

烟草打顶对腐胺 *N*-甲基转移酶基因表达的影响

戚元成^{1,2}, 马雷¹, 王菲菲², 刘卫群^{1,2,*}

河南农业大学¹烟草学院, ²生命科学学院, 郑州 450002

摘要: 水培 65 d 的烟株进行打顶后, 测定打顶和不打顶烟株上部叶中烟碱含量。分别提取根中总 RNA, 以腐胺 *N*-甲基转移酶基因(*PMT*)特异引物、肌动蛋白基因(*actin*)为内参作半定量 RT-PCR 分析; 同时将提取的总 RNA 转膜, 用地高辛标记 *PMT* RT-PCR 产物作探针, 进行 Northern 杂交分析的结果表明, 打顶后的上部烟叶中烟碱含量和 *PMT* 基因表达量显著增加。

关键词: 烟草打顶; 腐胺 *N*-甲基转移酶基因(*PMT*); 半定量 RT-PCR; Northern 杂交

The Influence of Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) Topping on the Expression of Putrescine *N*-methyltransferase Gene

Qi Yuan-Cheng^{1,2}, MA Lei¹, WANG Fei-Fei², LIU Wei-Qun^{1,2,*}

¹College of Tobacco Science, ²College of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China

Abstract: The tobacco (*Nicotiana tabacum*) plants were topped after water cultured for 65 d and the top leaf nicotine contents of the topped and untopped were examined. Total RNA were extracted respectively from the roots of topped and untopped tobacco plants. Expression analysis of putrescine *N*-methyltransferase gene (*PMT*) was carried out by semi-quantitative RT-PCR with the tobacco *actin* as control and by Northern blotting with the digoxin-labelled *PMT* RT-PCR product as probe. Results showed that *PMT* expression and the nicotine content in the top leaf increased after topping.

Key words: tobacco topping; putrescine *N*-methyltransferase gene (*PMT*); semi-quantitative RT-PCR; Northern blotting

烟碱合成的第一步是在腐胺 *N*-甲基转移酶 (putrescine *N*-methyltransferase, *PMT*) 催化下腐胺向 *N*-甲基腐胺的转化(Hibi等1994; Chou和Kutchan 1998)。打顶是影响烟株中烟碱合成积累的农艺措施之一。Shi 等(2006)的研究表明, 烟株打顶后, 生长素合成减少, 茉莉酸内酯增加, 最终烟碱生物合成量增加。Saunders 和 Bush (1979) 研究表明烟株打顶后根中烟碱合成相关酶类活性增加, 烟碱含量也增加。迄今, 将烟株打顶后烟碱的快速积累与 *PMT* 转录水平直接联系起来的报道尚少见。为此, 本文用半定量 RT-PCR 并结合 Northern 杂交的方法研究了打顶对烟株中 *PMT* 基因表达的影响, 从分子水平揭示烟碱合成关键基因转录和烟碱生物合成量之间的平行关系。

材料与amp;方法

实验材料为烟草(*Nicotiana tabacum* L.) 品种 ‘K326’。采用漂浮育苗法培育至四叶期时, 移入 Hoagland 营养液中, 水培 65 d 时打顶, 于打顶后 24 h 时进行实验。

打顶烟草和 不打顶烟草根部总 RNA 的提取依照 TIANGEN 公司的总 RNA 提取试剂盒(TRNzol Total RNA Reagent)说明书进行。

提取总 RNA 后, 以 1% 琼脂糖凝胶法检测总 RNA 的提取质量。根据 A_{260}/A_{280} 值, 计算其纯度, 并通过 A_{260} 值对总 RNA 作定量分析。

取等量打顶和 不打顶烟株的根部总 RNA, 用 TaKaRa 试剂盒 M-MLV RTase cDNA Synthesis Kit 合成第一链 cDNA。

根据烟草 *actin* 序列(EU938079), 设计特异引物, 进行烟草肌动蛋白的 PCR 扩增。向 25 μ L 反应体系中分别加入等量的 cDNA (3 μ L) 模板、10 倍的 PCR 缓冲液、200 μ mol \cdot L⁻¹ 的 dNTPs、1.5 mmol \cdot L⁻¹ 的 MgCl₂、0.4 μ mol \cdot L⁻¹ 的 *actin* 特异引物、1 U Taq DNA 聚合酶。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,

收稿 2009-04-17 修定 2009-06-22

资助 国家烟草专卖局重点项目(110200001011A)。

* 通讯作者(E-mail: liuweiqun2004@126.com; Tel: 0371-63555153)。

18个循环; 72 °C延伸5 min。

取等体积的PCR产物进行1%琼脂糖凝胶电泳。溴化乙锭(EB)染色后,用UVBand紫外-可见分光光度计计算机软件对电泳条带进行灰度分析,以调整 *PMT* 基因PCR扩增时的模板量。

根据已克隆的烟草 *PMT* (GenBank 登录号为D28506)序列设计特异引物,正向引物序列为: 5' CAGAACGGGACAATCAGC 3';反向引物序列为: 5' GGACCTTCAGTAGAGCAGT 3'。PCR扩增条件同上,按 *actin* 扩增后灰度分析的结果添加模板量。取等体积的PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳,EB染色,UVBand紫外-可见分光光度计观察照相。

