

# 拟南芥 *IQM3* 基因的表达分析及其突变体的鉴定

周玉萍<sup>1,2,3,4</sup>, 赵军<sup>3</sup>, 何滔<sup>3</sup>, 程惠贞<sup>3</sup>, 段俊<sup>1</sup>, 田长恩<sup>3,4</sup>

(1. 中国科学院华南植物园, 广州 510650; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049;

3. 广州市植物抗逆基因功能研究重点实验室, 广州 510405; 4. 广州大学生命科学学院, 广州 510006)

**摘要:**对拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) *IQM3* 基因的功能进行了分析。结果表明,推定 *IQM3* 的启动子中存在多种光、非生物胁迫和植物激素反应的顺式作用元件,可能参与植物对环境变化的反应。RT-PCR 分析表明,*IQM3* 在拟南芥莲座叶、花序叶、茎、花和根中的表达较强,但在荚果中的表达很弱;*IQM3* 基因的 T-DNA 插入突变体 *iqm3-1* 和 *iqm3-2* 分别是功能缺失和超表达突变体,对这些突变体的表型分析表明,*IQM3* 基因与种子萌发及幼苗子叶膨大有密切关系。

**关键词:** 拟南芥; 基因表达; *IQM3*; *iqm3-1*; *iqm3-2*

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2009)04-0365-06

## Expression Analysis of *Arabidopsis thaliana* *IQM3* Gene and Identification of *iqm3* Mutants

ZHOU Yu-ping<sup>1,2,3,4</sup>, ZHAO Jun<sup>3</sup>, HE Tao<sup>3</sup>, CHENG Hui-zhen<sup>3</sup>, DUAN Jun<sup>1\*</sup>, TIAN Chang-en<sup>3,4\*</sup>

(1. South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China;

2. Graduate University of Chinese Academy of Science, Beijing 100049, China; 3. Guangzhou Key Laboratory for Functional Studies on Plant Stress Resistant Genes, Guangzhou University, Guangzhou 510405, China;

4. School of Life Sciences, Guangzhou University, Guangzhou 510006, China)

**Abstract:** The function of *IQM3* gene from *Arabidopsis thaliana* was analyzed. The results showed that the putative promoter region of *IQM3* contained *cis*-acting regulatory elements involved in response to environmental changes, such as light, phytohormones and abiotic-stress. *IQM3* gene strongly expressed in different organs of 6-week-old plant, such as flower, rosette leaf, cauline leaf, stem, and root, but weakly in pods. Mutants *iqm3-1* and *iqm3-2* inserted T-DNA of *IQM3* gene had been found to be loss-of-function and over-expression line, respectively, by RT-PCR analysis. Phenotypic characterization of the mutants indicated that *IQM3* gene related with seed germination and cotyledon expansion.

**Key words:** *Arabidopsis thaliana*; Gene expression; *IQM3*; *iqm3-1*; *iqm3-2*

钙调素(calmodulin, CaM)作为细胞内  $Ca^{2+}$  的重要受体,在钙信号转导中起着重要作用。CaM 不具备酶和转录因子活性,必须通过钙调素结合蛋白(calmodulin-binding protein, CaMBP)等靶标来调节细胞生理。研究 CaMBP 是揭示 CaM 功能的重要途径,对 CaMBP 的鉴定和分析有助于阐明 CaM 信号途径的特异性、复杂性和多样性。CaMBP 与

CaM 的结合可分为  $Ca^{2+}$  依赖、 $Ca^{2+}$  不依赖和  $Ca^{2+}$  抑制 3 种类型<sup>[1]</sup>,其中, $Ca^{2+}$  不依赖型 CaMBP 含有 IQ 基序[(FILV)Qxxx(RK)Gxxx(RK)xx(FILVWY)]<sup>[2]</sup>。

*IQM1* 由 *At4g33050* 编码,含有一个 IQ 基序,与根的生长发育有关且在酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)中能够与拟南芥钙调素 2(CaM2)结合<sup>[3]</sup>。在拟南芥中还发现了另外 5 个含有 1 个 IQ 基序且

