维普资讯 http://www.cqvip.com

果 树 学 报 2006,23(4):491~494
Journal of Fruit Science

转基因苹果组培苗铁蛋白基因在转录水平上的表达

叶 霞[1,2],黄晓德[1],陶建敏[1],蔡斌华[1],章 镇[1*]

([1]南京农业大学园艺学院,南京 210095;[2]河南黄河园林绿化工程有限公司,郑州 450003)

摘 要:以转菜豆铁蛋白基因的嘎拉苹果4个株系的试管苗为材料,通过定量RT-PCR的方法检测外源和内源铁蛋白基因的转录表达量,结果表明苹果转基因植株外源铁蛋白基因的转录表达量与其插入的拷贝数没有明显的关系,可能受插入位点的影响;同时在铁诱导的条件下,外源铁蛋白基因与内源的铁蛋白基因的转录表达特性一致,转录水平受铁的调控,随着铁诱导时间的延长,其mRNA表达水平逐渐增加。对转基因植株的根、茎、叶3个部位铁蛋白基因的转录表达量研究结果表明,外源菜豆铁蛋白基因与内源苹果铁蛋白基因的mRNA含量均在根部最高,茎次之,叶片最低。

关键词:苹果;铁蛋白基因;转录;转基因植株;表达

中图分类号:S661.1 **文献标识码**:A **文章编号**:1009-9980(2006)04-491-04

Study on the expression of ferritin gene transcript from transgenic apple plants

YE Xia[1,2], HUANG Xiao-de[1], TAO Jian-min[1], CAI Bin-hua[1], ZHANG Zhen[1*]

([1]College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing, Jiangsu 210095 China; [2]Henan Yellow River Gardening Limited Company, Zhengzhou, Henan 450003 China)

Abstract: The expression level of ferritin mRNA of transgenic apple plants with recombinant bean iron-binding gene was analyzed by real time quantitative RT-PCR. The results indicated that exogenous ferritin mRNA abundance had no correction with the copies in the genome of *Malus domestica* Borkh., possibly affected by inert position. Also the results of real time quantitative RT-PCR analysis confirmed exogenous ferritin mRNA transcript in response to iron was similar with endogenous mRNA ferritin, and expression of the ferritin transcript of seedlings increased gradually with induced time after treatment with 0.5 mmol/L iron-citrate; the results indicated that the expression of exogenous ferritin gene was regulated in response to iron at transcriptional level. The results of real time quantitative RT-PCR analysis demonstrated both exogenous ferritin gene and endogenous ferritin gene mRNA accumulation are highest in roots, higher in stems, less in leaves.

Key Words: Apple; Ferritin gene; Transcript; Transgenic plant; Expression

铁蛋白广泛分布于生物有机体内,植物铁蛋白为中空的球状物,内部是一个含有铁核的空腔,每分子铁蛋白能以可溶、无毒,为生物体所利用的形式贮存4500个铁原子[1]。研究表明,在细胞核内编码植物铁蛋白的亚基首先在细胞质中被合成一种前体物质,该前体物质包含一个超过70个氨基酸残基的N-端突出肽(TP),在TP的定位作用下转运到质粒如叶绿体、造粉体中,同时该突出肽从植物铁蛋白亚基的前体中切割掉,剩余的植物铁蛋白亚基的延伸肽(EP)在质粒中被组装成成熟的蛋白[2-3]。

植物铁蛋白基因已从多种植物中克隆出来,如大豆、玉米、拟南芥、豌豆、豇豆、小金海棠等。为了提高水稻种子中的铁含量和增强铁的生物利用效率,Lucca等[4]将菜豆铁蛋白基因转入水稻,同时将曲霉菌抗热植酸酶引入水稻胚乳,且使富含半胱氨酸的内源金属硫蛋白类似蛋白过量表达,发现水稻种子中铁含量提高了2倍,铁吸收的抑制剂植酸也很容易被降解,并且过量的半胱氨酸还能迅速结合铁离子,提高铁的吸收。Goto等[5]通过农杆菌介导,将大豆铁蛋白cDNA转入水稻,在水稻特异性种子存储蛋白谷蛋白启动子GluB-1控制下,只在谷粒中富集铁。Goto等[6]将由35 S启动子驱动的大豆铁蛋白基

