

拟南芥 *DWF4* 基因的内含子影响自身表达

彭志红^{1,2}, 黄颖¹, 袁利兵¹, 任春梅^{1,2*}

(1.湖南农业大学 生物科学技术学院,湖南 长沙 410128 ;2.作物基因工程湖南省重点实验室,湖南 长沙 410128)

摘要: 为了进一步确定 *DWF4* 基因的内含子是否影响自身表达, 构建了 35S 启动子驱动的带内含子和不带内含子的 *DWF4* 基因表达载体, 分别转入拟南芥 *DWF4* 基因的弱突变体 *psc1*。对 T₂ 代幼苗进行表型分析发现, 转入带内含子的 *DWF4* 基因的转基因株系 *TgD4* 能完全恢复突变体的表型, 而转入不带内含子的 *DWF4* 基因的转基因株系 *TcD4* 只能部分恢复突变体的表型。RT-PCR 分析显示, *TgD4* 的 *DWF4* 表达水平明显增加, 说明内含子对 *DWF4* 基因的表达有增强作用。

关键词: 拟南芥; *DWF4* 基因; 内含子; 基因表达

中图分类号: Q786

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2012)06-0597-05

Introns of *DWF4* gene influence gene expression in *Arabidopsis*

PENG Zhi-hong^{1,2}, HUANG Ying¹, YUAN Li-bing¹, REN Chun-mei^{1,2*}

(1.College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China; 2.Crop Gene Engineering Key Laboratory of Hunan Province, Changsha 410128, China)

Abstract: To better understand the expression patterns of *DWF4*, expression plasmids with 35S CaMV constitutive promoter containing *DWF4* gene with or without its own introns were constructed and transformed respectively into the *psc1* mutant deficient in the biosynthesis of brassinosteroids (BRs). Phenotypic analysis showed that the transgenic lines *TgD4* with the introns of *DWF4* gene could rescue the defect of BR biosynthesis in *psc1* totally, whereas the transgenic lines *TcD4* without the introns of *DWF4* gene could only rescue the defect of BR biosynthesis partially. RT-PCR demonstrated that the expression of *DWF4* in the transgenic lines *TgD4* was obviously increased indicating the expression of *DWF4* gene could be enhanced by its own introns.

Key words: *Arabidopsis*; *DWF4*; intron; gene expression

芸薹素(brassinosteroids, BR)是 20 世纪 70 年代发现的一类重要的植物激素^[1]。芸薹素参与植物的细胞伸长和分裂、输导组织分化、衰老、抗逆性以及光调控,对植物生长发育起至关重要的作用^[2-4]。拟南芥 *DWF4* 基因编码芸薹素生物合成途径中的一个非常关键的酶^[5-6], 通过调控 *DWF4* 基因的表达可以控制芸薹素的生物合成,但目前对 *DWF4* 基因表达调控的研究仅涉及到启动子。内含子是断裂基因中的非编码区序列,其中,真核基因前体 mRNA 的

内含子是最常见的内含子^[7]。在 mRNA 转录加工后,内含子被切除掉,起初人们认为内含子没有功能。但近年来的许多研究发现,有些真核基因的内含子在基因表达中具有相当重要的作用^[8-17]。笔者构建了 35S 启动子驱动的带内含子和不带内含子的 *DWF4* 基因表达载体,分别转入拟南芥 *DWF4* 基因的弱突变体 *psc1*,以期通过对 T₂ 代幼苗的表型分析以及对基因表达水平的检测,探讨 *DWF4* 基因的内含子是否影响自身的表达,为 *DWF4* 基因调控芸薹

收稿日期: 2012-05-29

基金项目: 湖南省研究生科研创新项目(CX2010B288); 湖南省作物种质创新与资源利用重点实验室开放基金项目(10KFXM06)

作者简介: 彭志红(1972—),女,湖南永州人,博士研究生,讲师,主要从事植物分子遗传学研究, zhihong_peng@126.com; *通信作者, rencm66@163.com

