

脂肪族芥子油苷侧链修饰酶基因 *FMO_{GS-OX4}* 表达模式分析赵宇¹, 孔稳稳², 沙伟^{1*}, 李晶^{2*}

(1. 齐齐哈尔大学生命科学与农林学院分子遗传学研究室, 黑龙江齐齐哈尔 161006;

2. 东北农业大学农业生物功能基因重点实验室, 哈尔滨 150030)

摘要: 芥子油苷是一类由氨基酸衍生而来的、在植物抗生物胁迫防御性反应中起重要作用的次生代谢产物, 其生物活性与侧链结构密切相关。拟南芥中有 5 个黄素单氧化酶 *FMO_{GS-OX1-5}* 具有催化芥子油苷侧链上硫原子氧化的活性, 使甲基硫烷芥子油苷转变为甲基亚磺酰烷芥子油苷。前期研究工作表明, 在 5 个 *FMO_{GS-OX}* 基因缺失突变体中, 除了 *fmo_{gs-ox4}* 外均表现出芥子油苷侧链结构变化的表型。为了深入揭示 *FMO_{GS-OX4}* 的表达特性和它对芥子油苷侧链的修饰作用, 利用 *GFP* 和 *GUS* 为报告基因, 系统地分析了 *FMO_{GS-OX4}* 在不同组织中的表达情况。结果表明 *FMO_{GS-OX4}* 主要在花梗、叶片及角果的维管组织中表达, 在正常生长条件下, *FMO_{GS-OX4}* 表达的空间位置与芥子油苷的分布不重叠, 因而, 酶与底物的分离可能是 *fmo_{gs-ox4}* 没有明显表型的主要原因。

关键词: 拟南芥; 脂肪族芥子油苷; 黄素单氧化酶; 硫氧化; 组织定位

中图分类号: Q946.83⁺9

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2013)04-0406-09

Expression Pattern of *FMO_{GS-OX4}*, a Biosynthetic Gene Involved in Aliphatic Glucosinolate Side-chain Modification

ZHAO Yu¹, KONG Wen-Wen², SHA Wei^{1*}, LI Jing^{2*}

(1. Molecular Genetics Laboratory, College of Life Sciences and Forestry, Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang 161006, China;
2. Key Laboratory of Agricultural Functional Genes, College of Life Sciences, Northeast Agriculture University, Harbin 150030, China)

Abstract: Glucosinolates (GSLs) are amino acid-derived secondary metabolites, which play an important role in biotic defense reactions in plants. The bioactivity of GSLs is closely related with its chain structure. There are five Flavin-containing Monooxygenase (*FMO*) enzymes, *FMO_{GS-OX1-5}*, involved in GSL biosynthesis catalyzing the S-oxygenation from Methylthioalkyl GSLs to Methylsulfinylalkyl GSLs. Our previous work showed that all *fmo_{gs-ox}* mutants, except *fmo_{gs-ox4}*, presented altered GSLs phenotypes. To reveal the expression characteristics and functions in GSLs biosynthesis and chain structure modification, *GFP* and *GUS* were used as reporter genes, expression pattern of *FMO_{GS-OX4}* in different tissue was analyzed and results showed that *FMO_{GS-OX4}* was expressed mainly in the vascular tissue of the leaf, stem and silique. Under normal conditions, spatial distribution of *FMO_{GS-OX4}* did not overlap with the distribution of its substrates, which was considered as the reason why *fmo_{gs-ox4}* lacked altered GSLs phenotype.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; Aliphatic glucosinolates; *FMO_{GS-OX4}*; S-oxygenation; Tissue localization

收稿日期: 2012-12-10, 修回日期: 2013-04-01。

基金项目: 黑龙江省高等学校科技创新团队建设计划项目(2011TD005); 黑龙江省留学归国科学基金项目(LC2009C31)。

作者简介: 赵宇(1986-), 女, 硕士, 研究方向为植物遗传学(E-mail: zhaoyu860125@126.com)。

* 通讯作者(Author for correspondence): 李晶, 教授, 博士生导师(E-mail: lijing@neau.edu.cn); 沙伟, 教授, 博士生导师(E-mail: shw1129@267.net)。

芥子油苷是一类由氨基酸衍生而来的富含氮和硫的次生代谢产物, 主要存在于包括模式植物拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 及一些重要蔬菜作物如白菜、萝卜、西兰花等在内的十字花科植物中^[1]。芥子油苷通常由 β -D-硫葡萄糖基、硫化脲基团、侧链 R 基三部分构成, 目前已经发现的芥子油苷至少有 120 余种。根据氨基酸的来源不同, 可以将芥子油苷分为脂肪族芥子油苷 (来源于甲硫氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸)、芳香族芥子油苷 (来源于苯丙氨酸和酪氨酸) 和吲哚族芥子油苷 (来源于色氨酸)^[2]。在拟南芥中脂肪族芥子油苷在抗病虫害的防御性反应中起重要作用^[3,4]。此外, 某些脂肪族芥子油苷的降解产物对人类具有很高的抗癌活性^[5,6], 且其抗癌活性与侧链的长度和结构密切相关。

拟南芥中脂肪族芥子油苷侧链的碳原子数为 3~8 个, 其中侧链的碳原子个数为 4、7、8 的甲基亚磺酰烷基芥子油苷 (Methylsulfinylalkyl GSLs, MS GSLs) 表现出很强的抗肿瘤活性^[7-9], 而其合成前体甲基硫烷基芥子油苷 (Methylthioalkyl GSLs, MT GSLs) 则没有抗肿瘤活性。两者在结构上唯一的区别是前者侧链上的硫原子为氧化状态, 而后者为还原状态 (图 1), 可见脂肪族芥子油苷的生物活性与侧链结构密切相关, 脂肪族芥子油苷侧链修饰的研究也因此备受关注。

