

DOI: 10.11686/cyxb2018755

<http://cyxb.magtech.com.cn>

陆姗姗, 洪园淑, 刘萍. 苦豆子赖氨酸脱羧酶基因启动子在拟南芥中的表达分析. 草业学报, 2019, 28(11): 159—167.

Lu S S, Hong Y S, Liu P. Expression analysis of *SaLDC* promoter from *Sophora alopecuroides* in *Arabidopsis thaliana*. Acta Prataculturae Sinica, 2019, 28(11): 159—167.

苦豆子赖氨酸脱羧酶基因启动子在拟南芥中的表达分析

陆姗姗^{1,2,3}, 洪园淑^{1,2}, 刘萍^{1,2*}

(1. 宁夏优势特色作物现代分子育种重点实验室, 宁夏 银川 750021; 2. 宁夏大学农学院, 宁夏 银川 750021;
3. 青岛求实职业技术学院, 山东 青岛 266109)

摘要: 赖氨酸脱羧酶(LDC)基因是苦豆子中氧化苦参碱(OMA)生物合成的第一个关键酶基因。在已有苦豆子赖氨酸脱羧酶基因(*SaLDC*)基础上克隆得到该基因上游 1260 bp 的启动子序列, GenBank 登录号为 KY038928, 前期在苦豆子愈伤组织中的瞬时表达研究显示该启动子具有启动活性。生物信息学分析发现该启动子区域除了拥有启动子区的基本顺式作用元件 TATA-box 和 CAAT-box 外, 还具有多个与光信号、逆境应答等相关的顺式作用元件。为进一步研究 *SaLDC* 启动子的功能, 构建了该启动子与 β -葡萄糖苷酸酶(GUS)报告基因融合的植物表达载体并通过农杆菌介导遗传转化拟南芥, 同时对光诱导和聚乙二醇(PEG)胁迫的转基因拟南芥进行 GUS 活性染色和定量分析。结果显示, 在 T_2 代转基因拟南芥幼苗的不同生长阶段和成株的各组织器官中均可检测到 GUS 酶活性, 且随幼苗生长时间的延长, 叶片中的表达活性下降; 在成株叶片和花萼中的表达活性强于根、茎、花瓣和角果。光和 PEG 胁迫均能诱导转基因拟南芥中 *GUS* 的表达; GUS 酶活性定量测定显示, 短时间的 PEG 胁迫(1~2 h) GUS 酶活性显著上调($P<0.05$), 而连续胁迫 8 h 时 GUS 酶活性下调至最低($P<0.01$), 比胁迫前下降了 28.2%。以上结果表明 *SaLDC* 启动子既有时空表达特异性又有组织表达特异性, 光诱导和干旱胁迫对结构基因的表达有重要的调控作用。

关键词: 苦豆子; 赖氨酸脱羧酶; *SaLDC* 启动子; 表达分析

Expression analysis of *SaLDC* promoter from *Sophora alopecuroides* in *Arabidopsis thaliana*

LU Shan-shan^{1,2,3}, HONG Yuan-shu^{1,2}, LIU Ping^{1,2*}

1. Key Laboratory of Modern Molecular Breeding for Dominant and Special Crops in Ningxia, Yinchuan 750021, China; 2. College of Agronomy, Ningxia University, Yinchuan 750021, China; 3. Qingdao Qiushi College, Qingdao 266109, China

Abstract: Lysine decarboxylase (LDC) gene is the first key enzyme gene in oxymatrine (OMA) biosynthesis in *Sophora alopecuroides*. The promoter sequence (1260 bp, gene bank accession number: KY038928) upstream of the gene (*SaLDC*) encoding lysine decarboxylase was cloned from *S. alopecuroides* genomic DNA. Its promoter activity was evaluated by transient expression in *S. alopecuroides* callus. A bioinformatics analysis showed that the promoter sequence contains a TATA-box, a CAAT-box, and other cis-acting elements such as drought-responsive, light-responsive, defense-responsive, stress-responsive elements, methyl jasmonate-re-

收稿日期: 2018-11-28; 改回日期: 2019-03-04

基金项目: 国家自然科学基金(81760685)资助。

作者简介: 陆姗姗(1990-), 女, 山东青岛人, 硕士。E-mail: 15709602594@163.com

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: liupnxdx@126.com

sponsive element, and tissue-specific expression element. To further study the functionality of the *SaLDC* promoter, a plant expression vector with the *SaLDC* promoter sequence fused to the *GUS* reporter gene (encoding β -glucuronidase) was transferred into *Arabidopsis thaliana* by *Agrobacterium*. β -glucuronidase activity was quantified by GUS staining and quantitative assays. We detected GUS activity in T_2 transgenic *A. thaliana* seedlings at different growth stages and in tissues of the adult plants. During seedling growth, GUS activity in the leaves decreased. In adult plants, GUS activity was higher in the leaves and calyxes than in the roots, stems, petals and pods. The expression of *GUS* was induced by simulated drought (polyethylene glycol, PEG) stress and light in transgenic *A. thaliana*. Quantitative analyses showed that GUS activity increased significantly in the early stage of PEG stress (1–2 h) ($P < 0.05$) and then decreased to a minimum at 8 h ($P < 0.01$), to around 28.2% of its original level. All these results show that the *SaLDC* promoter confers tissue-specific and spatio-temporal-specific expression, and that the expression of this structural gene is regulated by light and drought stress.

