

大豆 *GmGAMYB1* 启动子克隆与分析

谷月娇,赵琳,张彦威,卢清瑶,宋仙萍,李文滨

(大豆生物学教育部重点实验室/农业部东北大豆生物学与遗传育种重点实验室/东北农业大学大豆研究所,黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要:利用 PCR 技术从大豆品种东农 42 基因组中分离得到了 *GmGAMYB1* 基因启动子片段 p*GmGAMYB1*,定向替换载体 pBI121 的 CAMV35S 组成型启动子,构建表达载体 pBI121-p*GmGAMYB1*,驱动下游报告基因 *GUS* 基因表达,并利用 PLACE 和 PlantCARE 在线启动子预测工具进行分析。结果表明:序列中含有多种典型的光及各种激素和胁迫诱导特异性表达元件,如光应答元件如 3-AF1 binding site、BOX-4、T-Box 和 TCT-motif;赤霉素应答元件 GARE;脱落酸应答元件 ABRE;热激元件 CCAATBox;节律钟 Ciradian 等。

关键词:*GmGAMYB1* 启动子;*GUS* 基因;组织化学染色

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2013)02-0160-05

Isolation and Analysis of Promoter of *GmGAMYB1* from Soybean

GU Yue-jiao, ZHAO Lin, ZHANG Yan-wei, LU Qing-yao, SONG Xian-ping, LI Wen-bin

(Key Laboratory of Soybean Biology in Chinese Ministry of Education/Key Laboratory of Biology and Genetics & Breeding for Soybean in Northeast China, Ministry of Agriculture/Soybean Research Institute of Northeast Agricultural University, Harbin 150030, China)

Abstract: Soybean (*Glycine max*) is a kind of typical plant in the developmental biology and molecular biology research, the completion of soybean genome has provided a lot of convenience for research, but there is still so little achievement on the soybean highly effective inducible promoters. Gibberellin (GA) biosynthesis and signaling pathways have been discussed in detail in recent years. In addition, several reviews discuss general mechanisms of morphogenesis. *GAMYB1* gene is an important promotive factor in the signal transduction pathways of GA. In this study, the promoter of *GmGAMYB1* was cloned from the soybean Dongnong 42 by PCR. It was directionally replaced CAMV 35S constitutive promoter of the vector pBI121. The expression vector of pBI121-p*GmGAMYB1* was constructed and the expression of downstream reporter *GUS* gene was driven. The analysis on promoter sequence by online promoter forecasting tool PLACE and PlantCARE showed that sequence contained a variety of specific expression elements, such as light and various hormones and stress-induced elements. *GUS* histochemical staining was used to explore the role of the promoter in plant growth regulation. This study had laid a good foundation for *GmGAMYB1* characteristics temporal and spatial expression.

Key words: *GmGAMYB1* promoter; *GUS* gene; Histochemical staining

赤霉素 (gibberellin, GA) 作为一种重要的植物激素,在促进植物营养生长向生殖生长转变过程中发挥重要作用^[1-3]。迄今,在高等植物中鉴定和筛选 GA 开花信号转导途径组分方面已经取得了一定进展,但对于大豆相关研究较少。*GAMYB* 基因是赤霉素信号转导途径中一个重要的促进因子,在拟南芥中,鉴定出 3 个 *GAMYB* 类基因 (*MYB33*, *MYB65*, *MYB101*),其中 *MYB33* 对花的形成起重要作用^[4]。研究表明,GA 促进其下游信号分子 *GAMYB* 的表达,*MYB33* 能结合到花分生组织特异基因 *LFY* 的启动子上,启动 *LFY* 基因的表达,从而促进开花^[5]。Kaneko 等^[6]发现水稻 *OsGAMYB* 基因与燕麦 *LtGAMYB* 基因在花形成中的功能一致,只在花分生组织中起作用,而对营养生长向生殖生长过渡本身没有

作用,所以对开花时间的调控没有影响。

拟南芥的 R2R3-MYB 家族中大部分基因启动子中都含有 MYB 结合元件 (核心序列为 TA-ACTG),在逆境胁迫下,MYB 转录因子与该元件的结合能够激活胁迫应答基因的表达。植物 R2R3-MYB 基因受各种环境因子所诱导,如信号分子 (ABA)、干旱、高盐胁迫等^[7]。MYB 转录因子对 ABA 的调控可以分为 3 种类型:第一种为诱导型,第二种为介导型,第三种为依赖型。拟南芥 *GAMYB* 类家族中的 *AtMYB33* 和 *AtMYB101* 属于介导型,通过调控 ABA 介导气孔的大小以应对外界干旱胁迫^[8-9];而 *GmGAMYB1* 基因有 R2R3 保守的结合区域,且与 *AtMYB33* 同源率较高,该基因是否也受激素和环境压力的诱导参与胁迫应答仍不清楚。

