

拟南芥复制因子 C 亚基 3 在黄化苗下胚轴伸长生长中的作用

夏石头¹, 匡勇², 萧浪涛^{1,*}

湖南农业大学¹湖南省植物激素与生长发育重点实验室,²科学技术处, 长沙 410128

摘要: 拟南芥遮光培养 2.5 d 时, *rfc3-1* 突变体黄化幼苗的下胚轴平均长度约比野生型植株黄化幼苗的下胚轴长 27.5%。观察表明, 相对于野生型复制因子 C 亚基 3 (replication factor C3, AtRFC3) 基因突变体的下胚轴表皮细胞, 特别是上部靠近子叶部分的表皮细胞, 单细胞长度变长。将野生型 *RFC3* 基因转染到 *rfc3-1* 后, 突变体恢复野生型表型, 进一步说明 RFC3 在黄化苗的下胚轴伸长生长中有作用。

关键词: 拟南芥; RFC3; 黄化苗; 下胚轴; 伸长生长

Arabidopsis Replication Factor C Subunit 3 Plays a Role in Hypocotyl Elongation of Etiolated Seedling

XIA Shi-Tou¹, KUANG Yong², XIAO Lang-Tao^{1,*}

¹Hunan Provincial Key Laboratory of Phytohormones and Growth Development, ²Science and Technology Agency, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China

Abstract: The average length of etiolated hypocotyl of *rfc3-1* mutant was about 27.5% longer than that of the wild type plants under dark culture conditions for 2.5 days. The main reason is that mutation in RFC3 (replication factor C3) causes the length of single epidermal cell, especially the epidermal cell close to cotyledon becoming longer than that of the wild type. Transformation of wild type *AtRFC3* gene into *rfc3* mutant rescued the mutant phenotypes, suggesting that RFC3 plays a role in hypocotyl elongation of etiolated seedlings in *Arabidopsis thaliana*.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; RFC3; etiolated seedling; hypocotyl; elongation

复制因子 C (replication factor C, RFC) 最初是从人类 HeLa 细胞提取物中纯化的, 是猿病毒 40 (simian virus 40, SV40) DNA 体外复制的必需因子 (Tsurimoto 和 Stillman 1989; Chen 等 1992)。人类复制因子 C (human replication factor C, hRFC), 又称激活子 1 (activator 1), 是一个多聚引物识别蛋白, 包括复制因子 C1 (RFC1)、复制因子 C2 (RFC2)、复制因子 C3 (RFC3)、复制因子 C4 (RFC4) 和复制因子 C5 (RFC5) 5 个独特亚基, 它们的分子量分别为 145、40、38、37 和 36.5 kDa (Tsurimoto 和 Stillman 1989; Chen 等 1992; Okumura 等 1995)。1992 年, 人类复制因子 C 在酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 中的功能类似物也已鉴定出来, 称为酵母复制因子 C 的 5 个亚基 (Fien 和 Stillman 1992)。一系列的研究结果 (Luckow 等 1994; Noskov 等 1994; Gray 和 MacNeill 2000) 表明, 复制因子 C 的 5 个亚基, 包括 1 个大亚基 (RFC140/RFC1) 和 4 个小亚基 (RFC37/RFC2、RFC36/RFC3、RFC40/RFC4 和 RFC38/RFC5), 在真核生物中普遍存在。

在 DNA 复制中, RFC 复合物是增殖细胞核抗

原 (proliferating cell nuclear antigen, PCNA) 的装配器, 优先选择结合附着在模板上的 DNA 引物 3' 末端 (Tsurimoto 和 Stillman 1990, 1991), 是结构特异性 DNA 结合蛋白并对 DNA 多聚酶 δ 和 ϵ 起着引物识别因子的作用 (Lee 和 Hurwitz 1990; Lee 等 1991)。RFC 在 ATP 存在的条件下将 PCNA 和 DNA 多聚酶 δ (Pol δ) 或 ϵ (Pol ϵ) 装配到附有引物的模板上。附有引物的 DNA-RFC-PCNA-DNA 多聚酶 δ (或 Pol ϵ) 复合物在有脱氧核糖核苷酸 (dNTPs) 存在的条件下通过人类单链 DNA 结合蛋白 (human single-stranded DNA binding protein, hSSB) 的作用而有效的延伸了 DNA 复制链。

