

超量表达细胞 D 型周期蛋白 CYCD3;1 影响拟南芥根的发育

李芳, 许颖, 张姣, 殷姗, 喻富根*

南京大学生命科学学院, 南京 210093

摘要: 用雌激素诱导表达的启动子(XVE启动子)超量表达CYCD3;1的结果表明CYCD3;1的超量表达不仅抑制拟南芥初生根的伸长,而且还抑制初生根对重力刺激的反应能力。

关键词: 拟南芥; XVE启动子; CYCD3;1; 根的发育; 向重力性反应

Overexpression of D-type Cyclin CYCD3;1 Affects Root Development in *Arabidopsis thaliana* L.

LI Fang, XU Ying, ZHANG Jiao, YIN Shan, YU Fu-Gen*

College of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210093, China

Abstract: To investigate the effect of CYCD3;1 on the development of *Arabidopsis* root, we had overexpressed CYCD3;1 under the control of the estrogen receptor-based chemical-inducible system (XVE promoter). The results demonstrate that CYCD3;1 overexpression inhibite the elongation of primary roots of *Arabidopsis* and reduce their ability responding to gravitropic stimulus.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; XVE promoter; CYCD3;1; root development; gravitropic response

植物发育是一个集细胞分裂、生长和分化为一体的过程,而细胞分裂是受细胞周期活动调控的(Inzé和Veylder 2006)。在细胞周期中,有两个关键的控制点,即G1/S期和G2/M期的转变。在拟南芥中,D型细胞周期蛋白CYCD3;1限制G1/S期的转变速度(Menges等2006)。Dewitte等(2003)用35S:CYCD3;1在拟南芥中组成型地过量表达CYCD3;1后,细胞周期的几个时期的分配即有改变,而且有丝分裂增加、细胞分化受抑制。由于35S:CYCD3;1是强组成型表达,转基因拟南芥的生长发育会受到影响,而且植株的形态结构也发生变异(Dewitte等2003)。本文采用含有XVE启动子(受雌激素诱导的化学诱导系统)的pER8质粒获得了诱导表达CYCD3;1的转基因拟南芥(王慧博等2007),用这一转基因的拟南芥定时、定量地表达CYCD3;1,研究雌激素诱导与非诱导条件下转基因和野生型拟南芥,初生根伸长生长和对重力反应的差异,以期进一步研究细胞周期活动与植物形态发生和生长发育的关系。

材料与amp;方法

野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)的生态型为Columbia型。取转化后收获的拟南芥种子,

用潮霉素抗性筛选获得转基因植株。转基因植株自交后收获种子(F₁代),每个株系所结的种子作潮霉素抗性筛选;选取有抗性与没有抗性的比例为3:1的株系所结的种子(即转基因的遗传符合孟德尔一对性状分离规律)萌发培养,分别收获每棵F₁代植株自交后所结的种子(F₂代),再分别抗性筛选每棵F₁代植株所结的种子。如F₂代不发生性状分离(即全部有抗性),则该棵F₁代植株是纯合植株,其所结种子(F₂代)为纯合体,可用于后续实验(王慧博等2007)。对纯合植株从分子水平上作PCR鉴定,鉴定引物为:5' AACCGATGATACG-GACGAAA 3'和5' TTGTATGGAGCAGCAGACGC 3'。PCR条件:94 预变性 10 min;94 变性 30 s,54 退火 90 s,72 延伸 30 s,35个循环;72 最后延伸 10 min。

配制1/2MS培养基(0.8%琼脂、1%蔗糖,pH 5.8),20 mmol·L⁻¹的雌激素(17-β-雌二醇)(Sigma公司)母液(溶于二甲基亚砷,DMSO);诱

收稿 2008-01-21 修定 2008-05-04

资助 国家自然科学基金(30270086)和南京大学大学生创新计划项目。

* 通讯作者(E-mail: fugenyu@sina.com; Tel: 025-83686755)。

导培养基加入雌激素(0.1、1、5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)、0.02% Tween20 (上海生工), 非诱导的培养基根据不同诱导浓度, 加入与诱导的培养基等量的 DMSO 和 0.02% Tween20 (Curtis 等 2005)。将经过酒精灭菌的种子点种在直径为 9 cm 培养皿中的培养基上, 每盘 30 粒种子。用保鲜膜包好培养皿后, 放入 4 °C 冷藏箱中同步化 3 d, 取出培养皿并竖直放在光照培养箱里。24 h 光照, 光照强度为 70 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 温度为(22±0.5) °C。