收稿日期:2012-12-12

基金项目:国家自然科学基金(31101169, 30671318, 31271748);黑龙江省教育厅大豆分子设计团队项目;黑龙江省教育厅省高校青年学术骨干项目;东北农业大学博士基金。

第一作者简介:谷月娇(1987-),女,在读硕士,主要从事大豆生物技术研究。E-mail: guyuejiao2010@qq.com。

通讯作者:李文滨(1958-),男,教授,博士生导师,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail: wenbinli@yahoo.com。

本研究通过克隆 *GmGAMYB1* 基因的启动子,将启动子::GUS 融合表达载体转化烟草叶盘,通过组织化学显色,揭示启动子参与生物和非生物压力反应的功能和启动表达规律,为进一步阐明该基因的功能奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆品种东农 42、大肠杆菌 DH5 α 、根瘤农杆菌 LBA4404 和 pBI121 为本实验室保存;限制性内切酶 *Hind* III 和 *Bam*H I、pMD18-T 克隆载体、LA Taq、T4 连接酶均购自 TaKaRa 公司;PCR 引物和 DNA 序列由北京华大基因公司合成和测序;其他试剂均为进口或国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 大豆总基因组 DNA 提取 参照张伟等^[10]的方法进行。

1.2.2 *GmGAMYB1* 基因启动子序列的克隆 根据 Phytozome 报道的序列,应用 Primer Premier 5.0 设计引物,根据载体构建的需要,在启动子序列 5' 和 3' 端分别引入 *Hind* III 和 *Bam*H I 酶切位点设计引物:Promoter 正义引物 5' GCAAGCTTTCTGTCATTC-CTTGCGTTCCTCG 3', Promoter 反义引物 5' GCG-GATCCTCTTCTTCATTTCTCCTCATCCTAG 3'。反应体系:DNA 1 μ L、10 \times PCR Buffer 2.5 μ L、dNTP Mix (10 mmol \cdot L⁻¹) 0.5 μ L、正义引物 0.5 μ L、反义引物 0.5 μ L、Taq 酶 0.5 μ L、ddH₂O 19.5 μ L,总体积 25 μ L。PCR 程序:94 $^{\circ}$ C 5 min;94 $^{\circ}$ C 30 s,56 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 2 min,38 个循环;72 $^{\circ}$ C 15 min。取 8 μ L 进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分析结果。将 PCR 产物纯化后连接到 pMD18-T 克隆载体上,转化获得重组质粒 pMD18T-pGmGAMYB1 进行筛选并测序。

1.2.3 pGmGAMYB1::GUS 融合表达载体构建 用 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切质粒 pMD18T-pGmGAMYB1 和 pBI121,将胶回收的启动子片段和 pBI121 载体大片段用 T4 连接酶进行连接,转化大肠杆菌,检测正确后,用冻融法直接将质粒导入根瘤农杆菌 LBA4404 细胞中。

1.2.4 启动子表达载体转化烟草叶盘 用含表达载体的农杆菌对预先共培养的烟草叶盘用 Jefferson 等的方法^[11]进行侵染,暗培养 3 d 后,分别用水、2 mmol \cdot L⁻¹GA₃、150 mmol \cdot L⁻¹NaCl、8% PEG 和

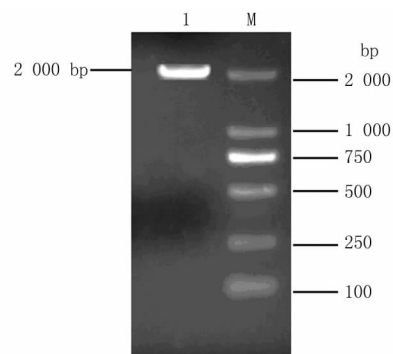
100 mmol \cdot L⁻¹ABA 处理 4 h,再用含有 X-Gluc 的 GUS 染色液进行染色。37 $^{\circ}$ C 温育过夜,酒精脱色后,观察染色情况。

1.2.5 *GmGAMYB1* 基因启动子全长序列分析 采用 BLAST 网上比对软件进行序列同源性分析,*GmGAMYB1* 启动子 GenBank 登录号:KC525898。利用 PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>) 和 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 分析克隆获得的 pGmGAMYB1 序列内部顺式调控元件^[12-13]。