MS 芥子油苷的生物合成分为三个阶段, 即甲硫氨酸链延长、核心结构合成及侧链硫氧化修饰。拟南芥中催化最后一步侧链硫氧化反应由 MT GSLs 形成 MS GSLs 的酶为 FMO (flavin-containing monooxygenase), 即黄素单氧化酶。FMO 可通过 NADPH 辅助因子和 FAD 辅基催化亲核的氮、硫、磷等原子充氧, 将一个氧原子转移到底物

上^[10]。Hansen 和 Li 等在拟南芥中鉴定了 5 个黄素单氧化酶 $FMO_{GS-OX1-5}$ 可将脂肪族芥子油苷侧链的硫原子氧化使 MT GSLs 转化为 MS GSLs^[11,12]。 $FMO_{GS-OX1-5}$ 的体外重组蛋白具有很强的将 MT GSLs 转化为 MS GSLs 的活性, 拟南芥体内过量表达也明显改变 MT 和 MS 芥子油苷的相对含量, 使 MT 和 MS 的比值显著降低。5 个 FMO_{GS-OX} 基因功能缺失突变体中除了 fmo_{gs-ox4} 以外, fmo_{gs-ox1} 、 fmo_{gs-ox2} 、 fmo_{gs-ox3} 和 fmo_{gs-ox5} 都或多或少地呈现出芥子油苷侧链变化的表型, 即 MT GSLs 和 MS GSLs 芥子油苷比例发生了显著变化。为了深入揭示 FMO_{GS-OX4} 的表达特性和它对脂肪族芥子油苷侧链修饰的催化作用, 我们测定了这一组 FMO_{GS-OX} 缺失突变体中芥子油苷的含量和组分, 由于 FMO_{GS-OX5} 的催化作用具有长链特异性, 只催化侧链中含有 8 个碳原子的 8-甲硫辛基芥子油苷 (8-methylthiooctyl GSL) 的氧化作用, 而拟南芥中脂肪族芥子油苷以短链结构为主^[11,12], FMO_{GS-OX5} 与其它 4 个酶在短链底物的催化作用上无法比较, 因此, 我们只对 FMO_{GS-OX1} 、 FMO_{GS-OX2} 、 FMO_{GS-OX3} 和 FMO_{GS-OX4} 相应的基因缺失突变体芥子油苷组分及含量进行了系统的比对分析, 分析了同时期野生型植株中各基因的表达水平。同时对 FMO_{GS-OX4} 的空间表达模式进行了研究, 构建了以 FMO_{GS-OX4} 基因启动子驱动的 GFP 与 GUS 融合的双报告基因植物表达载体, 并将其转入拟南芥, 分析了 FMO_{GS-OX4} 基因在植物中的空间表达模式, 以期将 FMO_{GS-OX4} 的表达水平和空间表达模式相结合, 深入探讨 FMO_{GS-OX4} 对脂肪族芥子油苷侧链修饰作用的特殊性, 并对其突变体的表型做出合理解释。

在芥子油苷合成途径的前两个步骤中, 许多合成酶基因的组织定位、细胞定位以及亚细胞定位都

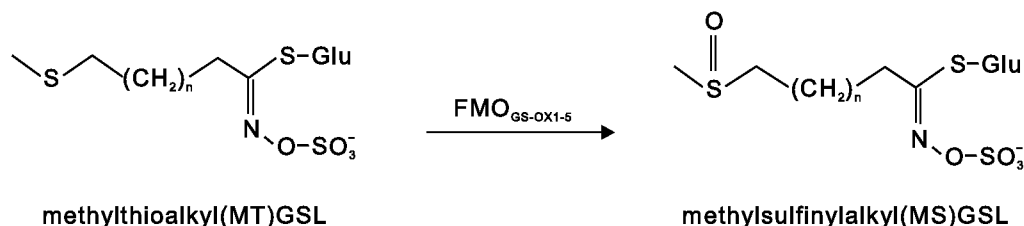


图 1 $FMO_{GS-OX1-5}$ 对脂肪族芥子油苷侧链硫的氧化作用

Fig. 1 S-oxygenating catalyzation of $FMO_{GS-OX1-5}$ for aliphatic glucosinolate side-chains

已经完成。催化侧链延长的酶 BCAT4^[13]，催化核心结构形成的 CYP79B2、CYP79F1、CYP79F2、UGT74B1^[14-17] 以及调节芥子油苷合成的转录因子 IOD1 和 OBP2 都主要在维管束表达^[18,19]，特别是韧皮部细胞。亚细胞定位结果显示，BCAT4 定位在细胞质中^[13]，MAM 位于叶绿体^[20]，CYP79F1、CYP79F2 及 CYP83A1 位于内质网^[15,21,22]，包括磺基转移酶在内的催化核心结构合成最终步骤的合成酶基因也定位在细胞质中^[23]。这些定位研究主要集中于芥子油苷核心结构的形成过程，关于侧链修饰的定位研究则只围绕 FMO_{GS-OX} 展开。Li 等以 FMO_{GS-OX1} 为主对 5 个基因进行了组织及亚细胞定位分析，结果显示 FMO_{GS-OX1} 主要在维管束表达，特别是韧皮部细胞，这与芥子油苷合成过程中的其他基因的定位结果相似^[24]。但对于其他 4 个 FMO_{GS-OX} 基因则没有详细的定位分析，本研究基于 *fmo_{gs-ox4}* 表型的特殊性，对 FMO_{GS-OX4} 的表达特性进行了深入的研究，配合表达水平的分析来探讨导致 *fmo_{gs-ox4}* 没有任何表型变化的原因。

1 材料与方法

1.1 实验材料

拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 生态型为 Columbia (Col-0)，经种子萌发后置于培养箱中培养，培养条件为温度 20℃，相对湿度 70%，光照强度 100 μmol·m⁻²·s⁻¹，光暗周期 16 h/8 h。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株为 Top10，农杆菌

