

1 个新水稻组成型启动子的克隆与功能鉴定

魏 晶 毛伟华 林拥军 陈 浩

华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室/华中农业大学国家植物基因研究中心(武汉), 武汉 430070

摘要 根据基因芯片数据库和 RT-PCR 验证得到 1 个高活性的水稻组成型表达基因(TIGR Locus: LOC-Os07g34589), 用 PCR 技术从籼稻品种明恢 63 基因组中克隆得到其上游启动子 P_{SU1} , 长度为 1 941 bp; 将其与 β -glucuronidase(*GUS*) 报告基因融合构建植物表达载体 DX2181b- P_{SU1} , 利用玉米 *Ubiquitin* 启动子融合 *GUS* 报告基因构建表达载体 DX2181b- P_{Ubi} 作为对照, 通过根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) 介导法将 DX2181b- P_{SU1} 和 DX2181b- P_{Ubi} 转化梗稻品种中花 11。组织化学染色表明, 含 DX2181b- P_{SU1} 的转基因植株中, *GUS* 基因在幼苗期叶片、叶鞘、根, 抽穗期叶片、叶鞘、茎秆、颖壳、雄蕊和成熟期的叶片、叶鞘、茎秆、胚、胚乳中均有表达, 说明 P_{SU1} 为组成型启动子。对 *GUS* 表达活性进行定量分析表明, P_{SU1} 启动子的活性约为玉米 *Ubiquitin* 启动子活性的 1/3~1/2, 但是 P_{SU1} 表现出了更好的表达稳定性。

关键词 水稻; 组成型启动子; *GUS* 报告基因; *GUS* 染色; *GUS* 定量

中图分类号 S 511.503; Q 343.1⁺2 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2012)02-0139-08

高活性的启动子在植物基因功能研究和遗传改良中具有非常好的应用前景, 目前植物基因工程中普遍使用的组成型启动子主要为花椰菜花叶病毒(CaMV)的 35S 启动子^[1]、根癌农杆菌 Ti 质粒的胭脂碱合成酶基因 *NOS* 启动子^[2], 以及玉米泛素蛋白 *Ubiquitin* 启动子^[3]。CaMV 35S 启动子和 *NOS* 启动子虽然不是来源于植物, 但能驱动外源基因在大部分植物中表达, 因而在植物基因工程中的应用极为广泛, 在转基因水稻、拟南芥、马铃薯、小麦等植物的研究中都有应用。CaMV 35S 启动子在双子叶植物中有较高的表达量, 但在单子叶植物中启动活性较低^[4]。有研究^[5]表明内源型启动子在驱动转基因盐藻外源基因的高效稳定表达中比外源启动子更具有优势。此外, 在植物基因工程中应用从病毒中克隆出来的启动子序列, 可能存在潜在的生物不安全性^[6]。因此, 克隆植物内源组成型启动子非常重要。玉米 *Ubiquitin* 启动子在禾本科等单子叶植物中具有较高的表达活性, 是禾本科植物基因工程中常用的启动子。虽然玉米 *Ubiquitin* 启动子在很多组织中都有高活性, 但其在成熟的组织中的活性明

显下降^[7]。

水稻是分子生物学的模式植物之一, 也是世界上最主要的粮食作物之一。目前在水稻中已经克隆了一批高活性的组成性表达启动子, 如 *Act1*^[8-9]、*OsTubA1*^[10]、*OsCc1*^[11]、*RuBQ1* 和 *RuBQ2*^[12]。虽然这些启动子在单子叶植物包括水稻中都有较高的活性, 但也存在各种各样的问题。比如 *OsCc1* 几乎在所有的组织都有活性, 但是其在根、愈伤组织等非光合组织中有高活性, 在成熟的叶片等光合组织中活性显著降低^[11]。*OsTubA1* 在根尖、幼嫩的叶片、颖花等生长旺盛的组织中有较高活性, 但是在成熟和衰老的组织中活性较低^[10]。*RuBQ1* 和 *RuBQ2* 表达活性为 CaMV 35S 启动子的 8~35 倍, 但不够稳定^[12]。*Oshox24P* 在各组织中均有表达, 但表达量只有在干旱诱导下才会升高^[13]。

组成型启动子为植物基因工程中应用最早、最为广泛的一类启动子。在转基因育种或用于研究基因功能时, 为了充分发挥外源基因表达产物的功能一般都使用组成型启动子使外源基因在植物中高效、稳定、持久地表达。为了避免同时使用同一个启动子驱动 2 个或 2 个以上的外源基因而导致基因沉

收稿日期: 2011-05-20

基金项目: 国家转基因专项(2008ZX08010-002)

