

李想, 林智敏, 陈在杰, 等. 水稻 Rubisco 激酶基因叶绿体转运肽增强转基因表达 [J]. 福建农业学报, 2013, 28 (2): 95-100.
LI X, LIN Z-M, CHEN Z-J, et al. Chloroplast Targeting Signal of a Rice Rubisco Activase Gene Enhances Transgene Expression [J].
Fujian Journal of Agricultural Sciences, 2013, 28 (2): 95-100.

水稻 Rubisco 激酶基因叶绿体转运肽增强转基因表达

李 想^{1,2}, 林智敏², 陈在杰², 王成虎², 刘 霞², 王 锋^{1,2}

(1. 福建师范大学生命科学学院, 福建 福州 350000;

2. 福建省农业科学院生物技术研究所, 福建 福州 350003)

摘 要: 将水稻 RCA 基因 N 端预测的转运肽 (TP) 序列融合报告基因 GFP, 构建瞬时表达载体 pGD-RCATP-GFP, 转化农杆菌后, 注射侵染烟草叶片, 通过荧光显微镜观察瞬时表达情况, 结果表明外源蛋白 GFP 定位在叶绿体上, 依此预测水稻 RCA 基因 N 端 48 aa 为叶绿体转运肽。将该序列与报告基因 GUS 融合, 构建植物表达载体 p1300-RCATP-AGS, 转化水稻后, 检测阳性株叶片的 GUS 酶活, 其 GUS 蛋白表达效率是未连有叶绿体转运肽的转基因植物的 4.2 倍左右。

关键词: RCA (二磷酸核酮糖羧化酶激酶); 叶绿体转运肽; GUS 酶活分析

中图分类号: Q 78; S 511

文献标识码: A

Chloroplast Targeting Signal of a Rice Rubisco Activase Gene Enhances Transgene Expression

LI Xiang^{1,2}, LIN Zhi-min², CHEN Zai-jie², WANG Cheng-hu², LIU Xia², WANG Feng^{1,2}

(1. School of Life Sciences, Fujian Normal University, Fuzhou, Fujian 350000, China;

2. Biotechnology Institute, Fujian Academy of Agricultural Sciences, Fuzhou, Fujian 350003, China)

Abstract: N-terminal sequence of the protein encoded by rice RCA gene was predicted to be a chloroplast transit peptide. The 144bp fragment of this gene was fused with GFP to construct a transient expression vector pGD-RCATP-GFP for genetic transformation. Transient transformation of tobacco was produced by the *Agrobacterium*-mediated infiltration method. Fluorescence microscopy analyses demonstrated that, in cells expressing the RCATP::GFP fusion protein, the fluorescence was specifically targeted to chloroplast. Then this fragment was fused with GUS to construct a vector p1300-RCATP-AGS for genetic transformation. To analyze GUS activity for the leaves of the positive plants, we discovered that the RCA TP sequence increased GUS protein expression levels about 3 fold, when compared to without RCA TP sequence.

Key words: RCA (Rubisco activase); chloroplast transit peptide; GUS activity analysis

Rubisco (1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶) 是光合作用植物叶片中含量最丰富的蛋白。它是植物光合作用过程中固定 CO₂ 的关键酶, 并参与植物的光呼吸代谢途径, 消耗植物光合作用合成的有机物^[1]。Rubisco 激酶 (Rubisco activase, RCA) 是细胞核编码的叶绿体蛋白, 普遍存在于高等植物、绿藻和部分光合细菌中^[2]。RCA 是维持和调节 Rubisco 活性必需的酶, 它的活力直接影响着 Rubisco 的活力。RCA 属于 AAA⁺ (ATPase associated to a variety of cellular activities) 蛋白家

族成员, 具有 ATPase 活性^[3], 其催化作用能使 Rubisco 活性位点与磷酸糖类物质结合, 最大程度地抑制 Rubisco 活性降低的不利效应^[4]。

