

文章编号: 1674 - 7054(2012)02 - 0116 - 05

拟南芥 *AtNUDT2* 启动子的分离及其功能分析张秀春^{1,2}, 吴坤鑫¹, 孙建波¹, 夏亦芥¹, 彭明^{1,2}, 李文彬¹(1. 中国热带农业科学院 热带生物技术研究所 / 农业部热带作物生物学与遗传资源利用重点实验室, 海南 海口 571101;
2. 农业部转基因植物及植物用微生物环境安全监督检验检疫测试中心, 海南 海口 571101)

摘要: 根据已发表的拟南芥基因组序列设计合成 1 对引物, 以拟南芥基因组 DNA 为模板克隆 *AtNUDT2* 上游非编码区, 并将其与 pBAR-GUS3 相连, 构建了植物表达载体 *pNUDT2P-GUS*。采用以农杆菌 GV3101 介导的渗透法转化野生型拟南芥, 通过除草剂筛选获得了一批抗性纯合子转基因植株。然后对转基因植株(2 周幼苗)进行 GUS 活性的组织化学染色分析, 并对 3.5~4 周的转基因植株叶片进行病原菌诱导表达分析。结果表明, 已获得 *AtNUDT2* 启动子, 且该启动子为组成型表达启动子; 病原菌 *Pst. DC3000* 及 *Pst. DC3000 AvrB* 对该启动子没有诱导作用。

关键词: 启动子; *AtNUDT2*; 克隆; GUS 染色

中图分类号: Q 785 **文献标志码:** A

Nudix(nucleoside diphosphates linked to some moiety X) 水解酶是需要 Mg^{2+} 的一类酶, 它广泛存在于病毒、细菌、真核生物(包括植物和人类)等 250 多种生物中; 它催化与其他基团(- X) 结合的核苷二磷酸(NDPX)的水解, 产物为 NMP + P - X。这类酶的共同特征是含有高度保守的由 23 个氨基酸残基组成的 Nudix 基序(motif/box) [1]。目前, 国内外对细菌和人类 Nudix 水解酶的研究表明: 大肠杆菌 MutT 具有抑制突变的作用 [2]; 人类 NUDT1 的突变容易导致癌症发生; 人类 NUDT21 可以水解加帽 mRNA; 细菌和人类 Nudix 水解酶至少具有两大功能, 一是清除细胞内产生的有害代谢产物; 二是调节各生化途径的中间代谢产物的积累 [1, 3-4]。对拟南芥基因组进行全序列分析, 发现拟南芥存在 24 个 Nudix 水解酶基因(命名为 *AtNUDTs*) [5], 分别分布于细胞质(*AtNUDT1* - 11)、叶绿体(*AtNUDT12* - 18) 和线粒体(*AtNUDT19* - 24) 中。目前, 研究人员对 Nudix 水解酶基因家族的了解, 还不够充分, 甚至在某些认识上存在矛盾 [6-11]。Takahisa Ogawa 等曾报道, 过量表达 *AtNUDT2* 能够提高拟南芥的抗氧化能力 [10], 但没有 *AtNUDT2* 启动子的相关报道。为此, 笔者从拟南芥基因组中克隆 *AtNUDT2* 上游非编码区, 并对该非编码区进行功能研究。

1 材料与方 法

1.1 材 料 拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) 为本实验室保存的哥伦比亚生态型; 实验用的大肠杆菌(*E. coli*) DH5 α 、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101 和载体 pBAR-GUS, 病原菌 *Pst. DC3000* 及 *Pst. DC3000 AvrB* 为本实验室保存; pMD18 - T vector 购自 TaKaRa 公司。各种限制性内切酶、连接酶等购自 Promega 公司, 生化试剂购自 Sigma 公司。

1.2 引物合成 DNA 引物由上海生工生物工程有限公司合成。

47650p5: AACCGGTGAGATTTATACCTGAGAGAGAGAC

收稿日期: 2010 - 12 - 29

基金项目: 国家自然科学基金(30760196, 31070608); 中央级公益性科研院所基本科研业务专项资金, 中国热带农业科学院院本级(1630052012007) 及热带生物技术研究所(ITBBZX0811) 项目资助

