

拟南芥诱导型启动子 rd29A 的克隆及其功能鉴定

齐恩芳^{1,2,3}, 贾小霞^{1,2,3}, 马 胜^{1,2,3}, 文国宏^{1,2,3}, 胡新元^{1,2,3},
龚成文^{1,2,3}, 王一航^{1,2,3}, 李建武^{1,2,3}

(1. 甘肃省农业科学院马铃薯研究所, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃省马铃薯种质资源创新工程实验室, 甘肃 兰州 730070;
3. 农业部西北旱作马铃薯科学观测实验站, 甘肃 渭源 748201)

摘 要: 以改善作物抗旱性为目的, 采用 PCR 方法从拟南芥中克隆了诱导型启动子 rd29A, 序列分析发现克隆的 rd29A 启动子与已发表的 rd29A 启动子序列(D13044)的同源性为 99.47%。利用 DNA 重组技术成功构建了 rd29A 启动子驱动 GUS 基因的植物表达载体 pBI121-rd29-GUS, 并通过农杆菌介导法转化烟草, 转基因烟草叶片中 GUS 酶活性的组织化学检测结果表明, rd29A 启动子能驱动目的基因的有效表达。因此, 可以在后续的马铃薯抗旱转基因研究中直接应用。

关键词: rd29A 启动子; 抗逆性; GUS 基因
中图分类号: S532.03; Q943.2 **文献标志码:** A

Cloning and functional characterization of an inducible promoter rd29A from *Arabidopsis thaliana*

QI En-fang^{1,2,3}, JIA Xiao-xia^{1,2,3}, MA Sheng^{1,2,3}, WEN Guo-hong^{1,2,3},
HU Xin-yuan^{1,2,3}, GONG Cheng-wen^{1,2,3}, WANG Yi-hang^{1,2,3}, LI Jian-wu^{1,2,3}

(1. Potato Research Institute, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou, Gansu 730070, China;
2. Gansu Engineering Laboratory of Potato Germplasm Resources Innovation, Lanzhou, Gansu 730070, China;
3. The Northwest Potato Dry Farming Scientific Observation Station of the Ministry of Agriculture, Weiyuan, Gansu 748201, China)

Abstract: To improve drought resistance of crops, inducible promoter rd29A was cloned from *Arabidopsis thaliana* by PCR method. Sequencing analysis indicated that the cloned fragment showed 99.47% identity to the published sequence (D13044). An rd29a driving GUS expression vector pBI121-rd29-GUS was constructed by DNA recombinant technology. By Agrobacterium-mediated transformation, pBI121-rd29-GUS was transformed into tobacco. The function of rd29A promoter was identified through the expression of GUS protein in transgenic tobacco. GUS activity in transgenic tobacco leaf showed that the rd29A promoter could drive efficient expression of the target gene. rd29A promoter could be used in subsequent transgenic study of drought resistance in potato.

Keywords: rd29A promoter; stress resistance; GUS gene

近年来,我国大部分地区持续干旱,特别是在北方地区,干旱发生频率较高^[1]。干旱胁迫是限制植物生长发育的重要因子,对作物造成的损失在所有非生物胁迫中占首位^[2]。因此,培育综合性状优良的抗旱品种非常迫切。转基因育种技术作为一种强有力的工具,在不改变作物原有特性的基础上,将控制重要农艺性状的关键基因导入其中,从而实现品种改良的目的。

目前,作物的遗传转化中,绝大多数用 CaMV35S 启动子驱动目的基因的表达, CaMV35S 启动子是植物组成型强启动子,它驱动外源基因在植物的各种

组织和所有发育阶段都会表达^[3-5],这不仅增加植株的代谢负担、浪费大量的物质和能量,还改变植物的基因调控和代谢途径,导致植物的形态发生改变,从而影响植物正常的生长发育。rd29A 是 DREB1S 调控的目的基因,在植物细胞缺水时能够大量表达。rd29A 的启动子区域含有 ABRE(ABA-responsive element, 保守序列: CACGTGGC/ACACGTGGC)顺式作用元件和 DRE 核心序列^[6]。植物细胞缺水时,植物产生的内源 ABA 通过信号传导产生与 rd29A 启动子的 ABRE 序列结合的转录因子,可以启动 rd29A 的表达, DREB1S 转录因子与 rd29A 启动子 DRE 核

