

## 大豆根部特异性启动子的克隆及功能分析

王 丹,王丕武,付永平,厉 志

(吉林农业大学农学院,吉林 长春 130118)

**摘 要:**利用 PCR 技术从大豆品种吉农 17 基因组 DNA 中分离得到大豆根部特异性启动子片段 RSP,长度约为 2.5 kb。序列分析表明 RSP 与报道序列同源性达 97% 以上。将其与 GUS 基因融合,构建植物表达载体 pRSP-GUS 后,转化到 EHA105 根癌农杆菌中,通过根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导法转化烟草(*Nicotiana tabacum*) NC89。转基因植株的 GUS 活性检测表明,仅能在根中检测到 GUS 活性,而在茎、叶和种子等其它组织中均未检测到 GUS 活性,证实 RSP 片段具有根部特异性表达功能。

**关键词:**大豆;根部特异性启动子;功能分析;GUS 染色

**中图分类号:**S565.1

**文献标识码:**A

**文章编号:**1000-9841(2009)02-0195-05

## Cloning and Identification of the Root Specific Promoter from Soybean

WANG Dan, WANG Pi-wu, FU Yong-ping, LI Zhi

(College of Agriculture, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin, China)

**Abstract:** The promoter region of root-specific gene was isolated from the genomic DNA of soybean Jilin 17 by PCR method, and obtained the promoter fragment RSP, the length of the clone sequence is 2.5kb. The results of sequence analysis indicated that this fragment had 97% homology compared with the reported promoters. The cloned promoter was fused to the GUS reporter gene to construct plant expression vector pRSP-GUS, which was transferred into tobacco (*Nicotiana tabacum*) NC89 by *Agrobacterium tumefaciens*-mediated method and several transformed plants were obtained. GUS activity assays of different soybean organs indicated that expression of GUS was active only in roots, which suggests the RSP gene is root-specific promoter.

**Key words:** Soybean; Root specific promoter; Functional Identification; GUS staining

根部特异性启动子(root specific promoter, RSP)是具有根部特异性表达功能的一类特异启动子。在采用分子生物学手段对农作物进行遗传改良的过程中,常希望插入的外源基因能够限定在特定的组织中表达,从而使植物获得有益的性状而不影响其它特性,这就需要通过特异性启动子对靶基因的表达进行调控<sup>[1]</sup>。植物的生长发育受基因调控,启动子是调控基因表达的关键元件之一。启动子有组成型和组织特异型两类,前者在所有组织中都启动基因表达,后者仅在特定的组织中和一定的发育时期启动基因表达。目前,在植物组织表达载体中广泛应用的启动子是组成型启动子,在这些组成型启动子的控制下,外源基因在转基因植物的所有部位和所有的发育阶段都会表达。然而外源基因在植物内持续、高效的表达,必然大量消耗植株体内的基础物质,而基础物质的额外消耗又必然影响和抑制植物

体内的其它代谢活动,不但造成浪费,往往还会引起植物的形态发生改变,影响植物的生长发育。为了使外源基因在植物体内有效发挥作用,同时又可减少对植物的不利影响,目前人们对特异表达启动子的研究和应用越来越重视。已发现的特异性启动子主要是组织器官特异性启动子<sup>[2-6]</sup>。

利用 PCR 技术从大豆基因组 DNA 中分离到大豆根部伸展蛋白基因启动子,与含有 GUS 报告基因的表达载体进行重组后,经 GUS 表达特异性进行组织化学鉴定能表现出大豆根部启动子的根组织特异性,为进一步在大豆遗传转化中的应用奠定了基础。

### 1 材料和方法

#### 1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒 菌种为 *E. coli* DH5 $\alpha$ 、植物表

收稿日期:2008-10-21

基金项目:教育部博士点基金资助项目(20070193005)。

作者简介:王丹(1983-),女,硕士研究生,研究方向为生物技术在作物遗传育种中的应用。

通讯作者:王丕武,教授,博士生导师。E-mail:peiww@yaho.com.cn。

达载体 pCAMBIA 1301、AHLG、根癌农杆菌 EHA105,由本实验室提供。pMD18-T Vector 购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 植物材料 大豆品种吉农 17 由本实验室提供。

