

拟南芥翻译延伸因子 *EF1A* 的亚细胞定位研究

陈 燕, 王伟倩, 张红莉, 夏群芳, 孙恒吉, 李瑞沙, 郑 帮, 周树敏, 张 卫

(上海大学 生命科学学院; 上海市能源作物育种及应用重点实验室, 上海 200444)

摘 要:探讨了拟南芥的翻译延伸因子 *EF1A* 的亚细胞定位. 以 Col 野生型拟南芥的 cDNA 为模板, 通过高保真 KOD 扩增酶获得 2 363 bp 的拟南芥转录延伸因子 *EF1A* 基因片段, 将其与 *GFP* 融合后共同连入 p1300 表达载体, 利用农杆菌侵染法将 *p35S::GFP* 和 *p35S::EF1A::GFP* 转入野生型拟南芥中, 观察转基因植物细胞中 *GFP* 的表达情况. 结果显示: *p35S::GFP* 转基因植物中, 细胞核中 *GFP* 荧光强度显著高于细胞质中荧光强度, 但是在 *p35S::EF1A::GFP* 转基因植物中, 细胞核中荧光强度与细胞质中荧光强度无显著差异, 说明在进行蛋白翻译时细胞质中的 *EF1A* 含量显著高于细胞核中, 这也为翻译延伸因子 *EF1A* 的亚细胞定位提供了实验依据.

关键词:拟南芥; 翻译延伸因子; *EF1A*; *GFP*

中图分类号:Q754

文献标志码:A

蛋白质的生物合成可分为 3 个基本阶段: 起始, 延伸和终止. 翻译的延伸需要几个可溶性蛋白的参与, 这些蛋白称为 eEFs^[1], 蛋白质的翻译场所主要在细胞质内的核糖体中进行. 翻译延伸因子 1A (elongation factor 1 alpha, *EF1A*) 是参与蛋白翻译延伸的重要蛋白质, *EF1A* 有 3 个结构域, 结构域 I 与 GTP 结合, 结构域 II 和 III 结合 tRNA^[2]. *EF1A* 是细胞内广泛存在的含量较多的蛋白, 占正常细胞总蛋白的 1%~2%, *EF1A* 基因的表达调控十分保守. *EF1A* 除了参与蛋白质翻译外, 还有许多非常重要的功能, 比如参与信号传导、翻译控制、细胞凋亡、细胞骨架组成等^[3]. 本实验以 *p35S* 过量表达 *EF1A::GFP* 融合蛋白, 旨在确定拟南芥翻译延伸因子 *EF1A* 的亚细胞定位, 为 *EF1A* 的进一步研究提供理论依据和思路.

1 材 料

1.1 植物材料

实验中所用到的野生型拟南芥植物为 Columbia (Col) 生态型. 人工光照培养室培养, 温度 22 ℃, 光照 16 h/黑暗 8 h, 相对湿度 70%^[4], 定期浇水和补充营养液. 营养液由上海永通化工有限公司生产.

植物培养介质为蛭石:黑土(3:1). 植物种子先在 4 ℃冷库进行低温处理, 以提高种子的萌发率, 4 d 后置于人工光照培养间进行培养, 待生长至两片真叶后进行移植并继续培养.

1.2 菌体和载体

TG1 (*E. Coli*): 大肠杆菌, 用于表达载体构建及质粒转化等实验. TG1 感受态由上海迈其生物科技有限公司提供; GV3101 (*Agrobacterium tumefaciens*): 根癌农杆菌, 用于介导外源基因侵染转化拟南芥植物, GV3101 超级感受态由本实验室自制; *p35S::GFP* 的表达载体由本实验室提供并保存.

2 方 法

2.1 拟南芥总 cDNA 的获得

2.1.1 植物总 RNA 的提取 采用 QIAamp R Viral RNA Mini Kit 试剂盒. 试剂盒购自 Qiagen 生物公司.

收稿日期: 2014-09-10

基金项目: 上海市教委浦江人才计划(08PJ1405500); 国家自然科学基金面上项目(30870225).