收稿日期:2005-11-05 接受日期:2006-03-20

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30370987);江苏省应用基础项目(BJ200018)。

作者简介:叶霞,女,博士在读生。Tel: 025-84396792, E-mail:yexiahenan@eyou.com

* 通讯作者。Author for correspondence. Tel: 025-84396724, E-mail:zhangzhen_nj@hotmail.com

维普资讯 http://www.cqvip.com

因,通过农杆菌转入莴苣后,发现含铁量明显提高,且转基因植物的生长速度也比野生型的快许多。Van WuytswinKel 等[7]用 CaMV35 S 启动子将大豆铁蛋白基因导入烟草后,发现转基因植物中铁蛋白过量表达,根中铁还原酶活性提高,叶片中铁含量增加2~3 倍。

为提高苹果果实中铁的含量,本研究室已将菜豆铁蛋白基因导入嘎拉苹果基因组内[8],本试验以转菜豆铁结合蛋白基因的嘎拉苹果植株为材料,探讨外源基因插入的拷贝数对其表达的影响,以及外源铁结合蛋白基因和内源铁结合蛋白基因在转录水平上的表达有何差异。

1 材料和方法

1.1 材料

供试的苹果材料为南京农业大学果树组培实验室保存的嘎拉苹果(*Malus domestica* Borkh.)转基因试管苗。

各种限制性内切酶、引物及其它分子生物学试剂均购自上海生物工程公司,地高辛标记及检测试剂盒购自德国 Roche 公司,带正电荷的尼龙膜为 Whatman 生产,分子杂交炉为 Whatman 公司生产的 OV4 型杂交炉。

1.2 方法

1.2.1 总 DNA 和 RNA 的提取 取试管苗的幼叶,采用王壮伟等[9]的方法提取植物基因组的 RNA,植物基因组 DNA 的提取采用陈大明等[10]方法,电泳分析 RNA 和 DNA 的质量。

1.2.2 抗性植株的 Southern bloting 检测 15 μg 苹果基因组总 DNA 分别用内切酶 *Eco*R Ⅰ 单酶切,*Bam*H Ⅰ 和 *Sac* Ⅰ 双酶切后,经 1% 琼脂糖凝胶电泳后,在碱性条件下将 DNA 转移至带正电荷的尼龙膜上。用引物 P1:5'CAGGATCCAATGGCCCTC-CGCTCCTTCTAAAG3'和 P2:5'CAGAGCTCAAGCG-GCATGTCCATCATGAA3'。扩增基因组 DNA 获得目的基因片段,使用地高辛标记试剂盒进行探针标记,杂交温度 43℃,杂交、洗膜和免疫鉴定程序全部按地高辛标记试剂盒的说明进行。

1.2.3 外源铁蛋白基因在不同转基因株系茎段中的转录表达检测 分别提取转基因苹果 4 个株系试管苗茎段基因组的 RNA,用 DNA 酶消化 RNA 中少量的 DNA,用 M-MLV 反转录酶进行反转录,反应体系为:3.5 μg RNA;oligo dT-adapter 引物(10 μmol),0.5 μL; M-MLV 反转录酶缓冲液(5×),5 μL; dNTP Mixture (10 mmol),2.5 μL;RNA 酶抑制剂 (40 U/μL),0.7 μL;M-MLV 反转录酶(200 U/μL),2 μL;加 ddH_2O 至总体积 25 μL,37℃反应 2 h,然后以 cDNA 为模板、以 P3(5'GCGTAATACTGACGAGCCAAC'3) 和 P4 引物(5'CCCTTTTCTGGGTTTTCTCTTT'3)扩增外源铁蛋白基因。重复 3 次。

