

小金海棠中三价铁螯合物还原酶基因的表达分析

张芸*, 王忆*, 许雪峰, 李天忠, 孔瑾, 韩振海**

中国农业大学农学与生物技术学院, 北京市果树逆境生理与分子生物学实验室, 北京 100094

摘要: 以从铁高效基因型小金海棠中克隆得到的三价铁螯合物还原酶基因片段为探针, 对小金海棠进行 Southern 杂交。结果显示, 三价铁螯合物还原酶基因在小金海棠基因组中为单拷贝。Northern 杂交结果表明: 在根中, 三价铁螯合物还原酶基因的转录受缺铁胁迫诱导, 并随缺铁胁迫时间的延长而增强; 在叶中, 此种基因的转录水平很高, 但不受低铁胁迫诱导。根中的三价铁螯合物还原酶活性随缺铁胁迫的时间进程而不断增强, 动态变化与其转录水平的变化趋势一致。

关键词: 三价铁螯合物还原酶; 基因表达; 小金海棠

Expression Analysis of Ferric-Chelate Reductase Gene of *Malus xiaojinensis* Cheng et Jiang

ZHANG Yun*, WANG Yi*, XU Xue-Feng, LI Tian-Zhong, KONG Jin, HAN Zhen-Hai**

Stress Physiology and Molecular Biology Laboratory of Fruit Tree, College of Agriculture and Biotechnology, China Agricultural University, Beijing 100094, China

Abstract: Ferric-chelate reductase gene in *Malus xiaojinensis* was investigated by blotting hybridization technique. Southern blot suggested that the genome of *M. xiaojinensis* had one copy. The transcription of ferric-chelate reductase gene was induced and strengthened by iron stress in roots, whereas it was no significant difference by iron stress in leaves. Ferric-chelate reductase activity was similar to its transcription change.

Key words: ferric-chelate reductase; gene expression; *Malus xiaojinensis*

铁是植物生长发育中必需的营养元素之一。但由于受土壤 pH 值的影响, 铁在土壤中经常是以比较稳定的氧化物形态 Fe(III) 存在, 其在水中的溶解度非常低, 因此能为植物吸收利用的铁只占很小的比例。一般来说, 植物生长所需要的最适铁浓度为 $10^{-9} \sim 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$, 但在碱性土壤 (pH 7.4~8.5) 中, 可溶性铁的浓度只有 $10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ (Guerinot 和 Yi 1994), 因而植物表现出缺铁失绿症, 给农业生产造成极大的损失。为了应对缺铁胁迫对植物自身生长的影响, 高等植物在长期进化过程中逐渐形成了不同的适应性机制 (Staiger 2002)。Romheld 和 Marschner (1986) 在总结前人研究工作以及对 120 种来源不同植物缺铁反应机制的研究基础上, 提出高等植物适应缺铁胁迫的铁素吸收机制 I 和机制 II 系统。最近的研究表明, 2 种机制系统植物并没有严格的界限, Bughio 等 (2002) 从禾本科植物水稻中克隆出 Fe(II) 载体蛋白相关基因 *IsIRT1*, 证明水稻中存在机制 I 系统; Curie 等 (2001) 也从拟南芥中发现了与玉米 Fe(III) 载体 YS1 同族的相关基因。随着研究的深入, 后来又发现

可能还存在机制 III 系统 (Mori 1999)。虽然植物各自有一套吸收铁的机制, 但根据植物类型的不同, 它们之间对缺铁的耐受力也有很大差异。有研究表明, 苹果砧木小金海棠是铁高效基因型苹果种, 深入探索其高效抗缺铁机制对解决生产中的缺铁黄叶病很重要 (韩振海和许雪峰 1995)。许多研究中均发现植物根部存在一种特异的三价铁螯合物还原酶, 能将土壤中的三价铁还原为二价铁 (Bienfait 1985; Guerinot 和 Yi 1994), 因而植物吸收利用铁的效率得以增加。通过对小金海棠三价铁螯合物还原酶基因的转录表达情况研究, 探索分析其受缺铁诱导的时空表达特异性, 以及今后与其他不耐缺铁胁迫苹果砧木基因表达情况相比较, 对深入研究小金海棠高效抗缺铁胁迫的分子机制来说是重要的。

