

拟南芥 *CKII* 基因上游转录调控因子筛选及鉴定

刘振宁^{1,2,3}, 袁黎^{2,4}, Venkatesan Sundaresan², 余小林³

1. 临沂大学农林科学学院, 临沂 276000
2. 加州大学戴维斯分校植物科学系, 加利福尼亚州戴维斯 95616, 美国
3. 浙江大学农业与生物技术学院, 杭州 310058
4. 西北农林科技大学园艺学院, 杨凌 712100

摘要: 拟南芥 *CKII* (cytokinin independent 1) 是双组分信号系统中一个组氨酸激酶蛋白, 通过作用于下游组氨酸磷酸转移蛋白激活双组分信号通路, 在调控胚囊中央细胞命运分化和发育过程中具有重要作用。然而目前对于 *CKII* 基因上游转录调控因子还知之甚少。本研究分析了不同长度的 *CKII* 启动子在拟南芥胚囊中的活性, 并利用酵母单杂交技术对 *CKII* 上游转录调控因子进行了筛选和鉴定。结果表明, 位于内含子区域中的 *F5/R2* 片段表现出与 *CKII* 启动子全长相一致的表达活性。进一步选取 3 个串联重复的 *F5/R2* 片段用于构建诱饵表达载体, 同时, 选取拟南芥雌蕊构建 cDNA 文库, 通过酵母单杂交筛选获得 226 个阳性克隆。去除低质量及冗余重复的序列后共获得 66 条可读序列, 其中 8 条序列对应的基因编码具有 DNA 结合功能的蛋白。研究结果为进一步揭示 *CKII* 基因的转录调控机制提供了重要参考信息。

关键词: *CKII*; 转录调控; 酵母单杂交; 拟南芥

Screening and identification of *CKII* upstream transcription regulators in *Arabidopsis*

Zhenning Liu^{1,2,3}, Li Yuan^{2,4}, Venkatesan Sundaresan², Xiaolin Yu³

1. College of Agriculture and Forestry Sciences, Linyi University, Linyi 276000, China
2. Department of Plant Biology, University of California, Davis CA 95616, USA
3. Institute of Vegetable Sciences, Zhejiang University, Hangzhou 310058, China
4. College of Horticulture, Northwest A & F University, Yangling 712100, China

Abstract: *Arabidopsis* *CKII* (cytokinin independent 1) is a histidine kinase protein involved in the two-component system, which can activate two-component signaling via the downstream histidine phospho-transfer proteins, playing the essential roles in central cell fate determination and development regulation in embryo sacs. However, studies on *CKII*

收稿日期: 2018-11-21; 修回日期: 2019-02-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(编号: 31700272, 31872110, 31460521), 山东省自然科学基金项目(编号: ZR2017PC012)和浙江省农业新品种选育重大科技专项重点项目子课题(编号: 2016C02051-6-1)资助[Supported by the National Natural Science Foundation of China (Nos. 31700272, 31460521, 31872110), the Natural Science Foundation of Shandong Province (No. ZR2017PC012) and the Breeding Project of the Sci-tech Foundation of Zhejiang Province (No. 2016C02051-6-1)]

作者简介: 刘振宁, 博士, 讲师, 研究方向: 植物生殖发育。E-mail: liuzhenning@lyu.edu.cn

通讯作者: 余小林, 博士, 教授, 博士生导师, 研究方向: 植物功能基因组学。E-mail: xlyu@zju.edu.cn

DOI: 10.16288/j.ycz.18-314

网络出版时间: 2019/4/2 17:11:57

URI: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1913.R.20190402.1711.002.html>

upstream transcription regulators are still limited. In the present study, promoter activities with varying fragments were investigated, and *CKII* upstream transcription regulators were screened and identified by the yeast-one hybrid technique. Results indicated *F5/R2* fragments located in the intron region showed promoter activities in embryo sacs, which is consistent with *CKII* full-length promoters. Then three tandem repeats of *F5/R2* fragments were used to construct the bait expression vector, and *Arabidopsis* pistils were collected for cDNA library construction. Totally, 226 positive clones were screened by the yeast-one hybrid technique, 66 readable sequences were retrieved after removing sequences with low quality and redundant repeats, among which eight proteins could act as DNA-binding proteins. These results provided some important clues to study the molecular function of *CKII* in the transcription regulation network.

Keywords: *CKII*; transcription regulation; yeast-one hybrid; *Arabidopsis thaliana*

双组分信号系统(two-component system, TCS)最初是在研究大肠杆菌(*Escherichia coli*)氮调节蛋白系统时发现的^[1]。最简单的双组分信号系统包括用于感应输入信号的组氨酸激酶(histidine kinase, HK)和用于调节输出信号的反应调节因子(response regulator, RR)两种元件, 原核生物常以简单的双组分信号系统形式存在。在细菌、酵母、粘液菌和植物中, 双组分信号系统进化为包括组氨酸激酶(histidine kinase, HK)、组氨酸磷酸转移蛋白(histidine phosphotransfer, HP)和反应调节因子(response regulator, RR)的多步磷酸化传递的双组分信号系统。