心序列结合也可以诱导该基因的表达。在植物细胞不缺水时, *rd29A* 并不表达^[7-9], 它是一个干旱诱导型启动子。

本研究从拟南芥中克隆了诱导型启动子 *rd29A*, 利用 DNA 重组技术构建了 *rd29A* 启动子驱动 *GUS* 基因的植物表达载体 pBI121 - *rd29* - *GUS*, 并通过农杆菌介导法转化烟草, 通过转基因烟草中 *GUS* 基因的表达情况证明了 *rd29A* 启动子能有效驱动目的基因的表达, 本实验为开展作物抗逆分子育种研究奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

植物材料: 拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 为 Columbia 生态型。

菌株和质粒: 载体 pGEM - T vector 和大肠杆菌菌株 DH5a 购自大连宝生物工程有限公司, 其余菌株由本实验室保存。Taq 酶、各种限制性内切酶、氨苄青霉素、卡拉霉素、IPTG、X - gal 等试剂均购自 TaKaRa 公司; T4DNA 连接酶购自 Promega 公司; DNA 回收试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司; 其他各种试剂均为国产分析纯。基因测序由赛百盛公司完成。

1.2 方法

1.2.1 拟南芥总基因组 DNA 的提取和 *rd29A* 启动子的克隆 根据 GenBank 中检索到的拟南芥 *rd29A* 启动子原序列 (genebank ID: D13044), 利用 PCR 技术从拟南芥基因组中分离 *rd29A* 启动子。通过分子生物学分析软件 Oligo 6.0 设计合成上下游引物 R1 和 R2, R1: 5' GCG AAG CTT^{Hind III} AGT ACT^{Sca I} AAC GCA TGA TTT GAT GGA GGA 3', R2: 5' GCG GGA TCC^{BamH I} CTT TCC AAT AGA AGT AAT CAA ACC 3'。

PCR 反应体积为 25 μ L, 包括 10 $\times$ buffer 2.5 μ L, Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L (5U $\cdot\mu$ L⁻¹), 20 mmol $\cdot$ L⁻¹上游引物 1 μ L, 20 mmol $\cdot$ L⁻¹下游引物 1 μ L, 2.5 mmol $\cdot$ L⁻¹ dNTP 2 μ L, 模板 DNA 0.5 μ L (约 500 ng), ddH₂O 补至 25 μ L。

PCR 反应程序为: 96 $^{\circ}$ C 预变性 4 min 后, 94 $^{\circ}$ C 40 s, 48 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.2.2 植物表达载体 pBI121 - *rd29* - *GUS* 的构建 图 1 为表达载体构建流程, 用 HindIII 和 BamH I 双酶切植物表达载体 pBI121, 回收大片段, 将回收的大片段与用同样酶切 T - *rd29A* 的小片段按 1:4 混合, 加入 10 U 的 T4 DNA 连接酶连接, 并将连接产物导入大肠杆菌 DH5a 中, 筛选重组子, 将重组子命名为 pBI121 - *rd29A* - *GUS*。

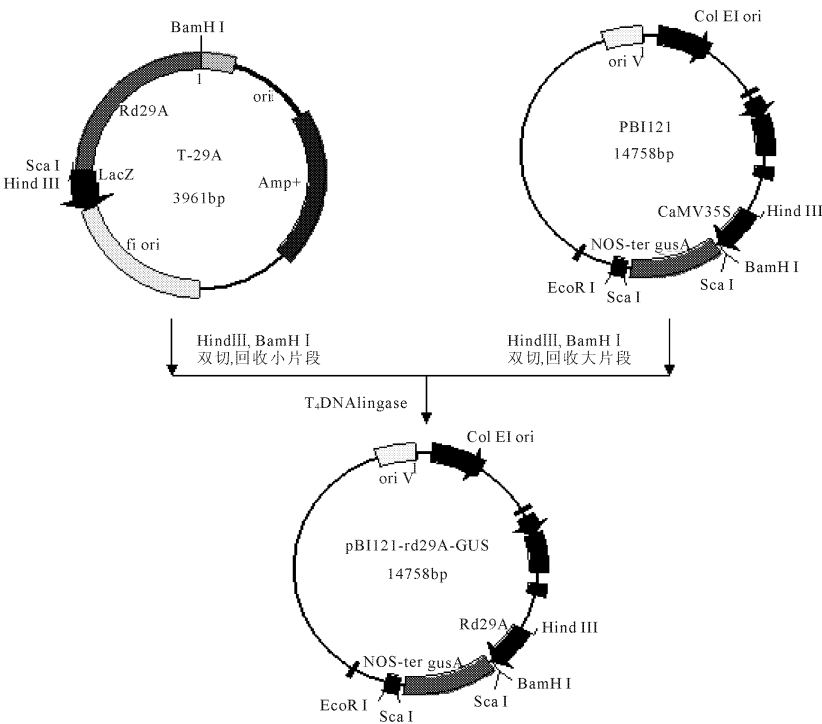


图 1 植物表达载体 pBI121 - *rd29A* - *GUS* 的构建流程

Fig.1 Schematic diagram for constr uction of the pBI121 - *rd29A* - *GUS* expression vectors