1.1.3 试剂与酶 PCR 扩增试剂盒、限制性内切酶(PstI、NcoI)、T<sub>4</sub> DNA 连接酶、DNA Marker DL-2000 分子量标准购自 TaKaRa 和 Promega 公司,其他试剂都是国产分析纯产品。

1.1.4 主要仪器设备 恒温振荡培养箱、低温离心机、移液枪、PCR 仪、电泳仪、凝胶成像仪、光照培养箱、超净工作台、超低温冰箱等。

## 1.2 方法

1.2.1 RSP 的克隆和序列分析 采用改良的 CTAB<sup>[7]</sup>法从大豆幼根中提取大豆基因组总 DNA。

参照已发表的序列(AF520576),人工设计扩增引物。(画线部分为加入的酶切位点)。

上游引物: 5' - TTTCTGCAGGACTTCCATGTGAAGTTG-3'

下游引物: 5' - TTTCCATGGGCTTGTGCTTAT-TATGCC-3'

PCR 扩增条件为:94℃ 预变性 8 min,94℃ 变性 55 s,63℃ 2 min,31 个循环,72℃ 后延伸 8 min。

扩增片段经琼脂糖凝胶电泳分离,V-gene 凝胶回收试剂盒纯化后连入 pMD18-T Vector,连接产物转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  菌株感受态细胞通过蓝白斑筛选、PCR 和酶切鉴定获得重组质粒,将 PCR 和酶切鉴定都正确的重组克隆载体分别命名为:pMD18-T-RSP。测序由大连 TaKaRa 公司完成,并通过 DNA-SIS 软件、DNAMAN 软件对其进行序列分析。

1.2.2 pRSP-GUS 表达载体构建 植物表达载体 pRSP-GUS 是在 pCAMBIA1301 基础上,用大豆根部特异性启动子将 CaMV35S 启动子置换并与 GUS 报告基因编码区连接构建而成,利用 Pst I、Nco I 分别酶切 pMD18-T-RSP 和 pCAMBIA1301,将 pMD18-T-RSP 小片段和 pCAMBIA1301 大片段用 T<sub>4</sub> DNA 连接酶连接,然后转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,构建得到植物表达载体 pRSP-GUS。经 PCR、酶切和测序鉴定后,获得植物表达载体 pRSP-GUS。

1.2.3 烟草的遗传转化 制备根癌农杆菌 EHA105 的感受态细胞,通过液氮冻融法<sup>[8]</sup>将根特异性表达载体 pRSP-GUS 转化到农杆菌 EHA105 中,采用农杆菌介导的烟草叶盘转化方法,对烟草品

种 NC89 进行遗传转化。转化烟草的筛选培养基为 MS 附加 2 mg·L<sup>-1</sup>6-BA、0.5 mg·L<sup>-1</sup> IAA、100 mg·L<sup>-1</sup>的氨苄青霉素、100 mg·L<sup>-1</sup>的羧苄青霉素和 15 mg·L<sup>-1</sup>的潮霉素。诱导生根培养基为 1/2MS 附加 80 mg·L<sup>-1</sup>的氨苄青霉素、80 mg·L<sup>-1</sup>的羧苄青霉素和 15 mg·L<sup>-1</sup>的潮霉素。

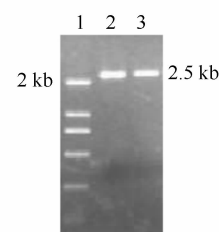
1.2.4 转基因植株的 PCR 检测 使用 CTAB 法,从烟草叶片中提取总 DNA。后将其作为模板,以 RSP 的特异性引物进行 PCR 扩增,扩增条件为 94℃ 预变性 8 min,94℃ 变性 55 s,63℃ 2 min,31 个循环,72℃ 后延伸 8 min。预期扩增片段大小为 2.5 kb。