大部分的叶绿体蛋白前有一段 N 端序列, 称为转运肽 (TP Transit peptide), 它能够使蛋白定位于叶绿体。大多数转运肽不仅携带叶绿体蛋白, 而且可以携带外源蛋白进入叶绿体^[5]。水稻 RCA 也存在转运肽, Yuzo Nozu 等^[6]用 2-D 电泳和质谱分析水稻叶片蛋白发现 RCA 的氨基酸序列存在 2 个可能的叶绿体转运肽切割位点, 分别是: 48

收稿日期: 2012-11-12 初稿; 2013-01-22 修改稿

作者简介: 李想 (1982-), 女, 硕士研究生, 主要从事植物分子生物学研究

通讯作者: 王锋 (1963-), 男, 博士, 研究员, 主要从事植物基因工程研究 (E-mail: wf@fjage.org)

基金项目: 福建省科技计划项目——省属公益类科研院所基本科研专项 (2011R1021-3)

(Ala) -49 (Lys) 和 76 (Ile) -77 (Thr)。可是关于其中哪个位点才是叶绿体转运肽的正确切割位点还不清楚。目前关于叶绿体转运肽提高外源蛋白表达的研究主要集中在 Rubisco 小亚基 (rbcS) 的转运肽上^[7-8], 而对于水稻 RCA 的转运肽能否增强外源蛋白在水稻中的表达水平尚未见报道。

本研究首先通过生物信息学方法推测水稻 RCA 叶绿体转运肽的切割位点为 48 (Ala) -49 (Lys), 通过融合 PCR 构建 RCA TP::GFP 表达载体注射烟草, 证实推测的水稻 RCA 基因的叶绿体转运肽能够将外源蛋白定位在叶绿体上; 其后构建 RCA TP::GUS 表达载体转化水稻, 分析转基因植株叶片的 GUS 蛋白表达水平, 发现水稻 RCA TP 能够提高外源 GUS 基因的表达。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 水稻转化材料为日本晴 (*Oryza Sativa japonica*), 烟草材料为本氏烟草 (*Nicotina benthamiana*)。

1.1.2 菌种及质粒 大肠杆菌 DH5 α , 农杆菌 LBA4404、GV3101, 载体质粒 p1300-AGS, pGD-GFP^[9]均由本实验室保存。

1.1.3 试剂 各种生化试剂和酶分别购自上海生工、大连宝生物和 Sigma 公司。总蛋白测定试剂盒购自 Solarbio 公司 (Cat. No. PC0010)。

1.2 方法

1.2.1 DNA 片段克隆、重组和质粒的提取鉴定 DNA 片段克隆、重组和质粒的提取鉴定参照分子克隆实验指南^[10]。

1.2.2 农杆菌介导水稻转化 农杆菌介导的水稻转化方法参照实验室已完成的工作^[11]。

1.2.3 农杆菌注射转化烟草瞬时表达

(1) 带有载体质粒的农杆菌菌株在含相应抗生素的 LB 平板上划线复苏, 挑取单菌落在含相同抗生素的 LB 液体培养基中 28℃ 摇菌 16~24 h; (2) 菌液经 5 000 r·min⁻¹ 离心弃去 LB 培养基, 用重悬液 (10 mmol MgCl₂, 10 mmol MES) 重悬农杆菌, 添加乙酰丁香酮 (As) 至终浓度 150 μ mol·L⁻¹, 悬浮液的浓度调整至 OD₆₀₀ 值为 0.6 左右, 25~28℃ 静置活化 3 h; (3) 用一次性注射器去除针头吸取 1 mL 菌液, 以手指抵住烟草 (1 月龄) 叶片下部, 轻轻用力将注射器内菌液压送并渗透到叶片组织中, 用标记笔标记注射部位; (4) 将注射后的烟草培养 72 h 后, 剪取标记部位叶片

提取原生质体, 荧光显微镜观察。

1.2.4 烟草原生质体提取 烟草原生质体提取方法参照文献^[13]。

1.2.5 烟草原生质体的荧光显微镜观察 用荧光显微镜 (Nikon Ci) 观察叶肉细胞原生质体中 GFP 的表达, 观察时物镜放大倍数为 40 倍。使用 B-1E (EX 470~490 nm, DM 505 nm, BA 520~560 nm) 和 GFP-L (EX 460~500 nm, DM 505 nm, BA 510 nm) 2 个档位进行荧光观察。