收稿日期:2007-10-09 接受日期:2008-01-10

基金项目:广州大学科研创新团队项目(2008)资助

\* 通讯作者 Corresponding author

与 IQM1 高度同源的蛋白,将这 6 个蛋白命名为 IQM 家族(IQ motif-containing proteins)。我们的研究表明 IQM2 参与蓝光信号转导(资料待发表)。这说明 IQM 家族成员在功能上存在差异,有必要对它们的功能进行研究。IQM3 由 *At3g52870* 编码,功能未知。本文旨在通过分析启动子顺式作用元件的生物信息学、*IQM3* 在成熟植株不同器官中的表达谱、突变体中 *IQM3* 的表达和突变体的表型,探讨 *IQM3* 基因的功能,为其利用和基因工程研究奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 植物材料

野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)为 Columbia (Col)生态型,由本实验室保藏。T-DNA 插入突变株 *SALK\_152927(iqm3-1)*和 *SALK\_086109(iqm3-2)*的种子购自 ABRC (The Arabidopsis Biological Resource Center, Ohio State University, USA)。

种子于 4℃ 处理 48 h,常规消毒后接种在 1/2MS 培养基上,按要求置于不同光照条件的培养箱中培养;或直接播种到营养土的表面,置于培养室中培养,培养温度 23℃,持续 93  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  光照,供表型观察、基因表达分析或分子标记鉴定用。

### 1.2 总 RNA 的提取

总 RNA 的提取采用 UNIQ-10 柱式 Trizol 总 RNA 抽提试剂盒(上海生工),按说明书操作。

### 1.3 基因表达的 RT-PCR 分析

根据 *IQM3* 基因设计特异性引物,正向引物 F: 5'-AGCTTCGATTTTCAGTCTTCG-3' 和反向引物 R: 5'-CCATGCATTGTGTGTAAGAAC-3',引物在基因组 DNA 上的距离为 1 279 bp,在 mRNA 上的距离为 662 bp。并以拟南芥基因组中的看家基因  $\beta$ -*ATPase* 设计了内标引物, F: 5'-CTGAATCAATCTCTTAAGCTG-3' 和 R: 5'-GTGCAGAAAGTTCTACAGAACTAC-3'。RT-PCR 采用 TaKaRa One Step RT-PCR Kit,每样品取 100 ng 总 RNA,总反应体积为 15  $\mu\text{L}$ 。扩增程序为 50℃ 30 min, 94℃ 2 min, 然后 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 90s, 35 个循环, 最后 72℃ 5 min。反应结束后取产物 5  $\mu\text{L}$  加入 1  $\mu\text{L}$  6  $\times$  loading buffer, 在 1.0% 的琼脂糖凝胶上电泳检测,用全自动凝胶成像分析系统(Alpha Innotech

Multimage™ Light Cabinet Filter Positions)拍照。

### 1.4 基因组 DNA 的提取

从待检植株上取 1 片嫩叶,液氮冷冻后研磨成粉末,常规方法<sup>[4]</sup>提取叶片基因组 DNA。

### 1.5 突变体的 PCR 鉴定

根据 ABRC 所提供的 *IQM3* 基因中 T-DNA 插入位点的旁侧序列,设计两对专一性的鉴定突变体的引物, F1: 5'-AGCTTCGATTTTCAGTCTTCG-3' 和 R1: 5'-CCATGCATTGTGTGTAAGAAC-3'; F2: 5'-CGTTGTTAGGTGGTGTCCG-3' 和 R2: 5'-CTTCTCCGACCAAAGAGAG-3'。同时根据 ABRC 所提供的 salk T-DNA 左边界序列设计 T-DNA 专一引物 LBa1: 5'-GCGTGGACCGCTTGCAACT-3'。PCR 总反应体系为 10  $\mu\text{L}$ , DNA 模板为 10 ~ 100 ng, 扩增参数: 94℃ 4 min, 然后 94℃ 30 s, 61℃ 30 s, 72℃ 90 s, 35 个循环; 72℃ 5 min。取扩增产物 5  $\mu\text{L}$  加入 1  $\mu\text{L}$  10  $\times$  loading buffer, 在 1.0% 的琼脂糖凝胶上电泳后用如前所述的凝胶成像系统照相。

