

拟南芥 *HPT1*, *VTE3* 及 *VTE4* 基因启动子在逆境条件下的表达特性分析

齐圆晖^{1,2}, 范云六¹, 王磊¹

(1. 中国农业科学院生物技术研究所, 国家农作物基因资源与基因改良重大科学工程, 北京 100081;
2. 长春理工大学生命科学技术学院, 长春 130022)

摘要: 维生素 E 是一类人体所必需的脂溶性维生素, 具有重要的生理功能。尿黑酸叶绿醇转移酶 (HPT)、2-甲基-6-叶绿基-1,4-苯醌甲基转移酶 (MPBQMT/VTE3)、 γ -生育酚甲基转移酶 (γ -TMT/VTE4) 是维生素 E 生物合成途径中的关键酶。本研究对来自拟南芥的 *HPT1*, *VTE3*, *VTE4* 三个基因启动子在低温、高盐及无光等逆境条件下的表达特性进行了分析, GUS 组织化学染色结果表明: 低温条件下, *HPT1* 的表达降低明显, 高盐条件下, *HPT1* 的表达仅略有降低, 无光条件下 *HPT1* 在茎中的表达升高, 而根中的表达则降低; 低温条件下 *VTE3* 的表达没有变化, 高盐条件下则明显降低, 无光条件下 *VTE3* 在茎中的表达显著降低; 低温条件下 *VTE4* 表达略有升高, 高盐条件下其表达明显降低, 无光条件下 *VTE4* 在茎中的表达有所降低。说明拟南芥维生素 E 合成途径中的酶的表达受外界环境条件的影响。

关键词: 拟南芥; 维生素 E; 生育酚; 启动子; 表达

中图分类号: Q74 文献标识码: A 文章编号: 1008-0864(2008)02-0100-05

Analysis of Characterizations of *HPT1*, *VTE3* and *VTE4* Promoters in Transgenic *Arabidopsis* under Some Environmental Stress

QI Yuan-hui^{1,2}, FAN Yun-liu¹, WANG Lei¹

(1. Biotechnology Research Institute, National Key Facility for Crop Gene Resources and Genetic Improvement, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; 2. School of Life Science and Technology, Changchun University of Science and Technology, Changchun 130022, China)

Abstract: Vitamin E (Tocopherol) is a lipid-soluble antioxidant and essential for human health. Homogentisate phytyltransferase (HPT), 2-methyl-6-phytyl-1, 4-benzo-quinol methyltransferase (MPBQMT/VTE3) and γ -tocopherol methyltransferase (γ -TMT/VTE4) are three key enzymes involved in the tocopherol biosynthetic pathway in plants. In this study, the expression patterns of the promoters of *HPT1*, *VTE3* and *VTE4* from *Arabidopsis thaliana* were characterized respectively under some environmental stress conditions, such as low-temperature, high salt content and non-light. GUS staining showed that the expression of *HPT1* decreased dramatically at low-temperature and decreased slightly with high salt content. In the dark-grown transgenic seedlings, an evident expression shift was observed that there was an increase in hypocotyls, whereas a decrease in roots. The promoter of *VTE3* was not responsive to low temperature, but displayed a significant reduction of expression at high salt content, with less expression in hypocotyls under non-light. The expression of *VTE4* increased slightly at low-temperature, but decreased dramatically on high salt content condition, with a little of decrease in hypocotyls under non-light. The data showed that the above three genes involved in vitamin E pathway are regulated by environmental conditions.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; vitamin E; tocopherols; promoter; expression

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

收稿日期: 2008-01-25; 修回日期: 2008-03-04

基金项目: 国家 973 项目 (2007CB108801) 资助。

作者简介: 齐圆晖, 硕士研究生, 研究方向为植物分子生物学。E-mail: qiyuanhui@126.com。通讯作者: 王磊, 副研究员, 博士, 主要从事植物小 RNA 与基因表达调控和植物维生素 E 代谢工程方面研究。Tel: 010-62133870; E-mail: wanglei@caas.net.cn

