

大豆 *GmPLP1* 启动子的克隆及功能分析

李永光,张宇航,罗秋兰,谷翰卿,李文滨

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

摘要:本研究利用染色体步移法从大豆栽培品种东农 L13 基因组中分离得到了 *GmPLP1* 基因 1.5 kb 的启动子片段,利用 PLACE 和 PlantCARE 在线启动子预测工具发现了 107 个调控元件。将该片段定向替换载体 pBI121 的 CaMV35S 组成型启动子,构建表达载体 pBI121-p*GmPLP1*,驱动下游报告基因 GUS 基因表达,并通过组织化学染色和 GUS 定量分析对预测结果进行验证,结果显示 *GmPLP1* 受黑暗、蓝光、低温、GA₃ 和 ABA 诱导表达。

关键词: *GmPLP1* 启动子;GUS 基因;组织化学染色;顺式调控元件

中图分类号: S565.1 **文献标识码:** A **DOI:** 10.11861/j.issn.1000-9841.2014.03.0311

Cloning and Functional Analysis of a Promoter of *GmPLP1* Gene in Soybean

LI Yong-guang, ZHANG Yu-hang, LUO Qiu-lan, GU Han-qing, LI Wen-bin

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

Abstract: To reveal the molecular mechanism underlying the expression of soybean PLP1 (*GmPLP1*) gene that contains PAS/LOV domain, its 5' regulatory region was analyzed. The 1.5 kb fragment upstream of the *GmPLP1* gene was isolated from soybean cultivar 'Dongnong L13' by genome walking. There were 107 cis-acting elements in the promoter predicted by online software Plant CARE and PLACE. The promoter fragment deletions were inserted into the 5' region of the gus. A reporter gene in vector pBI121 (replacing the 35S promoter). In order to determine the promoter characteristic of *GmPLP1*. The constructs were transferred into *Nicotiana tabacum* and *Glycine max*. The GUS activity was up-regulated under dark, blue light, gibberellin A₃ and abscisic acid driven by *GmPLP1* promoter.

Key words: *GmPLP1* promoter; GUS gene; Histochemical staining; Cis-regulatory elements

光是影响植物生长发育最重要的环境因子。植物接受和传导光信号主要依赖于各种光受体蛋白,以适应光环境的改变。迄今为止,在植物中已经发现了红光/远红光受体-光敏色素 (phytochrome, PHY)、蓝光/紫外光-A 受体包括隐花色素 (cryptochrome, CRY) 和向光色素 (phototropin, PHOT)、紫外光-A 和紫外光-B 受体 (UV-B photoreceptors, ULI) 以及 Zeirlupes (ZTLs) 等光受体^[1]。各种光受体能够调节植物种子萌发、幼苗伸长、向光性生长、开花等生理活动^[2]。除了上述几种光受体外,植物中其他未知的光受体也陆续被发现,PLP 是一种新的蓝光受体候选基因。在拟南芥中存在 4 种编码 PLP 蛋白的基因,分别为 PLPA、PLPB、PLPC 和 PLPD, PLPA 和 PLPB 均含有一个 N 末端 PAS 结构域和 1 个 C-末端 LOV 结构域,但是在 PLPC 中却不具有 LOV 结构域^[3]。2008 年 Ogura 等对 PLP 蛋白家族和其他的光受体进行了系统进化树分析,推测它们可能是一种新的蓝光受体蛋白。光化学分析重组蛋白显示这可能与 PLPA 和 PLPB 与核黄素结合作用有关。

这些结果也都表明 PLPs 很可能是一类新的蓝光受体蛋白^[4-5]。但是对于由于 PLP 的突变体没有任何表型和生理活动变化,导致人们对 PLP 蛋白具体的生理功能,生物化学活性以及与他们互作的具体蛋白都一无所知。

本研究利用染色体步移法克隆了大豆 *GmPLP1* 基因的启动子,通过启动子元件分析和转基因烟草 GUS 染色,初步明确了该基因启动子的启动表达特点,为进一步解析大豆 *GmPLP1* 基因的功能提供了理论基础。

