植物螯合肽合酶基因 *AtPCS2* 的表达调控

丁戈, 彭佳师, 张国斌, 易红英, 付艳蕾, 龚继明*

中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所, 植物分子遗传国家重点实验室, 上海 200032

* 联系人, E-mail: jmgong@sibs.ac.cn

收稿日期: 2013-09-19; 接受日期: 2013-10-21

国家自然科学基金创新研究群体科学基金(批准号: 31121063)资助项目

doi: 10.1360/052013-309

摘要 植物螯合肽合酶(PCS)受重金属离子激活, 并以还原型谷胱甘肽为底物合成植物螯合肽(PCs), 在植物和真菌的重金属解毒机制中起重要作用. 拟南芥基因组中有两个编码 PCS 的基因 *AtPCS1* 和 *AtPCS2*, 但 *AtPCS1* 单基因功能缺失即可导致相应的突变体 *cad1-3* 对镉高度敏感, 其体内也检测不到 PCs; 而体外表达分析表明, *AtPCS2* 具有完全的 PCs 合酶活性, 预示植物体内可能存在 *AtPCS2* 的负向调控机制. 基于该推测, 构建了 *CaMV 35S* 启动子驱动的 *AtPCS2* 基因编码区与 *c-Myc* 抗原标签融合的过表达载体. 结果表明, 在 *cad1-3* 的 *CaMV 35S/AtPCS2:cMyc* 的异位表达株系中, *AtPCS2* 的 mRNA 和蛋白都保持较高的表达量. 不仅如此, *AtPCS2* 具有植物螯合肽合成能力, 并完全互补了 *cad1-3* 突变体的镉敏感性状. *AtPCS2* 和 EYFP 的融合蛋白在细胞质有明显表达, 在细胞核也检测到一定信号. 以上结果表明, *AtPCS2* 在植物体内可能主要受转录水平调控, 而且可能具有调节 PCs 合成以外的其他生化功能.

关键词

cad1-3
AtPCS2
镉

在植物和真菌的重金属解毒机制中, 植物螯合肽(phytochelatin, PCs)起重要作用. 植物螯合肽合酶(phytochelatin synthase, PCS)受重金属离子, 如 Cd^{2+} , Cu^{2+} , Zn^{2+} , Pb^{2+} 以及类金属 As^{5+} 等激活, 以还原型谷胱甘肽(glutathione, GSH)为底物合成 PCs^[1,2]. PCs 的一般结构式是 $(\gamma\text{-Glu-Cys})_n\text{-Gly}$, 其中 $n=2\sim11$ ^[2-4]. 研究表明, PCs 形成后, 通过其分子中半胱氨酸的巯基与 Cd^{2+} 等迅速整合生成低分子量复合物 LMWC(low molecular weight complex)^[5,6], 然后低分子量复合物被以 SpHMT1(*Schizosaccharomyces pombe* heavy metal tolerance 1)为代表的液泡转运蛋白分隔到液泡中, 与其中的 Cd^{2+} 和硫化物形成更为稳定的高分子量复合物 HMWC(high molecular weight complex)^[3], 从而降

低细胞质中游离重金属离子的浓度, 进而减轻对细胞的毒害.

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)具有 *AtPCS1* 和 *AtPCS2* 两个高度同源的植物螯合肽合酶基因, 在植物体内能同时检测到其 mRNA, 但是否都具有功能一直未有定论, 因为在 *AtPCS1* 基因的功能缺失突变体 *cad1-3* 中, *AtPCS2* 仍然表达, 但是已检测不到 PCs^[7,8], 预示 *AtPCS2* 可能不具有调控 PCs 合成的活性. 但体外表达分析表明, *AtPCS2* 能够使缺乏 PCs 的裂殖酵母(*S. pombe*)突变株 *pcs⁻* 和酿酒酵母(*S. cerevisiae*)野生型细胞产生 PCs, 提高它们对镉(Cd)毒害的抗性^[9]. 这些看似矛盾的事实预示, 在植物体内可能存在一种未知的负向调控机制, 抑制了 *AtPCS2* 的

引用格式: 丁戈, 彭佳师, 张国斌, 等. 植物螯合肽合酶基因 *AtPCS2* 的表达调控. 中国科学: 生命科学, 2013, 43: 1112~1118Ding G, Peng J S, Zhang G B, et al. Regulation of the phytochelatin synthase gene *AtPCS2* in *Arabidopsis thaliana*. SCIENTIA SINICA Vitae, 2013, 43: 1112~1118, doi: 10.1360/052013-309