在动物系统中, RFC 复合物在 DNA 复制和修复以及细胞增生中的功能也逐渐被认识 (Green 等

收稿 2009-08-29 修定 2009-09-15

资助 国家自然科学基金项目 (30970247)、湖南省高等学校科学研究重点项目 (09A037)、作物种质创新与资源利用国家重点实验室培育基地开放重点项目和湖南农业大学稳定人才基金 (07WD14)。

* 通讯作者 (E-mail: ltxiao@hunau.net; Tel: 0731-84635260)。

2000; Mayer 等 2001)。而植物中有关 RFC 的研究进展缓慢,直到 2003 年, Furukawa 等(2003)才通过同系物克隆在水稻中成功分离了 *OsRFC* 的 5 个亚基: *OsRFC1*、*OsRFC2*、*OsRFC3*、*OsRFC4* 和 *OsRFC5*, 分析了其分子特性和表达部位。但由于未能得到相应的突变体植株,难以进行 RFC 的功能研究。原因可能是 RFC 是 DNA 复制的必需因子,其编码基因突变很可能会导致植株死亡。我们在对拟南芥复制因子 C 亚基 1 编码基因的 3 个 T-DNA 插入突变株系 *rfl-1*、*rfl-2* 和 *rfl-3* 的研究(Xia 等 2007)中,发现 T-DNA 在复制因子 C 亚基 1 编码基因外显子中的插入突变会引起胚胎发育异常,并导致胚胎和种子败育,说明复制因子 C 亚基 1 在拟南芥胚胎发生中起作用。为了探讨拟南芥复制因子 C 的其他 4 个亚基是否具有类似功能,继续进行了深入的研究。通过 EMS 诱变获得了拟南芥复制因子 C 亚基 3 编码基因的点突变体并命名为 *rfc3-1* (Xia 等 2009)。与复制因子 C 亚基 1 编码基因突变体 *rfl-1*、*rfl-2* 和 *rfl-3* 不同,*rfc3-1* 叶型狭长,生长发育受到的影响更明显。本文以 *rfc3-1* 突变体纯合子植株和野生型植株黄化幼苗为材料,研究 RFC3 在植株下胚轴生长发育中的作用。

材料与amp;方法

取拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)哥伦比亚生态型(Columbia, Col)种子用 20 mmol·L⁻¹ 甲基磺酸乙酯(ethylmethane sulphonate, EMS)处理 18 h,取适量处理后种子,加经高温灭菌的 0.1% 琼脂糖溶液,混匀后置于 4 °C 冰箱中低温处理 4~5 d。将种子均匀播于 18 孔塑料栽培盘的培养土上,在 16 h 光照(光照强度为 90 μmol·m⁻²·s⁻¹,温度为 23 °C) / 8 h 黑暗(21 °C)光照培养箱培养条件下培养幼苗和筛选突变体。

在筛选突变体时,发现一个个体小且叶片狭长的突变体,编号为 870。当 870 植株长至 3 片真叶时,将其移栽至新的培养钵中,25 d 后植株开始开花结实,40 d 后收集种子。然后将种子置于室温下风干 10 d,再按照上述方法播种和幼苗培养,观察记录了后代分离情况,并将突变体 870 与野生型植株进行回交试验。在对突变基因进行物理定位和克隆后,命名此突变体为 *rfc3-1*,并设计了特异性引物对(5' tatggctctcccgggtactca 3' 和 5' cactcctggacgaatatgc 3')用来检测 *rfc3-1* 突变体纯合子植株(Xia 等 2007, 2009)。