1.2.5 GUS 活性的组织染色 选取转基因植株的各个部位进行 GUS 组织化学分析,GUS 染色方法按照 Jefferson 等<sup>[9]</sup>的方法进行,将待测材料的根、茎、叶、种子及对照分别放入 1.5 mL 的 Eppendorf 中,加入 GUS 染色液,37℃ 保温过夜,根可直接观察,茎段、叶片用 75% 乙醇脱色至阳性对照为白色,种子要放在 10 倍显微镜下观察染色,照相记录结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 大豆根部特异性启动子片段的克隆和序列测定

通过多次改变 PCR 反应条件用以提高产物的特异性<sup>[10]</sup>,最终得出最佳反应条件。经 PCR 扩增后,取 5  $\mu$ L PCR 产物与标准分子量 DNA 一起在 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳,得到约 2.5 kb 大小,特异性强,单一的扩增带。(图 1)结果与预期大小相符,将该片段连入测序载体 pMD18-T Vector,获得 pMD18-T-RSP。pMD18-T-RSP 的 PCR、PstI、NcoI 双酶切结果(图 2)表明,扩增片段已成功连入 pMD18-T Vector 中。



1:DNA 分子量标准 2-3:PCR 产物

1:DNA Marker 2-3:PCR product

图 1 PCR 产物的电泳分析

Fig. 1 Electrophoresis of PCR product

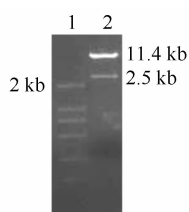
### 2.2 根部特异性启动子片段的序列分析

经过 DNA 全自动测序仪,测定得到的序列为



### 2.3 RSP-GUS 表达载体的构建

利用 Pst I、Nco I 分别酶切 pMD18-T-RSP 和 pCAMBIA1301, 将 pMD18-T-RSP 小片段和 pCAMBIA1301 大片段用 T<sub>4</sub> DNA 连接酶连接, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 构建得到植物表达载体 RSP-GUS。将重组表达载体 RSP-GUS 通过限制性内切酶 PstI、NcoI 双酶切鉴定表明(图 4), 获得预期大小 2.5kb 的目的片段, 该根部特异性启动子替换了 pCAMBIA1301 中的 CaMV35s 组成型启动子, 证明该植物表达载体构建正确。