1.2.3 烟草的遗传转化及其检测

(1) 根癌农杆菌转化 载体 pBI121 - rd29A - GUS 向根癌农杆菌 LBA4404 的直接转化参照文献 [10]。

(2) 烟草外植体的转化及植株再生 采用叶盘法进行转化^[11]。将烟草无菌苗健壮叶片切割成 0.5 cm² 的小块,浸入参照文献 [12] 制备的农杆菌菌液中,浸染 5 ~ 10 min。取出叶盘后,用无菌滤纸吸干菌液,将叶盘背光面朝下平放在 MS 培养基上,置于 25℃ 左右暗培养。3 d 后转移至 MS₁ (MS + 6 - BA 0.5 mg·L⁻¹ + 头孢曲松钠 Cef 500 mg·L⁻¹ + Kan 50 mg·L⁻¹) 培养基,于 25℃ 左右 14 h 光照培养。约 2 周后,切下带芽的叶缘插入 MS₁ 中进行筛选培养。4 周后,切下幼芽插入 MS₂ (1/2MS + Cef 250 mg·L⁻¹ + Kan 50 mg·L⁻¹) 培养基中于 25℃ 左右 14 h 光照条件下诱导生根,获得转基因植株。

(3) 转基因烟草的 PCR 检测 参照杨锦芬^[13] 等方法,用十六烷基三乙基溴化铵 (cetyltrimethylammonium bromide, CTAB) 法提取转基因烟草植株及未转基因对照烟草的叶片总 DNA,以 R1/R2 为引物进行 PCR 检测。

(4) 转基因烟草叶片中 GUS 酶活性的组织化学检测 用 30% PEG 模拟干旱条件,对烟草试管苗胁迫 3 d 后采集叶片,用打孔器将叶片切成小圆片后浸泡在含 X - gluc 的检测液中,与 37℃/100rpm 的摇床中保温过夜,检测反应结束后将叶片转入 70% 乙醇中脱色数次,至阴性对照组织呈白色,用肉眼或显微镜下观察,白色背景下的蓝色斑点即为 GUS 基因表达的位点。

2 结果与分析

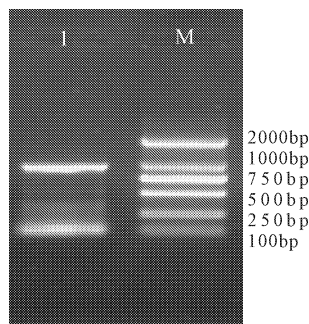
2.1 rd29A 启动子的克隆

以拟南芥基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增(引物 R1、R2),用琼脂糖凝胶电泳检测,结果显示,扩增出 1 条约 1 000 bp 的特异性条带(图 2),其大小与 rd29A 启动子的大小相符。将 PCR 产物回收后连接到 pGEM - T easy 载体上,然后导入大肠杆菌筛选出阳性克隆并进行测序分析,将测序结果与 GenBank 中序列比较(图 3),结果其同源性达到 99.47%。整个序列与原序列有个别碱基不同,其余完全吻合,并且其作为启动子的各个功能原件齐全。

2.2 植物表达载体 pBI121 - rd29 - GUS 的构建及检测

将重组子 pBI121 - rd29A - GUS 用 Hind III / BamH I 双酶切,得到了约 1 000 bp 的片段(图 4),与 rd29A 启动子的大小相符,表明 rd29A 启动子按预期

的方向插入 pBI121 相应的酶切位点上,植物表达载体 pBI121 - rd29A - GUS 构建成功。



注 Note: M: D2000; 1: 以 R1、R2 为引物扩增的 rd29A 启动子片段
Fragment amplified from the template of rd29A by primers R1 and R2

图 2 rd29A 启动子的 PCR 扩增结果

Fig.2 Promoter rd29A fragment amplified by primers R1、R2

2.3 转基因烟草的获得及 PCR 检测

工程菌浸染后的烟草叶盘经共培养、选择培养及生根培养后,得到无菌抗性苗 120 株(图 5 为抗性苗获得过程)。PCR 检测 40 株,结果阳性对照(质粒 pBI121 - rd29A - GUS)和 31 株转化植株扩增出目的基因片段,而阴性对照(未转化烟草)和部分转化植株无扩增条带(图 6 为 PCR 检测的部分结果),表明 5 ~ 7 号植株均有目的基因的整合,为转基因植株,4 号和 8 号没有目的基因的整合,为非转基因植株。

