

大豆 *GmGBP1* 启动子受激素和外源环境诱导的研究

丁福全 杜海龙 索艺宁 杨 雪 李敏敏 张可欣 赵 琳 李文滨

(东北农业大学 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 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 采用 PCR 方法克隆大豆光周期 *GmGBP1* 基因启动子, 构建含有 *GmGBP1* 启动子驱动报告基因 *GUS* 的融合性表达载体 *pBI121-pGmGBP1::GUS* 通过花序浸泡法, 转化野生型拟南芥获得 *pBI121-pGmGBP1::GUS* 转基因植株, 对 T_3 代转基因拟南芥进行 *GUS* 染色, 研究了 *GmGBP1* 启动子受激素和外源环境诱导的表达规律。结果表明: 大豆 *GmGBP1* 启动子受水杨酸 (SA) 和干旱 (PEG) 以及高温等外源环境的诱导, 与生物信息学预测 *GmGBP1* 启动子序列存在的逆境胁迫响应元件的结果相一致。

关键词: 拟南芥; *GmGBP1* 启动子; *GUS* 染色

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

DOI: 10.11861/j.issn.1000-9841.2016.04.0683

Research of the Promoter of Soybean *GmGBP1* Induced by Hormone and Exogenous Environment

DING Fu-quan, DU Hai-long, SUO Yi-ning, YANG Xue, LI Min-min, ZHANG Ke-xin, ZHAO Lin, LI Wen-bin

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

Abstract: The expression pattern of the *GmGBP1* promoter under hormone and environment were obtained. The *GmGBP1* promoter was cloned by PCR and the fusion expression vector was constructed, including the *GmGBP1* promoter and the reporter gene *GUS*. The fusion expression vector was used to infect *Arabidopsis thaliana*, and T_3 generation of transgenic *Arabidopsis* was obtained, then the *GUS* staining was used to research the expression pattern of the *GmGBP1* promoter in *Arabidopsis thaliana*. The results showed that the expression of the *GmGBP1* promoter was regulated by GA, SA, drought and high temperature, consistent with the predictions of *GmGBP1* promoter element by bioinformatics analysis. Our experiment provide theoretical basis for the cultivation of resistant crops in the future.

Keywords: *Arabidopsis*; *GmGBP1* promoter; *GUS* staining

真核生物的 SKIP 蛋白存在一个 *SKIP/SNW* 结构域, 该结构域相对保守, 能与致癌基因 *Ski* 互作^[1]。SKIP 蛋白的同源基因序列片段已在果蝇中被克隆出来^[2-3]。SKIP 蛋白在转录和剪切中作为真核生物的转录共激活子发挥着保守的共激活作用^[4]。研究表明目前已发现的 SKIP 同源蛋白 *SNW/SKIP* 的结构域均具有 *S-N-W-K-N* 信号肽, 但该同源蛋白所具有的额外功能在不同物种间却存在较大差异^[5]。SKIP 的同源蛋白参加调控 RNA 的转录、运输等多种信号传导途径^[4]。

大豆中在 16 号和 1 号染色体上具有两个同源的 *SKIP* 基因拷贝序列, 为 *GmGBP1* 和 *GmGBP2* 基因, 且这两个基因的氨基酸同源率高达 96.70%^[6]。研究表明短日照、干旱、热以及赤霉素等外界环境均能诱导大豆 *GmGBP1* 基因的表达^[7-8]。*GmGBP1*

的过表达能提高植株对非生物逆境胁迫的耐受性, 若干涉其表达则会降低其在逆境中的耐受性。研究表明, 在拟南芥中 *SKIP* 基因的表达对 ABA 不敏感, 而对高盐、干旱较敏感, 且表达量越高其抗逆性越强^[9]; *AtSKIP* 定位于细胞核中, 参与对细胞周期的调控, 该基因受细胞分裂素的诱导^[4], *AtSKIP* 还能通过调节植物昼夜的节律钟来调控拟南芥的花期^[10]。