素生物合成的分子机制的研究提供依据。

1 材料与方法

1.1 材料

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)野生型(Col-0, WT)和 *psc1* 突变体, 由作物基因工程湖南省重点实验室植物信号传导课题组提供。

1.2 方法

1.2.1 植株培养

拟南芥 Col-0、*psc1* 突变体种子用消毒液(20% bleach+0.1% Triton X-100)浸泡 10 min 后, 无菌水清洗 5 次, 播种于含 1%蔗糖的 1/2MS 固体培养基上, 经 4 °C 暗处理 3 d 后, 转入植物培养室, 每天 16 h 光照(22~24 °C)、8 h 黑暗(16~19 °C)培养。

1.2.2 目的片段的扩增

以拟南芥野生型 Col-0 的基因组 DNA 和反转录所得的 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。使用 Premier Primer 5.0 软件, 设计引物 D-5': 5'-ATGTT CGAAACAGAGCATCATA-3', D-3': 5'-AAAGAG CTCAAAAAAAAAAAGAAGAGAATAAAAA-3'。PCR 反应体系: DNA/cDNA 模板 2 μL, 引物 D-5' (10 μmol/L) 1 μL, 引物 D-3' (10 μmol/L) 1 μL, 10× Phusion Buffer 2 μL, dNTPs(10 mmol/L) 0.4 μL, Phusion DNA 聚合酶 0.2 μL, ddH₂O 13.4 μL, 反应总体积为 20 μL。DWF4 全长基因的 PCR 反应程序: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 3 min, 循环 30 次, 72 °C 终延伸 10 min。DWF4 基因 cDNA 的 PCR 反应程序: 94 °C 预变性 3 min, 94 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 100 s, 循环 30 次, 72 °C 终延伸 10 min。反应结束后于 16 °C 保存。使用天根普通 DNA 片段纯化试剂盒纯化 PCR 的扩增产物。

1.2.3 植物表达载体 *pMD4* 和 *pMcD4* 的构建

首先将扩增的目的片段用限制性酶 *Sac*I 单酶切, 质粒 pMYC2 用 *Sma*I 和 *Sac*I 双酶切, 并以质粒 pMYC2 的酶切作对照, 电泳检测。然后用 *T4* 连接酶将酶切纯化的 *DWF4* 基因和 pMYC2 连接。将分别连有 *DWF4* 全长基因和 *DWF4* cDNA 的载体命名

为 pMD4 和 pMcD4。采用热激法分别将载体 pMD4 和 pMcD4 转入大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 用含有 100 μg/mL Kan 的 LB 培养基进行培养。PCR 鉴定为阳性的菌落进行液体小量培养用于质粒提取, 并将提取的 pMD4 和 pMcD4 质粒交北京奥莱博公司进行测序鉴定。

1.2.4 工程菌的制备及拟南芥的遗传转化

采用电击法, 将测序结果正确的质粒 pMD4 和 pMcD4 转化到农杆菌 AGL-1 中, 用含有 100 μg/mL Kan 和 50 μg/mL Rif 的 LB 培养基进行筛选, 随机挑选阳性菌落进行 PCR 鉴定。挑取阳性单克隆农杆菌在含有 50 μg/mL Rif、100 μg/mL Kan 的 LB 液体培养基中, 28 °C、250 r/min 振荡培养过夜, 制备农杆菌悬浮液。采用农杆菌浸花转化法, 将 pMD4 和 pMcD4 转入拟南芥 *psc1* 突变体中, 在含 50 μg/mL Kan 的 MS 培养基上筛选, 提取转化植株 DNA 采用 PCR 进行分子鉴定。

