大豆酰基载体蛋白硫酯酶基因及其启动子表达方式的初步分析

赵 艳,杨晓杰,范震宇,祁宏英

(齐齐哈尔大学 生命科学与农林学院,黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘 要:利用实时定量PCR方法,检测大豆酰基载体蛋白硫酯酶(*acyl-ACP thioesterase*)基因在大豆各组织中的表达方式,结果显示该基因在大豆根、茎、叶、花中的表达活性低,而种子中的表达活性较高。利用PCR方法,克隆大豆*acyl-ACP thioesterase*基因5′端上游2 057 bp序列,命名为AP。在线启动子预测软件分析结果表明AP序列中含有多种典型的种子特异表达元件,如RY repeat、SEF1 motif、SEF3 motif、SEF4 motif、E-box、ACGT等顺式作用元件,推测大豆*acyl-ACP thioesterase*基因启动子具有种子特异表达活性。

关键词:大豆;酰基载体蛋白硫酯酶基因;启动子;克隆

中图分类号:Q756 **文献标识码**:A **文章编号**:1000-9841(2012)05-0714-04

Preliminary Analysis of the Expression Pattern of Soybean *acyl-ACP Thioesterase* Gene and Promoter

ZHAO Yan, YANG Xiao-jie, FAN Zhen-yu, QI Hong-ying

(College of Life Science and Agro-forestry, Qiqihaer University, Qiqihaer 161006, Heilongjiang, China)

Abstract: The expression pattern of soybean *acyl-ACP thioesterase* gene in soybean tissues was detected by real-time quantitative PCR(RTQ-PCR). The result showed that there were a little activity in roots, stems, leaves and flowers, but there was higher activity in seeds. The 5′-flanking upstream sequence of soybean *acyl-ACP thioesterase* gene, named AP, was isolated from soybean genomic DNA by PCR method, and the length was 2 057 bp. Sequence analysis by PLACE revealed that this fragment contained a series of motifs related to seed-specific promoters, such as RY repeat, SEF1 motif, SEF3 motif, SEF4 motif, E-box and ACGT. It can be inferred that AP promoter possess the function driven downstream gene expression exclusively in soybean seeds.

Key words: Soybean; *acyl-ACP thioesterase*; Promoter; Cloning

启动子是基因转录调控中重要的调控元件。近年来,具有调控下游基因种子专一性表达特性的种子特异性启动子已成为研究热点。种子特异性启动子主要来源于粮食作物和油料作物种子中富含的蛋白质、氨基酸、淀粉、脂类等合成代谢途径中相关的酶基因的5′端上游序列[1]。大豆是富含脂类、蛋白质及多种营养元素的重要经济作物。大豆中已克隆的种子特异性启动子并在转基因研究中得到应用的主要有伴大豆球蛋白[2]、球蛋白[3]、油质蛋白[4]和凝集素[5]的启动子。获得更多的大豆种子特异性启动子能够有效降低同源转录基因沉默,促进大豆转基因工程研究。

种子特异表达基因的研究是获得种子特异性启动子的关键。确定种子特异表达基因的方法很多,如基因芯片技术[6]、EST分析[7],半定量-PCP[8]、荧光定量[9]和Northern杂交[10]等,或根据其他植物中与蛋白质、氨基酸、淀粉、脂类等合成代谢途径中相关的种子特异表达基因,同源性搜索大豆中的种子特异表达基因。棉花*acyl-ACP thioesterase*基因启动子是种子特异性启动子,能够驱动鼠类乳腺细胞中特有的脂肪酸水解酶基因在转基因油菜种子中特异性表达[11-12]。因此,本研究根据棉花的*acyl-ACP thioesterase*基因的氨基酸序列,获得大豆*acyl-ACP thioesterase*基因的序列,并克隆其5′端上游约2 000 bp的序列;利用实时荧光定量PCR和生物信息学方法对大豆*acyl-ACP thioesterase*基因及其启动子序列进行初步分析。

1 材料与方法

1.1 供试材料

大豆品种吉豆2号、大肠杆菌DH 5α为本实验室保存;限制性内切酶*Hind*Ⅲ、*Bam*HI、pMD18-T克隆载体、ExTaq、T_4连接酶、RNAiso Reagent试剂盒、逆转录试剂盒均购自Takara公司,DNA凝胶回收试

收稿日期:2012-07-02

基金项目:齐齐哈尔大学青年教师科研启动支持计划项目(2010K-M09);黑龙江省教育厅科学技术研究项目(12521611);作物生物学国家重点实验室开放课题(2012KF13);国家自然科学基金(40971053)。

