

花生ABI3同源基因的定位分析

郭晓芳^{1,2}, 严海燕^{1*}, 何骥¹, 李立家³, 陶勇¹, 曹进京³

(1. 中国科学院武汉植物园, 武汉 430074; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039; 3. 武汉大学生命科学院, 武汉 430072)

摘要: ABSCISIC ACID-INSITIVE3 (ABI3)、LEAFY COTYLEDON2 (LEC2) 和 FUSCA3 (FUS3) 转录因子在种子发育过程中发挥着重要的调控作用。采用 Northern 杂交技术, 用拟南芥 ABI3 保守的 B3 结构域部分序列作为探针分别与花生根、茎、叶、子叶 RNA 进行了杂交, 同时也对花生根、茎、叶、子叶(含胚)组织切片进行了原位杂交, 结果均显示只有在花生的子叶和胚中有杂交信号出现, 表明花生中可能存在 ABI3、FUS3 和 LEC2 的同源基因, 且它们只分布在花生的子叶和胚中。

关键词: ABI3; FUS3; LEC2; Northern 杂交; 原位杂交

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2006)01-0022-05

Localization Analysis of ABI3 Homologous Gene in Peanut

GUO Xiao-Fang^{1,2}, YAN Hai-Yan^{1*}, HE Ji¹, LI Li-Jia³, TAO Yong¹, CAO Jin-Jing³

(1. Wuhan Botanical Garden, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China; 2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China; 3. College of Life Sciences, Wuhan University, Wuhan 430072, China)

Abstract: Transcription factors ABSCISIC ACID-INSITIVE3 (ABI3), LEAFY COTYLEDON (LEC2) and FUSCA3 (FUS3) play important roles during seed development. The RNA extracted from peanut root, stem, leaf and developing cotyledon were hybridized by probe from the conserved B3 domain of *Arabidopsis* ABI3 protein. The micro sections of root, stem, leaf and developing cotyledon (including embryo) of peanut were also hybridized *in situ* with the same probe. The positive results of hybridization signals only in peanut cotyledon reveal that the homologous gene of ABI3, FUS3 and LEC2 may exist in peanut and they only distributed in the cotyledon and embryo of peanut.

Key words: ABI3; FUS3; LEC2; Northern hybridization; *In situ* hybridization

高等植物种子的发育可以粗略地分为形态建成阶段、成熟阶段和干燥休眠 3 个阶段, 在每一个阶段均有一些特定的基因或基因家族表达, 来调控种子的发育过程^[1]。ABI3/VP1、FUS3 和 LEC2 蛋白就是在种子发育过程中发挥着重要调控作用的转录因子。

拟南芥的 ABI3 调控胚发育过程中大批基因的表达, 在胚发育的中期和晚期阶段 ABI3 作为一个正调控因子起作用, 而在萌发阶段则起负调控作用。ABI3 位点的突变体胚形态上和野生型没有什么不同, 但往往导致不成熟绿色种子的产生, 这种种子对外源的脱落酸 (ABA) 不敏感, 且不能获得对干燥的抵抗力。此外, 突变体胚对许多种子特异性的转录物的积累也有负面影响^[2]。VIVIPAROUS1 (VP1) 是玉米胚成熟过程中的一个转录激活子, 是 ABI3 在玉米中的同源蛋白, 调控玉米胚的成熟过程^[3]。

ABI3/VP1 的同源基因也已在其他几种植物中发现, 如水稻、菜豆、燕麦、胡萝卜、白杨、小麦等^[4-9]。目前, 其在花生中的同源基因尚未见报道。对 ABI3 和 VP1 的蛋白序列分析后发现它们在 3 个区域有很高的相似性, 分别命名为 B1、B2 和 B3^[3,10], 水稻的 OsVP1 和菜豆的 PvAlf 蛋白也含有同样的同源区域 B1、B2 和 B3^[4,5]。从玉米 VP1 中分离出其 B3 结构域, 发现它在体外可以与 C1 基因启动子上的 Sph 基序 (含有 RY 元件) 特异性地结合^[11]。在烟草中, ABI3 可通过其 B box 和 RY 基序激活 napA 的表达^[12]。