1.2.5 RT-PCR 分析

RT-PCR 分析按常规操作进行, 使用 ABI-2720 Thermal Cycler 型 PCR 仪, 采用反转录试剂盒进行逆转录, 得到 cDNA 第 1 条链。DWF4 基因 PCR 扩增所用的引物为 5'-ATGTTTCGAAACAGAGCAT CATA-3' 和 5'-AAAGAGCTCAAAAAAAAAAAGAA GAGAATAAAAA-3'; 以 *ACT2* 为参照基因, 所用引物为 5'-TTCGCTCTTTCTTTCCAAGCTCA-3' 和 5'-AAGAGGCATCAATTCGATCACTC A-3'。PCR 反应体系: cDNA 2 μL, 10×Buffer 2 μL, dNTPs (10 mmol/L) 0.5 μL, *Taq* 酶(5 U/μL) 0.5 μL, 引物各 0.8 μL, ddH₂O 13.4 μL, 反应总体积为 20 μL。PCR 反应程序: 95 °C 预变性 2 min, 94 °C 变性 30 s, 55 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 循环 26 次; 72 °C 终延伸 10 min。RT-PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测基因表达情况。

2 结果与分析

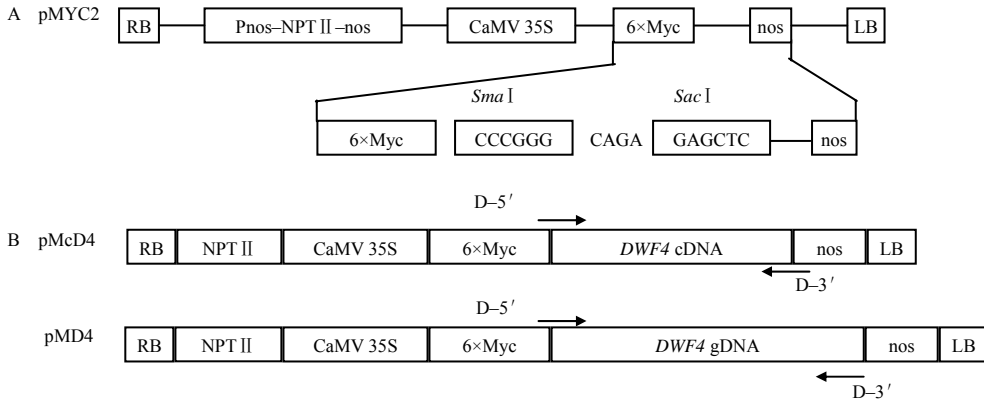
2.1 植物表达载体 *pMcD4* 和 *pMD4* 的构建结果

用载体 pMyc2^[18] 构建了 35S 启动子驱动的带内含子和不带内含子的 *DWF4* 基因表达载体, 其中扩增的 *DWF4* 基因组 DNA 为 2 952 bp, 包含从起始

密码子 ATG 开始到终止密码子 TAA 的 8 个外显子和 7 个内含子以及 3'-UTR 中的 45 bp 碱基片段。扩增的 *DWF4* cDNA 全长 1 587 bp, 包括 *DWF4* cDNA 和 45 bp 的 3'-UTR 区。

pMYC2 质粒(图 1-A)是在质粒 pROK2 T-DNA 区的 35S 启动子后加入了一段 MYC2 序列标签, 与转入的外源 DNA 片段一同转录翻译。用 *Sma*I

和 *Sac*I 将 pMYC2 载体切开, 使用 *T4* 连接酶将载体和 DNA 片段连接。靠近 nos 终止子的一端与 *DWF4* 基因片段的 3'端相连, *Sma*I 由于切开的是平末端, 可与基因片段磷酸化的 5'端相连, 这样就分别得到连有 *DWF4* cDNA 的 pMcD4 载体和连有 *DWF4* 全长基因的 pMD4 载体(图 1-B)。



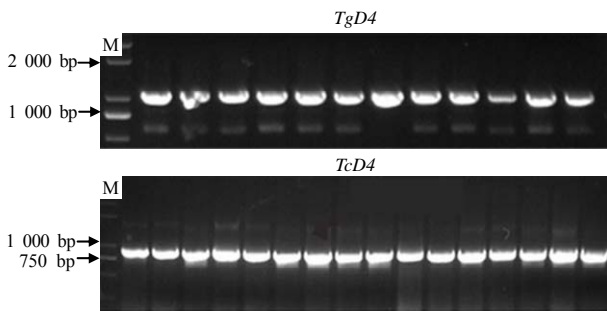
A pMYC2 质粒 T-DNA 区; B 连入了基因片段的 pMcD4 和 pMD4 载体。

