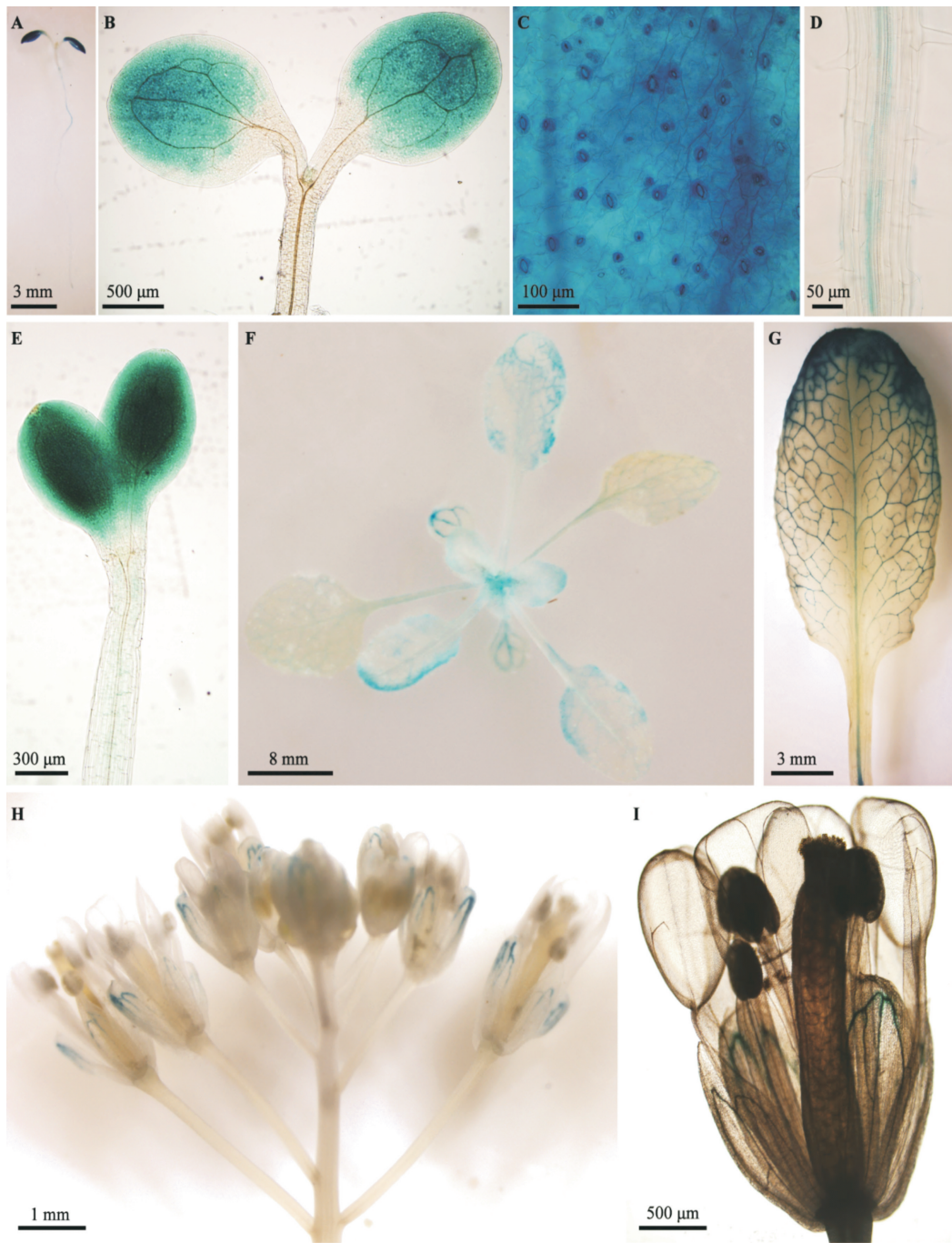


图 4 ProAt3g04000:GUS 转基因植株的 GUS 染色分析 A. 5 d 龄幼苗; B. 幼苗子叶的放大图; C. 幼苗子叶的局部放大图, 显示保卫细胞; D. 幼苗根部的放大图; E. 3 d 龄黑暗培养的幼苗子叶; F. 16 d 龄的拟南芥; G. 完全伸展的莲座叶; H. 花序; I. 花。

Fig. 4 GUS staining analysis of ProAt3g04000:GUS transgenic plants A. Five-day-old seedling; B. Magnified figure of seedling cotyledon; C. Magnified figure of seedling cotyledon, highlight the guard cells; D. Magnified figure of seedling root; E. Three-day-old seedling under dark treatment; F. Sixteen-day-old *Arabidopsis*; G. Fully extended rosette leaf; H. Inflorescence; I. Flower.