拟南芥的 LEAFY COTYLEDON2 (LEC2) 基因和 FUSCA3 (FUS3) 是 ABI3 最近的同源基因。和 ABI3 一样, 它们参与调控种子发育过程。在早期阶段, LEC 基因决定着胚柄细胞的命运和子叶的特性; 在晚期阶段, LEC 基因的作用在于使种子获得抗干燥

收稿日期: 2005-06-30, 修回日期: 2005-11-02。

基金项目: 中国科学院武汉植物园创新基金 (08025125) 资助。

作者简介: 郭晓芳 (1981-), 女, 在读硕士研究生, 研究方向为植物遗传学。

* 通讯作者 (E-mail: hyyan@wbgras.cn)。

能力以及调控许多成熟特异性基因的表达^[13]。*FUS3* 基因在授粉 2 d 后开始表达,在中期胚发育阶段不久表达量达到顶峰^[2]。*fus3* 突变体和 *abi3* 突变体有着很相似但仍独特的表型,*fus3* 突变体的表型表现在无抗干燥能力、产生过量的花青素、缺乏几种贮藏蛋白的积累、在子叶上出现毛状体的发育以及激活分生组织形成过程中涉及到的转录因子的表达。这些均被认为是生长性特征,表明 *fus3* 突变体跳过了种子成熟这个发育阶段而直接进入了萌发阶段^[14]。遗传研究表明,ABI3、FUS3 和 LEC2 通过协同作用来调控种子成熟过程中的一些事件^[15]。FUS3 蛋白同样含有 B3 结构域,且 Reidt 等^[16]已证实成熟特异性基因启动子上的 RY 基序是 FUS3 蛋白的直接靶位点;Kroj 等^[17]也证明 LEC2 蛋白可以与拟南芥贮藏蛋白 *At2S3* 启动子上的 RY-G-Box 相互作用。

ABI3/VP1、LEC2 和 FUS3 转录因子并不仅限于在种子中发挥调控作用,Rohde 等^[8]在黑暗中诱导的拟南芥中发现 ABI3 在托叶、长角果的离层和芽尖也有表达,表明 ABI3 可能也参与芽的休眠;Rohde 等^[8]还从木本的白杨中分离到了 ABI3 的同源基因,这表明不同的物种中 ABI3、LEC2、FUS3 蛋白可能有不同的情况。在花生中是否也存在这些转录因子的同源基因及它们的分布情况,是了解花生种子发育和贮藏蛋白合成要解决的关键问题。本研究利用 ABI3 的 B3 结构域中和 VP1、LEC2、FUS3 相似