魏 晶, 硕士研究生, 研究方向: 水稻基因工程。E-mail: jing-wei@hotmail.com

通讯作者: 陈 浩, 博士, 副教授, 研究方向: 水稻基因工程。E-mail: hchen@mail.hzau.edu.cn

默或共抑制的现象,需要用不同的启动子分别驱动外源基因、筛选基因和报告基因。虽然在先前的研究中一些水稻组成性启动子被分离和鉴定,这些研究工作大都是由国外的研究团队完成。分离一批具有自主知识产权的组成性启动子,对于减少未来知识产权纠纷具有重要意义。Wang 等^[14]构建了一个水稻全生育期 39 种不同组织来源的全基因组表达芯片检测数据库。根据此数据库的结果,本研究挑选了 1 个表达量高且在各组织中表达量相对稳定的基因 LOC-Os07g34589, TIGR rice annotation (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>) 注释此基因为蛋白翻译因子 (protein translation factor *SUI1*, putative, expressed)。

1 材料与方法

1.1 菌株

大肠杆菌菌株 Top10、农杆菌菌株 EHA105 均由华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室保存。启动子验证表达载体 DX2181b 由华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室博士研究生叶荣建改造。

1.2 供试水稻品种

籼稻品种明恢 63 (MH63)、粳稻品种中花 11 (ZH11) 由华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室保存。

1.3 RT-PCR

用 Trizol (Invitrogen, 美国) 法抽提水稻各组织 RNA。将抽提的 RNA 作为模板, 利用 SuperScript[®] III RT 转录酶 (Invitrogen, 美国) 反转录获得相应的 cDNA (操作见 Invitrogen 公司产品说明书)。

以反转录的 cDNA 产物作为模板, 通过 PCR 方法验证候选基因的表达模式。根据该基因的 cDNA 序列设计 RT-PCR 引物, 引物编号为 Rp-F、Rp-R, *Actin1* 基因引物编号为 Actin-F、Actin-R, 序列见表 1。

PCR 反应体系为: cDNA 模板 1 μ L (150 ng/ μ L), 10 \times PCR Buffer 2 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μ L, Rp-F/Actin-F (20 mmol/L) 0.2 μ L, Rp-R/Actin-R (20 mmol/L) 0.2 μ L, *r Taq* DNA 聚合酶 (TaKaRa, 中国大连) 0.2 μ L, 加 ddH₂O 至 20 μ L。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 28 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min。PCR 产物置于 1% 琼脂糖凝胶电泳, 产物预期大小

为 292 bp。

1.4 启动子的克隆与序列分析

以 LOC-Os07g34589 基因上游 2 kb 左右作为启动子区域, 并设计 PCR 扩增引物, 引物序列编号为 P_{SUI1}-F、P_{SUI1}-R, 序列见表 1。

表 1 引物编号及其序列

Table 1 The numbers and sequences of primers

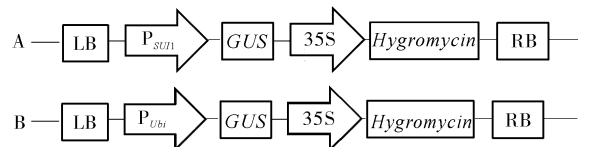
名称 Name	序列 Sequence
Rp-F	5'-TCTCGACATTCAGATCCCAAC-3'
Rp-R	5'-CCGGCCTGAACAAGAAAAT-3'
Actin-F	5'-GCCACACTGTCCCCATCTAT-3'
Actin-R	5'-GCGACCACCTTGATCTTCAT-3'
P _{SUI1} -F	5'-cgcggatccTACCCTGTGAGGAGGAGGTG-3'
P _{SUI1} -R	5'-aaactgcagCCGGGCCGTATATAGTGGTA-3'
GUS-F	5'-GGGCGAACAGTTCCTGATTA-3'
GUS-R	5'-CGAAATATTCCCGTGCACCT-3'

在 P_{SUI1}-F 引入 *Bam*H I 酶切位点及保护碱基, 在 P_{SUI1}-R 引入 *Pst* I 酶切位点及保护碱基。

利用 CTAB 法^[15] 从 MH63 中提取水稻总 DNA, 将 MH63 总 DNA 作为 PCR 模板。PCR 反应体系为: MH63 总 DNA (150 ng/ μ L) 1 μ L, 10 \times PCR Buffer 2 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μ L, P_{SUI1}-F (20 mmol/L) 0.2 μ L, P_{SUI1}-R (20 mmol/L) 0.2 μ L, *Ex Taq* 酶 (TaKaRa, 中国大连) 0.2 μ L, 加 ddH₂O 至 20 μ L。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 2 min; 94 $^{\circ}$ C 40 s, 58 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min, 28 个循环; 72 $^{\circ}$ C 7 min。PCR 产物置于 1% 琼脂糖凝胶进行电泳, 产物预期大小为 1 941 bp。PCR 产物经凝胶回收试剂盒 (TaKaRa, 中国大连) 纯化后 TA 克隆于 pEGM-T Vector (Promega, 美国)。TA 克隆阳性质粒进行测序鉴定并获得无碱基突变的启动子克隆, 该启动子命名为 P_{SUI1}。

1.5 植物表达载体的构建

利用 *Bam*H I 和 *Pst* I 酶切 TA 克隆获得后 P_{SUI1} 启动子序列, 然后克隆于启动子验证载体 DX2181b 上, 用于驱动报告基因 *GUS* 的表达, 获得



