

水稻干旱诱导型启动子 Oshox24P 的分离与鉴定

杨梅 熊立仲

华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070

摘要 为了挖掘水稻中的逆境诱导型启动子, 挑选了1个受干旱胁迫强烈诱导的水稻内源基因 *Oshox24*, 分离出该基因的启动子(命名为 Oshox24P), 通过酶切连接的方法构建 *GUS* 报告基因表达载体并转化到受体材料中花11中, 通过对转基因后代在不同逆境胁迫下的 *GUS* 活性检测, 证明该启动子强烈地受到干旱胁迫的诱导, 上调表达倍数至十几倍, 同时该启动子还受到脱落酸(ABA)的诱导, 对高盐和低温胁迫的反应并不明显。结果表明, 该启动子属于干旱诱导型启动子, 可以用于控制目标基因在水稻中的表达。

关键词 水稻; 启动子; 诱导型启动子; 干旱; *GUS* 报告基因

中图分类号 S 511.503.53 **文献标识码** A **文章编号** 1000-2421(2011)05-0525-07

干旱等非生物逆境一直是限制作物生长和产量的重要因素, 并且随着全球环境恶化、气候异常等变化将日益危害着我国的粮食生产安全。通过超量表达逆境应答过程中的重要基因可以显著提高作物的抗逆性。传统基因工程中超量表达通常利用的是组成型启动子, 其缺点是对植物可能产生一定的毒害作用和资源浪费; 而诱导型启动子却不同, 它可以驱动目标基因只有在植株受到诱导信号刺激后才上升表达, 不仅节约了植株细胞内有限的资源, 也减轻了目标蛋白对植株可能产生的负面效应, 其目标性和专一性更强。

在水稻等作物中被鉴定出来的逆境诱导型启动子还非常少。水稻 *rab16A* 的启动子活性受 ABA 诱导^[1-2]。拟南芥 *rd29A*^[3] 和 *RAB18*^[4] 的启动子也属于非生物逆境诱导型启动子。大麦中的 *blt101.1* 基因的启动子受低温诱导^[5]。Xiao 等^[6] 分离到的 *OsLEA3-1* 基因的启动子受高盐和干旱诱导并且利用该启动子控制目标基因成功地在水稻中诱导表达。*OsDREB1B* 基因启动子控制下的 *GUS* 基因在转基因拟南芥中可以受到甘露醇、盐、PEG、甲基紫精、寒冷、水杨酸、ABA 的强烈诱导^[7]。*OsABA2* 基因的启动子受到 ABA、盐和干旱诱导, 受 ABA 诱导强度可达到 12 倍^[8]。在最近的报道中, 水稻中的 *OVP3* 启动子受到缺氧胁迫的诱导, 而在盐和冷胁迫

中诱导很微弱^[9]。

启动子的活性特征与其序列息息相关, 逆境诱导型启动子区通常含有多个与逆境相关的顺式作用元件, 常见的如 ABRE (ABA response element, C/GACGTGGC)、DRE (dehydration response element)、LTRE (low temperature response element)、MYB、MYC 识别位点等。许多被 ABA 诱导的启动子通常含有 1 个或多个 ABRE 元件^[10]。而 DRE (A/GCCGAC) 元件和 DRE-like 元件则广泛存在于受 DREB 转录因子调控的下游基因的启动子区^[11-12]。LTRE 是 1 个低温应答的元件, 在多种植物中有报道^[13-14]。

本研究中的候选启动子 Oshox24P 对应的基因为 *Oshox24*, 它属于水稻中的 *HD-Zip* 家族, 在干旱胁迫时受到诱导上升表达^[15]。该家族是一类植物中特有的转录因子家族, 在植株的生长发育和逆境应答中发挥着多种功能^[15-18]。本研究通过构建 *GUS* 报告基因表达载体对 Oshox24P 启动子进行了鉴定, 并对其顺式作用元件进行了分析。

1 材料与方法

1.1 干旱胁迫 RNA 样品的获得

在水稻实验温棚里盆栽种植 3 个水稻品种: 中花 11、珍汕 97 和中旱 5 号 (IRAT109)。将每个品

收稿日期: 2011-04-21

基金项目: 国家转基因重大专项(2008ZX08009-004)

杨梅, 硕士研究生, 研究方向: 水稻逆境分子生物学. E-mail: ymeihzau@163.com

通讯作者: 熊立仲, 博士, 教授, 研究方向: 水稻分子育种. E-mail: lizhongx@mail.hzau.edu.cn

种的种子取 100~200 粒,42 °C 烘干 1 d 后常温浸水 48 h,37 °C 催芽 12 h 后常温放置并保持湿润,2~3 d 后待芽长至 2~3 cm、根长 0.5 cm 以上种植在事先准备好的沙性土壤里。每个品种种 5 排,每排 10 株,保证水肥供应充足。待水稻长到三四叶期时,停止灌水。按照卷叶情况分 4 个时间点取样:断水胁迫前、叶片微卷、叶片半卷和叶片全卷。用液氮取样,采用 Trizol 法(按产品说明书操作)抽提总 RNA。