同^[1,2]。尿黑酸叶绿醇转移酶(homogentisate phytyltransferase, HPT)是维生素 E 生物合成途径中的关键酶,处于维生素 E 生物合成的第一步,其作用是催化叶绿醇焦磷酸(phytyl-PP)与尿黑酸(HGA)的缩合,生成生育酚合成的公共中间体——2-甲基-6-叶绿醇苯醌(MPBQ),此产物由 MPBQ 甲基转移酶(2-methyl-6-phytyl-1,4-benzoquinol methyltransferase, MPBQMT/VTE3)催化生成 2,3-二甲基-6-叶绿醇苯醌(DMPBQ)^[3], DMPBQ 及 MPBQ 再由生育酚环化酶(tocopherol cyclase, VTE1)催化分别生成 γ -生育酚和 δ -生育酚^[4],二者再由 γ -生育酚甲基转移酶(γ -tocopherol methyltransferase, γ -TMT/VTE4)催化最终生成 α -生育酚和 β -生育酚^[5]。

α -生育酚大多存在于植物的绿色组织中,而 γ -生育酚大多在种子中发现。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 $\mu\text{g/g}$ 鲜重)。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 ~ 2 000 $\mu\text{g/g}$ 鲜重),而其中 α -生育酚的含量却比较低(84 ~ 200 $\mu\text{g/g}$ 鲜重),绝大多数为它的生物合成前体 γ -生育酚^[6]。Collakova 等^[7]在拟南芥中过表达 *HPT1*,转基因植株叶片总维生素 E 的含量比野生植株高出 4.4 倍,种子中总维生素 E 含量高出 40%,同时在拟南芥中过表达 *HPT1* 和 *VTE4* 基因,转基因拟南芥种子中总维生素 E 的活性提高了 12 倍。生育酚环化酶的活性在植物自然发育或胁迫过程中对生育酚合成没有明显影响。在转基因大豆中种子特异表达的 *VTE3* 基因,可使大豆中的 δ -生育酚由原来占总生育酚 20% 降低到占 2%, *VTE3* 突变体拟南芥种子中 δ -生育酚含量累积增加, γ -生育酚含量降低^[8]。所以,*HPT1*、*VTE3*、*VTE4* 表达及活性在决定植物维生素 E 的总含量和组成中起着重要作用。

在植物当中,生育酚的含量和组成在不同组织、不同发育时期、不同的逆境条件下会发生变化。在烟草中生育酚合成缺陷的植株对强光及光氧化逆境比野生型更为敏感^[9]。拟南芥中生育酚合成的突变对其光耐受性有些影响,但对光合作用没有显著的影响,推测是由于逆境处理条件不够理想,或者是其他的光保护机制补偿了生育酚的缺乏^[10]。但在马铃薯和玉米中如果缺乏生

育酚将导致光合产物的运输受阻^[11]。Michel 等^[12]利用拟南芥双突变体(*NPQ*, *VTE2*) 在强光、低温的强氧化逆境条件下对生育酚的功能进行了深入研究,结果表明 α -生育酚能够有效消除¹O₂,在保护和维持光合系统 II(PSII)的功能方面起着特殊的作用,一是保护 PSII 免受光抑制,二是防止脂膜的过氧化。还有研究表明在逆境和强光条件下拟南芥体内的生育酚总含量可升高 8 ~ 18 倍,细胞中相应的 *HPT1* mRNA 含量也明显增加,表明 *HPT1* 基因受逆境和强光信号诱导表达^[13]。本研究对拟南芥的 *HPT1*、*VTE3* 及 *VTE4* 启动子在逆境条件(低温、高盐、无光)下的表达特性进行了初步分析,研究了外界环境条件对维生素 E 在植物体内合成及含量的影响。

1 材料和方法

1.1 植物材料

拟南芥 *HPT1*、*VTE3* 及 *VTE4* 基因启动子转基因拟南芥(*Arabidopsis thaliana* ecotype Columbia)纯系种子 AtHPT1pro、AtVTE3pro 和 AtVTE4pro(各取 3 个转基因纯系),由中国农科院生物技术研究所在植物代谢工程实验室提供。

