

文章编号:1001-1498(2016)06-0946-05

AtMET1 基因克隆及化学诱导表达分析

梁立雄, 常英英, 高亚南, 王颜波, 张伟溪, 苏晓华, 张冰玉*

(林木遗传育种国家重点实验室, 国家林业局林木培育重点实验室, 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091)

关键词:pER8-MET1;17-β-雌二醇;化学诱导表达载体;瞬时表达

中图分类号:S718.46

文献标识码:A

AtMET1 Gene Cloning and Chemical-inducible Expression Analysis

LIANG Li-xiong, CHANG Ying-ying, GAO Ya-nan, WANG Yan-bo, ZHANG Wei-xi, SU Xiao-hua, ZHANG Bing-yu

(State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, Key Laboratory of Tree Breeding and Cultivation of State Forestry Administration, Research Institute of Forestry Chinese Academy of Forestry, Beijing 100091, China)

Abstract: [Objective] In order to study the function of *Arabidopsis thaliana* methyltransferase gene *AtMET1*, 17-β-estradiol inducible plant expression vector pER8-MET1 was constructed, and its characters of inducible expression were detected. [Methods] The *AtMET1* gene from *Arabidopsis thaliana* was used as the target gene, and ‘digestion-ligation’ method was applied for constructing the plant expression vector pER8-MET1, which could be induced by 17-β-estradiol. Then the vector was transferred to *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404. The *Agrobacterium* strain containing pER8-GFP vector was injected into the leaves of *Nicotiana tabacum*, then the leaves were induced by 17-β-estradiol in different levels of concentrations and time durations. QPCR was performed to detect GFP gene expression, through which the optimum concentration and time duration were screened. The *Agrobacterium* strain containing pER8-MET1 vector was injected into the leaves of *Nicotiana tabacum*, then the leaves were induced by optimal concentration of 17-β-estradiol through different time durations. QPCR was performed to detect *MET1* gene expression. [Results] The results of qPCR showed that 17-β-estradiol can effectively induce the expression of the target gene in pER8-MET1 and the optimal concentration of 17-β-estradiol is 50 μmol · L⁻¹. The expression level of *MET1* gene gradually increased with 17-β-estradiol treating time and reached the highest level at 12h. [Conclusion] The pER8-MET1 vector was successfully constructed. The construction of the plant expression vector pER8-MET1 lays a good foundation for the mechanism study on the relationship between DNA methylation and phenotype variation.

Keywords: pER8-MET1; 17-β-estradiol; chemical-inducible expression vector; transient expression

DNA 甲基化是植物基因组中普遍存在的一种的重要表观遗传学机制,对植物生长发育及进化起着重要的调节作用^[1-2]。植物体 DNA 甲基化的建立和维持受多个基因的协同调控,其中 *MET1* (DN-

MT1-like METHYLTRANSFERASE 1 gene)是在植物中最早分离出来的甲基化相关基因,编码 DNA 甲基化转移酶 1 (MET1, Methyltransferase1),该酶主要负责保持 CG 位点的甲基化,通过 DNA 甲基化作用影

收稿日期:2015-08-28

基金项目:国家高技术研究发展计划(863 计划)课题(2013AA102703)和林木遗传育种国家重点实验室基本科研业务费专项资金课题(TGB2013010)。

作者简介:梁立雄(1989—),男,河北保定人,硕士研究生,研究方向:林木遗传育种。E-mail:llx0613@126.com。

* 通讯作者:研究员,博士。E-mail:byzhang@caf.ac.cn。

响植物的基因组结构、发育和进化^[3-6]。在拟南芥中,当 T-DNA 插入或点突变使 *MET1* 功能受损时,基因组的甲基化水平均降低^[4,7]。此外,*MET1* 也能通过改变组蛋白的甲基化水平,从而影响染色质结构^[8]。在拟南芥的 *met1* 弱突变体中没有明显的表型变化,但其自交后代出现顶端优势减弱、植株矮小、叶形改变、营养状态差、开花时间延迟等性状,说明 DNA 甲基化的积累会导致一系列的表型变异^[7]。植物在适应环境胁迫的过程中,能通过 DNA 甲基化调控抗性相关基因的表达,从而增强其对环境的适应能力,*MET1* 在植物逆境胁迫中发挥的重要作用已成为近年来研究的热点^[9-10]。在拟南芥的 *ddm2-1/met1-1* 突变体中,还发现 *MET1* 对等位基因的变异起到了作用^[11]。因此,构建 *MET1* 基因的植物表达载体,为下一步获得转基因植株,通过分子手段培育变异植株以及抗性育种提供重要的理论基础和技术支撑。