取生长 4 d (5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 雌激素诱导和非诱导) 的拟南芥幼苗的根, 立刻用液氮冻存。用 GTC 法 (Konomi 等 2002) 提取根中总 RNA。用 U-3000UV 分光光度计 (HITACHI 公司) 测定总 RNA 浓度。用 M-MLV Reverse Transcriptase 反转录试剂盒 (Promega 公司) 扩增 cDNA 的第一条链。反转录体系总体积为 25 μL , 其中含有 1 μg 总 RNA、0.5 μg Oligo dT 引物, 补加无菌水至 17 μL 。70 °C 预热 5 min, 立即置冰上 2 min, 再加入 1.25 μL 的 10 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP 混合物、0.75 μL Rnase 抑制剂、5 μL 的 5×M-MLV 反转录缓冲液、1 μL 的 M-MLV 反转录酶。PCR 反应条件为: 42 °C 60 min, 70 °C 15 min。4 °C 保存备用。

为检测引物 (GeneScript 公司合成) 的特异性, 先做 RT-PCR (ABI 9700 PCR 仪), 并用 ACTIN2 做内参以标准化 cDNA 的模板量。50 μL RT-PCR 反应体系中含有 1 μL cDNA 模板。反应条件为: 94 °C 预变性 3 min; 94 °C 变性 30 s, 54 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 15 s, 扩增 33 个循环。引物为 *CYCD3;1*-F: 5' TCCTCAACAAATGCCACCG 3', *CYCD3;1*-R: 5' GAAAGAGGGTCAAAGGGA 3'; *ACTIN2*-F: 5' TTGACTACGAGCAGGAGATGG 3', *ACTIN2*-R: 5' ACAAACGAGGGCTGGAACAAG 3'。PCR 产物经凝胶电泳后回收测序 (GeneScript 公司)。

测定 *CYCD3;1* 表达量的实时 PCR (Real-time PCR) 用 SYBR® Green Realtime PCR Master Mix 试剂盒 (TOYOBO, www.bio-toyobo.cn), 采用 ABI PRISM 7700 体系渗入法。反应体系为 20 μL , 其中含有 0.5 μL cDNA 模板、0.4 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 引物、10 μL Master Mix, 在每轮实时 PCR 中都用 *ACTIN2* 做内参以标准化 cDNA 的模板量。反应条件为: 95 °C 预变性 60 s; 95 °C 变性 15 s, 54 °C 退

火 15 s, 72 °C 延伸和数据收集 45 s, 扩增 40 个循环。实验重复 9 次 (3 次生物学重复, 即提 3 次总 RNA; 3 次技术重复, 即每个 cDNA 模板做 3 次实时 PCR)。CYCD3;1 相对表达量按公式: $\Delta C_T = C_T (CYCD3;1) - C_T (ACTIN2)$ 计算, 表达量 = $100 \times 2^{-\Delta C_T}$, 实验数据为 9 次重复实验的平均值 (Portereiko 等 2006)。

分析初生根长度和向重力性反应时, 取生长在培养基中的第 4、6 天的拟南芥幼苗拍照, 用 AutoCAD 软件计算其初生根根长。每个实验重复 3 次, 每次 30 粒种子, 培养皿竖直放在光照培养箱中, 光照强度为 70 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 光照 48 h 后, 培养皿旋转 90 度放置 2.5 h 后, 用 70% 酒精固定幼苗, 于体视显微镜下拍照, 用 AutoCAD 软件测量根长和根弯曲的角度。实验重复 3 次, 每次 30 粒种子。在诱导与非诱导条件下, 转基因株系与野生型 (WT) 拟南芥的初生根根长和向重力性弯曲角度的差异显著性, 用成组 *t* 检验。数据 = 平均值 ± 标准偏差。

