

拟南芥 γ -生育酚甲基转移酶(γ -TMT)启动子的分离及表达特性分析 Isolation and Characterization of γ -TMT Gene Promoter from *Arabidopsis thaliana*

周 建^{1,2,3}, 王 磊^{1,2*}, 杜进民³, 范云六^{1,2}

ZHOU Jian^{1,2,3}, WANG Lei^{1,2*}, DU Jin-Min³ and FAN Yun-Liu^{1,2}

1 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081

2 国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程, 北京 100081

3 河北科技大学生物科学与工程学院, 石家庄 050018

1 Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China

2 National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement, NFCRI, Beijing 10008, China

3 College of Bioscience & Bioengineering, Hebei University of Science and Technology, Shijiazhuang 050018, China

摘 要 维生素 E 是一类人体所必需的脂溶性的维生素, 具有重要的生理功能。 γ -生育酚甲基转移酶(γ -TMT)是维生素 E 生物合成途径中的关键酶之一, 催化 γ 、 δ -生育酚甲基化, 生成 α 、 β -生育酚。从拟南芥中分离了 γ -生育酚甲基转移酶基因 1552bp 的启动子序列, 构建了含有该启动子和 *GUS* 报告基因的植物表达载体, 通过农杆菌介导转化拟南芥, 获得了转基因植株。*GUS* 组织化学染色结果表明, 在 γ -TMT 启动子的驱动下, 报告基因 *GUS* 在拟南芥的叶、茎以及花均有表达, 且在茎尖、雄蕊和幼叶中表达最强, 而在根、种子和种荚中则没有检测到 *GUS* 基因的表达, 表明 γ -TMT 基因可能仅在拟南芥某些组织中特异性高表达。

关键词 拟南芥, 维生素 E, 生育酚, γ -生育酚甲基转移酶(γ -TMT), 启动子

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2006)05-0835-05

Abstract Vitamin E (Tocopherols) is lipid-soluble antioxidants and essential for human health. Gamma-tocopherol methyltransferase (γ -TMT), one of the key enzymes in tocopherol biosynthetic pathway in plants, converts γ , δ -tocopherols into α , β -tocopherols. In this study, we isolated the 1552 bp promoter of *Arabidopsis TMT* gene. The promoter was fused with *GUS* reporter gene and this expression cassette was introduced into wild *Arabidopsis thaliana* by *Agrobacterium*-mediated transformation. *GUS* staining shows that *GUS* gene is expressed in leaves, stems and flowers, with the highest expression in young leaves, stamens and stem apices, while not observable in roots, seeds and siliques. The data indicate that γ -TMT gene promoter is likely to be expressed preferentially in some of the tissues of *Arabidopsis*.

Key words *Arabidopsis thaliana*, Vitamin E, tocopherols, gamma-tocopherol methyltransferase (γ -TMT), promoter

维生素 E (又称生育酚) 作为一种有效的抗氧化剂, 广泛地应用在医药、食品和饲料等行业中。它是一种人体必需的脂溶性维生素, 具有重要的生理功

能。人体每天吸收 7 ~ 9mg 的 α -生育酚才能维持肌肉、中枢神经系统和血管系统的正常生理功能 (FAO/WHO 推荐每天摄入量最低为 10mg α -生育

Received: April 28, 2006; Accepted: June 8, 2006.

This work supported by the grant from the National Key Basic Research Program (No. 2004CB7200).

