

利用烟草瞬时表达系统检测高等植物基因的剪接加工*

高少培^{1)**} 牛向丽^{2)**} 罗 笛¹⁾ 常丽娟¹⁾ 喻 旭¹⁾ 李欲翔¹⁾ 刘永胜^{1, 2)***}

(¹⁾ 四川大学生命科学学院, 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 成都 610064; ²⁾ 重庆大学农学及生命科学研究院, 重庆 400030)

摘要 解析基因的剪接加工机制是了解植物形态建成、生长发育和逆境胁迫应答的重要环节。与动物相比, 植物中相应的研究进展较为缓慢。利用农杆菌介导的烟草瞬时表达系统, 分别对单子叶植物水稻 *BADH2* 和双子叶植物拟南芥 *GR7* 基因片段在烟草叶片中的转录后剪接加工进行分析。结果表明, 一些重要剪接调控元件在植物中保守存在, 而烟草瞬时表达系统可以作为研究高等植物剪接调控的重要工具, 快捷灵敏地检测基因的剪接加工方式。

关键词 RNA 剪接, 烟草瞬时表达系统, 高等植物

学科分类号 Q5, Q7

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00735

基因的剪接加工机制是现代生物学研究的重要热点内容之一。1977 年, Sharp 和 Roberts 分别提出断裂基因的概念, 这一结论得到普遍认可, 并很快在其他真核基因中得到证实^[1]。真核生物基因由多个序列长短不一的内含子和外显子组成, 转录后生成前体 mRNA。前体 mRNA 通过剪接(splicing), 将内含子去掉、外显子连接在一起, 形成成熟 mRNA。1978 年, Gilbert^[2]提出一个基因的不同外显子可以按照不同的组合方式而形成不同的剪接产物, 即可变剪接(alternative splicing), 1980 年这一预测被 Choi 等^[3]证实。mRNA 的可变剪接使一个特定基因对应于不同的组织、发育阶段和外界生存条件, 通过剪接方式的调控变化而组合产生不同的 mRNA 及编码产物, 因而可以极大提高基因产物的多样性和功能的可塑性, 是存在于高等生物中的普遍现象。1989 年, Werneke 等^[4]报道植物 mRNA 的可变剪接现象, 此后的多项研究证实这一机制在植物中具有广泛的生理意义。如拟南芥 *FCA* 基因通过选择性剪接形成 α 、 β 、 γ 和 δ 4 种转录本, 其中只有 γ 可以编码全长基因产物, 而其他转录本对 γ 的丰度进行时空特异性调节, 调控着植物从营养生长向开花的转变^[5]。烟草花叶病毒的抗性 N 基

因可通过选择性剪接形成 N_L 和 N_S 两种产物, N_L 由于一个可变外显子的保留发生移码, 编码蛋白中丢失了 LRR(leucine-rich repeat)结构域的大部分, N_S 编码全长 N 蛋白, 具有不完全抗性, 当 N_L 和 N_S 同时存在时植株才表现出对病毒的完全抗性^[6]。水稻直链淀粉合成所必需的淀粉合成酶 *Waxy* 基因第 1 内含子剪接位点的碱基突变使其产生 Wx^a 和 Wx^b 两种转录本, 淀粉合成酶活性发生变化进而影响水稻胚乳中直链淀粉的含量和稻米品质^[7]。

已有的研究表明, 一些序列元件在剪接、可变剪接机制中发挥重要作用^[8-11], 如 U2 型内含子剪接识别位点 GT-AG、U12 型内含子剪接识别位点 AT-AC 是内含子剪接识别的最重要序列信号。此外, 外显子与内含子序列中还有大量剪接调控元件(splicing regulation elements, SRE)可以依据生物体

* 国家自然科学基金资助项目(30970260, 30971752, 30825030)和国家转基因专项课题资助项目(2009ZX08009-072B)。

** 共同第一作者。

*** 通讯联系人。

Tel: 028-85460570, E-mail: liuyongsheng1122@yahoo.com.cn

收稿日期: 2009-12-11, 接受日期: 2010-03-03

的内外生存环境变化促进、抑制剪接复合体的结合而调控基因的可变剪接。虽然基因剪接调控的重要性已受到广泛重视，但是由于剪接调控机制的复杂性，仍可能存在大量剪接调控元件及其机制有待发现，尤其是植物研究领域。本研究分别将单子叶模式植物水稻 *BADH2*(betaine aldehyde dehydrogenase 2, GenBank 登录号：AK071221)、双子叶模式植物拟南芥 *GR7*(glycine-rich RNA-binding protein 7, GenBank 登录号：AY042826)基因片段构建于 CaMV 35S 启动子驱动的 pHB-GUS 植物表达载体，并通过引物设计对这两个基因片段的一些剪接元件进行定点突变，利用农杆菌介导转化方法在烟草叶片中进行体内瞬时表达以检测这些元件对剪接的影响。另一方面，烟草瞬时表达系统因操作简单快捷而被用于外源重组蛋白瞬时表达以及启动子、转录因子活性鉴定和 RNA 干涉、植物病毒防御基因功能分析^[12-15]。本研究通过对一些典型剪接元件的突变分析检验该系统用于快速检测植物基因体内剪接方式的灵敏性。

1 材料与方法

1.1 植物材料及菌株

烟草(*Nicotiana tabacum* cv. Xanthinc)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana* line Columbia)、水稻(*Oryza sativa* cv. Nipponbare)在温室培养，生长条件为 22℃，昼夜 12 h/12 h，100 μmol/(m²•s)。生长至 6 周左右的烟草植株叶片用于农杆菌注射。植物表达载体 pHB-GUS、大肠杆菌 DH5α 菌株、农杆菌 EHA105 菌株均为本实验室保存。