收稿 2006-09-29 修订 2007-01-15

资助 国家转基因植物专项 (JY04-B-02)。

*共同第一作者。

** 通讯作者 (E-mail: rschan@cau.edu.cn; Tel: 010-62736880)。

材料与amp;方法

将小金海棠 (*Malus xiaojinensis* Cheng et Jiang) 生根组培苗转移到营养液中进行培养, 长到5~6片真叶时进行缺铁胁迫 ($4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA- Fe^{2+}) 和正常供铁 ($40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ EDTA- Fe^{2+}) 处理, 其他元素与完全营养液相同 (Hoagland 营养液, 初始 pH 值用 $1.0 \text{ mol}\cdot\text{L}^{-1}$ KOH 调至 6.0)。

提取小金海棠根系总 RNA (刘彦华 1999), 用 RQ1 RNase Free DNase 除去混合在 RNA 中的 DNA, 以电泳及紫外分光光度计检测其完整性和纯度。根据 GenBank 中三价铁螯合物还原酶基因氨基酸保守序列设计简并引物, 以总 RNA 的反转录产物为模板进行 RT-PCR 扩增。

提取叶中 DNA 分别进行 *EcoRI* 和 *HindIII* (上海生工有限公司) 单酶切后电泳转膜。处理后不同天数 (1、3、5、7 d) 分别提取叶片和根系的总 RNA 进行等量甲醛变性胶电泳和转膜, 具体步骤参考分子克隆实验指南 (Sambrook 等 1989)。

提取含有小金海棠三价铁螯合物还原酶基因片段菌株的质粒, 以 *EcoRI* 和 *PstI* 进行双酶切并回收, 参照随机引物标记试剂盒 (博大泰克公司) 说明书制备 [α - ^{32}P]dCTP (亚辉生物公司) 标记的探针, 进行 Southern 和 Northern 杂交。

定量和定性测定三价铁螯合物还原酶活性时, 将待测植株的根系放入饱和 CaSO_4 溶液中浸泡 5 min, 以去离子水冲洗干净后, 将每一处理的 3 株植株根系置于 60 mL $0.1 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Fe(III)-EDTA 和 $0.4 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ 2,2-联吡啶、不含 Fe(II) 的营养液中。光照下连续通气, 反应 2 h。结束后, 取反应液于波长 520 nm 处比色 (宋亚娜等 1999)。

将含有 0.25 g 琼脂、50 mL 正常浓度的缺铁营养液和 39 mL 去离子水的混合液加热煮沸, 并充分搅拌混匀后, 冷却到 $50 \text{ }^\circ\text{C}$ 左右, 加入 1 mL $10 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Fe-EDTA、10 mL $5 \text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ Ferrozine, 调节 pH 至 6.0。将活体根系在饱和硫酸钙溶液中浸洗 3~5 min, 再用去离子水洗 3~4 次, 然后将根系平铺在平皿内, 倒入琼脂-指示剂, 黑暗中显色 30~90 min 后观察根系周围的颜色变化。

实验结果

1 小金海棠三价铁螯合物还原酶基因片段的获得

如图 1 所示, 小金海棠总 RNA 中 18 S 和 28

S 泳带清晰, 并未出现降解, 检测后证明其符合作为反转录模板的要求。设计引物 P1: GATC-GGTACCTTCGGTTTCTTCAT, P2: TGGGCC-TTAAGGACCTTCCACTGA, 以总 RNA 反转录产物为模板进行 PCR 扩增, 得到 300 bp 的单一特异性条带 (图 2)。将 PCR 产物纯化回收后与 pMD18-T 载体连接, 转化大肠杆菌 (*Escherichia coli*), 挑选阳性克隆进行测序。测序结果在 GenBank 中进行 Blast 分析, 发现该片段与豌豆、苜蓿和番茄中已知的三价铁螯合物还原酶基因同源性达到 80% 以上, 结果显示扩增出的 cDNA 片段为小金海棠三价铁螯合物还原酶家族的基因片段。