基因的启动子是基因表达调控的重要元件, 也是 RNA 聚合酶识别、结合的重要位点, 在调控基因的表达式过程中起着重要作用。启动子调控机制的研究也是进一步探究植物表达调控网络、目的蛋白表达等过程的前提和基础。有关 *GmGBP1* 基因的研究目前主要在功能分析上, *GmGBP1* 启动子的克隆与外在诱导条件的研究报道尚少。因此, 本试

收稿日期: 2015-10-12

基金项目: 国家自然科学基金 (31271748); 转基因生物新品种培育科技重大专项 (2014ZX08004-005); 东北农业大学“青年才俊”项目 (14QC23); 黑龙江省自然科学基金 (C2015009); 东北农业大学 2015 年大学生 SIPT 计划 (201510224187); 东北农业大学 2016 年大学生 SIPT 计划 (201610224141); 黑龙江省教育厅青年学术骨干项目 (1253G010); 十二五农村领域国家科技计划课题 (2013AA102602); 东北农业大学研究生科技创新基金 (yjsx14047)。

第一作者简介: 丁福全 (1991-), 男, 硕士, 主要从事大豆生物技术研究。E-mail: 409034679@qq.com。

通讯作者: 赵琳 (1980-), 女, 研究员, 博导, 主要从事大豆生物技术研究。E-mail: zhaolinneau@126.com;

李文滨 (1958-), 男, 教授, 博导, 主要从事大豆生物技术研究。E-mail: wenbinli@yahoo.com。

验对 *GmGBP1* 启动子受外源环境诱导的表达规律进行研究,为进一步探究在非生物胁迫环境下 *GmGBP1* 基因的表达规律提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆品种为东农 42,拟南芥(*Columbia*) *E. coli* DH5 α 菌株,限制性内切酶是 *Bam*H I 和 *Hind* III。华舜生物胶回收试剂盒,PCR 引物由上海生工生物公司合成,基因测序由华大基因生物公司完成。

1.2 方法

1.2.1 大豆 *GmGBP1* 启动子与质粒 *pBI121* 融合表达载体的构建 依据 *GmGBP1* 启动子序列(GenBank 登录号: FJ94266) 设计引物,正义引物 *pGmGBP1-F* 5'-GCAAGCTTGATATTGTAAGAAAGGGAGTTCAT-3',反义引物 *pGmGBP1-R* 5'-GCCGATCCGATTTTGCAGGAGGAAGAAGCT-3',提取东农 42 大豆 DNA,PCR 扩增目的片段,将目的片段回收后与 *pGEM-T* 载体连接重组,并对 *pGEM-T-pGmGBP1* 重组质粒进行 DNA 测序。用 *Hind* III 和 *Bam*H I 酶分别双酶切含目的基因 *pGEM-T-pGmGBP1* 克隆载体与含 *GUS* 的质粒 *pBI121*,分别胶回收含目的基因 *GmGBP1* 启动子和含 *GUS* 基因的载体,经 T4 连接酶连接得到 *GmGBP1* 启动子与 *GUS* 基因融合的构建植物表达载体 *pBI121-pGmGBP1::GUS*。之后将融合表达载体转化到 *E. coli* DH5 α 中并筛选抗卡那霉素(*Kan*) 的阳性克隆菌株,提取质粒后,酶切验证,验证正确的阳性克隆菌株生物公司测序确证。将重组质粒转入根癌农杆菌 LBA4404 细胞中。

1.2.2 农杆菌介导法侵染拟南芥花序 将开花后的拟南芥植株花序浸泡在农杆菌重悬液中约 35 s,用纸巾吸取多余重悬液,然后将侵染后的拟南芥植株平放在培养箱中,覆上透明的塑料薄膜保湿,移入恒温暗室避光培养,24 h 后竖直正常光照培养。3~4 d 后,根据拟南芥植株的生长状态继续浸染几次。