Key words: *Sophra alopecuroides*; lysine decarboxylase (LDC); *SaLDC* promoter; expression analysis

启动子位于结构基因 5'端上游,是调控基因准确表达和有效转录所必需的结构,通过对下游基因表达时期与表达量的调节,决定植物完成特殊生长发育阶段的转变或应答特殊环境胁迫,因而具有转录起始的特异性^[1]。为获得精确稳定的结果,在研究启动子功能时往往采用转基因遗传表达的方法,分析不同条件下转基因植株中报告基因的表达水平以确定启动子的表达活性与特性^[2]。Gu 等^[3]克隆获得玉米(*Zea mays*)的 *ZmGLU1* 启动子,遗传转化至烟草(*Nicotiana tabacum*)中发现该启动子可在烟草根部高效表达;裴柳玲等^[4]研究发现水稻(*Oryza sativa*)胁迫相关的 *OsPM1* 启动子遗传转化拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)后,在受高盐、低温和干旱诱导下均可影响外源基因的表达;李英华等^[5]将大豆(*Glycine max*)*GmGBP1* 启动子片段(含光响应元件 TCT-motif 位点变异 SNP-796G)与双萤光素酶(luciferase, LUC)报告基因融合构建植物表达载体并转化烟草,瞬时表达结果显示,在短日照条件下,SNP-796G 会导致 TCT-motif 光效应元件变异,引起 *LUC* 显著上调表达,推测对缩短大豆生育期有作用。

赖氨酸脱羧酶(lysine decarboxylase, LDC)的主要生物学功能是催化赖氨酸脱羧生成尸胺(cadecine, Cad),在植物生长发育和抗逆性等方面发挥重要作用^[6–8],也是属于喹诺里西啶类生物碱(quinolizidine alkaloids, QAs)的氧化苦参碱(oxymatrine, OMA)(又称苦参素)和苦参碱(matrine, MA)生物合成途径的第一个关键酶^[9–10],杨毅等^[11–12]克隆了苦豆子(*Sophra alopecuroides*)赖氨酸脱羧酶基因的蛋白质编码区序列 *SaLDC*,发现该基因的表达和 OMA 的积累呈正相关关系,并且 *SaLDC* 的表达和 OMA 的积累均受干旱胁迫的影响。本实验室在已有苦豆子 *SaLDC* 编码区的基础上,步移克隆得到该基因上游的启动子序列,并将长度不同的启动子 5'端缺失片段分别与 *GUS* 报告基因融合,农杆菌介导遗传转化苦豆子愈伤组织,结果显示不同长度的 *SaLDC* 启动子片段均可驱动 *GUS* 在苦豆子愈伤组织中瞬时表达,但启动活性随 5'缺失片段长度的增加而逐渐减弱^[13]。为进一步验证 *SaLDC* 启动子的功能,本研究开展生物信息学分析,并将含有该启动子的重组表达载体遗传转化拟南芥,开展时空和组织特异性表达以及光照和干旱诱导研究,不仅为该启动子顺式作用元件的研究提供依据,还有助于从分子水平探讨该基因调控表达的机制,为研究 *SaLDC* 在 OMA 生物合成途径中的作用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

拟南芥生态型为哥伦比亚野生型(Columbia),由北京市农林科学院农业生物技术研究中心谢华教授惠赠。

1.2 试剂

根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)EHA 105 和 pBI 121 质粒载体由本实验室保存;Taq DNA 聚合酶

(TaKaRa); T_4 DNA 连接酶和限制性核酸内切酶 *Hind* III、*Bam* H I (NewEngland Biolabs, NEB); *pEASY-T1* simple Cloning Kit 和大肠杆菌 TOP 10 感受态 (TransGen Biotech); 质粒提取试剂盒 (天根生化科技有限公司, 北京); Silwet L-77 (GE Healthcare Bio-Sciences AB); 4-甲基伞形酮 (4-Methylumbelliferone, 4-MU) (世纪奥科生物技术有限公司); DNA 胶回收试剂盒、 β -葡萄糖苷酸酶 (β -glucuronidase, GUS)、5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-葡萄糖苷酸 (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide, X-Gluc)、4-甲基伞形酮- β -D-葡萄糖醛酸苷 (4-Methylumbelliferyl- β -D-glucuronide, 4-MUG)、TritonX-100 以及所有引物合成和测序工作均购自生工生物工程(上海)股份有限公司或由其完成, 其他试剂为进口或国产分析纯。

1.3 方法

1.3.1 *SaLDC* 启动子的克隆、序列分析和表达载体构建 在本实验室已有 *SaLDC* 编码区基础上, 设计巢式 PCR 特异引物和简并引物, 以苦豆子基因组 DNA 为模板, 通过两次步移, 去掉重叠片段拼接后, 获得 *SaLDC* 启动子片段。目标片段经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测、回收纯化后连接至 *pEASY-T1* simple 载体, 经转化、蓝白斑和氨苄青霉素 (ampicillin, Amp) 抗性平板筛选出阳性克隆并测序, 测序后的片段用 PLACE 数据库 (<http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/>) 和 PlantCARE 数据库 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 进行 *SaLDC* 启动子序列顺式作用元件预测。

提取含 *SaLDC* 启动子片段的 T 载体质粒 DNA, 通过 Primer Premier 5.0 软件对 *SaLDC* 启动子序列进行酶切位点分析, 在序列的上下游引物 5' 端分别设计插入 *Hind* III (AAGCTT) 和 *Bam* H I (GGATCC) 酶切位点, 双酶切质粒 DNA, 回收并验证目的片段, 同时双酶切 pBI 121 质粒, 用目的片段代替其中 35S 启动子, T_4 DNA 连接酶连接后得到 *SaLDC* 启动子片段的重组表达载体, 导入大肠杆菌 TOP 10, 经卡那霉素 (kanamycin, Kan) 筛选获得的阳性克隆经双酶切验证后, 重组质粒遗传转化至农杆菌 EHA 105。

