

拟南芥菜一个组织特异基因的克隆与研究

刘庆法^{1,2} 刘勤¹ 王中华¹

(1西北农业大学农学系,陕西杨凌 712100) (2复旦大学遗传研究所,上海 200433)

摘要 利用启动子陷阱技术,鉴定和分离了一个在拟南芥菜的维管束和花药的绒毡层细胞中高度特异性表达的基因。经鉴定,该基因全长为 4.4 kb,编码一种与 RNA helicase A 高度同源的蛋白。组织化学和原位杂交的证据表明,该基因只在维管束中少数细胞内转录、翻译并在原位发挥作用。

关键词 拟南芥菜,基因表达,组织特异性,绒毡层,维管束,基因克隆
分类号 Q789, S188

细胞分化和器官发生过程中基因表达的调节是发育生物学的中心问题之一。研究表明,mRNA 的转录和蛋白质的翻译在植物的生活周期中具有时空特异性。了解这种特异性的机制对植物基因工程的研究具有重要意义。

Bellen 和 O'Kane 等^[1]在果蝇,Allen 等^[2]在小鼠上首先利用在一个弱启动子控制下的报道基因 lacZ,建立了检测细胞和组织特异性增强子序列的直接方法。近年来植物中遗传转化技术的发展为在分子水平上研究植物中特定基因的调控。植物分化和发育的遗传控制提供了可能性^[3]。Topping 等^[4]和 Lindsey 等^[5]利用 T-DNA 标签(tagging)技术在植物上建立了类似的系统,用以鉴定组织或细胞特异性调控序列并研究其在植物中控制基因特异性表达的机制。其原理是:向受体植物引入一个没有启动子的 gusA 作为报道基因,当这一基因被引入到受体基因组的一个基因的启动子下游时,则 gus 基因可以被激活,从而表现出并与被插入的基因形成可以共转录的融合基因。因此,gus 基因的表达模式就反映了被插入的基因所具有的调控序列的特性。这个插入序列应该与被插入的基因及其调控序列是紧密连锁的,这样就很容易分离和克隆这些序列^[5]。利用这种技术,Lindsey 等先后分离了多种组织和器官特异性的基因^[4-8],证明了这种技术的广泛适用性。本文报道利用这一方法鉴定并克隆的一个在拟南芥菜(*Arabidopsis thaliana* C24)维管束和花药的绒毡层细胞中高度特异性表达基因的研究结果。

1 材料与方法

1.1 植物的遗传转化

拟南芥菜生态型 C24 的转化参照 Clarke 等^[9]的方法进行,所用农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)为 LBA 4404 株系。

1.2 遗传转化所用载体的基因组成

本研究中用的载体为 p ∇ gusBin19^[4],由 gusA 的编码区与 nos 终止序列组成的 2.2

收稿日期 1998-09-29

作者简介 刘庆法,男,1962年生,副教授,在读博士

kb的片段插入到 pBin19^[10]的多克隆位点构成。gusA序列的 5'末端与 T-DNA 的左边界重复序列 LB 相邻。

1.3 基因的克隆

参照 Lindsey 等^[5]的方法获得了 AtV T-1 中 T-DNA 的侧翼序列,以此为探针从 cDNA 文库中得到了与该插入突变有关的关键基因。cDNA 文库的构建以野生型拟南芥菜生态型 C 为 mRNA 来源,参照文献 [11] 描述的方法进行。5'-AmpliFinder 系统的使用参照厂家 (Clone Tech) 的说明进行。

1.4 组织化学分析

gus 酶活性的组织定位,参照 Block 和 Debrouwer^[12]建立的塑料包埋的组织原位酶活性组织化学方法进行了改良^[13]。实验材料采用插入了 T-DNA 的转化子植株 AtV t-1 进行。受检组织(叶片、茎、根和花器等)参照文献 [14] 的方法在室温下用 1 mmol/L 的 5-溴-4-氯-3-吡啶 β-D-葡萄糖醛酸 (X-glc, Biosynth G, Staad, Switzerland) 染色 12 h。缓冲液为含 10 mmol/L EDTA, 体积分数为 0.1% Triton X-100^[15]的 100 mmol/L 磷酸缓冲液。为了抑制可能的背景反应,反应体系中加入了不到 200 g/L 的甲醇。为了抑制反应中间产物在组织中的扩散,在缓冲液中加入 1 mmol/L 的铁氰化钾。塑料包埋剂采用 Histo-resin (Reichert-jung 70-2218-500), 适当大小的材料参照厂家的说明进行固定和包埋,切片后在相差显微镜下观察、照相。