国家重点基础研究发展规划 973 项目 资助项目 (批准号: 2004CB7200)

* Corresponding author. Tel: 86-10-62133870; Fax: 86-10-62133870; E-mail: wanglei70@cau.ac.cn 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

酚),每天吸收 100~1000mg 的 α -生育酚可以提高机体免疫力,具有抗衰老、防癌、防紫外线及润肤美容的作用^[1,2]。

天然维生素 E 有 8 种同系物: α 、 β 、 γ 、 δ -生育酚和 α 、 β 、 γ 、 δ -三烯生育酚,这 8 种天然同分异构体的生物活性因苯环上的甲基数目、位置的不同以及侧链内的不对称碳原子的构型变化而不同^[3,4]。在动物体内,生育酚活性最高的是完全被甲基化了的 RRR- α -生育酚形式,而 β -、 γ -和 δ -生育酚的活性分别是 α -生育酚活性的 40%、10% 和 1%。在体外的抗氧化研究表明 50 μ mol 的 α -生育酚的抗氧化活性相当于 1000 μ mol 的 γ -生育酚,二者相差 20 倍^[5]。与 α -生育酚相比, γ -生育酚抗氧化能力比较低,但据研究表明 γ -生育酚与活性氮(类似活性氧)的清除有关^[6]。

α -生育酚大多存在于植物绿色组织中,而 γ -生育酚大多在种子中发现。不同植物组织中生育酚的总量和成分差异很大。在绿色叶片组织中,含量最为丰富的生育酚形式是 α -生育酚,但这些组织的总生育酚水平却非常低(10~50 μ g·g⁻¹鲜重)。与光合组织不同,植物的非绿色组织(如大多数油料作物的种子)中总生育酚含量常常比较高(500~2000 μ g·g⁻¹鲜重),而其中 α -生育酚的含量却比较低(84~200 μ g·g⁻¹鲜重),绝大多数为它的生物合成前体- γ -生育酚^[7,8]。 γ -TMT 基因是植物维生素 E 合成中的关键酶基因之一,处于天然维生素 E 合成途径中的最后一个环节,催化 δ 、 γ -生育酚甲基化,生成活性较高的 β 、 α -生育酚^[9,10]。通过基因组学的方法从两种已经完成全序列测定的模式生物——聚球藻 *Synechocystis* PCC6803 (GenBank: D64004; AB001339)^[11],和拟南芥中克隆了 γ -TMT 基因(GenBank: AF104220)^[9],二者的氨基酸序列表现出 66% 的相似性。

随着维生素 E 代谢途径的阐明以及相关基因的克隆,人们开始通过转基因技术研究如何提高植物中 α -生育酚的含量。如利用 ZFP-TFs 锌指蛋白调控拟南芥内源 γ -TMT 的表达,转化的拟南芥种子中 α -生育酚含量由 1% 升至 20%^[12];利用胡萝卜种子特异性的启动子 DC3,构建了植物表达载体 pDC3-At- γ -TMT 并转化拟南芥,拟南芥种子中 α -生育酚的含量提高了 80 多倍^[9];将 γ -TMT 基因和维生素 E 代谢途径中的 2-甲基-6-叶绿醇-1,4-苯醌甲基转移酶(MPBQ MT)一起转化大豆,大豆中的 α -生育酚含量由原来的 10% 提高到 95% 以上^[13]。因此, γ -TMT

的表达及活性在决定种子维生素 E 的组成中起着重要作用,种子中 α -生育酚的含量与 γ -TMT 启动子的表达特性密切相关,而迄今尚未有该启动子的研究报道。

为了深入了解 γ -TMT 基因在植物体内的表达特征,本研究分离了拟南芥 γ -TMT 基因上游 1552bp 的启动子序列,以 *GUS* 作为报告基因,转化拟南芥,利用转基因拟南芥对该启动子的表达特性进行了初步分析研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒载体:大肠杆菌(*E. coli*)菌株 TOP10、DH5 α 、农杆菌菌株 LBA4404 等由中国农科院生物技术研究所植物代谢工程实验室提供;pGEM-T easy Vector 购自 Promega 公司,pENTR1A 购自 Invitrogen 公司。

1.1.2 植物实验材料:拟南芥(*Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia)由中国农科院生物技术研究所植物代谢工程实验室提供。

