

## 生长素极性运输 *PIN* 基因在拟南芥和芥菜 不同组织表达的定量分析

朱占伟, 彭彦, 赵燕, 胡清云, 张学文\*

(湖南农业大学生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128)

**摘要:** 为了解拟南芥和芥菜形态差异与其生长素极性分布的关系, 采用荧光定量 PCR, 以  $\beta$ -actin 为内参基因, 对拟南芥和芥菜的根、茎、叶、花等组织中与生长素极性运输相关的 *PIN1*、*PIN3*、*PIN7* 基因的表达进行定量分析。结果表明: 拟南芥各组织中 *PIN1* 的表达量都高于芥菜各组织中 *PIN1* 的表达量, 拟南芥的茎和花中 *PIN1* 的表达量分别比芥菜茎和花中 *PIN1* 表达量高 3 倍和 10 倍; 拟南芥各组织中 *PIN7* 的表达量也高于芥菜各组织的 *PIN7* 表达量, 其叶片中 *PIN7* 的表达量比芥菜叶片中 *PIN7* 的表达量高 10 倍以上; 芥菜各组织中 *PIN3* 的表达都高于拟南芥相应组织中 *PIN3* 的表达量, 在茎、叶中的表达分别高 3 倍和 10 倍以上, 这些生长素极性运输蛋白相关基因表达的差异可能是导致 2 种植物形态差异的直接原因。

**关键词:** 拟南芥; 芥菜; *PIN* 基因; 定量分析

中图分类号: Q786

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2013)05-0495-05

## Quantitative analysis of expression of auxin polar transport *PIN* genes in different tissues of *Arabidopsis thaliana* and *Capsella bursa-pastoris*

ZHU Zhan-wei, PENG Yan, ZHAO Yan, HU Qing-yun, ZHANG Xue-wen\*

(College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

**Abstract:** In order to understand the morphogenesis difference of *Arabidopsis thaliana* and *Capsella bursa-pastoris* and elucidate the difference of auxin distribution, fluorescence quantitative PCR (qPCR) method with the  $\beta$ -actin gene as internal reference was used to quantify the expression levels of *PIN1*, *PIN3*, *PIN7* in the roots, stems, leaves, flowers of the two kinds of plants. The results show that the *PIN1* expression in all *Arabidopsis thaliana* organs is higher than they are in the *Capsella* organs. The expressions of *PIN3* in the stem and flower of *Arabidopsis thaliana* were 3 and 10 times higher than those in the corresponding organs of *Capsella bursa-pastoris*. *PIN7* expression is also higher in *Arabidopsis thaliana* than it is in the corresponding organs of *Capsella* with the expression of *PIN7* in the leaf of *Arabidopsis thaliana* more than 10 times higher than those in the leaf of *Capsella bursa-pastoris*. *PIN3* expression is higher in all tissues of *Capsella bursa-pastoris* than it is in the *Arabidopsis thaliana*. The expressions of *PIN3* in the stem and flower of *Arabidopsis thaliana* were 3 and 10 times higher than those in the corresponding organs of *Capsella bursa-pastoris*. The differential expression of auxin polar transport protein related genes may be the direct reason causing the morphology difference in the two plants.

**Key words:** *Arabidopsis thaliana*; *Capsella bursa-pastoris*; *PIN* genes; quantitative analysis

生长素的极性运输主要是由生长素输出基因 *PIN* 所调控。目前, 从拟南芥中已经克隆了 8 个 *PIN* 基因, 其中 *PIN1*、*PIN3* 和 *PIN7* 在生长素的极性运输中具有关键的作用<sup>[1-2]</sup>。笔者采用同源克隆的方

收稿日期: 2013-01-15

基金项目: 湖南省教育厅重点实验室开放项目(S201201)

作者简介: 朱占伟(1984—), 男, 河南许昌人, 硕士研究生, 主要从事细胞发育生物学研究, zhuzhanwei1984@163.com; \*通信作者, xwzhang@hunau.edu.cn

法,从芥菜中克隆了与拟南芥各 *PIN* 基因对应的芥菜 *PIN1*(JN051352)、*PIN3*(JF966673)和 *PIN7*(JQ686225)基因的 cDNA。通过序列比对,发现这些基因与拟南芥中的相应基因具有高度的同源性,因此判断其具有相似的功能。拟南芥和芥菜均为十字花科植物,在整体形态上具有相似之处,但是与拟南芥不同的是芥菜的果荚为短角果,叶片为多裂叶。这些器官的形态建成说明在其发育过程中有独特的生长素分布,而生长素的分布可能是由于生长素极性运输基因的差异表达造成的。

