

评述与展望

Review and Progress

内含子调控转基因植物外源基因的表达研究

谢树章¹, 李新海², 雷开荣¹

1. 重庆市农业科学院生物技术研究中心, 逆境农业研究重庆市市级重点实验室, 重庆, 401329

2. 中国农业科学院作物科学研究所, 北京, 100081

✉ 通讯作者: lixh2008caas@yahoo.cn; ✉ 作者

分子植物育种, 2011 年, 第 9 卷, 第 12 篇 doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0012

收稿日期: 2010 年 10 月 22 日

接受日期: 2010 年 12 月 11 日

发表日期: 2011 年 02 月 15 日

这是一篇采用 Creative Commons Attribution License 进行授权的开放获取论文。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

引用格式:

谢树章等, 2011, 内含子调控转基因植物外源基因的表达研究, 分子植物育种 Vol.9 No.12 (doi: 10.5376/mpb.cn.2011.09.0012)

摘要 内含子在真核基因表达中具有重要调控作用, 近年来逐渐成为植物转基因中提高外源基因表达水平的研究热点。本文主要对内含子的剪接与分类、真核 mRNA 内含子特性和剪接机制进行概述, 重点分析了内含子对转基因植物外源基因表达的调控作用, 以及影响内含子调控真核基因表达的相关因素, 最后讨论展望了内含子在植物转基因研究的应用前景。本文期望通过真核基因内含子的有效利用, 采用适当的载体构建策略, 提高外源基因在植物体内的表达水平。

关键词 内含子; 转基因植物; 基因表达; 调控机理

The Regulatory Effects of Introns in Transgenic Plant Exogenous Gene Expression

Xie Shuzhang¹, Li Xinhai², Lei Kairong¹

1. Biotechnology Research Center/Chongqing Key Laboratory of Adversity Agriculture, Chongqing Academy of Agricultural Sciences, Chongqing, 401329, P.R. China

2. Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, 100081, P.R. China

✉ Corresponding author, lixh2008caas@yahoo.cn; ✉ Authors

Abstract Introns play an important role in regulation of eukaryotic gene expression. It has been used to improve Exogenous expression of transgenic plant. This paper mainly summarized splicing and classification of introns, features and splicing mechanism of Eukaryotic mRNA introns. we emphatically analyzes the regulatory effects of introns in transgenic plant Exogenous gene expression, then the influencing factors of the regulation process also been studied. Finally we discussed the application prospect of introns in Plant Genetic Engineering. We hope to improve expression level of transgenic plant by means of effective utilization of Eukaryotic gene introns and Proper vector construction Strategy.

Keywords Introns play an imIntron; Transgenic plants; Gene expression; Regulation mechanism

研究背景

绝大多数真核生物的基因为断裂基因, 主要由内含子(intron)和外显子(exon)组成。人们一直认为外显子的主要功能是编码蛋白质, 而内含子没有功能作用, 是一种垃圾 DNA (junk DNA)。但随着分子生物学的深入研究和基因工程技术的飞速发展, 现已发现内含子在基因表达中具有重要的调控作用, 已成为植物转基因中提高外源基因表达的研究热点(Brinster et al., 1988; 李杨等, 2004)。本文主要对内含子的剪接与分类、真核 mRNA 内含子特性和

剪接机制进行概述, 重点分析了内含子对转基因植物外源基因表达的调控作用, 以及影响内含子调控真核基因表达的相关因素, 最后对内含子在植物转基因研究的应用前景进行了展望。以期通过真核基因内含子的有效利用, 采用适当的载体构建策略, 提高外源基因在植物体内的表达水平。

1 内含子的剪接及分类

真核生物基因的基本特征是其被一个或多个内含子所间隔, 这些间隔 DNA 在转录后被除去以形成具有完整读码框的 mRNA, 这一过程称为内含

子剪接。根据剪接方式与结构不同, 内含子可以分为三类: 自我剪接内含子、真核 tRNA 内含子和真核 mRNA 内含子。

1.1 自我剪接内含子

自我剪接内含子指的是内含子的删除和外显子的连接通过 RNA 自身催化完成。在没有蛋白质存在的情况下, RNA 分子可经由自身的自我剪接反应将内含子剪接掉, 该过程除了需要鸟苷酸和 Mg^{2+} 外, 不需要任何酶的参与, 并可相邻片断的 5'端、3'端连接成为成熟的 RNA。通过碱基配对的方式, 这些 RNA 在一定条件下与底物 RNA 结合, 从而催化底物在特异位点断裂, 因而被称之为核糖核酸内切酶(ribozyme)。动植物细胞以及细菌、真菌中都存在这一类酶, 它们自身的 RNA 分子具备自我剪接(self-splicing)的功能。

1.2 真核 tRNA 内含子

真核 tRNA 内含子的剪接机制

以酵母为例, 首先核酸内切酶在两端把内含子切开, 然后内含子被释放出来, 同时产生两个“tRNA”半分子, 然后再由 RNA 连接酶和磷酸酯酶在 ATP 存在下起作用, 将这两个“tRNA”半分子进行连接, 产生成熟的 tRNA 分子(丁红梅等, 2006)。

1.3 真核 mRNA 内含子

随着基因组测序计划的进行, 发现绝大多数真核基因都含有内含子, 并且主要是真核 mRNA 内含子。真核基因的前体 mRNA(pre-mRNA)大部分含有 1 个或多个内含子, 在 mRNA 成熟的过程中, 这些内含子序列的删除和外显子序列的连接过程称为前体 mRNA 的剪辑(pre-mRNA splicing)。因为前体 mRNA 只有经过剪辑才能成为可翻译的成熟 mRNA, 而内含子的剪辑跟 mRNA 3'末端的形成及 mRNA 的运输密切相关, 所以前体 mRNA 的剪辑, 既是真核生物基因表达的一个重要环节, 也是调控基因表达的一个关键步骤。

真核 mRNA 内含子的剪接部位一般有三个: 3'端剪切点 AG、5'端剪切点 GT 和靠近 3'端含 A 序列的分支点。真核 mRNA 内含子的剪接是由剪接体来完成, 剪接体是由前体 mRNA、核内小分子核糖核蛋白(snRNPs)以及其它相关蛋白质因子组装成的精密装置。