1.1.3 工具酶和化学试剂:各种限制性内切酶和修饰酶购自 Promega 公司,X-gluc 购自 Promega 公司,其他化学药品均为国产分析纯试剂。

1.2 实验方法

1.2.1 拟南芥 DNA 的提取:以叶片为材料,采用 SDS 法提取植物总 DNA。

1.2.2 γ -TMT 基因启动子的分离:根据拟南芥全基因组序列预测的 γ -TMT 基因(At1g64970.1)序列,推测出其启动子的序列,并合成下列引物:FW:5'-CCGGATCCTTTGATGGTATTTTATTGTA;RV:5'-ATGAGCTCAGGGATTATTGATTATTGTTA,引物末端分别添加 *Bam*H I 和 *Sac* I 的酶切位点。取拟南芥基因组 DNA 20ng 为模板,以 FW 和 RV 为引物,进行 PCR 反应,条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 4min,94 $^{\circ}$ C 变性 30s,50 $^{\circ}$ C 退火 25s,72 $^{\circ}$ C 延伸 120s,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳后,回收纯化。连接到 pGEM-T easy 载体,转化 *E. coli* 菌株 TOP10,获得的重组质粒 pTMT-promoter。

1.2.3 植物表达载体构建:将 pTMT-promoter 用 *Bam*H I 和 *Eco*R I 双切,回收目的片段,连接到 pENTR1A 载体上,获得 pENTR1A-TMT-promoter 重组质粒。将纯化的 pENTR1A-TMT-promoter 质粒重组到植物表达载体 pKG,转化入 *E. coli* 菌株 DH5 α 。在含有壮观霉素(Spectinomycin, 50mg/L)的 LB 培养基平板

上筛选转化菌落,获得植物表达载体 pKG-TMT-promoter。

1.2.4 拟南芥转化 将 pKG-TMT-promoter 质粒用电击转化法转入农杆菌 LBA4404 中,挑取含有 pKG-promoter 质粒的农杆菌的单菌落,接种于 5mL YEB (Spec 50mg/L, Rif 50mg/L)液体培养基中,28℃,250 r/min 培养 36h。按照 1:300 转接至 200mL YEB (Spec 50mg/L, Rif 50mg/L)液体培养基中,28℃,250r/min 培养约 15h,至 $OD_{600} \approx 2.0$ 。5000r/min 离心 5~6min,菌体重悬于约 2 倍体积的 10% 的蔗糖溶液,至 $OD_{600} \approx 1.0$ 左右,加入 0.02% 的 Silwet 70。采用花沾法转化拟南芥,收获种子,在含有 Kan 50mg/L 的 1/2 MS 培养基上筛选,获得抗性植株。

1.2.5 抗性植株 PCR 检测 提取转基因植株基因组 DNA 进行 PCR 检测,引物序列如下:FW:5'-GC GGATCC TTTGATGTTATTTATTTGTA;RV:5'-AAC TTGTGCCGTTTACGTC,其中 RV 是 pKG 载体引物。PCR 条件:94℃ 预变性 4min,94℃ 变性 30s,53℃ 退火 30s,72℃ 延伸 120s,30 个循环,72℃ 延伸 10min;电泳检测。

1.2.6 GUS 染色 取不同生长时期的阳性拟南芥植株(22℃,16h 光照)进行 GUS 染色(100.0mmol/L 磷酸二氢钠、0.5mmol/L 高铁氰化钾、0.5mmol/L 亚铁氰化钾、1.0mmol/L X-gluc,50mg/mL DMSO、0.1% Triton-100,37℃,过夜),95% 乙醇脱色后,在体视镜下(Nikon DIGITAL CAMERA Dxm 1200F)观察。

2 结果与讨论

2.1 γ -TMT 启动子序列结构特征分析

根据拟南芥 γ -TMT 的基因组 DNA 序列(At1g64970.1)推测出其启动子序列,设计引物进行 PCR 扩增,得到 γ -TMT 基因上游 1552bp 的 DNA 片段(GenBank 登录号: DQ833456),与注释的拟南芥基因组 DNA 序列相比,所分离的启动子在 5' 端多出 96bp,以保证该启动子的完整和活性,该启动子在 -1458bp 处位上有一个碱基差异,由 A 变为 G(图 1),该碱基正好处于相邻的另外一个基因 At1g64980 的非编码区(3' UTR),且在该区域没有预测到顺式元件的存在,推测对该启动子的功能不会有影响。根据序列特征推测该启动子的 TATA box 和 CAAT box 分别位于距转录起始位点上游 30bp 和 91bp 处。