实验结果

1 转基因株系 AtD3;1-3 的筛选和鉴定

从表 1 可以看出, F_1 代植株有抗性与无抗性的比值为 3:1, 说明 T-DNA 插在一条染色体上, 抗性植株自交后的 F_2 代全部有抗性, 说明两条同源染色体上都有 T-DNA 插入, 转基因株系 AtD3;1-3 为纯合的植株。

表 1 潮霉素抗性培养基上转基因株系 AtD3;1-3 的筛选
Table 1 Screening of the transgenic plant AtD3;1-3 grown in hygromycin media

植株	长真叶的植株数 / 个	未长真叶的植株数 / 个
F_1 代	106	36
F_2 代	137	0

从图 1 可以看出, 用所设计的 PCR 鉴定引物, 转基因株系 AtD3;1-3 能扩增出目的条带 (约 2200 bp), 表明经过潮霉素筛选出的株系 AtD3;1-3 为阳性。

2 雌激素诱导后转基因植株 AtD3;1-3 根中 *CYCD3;1* 的过量表达

浓度为 5 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的雌激素对启动子的诱导效

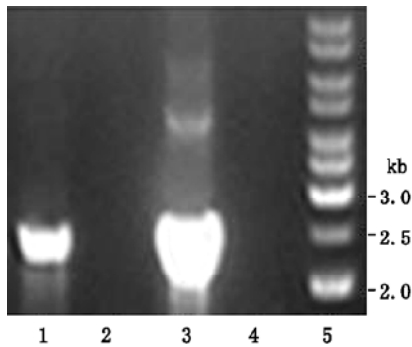


图1 转基因株系 AtD3;1-3 的 PCR 检测
Fig.1 Identification of PCR product
of transgenic plant AtD3;1-3

1 : AtD3;1-3 ; 2 : 野生型(WT) ; 3 : pERD3;1 质粒(王慧博等 2007) (阳性对照) ; 4 : 空白对照 ; 5 : DNA 分子量标准。

果可以达到饱和(Zuo 等 2000)。从图 2 可以看出, RT-PCR 扩增的条带大小正确, *CYCD3;1* 为 134 bp, *ACTIN2* 为 138 bp, 无杂带。切胶回收片段, 测序, 发现引物的特异性很好, 扩增出的产物为目的基因 *CYCD3;1* 和 *ACTIN2* 的片段。内参 *ACTIN2* 在转基因和野生型拟南芥中表达量几乎一致。

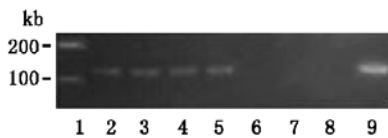


图2 转基因株系 AtD3;1-3 和野生型拟南芥中表达的 *CYCD3;1* RT-PCR 扩增
Fig.2 RT-PCR amplification of *CYCD3;1* expression in wildtype and AtD3;1-3 *Arabidopsis*

1 : DNA 分子量标准。2~5 : *ACTIN2* 的 PCR 产物, 其中 2 为非诱导的 WT ; 3 为诱导的 WT ; 4 为非诱导的 AtD3;1-3 ; 5 为诱导的 AtD3;1-3。6~9 : *CYCD3;1* 的 PCR 产物, 其中 6 为非诱导的 WT ; 7 : 为诱导的 WT ; 8 为非诱导的 AtD3;1-3 ; 9 为诱导的 AtD3;1-3。

根据公式 $CYCD3;1$ 的相对表达量 = $100 \times 2^{-\Delta C_T}$, 计算的转基因 AtD3;1-3 和野生型拟南芥中 *CYCD3;1* 相对表达量的结果是, 非诱导的 WT : $\Delta C_T = 2.58 \pm 0.04$; 诱导的 WT : $\Delta C_T = 1.85 \pm 0.03$; 非诱导的 AtD3;1-3 : $\Delta C_T = 0.49 \pm 0.05$; 诱导的 AtD3;1-3 : $\Delta C_T = -3.99 \pm 0.08$ 。从图 3 可以看出, 与非诱导的转基因株系 AtD3;1-3 相比, $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 雌激素诱导的 AtD3;1-3 中 *CYCD3;1* 表达量大大增加, 几乎提高了 25 倍。诱导与非诱导的野生型拟南芥中

CYCD3;1 表达量都极低且无明显变化。说明 XVE 系统是一高效可靠的诱导表达体系, 转基因株系 AtD3;1-3 的根能受雌激素诱导过量表达 *CYCD3;1*。