1.2 实时荧光定量 PCR

提取的总 RNA 先用没有 RNA 酶活性的 DNA 酶(购自 Invitrogen)处理,然后利用 Superscript III 反转录试剂盒进行反转录,再利用 TaKaRa SYBR Premix Ex Taq 试剂盒、ABI PRISM 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems) 仪器检测不同时间点中基因的相对表达量。候选基因 *Oshox24* 的扩增引物序列为 *Oshox24RTF* (5'-ATCACCTAGACTACTTGGGCGG-3') 和 *Oshox24RTR* (5'-TTGGCCATATCTCCCA-CAGATC-3'),预扩增序列 78 bp;内参基因 *Actin1* 的扩增引物序列为 *Actin1RTF* (5'-TGGCATCTCTCAGCACATTCC-3') 和 *Actin1RTR* (5'-TGCACAATGGATGGGGCAGA-3'),预扩增序列为 76 bp。利用相对定量的方法通过与内参基因的比较计算出目标基因的相对表达量变化^[19]。

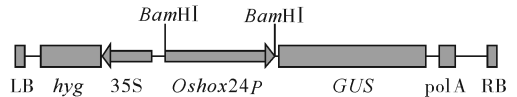
1.3 启动子顺式作用元件预测

将该启动子上游 1 918 bp 的序列在 PLACE 网站 (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>) 进行顺式作用元件预测,得到多个顺式作用元件的名称、位置、保守序列信息以及与该顺式作用元件相关的文献等信息的链接,通过进一步查阅文献可以得到顺式作用元件的更多资料。

1.4 启动子-GUS 表达载体的构建及转化

根据 *Oshox24* 基因的 BAC 编号 (AP004868)、基因注释编号 (LOC_Os02g43330) 以及 cDNA 克隆编号 (AK063685) 找出该基因上游 2.5 kb 的序列,设计合成 1 对引物 *Oshox24PF* (5'-ATAGGATCCAGACGAGAAAGGAGTGCC-3') 和 *Oshox24PR* (5'-ACAGGGATCCCGAATGTAAGAC-CAGAGCA-3'),并在引物 5' 端添加限制性酶切位点 *Bam*H I (用下划线表示,酶切位点前加 3 个碱基为保护碱基) 分离该基因的启动子。首先利用引物 *Oshox24PF* 和 *Oshox24PR* 以中旱 5 号基因组 DNA 为模板进行扩增,反应体系为 20 μ L GC buff-

er I (TaKaRa 公司) 体系,反应条件是:94 °C 预变性 5 min;94 °C 30 s,55 °C 30 s,72 °C 2 min,32 个循环;72 °C 延伸 7 min。PCR 产物连入 pGEM-T Easy 载体上,筛选阳性克隆并测序。测序验证后,通过 *Bam*H I 单酶切从 pGEM-T Easy 阳性克隆上回收 *Oshox24P* 再将其连接到 *GUS* 表达载体 p1391Z (来自 CAMBIA 公开使用的载体,载体含有 *GUS* 报告基因) (图 1)。酶切验证阳性克隆并检测插入方向正确后,通过农杆菌介导的水稻遗传转化体系导入到水稻品种中花 11 中^[20]。同时将不连接外源片段的 p1391Z 空载体转化水稻品种中花 11 作为对照。



潮霉素基因 (*hyg*) 为抗性筛选标记基因 The *hyg* gene is hygromycin resistance selectable marker.

图 1 *GUS* 报告基因表达载体示意图

Fig. 1 Scheme of the expression construct with a *GUS* reporter gene

1.5 水稻苗期的逆境胁迫处理

对 T_0 代转基因植株进行阳性检测。对 T_1 代种子进行潮霉素 (HN) 抗性筛选发芽,随机选取 3 个转启动子阳性家系和 1 个转空载体阳性对照家系,将发芽的苗子一部分种于小红桶的沙土中生长至四叶期做干旱胁迫,一部分种于小方盒内生长至三四叶期做高盐、ABA 和 4 °C 冷胁迫。其中干旱胁迫方法如“1.1”中所述,取胁迫前、叶片微卷、叶片半卷、叶片全卷 4 个时间点的样品。小方盒内用的是生根培养基,高盐胁迫是在小方盒内加入一定浓度的浓度为 200 mmol/L 的 NaCl 溶液,取胁迫 0、3、6、24 h 时间点的样品;ABA 胁迫是在每个小方盒内加入一定浓度的浓度为 100 mmol/L 的 ABA 溶液,取胁迫 0.0、0.5、3.0、24.0 h 时间点的样品,冷胁迫是将小方盒放入 4 °C 冷库中,取胁迫 0、6、12、24 h 样品。每份样品取的是该家系的混合样。