1.2.6 潮霉素磷酸转移酶 (*hpt*) 基因 PCR 检测

(1) 合成 *hpt* 内部引物: 正向引物 *hpt*-F: 5'-TACACAGCCATCGGTCCAGA-3', 反向引物 *hpt*-R: 5'-TAGGAGGGCGTGGATATGTC-3', 扩增产物片段长度为 832 bp; (2) 扩增反应体系: 模板 DNA: 30~90 ng; 10×Buffer: 2 μ L; 2.5 mmol·L⁻¹ dNTP: 1.5 μ L; 引物 (10 pmol·L⁻¹): 各 1 μ L; *Taq* 酶 (2.5 U· μ L⁻¹): 0.4 μ L; 水补足至 25 μ L; (3) PCR 程序: 94℃ 5 min; {94℃ 45s, 56℃ 45s, 72℃, 45s} 32 cycles; 72℃ 10 min; (4) 电泳: 取 PCR 产物 5 μ L 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测并拍照。

1.2.7 GUS 组织化学检测 分别取水稻转基因植株和野生型日本晴植株的根、茎、叶, 按照 Jefferson^[13]的方法, 将待检测组织浸入 GUS 染色液中, 37℃ 保温 2 h 观察。

1.2.8 GUS 蛋白的提取和活性检测 定义 GUS 酶活力: 每分钟水解 4-MUG 成 1 pmol 的 4-MU 的酶量为 1 个酶活单位 U; GUS 表达活性以每毫克总蛋白中的 GUS 酶活力表示: 4-MU pmol·min⁻¹·mg⁻¹。

将 100 mg 左右的水稻分蘖期叶片在 600 μ L GUS 提取液 (50 mmol·L⁻¹ 磷酸缓冲液, pH 7.0; 10 mmol·L⁻¹ EDTA; 0.1% Triton X-100) 中加小钢珠打成匀浆, 离心后取上清液测定 GUS 表达活性, 每个设定 3 个重复, 并设定对照。其中 GUS 酶活力测定: 从上清液中吸取 50 μ L 至 50 μ L GUS 反应液 (2 mmol·L⁻¹ MUG) 中, 37℃ 反应 20 min, 加入 900 μ L 反应终止液 (0.2 mol Na₂CO₃) 并用荧光分光光度计 (ThermoFisher-374) 测定。总蛋白含量的测定使用 Solarbio 公司 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒进行。

2 结果与分析

2.1 水稻 RCA 基因叶绿体转运肽序列预测分析

将水稻 RCA 基因氨基酸序列利用 TargetP

(<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP>) 预测，发现全长 466 aa 序列中具有叶绿体转运肽，并且切割位点可能位于第 47 个残基附近（图 1）。

因此推测水稻 RCA TP 的切割位点为 48（Ala）- 49（Lys），这段转运肽碱基长度为 144 bp，并将其命名为 RCA TP。

Name	Len	cTP	mTP	SP	other	Loc	RC	TPlen
Sequence	466	0.785	0.072	0.162	0.285	C	3	47
cutoff		0.000	0.000	0.000	0.000			

图 1 TargetP 预测分析结果

Fig. 1 Result of TargetP analysis

注：Len. 为提交的水稻 RCA 氨基酸序列长度；cTP. 为该序列含有叶绿体转运肽的概率；TPlen. 为该序列叶绿体转运肽可能的切割位点。

2.2 载体构建

2.2.1 注射烟草瞬时表达载体的构建 通过融合 PCR 将 RCATP 和 GFP 融合起来，根据 RCATP 序列设计融合 PCR 引物，以合成 RCATP 为模板，扩增目的片段。其中正向引物 RCATP-F 为 5'-ATAGTTAACATGGCTGCTGCCTTCTCC-3'（含 *HpaI* 限制性内切酶位点），反向引物 RCATP-R 为 5'-TCCTCGCCCTTGCTCACCATGGCCATCACCTTGAACCT-3'（含 20 bp GFP 首序列）。扩增产物，回收目的片段 173 bp。同时根据 GFP 序列设计融合 PCR 引物，以 pGD-GFP 载体质粒为模板，扩增 GFP 片段。其中正向引物 GFP-F 为 5'-ACAGGTTCAAGGTGATGGCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGAG-3'（含 20 bp RCATP 尾序