在 <http://intra.psb.ugent.be:8080/PlantCARE/index.html> 上利用 PlantCARE 数据库对 γ -TMT 启动子序列进行分析^[14],预测到的顺式作用元件中有 10

种与光调控有关(图 1),同时还发现 6 个逆境胁迫相关的元件。 γ -TMT 启动子区域中含有大量的与光调控有关的元件,说明 γ -TMT 的表达可能受光的调控。据研究表明:在强光逆境下,野生型拟南芥叶子中 α -生育酚的含量在 15d 观测时间中由 $0\text{nmol}\cdot\text{cm}^{-2}$ 升至 $8\text{nmol}\cdot\text{cm}^{-2}$,比 β 、 γ 、 δ -生育酚的含量增加之和还高出 3 倍,且在强光逆境下, α -生育酚含量与甲基化酶的活性有关^[15]。因此,推测叶子中 α -生育酚含量高很可能是由于 γ -TMT 基因受到光的诱导,表达升高引起的。

2.2 转基因植株的获得及检测

采用农杆菌介导法转化拟南芥,在含 Kan 50mg/L 的 1/2 MS 培养基上进行筛选,获得具有卡那霉素抗性的转基因植株 30 株,提取基因组 DNA 进行 PCR 检测。为了区别拟南芥自身的 γ -TMT 启动子,PCR 正向引物位于 γ -TMT 启动子中,反向引物则位于报告基因内部,最终共获得 PCR 阳性植株 20 株,分单株收取种子,直至筛选得到纯系。

2.3 GUS 组织化学染色观察启动子的时空表达

在获得的 20 株 PCR 阳性的转基因拟南芥株系中,GUS 染色呈阳性的为 6 株,挑选具有代表性的株系分别在其萌发、生长、开花和结种的不同时期进行 GUS 组织化学染色观察。

萌发两天染色观察发现 GUS 在子叶中表达最强、胚轴次之,而胚根不表达(图 2-A);在 22℃,16h 光照 8h 黑暗的生长条件下生长 6d 后,茎尖分生组织表达最强,幼苗的子叶、茎部次之,根部不表达(图 2-B);20d 后的植株除根部没有表达,其他部位均有表达,其中茎尖分生组织表达最强(图 2-C),真叶的表皮毛也有较强的表达(图 2-D);35d 后的植株,在花器官中,花柱、花药、花丝、花萼均有表达,其中花药、花丝表达最强(图 2-E),主根上部有表达,下部和侧根没有表达(图 2-F),即将成熟的种荚、种皮、种子均没有表达(图 2-G、H)。由此可见, γ -TMT 启动子活性最强的部位是茎尖及幼嫩的叶片,其次是成熟的叶片、花、茎等部位,而在根部、种荚以及种子中没有检测到 GUS 活性,说明该启动子的表达具有明显的组织特异性。

2.4 讨论

生育酚仅在微生物和植物体中合成,一般认为叶绿体和其它质体是其主要合成场所^[16]。在植物的不同组织中生育酚各组分之间有很大差别,在光合组织中 α -生育酚含量很高,是含量最为丰富的生育酚形式^[17]。众所周知,在光合作用过程中植物体