酶活性,但是具体的调控机制还不清楚。

因此,构建了 *CaMV 35S* 启动子驱动的 *AtPCS2* 基因编码区与 *c-Myc* 抗原标签融合的过表达载体,试图回答 *AtPCS2* 基因在植物体内是否在转录、翻译或翻译后水平上受到调控等最基本的科学问题。

1 材料与方法

1.1 材料、种子萌发和胁迫处理

拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L. Heynh.)哥伦比亚生态型野生型 Col-0 和突变体 *cad1-3* 的种子以 70% 乙醇表面灭菌 12 min, 无菌水清洗 5 次, 4℃ 春化 3 天, 点种在 1/4×植物营养液(plant nutrient solution, PNS)固体培养基(0.8%蔗糖、0.8%琼脂)上培养 4 天, 移栽到土壤基质(泥炭土、蛭石及珍珠岩按体积比 4:6:1 混合)或 1/4×PNS 中。

镉胁迫处理: 拟南芥种子在含有 50 μmol/L CdCl₂ 的 1/4×PNS 无糖固体培养基(1.5%琼脂)上垂直生长 7 天。拟南芥生长环境为相对湿度 70%, 恒温 22~24℃, 光照周期为 16 h 光照/8 h 黑暗, 光照强度 80~200 μE m⁻² s⁻¹ 的人工气候室。1/4×PNS 成分为 1.25 mmol/L KNO₃, 0.625 mmol/L KH₂PO₄, 0.5 mmol/L MgSO₄, 0.5 mmol/L Ca(NO₃)₂, 0.025 mmol/L FeNa-EDTA, 17.5 μmol/L H₃BO₃, 0.125 μmol/L CuSO₄, 3.5 mol/L MnCl₂, 0.25 μmol/L ZnSO₄, 0.05 μmol/L NaMoO₄, 2.5 μmol/L NaCl 和 0.0025 μmol/L CoCl₂, pH 5.7^[10]。

1.2 实时定量 PCR 和 RT-PCR

拟南芥在营养液中培养 4 周后, 用 TRIzol reagent(Invitrogen, 美国)抽提叶片总 RNA。总 RNA 样品(1 μg)用 PrimeScriptTM RT reagent Kit With gDNA Eraser(大连宝生物工程有限公司)进行反转录合成 cDNA。实时定量 PCR 在 Mastercycler ep Realplex2 PCR 仪(Eppendorf, 德国)上运行, 使用 SYBR Premix Ex Taq(大连宝生物工程有限公司)进行 PCR 反应, 反应程序参考说明书。以 *AtActin2* 作为内参, 进行 *AtPCS2* 基因的表达分析。实时定量 PCR 采用正向引物(5'-aggtatcgctgaccgtatgag-3')和反向引物(5'-catctgctggaatgtgctga-3')扩增 *AtActin2*, 采用正向引物(5'-tgttcaagcatgtggataagttt-3')和反向引物(5'-ctacca-ctgtcactttctcctc-3')扩增 *AtPCS2*。RT-PCR 采用正向引

物(5'-caccctgttcttcttaccgag-3')和反向引物(5'-cactgagc-acaatgttaccgta-3')扩增 *AtActin2*, 采用正向引物(5'-ttc-cgcacaatcagagca-3')和反向引物(5'-aggtaaagccaacag-aaga-3')扩增 *AtPCS2*。

1.3 表达载体的构建和农杆菌介导的拟南芥转化

采用正向引物(5'-ggatccatgtctatggcgagtttga-3')和反向引物(5'-gagctcttaggcaggagcagagagt-3')克隆 *AtPCS2* 编码序列(coding sequence, CDS)并通过酶切插入到载体 pCambia1300 的 *Bam*H I ~ *Sac* I 位点间(酶切位点在引物序列中以下画线标出, 下同), 得到载体 A(*CaMV 35S::AtPCS2 CDS/pCambia1300*)。采用正向引物(5'-ggatccatgtctatggcgagtttga-3')和反向引物(5'-actagttaggcaggagcagagagt-3')分别克隆 *AtPCS2* CDS 并插入到载体 *CaMV 35S::cMyc/pCambia1300* 和 *CaMV 35S::cMyc/pBI121* 的 *Bam*H I ~ *Spe* I 位点间, 分别得到 *cMyc* 在基因 3'端融合的载体 B(*CaMV 35S::AtPCS2CDS-cMyc/pCambia1300*) 和载体 E (*CaMV 35S::AtPCS2CDS-cMyc/pBI121*)。上述表达载体通过热激法导入农杆菌 GV3101, 并通过花序浸染法转化拟南芥 *cad1-3* 突变体^[11]。获得 T₃ 代纯合的单拷贝插入转基因植株用于功能研究。