分别取适量 *rfc3-1* 突变体纯合子和生态型野生型拟南芥种子表面消毒(Xia 等 2007)。用记号笔将具氨苄抗性(Amp⁺)的圆形 MS 培养板划分成两半,其中一半播种 *rfc3-1* 突变体,另一半播种野生型拟南芥种子,作好标记,然后用石蜡封口膜密封培养板,放入 4 °C 冰柜中低温处理 2~3 d。MS-Amp⁺ 培养基配方为 4.4 g·L⁻¹ MS+0.5% 蔗糖+0.8% 琼脂, Amp 浓度为 100 mg·mL⁻¹, pH 为 5.6~5.8。

黄化幼苗培养试验参照 Ullah 等(2003)和 Chen 等(2003)的方法,将低温处理后的培养板放入培养箱内,16 h 光照(23 °C) / 8 h 黑暗(21 °C)条件下发芽 1 d 后,用锡箔纸包裹整个培养板,遮光培养 2.5 d 后揭去锡箔纸,并从每个培养板取突变体和野生型黄化苗各 10 株,作好标记,快速测量黄化幼苗下胚轴的长度,共测 10 个培养板。

将黄化幼苗浸泡在水合氯醛/甘油/水溶液(8:1:2, W/V/V) (Ohad 等 1996)中 1 d 以上,以清除细胞内组织,然后使用 ZEISS:Axiovert 200 M 显微镜观测黄化幼苗下胚轴表皮细胞, AxioCam HRM 数码相机照相, AxioVision 4.2 Rel 软件进行细胞长度测量。同时,选取大小、长势和长相都具有代表性的 *rfc3-1* 突变体和 Col 野生型黄化幼苗各 2 株用解剖显微镜照相(Olympus SZH 解剖显微镜和 Olympus DP12 数码相机)。以上试验均重复 3 次。

用 PhusionTM 高保真酶(high-fidelity PCR master mix, NEB 公司)和基因特异引物 5' cgcgatcccgctcctgcaaatgctgatga 3' 和 5' cggggtaccacatggctggaccagcagag 3' 从拟南芥 Col 野生型基因组中扩增出 *RFC3* 的全序列(约 4.9 kb),琼脂糖凝胶电泳检测后用 QIA 凝胶 DNA 回收试剂盒(QIAGEN 公司)回收扩增产物,在 22 °C 下用 *KpnI* 和 *BamHI* 双酶切 PCR 产物,用无水乙醇低温沉淀,以 70% 乙醇洗涤沉淀后将其溶解在 0.1×TE 溶液中,最后将基因片段与用同样双酶切的 pG229 载体(该载体带有在微生物中的 Kan⁺ 抗性标记和植物中的 Baster 抗性标记)回收片段连接,构建成遗传互补重组质粒。经过测序验证正确的野生型 *RFC3* 基因阳性克隆,以农杆菌介导花器浸渍遗传转化法转染到突变体植株中,以获得 *rfc3-1* 突变体遗传互补植株。然后将完全互补植株(*rfc3-1/rfc3-1::RFC3*)与野生型植株种子按照前文所述方法播种在 MS-Amp⁺ 培养板进行黄化幼苗的培养,并测量黄化幼苗下胚轴的长度。

结果与讨论

1 *rfc3-1* 突变体的筛选

经 EMS 诱变而得到突变体 *rfc3-1*, 个体小, 且叶片狭长。在与哥伦比亚野生型植株回交后, 其回交后代(F_2)发生性状分离, 在总共获得的 173 株后代中, 野生型表型 131 株, 突变体 42 株, 野生型表型 / 突变体表型的理论比率为 3:1 ($\chi^2=0.05, P>0.05$)。特异引物 PCR 结果表明, 42 株突变体植物都含有突变基因, 进一步证明 *rfc3-1* 突变体是一个由单基因控制的隐性突变体。