2 内含子的序列特征

根据序列结构的特点, 内含子主要有两种类型: U2-型内含子和 U12-型内含子, U2-型内含子普遍存在, 约占总数的 99%, 而 U12-型内含子含量则很少(<0.4%) (徐军望等, 2003)。

2.1 U2-型内含子

U2-型内含子的典型特征是其 DNA 序列的 5'剪接位点一般为 AG/GTAAGT 的保守序列, 3'剪接位点末端为 TGCAG/G 的保守序列。分支点位于 3'SS 上游约 20-30 nt 处, 序列并不保守, 一般含有一个腺苷酸, 腺苷酸的突变或缺失会降低剪接的效率甚至导致 pre-mRNA 无法剪接。植物内含子一个显著特点就是分支点下游富含 UA 序列, UA 序列均匀地分散于整个内含子中, 为保证剪接的保真度和精确性起着关键作用(Ko et al., 1998)。

例如, 徐军望等分离得到水稻 EPSP 合酶基因的第一内含子 EPI, 其 5'端剪接位点序列为 GGTGAGA, 3'端的剪接位点序列为 ATTAGG, 这符合真核生物剪接位点序列的一致规则。EPI 序列的 AT 含量丰富, 在 704 个核苷酸对中 A+T 共为 449 个, 约占内含子核苷酸总数的 63.8%。这些结构特征表明, EPI 序列是一种典型的植物内含子。

2.2 U12-型内含子

U12-型内含子又称为 AT-AC 型内含子, 刘晓琼等(1997)从真核细胞基因组发现了一类新型的核 mRNA 内含子, 其剪接位点是保守的双核苷酸, 为 5'端的 AT 和 3'末端的 AC。这类内含子虽然含量较少, 但是在哺乳动物、植物和昆虫的核基因组中均有发现(Pomposiello et al., 2001; Lee et al., 2007)。

3 内含子的功能及对转基因植物外源基因表达的影响

3.1 选择性剪接

选择性地对 pre-mRNA 不同剪接位点进行不同组合的剪接, 称为选择性剪接。通过选择性剪接, 由一条 pre-mRNA 可生成多条成熟的 mRNA。某些基因的选择性剪接具有组织特异性或受发育调节(Storbeck et al., 1998)。

西葫芦羟基丙酮酸还原酶基因(HRP)中内含子在 5'剪接位点的可变剪接产生了两种不同的蛋白 HRP1 和 HRP2。这两种蛋白的细胞器定位不同,

HRPI 定位于过氧化物体, HRP2 定位于细胞质 (Lopez et al., 1998)。由于真核基因借助选择性剪接明显地扩大了编码蛋白质的能力, 所以选择性剪接成为蛋白质多样性的一个重要保障, 而蛋白质多样性在进化过程中加大了蛋白组的表现复杂性 (Kriventseva et al., 2003)。

3.2 内含子可能具有启动子的功能

Borokov 等(1997)发现马铃薯蔗糖合成酶基因的内含子序列含有一个类似启动子的结构, 这种结构具有调节基因自身启动子的活性, 从而提高蔗糖合成酶的表达水平。Salgueiro 等(2000)研究发现玉米泛素基因第一个内含子能够启动 GUS 基因的表达, 具有类似于启动子的功能, 进而分析该内含子的结构特征, 发现其具有 TATA box 结构(TATAA)和 CAT box 结构(CAAT)。

3.3 内含子可能具有增强子的特征

Gidekel 等人(1996)在研究拟南芥延伸因子 *Ib* 基因(*eEF-Ib*)的第一个内含子时发现, 当把该内含子以正向或反向插入到 35S 启动子的上游时, 都能够提高下游 GUS 基因的表达活性, 且这种内含子序列不位于转录单位内。所以 GUS 基因表达活性的提高可能是由于内含子中存在着类似于增强子的结构特征。

谢先芝等(2001)通过 DNA 重组实验表明, 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, 而且这种促进作用与该序列的插入位置及方向都没有关系, 呈现出明显的增强子特性。另外, GUS 酶组织化学染色荧光检测和凝胶阻滞实验也均证明 TPI 序列可能还具有启动子的活性。

周迅蕾等(1999)构建了一系列包含 *Nodal* 基因的完整第一内含子及其部分片段的荧光素酶报告质粒, 并通过瞬时转化的方法测定它们对报告基因转录活性的影响。该内含子 5'端 24 kb 的 DNA 片段可以使报告基因的转录活性提高约 8 倍。这一结果表明, 在 *Nodal* 基因的第一内含子中可能存在着控制 *Nodal* 基因表达的顺式增强子元件。

3.4 内含子对转基因植物外源基因表达的调控

内含子在剪接过程中参与了 5'端的加帽及 3'端 PolyA 的形成, 提高 mRNA 分子的稳定性, 从而增

强基因的表达效率, 这种由内含子介导使基因表达活性得到增强的现象, 称做内含子增强效应 (Intron-mediated enhancement, IME)。一般情况下, 内含子通过其增强效应来增强基因的表达。

内含子能通过选择性剪接使单一基因产生多种蛋白质, 能在不同方面影响基因表达, 包括多腺苷酸化、影响转录、mRNA 输出及翻译效率等。内含子能通过 mRNA 衰退来增强真核细胞基因转录忠实性, 很多研究显示基因的最佳表达离不开内含子的作用(Nott et al., 2003; Lynch et al., 2003)。因此, 内含子可作为提高转基因生物外源基因表达的重要元件之一。

内含子增强基因表达的作用最初由 Callis 等(1987) 1987 年在转基因玉米中发现, 玉米乙醇脱氢酶基因(*adh1*)第一内含子对外源基因的表达有明显增强作用, 同时该基因的其它内含子也存在一定的增强作用。随后, Vasil 等(1989)也发现玉米的果糖合成酶基因的第二个内含子可以使 CAT 表达水平提高近 10 倍。水稻肌动蛋白基因的第三个内含子也能使目的基因的表达水平提高 2~6 倍(Luehrsen et al., 1994)。