的一段序列做探针,进行了花生不同部位的定位表达研究。

1 材料与方法

1.1 材料

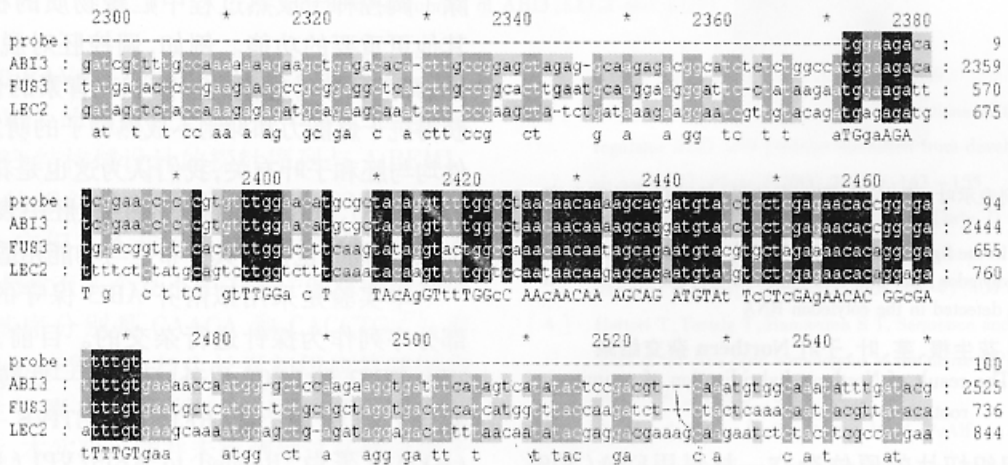
供试花生(*Arachis hypogaea* L.)品种为豫花 15 号。

发育中的子叶是取自果针入土后 30 ~ 40 d 的未成熟果实。一部分保存于 -80℃ 用于 Northern 杂交,另一部分固定包埋后保存于 -20℃ 用于原位杂交。

花生种子置于铺有几层吸水纸的 90 mm 培养皿中,保持适量水分,室温萌发并生长,分别剪取幼苗的根、茎、叶在液氮中速冻,用于提取 RNA,或直接用于固定包埋。

1.2 探针制备

根据 GenBank 中 ABI3 (NCBI 序列号: X68141) 的序列,选取其保守的 B3 结构域部分,设计了 100 bp 长的寡核苷酸探针,由北京奥科生物公司合成。此探针与 FUS3 和 LEC2 也有很高的相似性(见图 1),探针的序列为: TGG AAG ACA TCG GAA CCT CTC GTG TTT GGA ACA TGC GCT ACA GGT TTT GGC CTA ACA ACA AAA GCA GGA TGT ATC TCC TCG AGA ACA CCG GCG ATT TTG T,地高辛标记采用的是 Roche 公司的 DIG Random Labeling Mix 标记系统。

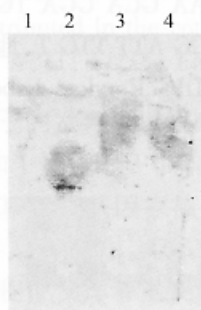


序列比对采用 GeneDoc 软件,ABI3、FUS3 和 LEC2 的 NCBI 序列号分别为: X68141、AF016265、NM102595;探针与 FUS3 的相似性为 72%,与 LEC2 的相似性为 63%
GeneDoc software is used for alignment,NCBI accession numbers of ABI3,FUS3 and LEC2 are X68141 AF016265 NM102595, respectively. Similarity between probe and FUS3 is 72%and similarity between probe and LEC2 is 63%

图 1 探针与 ABI3、FUS3、LEC2 的序列比对
Fig. 1 Alignment of probe and ABI3,FUS3 and LEC2 sequences

1.3 方法

(1) Northern 杂交 参照李菁芳等^[18]的方法分别提取根、茎、叶、子叶总 RNA。用 2.2 mol/L 的甲醛变性胶分离 RNA, 在 0.05 mol/L 的 NaOH 中处理 20 min 后上行毛细管法转移至硝酸纤维素膜上, 80℃ 真空烘烤 2 h, 固定 RNA^[19]。预杂交 1 h, 杂交 12 h (杂交液配方: 6 × SSC、5 × Denhardt's、0.5% SDS、50% 去离子甲酰胺、100 μg/mL 鲑鱼精子 DNA, 探针浓度为 25 ng/mL)。杂交完后浸入大体积的 2 × SSC、0.1% SDS 中室温洗膜 2 次, 每次 5 min, 然后将膜转移至预热到 50℃ 的 0.5 × SSC、0.1% SDS 中洗膜 2 次, 每次 15 min。1 × Blocking solution (Roche 公司) 中封闭 30 min, 用 1 × Blocking solution 按 1:5000 的比例稀释 anti-DIG-AP (Roche 公司), 室温反应 1 h。冲洗液 (0.1 mol/L 顺丁烯二酸、0.15 mol/L NaCl、pH 7.5、0.3% Tween-20) 中冲洗 2 × 15 min, 在显色缓冲液 (100 mmol/L Tris-HCl, 100 mmol/L NaCl, pH 9.5) 中平衡 5 min, 用显色缓冲液按照 1:50 的比例稀释 NBT/BCIP 显色液 (Roche 公司), 室温暗处显色 12 h, 用 TE 缓冲液 (10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol/L EDTA, pH 8.0) 浸泡 10 min 终止显色反应, 观察照相, 结果见图 2。