酸与 GFP 形成融合蛋白。本研究中用于亚细胞定位分析的载体中的启动子为 At3g04000 基因的自身启动子, 而且采用 At3g04000 完整蛋白与 GFP 形成融合蛋白, 并以稳定转化的转基因拟南芥作为观察材料。因此, 本研究中的亚细胞定位分析结果更具

准确性和科学性。本研究表明, At3g04000 不是拟南芥叶绿体醛还原酶 (AtChIADRs), 而是拟南芥细胞质醛还原酶 (*Arabidopsis* NADPH-dependent cytosolic ADs, AtCytADs)。另外, At3g04000 定位于细胞核也暗示着该酶可能存在着其它的功能。

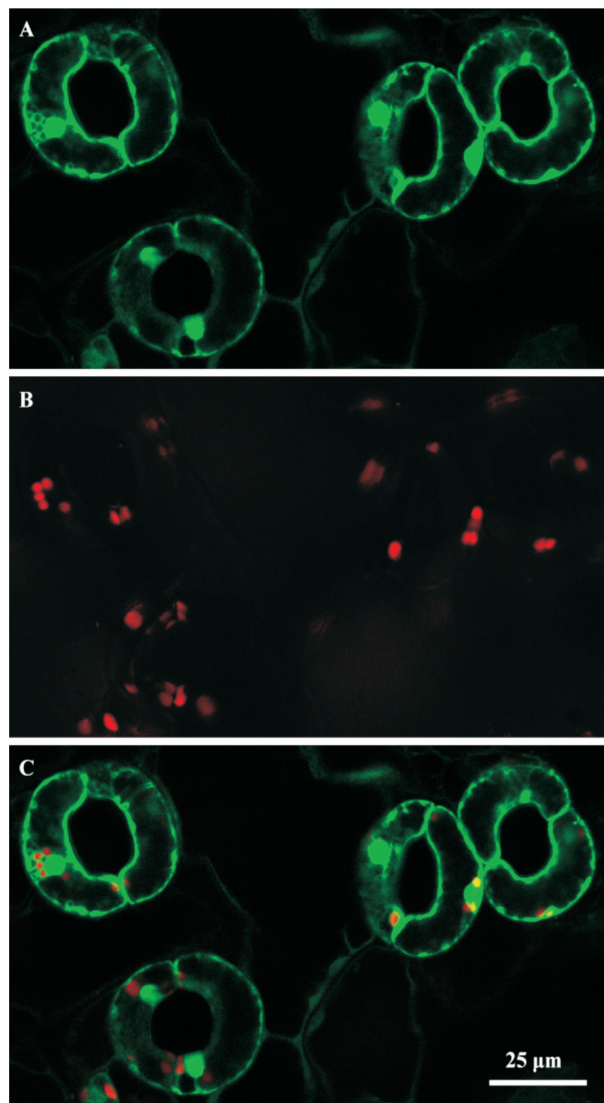


图 5 At3g04000 的亚细胞定位分析 A. At3g04000-绿色荧光蛋白信号; B. 叶绿体自发荧光信号; C. A 和 B 图叠加后图像。
Fig. 5 Analysis on subcellular localization of At3g04000 protein A. Green fluorescence protein signal; B. Auto-fluorescence signal of chloroplast; C. Merged image.

为了更深入研究 At3g04000 的功能,本研究虽获得了纯合的 At3g04000 过量表达转基因拟南芥,但在正常生长条件下过量表达植株与野生型相比未展现出明显的区别。对于拟南芥醛还原酶编码基因 At3g04000 的功能分析还需要进一步研究才能掌握该基因在植物抗逆中的作用。本文为进一步研究拟南芥醛还原酶在植物抗逆中的功能奠定了基础。

参考文献:

ASADA K, 1999. The water-water cycle in chloroplasts: scavenging of active oxygens and dissipation of excess photons [J]. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 50:601-639.

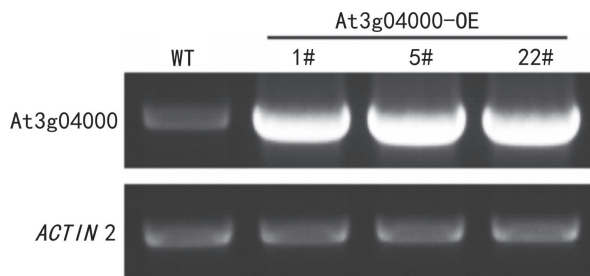


图 6 At3g04000-OE 转基因植株中 At3g04000 基因的转录水平分析 At3g04000-OE-1#、5# 和 22# 为 At3g04000 的过量表达株系;ACTIN2 作为内参基因。

Fig. 6 Transcription levels of At3g04000 gene At3g04000-OE-1#, 5# and 22# were overexpression lines of At3g04000. ACTIN2 gene was used as housekeeping gene.