2.4 烟草叶片中 GUS 酶活性的组织化学检测

图 7 中 A、B 分别为用 30% PEG 胁迫 3 d 后的转基因烟草叶片和阴性对照叶片的 GUS 酶活性染色结果的显微镜观察图。

本实验染色组织蓝色斑点的出现表明 GUS 基因的正常表达,进一步证明 rd29A 启动子能驱动目的基因有效表达。

3 讨 论

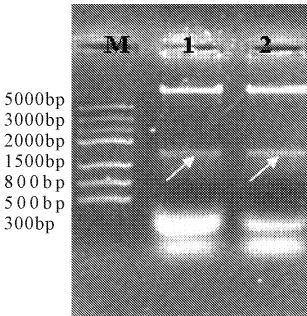
根据测序报告,克隆的 rd29A 启动子序列全长 961 bp。将测序结果与 GeneBank 中(序列号: D13044)的 rd29A 启动子序列比对,同源性达 99.47%。进一步对克隆片段序列结构分析发现,在第 851 ~ 856 之间有一个 TATA box (TATAAA),在第 660 ~ 669 之间和第 718 ~ 726 bp 之间各有一个干旱、高盐和低温响应 (DRE) 顺式作用元件, DRE 序列含有 9 个碱基 (TACCGACAT),它是目的基因在植物中被胁迫诱导表达或被反义抑制所必需的元件。所有这些调控元件及其邻近的序列与报道基本一致,个别的碱基变化可能是由于材料来源不同而产生的差异,但关键调控元件部位未发生变异,并不影响其功能,初步表明 rd29A 启动子克隆成功。



注: * 代表报道的已知序列 Note: * represents the sequence reported

图 3 rd29A 启动子的序列比对

Fig.3 The comparison of the rd29A promoter sequence



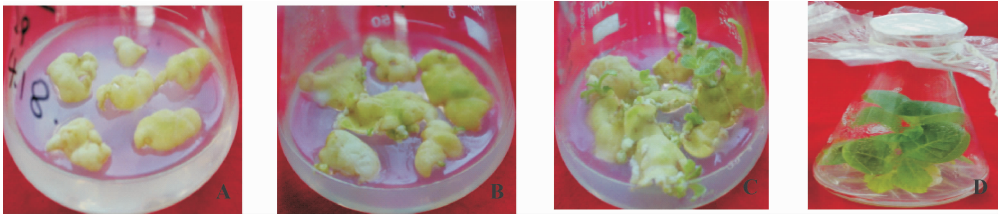
注 Note: M: MarkerⅢ; 1,2: 均为 BamHⅠ/HindⅢ 双酶切质粒 pBI121 - rd29A - GUS 的产物 Digested result of pBI121 - rd29 - GUS respectively by BamHⅠ/HindⅢ

图 4 载体 pBI121 - rd29A - GUS 鉴定结果

Fig.4 Restriction analysis and PCR detection of pBI121 - rd29A - GUS

为了进一步验证所克隆 rd29A 启动子的完整性和有效性,构建了 rd29A 启动子驱动 GUS 基因的植物表达载体 pBI121 - rd29A - GUS,通过农杆菌介导

法转化烟草,并通过组织化学染色法对转基因烟草叶片中 GUS 酶活性进行研究,进而研究 rd29A 启动子能否驱动目的基因的有效表达。GUS 基因编码的 β -D-葡萄糖醛酸酶是从大肠杆菌 K-12 菌株分离出的一种酸性水解酶,能催化许多 β -葡萄糖苷酯类物质的水解,其中很多水解产物具有发色团或形成荧光物质,采用某种 β -葡萄糖苷酶作底物,其反应产物可用分光光度、荧光和组织化学的方法检测。其中组织化学法催化的底物是 X-gluc(5-溴-4-氯-3-吲哚葡萄糖苷),产物为蓝色化合物,因此具有 GUS 活性的部位或位点呈现蓝色或蓝色斑点,可用肉眼或显微镜观察到。本实验中,转基因烟草叶片染色后出现蓝色斑点,而未转化植株叶片并没有蓝色斑点的出现,充分说明 rd29A 启动子能够驱动 GUS 基因在烟草中有效表达,rd29A 启动子的克隆是成功的。因此,可以在后续的马铃薯抗旱转基因研究中直接应用。