### 1.6 突变体的表型鉴定

**生长观察** 将经冷处理的种子直接点种到小盆的土上,每个株系各点种 5 盆,挑选长势一致的,每盆留 1 株苗,其余拔掉。从幼苗到成熟,记录长真叶和开花的时间及开花时的叶片数、主花苔数、荚果数、种子重量。实验重复 3 次。

**子叶大小、下胚轴长度与发芽率** 同一批种植的 3 个基因型植株的种子,生长条件、成熟度、干湿度一致。冷处理的种子约 100 粒消毒后接种到 1/2MS 固体培养基平板上,人工气候箱中 22℃ 培养 8 d;暗中培养的平板在接种后先进行 24 h 光照,后包上 2 层锡纸,继续培养 5 d。取出平板,记录没有发芽的种子数和幼苗数,统计发芽率。然后随机取部分幼苗浸泡在固定液(含 5% 甲醇和 5% 冰乙酸的溶液)中软化 3 h 以上,软化的幼苗拉直平铺在 1% 的琼脂平板上扫描,用 Scion Image 软件量出幼苗下胚轴的长度。另外,随机剪下每一株系的十几片子叶,平铺于平板上,扫描,测量叶宽和叶长。

**根的长度、生长速率** 将经冷处理的种子消毒,接种到加有 1/2MS 固体培养基的方形格子培养皿中,人工气候箱中 22℃ 培养,等根长到 0.5 cm 后作标记,3 d 后再扫描,用 Scion Image 软件测其长度。

## 2 结果和分析

### 2.1 *IQM3* 基因的推定启动子生物信息学分析

基因的时空表达决定着基因功能的发挥,而基因表达又受制于启动子中存在的顺式作用元件,因此,进行启动子生物信息学分析将有助于揭示基因的功能。我们首先从拟南芥数据库(The Arabidopsis Information Resource, TAIR)获得 *IQM3* 基因第1个 ATG 上游 2 kb 的序列作为推测的启动子序列,并利用 Web 软件 PlantCare (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 和 PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>) 搜寻其中包含的顺式作用元件。结果表明, *IQM3* 基因的启动子区有 35 个光反应元件; 2 个脱落酸(ABA)、16 个甲基茉莉酸(MeJA)、5 个赤霉素(GA<sub>3</sub>)、7 个水杨酸(SA)和 1 个生长素(IAA)等顺式作用元件; 14 个与非生物胁迫相关的反应元件(包括脱水、高温、低温、干旱、伤害和盐胁迫等)以及 4 个激发子元件(elicitor)。另外有 18 个在内种皮特异性表达的反应元件(表 1)。这些顺式作用元件的存在暗示该基因可能参与了植物对光照和逆境胁迫等的反应,是一个重要的基因。

迫等)以及 4 个激发子元件(elicitor)。另外有 18 个在内种皮特异性表达的反应元件(表 1)。这些顺式作用元件的存在暗示该基因可能参与了植物对光照和逆境胁迫等的反应,是一个重要的基因。

### 2.2 *IQM3* 基因的器官表达谱

*IQM3* 基因全长为 2 650 bp, 包括 9 个外显子和 8 个内含子,其 mRNA 由 1 371 个核糖核苷酸组成。通过 RT-PCR 技术分析其在成年植株中的表达谱(图 1), *IQM3* 基因在莲座叶中表达非常强,在茎生叶、茎、花和根中的表达较强,但在角果中表达很弱。说明 *IQM3* 基因在成年植株不同组织中的表达水平不同。