2 *RFC3* 基因突变对拟南芥黄化幼苗下胚轴伸长生长的影响

黄化幼苗下胚轴是指由子叶着生点到胚根的一段组织, 其生长情况直接反映了植株的生长状况。遮光培养 2.5 d 后, 突变体和野生型黄化幼苗生长差异明显。由图 1 可以看出, *rfc3-1* 突变体纯合子植株黄化幼苗不仅比野生型植株黄化幼苗稍高, 并且在遮光培养 2.5 d 后, *rfc3-1* 突变体纯合子植株黄化幼苗的子叶弯钩已处于半开状态, 而此时野生型植株黄化幼苗的子叶弯钩仍然紧闭闭合。为了量化两者之间的差异, 测定了培养板上遮光培养 2.5 d 的 *rfc3-1* 突变体和野生型黄化幼苗各 100 株。结果显示, *rfc3-1* 突变体黄化苗下胚轴的长度为 (5.113 ± 0.089) mm, 而相应野生型黄化苗下胚轴的长度为 (4.005 ± 0.153) mm, *rfc3-1* 突变体黄化苗下胚轴平均长度比野生型植株黄化幼苗下胚轴的长 1.1 mm (图 2), 暗示 *RFC3* 基因突变对拟南芥黄化幼苗下胚轴的生长具有重要影响。

3 *RFC3* 基因突变对拟南芥黄化幼苗下胚轴表皮细胞生长的影响

为了进一步研究引起 *rfc3-1* 突变体黄化苗下胚轴变长的内部原因, 在以水合氯醛/甘油/水溶液清除黄化幼苗细胞内组织后, 观测了从根部开始到下胚轴子叶接合部的下胚轴表皮细胞。结果表明, *rfc3-1* 突变体纯合子植株黄化幼苗下胚轴表皮细胞数目并不比野生型植株的更多, 甚至还少了 2~5 个细胞, 但单个细胞长度大于野生型植株, 特别是下胚轴上部靠近子叶的部分更是如此(图 3)。这表明 *rfc3-1* 突变体黄化苗下胚轴变长的主要原因可能是突变体黄化苗下胚轴的细胞长度和体积变大, 是基因突变影响细胞的增生并导致单个细胞体积增大的结果。

4 野生型 *AtRFC3* 基因对 *rfc3-1* 突变性状的遗传互补

用 Phusion™ 高保真酶(NEB 公司)和基因特异

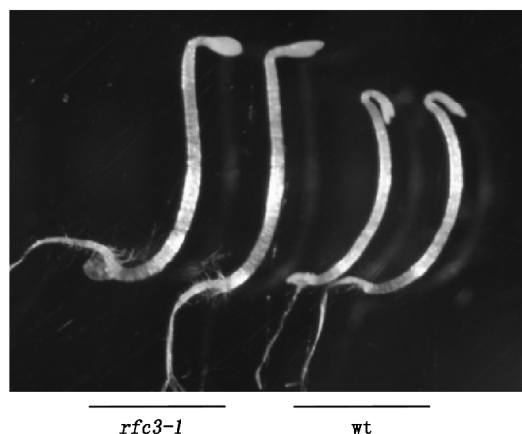


图 1 *rfc3-1* 突变体与野生型植株黄化幼苗

Fig.1 The etiolated seedlings of *rfc3-1* mutant and wild type plant

图中为黑暗培养 2.5 d 的典型的 *rfc3-1* 和野生型植物黄化幼苗解剖显微照片。wt: 野生型植物; *rfc3-1*: 突变体纯合子, 下图同此。

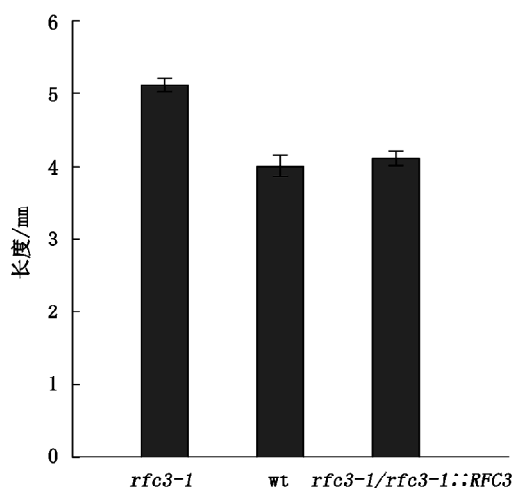


图 2 *rfc3-1* 突变体、野生型和互补植株黄化幼苗的下胚轴长度比较

Fig.2 Length comparison of etiolated hypocotyl of *rfc3-1* mutant, wild type, and genetically complementary plant