CKII(AT2G47430)是第一个被发现的具有细胞分裂素受体特征的组氨酸激酶蛋白, 在不添加细胞分裂素的培养基上, *CKII* 的过量表达能够导致特异的细胞分裂素应答反应^[2,3]。CKII 蛋白主要定位于内质网和细胞质膜上^[3~5]。Deng 等^[6]采用 qRT-PCR 方法研究了 *CKII* 基因的表达模式, 发现 *CKII* 主要在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的开放花、角果和花蕾中表达。Hejatko 等^[7]利用原位杂交技术和启动子 GUS 融合蛋白分析表明, *CKII* 在胚囊发育的 FG1 (female gametophyte 1)时期到成熟胚囊期 FG7 时期均稳定表达, 尤其在成熟胚囊期的中央细胞中表达量比较高, 在卵细胞和助细胞中的表达量比较低。另外, *CKII* 在拟南芥花序的维管组织中也有明显的表达信号^[8]。*CKII* 功能缺失突变体(*cki1/+*)植株的营养生长阶段没有明显的表型, 但雌配子体表现为 50% 败育的表型。遗传学实验证据表明, *CKII* 功能缺失的突变体其 T-DNA 插入位点不能通过母本传递到

子代中, 因而也无法获得纯合的功能缺失突变体。对 *cki1/+* 突变体胚囊的细胞学观察表明, *cki1/+* 突变体胚囊的败育发生在 FG4 时期向 FG5 时期的转换期^[4,6,7,9]。水稻(*Oryza sativa*)中 *CKII* 同源基因(*OsHK1*)的功能缺失突变体也表现出雌配子体败育表型^[10]。本课题组前期研究发现, CKII 通过作用于下游 AHP2、AHP3 和 AHP5 调控中央细胞的命运分化^[5,11,12], 但是目前仍不清楚该基因的转录调控机制。Dobisova 等^[13]对 *ProCKII::uidA* 转基因株系进行 EMS 诱变, 对 *CKII* 上游转录调控因子进行筛选, 发现 *CKII* 基因的表达受到光敏色素蛋白的调控, 并且 *CKII* 启动子区域存在大量 G-box 和 GATA motif 等光周期响应元件, 进一步通过酵母单杂交实验也证明 PIF3 和 CCA1 等受光敏色素蛋白调控的转录因子能够与 *CKII* 启动子区域互作。但是筛选到的光敏色素蛋白相关转录因子的突变体并没有表现出 *cki1/+* 突变体的表型, 由此推测, 在胚囊发育的阶段还存在其他转录调控因子能够调控 *CKII* 的表达。

酵母单杂交是根据在细胞内 DNA 结合蛋白与 DNA 顺式作用元件结合调控报告基因表达的原理, 用来鉴定调控基因转录的上游转录因子基因的一种有效方法^[14]。随着酵母单杂交系统的不断发展和完善, 该方法近年来已被广泛用于克隆和鉴定各种动植物的转录因子。本研究利用酵母单杂交技术对 *CKII* 上游转录调控因子进行了筛选和鉴定, 为进一步揭示 *CKII* 基因的转录调控机制提供了新的数据及重要信息。

1 材料与方法

1.1 材料

拟南芥 Col-0 野生型为本实验室保存。拟南芥种子先用含 20% Bleach 和 0.1% Tween 20 的消毒液进行表面消毒 10 min，然后使用灭菌的双蒸水清洗 3~5 遍，置于 MS 培养基上培养。待幼苗两周大的时候，将幼苗转移到带有培养基质(草炭 蛭石 珍珠岩为 6 3 2)的穴盘中培养，培养条件保持 16 h 光照/8 h 黑暗周期，温度为 22℃，相对湿度为 60%。

1.2 不同片段长度 CKII 启动子载体的构建

因为酵母基因组比植物基因组小得多，酵母启动子一般都比较短，如果整合到酵母基因组中的外

源启动子太长，可能会影响目的蛋白和启动子中顺式作用元件结合的效率，而且会造成更多的假阳性^[15,16]。因此，酵母单杂交一般选用几到几十 bp 的特定顺式作用元件或者尽可能短的有启动活性序列来构建诱饵表达载体。首先将 *CKII* 基因启动子平均分成若干区段，分别设计引物序列进行扩增，引物序列见表 1。然后通过 *Sac* 和 *Kpn* 双酶切克隆到 *H2B-eGFP-NOST-pCAMBIA1300* 中间载体中，构建带有相应启动子片段的 *promoter-H2B-eGFP-NOST-pCAMBIA1300* 表达载体(图 1)。

1.3 转基因株系的筛选和观察

经过测序验证后，构建成功的表达载体通过电转化法转入农杆菌 AGL1 菌株中，并通过浸花转化法转入到拟南芥野生植株中^[17,18]。待转化的拟南芥

表 1 本研究使用的引物信息
Table 1 Primers used in this study

引物名称	引物序列(5'→3')	用途
CKIIpro- <i>Sac</i> -F	CGAGCTCGATTGGGACTAAAGTCTTGT	扩增 <i>CKII</i> 启动子
CKIIpro- <i>Sac</i> -F1	CGAGCTCATTATAACCGGAAAGTTACATTGGA	扩增 <i>CKII</i> 启动子
CKIIpro- <i>Sac</i> -F2	CGAGCTCTTATCGTCAAACAAGTTTATATCAT	扩增 <i>CKII</i> 启动子
CKIIpro- <i>Sac</i> -F3	CGAGCTCAGATGTAAGTTTAAGTCGTGAATTT	扩增 <i>CKII</i> 启动子
CKIIpro- <i>Sac</i> -F4	CGAGCTCAATTATTCCTCAAAATTCACAAAG	扩增 <i>CKII</i> 启动子
CKIIpro- <i>Sac</i> -F5	CGAGCTCAAACATAATATCCGAATGCCTGAGAT	扩增 <i>CKII</i> 启动子
CKIIpro- <i>Kpn</i> -R1	GGGGTACCAATGTGAAATCGAGTGAACCATAAAA	扩增 <i>CKII</i> 启动子
CKIIpro- <i>Kpn</i> -R2	GGGGTACCTCATATTATCTTCTTCCTCGGAGCA	扩增 <i>CKII</i> 启动子
CKIIpro- <i>Kpn</i> -R3	GGGGTACCATCTCAGGCATTTCGATATTAGTTT	扩增 <i>CKII</i> 启动子
CKIIpro- <i>Kpn</i> -F5	GGGGTACCAAACTAATATCCGAATGCCTGAGAT	构建诱饵表达载体
CKIIpro- <i>Xho</i> -F5	CCGCTCGAGAAACTAATATCCGAATGCCTGAGAT	构建诱饵表达载体
CKIIpro- <i>Xho</i> -R2	CCGCTCGAGTCATATTATCTTCTTCCTCGGAGCA	构建诱饵表达载体
pGADT7-F	CACTACAGGGATGTTTAATACCACT	阳性克隆菌落 PCR 和测序
pGADT7-R	CATGGCCAAGATTGAACTTAGAGG	阳性克隆菌落 PCR