1.5 组织原位杂交分析

原位杂交参照文献 [16] 的方法进行了改良^[13]。材料采用拟南芥菜 C24 野生型的茎段、根和叶片等。探针采用目的 DNA 的两个片段 Iww36 和 Iww38, 以随机引物法进行标记。放射自显影后在相差显微镜下观察照相。

2 结果与分析

2.1 T-DNA 侧翼序列的 IPCR 扩增、目的基因的分离和鉴定

以前的研究已经证明, AtV T-1 是一个仅含有单拷贝 T-DNA 插入的转基因系^[5]。以 T-DNA 为探针与纯化的 AtV T-1 转基因系基因组 DNA 的限制性酶切产物进行 Southern 杂交, 分离出了含有 T-DNA 插入片段的基因组 DNA 片段, 该片段含有长约 0.5 kb 的植物 DNA。根据 Lindsey 等^[5]的方法采用 IPCR 方法, 获得了 T-DNA 侧翼的植物 DNA 片段并进行了克隆。

以上述克隆片段为探针, 从 cDNA 文库中分离了与插入突变有关的克隆 ww136。经 Southern 杂交分析 (图 2), 确定该克隆的插入片段长度为 3.7 kb。为了方便序列分析, 又对该克隆的插入片段进行了亚克隆, 得到 ww36 和 ww38。为了确定该克隆是否是完整的基因, 又以这两个亚克隆的插入片段为探针进行了 Northern 杂交, 发现野生型拟南芥菜中与之相对应的 mRNA 的为 4.4 kb。从而证明克隆 136 AtV T-1 的插入片段不是一个完整的基因, 尚缺约 0.7 kb 的 cDNA。随后用 Clone Tech 公司的 5' AmpliFinder cDNA 末端快速扩增 (5' RACE) 系统克隆了丢失的 0.7 kb cDNA 片段。至此, 完成了该基因 4.4 kb cDNA 的克隆工作。根据该基因的全序列, 其编码区与酵母、人、牛、果蝇、小鼠等生物中广泛存在的 RNA helicase A 有高度同源性。对该基因全序列的分析结果将另文报道。

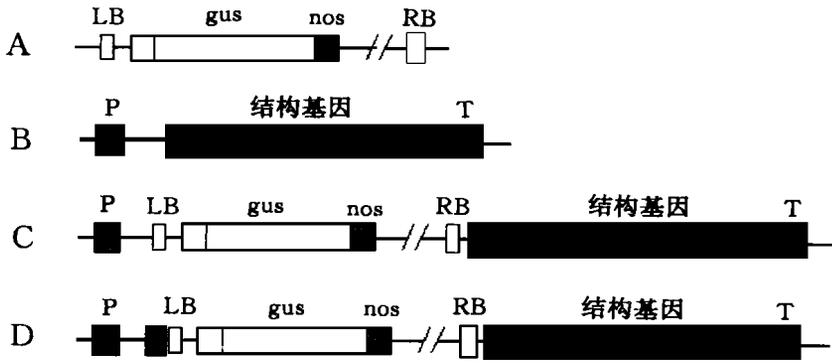


图 1 利用 *gus* 为报道基因研究植物基因表达调控的原理

A. Ti 质粒 T-DNA 片段的基因结构, *gus* 基因没有 5' 调控序列和启动子, 正常情况下不能被转录; B. 假定的一个植物结构基因 X 的结构, P 为其启动子; C, D. 当无启动子的 *gus* 基因插入到植物基因启动子 P 的下游时, 启动子 P 即可激活 *gus* 基因, 使其与植物基因的 5' 区一起被转录和翻译, 从而形成融合蛋白, 该基因产物具有 *gus* 酶的活性, 可以把 X-glu 分解产生蓝色产物, 从而反映出启动子 P 的所控制的植物基因 X 的表达特异性。C 为 *gus* 插入到植物基因 X 的启动子 P 和结构基因之间的情况; D 为 *gus* 基因插入到植物基因 X 的内部, 形成融合基因的情况。LB 和 RB 分别代表 T-DNA 的左右边界区, nos 代表 nos 基因的 3' 终止序列, T 表示植物基因 X 的终止序列。