作者简介: 张秀春(1972 -), 女, 福建永定人, 中国热带农业科学院热带生物技术研究所副研究员。

通信作者: 李文彬, E-mail: liwenbin@itbb.org.cn

47650p3: AACTAGTGGTGGAGCAACTGTGAAACG

1.3 总 DNA 提取方法 (1) 质粒提取、DNA 片段克隆、重组质粒鉴定的操作参考文献 [12]。(2) 采用 TIANGEN 公司回收试剂盒,按说明书进行 DNA 片段回收。(3) 采用 CTAB 法提取^[12]拟南芥总 DNA。

1.4 获取抗性植株 (1) 采用渗透法转化拟南芥^[13]。(2) 抗性植株的筛选 将收集的拟南芥种子晒干后,均匀地撒在已用除草剂 [$25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ glufosinate, 配制方法为 $150 \mu\text{L}$ RELY (18.19% glufosinate ammonium) 定容至 1 L] 浸泡过的培养基质上。 $4 \text{ }^\circ\text{C}$ 下暗培养 2 d 后,置于培养条件为 $22 \sim 24 \text{ }^\circ\text{C}$, 16 h 光照的培养室培养。

1.5 抗性植株 PCR 检测 采用 NaOH 法快速提取植物基因组 DNA,以基因组 DNA 为模板,以 BAR-219F (GGTCTGCACCATCGTCAACCACTACA) 和 BAR-671R (GGCAGGCTGAAGTCCAGCTGCCAGAA) 为引物,反应体系参照产品说明书进行 PCR 检测。反应条件为: $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 5 min; $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 40 s; $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 30 s; $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 40 s; 25 个循环; 最后 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 5 min。PCR 产物经 $w = 1\%$ 的琼脂糖凝胶电泳分离。

1.6 病原菌的培养和接种 病原菌 DC3000 的培养和接种参考文献 [14] 进行,具体为: 将菌种在固体 King's Medium (含 $\text{Rif } 50 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 平板划线 $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 培养 24 h,挑取单菌落转入 40 mL King's Medium 的液体培养基里 $28 \text{ }^\circ\text{C}$ 摇床振荡培养,直至 $OD_{600} = 0.6$ 时,培养好的病原菌作备用处理。将培养好的病原菌用 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MgCl_2 稀释至 $OD_{600} = 0.1$ 后,使用没有针头的注射器接种病原菌。接种方法: 将注射器口紧贴叶片背面,用力缓慢推注射器使菌液完全注入每片叶片的右半边,直至接种处叶片湿润为止。每个株系接种 6 个重复 (6 棵),每个重复接种 3 片叶子,分别取注射后 1, 5, 24 h 的叶片进行 GUS 活性的组织化学染色分析,以注射 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MgCl_2 为对照。本研究做了 8 个独立的转基因株系,重复 3 次。

1.7 GUS 活性的组织化学染色分析 从经除草剂抗性筛选后获得的抗性植株中,选择 T2 代种子抗性筛选存活比率为 3:1 的 2 周幼苗,与 T2 代 GUS 呈阳性的 8 个株系进行自花授粉产生的 T3 代纯合子 4 周幼苗进行病原菌注射,注射后的叶片进行 GUS 活性的组织化学染色分析^[15]。具体方法为: 将待检测的样品放入底物 X-Gluc ($1.0 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ X-Gluc; $\text{pH} 7.0$ 的 $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸缓冲液; $\text{pH} 8.0$ 的 $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA-Na; $\varphi = 20\%$ 的甲醇; $\varphi = 0.1\%$ 的 Triton X-100; $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 巯基乙醇) 的染色反应液中,于 $37 \text{ }^\circ\text{C}$ 保温过夜进行组织化学染色,然后用 $\varphi = 50\%$ 的乙醇进行脱色。