rfc3-1/rfc3-1::RFC3 为 *rfc3-1* 突变体的遗传互补植株。图中数值为至少 30 株暗培养 2.5 d 的 *rfc3-1*、互补植株或野生型植物黄化幼苗下胚轴长度的平均值。试验重复 3 次。

引物扩增野生型 *RFC3* 基因及其启动子序列 (genomic DNA, 约 4.9 kb), 回收扩增片段并将其重组到 Basta 筛选标记的 pG229 重组质粒中, 并将重组质粒转入 *rfc3-1* 突变体。遗传互补植株(*rfc3-1/rfc3-1::RFC3*)经过特异引物 PCR 检测验证(另文发表)后, 将互补植株与野生型植株种子播在同一培

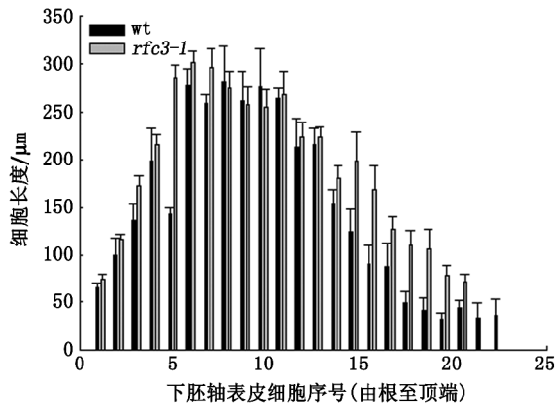


图3 *rfc3-1* 突变体与野生型植株黄化幼苗
下胚轴表皮细胞特征比较

Fig.3 Epidermal cell comparison of etiolated hypocotyl in *rfc3-1* mutant and wild type plant

试验检测了20株 *rfc3-1* 或野生型植株黄化幼苗超过400个表皮细胞的长度, 图中各数值为20个表皮细胞长度的平均值, 试验重复3次。

养板上, 在相同条件下培养黄化幼苗, 互补植株黄化幼苗下胚轴的长度与野生型植株的相似(图2), 说明野生型 *RFC3* 基因完全能够互补 *rfc3-1* 突变体纯合子的遗传表型。 *rfc3-1* 的突变遗传表型是由 *RFC3* 基因的点突变所引起的, 说明 *RFC3* 在下胚轴伸长生长中有作用。遮光培养2.5 d的 *rfc3-1* 黄化幼苗下胚轴变长的主要原因可能是 *RFC* 基因突变造成 *rfc3-1* 突变体纯合子植株黄化幼苗下胚轴表皮细胞长度大于野生型植株下胚轴表皮细胞长度, 但其具体作用机制尚待进一步研究。

参考文献

Chen J-G, Willard FS, Huang J, Liang J, Chasse SA, Jones AM, Siderovski DP (2003). A seven-transmembrane RGS protein that modulates plant cell proliferation. *Science*, 301: 1728~1731

Chen M, Pan ZQ, Hurwitz J (1992). Studies of the cloned 37-kDa subunit of activator 1 (replication factor C) of HeLa cells. *Proc Natl Acad Sci USA*, 89 (12): 5211~5215

Fien K, Stillman B (1992). Identification of replication factor C from *Saccharomyces cerevisiae*: a component of the leading-strand DNA replication complex. *Mol Cell Biol*, 12 (1): 155~163

Furukawa T, Ishibashi T, Kimura S, Tanaka H, Hashimoto J, Sakaguchi K (2003). Characterization of all the subunits of replication factor C from a higher plant, rice (*Oryza sativa* L.), and their relation to development. *Plant Mol Biol*, 53 (1-2): 15~25