1 材料与amp;方法

1.1 材料

大豆品种为东农 L13,烟草品种为 Havana 425,植物表达载体 pBI121 和根癌农杆菌 LBA4404 为本实验室保存;染色体步移试剂盒购自 Clontech 公司;限制性内切酶、荧光定量试剂盒等购自 TaKaRa 公司;引物合成和产物测序由北京华大基因公司完成;其他试剂均为国产分析纯。

收稿日期:2013-09-13

基金项目:抗逆转基因大豆新品种培育(2014ZX08004-002);国家自然科学基金(31201228)。

第一作者简介:李永光(1984-),男,博士,助理研究员,主要从事大豆生物技术研究。E-mail:yongguangli@neau.edu.cn。

通讯作者:李文滨(1958-),男,博士,教授,主要从事大豆遗传育种研究。E-mail:wenbinli@neau.edu.cn。

1.2 方法

1.2.1 *GmPLP1* 基因启动子序列的克隆及序列分析 采用改良的 CTAB 法提取基因组 DNA^[6], 根据 *GmPLP1* 基因序列设计染色体步移引物, 根据 Clontech 公司的 Genome Walker™ Universal Kit 进行克隆。采用衔接头 PCR 方法, 将基因组 DNA 经 4 种限制性内切酶: *Stu* I、*Eco*R V、*Pvu* II 和 *Dra* I 消化完全后, 在 T4 连接酶作用下与接头连接。将连接产物作为模板, 采用接头引物 (AP1, AP2) 与基因特异引物 (pGSP1: GTCGAAGGAACGCTGGATTGTTG; pNGSP1: ATCGGCATCGGCGTTGTTGGTG) 组合进行 PCR 扩增。

利用在线工具 PLACE 和 PlantCARE 进行启动子元件分析 (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE>, <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)^[7-8]。

1.2.2 *GmPLP1* 基因启动子表达载体的构建 在 *GmPLP1* 启动子片段两端分别引入 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点, 连接到 pBI121 载体中 (替换 pBI121 中的 CaMV35S 启动子), 双酶切鉴定连接产物, 将鉴定后得到的重组质粒命名为 pBI121-p*GmPLP1*。

1.2.3 转基因烟草的获得及鉴定 烟草种子采用氯气消毒 2 h, 播种于 MS 培养基上, 25℃ 培养 4 周后, 取叶片进行烟草叶盘转化, 转化方法参照 Muller^[9] 的方法。转基因烟草采用 PCR 法鉴定 *GUS* 基因条带。

1.2.4 *GUS* 组织化学染色 将待测样品与 X-Gluc 染色反应液 { 100 mmol·L⁻¹ KH₂PO₄, pH7.0; 0.5 mmol·L⁻¹ K₄[Fe(CN)₆]; 0.5 mmol·L⁻¹ K₃[Fe(CN)₆]; 0.1% Triton X-100; 0.5 mg·mL⁻¹ X-Gluc [X-glucuronide, Molecular probe]} 于 37℃ 保温 24 h 后观察。叶片等绿色组织用 95% 乙醇脱色后观察、照相, 以非转基因材料为阴性对照。检测转基因烟草中 *GUS* 基因的表达水平, 从而确定 *GmPLP1* 启动子的表达特性。

1.2.5 *GUS* 定量分析 *GUS* 荧光定量 PCR: 按照 SYBR(R) ExScript™ RT-PCR Kit 的程序进行荧光定量 PCR 反应, 每个样本进行 3 次重复, 使用 Chromas 4 (BioRad, USA) 荧光定量 PCR 仪进行 PCR 反应, PCR 反应条件: 95℃ 2 min; 40 个循环: 95℃ 10 s, 60℃ 12 s, 72℃ 15 s。PCR 反应后温度从 60℃ 上升到 95℃ 根据 2^{-ΔΔCt} 方法计算基因表达丰度的倍数变化。

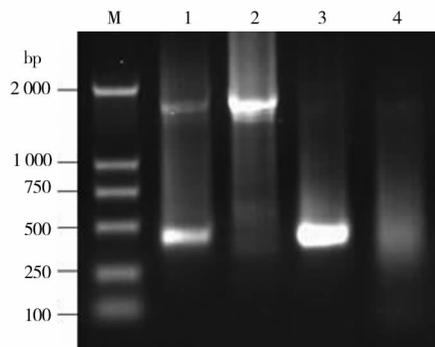
GUS 蛋白定量: 蛋白提取及标准曲线绘制参照 Bradford 方法^[10]。取 10 μL 从叶片中提取的蛋白液, 加入到 500 μL *GUS* 检测液中 (检测液中加入

