

水稻胚乳特异型双向启动子的克隆及功能鉴定

杨梅 王睿 林拥军

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

摘要 以水稻中的1对双向转录基因(TIGR Locus: LOC_Os09g39540 和 LOC_Os09g39550)的翻译起始位点之间的序列作为研究对象, 克隆其序列并进行功能鉴定。以明恢63基因组DNA为模板, 采用PCR法扩增该序列(命名为BDP1), 以正反两个方向插入启动子功能分析载体pDX2181, 分别命名为BDP11和BDP12; 转基因阳性植株的GUS组织化学染色结果证明该启动子为胚乳特异型的双向启动子, 两端的表达水平都很低。将启动子片段距离转录起始位点较短的一端向下游延伸123 bp(命名为BDP2), 以正反两个方向插入启动子功能分析载体pDX2181, 分别命名为BDP21和BDP22; 转基因阳性植株的GUS组织化学染色结果显示该启动子的胚乳特异型双向表达模式维持不变, 表达水平高于BDP1。

关键词 水稻; 双向启动子; GUS报告基因; 组织特异表达

中图分类号 S 511; Q 785 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2016)04-0001-06

在基因工程的研究中, 启动子作为表达载体的重要组成部分受到的关注越来越多。启动子驱动目的基因在植物体内表达的特异性 and 高效性非常关键。早期关于启动子的研究主要集中在组成型启动子上, 比如水稻的Actin1启动子^[1]、OsCcl启动子^[2]及玉米的Ubiquitin1启动子^[3]。但是组成型启动子驱动靶标基因的持续表达不仅造成细胞中能源和物质的浪费, 而且可能由于大量异源蛋白的积累引起植株发育迟缓^[4]。因此, 越来越多的科学家开始关注其他类型启动子的研究和应用。时空特异型启动子可将靶标基因集中在特定时期或组织中表达, 从而避免靶标基因在转基因植株非目标组织中表达造成的弊端。

转基因育种常需要将多个外源基因同时导入受体中并让它们维持同样的表达模式^[5-6], 因此, 单向启动子重复利用的现象频繁。这种方法虽然可以实现多基因同时转入受体的目的, 但是在载体构建过程中时间和材料消耗过大, 而且可能导致基因表达“共抑制”的现象, 造成基因表达沉默^[7]。双向启动子能够同时驱动2个基因在受体中表达, 有效避免上述情况的发生。目前, 利用天然双向启动子进行转基因研究的例子不多, 多数为人工构建的双向启

动子^[8]。Xie等^[9]在CaMV35S的5'端反方向加上mini35S融合成一个双向启动子, 并用该启动子同时驱动GUS和GFP的表达, 转基因烟草的结果证实GUS和GFP可以在受体中成功表达。Uwanogho等^[10]发现小鼠Recql4和Lrrc14基因之间序列为双向启动子; Bellizzi等^[11]研究发现人的SIRT3和PSMD13基因对是由788 bp的双向启动子驱动的; 艾青^[12]研究发现PRR11和FAM33A这2个转录方向相反的基因共用一个启动子, 该启动子能够双向调节这对基因的表达; 张丕燕等^[13]用PCR方法克隆顶头孢霉菌pcbAB-pcbC双向启动子区域, 并证明这一段DNA区域具有双向启动功能。植物中的研究报道较少, 拟南芥中叶绿素a/b结合蛋白(cab)家族中cab1和cab2基因对之间的序列已被证实为双向启动子^[14]。水稻中胰凝乳蛋白酶抑制基因Ocp1和Ocp2是“头对头”基因, Singh等^[15]分离克隆了该基因对之间的序列并验证其具有双向转录功能。本研究以水稻的1对双向转录基因(TIGR Locus: LOC_Os09g39540 和 LOC_Os09g39550)的翻译起始位点之间的序列为研究对象, 克隆其序列并进行功能鉴定, 旨在为植物基因工程研究提供材料。

收稿日期: 2015-05-21

基金项目: 国家重大科技专项(2011ZX08001-001)

杨梅, 硕士研究生, 研究方向: 水稻基因工程. E-mail: 630530879@qq.com

通信作者: 林拥军, 博士, 教授, 研究方向: 水稻基因工程. E-mail: yongjunlin@mail.hzau.edu.cn

1 材料与方法

1.1 植物材料及菌株材料

粳稻品种中花 11 (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*)、籼稻品种明恢 63 (*Oryza sativa* L. ssp.)、根癌农杆菌菌株 EHA105、大肠杆菌菌株 TOP10 和启动子功能分析载体 pDX2181 均由华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室长期保存。