1.2 化学试剂

X-gluc 购自 Promega 公司;其他化学药品均为国产分析纯试剂。

1.3 拟南芥培养

称取 25 ~ 30 mg/1.5 mL 离心管的种子,加入 1 mL 含 0.05% 吐温 20 的 75% 乙醇,在摇床上约 250 rpm 振荡 10 min。短暂离心,吸去上清。加入 1 mL 95% 乙醇清洗一次,离心,再次移去乙醇(重复 1 ~ 2 次)。无菌条件下,每管加入 0.3 mL 100% 乙醇,用移液器把种子转移到灭菌滤纸上,吹干后均匀的撒在含有 50 mg · L⁻¹ 卡那霉素和 1% 蔗糖的 1/2 MS 培养基上。4℃ 春化 48 ~ 72 h。22℃, 16 h 光周期培养 12 d。

1.4 逆境处理

低温逆境处理:拟南芥在黑暗条件生长时每天在 4℃ 冰箱中培养 2 h。高盐处理:将正常生长状态下的拟南芥在染色以前在高浓度盐水(600 mmol · L⁻¹ NaCl 溶液)中浸泡 4 h。无光处理:在 22℃ 条件下连续暗培养 7 d。

1.5 GUS 染色

将转基因拟南芥植株在不同的逆境条件(低温、高盐、无光)下处理后,进行 GUS 染色(染色液成份:100 mmol · L⁻¹磷酸二氢钠、0.5 mmol · L⁻¹高铁氰化钾、0.5 mmol · L⁻¹亚铁氰化钾、1.0 mmol · L⁻¹ X-gluc, 50 mg · mL⁻¹ DMSO、0.1% Triton-100), 37℃, 过夜, 95% 乙醇脱色后, 在显微镜下观察(Nikon DIGITAL CAMERA Dxm 1200F)。

2 结果与分析

为了减少实验误差和转基因株系之间的差异, 每个转基因(AtHPT1pro、AtVTE3pro、AtVTE4pro)拟南芥中各选取有代表性的株系 3 个, 转基因株系经过低温、高盐、无光等逆境处理 7 d 后, 与正常条件下生长的转基因拟南芥同时进行 GUS 染色, 而后进行组织化学染色观察, 结果见图 1。

正常情况下, HPT1 基因启动子在根部具有很强的表达(图 1-A); 但在低温逆境条件下, GUS 根中的表达则明显降低, 尤其在根尖等幼嫩部分降低显著, GUS 染色几乎观察不到表达(图 1-B); 高盐处理以后, GUS 在根部的表达量同样降低(图 1-C); 在无光条件下经 7 d 暗培养后, GUS 在根部的染色也存在明显的降低, 说明光信号对 HPT1 在根部的表达有诱导作用, 但无光条件下 HPT1 在茎部的表达显著升高, 这与光照条件下茎部不表达的结果相反(图 1-D), 表明 HPT1 的表达在茎中受到光的抑制, 说明光信号对 HPT1 表达的影响在不同的组织部位可能存在相反的作用。

VTE3 基因启动子在正常生长的拟南芥叶片及茎中有较强的表达量, 但在根中几乎没有表达, 这与 HPT1 启动子的表达特性恰恰相反(图 1-E); 在低温逆境条件下, VTE3 启动子在根、叶和茎中的表达基本没有变化(图 1-F); 在高盐逆境条件下, 其在叶片和茎部组织表达有较明显的降低, 在根部组织出现微量的诱导表达(图 1-G); 在无光条件下, VTE3 启动子在茎部表达显著减少, 仅仅在靠近子叶部分的茎部有表达, 表明 VTE3 在茎中的表达受到光的诱导, 其在根部的表达没有发生变化(图 1-H)。

VTE4 基因启动子在正常生长的拟南芥中的表达与 VTE3 相似, 在叶片及茎中显著表达, 根中则没有表达(图 1-I); 在低温条件下, VTE4 在茎叶中的表达略有提高, 根中没有变化(图 1-J); 经过高盐处理以后, VTE4 在茎叶中的表达量显著降低, 而根中略有表达(图 1-K), 这与 VTE3 的表达特性基本一致。在无光培养条件下, VTE4 在茎部的表达量略有降低(图 1-L)。