### 2.3 拟南芥 *iqm3* 突变体的鉴定

#### 2.3.1 突变体的 PCR 鉴定

根据 ABRC 提供的 *Salk* T-DNA 在 *IQM3* 基因插入的资料,绘出 *IQM3* 基因中 T-DNA 插入的结构图(图 2), *iqm3-1* 中 T-DNA 正向插入第 3 个内含

表 1 *IQM3* 基因推定启动子中的主要顺式作用元件

Table 1 Main *cis*-elements in the putative promotor of *IQM3*

顺式元件 <i>Cis</i> -elements	数量 Number	功能 Function
ABRE	2	脱落酸反应 The abscisic acid responsiveness
ACE	2	光反应 Light responsiveness
AE-Box	3	光反应 Part of a module for light response
Box-4	6	光反应 Light responsiveness
CGTCA	8	甲基茉莉酸反应 The MeJA-responsiveness
chs-Unit 1	4	光反应 Part of a light responsive element
DRE	1	脱水、低温、盐胁迫 Dehydration, low-temp, salt stresses
ELI-Box3	4	激发子反应 Elicitor-responsive element
GARE	4	赤霉素反应 Gibberellin-responsive element
GA/GAG	4	光反应 Part of a light responsive element
G-Box	8	光反应 Light responsiveness
GCN4	4	内种皮表达 Endosperm expression
GT1	3	光反应 Light responsive element
HSE	1	热胁迫反应 Heat stress responsiveness
MBS	1	干旱诱导反应 MYB binding site involved in drought-inducibility
P-Box	1	赤霉素反应 Gibberellin-responsive element
Skn-1	14	内种皮表达 Endosperm expression
TCT	5	光反应 Part of a light responsive element
TGACG	8	甲基茉莉酸反应 The MeJA-responsiveness
TCA	7	水杨酸反应 Salicylic acid responsiveness
TGACG	1	生长素反应 Auxin-responsive element
TC-rich repeats	5	防御和胁迫反应 Defense and stress responsiveness
WUN	1	伤害反应 Wound-responsive element

子(+564 bp)中,*iqm3-2* 中 T-DNA 反向插入启动子(-561 bp)中。利用 3 对引物分别进行 PCR, 鉴定每株植株的基因型。利用引物对 F1 和 R1 或 F2 和 R2 分别进行 PCR, 当有特异性条带时, 说明植株中不存在 T-DNA 插入, 为野生型; 利用引物对 LBa1 与 F1 或 R1 分别进行 PCR, 当有特异性条带时, 确定植株中存在 T-DNA 插入(*iqm3-1*), 利用 LBa1 与

F2 或 R2 分别进行 PCR, 当有特异性条带时, 确定植株中存在 T-DNA 插入(*iqm3-2*)。

图 3A 表明, 野生型植株只有用引物 F1 + R1 进行 PCR 才能扩增出特异性条带(1 279 bp), 而用 F1 + LBa1 和 R1 + LBa1 则无扩增条带; 突变体 *iqm3-1* 植株只有用 R1 + LBa1 引物进行 PCR 才能扩增出特异性条带(1 077 bp), 而用 F1 + R1 和 F1 + LBa1 则无扩增条带。图 3B 表明, 野生型植株只有用 F2 + R2 引物进行 PCR 才能扩增出特异性条带(1 359 bp), 而用 F2 + LBa1 和 R2 + LBa1 则无扩增条带; 突变体 *iqm3-2* 植株只有用 F2 + LBa1 引物进行 PCR 才能扩增出特异性条带(1 254 bp), 而用 F2 + R2 和 R2 + LBa1 则无扩增条带。

实验分别从 5 株 *iqm3-1* 和 14 株 *iqm3-2* 候选植株中分别获得了 3 株和 9 株纯合突变体。

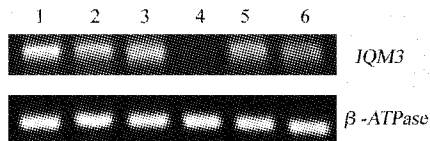


图 1 *IQM3* 基因的器官表达谱

Fig. 1 Expression of *AtIQM3* in different organs

6 周龄 Col 植株,  $\beta$ -*ATPase* 基因作内标。6-week-old wild type plant,  $\beta$ -*ATPase* was used as control. 1: 莲座叶 Rosette leaf; 2: 根 Root; 3: 花 Flower; 4: 角果 Silique; 5: 茎 Stem; 6: 茎生叶 Cauline leaf.