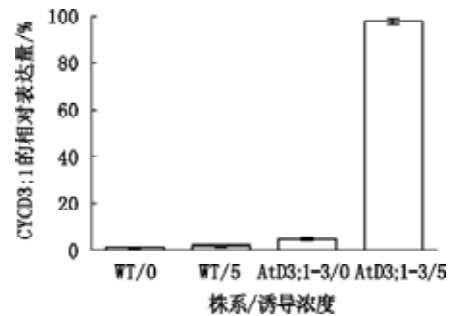


图3 转基因植株 AtD3;1-3 和野生型拟南芥中 *CYCD3;1* 相对表达量的 Real-time PCR 分析

Fig.3 Real-time RT-PCR analysis of *CYCD3;1* expression in wildtype and AtD3;1-3 *Arabidopsis* 诱导浓度单位为 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。下图同此。

3 *CYCD3;1* 的过量表达对转基因植株 AtD3;1-3 的初生根的伸长的影响

从图 4 和图 5 可以看出, 在不同浓度 (0.1 、 1 、 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$) 雌激素的诱导作用下, 生长 4 d 和 6 d 的拟南芥转基因株系 AtD3;1-3 比同样条件下非诱导的 AtD3;1-3 的初生根伸长明显变慢, 抑制伸长的程度随着雌激素浓度的增加而增加。很多文献中已报道 XVE 启动子诱导基因表达的效果是随着雌激素浓度增加而增加的 (Zuo 等 2000; Curtis 等 2005), 因此雌激素浓度越高 [雌激素浓度为 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 时它对启动子的诱导效果就会达到饱和 (Zuo 等 2000)], *CYCD3;1* 的表达越高, 初生根伸长越受抑制。需要说明的是: WT/0 和 WT/0.1、WT/0 和 WT/1、WT/0 和 WT/5 组合中 WT/0 根长的差异是由 DMSO (表面活性剂, 破坏细胞膜) 浓度的不同造成的, 高浓度的 DMSO 对野生型拟南芥初生根的伸长有不利影响。

4 *CYCD3;1* 的过量表达影响转基因植株的根向重力性反应

从表 2 和图 6 可以看出, 在重力作用下, 经过 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 雌激素诱导, 转基因株系 AtD3;1-3 对重力刺激的反应丧失, 不再向地弯曲, 而非诱导的转基因株系 AtD3;1-3 则正常弯曲, 向重力的反应正常。诱导的转基因株系 AtD3;1-3 比非诱导的