2.2 *gus* 活性的组织化学定位

以转基因系 AtVT-1 为材料, 对 *gus* 的活性进行了组织化学定位研究。利用报道基因 *gus* 分析植物基因表达的原理如图 1 所示。研究发现, 在以 X-glu 染色的幼苗中 *gus* 活性只出现在根、茎、叶等器官的维管束 (图 3A, 3B) 和花药的绒毡层以及花丝维管束 (图 3C) 中, 在这些器官的其他组织中未见 *gus* 活性。可见, 这是一个只在维管束和绒毡层中表达的特异基因。

为了进一步精确分析 *gus* 活性在维管束中的分布, 又对染色的根、茎、叶进行了切片观察, 发现在维管束中也不是所有的细胞都有 *gus* 活性, 例如在根的维管束中, 维管束鞘、韧皮部的细胞中可以见到明显的 *gus* 活性, 而其木质部的细胞未见 *gus* 染色反应 (图 3D)。在茎中, 维管束中的形成层细胞有明显的 *gus* 活性, 而木质部的全部细胞、韧皮部的筛管细胞以及维管束鞘内的髓部所有细胞中均未见有 *gus* 活性。由此可见, AtVT-1 是一个只在维管束中的极少数细胞和花药绒毡层细胞中表达的高度特异性基因。

2.3 基因表达的原位杂交分析

基因的表达是一个极为复杂的过程, 至少包含了 mRNA 的转录和蛋白质的翻译两个大的步骤。在这两个步骤中还有复杂的 mRNA 和蛋白质的加工过程。基因的转录和翻译以及所编码的蛋白质功能的发挥不一定是在同一种细胞里完成的。如果把一个基因的转录、翻译以及翻译产物功能的发挥 3 个步骤发生的地点 (即组织或细胞), 分别以 A, B 和 C 表示, 则 A, B, C 可以是相同的组织或细胞, 也可能 A 和 B 是一种而 C 是另外一种, 也

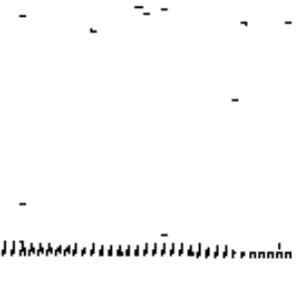


图 2 *ww136* 克隆与拟南芥菜基因组的杂交结果
A. DNA 的 Southern 杂交;
B. 总 RNA 的 Northern 杂交

可能 A 是一种而 B 和 C 是另外一种, 还有可能 A、B、C 是 3 种不同的组织或细胞



图 3 AtVT-1 的 *gus* 组织化学定位

A、B、C 分别示根、茎、花药绒毡层和花丝维管束; D 表示根的切片。箭头所指为 *gus* 表达部位

以上利用 *gus* 报道基因进行的研究只能反映翻译以后成熟蛋白质的活性分布情形, 不能反映转录以及转录、翻译和成熟产物的功能发挥是否有相同的组织特异性。另外, 当 *gus* 基因被植物基因的启动子激活以后, *gus* 酶的活性是否能够精确地反映植物内源基因的表达特征, 一直是一个尚未完全解决的问题。因此, 以 *ww36* 和 *ww38* 为探针对野生型拟南芥菜中该基因的表达进行了组织原位杂交分析。

图 4 是拟南芥菜 C24 野生型 6 日龄幼苗茎的原位杂交结果。杂交结果显示, 该基因只在维管束的形成层细胞中才能转录, 在其他组织或细胞类型中不转录。

结合图 3 中对 *gus* 酶活性的组织化学分析结果, 认为该株系中 *gus* 基因所对应的内源基因只在维管束的形成层细胞中转录、翻译和加工, 并在这些细胞中发挥作用。