1.4 *EYFP*载体的构建和 *EYFP*融合蛋白的亚细胞定位分析

采用正向引物(5'-ctcgagatgtctatggcgagtttga-3')和反向引物(5'-gaattcttaggcaggagcagagagt-3')克隆 *AtPCS2* 编码序列并插入到载体 *EYFP/pMON530* 的 *Xho* I ~ *Eco*R I 的位点间, 得到 *EYFP* 在基因 5'端融合的植物瞬时表达载体 C(*CaMV 35S::EYFP:AtPCS2 CDS/pMON530*)。采用正向引物(5'-ctcgagatgtctatggcgagtttga-3')和反向引物(5'-gtcgactccggcaggagcagagagt-3')克隆 *AtPCS2* CDS 构建到载体 *EYFP/pA7* 的 *Xho* I ~ *Sal* I 的位点间, 得到 *EYFP* 在基因 3'端融合的植物瞬时表达载体 D(*CaMV 35S::AtPCS2 CDS:EYFP/pA7*)。

上述瞬时表达载体通过基因枪(PDS-1000/He, Bio-Rad, 美国)介导的方法转化洋葱表皮细胞或通过 PEG(polyethylene glycol)介导的方法转化拟南芥 *cad1-3* 原生质体^[12]。转化后的材料在 22℃避光培养 12 h 后, 在共聚焦显微镜(LSM 510 Meta, Carl Zeiss, 德国)下观察。用 488 nm 激发光激发, 515~530 nm 检测 *EYFP* 荧光蛋白信号。图像先经 LSM5 Image

Browser(Carl Zeiss, 德国)处理, 然后用 Adobe Photoshop CS5 软件处理。

1.5 蛋白质的提取、SDS-PAGE 和免疫印迹

拟南芥经 1/4×PNS 培养 4 周后, 液氮研磨 0.1 g 植物叶片, 加入 250 μ L 缓冲液 E(125 mmol/L Tris-HCl pH 8.8, 1%(质量体积比)十二烷基硫酸钠(sodium dodecyl sulfate, SDS), 10%(体积比)甘油, 50 mmol/L $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_5$)蛋白质提取液, 15000 $\times$ g 离心 10 min, 收集上清液^[13]。BioRad DC Protein Assay 试剂盒(Bio-Rad, 美国)定量检测上清液蛋白质浓度。50 μ g 总蛋白在 12%SDS-聚丙烯酰胺胶(SDS-polyacrylamide gel, SDS-PAGE)分离后, 转膜至硝酸纤维素膜(Millipore, 美国), 依次使用小鼠抗 cMyc 单克隆抗体(Myc-Tag(19C2)Mouse mAb, Abmart, 上海)和辣根酶标记山羊抗小鼠 IgG(anti Ms IgG(H+L)/HRP, 北京鼎国昌盛生物技术有限责任公司)各孵育 1 h, 随后加入底物(SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate, Thermo Scientific, 美国)孵育 5 min。使用化学发光成像仪(ImageQuant LAS 4000 mini, General Electric Company, 美国)直接拍照成像。

1.6 高效液相色谱测定植物组织中 PCs 含量

1/4×PNS 培养 4 周的拟南芥经 50 μ mol/L CdCl_2 处理 3 天后, 用 HPLC(Agilent 1200 series, 美国)和反相 C_{18} 柱(Agilent 300 Extend- C_{18} 4.6 $\times$ 150 mm, 3.5 μ m particle size, 美国)测定组织中 PCs 含量。PCs 标准品(AnaSpec, 美国)和样品的硫醇基团按照 Gong 等人^[14]的方法以 monobromobimane(mBBBr)进行荧光标记。荧光法高效液相色谱(high performance liquid chromatography, HPLC)检测硫醇基团的具体设置参考 Minocha 等人^[15]的方法。