A: DX2181b-P_{SUI1}; B: DX2181b-P_{Ubi}。

图 1 表达载体 T-DNA 区结构示意图

Fig. 1 Schematic map of T-DNA region of the expression vectors

的最终植物表达载体命名为 DX2181b-P_{SU11} (图 1-A)。利用 *Hind* III 和 *Bam*H I 酶切笔者所在实验保存的质粒 pBar13-Cry2A* 获得玉米 *Ubiquitin* 启动子, 然后克隆于载体 DX2181b 上, 获得表达载体 DX2181b-P_{Ubi} (图 1-B)。

1.6 水稻的遗传转化

以 ZH11 成熟种子的胚经诱导后产生的愈伤组织作为转化受体, 用含有表达载体的根癌农杆菌 EHA105 侵染, 共培养后用 50 mg/L 的潮霉素筛选 2 代得到抗性愈伤, 经分化、生根获得转基因植株^[16]。DX2181b-P_{SU11}、DX2181b-P_{Ubi} 载体转化所得到的植株分别命名为 P_{SU11} 和 P_{Ubi}。

1.7 转基因植株的阳性检测

取转基因植株幼苗叶片, 利用小量抽提 DNA 法抽提其基因组 DNA, 以其作为模板用 *GUS* 基因内部引物 PCR 扩增 *GUS* 基因进行阳性检测。引物编号为 GUS-F、GUS-R (表 1)。

PCR 反应体系: 转基因植株基因组 DNA (150 ng/ μ L) 1 μ L, 10 \times PCR Buffer 2 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μ L, GUS-F (20 mmol/L) 0.2 μ L, GUS-R (20 mmol/L) 0.2 μ L, *rTaq* DNA 聚合酶 (TaKaRa, 中国大连) 0.2 μ L, ddH₂O 14.4 μ L。扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 28 个循环, 72 $^{\circ}$ C 7 min。产物大小为 450 bp。

1.8 阳性植株 GUS 活性的组织染色

分别取 T₀ 代 P_{SU11} 转基因植株幼苗期的叶片、叶鞘、根, 抽穗期的叶片、叶鞘、茎秆、颖花、根, 成熟期的叶片、叶鞘、茎秆、根、胚及胚乳切成适当大小, 浸泡入 GUS 染色液^[16] 中, 置于 37 $^{\circ}$ C 恒温培养箱染色 10 h, 然后用 95%、75% 乙醇各脱色 1 次, 观察。

1.9 阳性植株 GUS 定量测定

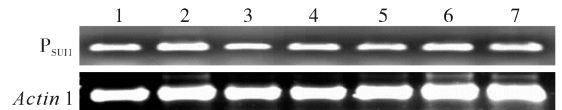
分单株取 T₀ 代 P_{SU11} 和 P_{Ubi} 阳性植株幼苗期叶片和根, 抽穗期的叶片、叶鞘、茎、颖花, 蜡质期的叶片、叶鞘、茎、种子。将所取的水稻组织样品用液氮磨成粉末, 取约 0.6 g 粉末于 1.5 mL 离心管, 加入 1 mL 蛋白抽提缓冲液 (50 mmol/L 磷酸缓冲液 pH 7.0、0.1% Triton X-100、0.1% SDS; 10 mmol/L β -巯基乙醇 10 mmol/L Na₂-EDTA) 混匀冰上静置 10 min, 12 000 r/min 离心 10 min 后吸取上清, 此上清即为总蛋白提取液。采用 Bradford 法^[16] 测定总蛋白浓度, 将总蛋白提取液与考马斯亮蓝反应 (体积比 1 : 3), 用酶标仪测定其总蛋白浓

度。采用 Jefferson 法测定 GUS 蛋白活性^[17], 结果以所生成的 4-MU 的量与总蛋白含量和时间的比值 pmol/(mg \cdot min) 表示。

2 结果与分析

2.1 水稻组成型启动子的特异性鉴定

以 MH63 的胚乳、成熟胚愈伤、根、叶片、叶鞘、茎秆和颖花等不同组织的总 RNA 反转录的 cDNA 作为模板, 进行 RT-PCR 验证候选基因 Os07g34589 的表达模式; 以水稻内源 *Actin1* 基因作为对照。结果显示: 候选基因和 *Actin1* 的表达模式一致, 在水稻胚乳、成熟胚愈伤、根、叶片、叶鞘、茎秆、根和颖花中均为组成性表达, 且表达量基本一致; 从 RT-PCR 扩增产物的浓度来判断, Os07g34589 的表达量没有 *Actin1* 高 (图 2)。



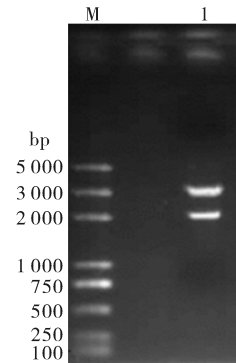
1: 胚乳 Endosperm; 2: 愈伤 Callus; 3: 根 Root; 4: 叶片 Leaf; 5: 叶鞘 Leaf sheath; 6: 茎秆 Stem; 7: 颖花 Spikelet.