列），反向引物 GFP-R 为 5'-TTACTTGTACAGCTCGTCCATG-3'。扩增产物，回收目的片段 740 bp。将获得的 2 个目的片段进行融合 PCR 拼接，得到 RCATP：GFP 目的片段 913 bp。经 *HpaI* 限制性内切酶酶切补平后与经 *BamHI* 和 *NcoI* 双酶切后 T4 外切酶补平的 pGD-GFP 载体片段连接，构建 CaMV35S 强启动子驱动 RCATP::GFP 的烟草瞬时表达载体 PGD-RCATP-GFP（图 2）。

2.2.2 转化水稻稳定表达载体的构建 载体 p1300-AGS 经 *NcoI* 限制性内切酶酶切 T4 外切酶补平后与合成的 RCA TP 片段连接，构建 Actin 启动子驱动 RCATP：GUSA 的水稻稳定表达载体 p1300-RCATP-AGS 如（图 3）。

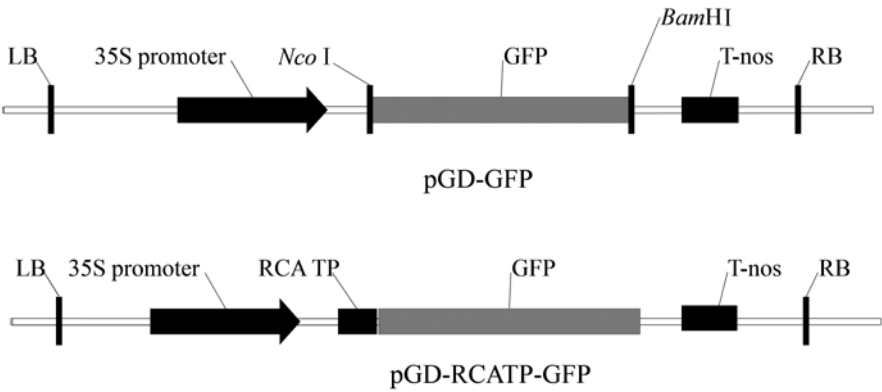


图 2 瞬时表达载体 pGD-RCATP-GFP 图谱

Fig. 2 Map of the expression vector pGD-RCATP-GFP

2.3 报告基因 GFP 的表达和亚细胞定位

荧光显微镜观察烟草叶肉细胞的原生质体（图 4）。在 470~490 nm 的激发光下，野生型仅在大于 560 nm 处出现叶绿体自发荧光（红色），在 GFP 发

射光波段 505~530 nm 没有任何信号（图 4，A~C），而 pGD-GFP 转基因植株的原生质体在该波段出现，GFP 荧光（绿色）在细胞质中呈弥散状分布（图 4，D~F）。在 pGD-RCATP-GFP 转基因植株的