1.6 GUS 染色

将植株新鲜的组织器官用剪刀剪下浸泡于 *GUS* 染液^[21] 中,置于 37 °C 恒温箱内温育一段时间至样品变蓝,再用 70% 乙醇脱色后拍照记录。

1.7 GUS 比酶活的测定

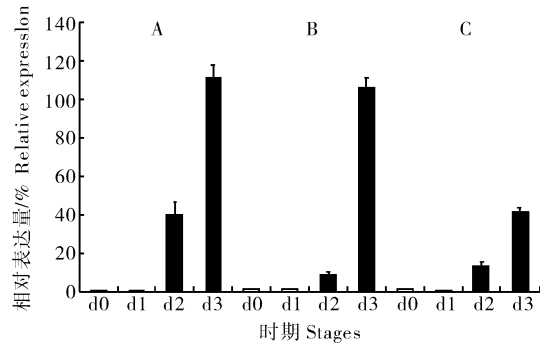
样品用液氮磨样,通过 *GUS* 抽提液 (50 mmol/L Na_2HPO_4 , pH 7.0, 10 mmol/L β -mercaptoethanol, 10 mmol/L Na_2EDTA , 0.1% Sarkosyl,

0.1% Triton-100)抽提总蛋白,从样品中取出一定量的蛋白进行 GUS 活性定量分析。具体步骤如下:通过 Bradford 法^[22]测得样品的总蛋白浓度,再根据浓度用移液器量取一定体积的相同质量的总蛋白,用相同质量的总蛋白质加入 0.4 mL GUS 提取缓冲液,再加入 10 μL 40 mmol/L 的底物 MUG(4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide),在 37 °C 温育一定时间后,加入 1.6 mL 反应终止液(0.2 mol/L Na₂CO₃),每个反应设置 3 个技术重复;用 Tecan 光栅型酶标仪 infinite M200 测量各个样品在激发光 365 nm、发射光 455 nm 处的荧光值,同时以 50 nmol/L MU 的荧光值作为参比,进而通过以上数据计算出各个样品中 GUS 蛋白的比酶活,即 1 μg 总蛋白每分钟反应底物 MU 的量(单位 pmol/(min · μg))。

2 结果与分析

2.1 *Oshox24* 在干旱胁迫时的表达量

通过对水稻基因表达谱芯片数据和水稻干旱诱导基因表达谱芯片数据(笔者所在的实验室未发表数据)的分析,挑选到了 1 个受干旱强烈诱导上调表达的基因 *Oshox24*。通过 Real-time PCR 的方法,对候选基因 *Oshox24* 在干旱胁迫条件的表达量变化进行了验证,从图 2 中可以看出,该基因在中早 5 号和中花 11 中受干旱诱导倍数高达 100 倍以上,在胁迫后的 3 个时间点呈现逐渐上升的趋势,在叶片半卷和全卷时期诱导倍数上升最快;在珍汕 97 中诱导上升表达约 40 倍,明显低于中早 5 号和中花 11,这可能是由于不同品种间该基因启动子序列的差异



d0:干旱胁迫前 Before drought stress; d1: 叶片微卷 Slight leaf-drooping; d2:叶片半卷 Moderate leaf-rolling; d3:叶片全卷 Complete leaf-rolling(下同 The same as belows). 各个时间点的 *Oshox24* 基因相对表达量以中花 11 的 d0 为参照(即设定为 1) Expression level of every sample was compared with that of d0 in Zhonghua 11.

图 2 *Oshox24* 基因在苗期中早 5 号(A)、中花 11(B)、珍汕 97(C)干旱胁迫的表达量变化

Fig. 2 Expression level of *Oshox24* at seeding stage in IRAT 109(A), Zhonghua 11(B), Zhenshan 97(C)

造成。以上结果表明,*Oshox24* 是 1 个受干旱强烈诱导表达的基因。

2.2 *Oshox24P* 的顺式作用元件分析

将分离到的 *Oshox24* 基因的启动子(*Oshox24P*)的序列测序后在 PLACE 数据库进行顺式作用元件预测,结果如图 3 所示。结果表明,*Oshox24P* 含有大量的与逆境相关的顺式作用元件:含有 ABA 应答元件 ABRE 28 个,脱水反应应答元件 DRE 6 个,低温应答元件 LTRE 6 个。