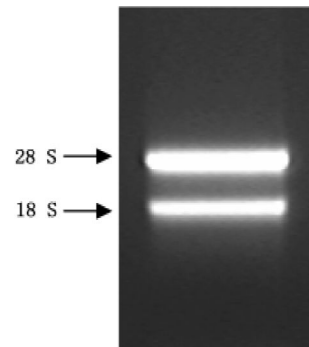


图 1 小金海棠总 RNA

Fig. 1 The total RNA of *M. xiaojinensis*

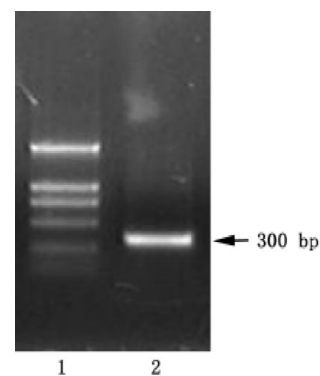


图 2 小金海棠三价铁螯合物还原酶基因片段 RT-PCR
Fig. 2 RT-PCR for ferric-chelate reductase gene of *M. xiaojinensis*

1: DNA marker (DL2000); 2: RT-PCR 产物。

2 小金海棠三价铁螯合物还原酶基因的 Southern 杂交

基因组 DNA 进行充分酶切后电泳产生均匀的

弥散条带, 转膜进行 Southern 杂交。由图 3 可以看出, 2 种单酶切均明显有唯一的杂交信号, 由此推测三价铁螯合物还原酶在小金海棠基因组中是以单拷贝存在的。

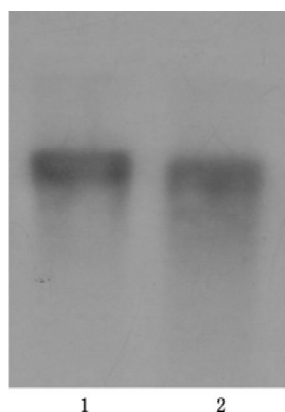


图3 小金海棠三价铁螯合物还原酶基因的Southern杂交

Fig. 3 Southern blot of ferric-chelate reductase gene

in *M. xiaojinensis*

1: 基因组 DNA 的 *EcoRI* 酶切; 2: 基因组 DNA 的 *HindIII* 酶切。

3 小金海棠三价铁螯合物还原酶基因的Northern杂交

分别提取正常供铁和缺铁生长 1、3、5 和 7 d 的小金海棠根系和叶片中总 RNA (图 4-c), 等量甲醛变性胶电泳后转膜后进行 Northern 杂交的结果表明: 无论是在正常供铁还是在缺铁条件下, 此种基因在小金海棠根系和叶片中均得以转录; 与正常供铁处理相比, 此种基因在根中缺铁第 3 天表达开始加强, 随着处理时间的增加而不断加

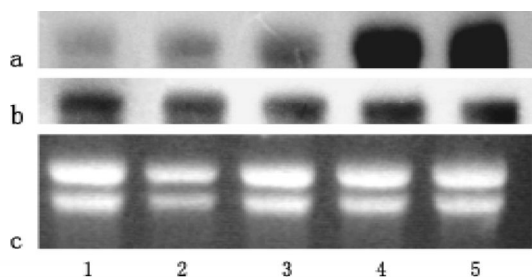


图4 小金海棠三价铁螯合物还原酶基因的Northern杂交

Fig. 4 Northern blot of ferric-chelate reductase gene

in *M. xiaojinensis*

a: 根系 Northern 杂交; b: 叶片 Northern 杂交; c: 总 RNA。1: 缺铁 0 d; 2: 缺铁 1 d; 3: 缺铁 3 d; 4: 缺铁 5 d; 5: 缺铁 7 d。