本研究以拟南芥和芥菜的根、茎、叶、花等组织为材料,采用荧光定量 PCR 技术,以  $\beta$ -actin 为内参基因,对拟南芥和芥菜不同组织中 *PIN1*、*PIN3*、*PIN7* 基因的表达量进行分析,旨在为研究 *PIN* 基因在芥菜发育过程中生长素的极性运输对器官的形态建成提供依据。

表 1 qPCR 所用引物及对应的参考基因序列

引物名称	引物序列(方向 5'-3')	扩增基因	引物名称	引物序列(方向 5'-3')	扩增基因
$\beta$ -actinF	CACTTGCACCAAGCAGCATGAAGA	$\beta$ -actin	<i>AtPIN7R</i>	AAACACAAACGGCAGATCCCTTG	
$\beta$ -actinR	AATGGAACCACCGATCCAGACACT		<i>CbPIN1F</i>	TACTCGAIGATGGCTTCTGGTGGT	芥菜 <i>PIN1</i>
<i>AtPIN1F</i>	TGCTCGTTGCTTCTTATGCCGTTG	拟南芥 <i>PIN1</i>	<i>CbPIN1R</i>	TCTCCACAACAGGTTGTCGTTAC	
<i>AtPIN1R</i>	ACCGCAGTGCTAAGAATGTCAGGA		<i>CbPIN3F</i>	CAACGTTTGCGATGGCTGTTAGGT	芥菜 <i>PIN3</i>
<i>AtPIN3F</i>	TTTCCCTCTCCACTTCCCAACA	拟南芥 <i>PIN3</i>	<i>CbPIN3R</i>	CAACACGCAGTAAATCACCACGCA	
<i>AtPIN3R</i>	ACGATTGGACCATGAGGGAACCA		<i>CbPIN7F</i>	ATCCTCCTCAGAACGGTGAAAGCA	芥菜 <i>PIN7</i>
<i>AtPIN7F</i>	CGTGGCAGCAATGGCTATTGGATT	拟南芥 <i>PIN7</i>	<i>CbPIN7R</i>	TCTTTAGGGTTTAGCTCGGCCGTT	

#### 1.4 拟南芥和芥菜的根、茎、叶、花的 RNA 提取

分别取生长健壮的拟南芥和芥菜的根、茎、叶、花 500 mg,液氮研磨成粉末状,并转移至 1.5 mL 的 Ep 管中,加入 1 mL Trizol,振荡混匀,冰上静置 5 min;4 °C、12 000 r/min 离心 10 min,取上清液转移至新的 Ep 管中,冰上静置 15 min;加入 0.2 mL 氯仿剧烈颠倒 15 s,然后冰上静置 5 min;4 °C、12 000 r/min 离心 15 min;将上清转移至另一新的 Ep 管中,加入等体积的异丙醇混匀,-20 °C 静置 30 min 沉淀 RNA;4 °C、12 000 r/min 离心 10 min,加入 1 mL 75%DEPC 处理过的乙醇(预冷),4 °C、7 500 r/min 离心 5 min,加入 30  $\mu$ L 无 RNA 酶的水溶解 RNA。

#### 1.5 第一条链 cDNA 合成

冰上配置体系: Total RNA 1  $\mu$ L, Anchored

## 1 材料与方法

### 1.1 供试植物

开花期的野生型芥菜和哥伦比亚型拟南芥(湖南农业大学细胞生物学实验室栽培)。

### 1.2 试剂及仪器

Easy script 反转录试剂盒购自北京全式金生物技术有限公司, Light Cycler 480 SYB Green I Master 试剂盒购自上海杰海生物科技有限公司,罗化实时荧光定量 PCR 仪(型号 Light Cycler®480)。

### 1.3 引物的设计

根据 NCBI 中已经发布的登录号为 AT3G18780、AT1G73590、AT1G70940、AT1G23080、JN051352、JF966673、JQ686225 的序列分别设计  $\beta$ -actin 内参引物,扩增拟南芥 *PIN1*、*PIN3*、*PIN7* 和芥菜 *PIN1*、*PIN3*、*PIN7* 基因序列的引物(表 1)。由华大基因公司合成。