图 2 Os07g34589 基因表达模式的验证

Fig. 2 The expression pattern of Os07g34589

2.2 水稻组成型启动子的克隆

以 MH63 总 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 成功获得了预期的约 1.9 kb 启动子片段, 命名为 P_{SU11}, 并将其 TA 克隆到载体 pGEM-T Vector 上, 结果 (图 3) 显示阳性 TA 克隆经 *Bam*H I 和 *Pst* I 双酶切检测, 外源扩增片段已成功连入 pGEM-T Vector 中。



M: DNA 标准分子质量 DNA marker; 1: pGEM-T+P_{SU11} TA 克隆 *Bam*H I / *Pst* I 双酶切 TA clone of pGEM-T+P_{SU11} digested by *Bam*H I / *Pst* I.

图 3 P_{SU11} 启动子 TA 克隆的酶切鉴定

Fig. 3 Restriction enzyme digestion analysis of TA clone with P_{SU11} promoter

1 taccct **gtga** ggaggagggtg gaggagggaa gagaacgacc aagaactcga
 GTGANTG10
 51 ceggaa **gata** tggatcgaga aggcggtcgc tcggettctg ctagtgcgct
 GATA box
 101 gtccttgggtg ctctccctct tcttggettg gatgcctcct atagagag
 151 gggaaaagg gggaggaatt tatagatggg aggaggagga tcttggttt
 201 tctttgctc tctctctc tcttgccgc aaacctgct gttaaaagg
 251 tgttgggac ttgctgctc cegttagatc atcgttttt gtgggttgt
 301 ctgtgggcag ccaactctgt gttgcctgtg tgc **ccaat** at gggagattg
 CCAAT box
 351 cgctcgcga cgagcaaat tctttttt ttgtatg gaaaaaccta
 401 atagttcgtt tcatacttt catgc **tattc t** gtaaaa **tta tt** ttttgat
 -10PEHVPSBD TATA box5
 451 ttta **gata** tt attaaaagt gctgggtgat ggtggagtgc tgaattcag
 501 atattgctac ctaaagtat taaataggcg agt **gata** tta gagatgtgt
 551 getagttgaa cgtgtattga ggaggtgcac teacacatgc acatgagcac
 601 aaagtgtgtg cgtaa **gtac** c ttgcatctaa tcgaaaaagg ataaataa
 CURECORECR
 651 aaaataagtc aattgtcttt aactactaaa taaaattgg gatggagtaa
 701 gacatgtcct taatgatgtg c **gata/tgacg** aatgcacaaa ctataaatt
 UASF1MOTIFCAMV
 751 atataattat atgtttaat ctttg **ccaat** acgttcagaa tatcttcatt
 801 ctatttttt aaaaaaa **tc tctctc** tta ccattgagt tcagctagaa
 CTRM CAMV35S
 851 agatttttt attcaagaag agtttgatga **caat** tatggc tacctcgaat
 CAAT box1
 901 aatttaactt catgacagag atgtgaacgt a **tattct** aag **caat** aatgat
 951 ttcatttcc cacttaatta ctaagaaaa cgaagctagt gtagcgactc
 1 001 tttt **ttattt** agcccgattg ccactaaagt aggtggatga gttttcttg
 1 051 catagtcta gttatcagcg ctacatatat aaggtctcat tttatatta
 1 101 gcacacgttc cctatattgt tagttagggg **gtga** aaacgg tgcagaaact
 1 151 tttcggattc tagacctatt ttgaaaatg aaatctgctg gttggaatt
 1 201 tetcaaaact tetggaatt ttatgactga aataccctgg gtcttttt
 1 251 ttgactga aacagtgaat accatggat ttggatg **tta ttt** tttaaaa
 1 301 aatattgtt atgcaaatc gaagtacat aagaatttt tcccgcatt
 1 351 gggatttate aacagcgtta ctctcttaa ca **tatataa** t **ttattt** cata
 TATA box4 TATA box5
 1 401 cattgtgtt tatgat **gtac** tgttgagact taa **caat** tga act **tatataa**
 CAAT box1 TATA box4
 1 451 tttgtgttt atgatgaatt gttaccgtt gagactgag aattggatt
 1 501 atcagtttga ggggtttttg tattcc **gata** aatttcata cegtattcc
 1 551 gccggttctg ttttctccg ttttcggtt c **gata** atatt cgattccatt
 1 601 ttcataaccg gttttctgat tccgattcag aaaaaaata aaaaataa
 1 651 t **gata** aaagt tgtttctg cgtttcc **gta c** cgttttcc ccctattgtt
 1 701 agtgatggcc agagagaaga tagcttgtg gaggcaciaa gtaaaaaag
 1 751 **caat** attgaac cgatgagcac aaataaat tatggttc **t ataat** ctatg
 CAAT box1 TATA box
 1 801 ccattgcaaa tttgtgaat tgaaaaaata tctactat ccgttgat
 1 851 tggctgtgt ccatgggtat atttgtaa aattttaatt tctcaattg
 1 901 taagaaaaa tatacacta tatacggccc ggacgtagt g