2 结果与分析

2.1 *AtNUDT2* 启动子的分离、克隆和测序 根据 GenBank 序列,设计 *AtNUDT2* 上游非编码区的特异引物 47650p5 和 47650p3,以拟南芥基因组 DNA 为模板,进行 PCR 扩增。反应条件为: $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 预变性 5 min; $94 \text{ }^\circ\text{C}$ 变性 50 s; $55 \text{ }^\circ\text{C}$ 退火 40 s; $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 90 s; 25 个循环; 最后 $72 \text{ }^\circ\text{C}$ 延伸 10 min。PCR 产物经 $w = 10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 的琼脂糖凝胶电泳分离,得到约 1400 bp 的特异扩增产物,大小与预期一致 (见图 1)。将其与 pMD18-T 载体连接后,在含 X-gal 和 IPTG 的固体 LB 培养基上进行重组子的筛选,并对其中的 2 个白斑进行 PCR 和酶切鉴定。PCR 鉴定结果见图 1 所示,以 47650p5 和 47650p3 为引物,从 2 个白斑提取的质粒为模板的 PCR 扩增产物与基因组 DNA 为模板的 PCR 扩增产物大小相同,均在 1000 bp 和 2000 bp 之间出现 1 条明亮条带,这说明待鉴定的质粒含有与基因组扩增产物相同的片段。重组质粒双酶切鉴定结果见图 2, *Age* I 和 *Spe* I 双酶切切下了与预期大小相一致的片段。该片段经测序,确认与 GenBank 的完全一致 (图略),得到含有 *AtNUDT2* 上游非编码区的克隆载体,命名为 *pNUDT2P*。

2.2 植物表达载体的构建 将克隆载体 *pNUDT2P* 用 *Age* I 和 *Spe* I 双酶切,回收得到 1400 bp 目的片段,与经同样双酶切的 pBAR-GUS 相连,获得的重组质粒以 47650p5 和 47650p3 为引物进行 PCR 鉴定,结果如图 3 所示,并用 *Age* I 和 *Spe* I 双酶切鉴定该重组子,结果如图 4 所示。PCR 鉴定和酶切结果均证明重组质粒的构建是正确的,经测序,确认获得了以 *GUS* 为报告基因的植物表达载体,命名为 *pNUDT2P-GUS*。该载体转入农杆菌 GV3101 后,用于拟南芥转化。

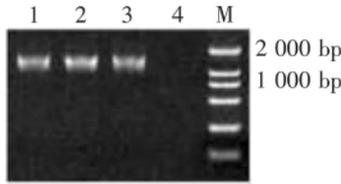


图 1 *AtNUDT2* 上游非编码区 PCR 扩增和重组质粒 *pNUDT2P* 的 PCR 鉴定

1:基因组 DNA 为模板的 *AtNUDT2* 上游非编码区 PCR 扩增产物;2~3:重组质粒 *pNUDT2P* 为模板的 PCR 扩增产物;4:ddH₂O 为模板的扩增产物;M: DNA Marker