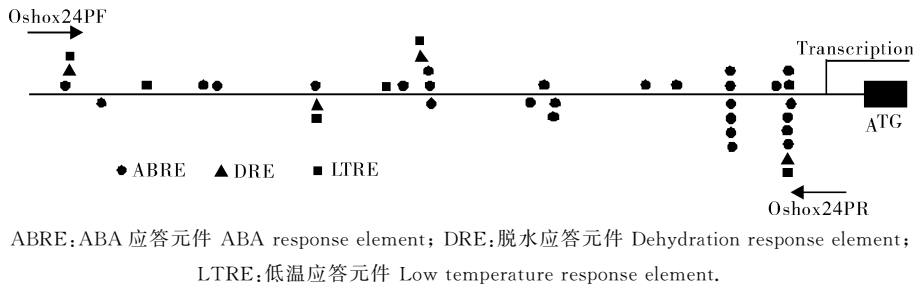


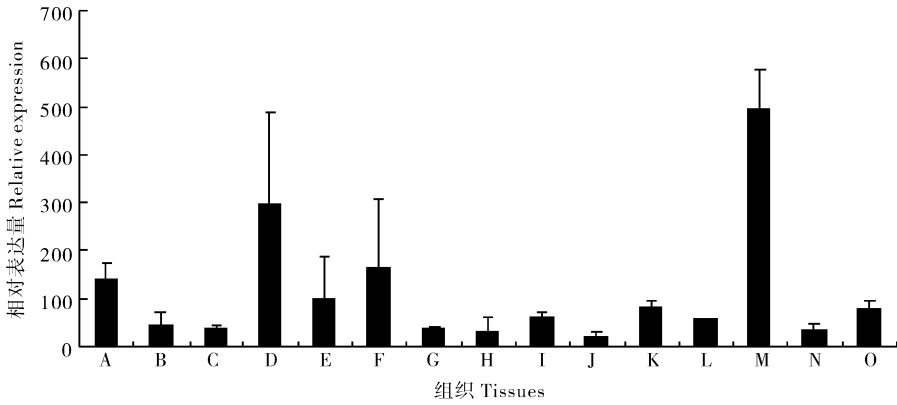
图 3 *Oshox24P* 顺式作用元件分析

Fig. 3 Analysis of putative *cis*-acting elements present in *Oshox24P*

2.3 *Oshox24P* 的组织表达活性

通过 CREP 数据库^[23]中珍汕 97 全基因组 DNA 芯片数据获得了 *Oshox24* 在全生育期不同组织器官中的表达信息,表达谱显示该基因在大多数的器官和组织中表达量比较稳定并且相对较低(图 4)。

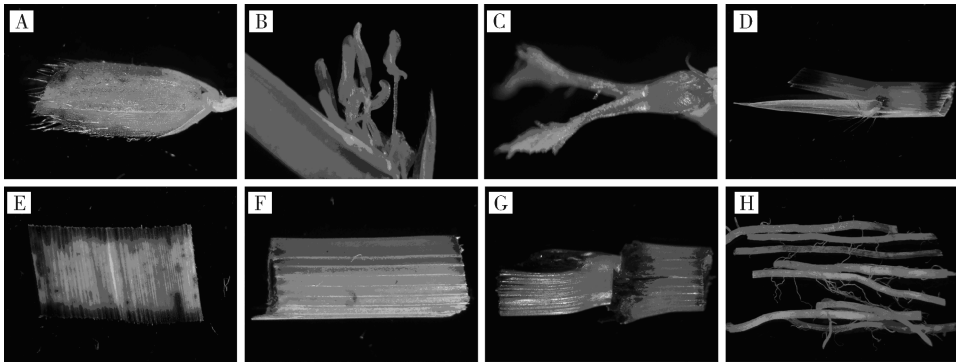
通过对 *Oshox24P*:GUS 转基因植株成熟期的组织染色,发现 *Oshox24P* 启动子具有一定的组织特异性(图 5),在颖壳、叶耳、叶片、节间、节间分生组织、幼根中表达,在节、雄蕊、雌蕊和成熟根中不表达或者表达很弱。