第一作者简介:赵艳(1981-),女,博士,讲师,主要从事植物分子生物学研究。E-mail:zhaoyan3053877@yahoo.com.cn。

通讯作者:杨晓杰(1963-),女,教授,主要从事植物资源与利用研究。E-mail:yangxiaojie1980@163.com。

剂盒购自维特洁公司,PCR 引物由上海生工生物工程公司合成,其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2　方法

1.2.1　*大豆总 RNA 的提取及 cDNA 的合成*　利用 RNA 提取试剂盒提取大豆根、茎、叶、花及种子的总 RNA,以提取的总 RNA 为模板,按照逆转录试剂盒的说明合成大豆 cDNA 的第一条链。

1.2.2　*实时荧光定量 PCR*　以不同大豆组织材料的 cDNA 为模板,进行荧光定量 PCR 反应。大豆的持家基因 *β-tubulin*(GMU12286)为内参,引物分别为:B_1:5′-GGAAGGCTTTCTTGCATTGGTA-3′;B_2:5′-AGTGGCATCCTGGTACTGC-3′。根据棉花 *acyl-ACP thioesterase* 基因的氨基酸序列(AF076535.1),同源序列搜索获得大豆 *acyl-ACP thioesterase* 基因的序列。根据该基因序列,设计检测大豆 *acyl-ACP thioesterase* 基因表达量的引物,分别为:C_1:5′-CAGGGAAGAATGGTATGCG-3′;C_2:5′-TAGACAGCCTCCGTGTTAC-3′。

1.2.3　*启动子序列的克隆及预测分析*　以大豆叶片为材料,采用 CTAB 法提取大豆的基因组 DNA。根据大豆基因组序列(http://www.phytozome.net/soybean),以基因组 DNA 为模板,设计引物(P_1:5′-GAGGAATGCTAAATTAATTAGG-3′;P_2:5′-AATGAATTTCTAAGGTCGCTGC-3′),扩增大豆 *acyl-ACP thioesterase* 基因 ATG 上游约 2 000 bp 的序列。PCR 反应条件为预变性 95℃ 5 min;94℃ 30 s,59℃ 40 s,72℃ 1 min,共 30 个循环;72℃后延伸 7 min。将 PCR 扩增片段连接到 pMD18-T 克隆载体上,获得重组质粒并进行测序。利用 DNAMAN 进行序列比对,在线启动子分析软件 PlantCARE(http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.htmL)分析启动子序列中存在的顺式作用元件。

2　结果与分析

2.1　大豆 *acyl-ACP thioesterase* 基因的组织表达特性

根据棉花 *acyl-ACP thioesterase* 基因的氨基酸序列,同源序列搜索获得大豆 *acyl-ACP thioesterase* 基因的序列(NP_001237802)。以大豆持家基因 *β-tubulin* 作为内参基因,采用实时荧光定量对大豆根、茎、叶、花、种子各组织中 *acyl-ACP thioesterase* 基因的表达量进行分析。结果显示大豆 *acyl-ACP thioesterase* 基因在大豆根、茎、叶、花中表达活性相对低,而种子中的表达活性相对高(图 1),表明大豆 *acyl-ACP thioesterase* 基因主要集中在种子中表达。

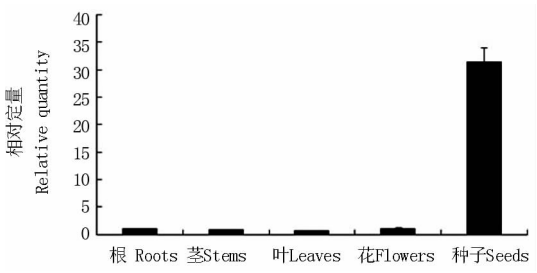
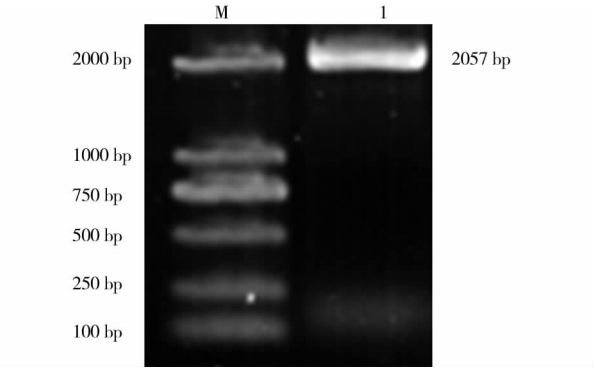


图 1　大豆 *acyl-ACP thioesterase* 基因在大豆各组织中的表达

Fig. 1　The expression of soybean *acyl-ACP thioesterase* gene in different soybean tissues