作者简介: 陈 燕(1990-), 女, 江苏南通人, 上海大学硕士研究生, 研究方向为植物学.

通信作者: 张 卫(1966-), 上海大学教授, 博士, E-mail: zhw62207@shu.edu.cn.

2.1.2 植物总 RNA 的反转录 RNA 反转录所用试剂盒购自 TaKaRa 生物科技公司. 具体操作按下列组分配制 RT 反应液(反应液配制在冰上进行): $5\times$ PrimeScript RT Master Mix(for Real Time)使用量 $2\ \mu\text{L}$, Total RNA 使用量 $1\ \mu\text{L}$;RNase Free ddH₂O 使用量 $7\ \mu\text{L}$.

反应体系可按需求相应放大, $10\ \mu\text{L}$ 反应体系可最大使用 500 ng 的 TotalRNA.

反转录反应条件如下: $37\ ^\circ\text{C}$ 15 min(反转录反应); $85\ ^\circ\text{C}$, 5 s(反转录酶的失活反应); $4\ ^\circ\text{C}$ (保存).

2.2 引物和试剂

在 www.arabidopsis.org 网站下载 EF1A 基因的序列,并依据基因序列设计 PCR(Polymerase Chain Reaction)扩增引物在上下游引物两端分别加上 Xba I 和 BamHI 酶切位点,实验所用引物如表 1 所示. 本实验所用引物均由上海生工生物工程股份有限公司进行合成.

表 1 实验引物序列

引物作用	上/下游(酶切位点)序列
EF1A 克隆	上游 (XbaI) GCTTCTAGAATGGGTAAAGAGAAGTTTCAC
	下游 (BamHI)GCCGGATCCTTTGGCACCTTCTCACTGC
GFP 克隆	上游 (BamHI)CGCGGATCCATGGTGAGCAAGGGCGAGGA
	下游 (SalI)DCGTGCGACTTACTTGTACAGCTCGTCC
EF1A 转基因植物鉴定	上游 ATGGTGAGCAAGGGCGAG
	下游 TTACTTGTACAGCTCGTC

PCR 扩增采用 Takara 公司的高保真 KOD 酶. PCR 扩增参数为: $94\ ^\circ\text{C}$ 2 min; $98\ ^\circ\text{C}$ 30 s(变性); $68\ ^\circ\text{C}$ 30 s/K(延伸); $72\ ^\circ\text{C}$ 10 min; $10\ ^\circ\text{C}$ 10 min;33 次.

将扩增所得的目的片段以 taq 酶加“PolyA”尾加“PolyA”尾后进行胶回收操作,胶回收试剂盒由 Takara 公司生产. 将含目的 DNA 片段的胶回收产物连入 pMD18-T 载体进行测序,pMD18-T 载体和连接酶 Solution I 由 Takara 公司生产.

连接体系($10\ \mu\text{L}$)如下:目的片段 1.5 ;T 载体 0.5 ;Solution I:5 uL;ddH₂O:3 μL .

其中 Solution I 连接酶内含 T4 DNA 连接酶为试剂盒内配套试剂. 实验中所有 TA Cloning Vector 均由上海美吉生物医药科技有限公司完成测序

测序结果在 NCBI 网站(<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>)使用 BLAST 程序进行序列比对分析.

2.3 表达载体构建流程

表达载体 p35S:EF1A::GFP 的构建根据郑帮等^[5]的方法进行.

2.4 表达载体对野生型拟南芥的转化

将构建好的表达载体采用热激转化法转入农杆菌 GV3101,并对培养出来的农杆菌菌落进行阳性克隆的筛选和鉴定,农杆菌转化方法详见参考文献^[6-7]. 将转入表达载体的农杆菌阳性克隆菌株依次进行划线、挑选单克隆、少量培养(5 mL)、大量培养(250 mL)后,侵染转化野生型拟南芥植株,植物转基因具体步骤详见参考文献^[6-9].

2.5 转基因阳性苗的筛选

收取转化植株的种子干燥处理后,用含 $50\ \mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素的抗性平板进行转基因阳性苗筛选,将所获的转基因阳性苗移植培养.