Fu 等(1995)将马铃薯蔗糖合成酶基因 *sus3* 和 *sus4* 的 5'-UTR 除去内含子后, 通过转基因植物进行研究。结果表明, 内含子的去除, 不但影响该基因在马铃薯中的表达水平(如在马铃薯块茎中表达水平降低至 1/8, 在根中降低至 1/4), 而且也改变了该基因在不同组织器官的表达水平。如在转基因烟草植株中, 除去 *sus3* 5'-UTR 的内含子后, 该基因在发育后期花药维管束中的表达水平有所下降, 而在花粉中的表达水平却明显提高(可提高 100 倍)。由此可见, 真核 mRNA 内含子对基因的组织特异性表达既有正调控作用, 又有负调控作用。

Salgueiro 等(2000)研究表明, 在未成熟的三叶草花序和小麦盾片中, 玉米泛素基因的第二个内含子和第一个外显子能够启动 GUS 基因的瞬时表达, 并且表达活性比起泛素基因启动子作为调控序列时高出 50 倍。另外, 玉米 *adh1* 基因的第一个内含子也可以启动 GUS 基因的瞬时表达, 但表达水平相对较低。

Vain 等(1996)将 *ubi* 内含子和 *chsA* 内含子分别置于 CaMV35S 启动子与 *uidA* 基因之间, 转化玉米

愈伤组织, 结果显示, ubi 内含子促使 *uidA* 基因的表达量提高了 26 倍, 而 *chsA* 内含子促使 *uidA* 基因的表达量提高了 92 倍。Humara (1998) 将 *Sh1-int1* 和 *Adh1-int1* 两个内含子分别与 *GUS* 基因构建表达载体, 然后转化五针松和欧洲黑松, 检测表明 *Sh1-int1* 提高基因的表达量 2-6 倍, 而 *Adh1-int1* 降低基因的表达量。

Plesse 等(2001)研究表明, 烟草多聚泛素基因前导内含子不仅能够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。徐军望等(2003)将水稻 EPSP 合酶第一内含子(EPI)序列插入 CaMV35S 启动子和 *GUS* 基因之间, 转化烟草, 结果表明 EPI 内含子的存在可以使 *GUS* 的平均表达水平提高 3 倍, 最高单株可提高 6 倍。Wang 等(2008)利用拟南芥 *Agamous* 基因的 3'末端第二内含子构建 AG-I-35S (-60)::Barnase 表达载体, 转化烟草, 研究证明该内含子对基因表达具有很强的调控作用。

王悦冰(2008)将来自玉米泛素蛋白基因的第一

内含子(ubil)、水稻肌动蛋白基因的第一内含子(*act1*)、玉米乙醇脱氢酶基因的第一内含子(*adh1*)、马铃薯高赖氨酸基因 *SBgLR* 基因的第二内含子(*SBgLR2*)构建瞬时表达载体后, 基因枪轰击玉米愈伤组织。对报告基因 *GUS* 进行了组织化学分析和荧光定量分析。结果表明, ubil 增强基因表达活性的能力最强, 它的存在可使 *GUS* 的表达活性提高 5 倍, *act1* 可使 *GUS* 的表达活性提高 3 倍, *adh1* 和 *SBgLR2* 没有增强 *GUS* 基因的表达活性。根据实验结果, 将 ubil 插入到含有 Bt *cryIAh* 基因的植物表达载体中, 然后转化玉米。ELISA 检测表明, T1、T2 代转基因植株 *CryIAh* 蛋白的平均表达量提高 20%。这表明玉米 ubil 可以有效增强 *cryIAh* 基因在转基因玉米中的表达。

可以看出, 近年来对内含子增强植物基因表达的研究越来越多, 表 1 列出了 2000 年以来的主要研究成果。

表 1 2000-2010 年内含子调控转基因植物外源基因表达研究

Table 1 the research progress of Eukaryotic gene introns in regulation of plant gene expression in the last ten years

内含子 Intron	目的基因 Aim gene	转化受体 Transformation receptor	结果情况 Result	研究者 Investigator
The ancient intron in ACT2 5'UTR	<i>ACT2</i>	拟南芥, 小立碗藓 Arabidopsis thaliana, Physcomitrella patens	该内含子是 <i>ACT2</i> 基因在拟南芥和小立碗藓有效表达的必要元件 This intron was required for <i>ACT2</i> gene strong expression in Arabidopsis thaliana and Physcomitrella	An Yong Qiang Charles (2010)
AGAMOUS second intron	<i>PCSI</i>	烟草 Tobacco	表现出更高的不育性 Showed higher sterility	Xu Xiangbin (2010)
RpoT-i4 from maize and UBQ10-i1 from Arabidopsis	<i>Firefly luciferase (LUC)</i>	大麦 Barley	增强基因的表达 Enhanced gene expression	Bartlett J G (2009)
OsTub6 leader intron	<i>GUS</i>	水稻 Rice	极大影响基因的表达量和表达位置 Greatly influence gene expression level and expression position	Gian iSilvia (2009)
The 5'UTR intron of rice rubi3 gene	<i>GUS</i>	水稻 Rice	提高 <i>GUS</i> 基因的转录水平 20 倍左右, 提高 <i>GUS</i> 的活性 29 倍。 the intron enhanced the steady state RNA level of the <i>GUS</i> reporter gene by nearly 20-fold, and enhanced the <i>GUS</i> reporter gene activity in these lines by about 29-fold	Samadder Partha (2008)