1.2.4 铁蛋白基因的铁诱导转录表达检测 苹果转基因株系 2 试管苗和非转基因试管苗分别经 0.5 mmol 柠檬酸铁处理 0、1.5、3.0、4.5、6.0 h,然后提取植物基因组的 RNA 进行反转录,根据序列信息(资料待发表)设计苹果内源铁结合蛋白基因上游引物 P5:5'AAGGAATCGAGTGAGGAAGA3',下游引物 P6:5'TCTTTGTTCTTCTCAGCAAC3',转基因株系 2 试管苗茎段转录的表达检测以 P3 和 P4 为引物进行 PCR 扩增,然后以 cDNA 为模板进行 PCR 扩增。重复 3 次。

1.2.5 铁蛋白基因在转基因植株不同部位的转录表达检测 分别提取转基因苹果株系 2 试管苗的根、茎、叶的 RNA,用 M-MLV 反转录酶进行反转录,然后以 cDNA 为模板,以 P3、P4 和 P5、P6 为引物分别扩增外源和内源的铁蛋白基因。反应条件为:94°C 30s,51°C 30s,72°C 1min,35 个循环。重复 3 次。

2 结果与分析

2.1 Southern blotting 检测

基因组经双酶切后杂交结果显示 (图 1-A),转基因株系 1~4 和质粒具有清晰的条带,而非转化植株 0 没有出现明显的条带。由于外源 Ferritin 基因整合在限制内切酶 *Bam*H Ⅰ 和 *Sac* Ⅰ 酶切位点之间,而植株总基因组是由限制性内切酶 *Bam*H Ⅰ 和 *Sac* Ⅰ 双酶切,所以抗性植株 1~4 在 764 bp 处有清晰的杂交信号,表明目的基因可能已整合到了苹果基因组中。同时在中间位置也出现了微弱的杂交信号,可能与基因组的不完全酶切有关。

基因组经 *Eco*R Ⅰ 单酶切后杂交结果表明 (图 1-B),外源 Ferritin 基因在转基因株系 1 和 2 基因组中至少有 3 个拷贝,杂交信号出现在相同的位置,而在 3 和 4 株系中至少有 5 个拷贝,杂交信号与 1、2 株系的位置不同,说明外源基因在基因组内整合的位点不同。

2.2 外源铁蛋白基因在不同转基因株系中的转录表达特性

用定量 RT- PCR 方法对 Southern blotting 阳性转化植株基因表达检测的结果表明 (图 2),4 个转

维普资讯 http://www.cqvip.com

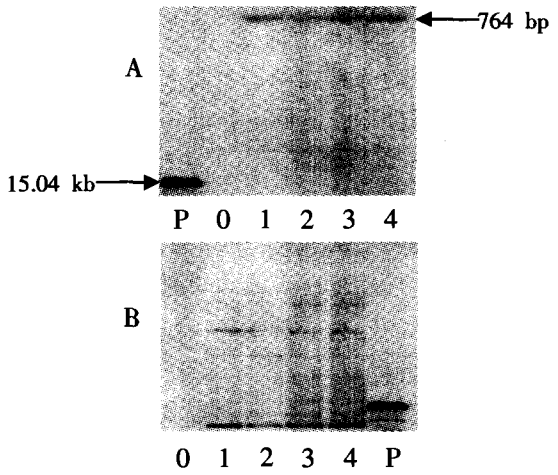

图 1　嘎拉 GUS 阳性植株的 Southern 杂交检测

P. 阳性质粒；0. 非转化植株对照；1~4. 转基因植株

Fig. 1 Southern blotting of the transgenic plants

P. Plasmid; 0. Non-transgenic plants; 1~4. Transgenic plants

基因株系植株茎段的 RNA 经反转录后都能检测到外源菜豆铁蛋白基因的表达，而非转基因植株 CK 未见有表达，其中以株系 2 茎段的转录表达量最大，为 128000 copies/μL(含 110 ng/μL的 RNA)，而转基因株系 1 的表达量只有 781 copies/μL，几乎检测不到其表达。