1.2 主要试剂

T4 DNA 连接酶、限制性内切酶、pMD 18-T 载体、DNase、RNase H(Takara 公司)；DEPC、乙酰丁香酮(Sigma 公司)；Trizol(Invitrogen 公司)；第一链 cDNA 合成试剂盒(Toyobo 公司)；植物基因组提取试剂盒、质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒、RNA 纯化试剂盒(Omega 公司)；Taq DNA 聚合酶(天根生化科技有限公司)；Agrose(Spain 公司)。其他化学试剂均为国产分析纯。引物采用 Primer 5.0 设计(表 1)，由上海英骏生物技术有限公司合成。序列测定由上海英骏生物技术有限公司完成。

Table 1 Oligonucleotide primers for construction and detection

Primers	Sequences (5'→3')	The primer used for
B2F	CATAGTGACTGGATTAGTTCTG	Amplification of <i>BADH2</i> fragment
B2R	TCAACATCATCAAACACCACT	Amplification of <i>BADH2</i> fragment
GR7F	GACTGCCTTCGCTCAATACG	Amplification of <i>GR7</i> fragment
GR7R	GGCTTTCTCATCCTTGAAGG	Amplification of <i>GR7</i> fragment
B2F1	AAGCTTACCCTGGTGTAGACAAGCGACAG	Mutation at <i>BADH2</i> 5' splice site, gt→cg
B2R1	GGATCCACTCCCAGTAAATGCAACGCAACAG	Mutation at <i>BADH2</i> 3' splice site, ag→gc
5B2F1	AAGCTTACCCTGGTGTAGACAAGGTACAG	Control construct introduction
5B2F2	AAGCTTACCCTGGTGTAGACACGGTACAG	Mutation at <i>BADH2</i> 5' splicing boundary sequence, A→C
5B2F3	AAGCTTACCCTGGTGTAGACAATGTACAG	Mutation at <i>BADH2</i> 5' splicing boundary sequence, G→T
5B2F4	AAGCTTACCCTGGTGTAGACACTGTACAG	Mutation at <i>BADH2</i> 5' splicing boundary sequence, AG→CT
5B2R	GGATCCTCAACATCATCAAACACCACT	Construction <i>BADH2</i> 5' mutation minigenes
J5B2F	AAGCTTACCCTGGTGTAGAC	Determination splicing products from <i>BADH2</i> 5' mutation constructs
3B2F	AAGCTTCATAGTGACTGGATTAGTTCTG	Construction/determination of <i>BADH2</i> 3' mutation minigenes
3B2R1	GGATCCACTCCCAGTAAATGCAACCTAAC	Control construct introduction
3B2R2	GGATCCACTCCCAGTAAATGCAAGCTAAC	Mutation at <i>BADH2</i> 3' splicing boundary sequence, G→C
3B2R3	GGATCCACTCCCAGTAAATGCAGCCTAAC	Mutation at <i>BADH2</i> 3' splicing boundary sequence, T→C
3B2R4	GGATCCACTCCCAGTAAATGCAGGCTAAC	Mutation at <i>BADH2</i> 3' splicing boundary sequence, GT→CC
5LGR7F1	GCTCAATACGGCGACGTTATTGATTCCAAGGTC	Control construct introduction
5LGR7F2	GCTCAATACGGCGACGTTATTGATTCCACGGTC	Mutation at <i>GR7</i> 5' splicing boundary sequence, A→C
5LGR7F3	GCTCAATACGGCGACGTTATTGATTCCAATGTC	Mutation at <i>GR7</i> 5' splicing boundary sequence, G→T

Continued

Primers	Sequences (5'→3')	The primer used for
5LGR7F4	GCTCAATACGGCGACGTTATTGATTCCACTGTC	Mutation at <i>GR7</i> 5' splicing boundary sequence, AG→CT
5GR7R	GGATCCGGCTTTCTCATCCTTGAAGG	Construction <i>GR7</i> 5' mutation minigenes
5LGR7F0	AAGCTTGACTGCCTTCGCTCAATACGGCGACGTT	Elongation/determination of <i>GR7</i> 5' mutation constructs
5LGR7MF	GCTCAATACGGCGACGTTATTGATTCCAAGGTATGT	Mutation at <i>GR7</i> 5' splicing boundary sequence, C→A
5GR7F1	AAGCTTGTTATTGATTCCAAGGTCTGT	Control construct introduction
5GR7F2	AAGCTTGTTATTGATTCCACGGTCTGT	Mutation at <i>GR7</i> 5' splicing boundary sequence, A→C
5GR7F3	AAGCTTGTTATTGATTCCAATGTCTGT	Mutation at <i>GR7</i> 5' splicing boundary sequence, G→T
5GR7F4	AAGCTTGTTATTGATTCCACTGTCTGT	Mutation at <i>GR7</i> 5' splicing boundary sequence, AG→CT
J5GR7F	GAAGCTTGTTATTGATTCCA	Determination splicing products from <i>GR7</i> 5' mutation constructs
GUSR	CCTGCCCAACCTTTTCGGTAT	Detection primer designed from GUS gene sequence

1.3 载体质粒的构建、鉴定与转化

以水稻和拟南芥基因组 DNA 为模板, 用引物 B2F、B2R 和 GR7F、GR7R(表 1)分别扩增水稻 *BADH2* 基因片段(第 6 外显子第 61 碱基至第 8 外显子第 56 碱基, 460 bp, 图 1)和拟南芥 *GR7* 基因

片段(418 bp, 图 2), PCR 产物连接于 pMD 18-T 载体, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 将鉴定阳性克隆送测序, 测序正确克隆作为载体构建扩增模板备用. 设计对照、定点突变并带相应酶切位点的 PCR 特异引物(表 1)克隆目标片段, 将得到的 PCR 产物连接于 pMD18-T 载体, 经酶切和测序验证正确后, 从 pMD18-T 载体上酶切、回收, 连接于植物表达载体 pHB-GUS(图 3), 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 然后鉴定阳性克隆并抽提质粒. 将质粒通过冻融转化法导入农杆菌 EHA105 感受态细胞中, 鉴定农杆菌阳性克隆, 备用.

