

# 烟草 *NtNAC-R1* 基因内含子鉴定 与瞬时表达分析

程广伟<sup>1</sup>, 李桂玲<sup>2</sup>, 程志鹏<sup>1</sup>, 胡 曼<sup>1</sup>, 刘卫群<sup>1,2\*</sup>

(1. 河南农业大学 生命科学学院, 河南 郑州 450002; 2. 河南农业大学 国家烟草栽培重点实验室, 河南 郑州 450002)

**摘要:** 克隆烟草 *NtNAC-R1* 基因, 并进行瞬时表达分析, 探讨其是否含有内含子及其在烟碱生物合成中的调控作用。以烟草基因组 DNA 为模板克隆得到 *NAC* 转录因子 *NtNAC-R1*, 鉴定结果表明, 该基因含有 2 个内含子。通过构建真核表达载体, 建立瞬时表达分析体系, RT-PCR 检测结果显示 *NtNAC-R1* 基因过表达, 烟碱生物合成关键基因 *PMT* 表达量升高, JA 信号途径标记基因 *PDF1.2* 和 IAA 响应基因 *IAA13* 表达量降低。瞬时表达分析表明, 该基因受 JA 信号和 IAA 信号途径的交互对话影响, 进而调控烟碱的生物合成。

**关键词:** 烟草; *NtNAC-R1*; 瞬时表达分析; 信号途径; 内含子

中图分类号: S572 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2013)07-0027-05

## Introns Identification and Transient Expression Analysis of *NtNAC-R1* Gene in Tobacco (*Nicotiana tabacum* L.)

CHENG Guang-wei<sup>1</sup>, LI Gui-ling<sup>2</sup>, CHENG Zhi-peng<sup>1</sup>, HU Man<sup>1</sup>, LIU Wei-qun<sup>1,2\*</sup>

(1. College of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. Key Laboratory of National Tobacco Cultivation, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China)

**Abstract:** Cloning and transient expression analysis of tobacco *NtNAC-R1* gene was performed to discuss whether it contains introns and its function in nicotine biosynthesis. In this study, *NAC* transcription factor *NtNAC-R1* was isolated by using tobacco genomic DNA and its two introns were identified. By constructing eukaryotic expression vector and establishing transient expression analysis system, over-expression of *NtNAC-R1* gene followed by RT-PCR detection indicated that the expression amount of nicotine biosynthesis key gene *PMT* increased while JA signal marker gene *PDF1.2* and IAA response gene *IAA13* decreased. Transient expression analysis suggested that the gene regulated nicotine biosynthesis under the cross talking of JA and IAA signal pathway.

**Key words:** *Nicotiana tabacum* L.; *NtNAC-R1* gene; transient expression analysis; signal pathway; introns

大多数真核生物的功能基因都含有内含子, 内含子在基因的表达调控过程中发挥着重要作用。关于内含子的研究已成为植物转基因中提高外源基因表达的研究热点<sup>[1]</sup>。真核 mRNA 内含子对基因的

转录和下游 mRNA 的新陈代谢起着促进作用, 可与其他 pre-mRNA 发生互作, 影响 5' 端加帽和 3' 端的形成, 提高 mRNA 分子的稳定性<sup>[2]</sup>。*NAC* 作为植物所特有的转录因子, 在植物的多个生长发育过程

收稿日期: 2013-02-17

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30971704)

作者简介: 程广伟 (1986-), 男, 河南商丘人, 在读硕士研究生, 研究方向: 逆境分子生物学。

E-mail: chengguangwei2007@126.com

\* 通讯作者: 刘卫群 (1956-), 女, 河北临城人, 教授, 博士生导师, 主要从事植物代谢网络调控研究。

E-mail: liuweiqun2004@126.com

中发挥重要作用<sup>[3]</sup>。功能研究<sup>[4-6]</sup>发现,NAC参与调控植物侧根发育、次生壁的形成、叶片衰老等组织的生长发育过程,同时也响应干旱、高低温、盐胁迫、病原菌等生物和非生物胁迫,受茉莉酸(JA)、脱落酸(ABA)、生长素(IAA)等激素诱导,响应逆境胁迫信号传递,进而调控下游相关基因表达。因此,对NAC内含子的克隆与分析将为系统研究该类基因在植物代谢过程中的具体功能提供帮助。

