



## 1 材料和方法

### 1.1 质粒、菌株和植物

大肠杆菌(*E. coli*) DH5 $\alpha$ 、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)哥伦比亚生态型为本实验室保存。植物表达载体 pBI121 购自 Clontech 公司,植物表达载体 CSBT 由中国科学院遗传研究所陈正华教授惠赠。

### 1.2 酶与试剂

分子生物学实验用各种限制性内切酶、连接酶等购自 Promaga 公司,生化试剂购自 Sigma 公司。所用 DNA 引物由赛百盛生物工程有限公司合成,有引物 8 条,它们的序列分别为: PRSO-01: 3'-GGTCTAGACAATCCCCTATCCTTCG-5'; PRSO-02: 3'-GGGGATCCTGTACAATGTAATTGTAAATA GTAATTGTAAT-5'; PRSB-01: 3'-ATCTACGTC AAGAGTT-5'; PRSB-02: 3'-CCCTCTAGAATGTAGACAA TTGGTGGCCGAGTGACTCCAACCTCTTGACGTAG ATAATTGGTGGCGAGTGACTCC-5'; PRSB-03: 3'-AACTCTTGACGTAGAT-5'; PRSB-04: 3'-CCGGTC GACACTAGTCAAGAGTTGGAGTCACTCGGCCAC CAATTATCTACGTCAAGAGTTGGAGTCACTCGCC ACCAATT-5'; S1: 3'-CGCCAGGGTTTTCCAGTCA C-5'; GUS1: 3'-CGTAATGAGTGACCGCATC-5'。

### 1.3 基础转录元件和翻译增强子构建

植物表达载体 CSBT 的 CaMV35S 启动子下游包含有一个由 68 bp 核苷酸组成的  $\Omega$  元件,该元件来自烟草花叶病毒(TMV)的 126 kDa 蛋白基因的 5' UTR,具有增强翻译的效果。以 PRSO-01、PRSO-02 为引物,质粒 CSBT 为模板,反应体系按说明书进行。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30s,58 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,25 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 产物经 2.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离,回收 157 bp 产物,即获得包含  $\Omega$  序列的 35S 最小转录元件。经 *Xba*I 和 *Bam*HI 酶切后,插入到经同样双酶切的 pUC18,并进行测序确认,得到含基础转录元件和翻译增强子的中间载体 pUSO。

### 1.4 诱导调节序列的合成

利用 DNA 热聚合酶 Tag,采用大引物延伸法合成 DNA 片段。合成分两步进行,第一步先将引物 PRSB-01 和 PRSB-02、PRSB-03 和 PRSB-04 分别

混合延伸;反应程序:将除 DNA 热聚合酶外的成分在 PCR 仪上 95 $^{\circ}$ C 变性 5 min 后,加入 DNA 热聚合酶,然后 45 $^{\circ}$ C 退火 30 s;72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,循环 10 次。第二步将上述两个反应液混合,继续 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s 和 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,循环 10 次,得到长度为 154 bp 的诱导调节序列。PCR 产物克隆到 pGEM-T easy 载体上,并进行测序确认,得到含诱导调节序列的克隆载体,命名为 pGSAR。

### 1.5 表达载体 pCB212 的构建

将诱导调节序列的克隆载体 pGSAR 用 *Sal*I 和 *Xba*I 双酶切,回收 122 bp 的目的片段,与经同样双酶切的含基础转录元件和翻译增强子的中间载体 pUSO 相连,构建成 pBSAR 中间载体;pBSAR 经 *Hind*III/*Eco*RI 双酶切,回收完整的 *GUS* 表达框架,与经同样双酶切的 pCAMBIA1302 相连,构建成以 *GUS* 为报告基因,新合成的 SAR 为启动子的表达载体。

### 1.7 拟南芥转化

采用真空渗透法(vacuum infiltration transformation)<sup>[1]</sup>转化拟南芥。

### 1.8 抗性植株 PCR 检测

采用 SDS 法快速提取植物基因组 DNA。以基因组 DNA 为模板,引物 S1 和 GUS1 为引物,反应体系参照说明书进行 PCR 检测。反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 40 s,55 $^{\circ}$ C 退火 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 40 s,25 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离。