(a) CATAGTGACTGGATTGTTCTGAAGCCGGAGCTC
 CTTTGTGCATCACACCCTGGTGTAGACAAGgtacagcta
 ttctctctgtaatcatgtataccccaatggaatgatattctctcaata
 catggtttatgttttctgttagGTTGCATTTACTGGGAGTTATG
 AAAGTGGTAAAAAGATTATGGCTTCAGCTGCTCCT
 ATGGTTAAGgtttgtttccaaatttctgt/tatggttcgttttcttgaca
 gCCTGTTTCACTGGAAGTTGGTGAAAAAGTCCTA
 TAGTGGTGTGTTGATGATGTTGA

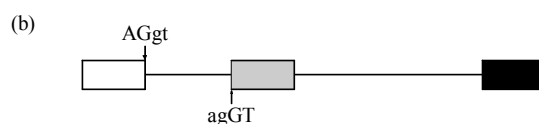


Fig. 1 Sequence and diagram of rice *BADH2* gene fragment

(a) Sequence of rice *BADH2* gene fragment. Introns and exons are indicated by uppercase and lowercase letters, respectively. Intron border sequences at splicing junctions tested here are underlined and the adjacent corresponding exon border sequences used for mutations are marked by asterisk. Interrupted lines represent the sequence not shown here. (b) Diagram of rice *BADH2* gene fragment. Introns and exons are indicated as lines and boxes, respectively. Exon/intron border sequences at splicing sites are indicated by uppercase and lowercase letters, respectively.

(a) GACTGCCTTCGCTCAATACGGCGACGTTATTGATT
 CCAAGGTCTGTACACGCCGAGATCGGACTCCG
 AGTGATAATCGATGATCTCATCCTCGACGGATCTGT
 TCCGATCTGTGTTTCTCTGTTACTTGATTTCGATTA
 CTCTGTTACTATTCTCGTTCCTTTGTTACTACTACTA
 CTACTACTGTTACTTGTATTTTCCCAATCGGTAC
 GTTCATCTTCCTGCTTCTGTGAGCCCGAGATCG
 ATCGGATTTTTTTGTATTTTGTATTTTGTGTAGAT
 CTAATGCTTTTGTTCAGTTTTGTGGATTGTTTTG
 CTGATCTGGTTTTTGTATTATTTGGATAACAGATCA
 TTAACGATCGTGAGACTGGAAGATCAAGGGGATT
 CGGATTCGTCACCTTCAAGGATGAGAAAGCC

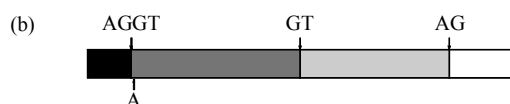


Fig. 2 Sequence and diagram of Arabidopsis *GR7* gene fragment

(a) Sequence of Arabidopsis *GR7* gene fragment. The 5' and 3' alternative splicing sites tested in this study are underlined, and the nucleotides used for mutations are marked by asterisk. (b) Diagram of Arabidopsis *GR7* gene fragment. The splicing sites as well as mutation sites in (a) are shown.

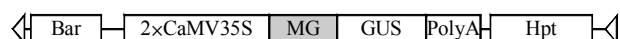


Fig. 3 Schematic diagram of T-DNA region of minigene construct

MG represents introduced gene fragments. Bar, Hpt indicate herbicide resistant gene and hygromycin phosphotransferase gene, respectively.

1.4 农杆菌介导烟草叶片瞬时转化

将已鉴定的农杆菌单克隆接种到 5 ml 含抗生素的 LB 培养基(10 g/L 蛋白胨, 10 g/L 氯化钠, 5 g/L 酵母提取物, 60 mg/L 利福平, 50 mg/L 卡那霉素) 28℃ 培养 20 h 后, 加至 50 ml 培养基(10 g/L 蛋白胨, 10 g/L 氯化钠, 5 g/L 酵母提取物, 10 mmol/L 2- 吗啉乙磺酸 (MES, pH 5.7), 20 μmol/L 乙酰丁香酮), 28℃ 培养 16~20 h 至 $A_{600} = 0.5$. 将菌液 4 000 r/min 离心 10 min, 用 50 ml 缓冲液(10 mmol/L 氯化镁, 10 mmol/L MES, 150 μmol/L 乙酰丁香酮)重悬, 室温放置至少 3 h. 以 3 ml 无菌医用注射器吸取菌液, 去除注射针头, 注射器尖端贴紧烟草叶片, 将菌液从下表皮缓缓注射进叶片中, 36~48 h 后注射叶片从烟草植株上取下^[15]. 注射实验重复 3 次.

1.5 烟草叶片总 RNA 提取和 cDNA 合成

取下的烟草叶片在液氮中快速研磨, 参照 Trizol 法提取总 RNA. RNA 以适量 DNase 37℃ 处理 30 min 后, 用纯化试剂盒进行 RNA 纯化. 取约 1 μg 总 RNA 合成第一链 cDNA, 反转录完成后加入 1 μl RNase H, 37℃ 处理 30 min, -20℃ 储存备用.

1.6 基因剪接结果检测

以 1 μl 烟草 cDNA 为模板, 分别用正向检测引物 J5B2F、3B2F、J5GR7F、5LGR7F0 和反向检测引物 GUSR 分析基因的剪接情况. PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 变性 40 s, 53~56℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 30~40 s, 30 个循环, 最后 72℃ 总延伸 10 min. 反应结束后, 取 5 μl PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测, 电泳结果用软件 AlphaImager(Alpha Innotec)进行分析, 并将 PCR 产物进行连接、测序.

