

roGFP1 探针在玉米幼胚中响应细胞氧化还原状态改变的初步研究

吴佳梅¹, 刘晓宁², 赵军^{1,2} (1. 兰州大学草地农业科技学院, 甘肃兰州 730020; 2. 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081)

摘要 [目的] 建立 roGFP1 探针响应玉米体内氧化还原状态变化的稳定表达系统。[方法] 首先利用基因枪介导玉米幼胚转化法瞬时表达 roGFP1 基因, 利用激光共聚焦显微镜 405 和 488 nm 激发光通道对 10 mmol/L H₂O₂ 和 2 mmol/L DTT 溶液处理下的幼胚进行 510 nm 的 GFP 荧光成像, 后通过 ImageJ 处理图像和分析荧光比值 [405/488 nm]; 同时利用农杆菌介导玉米幼胚转化法开展 roGFP1 基因的玉米稳定转化, 进行 Southern Blot 鉴定和荧光显微镜观察。[结果] 在玉米幼胚瞬时表达系统中, 经 10 mmol/L H₂O₂ 处理后, roGFP1 探针的荧光强度比值 [405/488 nm] 由原来的 0.844 升高至 1.837, 而在 2 mmol/L DTT 溶液处理下的荧光强度比值下降至 0.911; 经 Southern Blot 鉴定和 GFP 荧光检测获得了 roGFP1 转基因阳性植株。[结论] 在玉米幼胚瞬时表达系统中, roGFP1 探针能够响应由外源氧化还原剂引起的体内氧化还原状态改变; 获得了表达 roGFP1 的转基因玉米植株。

关键词 roGFP1; 荧光强度比值; 玉米; 瞬时表达; 稳定转化

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2014)12-03491-03

Preliminary Study on roGFP1 Biosensor Responding to the Redox Changes in Maize Embryo Cells

WU Jia-mei et al (College of Pastoral Agriculture Sciences and Technology, Lanzhou University, Lanzhou, Gansu 730020)

Abstract [Objective] The aim was to establish the stable expression system of roGFP1 biosensor which can respond to the redox changes in *Z. mays*. [Method] roGFP1 was transiently expressed in maize immature embryos by particle bombardment. Images of GFP fluorescence at 510 nm in bombarded embryos under the treatment of 10 mmol/L H₂O₂ and 2 mmol/L DTT solution were collected through confocal scanning laser microscope using 405 nm and 488 nm exaltation light. Image was used for processing images and analysis of fluorescence ratio [405/488 nm]. In addition, maize was transformed with roGFP1 by Agrobacterium-mediated transformation method and both Southern Blot and fluorescence microscope imaging were employed to identify transgenic plants. [Result] The addition of 10 mmol/L H₂O₂ to the immature embryo resulted in an increase of the fluorescence ratio [405/488 nm] from 0.844 to 1.837. Subsequently, the ratio decreased to 0.911 after the treatment of 2 mmol/L DTT. Moreover, transgenic plants were obtained by both Southern Blot and GFP fluorescence detection. [Conclusion] roGFP1 responds to the redox changes caused by exogenously applied reductant and oxidant in maize immature embryo cells, and transgenic maize plants expressing roGFP1 were obtained.

Key words roGFP1; Fluorescence ratio; Maize; Transient expression; Stable transformation

玉米是我国重要的粮食作物和饲料来源, 自然条件下, 干旱、低温、高盐等非生物逆境制约了玉米的生长发育和产量。活性氧 (Reactive Oxygen Species, ROS) 在植物遭受非生物逆境时大量积累^[1], 曾一度被认为是具有氧化代谢过程中具有毒性的副产物。然而近年来的研究发现, 活性氧作为不可或缺的成分参与调控植物的生长发育以及各种胁迫反应, 是细胞信号转导网络过程中一种重要的信号分子^[1]。ROS 的作用机制成为当今的研究热点, 利用植物的 ROS 信号转导网络在提高拟南芥、紫花苜蓿、小麦和水稻等的抗逆性研究上取得了较大进展^[2,13-14], 而测定植物体内 ROS 含量的动态变化对于研究植物 ROS 信号转导网络具有重要意义。以往通常使用单态氧 (Singlet Oxygen Sensor Green, SOSG) 探针, 超氧化物阴离子 (Dihydroethidium, DHE) 探针, 二氢罗丹明 (Dihydrohodamine 123, DHR) 染料, Amplex Red 试剂, OxyBurst green 试剂和 Dihydrodichlorofluorescein (H2DCF) 等荧光探针来测定植物体内 ROS 含量^[3], 但是这些方法都存在着诸多不足。一方面, 由于不可逆性, 无法得知植物体内 ROS 含量的动态变化; 另一方面, 探针自身也存在潜在的问题, 比如当 OxyBurst green 接触到氧气时就会被氧化^[4]。Hanson^[5] 等对野生型绿色荧光蛋白 (Green Fluorescent Protein, GFP) 进行改造后得到氧化还原敏感的 roGFP1 biosensor (C48S, S147C 和