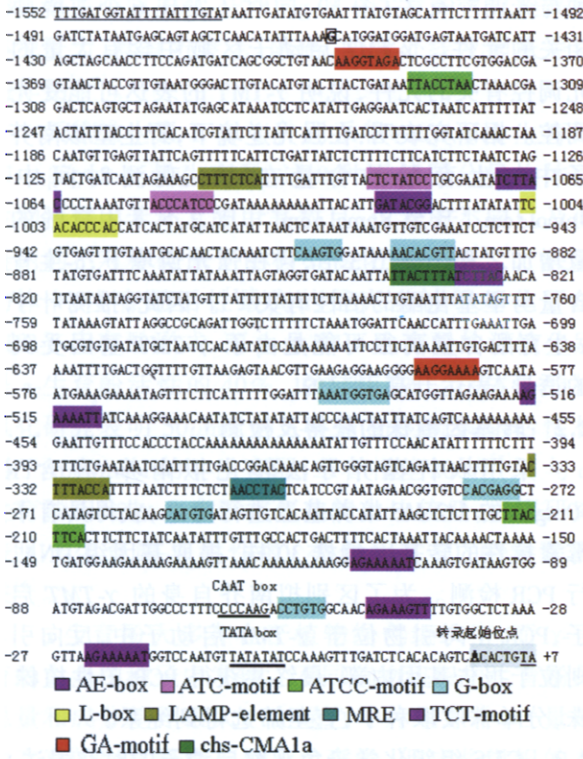


图1 拟南芥 γ -TMT 基因启动子 DNA 序列及其特征分析

Fig.1 Sequence and analysis of *Arabidopsis*

γ -TMT gene promoter

内会产生大量的活性氧,包括单线态氧、过氧化氢、超氧阴离子、羟基自由基等^[18]。在叶绿体中, α -生育酚可以有效清除单线态氧(1O_2),据估计,一分子的 α -生育酚可以清除 120 分子的单线态氧^[19]。在光合膜中, α -生育酚与其他抗氧化剂共同清除活性氧,抑制脂类过氧化反应, α -生育酚还可以清除环氧化合物,羟基自由基等^[20],维持类囊体膜的结构和功能,保证了叶绿体的正常光合作用^[21]。事实上,植物体内的抗氧化系统是受到光信号调控的,强光逆境条件下,植物的抗氧化系统相关基因受诱导表达^[22]。在拟南芥 γ -TMT 基因突变体中,在高光,高温,低温氧化逆境条件下,野生型拟南芥叶片中 γ , α -生育酚的含量均增加,突变体中只有 γ -生育酚的含量增加,但二者的表型以及脂肪酸和脂类等均没有区别,推测 γ -生育酚可以替代 α -生育酚的功能,保护植物的光合系统^[23]。在本研究中,通过对 γ -TMT 启动子进行序列分析发现该序列中存在大量的光调控元件以及逆境胁迫相关元件,说明该启动子很可能受光以及逆境的调控,该启动子在光和其它逆境条件下的表达方式以及相关的调控元件还有待于进一步的分析研究。