2 结 果

2.1 水稻 *BADH2* 基因片段剪接加工分析

2.1.1 内含子 5'端剪接位点 gt 和 3'端剪接位点 ag

突变对剪接的影响. 已知的绝大部分 U2 型内含子剪接识别位点符合 gt-ag 规则, 如拟南芥的剪接位点生物信息学分析结果认为不符合这一规则的非标准剪接位点(noncanonical splice sites)仅占 0.7%^[11].

本实验中以已获得的水稻 *BADH2* 第 6 外显子~第 8 外显子(460 bp)基因组序列为模板, 利用引物 B2F1、B2R1 将第 6 内含子 5'、3'端剪接识别位点 gt 和 ag 分别突变为 cg 和 gc(图 4a), 并通过引物 5B2F1、3B2R1 扩增相应正常对照序列(外显子 6 第 108 碱基~外显子 7 第 18 碱基, exon 6. 108~exon 7. 18, 119 bp). 扩增片段经测序验证后分别构建于植物表达载体 pHB-GUS、转化 EHA105. 按上述方法平行注射烟草叶片, 以引物 J5B2F、GUSR 对注射叶片 cDNA 样品进行检测. 结果如图 4b 所示, 与正常对照(图 4b, 第 1 泳道)相比, *BADH2* 第 6 内含子 5'、3'端剪接识别位点 gt、ag 突变后内含子不能被有效识别, 在电泳(图 4b, 第 2 泳道)和随后的 PCR 产物连接、测序分析中均未能发现 *BADH2* 第 6 内含子正常剪接转录本, 说明 gt-ag 也是这一植物基因内含子的最基本识别信息.

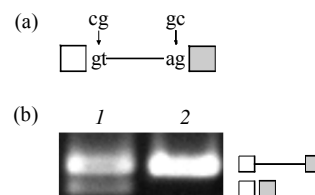


Fig. 4 Splicing alteration of rice *BADH2* intron 6 by mutation at 5' and 3' splicing site

(a) Structure of rice *BADH2* fragment tested. Exons and intron are indicated as boxes and line, respectively. The mutated nucleotides are shown at the intron borders. (b) Agarose gel electrophoresis analysis of RT-PCR amplification products derived from the transiently expressed minigene constructs in infiltrated tobacco leaves. 1: From the control minigene construct of *BADH2* fragment; 2: From the mutated minigene construct at both 5' and 3' splicing sites of *BADH2* intron 6. The structures of the PCR-amplified products are indicated on the right.

2.1.2 内含子 5'端和 3'端剪接识别位点 gt、ag 旁侧外显子碱基突变对剪接的影响.

在内含子剪接位点识别中, 除 gt、ag 二核苷酸外, 其邻近碱基也有一定的保守性. 通过对数据库中大量基因的生物信息学分析发现, 与脊椎动物相似, 在植物内含子 5'端、3'端分别是碱基 AG/gtaagt、cag/GT(斜线代表外显子、内含子交界)

出现的频率较高, 且越靠近 *gt*、*ag*, 碱基的保守性越强^[11]. 本实验通过引物设计(表 1)分别在 5'端、3'端对 *BADH2* 第 6 内含子 *gt*、*ag* 旁侧外显子碱基进行突变:

a. 利用引物 5B2F1-4、5B2R(exon 6. 108-exon 8. 56, 413 bp)分别构建 *BADH2* 第 6 内含子 5'端剪接供体位点 *gt* 上游碱基 AG 突变系列载体, 即对照、AG→CG、AG→AT、AG→CT, 而其他序列经测序验证保持不变(图 1、图 5). 将农杆菌阳性转化克隆分别平行注射烟草叶片, 以引物 J5B2F、GUSR 对注射叶片 cDNA 样品进行扩增检测. 结果如图 5b、c 所示: 与对照(图 5b, 第 1 泳道)相比, 5'端剪接识别位点 *gt* 旁侧外显子碱基 AG 突变使 *BADH2* 第 6 内含子未剪接转录本比例升高, 且突变碱基越靠近 *gt* 升高程度越大(图 5c, 未剪接/剪接转录本比例从左至右依次为 0.42、1.29、9.03、18.03).

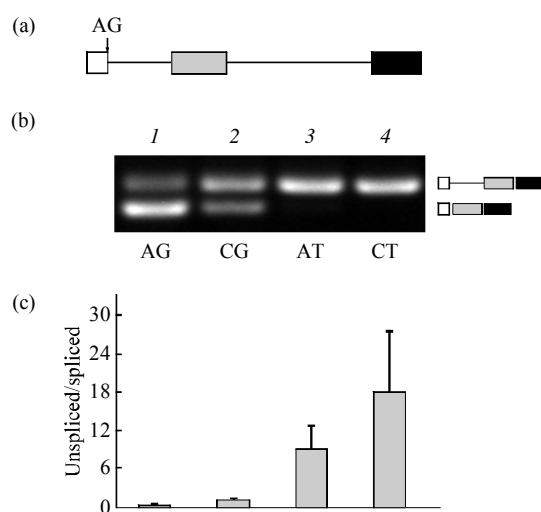


Fig. 5 Splicing alterations of rice *BADH2* intron 6 through mutation of the 5' splicing boundary sequence