1.3.2 拟南芥种植和农杆菌介导的蘸花法遗传转化拟南芥 拟南芥种子经 5% NaClO 和 75% 乙醇除菌处理, 接种于 MS 培养基中, 并于 4 °C 冰箱内春化 3~4 d 后转到 (22±1) °C 的人工气候箱内, 16 h 光照/8 h 黑暗条件下生长, 待 4~6 片叶时移栽到营养土中。

将 1.3.1 构建好含 *SaLDC* 启动子片段表达载体的农杆菌单克隆于含 Kan (50 mg · L⁻¹) 的 LB 液体培养基中 28 °C 培养至 A_{600} = 0.8~1.5, 收集菌体, 用侵染缓冲液 (1/2 MS + 5% 蔗糖 + 0.02% Silwet L-77) 悬浮菌体至 A_{600} = 0.6~0.8, 侵染未开花的拟南芥花蕾 1~2 min, 10 min 后重复侵染一次。侵染过的植株侧放在纸盒中 22 °C 避光 24 h 后于人工气候箱内正常管理, 直至收取 T_0 代种子。将收集到的 T_0 代拟南芥种子无菌处理后于含 Kan (25 mg · L⁻¹) 的 MS 筛选培养基内进行抗性苗筛选, 直到获得阳性克隆拟南芥 T_2 代株系。

1.3.3 *SaLDC* 启动子在转基因拟南芥中的表达 将转 *SaLDC* 启动子的拟南芥 T_2 代种子按 1.3.2 方式播种, 对春化后 4 d (2 片叶)、11 d (4 片叶)、16 d (6 片叶) 的拟南芥幼苗进行 GUS 染色, 观察并拍照记录不同生长阶段转基因植株的 GUS 表达情况; 对春化后生长 30 d 的转基因拟南芥根、茎、叶、花序和角果分别作 GUS 染色, 观察、记录 GUS 在拟南芥不同器官的表达情况。

1.3.4 转基因拟南芥对不同光照条件的响应 将春化后生长 16 d 的转基因拟南芥幼苗置于培养箱内作以下处理: 1) 3 d 全光照培养; 2) 2 d 光照 + 1 d 黑暗培养; 3) 1 d 光照 + 2 d 黑暗培养; 4) 3 d 全黑暗培养, 对上述处理的拟南芥幼苗分别进行 GUS 染色, 仔细观察染色情况并拍照记录。

1.3.5 转基因拟南芥对干旱胁迫的响应 对春化后生长 16 d 的转基因拟南芥幼苗用 6% PEG 模拟干旱胁迫, 分别于 0、1、2、4、8 和 24 h 时采集拟南芥整株, 平均分成 2 份, 一份用于 GUS 染色, 另一份按单株提取总蛋白, 采用考马斯亮蓝法^[14]测定总蛋白含量, 定量法测定 GUS 酶活性, 均 3 次重复。

GUS 酶活性测定方法: 以胁迫 0 h 为空白对照, 转基因拟南芥总蛋白提取液与含 GUS 反应底物的缓冲液酶促反应 30 min 后, 反应液在荧光分光光度计 (日立, F-4600) 激发光 365 nm, 发射光 455 nm, 狭缝 10 nm 条件下, 读取各胁迫样品蛋白提取液中 GUS 与底物 4-MUG 反应生成 4-MU 的荧光值, 并根据 4-MU 标准曲线计算出转基因拟南芥中 GUS 酶的活性。

$$\text{GUS 酶活性(4-MU, nmol} \cdot \text{min}^{-1} \cdot \text{mg}^{-1}) = \frac{\text{生成 4-MU 的含量(nmol)}}{\text{总蛋白含量(mg)} \times \text{酶反应时间(min)}}$$

1.4 数据处理

采用 Office 2007 分析数据,并用 DPS 6.0 进行方差分析。

2 结果与分析

2.1 *SaLDC* 启动子序列克隆

以苦豆子基因组 DNA 为模板扩增 *SaLDC* 启动子序列,琼脂糖凝胶电泳检测获得约 1300 bp 大小的条带(图 1)。克隆获得的启动子片段经连接、转化、挑取 Amp 平板上的单菌落摇菌后菌液 PCR 验证,阳性克隆送公司测序,测序结果表明 *SaLDC* 启动子片段为 1260 bp (图 2),序列提交 NCBI 获登录号: KY038928。

2.2 *SaLDC* 启动子序列信息学分析

经 PLACE 和 PlantCARE 数据库对所获得的 1260 bp *SaLDC* 启动子序列预测分析,该启动子转录起始位点为起始密码子上游 45 bp 处的碱基 A,将其标记为+1(图 2)。*SaLDC* 启动子序列中不仅包含核心元件 TATA-box(-27)和 CAAT-box(-82),还含有大量生物和非生物相关的顺式作用元件,包括干旱

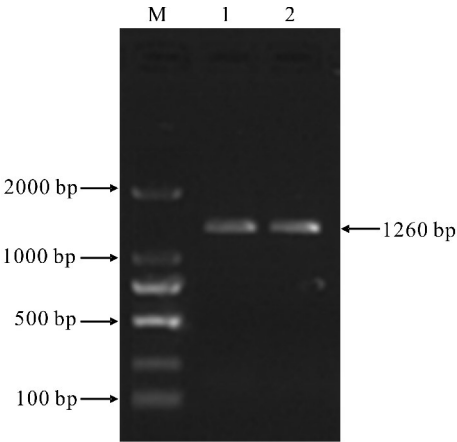


图 1 *SaLDC* 启动子片段琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of *SaLDC* promoter

M:DL2000 DNA 条带 DL2000 DNA Marker;1,2:*SaLDC* 启动子条带 *SaLDC* promoter.