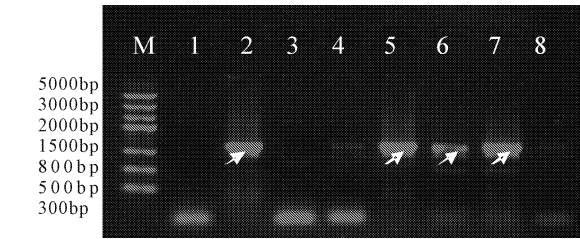


注:A.选择培养基上浸染后 7 d 的烟草叶盘; B.选择培养基上浸染后 14 d 的烟草叶盘; C.选择培养基上浸染后 21 d 的烟草叶盘; D.在加有 75 mg·L⁻¹ Kan 的生根培养基上的抗性苗。

Note: A. Leaf discs in the selective culture media after 7 days; B. Leaf discs in the selective culture media after 14 days; C. Leaf discs in the selective culture media after 21 days; D. The resistant seedlings in the rooting media with 75 mg·L⁻¹ Kan.

图 5 抗性苗的获得过程

Fig.5 Induction of resistant seedlings

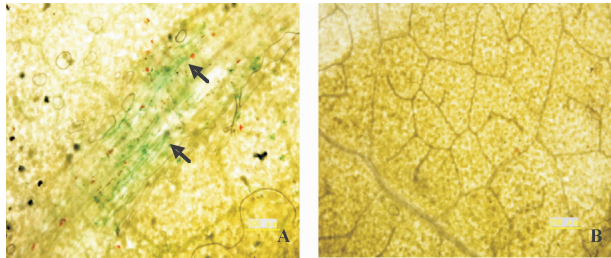


注: M: MarkerⅢ; 1:空白对照; 2:阳性对照(以质粒 pBI121 - rd29A - GUS 为模板); 3:阴性对照; 4~8:转化植株。

Note: M: MarkerⅢ; 1: Blank; 2: Positive control(plasmid pBI121 - rd29A - GUS as templet); 3: Negative control; 4~8: Transgenic plants.

图 6 转基因烟草的 PCR 检测结果

Fig.6 PCR detection of Nicotiana tabacum transformant



注:图 A 中箭头所指为转基因烟草叶片的蓝色斑点
Notes: The arrow is pointing to the blue spots of Nicotiana tabacum transformant in figure A

图 7 烟草叶片中 GUS 酶活性的组织化学检测结果

Fig.7 Results of histochemical staining of GUS activity

参 考 文 献:

[1] 姜东燕,于振文.土壤水分对小麦产量和品质的影响[J].核农学报,2007,21(6):641-645.

[2] 付秋实,李红岭,崔健,等.水分胁迫对辣椒光合作用及相关生理特性的影响[J].中国农业科学,2009,42(5):1859-1866.

[3] Sunilkumar G, Mohr L, Lopata-Finch E, et al. Developmental and tissue-specific expression of CaMV 35S promoter in cotton as revealed by GFP[J]. Plant Molecular Biology, 2002,50:463-474.

[4] 纪巍,李杰,朱延明,等.不同启动子调控的 *DREB1A* 基因对黄瓜的遗传转化[J].东北农业大学学报,2005,36(4):442-447.

[5] 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):492-497.

[6] 押辉远,秦广雍,霍裕平. *Prd29A* 及 *DREB1A* 的克隆和干旱诱导型植物表达载体的构建与鉴定[J].植物生理学通讯,2005,41(3):371-375.

[7] 江香梅,黄敏仁,王明麻.植物抗盐碱、耐干旱基因工程研究进展[J].南京林业大学学报(自然科学版),2001,25(5):57-62.

[8] Xiong L, Schumaker K S, Zhu J K. Cell signaling during cold, drought and salt stress[J]. Plant Cell, 2002,14:2165-2183.

[9] 万小荣,莫爱琼,刘帅,等.粤油 7 号花生 *AhNCED1* 基因启动子克隆及其活性分析[J].核农学报,2011,25(4):692-699.

[10] 谷俊涛,赵红梅,刘祝玲,等.农杆菌介导白三叶草高效遗传转化和转基因植株再生[J].草业学报,2007,16(2):84-89.

[11] 孙勇如.遗传学指南[M].长沙:湖南科学技术出版,1989:450-452.

[12] 汪波,彭定祥,孙珍夏,等.根瘤农杆菌介导苕麻转绿色荧光蛋白(GFP)基因植株再生[J].作物学报,2007,33(10):1606-1610.

[13] 杨锦芬,郭振飞,杨静.根瘤农杆菌介导苕麻转绿色荧光蛋白(GFP)基因植株再生[J].草业学报,2007,16(3):21-28.