图 4 目的片段的核苷酸序列

Fig. 4 Nucleotide sequence of purpose gene

2.3 水稻组成型启动子的序列分析

对鉴定后的3个阳性克隆分别进行测序,通过软件 Sequencher 4.6 分析,并与 NCBI 上发表序列比较,选出无碱基突变的阳性克隆进行测序,结果表明启动子全长为 1 941 bp。对该启动子用生物数据库 PLACE(<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>)进行分析表明,其存在多种其他组成型启动子中含有的启动子通用元件如 TATABOX 和 GATABOX、CCAATBOX、-10PEHVPSBD、CTRM-CAMV35S、ASF1MOTIFCAMV 等(图 4),与其基因组组成型表达的模式(图 2)检测结果相符。

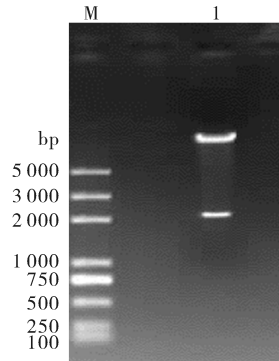
TATABOX 是真核生物启动子的基本元件,是许多通用转录因子的装配位点,一般位于转录起始位点上游 23~30 bp 处。我们分离的目标启动子有 9 个典型的 TATABOX 序列(TATAWAW),其中 -146 bp 的 TATA box 序列前 36 bp 处有 CAAT box,通过对老鼠近球形蛋白基因启动子的 CAAT-BOX 元件的研究发现,该元件的完整性直接影响启动子的强弱^[18], -491 bp 的 TATA box 序列前 6 bp 处有 CAAT box, -931 bp 的 TATABOX 序列前 60 bp 处有 CAAT box。但是后面的 2 个 TATA box 距离 5'-UTR 太远,与 Jin 等^[19]推断的结果不符,他们分析转录起始位点在 5'-UTR 上游附近。因此 -146 bp 的 TATABOX 可能为该启动子真实的 TATA box。

2.4 水稻的遗传转化

将 P_{SU11} 启动子构建于启动子验证载体 DX2181b 上获得转化载体 DX2181b- P_{SU11} 。将重组表达载体经 *Bam*H I 和 *Pst* I 双酶切检测表明,目的片段已成功连接 DX2181b(图 5)。将玉米的 *Ubiquitin* 启动子也构建于 DX2181b 上获得转化载体 DX2181b- P_{Ubi} 作为 P_{SU11} 启动子的对照。

通过农杆菌介导的方法将表达载体 DX2181b- P_{SU11} 和 DX2181b- P_{Ubi} 导入到粳稻品种 ZH11。通过 PCR 的方法剔除阴性的转基因再生水稻植株,最终共获得转 DX2181b- P_{SU11} 载体的 T_0 代独立转化植

株 46 株,转 DX2181b- P_{Ubi} 载体的 T_0 代独立转化植株 28 株。



M: DNA 分子标准质量 DNA marker; 1: DX2181B + P_{SU11}
*Bam*H I/*Pst* I 双酶切 DX2181b+ P_{SU11} digested by *Bam*H I and *Pst* I.

图 5 表达载体 DX2181b+ P_{SU11} 的酶切鉴定

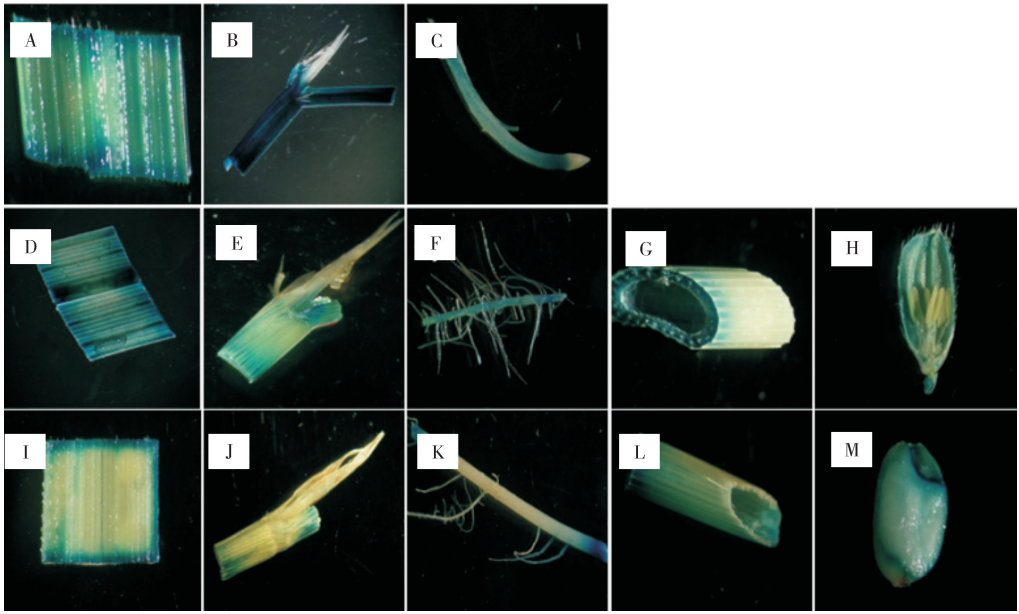
Fig. 5 Restriction enzyme digestion analysis
of DX2181b+ P_{SU11}