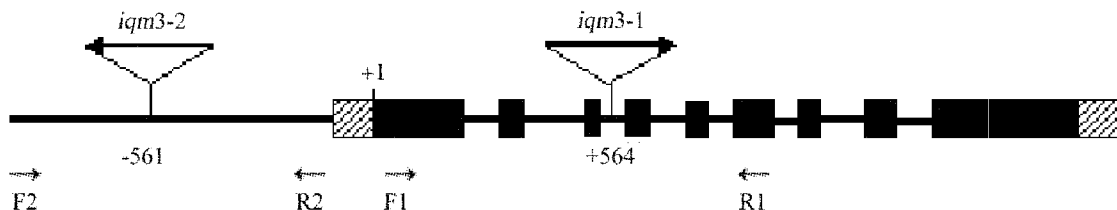


图 2 *IQM3* 基因的 T-DNA 插入位点

Fig. 2 Insertion site of T-DNA in *AtIQM3* gene

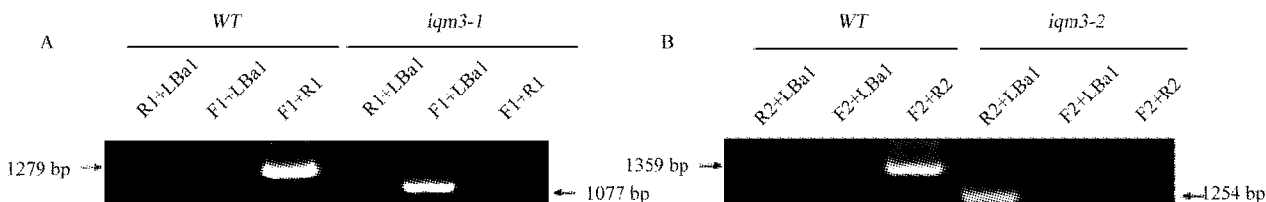


图 3 *iqm3* 突变体的 PCR 鉴定

Fig. 3 Identification of *iqm3* mutants by PCR

A. *iqm3-1*; B. *iqm3-2*; WT: 野生型 Wild type

### 2.3.2 突变体 *IQM3* 的表达分析

由图 4 可知, 3 个材料中的内标( $\beta$ -*ATPase* 扩增出的条带亮度基本一致, 但在突变体中, *iqm3-1* 没有扩增条带, 而 *iqm3-2* 的扩增条带比野生型的亮得多。说明 *iqm3-1* 因为 T-DNA 插入到基因内部, 破坏了基因的完整性, 导致基因不表达, 是一个功能缺失突变体; 而 *iqm3-2* 因为 T-DNA 插入在启动子区域, 增强了启动子的作用, 促进了基因的表达, 是一个超表达突变体。

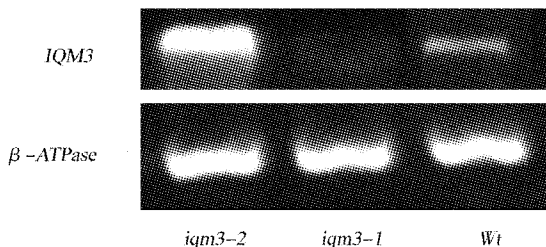


图 4 突变体中 *IQM3* 表达的 RT-PCR 分析

Fig. 4 Analysis on gene expression of *IQM3* in *iqm3-1* and *iqm3-2*

## 2.4 *iqm3-1* 和 *iqm3-2* 的表型分析

功能缺失或超表达突变体是进行基因功能分析的良好材料。为了解 *IQM3* 基因在植株生长发育过程中的作用,我们观察比较了突变体 *iqm3-1*、*iqm3-2* 和野生型 Col 的整个生长周期。与野生型相比,突变体的种子萌发时间、幼苗的下胚轴长度、根的生长速率、侧根发生和发育、真叶长出的时间、抽花苔时间、开花时的莲座叶片数、成熟植株的主花苔数、荚果数和种子重量等均无明显差异(数据未列出),但光下的种子发芽率和幼苗子叶大小存在显著差异。