(a) Structure of rice *BADH2* fragment tested in this study. Exons and introns are indicated as boxes and lines, respectively. The position of AG nucleotides used for mutations are shown. (b) Agarose gel electrophoresis analysis of RT-PCR amplification products derived from the transiently expressed minigene constructs in infiltrated tobacco leaves. Nucleotide mutations are indicated by uppercase letters at the bottom of each lane. 1: From the control; 2: From the mutation of AG→CG; 3: From the mutation of AG→AT; 4: From the mutation of AG→CT. The structures of the PCR-amplified products are indicated on the right. (c) Ratio of unspliced products to spliced products. Each bar represents three replications. Error bars represent standard errors.

b. *BADH2* 第 6 内含子 5'端序列不变, 利用引物 3B2F、3B2R1-4(exon 6. 61-exon 7. 18, 166 bp)分别构建 3'端剪接受体位点 *ag* 下游碱基 GT 突变系列载体, 即对照、GT→GC、GT→CT、GT→CC(图 1、图 6). 将农杆菌阳性转化克隆分别平行注射烟草叶片, 以引物 3B2F、GUSR 对注射叶片 cDNA 样品进行扩增检测. 结果如图 6b、c 所示: 与对照(图 6b, 第 1 泳道)相比, 3'端剪接识别位点 *ag* 旁侧外显子碱基 GT 突变使 *BADH2* 第 6 内含子未剪接转录本比例升高, 且突变碱基越靠近 *ag* 升高程度越大(图 6c, 未剪接/剪接转录本比例从左至右依次为 1.08、2.11、3.59、6.31).

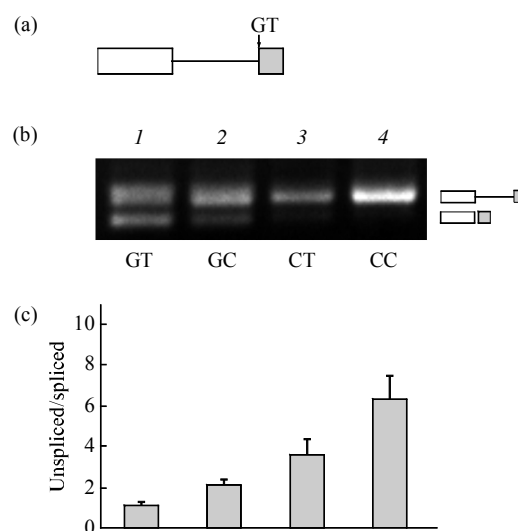


Fig. 6 Splicing alterations of rice *BADH2* intron 6 through mutations of 3' splicing boundary sequence

(a) Structure of the rice *BADH2* fragment tested. Exons and intron are indicated as boxes and line, respectively. The position of GT nucleotides used for mutations are shown. (b) Agarose gel electrophoresis analysis of RT-PCR amplification products derived from the transiently expressed minigene constructs in infiltrated tobacco leaves. Nucleotide mutations are indicated by uppercase letters at the bottom of each lane. 1: From the control; 2: From the mutation of GT→GC; 3: From the mutation of GT→CT; 4: From the mutation of GT→CC. The structures of the PCR-amplified products are indicated on the right. (c) Ratio of unspliced products to spliced products. Each bar represents three replications. Error bars represent standard errors.

2.1.3 基因片段长度对剪接的影响. 在上述 2.1.1 部分, 剪接位点突变对照载体(图 4a, exon 6. 108-exon 7. 18, 119 bp, 命名为 SWT)与 2.1.2 部分 3'端旁侧碱基突变对照载体(图 6a, exon 6. 61-exon 7. 18, 166 bp, 命名为 LWT)相比, 下游外显

子7序列相同,而上游外显子6序列LWT较SWT长47 bp,距离*BADH2*第6内含子5'端剪接位点分别为64 bp和17 bp(图7,基因片段结构简图所示)。将这两个载体农杆菌阳性克隆平行注射烟草叶片,对注射叶片cDNA样品进行扩增检测。结果如图7所示:与载体LWT(第2泳道)相比,载体SWT(第1泳道)的内含子6剪接效率降低,说明基因片段长度对剪接也有影响。另一方面,这两个载体烟草正常剪接转录本的存在也说明:虽然外显子序列最远端距剪接位点仅有十几个碱基,如载体SWT距*BADH2*第6内含子5'端剪接位点17 bp;载体SWT和LWT距第6内含子3'端剪接位点均为18 bp,也可以部分满足剪接复合体的结合需要,使剪接反应正常进行。

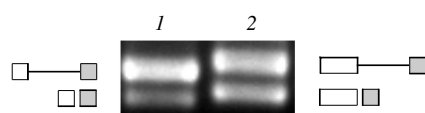


Fig. 7 Splicing analysis of rice *BADH2* intron 6 with different size

Agarose gel electrophoresis analysis of RT-PCR amplification products derived from the transiently expressed minigene constructs in infiltrated tobacco leaves. 1: From the expressed minigene constructed from 108th base of *BADH2* exon 6 to 18th of exon 7; 2: From the expressed minigene constructed from 61st base of *BADH2* exon 6 to 18th of exon 7. The structures of amplification products in lane 1 and lane 2 are explained on the left and right, respectively.