1.2.3 转基因拟南芥 PCR 分析 4℃ 低温处理过表达的 T_0 代拟南芥转 *pBI121-pGmGBP1::GUS* 基因种子 3 d,然后将种子均匀播于含有 *kan* 的 MS 培养基上,放入 16 h / 8 h 光照的长日照培养室培养。在 6~10 d 后将拟南芥植株移栽至 MS 培养基上,生长 6 d 后,转移到土中培养。从移栽转化拟南芥及未转化的拟南芥上分别取叶片,提取 DNA,进行 PCR 扩增,筛选转基因植株。

1.2.4 *pGmGBP1-pBI121* 启动子 *GUS* 染色 将转 *pGmGBP1-pBI121* 的 T_3 代拟南芥幼苗,分别用 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GA 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA 8% PEG6000 和 H_2O 对照浸泡拟南芥根长处理 4 h,叶子不要沾上处理

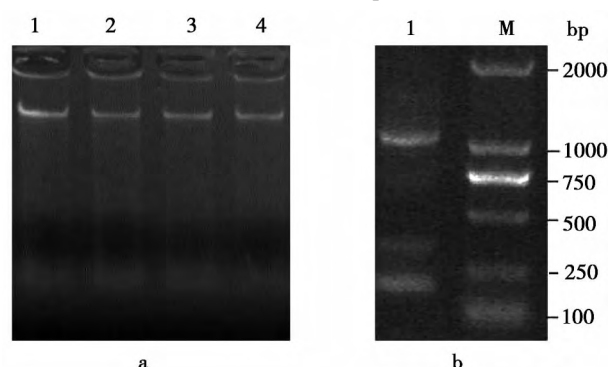
液,在 42℃ 高温处理 30 min,然后进行 *GUS* 染色,反应液(1 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH7.0 磷酸钠缓冲液 500 μL 、0.033 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 铁氰化钾 100 μL 、0.042 $\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 亚铁氰化钾 100 μL 、0.5 $\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH8.0 乙二胺四乙酸 20 μL 、Triton X-100 10 μL 和 2.5 mg X-gluc 水溶至 10 mL 得到 *GUS* 组织化学染色反应液),然后用 95% 酒精进行脱色。观察 *GUS* 染色结果。

1.2.5 *pGmGBP1-pBI121* 启动顺势作用元件预测 应用 PLACE 在线启动子预测工具,预测启动子中的顺势作用元件。

2 结果与分析

2.1 *GBP1* 启动子的扩增与克隆

提取大豆叶片 DNA,经 1% 琼脂糖凝胶电泳,以 DNA 为模板,进行 PCR 扩增得到一条 DNA 片段,经 1% 琼脂糖凝胶电泳,获得 1 045 bp 启动子片段(图 1)。



a: 大豆叶片 DNA 琼脂糖凝胶电泳图; b: 以 DNA 为模板进行 PCR 扩增; M: DL2000 DNA 分子量标准; 1: 扩增产物。

a: Agarose gel electrophoresis of DNA in soybean leaves; b: DNA as a template for PCR amplification; M: DL2000 DNA Marker; 1: PCR products.

图 1 *GmGBP1* 启动子扩增和克隆部分结果

Fig.1 *GmGBP1* promoter amplification and cloning of partial results

2.2 重组表达载体 *pGmGBP1-pBI121* 启动子的鉴定

将 *pGEM-T-pGmGBP1* 阳性质粒用 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切与同样用 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切的 *pBI121* 表达载体连接,构建成含有 *GmGBP1* 启动子和 *GUS* 标签的融合表达载体 *pGmGBP1-pBI121::GUS*(图 2)。

2.3 T_0 转基因拟南芥 PCR 鉴定

SDS 小量法提取 40 株转 *pGmGBP1-pBI121* 启动子基因拟南芥,用 PCR 方法鉴定转基因植株,PCR 大小约为 1 045 bp。结果表明 22 株植株为转基因,转化率为 55%(图 3)。