2.2　大豆 *acyl-ACP thioesterase* 基因启动子序列的克隆

以大豆基因组 DNA 为模板,PCR 扩增大豆 *acyl-ACP thioesterase* 基因 5′端上游序列,获得长度为 2 057 bp的片段,命名为 AP(图 2)。将该片段连接到 pMD18-T 载体上,获得重组质粒 pMD18-T-AP。将其转入大肠杆菌中,提取质粒进行鉴定,用*Hind*Ⅲ

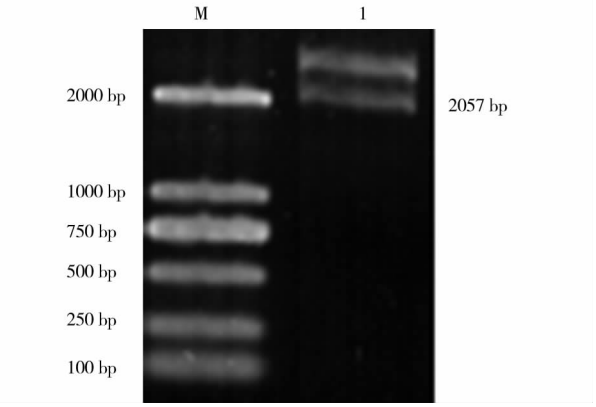


M. 2000 bp DNA marker; 1:PCR 产物

M. 2000 bp DNA marker; 1:PCR amplification of AP

图 2　AP 的扩增产物

Fig. 2　PCR amplification of AP



M. 2000 bp DNA Marker;1:*Hind*Ⅲ和 *Bam*HI 双酶切片段

M. 2000 bp DNA Marker; 1:*Hind*Ⅲ and *Bam*HI digestion of pMD18-T-AP

图 3　pMD18-T-AP 酶切鉴定

Fig. 3　Restriction enzyme digestion identification of pMD18-T-AP

和 *Bam*HI 双酶切鉴定结果得到与预期相符的片段(图 3)。

2.3 大豆 AP 启动子的序列分析

利用 DNAMAN 软件,将测序结果与大豆基因组上该段序列进行同源性比对,同源性达到 100%,说明该段序列在不同大豆品种间无差别。生物信息学分析表明,AP 序列中含有多种典型的种子特异表达元件(图 4),如:RY repeat(对种子特异性基因的高水平表达十分重要[13-14])、SEF1 motif(能够增强启动子的转录活性[15])、SEF3 motif(胚特异蛋白 SEF3 的结合位点)、SEF4 motif(胚特异蛋白 SEF4 的结合位点[16])、G-box(广泛存在于各种种子特异性启动子中[17])、E-box(常出现在参与三酰基甘油合成和植物种子特异表达基因的启动子中[18])和多个种子特异表达元件 AACA[19]、ACGT[20]、CCAA[21]等。