下划线序列表示引物中相应的酶切位点。

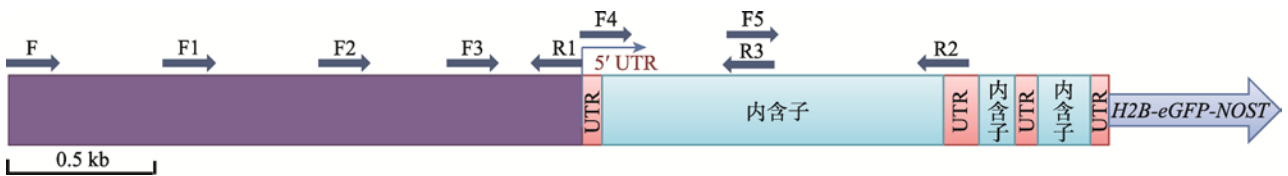


图 1 不同长度的 *CKII* 基因启动子活性分析载体构建示意图

Fig. 1 Graphic representation of vector constructions for *CKII* promoter activities with different lengths
CKII 启动子区域包括 4 段 5'UTR(粉色区域)、3 段内含子(蓝色区域)和 5'UTR 上游序列(紫色区域)。F、F1、F2、F3、F4、F5 和 R1、R2、R3 分别为上、下游引物。

植株种子成熟,收集和干燥种子,然后通过上述拟南芥种子表面消毒和播种方法,将种子在含有 25 mg/L 潮霉素 B 的 MS 培养基中进行筛选,最后将筛选获得的幼苗转移到培养基中正常培养。

对拟南芥胚囊中荧光信号进行观察。首先在载玻片上滴几滴灭菌的双蒸水,然后在解剖镜下将选取的雌蕊在双蒸水中使用解剖针解剖开,仅留下胚珠,去除多余的组织,盖上盖玻片,立即在荧光显微镜(Zeiss, Axioskop 2 plus)下观察拍照。

1.4 诱饵表达载体的构建与酵母遗传转化

诱饵表达载体的构建和酵母遗传转化参照酵母单杂交试剂盒(Clontech 公司,美国)进行。为提高转录因子和顺式作用元件的识别率和结合率,在诱饵表达载体构建中,本研究使用 3 个串联重复的 *F5/R2* 片段。首先,使用 *SacI* 和 *KpnI* 双酶切将第 1 个 *F5/R2* 片段克隆到 *pAbAi* 载体中,然后使用 *KpnI* 和 *XhoI* 双酶切将第 2 个 *F5/R2* 片段克隆到 *pAbAi* 载体中,最后使用 *XhoI* 单酶切将第 3 个 *F5/R2* 片段克隆到 *pAbAi* 载体中,完成 *pBait-AbAi* 载体的构建。每一步载体构建均经过了酶切和测序验证。然后将诱饵表达载体用 *BstBI* 限制性内切酶切成线性质粒,转入 *YIH* 酵母菌株感受态中。最后选取 5 个单菌落,使用 Matchmarker Insert Check PCR Mix 1 试剂盒(Clontech 公司,美国)进行菌落 PCR 鉴定含有诱饵表达载体的阳性菌落,选取阳性菌落备用。

1.5 抑制诱饵菌株生长的最低 AbA 浓度的筛选

选取阳性菌落活化,然后用适量的 0.9% NaCl 重悬菌液,调制 OD_{600} 值约为 0.002。分别在含 0 ng/mL、100 ng/mL、150 ng/mL、200 ng/mL、250 ng/mL、300 ng/mL、400 ng/mL、500 ng/mL、600 ng/mL、800 ng/mL 和 1000 ng/mL 等不同浓度 AbA 的 SD/-Ura 固体培养基涂布 100 μ L 菌液,置于 30 $^{\circ}$ C 培养 2~3 d,观察酵母菌落的生长情况。

1.6 酵母单杂交文库的构建与筛选

Smyth 等^[19]根据拟南芥花发育不同阶段的形态特征将其划分为 12 个时期。本研究选取拟南芥花发育阶段在 10~12 时期的雌蕊提取 RNA,然后将所提

取的 RNA 按照 Clontech 公司单杂交文库试剂盒的操作步骤进行反转录,合成含有 SMARTIII 和 CDSIII 锚定末端的双链 DNA (double strand cDNA, dscDNA)。RNA 提取参照 Invitrogen 公司 RNA 提取试剂 TRIzol 产品操作说明书进行, RNA 纯化参照 QIAGEN 公司 RNA 纯化试剂盒操作说明书进行。第一、第二链 cDNA 的合成、dscDNA 的纯化参照 Clontech 公司酵母单杂交试剂盒进行。