图 1 pMD4 和 pMcD4 载体的构建

Fig.1 The construct of pMcD4 and pMD4

2.2 纯合单拷贝转基因植株的筛选与鉴定

采用农杆菌介导法将 pMD4 和 pMcD4 转入拟南芥 *psc1* 突变体中, 在含 50 μg/mL Kan 的培养基上筛选阳性苗, 获得的阳性苗分别命名为 *TgD4* 和 *TcD4*, 转基因植株 T₁ 代提取 DNA 进行 PCR 鉴定的结果均为阳性(图 2)。对 T₂ 代植株进行 Kan 抗性鉴定, 最终各得到了 2 个 *TgD4* 和 *TcD4* 的纯合 T-DNA 株系。



TgD4 转入带内含子的 *DWF4* 基因的转基因株系, *TcD4* 转入不带内含子的 *DWF4* 基因的转基因株系。

图 2 转基因植株的 PCR 鉴定结果

Fig.2 PCR identification of transgenic plants

2.3 内含子对 *DWF4* 基因表达的影响

2.3.1 转基因植株的表型

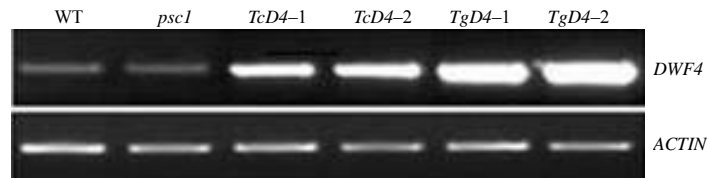
将转基因植株 T₂ 代纯合单拷贝的种子转移至土壤中继续生长, 观察 3 周龄转基因株系的表型(封三彭志红图 3), 发现 *TgD4* 转基因植株由于转入了由 35S 启动子驱动 *DWF4* 全长基因, 原来的 *psc1* 突变体表型已完全被恢复, 与同期的 *psc1* 差异明显, 叶形、叶柄, 叶色等与野生型 Col-0 相似, 甚至其生长状态在一定程度上超过了野生型, 有 *DWF4* 过表达表型。而 *TcD4* 转基因植株由于转入了 35S 启动子驱动 *DWF4* cDNA, 也能部分互补 *psc1* 的表型, 与同期的 *psc1* 相比, *TcD4* 叶片大小、叶柄长度等都超过了 *psc1*, 叶片颜色较野生型深, 不过其植株生长较野生型仍然缓慢, 生长状态介于野生型和 *psc1* 之间, 说明由 35S 启动子驱动的 *DWF4* cDNA 转化植株能部分恢复 *psc1* 的表型。

2.3.2 转基因植株的 *DWF4* 基因表达

为了进一步确定 *DWF4* 内含子是否在该基因转

录水平起调控作用,分别提取3周龄的转基因株系 *TgD4* 和 *TcD4* 叶片的 RNA,以 Col-0 和 *psc1* 作为对照, *ACTIN* 作为内参进行 RT-PCR(图4)。结果发现, Col-0 和 *psc1* 中 *DWF4* 基因表达水平相当,说明 *psc1* 植株内 *DWF4* 基因的点突变不影响该基因的表达水平,由此推测 *psc1* 植株表型的变化可能

是该基因编码蛋白的活性降低引起的。而在转基因株系 *TcD4* 中 *DWF4* 基因的表达水平要高于 Col-0 和 *psc1*,表明转入 *DWF4* cDNA 在 35S 启动子的驱动下在拟南芥中过量表达,使基因的转录水平升高,并且 *TgD4* 的 *DWF4* 基因的表达水平又明显高于 *TcD4*,这表明内含子能提高 *DWF4* 基因的表达量。