1.2 试剂

Taq DNA 聚合酶、T₄-DNA 连接酶、各种限制性内切酶和 dNTPs 购自 TaKaRa 公司;反转录试剂盒购自 Invitrogen 公司;T-载体试剂盒和 DNA Marker 购于 Transgene 公司;组织培养中用到的潮霉素、谷氨酰胺、2,4-D、乙酰丁香酮等购自 Sigma 公司;Realtime 试剂盒购自 Roche。引物合成由上海生工完成,测序在金斯瑞完成。

1.3 启动子 BDP1 的克隆及表达载体的构建

本研究在水稻中发现了 1 对相邻且转录方向相反的基因对 (TIGR Locus: LOC_Os09g39540 和 LOC_Os09g39550),预测该双向转录基因对之间的序列为双向启动子。利用 PLACE 数据库对 LOC_Os09g39540 和 LOC_Os09g39550 两个基因的翻译起始位点之间的序列进行顺式作用元件扫描,同时用 MethPrimer 在线软件预测该序列的 CpG 岛,发现其具有双向启动子的结构特征。根据插入载体的方向设计了 2 对引物,序列插入的正向引物为 BDP11-F 和 BDP11-R,序列反向插入的引物为 BDP12-F 和 BDP12-R(左引物添加 HindⅢ 酶切位点,右引物添加 BamHⅠ 酶切位点及相应的保护碱基),对该基因对翻译起始位点之间的序列进行扩增,分别命名为 BDP11 和 BDP12。引物序列如下:

BDP11-F:

CCCAAGCTTGAGAAAACCGAACAAGCCAG,

BDP11-R:

CGGGATCCCGCCGCGAGAAACCTAGAACAA;

BDP12-F:

CCCAAGCTTCGCCGCGAGAAACCTAGAACAA,

BDP12-R:

CGGGATCCGAGAAAACCGAACAAGCCAG;

AAGCTT 为 HindⅢ 酶切位点;GGATCC 为 BamHⅠ 酶切位点。

利用 CTAB 法从明恢 63 中提取基因组 DNA,以此基因组 DNA 为模板,利用 PCR 技术扩增启动子 BDP11 和 BDP12。PCR 反应体系(20 μ L):基因

组 DNA (100 ng/ μ L) 1 μ L, 10 $\times$ ExTaq Buffer 2 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 2 μ L, 左引物 (10 mmol/L) 0.2 μ L, 右引物 (10 mmol/L) 0.2 μ L, ExTaq 酶 (TaKaRa, 日本) 0.2 μ L, 补水至 20 μ L。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分离和凝胶回收试剂盒纯化后克隆到 pEASY-T₃ 载体,测序验证后的阳性克隆经过 BamHⅠ 和 HindⅢ 双酶切后,连入启动子功能分析载体 pDX2181 获得阳性重组质粒,分别命名为 DX2181-BDP11 和 DX2181-BDP12。

1.4 BDP2 的克隆及载体的构建

以 BDP1 启动子序列距离转录起始位点较短的一端向下游延伸 123 bp,命名为 BDP2。重新设计引物 BDP2-F 和 BDP2-R(左右引物均添加 BamHⅠ 酶切位点及相应的保护碱基)序列如下:

BDP2-F:CGGGATCCGAGAAAACCGAACAAGCCAG,

BDP2-R:CGGGATCCCTTGATGTAGACGTTCTCGG

(下划线均为 BamHⅠ 酶切位点)。

利用 PCR 法以明恢 63 基因组 DNA 为模板扩增启动子 BDP2,并导入 pDX2181 获得阳性重组质粒,测序后分别选出序列正向和反向连入的克隆,分别命名为 DX2181-BDP21 和 DX2181-BDP22。

1.5 根癌农杆菌介导的遗传转化

中花 11(粳稻品种)成熟种子的胚诱导后可以产生愈伤组织,用含有上述功能分析载体的根癌农杆菌 EHA105 侵染愈伤组织,共培养后用潮霉素筛选 2 代,筛出的抗性愈伤经分化和生根后得到转基因植株。