续表 1

Continuing table 1

内含子 Intron	目的基因 Aim gene	转化受体 Transformation receptor	结果情况 Result	研究者 Investigator
Ubi1 intron	<i>Bt cry1Ah</i>	玉米 Maize	增强基因表达 20%左右 Showed that the expression of Cry1Ah protein in the construct containing the ubi1 intron (pUUOAH) was 20% higher than that of the intronless construct (pUOAH)	Wang YueBing (2008)
AGAMOUS second intron	<i>GUS</i>	拟南芥 Arabidopsis thaliana	植株不育 Sterility of transgenic plants	Liu Z.R.(2008)
LeSUT1 introns	<i>GUS, Tomato LeSUT1</i>	烟草 Tobacco	内含子调控基因组织特异性表达。LeSUT1 第二内含子促进基因在伴胞和保卫细胞中表达, LeSUT1 第三内含子促进基因在表皮毛中表达 Showed three introns remarkable functions for SUT1 tissue-specific expression. Intron 3 is responsible for expression in trichomes, whereas intron 2 is necessary for expression in companion cells and guard cells	Weise Andreas (2008)
5'UTR intron of the rubi3 gene	<i>GUS</i>	水稻 Rice	提高基因表达量 Improved gene expression level	Lu Jianli (2008)
AGAMOUS second intron	<i>Barnase</i>	烟草 Tobacco	表现出更高的不育性 Showed higher sterility	Wang HuiZhong (2008)
Ubil, act1, adh1 和 SBgLR2	<i>GUS</i>	玉米 Maize	ubil 增强基因表达活性的能力最强, 可使 <i>GUS</i> 的表达活性提高 5 倍, act1 可使 <i>GUS</i> 的表达活性提高 3 倍, adh1 和 SBgLR2 没有增强 <i>GUS</i> 基因的表达活性 Ubil enhanced the <i>GUS</i> gene activity by 5-fold, act1 enhanced <i>GUS</i> gene activity by 3-fold. Adh1 and SBgLR2 can't enhance <i>GUS</i> gene activity	王悦冰等(2008)
The leader intron of the Arabidopsis Cox5c gene	<i>GUS, Hahb-4</i>	拟南芥 Arabidopsis thaliana	增强基因的表达和抗逆性 enhanced gene expression and stress tolerance	Cabello J V (2007)
Intron2 and intron9 of GBSSI cDNA	<i>GBSSI cDNA inverted repeat constructs</i>	马铃薯 Nicotiana tabacum	两个内含子都对基因沉默不产生影响 The two introns did not result in enhancement of silencing in experimental system	Heilersig H J B (2006)
SeFAD2 introns	<i>GUS</i>	拟南芥 Arabidopsis thaliana	提高 <i>GUS</i> 基因表达量 100 倍, 内含子具有启动子活性 Enhanced the <i>GUS</i> gene activity by 100-fold, the intron have promoter activity	Kim Mi Jung (2006)
Introns of actin (Act) genes	<i>rhVEGF</i>	小立碗藓 Physcomitrella patens	增强基因表达最高达到 7 倍 Improved gene expression level by 7-fold	Weise Andreas (2006)
Castor bean catalase intron	<i>C1 gene</i>	番茄 Tomato	构建反义表达载体, 抑制基因的表达 An intron-hairpin genetic construction to induce post-transcriptional gene silencing against the early TYLCV replication associated protein gene (C1)	Alejandro Fuentes (2006)

续表 1

Continuing table 1

Rice a-tubulin first introns	<i>GUS</i>	水稻 Rice	增强基因的表达量 Enhanced gene expression	Elisa Fiume (2004)
内含子 Intron	目的基因 Aim gene	转化受体 Transformation receptor	结果情况 Result	研究者 Investigator
The first introns from both the TRP1 and UBQ10	<i>GUS</i>	拟南芥 Arabidopsis thaliana	内含子提高转录和促进翻译是两种不同的机制 Introns increase transcription and promote translation by two distinct mechanisms	Alan B. Rose (2004)
The first intron of rice EPSP	<i>GUS</i>	烟草 Tobacco	增强基因的表达 Enhanced gene expression	Xu Junwang (xu et al., 2003)
The sense orientation of the PCISV leader sequence	<i>GUS, CAT</i>	烟草 Tobacco	提高了基因的表达量 Improved gene expression level	Bhattacharyya Somnath (2003)
Ubi.U4 leader intron	<i>GUS</i>	烟草 Tobacco	提高基因的表达量, 而且能够调控基因的组织特异性表达 Enhanced gene expression level and influenced expression position	Plesse B. (2001)
Introns of histone H3 genes	<i>GUS</i>	拟南芥 Arabidopsis thaliana	增强基因表达量 2-70 倍 Enhanced gene expression ranging from 2-fold to 70-fold	Chaubet-Gigot N. (2001)
Maize ubi1, maize adh1, rice act1 and sugarcane rbcS genes	<i>BT6.1 promoter</i>	香蕉 Banana	Rice act1 内含子提高 BT6.1 启动子活性 300 倍, maize ubi1 提高 100 倍, sugarcane rbcS intron 提高 10 倍, maize adh1 没有明显的影响 The rice act1 and maize ubi1 introns increasing native BT6.1 promoter activity by about 300-fold and 100-fold, respectively. The sugarcane rbcS intron increased expression about tenfold, whereas the adh1 intron had no significant effect	Dugdale B. (2001)
Potato ST-LS1, pea legumin introns	<i>GUS</i>	烟草 Tobacco	内含子及其插入位点对基因的表达很关键 Introns and their sites of insertion into gene constructs were important to gene expression	Ibrahim A.F.M. (2001)
PIV2	<i>GFP</i>	烟草、玉米 Tobacco, maize	能有效调控单子叶和双子叶植物的表达 Indicating that the PIV2 intron is spliced effectively in both monocotyledonous and dicotyledonous plant species	Mankin S. L. (2001)
TPI	<i>GUS</i>	烟草 Tobacco	提高报告基因 gusA 的表达水平, 呈现出明显的增强子特性 Improved GUS gene expression level, Showed a significant characteristic enhancer	谢先芝等(2001)
Maize ubi1 promoter, exon and intron	<i>GUS</i>	麦类作物幼穗 Triticordeum and wheat	表达量是对照的 50 倍 Enhanced gene expression by 50-fold	Sancha Salgueiro (2000)

4 内含子基因调控的影响因素

内含子对基因表达的增强程度跟许多因素有关, 如内含子自身特征、启动子和外显子序列特征、内含子在载体上的位置、目的基因序列结构、细胞类型及细胞生理状态等。

4.1 内含子自身特征

内含子自身的长度和组成会影响内含子功能表达。不同内含子对同一基因表达活性的作用效果不同。在转基因玉米中, 玉米蔗糖合成酶基因 *sh1* 的第一个内含子能使报告基因的表达水平增强近 40 倍(Clancy et al., 2002), 而玉米乙醇脱氢酶基因 *adh1* 的第一个内含子仅使报告基因的表达水平提高了 4 倍。*adh1* 基因的第二个内含子和第六个内含子均能不同程度地增强报告基因的表达, 但其第九个内含子却不能。