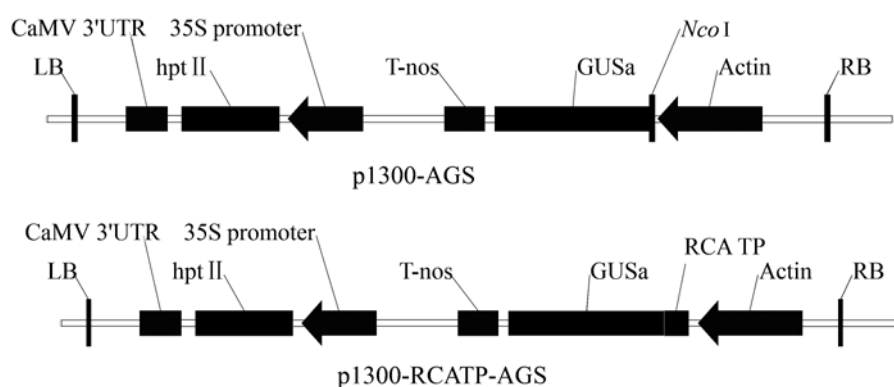


图 3 稳定表达载体 p1300-RCATP-AGS 图谱

Fig. 3 Map of the expression vector p1300-RCATP-AGS

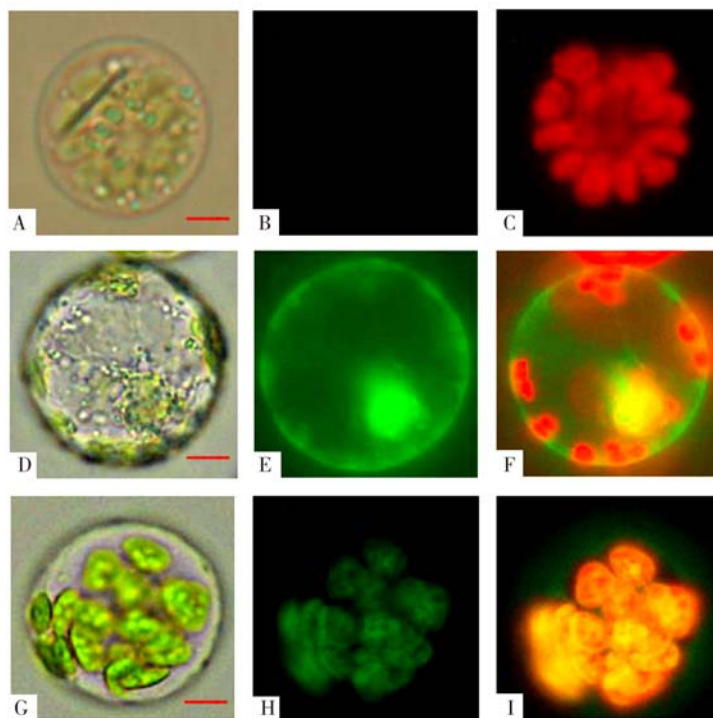


图 4 转基因烟草叶肉细胞原生质体的 GFP 荧光观察

Fig. 4 Fluorescence detection in the transgenic Tobacco protoplast of mesophyll cells

注: A~C 为野生型植株原生质体 GFP 荧光观察; D~F 为转基因 pGD-GFP 植株 GFP 荧光观察; G~I 为转基因 pGD-RCATP-GFP 植株 GFP 荧光观察; A、D、G 为普通明场观察; B、E、H 为 GFP 绿色荧光; C、F、I 为叶绿体自发荧光和 GFP 绿色荧光叠加。图中标尺为 10 μm 。

原生质体中, GFP 荧光信号与叶绿体自发荧光信号共定位于叶绿体中(图 4, G~I)。因此基因 RCA 编码蛋白的 N 端 48 aa 能够将 GFP 转运进入叶绿体, 为叶绿体转运肽。

2.4 转基因植株的获得及其 GUS 蛋白表达水平检测

将质粒 p1300-AGS 与 p1300-RCATP-AGS 分别电击导入农杆菌 LBA4404, 农杆菌介导法转化

日本晴, 对再生植株进行分子检测(图 5), 阳性植株数分别为 11 株和 12 株。

将阳性植株进行 GUS 组织化学染色, 挑选 GUS 组织化学染色表达一致的阳性克隆各 7 株进行 GUS 酶活分析(图 6), 结果表明转化质粒 p1300-RCATP-AGS 的转基因水稻叶片的 GUS 蛋白表达水平是转化质粒 p1300-AGS 的 4.2 倍左右(表 1)。