上述结果表明, 在逆境条件处理下, 维生素 E 的含量和组成在环境应激下会发生明显变化, 说明维生素 E 合成途径中的关键酶基因的表达受低温、盐渍、光等环境条件的影响, 相比之下, 光信号除了对 HPT1 在茎中的表达有所抑制外, 对 3 个基因的表达均有明显的诱导作用, 高盐对 3 个基因表达的抑制作用比较明显, 而低温对 3 个基因表达的影响比较弱。

3 讨论

生育酚具有一个疏水侧链和一个芳香环的极性头部, 当它们参与膜组成时, 其疏水侧链插入膜脂双分子层的疏水核心, 而极性头部则保留在膜脂的表面。生育酚能有效清除脂类过氧化物及单线态氧等自由基, 使膜免受脂类过氧化物的伤害, 维护生物膜的完整性^[6]。

在正常生长条件下 HPT1 启动子在拟南芥的根中活性最高, 其次是在成熟叶片的叶脉, 花丝, 雌蕊等处有些表达, 茎中没有表达^[14], 表明其主要是在植物的非绿色部位表达; 而 VTE3 和 VTE4 启动子主要在拟南芥子叶、茎、果荚等组织中高表达, 根中几乎不表达^[15-17], 说明二者主要在植物的地上(尤其是绿色组织中)表达。在本研究中的暗培养条件下, HPT1 在茎中有明显表达(图 1-A), 而正常生长条件下茎中基本没有表达, 这与 HPT1 主要在植物的非绿色部位表达的结果相一致, 表明 HPT1 在茎中的表达很可能受到光的抑制; 黑暗条件下 VTE3 在茎中的表达显著降低(图 1-H), VTE4 的表达也有所降低, 这与二者主要在植物的绿色组织中表达的结果相一致, 说明二者在茎中的表达可能受到光的诱导, 启动子序列分析也表明二者含有大量的光调控相关元件。