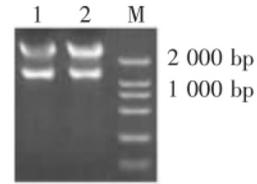


图 2 重组质粒 *pNUDT2P* 酶切鉴定
1~2:重组质粒 *pNUDT2P/Age I + Spe I* ;
M: DNA Marker

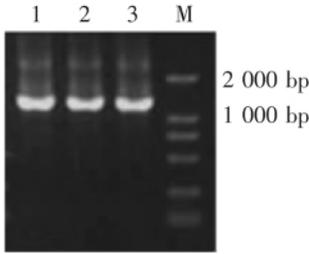


图 3 重组质粒 *pNUDT2P-GUS* 的 PCR 鉴定

1:质粒 *pNUDT2P* 为模板的 PCR 扩增产物;2~3:质粒 *pNUDT2P-GUS* 为模板的 PCR 扩增产物;M: DNA Marker

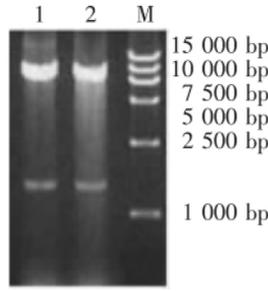


图 4 重组质粒 *pNUDT2P-GUS* 的酶切鉴定

1~2 :重组质粒 *pNUDT2P-GUS / Age I + Spe I* ;M: DNA Marker

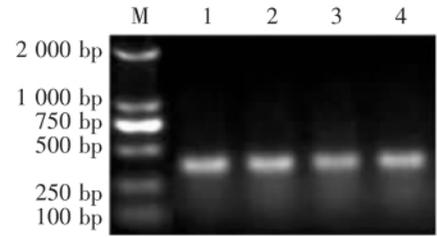


图 5 转基因植株的 PCR 鉴定

M:DL2000 DNA ladder; 1:质粒 *pNUDT2P-GUS* PCR 扩增产物;2~4:拟南芥抗性植株 PCR 扩增产物

2.3 抗性植株 PCR 检测 用渗透转化法 将 *AtNUDT2* 上游非编码区及 *GUS* 报告基因转入拟南芥 经除草剂抗性筛选获得 58 株抗性植株。用引物 BAR - 219F 和 BAR - 671R 对抗性植株进行 PCR 检测 ,部分结果如图 5 所示。由图 5 可见 检测植株的扩增结果均与质粒 *pNUDT2P-GUS* 的扩增结果相同 在 250 ~ 500 bp 之间出现 1 条明亮条带 ,大小与预期一致 这证明抗性植株均含有 *bar* 基因片段 ,说明获得了转基因植株。

2.4 *AtNUDT2* 上游非编码区在拟南芥中的组织特异性表达 对以上筛选的 *bar* 基因阳性的 T₂ 代转基因材料(2 周的幼苗) 进行 *GUS* 组织化学染色 结果显示 *AtNUDT2* 在真叶中均有表达 ,且在叶脉中的表达量比较高(见图 6A) ,但在茎中不表达或表达很低 (见图 6B)。

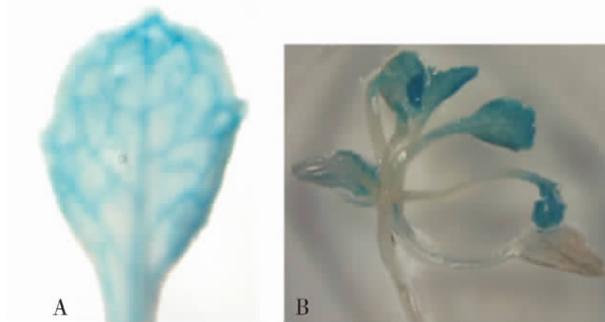


图 6 *AtNUDT2* 启动子在拟南芥中的表达
A:真叶; B: 幼苗

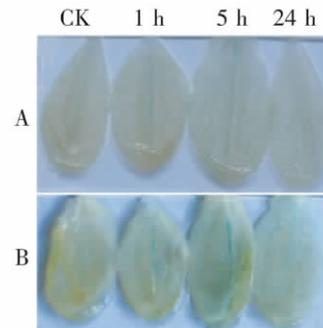


图 7 病原菌 *Pst.DC3000* 及 *Pst.DC3000 AvrB* 对 *AtNUDT2* 启动子的诱导表达
A:病原菌 *Pst.DC3000* 诱导;B:病原菌 *Pst.DC3000 AvrB* 诱导