(*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株为 LBA4404，质粒为 pCambia3300 NLS-GFP-GUS (构建方法见 1.2.4)。酶、Trizol 等分子试剂均购自 TIAN-GEN 生物科技公司。iScript cDNA 合成试剂盒购自 Bio-Rad。拟南芥突变体 Salk_079493 (*fmo_{gs-ox1}*)、Salk_080561 (*fmo_{gs-ox2}*)、GT13906 (*fmo_{gs-ox3}*)、Salk_059185 (*fmo_{gs-ox4}*) 种子购自 ABRC。

1.2 实验方法

1.2.1 FMO_{GS-OX} 突变体基因型及基因表达水平的鉴定

采用 CTAB 法分别提取各基因突变体植株的总 DNA。以该 DNA 为模板，采用“双引物”法 PCR 鉴定突变体的基因型。所用的引物序列见表 1。用于鉴定 *fmo_{gs-ox1}* 基因型的引物为 MU1 和 T-DNA 特异性引物 TD；用于鉴定 *fmo_{gs-ox2}* 基因型的引物为 MU2 和 T-DNA 特异性引物 LBa1；用于鉴定 *fmo_{gs-ox3}* 基因型的引物为 MU3 和 T-DNA 特异性引物 Ds_{5.2}；用于鉴定 *fmo_{gs-ox4}* 基因型的引物为 MU4 和 T-DNA 特异性引物 LBa1。取野生型及上述检测为纯合突变体的植株为供试材料，拟南芥生长至第 25 d 时取叶片，采用 Trizol 法分别提取总 RNA。以 iScript cDNA 合成试剂盒进行反转录合成 cDNA，以 cDNA 为模板进行半定量 RT-PCR 鉴定，以确定各 FMO_{GS-OX} 基因是否已经被敲除。扩增 FMO_{GS-OX1} 的引物为 RT1，扩增 FMO_{GS-OX2} 的引物为 RT2，扩增 FMO_{GS-OX3} 的引物为 RT3，扩增 FMO_{GS-OX4} 的引物为 RT4；用于扩增内参基因 *Actin2*

表 1 FMO_{GS-OX} 突变体基因型及表达水平鉴定引物
Table 1 Primers of FMO_{GS-OX} mutant genotypes and identification of expression level

引物名称 Primer name	序列 (5'~3') Sequence (5'~3')	
MU1	ACTCTTCAATTGATTTTGGGATC	TCATTTTGAAAATCAAATCATGC
MU2	TTTCCCACGATGAGATCTTT	TGCGTGTCTTTATAACACGTTTC
MU3	CCAAGCTTGATTAACTCGCATC	GCTCTAGACGCAATGTGGACTT
MU4	CATTTCGCAGAACCAAACATC	GACGTTTTTCGAAAGTGTTGG
RT1	ATGGCACCAACTCAAAACACAATC	TGATTTCGAGGAAATAAGAAGGA
RT2	GAGGATATGGGAAGGATGGAAACTAAT	ATGGCACCAAGCTCAAAACCC
RT3	ATGGCACCAAGCTCAAAACCAAATC	TCTTCCATTTTCGAGGTAATAAG
RT4	ATGGCCACAGCTCCTAGTCCAAT	TCTTCCGGATTTCGAGAAAACGA
Actin	TTACCCGATGGGCAAGTC	GCTCATACGGTCAGCGATAC
TD	GCGTGGACCGCTTGCTGCAACT	
LBa1	TGGTTCACGATAGTGGGCCATCG	
Ds _{5.2}	GCGTTTTGTATATCCCGTTTCCGT	

的引物为 Actin。野生型拟南芥中各 FMO_{GS-OX} 基因表达水平的 RT-PCR 检测方法同上。

1.2.2 FMO_{GS-OX} 突变体芥子油苷含量的测定

取上述生长至 25 d 的 fmo_{gs-ox1} 、 fmo_{gs-ox2} 、 fmo_{gs-ox3} 、 fmo_{gs-ox4} 的纯合突变体植株及野生型拟南芥叶片用于芥子油苷含量的测定。分别取 5 种基因型植株的基生叶 2~3 枚，称重，参照 Hansen 等^[12] 的方法进行芥子油苷提取及组分含量的 HPLC 分析。

1.2.3 FMO_{GS-OX4} 基因启动子的克隆

根据 FMO_{GS-OX4} 基因起始密码子 ATG 上游 DNA 序列设计了一对引物 5'-ggcttaauTCCCCCTCATAAATTCTTCC-3' 和 5'-gggttaauTTTTCAAAGTTTTGAATG-3'，以野生型拟南芥基因组 DNA 为模板，PCR 扩增获得 2 kb 的 FMO_{GS-OX4} 基因启动子序列。

1.2.4 植物表达载体构建

以植物表达载体 pCambia3300 为基础，加入 NLS(核定位信号序列)和融合基因 $GFP-GUS$ 序列，参照 Nour-Eldin^[25] 等方法引入 User 克隆位点，将 1.2.3 中 PCR 扩增产物连入表达载体，获得由 FMO_{GS-OX4} 启动子驱动的表达 $GFP-GUS$ 融合基因的植物表达载体 $FMO_{GS-OX4} : GFP-GUS$ (图 2)。

1.2.5 外源基因转化拟南芥及转基因植株的筛选

采用农杆菌介导的花序浸染法^[26] 将构建好的植物表达载体 $FMO_{GS-OX4} : GFP-GUS$ 转入 Col-0 生态型拟南芥，经筛选压力为 50 mg/L 的卡那霉素 (Km) 筛选得到抗性植株。采用 CTAB 法分别提取抗性植株的基因组 DNA，分别以 GFP 及 GUS 基因的特异性引物，进行外源基因整合的 PCR 鉴定， GFP 特异性引物为 5'-GTAAAGGAGAAGAACTTTTCACTGG-3' 和 5'-AGCTGTTACAACTCAAGGA-