化学诱导表达系统是研究基因功能的有效手段之一,目前已经在基因功能分析、无标记植物转化、特定位点 DNA 切除、雄性不育的育性恢复、RNA 沉默等多个研究领域取得广泛的应用^[12]。其中,类固醇激活系统是基于糖皮质激素受体、雌激素受体等建立的化学诱导表达系统,糖皮质激素受体、雌激素受体作为转录激活因子与融合启动子结合,可调控下游基因的表达:当类固醇存在时,受体从细胞质中的热休克蛋白 90 (HSP90) 中解离出来,转移到细胞核中,并与融合启动子结合,激活目的基因的表达。Zuo 等^[13] 构建的雌激素激活表达系统 (XVE 系统) 能够精密的调控下游基因的表达,并且对植物没有毒害作用,是研究基因功能的理想工具。

本研究以拟南芥甲基化转移酶基因 *MET1* 为目的基因,构建了以 17-β-雌二醇为诱导剂的 XVE 系统载体 pER8-MET1,将其转入农杆菌 LBA4404 菌株中,通过烟草瞬时表达,对该载体的诱导表达特性进行了研究,为进一步研究转 *MET1* 基因植株的诱导表达研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 由中国林业科学研究院林业所卢孟柱课题组馈赠。播种于土壤中,并将其放入 (26 ± 1) °C、16 h/d 光照和 50 μmol · m⁻² · s⁻¹ 光强的人工气体培养箱中培养。60 d 后用于

农杆菌介导的基因瞬时表达。

1.2 菌株、质粒

含有雌二醇诱导型启动子的 pER8-GFP 质粒由 Nam. Hai Chua 博士 (The Rockefeller University, USA) 赠送,含拟南芥 *MET1* (Methyltransferase1 protein) cDNA 的 pBsCM-Y28 质粒由 Jean Finnegan 博士 (CSIRO Plant Industry, Australia) 赠送。农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 为本实验室保存。

1.3 方法

1.3.1 拟南芥 *MET1* 诱导表达载体构建 根据 GenBank 中 *MET1* (序列号:NM_124293) 序列设计引物 *MET1*-F (5'-CCGCTCGAG ATGGTGGAAAATGGGCTA-3') 和 *MET1*-R (5'-CTAGAC-TAGTCTAGGGTTGGTGTGA GGAG-3') (下划线分别表示 *Xho* I 和 *Spe* I 的酶切位点)。以 pBsCM-Y28 质粒为模板,PCR 扩增 *MET1* 片段。PCR 扩增产物通过 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后,用 Axygen 公司琼脂糖凝胶回收试剂盒回收纯化目的片段,连接到克隆载体 pMDTM19-T Vector (Takara 公司,日本)。转化 *E. coli* DH5α,经过蓝白斑筛选,挑取阳性克隆进行序列测定。用 *Xho* I 和 *Spe* I (NEB 公司,美国) pMDTM19-T-MET1 和 pER8-GFP,酶切回收的 *MET1* 片段和 pER8 线性片段,用 T4 DAN 酶 (NEB 公司,美国) 连接,挑取单克隆进行 PCR 检测,所用引物在载体多克隆位点设计 (p*Xho* I-F: 5'-CGCTGAAGCTAGTCGACT-3'; p*Spe* I-R: 5'-AGGCCTGATCGACTAGT-3')。阳性克隆提取质粒 pER8-MET1 (图 1)。