首先将制备好的 3 μ g dscDNA、6 μ L *pGADT7-Rec* 载体(经 *SmaI* 线性化处理)和 20 μ L 鲑鱼精子 DNA (10 mg/mL) 转入酵母感受态中,转化液涂布在 150 mm 直径含 250 ng/mL 浓度 AbA 的 SD/-Leu 固体培养基平板上,每个板涂布大约 150 μ L,同时将 100 μ L 稀释 100 倍的转化液涂布在 SD/-Leu 固体培养基平板上作为对照。将平板置于 30 $^{\circ}$ C 培养箱中倒置培养 3~5 d,观察酵母菌落的生长情况并计算转化效率。

转化效率满足要求后,将线性化的融合表达载体 *pGADT7-Rec2* 和获得的 SMARTIII 和 CDSIII 锚定末端的 dscDNA 同时转入 *YIH Gold[Bait/AbAi]* 酵母感受态中,转化液涂布在含 250 ng/mL 浓度 AbA 的 SD/-Leu 固体培养基平板上,在 30 $^{\circ}$ C 条件下培养 3~5 d 后观察统计培养基上的单菌落数量。

1.7 阳性克隆鉴定和测序

将能够在含 250 ng/mL 浓度 AbA 的 SD/-Leu 固体培养基上生长的单菌落进一步在含 300 ng/mL 浓度 AbA 的 SD/-Leu 固体培养基上进行划线,经过 3 次划线后均生长的克隆被认为是阳性克隆。选取阳性克隆,摇菌,提取酵母质粒。以酵母质粒为模板,使用 Matchmaker Insert Check PCR Mix 2 试剂盒(Clontech 公司,美国)扩增目的片段,将凝胶回收的目的片段连接到 T 载体上,再进一步转化到大肠杆菌中,并选取阳性克隆进行测序。引物序列见表 1。

2 结果与分析

2.1 不同长度的 *CKII* 基因启动子活性分析

根据前人对 *CKII* 启动子活性的研究,FR2 序列

(1661 bp)是 *CKII* 启动子启动活性所必需的^[6,7],但对于酵母单杂交来说并不是特别理想的启动子长度。为进一步获得 *CKII* 启动子尽可能短的功能序列,本研究在 *FR2* 启动子不同区间设计引物进行分段扩增。首先将 *FR2* 序列截短成 *F/R1* (1080 bp)、*F/R2* (1661 bp)、*F1/R1* (698 bp)、*F1/R2* (1279 bp)、*F2/R1* (488 bp)、*F2/R2* (1069 bp)、*F3/R1* (301 bp)和 *F3/R2* (882 bp)等 8 个片段(图 1),并分别构建了 *promoter::H2B-eGFP* 表达载体,转化拟南芥,观察转基因阳性植株胚囊中的启动子活性。结果表明,只有 *F/R2*、*F1/R2*、*F2/R2* 和 *F3/R2* 这 4 段序列具有 *CKII* 启动子活性。随后,将 *F3/R2* 这一段序列再次

截短为 *F4/R3* (224 bp)、*F4/R2* (581 bp)和 *F5/R2* (382 bp)等 3 个片段,分别构建 *promoter::H2B-eGFP* 表达载体,转化拟南芥,观察转基因阳性植株胚囊中的启动子活性。结果表明,只有 *F4/R2* 和 *F5/R2* 这两段序列具有 *CKII* 启动子的活性(图 2, A~P),其表达模式与 *CKII* 启动子全长的表达模式一致^[5]。研究结果表明,能够被转录因子识别的顺式作用元件位于 *F5/R2* 这个区间的内含子区域。进一步通过 PLACE和 PlantCARE 在线启动子预测工具对该内含子区域转录调控元件进行分析,结果表明该区域存在对光照、昼夜节律、厌氧感应,以及细胞分裂素和茉莉酸甲酯两种植物激素响应的元件(图 3)。