烟碱是烟草根系合成的次生代谢产物。在烟草栽培过程中,为了得到高质量的烟叶,烟株打顶是农业生产中的一种常规措施,但烟株打顶后,烟碱合成能力显著增加。烟株打顶是一种伤害刺激,地上部烟株的伤害诱导根系烟碱合成能力增加是一种信号传导过程。邹焱等<sup>[7]</sup>认为,烟株打顶后 IAA 合成大量减少,导致烟株中 IAA 含量明显下降,这对烟株体内激素含量水平和受激素调节的生理代谢过程平衡产生重要影响。刘卫群等<sup>[8]</sup>研究表明,烟株打顶导致植物内源生长素的库源关系发生变化,IAA 的产生源由顶端组织转移到根尖分生组织,影响烟碱的生物合成。Shoji 等<sup>[9]</sup>对烟株打顶前后 JA 含量的变化进行了研究,认为伤害刺激引起 JA 含量增加,促进根系烟碱的生物合成。为了研究烟株打顶后根系烟碱合成能力增强的机制,国家烟草栽培重点实验室代谢网络调控室构建了烟株打顶前、后根尖组织 SSH cDNA 文库,并从中筛选、克隆了一条烟草 NAC 类转录因子 cDNA 序列(HQ413134)<sup>[10-11]</sup>,命名为 *NtNAC-R1*。本研究设计特异引物,以烟草基因组 DNA 为模板扩增 *NtNAC-R1*,同 cDNA 序列比较分析其是否含有内含子,并通过瞬时表达分析探讨该基因在激素信号传导及烟碱生物合成中的调控作用,为有效调控降低烟叶中的烟碱含量、提高烟叶品质提供理论依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

1.1.1 植物材料 供试烟草品种为 K326(*Nicotiana tabacum* L. cv K326)。

1.1.2 菌株、载体与主要试剂 大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 $\alpha$ 、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株 GV3101、质粒 pS1300 均由本实验室保存;TRNZOL、MLV、pMD19-T Vector、*Xba* I 和 *Kpn* I 限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、DNA 分子量标准、质粒 DNA 回收试剂盒等购自 TaKaRa 公司;DNA 凝胶回收试剂盒购自上海生工生物工程有限公司。引物合成和测序由上海博尚生物技术有限公司完成。

### 1.2 试验方法

#### 1.2.1 总 DNA、RNA 的提取及 mRNA 的反转录

选取生长 5~6 周的实验室栽培烟草 K326 植株,采用 CTAB 法提取烟草根尖组织基因组 DNA,方法参考文献<sup>[12]</sup>。以 TRNzol 法提取烟草根尖组织总 RNA,反转录根尖组织 mRNA 为 cDNA,提取和反转录方法均参照试剂说明书。

1.2.2 烟株打顶前、后 *NtNAC-R1* 和 *PMT* 的 RT-PCR 检测 提取不打顶、打顶 24 h 后的烟株根尖组织总 RNA,以 *Actin*(AB158612)为内参,RT-PCR 检测根尖组织中的 *NtNAC-R1*、*PMT*(EU165356.1)基因的相对表达量。*Actin* 引物为 ACTIN-S: ACTGGT-GTTATGGTTGGTATGGGTC, ACTIN-A: AT-GACCTGCCCATCTGGTAAGTC。*PMT* 引物为 PMT-S: CAGAACGGGACAATCAGC, PMT-A: GGACCTTCAGTAGAGCAGT。*NtNAC-R1* 引物为 *NtNAC-R1*-S: GGATAAAGAAGGCGTTAGT-GTT, *NtNAC-R1*-A: CTTTGGACCTCCTTAT-TACACG。