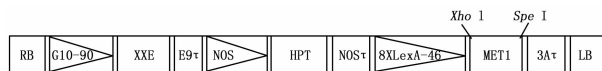


图 1 植物诱导表达载体 pER8-MET1 的结构示意图

1.3.2 pER8-MET1 载体的诱导表达特性研究

1.3.2.1 烟草的处理方法

用电击法分别将质粒 pER8-GFP、pER8-MET1 转入农杆菌 LBA4404,得到 1# 和 2# 菌株;在含 Rif (50 μg · mL⁻¹) 和 Spectinomycin (50 μg · mL⁻¹) 的 YEP 培养基中培养,于 28 °C,200 r · min⁻¹ 培养直至 OD₆₀₀ 为 0.4 ~ 0.6。先用 1# 农杆菌注射烟草叶片,26 °C 控湿培养箱中培养 12 h,再用 17-β-雌二醇涂抹烟草叶面,浓度处理分别为 0 (CK)、0.008、0.2、1、5、25、50、100 和 200 μmol · L⁻¹,12 h 之后打孔取

叶片,每个处理3次重复,每次重复取样约100 mg,立即投入液氮中,保存于 -80°C 冰箱中(下同)。以 $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 17- β 雌二醇处理烟草叶面,于0(CK)、0.5、1、3、6、12、24、48、96 h后取样。

用2#农杆菌注射烟草叶片,以 $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 17- β 雌二醇处理,分别于0(CK)、1、6、12、24、48 h后打孔取叶片,检测并验证雌激素激活系统对 *MET1* 基因的表达调控。

1.3.2.2 总 RNA 提取及 cDNA 合成

使用 Qiagen 公司 RNeasy Plant Mini Kit 试剂盒提取不同处理的叶片总 RNA,用 NaNo Drop 8000 分光光度计测 RNA 的浓度和纯度。采用 Reverse transcriptase-PCR 方法合成 cDNA 具体反应过程参照 Promega 公司的说明书进行。

1.3.2.3 实时定量 PCR (Real-time quantitative PCR, qPCR) 反应

以获得的不同处理的烟草叶片的 cDNA,稀释10倍作为模板,采用 Roche LightCycle 480 II 型荧光定量 PCR 仪进行 qPCR 反应。以 Actin 为内参基因,定量引物在 primer5.0 中设计(表1)。应用 $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$ 算法进行分析^[14]。

2 结果与分析

2.1 拟南芥 *MET1* 基因化学诱导表达载体的构建

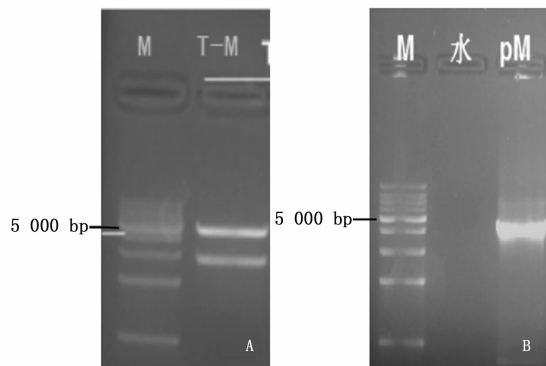
用带有酶切位点的全长引物扩增 pBsCM-Y28 质粒,获得 *MET1* 全长基因,连入 pMDTM19-T-vector,经过 PCR、双酶切和测序验证。结果表明,插入

表1 qPCR 引物序列

基因	扩增长度/bp	qPCR 引物序列
<i>MET1</i>	235	F: 5' - AATGGTGGAAAATGGGGCTA - 3' R: 5' - AACATCAGTTTCCAGAGCCGT - 3'
<i>GFP</i>	166	F: 5' - TGTTCCATGCGCAACACTTG - 3' R: 5' - ACGTGTCTTGTAGTTCCCGT - 3'
<i>Actin</i>	195	F: 5' - TGTGTGGACTCTGGTGATG - 3' R: 5' - CGCTCGGTAAGGATCTTCATC - 3'