强(图 4-a), 而在叶片中表达无显著增加(图 4-b)。这说明在小金海棠中, 此种基因在根中的转录受缺铁胁迫诱导, 并随着缺铁胁迫处理天数的增加而加强, 但 7 d 以内在植株叶中的转录基本上不受缺铁胁迫的诱导。

4 小金海棠三价铁螯合物还原酶的活性变化

小金海棠根系三价铁螯合物还原酶活性的定性试验结果表明, 正常供铁小金海棠根系出现非常微弱的浅红色, 而在缺铁 1 周时根系却出现了紫红色, 其范围和颜色明显强于正常供铁小金海棠, 结果显示缺铁胁迫可增强小金海棠根部三价铁螯合物还原酶的活性(图未示)。

从图 5 中可以看出, 缺铁 ($4 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{Fe}^{2+}$) 与正常供铁 ($40 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1} \text{Fe}^{2+}$) 的小金海棠根中三价铁螯合物还原酶活性变化之间有明显差异。在正常供铁条件下, 小金海棠根中三价铁螯合物还原酶活性始终保持在较低水平上 [约 $75.84 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1} (\text{FW})\cdot\text{h}^{-1}$]。而在缺铁时, 从处理的第 3 天起根中三价铁螯合物还原酶活性不断增强, 在处理第 7 天达到 $364.69 \text{ nmol}\cdot\text{g}^{-1} (\text{FW})\cdot\text{h}^{-1}$, 为正常供铁的 5.1 倍。根中三价铁螯合物还原酶活性变化动态和此种基因的转录有相同的变化趋势(图 4-a、图 5)。

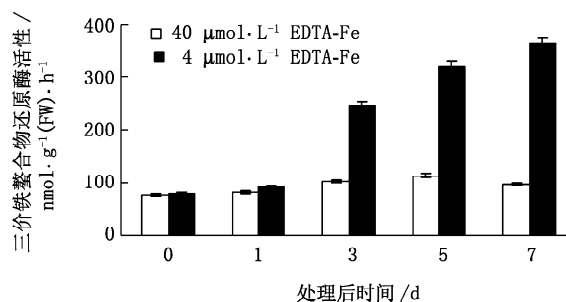


图5 不同供铁水平下根系三价铁螯合物还原酶的活性变化

Fig. 5 The changes of ferric-chelate reductase activity in roots with different Fe supply

讨 论

作为一种膜蛋白的三价铁螯合物还原酶, 在双子叶和非禾本科单子叶植物吸收铁的过程中起关键作用。此种基因最早是在酵母中发现的 (Dancis 等 1990), 近些年在植物中也有发现, 并通过功能互补方法验证了其功能 (Eide 等 2002; Li 等 2002)。但在不同植物的不同组织中其表达情况有