### 2.4.1 发芽率

在白光下,第5天野生型 Col 的发芽率为

95.4%,*iqm3-1* 和 *iqm3-2* 分别为 86.2% 和 83.9%; 但黑暗下,3 者之间无明显差异。白光下突变体的发芽率始终低于野生型(表 2)。这说明 *IQM3* 基因的突变引起了光照条件下种子发芽率的降低。

### 2.4.2 子叶大小

随机剪取在白光下培养 5d 的幼苗子叶,平铺在琼脂板上,扫描成像后用 Scion Image 软件测量出每片子叶的长度和宽度,结果见图 5。

由图 5 可以看出,*iqm3-1* 的子叶明显大于野生型 Col 和 *iqm3-2*。野生型 Col 的子叶大小为  $1.28 \pm 0.26 \text{ mm} \times 1.10 \pm 0.18 \text{ mm}$ ,*iqm3-1* 为  $1.81 \pm 0.32 \text{ mm} \times 1.46 \pm 0.20 \text{ mm}$ ,*iqm3-2* 的为  $1.41 \pm 0.28 \text{ mm} \times 1.17 \pm 0.18 \text{ mm}$ 。经 Student's *t* 检验,无论是子叶的

表 2 *iqm3-1*、*iqm3-2* 及其野生型的发芽率(%)

株系 Line	白光萌发天数 Germination days under white light			黑暗 Dark
	3	4	5	
Col	91.6 ± 3.0	95.0 ± 3.5	95.4 ± 2.7	86.5 ± 3.0
<i>iqm3-1</i>	83.1 ± 3.8	85.6 ± 3.7	86.2 ± 3.0	85.3 ± 0.9
<i>iqm3-2</i>	77.1 ± 3.9	82.1 ± 3.6	83.9 ± 1.7	76.9 ± 8.9

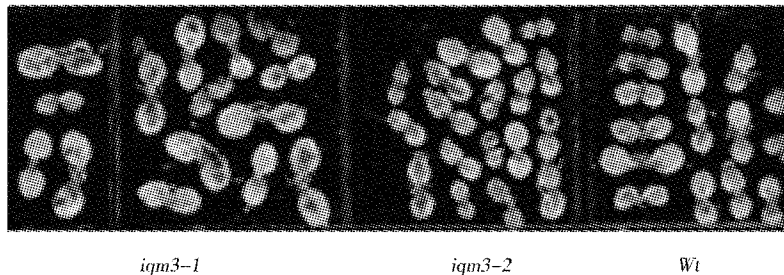


图 5 *iqm3-1*、*iqm3-2* 及野生型植物的子叶

Fig. 5 Cotyledens in *iqm3-1*, *iqm3-2* and wild type

长度还是宽度,*iqm3-1* 与 *iqm3-2* 和 Col 之间均存在显著差异,而 *iqm3-2* 与 Col 之间则无显著差异。这说明 *IQM3* 功能的缺失促进了子叶的膨大。

## 3 讨论

在植物细胞中,钙调素结合蛋白具有广泛的生理功能,参与到植物发育、代谢调节、细胞骨架功能、激素反应、逆境胁迫反应、防御反应、转录调控和离子吸收等过程<sup>[5]</sup>。目前已鉴定的多种与 CaM 结合的蛋白激酶在植物发育及各种刺激反应中发挥着重要作用<sup>[6]</sup>。拟南芥中 AtIQD1 蛋白既含有 IQ 基序,又含有 Ca<sup>2+</sup> 依赖型基序,涉及植物对非生物胁迫的响应<sup>[7]</sup>,最近在拟南芥中鉴定的钙调素结合蛋白 AtBAG6 含有 IQ 基序,参与了程序化细胞死