TC-3'。 GUS 特异性引物为 5'-GTCGCGCAAGAC-TGTAACC-3' 和 5'-GGTCGCGAGTGAAGATCC-3'。取 PCR 检测为阳性的植株进行后续的组织定位研究。

1.2.6 GFP 荧光观察及 GUS 组织化学检测

取转基因阳性植株的种子，灭菌、春化后播种于 1/2MS 固体培养基，于四叶期时移栽到蛭石:黑土为 1:1 的培养基质中继续培养。取生长 25 d 的转化植株的不同组织于 GUS 染液中 37℃ 保温 12 h^[27]。反应完毕后，再经 96% 乙醇于 65℃ 脱色至叶绿素完全除去，将花梗用琼脂糖包埋^[28]，使用 Leica VT1000S 切片机进行切片，然后用实体显微镜拍摄系统观察拍照。将同时期材料置于 OLYMPUS BX43 荧光正置显微镜下 488 nm 激发绿色荧光，观察拍照。

2 结果与分析

2.1 FMO_{GS-OX1} 、 FMO_{GS-OX2} 、 FMO_{GS-OX3} 和 FMO_{GS-OX4} 基因缺失突变体表型分析

首先对购自 ABRC 的 fmo_{gs-ox1} 、 fmo_{gs-ox2} 、 fmo_{gs-ox3} 、 fmo_{gs-ox4} 突变体 Salk_079493、Salk_080561、GT13906 和 Salk_059185 进行基因型的检测，取纯合的 T-DNA 插入突变体做实验材料，RT-PCR 检测证明各突变体均为目的基因完全敲除的突变体。RT-PCR 结果见图 3。

FMO_{GS-OX} 的功能是将 MT GSLs 中的硫氧化生成 MS GSLs (图 1)，缺失时发生明显变化的是 MT GSLs 和 MS GSLs 的相对含量，理论上不影响芥子油苷总含量及其它芥子油苷 (如吲哚族芥子油苷) 的含量，因此我们这里只对脂肪族芥子油苷含量进行分析，对侧链上含有 3~8 个碳原子的丙基芥



LB: 左边界 (Left border, T-DNA); RB: 右边界 (Right border, T-DNA); Tnos: 胭脂碱合成酶基因终止子; Km: 卡那霉素抗性基因; CaMV35S: 花椰菜花叶病毒 35S 启动子; FMO_{GS-OX4} Pro: FMO_{GS-OX4} 基因启动子; NLS-GFP-GUS: 带有核定位信号的 GFP 和 GUS 融合蛋白。
LB: Left border; RB: Right border; Tnos: NOS terminator; Km: Kanamycin resistance gene; CAMV35S: 35S constitutive promoter; FMO_{GS-OX4} Pro: Endogenous promoter of FMO_{GS-OX4} ; NLS-GFP-GUS: GFP and GUS fusion protein with nuclear localization signal.

图 2 $FMO_{GS-OX4} : GFP-GUS$ 双报告基因植物表达载体示意图
Fig. 2 Schematic map of plant expression vector $FMO_{GS-OX4} : GFP-GUS$

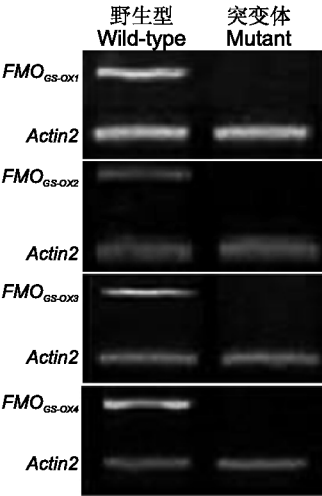


图 3 突变体中 FMO_{GS-OX} 基因的 RT-PCR 检测
Fig. 3 Semi-quantitative RT-PCR analysis of transcript level of FMO_{GS-OX} genes in mutants

子油苷(C3)、丁基芥子油苷(C4)、戊基芥子油苷(C5)、己基芥子油苷(C6)、庚基芥子油苷(C7)和辛基芥子油苷(C8)分别用相应的 MS GSLs 和 MT GSLs 的比值 MS/MT 来表示侧链结构的变化。各 fmo_{gs-ox} 突变体中由于 FMO_{GS-OX} 酶缺失, MT GSLs 向 MS GSLs 的转化减弱, MS/MT 的值理论上应该比野生型有所降低。由表 2 可知 fmo_{gs-ox1} 中 C4、C5、C7 和 C8 及 fmo_{gs-ox2} 中 C4 和 C5 的 MS/MT 值均显著低于野生型。由于无法通过商业渠道获得有效的 Col-0 生态型 fmo_{gs-ox3} 突变体, 本研究中所采用的 fmo_{gs-ox3} 突变体的遗传背景为 Ler 生

表 2 突变体中 MS 芥子油苷和 MT 芥子油苷相对含量的变化
Table 2 Altered relative content of MS GSLs and MT GSLs in mutants

芥子油苷含量比例 MS/MT	野生型 Wild-type	突变体 Mutant			
		fmo_{gs-ox1}	fmo_{gs-ox2}	fmo_{gs-ox3}^b	fmo_{gs-ox4}
C ₃	30.00	26.00	28.50	2.60(48 ^c) ^a	29.00
C ₄	6.00	2.00 ^a	3.60 ^a	ND	6.10
C ₅	4.80	2.00 ^a	2.90 ^a	ND	4.70
C ₆	0.50	0.35	0.40	ND	0.51
C ₇	2.30	1.70 ^a	2.00	ND	2.35
C ₈	6.20	4.30 ^a	5.80	8.80(10 ^c)	6.32

注: a: 差异显著; b: fmo_{gs-ox3} 拟南芥突变体生态型为 Ler; c: 野生型 Ler 中 MS/MT 的值; ND: 未检测到。t 检验 $p < 0.05$ 。
Notes: a: Significant differences; b: Mutant fmo_{gs-ox3} in eco-type Ler background; c: MS/MT in wild-type of Ler; ND: Not detected. t test $p < 0.05$.