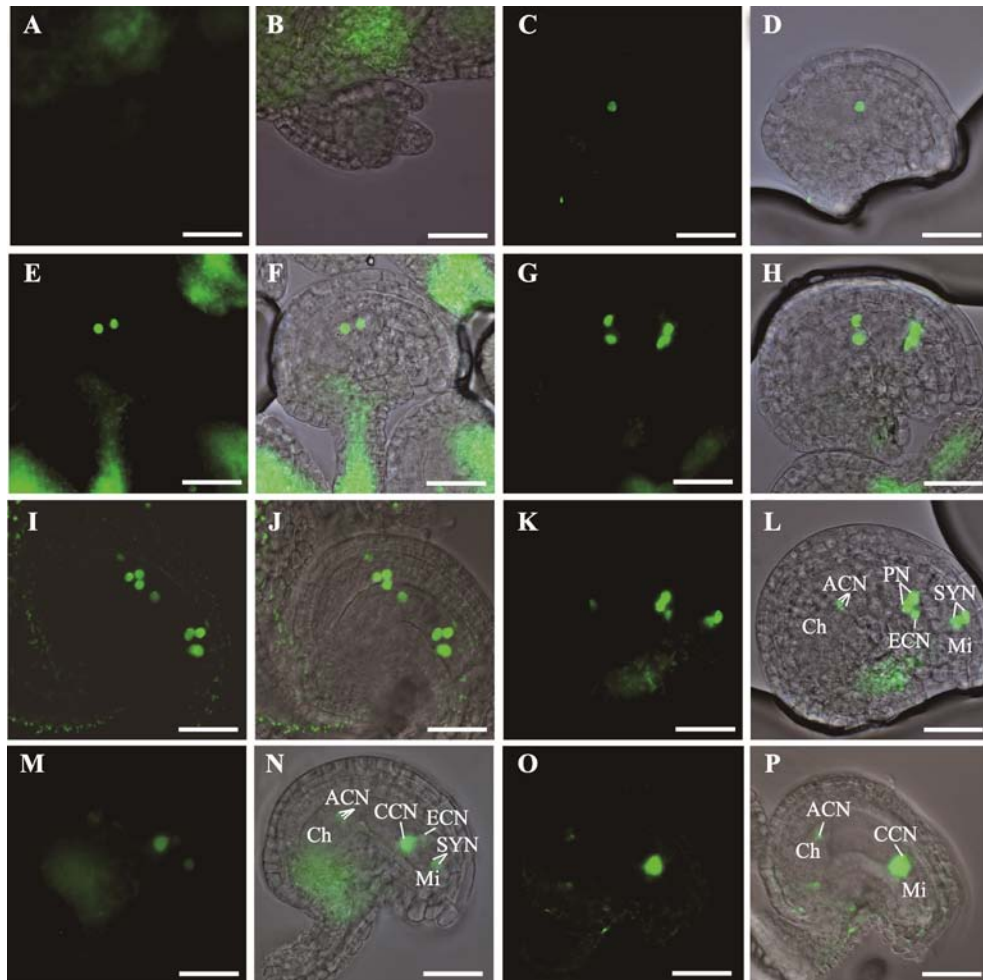


图 2 *CKII* 基因启动子片段 *F5/R2* 在胚囊中的启动活性

Fig. 2 Promoter activities of the *CKII* promoter fragment *F5/R2* in *Arabidopsis* embryo sacs

A 和 B: 大孢子母细胞时期; C 和 D: 功能大孢子时期~FG1 时期; E 和 F: FG2~FG3 时期; G 和 H: FG4 时期; I 和 J: FG5 时期; K 和 L: FG6 时期; M~P: FG7 时期。两个极核刚完成融合时,在助细胞和卵细胞中能检测到 *CKII* 启动子活性,但随后助细胞和卵细胞中的信号消失,仅反足细胞和中央细胞中具有 *CKII* 启动子活性。标尺为 20 μm 。

AGATATTGTTTCCTAAATGAGATGATTGTTTTATTTATTACCATTGATT
响应光照

1351 TGTTCCTACTAAGCTTCCTTTCCCTTTGCAATACATAGGATATAAATT
昼夜节律 醇溶谷蛋白框

1401 ATACATGTTCTAATTTTATTTTGCACCTTGAGTTTATGGTTTCTTTGG

1451 TGGAAGATCTATATGTATCTATATCTATATTATTTTACTCTTTTCTTCGT

1501 CGTCATTTATAGTATATTATATATATGCACACACACACACCTATATGT
响应茉莉酸甲酯

1551 ATAGCTCAATTCTAGATAAAATATATAGAAATGGATCTTGAGAATCATT
响应光照 响应细胞分裂素

1601 TTTTGTATTCTTTTGTATCAAGGGTTTCGACTTTGCTCCGAGGAA
厌氧感应

图 3 内含子 *F5/R2* 区域中转录调控元件的预测
Fig. 3 Prediction of transcription regulation elements in *F5/R2* intron regions

2.2 酵母单杂交文库的构建和筛选

2.2.1 诱饵表达载体的构建

本研究选取 *F5/R2* 序列作为诱饵序列，并将 3 个串联重复的 *F5/R2* 片段克隆到 *pAbAi* 载体中，构建诱饵表达载体 *p3×F5/R2-AbAi*。鉴于诱饵表达载体存在报告载体的本底表达，本文首先测试了含有诱饵表达载体的 *p3×F5/R2-AbAi* 的 YIH Gold 酵母菌株(YIH Gold [Bait/AbAi])在不同浓度 AbA 中生长的情况。与对照相比，AbA 能明显地抑制含有诱饵表达载体的 YIH Gold 菌株的生长(图 4，A~J)。在含有

100 ng/mL、150 ng/mL 和 200 ng/mL 浓度 AbA 的培养基中依然有少数菌落的生长，而 250 ng/mL 浓度以上的 AbA 能彻底抑制酵母的生长。因此，250 ng/mL 浓度的 AbA 被确定为后续文库筛选最合适的浓度。

2.2.2 酵母单杂交文库的建立和筛选

dscDNA 经检测满足建库要求，融合表达载体 *pGADT7-Rec2* 转入 YIH Gold[Bait/AbAi]酵母感受态中的效率为 1.125×10^6 cfu/ μ g，也高于 1×10^5 cfu/ μ g 的最低转化率要求。将含有 250 ng/mL AbA 的 SD/-Leu 培养基上筛选到的单克隆菌落接种到新的