2 结果与分析

2.1 *GmGAMYB1* 基因启动子片段的克隆

用 Promoter 正义引物和反义引物进行 PCR,得到大小约为 2 000 bp 的片段(图 1),然后将其与 pMD18T 载体相连接,获得克隆片段并进行测序,测序结果用来进行顺式元件分析。



M: DL2000 分子量标准;1:PCR 产物

M: DL2000 Maker;1:PCR product

图 1 *GmGAMYB1* 基因启动子的克隆

Fig.1 Cloning of the *GmGAMYB* promoter

2.2 *GmGAMYB1* 基因启动子表达载体的构建

载体构建流程如图 2 所示,将扩增的启动子片段经胶回收,再用 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切,与用 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切的载体 pBI121 大片段连接,定向替换 pBI121 表达载体中 CAMV35S 组成型启动子,驱动 *GUS* 报告基因表达。如图 3 所示,将质粒 1 用双酶切,切成目的条带 2 000 bp 和 pBI121 的大片段,将鉴定后得到的重组质粒命名为 pBI121-pGmGAMYB1。

2.3 启动子表达载体转化烟草叶盘

经过重复试验,每种处理染色 15 片叶盘,得到的结果基本一致。图 4 是 2 个平行试验结果,染色结果基本一致。pGAMYB1-GUS 启动子表达载体只

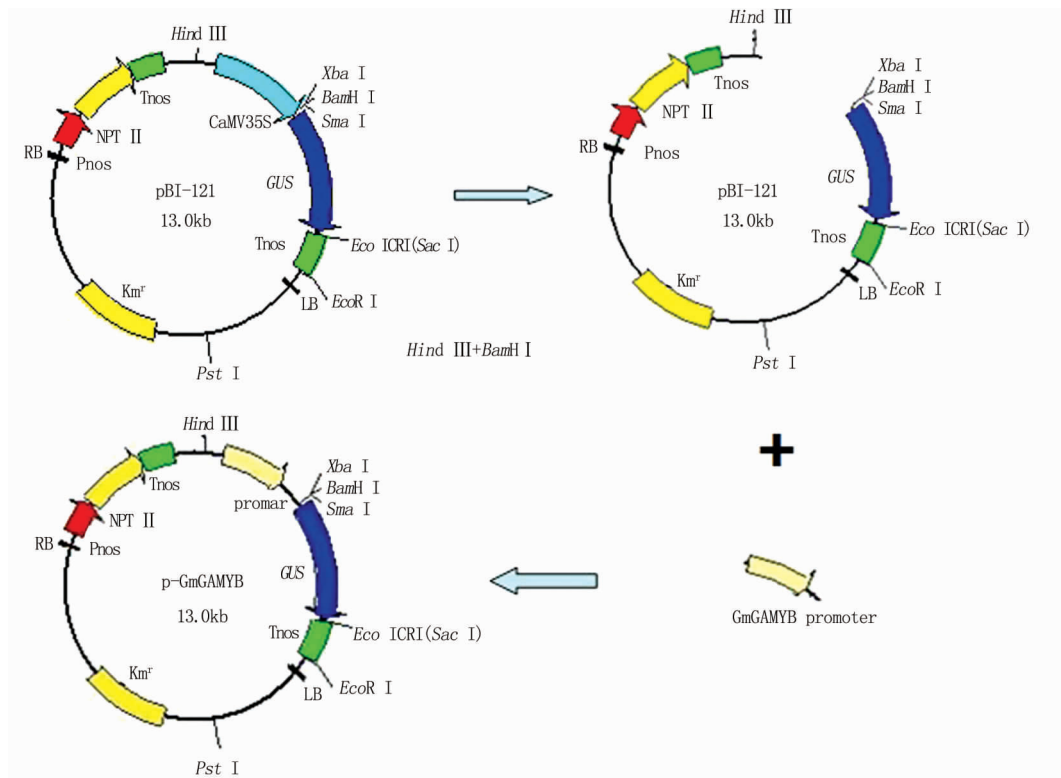
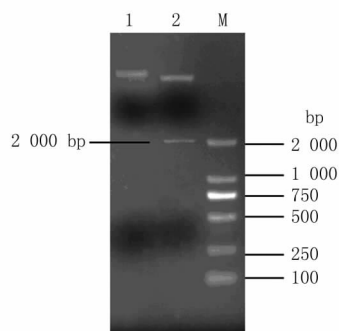