1、2、3、4 分别表示叶、子叶、根、茎杂交结果, 显示在子叶有杂交信号出现

1, 2, 3 and 4 in the figure show the result of Northern hybridization of peanut leaf, cotyledon, root and stem, respectively, and hybridization signal can be detected in the cotyledon RNA

图2 花生根、茎、叶、子叶 Northern 杂交结果

Fig. 2 The result of Northern hybridization of peanut root, stem, leaf and cotyledon

(2) 组织切片的原位杂交 材料用 FAA (50% 乙醇、5% 冰乙酸、3.7% 甲醛、41.3% DEPC 水) 固定 16 h, 经 50%、60%、70%、85%、95%、100% 系列酒精脱水, 然后经 25% 二甲苯: 75% 乙醇、50% 二甲苯: 50% 乙醇、75% 二甲苯: 25% 乙醇、90% 二甲苯: 10% 氯仿透明, 每级 30 min。浸蜡 12 h, 然后包埋蜡块。切片及原位杂交主要采用陈绍容等^[20-23]的方法

进行。

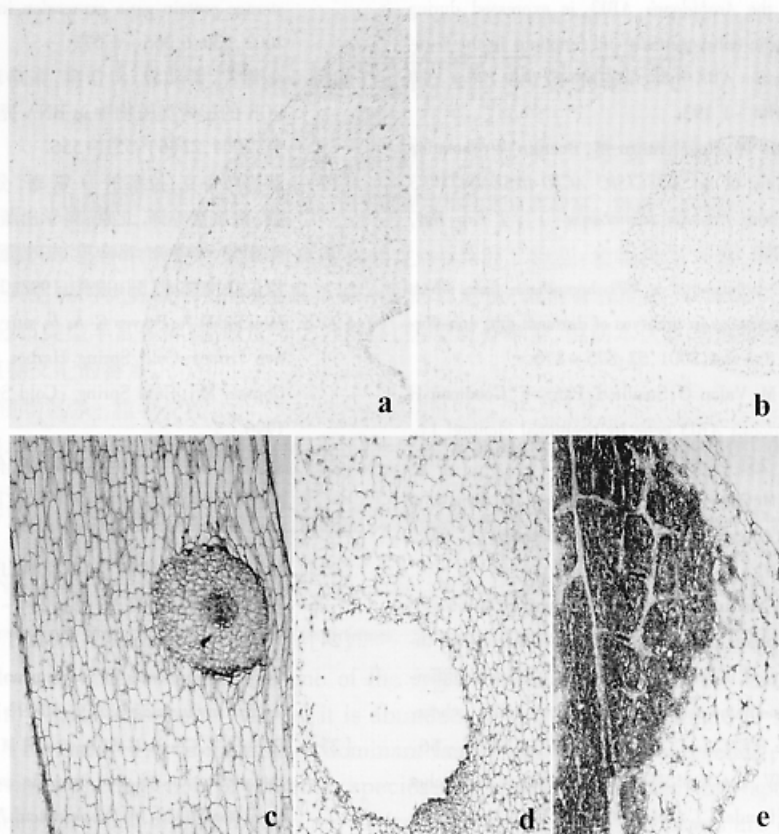
2 结果与讨论

根、茎、叶、子叶 Northern 杂交只有在子叶 RNA 中有杂交信号出现, 同样原位杂交结果也显示只有在子叶和胚中有蓝色沉淀出现, 而在根、茎、叶中除有适量背景外无杂交信号出现 (图 2, 图 3), 这表明花生中含有 ABI3 的同源基因, 且此基因只在子叶和胚中表达。我们认为这个结果与 ABI3/VP1、LEC2 和 FUS3 蛋白发挥的功能可能是一致的。