2.4 转基因拟南芥 *GUS* 基因表达检测

利用 PlantCare 软件对此 *GmGBP1* 启动子序列分析发现其上存在着 1 个干旱诱导相关元件(MBS

MYB binding site to drought-inducibility) ,1 个 SA 诱导相关元件(*TCA*-element cis-acting element in salicylic acid) 和 2 个热诱导相关元件(HSE cis-acting element to heat stress responsiveness) ,但在该片段上未发现 GA_3 诱导元件(表 1) 。将启动子片段与 *GUS* 基因融合 构建成表达载体后 ,转基因拟南芥 T_3 代做 GUS 染色分析(图 4) 。*GmGBP1* 启动子启动 *GUS*

基因在转化的拟南芥中表达研究表明 ,水杨酸(SA) 和 PEG 处理以及高温能诱导 *GmGBP1* 启动子调控 *GUS* 基因的表达 ,但该启动子不受赤霉素(GA_3) 诱导。虽然该启动子序列上没有 GA_3 诱导相关元件 ,但本实验室的相关研究结果表明 *GmGBP1* 也能受 GA_3 诱导^[11]。结合(表 1) 可知 , GA 诱导相关元件不在该启动子序列上。

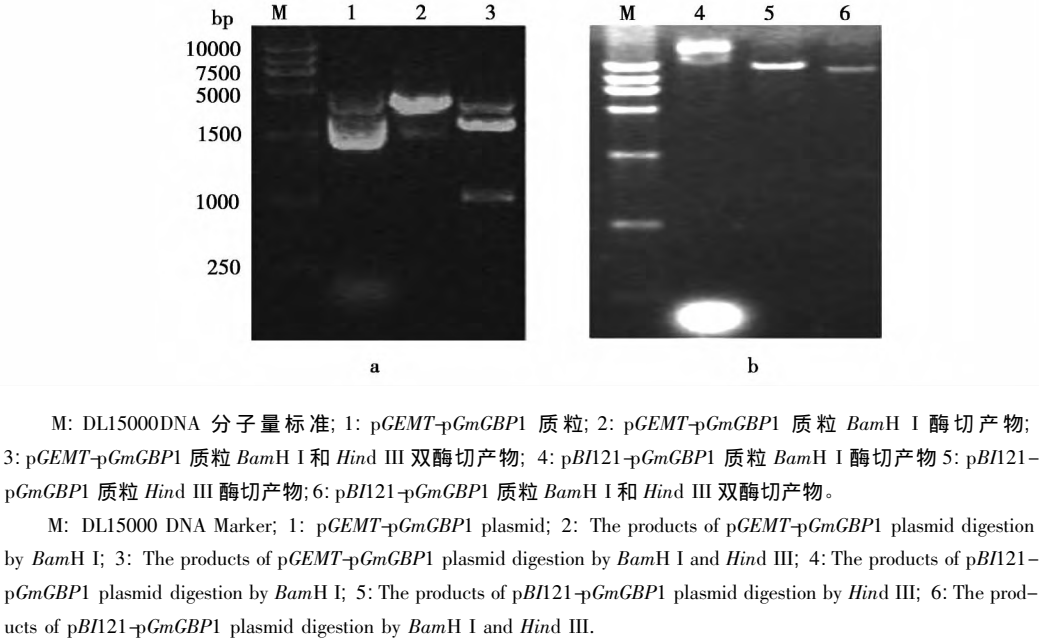


图 2 *pGEMT-pGmGBP1* 重组质粒(a) 和 *pBI121-pGmGBP1*(b) 的酶切结果

Fig. 2 The results of *pGEMT-pGmGBP1* recombinant plasmid and *pBI121-pGmGBP1* single and double digestion