1.2.3 *NtRNA-R1* 基因的克隆 根据已知 *NtNAC-R1* 基因的全长序列及所用载体的限制性酶切位点,用 Primer 5.0 设计扩增 ORF 的特异引物,在引物的 5'端和 3'端分别加上限制性内切酶 *Xba* I 和 *Kpn* I 酶切位点以及保护碱基,引物序列为 PN-R: 5'-CGCCGT/CTAGAGAAGAGTGAAATTTTGAAGG-3'和 PN-S: 5'-GACTCACG/GTACCGTAAGGTTTCTGCATGT-3'。分别以烟草根尖组织总 RNA 的反转录产物 cDNA 和基因组 DNA 为模板,进行 PCR 扩增,反应条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 40 s, 60 °C 45 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 延长 10 min。PCR 产物纯化回收后,连接至 pMD19-T Vector,转化感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,鉴定并测序。其中连接以 cDNA 为模板扩增 ORF 的质粒命名为 *NtNAC-R1-T*。

1.2.4 瞬时表达载体构建和农杆菌介导转化 分别用 *Xba* I 和 *Kpn* I 同时双酶切质粒 *NtNAC-R1-T*、pS1300,凝胶回收酶切产物,T4 连接酶 16 °C 下过夜连接,转化感受态大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,构建融合质粒 pS1300-*NtNAC-R1*。热激法将融合质粒和空载体分别转化感受态农杆菌 GV3101,经 Kana 抗性筛选和菌液 PCR 验证阳性菌落。参照 Sparkes 等<sup>[13]</sup>的方法建立烟草叶片瞬时表达体系。

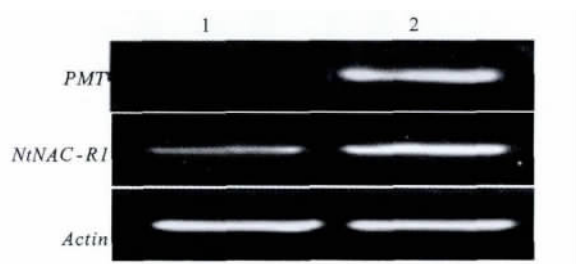
1.2.5 瞬时表达分析 烟株正常培养 3 d 后提取瞬时表达 pS1300-*NtNAC-R1*、转化 pS1300 空载体和未转化烟株的叶片总 RNA,利用 Primer 5.0 设计特异引物, *Actin* 为内参, RT-PCR 检测 *IAA13*

(ADG60258.1)、*PDF1.2* (NM\_123809.3)、*PMT*、*NtNAC-R1* 基因的瞬时表达水平。*IAA13* 引物为 *IAA13-S*: TCACTAATGCGAGTAGCAGC, *IAA13-A*: TAGGCTTAGTCCTCTGTCTTCC。*PDF1.2* 引物为 *PDF1.2-S*: GCGCCGGTATTTTATATTATTGTAA-CAACAA, *PDF1.2-A*: GCGCCACACAACACATA-CATCTATACATTG。

## 2 结果与分析

### 2.1 烟株打顶前、后 *NtNAC-R1* 和 *PMT* 的表达水平分析

RT-PCR 结果(图 1、2)显示,烟株打顶后根尖组织中的 *NtNAC-R1* 基因和烟碱合成关键基因 *PMT* 表达量均明显升高。相对表达量分析表明,打顶后 *NtNAC-R1* 基因的表达量与烟碱合成量变化趋势一致,为进一步研究烟株打顶后 *NtNAC-R1* 基因对烟碱合成的调控作用奠定了基础。