### 1.9 抗性植株 GUS 组织化学分析

抗性植株 GUS 组织化学染色参照 Jeffrson<sup>[2]</sup>的方法进行。

## 2 结果和分析

### 2.1 基础转录元件和翻译增强子构建

以 PRSO-01、PRSO-02 为引物,质粒 CSBT 为模板,进行 PCR 扩增。PCR 产物经 2.5% 的琼脂糖凝胶电泳分离,得到 150 bp 左右的特异扩增产物,大小与预期一致(图略)。回收该目的片断,经 *Xba*I 和 *Bam*HI 酶切后,插入到经同样双酶切的 pUC18,经测序确认与预期的完全一致(图略),获得包含  $\Omega$  序列的 35S 最小转录元件,将该载体命名为 pUSO。

### 2.2 诱导调节序列的合成

为了构建高效率的诱导型启动子,我们将合成

启动子分两部分考虑：一是合成植物启动子的基本转录单元；二是组合病原响应的 DNA 顺式作用元件，构成启动子的诱导调节部分。本研究将来自烟草(*Nicotiana tabacum* L.)*sar2.8b* 基因启动子区的一段重复序列的诱导调节序列 SA 片段、包含了 CaMV35S 启动子的 -62~+2 mini-promoter 序列和来自 TMV 的“Ω”翻译增强序列的基本转录单元连

接，即构成完整的启动子，命名为 SAR 启动子。

### 2.3 改造后的启动子结构分析

对改造后的启动子 SAR 用 PLACE(<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>)扫描分析，结果 SAR 启动子中包含 6 个 W-BOX、1 个 E-BOX 和 2 个 GT-1-BOX 元件(图 1)。这些顺式调节元件均与植物防卫信号转导有关。

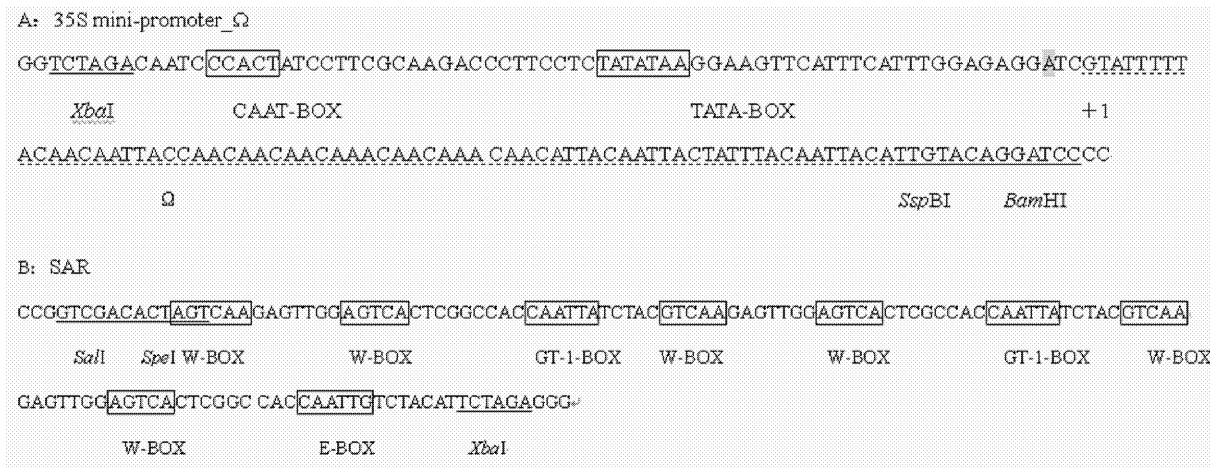


图 1 合成启动子序列与结构

Fig. 1 Sequences and structures of synthetic promoter

### 2.4 植物表达载体的构建

为了研究合成启动子 SAR 的转录活性，我们将上述含诱导调节序列的克隆载体 pGSAR 用 *Sal*I 和 *Xba*I 双酶切，回收 122 bp 的目的片段，与经同样双酶切的含基础转录元件和翻译增强子的中间载体 pUSO 相连，构建成 pBSAR 中间载体；pBSAR 经 *Hind*III/*Eco*RI 双酶切，回收完整的 *GUS* 表达框架，与经同样双酶切的 pCAMBIA1302 相连，构建成以 *GUS* 为报告基因，新合成的 SAR 为启动子的表达载体，经测序确认后命名为 pCB212。