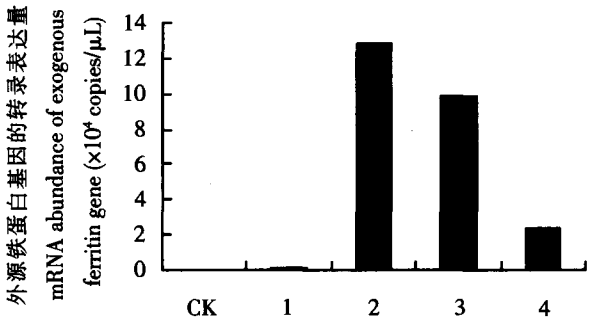

图 2　外源铁蛋白基因在不同转基因株系基因组中转录表达的定量 RT-PCR

1~4. 转化植株；CK. 非转化植株对照

Fig. 2 Real time quantitative RT-PCR of exogenous ferritin gene transcript of the transgenic plants

1~4. Transgenic plants; CK. Non-transgenic plants

2.3　在铁诱导条件下的铁结合蛋白基因的转录表达特性

转基因株系 2 试管苗茎段和非转基因试管苗茎段分别经 0.5 mmol 柠檬酸铁处理不同时间后，对转基因植株的外源铁结合蛋白基因和非转基因植株的内源铁结合蛋白基因转录表达进行了定量 RT-PCR 分析(图 3)，结果显示，外源和内源铁结合蛋白基因随着处理时间的延长，转录表达量均逐渐增加，表明内外源菜豆铁结合蛋白基因的表达在转录水平上均受铁诱导表达。与内源铁结合蛋白基因的转录表达量比较，转基因植株的外源铁结合蛋白基因的表达量较高，其中试管苗在处理 6 h 后，内源铁结合蛋白基因的转录表达量为 213500 copies/μL，而外源铁结合蛋白基因的表达量高达 197000 copies/μL，在未经铁诱导表达的条件下，转基因苹果基因组外源菜豆铁结合蛋白基因的转录表达量是非转基因植株内源铁结合蛋白基因转录表达量的 42.03 倍。

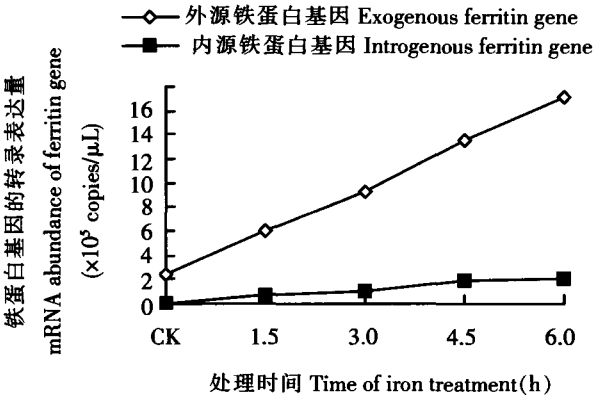

图 3　Ferritin 基因在铁诱导条件下的转录表达的定量 RT-PCR 分析

Fig.3 Real time quantitative RT-PCR analysis of ferritin gene transcript in iron inducing condition

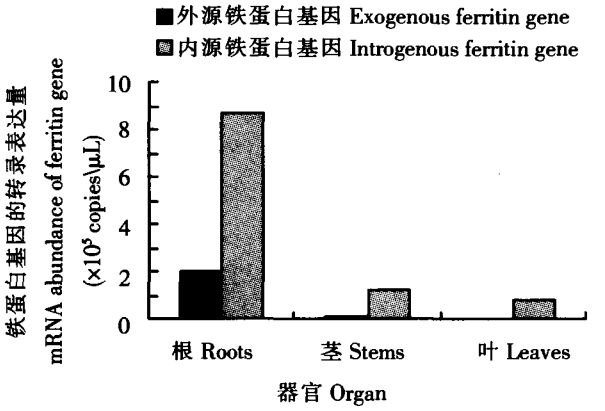

图 4 ferritin 基因在不同部位转录表达的定量 RT-PCR 分析

Fig. 4 Real time quantitative RT-PCR analysis of ferritin gene transcript in the different parts