图2 *GmGAMYB1* 基因启动子序列和 pBI121 质粒载体构建示意图

Fig. 2 The constructs of *GmGAMYB1* promoter and pBI121 recombinant plasmid



M: DL2000 分子量标准; 1: 重组质粒; 2: *Bam*H I 和 *Hind* III 双酶切鉴定

M: DL2000 Maker; 1: Recombinant plasmid; 2: Double digestion of *Bam*H I and *Hind* III enzymes

图3 *GmGAMYB1* 启动子表达载体构建

Fig. 3 The construction of promoter expression vector

在边缘叶脉处有一点有蓝色。用 PEG 和 ABA 处理的烟草叶盘染色程度较深, GA 与之相比颜色稍浅, NaCl 处理比无激素处理的 CK 染色明显, 这说明预测的基因启动子有启动功能。

2.4 *GmGAMYB1* 基因启动子顺式作用元件分析

应用 PLACE 和 PlantCARE 软件分析, 发现 *pG-mGAMYB1* 除了含有必需的起始转录位点、TATA-BOX^[14]、CAAT 增强子外, 还包含多个调控元件: 如光应答元件 3-AF1 binding site、BOX-4、T-Box^[15]、TCT-motif; 赤霉素应答元件 GARE; 脱落酸应答元件 ABRE^[16]; 热激元件 CCAATBox^[17]; 节律钟 Circadian; 此外还有响应干旱和寒冷胁迫的 MYB 和 MYC 蛋白因子识别的保守序列(表 1)。根据各顺式元件的位置, 画出融合示意图(图 5)。

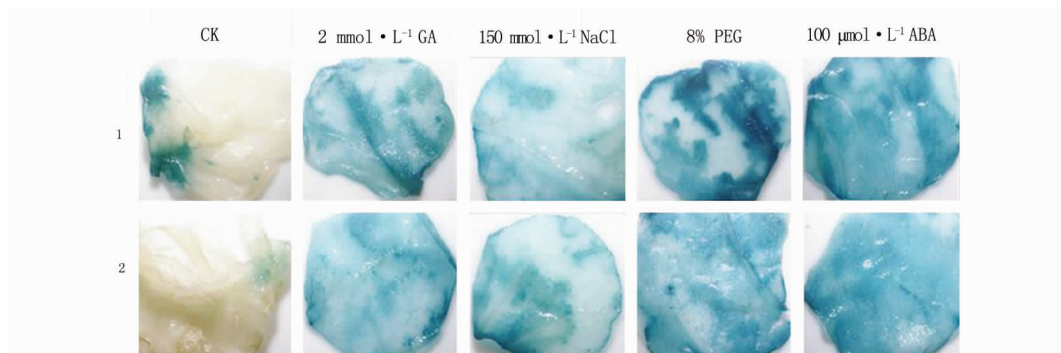


图4 *pGmGAMYB1* 转基因烟草不同处理 GUS 植株组织化学检测

Fig. 4 GUS gene expression of *GmGAMYB1* transgenic tobacco under different treatments

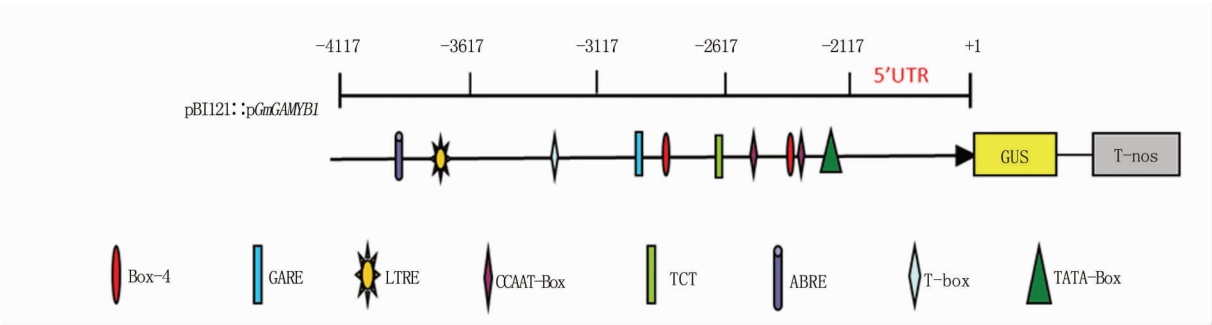


图5 *GmGAMYB1* 基因启动子片段与 GUS 基因融合示意图
Fig.5 Schematic diagrams of *GmGAMYB1* promoter sections and GUS fusions