生育酚在体内的主要功能是抗氧化性, 清除体内单线态氧^[1]。在强光逆境条件下, 植株中维

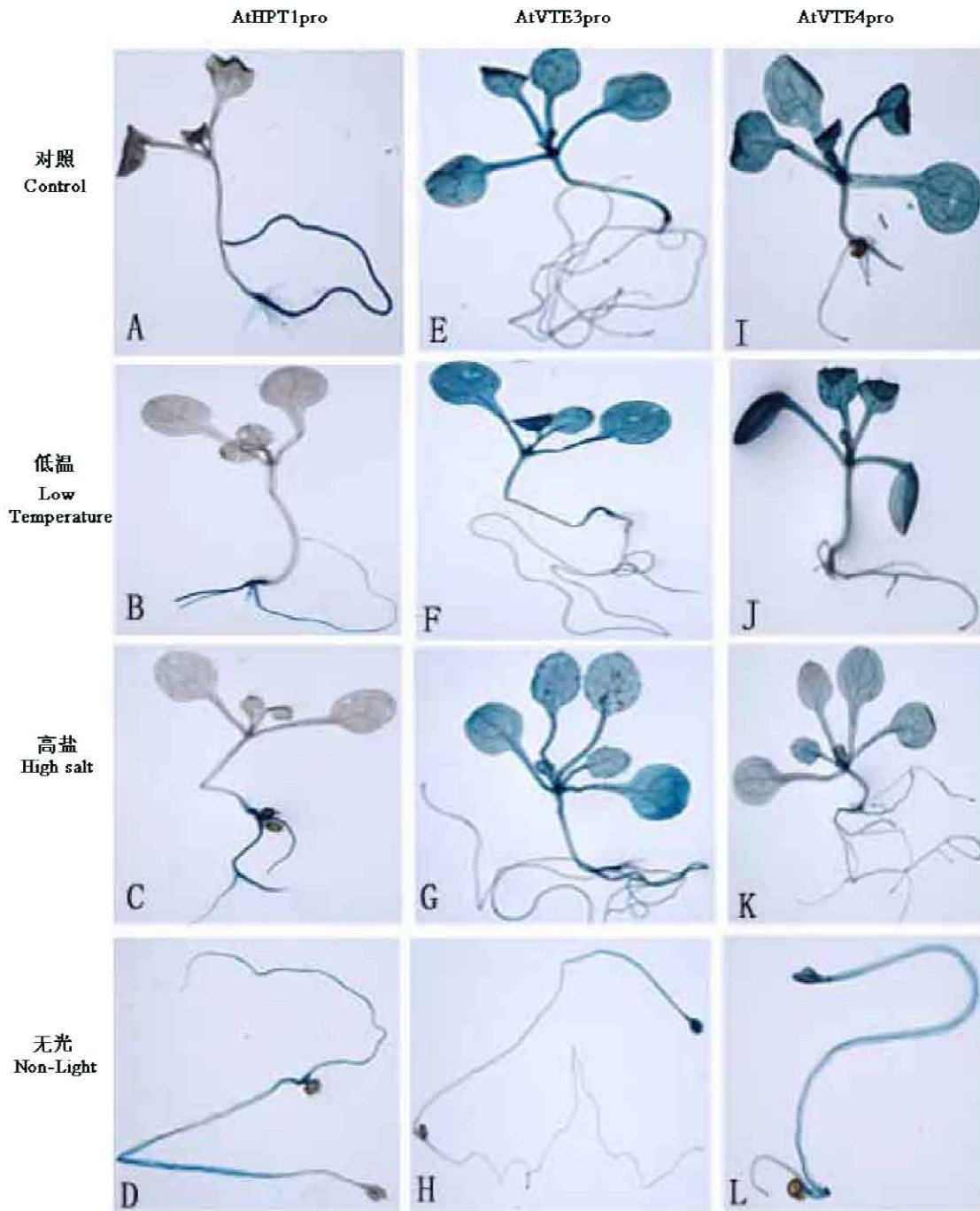


图 1 转 *HPT1*, *VTE3*, *VTE4* 基因启动子拟南芥在低温、高盐及无光条件的 GUS 表达分析

Fig. 1 GUS-staining patterns in transgenic *Arabidopsis* at low temperature, high salt and non-light.

生素 E 的总含量有显著的提高,控制维生素 E 合成总量的关键酶基因的 mRNA 表达量和酶活性也有显著的提高,其中 *HPT1* 基因的 mRNA 表达量提高近 20 倍,酶活性提高近 6 倍,说明强光可以诱导维生素 E 合成的关键酶基因的表达,这与维生素 E 的抗氧化功能是相偶联的^[13]。本研究

中 *HPT1* 在无光条件下,其根中的表达量降低,表明 *HPT1* 在根中的表达很可能受光信号的诱导,*HPT1* 在强光条件下的表达特性还有待进一步研究。

据报道,在低温逆境条件下野生型拟南芥相对于正常条件,其体内的生育酚含量明显提

高^[19];在高盐逆境条件下,野生烟草体内的生育酚含量有明显提高^[20],说明在低温和高盐逆境条件下,*HPT1*的活性升高。但在本研究中*HPT1*在低温和高盐条件下的表达没有发生明显的变化,考虑到拟南芥有2个*HPT*基因,也许*HPT2*受低温和高盐逆境的诱导表达,另一种可能是低温和高盐条件下,*HPT1*酶本身的稳定性或活性提高,其具体原因还有待研究。

根据拟南芥的基因表达谱数据库^[18],*HPT1*基因在衰老的时候表达量最高,在低温时表达量降低,在高盐逆境诱导下表达量提高,这与本研究中低温下GUS表达降低的结果相一致,但是在高盐浓度下本研究中GUS表达含量有微弱的降低,这也许与生长的条件、胁迫的强度或生长时期的差异有关;表达谱数据库中*VTE3*在高盐条件下表达量降低,*VTE4*表达量显著降低,本研究也证实了这一点。在低温诱导下,*VTE3*和*VTE4*的表达量基本没有变化,本研究结果与表达谱数据库数据基本一致。此外表达谱数据库中*HPT1*、*VTE3*和*VTE4*的表达还受到干旱、激素(乙烯、脱落酸、赤霉素、生长素)、创伤以及病原反应等逆境条件的诱导表达^[18],说明维生素E在植物对生物逆境和非生物逆境的应答过程中均有一定的作用。