1 mmol·L⁻¹ 4-MUG), 37℃ 温育 30 min, 最后加入 Na₂CO₃ 终止反应。用 Kontron SFM 25 型分光光度计测定荧光 (激发光 365 nm, 发射光 455 nm, 缝隙宽度为 10 nm)。利用绘制的标准曲线计算产物浓度。*GUS* 活性计算公式为 $G = 1510 \times e/30 \times d$ (G : *GUS* 蛋白活性; e : 4-MU 的浓度; d : 可溶性蛋白浓度)。

2 结果与分析

2.1 *GmPLP1* 基因启动子片段的克隆

大豆基因组 DNA 经 4 种限制性内切酶 *Stu* I、*Eco*R V、*Pvu* II 和 *Dra* I 消化后, 在 T4 连接酶的作用下与衔接头连接过夜。取少量 DNA 连接产物作为模板, 采用衔接头引物 (AP1, AP2) 和基因特异引物 (pGSP1, pNGSP1) 组合进行 PCR 扩增, 第二轮 PCR 扩增结果如图 1 所示, 经过 *Eco*R V 和 *Pvu* II 酶切过的基因组 DNA 样品分别扩增出一条约 1.8 kb 和 400 bp 的特异条带; 而经 *Dra* I 酶切过的基因组 DNA 没有扩增出特异条带; *Stu* I 酶切过的基因组扩增出 2 条条带。分别将这些条带回收, 测序分析, 发现只有 *Eco*R V 酶切的基因组扩增出了正确的启动子序列, 该片段向基因组 5' 端共延伸了 1 500 bp。因此, 取该 1 500 bp 片段作为基因的启动子进行功能分析。



M: DL2000 DNA 分子量标准; 1: *Stu* I 酶切基因组 PCR 产物; 2: *Eco*R V 酶切基因组 PCR 产物; 3: *Pvu* II 酶切基因组 PCR 产物; 4: *Dra* I 酶切基因组 PCR 产物。

M: DL2000 DNA marker; 1: PCR products of genome DNA digested by *Stu* I; 2: PCR products of genome DNA digested by *Eco*R V; 3: PCR products of genome DNA digested by *Pvu* II; 4: PCR products of genome DNA digested by *Dra* I.

图 1 染色体步移法扩增 *GmPLP1* 启动子全长
Fig. 1 The amplification of *GmPLP1* promoter by genome walking method

2.2 *GmPLP1* 基因启动子顺式作用元件分析

将分离获得的大豆 *GmPLP1* 基因的启动子序列提交到启动子预测网站 plantCARE 在线分析启动子的各个顺式元件组成。该启动子含有 107 个顺式作用元件, 其中包扩启动子核心元件 TATA-BOX^[11]、CAAT-Box 等, 光反应元件 BOX-4 等; 转录增强元件

5'UTR Py-rich stretch;茉莉酸甲酯应答元件 TGACG-motif;脱落酸应答元件 ABRE^[12];乙烯应答元件 ERE;生长素应答元件 TGA-element;水杨酸应答元件 TCA-element;低温应答元件 LTR;胁迫和防御应

答元件 TC-rich repeats;种子特异表达调控元件 RY-element;节律钟调控元件 Ciradian。启动子元件分析结果表明,*GmPLP1* 基因表达可能受光、低温、激素等调节。