2.5 病原菌 *Pst. DC3000* 及 *Pst. DC3000 AvrB* 对 *AtNUDT2* 启动子的诱导表达分析 为检测病原菌

Pst. DC3000 及 *Pst.* DC3000 *AvrB* 是否对 *AtNUDT2* 启动子具有诱导作用, 笔者分别用 *Pst.* DC3000 及 *Pst.* DC3000 *AvrB* 注射 T2 代 GUS 呈阳性的 8 个株系进行自花授粉产生的 T3 代纯合子 3.5 ~ 4 周幼苗的叶片进行诱导表达分析。分别取注射后 1, 5, 24 h 的叶片进行 GUS 活性的组织化学染色分析, 以注射 10 mmol · L⁻¹ 的 MgCl₂ 为对照 (CK), 结果见图 7。结果表明, 转基因植株右半边的叶片病原菌诱导后 1, 5, 24 h 的 GUS 的表达与左半边没有注射的对照没有区别。

3 结 论

Nudix 是真核生物中广泛存在的水解酶, *AtNUDT2* 分布于细胞质中。目前, 关于 *AtNUDT2* 的研究报道不多, 对其功能不是很清楚。本研究以拟南芥基因组 DNA 为模板克隆了 *AtNUDT2* 上游非编码区, 并将其与 pBAR-GUS₃ 相连, 构建了植物表达载体 *pNUDT2P-GUS*, 采用以农杆菌 GV3101 为介导的渗透法转化野生型拟南芥, 然后通过除草剂筛选获得了一批抗性转基因植株。对转基因植株 2 周幼苗进行 GUS 活性的组织化学染色分析, 并对 3.5 ~ 4 周的转基因植株叶片进行病原菌诱导表达分析, 其结果显示, 已获得 *AtNUDT2* 启动子, 且该启动子为组成型表达的启动子; 与 Takahisa 等的研究报道 (*AtNUDT2* 在根、茎和叶中的转录水平基本一致) 不同^[4], 本研究结果显示 *AtNUDT2* 启动子在叶中的活性比根、茎中的高 (见图 6)。这可能是不同的培养条件引起的。Jambunathan 等报道野生型拟南芥 (Col-0) 的 *AtNUDT2*, *AtNUDT6* 和 *AtNUDT7* 在营养丰富程度不同的培养基质培养表达水平是有差异的^[16]。本研究还表明, 病原菌 *Pst.* DC3000 及 *Pst.* DC3000 *AvrB* 对该启动子驱动的 GUS 表达没有诱导作用, 这与 Adams-Phillips 等的报道一致^[17]。本研究结果将为 *AtNUDT2* 的功能研究打下基础。

参考文献:

- [1] MCLENNAN A G. The Nudix hydrolase superfamily [J]. *Cell Mol Life Sci*, 2006, 63(2): 123 - 143.
- [2] BESSMAN M J, FRICK D N, O'HANDLEY S F. The MutT proteins or "Nudix" hydrolases, a family of versatile, widely distributed, "housecleaning" enzymes [J]. *J Biol Chem*. 1996, 271(41): 25059 - 25062.
- [3] MCLENNAN A G, CARTWRIGHT J L, GASMI L. The human NUDT family of nucleotide hydrolases: Enzymes of diverse substrate specificity [J]. *Adv Exp Med Biol* 2000 486: 115 - 118.
- [4] OGAWA T, UEDA Y, YOSHIMURA K, et al. Comprehensive analysis of cytosolic Nudix hydrolases in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Biol Chem* 2005 280(26): 25277 - 25283.
- [5] KLAUS S M, WEGKAMP A, SYBESMA W, et al. A Nudix enzyme removes pyrophosphate from dihydroneopterin triphosphate in the folate synthesis pathway of bacteria and plants [J]. *J Biol Chem*, 2005 280(7): 5274 - 5280.
- [6] YOSHIMURA K, OGAWA T, UEDA Y, et al. At-NUDX1, an 8-oxo-7-β-dihydro-2'-deoxyguanosine 5'-triphosphate pyrophosphohydrolase, is responsible for eliminating oxidized nucleotides in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell Physiol* 2007 48: 1438 - 1449.
- [7] OLEJNIK K, KRASZEWSKA E. Cloning and characterization of an *Arabidopsis thaliana* Nudix hydrolase homologous to the mammalian GFG protein [J]. *Biochim Biophys Acta*. 2005 1752(2): 133 - 141.
- [8] JAMBUNATHAN N, MAHALINGAM R. Analysis of Arabidopsis Growth Factor Gene 1 (*GFG1*) encoding a Nudix hydrolase during oxidative signaling [J]. *Planta* 2005(3): 1 - 11.
- [9] BARTSCH M, GOBBATO E, BEDNAREK P, et al. Salicylic acid-independent ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY1 signaling in Arabidopsis immunity and cell death is regulated by the monooxygenase FMO1 and the Nudix hydrolase NUDT7 [J]. *Plant Cell*. 2006, 18: 1038 - 1051.
- [10] OGAWA T, ISHIKAWA K, HATADA K, et al. Overexpression of an ADP-ribose pyrophosphatase, *AtNUDX2*, confers enhanced tolerance to oxidative stress in Arabidopsis plants [J]. *The Plant Journal*, 2009 57: 289 - 301.
- [11] DE BLOCK M, VERDUYN C, DE BROUWER, et al. Poly(ADP-ribose) polymerase in plants affects energy homeostasis, cell death and stress tolerance [J]. *Plant J* 2005, 41: 95 - 106.
- [12] SAMBROOK J, RUSSELL D W. 分子克隆实验指南 [M]. 3 版. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚基, 等译. 北京: 科学出版社, 2002: 27 - 30.
- [13] 张秀春, 李文彬, 夏亦芬, 等. *AtNUDT8* 过量表达的拟南芥转基因植株 [J]. *热带生物学报*, 2010, 1(1): 8 - 11.