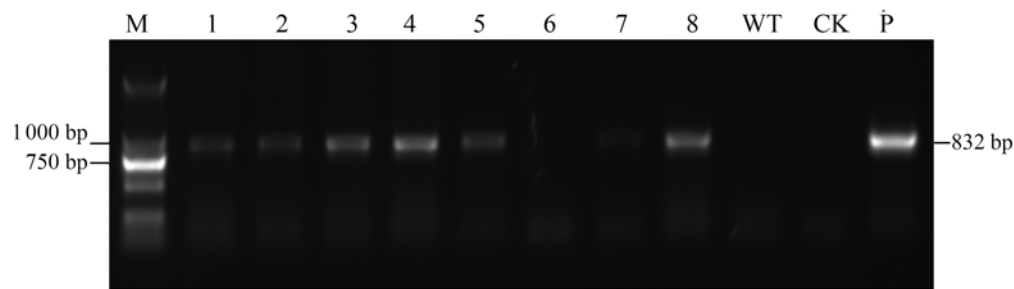


图 5 p1300-AGS 和 p1300-RCATP-AGS 转基因植株 PCR 检测

Fig. 5 PCR analysis of the p1300-AGS and p1300-RCATP-AGS transgenic plants

注：M 为 DNA 标准分子量；泳道 1~8 为转基因植株；WT 为野生型日本晴作为阴性对照；CK 为空白对照；P 为 p1300-AGS 质粒作为阳性对照。

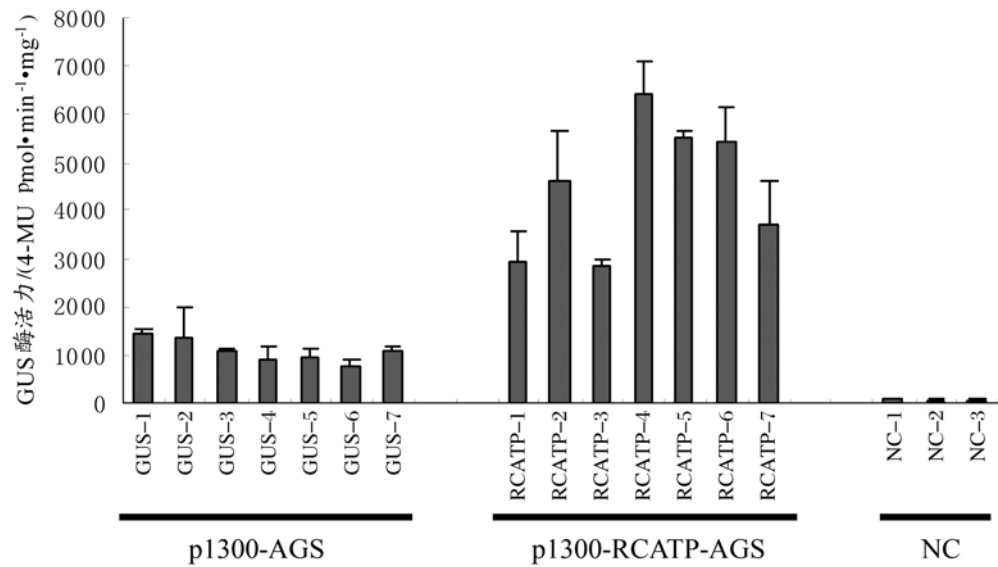


图 6 GUS 酶活性定量分析

Fig. 6 GUS activity analysis

注：p1300-AGS 为 p1300-AGS 转基因植株；p1300-RCATP-AGS 为 p1300-RCATP-AGS 转基因植株；NC 为 野生型日本晴。

表 1 转基因水稻的 GUS 酶活分析
Table 1 GUS activity analysis of transgenic rice

质粒表达载体	GUS 酶活力平均值 (4-MU pmol · min ⁻¹ · mg ⁻¹)	检测 克隆数
p1300-AGS	1073. 3±247. 3a	7
p1300-RCATP-AGS	4481. 2±1373. 2b	7

注：同列数据后不同小写字母表示差异显著 (P=0. 002)。

3 讨 论

本研究利用转运肽预测网站对 10 多条可能的水稻叶绿体转运肽进行分析后，挑选可能的叶绿体转运肽融合报告基因 GFP 构建表达载体，通过烟草叶肉细胞原生质体瞬时表达实验分析，进一步验证其功能。试验结果证实水稻 RCA 基因叶绿体转

运肽的切割位点为 48 (Ala) -49 (Lys)，碱基长度为 144 bp。融合水稻 RCA 基因的叶绿体转运肽和报告基因 GUS，转化水稻日本晴后阳性株的 GUS 酶活定量分析发现：融合叶绿体转运肽的转基因株的 GUS 蛋白表达水平是无叶绿体转运肽的转基因株的 4.2 倍左右。可见该转运肽不仅具有转运外源基因到叶绿体定位的功能，还能提高外源基因的表达。