A: 继代 15 d 后的愈伤 Calli of 15 days after subculture; B: 吸水 72 h 后的种子 Seed of 72 hours after imbibition; C: 种子萌发 48 h 后的幼芽 Plumule of 48 hours after emergence; D: 种子萌发 48 h 后的胚根 Radicle of 48 hours after emergence; E: 3 叶期的根和叶片 Root and leaf at three-leaf stage; F: 2 个分蘖时期的根部 Root of seeding with two tillers; G: 2 个分蘖时期的地上部分 Shoot of seeding with two tillers; H: 抽穗期前 5 d 的剑叶 Flag leaf of 5 days before heading; I: 抽穗期前 5 d 的茎秆 Stem of 5 days before heading; J: 4~5 cm 幼穗期的叶片 Leaf of 4~5 cm young panicle stage; K: 4~5 cm 幼穗期的幼穗 Panicle of 4~5 cm young panicle stage; L: 抽穗期的茎秆 Stem of heading stage; M: 开花期前 1 d 的雄蕊 Stamen of 1 day before flowering; N: 抽穗后 14 d 的剑叶 Flag leaf of 14 days after heading; O: 授粉后 21 d 后的胚乳 Endosperm of 21 days after pollination.

图 4 *Oshox24* 基因在 15 个不同组织中的表达谱

Fig. 4 Expression profile of *Oshox24* in 15 different tissues



A: 颖壳 Hull; B: 雄蕊 Stamen; C: 雌蕊 Pistil; D: 叶耳 Auricle; E: 叶片 Leaf; F: 节间 Internode; G: 节 Node; H: 根 Root.

图 5 *Oshox24P* 控制下的 GUS 在不同组织中的活性

Fig. 5 GUS activity in different tissues of *Oshox24P*-GUS transgenic rice

2.4 *Oshox24P* 控制下的 GUS 蛋白的逆境诱导表达活性

对 *Oshox24P*:GUS 转基因植株苗期进行干旱、高盐、ABA 和低温胁迫处理,并检测 GUS 的活性变化(图 6)。可以看出,当植株受到干旱胁迫时,*Oshox24P* 控制下的 GUS 活性随着胁迫程度加深而不断增强,在叶片半卷和叶片全卷时期活性上升幅度最大,与胁迫前相比,在 3 个转基因家系中受诱导倍数分别为 6.3、18.7、2.7 倍(图 6-A);同时在外施 ABA 处理时该启动子控制下的 GUS 蛋白活性也呈现出增强的趋势,变化幅度约 2~3 倍(图 6-C);但在高盐胁迫和冷胁迫时 GUS 蛋白的活性变化不大