片段大小正确,为4 605 bp(图2A)。测序结果表明,核酸序列与 GenBank 中 NM_124293 的碱基序列发生一个同义突变,密码子 GTT→GTC,并不影响蛋白的表达。此结果证明了 *MET1* 基因核酸序列的正确性。然后,用 *Xho* I 和 *Spe* I 双酶切 pMDTM19-T-MET1 质粒和 pER8-GFP 质粒,胶回收后用 T4 连接酶将 *MET1* 片段连入 pER8 载体中,获得 pER8-MET1 植物表达载体。PCR 验证结果表明,扩增片段大小约为4 605 bp + 36 bp,与预测长度、插入位点

相符,*Xho* I 和 *Spe* I 为插入位点(图2B)。将构建的 pER8-MET1 载体转入农杆菌后用于 *MET1* 诱导表达特性分析。



A 中间载体 pMDTM19-T-MET1 的双酶切验证 M:1kb Marker, T-M:MDTM19-T-MET1 质粒的酶切条带。B 重组质粒 pER8-MET1 的 PCR 检测 M:1kb Marker,阴性对照;以 H_2O 为模板的 PCR 产物, pM:以 pER8-MET1 质粒为模板的 PCR 产物。

图2 重组载体 pER8-MET1 的构建

2.2 植物表达载体 pER8-MET1 诱导表达特性分析

2.2.1 最佳诱导剂浓度及诱导时间的确定 将含有 pER8-GFP 质粒的 LBA4404 菌株注射到烟草中,共培养12 h后检测不同浓度17- β -雌二醇处理下 *GFP* 基因的表达情况。结果表明,pER8-GFP 载体对17- β -雌二醇依赖性表达,并且随着17- β -雌二醇浓度增加,*GFP* 的表达量逐渐增加,17- β -雌二醇浓度达到 $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 后,*GFP* 的表达量增加趋势趋于平缓,即最佳诱导剂浓度为 $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ (图3A)。

为了检测在烟草瞬时表达体系中 XVE 系统的目的基因表达水平随17- β -雌二醇处理时间变化的趋势,用 $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的17- β -雌二醇处理共培养后的烟草叶片,处理时间分别为0、0.5、1、3、6、12、24、48、96 h。所取叶片,提取 RNA 和反转录并进行 qPCR,结果表明,随着17- β -雌二醇处理时间的增加,*GFP* 的表达量逐渐增加,12 h 时表达量最大,之后逐渐降低(图3B)。

2.2.2 植物表达载体 pER8-MET1 中 *MET1* 的诱导表达特性分析 在以上研究的基础上,我们采用 qPCR 技术,对 $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的17- β -雌二醇处理下的烟草叶片中 *MET1* 基因的诱导表达特性进行了研究。结果表明, $50\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 的17- β -雌二醇也能有效诱导 *MET1* 基因的表达,处理1 h后 *MET1* 基因即有较高的表达量,处理12 h时,*MET1* 表达量最高,之后缓慢降低(图4)。*MET1* 基因在烟草瞬时表达