Q204C), 在氧化环境下, roGFP1 的 147 位和 204 位的半胱氨酸残基形成二硫键^[6], 由于生色团的中性电子和阴离子之间的内在平衡, roGFP1 探针在 400 nm 和 475~490 nm 的激发光下的荧光强度比值发生改变, 这种荧光强度比值法仅受激发光的影响, 从而消除了由探针浓度、光漂白以及组织厚度等引起的误差^[5]。roGFP 探针在哺乳动物细胞中能够响应氧化还原状态改变^[5,7] 得到证实后, 被广泛应用于拟南芥^[8-9]、烟草叶肉细胞^[10]、酵母^[11] 和小鼠表皮细胞^[12] 中。

前人对 roGFP 探针的研究主要集中在哺乳动物细胞和拟南芥等模式植物细胞中, 在作物细胞中的研究鲜有报道。探究 roGFP 探针能否响应玉米体内的氧化还原改变对于进一步研究玉米 ROS 信号转导网络、提高玉米抗逆性具有重要意义。笔者利用玉米幼胚瞬时表达系统检测 roGFP1 探针的荧光强度比值 [405/488 nm] 是否响应动态的氧化还原环境, 然后利用农杆菌介导玉米幼胚转化法创制转基因阳性植株, 旨在为规模化鉴定 ROS 信号转导基因提供直观便捷的检测工具。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 研究对象。杂交种 Hi II 和自交系综 31 玉米幼胚。

1.1.2 供试菌株以及载体。大肠杆菌 DH5 α 和农杆菌 C58C1 由实验室保存; 含有 9zf(-)-Pubi-Tnos 载体的 DH5 α 大肠杆菌菌株由实验室保存; pCAMBIA1304-P35S-roGFP1-Tnos 载体, 由 Keni Jiang 惠赠。

1.1.3 主要仪器。PTC0200 型 PCR 仪和 PDS-1000/He 台式

作者简介 吴佳梅 (1990-), 女, 江苏常州人, 硕士研究生, 研究方向: 植物抗逆分子生物学。

收稿日期 2014-04-14

基因枪,购自 Bio-Rad 公司;LSM 700 激光共聚焦显微镜和 HAL 100 荧光显微镜,购自 ZEISS 公司。

1.1.4 主要试剂。限制性内切酶,购自 New England Biolabs (NEB)公司; *Taq* DNA 聚合酶和 dNTP 等试剂,均购自宝生物工程(大连)有限公司;引物合成及测序,由生工生物工程(上海)有限公司完成;纤维素酶和离析酶,均购自日本 Yakult Pharmaceutical 公司;甘露醇、PEG 以及一些常用试剂,均购自 Amresco 公司。

1.2 方法

1.2.1 roGFP1 基因表达载体的构建。按照图 1 的方法构建 roGFP1 基因表达载体 9zf(-)-Pubi-roGFP1-Tnos 和 pCAMBIA1304-Pubi-roGFP1-Tnos;用 *Nco*I 和 *Afl*II 双酶切 pCAMBIA1304-P35s-roGFP1-Tnos 质粒获得 roGFP1 片段,同时用 *Eco*R V 酶切 9zf(-)-Pubi-Tnos 获得大片段,roGFP1roGFP1 片段经 Klenow 聚合酶补平后和 9zf(-)-Pubi-Tnos 回收片段经酶连后获得 9zf(-)-Pubi-roGFP1-Tnos 载体,转化大肠杆菌 DH5 α ,经酶切鉴定和测序,于 -80℃ 保存阳性克隆。9zf(-)-Pubi-roGFP1-Tnos 质粒经 *Bam*HI 和 *Afl*II 酶切后获得 ubi-roGFP1 片段,用 *Bam*HI 和 *Afl*II 酶切 pCAMBIA1304-P35s-roGFP1-Tnos 后获得大片段,将 ubi-roGFP1 和 pCAMBIA1304-P35s-roGFP1-Tnos 回收片段酶连后获得 pCAMBIA1304-Pubi-roGFP1-Tnos,转化农杆菌 C58C1,经酶切鉴定和测序后,于 -80℃ 保存阳性克隆。