2.5 转基因植株的 GUS 染色

对 T_0 代转基因水稻植株不同发育时期的不同组织进行 GUS 染色检测。结果显示, P_{SU11} 转基因水稻在幼苗期的叶片、叶鞘和根,在抽穗期的叶片、叶鞘、茎秆、颖壳、雄蕊和根,以及成熟期的叶片、叶鞘、茎秆、胚、胚乳和根中均检测到较强的 *GUS* 基因表达活性。该结果初步证明, 1 941 bp 的 P_{SU11} 启动子为组成型启动子,可以驱动 *GUS* 基因在转基因水稻的叶片、叶鞘、茎秆、根、颖壳、雄蕊、胚和胚乳中组成型表达(图 6)。

2.6 P_{SU11} 启动子表达活性的定量分析

为明确了解 P_{SU11} 启动子的表达活性,我们随机选择 GUS 染色呈阳性的 20 株 T_0 代 P_{SU11} 水稻植株和 16 株 T_0 代 P_{Ubi} 水稻植株幼苗期的叶片和根,抽穗期的叶片、叶鞘、茎、颖花,蜡质期的叶片、叶鞘、茎、种子的样品,抽提总蛋白,测其 *GUS* 蛋白活性。结果显示,在水稻不同发育时期的不同组织中, P_{SU11} 驱动 *GUS* 基因的表达活性大致为 *Ubiquitin* 启动子的 1/3~1/2。对比不同转基因单株的 *GUS* 定量分析结果,我们发现 P_{SU11} 的标准差明显低于 P_{Ubi} , P_{SU11} 单株在不同的时期所有被检测的样品中的表达稳定性均明显好于 *Ubiquitin* 启动子(表 2)。



A: 幼苗期叶片 Leaf in seedling stage; B: 幼苗期叶鞘 Leaf sheath in seedling stage; C: 幼苗期根 Root in seedling stage; D: 抽穗期叶片 Leaf in heading stage; E: 抽穗期叶鞘 Leaf sheath in heading stage; F: 抽穗期根 Root in heading stage; G: 抽穗期茎秆 Stem in heading stage; H: 抽穗期颖花 Spikelet in heading stage; I: 成熟期叶片 Leaf in maturity stage; J: 成熟期叶鞘 Leaf sheath in maturity stage; K: 成熟期根 Root in maturity stage; L: 成熟期茎秆 Stem in maturity stage; M: 成熟期胚及胚乳 Seed in maturity stage.

图 6 P_{SUI1} 阳性转基因水稻植株在不同发育时期各组织器官的 GUS 组织化学分析

Fig. 6 GUS histochemical analysis of various tissues and organs of P_{SUI1} transgenic plants at different development stages

表 2 P_{SUI1} 和 P_{Ubi} GUS 活性测定¹⁾

Table 2 GUS activity of P_{SUI1} and P_{Ubi} transgenic rice plants

pmol/(mg · min)

组织器官(时期) Tissues or organs (Stage)	<i>n</i>	P_{SUI1}	<i>n</i>	P_{Ubi}
叶片(幼苗期) Leaf (Seedling stage)	20	1 390.63±215.74 def	16	4 134.16±2 150.34 b
根(幼苗期) Root (Seedling stage)	20	1 375.82±164.46 ef	16	4 780.81±1 526.83 ab
叶片(抽穗期) Leaf (Heading stage)	20	1 277.12±194.00 f	16	4 630.6±2 008.58 b
叶鞘(抽穗期) Leaf sheath (Heading stage)	20	1 522.51±256.21 bc	16	5 912.16±1 732.32 a
茎秆(抽穗期) Stem (Heading stage)	20	1 628.64±187.63 ab	16	5 283.61±1 196.14 ab
颖花(抽穗期) Spikelet (Heading stage)	20	1 386.71±222.73 def	16	4 612.82±2 065.58 b
叶片(成熟期) Leaf (Maturity stage)	20	1 485.93±86.31 cde	16	4 350.29±2 515.42 b
叶鞘(成熟期) Leaf sheath (Maturity stage)	20	1 670.95±146.84 a	16	5 869.02±3 060.89 a
茎秆(成熟期) Stem (Maturity stage)	20	1 749.48±225.10 a	16	4 767.23±2 736.93 ab
种子(成熟期) Seed (Maturity stage)	20	1 506.54±262.84 bcd	16	4 618.42±2 356.08 b

1) 数据表示为平均数±标准差,不同小写字母表示转基因水稻植株组织不同组织器官相比具有显著差异 Values are the means± S_a , different lower letters show significantly different from tissues and organs of transgenic rice plants at $P<0.05$, respectively.