表 1 部分 *GmPLP1* 基因启动子元件的位置及功能

Table 1 Location and function of cis-elements in *GmPLP1* promoter

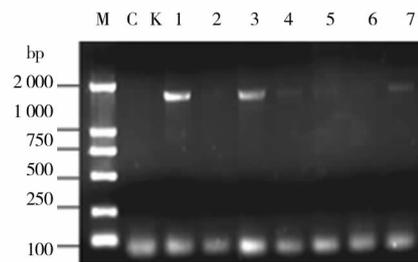
基序 Motif	正(+)反(-)链 Sense(+) antisense(-) strand	位置 Location/bp	序列 Sequence	预测功能 Putative function
5'UTR Py-rich stretch	-	-340	TTTCTTCTCT	转录增强元件
Box-4	+ + +	-377, -813, -850	ATTAAT	光应答元件
TGACG-motif	-	-1448	TGACG	茉莉酸甲酯应答元件
CGTCA-motif	+	-1448	CGTCA	茉莉酸甲酯应答元件
ERE	+	-819	ATTTCAAA	乙烯应答元件
ABRE	+	-1005	TACGTG	脱落酸应答元件
TGA-element	-	-1337	AACGAC	生长素应答元件
TCA-element	-	-1312	GAGAAGAATA	水杨酸应答元件
LTR	-	-737	CCGAAA	低温应答元件
TC-rich repeats	-	-4	ATTTTCTTCA	防御和胁迫应答元件
RY-element	+	-781	CATGCATG	种子特异表达调控元件
Ciradian	+	-924	CAANNNNATC	节律钟相关元件

2.3 *GmPLP1* 启动子转基因烟草的 PCR 检测

将构建好的 pBI121-*pGmPLP1* 质粒通过冻融法导入农杆菌 LBA4404, 鉴定正确的阳性克隆后, 通过农杆菌介导的叶盘转化法转化烟草, 获得带有卡纳抗性的转基因植株。提取转化后的植株 DNA, 采用 *GUS* 基因引物进行 PCR 鉴定, 结果共得到 20 株转 *pGmPLP1* 全长启动子的 T0 代烟草, 图 2 为部分植株的 PCR 鉴定结果。

2.4 转 *GmPLP1* 启动子烟草的 GUS 表达分析

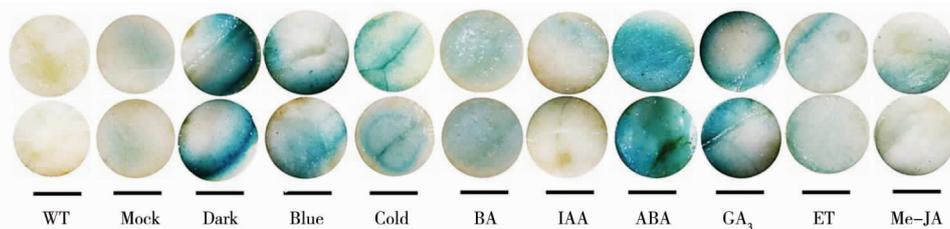
将 T2 代转 *GmPLP1* 全长启动子的烟草叶片打成叶盘, 分别放入 1 mg · L⁻¹ 的 GA₃、6-BA、MeJA、IAA 及 100 μmol · L⁻¹ 的 ABA 中, 以水作为对照, 正常光下处理 48 h, 蓝光同样处理 48 h。经过不同环



M; DL2000 DNA 分子量标准; CK; 未转化对照植株; 1~7: 转 *GmPLP1* 启动子烟草。

M; DL2000 DNA marker; CK; Untransformed control plant; 1-7: Transformed *GmPLP1* promoter tobacco.

图 2 *GmPLP1* 启动子转基因植株的 PCR 鉴定
Fig. 2 Part of PCR identification results of *GmPLP1* promoter transgenic plants



WT 为非转基因烟草; Mock 为水处理的转基因烟草。

WT was non transgenic tobacco; Mock was transgenic tobacco without treatments.

图 3 转 *GmPLP1* 启动子烟草叶盘在不同环境处理下的 GUS 染色

Fig. 3 GUS histochemical staining of transgenic tobacco leaf disc with *GmPLP1* promoter plus GUS reporter gene under different abiotics stress treatments