Northern杂交按照威元成等(2004)文中的方法进行,探针是DIG DNA Labeling Kit (Roche)标记的 *PMT* 基因RT-PCR产物。

打顶24 h后,取打顶和不打顶烟草的上部叶,重复3个。烟碱含量测定采用王瑞新(2003)书中的紫外分光光度法。实验数据分析用 Student's *t* 检验($P \leq 0.05$)。

结果与讨论

1 RNA 电泳检测

提取的总RNA以1%琼脂糖凝胶电泳检测的结果(图1)显示,28S、18S、5S三条带中28S和18S带比较亮,说明RNA样品纯度高,并未发生降解,因此认为可用于cDNA第一链的合成。

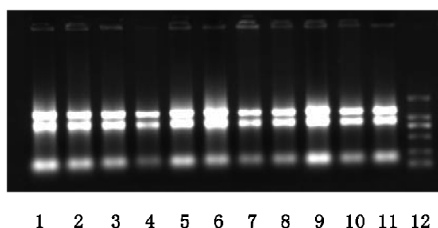


图1 总RNA的电泳检测

Fig.1 Total RNA separated on agarose gel
1~5: 不打顶烟株; 6~11: 打顶烟株; 12: DNA marker DL2000。

2 *PMT* 引物和内参引物分管 PCR 分析

从图2可以看出,PCR扩增产物的条带比较清晰,基本上没有拖尾现象。打顶烟株的条带亮度大于不打顶烟株的,但两类烟株的 *actin* 扩增产物差异不显著,说明烟草打顶后根部 *PMT* 基因表达量明显增加。

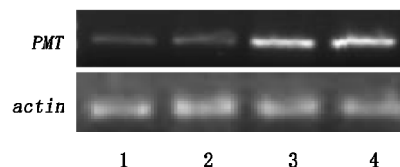


图2 *PMT* 的半定量RT-PCR分析

Fig.2 Semi-quantitative RT-PCR analysis of *PMT*
1、2: 不打顶烟株; 3、4: 打顶烟株。以 *actin* 扩增产物为内参。

3 *PMT* 表达的 Northern 杂交分析

由Northern杂交结果(图3)可知,在两个泳道rRNA的量一致的情况下,打顶烟株的杂交带比不打顶烟株的条带亮,这表明烟草打顶后根部 *PMT* 基因表达量明显增加。

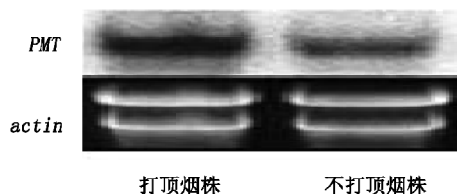


图3 *PMT* 表达的 Northern 杂交分析

Fig.3 Northern blotting analysis of the *PMT* expression
rRNA 的 EB 染色条带作上样量对照。

4 上部烟叶烟碱含量变化

从图4可见,烟株移栽65 d时,上部叶中烟碱含量为0.19%,打顶后24 h的上部叶中烟碱含量为0.266%; Student's *t* 检验($P \leq 0.05$)分析表明,打顶后的烟碱合成量比打顶前显著上升。这跟 *PMT* 表达的半定量RT-PCR和Northern杂交结果存在一定

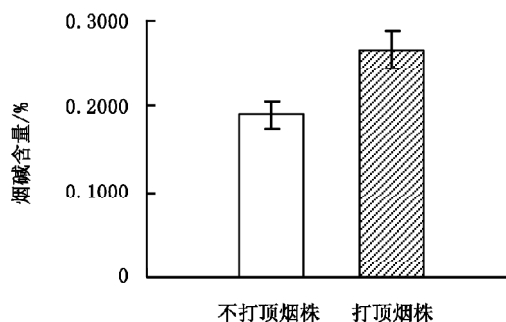


图4 烟株打顶前后的烟碱含量变化

Fig.4 Changes in nicotine contents before and after
topping of tobacco plants

的平行关系。

参考文献

- 戚元成, 张世敏, 王丽萍, 王明道, 张慧(2004). 谷胱甘肽转移酶基因过量表达能加速盐胁迫下转基因拟南芥的生长. 植物生理与分子生物学学报, 30 (5): 517~522
- 王瑞新(2003). 烟草化学. 北京: 中国农业出版社, 271~272
- Chou WM, Kutchan TM (1998). Enzymatic oxidations in the biosynthesis of complex alkaloids. Plant J, 15: 289~300
- Hibi N, Higashiguchi S, Hashimoto T, Yamada Y (1994). Gene expression in tobacco low-nicotine mutants. Plant Physiol, 6: 723~735
- Saunders JW, Bush LP (1979). Nicotine biosynthetic enzyme activities in *Nicotiana tabacum* L. genotypes with different alkaloid levels. Plant Physiol, 64 (2): 236~240
- Shi QM, Li CJ, Zhang FS (2006). Nicotine synthesis in *Nicotiana tabacum* L. induced by mechanical wounding is regulated by auxin. J Exp Bot, 57 (11): 2899~2907