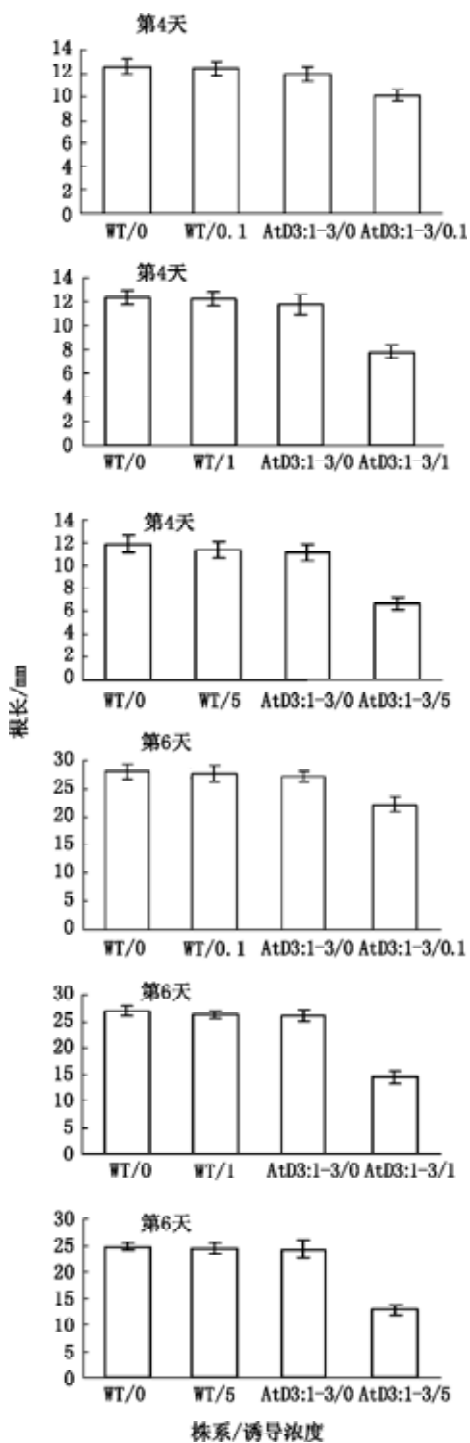


图4 *CYCD3;1* 的过量表达对转基因株系 AtD3;1-3 的初生根伸长的影响

Fig.4 Effects of *CYCD3;1* overexpression on primary roots elongation of transgenic plant AtD3;1-3

AtD3;1-3的根伸长慢,而诱导与非诱导的野生型拟南芥之间的向重力反应与根伸长无明显差异。

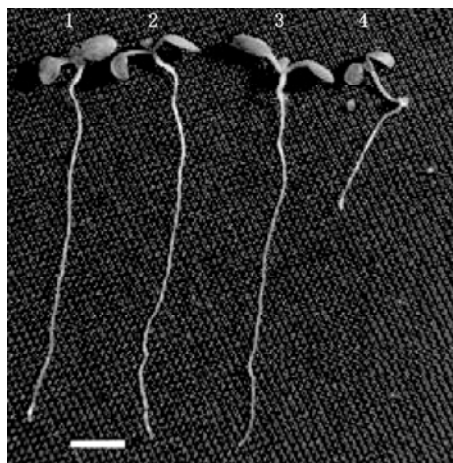


图5 生长6 d的转基因植株 AtD3;1-3 和野生型拟南芥根的生长

Fig.5 Growth of roots of the 6-d-old wildtype and AtD3;1-3 *Arabidopsis*

1 : 非诱导的 WT ; 2 : 诱导的 WT ; 3 : 非诱导的 AtD3;1-3 ; 4 : 诱导的 AtD3;1-3。标尺 : 3 mm。雌激素诱导浓度为 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

表2 *CYCD3;1* 的过量表达对转基因株系 AtD3;1-3 的初生根向重力性弯曲的影响

Table 2 Effects of the *CYCD3;1* overexpression on primary root gravitropic curvature of transgenic plant AtD3;1-3

植株	弯曲角度/度	根长/mm
非诱导的 WT	34.0 ± 12.0	3.87 ± 0.66
诱导的 WT	32.9 ± 10.5	3.41 ± 0.57
非诱导的 AtD3;1-3	36.2 ± 12.1	3.21 ± 0.65
诱导的 AtD3;1-3	0	2.37 ± 0.46^a

a 表示差异极显著, 显著水平为 0.01。

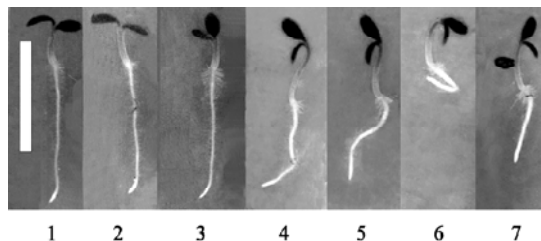


图6 转基因株系 AtD3;1-3 与野生型拟南芥的向地反应

Fig.6 Root gravitropic responses of wildtype and AtD3;1-3 *Arabidopsis*

1 : 非诱导的 WT ; 2 : 诱导的 WT ; 3 : 非诱导的 AtD3;1-3 ; 4~7 : 诱导的 AtD3;1-3。标尺 : 3 mm。雌激素诱导浓度为 $5 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 。