- [14] WHALEN M C , INNES R W , BENT A F , et al. Identification of pseudomonas syringae pathogens of Arabidopsis and a bacterial locus determining avirulence on both Arabidopsis and soybean [J]. Plant Cell ,1991 ,3(1) : 49 – 59.
- [15] JEFFERSON R A , KAVANAGH T A , BEVAN M W. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higherplants [J]. EMBO J ,1987 (6) : 3901 – 3907.
- [16] JAMBUNATHAN N , PENAGANTI A , TANG Y , et al. Modulation of redox homeostasis under suboptimal conditions by Arabidopsis Nudix hydrolase 7 [J]. BMC Plant Biol ,2010 ,10: 173.
- [17] ADAMS – PHILLIPS L , WAN J , TAN X , et al. Discovery of ADP-ribosylation and other plant defense pathway elements through expression profiling of four different Arabidopsis-Pseudomonas R-avr interactions [J]. Mol Plant Microbe Interact , 2008 21(5) : 646 – 57.

Cloning and Functional Analysis of Promoter *AtNUDT2* in *Arabidopsis thaliana*

ZHANG Xiu-chun^{1 2} , WU Kun-xin¹ , SUN Jian-bo¹ , XIA Yi-ji¹ , PENG Ming^{1 2} , LI Wen-bin

(1. Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology , Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences , and Key Laboratory of Biology and Genetic Resources of Tropical Crops , Ministry of Agriculture , Haikou 571101 , China; 2. Environmental Safety Supervision and Inspection Centre for Genetically Modified Plants and Microorganisms used in Plants , Ministry of Agriculture , Haikou 571101 , China)

Abstract: 5' -UTR of *AtNUDT2* was cloned by PCR from *Arabidopsis thaliana* and inserted into pBAR-GUS to form a recombinant construct pNUDT2P-GUS. The construct was then used to transform wide-type *A. thaliana* through *Agrobacterium tumefaciens* by mediating. A batch of transgenic *A. thaliana* with 5' -UTR of *AtNUDT2* was obtained through glufosinate screening. The transgenic plants (2 weeks old) were then histochemically stained to assess their GUS activity , and the leaves of the 3.5 ~4 weeks old plants were inoculated with pathogens to observe their pathogenic expression. The results showed the promoter of *AtNUDT2* produced is constitutive. Furthermore , the expression of the promoter were not induced by the *Pst.* DC3000 and *Pst.* DC3000 *AvrB*.

Key words: promoter; *AtNUDT2*; clone; GUS staining