2.6 转基因拟南芥的 PCR 检测

以转基因拟南芥叶为材料,采用 SDS 法提取基因组 DNA,该提取方法根据 Dellaporta,Wood 和 Hicks 的方法改进而成,检测转基因拟南芥所用引物如表 1 所示.

2.7 转基因植物的荧光观察

取转基因拟南芥第 3~5 片真叶,用超纯水冲洗后,制成临时装片,用蔡司 LSM710 共聚焦显微镜进行荧光观察及表型鉴定所获图片利用蔡司 2.0 图形分析软件进行分析.

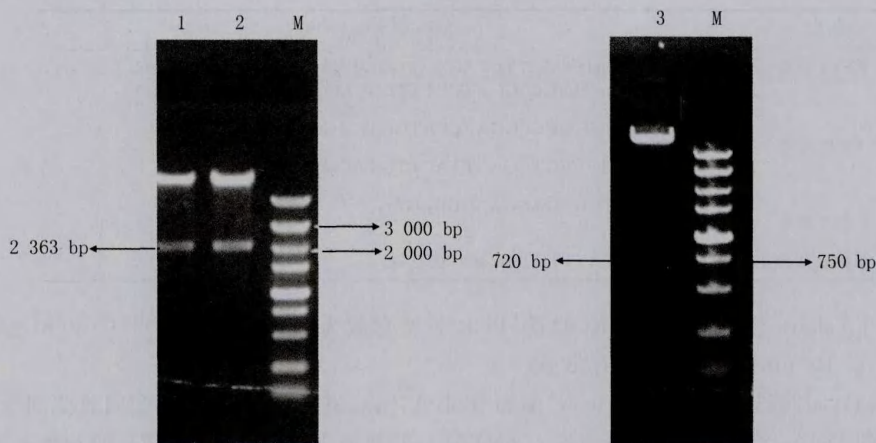
3 结果

3.1 *EF1A* 基因的克隆

通过 NCBI 网站,对 *EF1A* 及 *GFP* 基因的测序结果进行核对结果显示,实验中所获得的基因序列完全正确,可将其装入 p1300 质粒构建表达载体.

3.2 载体构建

对构建好的 p1300 质粒载体进行酶切鉴定.分别采用 Xba I + BamHI 以及 BamHI + Sal I 对 *EF1A* 基因及 *GFP* 基因序列进行双酶切鉴定.通过凝胶电泳清晰地显示出了约 2 363 bp 和 720 bp 的单一目的片段(图 1,2).



1、2: p1300-*EF1A*::*GFP* 阳性克隆质粒样品酶切; 3:p1300-*GFP* 阳性克隆质粒酶切;
M: 分子 marker

图 1 *EF1A* 基因 CDS 酶切鉴定

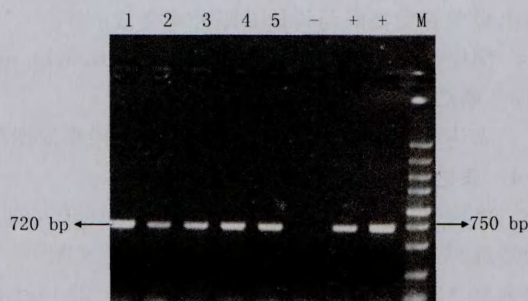
图 2 *GFP* 酶切鉴定

3.3 转基因植物鉴定

构建好的表达载体通过农杆菌介导转化 Col 野生型拟南芥,利用 PCR 对筛选到的阳性植株进行基因型鉴定.以 *GFP*720 bp 大小的特异条带作为鉴定标记鉴定出多株转基因植株(图 3).

3.4 荧光观察

利用激光共聚焦荧光显微镜对转基因植株叶片的气孔保卫细胞进行观察,发现 35S 过表达 *GFP* 蛋白时,细胞质以及细胞核里均有绿色荧光被检测到,且在细胞核里的荧光更显著(图 4A-4C);而 *p35S* 过表达 *EF1A*::*GFP* 融合蛋白时,细胞质和细胞核中显示的绿色荧光强度基本相似(图 4D-4F).