4.2 启动子的影响

实验表明, 内含子对基因表达增强程度受驱动转录的启动子影响。在 *adh1* 基因自身启动子的作用下, *adh1* 基因的第二个内含子对报告基因表达的增强程度明显大于其在 *CaMV35S* 启动子的作用下(王悦冰等, 2008)。另外也有一些实验显示, 内含子对基因表达的增强程度可能与所用启动子的强度成反比(Lorkovi et al., 2000)。

4.3 外显子序列的影响

外显子序列也影响内含子增强基因表达的程度。玉米 *adh1* 基因第二个内含子相邻的外显子缺失时, 第二个内含子增强报告基因表达的特性也随之消失。另外, 当 *HSP82* 基因的内含子 5'帽端 60~90 个核苷酸外显子序列存在时, 能极大地提高增强报告基因 *GUS* 的表达水平, 而 3'poly 端外显子序列如果也存在则会消除内含子的增强效应(Sinibaldi et al., 1992)。

当单独使用内含子时可以增强基因表达水平, 但是如果有其相邻外显子的协同作用, 基因表达水平可以得到进一步提高。Maas 等(Maas et al., 1991)通过 DNA 重组将表达子 I 或玉米 *sh1* 基因第一个内含子放置于 35S 启动子和 *CAT* 基因之间, 并转化到水稻和玉米中, 检测其瞬时表达活性水平。当只加入一个表达子 I 的情况下, 能使基因表达水平提高 10 倍; 仅加入 *sh1* 基因第一个内含子的情况下可使

基因表达水平上升 100 倍; 当将两者同时插入在启动子和 *CAT* 基因之间时, 则可使基因的表达水平上升达 1 000 倍。

4.4 内含子的位置和方向

Bourdon 等(Bourdon et al., 2001)将三个玉米内含子序列分别置于报告基因荧光素酶编码序列的三个不同位点后转化玉米原生质体, 结果发现三个内含子都被正确的剪切, 但其中只有一种内含子能增强基因的表达。

将玉米 *Adhl* 基因的第一个内含子置于 5'端时, 报告基因 *CAT* 的表达能提高 100 倍, 而位于 3'端时, 基因的表达仅能提高 5 倍。若置于转录区以外, 则 *CAT* 的表达不会增加(Mascarenhas et al., 1990)。这表明内含子序列的位置也是影响基因表达的重要因素。

同时, 内含子序列在基因编码区内的位置也影响基因的表达。王悦冰(2008)将 *ubil* 分别插入到 *GUS* 基因的+13、+115、+513 位编码区内, 结果表明: *ubil* 位 T'+13 位时, 报告基因表达活性提高 4.26 倍; 当 *ubil* 分别位于报告基因的+115、+513 位时, 报告的表达活性分别提高了 3.2 倍和 0.97 倍; 而当 5'-UTR 和+13 位同时插入 2 个拷贝的 *ubil* 时, 基因的表达活性提高了 1.55 倍。

内含子的方向变化也会影响基因的表达。将玉米趋缩基因(*sh1*)的第一个内含子正向插入嵌合结构 35S-*cat* 的 *cat* 编码区上游, 能促使 *cat* 表达活性提高 60~150 倍, 而将其反向插入同样位置时, 则对 *cat* 表达活性起抑制作用(谢先芝等, 2001)。

4.5 宿主细胞的类型

不同的宿主细胞也会影响内含子对基因表达的调控。Tanaka 等(Tanaka et al., 1990)多项研究显示, 内含子对基因表达的增强作用主要发生于单子叶植物, 在双子叶植物中并不明显。Xu 等(1994)研究发现 *TPI-int1* 内含子能够增强目的基因在单子叶植物中(水稻, 玉米, 小麦)表达, 但对基因在双子叶植物(番茄, 烟草, 大豆)的表达则影响很小。

同种植物不同组织细胞中内含子的影响也不同。例如, 在玉米糊粉粒原生质体中 *adh1* 基因第一个内含子可提高报告基因表达活性 44 倍, 而在胚乳细胞原生质中仅提高 16.5 倍(Gallie et al., 1994)。

5 内含子在植物转基因研究的应用

在表达载体构建策略中, 为了使基因能表达或提高表达效率, 需要充分利用相关的调控元件, 而内含子已成为提高转基因植物外源基因表达的重要元件之一。表 2 为目前主要商业化转化体中启动子和内含子的应用策略。一些内含子不仅能够提高

基因的表达水平, 而且还调控基因的组织特异性表达。但目前对其调控机理的研究还不甚清楚。随着分子生物学和生物技术的发展, 内含子增强效应终将能够与提高外源基因的表达水平有机的联系起来, 推动转基因研究的更快发展。