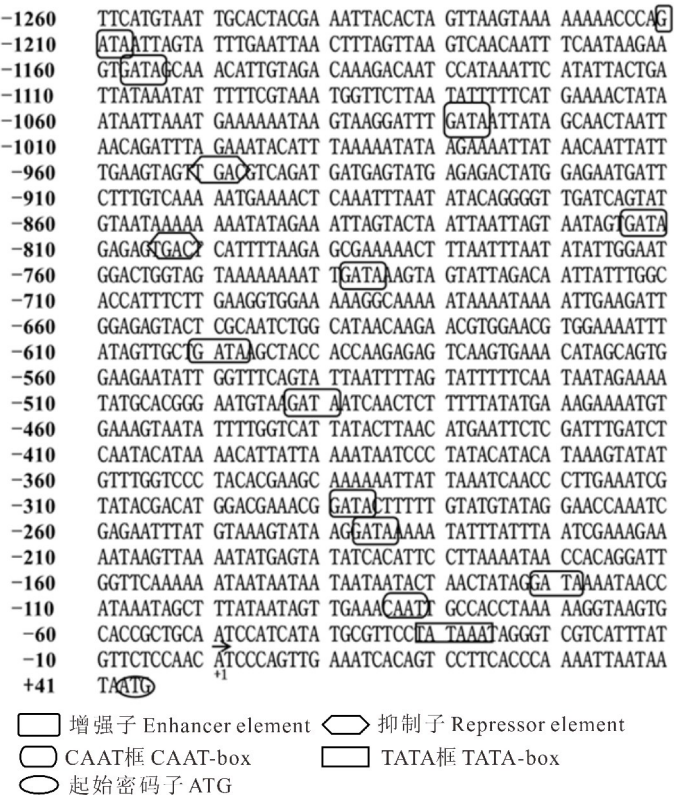


图 2 苦豆子 *SaLDC* 启动子序列

Fig. 2 *SaLDC* promoter sequence of *S. alopecuroides*

胁迫响应元件 MYBCORE;病原体响应元件 WBOXATNPR1;茉莉酸甲酯响应元件 CGTCA-motif;组织表达特异性元件 Skn1-motif、GCN4- motif 以及光响应元件 IBOXCORE、ACE、G-box、chs-CMA1a 和 chs-CMA2a 等。此外,在该序列中还存在大量增强子元件 GATA-box,11 个 GATA-box 中有 7 个集中分布于-765 bp 以内,1 个定位于-811,另 3 个分布于-1212~-1026;在-1177~-442 的正负链上共分布有 6 个抑制子元件 WRKY710S(表 1)。

表 1 *SaLDC* 启动子区域顺式作用元件位置和功能
Table 1 Physical location and function of Cis-elements in the *SaLDC* promoter

顺式作用元件 Cis-elements name	序列 Sequences (5'→3')	位置 Location	功能 Function	数量 Number
IBOXCORE	GATAA	-118, -234, -489, -597, -735, -1026, -1207	光响应元件 Light responsiveness	7
ACE	ACGTGGA	-617, -624	光响应元件 Light responsiveness	2
G-box	CACGTT	-619*, -626*	光响应元件 Light responsiveness	2
GAG-motif	AGAGAGT	-580, -805	光响应元件 Light responsiveness	2
TCT-motif	TCTTAC	-492*	光响应元件 Light responsiveness	1
chs-CMA1a	TTACTTAA	-1222*	光响应元件 Light responsiveness	1
chs-CMA2a	TCACTTGA	-573*	光响应元件 Light responsiveness	1
MYBCORE	TAACCA	-110, -168	干旱响应元件 Drought response element	2
WBOXATNPR1	TTGAC	-577*, -902*, -948, -1176*	病原体响应元件 Pathogen responsive element	4
CGTCA-motif	CGTCA	-16, -944	茉莉酸甲酯响应元件 MeJA responsive element	2
WRKY710S	TGAC	-16*, -442*, -578*, -903*, -802, -948, -1177*	抑制子 Repressor element	7
GATA -box	GATA	-119, -187*, -235, -287, -490, -598, -736, -811, -1027, -1155, -1208	增强子 Enhancer element	11
Skn1-motif	GTCAT	-15, -441	胚乳特异性表达元件 Endosperm-specific element	2
GCN4-motif	TGAGTCA	-799*	胚乳特异性表达元件 Endosperm-specific element	1

注: * 表示该顺式作用元件在互补链上;表中所列位置为 3'端的第一个碱基。
Note: * The Cis-acting elements on the complementary strand; this location is the first base at the 3' end.

2.3 *SaLDC* 启动子在转基因拟南芥中的时空和组织特异性表达

2.3.1 *SaLDC* 启动子在转基因拟南芥中的时空表达特性 不同生长阶段的转基因拟南芥幼苗均可通过 GUS 染色检测到其活性,但表达水平存在差异。春化后生长 4 d(2 片叶)的拟南芥植株地上部染色较深,尤以叶片、叶柄和茎中颜色深,说明叶和茎中 *GUS* 表达强度较高;生长 11 d(4 片叶)的植株中叶柄和茎的染色相对于叶片要深些,但浅于生长 4 d 的,显示生长 11 d 的叶片中 *GUS* 表达强度降低,而叶柄和茎的表达强度却比生长 4 d 的高;生长 16 d(6 片叶)的植株无论是叶片、叶柄还是茎,其 *GUS* 表达强度均较生长 4 和 11 d 的有所下降(图 3)。可见,*SaLDC* 启动子驱动 *GUS* 在拟南芥中的表达强度具有时空特异性,在拟南芥生长早期有较强的驱动下游功能基因表达的作用,但随植株的生长这种作用有下降趋势。