2.2 拟南芥 *GR7* 基因片段剪接加工分析

2.2.1 5'端剪接识别位点 gt 旁侧外显子碱基突变对剪接的影响。

为了试验烟草瞬时表达系统在检测其他植物基因剪接中的可行性,另选双子叶模式植物拟南芥 *GR7* 基因进行验证,该基因已在预实验中发现存在可变剪接产物(图2中划线部分标明其5'端可变剪接识别位点)。以 *GR7* 基因序列(418 bp)为模板,通过引物设计突变相应碱基序列构建植物表达载体。

a. 利用引物 5LGR7F1-4、5GR7R 获得 *GR7* 基因第1个5'端识别位点(图2)上游碱基 AG 突变扩增片段,即对照、AG→CG、AG→AT、AG→CT,然后4个扩增产物再分别用引物 5LGR7F0 向 *GR7* 基因5'端上游延伸,测序验证后构建突变系

列载体。将农杆菌阳性转化克隆平行注射烟草叶片,以引物 5LGR7F0、GUSR 对注射叶片 cDNA 样品进行扩增检测。结果如图8所示:与对照(图8b,第1泳道)相比,第1个5'端选择性识别位点上游碱基 AG 的突变很大程度抑制了从该位点的剪接,仅在 AG→CG 载体(图8b,第2泳道)测序结果中发现极少量选择这一5'端剪接位点的转录本。说明与上述水稻 *BADH2* 检测结果相似,拟南芥 *GR7* 基因5'端剪接位点上游碱基 AG 也在剪接中发挥作用。

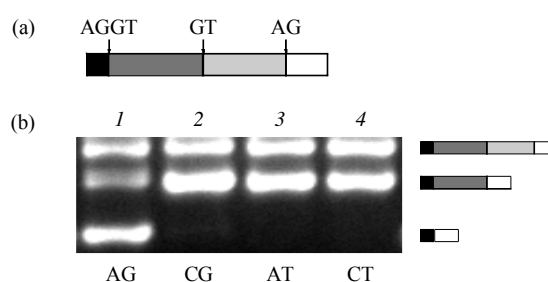


Fig. 8 Splicing alterations of *Arabidopsis GR7* fragment through mutations of 5' splicing boundary sequence

(a) Structure of the *Arabidopsis GR7* gene fragment tested. The 5' and 3' alternative splicing sites are indicated at GT and AG, respectively. Nucleotides used for mutations are shown by italic AG. (b) Agarose gel electrophoresis analysis of RT-PCR amplification products derived from the transiently expressed minigene constructs in infiltrated tobacco leaves. Nucleotide mutations are indicated by italic letters at the bottom of each lane. 1: From the control; 2: From the mutation of AG→CG; 3: From the mutation of AG→AT; 4: From the mutation of AG→CT. The structures of the PCR-amplified products are explained on the right.

b. 如上述,已知生物信息学分析结果表明5'端剪接识别保守序列为 AG/gtaag^[11](斜线代表外显子、内含子交界)。*GR7* 基因第1个5'端识别位点边界序列碱基为 AG/GTCTG(图2),利用引物 5LGR7MF 将识别位点下游碱基 C 突变为 A(图9a),然后扩增产物用引物 5LGR7F0 向 *GR7* 基因5'端上游延伸,测序验证后构建载体,与相应对照载体农杆菌阳性转化克隆平行注射烟草叶片,以引物 5LGR7F0、GUSR 对注射叶片 cDNA 样品进行扩增检测。结果如图9b所示,与对照(图9b,第1泳道)相比,这一碱基的点突变使该剪接位点的效率显著提高。

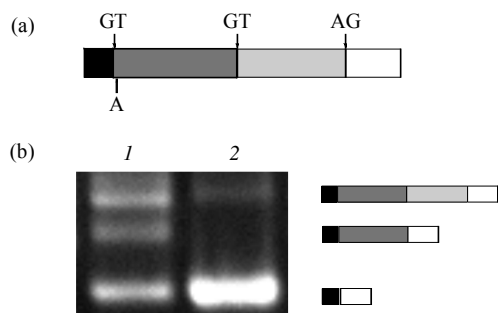


Fig. 9 Splicing analysis of *Arabidopsis* GR7 fragment through mutation of 5' splicing boundary sequence

(a) Structure of *Arabidopsis* GR7 gene fragment tested. The mutation site and alternative splicing sites are shown. (b) Agarose gel electrophoresis analysis of RT-PCR amplification products derived from the transiently expressed minigene constructs in infiltrated tobacco leaves. 1: From the control; 2: From the mutation of C → A. The structures of the PCR-amplified products are indicated on the right.

2.2.2 基因片段长度对剪接的影响. 当利用引物 5GR7F1-4、5GR7R 进行扩增、构建时, 所获得的 GR7 基因对照、AG→CG、AG→AT、AG→CT 载体系列与上述 2.2.1 部分载体系列相比, 差异仅在于上游序列距第 1 个 5'端剪接位点由 40 bp 缩短为 15 bp(表 1、图 2). 烟草瞬时表达检测结果显示: 对照载体(图 10b, 第 1 泳道)剪接主要发生于第 2 个 5'端识别位点(图 2, 第 207 个碱基), 对第 1 个

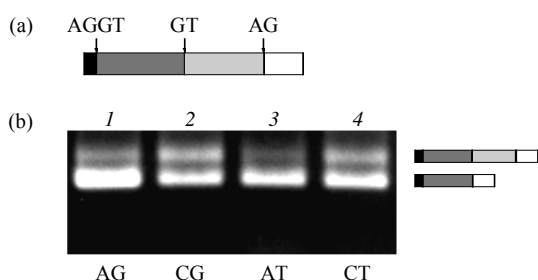


Fig. 10 Splicing alterations of truncated *Arabidopsis* GR7 fragment through mutations of 5' splicing boundary sequence

(a) Structure of *Arabidopsis* GR7 gene fragment tested. The alternative splicing sites are indicated, and the nucleotides used for mutations are shown by italic. (b) Agarose gel electrophoresis analysis of RT-PCR amplification products derived from the transiently expressed minigene constructs in infiltrated tobacco leaves. Nucleotide mutations are indicated by italic letters at the bottom of each lane. 1: From the control; 2: From the mutation of AG→CG; 3: From the mutation of AG→AT; 4: From the mutations of AG→CT. The structures of the PCR-amplified products are indicated on the right.