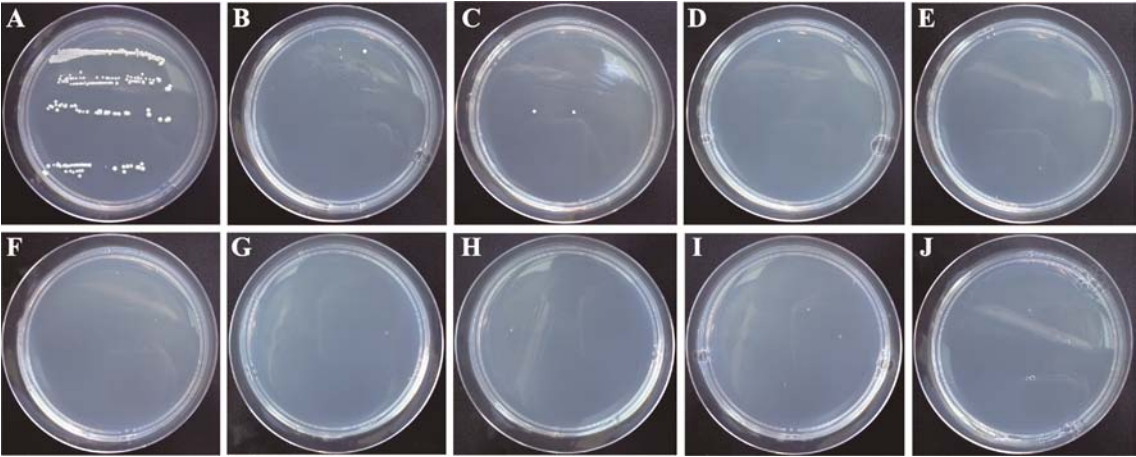


图 4 测试含诱饵表达载体的 YIH Gold 酵母菌株在含有不同浓度 AbA 的培养基上的生长情况
Fig. 4 The growth of YIH Gold yeast strains was tested with bait expression vectors in medium with various concentrations of AbA
A：不含 AbA；B：100 ng/mL AbA；C：150 ng/mL AbA；D：200 ng/mL AbA；E：250 ng/mL AbA；F：300 ng/mL AbA；G：400 ng/mL AbA；H：500 ng/mL AbA；I：600 ng/mL AbA；J：800 ng/mL AbA。

含有 300 ng/mL AbA 的 SD/-Leu 培养基上继续培养, 此过程重复两次。经过 3 次划线接种均生长的克隆, 被认为是阳性克隆。经过 3 次筛选最终获得 226 个阳性克隆。

2.2.3 目的序列的基因功能注释

将上述获得的 226 个阳性克隆进行测序, 然后将测序结果与拟南芥基因数据库中的基因进行比对, 去除低质量及冗余重复的序列, 共获得 66 条可读序列。对这 66 条可读序列进行基因功能注释, 发现 8 个具有 DNA 结合功能的蛋白, 包括 RING/FYVE/PHD zinc finger 家族蛋白、染色质组装修饰蛋白、组蛋白、AUX/IAA 蛋白等(表 2)。根据中央细胞转录组测序数据库^[20], 进一步分析了这 8 个候选基因在中央细胞中的表达情况, 除了 *AT1G04550* 在中央细胞中不表达, 其余 7 个基因在中央细胞中都有一定的表达量。因此, 这 7 个基因可能是 *CKII* 上游转录调控因子的候选基因。除了转录因子外, 本研究还发现其中 36 个阳性克隆测序结果为一个功能未知基因—*AT3G12965*。该基因编码杂相 RNA(miscellaneous RNA), 是一类庞杂的小 RNA 分子, 具有类酶催化、RNA 加工和控制基因表达开关的作用^[21]。目前对 miscellaneous RNA 研究极少, 其具体的功能机制尚不清楚。

3 讨论

3.1 *CKII* 基因的内含子具有启动子功能

绝大多数真核生物的基因是断裂基因, 由外显

子和内含子间隔组成。外显子是真核生物基因中编码蛋白质的序列, 而内含子为非编码蛋白序列。越来越多的研究发现, 内含子并非垃圾序列, 内含子对基因的表达存在调控作用。目前在很多基因的内含子中发现了基因表达的调控元件, 内含子具有启动子的功能。Chang^[22]发现猪 *MyHC* 基因内含子中存在重要的调控元件, 可以调控转录的起始来增强基因的表达。Salgueiro 等^[23]发现玉米泛素基因的第二个内含子能够启动 *gusA* 表达, 具有类似于启动子的功能, 对该内含子结构特征的进一步研究发现该启动子具有 TATA box 和 CAAT box。谢先芝等^[24]对番茄蛋白酶抑制剂 II 基因的内含子 *TPI* 序列进行研究, 发现 *TPI* 序列具有启动子活性, 能够启动下游 *gusA* 基因的表达, *TPI* 序列中也存在着类似于真核基因启动子 TATA box 的结构。小鼠 *Murrl* 基因第一个内含子中存在一个 *U2afbp-rs* 基因, 该内含子能够启动 *U2afbp-rs* 基因的表达, 具有类似启动子的功能^[25]。本研究通过对 *CKII* 基因启动子的研究, 发现 *CKII* 基因第一个内含子也具有启动子活性, 并且在该区域内鉴定到了能够响应光照、昼夜节律、厌氧反应与植物激素的转录调控元件。但具体哪些转录调控元件能够真正介导上游转录因子对 *CKII* 基因的转录激活仍需要进一步研究。

3.2 *CKII* 基因上游转录调控因子的候选基因

转录因子是调控真核生物基因表达的重要因子, 典型的转录因子都有 DNA 结合区, 不同的转录因子与靶基因启动子的顺式作用元件特异性结合并相互作用, 从而激活或抑制靶基因的表达。酵母单杂交技术是一种体内鉴定 DNA 与蛋白质相互作用

表 2 目的基因的功能注释

Table 2 Annotation of target genes

基因座	基因名称	所属基因家族	中央细胞中的转录组测序总 reads 数
<i>AT5G16680</i>	—	PHD-finger 基因家族	434
<i>AT2G13370</i>	<i>chromatin remodeling 5</i>	SWI2/SNF2 基因家族	134
<i>AT5G10400</i>	<i>HISTONE 3.1(HTR9)</i>	组蛋白基因家族	1205
<i>AT1G09200</i>	<i>HISTONE 3.1</i>	组蛋白基因家族	409
<i>AT4G21430</i>	<i>B160</i>	ImjC 基因家族	182
<i>AT5G57660</i>	<i>ATCOL5(BBX6)</i>	COL 基因家族	38
<i>AT1G04550</i>	<i>BDL(IAA12)</i>	AUX/IAA 基因家族	不表达
<i>AT4G20380</i>	<i>LSD1</i>	LSD 基因家族	350