一方面, ABI3/VP1、FUS3、LEC2 转录因子的一个重要作用是在胚发育的成熟阶段调控贮藏物质的积累^[8], 花生中贮藏的蛋白含量丰富, Ara h1 ~ 8 是目前研究最多的花生贮藏蛋白, 它们都可以引起由 IgE 介导的超敏反应, 其中 Ara h1 和 Ara h2 是主要的致敏源。对 Ara h1 5' 端非翻译区结构分析发现, 在其启动子上有 2 个 RY 基序 RY-1 和 RY-2^[24], 原生质体瞬时表达实验表明, RY 基序和 ABI3、PvAlf、FUS3、LEC2 等含 B3 结构域的转录因子相互作用^[12, 16, 17, 25], 这意味着 Ara h1 的表达可能要受到花生中含 B3 结构域的转录因子 ABI3、FUS3 和 LEC2 同源蛋白的调控, 而 Northern 杂交和原位杂交的结果显示, 在花生子叶中有杂交信号出现, 这表明其分布是与功能相适应的。然而 ABI3、FUS3 和 LEC2 确切的表达定位还需要克隆其具体的基因进一步证明。

另一方面, ABI3/VP1、FUS3 和 LEC2 转录因子除了调控种子成熟过程中贮藏物质的积累外, 还有其他更重要的功能。例如, 调控胚对脱落酸的敏感性、调控胚中叶绿素的降解和花青素的合成、使种子获得抗干燥能力和抑制不成熟种子的萌发等, 这些事件均与胚和子叶有关, 我们认为这也是花生中 ABI3/VP1、FUS3、LEC2 类的同源蛋白在胚中表达的另外一个原因, 同时也说明其分布是与功能相适应的。

本实验是采用拟南芥 ABI3 保守的 B3 结构域部分序列作为探针进行杂交的。目前, 除了 ABI3/VP1、FUS3 和 LEC2 以外, 还发现一些转录因子也含有 B3 结构域, 如: REPRODUCTIVE MERISTEM1 (REM1) 蛋白、Related to ABI3/VP1 (RAV) 蛋白、AUXIN RESPONSE FACTOR1 (ARF1) 蛋白^[26-28]。拟南芥的 REM 蛋白 AtREM1 可能在生殖性分生组织的组织和花器官的发育过程中发挥作用^[26]; ARF1 转录因子的作用在于调控植物激素生长素初级应答基因的表达^[28]; RAVs 蛋白的功能目前还没有确定; 这些蛋白的 B3 结构域序列与 ABI3 的相似



a:花生子叶(含胚)原位杂交结果(有蓝色沉淀);b:不加探针的对照杂交结果(无蓝色沉淀);c、d、e:分别为根、茎、叶原位杂交结果(均无蓝色沉淀)

a: The results of *in situ* hybridization of peanut cotyledon and embryo with blue deposition; b: Control results of *in situ* hybridization of peanut cotyledon and embryo without the probe; c, d, e: Show the results of *in situ* hybridization of peanut root, stem and leaf, respectively

图3 ABI3、LEC2 和 FUS3 的同源基因序列在花生根、茎、叶、子叶(含胚)中的原位杂交结果
Fig. 3 The results of *in situ* hybridization of peanut root, stem, leaf and cotyledon (including embryo) with homo-sequence of ABI3, LEC2 and FUS3

性并不高,如 RAV 与 ABI3 的 B3 结构域仅有 29% 的相似性,ARF1 的相似性更低,为 12%。同样,根据 ABI3 的 B3 结构域设计的探针序列与 AtREM1、RAV、ARF1 的相似性也不高,分别为 33%、24%、36%。而且,它们并不与 RY 基序相结合,如 RAV 蛋白特异地与含有 2 个互不相关基序的双向序列结合,这 2 个基序分别是 CAACA 和 CACCTG^[27];而 ARF 转录因子特异性地与生长素初级应答基因启动子上的生长素应答元件(AuxREs) TGTCTC 结合^[29]。因此,本实验可能并未检测到这些转录因子的分布情况。