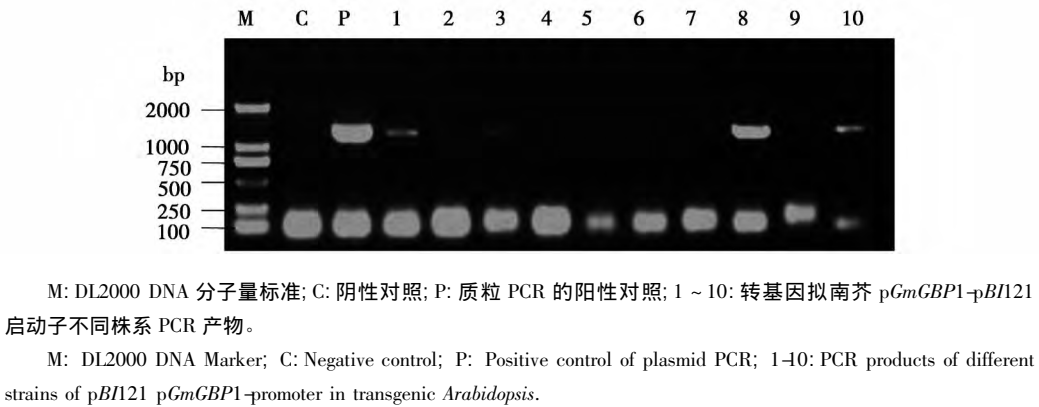


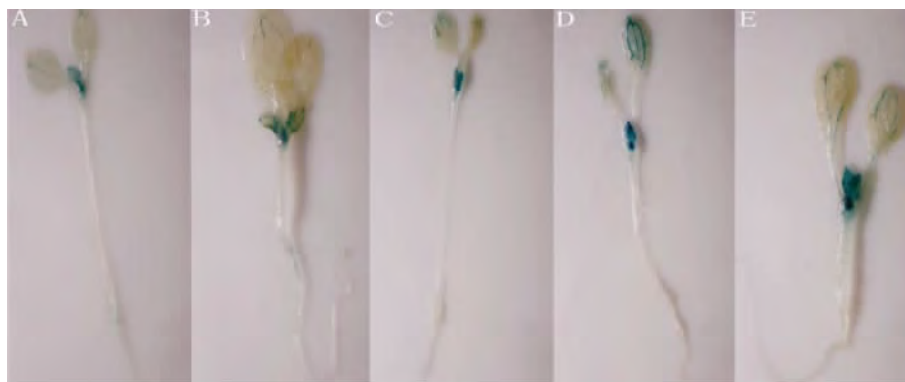
图 3 PCR 扩增转基因拟南芥的部分结果

Fig. 3 Part of PCR results of transgenic *Arabidopsis*

表 1 *GmGBP1* 启动子中顺势作用元件预测

Table 1 The analysis of cis-acting elements of *GmGBP1* promoter

名称 Name	序列 Sequence	数量 No.	位置 Location	功能 Function
HSE	AAAAAATTTTC	2	117 /461	高温响应元件 High temperature
MBS	TAACTG	1	507	干旱响应元件 Drought
TCA	GAGAAGAATA	1	308	水杨酸响应元件 SA



A: H₂O; B: 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ GA₃; C: 8% PEG 6000; D: 2 $\text{mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ SA; E: 42℃。

图4 pBI121-pGmGBP1::GUS 转基因拟南芥 GUS 染色化学定位

Fig.4 Histochemical localization of GUS expression driven by the pBI121-pGmGBP1 in transgenic *Arabidopsis*

3 结论与讨论

地区差异性、非生物逆境胁迫等是影响大豆产量的重要因素。光照、温度、盐碱等非生物胁迫因子通过影响大豆生长发育进程中有关基因的表达,进而影响大豆产量。如何打破大豆生长地区差异限制,提高大豆非生物胁迫适应性,是大豆稳产、增产的关键所在。据研究报道,过表达的 *GmGBP1* 植株在非生物逆境胁迫的环境下耐受性提高,而 *GmGBP1* 干扰植株对逆境胁迫的耐受性降低^[11-12]。

关于 *GmGBP1* 基因的研究目前主要在功能分析上,有关 *GmGBP1* 启动子的克隆与外在诱导条件的试验报道尚少。本试验构建了 pBI121-pGmGBP1::GUS 融合性表达基因载体并将其转入野生拟南芥,获得 pBI121-pGmGBP1::GUS 转基因拟南芥植株通过 GUS 染色,分析 pBI121-pGmGBP1::GUS 转基因拟南芥植株 *GmGBP1* 启动子的表达部位及其活性。结果表明: *GmGBP1* 启动子驱动下的 GUS 基因在转基因拟南芥子叶、下胚轴和根中都有表达,但表达活性有差异,与对照组相比,赤霉素处理染色结果不明显,但干旱处理、水杨酸处理和高温处理,能明显提高 GUS 基因的表达活性,表明 *GmGBP1* 启动子受激素及外源环境诱导。在 1 045 bp 的启动子调控区,不存在赤霉素诱导相关元件。结合前人研究, *GmGBP1* 受 GA₃ 诱导,推测赤霉素诱导相关元件可能在启动子其它调控区。