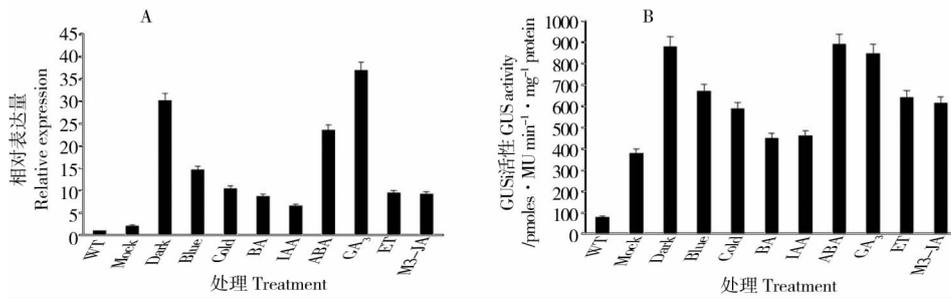


图4 转 GmPLP1 启动子烟草的 GUS 表达分析

Fig.4 The GUS activity of transgenic tobacco under different treatments

境和植物激素处理后,分别进行 GUS 染色和定量分析 GUS 基因表达量在各个处理组间的差异,结果如图 3 和 4。从 GUS 染色和定量分析中可明显看出暗处理、低温、GA₃、ABA 处理后 GUS 表达量显著升高,蓝光处理后表达量也明显升高,而 6-BA 和 IAA 处理却对其活性没有太大影响。说明 GmPLP 基因受暗、低温、GA₃、ABA 及蓝光强烈诱导,推测 Gm-PLP1 可能大豆中潜在的蓝光受体,并受到多种激素的调控。

3 讨论

本研究采用染色体步移法进行了 GmPLP1 基因全长启动子的克隆。选用 4 种限制性内切酶进行酶切大豆基因组,酶切产物加入接头后进行 PCR 扩增,4 种酶切得到的结果不一样,发现染色体步移法中限制性内切酶的选择比较关键,一般选用一些物种稀有限制性内切酶,尽量避免将未知序列切断,应用该法获得的启动子较全面而且特异性高。

启动子元件及功能分析一直是基因功能研究中的重要内容,顺式作用元件的差异对基因的表达具有重要的调控作用,发掘一种组织特异型或诱导型启动子对于转基因作物育种具有重要意义^[13-15]。本研究通过对 GmPLP1 基因启动子元件的预测分析,发现了许多与激素以及光周期相关的顺式调控元件。组织化学染色分析和 GUS 酶活力测定结果也精确显示 GmPLP1 基因启动子受黑暗、蓝光、低温、GA₃和 ABA 诱导表达,与启动子元件预测结果一致。GmPLP1 基因启动子的分析结果为该基因是大豆的一种蓝光受体基因提供了佐证,同时也说明 GmPLP1 基因参与植物激素以及逆境胁迫反应,但基因具体的功能和作用途径还有待进一步验证。

参考文献

[1] Lariguet P, Dunand C. Plant photoreceptors: phylogenetic overview [J]. Journal of Molecular Evolution, 2005, 61: 559-569.
 [2] Tomohiro K, Masamitsu W. LKP1. LOV Kelch protein 1: a factor involved in the regulation of flowering time in Arabidopsis [J]. Plant

Journal, 2000, 23: 807-815.
 [3] Ogura Y, Komatsu A, Zikihara K, et al. Blue light diminishes interaction of PAS/LOV proteins, putative blue light receptors in Arabidopsis thaliana, with their interacting partners [J]. Journal of Plant Research, 2008, 121: 97-105.
 [4] Ogura Y, Tokutomi S, Wada M, et al. PAS/LOV proteins: A proposed new class of plant blue light receptor [J]. Plant Signaling Behavior, 2008, 3: 966-968.
 [5] Sansom S. Role of Arabidopsis thaliana PAS/LOV Protein in salt and dehydration stress conditions [J]. Department of Plant Cellular and Molecular Biology Honors Theses, 2008.
 [6] 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.)
 [7] 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.
 [8] 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.
 [9] Muller A J, Mendel R R, Schiemann J, et al. High meiotic stability of a foreign gene introduced into tobacco by Agrobacterium-mediated transformation [J]. Molecular and General Genetics, 1987, 207: 171-175.
 [10] Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. Analytical Biochemistry, 1976, 72: 248-254.
 [11] 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.
 [12] Stilberg K, Ellerstm M, Ezcurra I, et al. Disruption of an overlapping E-box/ABRE motif abolished high transcription of the nap A storage-protein promoter in transgenic Brassica napus seeds [J]. Planta, 1996, 4: 515-519.
 [13] 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 promote [J]. Letters in Biotechnology, 2006, 17(4): 658-661.)
 [14] 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.)
 [15] 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.