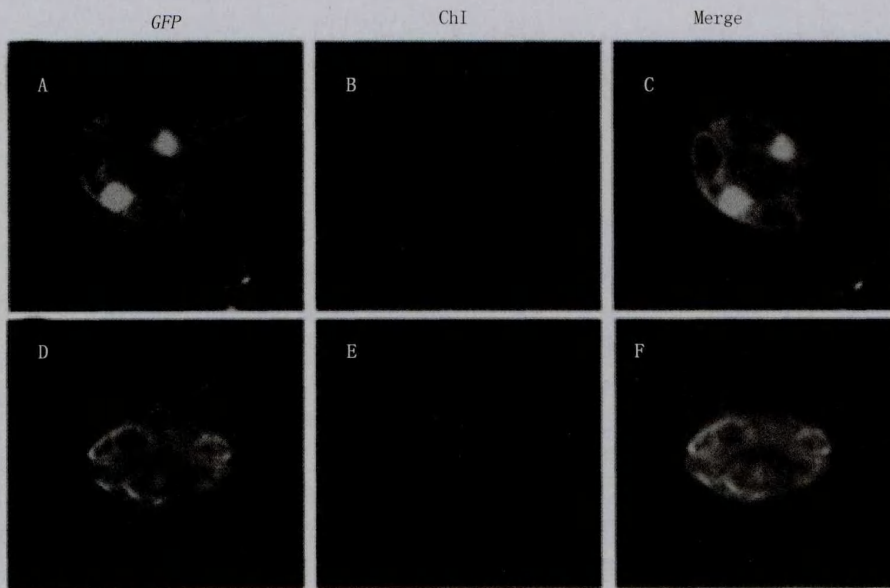
-: 以非转基因拟南芥基因组为模板;+: 以 p1300-*EF1A*::*GFP* 质粒为模板; M: 分子量标记;
1-5: 分别以 p1300-*EF1A*::*GFP* 转基因拟南芥基因组 DNA 为模板.

图 3 转基因植物 PCR 鉴定

4 讨论

拟南芥基因组的测序完成使得大量参与生命活动重要的基因被发现.在植物蛋白质翻译延伸的过程中,*EF1A* 是一个重要的翻译因子,在快速增殖的细胞中,*EF1A* 基因的表达调控十分保守,其表达水平同细胞生长及增殖速度有关^[10].除此以外,近年来越来越多的研究显示,*EF1A* 蛋白不仅仅是功能单一的翻译延伸因子,约有 24 种不同的蛋白质能和 *EF1A* 相互作用

用^[11],可见 EF1A 是一个非常重要的多功能蛋白.



A-C: p35S::GFP 在 Col-0 植物细胞中 GFP 在细胞核和细胞质中的分布. D-F: p35S::EF1A::GFP 在 Col-0 植物细胞中 GFP 在细胞核和细胞质中的分布. GFP: 荧光通道; ChI: 线粒体自发荧光通道; Merge: GFP 与 ChI 叠加通道.

图 4 共聚焦显微镜观察结果

通过本研究发现, *p35S* 过表达 *GFP* 时, 细胞核中荧光强度显著高于细胞质中荧光强度, 但是 *p35S* 过表达 *EF1A::GFP* 融合蛋白时, 细胞核中荧光强度与细胞质中荧光强度无显著差异, 说明融合蛋白是均匀的在细胞核和细胞质中分布的. 报告基因 *GFP* 的利用使得 *EF1A* 在细胞内的观察更加简单、易行, 因此采用此方法可对 *EF1A* 的亚细胞定位进行研究, 为今后进一步深入研究 *EF1A* 功能奠定基础^[12], 也为其他基因的相关研究提供可借鉴的思路.