2.4　铁结合蛋白基因在转基因植株不同部位的转录表达特性

对铁结合蛋白基因在转基因株系 2 试管苗的根、茎、叶 3 个部位的转录表达定量 RT-PCR 分析表明，外源菜豆铁蛋白基因和内源苹果铁蛋白基因

维普资讯 http://www.cqvip.com

均在根部转录表达量最大,茎次之,在叶片中转录表达量最低;定量 RT-PCR 结果还表明外源菜豆铁蛋白在根、茎、叶 3 个部位的转录表达量均比内源苹果铁蛋白的转录表达量高，其中叶片中外源铁蛋白基因的 mRNA 含量比内源铁蛋白表达量高 30 倍。

3 讨 论

关于拷贝数与基因表达的关系，目前有 2 种观点：一是多数文献报道外源基因的拷贝数增加并不意味着表达水平的提高，反而常常会导致外源基因的沉默[11-12];二是有研究报道外源基因插入拷贝数的多少与基因沉默之间不存在必然的联系[13-14],本实验也发现类似的结果。我们对菜豆铁蛋白基因在苹果基因组内的转录表达定量 RT-PCR 检测显示，插入 3 个拷贝和 5 个拷贝数的外源基因在苹果基因组内都有转录，其中整合了3 个拷贝目的基因的株系 2 的表达量最大，而同样整合了 3 个拷贝外源基因的株系 1 的表达量却极低，这些结果表明转基因拷贝数对于外源基因的表达不起决定作用。

外源基因和内源基因如果存在序列的同源性，在转基因植物中,它们会竞争地结合核基质、核膜等转录和翻译所必需的不可扩散元件，而出现相互抑制影响内外源基因的表达[15]。本研究的菜豆铁蛋白基因核苷酸序列和苹果铁蛋白基因核苷酸序列的同源性高达 83%(资料待发表),但并未影响到外源菜豆铁蛋白基因在苹果体内的转录。所以,从以上实验结果可以看出，外源基因在转基因植物中表达并不仅限于外源基因插入的拷贝数、与内源基因的高同源性等因素,可能是这些因素与外源基因位点效应、DNA 甲基化、DNA 重排等综合影响的结果。

在动物体内铁蛋白基因的表达受金属离子的调控,调控发生在转录水平和转录后水平[16],而铁诱导的大豆细胞铁蛋白的表达调控主要发生在转录水平上[17],本研究发现苹果内源 ferritin 基因在铁诱导的条件下 mRNA 表达量增加,而且外源菜豆铁蛋白基因的表达量也随着铁诱导时间的延长而增加，与苹果自身具有的铁蛋白的表达特性一致,这与 Isabille 等[18]报道的玉米铁蛋白的表达量受铁的调控结果一致，进一步证实了植物铁蛋白基因的表达在转录水平上受铁的调控。

Briat[19]发现铁蛋白主要分布在低光合性的非绿色质体中,如黄化质体、造粉体、种子、幼苗、根的顶部及豆科植物的根瘤中，而有光合活性的叶绿体中却只有少量分布。本研究结果显示内源铁蛋白和外源铁蛋白基因 mRNA 的含量均在试管苗的根部表达量最高,茎次之,叶片中最低,进一步在分子水平上证实了铁蛋白的分布规律。本研究还发现在铁诱导及正常生理条件下，不同生长部位的外源铁蛋白基因的转录表达量均远高于内源铁结合蛋白基因，这为转基因的苹果植株果实中铁含量的进一步提高在分子水平上提供了依据；但转基因植株中氨基酸水平上的铁蛋白含量是还否能高表达，能否提高转基因植株果实中的铁含量有待进一步研究。

参考文献 Reference:

[1] JEAN-FRANCOIS B, FOBIS-LOISY I, NICOLE G,et al. Cellular and molecular aspects of iron metabolism in plants [J]. Biol Cell, 1995,84: 69-81.