态型, 其叶片中的 C4、C5、C6、C7 由于含量过低无法检测到, 但 C3 的 MS/MT 与野生型相比显著降低(表 2)。因此 FMO_{CS-OX1} 、 FMO_{CS-OX2} 和 FMO_{CS-OX3} 的基因缺失突变体均具有脂肪族芥子油苷侧链结构变化的表型。只有 fmo_{gs-ox4} 中 C3、C4、C5、C6、C7 和 C8 的 MS/MT 均与野生型无明显差别(表 2), 说明 FMO_{CS-OX4} 基因缺失不能象其它 FMO_{GS-OX} 基因缺失时一样产生表型。 fmo_{gs-ox4} 缺乏表型可能是由功能冗余引起的, 因为 4 个 FMO_{GS-OX} 都具有催化 MT GSLs 转化成 MS GSLs 的功能, FMO_{GS-OX4} 的缺失可能引起了其它 FMO_{GS-OX} 基因的反馈性增强, 掩盖了表型, 但 fmo_{gs-ox1} 、 fmo_{gs-ox2} 和 fmo_{gs-ox3} 均或多或少呈现表型, 只有 fmo_{gs-ox4} 例外, 说明了 FMO_{CS-OX4} 的特殊性。 fmo_{gs-ox4} 缺乏表型也可能是由于基因表达水平过低引起的。因此我们在测定各突变体芥子油苷含量时, 取相同生长时期的野生型植株对 4 个 FMO_{GS-OX} 基因的表达进行了 RT-PCR 分析(图 4), 结果发现 FMO_{CS-OX4} 基因的表达水平明显高于 FMO_{GS-OX1} 、 FMO_{GS-OX2} 和 FMO_{GS-OX3} 。说明 fmo_{gs-ox4} 缺乏表型并不是由 FMO_{GS-OX4} 表达水平过低造成的。我们认为 fmo_{gs-ox4} 缺乏表型可能与其空间表达模式有关, 为了验证这一假设, 我们对 FMO_{CS-OX4} 基因进行了组织定位的研究。

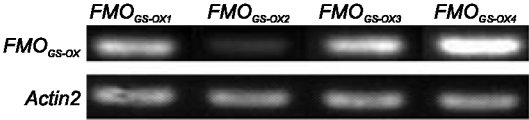


图 4 野生型植株中 FMO_{GS-OX} 基因的表达水平
Fig. 4 Semi-quantitative RT-PCR analysis of transcript level of the FMO_{GS-OX} gene in wild-type plants

2.2 FMO_{GS-OX4} : GFP-GUS 表达载体对拟南芥的遗传转化及分子检测

采用农杆菌介导的花序侵染法将 FMO_{GS-OX4} : GFP-GUS 植物表达载体转入拟南芥, 对具有卡那霉素抗性的植株分别以 GFP 和 GUS 基因的特异性引物进行 PCR 鉴定。预期 GFP 基因的 PCR 扩增产物为 556 bp, GUS 基因的 PCR 扩增产物为 1147 bp。在随机选取的 10 株卡那霉素抗性植株中有 8 株检测出预期的条带(图 5), 说明 GFP-GUS 融合基因已经整合入这 8 株植物的基因组

DNA 中，收取种子， T_2 代可用于后续的组织定位实验。

2.3 *FMO_{GS-OX4}* 启动子驱动的报告基因在拟南芥不同组织中的表达

取 *FMO_{GS-OX4}*: GFP-GUS 转基因植株，对不同组织进行了 GFP 荧光信号检测和 GUS 染色分析(图 6)。GFP 荧光检测的结果表明，叶片中 *FMO_{GS-OX4}* 只在侧脉表达，主叶脉检测不到荧光信号(图 6: A)。在花梗的横切面上，部分皮层和韧皮部细胞可以观察到荧光。内皮层和韧皮部之间的细胞应该是硫细胞的位置，这个位置的 GFP 和 GUS 信号都非常微弱或者检测不到(图 6: B)。角果果皮的维管束和种子的种柄处也有较强的荧光信

号(图 6: C, D)。GUS 染色分析与 GFP 荧光信号所获得的结果具有高度的一致性(图 6: A1, B1, C1, D1)。

3 讨论

3.1 *FMO_{GS-OX4}* 的空间表达特点

5 个 *FMO_{GS-OX}* 基因缺失突变体中只有 *fmo_{gs-ox4}* 没有表现出 MT GSLs 与 MS GSLs 组分比例的明显变化^[11,12]。鉴于 *fmo_{gs-ox4}* 的特殊性，我们对 *FMO_{GS-OX4}* 基因的空间表达模式进行了详细分析。