WT 拟南芥野生型; *psc1* *DWF4* 基因的弱突变体; *TgD4-1* 和 *TgD4-2* 转入带内含子的 *DWF4* 基因的单拷贝转基因株系; *TcD4-1* 和 *TcD4-2* 转入不带内含子的 *DWF4* 基因的单拷贝转基因株系。

图4 *DWF4* 基因的 RT-PCR 检验结果

Fig.4 RT-PCR testing of *DWF4* gene

3 讨论

在高等植物中,有些基因的内含子能增强基因的表达,如玉米 *Sh1* 基因、水稻 *Ostub16* 基因和 *Wx* 基因、拟南芥 *PAT1* 基因和 *COX5c* 基因等^[8-12];有些基因的内含子具有调节基因时空特异表达的作用,如水稻 *OsTubA1* 基因、矮牵牛花 *PhADF1* 基因、拟南芥 *AGAMOUS* 基因等^[13-15];还有一些基因的内含子为基因表达所必需,如水稻 *TPI* 基因和 *OsBP-73* 基因等^[16-17],但并非所有真核基因的内含子都影响基因表达。拟南芥 *DWF4* 基因编码芸藁素生物合成途径中的一个非常关键的酶,对芸藁素生物合成起到限速的作用。用载体 pMyc2 构建 35S 启动子驱动的带内含子和不带内含子的 *DWF4* 基因表达载体,分别转入拟南芥 *DWF4* 基因的弱突变体 *psc1*,研究 *DWF4* 基因的内含子是否影响自身的表达,通过表型观察发现:转入带内含子的 *DWF4* 基因的转基因植株 *TgD4* 能完全恢复突变体的表型;而转入不带内含子的 *DWF4* 基因的转基因植株 *TcD4* 只能部分恢复突变体的表型,但并不能完全弥补 *psc1* 基因突变带来的生长障碍。RT-PCR 进一步分析,转基因植株 *TgD4* 和 *TcD4* 中 *DWF4* 基因的表达水平都要高于野生型和 *psc1*,并且, *DWF4* 基因在 *TgD4* 的表达水平明显增加,这说明内含子对 *DWF4* 基因的表达有增强作用。

由于 *DWF4* 的表达受芸藁素反馈调控影响,即

当芸藁素合成不足时, *DWF4* 表达量上升,能促进芸藁素的生物合成;而当植物体内芸藁素的含量达到某个阈值时, *DWF4* 的表达受到抑制,导致芸藁素合成速度下降,从而使植物体内芸藁素含量处于一种动态平衡状态。本研究结果表明, *DWF4* 基因的内含子在该基因的表达中起着正调控的作用,那么,对 *DWF4* 基因进行负调控的元件很可能是该基因的启动子区。然而,不同基因的内含子增强基因表达的机理也不完全相同:有的提高转录效率;有的增加 mRNA 的稳定性;有的影响基因翻译等^[19-21]。此外, *DWF4* 基因中总共有 7 个内含子,究竟哪个内含子或者哪几个内含子以何种方式对该基因的表达起着调控作用,还有待进一步的研究。

参考文献:

- [1] Mitchell J W, Mandava N, Worley J F, et al. Brassins: A new family of plant hormones from rape pollen [J]. *Nature*, 1970, 225: 1065-1066.
- [2] Szekeres M, Nemeth K, Koncz-Kalman Z, et al. Brassinosteroids rescue the deficiency of CYP90, a cytochrome P450, controlling cell elongation and de-etioliation in *Arabidopsis* [J]. *Cell*, 1996, 85: 171-182.
- [3] Kang J G, Yun J, Kim D H, et al. Light and brassinosteroid signals are integrated via a dark-induced small G protein in etiolated seedling growth [J]. *Cell*, 2001, 105: 625-636.
- [4] 储昭庆, 李李, 宋丽, 等. 油菜素内酯生物合成与功能的研究进展 [J]. *植物学通报*, 2006, 23(5): 543-555.