Oligo(dT)18 1  $\mu$ L, dNTP 1  $\mu$ L, 5 $\times$ Buffer 4  $\mu$ L, Ribonuclease inhibitor 0.5  $\mu$ L, Easy script TR 1  $\mu$ L, 加无 RNA 酶水至总体积为 20  $\mu$ L。轻轻混匀,42 °C 孵育 30 min。85 °C 加热 5 min,失活 Easyscript TR。

### 1.6 普通 PCR 对引物的扩增特性的检测

取 1  $\mu$ L 反转录 cDNA,分别用拟南芥的 actin 和 *PIN1*、*PIN3*、*PIN7* 及芥菜的 *PIN1*、*PIN3*、*PIN7* 基因的上下游引物配制 25  $\mu$ L 反应体系: 2.5  $\mu$ L 10 $\times$ Buffer, 1.5  $\mu$ L 25 mmol/L MgCl<sub>2</sub>, 1  $\mu$ L 10 mmol/L dNTPs, 1  $\mu$ L Primer Up(10  $\mu$ mol/L), 1  $\mu$ L Primer Dn(10  $\mu$ mol/L), 0.5  $\mu$ L *Tap* 酶, 17.5  $\mu$ L H<sub>2</sub>O。PCR 反应程序为: 94 °C 预变性 4 min; 95 °C 变性 30 s, 58 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 30 s, 30 个循环; 72 °C 终延伸 10 min。扩增产物在 1.0% 的琼脂糖凝胶上进行电泳检测,在紫外凝胶成像系统中拍照记录。

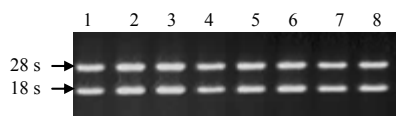
### 1.7 拟南芥和芥菜 PIN1、PIN3、PIN7 基因的表达分析

以  $\beta$ -actin 为内参基因,采用 96 孔反应模块对拟南芥和芥菜的 PIN1、PIN3、PIN7 基因进行 35 个循环的 Real-time qPCR 扩增。扩增体系: cDNA 5  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L primer Up 1  $\mu$ L, 10  $\mu$ mol/L primer Dn 1  $\mu$ L, Master mix 10  $\mu$ L, H<sub>2</sub>O 3  $\mu$ L, 总体积为 20  $\mu$ L。扩增程序: 95  $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95  $^{\circ}$ C 变性 10 s, 60  $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72  $^{\circ}$ C 延伸 10 min。在延伸阶段收集荧光信号。经软件分析得到样本内参基因的循环阈值( $C_t$ 值)。

## 2 结果与分析

### 2.1 RNA 的质量检测

用紫外分光光度计对拟南芥和芥菜各组织中提取的 RNA 的 OD 值进行测定,其  $OD_{260nm}/OD_{280nm}$  值略大于 2.0,表明纯度较高,可以用于扩增。琼脂糖凝胶电泳结果(图 1)也显示,总 RNA 条带清晰、整齐。可见,所提取的 RNA 纯度高,完整性好,无 DNA 污染,可以满足后续试验的需要。



1~4 分别为拟南芥的根、茎、叶、花的 RNA; 5~8 分别为芥菜的根、茎、叶、花的 RNA。

图 1 拟南芥和芥菜的根、茎、叶、花中提取的 RNA

Fig.1 RNA isolated from the root, stem, leaf and flower tissues of *Arabidopsis thaliana* and *Capsella bursa-pastoris*