表 2 商业化转化体中启动子和内含子的应用

Table 2 applications of promoters and introns in Commercialized transformants

商业化转化体 Commercial transformants	目的基因 Aim gene	启动子 Promote	内含子与其他调控元件 Intron and other regulatory elements
玉米 NK603 Maize NK603	<i>CP4-EPSPS</i>	1. Rice actin 1; 2. CaMV35S	1.水稻肌动蛋白 1 启动子; 1.P-ract1/ract1 intron containing rice actin 1 Promoter; 2.玉米热休克蛋白 70 内含子; 2.Maize HSP70 intron;
玉米 T1507 Maize T1507	<i>cryIFa2</i>	ZM (Zea mays) ubiquitin (ubi)	玉米泛素基因第一外显子和内含子 ZM ubiquitin (ubi) the first exon and intron
玉米 DAS-59122-7 Maize DAS-59122-7	<i>cry34Ab1</i> <i>cry35Ab1</i>	ZM (Zea mays) ubiquitin (ubi)	玉米泛素基因内含子及 5'非翻译区 ZM ubiquitin (ubi) intron and 5' UTR
玉米 MON810 Maize MON810	<i>cryIAb</i>	CaMV 35S	玉米热休克蛋白 70 内含子 Maize HSP70 intron
玉米 BT11 Maize BT11	1. <i>pat</i> 2. <i>cryIAb</i>	1. CaMV 35S; 2. CaMV 35S	1.玉米乙醇脱氢酶基因 IVS 2 内含子 IVS 2 intron from the maize adh1 gene 2.玉米乙醇脱氢酶基因 IVS 6 内含子 IVS 6 intron from the maize adh1 gene
玉米 MON863 Maize MON863	<i>cry3Bb1</i>	4-AS1 (single CaMV 35S plus four repeats of activating sequence)	小麦叶绿素 a/b 结合蛋白5'非翻译区前导序列和水稻肌动蛋白基因内含子 5' untranslated leader sequence from wheat chlorophyll a/b binding protein, and rice actin intron
玉米 GA21 Maize GA21	<i>epsps</i>	Rice actin 1	水稻肌动蛋白基因第一内含子 Rice act1 intron
玉米 Event 3272 Maize Event 3272	1. <i>amy797E</i> 2. <i>pmi</i>	1.玉米醇溶蛋白基因 <i>Zein</i> 启动子 1. GZein promoter 2.玉米泛素基因启动子 2. Zm poly-ubiquitin gene promoter	1.玉米 <i>PEPC</i> 基因 9 内含子; 1. Zm PEPC gene intron 9; 2.玉米泛素基因第一内含子; 2. Zm poly-ubiquitin gene first intron
玉米 BT176 Maize BT176	<i>cryIAb</i>	PEPC promoter CDPK promoter	玉米 <i>PEPC</i> 基因 9 内含子 Zm PEPC intron 9
玉米 CBH-351 Maize CBH-351	<i>cry9c</i>	CaMV35S	矮牵牛 <i>cab22L</i> 基因前导序列 leader sequence of the cab22L gene of Petunia hybrida
油菜 ZSR500 Brassica napus ZSR500	<i>CP4 epsps</i>	Zm ubi	玉米泛素基因第一内含子 Zm ubi intron1
油菜 HCN10 Brassica napus HCN10	<i>Pat</i>	CaMV35S	
油菜 CT73/R773 Brassica napus CT73/R773	<i>EPSPS</i>	FMV35S	

续表 2

Continuing table 2

商业化转化体 Commercial transformants	目的基因 Aim gene	启动子 Promote	内含子与其他调控元件 Intron and other regulatory elements
大豆 MON89788 Soybean MON89788	<i>CP4 epsps</i>	P-FMV/TSF1	拟南芥 <i>tsf1</i> 基因前导内含子, 拟南芥叶绿体转运肽序列 A. thaliana <i>tsf1</i> leader and intron; chloroplast transit peptide from A. thaliana
大豆 GTS40-3-2 Soybean GTS40-3-2	<i>EPSPS</i>	CaMV35S	叶绿体转运肽 4 CTP4
棉花 15985	<i>1. cry1Ac</i>	1.double CaMV35S	2.热休克蛋白 70 内含子, 叶绿体转运肽 2
Cotton 15985	<i>2. cry2Ab</i>	2. double CaMV35S	2. HSP70 leader sequence, CTP2
棉花 COT102	<i>vip3A(a)</i>	改造启动子	拟南芥肌动蛋白 2 基因第一外显子和内含子
Cotton COT102		Modified promoter	First exon and intron of At actin-2 gene
棉花 GHB614	<i>epsps</i>	拟南芥启动子结构域组蛋白 H4 基因	拟南芥 h3At 内含子
Cotton GHB614		Promoter region of the histone H4 gene from A. thaliana	h3At intron

作者贡献

谢树章参与题目选定、文献资料收集和梳理分析、初稿撰写与修改润色; 李新海、雷开荣参与总体思路和文章结构的确立、文章结构修改、文字润色。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家转基因生物新品种培育重大专项课题(2008ZX08011-003)和重庆市科技攻关计划项目(CSTC, 2009AB1110)共同资助。

参考文献

Alejandro F., Pedro L.R., Elvira F., Danay C., Yadira S., Rudy P., Raidel R and Merardo P., 2006, Intron-hairpin RNA derived from replication associated protein C1 gene confers immunity to tomato yellow leaf curl virus infection in transgenic tomato plants, *Transgenic Research*, 15:291-304

An Y.Q.C., and Meagher R.B., 2010, Strong expression and conserved regulation of ACT2 in *Arabidopsis thaliana* and *Physcomitrella patens*, *Plant Mol. Biol. Rep.*, 28:481-490

Bartlett J.G., Snape J.W., and Harwood W.A., 2009, Intron-mediated enhancement as a method for increasing transgene expression levels in barley, *Plant Biotechnology Journal*, 7 (9): 856-866

Bhattacharyya S., Pattanaik S., and Maiti I.B., 2003, Intron-mediated enhancement of gene expression in transgenic plants using chimeric constructs composed of the Peanut chlorotic streak virus (PCISV) promoter-leader and the antisense

orientation of PCISV ORF VII (p7R), *Planta*, 218: 115-124

Borokov A.Y., 1997, Role of the leader intron in regulation of the expression of the potato sucrose synthase gene, *Plant Physiol*, 114(S1): 64-71

Bourdon V., Harvey A., and Lonsdale D.M., 2001, Introns and their positions affect the translational activity of mRNA in plant cells, *Scientific Report*, 2(5): 394-39

Brinster R.L., Alien J.M., Behringer R.R., Gelinas R.E., and Palmiter R.D., 1988, Introns increase transcriptional efficiency in transgenic mice, *Proc. Natl. Acad. Sci., USA.*, 85(3): 836-840

Cabello J.V., Dezar C.A., Manavella P.A., and Chan R.L., 2007, The intron of the *Arabidopsis thaliana* COX5c gene is able to improve the drought tolerance conferred by the sunXower Hahb-4 transcription factor, *Planta*, 226: 1143-1154

Callis J., Fromm M., and Walbot V., 1987, Introns increase gene expression in cultured maize cells, *Genes and Development*, 1: 1183-1200

Chaubet G.N., Kapros T., Flenet M., Kahn K., Gigot C., and Waterborg J.H., 2001, Tissue-dependent enhancement of transgene expression by introns of replacement histone H3 genes of *Arabidopsis*, *Plant Molecular Biology*, 45: 17-30

Clancy M., and Hannah L.C., 2002, Splicing of the maize Sh1 first intron is essential for enhancement of gene expression, and a T-rich motif increases expression without affecting splicing, *Plant Physiol*, 130(2): 918-929