参 考 文 献

- [1] Maria K. Mateyak, Terri Goss Kinzy. eEF1A: Thinking Outside the Ribosome[J]. The Journal Of Biological Chemistry, 2010, 28(285): 21209-21213.
- [2] 周 冰, 曹 诚, 刘传暄. 延伸因子 1A 的研究进展[J]. 生物技术通讯, 2007, 18(2): 281-284.
- [3] Yasuyuki Yamaji, Toshihiko Kobayashi, Koji Hamada. In vivo interaction between Tobacco mosaic virus RNA-dependent RNA polymerase and host translation elongation factor 1A[J]. Virology, 2006, 347(1): 100-108.
- [4] 赵术珍, 毕玉平. 拟南芥室内繁殖技术的改进[J]. 山东农业科学, 2011(3): 50-51.
- [5] 郑 帮, 陈 燕, 褚艳霞, 等. 拟南芥 HSP70 基因启动子表达载体的构建及在烟草 BY2 细胞中的应用[J]. 上海师范大学学报: 自然科学版, 2013, 42(5): 492-498. [6] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南(上下册)[K]. 黄培堂, 译. 北京: 科学出版社, 2002: 92-96.
- [7] 张好富, 张宪银. 一种不依赖于无菌培养的拟南芥活体转基因种子筛选方法[J]. 浙江大学学报: 农业与生命科学版, 2009, 35(4): 372-376.
- [8] 张秀春, 李文彬, 夏亦莽, 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): 9-10.
- [9] 樊 荣, 万小荣, 张文涛, 等. LE-ACS6 启动子在 LE-ACS6::GUS 转基因拟南芥中的特异性[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2004, 30(3): 351-358.
- [10] 覃迎姿, 黄先益, 叶兴枝, 等. 植物延伸因子 eEF1A 研究进展[J]. 广西农业科学, 2009, 40(5): 472-477.

Two-Dimensional Cellular Automata based Simulation of the Formation of Aerobic Granular Sludge

HAI Benzhai^a, WANG Hailei^b

(a. College of Compute Science & Technology; b. College of Life Sciences,
Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: The formation mechanism and environmental conditions of the aerobic granular sludge becomes the target of many researchers. With the method of cellular automata this paper gives a model of formation of an aerobic granular sludge. The simulation results show that the model effectively reveals the formation mechanism of aerobic granular sludge, the reliability of the model was verified, the results amplified has an important guiding significance for the aerobic granular sludge industrialization.

Keywords: cellular automata; aerobic granular sludge; wastewater treatment

(上接第 109 页)

- [11] Ransom-Hodgkins W D. The application of expression analysis in elucidating the eukaryotic elongation factor one alpha gene family in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Mol Genet Genomics*, 2009, 281(4): 391-405.
- [12] 周峰, 刘燕, 马永贵, 等. 真核翻译延伸因子 1A 蛋白家族功能位点的进化踪迹分析[J]. *中国生物化学与分子生物学报*, 2013, 29(8): 773-782.

Subcellular Localization of translation Elongation Factor *EF1A* in *Arabidopsis Thaliana*

CHEN Yan, WANG Weiqian, ZHANG Hongli, XIA qunfang, SUN Hengji, LI Ruisha,
ZHENG Bang, ZHOU Shumin, ZHANG Wei

(Shanghai Key Laboratory of Bio-Energy Crops; School of Life Science, Shanghai University, Shanghai 200444, China)

Abstract: The subcellular localization of the translation elongation factor *EF1A* of *Arabidopsis* was investigated in this study. The 2 363 bp cDNA fragment of the *Arabidopsis translation* elongation factor *EF1A* was cloned by KOD reaction from *Arabidopsis Columbia*. With *GFP* fusion, the gene fragment constructed into the p1300 vector, Then the *p35S; GFP* and *p35S; EF1A : : GFP* were transformed into *Col ecotypes Arabidopsis* by *Agrobacterium*-mediation. *GFP* expression in transgenic plants cell was observed and showed that *35S; GFP* transgenic plants exhibited a significantly high *GFP* fluorescence in the nucleus than in cytoplasm, but in *p35S; EF1A : : GFP* transgenic plants, the fluorescence intensity in nucleus was similar to cytoplasm. These results suggested that during protein translation, *EF1A* content in cytoplasm is higher than in nucleus. Furthermore, the subcellular localization of *EF1A* also been revealed in this study.

Keywords: *Arabidopsis thaliana*; translation elongation factor; *EF1A*; *GFP*