1: PstI/NcoI 双酶切 2: DNA 分子量标准

1: RSP-GUS digested by PstI and NcoI 2: DNA Marker

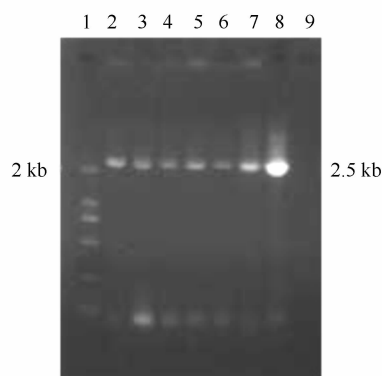
图 4 根部特异性表达载体 RSP-gus 的酶切鉴定

Fig. 4 Identification of root-specific expression vector RSP-GUS

### 2.4 转基因植株的 PCR 检测

将 pRSP-GUS 通过液氮冻融法转化到根癌农杆菌 EHA105, 转化烟草, 获批量具潮霉素抗性的转化植株。从转化烟草基因组 DNA 中经 PCR 扩增得到

约 2.5 kb 左右扩增带(图 5)。



1: DNA 分子量标准 2-7: 转基因植株

8: pRSP-GUS 质粒阳性对照 9: 未转基因植株阴性对照

1: DNA Marker 2-3: Putative transgenic plants

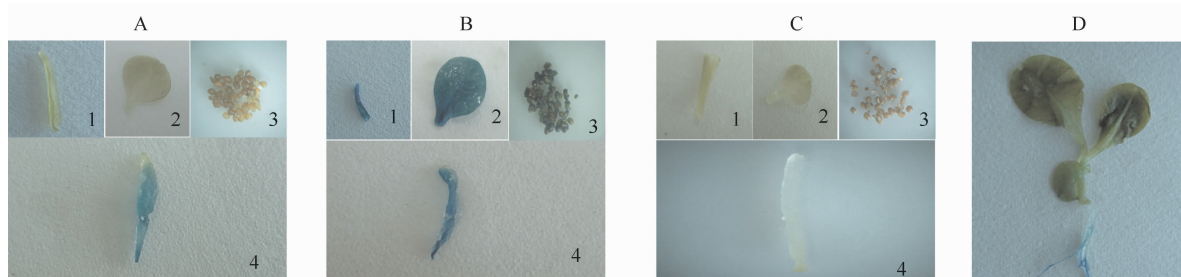
8: Positive control of plasmid pRSP-GUS 9: Negative control of non-transformed plant

图 5 转基因烟草的 PCR 和分析

Fig. 5 PCR analysis of transgenic tobaccos

### 2.5 转基因烟草的 GUS 活性检测

对 PCR 检测呈阳性的转基因烟草植株进行了 GUS 活性检测, X-Gluc 显色结果表明, 转基因烟草根具有很强的 GUS 活性, 其它部位未检测到 GUS 活性。非转基因烟草根未能染色, 并没有 GUS 活性(图 6)。以上结果表明, 转基因烟草的 GUS 基因是在根特异性启动子的调控下在根部特异性表达。



A 为转 pRSP-GUS 融合质粒烟草不同组织的 GUS 化学染色结果; B 为转 pBI121 质粒烟草不同组织的 GUS 化学染色结果; C 为未转化烟草不同组织的 GUS 化学染色结果; D 为根特异性表达的转基因植株 GUS 化学染色结果。

1: 茎部的 GUS 活性检测; 2: 叶片的 GUS 活性检测; 3: 种子的 GUS 活性检测; 4: 根部的 GUS 活性检测。

(A) Histochemical staining of GUS activity in different organs of transgenic tobacco plants carrying the pRSP-GUS construct.

(B) Histochemical staining of GUS activity in different organs of transgenic tobacco plants carrying the pBI121 construct.

(C) Histochemical staining of GUS activity in different organs of non-transformed tobacco plant as negative control.

(D) Histochemical staining of GUS activity in Root-specific expression of transgenic plants

1: X-Gluc staining of GUS activity in stem segment; 2: X-Gluc staining of GUS activity in leaf;

3: X-Gluc staining of GUS activity in seeds; 4: X-Gluc staining of GUS activity in root.

图 6 转基因烟草的 GUS 组织化学染色结果

Fig. 6 Results of histochemical location of GUS activity in transgenic tobaccos

### 3 讨论

从大豆基因组 DNA 中分离得到了大豆根部启动子 RSP, 该启动子片段长为 2.5 kb。将 RSP 与 GUS 报告基因相连, 通过启动 GUS 基因在烟草中表达证明该启动子具有根部特异性。以 GUS 为外源基因检测启动子功能具优越性。GUS 不仅为常用报告基因且操作便捷、产物稳定, 更重要的是在烟草种子中几乎检测不到内源 GUS 活性, 这对鉴定该启动子功能尤为重要。

序列分析表明其与报道序列同源性为 97%。转录起始位点的基本特征是嘧啶碱基包围的腺呤, TATA 盒与转录起始位点之间的间隔为  $(32 \pm 7)$  bp<sup>[11]</sup>。由此推测 RSP 启动子可能的转录起始位点在图 3 序列中标出, 2258 bp ~ 2286 bp 区域内有 TA-TA-box、CAAT-box 以及根部特异表达所必须的调控元件, 例如 7 个 ACGT 核心序列, 9 个 CANNTG-motifs, 11 个 GATA-motifs 等顺式作用元件是决定组织器官特异表达的转录因子结合位点<sup>[12]</sup>, 以及 6 个诱导物(elicitor)应答元件 W-box((T)TGAC(C)), 8 个 AACA(AAACAA) 和 1 个 GCAAAA(GCN4)。Yoshihara 等<sup>[13]</sup>研究发现水稻谷蛋白启动子上游 -104 ~ -60 bp 之间有两个顺式作用元件 AACA 和 GCN4, GCN4 能增强启动子的活性, 而启动子的组织特异性则须两者协同作用。克隆的 RSP 中富含 A/T 序列。Stalberg<sup>[14]</sup>等认为, 富含 AT 的区段大多是转录因子的结合部位, 可调控下游基因的高效表达。