或者变化规律不明显(图 6-B,6-D)。

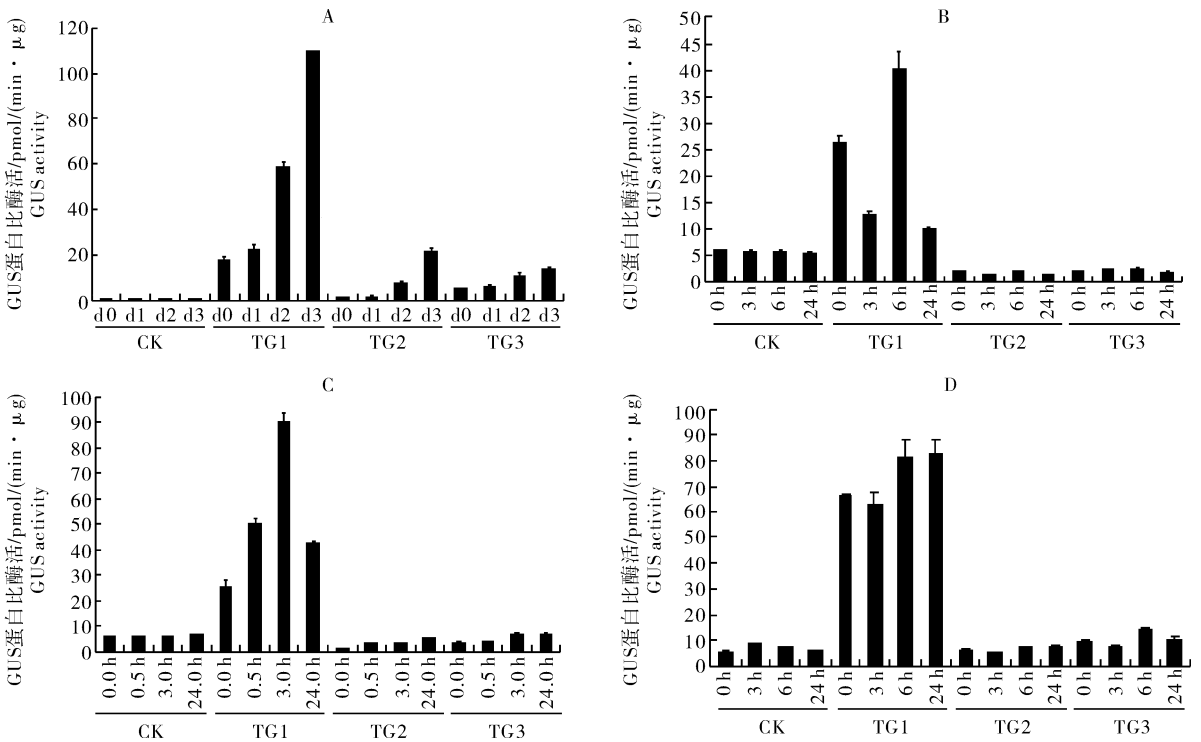
3 讨论

本研究从逆境诱导表达谱芯片数据出发,筛选到受干旱胁迫强烈诱导的基因 *Oshox24*,并通过分离和鉴定该基因的启动子 *Oshox24P* 验证了该启动子是 1 个干旱诱导型启动子。无论是实时荧光定量 PCR 结果(图 2)还是 GUS 活性结果(图 6-A)都表明 *Oshox24* 是 1 个强烈受到干旱诱导上调表达的基因。鉴于该基因编码 1 个 HD-Zip 家族转录因子,由此可以推测该基因很可能参与干旱胁迫信号传递,在植物的抗旱性应答中发挥作用。此外,Os-

hox24P 启动子区含有大量的串联的 ABA 应答元件 ABRE, 在 GUS 活性测定中, 它也稳定地受到 ABA 胁迫的诱导, 尽管诱导程度不是很强烈, 这就暗示着有可能 *Oshox24* 参与的是依赖于 ABA 的逆境信号应答途径。

在 mRNA 水平上分析 *Oshox24* 基因表达量的试验中, 发现该基因在粳稻品种中受干旱上调表达 100 倍以上(图 2), 而在通过 GUS 报告基因鉴定该基因启动子(来源于粳稻品种中早 5 号)活性分析时, GUS 活性受干旱诱导上调表达却最高只有十几倍(图 6-A)。这种现象在前人的报道中也存在, 如水稻中的 *OVP3* 基因在转录水平受到缺氧胁迫诱导上升十几倍, 而启动子连接的 GUS 基因活性在转基因植株中受到缺氧处理只诱导上升 3 倍左右^[9]。笔者认为造成这种差异的原因至少有 2 个: 一是转录水平和转录后水平表达量的差别, 通过半定量、相

对定量或者芯片数据检测的是转录水平的 mRNA 的变化量, 而 GUS 报告基因模拟的是转录后水平或者是蛋白质水平的表达量, 对于 1 个基因的表达来说, 转录水平、转录后水平和蛋白质水平的变化量或者变化趋势是否一致, 中间还存在着很多调控因素; 二是因为启动子序列的范围难以确定, 所分离出来的启动子序列不一定包含了原有的所有结构元件。真核生物中的增强子可能位于核心启动子区的上游几千碱基处, 而且有些基因的 5'UTR、编码区部分序列、内含子等也会影响到启动子的活性^[24-30]。此外, 本研究检测的 3 个独立转化植株中 GUS 活性受干旱诱导的程度很不一样, 这可能与每个独立转化事件中 T-DNA 的插入位置有关; 这一结果也暗示了在利用这一诱导启动子驱动目标基因的表达时需要分析多个独立转化株, 从中找出诱导程度理想的转化植株。



材料 Materials

CK: p1391Z 空载体转化的中花 11, 作为对照家系 Transgenic Zhonghua 11 of p1391Z as a control; TG1、TG2、TG3: p1391Z-Os-hox24P:GUS 转化中花 11 得到的 3 个独立的转基因阳性家系 Three independent positive lines of transgenic Zhonghua 11 of p1391Z-Oshox24P:GUS.

A: 干旱胁迫 Drought stress; B: 200 mmol/L NaCl 胁迫 Salt stress with 200 mmol/L NaCl; 4 个时间点分别是胁迫 0、3、6、24 h Four time points are 0, 3, 6, 24 hours after stress; C: 100 μmol/L ABA 胁迫 100 μmol/L ABA stress; 4 个时间点分别是胁迫 0、0.5、3.0、24.0 h Four time points are 0, 0.5, 3.0, 24.0 hours after stress; D: 4 °C 低温胁迫 Cold stress with 4 °C; 4 个时间点分别是胁迫 0、6、12、24 h Four time points are 0, 6, 12, 24 hours after stress.