1. 不打顶烟株; 2. 打顶烟株

图 1 烟株打顶前、后 RT-PCR 检测 *NtNAC-R1*、*PMT* 表达水平

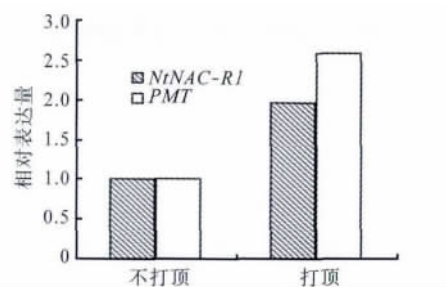
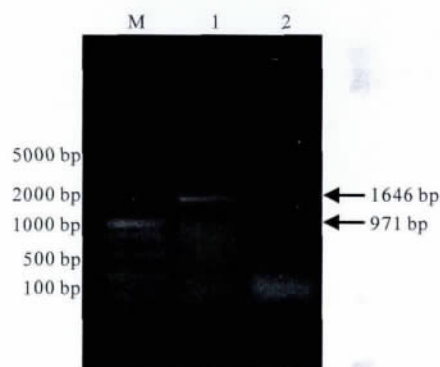


图 2 *NtNAC-R1* 和 *PMT* 在烟株打顶前、后的相对表达量

### 2.2 烟草 *NtNAC-R1* 的克隆及内含子鉴定

以烟草基因组 DNA 为模板进行扩增,获得一条 1 646 bp 的特异性条带(图 3),经测序后,比对 cDNA 序列分析表明,*NtNAC-R1* 内部含有 2 个大小分别为 613 bp 和 97 bp 的内含子,具有典型的 GU……AG 内含子剪切特征,内含子区域富含 AU,属于 U2-型内含子<sup>[14]</sup>,均位于 N-端的蛋白保守域中(图 4)。



M. DL5000; 1. 以 DNA 为模板; 2. 以 cDNA 为模板

图 3 不同模板 *NtNAC-R1* 基因 ORF 的 PCR 扩增结果

```

1  ATGATCAAAGGCGTACACAGAAATCAGCAGCAATGGAATTACCAGCGGATTAGATTCCATCCAAACGGATG
74  AGGAATTAGTTCACATTATCTCTGCGTAAATGCGCTGGCAGCCTATATCTGTTTCAATTATAGCTGAAATTGA
150  TCTTTGCAAGTTTGATCTTGCGCAATTACCTGGTAAATTTTGCTCTCTCATTTTTCATGCTTTCAAAT
223  CTAGGTGTAAGAAATAGAACAGATTAAATGACTTATTTAGGTTTAACTATAATTTTAGAGCTTTTAA
294  CAGGGTTGAGTTTTCATCTTCGGAATTGGGTTTGGGTTAGTAGGATGATATATACTAGTAAGTTGA
364  GTGACCTCTGTAAGAAATTCAGTGGTGTATTTTGTAATAAAATCGTTTCTTTCAAAATTGTCTCT
434  GGTATTTTAATTTTAAAGGAAAATTCATTTCTTTCACCGAATTAATAGTAATAATAATTTTGTGAC
506  TGCCATGGAGTTCTTACACAAATAGCTGGTAAATCTCTATTTACTTTTTCGAGCGGGTATGCATAAA
576  TTTATATAATTTTCATGATTATATACATATTATATAGATTATATAATTTTATACAATTAATCTCTCTATA
651  ACAACTATCTTATATAACATTCATTATATAAAAGCTAAACAATGTTTTATATATCTGTTAGCTATTTT
724  AAATTTAGCAGCTGTCCGGCTATTAGATTAAATTTTCTATCCAAATAATTTGTTTGTATAAATGCAG
795  AGAAGGCTTTGCAAGGTAAGAAAGGAATGGTATTTTCTACCAAGAGATAGAAAATATCCGAACGGCTACG
868  GCCAAACAGAGCGCGGAGCGGTTACTTGAAGGCCACCGAGCTGATAAGCCAGTGGGAAAGGCCAAG
938  ACTTTAGGATAAAGAAGGCGTTAGTGTTTACGCTGGAAGGCAACCCAGAGGAATCAAAACCAATTGGATAA
1011  TGCACGAATATGACTGCTAATGTGGACGGTCTCTGGCAAGAGCAATAAATCTGAGGGTAAAGCGCTC
1083  TCAGATTCTGGATTAAACCTGAATCCAAATTTTATTAATATAATCGAAATTTGTATTGTGACTTATTA
1155  GTGAACCTTTTTCAGCTTGACGATTGGGTATTGTGCGAATATACAACAAGAAGGGCACACTTGAGAAGTAT
1228  ACAATGTGGATAACAAGGAACATTTGGGCTTCGATGAAGTTGAGGAAGAAGAGGAAAAACCAAGTTTATC
1300  CATTTTCACAAAGTAATGAGTTGATAGCACAATTAGCAACGAGCGCGGATGCCACCGCGGCCACATCGATGC
1373  GGGCTACTTTCATTTGAAACGTCGAGTGTGACTAGGATGCATACAACAACTCGAGCTCTGGGTCAGAG
1446  CATGTTTGTGCTGTGTAATAAGGAGGTCCAAAGTGTCCCAATGGGACGACCTCGACAATGCCCTGATTT
1520  CCAGCTAAATTTTGGACAGCTTCCAATATGAOCTTTTGAGCOCCAAATGCAGCAGCAAAATTCACAACTG
1594  ATCAGTCAATCTTTTCCAAGACATGTTCTGATATGACAGAAOCTTACTAA

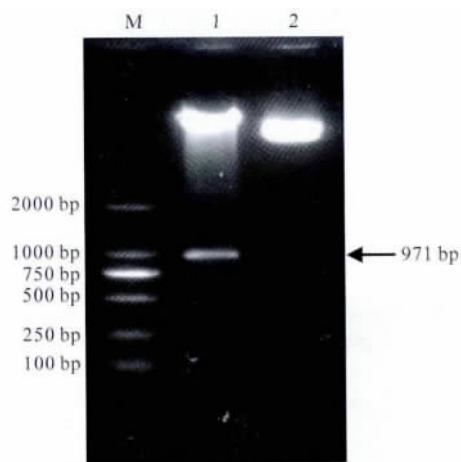
```