5'端剪接位点的识别被抑制. 而对第 1 识别位点上游碱基 AG 的突变也得到相似剪接加工结果, 在电泳(图 10b, 第 2~4 泳道)和随后的 PCR 产物连接、测序分析中均未发现识别第 1 个 5'端剪接位点的转录本.

3 讨 论

本实验中, 水稻 *BADH2* (betaine aldehyde dehydrogenase 2) 和拟南芥 *GR7* (glycine-rich RNA-binding protein 7) 基因是在前期研究结果^[16]中发现可进行剪接、可变剪接而随机选取的, 它们分别来源于单、双子叶模式植物, 说明该烟草系统可广泛应用于植物基因的剪接研究. 植物表达载体 pHB-GUS 中 *GUS* (β -glucuronidase) 基因的作用主要是: a. 提高剪接产物检测的特异性. 实验中所使用反向检测引物 GUSR 是基于植物外源 *GUS* 基因序列设计的特异引物, 因而可以尽量避免烟草内源非特异扩增产物的干扰. 在预试中对未转化烟草叶片样品进行相应检测引物 PCR 扩增未发现非特异产物. b. 方便剪接产物的检测. 检测所使用反向引物均为 GUSR, 可以为小的剪接产物片段(本实验中最短为 41 bp)提供骨架(*GUS* 基因扩增片段为 260 bp)以方便随后的琼脂糖凝胶电泳分析, 并保证同一突变系列不同载体检测的均一性. 另一方面, *GUS* 基因在植物基因剪接产物中的融合表达, 也可以为以后可变剪接产生不同编码产物的 Western blot 检测等提供便利.

在模式植物拟南芥和水稻中, 通过对已有的 EST、cDNA 序列分析发现, 可变剪接的发生率分别为 21.8% 和 21.2%^[17], 推测植物可能通过可变剪接调控蛋白质比率、分布、功能结构域以及磷酸化状态的改变等以适应发育需要和环境变化, 但对由此所产生的植物生理功能多样性的具体细节及其调控机制所知甚少. 早期对植物剪接的研究主要是通过获得检测基因片段的转基因植物后代, 或用电击等转化方法使检测基因在烟草、玉米质体中进行瞬时表达, 后又利用烟草叶片愈伤组织瞬时转化^[18], 这些方法主要缺点是耗时较长或操作不方便. 烟草叶片注射系统建立后多用于外源重组蛋白瞬时表达, 此后通过对绿色荧光蛋白、GUS 和荧光素酶等报告基因的表达检测, 该系统被进一步用于启动子、转录因子活性鉴定和 RNA 干涉、植物病毒防御基因功能分析^[12-15]. 在本实验中, 烟草叶片注射系统不需要昂贵的特殊试剂和培养条件, 从注射到

样品提取仅需 2~3 天, 可以灵敏地检测到单个碱基突变对剪接的影响(图 5、6、8、9), 并具有较好的重复性, 适合于检测植物基因的剪接调控。

动物基因可变剪接及其调控机制的研究远较植物丰富, 借助于细胞系培养及转染系统, 在动物的外显子与内含子序列中鉴定了大量剪接增强、抑制元件^[8-10]。可以预见, 植物基因外显子、内含子中也会存在许多剪接调控元件。在本实验载体构建过程中, 经测序发现了一些点突变基因片段, 所构建载体经烟草注射、检验后发现: 其中水稻 *BADH2* 基因外显子 6(124 bp)第 112 碱基突变(T→G), 与相应载体相比使第 6 内含子剪接效率降低(图 11, 第 2 泳道); 而 *BADH2* 内含子 6(84 bp)第 71 碱基突变后(a→g), 与相应载体相比其未剪接转录本比例增加(图 12), 表明植物外显子、内含子中一些序列元件对剪接有调控作用。

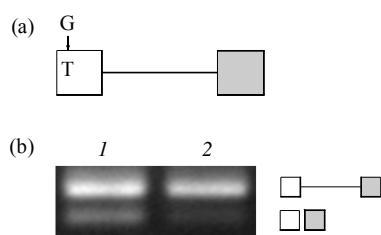


Fig. 11 Effects of point mutation in the rice *BADH2* exon 6 on downstream intron splicing

(a) Structure of rice *BADH2* fragment tested. Exons and intron are indicated as boxes and line, respectively. The mutation site is shown. (b) Agarose gel electrophoresis analysis of RT-PCR amplification products derived from the transiently expressed minigene constructs in infiltrated tobacco leaves. 1: From the control; 2: From the point mutation in exon 6. The structures of the PCR-amplified products are indicated on the right.

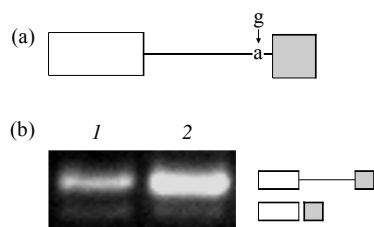


Fig. 12 Splicing alteration through point mutation in the rice *BADH2* intron 6

(a) Structure of rice *BADH2* fragment tested. Exons and intron are indicated as boxes and line, respectively. The mutation site is shown. (b) Agarose gel electrophoresis analysis of RT-PCR amplification products derived from the transiently expressed minigene constructs in infiltrated tobacco leaves. 1: From the control, 2: From the point mutation in intron 6. The structures of the PCR-amplified products are indicated on the right.