本研究通过 GUS 染色,发现 γ -TMT 启动子在植

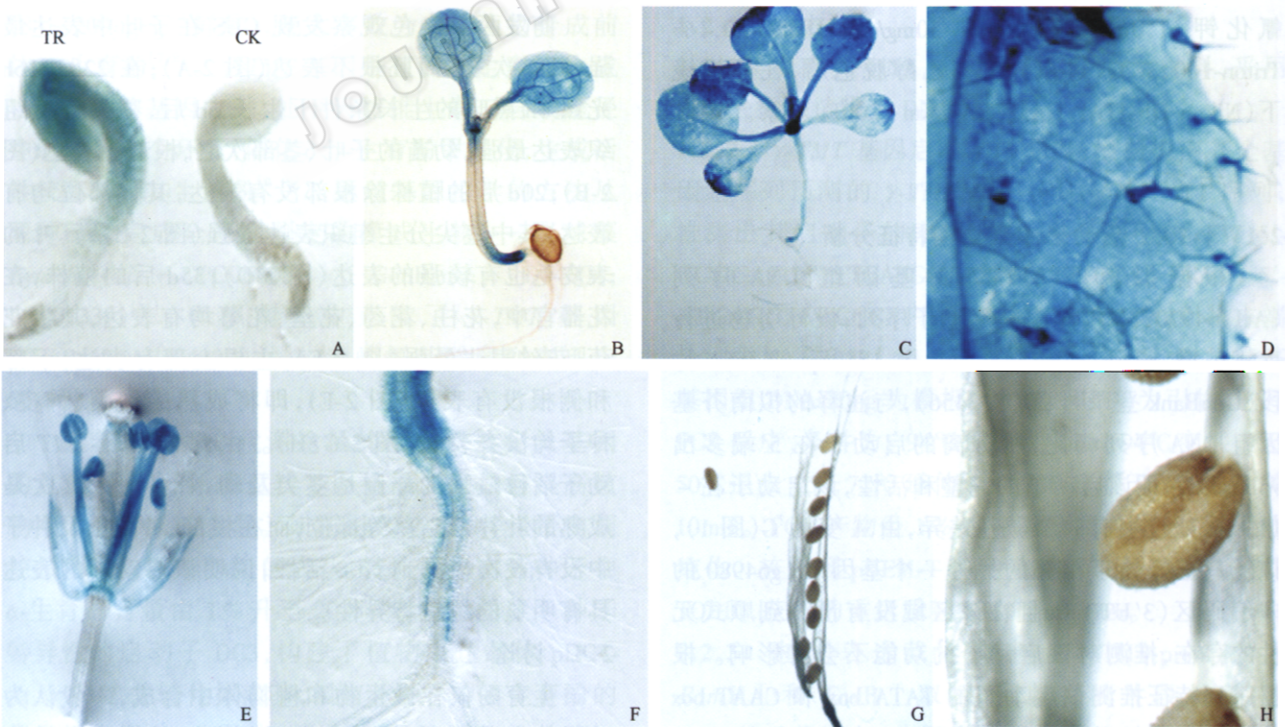


图2 转基因拟南芥不同生长时期及不同组织的 GUS 染色

Fig.2 GUS-staining in transgenic *Arabidopsis*

A: 2-d seedling, B: 6-d seedling, C: 20-d seedling, D: mature leaf, E: flower, F: root, G: mature silique, H: seeds.

物的叶片尤其是生长旺盛的幼叶中 GUS 染色最强,说明 γ -TMT 启动子的活性高,使 γ -TMT 基因在叶片中得到高表达。相应叶片中的 α -生育酚含量也高,这与已有的实验结果相一致^[8]。该启动子在种子中 GUS 染色呈阴性,说明 γ -TMT 启动子在种子中基本没有活性,这与种子中 γ -生育酚含量高, α -生育酚含量低的结果一致。据研究表明 γ -生育酚含量丰富的玉米和大豆种子在储存过程中可以产生致死量的 NO_2 ,而 γ -生育酚与活性氮的消除有关^[6]。种子的储存寿命也许与 γ -生育酚的含量有关, γ -生育酚在植物体内的生理功能目前尚有许多不明之处,本研究的结果可为 γ -生育酚的生理功能研究提供参考。尽管在成熟种子中未检测到 γ -TMT 启动子的活性,但种子中含有一定量的 α -生育酚,推测 γ -TMT 启动子也许仅在种子发育的某个阶段表达,从而导致种子中存在低含量的 α -生育酚,是否如此,还需要在种子发育的不同时期取样进行研究。

通过对 γ -TMT 基因启动子在整个生长周期的不同时期进行 GUS 染色分析,可以看出,拟南芥 γ -TMT 启动子是一个具有组织特异性的启动子,其在拟南芥的茎叶花中均有表达,尤其是在嫩叶、茎尖和雄蕊等生长比较旺盛的组织中表达最强。

REFERENCES (参考文献)