Gray FC, MacNeill SA (2000). The *Schizosaccharomyces pombe* *rfc3⁺* genes encodes a homologue of the human hRFC36 and *Saccharomyces cerevisiae* Rfc3 subunits of replication factor

C. *Curr Genet*, 37 (3): 159~167

Green CM, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Lowndes NF (2000). A novel Rad24 checkpoint protein complex closely related to replication factor C. *Curr Biol*, 10 (1): 39~42

Lee SH, Hurwitz J (1990). Mechanism of elongation of primed DNA by DNA polymerase δ , proliferating cell nuclear antigen, and activator 1. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87 (15): 5672~5676

Lee S-H, Kwong AD, Pan Z-Q, Hurwitz J (1991). Studies on the activator 1 protein complex, an accessory factor for proliferating cell nuclear antigen-dependent DNA polymerase δ . *J Biol Chem*, 266 (1): 594~602

Luckow B, Bunz F, Stillman B, Lichter P, Schütz G (1994). Cloning, expression, and chromosomal localization of the 140-kilodalton subunit of replication factor C from mice and human. *Mol Cell Biol*, 14 (3): 1626~1634

Mayer ML, Gygi SP, Aebersold R, Hieter P (2001). Identification of RFC (Ctf18p, Ctf8p, Dcc1p): an alternative RFC complex required for sister chromatid cohesion in *S. cerevisiae*. *Mol Cell*, 7 (5): 959~970

Noskov V, Maki S, Kawasaki Y, Leem SH, Ono B, Araki H, Pavlov Y, Sugino A (1994). The *RFC2* gene encoding a subunit of replication factor C of *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res*, 22 (9): 1527~1535

Ohad N, Margossian L, Hsu Y-C, Williams C, Repetti P, Fischer RL (1996). A mutation that allows endosperm development without fertilization. *Proc Natl Acad Sci USA*, 93 (11): 5319~5324

Okumura K, Nogami M, Taguchi H, Dean FB, Chen M, Pan ZQ, Hurwitz J, Shiratori A, Murakami Y, Ozawa K et al (1995). Assignment of the 36.5-kDa (RFC5), 37-kDa (RFC4), 38-kDa (RFC3), and 40-kDa (RFC2) subunit genes of human replication factor C to chromosome bands 12q24.2-q24.3, 3q27, 13q12.3-q13, and 7q11.23. *Genomics*, 25 (1): 274~278

Tsurimoto T, Stillman B (1989). Purification of a cellular replication factor, RF-C, that is required for coordinated synthesis of leading and lagging strands during simian virus 40 DNA replication *in vitro*. *Mol Cell Biol*, 9 (2): 609~619

Tsurimoto T, Stillman B (1990). Functions of replication factor C and proliferating-cell nuclear antigen: functional similarity of DNA polymerase accessory proteins from human cells and bacteriophage T4. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87 (3): 1023~1027

Tsurimoto T, Stillman B (1991). Replication factors required for SV40 DNA replication *in vitro*. II. Switching of DNA polymerase α and δ during initiation of leading and lagging strand synthesis. *J Biol Chem*, 266 (3): 1961~1968

Ullah H, Chen J-G, Temple B, Boyes DC, Alonso JM, Davis KR, Ecker JR, Jones AM (2003). The β -subunit of the *Arabidopsis* G protein negatively regulates auxin-induced cell division and affects multiple developmental processes. *Plant Cell*, 15 (2): 393~409

Xia ST, Xiao LT, Bi DL, Zhu ZH (2007). *Arabidopsis* replication factor C subunit 1 plays an important role in embryogenesis. *J Plant Physiol Mol Biol*, 33 (3): 179~187

Xia ST, Zhu ZH, Hao L, Chen J-G, Xiao LT, Zhang Y, Li X (2009). Negative regulation of systemic acquired resistance by replication factor C Subunit3 in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 150 (4): 2009~2017