图 6 *Oshox24P* 启动子控制下的 GUS 在干旱(A)、高盐(B)、ABA(C)、低温(D)胁迫处理下的表达活性

Fig. 6 GUS activity of the *Oshox24P*-GUS transgenic rice during drought(A), salt(B), ABA(C), cold(D) stress

目前已经有大量的启动子应用于植物基因工程。其中,组成型启动子在这两方面的应用都已经有一段历史,并已经取得很多突出的成就,组织特异性和诱导型启动子近年来才逐渐被重视和应用。例如水稻中的 *rbcs* 基因的启动子早在 1993 年被鉴定为叶肉细胞特异性启动子,同时受光诱导^[31];其后 Garg 等^[32]利用该启动子与拟南芥中的光敏色素基因 *PHYA* 连接转入到水稻中,转基因植株变矮、节间变短、节直径变小,但是每株有效穗数增加,使水稻产量提高 6%~21%;后来 Kim 等^[33]用该启动子控制 *cry1Ac* 基因在水稻中表达,在转基因植株中 *cry1Ac* 能够超量表达 25~100 倍,与对照相比能够显著地减少植株遭受虫害的侵袭。

参 考 文 献

- [1] YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, MINO M, MUNDY J, et al. Analysis of an ABA-responsive rice gene promoter in transgenic tobacco[J]. *Plant Mol Biol*, 1990, 15: 905-912.
- [2] ONO A, IZAWA T, CHUA N H, et al. The rab16B promoter of rice contains two distinct abscisic acid-responsive elements [J]. *Plant Physiol*, 1996, 112: 483-491.
- [3] YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, SHINOZAKI K. Characterization of the expression of a desiccation-responsive *rd29* gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants[J]. *Mol Gen Genet*, 1993, 236: 331-340.
- [4] LANG V, PALVA E T. The expression of a rab-related gene, *rab18*, is induced by abscisic acid during the cold acclimation process of *Arabidopsis thaliana* L. Heynh[J]. *Plant Mol Biol*, 1992, 20: 951-962.
- [5] BROWN A P, DUNN M A, GODDARD N J, et al. Identification of a novel low-temperature-response element in the promoter of the barley (*Hordeum vulgare* L.) gene *blt101.1*[J]. *Planta*, 2001, 213: 770-780.
- [6] XIAO B, HUANG Y, TANG N, et al. Over-expression of a *LEA* gene in rice improves drought resistance under the field conditions[J]. *Theor Appl Genet*, 2007, 115: 35-46.
- [7] GUTHA L R, REDDY A R. Rice DREB1B promoter shows distinct stress-specific responses, and the overexpression of cDNA in tobacco confers improved abiotic and biotic stress tolerance[J]. *Plant Mol Biol*, 2008, 68: 533-555.
- [8] RAI M, HE C, WU R. Comparative functional analysis of three abiotic stress-inducible promoters in transgenic rice[J]. *Transgenic Res*, 2009, 18: 787-799.
- [9] LIU Q, ZHANG Q, BURTON R A, et al. Expression of vacuolar H⁺-pyrophosphatase (OVP3) is under control of an anoxia-inducible promoter in rice[J]. *Plant Mol Biol*, 2010, 72: 47-60.
- [10] MUNDY J, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, CHUA N H. Nuclear proteins bind conserved elements in the abscisic acid-responsive promoter of a rice *rab* gene[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, 87: 1406-1410.
- [11] STOCKINGER E J, GILMOUR S J, THOMASHOW M F. *Arabidopsis thaliana* CBF1 encodes an AP2 domain-containing transcriptional activator that binds to the C-repeat/DRE, a cis-acting DNA regulatory element that stimulates transcription in response to low temperature and water deficit[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94: 1035-1040.
- [12] LIU Q, KASUGA M, SAKUMA Y, et al. Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 1998, 10: 1391-1406.
- [13] BAKER S S, WILHELM K S, THOMASHOW M F. The 5'-region of *Arabidopsis thaliana* *cor15a* has cis-acting elements that confer cold-, drought- and ABA-regulated gene expression [J]. *Plant Mol Biol*, 1994, 24: 701-713.
- [14] JIANG C, IU B, SINGH J. Requirement of a CCGAC cis-acting element for cold induction of the *BN115* gene from winter *Brassica napus* [J]. *Plant Mol Biol*, 1996, 30: 679-684.
- [15] AGALOU A, PURWANTOMO S, OVERNAS E, et al. A genome-wide survey of *HD-Zip* genes in rice and analysis of drought-responsive family members[J]. *Plant Mol Biol*, 2008, 66: 87-103.
- [16] SCARPELLA E, RUEB S, BOOT K J, et al. A role for the rice homeobox gene *Oshox1* in provascular cell fate commitment [J]. *Development*, 2000, 127: 3655-3669.
- [17] DAI M, HU Y, MA Q, et al. Functional analysis of rice HO-MEOBOX4 (*Oshox4*) gene reveals a negative function in gibberellin responses[J]. *Plant Mol Biol*, 2008, 66: 289-301.
- [18] ITOH J, HIBARA K, SATO Y, et al. Developmental role and auxin responsiveness of class III homeodomain leucine zipper gene family members in rice [J]. *Plant Physiol*, 2008, 147: 1960-1975.
- [19] LIVAK K J, SCHMITTGEN T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) method[J]. *Methods*, 2001, 25: 402-408.
- [20] HIEI Y, OHTA S, KOMARI T, et al. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of the boundaries of the T-DNA[J]. *Plant J*, 1994, 6: 271-282.
- [21] JEFFERSON R A, KAVANAGH T A, BEVAN M W. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants [J]. *EMBO J*, 1987 (6): 3901-3907.
- [22] BRADFORD M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248-254.