2 结果

2.1 异位表达株系能表达高丰度的 *AtPCS2* mRNA

为了回答 *AtPCS2* 能否在植物体内高表达, *AtPCS2* 的全长编码序列被构建入含有 *CaMV* 35S 启动子的植物表达载体 pCambia1300, 并转化 PCs 缺失突变体 *cad1-3*, 获得 T_3 代纯合的单拷贝插入转基因株系 A12-1。 *AtPCS2* 的全长 CDS 序列与抗原标签

c-Myc 序列融合后, 分别被构建入含有 *CaMV* 35S 启动子的植物表达载体 pCambia1300 和 pBI121, 并转化 *cad1-3*, 分别获得 T_3 代纯合的单拷贝插入转基因株系 B4-1(pCambia1300), B4-4(pCambia1300)和 E1-1(pBI121)。

实时定量 PCR 检测 *AtPCS2* 基因在拟南芥野生型 Col-0, PCs 缺失突变体 *cad1-3*, 4 个 35S::*AtPCS2* 转基因株系中的表达水平。结果表明, 4 个转基因株系中 *AtPCS2* 的表达量都显著上调, 其中 A12-1 株系中的 *AtPCS2* 表达量达到了内参基因 *AtActin2* 的 0.12 倍, B4-4 株系中的 *AtPCS2* 表达量高达内参基因 *AtActin2* 的 0.91 倍(图 1A)。RT-PCR 分析也同样证实了这个结果, 4 个转基因株系中 *AtPCS2* 的表达量都显著上调(图 1B)。这些结果表明, *AtPCS2* 基因能够在植物体内大量转录。

2.2 异位表达株系能表达高丰度的 *AtPCS2* 蛋白

Lee 和 Kang^[16]研究发现, *AtPCS2* 的异位表达能使 *AtPCS2* mRNA 表达上调, 但是只能检测到微量的 *AtPCS2* 蛋白, 由此推断, *AtPCS2* 在蛋白翻译水平上受到调控。因此, 为回答 *AtPCS2* 蛋白能否在植物体内高效地翻译, 对转基因株系的 *AtPCS2*-Myc 融合蛋白进行免疫印迹分析。结果表明, 3 个融合了 c-Myc 抗原标签序列的转基因株系 B4-1, B4-4 和 E1-1 均检

图 1 *AtPCS2* mRNA 的表达情况

A: 实时定量 PCR 检测 4 个 35S::*AtPCS2* 转基因株系中 *AtPCS2* 的表达水平。数据为 $\bar{x} \pm \text{SD}(n=3)$, 每个处理的各株系幼苗大于 16 株。Col-0 为野生型拟南芥; *cad1-3* 为 PCs 缺失突变体; A12-1, B4-1, B4-4 和 E1-1 为 4 个 35S::*AtPCS2* 转基因株系。以 *Actin2* 的表达量为标准, 对 *AtPCS2* 表达量进行均一化; B: RT-PCR 检测 4 个 35S::*AtPCS2* 转基因株系中 *AtPCS2* 的表达水平

测到了 AtPCS2-Myc 融合蛋白(图 2). 并且与它们的转录水平(图 1)对应, B4-4 株系中的融合蛋白表达水平最高, 其次是 B4-1 株系和 E1-1 株系. 这些结果表明, AtPCS2 基因能够在植物体内翻译成蛋白, 并且蛋白的含量和基因的转录水平正相关. 由于在 A12-1 株系表达的仅是 AtPCS2 基因的编码区, 缺乏相应抗体而无法检测其蛋白水平.

2.3 AtPCS2 蛋白在植物体内具有合成 PCs 的功能

鉴于更换启动子后, AtPCS2 在转录和翻译水平都没有受到显著的负调控(图 1 和 2), 下一个问题是 AtPCS2 蛋白的酶活性是否受到体内的负调控机制调节. 为此, 检测了转基因株系体内的 PCs 含量. 结果表明, 经 Cd^{2+} 处理后的转基因株系 B4-1, B4-4 和 E1-1 体内都检测到了植物螯合肽(图 3), 而未经 Cd^{2+} 处理的株系均未能检测到植物螯合肽(数据未列出). 与它们的转录本丰度(图 1)和蛋白丰度(图 2)对应, B4-4 株