目前，芥子油苷合成酶基因的组织定位研究已经取得了一定的成果，大多数研究集中于芥子油苷核心结构的形成过程，关于侧链修饰的定位研究则

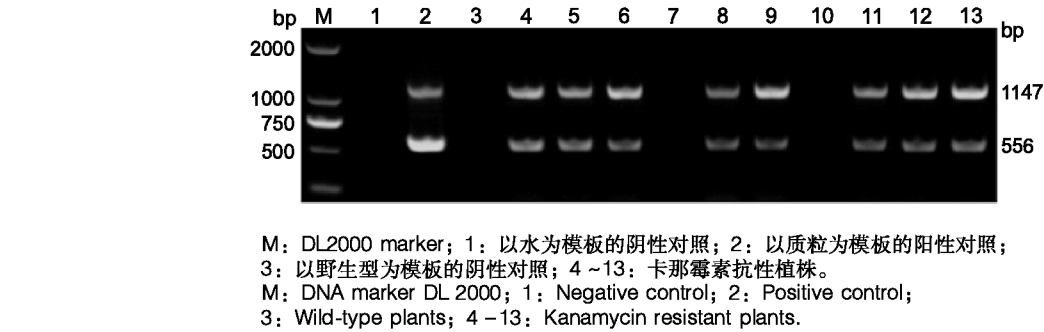
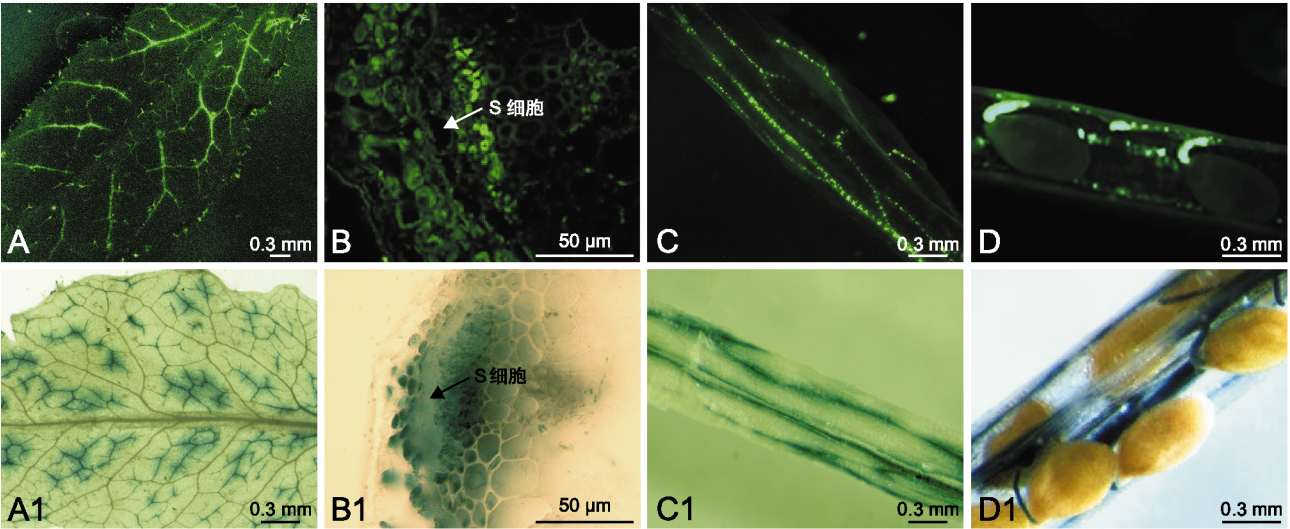


图 5 转基因植株的分子检测
Fig. 5 PCR confirmation of transgenic plants



A: 叶片 GFP 荧光信号; A1: 叶片 GUS 染色; B: 花梗横切面 GFP 荧光信号; B1: 花梗横切面 GUS 染色; C: 角果果皮 GFP 荧光信号; C1: 角果果皮 GUS 染色; D: 种柄 GFP 荧光信号; D1: 种柄 GUS 染色。S: 硫细胞。
A: GFP signal in leaf; A1: GUS signal in leaf; B: GFP signal in flower stalk; B1: GUS signal in flower stalk; C: GFP signal in silique wall; C1: GUS signal in silique wall; D: GFP signal in seed funicles; D1: GUS signal in seed funicles. S: S cell.

图 6 *FMO_{GS-OX4}* 启动子驱动报告基因的表达模式
Fig. 6 Expression patterns of reporter genes driven by *FMO_{GS-OX4}* promoter

很少。Li 等^[24]主要以 FMO_{GS-OX1} 为代表对脂肪族芥子油苷侧链氧化作用进行了组织及亚细胞定位分析,但对于其它侧链修饰酶基因的详细定位还有待深入探讨。本研究对 FMO_{GS-OX4} 进行了详细的空间表达模式分析。结果表明: FMO_{GS-OX4} 主要在花梗、叶、角果的维管组织及种柄等处表达,与前人研究中芥子油苷的合成部位极其吻合^[13-23]。但 FMO_{GS-OX4} 在叶片中的表达有其特殊性,即在主脉中无表达,这与 FMO_{GS-OX1} (在主脉中强烈表达)完全不同。Shroff 等在研究叶片中芥子油苷分布与昆虫取食关系时发现,芥子油苷主要集中分布于主脉和叶片边缘^[29],因此在正常生长情况下, FMO_{GS-OX4} 与其催化底物是分离的,由此可推论 FMO_{GS-OX4} 空间上与其底物的分离可能是其缺失突变体缺乏表型的主要原因。

3.2 FMO_{GS-OX4} 的生理功能

研究结果显示 FMO_{GS-OX4} 的空间表达模式有其自身的特殊性,结合其基因缺失突变体的特殊表型,推测 FMO_{GS-OX4} 与其它 FMO_{GS-OX} 功能上并不完全冗余。植株在正常生长条件下,芥子油苷主要集中在主叶脉中^[29],而 FMO_{GS-OX4} 只在侧脉表达,与底物 MT 芥子油苷分离,不能表现出催化作用,因而在其缺失时无表型变化。AtGenExpress (<http://www.weigelworld.org/resources/microarray/At-GenExpress/>) 数据库中数据显示低温、机械损伤等逆境胁迫可诱导 FMO_{GS-OX4} 的表达,这暗示 FMO_{GS-OX4} 可能在上述逆境条件下,扩大自身空间表达范围,从而与底物接触,改变芥子油苷侧链结构。另一种可能是在逆境下,芥子油苷扩散到其相邻细胞中与 FMO_{GS-OX4} 接触,发生芥子油苷侧链结构上的变化。 FMO_{GS-OX4} 与底物空间上的分离在花梗中也有表现。根据 Koroleva 等的研究,拟南芥花梗中每个维管束的韧皮部和内皮层之间有 1~6 个大型细胞,称为硫细胞(S 细胞),内部含有高浓度芥子油苷,是花梗中芥子油苷集中分布区域^[30]。而 FMO_{GS-OX4} 主要在其相邻的皮层细胞和韧皮部细胞中表达,这种分布模式与 FMO_{GS-OX1} 很相似^[24],这说明其它的 FMO_{GS-OX} 酶在花梗中也可能存在相似的作用机制,即正常生长条件下与底物隔离,在机械损伤等逆境胁迫下被诱导并与相邻细胞