2.3.2 *SaLDC* 启动子在转基因拟南芥中的组织特异性表达 对春化后生长 30 d 的转基因成株拟南芥的根、茎、叶、花序和角果分别作 GUS 染色发现,叶片和花萼染色较深,根、茎、花瓣和角果染色浅,说明 *SaLDC* 启动子在转基因拟南芥不同器官中驱动 *GUS* 表达的能力有差异,在叶片和花萼中优势表达,但在茎、花瓣、角果和根中表达较弱(图 4),有一定的组织表达特异性。

2.4 *SaLDC* 启动子对不同光照条件的响应

生物信息学分析发现在 *SaLDC* 启动子上共有 7 类 16 个光响应顺式作用元件(表 1),为验证该启动子对光

信号的响应情况,对转*SaLDC*启动子的拟南芥植株(春化后 16 d)进行不同光照时间处理。研究表明,在黑暗与光照条件下生长的转基因拟南芥幼苗中的*SaLDC*启动子均能驱动*GUS*表达,与持续黑暗生长 3 d 的转基因拟南芥叶片中的染色程度相比,持续光照生长 3 d 明显深于 2 d 光照+1 d 黑暗培养以及 1 d 光照+2 d 黑暗培养,而且染色深度是光照 3 d>2 d>1 d>0 d(图 5),表明虽然*SaLDC*在黑暗条件下能够驱动*GUS*,但光诱导可以更有效地促使*GUS*表达上调。

2.5 *SaLDC* 启动子对干旱胁迫的响应

由于*SaLDC*启动子序列中含有 2 个与干旱相关的响应元件 MYBCORE(表 1),选取春化后 16 d 的转基因拟南芥幼苗模拟干旱胁迫 0~24 h,用*GUS*染色观察报告基因表达情况。经干旱胁迫和未经干旱胁迫处理的转基因拟南芥植株均能被*GUS*染色,胁迫 1~2 h 后拟南芥植株的*GUS*染色明显较未胁迫前加深,但随胁迫时间的延长,染色又逐渐变浅(图 6)。可见,转基因拟南芥中*SaLDC*启动子对干旱胁迫响应迅速,在胁迫初期能迅速驱动下游*GUS*表达水平上调,然而,随胁迫时间的延长*SaLDC*启动子对干旱胁迫的响应有所减弱,致使*GUS*的表达强度逐渐降低,由此说明,*SaLDC*启动子是一个干旱诱导型启动子。

为进一步精确分析转基因拟南芥在模拟干旱胁迫下*SaLDC*启动子驱动*GUS*的表达差异,对*GUS*酶活性进行定量测定,结果显示不同 PEG 胁迫时间对转基因拟南芥中*GUS*酶活性均有影响(图 7),胁迫 1~2 h 时,显著升高($P<0.05$),分别是胁迫前的 1.39 和 1.21 倍;随后*GUS*酶活性逐渐下降,胁迫 4 h 时较胁迫前有所下降,但无显著性差异;胁迫 8 h 时*GUS*酶活性降至最低($P<0.01$),较胁迫前下降了 28.2%;当胁迫至 24 h 时基本恢复至未胁迫水平,与*GUS*染色的表现结果完全一致。

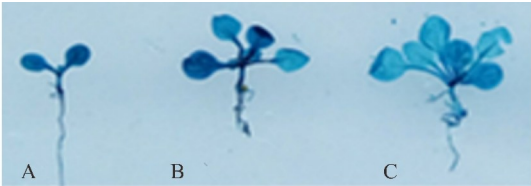


图 3 含 *SaLDC* 启动子的转基因拟南芥不同生长阶段 *GUS* 表达

Fig. 3 Expression of *GUS* driven by *SaLDC* promoter at different growth stages in transgenic *A. thaliana*

A: 生长 4 d Growing 4 d; B: 生长 11 d Growing 11 d; C: 生长 16 d Growing 16 d.



图 4 含 *SaLDC* 启动子的转基因拟南芥组织特异性表达

Fig. 4 Tissue specific expression of *SaLDC* promoter in transgenic *A. thaliana*

A: 豆荚 Pod; B: 叶片 Leaf; C: 根 Root; D: 茎 Stem; E: 花序 Floral.

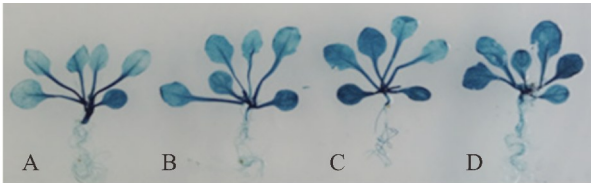


图 5 含 *SaLDC* 启动子的转基因拟南芥在不同光照条件下的 *GUS* 表达

Fig. 5 Expression of *GUS* driven by *SaLDC* promoter under different light conditions in transgenic *A. thaliana*

A: 3 d 黑暗培养 3 days darkness; B: 1 d 光照+2 d 黑暗培养 1 day light+2 days darkness; C: 2 d 光照+1 d 黑暗培养 2 days light+1 day darkness; D: 3 d 光照培养 3 days light.

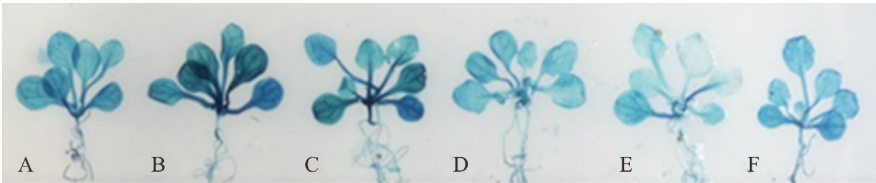


图 6 PEG 胁迫对 *SaLDC* 启动子驱动 *GUS* 表达强度的影响

Fig. 6 *GUS* expression driven by *SaLDC* promoter in transgenic *A. thaliana* under PEG stress

PEG 胁迫时间 PEG stress time; A, 0 h; B, 1 h; C, 2 h; D, 4 h; E, 8 h; F, 24 h.