下划线部分代表 *NtNAC-R1* 的内含子序列

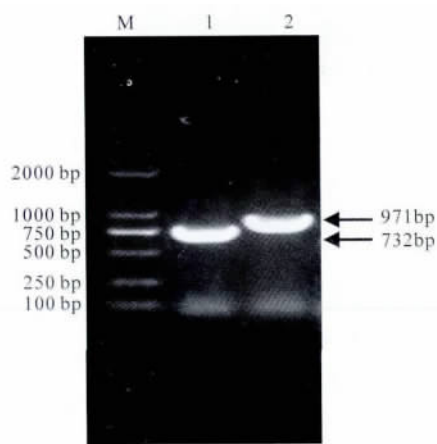
图 4 *NtNAC-R1* 的 ORF 和内含子核苷酸序列及结构示意图

### 2.3 瞬时表达载体构建及农杆菌转化

RT-PCR 扩增 *NtNAC-R1* 基因 ORF 全长, 扩增产物大小为 971 bp(图 3), 测序结果与已知序列完全一致。Xba I 和 Kpn I 双酶切鉴定融合载体 pS1300-NtNAC-R1, 获得大小约 971 bp 条带(图 5), 证实重组子含有目的基因。经测序验证结果正确。菌液 PCR 验证转化农杆菌 GV3101 菌落, 其中 pS1300 产物大小约 732 bp, pS1300-NtNAC-R1 产物大小约 971 bp(图 6), 证明转化成功。