中的底物相接触,催化芥子油苷侧链结构的变化,从而启动相应的防御性反应。 FMO_{GS-OX4} 空间表达模式的分析揭示了芥子油苷合成途径中底物与酶之间一种可能的作用机制,为深入理解芥子油苷的抗虫、抗病机制提供了参考。

参考文献:

- [1] Lee S, Kaminaga Y, Cooper B, Pichersky E, Dudareva N, Chapple C. Benzoylation and sinapoylation of glucosinolate R-groups in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2012, 72(3): 411-422.
- [2] Fahey J W, Zalcmann A T, Talalay P. The chemical diversity and distribution of glucosinolates and isothiocyanates among plants [J]. *Phytochemistry*, 2001, 56: 5-51.
- [3] Kliebenstein D J, Gershenzon J, Mitchell-Olds T. Comparative quantitative trait loci mapping of aliphatic, indolic and benzylic glucosinolate production in *Arabidopsis thaliana* leaves and seeds [J]. *Genetics*, 2001, 159(1): 359-370.
- [4] Tierens K F, Thomma B P, Brouwer M, Schmidt J, Kistner K, Porzel A, Mauch-Mani B, Cammue B P, Broekaert W F. Study of the role of antimicrobial glucosinolate-derived isothiocyanates in resistance of *Arabidopsis* to microbial pathogens [J]. *Plant Physiol*, 2001, 125(4): 1688-1699.
- [5] 程坤, 杨丽梅, 方智远, 刘玉梅, 庄木, 张扬勇, 孙培田. 十字花科植物中主要硫代葡萄糖苷合成与调节基因的研究进展 [J]. *中国蔬菜*, 2010, 12: 1-6.
- [6] 袁高峰, 陈思学, 汪俏梅. 芥子油苷及其代谢产物的生物学效应研究与应用 [J]. *核农学报*, 2009, 23(4): 664-668.
- [7] Fahey J W, Haristoy X, Dolan P M, Kensler T W, Scholtus I, Stephenson K K, Talalay P, Lozniewski A. Sulforaphane inhibits extracellular, intracellular, and antibiotic-resistant strains of *helicobacter pylori* and prevents benzo[a]pyrene-induced stomach tumors [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(11): 7610-7615.
- [8] Rose P, Huang Q, Ong C N, Whiteman M. Broccoli and watercress suppress matrix metalloproteinase-9 activity and invasiveness of human MDA-MB-231 breast cancer cells [J]. *Toxicology*

- Appl Pharmacol*, 2005, 209(2): 105–113.
- [9] Talalay P, Fahey J W, Healy Z R, Wehage S L, Benedict A L, Min C, Dinkova-Kostova A T. Sulforaphane mobilizes cellular defenses that protect skin against damage by UV radiation [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2007, 104 (44): 17500–17505.
 - [10] Schlaich N L. Flavin-containing monooxygenases in plants: looking beyond detox [J]. *Trends Plant Sci*, 2007, 12(9): 412–418.
 - [11] Li J, Hansen B G, Ober J A, Kliebenstein D J, Halkier B A. Subclade of flavin-monooxygenases involved in aliphatic glucosinolate biosynthesis [J]. *Plant Physiol*, 2008, 148(3): 1721–1733.
 - [12] Hansen B G, Kliebenstein D J, Halkier B A. Identification of a flavin monooxygenase as the S-oxygenating enzyme in aliphatic glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2007, 50 (5): 902–910.
 - [13] Schuster J, Knill T, Reichelt M, Gershenzon J, Binder S. Branched-chain aminotransferase 4 is part of the chain elongation pathway in the biosynthesis of methionine-derived glucosinolates in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2006, 18(10): 2664–2679.
 - [14] Mikkelsen M D, Hansen C H, Wittstock U, Halkier B A. Cytochrome P450 CYP79B2 from *Arabidopsis* catalyzes the conversion of tryptophan to indole-3-acetaldoxime, a precursor of indole glucosinolates and indole-3-acetic acid [J]. *J Biol Chem*, 2000, 275(43): 33712–33717.
 - [15] Reintanz B, Lehnen M, Reichelt M, Gershenzon J, Kowalczyk M, Sandberg G, Godde M, Uhl R, Palme K. Bus, a bushy *Arabidopsis* CYP79F1 knockout mutant with abolished synthesis of short-chain aliphatic glucosinolates [J]. *Plant Cell*, 2001, 13(2): 351–367.
 - [16] Tantikanjana T, Yong J W, Letham D S, Griffith M, Hussain M, Ljung K, Sandberg G, Sundaresan V. Control of axillary bud initiation and shoot architecture in *Arabidopsis* through the SUPER-SHOOT gene [J]. *Gene Dev*, 2001, 15: 1577–1588.
 - [17] Grubb C D, Zipp B J, Ludwig-Müller J, Masuno M N, Molinski T F, Abel S. *Arabidopsis* glucosyltransferase UGT74B1 functions in glucosinolate biosynthesis and auxin homeostasis [J]. *Plant J*, 2004, 40: 893–908.
 - [18] Levy M, Wang Q, Kaspi R, Parrella M P, Abel S. *Arabidopsis* IQD1, a novel calmodulin-binding nuclear protein, stimulates glucosinolate accumulation and plant defense [J]. *Plant J*, 2005, 43 (1): 79–96.
 - [19] Skirycz A, Reichelt M, Burow M, Birkemeyer C, Rolcik J, Kopka J, Zanor M I, Gershenzon J, Strnad M, Szopa J, Mueller-Roeber B, Witt I. DOF transcription factor AtDof1. 1 (OBP2) is part of a regulatory network controlling glucosinolate biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2006, 47 (1): 10–24.
 - [20] Textor S, de Kraker J W, Hause B, Gershenzon J, Tokuhiya J G. MAM3 catalyzes the formation of all aliphatic glucosinolate chain lengths in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2007, 144: 60–71.
 - [21] Chen S, Glawischnig E, Jørgensen K, Naur P, Jørgensen B, Olsen C E, Hansen C H, Rasmussen H, Pickett J A, Halkier B A. CYP79F1 and CYP79F2 have distinct functions in the biosynthesis of aliphatic glucosinolates in *Arabidopsis* [J]. *Plant J*, 2003, 33: 923–937.
 - [22] Naur P, Petersen B L, Mikkelsen M D, Bak S, Rasmussen H, Olsen C E, Halkier B A. CYP83A1 and CYP83B1, two nonredundant cytochrome P450 enzymes metabolizing oximes in the biosynthesis of glucosinolates in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2003, 133: 63–72.
 - [23] Klein M, Reichelt M, Gershenzon J, Papenbrock J. The three desulfoglucosinolate sulfotransferase proteins in *Arabidopsis* have different substrate specificities and are differentially expressed [J]. *FEBS J*, 2006, 273: 122–136.
 - [24] Li J, Kristiansen K A, Hansen B G, Halkier B A. Cellular and subcellular localization of flavin-monooxygenases involved in glucosinolate biosynthesis [J]. *J Exp Bot*, 2011, 62(3): 1337–1346.
 - [25] Nour-Eldin HH, Hansen B G, Norholm M H, Jensen J K, Halkier B A. Advancing uracil-excision based cloning towards an ideal technique for