3 讨论

基因表达受其上游启动子调控,有研究报道启动子主要分为组成型启动子、诱导型启动子和组织特异性启动子 3 类^[15],组织特异性启动子所调控的下游基因往往只在特定条件和组织器官中特异表达,从而避免持续稳定、高效表达所造成的浪费,降低了植物的代谢负担^[16]。刘华等^[17]分析了 2 个花生(*Arachis hypogaea*)品种开花后 20、40 和 60 d 种子以及根、茎、叶和花 7 个不同组织中油酸脱氢酶基因 *AhFAD2A* 和 *AhFAD2B* 的表达,发现这 2 个基因在各组织中都有表达,但在花后 40 d 的种子中表达量最高,表现出明显的时空特异性;张吉顺等^[18]利用实时荧光定量 PCR 对烟草赖氨酸脱羧酶基因 *NtLDC1* 进行组织特异性表达分析,发现该基因在烟草叶片组织中的表达水平最高,在茎中表达水平最低;Naoumkina 等^[19]将克隆到的瓜尔豆(*Cyamopsis tetragonoloba*)甘露聚糖合酶基因的启动子与报告基因融合并转入紫花苜蓿(*Medicago sativa*),研究显示该启动子只在紫花苜蓿的胚乳组织中特异表达。本研究发现 *SaLDC* 启动子虽然在转基因拟南芥幼苗和成株的各组织中均能驱动 *GUS* 报告基因表达,但表达强度有区别,在幼苗中随生长时间的延长,叶片中表达活性下降;在成株的叶片和花萼中表达活性高于根、茎、花瓣和角果,由此可见,*SaLDC* 启动子既有时空表达特异性,又有组织表达特异性。

植物通过感知多种环境因子(光、温度、水分等)的转导信号,诱导基因表达以调节自身正常的生长发育^[20]。由诱导型启动子驱动的抗逆基因的表达研究已在多种植物中开展^[21-24],程寅胜等^[25]用 NaCl、干旱、赤霉素(gibberellin A₃, GA₃)、茉莉酸甲酯(methyl jasmonate, MeJA)以及光照处理含砗山酥梨(*Pyrus bretschneideri* ‘Dangshan Suli’)糖转运相关基因 *PbTMT4* 启动子的转基因拟南芥,结果显示这些非生物胁迫因子一定程度上均可提高拟南芥中 *GUS* 的转录水平;李小冬等^[26]发现紫花苜蓿 *MsMBF1C* 启动子上具有与植物耐热调节相关的结合位点,42 °C 高温热诱导后转基因拟南芥中 *GUS* 与 *At-MBF1C* 的表达都得到显著提高。研究表明 *LDC* 的表达也受多种环境因子的影响,NaCl 可促使冰叶日中花(*Mesembryanthemum crystallinum*)的 *LDC* 表达上调^[27];低温能够使耐冷性强的黄瓜(*Cucumis sativus*)品种在发芽期诱导赖氨酸脱羧酶基因表达,但该基因在耐冷性弱的品种中不能被诱导^[28],苗永美等^[29]对携带有 *CsLDC* 的耐冷黄瓜品种进行低温和盐胁迫,证明 *CsLDC* 是低温和盐快速响应基因;杨毅等^[12]通过 qPCR 检测发现苦豆子植株 *SaLDC* 的表达对干旱胁迫有响应。本研究将 *SaLDC* 启动子融合 *GUS* 遗传转化拟南芥,经干旱胁迫后,转基因拟南芥幼苗的 *GUS* 酶活性从胁迫 1~8 h 发生显著变化,由此预示 *SaLDC* 启动子能利用拟南芥植物体内自身存在的调节机制调控基因表达,在经受干旱胁迫时,启动了相应的应答机制,在转录水平上参与 *SaLDC* 调控表达,从而抵御外界环境胁迫,使基因表达与植物生长状态协调统一。

在植物生长发育过程中,光不仅直接参与光合作用,还是调控相关基因表达的一个重要的信号^[30],光诱导型启动子通过其光调控元件的特殊组合方式调控基因的表达^[31],Wang 等^[32]克隆并分析了白杨(*Populus*)Pt-RbcS 启动子,发现其包含有 TCT-motif、ATCT-motif 和 GAG-motif 等光响应元件,该启动子驱动 *GUS* 优先在具有光合组织的叶和茎中表达,本研究在苦豆子 *SaLDC* 启动子中发现 7 类共 16 个光响应元件,包括 IBXCORE、ACE、G-box、GAG-motif、TCT-motif 等,研究发现,虽然黑暗与光照条件下 *SaLDC* 启动子均能驱动转基因拟南芥中 *GUS* 表达,但表达的程度是光照 3 d>2 d>1 d>0 d,说明光诱导可以促使该启动子中的光响应元件发挥作用,提高 *GUS* 在 mRNA 上的转录水平,这与实践中光照促进植物生长发育相一致。

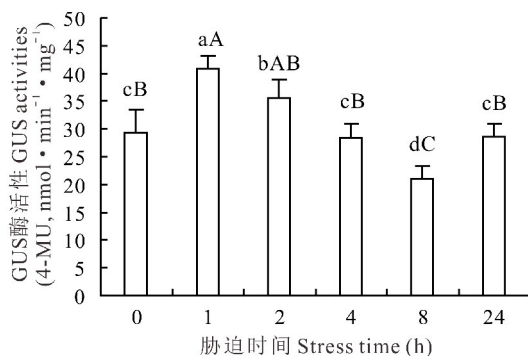


图 7 PEG 胁迫后转基因拟南芥中 *GUS* 酶活性差异比较

Fig. 7 *GUS* enzyme activity expression difference in transgenic *A. thaliana* under PEG stress

不同小写字母表示 0.05 水平差异显著,不同大写字母表示 0.01 水平差异显著。Different lowercase letters indicates significant differences at 0.05 level, and uppercase letters indicate significant differences at 0.01 level.