表1 *GmGAMYB1* 基因启动子顺式调控元件的位置与推测功能
Table 1 Location and putative function of cis-elements in *GmGAMYB1* promoter

基序 Motif	正(+)反(-)链 Sense(+) antisense(-) strand	位置 Location	序列 Sequence	预测功能 Putative function
3-AF1binding site	+	-1247 bp	TAAGAGAGGAA	光应答元件
Box-4	++	-2239 bp, -2932 bp	ATTAAT	光应答元件
T-Box	+	-3282bp	CACGTGG	光应答元件
TCT-motif	+ -	-2365 bp, -2775 bp	TCTTAC	光应答元件
CCAATBOX	++	-2178 bp, -2335 bp	CCAT	热激应答元件
circadian	+	-2368 bp	CAANNATC	节律钟相关元件
GARE	+	-2988 bp	TATCCCA	赤霉素顺式应答元件
ABRE	+	-3842 bp	CACGTG	脱落酸顺式应答元件
LTRE	+	-3714 bp	CCGAC	低温和干旱应答元件
WUN-motif	+	-2685 bp	TCATTACGAA	创伤应答元件
GARE	+	-1131 bp	TAACAAR	赤霉素应答元件
ARFAT	+	-3655 bp	TGTCTC	IAA 和 BL 调节元件

3 讨 论

目前植物基因工程中广泛应用的是组成型启动子,如 CAMV35S,驱动目的基因在植物生长发育中的各个组织均有表达,造成物质和能量的浪费,增加植物代谢负担,一定程度上影响植物的发育,甚至引起植物形态的改变^[18-19]。因此在转基因育种工作中,人们试图在发掘一种组织特异型或诱导型启动子,前者可以实现对基因表达的预想调控,后者有利于改良转基因作物有关农艺性状。因此,启动子功能分析一直是功能基因组研究的重要内容^[20]。

GmGAMYB1 基因的 5'UTR 全长序列中含有多个内含子,所以在设计引物时,不能像其他基因一样,将起始密码子前 2 000 bp 作为启动子进行克隆和分析。通过 www. phytozome. com 生物网站上比对,在 5'UTR 前 2 000 bp 预测了 *GmGAMYB1* 的启动子。正如序列分析所见,*GmGAMYB1* 启动子上有非常多且具有重要意义的顺式调控元件,除 TATA-BOX^[14]、CAAT 增强子外,还包含多个调控元件:如

光应答元件 3-AF1 binding site、BOX-4、T-Box^[15]、TCT-motif;赤霉素应答元件 GARE;脱落酸应答元件 ABRE^[16];热激元件 CCAATBox^[17];节律钟 Ciradian。本研究构建了的 *GmGAMYB1* 基因的启动子表达载体 *pGmGAMYB1::GUS*,采用农杆菌侵染烟草叶盘的方法,验证了该启动子具有启动功能,说明该启动子虽然没有直接与 *GmGAMYB1* 基因相连,但仍然具有启动功能,而且 *GmGAMYB1* 基因启动子被干旱、高盐、GA 和 ABA 诱导表达,进一步推测该基因可能参与植物激素调节植物的生长发育,以及脱落酸 (ABA) 介导植物对环境胁迫的反应,但具体机制有待进一步研究。

参考文献

[1] O' Neill D P, Ross J J. Auxin regulation of the gibberellin pathway in pea[J]. Plant Physiology, 2002, 130: 1974-1982.
[2] Hedden P, Phillips A L. Gibberellin metabolism: new insights revealed by the genes [J]. Trends in Plant Science, 2000, 5: 523-530.
[3] Hardtke C S. Gibberellin signaling: GRASs growing dispatch roots [J]. Current Biology, 2003, 13: 366-367.