对于外源基因 N 端融合叶绿体转运肽能提高转基因植株中外源基因表达的机理归纳起来有 2 种：一是由于将外源基因靶向细胞器中能够形成富集效应。例如 Wandlt 等^[14]发现当种子的蛋白通过转基因在叶片中表达时，表达量都很低。但是将这些异源蛋白定位于内质网时能够提高这些蛋白的表达量。二是叶绿体转运肽的核酸序列让外源基因的

mRNA 更稳定。比如 DeAlmeida 等^[15]发现在融合有叶绿体转运肽时, 编码新霉素转磷酸酶 II 和草丁膦乙酰转移酶的外源基因在转基因植物的叶片中具有更高的 mRNA 稳定性。

参考文献:

- [1] 梅杨, 李海蓝, 谢晋, 等. 核酮糖-1, 5-二磷酸羧化酶/加氧酶(Rubisco)[J]. 植物生理学通讯, 2007, 43(2): 363—368.
- [2] ZHANG G, WANG W, ZOU Q. Molecular biology of Rubisco activase [J]. Plant Physiol Commun, 2004, 40 (5): 633—637.
- [3] PORTIS A R. Rubisco activase-Rubiscos catalytic chaperone [J]. Photosynth Res, 2003, 75: 11—27.
- [4] 祝钦泷, 谢先荣, 睦顺照, 等. 彩叶草 Rubisco 活化酶基因 SsRCAD 的分子特征及其表达模式 [J]. 西北植物学报, 2011, 31 (6): 1097—1104.
- [5] 吴光耀. 核编码叶绿体蛋白中的转运肽 [J]. 植物生理学通讯, 1991, 27 (3): 166—172.
- [6] YUZO N, AKIRA T, KENICHI KAMIJO. Proteomic analysis of rice leaf, stem and root tissues during growth course [J]. Proteomics, 2006, 6: 3665—3670.
- [7] JANG I C, LEE K H, NAHM B H, et al. Chloroplast targeting signal of a rice rbcS gene enhances transgene expression [J]. Mol Breeding, 2002, 9: 81—91.
- [8] WONG E Y, HIRONAKA C M, FISCHOFF D A. Arabidopsis thaliana small subunit leader and transit peptide enhance the expression of Bacillus thuringiensis proteins in transgenic plants [J]. Plant Mol Biol, 1992, 20: 81—93.
- [9] GOODIN M M, DIETZGEN R G, SCHICHNES D, et al. pGD vectors: versatile tools for the expression of green and red fluorescent protein fusions in agroinfiltrated plant leaves [J]. Plant J, 2002, 31 (3): 375—83.
- [10] SMBROOK J, RUSSELL D W. 分子克隆实验指南: 第 3 版 [M]. 黄培堂译. 北京: 科学出版社, 2002.
- [11] 郑娅珊. 水稻茎叶优势表达基因 OsZF153 和 OsW8513 启动子的功能分析 [D]. 福州: 福建师范大学, 2009.
- [12] BHOJWANI S S, RAZDAN M K. Plant tissue culture: theory and practice [M]. Netherlands: Elsevier Science Publishers B V, 1983: 237—245.
- [13] JEFFERSON R A, KAVANAGH T A, BEVAN M V, et al. GUS fusions: β -Glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants [J]. EMBO J, 1987, 6: 3901—3907.
- [14] WANDEL T C I, KHAN M R I, CRAIG S, et al. Vicilin with carboxy-terminal KDEL is retained in the endoplasmic reticulum and accumulates to high levels in the leaves of transgenic plants [J]. The Plant J, 1992, 2: 181—192.
- [15] DEALMEIDA E R P, GOSSELE V, MULLER C G, et al. Transgenic expression of two marker genes under the control of an Arabidopsis rbcS promoter: sequence encoding the rubisco transit peptide increase expression levels [J]. Mol Gen Genet, 1989, 218: 78—86.

(责任编辑: 柯文辉)