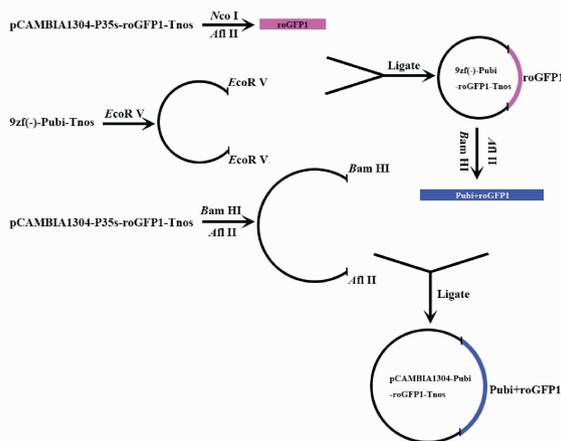


图 1 roGFP1 基因的玉米表达载体构建流程

1.2.2 玉米幼胚瞬时表达系统的建立。以 Hi II 杂交系授粉后 20 d 的玉米幼穗为材料,经过 5% NaClO 处理后剥幼胚,将幼胚用 MS 清洗 2 次后转移至固体高渗培养基中;用 10 μ l 金粉包裹 1 μ g 质粒制成微弹;轰击幼胚过程按照基因枪说明书进行,气压为 7.586 MPa,完成后放置植物培养箱内过夜培养。

1.2.3 激光共聚焦显微镜观察。将基因枪转化后培养过的幼胚制成横切片置于载玻片上盖上盖玻片后利用 ZEISS LSM700,选取 405 和 488 nm 2 个通道进行 roGFP1 观察和拍摄,随后加入 10 mmol/L H₂O₂ 处理 5~10 min 并拍摄图像,完毕后吸去 H₂O₂ 溶液,加入 2 mmol/L DTT 溶液处理 5~10 min 再次拍摄图像。

1.2.4 农杆菌介导转化玉米幼胚。用 pCAMBIA1304-Pubi-roGFP1-Tnos 载体转化 C58C1 农杆菌获得转化菌株;用该转化菌株菌液浸染综 31 野生型玉米幼胚,经过共培养后,转入到含潮霉素 B (Hygromycin B) 的选择培养基上进行筛选,将诱导分化的玉米幼苗移栽至大棚继续培养。

1.2.5 PCR 和 Southern Blot 鉴定转基因植株。PCR 鉴定所用引物为 FWHyg 和 RV35S(表 1),条件为变性温度 95℃,45 s,退火温度 60℃,40 s,延伸温度 72℃,1 min,30 个循环,阳性植株 PCR 产物应出现大小为 542 bp,然后荧光观察玉米叶片。结合两者的初步鉴定,将筛选出的玉米材料做 Southern Blot 鉴定,大致过程如下:利用 roGFP-F 和 roGFP-R(表 1)扩增出 roGFP1 基因特异的探针;用 CTAB 法大量提取玉米基因组 DNA,Hind III 酶切 40 V 电泳过夜后将凝胶进行酸碱变性,利用毛细管碱性转移法转膜 18 h,将膜 80℃ 烤箱烘烤 2 h 后进行预杂交,2 h 后用同位素标记的 roGFP1 探针进行杂交试验,18 h 后洗膜和压片。

表 1 转化材料所用引物

编号	引物名称	序列
1	FWHyg	5' AACCCGCTCGTCTGGCTAAGATCGG 3'
2	RV35S	5' GACGCACAATCCCACCTATCCTTCGC 3'
3	roGFP-F	5' ATGGTGAGCAAGGGCAGGAGCTGTTAC 3'
4	roGFP-W	5' AGGTAGTGGTTGTCGGGCAGCAGCACG 3'