- [1] Winkhofer-Roob BM, Rock E, Ribalta J *et al.* Effects of vitamin E and carotenoid status on oxidative stress in health and disease. Evidence obtained from human intervention studies. *Mol Aspects Med* 2003, **24**: 391–402
- [2] Maret G, Traber, Helmut Sies. Vitamin E in humans: demand and delivery. *Annu Rev Nutr*, 1996, **16**: 321–347
- [3] Bramley PM, Elmadfa I, Kafatos A *et al.* Vitamin E. *J Sci Food Agric*, 2000, **80**: 913–938
- [4] Kamal-Eldin A, Appelqvist LA. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols. *Lipids*, 1996, **31**: 671–701
- [5] Arteaga E, Rojas A, Villaseca P *et al.* The effect of 17 β -estradiol and alpha-tocopherol on the oxidation of LDL cholesterol from postmenopausal women and the minor effect of gamma-tocopherol and melatonin. *Menopause* 2000, **7**(2): 112–116
- [6] Cooney RV, Franke AA, Harwood PJ *et al.* Gamma-tocopherol detoxification of nitrogen dioxide: superiority to alpha-tocopherol. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1993, **90**(5): 1771–1775
- [7] Grusak MA, DellaPenna D. Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition and health. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1999, **50**: 133–161
- [8] Sheppard AJ, Pennington JA, Weihrauch JL. Analysis and Distribution of Vitamin E in Vegetable Oils and Foods. In *Vitamin E in Health and Disease*, L. Packer and J. Fuchs, eds. New York: Marcel Dekker, 1993, pp. 9–31
- [9] Shintani D, DellaPenna D. Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering. *Science*, 1998, **282**: 2098–2100
- [10] Sattler Scott E, Cheng Zigang, DellaPenna Dean. From *Arabidopsis* to agriculture: engineering improved Vitamin E content in soybean. *TRENDS in Plant Science*, 2004, **9**: 365–371
- [11] Kaneko T, Sato S, Kotani H *et al.* Sequence analysis of the genome of the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803. II. Sequence determination of the entire genome and assignment of potential protein-coding regions. *DNA Res*, 1996, **3**(3): 109–136
- [12] Van Eenennaam AL, Li G, Venkatramesh M *et al.* Elevation of seed tocopherol levels using plant-based transcription factors targeted to an endogenous locus. *Metabolic Engineering*, 2004, **102**: 101–108
- [13] Van Eenennaam AL, Lincoln K, Durrett TP *et al.* Engineering vitamin E content: from *Arabidopsis* mutant to soy oil. *Plant Cell*, 2003, **15**(12): 3007–3019
- [14] Lescot M, Déhais P, Moreau Y *et al.* PlantCARE: a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res*, 2002, **30**(1): 325–327
- [15] Eva Collakova, Dean DellaPenna. The role of homogentisate phytyltransferase and other tocopherol pathway enzymes in the regulation of tocopherol synthesis during Abiotic stress. *Plant Physiology*, 2003, **133**: 930–940
- [16] Soll J, Douce R, Schultz G *et al.* Localization and synthesis of Prenylquinones in isolated outer and inner envelope membranes from spinach chloroplasts. *Arch Biochem Biophys*, 1985, **238**(1): 290–299
- [17] Dean Della Penna, Barry Pogson. Vitamin synthesis in plants: tocopherols and carotenoids. *ARI*, 2006, **1**: 721
- [18] Apel K, Hirt H. Reactive oxygen species: metabolism, oxidative stress and signal transduction. *Annu Rev Plant Biol*, 2004, **55**: 373–399
- [19] Fahrenholz SR, Doleiden FH, Tozzolo AM *et al.* On the quenching of singlet oxygen by a-tocopherol. *Photochem Photobiol*, 1974, **20**: 505–509
- [20] Sergi Munne-Bosch. The role of α -tocopherol in plant stress tolerance. *Journal of Plant Physiology*, 2005, **162**: 743–748
- [21] Munne-Bosch S, Alegre L. The function of tocopherols and tocotrienols in plants. *Crit Rev Plant Sci*, 2002a, **21**: 31–57
- [22] Christine H Foyer, Graham Noctor. Leaves in the dark see the light. *Science*, 1999, **284**: 599–601
- [23] Porfirova S, Dormann P. Characterization of an *Arabidopsis* mutant deficient in gamma-tocopherol methyltransferase. *Plant Mol Biol*, 2003, **52**(6): 1181–1190