1.6 GUS 组织化学染色

转基因植株的 GUS 组织化学染色参照 Jefferson 等^[16]报道的方法。分别取其转基因阳性植株的叶片、叶鞘、穗、茎秆以及成熟期的胚乳剪成合适的大小浸入 GUS 染色液中,置于 37 $^{\circ}$ C 恒温箱中 6~10 h,依次用 95%乙醇和 75%乙醇进行脱色,用莱卡解剖镜(Leica MZFLIII)观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 启动子序列的生物信息学分析

用 PLACE 网站对启动子序列进行顺式作用元件扫描,同时用 BioXM 分析其 GC 含量并用 MethPrimer 预测 CpG 岛,发现在 BDP1 和 BDP2 中只包含 1 个 TATA 盒,同时还包含 ARR1、CGACG、SEF4 等与胚乳特异表达的顺式作用元件(表 1)。而且启动子 BDP1 的 GC 含量为 55.05%,

表 1 启动子 BDP2 序列中与胚乳特异表达相关的顺式作用元件

Table 1 Cis-elements in the promoter BDP2 which is related to endosperm specific expression

元件名称 <i>Cis-elements</i>	出现次数 <i>Frequencies</i>	生物学功能 <i>Biological function</i>
GCN4 motif	1	与水稻谷蛋白基因启动子有关 Related with the promoter of rice glutelin gene
Skn-1 motif	4	胚乳特异表达的顺式作用元件 <i>Cis-acting regulatory element required for endosperm expression</i>
ARR1-binding element	2	与水稻非共生血红蛋白基因启动子有关 Related with the promoter of rice non-symbiotic haemoglobin gene
ACGT motif	2	与水稻谷蛋白基因启动子有关 Related with the promoter of rice glutelin gene
AACA motif	2	与水稻谷蛋白基因启动子有关 Related with the promoter of rice glutelin gene
SEF4 binding site	1	与大豆 7S globulin 基因启动子有关 Related with the promoter of soybean 7S globulin gene
CGACG element	5	与水稻中 α -淀粉酶基因启动子有关 Related with the promoter of rice and barley alpha-amylase gene
DPBFCOREDCDC3	1	与胡萝卜胚胎特异表达基因启动子有关 Related with the promoter of carrot embryo-specific expression gene

BDP2 的 GC 含量为 57.07%。2 个启动子在 50~403 bp 处存在 354 bp 的 CpG 岛,启动子 BDP2 在 530~701 bp 处还存在 1 个长 172 bp 的 CpG 岛。生物信息学分析表明 BDP1 和 BDP2 可能是胚乳特异表达双向启动子。

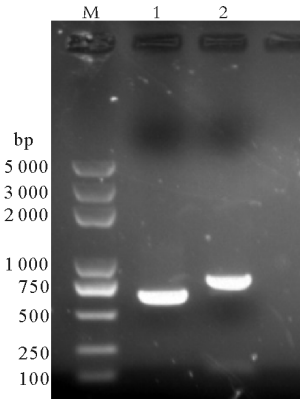
2.2 启动子的克隆、载体构建及转化

以明恢 63 的基因组 DNA 为模板,克隆出的启动子 BDP11 和 BDP12 长度为 634 bp,启动子 BDP2 在启动子 BDP1 的基础上延伸了 123 bp,长度为 757 bp(图 1)。将 PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳分离,凝胶回收试剂盒纯化后克隆到 pEASY-T₃ 载体测序验证,获得的阳性克隆经过酶切后连接到 pDX2181 获得阳性重组质粒(图 2),并利用农杆菌介导法导入粳稻品种中花 11 中,得到的 T₀ 转基因阳性植株种植于大田中。

2.3 GUS 组织化学染色

对 T₀ 代阳性植株的不同组织进行 GUS 组织化学染色。结果显示,启动子 BDP11 和 BDP12 以及 BDP21 和 BDP22 都只在胚乳组织能染出显示 GUS 活性的蓝色,其他组织均未能染色。证明 BDP1 和 BDP2 均为胚乳特异型双向启动子。BDP21 的胚乳染出的蓝色深于 BDP11,且 BDP22 的胚乳染出的蓝色深于 BDP12,而 BDP11 与 BDP12 的表达水平差不多,BDP21 和 BDP22 的表达水平相差不大。说

明同一个启动子两端的表达水平差不多,BDP2 两端的表达水平均高于 BDP1(图 3)。



M:DL2000 marker; 1:BDP1; 2:BDP2.