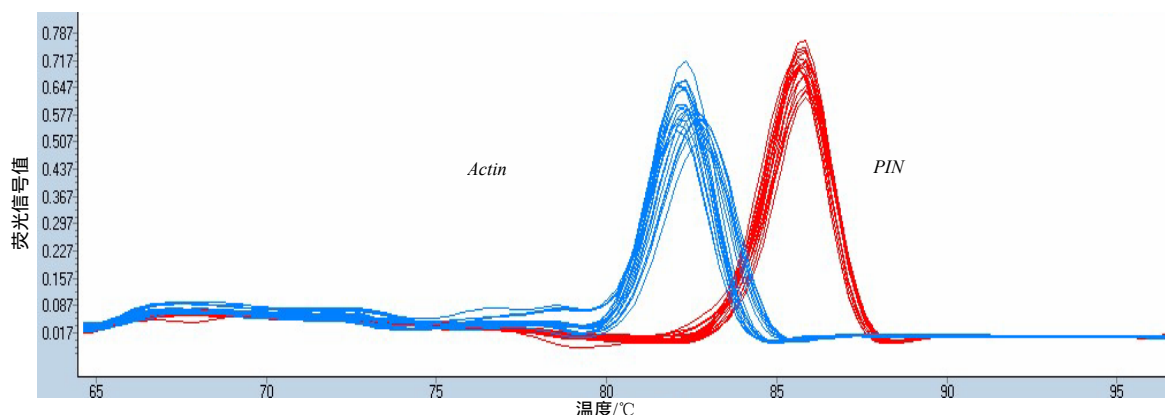


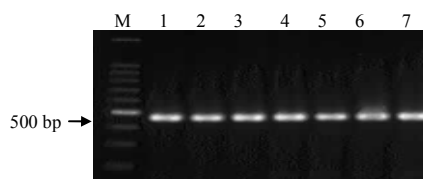
图 3 检测 PIN 基因的实时荧光定量 PCR 的熔解曲线

Fig.3 Melting curve of real-time qPCR for PIN genes

利用  $C_t$  值比较法对拟南芥和芥菜的 PIN1、PIN3、PIN7 基因的表达量进行分析,假设内参

### 2.2 内参引物及拟南芥和芥菜 PIN1、PIN3、PIN7 的扩增检测

以总 RNA 反转录的 cDNA 为模板,用普通的 PCR 扩增体系和反应程序,对设计的内参引物和目的基因的引物进行扩增检测,琼脂糖凝胶电泳结果(图 2)显示,各对引物均能正常扩增,产物均呈现为 1 条清晰稳定的扩增带,大小与预期片段大小一致。说明引物具有高度的扩增特异性。



1~3 以拟南芥根的 cDNA 为模板,用拟南芥 PIN1、PIN3、PIN7 引物进行扩增的结果; 4~6 以芥菜根的 cDNA 为模板用芥菜 PIN1、PIN3、PIN7 引物进行扩增的结果; 7 以拟南芥根的 cDNA 为模板,用  $\beta$ -actin 内参引物进行扩增的结果。

图 2 用内参基因引物和目的基因引物进行 RT-PCR 检测的结果

Fig.2 Results of RT-PCR test using primers for  $\beta$ -actin and primers for PIN genes

### 2.3 PIN 基因的表达量分析

分别以拟南芥和芥菜的 PIN1、PIN3、PIN7 基因的特异性引物,以拟南芥和芥菜的根、茎、叶、花不同组织的 cDNA 为模板,每组设 3 个重复,进行荧光定量 PCR,熔解曲线的峰值单一(图 3),说明引物具有高度特异性,没有非特异性产物扩增。

基因和目的基因的扩增效率都接近 100%,  $\Delta C_t = C_{t(\text{目的基因})} - C_{t(\text{内参基因})}$ ,  $\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t(\text{其他组织})} - \Delta C_{t(\text{拟南芥根})}$ , 相对

表达量=2<sup>-ΔΔCt</sup>，对试验结果进行处理。

由图 4 可知，拟南芥的根、茎、叶、花中 PIN1 基因的表达量都相应高于芥菜的根、茎、叶、花中 PIN1 基因的表达量。在拟南芥和芥菜的叶片中 PIN1 基因表达量都比较低。在拟南芥和芥菜的根部，PIN1 基因的表达量差异不明显。在茎和花中的差异最明显，拟南芥茎组织中 PIN1 基因的表达量比芥菜茎组织中 PIN1 基因的表达量高 3 倍，拟南芥花中 PIN1 基因的表达量是芥菜花中 PIN1 基因表达量的 10 倍以上。

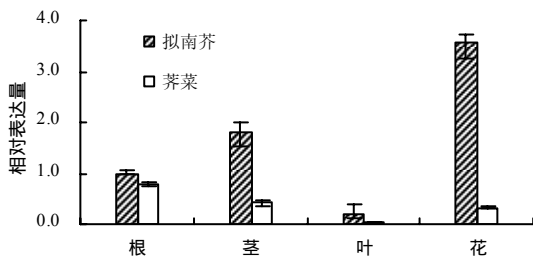


图4 PIN1基因在拟南芥和芥菜的根、茎、叶、花中表达参比β-actin的相对定量

Fig.4 Relative quantification of PIN1 gene expression in root, stem, leaf, and flower tissues of Arabidopsis and Capsella using β-actin as reference