Ding H.M., Shao G.B., and Xu Y.X., 2006, The function of

- introns in gene expression regulation, *Xumu Yu Shouyi* (Animal Husbandry & Veterinary Medicine), 38(3): 50-53(丁红梅, 邵根宝, 徐银学, 2006, 内含子与基因表达调控, 畜牧与兽医, 38(3): 50-53)
- Dugdale B., Becker D.K., Harding R.M., and Dale J.L., 2001, Intron-mediated enhancement of the banana bunchy top virus DNA-6 promoter in banana (*Musa* spp.) cells and transgenic plants, *Plant Cell Reports*, 20(3): 220-226
- Fiume E., Christou P., Gian iS., and Breviario D., 2004, Introns are key regulatory elements of rice tubulin expression, *Planta*, 218: 693-703
- Fu H., Kim S.Y., Park W.D., 1995, High-level tuber expression and sucrose inducibility of a potato *Sus4* sucrose synthase gene require 5' and 3' flanking sequences and the leader intron, *Plant Cell*, 7:1387-1394
- Gallie D.R., and Young T.E., 1994, The regulation of gene expression in transformed maize aleurone and endosperm protoplasts, analysis of promoter activity, intron enhancement and mRNA untranslated regions on expression, *Plant Physiol*, 106: 929-939
- Gian iS., Altan A., Campanoni P., Morello L., and Breviario D., 2009, In transgenic rice, α - and β -tubulin regulatory sequences control GUS amount and distribution through intron mediated enhancement and intron dependent spatial expression, *Transgenic Res.*, 18: 151-162
- Gidekel M., Jimenez B., and Herrera E.L., 1996, The first intron of the *Arabidopsis thaliana* gene coding for elongation factor 1 contains an enhancer-like element, *Gene*, 170: 201-206
- Heilersig H.J.B., Loonen A.E.H.M., Wolters A.M.A., and Visser R.G.F., 2006, Presence of an intron in inverted repeat constructs does not necessarily have an effect on efficiency of post-transcriptional gene silencing, *Molecular Breeding*, 17: 307-316
- Humara J.M., López M., and Ordás R.J., 1998, Modifying transient-glucuronidase expression in pine species using introns, *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 52: 183-187
- Ibrahim A.F., Watters J.A., Clark G.P., Thomas C.J., Brown J.W., and Simpson C.G., 2001, Expression of intron-containing GUS constructs is reduced due to activation of a cryptic 5' splice site, *Mol. Gen. Genomics*, 265: 455-460
- Kim M.J., Kim H., Shin J.S., Chung C.H., Ohlrogge J.B., and Suh M.C., 2006, Seed-specific expression of sesame microsomal oleic acid desaturase is controlled by combinatorial properties between negative cis-regulatory elements in the *SeFAD2* promoter and enhancers in the 5'UTR intron, *Mol. Gen. Genomics*, 276: 351-368
- Ko C.H., Brendel V., Taylor R.D., and Walbot V., 1998, U-richness is a defining feature of plant introns and may function as an intron recognition signal in maize, *Plant Mol. Biol.*, 36: 573-583
- Kriventseva E.V., Koch I., Apweiler R., Vingron M., Bork P., Gelfand M.S., Sunyaev S., 2003, Increase of functional diversity by alternative splicing, *Trends. Genet.*, 19(3): 124-128
- Lee Y., Yeom J., Kang Y.S., Kim J., Sung J.S., Jeon C.O., and Park W., 2007, Molecular characterization of *fprB* (ferredoxin-NADP reductase) in *Pseudomonas putida* KT2440, *J. Microbiol. Biotechnol.*, 17: 1504-1512
- Li Y., Su Q., and An L.J., 2004, The Desert of Genome-intron and its Application in Plant Genetic Engineering, *Fenzi Zhiwu Yuzhong* (Molecular Plant Breeding), 2(4): 569-573(李杨, 苏乔, 安利佳, 2004, 基因组的“沙漠区域”内含子及其在植物基因工程中的应用, 分子植物育种, 2(4): 569-573)
- Liu X.Q., Shi X.Z., 1997, Studies on a new class of introns, *Shengwu Huaxue Yu Shengwu Wuli Jinzhan* (Prog. Biochem. Biophys.), 24(6): 496-499(刘晓琼, 施先宗, 1997, 一类新内含子的研究状况, 生物化学与生物物理进展, 24(6): 496-499)
- Liu Z.R., and Liu Z.C., 2008, The second intron of *AGAMOUS* drives carpel and stamen-specific expression sufficient to induce complete sterility in *Arabidopsis*, *Plant Cell Rep.*, 27: 855-863
- Lopez A.J., 1998, Alternative splicing of pre-mRNA: developmental consequences and mechanisms of regulation, *Annu Rev. Genet.*, 32: 279-305
- Lorković Z.J., Wiczyrek Kirk D.A., Lambermon M.H., and Filipowicz W., 2000, Pre-mRNA splicing in higher plants, *Trends Plant Sci.*, 5(4): 160-167
- Lu J.L., Sivamani E., Azhakanandam K., Samadder P., Li X.,