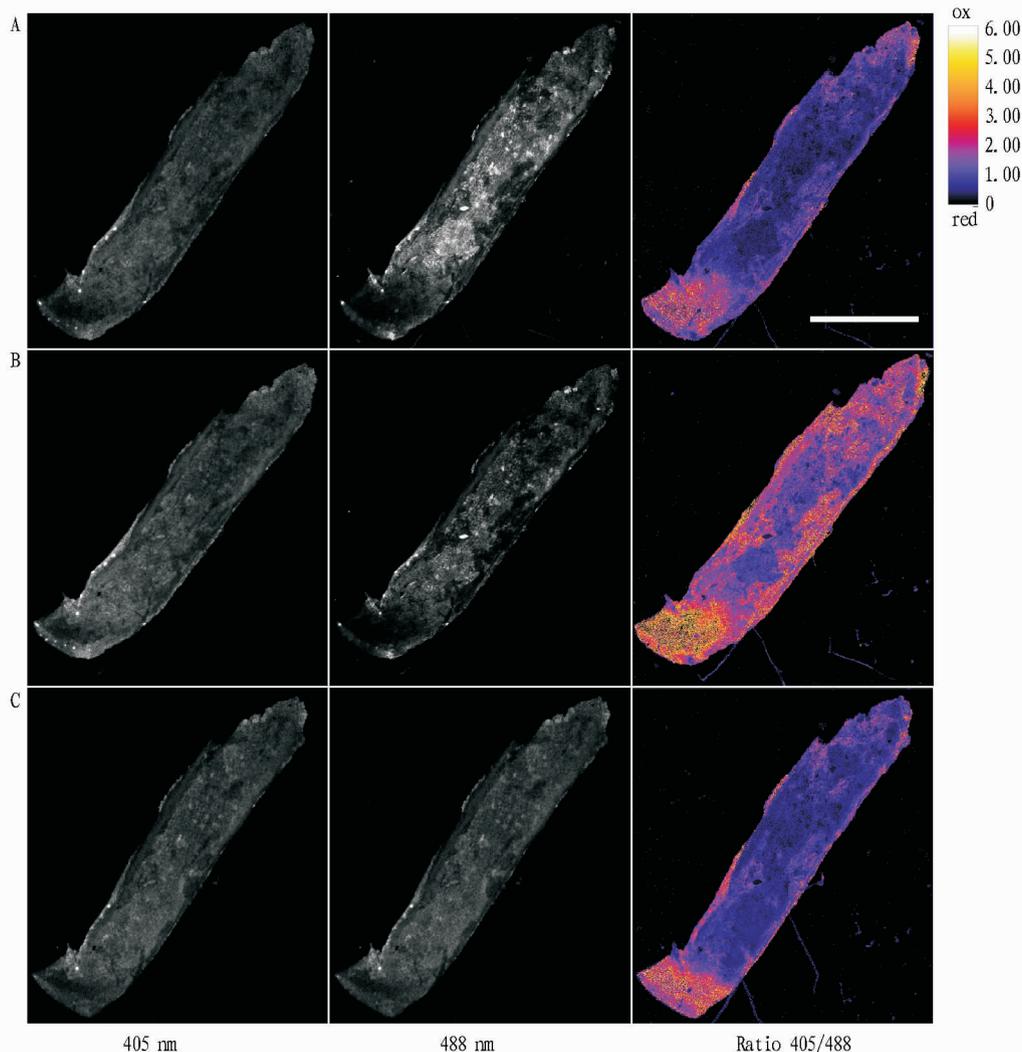
1.2.6 统计分析。利用 ImageJ 软件对图片进行处理,荧光强度比值计算过程如前所述^[8]。