亡过程<sup>[8]</sup>。水稻(*Oryza sativa* L.)中的 OsCBT 是既含有 IQ 基序,又含有 Ca<sup>2+</sup> 依赖型基序的 CaMBP,其转录激活作用受 CaM 抑制<sup>[9]</sup>,这表明含 IQ 基序的 CaMBP 的功能和特性各不相同,因此,研究其他含 IQ 基序的 CaMBP 的功能非常必要。

本研究表明,拟南芥 *IQM3* 的推定启动子中存在多种光、非生物胁迫和植物激素反应的顺式作用元件(表 1),预示 *IQM3* 可能参与植物对环境的反应。表达谱分析表明,*IQM3* 在成熟植株的莲座叶中表达非常强,在花序叶、茎、花和根中表达也比较强,但在荚果中很弱(图 2),表明 *IQM3* 基因在成熟植株中的表达具有器官特异性。经过 PCR 鉴定,*iqm3-1* 是功能缺失突变体,*iqm3-2* 是超表达突变体(图 4)。在白光下,*iqm3-1* 和 *iqm3-2* 的种子萌发率

均显著低于野生型(表 2),说明 *IQM3* 基因的超表达或不表达在一定程度上抑制了种子萌发,而该基因的正常表达与种子正常萌发有密切关系。形态上 *iqm3-1* 幼苗的子叶比野生型的大,而 *iqm3-2* 与野生型相似(图 5),说明 *IQM3* 基因的编码产物抑制幼苗子叶的膨大。从表达谱及突变体表型来看,*IQM3* 基因的生物功能与 *IQM1*<sup>[3]</sup> 的明显不同,说明 IQM 家族中各成员的功能是不同的。全面了解 *IQM3* 的生物功能尚待进一步研究。

### 参考文献

- [1] O'Day D H. CaMBOT: Profiling and characterizing calmodulin-binding protein [J]. *Cell Sign*, 2003, 15: 347–354.
- [2] Rhoads A R, Friedberg F. Sequence motif and calmodulin recognition [J]. *FASEB J*, 1997, 11: 331–340.
- [3] Zhou Y P, Fujibe T, Wang X L, et al. Initial characterization of *Arabidopsis* T-DNA insertion mutants of the *IQM1* gene that encodes an IQ Motif-containing protein [J]. *Plant Cell Physiol*, 2007, 48(Suppl): s197.
- [4] Zou H W(邹华文), Huang C L(黄丛林). A simple and rapid method for genome DNA extraction from *Arabidopsis* [J]. *J Yangtze Univ (Nat Sci)*(长江大学学报:自然科学版), 2006, 3(4): 193–194.(in Chinese)
- [5] Mao G H(毛国红), Song L X(宋林霞), Sun D Y(孙大业). Progress of study on calmodulin-binding proteins in plants [J]. *Acta Phytophysiol Sin*(植物生理学报), 2004, 30: 481–488.(in Chinese)
- [6] Zhang L, Lu Y T. Calmodulin-binding protein kinases in plants [J]. *Trends Plant Sci*, 2003, 8: 123–127.
- [7] Abel S, Savchenko T, Levy M. Genome-wide comparative analysis of the IQD gene families in *Arabidopsis thaliana* and *Oryza sativa* [J]. *BMC Evol Biol*, 2005, 5: 72–89.
- [8] Kang C H, Jung W Y, Kang Y H, et al. AtBAG6, a novel calmodulin-binding protein, induces programmed cell death in yeast and plants [J]. *Cell Death Differ*, 2006, 13: 84–95.
- [9] Choi M S, Kim M C, Yo J H, et al. Isolation of a calmodulin-binding transcription factor from rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *J Biol Chem*, 2005, 280: 40820–40831.