图 2 AtPCS2 蛋白的表达情况

融合了 *c-Myc* 抗原标签序列的 3 个 35S::AtPCS2 转基因株系 B4-1, B4-4 和 E1-1 中检测到了高含量的 AtPCS2-Myc 融合蛋白. Col-0, *cad1-3*, A12-1 作为免疫印迹实验的负对照. SDS-PAGE 胶经考马斯亮蓝染色后, 以 Rubisco 蛋白的大亚基(RbcL)作为蛋白上样量对照

图 3 植物螯合肽的合成情况

营养液培养 4 周的拟南芥经 $50 \mu\text{mol/L}$ CdCl_2 处理 3 天后, HPLC 测定 35S::AtPCS2 转基因株系叶片的植物螯合肽含量. PCs 表示 PC_2 , PC_3 , PC_4 之和. n. d. 表示未检测到植物螯合肽. 数据为 $\bar{x} \pm \text{SD}$ ($n=3$), 每个处理的各株系幼苗大于 16 株

系和 B4-1 株系的植物螯合肽水平高于 E1-1 株系. 这些结果表明, AtPCS2 蛋白的酶活性在植物体内也不受负调控机制的调节. 该结论不受 A12-1 体内未能检测到 PCs 的事实影响, 因为随后的表型分析表明, A12-1 的镉耐受增强(图 4), 其体内未能检测到 PCs 可能是含量较低, 该假设符合图 1 中 AtPCS2 基因的表达量分布情况.

2.4 AtPCS2 的异位表达能够弥补 *cad1-3* 的镉敏感性状

为了回答 AtPCS2 的异位表达能否降低植物体内的镉毒害, 对转基因株系的镉耐受表型进行分析. 结果表明, 4 个转基因株系都能够恢复镉耐受的能力(图 4). B4-4 株系能够完全恢复镉耐受的能力, 其根长与 Col-0 相比没有显著差异(图 4B), A12-1, B4-1 和 E1-1 株系的根长与 Col-0 比较, 能够恢复大部分的镉耐受能力(转基因株系与 Col-0 根长比为 79%~85%)(图 4B). 这些结果表明, AtPCS2 在植物体内参与了重金属解毒机制, 降低了植物的镉毒害程度.

2.5 AtPCS2 蛋白的亚细胞定位

一般认为, AtPCS2 作为 PCs 合成的催化酶, 应该位于细胞质中. 但有趣的是, 通过在拟南芥原生质体中的瞬时表达 AtPCS2 蛋白, 分析其亚细胞定位, 表明 AtPCS2 不仅定位在细胞质内, 还有可能定位于细胞核(图 5A 和 B). 为了进一步明确 AtPCS2 在细胞内的定位, 进行了洋葱表皮细胞瞬时转化分析. 结果表明, AtPCS2 蛋白在细胞核和细胞质内皆有分布(图 5C 和 D). 这些结果说明, AtPCS2 可能具有其他与细胞核定位相对应的一些生化功能.

3 讨论

AtPCS2 的表达调控机制和具体生理作用远比想象中复杂. Lee 和 Kang^[16] 研究发现, AtPCS2 的异位表达能使 AtPCS2 mRNA 表达上调, 但是只能检测到微弱的 AtPCS2 蛋白表达, 他们由此推断, AtPCS2 在蛋白翻译水平上受到调控, 低翻译效率是导致 *cad1-3* 中未能检测到 PCs 的主要原因之一. 但是本研究表明, 在 *cad1-3* 的 *CaMV 35S::AtPCS2::cMyc* 的异位表达株系中, AtPCS2 的 mRNA(图 1)和蛋白(图 2)都显示出较高

的表达量, 而且蛋白的含量和基因的转录水平正相关(图 1 和 2). 表明在植物体内, *AtPCS2* 蛋白的翻译效率并不低, 在翻译水平上可能并不受负调控机制的显著影响.

不仅如此, 进一步研究表明, *AtPCS2* 可能主要从

转录水平接受负调控机制调节. 主要基于以下两方面原因: (i) 通过置换基因启动子, 本研究成功实现了 *AtPCS2* 基因在植物体内的高表达; (ii) 异位表达株系经 Cd^{2+} 处理后均能够检测到植物螯合肽(图 3), 而且 PCs 含量和 *AtPCS2* 的表达水平正相关(图 1~3).