- and Qu R., 2008, Gene expression enhancement mediated by the 5'UTR intron of the rice rubi3 gene varied remarkably among tissues in transgenic rice plants, *Mol. Genet Genomics*, 279: 563-572
- Luehrsen K.R., and Walbot V., 1994, The impact of AUG start codon context on maize gene expression in vivo, *Plant Cell Rep.*, 13: 454-458
- Lynch M., and Kewalramani A., 2003, Messenger RNA surveillance and the evolutionary proliferation of introns, *Mol. Biol. Evol.*, 20(4): 563-571
- Maas C., Laufs J., Grant S., Korfhage C., and Werr W., 1991, The combination of a novel stimulatory element in the first exon of the maize Shrunken-1 gene with the following intron 1 enhances reporter gene expression up to 1000-fold, *Plant Mol. Biol.*, 16: 199-207
- Mankin S.L., and Thompson W.F., 2001, New green fluorescent protein genes for plant transformation: Intron-containing, er-localized, and soluble-modified, *Plant Molecular Biology Reporter*, 19: 13-26
- Mascarenhas D., Mettler I.J., Pierce D.A., and Lowe H.W., 1990, Intron mediated enhancement of heterologous gene expression in maize, *Plant Mol. Biol.*, 15: 913-920
- Nott, A., Meislin S.H., and Moore M.J., 2003, A quantitative analysis of intron effects on mammalian gene expression, *RNA*, 9(5): 607-617
- Plesse B., Criqui M.C., Durr A., Parmentier Y., Fleck J., and Genschik P., 2001, Effects of the polyubiquitin gene Ubi.U4 leader intron and first ubiquitin monomer on reporter gene expression in nicotiana tabacum, *Plant Molecular Biology*, 45: 655-667
- Pomposiello P.J. and Demple B., 2001, Redox-operated genetic switches: The SoxR and OxyR transcription factors, *Trends Biotechnol.*, 19: 109-114
- Rose A.B., 2004, The effect of intron location on intron-mediated enhancement of gene expression in Arabidopsis, *Plant J.*, 40(5): 744-751
- Salgueiro S., Pignocchi C., and Parry M.A.J., 2000, Intron-mediated gusA expression in tritordeum and wheat resulting from particle bombardment, *Plant Mol. Biol.*, 42: 615-622
- Samadder P., Sivamani E., Lu J., Li X., and Qu R., 2008, Transcriptional and post-transcriptional enhancement of gene expression by the 5'UTR intron of rice rubi3 gene in transgenic rice cells, *Mol. Genet Genomics*, 279: 429-439
- Sinibaldi R.M., and Mettler I.J., 1992, Intron splicing and intron-mediated enhanced expression in monocots, *Prog Nucleic Acid. Res., Mol. Biol.*, 42: 229-257
- Storbeck C.J., Sabourin L.A., Waring J.D., and Korneluk R.G., 1998, Definition of regulatory sequence elements in the promoter region and the first intron of the myotonic dystrophy protein kinase gene, *The Journal of Biological Chemistry*, 273: 9139-9147
- Tanaka A., Mita S., Ohta S., Kyojuka J., Shimamoto K., and Nakamura K., 1990, Enhancement of foreign gene expression by a dicot intron in rice but not in tobacco is correlated with an increased level of mRNA and an efficient splicing of the intron, *Nucl. Acids. Res.*, 18: 6767-6770
- Vain P., Finer K.R., Engler D., Pratt R.C., and Finer J.J., 1996, Intron-mediated enhancement of gene expression in maize and bluegrass, *Plant cell Rep.*, 15: 489-494
- Vasil V., Clancy M., Ferl R.J., Vasil I.K., and Hannah L.C., 1989, Increased gene expression by the first intron of maize shrunken-1 locus in grass species, *Plant Physiol*, 91: 1575-1579
- Wang H.Z., Hu B., Chen G.P., Shi N.N., Zhao Y., Yin Q.C., and Liu J.J., 2008, Application of Arabidopsis AGAMOUS second intron for the engineered ablation of flower development in transgenic tobacco, *Plant Cell Rep.*, 27: 251-259
- Wang Y.B., Lang Z.H., Zhang J., He K.L.i, Song F.P., and Huang D.F., 2008, Ubi1 intron-mediated enhancement of the expression of Bt cry1Ah gene in transgenic maize (*Zea mays* L.), *Chinese Science Bulletin*, 53(20): 3185-3190
- Wang Y.B., 2008, Intron-mediated enhancement of the expression of Bt cry1Ah gene in transgenic maize, Dissertation for Ph.D., Biotechnology Research Institute CAAS, Supervisor:Huang D.F., pp.15-20 (王悦冰, 2008, 利用内含子增强效应提高 Bt cry1Ah 基因在转基因玉米中的表达, 博士学位论文, 中国农业科学院研究生院, 导师: 黄大昉, pp.15-20)
- Weise A., Lalonde S., Kühn C., Frommer W.B., and Ward J.M., 2008, Introns control expression of sucrose transporter

LeSUT1 in trichomes, companion cells and in guard cells, *Plant Mol. Biol.*, 68: 251-262

Weise A., Rodriguez F.M., Timm B., Hermann M., Link S., Jost W., and Gorr G., 2006, Use of *Physcomitrella patens* actin 5' regions for high transgene expression: importance of 5' introns, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 70: 337-345

Xie X.Z., and Wu N.H., 2001, The isolation of protease inhibitors II gene from solanum and the function of intron, *Kexue Tongbao (Chinese Science Bulletin)*, 46(11): 933-938 (谢先芝, 吴乃虎, 2001, 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*, 46(11): 933-938)

Xu J.W., Fen D.J., Song G.S., Wei X.L., Chen L., Wu X.L., Li X.G., and Zhu Z., 2003, The first intron of rice EPSP synthase enhances expression of foreign gene, *Zhongguo Kexue(C Ji) (Science in China. Series C, Life Sciences)*, 33(3): 224-230 (徐军望, 冯德江, 宋贵生, 魏晓丽, 陈蕾, 伍晓丽, 李旭刚, 朱楨, 2003, 水稻 EPSP 合酶第一内含子增强外源基因的表达, *中国科学(C 辑)*, 33(3): 224-230)

Xu X.B., Bian J.F., Liu S.B., Shi N.N., Tao Y.Z., and Wang H.Z., 2010, Flower-specific expression of Arabidopsis PCS1 driven by AGAMOUS second intron in tobacco decreases the fertility of transgenic plants, *Mol. Breeding*

Xu Y., Yu H., and Hall T.C., 1994, Rice triosephosphate isomerase gene 5' sequence directs b-glucuronidase activity in transgenic tobacco but requires an intron for expression in rice, *Plant Physiol*, 106: 459-467

Zhou X.L., and Wu H.L., 1999, A cis-regulatory enhancer element of the nodal gene is present in its first intron, *Yichuan Xuebao (Acta Genetica Sinica)*, 26(1): 15-21 (周迅蕾, 吴鹤龄, 1999, *Nodal* 基因的第一内含子中存在着顺式调控增强子元件, *遗传学报*, 26(1): 15-21)



5thPublisher是一个致力于科学与文化传播的中文出版平台

在5thPublisher上发表论文, 任何人都可以免费在线取阅您的论文

- ※同行评审, 论文接受严格的高质量评审
- ※在线发表, 论文一经接受, 即刻在线发表
- ※开放取阅, 任何人都可免费取阅无限使用
- ※快捷搜索, 涵盖谷歌学术搜索与知名数据库
- ※论文版权, 作者拥有版权读者自动授权使用

在线投稿: <http://5th.sophiapublisher.com>