所不同。如在拟南芥、蚕豆和番茄的根中三价铁螯合物还原酶基因的转录受缺铁胁迫诱导而加强表达,但在叶片中三价铁螯合物还原酶的表达情况差异则很大,在拟南芥叶中表达量非常低(Robinson等1999),在蚕豆叶片中可受缺铁胁迫而诱导表达(Eide等2002),在番茄叶片中基因表达不受缺铁胁迫的诱导而表现为高转录水平的组成型表达(Li等2004)。本文结果表明:小金海棠三价铁螯合物还原酶基因在根中受缺铁胁迫的诱导加强表达,但在叶中的转录则几乎不受缺铁胁迫的诱导,与番茄中该基因家族基因表达情况相类似。且随着缺铁处理时间的增加,根中三价铁螯合物还原酶的活性不断增强,这一变化趋势与此种基因在转录水平上的变化趋势相吻合。据此我们认为,在缺铁胁迫下,小金海棠的根是通过提高三价铁螯合物还原酶的转录水平,翻译出更多的三价铁螯合物还原酶蛋白,即是通过转录水平的调控来应对缺铁胁迫的。这些结果支持了Robinson等(1999)的结论:三价铁螯合物还原酶活性的调控发生在转录水平上。三价铁螯合物还原酶将根际中的三价铁还原为二价铁,并转运到植物内部以满足生长需要。铁在植物体中通常是以三价铁的形式运输到达地上部后,又通过三价铁进一步还原为二价铁以供植物生长需要。但是在叶中三价铁螯合物还原酶的表达未见到明显受缺铁胁迫诱导,我们推测其原因可能有3个:(1)叶中有足够的还原能力将经过长距离运输到达叶片的三价铁还原为二价铁以供叶肉细胞生理生化反应所需;(2)叶中此种基因的调控不仅限于转录水平,可能还存在着转录后水平的调节;(3)根部缺铁直接导致根部基因表达量上升,但植株体内贮藏铁的二次利用在初期导致叶片受缺铁胁迫可能并不明显。因此,进一步研究缺铁胁迫下三价铁螯合物还原酶基因和其他与缺铁相关基因的调控方式,对于小金海棠高效抗缺铁机制来说是值得考虑的。

参考文献

- 韩振海, 许雪峰(1995). 不同铁效率果树基因型研究的现状和前景. 园艺学年评, 1: 1~16
- 刘彦华(1999). 苹果铁高效基因型生物技术研究——根总RNA提取方法的比较及mRNA的纯化[硕士学位论文]. 北京: 中国农业大学
- 宋亚娜, 王贺, 李春俭, 张福锁(1999). 大豆根系体外铁库的积累及其在缺铁时被利用的规律. 植物学报, 41 (12): 1299~1302
- Bienfait HF (1985). Regulated redox processes at the plasmalemma of plant root cells and their function in iron uptake. J Bioenerg Biomembr, 17: 73~83
- Bughio N, Yamaguchi H, Nishizawa NK, Nakanishi H, Mori S (2002). Cloning an iron-regulated metal transporter from rice. J Exp Bot, 53 (374): 1677~1682
- Curie C, Panaviene Z, Loulergue C, Dellaporta SL, Briat JF, Walker EL (2001). Maize yellow stripel encodes a membrane protein directly involved in Fe(III) uptake. Nature, 409 (6818): 346~349
- Dancis A, Klausner RD, Hinnebusch A, Barriochanal JG (1990). Genetic evidence that ferric reductase is required for iron uptake in *Saccharomyces cerevisiae*. Mol Cell Biol, 10: 2294~2301
- Eide DJ, Blevins DG, Waters BM (2002). Characterization of FRO1, a pea ferric-chelate reductase involved in root iron acquisition. Plant Physiol, 129: 85~94
- Guerinot ML, Yi Y (1994). Iron: nutritious, noxious, and not readily available. Plant Physiol, 104: 815~820
- Li LH, Cheng XD, Ling HQ (2004). Isolation and characterization of Fe(III)-chelate reductase gene *LeFRO1* in tomato. Plant Mol Biol, 54: 125~136
- Li L, Luo XY, Zhou ZY, Pei Y (2002). Expression of ferric-chelate reductase gene under iron deficiency in fruit rootstocks of four species. J Plant Physiol Mol Biol, 28 (4): 299~304
- Mori S (1999). Iron acquisition by plants. Curr Opin Plant Biol, 2 (3): 250~253
- Robinson NJ, Procter CMP, Connolly EL, Guerinot ML (1999). A ferric-chelate reductase for iron uptake from soils. Nature, 397: 694~697
- Romheld V, Marschner H (1986). Genotypical differences among graminaceous species in release of phytosiderophores and uptake of iron-phytosiderophores. Plant Soil, 123: 147~153
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press
- Staiger D (2002). Chemical strategies for iron acquisition in plants. Angew Chem Int Ed, 41: 2259~2264