2 结果与分析

2.1 RoGFP1 探针响应 H₂O₂ 和 DTT 引起的玉米幼胚氧化还原状态改变 为了探究 roGFP1 探针是否响应玉米体内氧化还原状态的变化,试验利用基因枪介导转化法在玉米幼胚中瞬时表达 roGFP1 基因,通过激光共聚焦显微镜观察不同氧化还原处理下幼胚中的 405 和 488 nm 荧光强度并计算比值。结果发现,roGFP1 基因能在玉米幼胚中成功表达;向幼胚切片中先后加入 10 mmol/L H₂O₂ 溶液 roGFP1 探针迅速被氧化,荧光强度比值从 0.844 升高至 1.837,而再加入 2 mmol/L DTT 溶液后 roGFP1 探针又被还原,荧光强度比值下降至 0.911(图 2)。这表明 roGFP1 基因能够在玉米幼胚中成功表达,并且对幼胚细胞内的可逆性氧化还原状态改变作出响应。

2.2 RoGFP1 转基因玉米植株的鉴定 为了建立 roGFP1 探针响应玉米体内氧化还原改变的稳定表达系统,以玉米自交系综 31 为材料,用含有 pCAMBIA1304-Pubi-roGFP1-Tnos 载体的 C58C1 农杆菌菌液浸染玉米幼胚,并诱导分化再生植株。PCR 初步鉴定结果(图 3)显示,编号为 roGFP-A、roGFP-B、roGFP-C、roGFP-D、roGFP-E、roGFP-F、roGFP-G、roGFP-H 和 roGFP-I 的 DNA 样品均出现 500 bp 左右的特异性条带,可初步鉴定为转基因阳性植株。

将以上 PCR 鉴定的阳性植株进行荧光观察和 Southern Blot 鉴定荧光观察后发现编号为 roGFP-C 和 roGFP-E 的植株



注:(A)为未处理的玉米幼胚;比值的颜色代表 roGFP1 的氧化还原状态,蓝色表示 roGFP1 的完全还原状态,黄色表示 roGFP1 的完全氧化状态;(B)为经 10 mmol/LH₂O₂ 溶液处理的幼胚;(C)为经 2 mmol/LDTT 溶液处理的幼胚;Scale bar = 300 pixel。

图 2 玉米幼胚中 roGFP1 在 405 和 488 nm 通道下的荧光比值图片

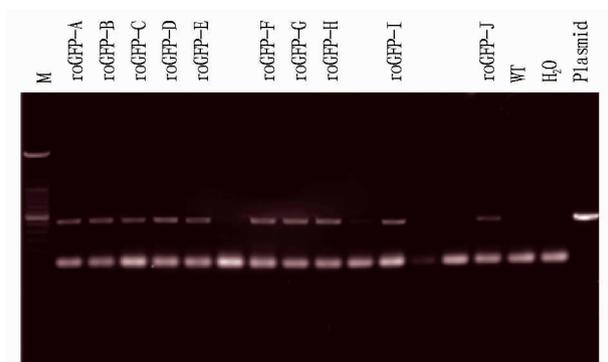


图 3 roGFP1 转基因植株的 PCR 鉴定

出现较强的 GFP 荧光。将以上 PCR 鉴定的阳性植株进行 Southern Blot 鉴定。图 4 显示,roGFP-C 和 roGFP-E 出现特异性杂交条带,表明 roGFP1 基因已整合到玉米基因组中,为建立 roGFP1 探针响应玉米体内氧化还原改变的稳定表达系统创造了重要的材料。

3 结论与讨论

试验利用基因枪介导玉米幼胚转化法瞬时表达 roGFP1

基因,通过 H₂O₂ 溶液处理,roGFP1 探针的荧光强度比值由原来的 0.844 升高至 1.837,而经 DTT 溶液处理后,幼胚中的 roGFP1 探针的荧光强度比值下降至 0.911,证实了 roGFP1 探针能够响应玉米体内氧化还原状态的动态变化;通过 Southern Blot 鉴定获得了转 roGFP1 基因的阳性玉米植株。

roGFP 探针在众多植物细胞中的研究备受关注,然而在玉米中还缺乏研究。试验首先通过在 Hi II 植株授粉后 20 d 的玉米幼胚中瞬时表达 roGFP1 基因试验证实,roGFP1 能够在玉米中响应 H₂O₂ 和 DTT 引起的可逆性氧化还原状态改变,这与 Meyer^[8]利用 roGFP2 探针在拟南芥根中的研究结果相吻合。试验随后利用农杆菌浸染综 31 玉米幼胚,诱导分化的玉米幼苗经荧光显微镜观察和 Southern Blot 鉴定后存在阳性植株,表明 roGFP1 基因已经整合到玉米基因组中。