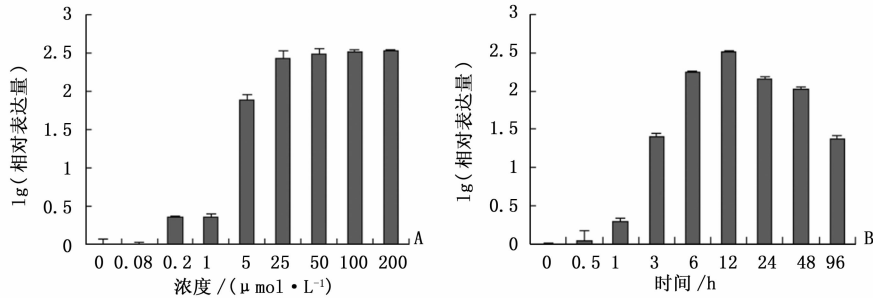


图3 雌激素激活表达载体 pER8-GFP 对 17- β -雌二醇浓度和处理时间的响应

系统中的诱导表达模式与 pER8-GFP 载体中 GFP 基因相似,但表达量较 GFP 要低。

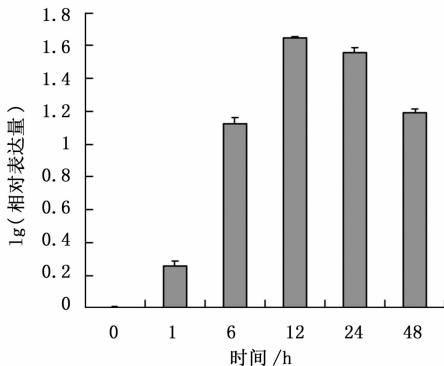


图4 雌激素激活系统中 *MET1* 的诱导表达检测

3 讨论

为了更加深入的研究 *AtMET1* 在 DNA 甲基化过程中的作用,选用雌激素激活系统构建了受 17- β -雌二醇诱导表达的 pER8-MET1 双元载体,并利用烟草的瞬时表达技术和 qPCR 技术,检测了该系统中 *MET1* 随 17- β -雌二醇处理条件变化的趋势。结果表明,诱导剂 17- β -雌二醇能有效诱导 *MET1* 的表达,最佳诱导剂浓度为 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$,处理 12 h 后表达量最高。Zuo 等^[13]在拟南芥转基因植株中研究发现,17- β -雌二醇处理浓度为 $5 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 、处理时间为 24 h 时,XVE 系统中目的基因表达量最大。而本研究中 17- β -雌二醇浓度提高到 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,目的基因表达量才能达到最大,可能是因为本研究中诱导剂处理的方法为叶片涂抹法,诱导剂容易挥发导致处理浓度降低;而拟南芥转基因研究中诱导剂处理的方法为根部吸收,这更有利于为植物提供稳定的诱导条件^[14]。本研究中 17- β -雌二醇处理 12 h 后即可诱导目的基因的表达水平达到最高,原因可能是恒定表达与瞬时表达转基因方法不同所致^[15]。本研究还发现,雌激素激活系统对 GFP 基因

和对 *MET1* 基因的调控水平也有差异,可能是由于目的基因片段大小不同导致转化效率的差异所引起的^[16]。

在烟草的瞬时表达体系中,农杆菌的孵育时间以及表达后检测时间等问题会影响表达的水平。孵育时间即为,植物感染农杆菌后外源基因在宿主细胞内瞬时表达,直到取样检查的一段时间。若要取得较好的表达效果,这段时间不能过长或过短,时间过短,外源基因还未开始表达或者表达量不够;时间过长,表达产物由于降解而得不到理想效果。研究表明,在烟草的瞬时表达体系中,12 h 的共培养时间即可使 T-DNA 达到较高的表达水平,孵育时间 48 h 左右表达量达到最高^[17-19]。在本研究中,分析载体对诱导剂浓度响应的取样时间为 24 h,分析载体随着诱导剂处理时间诱导表达变化的取样时间为 12 ~ 96 h。通过激光共聚焦显微镜观测,该时间段内荧光信号产生规律性变化与 qPCR 的结果相符。本研究为下一步获得转基因植株,通过分子手段培育变异植株以及抗性育种提供重要的理论基础和技术支撑。

4 结论

在植物中,主要存在三种甲基化模式,发生的位点分别为:CG、CHH 和 CHG(H 为 C、A、T 中的任意一个)。其中 CG 位点的甲基化模式占主导地位,它的甲基化水平主要由 *MET1* 维持。*MET1* 的活性受到影响后,植物的 DNA 甲基化水平发生改变,并能诱导一系列的表型变异。本研究构建了 *MET1* 的化学诱导表达载体,并且筛选出了诱导剂的处理条件与 *MET1* 表达量之间的关系,即最适 17- β -雌二醇浓度为 $50 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$;诱导处理后目的基因表达量逐渐升高,12 h 后达到最高。为进一步的转基因实验奠定了基础,同时对研究 *MET1* 的调控与表型变异之间的相互关系具有重要意义。

参考文献:

- [1] Lukens L N, Zhan S. The plant genome's methylation status and response to stress: implications for plant improvement[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2007, 10(3): 317-322.
- [2] Jullien P E, Mosquana A, Ingouff M, *et al.* Retinoblastoma and its binding partner MSI1 control imprinting in *Arabidopsis*[J]. *PLoS Biol*, 2008, 6(8): e194.
- [3] Finnegan E J, Dennis E S. Isolation and identification by sequence homology of a putative cytosine methyltransferase from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21(10): 2383-2388.
- [4] Finnegan E J, Peacock W J, Dennis E S. Reduced DNA methylation in *Arabidopsis thaliana* results in abnormal plant development[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 1996, 93(16): 8449-8454.
- [5] Kato M, Miura A, Bender J, *et al.* Role of CG and non-CG methylation in immobilization of transposons in *Arabidopsis* [J]. *Current Biology*, 2003, 13(5): 421-426.
- [6] López-Maury L, Marguerat S, Bähler J. Tuning gene expression to changing environments: from rapid responses to evolutionary adaptation[J]. *Nature Reviews Genetics*, 2008, 9(8): 583-593.
- [7] Kankel M W, Ramsey D E, Stokes T L, *et al.* *Arabidopsis* MET1 cytosine methyltransferase mutants[J]. *Genetics*, 2003, 163(3): 1109-1122.
- [8] Deleris A, Stroud H, Bernatavichute Y, *et al.* Loss of the DNA methyltransferase MET1 Induces H3K9 hypermethylation at PcG target genes and redistribution of H3K27 trimethylation to transposons in *Arabidopsis thaliana* [J]. *PLoS Genetics*, 2012, 8(11): e1003062.
- [9] Lira-Medeiros C F, Parisod C, Fernandes R A, *et al.* Epigenetic variation in mangrove plants occurring in contrasting natural environment[J]. *PLoS One*, 2010, 5(4): e10326.
- [10] Finnegan E J. Epialleles-a source of random variation in times of stress[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2002, 5(2): 101-106.
- [11] Deleris A, Stroud H, Bernatavichute Y, *et al.* Loss of the DNA methyltransferase MET1 Induces H3K9 hypermethylation at PcG target genes and redistribution of H3K27 trimethylation to transposons in *Arabidopsis thaliana*[J]. *PLoS Genetics*, 2012, 8(11): e1003062.
- [12] 庄晓英, 卢 钢, 曹家树, 等. 化学诱导表达系统及其在植物中的应用[J]. *细胞生物学杂志*, 2005, 27(4): 407-413.
- [13] Zuo J, Niu Q W, Chua N H. An estrogen receptor - based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants[J]. *The Plant Journal*, 2000, 24(2): 265-273.
- [14] Pfaffl M W, Horgan G W, Dempfle L. Relative expression software tool (REST[©]) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR [J]. *Nucleic acids research*, 2002, 30(9): e36-e36.
- [14] Martin L, Decourteix M, Badel E, *et al.* The zinc finger protein PtaZFP2 negatively controls stem growth and gene expression responsiveness to external mechanical loads in poplar[J]. *New Phytologist*, 2014, 203(1): 168-181.
- [15] Sparkes I A, Runions J, Kearns A, *et al.* Rapid, transient expression of fluorescent fusion proteins in tobacco plants and generation of stably transformed plants[J]. *Nature Protocols*, 2006, 1(4): 2019-2025.
- [16] 朱俊华, 竺晓平, 温孚江, 等. 马铃薯 Y 病毒衣壳蛋白基因片段长度对 RNA 介导抗病性的影响[J]. *中国科学: C 辑*, 2004, 34(1): 23-30.
- [17] 欧阳乐军, 黄真池, 沙月娥, 等. 植物病原菌诱导表达载体构建及在烟草中的瞬时表达研究[J]. *华北农学报*, 2013, 28(4): 41-45.
- [18] 吴英杰, 姜 波, 张 岩, 等. 农杆菌介导的烟草瞬时表达试验条件优化[J]. *东北林业大学学报*, 2010, 38(9): 110-112.
- [19] 谭小力, 诸葛锐军, 李冠英, 等. 农杆菌介导的油莱子叶瞬时表达[J]. *生物学杂志*, 2013, 29(6): 93-96.

(责任编辑:张 研)