讨 论

已有的研究表明, CYCD3;1 促进细胞周期中的植物细胞从 G1 期进入 S 期(Menges 等 2006; Dewitte 等 2007)。组成型超量表达 CYCD3;1 的拟南芥, 生长迟缓, 大量的细胞不能及时退出细胞周期而分化成熟(Dewitte 等 2003)。与 Dewitte 等 (2003) 用 35S 组成型启动子相比, 本文所用的雌激素诱导的启动子能定时定量、严谨高效地表达 CYCD3;1, 同时通过诱导与非诱导的转基因植株的比较, 排除了转基因操作本身对植株的影响, 能更加清晰准确地研究 CYCD3;1 的表达对根发育的影响。本文结果表明, 诱导后超量表达 CYCD3;1 的转基因拟南芥, 其初生根伸长生长比野生型明显的慢。由于根的伸长主要靠成熟区的细胞增大而变长的(Furutani 等 2000), 所以可以推测超量表达 CYCD3;1 对转基因拟南芥初生根伸长生长之所以抑制, 可能是其从分生区退出细胞周期进入伸长区的细胞减少所致。

初生根生长发育的一个特点是其能感受重力方向的变化, 并调整自身的生长模式, 因而根尖端保持与重力方向一致(Beemster 等 2003; Ishikawa 和 Evans 1995)。多数研究认为, 根感受重力的部位是根冠, 而发生向重力弯曲生长的部位在根的伸长区(Palme 等 2006)。本文结果表明, 超量表达 CYCD3;1 的转基因拟南芥, 其初生根的向重力反应能力丧失。由于超量表达 CYCD3;1 会破坏细胞周期活动方式和抑制细胞分化, 因此我们认为, 本文中植物根的向地性反应能力的保持, 必须有协调的分生区细胞周期活动以及正确的伸长区细胞分化。这从另一个侧面为研究植物细胞周期和细胞分裂以及分化之间的复杂关系提供了一条新的思考途径。

参考文献

王慧博, 赵剑春, 黄守程, 李芳, 喻富根(2007). 拟南芥 *CYCD3;1*

- 基因的克隆及功能研究. 西北植物学报, 27 (11): 2153~2157
- Beemster GTS, Fiorani F, Inzé D (2003). Cell cycle: the key to plant growth control? Trends Plant Sci, 8: 154~158
- Curtis IS, Hanada A, Yamaguchi S, Kamiya Y (2005). Modification of plant architecture through the expression of GA 2-oxidase under the control of an estrogen inducible promoter in *Arabidopsis thaliana* L.. Planta, 222 (6): 957~967
- Dewitte W, Riou-Khamlichi C, Scofield S, Healy JMS, Jacquard A, Kilby NJ, Murray JAH (2003). Altered cell cycle distribution, hyperplasia, and inhibited differentiation in *Arabidopsis* caused by the D-Type cyclin CYCD3. Plant Cell, 15 (1): 79~92
- Dewitte W, Scofield S, Alcasabas AA, Maughan SC, Menges M, Braun N, Collins C, Nieuwland J, Prinsen E, Sundaresan V et al (2007). *Arabidopsis* CYCD3 D-type cyclins link cell proliferation and endocycles and are rate-limiting for cytokinin responses. Proc Natl Acad Sci USA, 104 (36): 14537~14542
- Furutani I, Watanabe Y, Prieto R, Masukawa M, Suzuki K, Naoi K, Thitamadee S, Shikanai T, Hashimoto T (2000). The SPIRAL genes are required for directional control of cell elongation in *Arabidopsis thaliana*. Development, 127: 4443~4453
- Inzé D, De Veylder L (2006). Cell cycle regulation in plant development. Annu Rev Genet, 40: 77~105
- Ishikawa H, Evans ML (1995). Specialized zones of development in roots. Plant Physiol, 109: 725~727
- Konomi N, Lebowitz E, Zhang D (2002). Comparison of DNA and RNA extraction methods for mummified tissues. Mol Cell Prob, 16: 445~451
- Menges M, Samland AK, Planchais S, Murray JAH (2006). The D-type cyclin CYCD3;1 is limiting for the G1-to-S-phase transition in *Arabidopsis*. Plant Cell, 18 (4): 893~906
- Palme K, Dovzhenko A, Ditengou FA (2006). Auxin transport and gravitational research: perspectives. Protoplasma, 229: 175~181
- Portereiko MF, Lloyd A, Steffen JG, Punwani JA, Otsuga D, Drews GN (2006). *AGL80* is required for central cell and endosperm development in *Arabidopsis*. Plant Cell, 18: 1862~1872
- Zuo JR, Niu QW, Chua NH (2000). An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. Plant J, 24 (2): 265~273