- cloning PCR fragments[J]. *Nucleic Acids Res*, 2006, 34(18): e122.
- [26] Clough S J, Bent A F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*[J]. *Plant J*, 1998, 16(6): 735–743.
- [27] Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants[J]. *EMBO J*, 1987, 6(13): 3901–3907.
- [28] Peleman J, Saito K, Cottyn B, Engler G, Seurinck J, Montagu M V, Inze D. Structure and expression analyses of the S-adenosyl synthetase gene family in *Arabidopsis thaliana*[J]. *Gene*, 1989, 84: 359–369.
- [29] Shroff R, Vergara F, Muck A, Svatos A, Gershenzon J. Nonuniform distribution of glucosinolates in *Arabidopsis thaliana* leaves has important consequences for plant defense[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, 105(16): 6196–6201.
- [30] Koroleva O A, Davies A, Deeken R, Thorpe M R, Tomos A D, Hedrich R. Identification of a new glucosinolate-rich cell type in *Arabidopsis* flower stalk[J]. *Plant Physiol*, 2000, 124: 599–608.

(责任编辑:王豫鄂)

欢迎订阅 2014 年《植物资源与环境学报》

全国中文核心期刊 中国科技核心期刊

中国科学引文数据库核心期刊 RCCSE 中国核心学术期刊(A)

季刊, 单价 20 元, 邮发代号: 28–213, 国内统一连续出版物号: CN 32–1339/S

《植物资源与环境学报》系江苏省·中国科学院植物研究所、江苏省植物学会等单位联合主办的学术刊物, 国内外公开发行人。本刊为全国中文核心期刊(北大)、中国科技核心期刊、中国科学引文数据库核心期刊(CSCD)和 RCCSE 中国核心学术期刊(A), 并为 BA、CA、CAB、Elsevier's、中国生物学文摘、中国环境科学文摘、中国科学引文数据库、万方数据——数字化期刊群、中国学术期刊(光盘版)和中文科技期刊数据库等国内外著名刊库收录。

本刊围绕植物资源与环境两个中心命题, 报道我国植物资源的考察、开发利用和植物物种多样性保护, 自然保护区与植物园的建设和管理, 植物在保护和美化环境中的作用, 环境对植物的影响以及与植物资源和植物环境有关学科领域的原始研究论文、研究简报和综述等。凡从事植物学、生态学、自然地理学以及农、林、园艺、医药、食品、轻化工和环境保护等领域的科研、教学、技术人员及决策者均可以从本刊获得相关学科领域的研究进展和信息。

本刊为季刊, 大 16 开本, 每期 120 页。全国各地邮局均可订阅, 每期定价 20 元, 全年 80 元。若错过征订时间或需补齐 1992 年至 2013 年各期者, 请直接与编辑部联系邮购。1992 年至 1993 年每年 8 元; 1994 年至 2000 年每年 16 元; 2001 年至 2005 年每年 24 元; 2006 年至 2008 年每年 40 元; 2009 年至 2011 年每年 60 元; 2012 年至 2013 年每年 80 元(均含邮资, 如需挂号另付挂号费 3 元)。

编辑部地址: 南京中山门外江苏省中国科学院植物研究所内(邮编 210014); 电话: 025-84347016, 025-84347014; QQ: 2219161478; E-mail: zwzy@mail.cnbg.net。本刊网上投稿系统已开通运行, 网址: <http://www.cnbg.net/Tg/Contribute/Login.aspx>, 欢迎使用并提出宝贵意见。

欢迎订阅! 欢迎投稿!