3 讨论

象其他多细胞生物一样, 高等植物的一个基本特点是在发育过程中的细胞分化和形态发生, 从而形成结构和功能高度分化的组织和器官。这一过程是通过一系列特异基因的

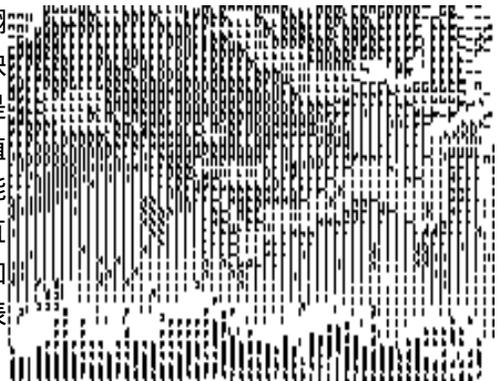


图 4 以 *WW36* 和 *WW38* 为探针对拟南芥菜 C24 株系的原位杂交。拟南芥菜选用 C24 株系的 6 日龄幼苗茎, 箭头所指为杂交信号

启动和关闭实现的。最终形成的结构和功能各不相同的组织和器官中也有着系列基因的特异表达。显然,在高等植物生活周期中,一方面,mRNA的转录和积累有着高度的时空特异性,这是个体发育正常进行的分子基础;另一方面,特定的基因是由各种各样的环境和体内的生物化学途径激活的,这就构成了植物生长发育可塑性的遗传学基础^[2, 17, 18]。阐明细胞分化和器官发生过程中基因的特异表达和协调,以及不同组织和器官中基因表达的特异性是发育生物学的中心研究课题之一。但是,以往的研究中主要是通过研究发育过程中基因表达的变化以及解析代谢网络来进行的。90年代以来,分子生物学技术的发展,使人们能够利用转基因技术来获得并分析和鉴定与特定形态发生过程相关的以及在特定组织和器官中特异表达的突变体,分离各种特异表达的基因,在分子水平上解剖发育过程的基因调控。

启动子陷阱技术是90年代初建立的一种可以直接识别细胞和组织特异性基因、环境或发育调节的基因并产生可见标记的方法,借助这种方法还可以鉴别和分离细胞、器官、组织或发育、环境调节的特异基因以及与特定发育过程相关的基因及其调控序列。这一技术已经成功地在若干物种得到应用^[19, 20],分离了植物在分化发育过程中建立极性的相关基因^[6]、与线虫侵染相关的应答基因及其启动子^[6]、胚胎发育相关基因^[7, 8]、胚胎和幼苗形态发生相关基因^[21]等。本文报到的是利用这种方法分离的一个高度组织特异的基因。实践已经证明,启动子陷阱技术是一种十分有效的鉴定、分离特异基因及其调控序列、研究基因表达的方法。这种技术在产生各种特异性标记以及在确定基因组序列功能方面的价值是显然的。

维管束是高等植物的特有结构,不但对植物体起着支撑作用,而且担负着物质和能量运输以及部分信息传导的任务,在植物的生命活动中有着极为重要的作用。维管束也是许多危害植物的刺吸式口器昆虫吸食汁液的渠道。分离和研究在维管束中特异表达的基因不但对于进一步深入研究维管束的生理功能和代谢特点等有着重要意义,而且对于研究寄主对虫害的应答以及利用基因工程技术防治病虫害也有着不可低估的作用。从水稻中分离的一个维管束特异基因的启动子已经广泛用于刺吸式昆虫的基因工程研究。绒毡层是植物雄性生殖器官中的重要营养结构,对于花粉的发育有着重要的生理功能。对绒毡层细胞特异基因的研究有助于揭示绒毡层和花粉发育的关系,这对于阐明植物雄性不育的机理将有所帮助。利用绒毡层特异启动子创造雄性不育系也已经初步获得成功,显示出潜在的巨大的应用价值。RNA helicase A是一种与RNA加工有关的酶,它在维管束和绒毡层中的生理意义还不清楚。本研究所揭示的这种在维管束和绒毡层中共同表达的RNA helicase A基因及其表达调控的理论意义和应用价值还有待于进一步研究探索。

参 考 文 献

- 1 Bellen H I, O'Kane C J, Willson C, et al. P-element-mediated enhancer detection: a versatile method to study development in *Drosophila*. *Development*, 1989, 3: 1288~ 1300
- 2 Allen N D, Cran D G, Barton S C, et al. Transgenes as probes for active chromosomal domains in mouse development. *Nature*, 1988, 333: 852~ 855
- 3 Kulemeier C, Green P J, Chua N H. Regulation of gene expression in higher plants. *Ann Rev Plant Physiology*, 1987, 38: 221~ 257
- 4 Topping J F, Wei W, Lindsey K. Functional tagging of regulatory elements in the plant genome. *Development*, 1994, 120: 1199~ 1204