花生中 ABI3、LEC2 和 FUS3 的同源基因序列、同源蛋白的具体确切的功能以及它们与哪些基因的启动子相互作用有待进一步的研究。

参考文献:

[1] West M A L, Harada J J. Embryogenesis in higher plants: an over-

view[J]. *Plant Cell*, 1993, 5: 1361 - 1369.

[2] Smita K, Huw D J, Michael J H. Interactions of the development regulator ABI3 with proteins identified from developing *Arabidopsis* seeds[J]. *Plant J*, 2000, 21(2): 143 - 155.

[3] Suzuki M, Kao C Y, Cocciolone S, McCarty D R. Maize VP1 complements *Arabidopsis* abi3 and confers a novel ABA/auxin interaction in roots[J]. *Plant J*, 2001, 28(4): 409 - 418.

[4] Hattori T, Terada T, Hamasuna S T. Sequence and functional analyses of the rice gene homologous to the maize VP1[J]. *Plant Mol Biol*, 1994, 24: 805 - 810.

[5] Bobb A J, Eiben H G, Bustos M M. PvAlf, an embryo-specific acidic transcriptional activator enhances gene expression from *Phaseolin* and phytohemagglutinin promoters[J]. *Plant J*, 1995, 8(3): 331 - 343.

[6] Jones H D, Peters N C B, Holdsworth M J. Genotype and environment interact to control dormancy and differential expression of the *VIVIPAROUS1* homologue in embryos of *Avena fatua* [J]. *Plant J*, 1997, 12(5): 911 - 920.