的有效方法。该系统筛选到的蛋白质是在体内相对自然条件下有结合功能的蛋白质,比体外技术获得的结果更能体现真核基因表达调控的真实情况。通过酵母单杂交系统,本研究筛选出到7个在中央细胞中表达的转录因子基因。同时,考虑到酵母单杂交的假阳性问题,今后有必要对这7个候选基因进一步采用 EMSA 或者 ChIP-qPCR 验证酵母单杂交的筛选结果,以排除可能的假阳性。前期研究表明, *CKII* 基因功能缺失突变体表现出50%的雌配子体败育表型,由此推测, *CKII* 基因上游转录调控因子的突变体可能也具有雌配子体败育的表型。研究显示,只有 *AT1G09200*^[26]和 *AT4G20380*^[27]这两个基因的功能缺失突变体没有明显的雌配子发育异常表型,其余5个基因的突变体是否具有雌配子发育异常表型尚不清楚。因此,上述5个基因是今后需要重点关注的候选基因。

3.3 转录调控因子基因的高通量筛选

酵母单杂交技术目前是鉴定 DNA 和蛋白质互作以及筛选转录因子常用的主流技术。利用特定序列的顺式作用元件或者一段启动子序列筛选目的转录因子需要构建 cDNA 文库,而 cDNA 文库存在基因冗余重复、基因序列不完整和非特异性的问题,容易产生很多的假阳性克隆和重复克隆,为后期的进一步鉴定和验证增加了大量的工作量。本研究利用酵母单杂交技术对拟南芥雌蕊的 cDNA 文库进行了筛选,获得了226个阳性克隆,仅获得66条可读序列,其中转录因子基因只有8个,上述阳性克隆存在着大量冗余重复的序列和低质量的序列。为提高酵母单杂交筛选转录因子的效率和特异性,转录调控因子基因的高通量筛选技术日益受到重视。Castrillo 等^[16]构建了包含1200个拟南芥转录因子的文库,在96孔板上通过传统的酵母配对的方式对脂肪酶基因 *LIP1* 的上游转录因子进行了高通量的筛选,找到了 *LIP1* 的上游调控基因。利用同样的方法, Ou 等^[28]构建了包含1589个拟南芥转录因子的文库,筛选到了8个能够调控 *Med25* 基因表达的转录因子。Pruneda-Paz 等^[15]构建了包含1956个拟南芥转录因子的文库,筛选到了能够结合到 *CCA1* 基因启动子区域的转录因子。这种转录因子高通量的筛选技术

能够直接筛选到与目的 DNA 互作的转录因子,避免了 cDNA 文库筛选存在的过高的假阳性问题和冗余重复序列。这些拟南芥转录因子文库在 ABRC 网站上都可以订购获得,无疑对特定基因上游调控转录因子的筛选大有裨益。但上述转录因子筛选文库使用的是拟南芥各器官混合建库,针对器官或组织特异性的转录因子筛选存在一定的局限性,因而进一步完善针对特定发育时期或器官、组织特异性的转录因子文库具有重要的潜在应用价值。

参考文献(References):

- [1] Kamberov ES, Atkinson MR, Chandran P, Ninfa AJ. Effect of mutations in *Escherichia coli glnL (ntrB)*, encoding nitrogen regulator II (NRII or NtrB), on the phosphatase activity involved in bacterial nitrogen regulation. *J Biol Chem*, 1994, 269(45): 28294–28299. [DOI]
- [2] Kakimoto T. CKI1, a histidine kinase homolog implicated in cytokinin signal transduction. *Science*, 1996, 274(5289): 982–985. [DOI]
- [3] Hwang I, Sheen J. Two-component circuitry in *Arabidopsis* cytokinin signal transduction. *Nature*, 2001, 413(6854): 383–389. [DOI]
- [4] Rabiger DS, Drews GN. MYB64 and MYB119 are required for cellularization and differentiation during female gametogenesis in *Arabidopsis thaliana*. *PLoS Genet*, 2013, 9(9): e1003783. [DOI]
- [5] Yuan L, Liu ZN, Song XY, Johnson C, Yu XL, Sundaresan V. The CKI1 histidine kinase specifies the female gametic precursor of the endosperm. *Dev Cell*, 2016, 37(1): 34–46. [DOI]
- [6] Deng Y, Dong H, Mu J, Ren B, Zheng B, Ji Z, Yang WC, Liang Y, Zuo J. *Arabidopsis* histidine kinase CKI1 acts upstream of histidine phosphotransfer proteins to regulate female gametophyte development and vegetative growth. *The Plant Cell*, 2010, 22(4): 1232–1248. [DOI]
- [7] Hejácíto J, Pernisová M, Eneva T, Palme K, Brzobohatý B. The putative sensor histidine kinase CKI1 is involved in female gametophyte development in *Arabidopsis*. *Mol Genet Genomics*, 2003, 269(4): 443–453. [DOI]
- [8] Hejácíto J, Ryu H, Kim GT, Dobesová R, Choi S, Choi SM, Soucek P, Horák J, Pekárová B, Palme K, Brzobohatý B, Hwang I. The histidine kinases CYTOKININ-INDEPENDENT1 and ARABIDOPSIS HISTIDINE KINASE2 and 3 regulate vascular tissue development in *Arabidopsis* shoots. *The*