ROS 在植物抗逆和生长发育中发挥了重要的信号分子作用。利用玉米 ROS 基因网络的关键组分提高植物的抗逆性取得了较大的进展,如 ABP9 转录因子参与 ROS 代谢调

(下转第 3496 页)

米的工作中摸索出一种适用于 PCR 检测的玉米基因组 DNA 快速提取方法,该方法在改良的 CTAB 法的基础上进行进一步简化,不需要沉淀、干燥、溶解、RNase 消化等步骤,大大简化了操作过程,节省了操作时间。同时在 CTAB 的配方中不需要加入巯基乙醇,大大减少对人体的危害和对环境的污染。另外,简化操作步骤还可以减少对基因组的损伤,减小操作过程污染的可能性,减少 PCR 检测过程中出现的假阳性现象。经过和试剂盒提取法比较和应用 ELISA 的方法进行检验,发现其检测效果与试剂盒提取法无差异,准确度高,完全满足常规的 PCR 检测。实现了简捷、快速、高效、高通量提取玉米基因组 DNA 的要求。

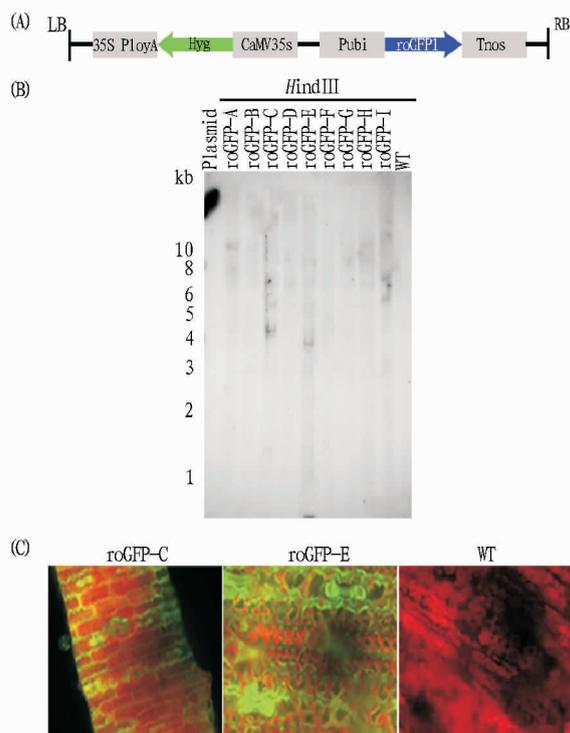
参考文献

- [1] 仇焕广,张世煌,杨军,等. 中国玉米产业的发展趋势,面临的挑战与政策建议[J]. 中国农业科技导报,2013,15(1):20-24.
- [2] 彭永刚,张磊,朱祯. 国内外转基因农作物研发进展[J]. 植物生理学学报,2013,49(7):611-614.
- [3] STEWART JR C N, VIA L E. A rapid CTAB DNA isolation technique use-

ful for RAPD fingerprinting and other PCR applications [J]. Biotechniques, 1993, 14(5):748-750.

- [4] EDWARDS K, JOHNSTONE C, THOMPSON C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis[J]. Nucleic Acids Research, 1991, 19(6):1349.
- [5] 陈丽丽,张鹏,黄新,等. 玉米基因组 DNA 提取及浓度测定方法评价[J]. 生物技术通报,2011(12):13.
- [6] 曹士亮,曹靖生,王成波,等. 玉米 SSR 分子标记技术操作流程研究进展[J]. 中国农学通报,2012,28(15):1-4.
- [7] 楼巧君,陈亮,罗利军. 三种水稻基因组 DNA 快速提取方法的比较[J]. 分子植物育种,2006,3(5):749-752.
- [8] 李筱婷,陈卓君,许文涛,等. 一种适于 PCR 扩增的植物基因组 DNA 快速提取新方法[J]. 农业生物技术学报,2010,18(2):394-399.
- [9] 张晓祥,王玲,寿路路. 一种快速提取小麦基因组 DNA 的改良 CTAB 方法[J]. 中国农学通报,2012,28(36):46-49.
- [10] JAMES CLIVE. ISAAA Report on Global Status of Biotech/GM Crops: 2013[J]. China Biotechnology, 2014, 34(1):1-8.
- [11] 黄大防. 加快发展现代农业,大力推进转基因生物育种产业化[J]. 中国农业科技导报,2007,9(3):9-12.
- [12] 孙璐宏,鲁周民,张丽. 植物基因组 DNA 提取与纯化研究进展[J]. 西北林学院学报,2010,25(6):102-106.