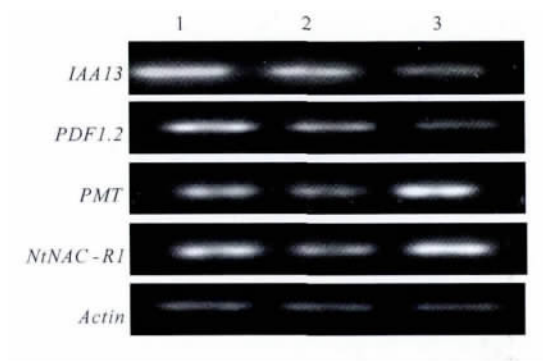
M, DL2000; 1. 重组质粒 Xba I、Kpn I 双酶切; 2. 重组质粒  
图 5 重组质粒 pS1300-NtNAC-R1 的双酶切分析



M, DL2000; 1. pS1300; 2. pS1300-NtNAC-R1  
图 6 菌液 PCR 鉴定 pS1300 和 pS1300-NtNAC-R1 阳性菌落

### 2.4 瞬时表达 *NtNAC-R1* 基因分析

RT-PCR 检测结果(图 7、8)显示, 与对照相比, *NtNAC-R1* 基因过表达, *PDF1.2* 的表达量降低, 说明 *NtNAC-R1* 参与到烟草 JA 信号途径中; *IAA13* 的表达量降低, 说明 *NtNAC-R1* 参与到生长素信号传导过程中。PMT 表达量升高, 表明烟草 *NtNAC-R1* 能够调控 PMT 基因的表达, 促进了烟碱的生物合成。



1. 空白对照; 2. 转化空载体 pS1300 植株;  
3. 转化融合载体 pS1300-NtNAC-R1 植株

图 7 瞬时表达 *NtNAC-R1* 后 RT-PCR 检测  
*NtNAC-R1*、PMT、*PDF1.2*、*IAA13* 表达水平

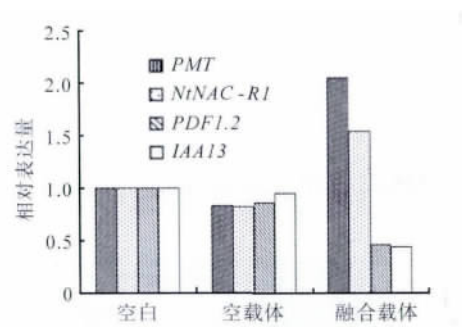


图 8 瞬时表达 *NtNAC-R1* 后 *NtNAC-R1*、PMT、*PDF1.2*、*IAA13* 基因的相对表达量

## 3 结论与讨论

已知植物内含子的一个显著特点就是富含 UA 序列, UA 序列均匀分散在整个内含子中, 对于保证剪接的保真度和精确性起着关键作用<sup>[6]</sup>。有研究表明, 在转基因玉米中, 玉米蔗糖合成酶基因 *Sh1* 的第 1 个内含子能使报告基因的表达水平增强近 40 倍<sup>[15]</sup>, 通过 DNA 重组试验也发现, 番茄蛋白酶抑制剂 II 基因的内含子 TPI 序列能够有效促进 *GUS* 基因的表达<sup>[16]</sup>, 烟草多聚泛素基因前导内含子不仅能极大提高基因的表达量, 而且能够调控基因的组织特异性表达<sup>[17]</sup>。本研究鉴定了 *NtNAC-R1* 基因的 2 个内含子, 为进一步研究其对基因表达的影响奠定基础。

作为一种伤害刺激, 打顶势必引起植物相关抗胁迫机制的响应, JA 信号途径是有关伤害刺激的主要胁迫信号途径之一, 该信号途径激活后能够引起防御基因 *PDF1.2* 的表达, *PDF1.2* 可作为 JA 途径的一个标记基因<sup>[18]</sup>。打顶去除了生长素的产生位点, 将会激活 IAA 信号通路, *IAA13* 为 Aux/IAA 基因家族成员, 是一个早期响应生长素信号的因子, 在生长素信号转导过程中发挥调控作用, 其可作为 IAA 激素响应的一个标记基因<sup>[19]</sup>。本研究对