综上所述,本试验对转基因拟南芥 GUS 染色发现,水杨酸(SA)、PEG 处理以及一定范围内高温能促进启动子调控 GUS 基因的表达,为下一步研究不同的激素和外源环境诱导 *GBP1* 基因表达调控网络间的关系提供科学的理论基础。

参考文献

- [1] Saumweber H, Frasch M, Korge G. Two puff-specific proteins bind within the 2.5 kb upstream region of the *Drosophila melanogaster* *Sgs-4* gene [J]. *Chromosoma*, 1990, 99(1): 52-60.
- [2] Dahl R, Wani B, Hayman M J. The Ski Oncoprotein interacts with *SKIP*, the human homolog of *Drosophila* Bx42 [J]. *Oncogene*, 1998, 16(12): 1579-1586.
- [3] Wieland C, Mann S, von Besser H, et al. The *Drosophila* nuclear protein Bx42, which is found in many puffs on polytene chromosomes, is highly charged [J]. *Chromosoma*, 1992, 101(8): 517-525.
- [4] Zhang X, Ju H W, Huang P, et al. Functional identification of At-*SKIP* as a regulator of the cell cycle signaling pathway in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Journal of Plant Biology*, 2013, 55(6): 481-488.
- [5] Chen Y, Zhang L, Jones K A. *SKIP* counteracts p53-mediated apoptosis via selective regulation of p21^{Cip1} mRNA splicing [J]. *Genes & Development* 2011 25: 701-716.
- [6] Zhao L, Luo Q, Yang C, et al. A RAV-like transcription factor controls photosynthesis and senescence in soybean [J]. *Planta*, 2008, 227(6): 1389-1399.
- [7] 赵琳, 罗秋兰, 杨春亮, 等. 大豆在暗诱导条件下差异表达 cDNA 文库的构建及分析 [J]. *大豆科学*, 2008, 26(2): 134-139. (Zhao L, Luo Q L, Yang C L, et al. Construction and analysis of differentially expressed cDNA library from soybeans induced by darkness [J]. *Soybean Science* 2008, 26(2): 134-139.)
- [8] Zhao L, Wang Z, Lu Q, et al. Overexpression of a *GmGBP1* ortholog of soybean enhances the responses to flowering, stem elongation and heat tolerance in transgenic tobaccos [J]. *Plant Molecular Biology* 2013, 82(3): 279-299.
- [9] Lim G H, Zhang X, Chung M S, et al. A putative novel transcription factor, At-*SKIP*, is involved in abscisic acid signalling and confers salt and osmotic tolerance in *Arabidopsis* [J]. *New Phytologist*, 2010, 185(1): 103-113.
- [10] Wang X, Wu F, Xie Q, et al. *SKIP* is a component of the spliceosome linking alternative splicing and the circadian clock in *Arabidopsis* [J]. *The Plant Cell Online*, 2012, 24(8): 3278-3295.
- [11] 张彦威. 大豆 *GmGBP1* 基因参与光周期开花途径和逆境反应的功能分析 [D]. 哈尔滨: 东北农业大学. 2013. (Zhang Y W. Functional analysis of soybean *GmGBP1* gene involved in photoperiodic flowering pathway and stress responses [D]. Harbin: Northeast Agricultural University 2013.)
- [12] Zhang Y W, Zhao L, Li H Y, et al. *GmGBP1*, a homolog of human ski interacting protein in soybean, regulates flowering and stress tolerance in *Arabidopsis* [J]. *BMC Plant Biology*, 2013, 13: 21.