(上接第 3493 页)



注:(A)为 roGFP1 基因示意图;(B)为 roGFP1 转基因植株的 Southern Blot 鉴定;(C)为转基因株系 roGFP-C、roGFP-E 以及 WT 玉米叶片荧光图片。

图 4 roGFP1 转基因植株的 Southern Blot 鉴定和荧光显微镜观察节,过表达 ABP9 基因提高了玉米的多种非生物逆境抗性^[13]。响应玉米体内氧化还原状态改变的 roGFP1 稳定表达系统的建立为进一步分离玉米 ROS 信号转导网络中的关键组分奠定了重要的基础。

参考文献

- [1] MITTLER R, VANDERAUWERA S, SUZUKI N, et al. ROS signaling: the new wave? [J]. Trends in Plant Science, 2011, 16(6):300-309.

- [2] 薛鑫,张芊,吴金霞. 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,2013(10):6-11.
- [3] SWANSON S J, CHOI W G, CHANOCA A, et al. In vivo imaging of Ca^{2+} , pH, and reactive oxygen species using fluorescent probes in plants[J]. Annu Rev Plant Biol, 2011, 62:273-297.
- [4] BULGAKOV V P, AMININ D L, SHKRYL Y N, et al. Suppression of reactive oxygen species and enhanced stress tolerance in *Rubia cordifolia* cells expressing the roC oncogene[J]. Mol Plant Microbe Interact, 2008, 21:1561-1570.
- [5] HANSON G T, AGGELER R, OGLESBEE D, et al. Investigating Mitochondrial Redox Potential with Redox-sensitive Green Fluorescent Protein Indicators[J]. J Biol Chem, 2004, 279:13044-13053.
- [6] CHOI W G, SWANSON S J, GILROY S. High-resolution imaging of Ca^{2+} , redox status, ROS and pH using GFP biosensors[J]. The plant Journal, 2012, 70:118-128.
- [7] DOOLEY C T, DORE T M, HANSON G T, et al. Imaging dynamic redox changes in mammalian cells with green fluorescent protein indicators[J]. J Biol Chem, 2004, 279:22284-22293.
- [8] MEYER AJ, BRACH T, MARTY L, et al. Redox-sensitive GFP in *Arabidopsis thaliana* is a quantitative biosensor for the redox potential of the cellular glutathione redox buffer[J]. The Plant Journal, 2007, 52:973-986.
- [9] JIANG K, SCHWARZER C, LALLY E, et al. Expression and characterization of a redox-sensing green fluorescent protein (reduction-oxidation-sensitive green fluorescent protein) in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 2006, 141:397-403.
- [10] SCHWARZLÄNDER M, FRICKER M D, MÜLLER C, et al. Confocal imaging of glutathione redox potential in living plant cells[J]. Journal of Microscopy, 2008, 231(2):299-316.
- [11] YU S, QIN W, ZHUANG G, et al. Monitoring oxidative stress and DNA damage induced by heavy metals in yeast expressing a redox-sensitive green fluorescent protein [J]. Current Microbiology, 2009, 58(5):504-510.
- [12] WOLF A M, NISHIMAKI K, KAMIMURA N, et al. Real-time Monitoring of Oxidative Stress in Live Mouse Skin [J]. Journal of Investigative Dermatology, 2013. doi: 10.1038/jid.2013.428.
- [13] ZHANG X, WOLLENWEBER B, JIANG D, et al. Water deficits and heat shock effects on photosynthesis of a transgenic *Arabidopsis thaliana* constitutively expressing ABP9, a bZIP transcription factor[J]. Journal of Experimental Botany, 2008, 59(4):839-848.
- [14] ZHANG X, WANG L, MENG H, et al. Maize ABP9 enhances tolerance to multiple stresses in transgenic *Arabidopsis* by modulating ABA signaling and cellular levels of reactive oxygen species[J]. Plant Mol Biol, 2011, 75:365-378.