- BOLWELL GP, BUTT VS, DAVIES DR, et al, 1995. The origin of the oxidative burst in plants [J]. *Free Radic Res*, 23(6): 517-532.
- BURCHAM PC, 1998. Genotoxic lipid peroxidation products; their DNA damaging properties and role in formation of endogenous DNA adducts [J]. *Mutagenesis*, 13(3):287-305.
- BURCZYNSKI ME, SRIDHAR GR, PALACKAL NT, et al, 2001. The reactive oxygen species-and Michael acceptor-inducible human aldo-ketoreductase AKR1C1 reduces the α , β -unsaturated aldehyde 4-hydroxy-2-nonenal to 1, 4-dihydroxy-2-nonenone [J]. *J Biol Chem*, 276(4):2 890-2 897.
- CHEN THH, MURATA N, 2002. Enhancement of tolerance of abiotic stress by metabolic engineering of betaines and other compatible solutes [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 5(3):250-257.
- DICK RA, KWAK MK, SUTTER TR, et al, 2001. Antioxidative function and substrate specificity of NAD(P)H-dependent alkenal/one oxidoreductase. A new role for leukotriene B₄ 12-hydroxydehydrogenase/15-oxoprostaglandin13-reductase [J]. *J Biol Chem*, 276(44):40 803- 40 810.
- ESTERBAUER H, SCHAUR RJ, ZOLLNER H, 1991. Chemistry and biochemistry of 4-hydroxynonenal, malonaldehyde and related aldehydes [J]. *Free Rad Biol Med*, 11(1):81-128.
- FATH A, BETHKE P, BELIGNI V, et al, 2002. Active oxygen and cell death in cereal aleurone cells [J]. *J Exp Bot*, 53(372):1 273-1 282.
- HALLIWELL B, 2006. Reactive species and antioxidants. Redox biology is a fundamental theme of aerobic life [J]. *Plant Physiol*, 141(2):312-322.
- HARTLEY DP, RUTH JA, PETERSEN DR, 1995. The hepatocellular metabolism of 4-hydroxynonenal by alcohol dehydrogenase, aldehyde dehydrogenase, and glutathione S-transferase [J]. *Arch Biochem Biophys*, 316(1):197-205.
- JACKSON PAP, GALINHA CIR, PEREIRA CS, et al, 2001. Rapid deposition of extensin during the elicitation of grapevine callus cultures is specifically catalyzed by a 40-kilodalton peroxidase [J]. *Plant Physiol*, 127(3):1 065-1 076.
- KOLB NS, HUNSAKER LA, VANDERJAGT DL, 1994. Aldose reductase-catalyzed reduction of acrolein: implications in cyclophosphamide toxicity [J]. *Mol Pharmacol*, 45(4):797-801.
- LI BB, ZHAO Q, ZHANG LF, 2005. Active oxygen and protein oxidative damage [J]. *J Pingsdingshan Inst of Technol*, 14(5):