由图 5 可知，拟南芥和芥菜中 PIN3 基因的表达量与 PIN1 基因的表达量相反，芥菜各组织中 PIN3 基因表达量都高于拟南芥各组织中 PIN3 基因的表达量。在拟南芥和芥菜的根部 PIN3 基因表达量的差异不明显；在茎和叶中的差异明显，芥菜茎组织中 PIN3 基因的表达量比拟南芥茎组织中 PIN3 基因的表达量高 3 倍；芥菜叶中 PIN3 基因的表达量比拟南芥叶中 PIN3 基因的表达量高 10 倍左右；芥菜花中 PIN3 基因的表达量略高于拟南芥花中 PIN3 基因的表达量。

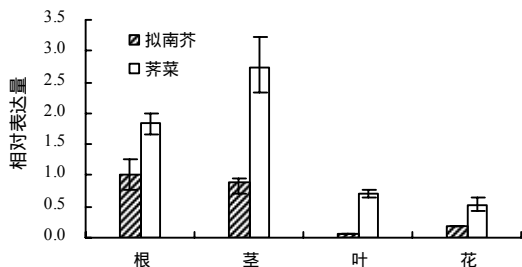


图5 PIN3基因在拟南芥和芥菜的根、茎、叶、花中表达参比β-actin的相对定量

Fig.5 Relative quantification of PIN3 gene expression in root, stem, leaf and flower tissues in Arabidopsis and Capsella using β-actin as reference

由图 6 可知，拟南芥和芥菜的 PIN7 基因表达量的差异主要在叶片中，拟南芥 PIN7 基因的表达量是芥菜 PIN7 基因表达量的 10 倍以上；拟南芥和芥菜的根和茎组织中 PIN7 基因的表达量都比较低，而拟南芥和芥菜花中 PIN7 基因的表达量都很高。

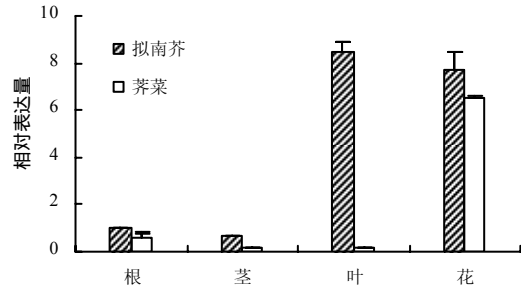


图6 PIN7基因在拟南芥和芥菜根、茎、叶、花中表达参比β-actin的相对定量

Fig.6 Relative quantification of PIN7 gene expression in root, stem, leaf and flower tissue in Arabidopsis and Capsella using β-actin as reference

### 3 讨论

PIN 基因的表达具有组织特异性或细胞特异性，不同的 PIN 基因家族成员表达的部位也不相同。这些 PIN 基因时空表达的特异性与生长素的极性运输高度相关<sup>[3]</sup>。而多个高度保守的 PIN 基因的存在，表明生长素在植物体内的运输存在多条路径，同时也反映生长素极性运输的复杂性<sup>[4]</sup>。

荧光定量 PCR 的结果显示，在拟南芥和芥菜的不同组织中，各种生长素输出蛋白表达量不一样，对于植物不同器官的形成可能起着不同的作用。在拟南芥和芥菜的根部维管组织中，PIN1 蛋白主要通过极性运输将生长素运输到细胞的基部。在根部的极点生长素的极性以及生长素的积累是引发根尖分生组织细胞分裂的主要因素。PIN 的突变体不能发育成有功能的根，这说明了生长素的极性运输和分布在根尖发育过程中对于根功能的形成具有重要的作用<sup>[5]</sup>。在对 PIN1 基因的突变体的胚胎的观察中得到证实，表明 PIN1 基因介导的极性运输在两侧对称性生长的器官的式样建成中具有重要的作用<sup>[6]</sup>。Tsukaya<sup>[7]</sup>提出生长素极性运输可以使将来发育成子叶的 2 个区域中的生长素达到合适的浓度，从而有利于子叶原基的发端形成两侧对称的子叶。