4 结论

SaLDC 启动子序列中除了基本顺式作用元件外, 还有多个响应外界刺激的生物和非生物作用元件。虽然 *SaLDC* 启动子在拟南芥幼苗的不同生长阶段和成株的各组织器官中均能驱动 *GUS* 表达, 但有时空特异性和组织特异性。生物信息分析、组织化学染色和定量分析等多个角度说明 *SaLDC* 启动子受光照和 PEG 胁迫诱导, 可作为光照和干旱胁迫诱导型启动子用于后续研究。

参考文献 References:

- [1] Zhu Y X, Li Y, Zheng X F, *et al.* Modern molecular biology (Fourth Edition). Beijing: Higher Education Press, 2013.
朱玉贤, 李毅, 郑晓峰, 等. 现代分子生物学(第4版). 北京: 高等教育出版社, 2013.
- [2] Wang X C, Yang C D. Biosafe marker genes and their novel approaches. China Biotechnology, 2003, 23(4): 19—22.
王兴春, 杨长登. 转基因植物生物安全标记基因. 中国生物工程杂志, 2003, 23(4): 19—22.
- [3] Gu R L, Zhao L, Wang G Y, *et al.* Isolation of a maize beta—glucosidase gene promoter and characterization of its activity in transgenic tobacco. Plant Cell Reports, 2006, 25(11): 1157—1165.
- [4] Pei L L, Tang Q, Zhang T, *et al.* Cloning and analysis of promoter of stress—related gene *OsPM1* from *Oryza sativa*. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2015, 35(11): 2179—2184.
裴柳玲, 唐清, 张涛, 等. 水稻胁迫相关基因 *OsPM1* 启动子的克隆与分析. 西北植物学报, 2015, 35(11): 2179—2184.
- [5] Li Y H, Wang K, Zhao L, *et al.* TCT-motif function of photoperiod response element of soybean *GmGBP1* gene promoter. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2018, 40(4): 592—596.
李英华, 王阔, 赵琳, 等. 大豆 *GmGBP1* 基因启动子的光周期响应元件 TCT-motif 功能分析. 中国油料作物学报, 2018, 40(4): 592—596.
- [6] Du C, Li J, Tang Y T, *et al.* Cloning, prokaryotic expression and characterization of lysine decarboxylase gene from *Huperzia serrata*. Chinese Journal of Biotechnology, 2014, 30(8): 1299—1307.
杜次, 李菁, 唐云涛, 等. 蛇足石杉赖氨酸脱羧酶基因的克隆、原核表达及其功能分析. 生物工程学报, 2014, 30(8): 1299—1307.
- [7] Schoofs G, Teichmann S, Hartmann T, *et al.* Lysine decarboxylase in plants and its integration in quinolizidine alkaloid biosynthesis. Phytochemistry, 1983, 22(1): 65—69.
- [8] Zhang J C, Chen Z Y, Song Y H. Analysis of differential expression of the key enzyme genes involved in huperzine A biosynthesis and metabolic pathways. Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics, 2015, 35(1): 1—5.
张君诚, 陈作毅, 宋育红. 石杉碱甲生物合成与代谢调控关键基因的差异表达分析. 中国生化药物杂志, 2015, 35(1): 1—5.
- [9] Waller G R, Nowacki E K. Alkaloid biology and metabolism in plants. Translated by Zhu T P, Tong S H and Ma Z W. Beijing: Science Press, 1984.
Waller G R, Nowacki E K. 生物碱的生物学及其在植物中的代谢作用. 朱太平, 佟绍华, 马忠武, 译. 北京: 科学出版社, 1984.
- [10] Bunsupa S, Katayama K, Ikeura E, *et al.* Lysine decarboxylase catalyzes the first step of quinolizidine alkaloid biosynthesis and coevolved with alkaloid production in Leguminosae. The Plant Cell, 2012, 24(3): 1202—1216.
- [11] Yang Y, Tian L, Liu P, *et al.* Relationship between gene expression of lysine decarboxylase and accumulation of matrine and oxymatrine in *Sophora alopecuroides*. China Journal of Chinese Materia Medica, 2015, 50(10): 846—849.
杨毅, 田蕾, 刘萍, 等. 苦豆子赖氨酸脱羧酶基因表达与苦参碱和氧化苦参碱含量的关系. 中国药理学杂志, 2015, 50(10): 846—849.
- [12] Yang Y, Lu S S, Liu P, *et al.* Cloning and expression analysis of a lysine decarboxylase gene in *Sophora alopecuroides*. Acta Prataculturae Sinica, 2016, 25(8): 128—135.
杨毅, 陆姗姗, 刘萍, 等. 苦豆子赖氨酸脱羧酶基因克隆与表达分析. 草业学报, 2016, 25(8): 128—135.
- [13] Lu S S, Meng X S, Liu P, *et al.* Establishment of genetic transformation system for *Sophora alopecuroides* and deletion analysis of *SaLDC* promoter. China Journal of Chinese Materia Medica, 2017, 42(10): 1853—1859.
陆姗姗, 孟祥善, 刘萍, 等. 苦豆子遗传转化体系建立及 *SaLDC* 启动子缺失分析. 中国中药杂志, 2017, 42(10): 1853—1859.
- [14] Zou Q, Zhao S J, Wang Z, *et al.* Plant physiology guide. Beijing: China Agricultural Press, 2000.
邹琦, 赵世杰, 王忠, 等. 植物生理学指导. 北京: 中国农业出版社, 2000.
- [15] Carninci P, Sandelin A, Lenhard B, *et al.* Genome-wide analysis of mammalian promoter architecture and evolution. Nature