- 1991, 112 1009~ 1019
- 5 Lindsey K, Wei W, Clarke M C, et al. Tagging genomic sequences that direct transgene expression by activation of a promoter trap in plants. *Transgenic Research*, 1993, 2 33~ 47
 - 6 Barthels N, van der Lee F M, Kla J, et al. Regulatory sequences of *Arabidopsis* drive reporter gene expression in nematode feeding structures. *The Plant Cell*, 1997, 9 2119~ 2134
 - 7 Lindsey K, Topping J F, da Rocha P S C F, et al. Insertional mutagenesis to dissect embryonic development in *Arabidopsis*. In: Wang T, Cuming A C. *Embryogenesis: generation of a plant*. UK: Oxford Press, 1996. 51~ 76
 - 8 Topping J F, Lindsey K. Promoter trap markers differential structural and positional components of polar development in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 1997, 9 1713~ 1725
 - 9 Clarke M C, Wei W, Lindsey K. High frequency transformation of *Arabidopsis thaliana* by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Molecular Biology Report*, 1992, 10 178~ 189
 - 10 Bevan M W. Binary *Agrobacterium* vectors for plant transformation. *Nuclear Acids Research*, 1982, 22 871~ 8721
 - 11 Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. *Molecular Cloning: A laboratory manual*. Cold Spring Harbor: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1982. 364~ 471
 - 12 Block M D, Debrouwer D. *In situ* histochemistry on plastic embedded plant material: the development of an artifact-free β -glucuronidase assay. *Plant J*, 1992, 2 261~ 266
 - 13 刘庆法, 郝峥嵘, 沈大棱. 植物基因表达的组织原位杂交和原位组织化学分析技术的改进. *植物学报*, 1997, 40 580~ 584
 - 14 Jefferson R A. Assaying chimerical genes in plants: the gus gene fusion system. *Plant Molecular Biology Report*, 1987, 5 387~ 450
 - 15 Martin T, Schmidt R, Altmann T, et al. Non-destructive assay systems for detection of β -glucuronidase activity in higher plants. *Plant Molecular Biology Report*, 1992, 10(1): 37~ 46
 - 16 Cox K H, DeLeon D V, Angerer L M, et al. Detection of mRNA in uterine embryos by *in situ* hybridization using asymmetric RNA probes. *Developmental Biology*, 1984, 101: 485~ 494
 - 17 Goldberg R B. Plants: novel developmental processes. *Science*, 1988, 240 1460~ 1467
 - 18 Edwards J W, Coruzzi G M. Cell specific gene expression in plants. *Ann Rev Genet*, 1990, 24 275~ 303
 - 19 Hope I A. Promoter trapping in *Caenorhabditis elegans*. *Development*, 1991, 113 399~ 408
 - 20 Claes B, Smalle J, Dekoyser R, et al. Organ-dependent regulation of a gene promoter isolated from rice by promoter-trapping in tobacco. *Plant J*, 1991, 1 15~ 26
 - 21 Topping J F, Agyeman F, Henicot B, et al. Identification of molecular markers of embryogenesis in *Arabidopsis thaliana* by promoter trapping. *Plant J*, 1994, 5 895~ 903

Cloning and Studies on a Tissue-Specific Gene in *Arabidopsis thaliana* Identified by Promoter Trapping

Liu Qingfa^{1,2} Liu Qin¹ Wang Zhonghua¹

(1 Department of Agronomy, Northwestern Agricultural University, Yangling, Shaanxi 712100)

(2 Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai 200433)

Abstract By the aid of promoter trapping, a vascular and tapetum-specifically expressed gene was identified, characterized and expressionally analyzed. The results showed that the gene was 4.4 kb in length, coding a protein highly homologous to RNA helicase A. Histochemical and tissue *in situ* hybridization analysis revealed that it was expressed and processed in xylem and tapetum cells, and functions in these cells only.

Key words *Arabidopsis thaliana*, gene expression, tissue-specific, tapetum, vascular, gene cloning