图 1 启动子 BDP1 和 BDP2 的 PCR 扩增

Fig.1 PCR amplification of promoter BDP1 and BDP2

3 讨 论

双向启动子是指在序列的 2 个方向都能进行转录起始的 DNA 序列,对于转录水平上调节基因共表达起着重要的作用。利用双向启动子驱动多个外源基因同时表达时,能够避免基因沉默的现象,因而双向启动子的应用为克服“基因沉默”这个转基因技术难题提供了一种较好的解决方法。本研究成功克隆了 LOC_Os09g39540 和 LOC_Os09g39 550 两个

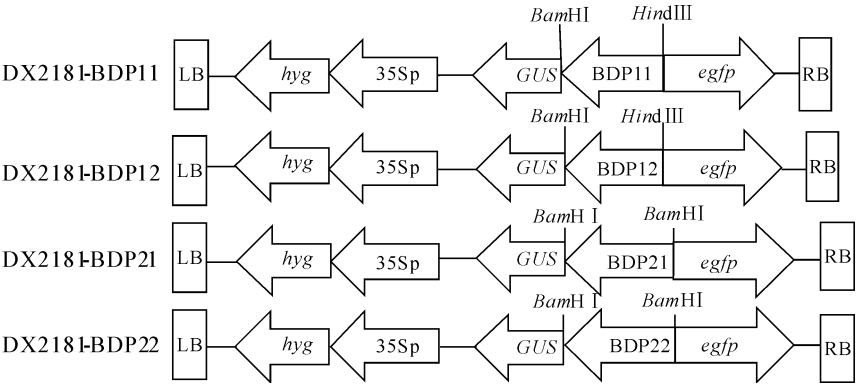


图 2 启动子功能分析载体 T-DNA 区域简图

Fig.2 Schematic diagram of the T-DNA region of fuctional carrier pDX2181 with BDP

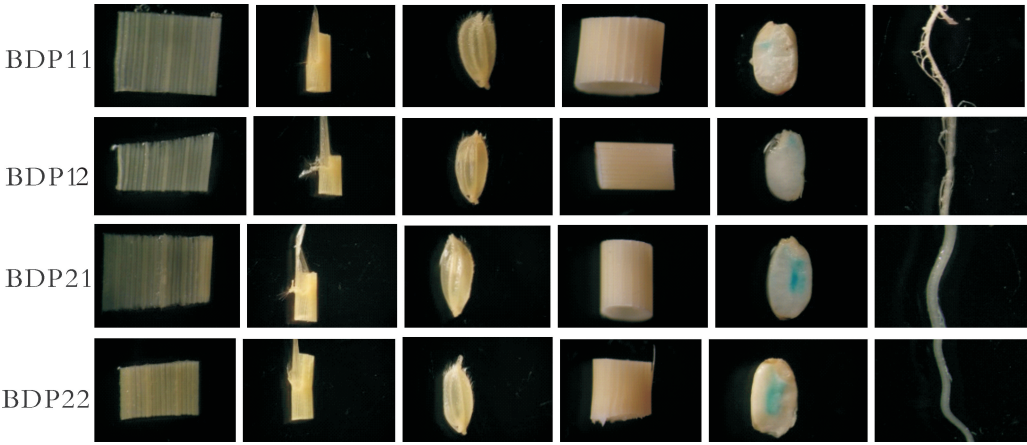


图 3 组织化学分析启动子的表达模式

Fig.3 Histochemical analyses of the expression pattern of promoters

基因翻译起始位点之间的序列并验证其为胚乳特异型双向启动子。胚乳特异型双向启动子可以调控 2 个外源基因同时在胚乳表达,而在其他部位不表达,从而减少外源基因过量表达对植物生长发育产生的影响。同时,不同外源基因在胚乳的表达可以达到改良水稻多个品质的目的。已有报道的有降低血清胆固醇作用的“大豆米”^[17],可预防贫血的“铁蛋白米”^[18]和富含维生素 A 的合成前体 β 胡萝卜素的“黄金大米”^[19-21]是谷蛋白基因 *GluB-1* 启动子分别驱动大豆球蛋白基因、大豆铁蛋白编码序列和八氢番茄红素合成酶基因 (*psy*) 在胚乳特异表达的结果。因而胚乳特异型双向启动子对增加水稻的营养以及水稻品质的改良具有实际的应用价值。目前,来源于水稻内源性胚乳特异型启动子的克隆比较少,如谷蛋白基因启动子^[22]、球蛋白基因启动