拟南芥叶中 *PIN7* 基因的表达量高, 荠菜叶中 *PIN3* 基因的表达量高, 证明 *PIN7* 基因和 *PIN3* 基因的表达对于维持拟南芥和荠菜叶片的形态有关。在荠菜的花中也有 *PIN1* 基因的表达, 因此, *PIN1* 基因应该也参与了荠菜两侧对称型的心皮的形态建成。当拟南芥 *PIN3* 基因突变之后, 突变株的向光性和向重力性减弱, 在根尖的重力感受细胞中, 拟南芥 *PIN3* 蛋白接受相应重力的刺激, 迅速转移到细胞的侧面, 控制细胞内生长素的侧向分布, 暗示 *PIN3* 基因可能控制生长素在细胞中的侧向分布, 从而调控植物的向性生长<sup>[8]</sup>。拟南芥和荠菜的花中都有 *PIN3* 基因的表达。荠菜花中 *PIN3* 基因的表达量要高于拟南芥中花 *PIN3* 基因的表达量, 因此推测在荠菜心皮发育过程中存在着生长素的侧向分布, 维持细胞的侧向分裂, *PIN3* 基因在荠菜心皮的形态建成中对于生长素的侧向运输起着十分重要的作用。拟南芥的 *PIN7* 基因维持着生长素的向基式运输, 其突变体的胚胎极性发生异常。拟南芥和荠菜的花器官中 *PIN7* 基因的表达量都很高, 可能影响拟南芥和荠菜花器官的形成。细胞内的生长素极性运输不但取决于生长素输出蛋白 PIN 的分布, 而且生长素本身对于其分布存在着反馈调节<sup>[9]</sup>。

生长素的极性运输是一个极其复杂的过程。*PIN* 基因家族成员存在着广泛的冗余现象, 而且成员之间还存在各种各样的交错调控和反馈调节<sup>[10]</sup>; 因此, 在荠菜发育过程中, 应该存在着不同的 *PIN* 基因对生长素浓度的调节。笔者采用荧光定量 PCR 对拟南芥和荠菜不同组织中 *PIN* 基因的表达进行分析, 结果表明, *PIN1* 基因可能在拟南芥和荠菜花器官发育中起到了重要的生长素调节作用, 而 *PIN7* 基因则可能在叶片的发育中发挥了重要的形态建成功能。

#### 参考文献:

- [1] 李运合, 孙光明, 吴蓓, 等. 植物生长素的极性运输载体研究进展[J]. 西北植物学报, 2009, 29(8): 1714-1722.
- [2] Jirl Friml, Klaus Palme. Polar auxin transport-old questions and new concepts?[J]. Plant Molecular Biology, 2002(49): 273-284.
- [3] Wendy Ann Peer, Anindita Bandyopadhyay, Joshua J Blakeslee, et al. Variation in expression and protein localization of the PIN family of auxin efflux facilitator proteins in flavonoid mutants with altered auxin transport in *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Cell, 2004(16): 1898-1911.
- [4] Anne Vieten, Steffen Vanneste, Justyna Wisniewska, et al. Functional redundancy of PIN proteins is accompanied by auxin-dependent cross-regulation of *PIN* expression[J]. Development, 2005, 132(20): 4521-4531.
- [5] Helene S Robert, Jirl Friml. Auxin and other signals on the move in plants[J]. Nature Chemical Biology, 2009 (5): 325-332.
- [6] 李俊华, 种康. 植物生长素极性运输调控机理的研究进展[J]. 植物学通报, 2006, 23(5): 466-477.
- [7] Tsukaya H. Leaf morphogenesis: Genetic regulations for length, width and size of leaves[J]. Tanpakushitsu Kakusan Koso, 2002, 47(12): 1576-1580.
- [8] Jirl Friml, Justyna Wisniewska, Eva Benkova, et al. Lateral relocation of auxin efflux regulator *PIN3* mediates tropism in *Arabidopsis* [J]. Nature, 2002, 415: 806-809.
- [9] Steffen Vanneste, Jirl Friml. Auxin trigger of change in plant development [J]. Cell, 2009, 136(6): 1005-1016.
- [10] Ikram Blilou, Jian Xu, Viola Willemsen, et al. The *PIN* auxin efflux facilitator network controls growth and patterning in *Arabidopsis* roots[J]. Nature, 2005, 433: 39-44.

责任编辑: 罗 维

英文编辑: 罗 维