3 讨论

根据 Wang 等^[14]的基因芯片的检测结果,本研究的目标基因 $SUI1$ (Os07g34589)在 100 个表达最稳定的水稻基因中的表达量很高,其平均表达水平仅次于 Os12g43600,排在第 2 位。我们用 RT-PCR 对 Os07g34589 进行了基因表达模式的初步检验,发现 Os07g34589 的表达量低于内参基因 $Actin 1$

的表达量(内参基因 $Actin 1$ 的 RT-PCR 引物参照基因 Os03g50885 的 mRNA 序列设计)。我们利用 Os07g34589 和 Os03g50885 的蛋白质序列在 TIGR rice annotation 网站 (<http://rice.plantbiology.msu.edu/>) 进行 Blastp 搜索,发现 $SUI1$ 基因和 $Actin1$ 基因在水稻基因组上均存在多个拷贝。其中与 Os07g34589 高度同源的基因(蛋白质序列一致性高于 90%)位点有 2 个(Os01g58220、

Os05g41900),与 Os03g50885 高度同源的基因(蛋白质序列一致性高于 90%)位点有 9 个(Os05g01600、Os03g61970、Os11g06390、Os01g73310、Os10g36650、Os12g06660、Os01g64630、Os05g36290、Os12g44350)。因此我们推断这 2 个基因的 RT-PCR 检测结果是多个基因表达的混合样。由于有基因多拷贝的存在,RT-PCR 结果只能用于推断基因表达模式的初步参考,不能判断特定基因的表达强弱。

我们将目标启动子与 *GUS* 报告基因融合,通过定量检测 *GUS* 蛋白的表达活性确定启动子的表达强度。玉米 *Ubiquitin* 启动子是目前单子叶植物中最常使用的组成性强启动子,在本研究中我们采用 *Ubiquitin* 启动子作为研究的对照启动子,选取了 3 个发育时期(苗期、抽穗期和成熟期)的不同组织和器官(叶片、叶鞘、根、茎、颖花和种子)为代表,全面对比了目标启动子和 *Ubiquitin* 启动子的表达活性。常用的玉米 *Ubiquitin* 启动子实际上包含了 *Ubiquitin* 基因启动子区域,5'非翻译区和第 1 个内含子^[20]。而在 TIGR rice annotation 网站对 Os07g34589 的基因结构注释表明 Os07g34589 有 4 个 mRNA 异形体,其中 3 个 mRNA 异形体的 5'非翻译区含有 1 个约 1 kb 的内含子。我们分离 Os07g34589 的启动子仅仅只包含了其转录起始位点下游 220 bp 的序列(即没有包含完整的 5'非翻译区和第一个内含子),这可能是造成我们分离的目标启动子比 *Ubiquitin* 启动子弱的原因。进一步的研究将分离 Os07g34589 启动子区和完整的 5'非翻译区和第一个内含子,以检测是否可以提高目标启动子的表达活性。

前人的研究^[21]发现 *Ubiquitin* 启动子的表达活性在植株的成熟期会明显下降。由于我们测定的 *GUS* 活性是单位总蛋白内所含有的 *GUS* 蛋白催化 4-MUG 生成 4-MU 的速率,而在成熟期水稻各组织中的总蛋白的含量也显著下降,因此在成熟期测定的 *GUS* 活性相对苗期和抽穗期并没有出现明显的下降。此外,在成熟期,目标启动子表达的 *GUS* 活性相对 *Ubiquitin* 启动子并没有显著上升,这表明目标启动子和 *Ubiquitin* 启动子的表达活性在成熟期的变化趋势应该一致。

我们分单株检测了 20 棵 T_0 代 P_{SUI} 和 16 棵 T_0 代 P_{Ubi} 独立转化单株,对于所检测的不同发育时期的不同组织和器官, P_{SUI} 转基因植株的表达活性的方差均小于 P_{Ubi} 转基因植株。该结果表明:虽然整

体上目标启动子的活性低于玉米 *Ubiquitin* 启动子,但是目标启动子在不同转基因家系中的表达稳定性好于 *Ubiquitin* 启动子。提高外源基因表达的稳定性,无论是用于转基因育种,还是基因功能验证都是有利的,因为外源基因在不同转基因植株中表达量相对稳定可以使不同转基因单株表现出来的目标性状相对一致从而有利于对目标性状进行准确的评价。