图 4 35S::*AtPCS2* 转基因植株恢复镉耐受能力

A: 种子在 50 μmol/L CdCl_2 处理的无糖培养条件下垂直生长 7 天. 35S::*AtPCS2* 转基因植株恢复了镉耐受能力; B: 种子在 50 μmol/L CdCl_2 处理的无糖培养条件下垂直生长 7 天后统计幼苗根长. 字母不同表示差异显著, $P < 0.05$. 数据为 $\bar{x} \pm \text{SD}$ ($n=7$), 每个处理的各株系幼苗大于 50 株

图 5 *AtPCS2* 蛋白的亚细胞定位

A: 拟南芥原生质体瞬时转化. 转 *EYFP/pA7* 空载体 Vector 作为对照. *AtPCS2:YFP* 绿色荧光出现在细胞质内; B: 拟南芥原生质体瞬时转化. 转 *EYFP/pMON530* 空载体 Vector 作为对照. *EYFP:AtPCS2* 绿色荧光出现在细胞质内; C: 洋葱表皮细胞瞬时转化. 转 *EYFP/pA7* 空载体 Vector 作为对照. *AtPCS2:YFP* 绿色荧光出现在细胞质和细胞核内; D: 洋葱表皮细胞瞬时转化. 转 *EYFP/pMON530* 空载体 Vector 作为对照. *EYFP:AtPCS2* 绿色荧光出现在细胞质和细胞核内

表明 AtPCS2 蛋白的酶活性也不大可能受负调控机制的调节. 值得注意的是, 在 *AtPCS2* 转录本最低的 A12-1 株系未能检测到植物螯合肽(图 3), 这可能归因于基因表达的剂量效应, 支持该推测的证据是 A12-1 表现出了较高的镉耐受性; 但是也不能排除酶活性受一定程度的负调控机制调节的可能性.

与本研究提出的 *AtPCS2* 主要从转录水平受负调控机制调节的观点一致, Blum 等人^[17]研究发现, *AtPCS2* 蛋白在幼苗的根尖皮层表达, 因此推测可能由于 *AtPCS2* 基因只在特异的组织中表达, 从而导致 *cad1-3* 中未能检测到 PCs. 此外, Cazalé 和 Clemens^[9]提出一种假设, *AtPCS2* 蛋白可能被区隔在镉浓度极低的细胞器中, 从而不能合成 PCs. 本研究的发现也支持该推论: *AtPCS2* 在细胞质和细胞核中均有明显

分布(图 5C 和 D), 预示 *AtPCS2* 可能具有在局部区域合成 PCs 或者除此之外的其他生化功能, 或者合成的 PCs 除了参与解除重金属毒害外(图 4), 还参与其他特定的重要生理过程. 例如, 有研究表明, PCs 可能在维持胞内营养离子, 如 Zn^{2+} 的平衡方面起作用^[18]; 而其他的研究则表明, PCs-金属复合物作为金属依赖型酶的金属离子供体, 如 PCs-Cu 和 PCs-Zn 复合物, 分别能重新活化 Cu^{2+} 依赖型二氢氧化酶及 Zn^{2+} 依赖型碳酸酐酶^[19].

总之, *AtPCS2* 的异位表达研究表明, *AtPCS2* 在植物体内可能主要从转录水平接受某种负向调控机制的调节, 从而在植物的特定组织或者器官行使调控 PCs 合成或者其他生理过程的功能, 精细调节着重金属解毒或者离子平衡等多种局部反应.