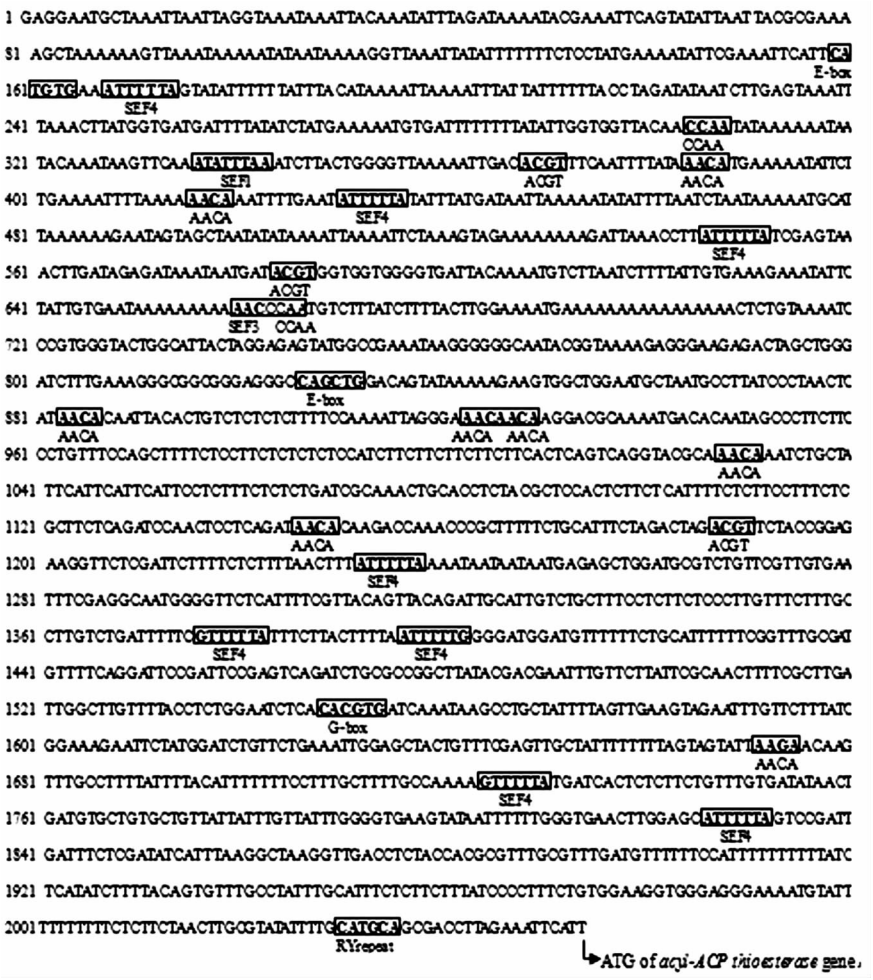


图 4 AP 序列的生物信息学分析

Fig. 4 Bioinformatics analysis of DNA sequence of AP

3 讨 论

本研究通过实时荧光定量 PCR 和生物信息学方法,对大豆 *acyl-ACP thioesterase* 基因及其启动子序列进行初步分析。实时荧光定量 PCR 检测结果表明大豆 *acyl-ACP thioesterase* 基因在大豆中具有组织表达特性,即主要在种子中表达,种子中相对表达量约为其它组织的 31 倍;利用生物信息学软件预测该基因的启动子序列,表明该序列中具有多种典型的种子特异表达元件,且多种顺式元件的数量有多个,推测大豆 *acyl-ACP thioesterase* 基因启动子具有种子特异表达活性,与实时荧光定量 PCR 检测基因在大豆组织中的表达方式一致。

种子特异性启动子获得的方法很多,由于大豆基因组序列的公布,根据其他植物中与蛋白质、氨基酸、淀粉、脂类等合成代谢途径中相关的种子特异表达基因寻找大豆种子特异表达基因,进而研究启动子序列的方法简单易行。根据以上的研究结果,初步表明大豆 *acyl-ACP thioesterase* 基因启动子具有种子特异表达活性,其是否具有稳定的种子特异表达特性还需进一步在转基因植物中进行验证。

参考文献

[1] 赵艳,刘晓鑫,张庆林,等. 大豆种子特异性启动子的研究进展

[J]. 大豆科学,2010,29(1):151-156. (Zhao Y, Liu X X, Zhang Q L, et al. Advances of studies on seed-specific promoters of soybean[J]. Soybean Science, 2010, 29(1): 151-156.)

[2] Chiera J M, Finer J J, Grabau1 E A. Ectopic expression of a soybean phytase in developing seeds of *Glycine max* to improve phosphorus availability[J]. Plant Molecular Biology, 2004, 56(6): 895-904.

[3] Ding S H, Huang L Y, Wang Y D, et al. High-level expression of basic fibroblast growth factor in transgenic soybean seeds and characterization of its biological activity[J]. Biotechnology Letters, 2006, 28(12): 869-875.

[4] Sarmiento C, Ross J H, Herman E, et al. Expression and subcellular targeting of a soybean oleosin in transgenic rapeseed. Implications for the mechanism of oil-body formation in seeds[J]. Plant Journal, 1997, 11(4): 783-796.

[5] Philip R, Darnowski D W, Maughan P J, et al. Processing and localization of bovine β-casein expressed in transgenic soybean seeds under control of a soybean *lectin* expression cassette[J]. Plant Science, 2001, 161(2): 323-355.

[6] Gaur V S, Singh U S, Kumar A. Transcriptional profiling and in silico analysis of Dof transcription factor gene family for understanding their regulation during seed development of rice(*Oryza sativa* L.)[J]. Molecular Biology Reports, 2011, 38(4): 2827-2848.

[7] Jeong S C, Yang K, Park J Y, et al. Structure, expression, and mapping of two nodule-specific genes identified by mining public soybean EST databases[J]. Gene, 2006, 15(383): 71-80.

[8] Meng Q C, Zhang C H, Gai J Y, et al. Molecular cloning, sequence characterization and tissue-specific expression of six NAC-like genes in soybean[*Glycine max* (L.) Merr.][J]. Journal of Plant Physiology, 2007, 164(8): 1002-1012.

[9] Chauhan H, Khurana N, Agarwal P, et al. Heat shock factors in rice(*Oryza sativa* L.): genome-wide expression analysis during reproductive development and abiotic stress[J]. Molecular Genetics Genomics, 2011, 286(2): 171-187.