- [4] Gocal G F W, Sheldon C C, Gubler F, et al. GAMYB-like genes, flowering, and gibberellin signaling in arabidopsis[J]. Plant Physiology, 2001, 127: 1682-1693.
- [5] Gubler F, Kalla R, Roberts J K, et al. Gibberellin-regulated expression of a MYB gene in barley aleurone cells; evidence for MYB transactivation of a high-pI α -amylase gene promoter[J]. The Plant Cell, 1995, 7: 1879-1891.
- [6] Kaneko M, Inukai Y, Ueguchi-Tanaka M, et al. Loss-of-function mutations of the rice *GAMYB* gene impair α -amylase expression in aleurone and flower development[J]. The Plant Cell, 2004, 16: 33-44.
- [7] Abe H, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao T, et al. Role of arabidopsis MYC and MYB homologs in drought and abscisic acid-regulated gene expression[J]. Plant Cell, 1997, 9: 1859-1868.
- [8] Cominelli E, Galbiati M, Vavasseur A, et al. A guard-cell-specific MYB transcription factor regulates stomatal movements and plant drought tolerance[J]. Current Biology, 2005, 15: 1196 ~ 200.
- [9] Jung C, Seo J S, Han S W, et al. Overexpression of AtMYB44 enhances stomatal closure to confer abiotic stress tolerance in transgenic arabidopsis[J]. Plant Physiology, 2008, 146: 623-635.
- [10] 张伟, 谢甫锦, 曹萍, 等. 大豆叶片 DNA 提取方法的比较[J]. 大豆科学, 2007, 26(1): 60-65. (Zhang W, Xie F T, Cao P, et al. Comparative studies on extraction of genome DNA from soybean leaf[J]. Soybean Science, 2007, 26(1): 60-65.)
- [11] Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants[J]. EMBO Journal, 1987, 6: 3901-3907.
- [12] Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, et al. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database[J]. Nucleic Acids Research, 1999, 27(1): 297-300.
- [13] Prestridge D S. SIGNAL SCAN: A computer program that scans DNA sequences for eukaryotic transcriptional elements[J]. Computer Applications in the Biosciences, 1997, 7: 203-206.
- [14] Copik A J, Webb M S, Miller A L, et al. Activation function 1 of glucocorticoid receptor binds TATA-binding protein in vitro and in vivo[J]. Molecular Endocrinology, 2006, 20: 1218-1230.
- [15] van den Boogaard M, Wong L Y E, Tessadori F, et al. Genetic variation in T-box binding element functionally affects SCN5A/SCN10A enhancer[J]. American Society for Clinical Investigation, 2012, 122: 2519 - 2530.
- [16] Stålberg K, Ellerström M, Ezcurra I, et al. Disruption of an overlapping E-box/ABRE motif abolished high transcription of the *napA* storage-protein promoter in transgenic *Brassica napus* seeds[J]. Planta, 1996, 4: 515-519.
- [17] Owen T A, Bortell R, Yocum S A, et al. Coordinate occupancy of AP-1 sites in the vitamin D-responsive and CCAAT box elements by Fos-Jun in the osteocalcin gene: model for phenotype suppression of transcription[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 1990, 87: 9990-9994.
- [18] 李杰, 张福城, 王文泉, 等. 高等植物启动子的研究进展[J]. 生物技术通讯, 2006, 17(4): 658-661. (Li J, Zhang F C, Wang W Q, et al. Advance in the study of higher plant promoter[J]. Letters in Biotechnology, 2006, 17(4): 658-661.)
- [19] 李新锋, 赵淑清. 转基因植物中报道基因 GUS 的活性检测及其应用[J]. 生命的化学, 2004, 24(1): 71-73. (Li X F, Zhao S Q. Reporter gene GUS activity detection and its application in transgenic plant[J]. Chemistry of Life, 2004, 24(1): 71-73.)
- [20] Pattanaik S, Dey N, Bhattacharyya S, et al. Isolation of full-length transcript promoter from the strawberry vein banding virus (SVBV) and expression analysis by protoplasts transient assays and in transgenic plants[J]. Plant Science, 2004, 167: 427-438.

科学出版社生物分社新书推介

《新生物学丛书:新生物学年鉴 2012》

编著者:王利兵

初版时间:2013 年 2 月

书号:9787030364036

定价:98.00 元

蒲慕明主编的《新生物学年鉴(2012)》为一部反映生命科学最前沿领域的综述性文集,内容涉及细胞生物学、免疫学、药物化学、蛋白质组学,以及现代生物学的新技术与新方法等,共 12 篇章。这些文章由《新生物学丛书》7 位编委组稿并遴选,各地大学及研究所相关领域的领军科学家撰写,因此体现了这些领域的最新研究成果,以及前沿生命科学的发展现状。《新生物学年鉴》每年出版一本,记录生命科学的发展与进步。

《新生物学年鉴(2012)》适合各相关领域的高年级本科生、研究生、专业研究人员学习参考。对于希望了解生物学发展现状的科研爱好者,本书也可作为很好的阅读材料。

购书指南

网上购书:淘宝商城科学出版社旗舰店 <http://kxcbs.tmall.com/>

电话购书:联系人:贾海涛;电话:010-64017321