- [5] Choe S , Dilkes B P , Fujioka S , et al . The *DWF4* gene of *Arabidopsis* encodes a cytochrome P450 that mediates multiple 22 α -hydroxylation steps in brassinosteroid biosynthesis[J] . *Plant Cell* , 1998 , 10 : 231–243 .
- [6] 石琰臻 , 孙仲序 , 束怀瑞 . 油菜内酯类似物(BRs)的生物合成与信号传导引起的植物矮化[J] . *生命科学* , 2005 , 17(1) : 69–75 .
- [7] Gilbert W . Why genes in pieces[J] . *Nature* , 1978 , 271 : 501 .
- [8] Clancy M , Hannah L C . Splicing of the maize *Sh1* first intron is essential for enhancement of gene expression , and a T-rich motif increases expression without affecting splicing[J] . *Plant Physiol* , 2002 , 130 : 918–929 .
- [9] Morello L , Bardini M , Sala F , et al . A long leader intron of the *Ostub16* rice beta-tubulin gene is required for high-level gene expression and can autonomously promote transcription both in vivo and *in vitro*[J] . *Plant J* , 2002 , 29 : 33–44 .
- [10] 程世军 , 葛鸿飞 , 王宗阳 , 等 . 在转基因水稻植株中蜡质基因第1内含子对基因表达影响的分析[J] . *植物生理学报* , 2001 , 27(5) : 381–386 .
- [11] Rose A B , Last R L . Introns act post-transcriptionally to increase expression of the *Arabidopsis thaliana* tryptophan pathway gene *PAT1*[J] . *Plant J* , 1997 , 11 : 455–464 .
- [12] Curi G C , Chan R L , Gonzalez D H . The leader intron of *Arabidopsis thaliana* genes encoding cytochrome *c* oxidase subunit 5c promotes high-level expression by increasing transcript abundance and translation efficiency[J] . *J Exp Bot* , 2005 , 56 : 2563–2571 .
- [13] Jeon J S , Lee S , Jung K H , et al . Tissue-preferential expression of a rice alpha-tubulin gene , *OsTubA1* , mediated by the first intron[J] . *Plant Physiol* , 2000 , 23 : 1005–1014 .
- [14] Jeong Y M , Mun J H , Kim H , et al . An upstream region in the first intron of petunia actindepolymerizing factor 1 affects tissue-specific expression in transgenic *Arabidopsis*[J] . *Plant J* , 2007 , 50 : 230–239 .
- [15] Liu Z , Liu Z . The second intron of *AGAMOUS* drives carpel and stamen-specific expression sufficient to induce complete sterility in *Arabidopsis*[J] . *Plant Cell Rep* , 2008 , 27 : 855–863 .
- [16] Xu Y , Yu H , Hall T C . Rice triosephosphate isomerase gene 59 sequence directs b-glucuronidase activity in transgenic tobacco but requires an intron for expression in rice[J] . *Plant Physiol* , 1994 , 106 : 459–467 .
- [17] 陈俊 , 王宗阳 . 水稻 *OsBP-73* 基因表达需要其内含子参与[J] . *植物生理与分子生物学学报* , 2004 , 30(1) : 81–86 .
- [18] Ren C , Pan J , Peng W , et al . Point mutations in *Arabidopsis* Cullin1 reveal its essential role in jasmonate response[J] . *Plant J* , 2005 , 42 : 514–524 .
- [19] Bourdon V , Harvey A , Lonsdale D M . Introns and their positions affect the translational activity of mRNA in plant cells[J] . *EMBO Reports* , 2001(2) : 394–398 .
- [20] Rose A B . The effect of intron location on intron-mediated enhancement of gene expression in *Arabidopsis*[J] . *Plant J* , 2004 , 40 : 744–751 .
- [21] Rose A B , Elfersi T , Parra G , et al . Promoter-proximal introns in *Arabidopsis thaliana* are enriched in dispersed signals that elevate gene expression[J] . *Plant Cell* , 2008 , 20 : 543–551 .

责任编辑: 罗慧敏

英文编辑: 罗维