- Plant Cell*, 2009, 21(7): 2008–2021. [DOI]
- [9] Pischke MS, Jones LG, Otsuga D, Fernandez DE, Drews GN, Sussman MR. An *Arabidopsis* histidine kinase is essential for megagametogenesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, 99(24): 15800–15805. [DOI]
- [10] Ito Y, Kurata N. Identification and characterization of cytokinin-signalling gene families in rice. *Gene*, 2006, 382, 57–65. [DOI]
- [11] Liu ZN, Yuan L, Song XY, Yu XL, Sundaresan V. AHP2, AHP3, and AHP5 act downstream of CKII in *Arabidopsis* female gametophyte development. *J Exp Bot*, 2017, 68(13): 3365–3373. [DOI]
- [12] Liu ZN, Yuan L, Sundaresan V, Yu X. *Arabidopsis* CKII mediated two-component signaling in the specification of female gametophyte. *Plant Signal Behav*, 2018, 13(10): e1469360. [DOI]
- [13] Dobisova T, Hrdinova V, Cuesta C, Michlickova S, Urbankova I, Hejatkova R, Zadnikova P, Pernisova M, Benkova E, Hejatk J. Light controls cytokinin signaling via transcriptional regulation of constitutively active sensor histidine kinase CKII. *Plant Physiol*, 2017, 174(1): 387–404. [DOI]
- [14] Li JJ, Herskowitz I. Isolation of *ORC6*, a component of the yeast origin recognition complex by a one-hybrid system. *Science*, 1993, 262(5141): 1870–1874. [DOI]
- [15] Pruneda-Paz JL, Breton G, Nagel DH, Kang SE, Bonaldi K, Doherty CJ, Ravelo S, Galli M, Ecker, JR, Kay SA. A genome-scale resource for the functional characterization of *Arabidopsis* transcription factors. *Cell Rep*, 2014, 8(2): 622–632. [DOI]
- [16] Castrillo G, Turck F, Leveugle M, Lecharny A, Carbonero P, Coupland G, Paz-Ares J, Oñate-Sánchez L. Speeding *cis-trans* regulation discovery by phylogenomic analyses coupled with screenings of an arrayed library of *Arabidopsis* transcription factors. *PLoS One*, 2011, 6(6): e21524. [DOI]
- [17] Clough SJ, Bent AF. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J*, 1998, 16(6): 735–743. [DOI]
- [18] Zhang X, Henriques R, Lin SS, Niu QW, Chua NH. *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nat Protoc*, 2006, 1(2): 641–646. [DOI]
- [19] Smyth DR, Bowman JL, Meyerowitz EM. Early flower development in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 1990, 2(8): 755–767. [DOI]
- [20] Schmid MW, Schmidt A, Klostermeier UC, Barann M, Rosenstiel P, Grossniklaus U. A powerful method for transcriptional profiling of specific cell types in eukaryotes: laser-assisted microdissection and RNA Sequencing. *PLoS One*, 2012, 7(1): e29685. [DOI]
- [21] Nolte-t Hoen EN, Buermans HP, Waasdorp M, Stoorvogel W, Wauben MH, t Hoen PA. Deep sequencing of RNA from immune cell-derived vesicles uncovers the selective incorporation of small non-coding RNA biotypes with potential regulatory functions. *Nucleic Acids Res*, 2012, 40(18): 9272–9285. [DOI]
- [22] Chang KC. Critical regulatory domains in intron 2 of a porcine sarcomeric myosin heavy chain gene. *J Muscle Res Cell M*, 2000, 21(5): 451–461. [DOI]
- [23] Salgueiro S, Pignocchi C, Parry MA. Intron-mediated *gusA* expression in tritordeum and wheat resulting from particle bombardment. *Plant Mol Biol*, 2000, 42(4): 615–622. [DOI]
- [24] Xie XZ, Wu NH. Isolation of protease inhibitor II and functional analysis of its intron in tomato. *Chin Sci Bull*, 2001, 46(11): 934–938.
谢先芝, 吴乃虎. 番茄蛋白酶抑制剂II基因的分离及其内含子功能. 科学通报, 2001, 46(11): 934–938. [DOI]
- [25] Wang Y, Joh K, Masuko S, Yatsuki H, Soejima H, Nabetani A, Beechey CV, Okinami S, Mukai T. The mouse *Murr1* gene is imprinted in the adult brain, presumably due to transcriptional interference by the antisense-oriented *U2af1-rs1* gene. *Mol Cell Biol*, 2004, 24(1): 270–279. [DOI]
- [26] Okada T, Endo M, Singh MB, Bhalla PL. Analysis of the histone H3 gene family in *Arabidopsis* and identification of the male-gamete-specific variant *AtMGH3*. *Plant J*, 2005, 44(4): 557–568. [DOI]
- [27] Wituszyńska W, Szechyńska-hebda M, Sobczak M, Rusaczonek A, Kozłowska-makulska A, Witoń D, Karpiński S. LESION SIMULATING DISEASE 1 and ENHANCED DISEASE SUSCEPTIBILITY 1 differentially regulate UV-C-induced photooxidative stress signalling and programmed cell death in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Environ*, 2015, 38(2): 315–330. [DOI]
- [28] Ou B, Yin KQ, Liu SN, Yang Y, Gu T, Wing Hui JM, Zhang L, Miao J, Kondou Y, Matsui M, Gu HY, Qu LJ. A high-throughput screening system for *Arabidopsis* transcription factors and its application to Med25-dependent transcriptional regulation. *Mol Plant*, 2011, 4(3): 546–555. [DOI]