对于内含子剪接识别边界序列, 已有研究结果认为, 植物、动物基因剪接识别序列较为保守^[11]。利用人类基因剪接数据库(human splicing finder, <http://www.umd.be/HSF/HSF.html>)对本工作中选取的水稻 *BADH2* 基因外显子 6- 外显子 7 序列进行剪接位点预测, 结果表明预测剪接发生几率最大的位点正是经本实验验证的第 6 内含子剪接位点。在动、植物保守的剪接识别序列中, 5'端、3'端外显子 / 内含子交界序列出现频率最高的均为 AG/GT, 并且在本实验和其他已有报道中^[8, 11]显示这些碱基影响着剪接的效率。而本课题组在对水稻 *BADH* 等基因的研究中报道了短正向重复序列介导的转录后加工现象^[16], AGGT 是否是这种短正向重复序列的特例, 这两种剪接加工机制是否有关联, 将会是一个很有意义的研究课题。

参 考 文 献

- [1] Sharp P A. Splicing of mRNA precursors. *Science*, 1987, **235**(4790): 766-771
- [2] Gilbert W. Why genes in pieces. *Nature*, 1978, **271**(5645): 501
- [3] Choi E, Kuehl M, Wall R. RNA splicing generates a variant light chain from an aberrantly rearranged kappa gene. *Nature*, 1980, **286**(5775): 776-779
- [4] Werneke J M, Chatfield J M, Ogren W L. Alternative mRNA splicing generates the two ribulosebiphosphate carboxylase/oxygenase activase polypeptides in spinach and *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1989, **1**(8): 815-825
- [5] Quesada V, Macknight R, Dean C, *et al.* Autoregulation of FCA premRNA processing controls *Arabidopsis* flowering time. *EMBO J*, 2003, **22**(12): 3142-3152
- [6] Dinesh-Kumar S P, Baker B J. Alternatively spliced N resistance gene transcripts: their possible role in tobacco mosaic virus resistance. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, **97**(4): 1908-1913
- [7] Isshiki M, Morino K, Nakajima M, *et al.* A naturally occurring functional allele of the rice waxy locus has a GT to TT mutation at the 5' splice site of the first. *Plant J*, 1998, **15**(1): 133-138
- [8] Black D L. Mechanisms of alternative pre-messenger RNA splicing. *Annu Rev Biochem*, 2003, **72**: 291-336
- [9] Wang Z, Rolish M E, Yeo G, *et al.* Systematic identification and analysis of exonic splicing silencers. *Cell*, 2004, **119**(6): 831-845
- [10] Zhang C, Li W H, Krainer A R, *et al.* RNA landscape of evolution for optimal exon and intron discrimination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2008, **105**(15): 5797-5802
- [11] Reddy A S. Alternative splicing of pre-messenger RNAs in plants in the genomic era. *Annu Rev Plant Biol*, 2007, **58**: 267-294
- [12] Vaquero C, Sack M, Chandler J, *et al.* Transient expression of a tumor-specific single-chain fragment and a chimeric antibody in tobacco leaves. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**(20): 11128-11133

- [13] 张海文, 谢丙炎, 卢向阳, 等. 拟南芥防卫基因 PDF1.2 启动子中 GCC 盒是应答茉莉素反应必要的顺式作用元件. 科学通报, 2004, **49**(23): 2444–2448
Zhang H W, Xie B Y, Lu X Y, *et al.* Chin Sci Bull, 2004, **49**(23): 2444–2448
- [14] Yang Y, Li R, Qi M. *In vivo* analysis of plant promoters and transcription factors by agroinfiltration of tobacco leaves. Plant J, 2000, **22**(6): 543–551
- [15] Llave C, Kasschau K D, Carrington J C. Virus-encoded suppressor of posttranscriptional gene silencing targets a maintenance step in the silencing pathway. Proc Natl Acad Sci USA, 2000, **97** (24): 13401–13406
- [16] Niu X L, Zheng W J, Lu B R, *et al.* An unusual post-transcriptional processing in two betaine aldehyde dehydrogenase (*BADH*) loci of cereal crops directed by short-direct repeats in response to stress conditions. Plant Physiol, 2007, **143**(4): 1929–1942
- [17] Wang B B, Brendel V. Genomewide comparative analysis of alternative splicing in plants. Proc Natl Acad Sci USA, 2006, **103** (18): 7175–7180
- [18] McCullough A J, Lou H, Schuler M A. *In vivo* analysis of plant pre-mRNA splicing using an autonomously replicating vector. Nucleic Acids Res, 1991, **19**(11): 3001–3009

Application of Tobacco Transient Expression System to Detect Gene Splicing in Higher Plants*

GAO Shao-Pei¹⁾**, NIU Xiang-Li²⁾**, LUO Di¹⁾, CHANG Li-Juan¹⁾,
YU Xu¹⁾, LI Yu-Xiang¹⁾, LIU Yong-Sheng^{1, 2)}***

⁽¹⁾ Key Laboratory of Bio-resources and Eco-environment Ministry of Education, College of Life Science, Sichuan University, Chengdu 610064, China;

⁽²⁾ College of Agricultural and Life Sciences, Chongqing University, Chongqing 400030, China)

Abstract To dissect the splicing mechanism is a critical step in understanding the plant morphogenesis, growth, development and responses to stresses. Compared to animals, the research on RNA splicing is progressing poorly in plants. The splicing patterns of gene fragments derived from monocot rice *BADH2* and dicot *Arabidopsis GR7* were detected by Agrobacterium-mediated tobacco transient expression system. The results indicated that the fundamental splicing regulatory elements are conserved in plants. The tobacco transient expression system could be used as an important tool for fast and sensitive detection of gene splicing regulation in higher plants.

Key words RNA splicing, tobacco transient expression system, higher plants

DOI: 10.3724/SP.J.1206.2009.00735

*This work was supported by grants from The National Natural Science Foundation of China (30970260, 30971752, 30825030) and The National Mega-transgenic Project (2009ZX08009-072B).

**These authors contributed equally to this work.

***Corresponding author.

Tel: 86-28-85460570, E-mail: liuyongsheng1122@yahoo.com.cn

Received: December 11, 2009 Accepted: March 3, 2010