- [23] WANG L, XIE W, CHEN Y, et al. A dynamic gene expression atlas covering the entire life cycle of rice[J]. *Plant J*, 2010, 61: 752-766.
- [24] LU J, SIVAMANI E, LI X, et al. Activity of the 5' regulatory regions of the rice polyubiquitin *ubi3* gene in transgenic rice plants as analyzed by both GUS and GFP reporter genes[J]. *Plant Cell Rep*, 2008, 27: 1587-1600.
- [25] LU J, SIVAMANI E, AZHAKANANDAM K, et al. Gene expression enhancement mediated by the 5' UTR intron of the rice *ubi3* gene varied remarkably among tissues in transgenic rice plants[J]. *Mol Genet Genomics*, 2008, 279: 563-572.
- [26] SAMADDER P, SIVAMANI E, LU J, et al. Transcriptional and post-transcriptional enhancement of gene expression by the 5' UTR intron of rice *ubi3* gene in transgenic rice cells[J]. *Mol Genet Genomics*, 2008, 279: 429-439.
- [27] VITALE A, WU R J, CHENG Z, et al. Multiple conserved 5' elements are required for high-level pollen expression of the *Arabidopsis* reproductive actin ACT1 [J]. *Plant Mol Biol*, 2003, 52: 1135-1151.
- [28] NORRIS S R, MEYER S E, CALLIS J. The intron of *Arabidopsis thaliana* polyubiquitin genes is conserved in location and is a quantitative determinant of chimeric gene expression[J]. *Plant Mol Biol*, 1993, 21: 895-906.
- [29] ROLLFINKE I K, SILBER M V, PFITZNER U M. Characterization and expression of a heptaubiquitin gene from tomato [J]. *Gene*, 1998, 211: 267-276.
- [30] PLESSE B, CRIQUI M C, DURR A, et al. Effects of the polyubiquitin gene *Ubi*. U4 leader intron and first ubiquitin monomer on reporter gene expression in *Nicotiana tabacum* [J]. *Plant Mol Biol*, 2001, 45: 655-667.
- [31] KYOZUKA J, MCELROY D, HAYAKAWA T, et al. Light-regulated and cell-specific expression of tomato *rbcS-gusA* and rice *rbcS-gusA* fusion genes in transgenic rice[J]. *Plant Physiol*, 1993, 102: 991-1000.
- [32] GARG A K, SAWERS R J, WANG H, et al. Light-regulated overexpression of an *Arabidopsis phytochrome A* gene in rice alters plant architecture and increases grain yield[J]. *Planta*, 2006, 223: 627-636.
- [33] KIM E H, SUH S C, PARK B S, et al. Chloroplast-targeted expression of synthetic *cry1Ac* in transgenic rice as an alternative strategy for increased pest protection[J]. *Planta*, 2009, 230: 397-405.

Isolation and characterization of a drought-inducible promoter Oshox24P in rice

YANG Mei XIONG Li-zhong

National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China

Abstract Abiotic stresses are major limiting factors for crops growth and production, and stress resistance of crops can be significantly improved by overexpressing stress-related genes. In this study we aimed to isolate and identify a stress-inducible promoter which is useful for genetic engineering. Firstly a candidate promoter Oshox24P was screened and fused to GUS expression vector, and then transferred into *japonica* rice Zhonghua 11. GUS activity in transgenic rice plants containing GUS reporter gene under the control of Oshox24P promoter (1 918 bp in length) was induced by drought and the activity increased in response to the increasing severity of drought stress. The GUS activity was slightly induced by abscisic acid (ABA) while treatments of salt and cold had little effect on Oshox24 promoter-driven GUS expression. These results suggest that Oshox24P is a drought-inducible promoter, and will be useful for driving specific expression of target genes or proteins during drought stress, thus for genetic improvement of drought resistance.

Key words rice; promoter; drought-inducible promoter; drought; GUS reporter gene

(责任编辑: 杨锦莲)