[10] Terauchi K, Asakura T, Ueda H. Plant-specific insertions in the soybean aspartic proteinases, soyAP1 and soyAP2, perform different functions of vacuolar targeting[J]. Plant Physiology, 2006, 163(8): 856-862.

[11] Yoder D W, Nampalsansuk M, Pirtle I L, et al. Molecular cloning and nucleotide sequence of a gene encoding a cotton palmitoyl-acyl carrier protein thioesterase[J]. Biochimica et Biophysica Acta-Gene Structure and Expression, 1999, 1446(3): 403-413.

[12] Holmberg N, Harker M, Gibbard C L, et al. Sterol C-24 methyltransferase type 1 controls the flux of carbon into sterol biosynthesis in tobacco seed[J]. Plant Physiology, 2002, 130(3): 303-311.

[13] Chatthai M, Forward B S, Yevtushenko D, et al. 2S storage protein gene of Douglas-fir; characterization and activity of promoter in transgenic tobacco seeds[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2004, 42(5): 417-423.

[14] Moreno-Risueno MA, González N, Díaz I, et al. FUSCA3 from barley unveils a commo transcriptional regulation of seed-specific genes between cereals and *Arabidopsis*[J]. Plant Journal, 2008, 53(6): 882-894.

[15] Yoshino M, Nagamatdu A, Tsutsumi K, et al. The regulatory function of the upstream sequence of the β-conglycinin α subunit gene in seed-specific transcription is associated with the presence of the RY sequence[J]. Genes and Genetic Systems, 2006, 81(2): 135-141.

[16] Chung K J, Hwang S K, Hahn B S, et al. Authentic seed-specific activity of the Perilla oleosin 19 gene promoter in transgenic Arabidopsis[J]. Plant Cell Reports, 2008, 27(1): 29-37.

[17] Chandrasekharan M B, Bishop K J, Hall T C. Module specific regulation of the beta-phaseolin promoter during embryogenesis[J]. Plant Journal, 2003, 33(5): 853-866.

[18] Kim M J, Kim J K, Shin J S, et al. The SebHLH transcription factor mediates trans-activation of the *SeFAD2* gene promoter through binding to E-and G-box elements[J]. Plant Molecular Biology, 2007, 64(4): 453-466.

[19] Washida H, Wu C Y, Suzuki A, et al. Identification of cis-regulatory elements required for endosperm expression of the rice storage protein glutelin gene *GluB*-1[J]. Plant Molecular Biology, 1999, 40(1): 1-12.

[20] Niu X, Adams C C, Workman J L, et al. Binding of the wheat basic leucine zipper protein EmBP-1 to nucleosomal binding sites is modulated by nucleosome positioning[J]. Plant Cell, 1996, 8: 1569-1587.

[21] Chamberland S, Daigle N, Bernier F. The legumin boxes and the 3′ part of a soybean beta-conglycinin promoter are involved in seed gene expression in transgenic tobacco plants[J]. Plant Molecular Biology, 1992, 19(6): 937-949.

(上接第 713 页)

[9] Letunic I, Copley R R, Pils B, et al. SMART 5: domains in the context of genomes and networks[J]. Nucleic Acids Research, 2006, 34(Database issue): D257-260.

[10] 郭安源,朱其惠,陈新. GSDS:基因结构显示系统[J]. 遗传, 2007,29(8):1023-1026. (Guo A Y, Zhu Q H, Chen X. GSDS: Genetic structure the display system[J]. Genetic, 2007, 29(8): 1023-1026.)

[11] Coen E S. Floral symmetry[J]. EMBO Journal, 1996, 15: 6777-6788.

[12] Luo D, Carpenter R, Vincen C, et al. Origin of floral asymmetry in *Antirrhinum*[J]. Nature, 1996, 383: 794-799.

[13] Kosugi S, Ohashi Y. PCF1 and PCF2 specifically bind to cis elements in the rice proliferating cell nuclear antigen gene[J]. Plant Cell, 1997, 9: 1607-1619.

[14] 聂丽娜,夏兰琴,徐兆师,等. 植物基因启动子的克隆及其功能研究进展[J]. 植物遗传资源学报,2008,9(3):385-391. (Nie L N, Xia L Q, Xu Z S, et al. Plant gene promoter of the cloning research progress and its functions[J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2008, 9(3): 385-391.)

[15] He C Y, Tian Y, Saedler R, et al. The MADS-domain protein MPF1 of *Physalis xoridana* controls plant architecture, seed development and Flowering time[J]. Planta, 2010, 231: 767-777.