子^[23]、醇溶谷蛋白基因启动子^[24]、*DXCP35*^[25]和 *EnP2*^[26]等,且都是单向启动子,而本研究克隆的启动子 BDP2 为胚乳特异型双向启动子,有望应用于转基因育种中,也为启动子的改造和设计提供资源。

启动子的表达模式是由顺式作用元件和相应的转录因子协同作用的结果。对启动子顺式作用元件的分析有助于更好地理解启动子的功能。本研究对启动子 BDP1 和 BDP2 的序列进行生物信息学分析发现其不仅具有双向启动子“少 TATA 盒、GC 含量高及 CpG 岛”的特点,还含有很多与胚乳特异表达有关的顺式作用元件,如:GCN4 motif、AACA 和 ACGT 已被证明是谷蛋白基因启动子胚乳特异表达所必需的顺式作用元件^[27]。BDP2 较 BDP1 则增加了 AGCBOXNPGLB、RHERPATEXPA7、NOD-CON2GM、OSE2ROOTNODULE 等元件。GUS

组织化学染色结果证实了BDP1和BDP2均为胚乳特异型双向启动子。已有不少文献报道基因5'端的外显子和内含子对启动子的活性起增强作用^[28-30]。BDP2是在BDP1距离转录起始位点较近的一端延伸了外显子部分序列,GUS组织化学染色结果显示BDP2两端的表达水平均高于BDP1,说明延伸的外显子序列中存在能增强基因表达的顺式作用元件,这也为顺式作用元件的功能研究提供了可利用的资源。