[2] RAGLAND M, BRIAT J F, GAGNON J, et al. Evidence for conservation of ferritin sequences among plants and animals and for a transit peptide in soybean[J]. J Bio chem, 1990,265(183):39-44.

[3] WALDO G S, WRIGHT E, WHANG, Z H, et al. Formation of the ferritin iron mineral occurs in plastids[J]. Plant Physiol,1991,109: 797-802.

[4] LUCCA P, HURRELL R, POTRYKUS I. Fighting iron deficiency anemia with iron-rich rice[J]. Am Cell Nutr, 2002,21(3):184-190.

[5] GOTO F, YOSHIHARA T, SHIGEMOTO N, et al. Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene [J]. Nature Biotechnology, 1999,17:282-286.

[6] GOTO F, YOSHIHARA T, SAIKI H. Iron accumulation and enhanced growth in transgenic lettuce plants expressing the iron-binding protein ferritin[J]. Theor Appl Genet, 2000,100:658-664.

[7] VAN WUYTSWINKEL O,GERAD V,NICOLE G, et al. Iron homeostasis alteration in transgenic tobacco over-expressing ferritin[J]. Plant J, 1998,17(1):93-97.

[8] YE X, HUANG X D, TAO J M, et al(叶霞, 黄晓德,陶建敏,等). *Agrobacterium*-mediated transformation of apple with ferritin gene [J]. Journal of Fruit Science (果树学报),2005 (4):387-389. (in Chinese)

[9] WANG Z W, QU S C, ZHANG Z, et al(王壮伟,渠慎春,章镇,等). A fast method for total RNA extraction from culture material of *Malus* sp.[J]. Journal of Fruit Science(果树学报),2004,21(4):385-387. (in Chinese)

[10] CHEN D M, ZHANG S L, JIN Y F(陈大明,张上隆,金勇丰). A method for genomic DNA preparation of woody fruit crops[J]. Journal of Zhejiang Agricultural University(浙江大学学报),1997,23(6): 621-624. (in Chinese)

[11] ASSAAD F F, TUCKER K L, SINGER E R. Epigenetic repeat-induced gene silencing(RIGS) in *Arabidopsis*[J]. Plant Mol Biol, 1993, 22:1067-1085.

[12] SABL J F, HENIKOFF S. Copy numbers and orientation determine the susceptibility of a gene silencing by nearby heterochromatin in Drosophila[J]. Genetic, 1996, 142:447-458.

[13] HOBBS S L A , WARKENTIN T D, DELONG C M O.Transgene copy number can be positively or negatively associated with transgene expression[J]. Plant Mol Biol, 1993, 21: 17-26.

[14] IYER L M. Transgene silencing in monocots[J]. Plant Mol Bio, 2000,43:323-346.

[15] PENG C Z,LIU Z X,ZHENG X Q(彭存智,刘志昕,郑学勤). Development, measurement, application of transgene silencing[J]. Life Chemistry(生命的化学),2001,21(5):407-409. (in Chinese)

[16] KLAUSNER R D, ROUAULT T A, HARFORD J B. Regulating the fate of mRNA: the control of cellular iron metabolism[J]. Cell, 1993, 72:19-28.

[17] LESCURE A M, PROUDHON H N, PESEY H,et al. Ferritin gene transcription is regulated by iron in soybean cell cultures [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991,88:8222-8226.

[18] ISABILLE F L, KARINE L, STEANE L, et al. Structure and differential expression of two maize ferritin genes in response to iron and abscisic acid[J]. Eur J Biochem, 1995,231:609-619.

[19] BRIAT J F. Roles of ferritin in plants[J]. J Plant Nutr, 1996,19(89): 1331-1342.