参考文献

- 1 Grill E, Löffler S, Winnacker E L, et al. Phytochelatins, the heavy-metal-binding peptides of plants, are synthesized from glutathione by a specific gamma-glutamylcysteine dipeptidyl transpeptidase (phytochelatin synthase). *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 6838–6842
- 2 Zenk M H. Heavy metal detoxification in higher plants—a review. *Gene*, 1996, 179: 21–30
- 3 Cobbett C S. Phytochelatins and their roles in heavy metal detoxification. *Plant Physiol*, 2000, 123: 825–832
- 4 Cobbett C S, Goldsbrough P. Phytochelatins and metallothioneins: roles in heavy metal detoxification and homeostasis. *Annu Rev Plant Biol*, 2002, 53: 159–182
- 5 Hirata K, Tsuji N, Miyamoto K. Biosynthetic regulation of phytochelatins, heavy metal-binding peptides. *J Biosci Bioeng*, 2005, 100: 593–599
- 6 Mehra R K, Kodati V R, Abdullah R. Chain length-dependent Pb(II)-coordination in phytochelatins. *Biochem Biophys Res Commun*, 1995, 215: 730–736
- 7 Ha S B, Smith A P, Howden R, et al. Phytochelatin synthase genes from *Arabidopsis* and the yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Plant Cell*, 1999, 11: 1153–1163
- 8 Howden R, Andersen C R, Goldsbrough P B, et al. A cadmium-sensitive, glutathione-deficient mutant of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol*, 1995, 107: 1067–1073
- 9 Cazalé A C, Clemens S. *Arabidopsis thaliana* expresses a second functional phytochelatin synthase. *FEBS Lett*, 2001, 507: 215–219
- 10 Artega R N, Artega J M. A novel method for growing *Arabidopsis thaliana* plants hydroponically. *Physiol Plant*, 2002, 108: 188–193
- 11 Clough S J, Bent A F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 1998, 16: 735–743
- 12 Yoo S D, Cho Y H, Sheen J. *Arabidopsis* mesophyll protoplasts: a versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat Protoc*, 2007, 2: 1565–1572
- 13 Martínez-García J F, Monte E, Quail P H. A simple, rapid and quantitative method for preparing *Arabidopsis* protein extracts for immunoblot analysis. *Plant J*, 1999, 20: 251–257
- 14 Gong J M, Lee D A, Schroeder J I. Long-distance root-to-shoot transport of phytochelatins and cadmium in *Arabidopsis*. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100: 10118–10123
- 15 Minocha R, Thangavel P, Dhankher O P, et al. Separation and quantification of monothiol and phytochelatins from a wide variety of cell cultures and tissues of trees and other plants using high performance liquid chromatography. *J Chromatogr A*, 2008, 1207: 72–83
- 16 Lee S, Kang B S. Expression of *Arabidopsis* phytochelatin synthase 2 is too low to complement an *AtPCS1*-defective *Cad1-3* mutant. *Mol Cells*, 2005, 19: 81–87
- 17 Blum R, Meyer K C, Wünschmann J, et al. Cytosolic action of phytochelatin synthase. *Plant Physiol*, 2010, 153: 159–169
- 18 Tennstedt P, Peisker D, Bottcher C, et al. Phytochelatin synthesis is essential for the detoxification of excess zinc and contributes significantly to the accumulation of zinc. *Plant Physiol*, 2009, 149: 938–948

- 19 Thumann J, Grill E, Winnacker E L, et al. Reactivation of metal-requiring apoenzymes by phytochelatin-metal complexes. *FEBS Lett*, 1991, 284: 66–69

Regulation of the Phytochelatin Synthase Gene *AtPCS2* in *Arabidopsis thaliana*

DING Ge, PENG JiaShi, ZHANG GuoBin, YI HongYing, FU YanLei & GONG JiMing

National Key Laboratory of Plant Molecular Genetics, Institute of Plant Physiology and Ecology, Shanghai Institutes for Biological Sciences, Chinese Academy of Sciences, Shanghai 200032, China

Phytochelatin synthase (PCS) plays an essential role in heavy metal detoxification in plants and fungi, via the catalyzation of phytochelatins (PCs) biosynthesis from the substrate of glutathione (GSH). Two PCS genes *AtPCS1* and *AtPCS2* are present in *Arabidopsis* genome. However, loss of function of only the *AtPCS1* gene resulted in undetectable PCs and the consequent metal hypersensitivity in the corresponding mutant *cad1-3*, while *in vitro* assay indicated that *AtPCS2* is capable to efficiently catalyze PCs biosynthesis. These results suggest that repression mechanisms exist in *Arabidopsis* to tightly control *AtPCS2* function *in vivo*. To test and decipher this hypothesis, we generated the construct 35S/*AtPCS2*::cMyc and transformed it into the PCs-deficient mutant *cad1-3*. Our results showed that both the *AtPCS2* mRNA and protein levels were steadily high in the transgenic plants. Consistently, PCs biosynthesis and metal tolerance were also observed when *AtPCS2* was introduced into *cad1-3*. Furthermore, in addition to the cytosol, *AtPCS2* was also localized to the nuclei. Taken together, all these results indicate that *AtPCS2* is under tight control mainly at the transcription level in *Arabidopsis*, and it may function beyond catalyzing PCs biosynthesis.

***cad1-3*, *AtPCS2*, cadmium**

doi: 10.1360/052013-309