参 考 文 献

- [1] Bramley P M, Elmadfa I, Kafatos A, *et al.*. Vitamin E[J]. J. Sci. Food Agric., 2000, 80: 913 - 938.
- [2] Kamal-eldin A. The chemistry and antioxidant properties of tocopherols and tocotrienols[J]. Lipids, 1996, 31: 671 - 701.
- [3] Shintani D, Cheng Z D. The role of 2-methyl-6-phytylbenzoquinone methyltransferase in determining tocopherol composition in *Synechocystis* sp. PCC6803[J]. FEBS Lett., 2002, 511(1): 1 - 5.
- [4] Porfirova S, Bergmuller E, Tropf S, *et al.*. Isolation of an *Arabidopsis* mutant lacking vitamin E and identification of a cyclase essential for all tocopherol biosynthesis[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002, 99: 12495 - 12500.
- [5] Shintani D, Dellapenna D. Elevating the vitamin E content of plants through metabolic engineering[J]. Science, 1998, 282: 2098 - 2100.
- [6] Grusak Ma D. Improving the nutrient composition of plants to enhance human nutrition and health[J]. Annu. Rev. Plant Physiol. Plant Mol. Biol., 1999, 50: 133 - 161.
- [7] Collakova E, Deuapenna D. Homogentisate phytyltransferase activity is limiting for tocopherol biosynthesis in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2003, 131(10): 632 - 642.
- [8] Alison L., Van Eenennaam. Engineering vitamin E content: from *Arabidopsis* mutant to soyoil[J]. The Plant Cell, 2003, 15: 3007 - 3019.
- [9] Havaux M, Grimm B. Chloroplast membrane photostability in *chlP* transgenic tobacco plants deficient in tocopherols [J]. Plant Physiol., 2003, 132: 300 - 310.
- [10] Porfirova S, Bergmuller E, Tropf S, *et al.*. Isolation of an *Arabidopsis* mutant lacking vitamin E and identification of a cyclase essential for all tocopherol biosynthesis[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 2002, 99: 12495 - 12500.
- [11] Hofius D, Hajirezaei M R, Geiger M, *et al.*. RNAi-mediated tocopherol deficiency impairs photoassimilate export in transgenic potato plants [J]. Plant Physiology, 2004, 135: 1256 - 1268.
- [12] Havaux M, Eymery F, Porfirova S, *et al.*. Vitamin E protects against photoinhibition and photooxidative stress in *Arabidopsis thaliana* [J]. The Plant Cell, 2005, 17(12): 3451 - 3469.
- [13] Collakova E, Dellapenna D. The role of homogentisate phytyltransferase and other tocopherol pathway enzymes in the regulation of tocopherol synthesis during abiotic stress [J]. Plant Physiol., 2003, 133: 930 - 940.
- [14] 朱永兴, 王 磊, 张 兰, 等. 拟南芥尿黑酸卣绿醇转移酶(*HPT*)基因启动子的分离及表达特性分析[J]. 作物学报, 2007, 33: 554 - 559.
- [15] 刘 宾, 王 磊, 杨娇艳, 等. 拟南芥 2-甲基-6-卣绿基-1,4-苯醌甲基转移酶启动子在转基因烟草中的表达特性分析[J]. 中国农学通报, 2007, 23: 33 - 37.
- [16] 周 建, 王 磊, 杜进民, 等. 拟南芥 γ -生育酚甲基转移酶(*AtG-TMT*)启动子的分离及表达特性分析[J]. 生物工程学报, 2006, 22: 835 - 839.
- [17] 刘 宾, 王 磊, 杨娇艳, 等. 拟南芥 2-甲基-6-卣绿基-1,4-苯醌甲基转移酶启动子的分离与表达特性分析[J]. 生物工程学报, 2008, 24: 33 - 39.
- [18] Zimmermann P, Hirsh-Hoffmann M, Hennig L, *et al.*. *Arabidopsis* microarray database and analysis toolbox [J]. Plant Physiology, 2004, 136: 2461 - 2632.
- [19] Maeda H, Song W, Sage T L, *et al.*. Tocopherols play a crucial role in low-temperature adaptation and phloem loading in *Arabidopsis* [J]. The Plant Cell, 2006, 18: 2710 - 2732.
- [20] Abbasi A R, Hajirezaei M, Hofius D, *et al.*. Specific roles of α - and γ -tocopherol in abiotic stress responses of transgenic tobacco [J]. The Plant Physiology, 2007, 143: 1720 - 1738.