[7] Shiota H, Satoh R, Watabe K, Harada H, Kamada H. *C-ABI3*, the

- carrot homologue of the *Arabidopsis* ABI3, is expressed during both zygotic and somatic embryogenesis and functions in the regulation of embryo-specific ABA-inducible genes [J]. *Plant Cell Physiol*, 1998, **39**: 184 - 193.
- [8] Rohde A, Aradiles Diaz W, Van Montagu M, Boerjan W. Isolation and expression analysis of an *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE3* (*ABI3*) homologue from *Populus trichocarpa* [J]. *J Exp Bot*, 1998, **49**: 1059 - 1060.
- [9] Shingo N, Tomoko T. Isolation of a VPI homologue from wheat and analysis of its expression in embryos of dormant and non-dormant cultivars [J]. *J Exp Bot*, 2001, **52**: 875 - 876.
- [10] Giraudat J, Hauge B M, Valon C, Smalle J, Parcy F, Goodman H M. Isolation of *Arabidopsis* ABI3 gene by positional cloning [J]. *Plant Cell*, 1992, **4**: 1251 - 1261.
- [11] Suzuki M, Kao C Y, McCarty D R. The conserved B3 domain of VIVIPAROUS1 has a cooperative DNA binding activity [J]. *Plant Cell*, 1997, **9**: 799 - 807.
- [12] Ezcurra I, Wycliffe P, Nehlin L, Ellerstrom M, Rask L. Transactivation of the *Brassica napus* napin promoter by ABI3 requires interaction of the conserved B2 and B3 domains of ABI3 with different cis-elements; B2 mediates activation through an ARBE, whereas B3 interact with an RY/C-box [J]. *Plant J*, 2000, **24**: 57 - 66.
- [13] Stone S L, Kwong L W, Yee K M, Pelletier J, Lepiniec L, Fischer R L, Goldbery R B, Harada J J. *LEAFY COTYLEDON2* encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development [J]. *Proc Natl Acad Sci*, 2001, **98**(20): 11806 - 11811.
- [14] Bäumlein H, Miséra S, Luerben H, Kölle K, Horstmann C, Wobus V, Müller A J. The *FUS3* gene of *Arabidopsis thaliana* is a regulator of gene expression during late embryogenesis [J]. *Plant J*, 1994, **6**(3): 379 - 387.
- [15] Parcy F, Valon C, Kohara A, Miséra S, Giraudat J. The *ABSCISIC ACID-INSENSITIVE3*, *FUSCA3*, and *LEAFY COTYLEDON1* loci act in concert to control multiple aspects of *Arabidopsis* seed development [J]. *Plant Cell*, 1997, **9**: 1265 - 1277.
- [16] Reidt W, Wohlfarth T, Ellerstrom M, Cziha A, Tewes A, Ezcurra I, Rask L, Bäumlein H. Gene regulation during late embryogenesis; the RY motif of maturation-specific gene promoters is a direct target of the *FUS3* gene product [J]. *Plant J*, 2000, **21**: 1 - 8.
- [17] Kroj T, Savino G, Valon C, Giraudat J, Parcy F. Gene regulation of storage protein gene expression in *Arabidopsis* [J]. *Development*, 2003, **130**: 6065 - 6073.
- [18] 李菁芳, 黄劲毅, 田任鹏, 张珞珍, 方呈祥. 一种适用于 RT-PCR 的杉树类植物中总 RNA 提取的方法 [J]. 武汉植物学研究, 2004, **22**(6): 551 - 556.
- [19] 萨姆布鲁克, 拉塞尔 D W 著. 分子克隆实验指南 [M]. 第3版. 黄培堂等译. 北京: 科学出版社, 2002.
- [20] 陈绍荣, 毕学知, 吕应堂, 杨弘远. 一种优化的植物组织 RNA 原位杂交技术 [J]. 遗传, 1998, **20**(3): 27 - 30.
- [21] Micklos D A, Freyer G A. *In situ* Hybridization with Nonradioactive Probes; Cold Spring Harbor *Arabidopsis* Molecular Genetics Course [M]. Cold Spring: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1996.
- [22] 翁清妹, 黄臻, 王小兰, 祝莉莉, 何光存. 蛋白酶抑制剂 mRNA 在抗褐飞虱水稻中的原位定位 [J]. 科学通报, 2003, **48**(8): 827 - 830.
- [23] 徐云远, 钟康, 许智宏, 谭克辉. RNA 原位杂交实用技术 [J]. 植物学通报, 2002, **19**(2): 234 - 238.
- [24] Viquez O M, Konan K N, Dodo H W. Structure and organization of the genomic clone of a major peanut allergy gene, *Ara h1* [J]. *Molecular Immunology*, 2003, **40**(9): 566 - 571.
- [25] Bobb A J, Chern M S, Bustos M M. Conserved RY repeats mediate transactivation of seed specific promoters by the developmental regulator PvAlf [J]. *Nucleic Acid Res*, 1997, **25**: 641 - 647.
- [26] Franco-Zorrilla J M, Cubas P, Jarillo J A, Calvin B F, Salinas J, Zapater J M M. *AtREM1*, a member of a new family of B3 domain-containing genes, is preferentially expressed in reproductive meristems [J]. *Plant Physiol*, 2002, **128**: 418 - 427.
- [27] Kagaya Y, Ohmiya K, Hattori T. RAV1, a novel DNA-binding protein, binds to bipartite recognition sequence through two distinct DNA-binding domains uniquely found in higher plants [J]. *Nucleic Acids Research*, 1999, **27**(2): 470 - 478.
- [28] Ulmasov T, Hagen G, Guilfoyle T J. Activation and repression of transcription by auxin-response factors [J]. *Proc Natl Acad Sci*. 1999, **96**(10): 5844 - 5849.
- [29] Tiwari S B, Hagen G, Guilfoyle T. The roles of auxin response factor domains in auxin-responsive transcription [J]. *Plant Cell*, 2003, **15**(2): 533 - 543.