- Genetics, 2006, 38(6): 626—635.
- [16] Li Y, Lee K K, Walsh S, *et al.* Establishing glucose and ABA-regulated transcription networks in *Arabidopsis* by microarray analysis and promoter classification using a relevance vector machine. *Genome Research*, 2006, 16(3): 414—427.
- [17] Liu H, Xue J M, Xu Q Y, *et al.* Spatio-temporal expression of fatty acid desaturase genes *AhFAD2A* and *AhFAD2B* in peanuts. *Journal of Zhejiang A&F University*, 2019, 36(1): 14—20.
刘华, 薛金嫚, 徐倩玉, 等. 花生油酸脱氢酶基因 *AhFAD2A* 和 *AhFAD2B* 的时空表达特征. *浙江农林大学学报*, 2019, 36(1): 14—20.
- [18] Zhang J S, Zhang X L, Lin S F, *et al.* Cloning and expression analysis of lysine decarboxylase gene *NtLDC1* from *Nicotiana tabacum*. *Plant Physiology Journal*, 2016, 52(4): 445—453.
张吉顺, 张孝廉, 林世锋, 等. 烟草赖氨酸脱羧酶基因 *NtLDC1* 的克隆和表达分析. *植物生理学报*, 2016, 52(4): 445—453.
- [19] Naoumkina M, Dixon R A. Characterization of the mannan synthase promoter from guar (*Cyamopsis tetragonoloba*). *Plant Cell Reports*, 2011, 30: 997—1006.
- [20] Jia W S, Xing Y, Lu C M, *et al.* Signal transduction from water stress perception to ABA accumulation. *Acta Botanica Sinica*, 2002, 44(10): 1135—1141.
- [21] Urao T, Shinozaki K, Urao S, *et al.* An *Arabidopsis* MYB homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell*, 1993, 5(11): 1529—1539.
- [22] Wormit A, Trentmann O, Feifer I, *et al.* Molecular identification and physiological characterization of a novel monosaccharide transporter from *Arabidopsis* involved in vacuolar sugar transport. *Plant Cell*, 2006, 18(12): 3476—3490.
- [23] Wang Q, Yuan F, Pan Q F, *et al.* Isolation and functional analysis of the *Catharanthus roseus* deacetylvindoline-4-O-acetyltransferase gene promoter. *Plant Cell Reports*, 2010, 29(2): 185—192.
- [24] Li X L, Xue C, Li J M, *et al.* Genome-wide identification, evolution and functional divergence of MYB transcription factors in Chinese white pear (*Pyrus bretschneideri*). *Plant Cell Physiology*, 2016, 57(4): 824—847.
- [25] Cheng Y S, Chen J Q, Chen D, *et al.* Cloning and functional analysis of the promoter of *PbTMT4* gene related sugar transport in pear. *Acta Horticulturae Sinica*, 2019, 46(1): 25—36.
程寅胜, 陈健秋, 陈丹, 等. 梨糖转运相关基因 *PbTMT4* 启动子克隆及功能分析. *园艺学报*, 2019, 46(1): 25—36.
- [26] Li X D, Mo B T, Han Y F, *et al.* Cloning and function analysis of the high temperature inducible promoter *pMsMBF1c* in alfalfa (*Medicago sativa*). *Acta Prataculturae Sinica*, 2019, 28(1): 128—137.
李小冬, 莫本田, 韩永芬, 等. 紫花苜蓿高温诱导启动子 *pMsMBF1c* 的克隆与功能分析. *草业学报*, 2019, 28(1): 128—137.
- [27] Kuznetsov V, Shorina M, Aronova E, *et al.* NaCl and ethylene-dependent cadaverine accumulation and its possible protective role in the adaptation of the common ice plant to salt stress. *Plant Science*, 2007, 172: 363—370.
- [28] Lu M H, Li X M, Chen J F, *et al.* Study on chilling tolerance of cucumber during germination and expression of lysine decarboxylase gene. *Scientia Agricultura Sinica*, 2005, 38(12): 2492—2495.
逯明辉, 李晓明, 陈劲枫, 等. 黄瓜发芽期耐冷性与赖氨酸脱羧酶基因表达. *中国农业科学*, 2005, 38(12): 2492—2495.
- [29] Miao Y M, Ning Y, Shen J, *et al.* Cloning of *LDC* gene and its expression analysis under several adversity stresses from *Cucumis sativus* L. *Journal of Nanjing Agricultural University*, 2013, 36(3): 8—14.
苗永美, 宁宇, 沈佳, 等. 黄瓜 *LDC* 基因克隆及逆境胁迫下的表达分析. *南京农业大学学报*, 2013, 36(3): 8—14.
- [30] Lau O S, Deng X W. Plant hormone signaling lightens up: Integrators of light and hormones. *Current Opinion in Plant Biology*, 2010, 13(5): 571—577.
- [31] Li Z X, Chen X B. Research advances on plant inducible promoters and related cis-acting elements. *Biotechnology Bulletin*, 2015, 31(10): 8—15.
李濯雪, 陈信波. 植物诱导型启动子及相关顺式作用元件研究进展. *生物技术通报*, 2015, 31(10): 8—15.
- [32] Wang L, Li L, Xu L, *et al.* Isolation and functional analysis of the poplar *RbcS* gene promoter. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2013, 31(1): 120—127.