参 考 文 献

- [1] ODELL J, NAGY F, CHUA N. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter [J]. *Nature*, 1985, 313(28): 810-812.
- [2] KIM S, KIM Y, AN G. Identification of methyl jasmonate and salicylic acid response elements from the nopaline synthase (nos) promoter [J]. *Plant Physiology*, 1993, 103(1): 93-97.
- [3] CHRISTENSEN A, QUAIL P. Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and or screenable marker genes in monocotyledonous plants [J]. *Transgenic Research*, 1996, 5(3): 213-218.
- [4] BATTRAW M J, HALL T C. Histochemical analysis of CaMV 35S promoter β -glucuronidase gene expression in transgenic rice plants [J]. *Plant Molecular Biology*, 1990, 15(4): 527-538.
- [5] 曲东京, 李杰. 不同启动子驱动下转基因盐藻外源基因的稳定表达 [J]. *中国生物工程杂志*, 2007, 27(3): 47-53.
- [6] 陈雪梅, 张春晓, 王文棋, 等. 植物基因启动子研究进展 [J]. *遗传学报*, 2004, 31(12): 1455-1464.
- [7] CORNEJO M J, LUTH D, BLANKENSHIP K M, et al. Activity of a maize ubiquitin promoter in transgenic rice [J]. *Plant Molecular Biology*, 1993, 23(3): 567-581.
- [8] MCELROY D, ZHANG W, CAO J, et al. Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation [J]. *The Plant Cell Online*, 1990, 2(2): 159-163.
- [9] MCELROY D, BLOWERS A D, JENES B, et al. Construction of expression vectors based on the rice actin 1(Act1) 5' region for use in monocot transformation [J]. *Molecular and General Genetics*, 1991, 231(1): 150-160.
- [10] JEON J S, LEE S, IUNG K H, et al. Tissue-preferential expression of a rice β -tubulin gene, *OsTubA1*, mediated by the first intron [J]. *Plant Physiology*, 2000, 123(3): 1000-1005.
- [11] JANG I C, CHOI W B, LEE K H, et al. High-level and ubiquitous expression of the rice cytochrome c gene *oscc1* and its promoter activity in transgenic plants provides a useful promoter for transgenesis of monocots [J]. *Plant Physiology*, 2002, 129(4): 1468-1473.
- [12] WANG J, OARD J. Rice ubiquitin promoters: deletion analysis and potential usefulness in plant transformation systems [J]. *Plant Cell Reports*, 2003, 22(2): 129-134.
- [13] 杨梅, 熊立仲. 水稻干旱诱导型启动子 *Oshox24P* 的分离与鉴

- 定[J]. 华中农业大学学报, 2011, 30(5): 525-531.
- [14] WANG L, XIE W B, YING C, et al. A dynamic gene expression atlas covering the entire life cycle of rice [J]. The Plant Journal, 2010, 61: 752-766.
- [15] STEWART C, VIA L E. A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications [J]. Biotechniques, 1993, 14(5): 748-749.
- [16] 林拥军. 农杆菌介导的水稻基因转化研究[D]. 武汉: 华中农业大学图书馆, 2002.
- [17] 黄海群, 林拥军. 水稻 *rbcs* 基因启动子的克隆及结构功能分析[J]. 农业生物技术学报, 2007, 15(3): 451-458.
- [18] DELVOYE N, DESTROISMAISONS N, WALL L. Activation of the beta-globin promoter by the locus control region correlates with binding of a novel factor to the CAAT box in murine erythroleukemia cells but not in K562 cells[J]. Molecular and Cellular Biology, 1993, 13(11): 6968-6969.
- [19] JIN Y F, BIAN T F. Isolation and expression of a wheat pollen-specific gene with long leader sequence[J]. Acta Botanica Sinica, 2004, 46(11): 1347-1356.
- [20] 张宝石. 玉米 *Ubiquitin* 启动子的克隆及功能鉴定[J]. 沈阳农业大学学报, 2006, 37(1): 9-12.
- [21] PARK S H, YI N, KIM Y S, et al. Analysis of five novel putative constitutive gene promoters in transgenic rice plants [J]. Journal of Experimental Botany, 2010, 61(9): 3458-3459.

Isolation and characterization of a novel rice constitutive promoter

WEI Jing MAO Wei-hua LIN Yong-jun CHEN Hao

National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement /
National Center of Plant Gene Research (Wuhan),
Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract A constitutive gene (TIGR Locus; Loc_ Os07g34589) was obtained by combining our lab's database with RT-PCR verification. A novel rice constitutive promoter named P_{SU11} with 1 941 bp was isolated using the genomic DNA of the indica rice variety Minghui63 based on a PCR method. To determine the expression strength and pattern of the novel constitutive promoter, the cloned promoter was fused with the β -glucuronidase (*GUS*) reporter gene to form plant expression vector DX2181b-P_{SU11}, and the maize ubiquitin promoter was also fused with *GUS* reporter gene to form expression vector DX2181b-P_{Ubi} as the control. Both DX2181b-P_{SU11} and DX2181b-P_{Ubi} were transformed into japonica rice variety Zhonghua11 by *Agrobacterium*-mediated method. *GUS* staining showed that *GUS* gene was expressed in different rice tissues and organs at different growth stages of DX2181b-P_{SU11} transgenic rice plants. Quantitative analysis of *GUS* activity showed that the strength of maize ubiquitin promoter was 2-3 times higher than that of the P_{SU11} promoter, but the expression of P_{SU11} promoter exhibited much more stable than that of maize *Ubiquitin* promoter between transgenic rice lines.

Key words *Oryza sativa*; constitutive promoter; *GUS* reporter gene; *GUS* staining; quantitative analysis of *GUS*

(责任编辑: 张志钰)