- 16-17,30. [李冰冰,赵倩,张龙富,2005. 活性氧与蛋白质氧化损伤 [J]. 平顶山工学院学报,14(5):16-17,30.]
- LIN ZF, LIU N, 2012. Research progress in the control and regulation of plant growth and development by reactive oxygen species [J]. Chin Bull Bot, 47(1):74-86. [林植芳,刘楠,2012. 活性氧调控植物生长发育的研究进展 [J]. 植物学报,47(1):74-86.]
- MANO J, BELLES-BOIX E, BABIYCHUK E, et al, 2005. Protection against photooxidative injury of tobacco leaves by 2-alkenal reductase. Detoxication of lipid peroxide-derived reactive carbonyls [J]. Plant Physiol, 139(4):1 773-1 783.
- MILLAR AH, LEAVER CJ,2000. The cytotoxic lipid peroxidation product, 4-hydroxy-2-nonenal, specifically inhibits decarboxylating dehydrogenases in the matrix of plant mitochondria [J]. FEBS Lett, 481(2):117-121.
- POTIKHA TS, COLLINS CC, JOHNSON DI, et al, 1999. The involvement of hydrogen peroxide in the differentiation of secondary walls in cotton fibers [J]. Plant Physiol, 119(3): 849-858.
- SELLIN S, HOLMQUIST B, MANNERVIK B, et al, 1991. Oxidation and reduction of 4-hydroxyalkenals catalyzed by isozymes of human alcohol dehydrogenase [J]. Biochemistry, 30(9): 2 514-2 518.
- THANNICKAL VJ, FANBURG BL,2000. Reactive oxygen species in cell signaling [J]. Am J Physiol Lung Cell Mol Physiol, 279(6):1 005-1 028.
- TIAN M, RAO LB, LI JY, 2005. Reactive oxygen species (ROS) and its physiological functions in plant cells [J]. Plant Physiol Comm, 41(2):235-241. [田敏,饶龙兵,李纪元,2005. 植物细胞中的活性氧及其生理作用 [J]. 植物生理学通讯,41(2):235-241.]
- UCHIDA K, 2003. 4-Hydroxy-2-nonenal: a product and mediator of oxidative stress[J]. Prog Lipid Res, 42(4):318-343.
- WU X, WANG SW, CAO D, et al, 2015. Influence of overexpression of 2-alkenal reductase gene on drought resistance in tobacco [J]. Acta Bot Boreal-Occident Sin, 35(6):1 166-1 172. [吴茜,王仕稳,曹丹,等,2015. 超表达拟南芥2-烯醛还原酶基因对烟草抗旱性的作用机理分析 [J]. 西北植物学报,35(6): 1 166-1 172.]
- XUE X, ZHANG Q, WU JX, 2013. Research of reactive oxygen species in plants and its application on stress tolerance [J]. Biotechnol Bull, (10):6-11. [薛鑫,张芊,吴金霞,等,2013. 植物体内活性氧的研究及其在植物抗逆方面的应用 [J]. 生物技术通报,29(10):6-11.]
- YAMAUCHI Y, FURUTERA A, SEKI K, et al, 2008. Malondialdehyde generated from peroxidized linolenic acid causes protein modification in heat-stressed plants [J]. Plant Physiol Biochem, 46(8-9):786-793.
- YAMAUCHI Y, HASEGAWA A, TANINAKA A, et al, 2011. NADPH-dependent reductases involved in the detoxification of reactive carbonyls in plants [J]. J Biol Chem, 286(9):6 999-7 009.
- YAMAUCHI Y, SUGIMOTO Y, 2010. Effect of protein modification by malondialdehyde on the interaction between the oxygen-evolving complex 33 kDa protein and photosystem II core proteins [J]. Planta, 231(5):1 077-1 088.
- YIN LN, MANO J, WANG SW, et al, 2010. The involvement of lipid peroxide-derived aldehydes in aluminum toxicity of tobacco roots [J]. Plant Physiol, 152(3):1 406-1 417.
- ZHANG HL, SHANG C, LI JK, et al, 2010. Studies on transformation of aldehyde dehydrogenase (ALDH) into tomato [J]. Chin Agric Sci Bull, 26(13):23-29. [张海玲,尚晨,李侗,等,2010. 乙醛脱氢酶基因(ALDH)转化番茄的研究 [J]. 中国农学通报,26(13):23-29.]
- ZHANG WL, WEI LQ, WANG LS, et al, 2000. Oxidative damage of active oxygen on biomacromolecules [J]. J Henan Norm Univ: Nat Sci Ed, 28(4):69-71. [张文玲,魏丽勤,王林嵩,等,2000. 活性氧对生物大分子的氧化性损伤 [J]. 河南师范大学学报·自然科学版,28(4):69-71.]
- (上接第 697 页 Continue from page 697)
- 高立志, 2010. 云南古茶园栽培大叶茶和大理茶群体的叶绿体 [J]. 云南植物研究, 32(5): 427-434.]
- MENG LY, YANG HL, WU GL, et al, 2008. Genetic structure and phylogeography of populations of *Alsophila podophyllain* Hainan and Guangdong, southern China, based on cpDNA trnL-F noncoding sequences [J]. J Syst Evol, 46(1): 32-20. [孟丽华, 杨慧玲, 吴桂丽, 等, 2008. 基于叶绿体 DNA trnL-F 序列研究肋果沙棘的谱系地理学 [J]. 植物分类学报, 46(1): 32-20.]
- MORITZ C, 1994. Defining "Evolutionarily Significant Units" for conservation [J]. Trend Ecol Evol, 9(10): 373-375.
- OUBORG NJ, PIQUOT Y, VAN GROENENDAEL JM, 1999. Population genetics, molecular markers and the study of dispersal in plants [J]. J Ecol, 87(4): 551-568.
- PETIT RJ, DUMINIL J, FINESCHI S, et al, 2005. Comparative organization of chloroplast, mitochondrial and nuclear diversity in plant populations [J]. Mol Ecol, 14(3): 689-701.
- SU YJ, WANG T, ZHENG B, et al, 2004. Genetic structure and phylogeography of populations of *Alsophila podophyllain* Hainan and Guangdong, southern China, based on cpDNA trnL-F noncoding sequences [J]. Acta Ecol Sin, 24(5): 914-919. [苏应娟, 王艇, 郑博, 等, 2004. 根据 cpDNA trnL-F 非编码区序列变异分析黑桫椤海南和广东种群的遗传结构与系统地理. 生态学报, 24(5): 914-919.]
- WANG FY, GONG X, HU CM, et al, 2008. Phylogeography of an alpine species *Primula secundiflora* inferred from the chloroplast DNA sequence variation [J]. Acta Phytotax Sin, 46(1):13-22.