参 考 文 献

- [1] MCELROY D,ZHANG W,CAO J,et al. Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation[J]. Plant cell,1990,2(2):163-171.
- [2] JANG I C,CHOI W B,LEE K H,et al. High-level and ubiquitous expression of the rice cytochrome C gene *Osc1* and its promoter activity in transgenic plants provides a useful promoter for transgenesis of monocots[J]. Plant Physiol,2002,129(4):1473-1481.
- [3] CHRISTENSEN A H,QUAIL P H. Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and or screenable marker genes in monocotyledonous plants[J]. Transgenic Res,1996,5(3):213-218.
- [4] MOURRAIN P,VAN B R,KOOTER J M,et al. A single transgene locus triggers both transcriptional and post-transcriptional silencing through double-stranded RNA production[J]. Planta,2007,225(2):365-379.
- [5] 张启发.未来作物育种对绿色技术的需求[J].华中农业大学学报,2014,33(6):10-15.
- [6] 刘聃璐,林拥军.葡萄白藜芦醇合酶基因转化水稻的研究[J].华中农业大学学报,2014,33(2):8-14.
- [7] MEYER P,SAEDLER H. Homology-dependent gene silencing in plants[J]. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol,1996,47:23-48.
- [8] LV X,SONG X,RAO G,et al. Construction vascular-specific expression bi-directional promoters in plants[J]. J Biotechnol,2009,141(3/4):104-108.
- [9] XIE M,HE Y,GAN S. Bidirectionalization of polar promoters in plants[J]. Nat Biotechnol,2001,19:677-679.
- [10] UWANOGHO D A,YASIN S A,STARLING B,et al. The intergenic region between the mouse *Recql4* and *Lrrc14* genes functions as an evolutionary conserved bidirectional promoter[J]. Gene,2010,449(1/2):103-117.
- [11] BELLIZZI D,DATO S,CAVALCANTE P,et al. Characterization of a bidirectional promoter shared between two human genes related to aging: *SIRT3* and *PSMD13*[J]. Genomics,2007,89(1):143-150.
- [12] 艾青.人PRR11和FAM33A基因双向启动子的初步鉴定与分析[D].重庆:重庆医科大学,2011.
- [13] 张丕燕,朱春宝,朱宝泉.顶孢霉 *pcbAB- pcbC* 双向启动子区域的克隆与应用[J].微生物学报,2004,44(2):255-257.
- [14] MITRA A,HAN J,ZHANG Z J,et al. The intergenic region of *Arabidopsis thaliana cab1* and *cab2* divergent genes functions as a bidirectional promoter[J]. Planta,2009,229:1015-1022.
- [15] SINGH A,SAHI C,GROVER A. Chymotrypsin protease inhibitor gene family in rice: genomic organization and evidence for the presence of a bidirectional promoter shared between two chymotrypsin protease inhibitor genes[J]. Gene,2009,428:9-19.
- [16] JEFERSON R A,TONY A K,MICHAEL W B. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants[J]. The EMBO journal,1987,6:3901-3907.
- [17] LEE T T T,CHUNG M C,KAO Y W,et al. Specific expression of a sesame storage protein in transgenic rice bran[J]. Journal of cereal science,2005,41:23-29.
- [18] LEE S,JEON U S,LEE S J,et al. Iron fortification of rice seeds through activation of the nicotianamine synthase gene[J]. Proc Natl Acad Sci USA,2009,106(51):22014-22019.
- [19] YE X,AL-BABILI S,KLÖTI A,et al. Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm[J]. Science,2000,287(5451):303-305.
- [20] 杜丽缺,赵明超,林拥军,等. β -胡萝卜素加强的转基因水稻培育[J].华中农业大学学报,2014,33(5):1-7.
- [21] DUBOCK A.黄金大米现状[J].华中农业大学学报,2014,33(6):68-82.
- [22] 张宪银,薛庆中.水稻胚乳特异性启动子 *Gt1* 的克隆及其功能验证[J].作物学报,2002,28(1):110-114.
- [23] NG D W-K,HALL T C. *PvALF* and *FUS3* activate expression from the phaseolin promoter by different mechanisms[J]. Plant Mol Biol,2008,66(3):233-244.
- [24] QU L Q,TAKAIWA F. Evaluation of tissue specificity and expression strength of rice seed component gene promoters in transgenic rice[J]. Plant Biotechnol J,2004,2(2):113-125.
- [25] 颜彦,林拥军.水稻胚乳特异表达启动子 *DXCP35* 的克隆及功能鉴定[J].华中农业大学学报,2014,33(5):15-20.
- [26] 叶荣建.水稻组织特异表达启动子的分离克隆、功能分析及应用[D].武汉:华中农业大学,2012.
- [27] WASHIDA H,WU C Y,SUZUKI A,et al. Identification of cis-regulatory elements required for endosperm expression of the rice storage protein glutelin gene *GluB-1*[J]. Plant Mol Biol,1999,40(1):1-12.
- [28] CARBARINO J E,OOSUMI T,BELKNAP W R. Isolation of a polyubiquitin promoter and its expression in transgenic potato plants[J]. Plant Physiol,1995,109:1371-1378.
- [29] MAAS C,LAUPS J,GRANT S,et al. The combination of a novel stimulatory element in the first exon of the maize *Shrunken-1* gene with the following intron 1 enhances reporter gene expression up to 1000 fold[J]. Plant Mol Bio,1991,16:199-207.

[30] REDDY V S, REDDY A S N. Developmental and cell-specific expression of *ZWICHEL* is regulated by the intron and exon sequences of its upstream protein-coding gene[J]. *Plant Mol Biol*, 2004, 54: 273-293.

Cloning and functional analysis of a bidirectional promoter with endosperm specific expression in rice (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica*)

YANG Mei WANG Rui LIN Yongjun

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

Abstract The sequence between translation initiation site of a bidirectional gene pair(TIGR Locus: LOC_Os09g39540 and LOC_Os09g39550) has been predicted as a bidirectional promoter. This promoter was acquired from the genomic DNA of Minghui 63 by PCR and named as BDP1 and inserted into the promoter function analysis vector pDX2181 in forward and reverse directions (named BDP11 and BDP12). BDP1 was identified as an endosperm-specific bidirectional promoter in transgenic plants with GUS histochemical staining. The expression efficiency of the two directions were low. The promoter fragment was extended 123 bp downstream from the end nearer the transcription start site. The new promoter named as BDP2 was inserted into the promoter function analysis vector pDX2181 in forward and reverse directions (named as BDP21 and BDP22). The expression pattern of the BDP2 was the same as BDP1. The expression efficiency of BDP21 and BDP22 were higher than that of BDP1.

Keywords rice; bidirectional promoter; *GUS* reporter gene; tissue-specific expression

(责任编辑:张志钰)