虽然对 RSP 基因的结构初做分析, 可以看出 RSP 启动子中存在负责根特异性表达的功能区域, 具顺式作用元件, 同时 RSP 启动子能在根中特异性或优先地激活从而启动 GUS 基因的表达, 但是对基因的调控未作深入分析; 要证明其是否达到目的基因表达的需要量仍需进一步的研究。

### 参考文献

- [1] 李桂兰, 王文颇, 臧少先, 等. 拟南芥黑芥子酶基因根特异性表达启动子的克隆[J]. 河北农业大学学报, 2005, 28(1): 52-55. (Li G L, Wang W P, Zang S X, et al. Cloning of root specific expression promoter of myrosinase (pyk10) gene from Arabidopsis

- thaliana[J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2005, 28(1): 52-55.)
- [2] 张春晓, 王文棋, 蒋湘宁, 等. 植物基因启动子研究进展[J]. 遗传学报, 2004, 12: 130-139. (Zhang C X, Wang W Q, Jiang X N, et al. Review on plant gene promoters[J]. Acta Genetica Sinica, 2004, 12: 130-139.)
- [3] 侯丙凯, 夏光敏, 陈正华. 植物基因工程表达载体的改进和优化策略[J]. 遗传, 2001, 23(5): 492-495. (Hou B K, Xia G M, Chen Z H. Strategies for optimizing expression vectors used in plant genetic engineering [J]. Hereditas (Beijing), 2001, 23(5): 492-497.)
- [4] Shirsat A, Wilford N, Croy R, et al. Sequences responsible for the tissue specific promoter activity of a pea legumin gene in tobacco [J]. Molecular and General Genetics, 1989, 215: 326-331.
- [5] Colleen G S, Gaul L S, Timothy W C. Developmental and transgenic analysis of two tomato fruit enhanced genes[J]. Plant Molecular Biology, 1997, 33: 405-416.
- [6] Yamamoto Y T, Taylor C G, Acedo G N, et al. Characterization of cis-acting sequences regulating root-specific gene expression in tobacco[J]. Plant Cell, 1991, 3: 371-382.
- [7] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 744. (Wang G L, Fang H J, Plant genetic engineering[M]. Beijing: Science Press, 2002: 744.)
- [8] Hofen R, Willmitzer L. Storage of competent cells for Agrobacterium transformation[J]. Nucleic Acids Research, 1988, 16: 9877.
- [9] Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1987, 5(4): 387-405.
- [10] 迪芬巴赫 CW, 德维克斯勒 GS. PCR 技术实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 23-41. (Dieffenbach C W, Dweikesile G S. PCR experimental technology guide [M]. Beijing: Science Press, 1999: 23-41.)
- [11] Foster R, Izawa T, Chua N H. Plant bZIP proteins gather at ACGT elements[J]. FASEB, 1994, 8: 192-200.
- [12] 路静, 赵华燕, 何奕昆, 等. 高等植物启动子及其应用研究进展[J]. 自然科学进展. 2004, 14(8): 856-862. (Lu J, Zhao H Y, He Y K, et al. Advances and progresses of high promoter research and its application[J]. Natural Science Progresses, 2004, 14(8): 856-862.)
- [13] Yoshihara T, Washida H, Takaiwa F, et al. A 45-bp proximal region containing AACA and GCN4 motif is sufficient to confer endosperm-specific expression of the rice storage protein glutelin gene, GluA-3[J]. FEBS Letters, 1996, 383(3): 213-218.
- [14] Stalberg K, Ellerstrom 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, 199: 515-519.