*NtNAC-R1* 基因瞬时表达分析表明,该基因受 JA 信号和 IAA 信号途径的交互对话影响,进而影响烟碱的生物合成。该结果将为系统分析 *NtNAC-R1* 基因在影响烟株根系发育及烟碱生物合成中的调控作用提供依据。

#### 参考文献:

- [1] 谢树章,李新海,雷开荣. 内含子调控转基因植物外源基因的表达研究[J/OL]. 分子植物育种, 2011, 9(12): <http://mpb.chinese.sophiapublisher.com>.
- [2] 王悦冰,郎志宏,黄大日方. 内含子对真核基因表达调控的影响[J]. 生物技术通报, 2008(4): 1-4.
- [3] Addie N O, Heidi A E, Leila L L, *et al.* NAC transcription factors: Structurally distinct, functionally diverse [J]. Plant Science, 2005, 10(2): 79-87.
- [4] Ooka H, Satoh K, Doi K, *et al.* Comprehensive analysis of NAC family genes in *Oryza sativa* and *Arabidopsis thaliana* [J]. DNA Research, 2003, 10(6): 239-247.
- [5] 孙利军,李大勇,张慧娟,等. NAC 转录因子在植物抗病和抗非生物胁迫反应中的作用[J]. 遗传, 2012, 34(8): 993-1002.
- [6] Puranik S, Sahu P P, Srivastava P S, *et al.* NAC proteins: Regulation and role in stress tolerance [J]. Plant Science, 2012, 17(6): 369-381.
- [7] 邹焱,苏以容. 打顶及施用植物生长调节剂对烟草内源激素的影响[J]. 烟草科技, 2008(10): 50-53.
- [8] 刘卫群,丁永乐,张联合,等. 烤烟打顶前后根系激素水平与物质代谢的关系初探[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(4): 330-332.
- [9] Shoji T, Nakajima K, Hashimoto T. Jasmonate induction of putrescine N-methyltransferase genes in the root of *Nicotiana sylvestris* [J]. Plant Cell Physiol, 2000, 41(7): 831-839.
- [10] 戚元成,马雷,王菲菲,等. 打顶烟草根尖组织抑制性消减 cDNA 文库的构建及其序列分析[J]. 中国农业科学, 2011, 44(7): 1331-1337.
- [11] 戚元成,王菲菲,刘卫群,等. 烟草中 NAC 类转录因子的克隆及分析[J]. 中国农业科学, 2011, 44(11): 2225-2233.
- [12] 萨姆布鲁克 J, 费里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T, 等. 分子克隆实验指南[M]. 金冬雁,黎孟枫,译. 北京:科学出版社, 1999: 19-22.
- [13] 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 Protoc, 2006, 1(4): 2019-2025.
- [14] Eugene V K, Miklos C, Igor B R. Whence genes in pieces: Reconstruction of the exon-intron gene structures of the last eukaryotic common ancestor and other ancestral eukaryotes [J]. WIREs RNA, 2013(4): 93-105.
- [15] Clancy M, Hannah L C. Splicing of the maize *Sh1* first intron is essential for enhancement of gene expression, and a T-rich motif increases expression without affecting splicing [J]. Plant Physiol, 2002, 130(2): 918-929.
- [16] 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[J]. 科学通报, 2001, 46(11): 933-938.
- [17] Plesse B, Criqui M C, Durr A, *et al.* Effects of the polyubiquitin gene *Ubi. U4* leader intron and first ubiquitin monomer on reporter gene expression in *Nicotiana tabacum* [J]. Plant Molecular Biology, 2001, 45: 655-667.
- [18] Rebecca L B, Kemal K, Ken C M, *et al.* A role for the GCC-box in jasmonate-mediated activation of the *PDF1. 2* gene of *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2003, 6: 1020-1032.
- [19] Thakur J K, Jain M, Tyagi A K, *et al.* Exogenous auxin enhances the degradation of a light down-regulated and nuclear-localized OsIAA1, an Aux/IAA protein from rice, via proteasome [J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1730(3): 196-205.