### 2.5 抗性植株 PCR 检测

用真空渗透转化法，将 SAR 启动子及 *GUS* 报告基因转入拟南芥，经潮霉素抗性筛选获得 34 株抗性植株。用引物 S1 和 GUS1 对抗性植株进行 PCR 检测，结果如图 2 所示，所检测植株的扩增结果均与质粒 pCB212 的相同，在 500~750 bp 之间出现一条明亮条带，大小与预期一致，证明抗性植株均含有合成启动子和 *GUS* 基因片段，获得了转基因植株。

### 2.6 合成启动子 SAR 在拟南芥中组织特异性表达

对以上筛选的 T1 代转基因材料进行 *GUS* 组织化学染色，结果除 1 株无显色反应外，其余均有不同程度的显色反应。并且不同叶片 *GUS* 活性分布并不完全一致，但有趣的是，多数叶片 *GUS* 在叶毛特异性表达，其余的可在整片叶中表达，以叶脉中活性最高。

为了进一步确认 SAR 的表达模式，将 T1 代转基因拟南芥进行自交，获得 T2 代转基因株系。随机选取 15 个株系，每个株系随机选取 5 个潮霉素抗性植株进行整株的 *GUS* 组织染色。结果，从染

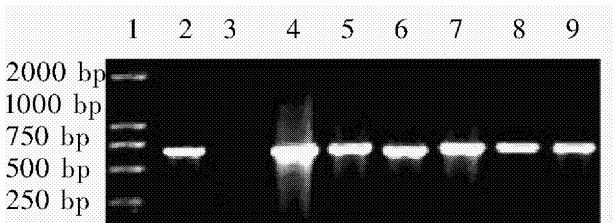


图 2 转基因植株的 PCR 鉴定

Fig. 2 Identification of putative transgenic *Arabidopsis thaliana* by PCR  
 1. DL2000 DNA ladder; 2. 质粒 pCB212 Plasmid pCB212; 3. 野生型拟南芥 Wild type *Arabidopsis thaliana*; 4~9. 拟南芥抗性植株 Putative *Arabidopsis thaliana*.

色强度看,不同株系的 *GUS* 活性不同,且在潮霉素筛选培养基上生长势较强的株系, *GUS* 活性也较强,说明启动子活性受基因整合位置影响很大,即位置效应;从 *GUS* 活性的分布来看,不同的转基因株系, *GUS* 基因的表达模式基本一致:在子叶、根和真叶叶毛中优势表达(图3)。

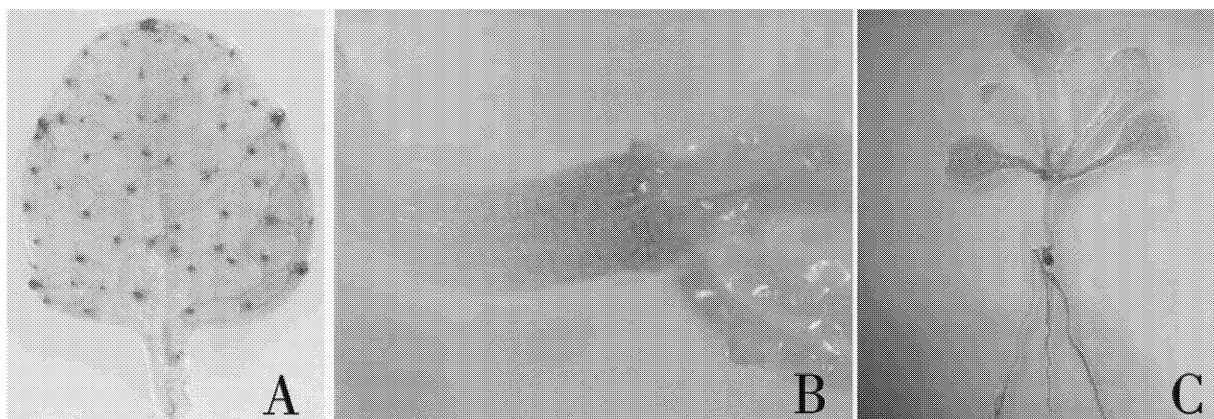


图3 SAR启动子在拟南芥中的表达

Fig. 3 Expression pattern of SAR promoter in *Arabidopsis thaliana*

A 真叶 Leaf; B: 根茎交界处 Rhizome conjoin region; C: 幼苗 Seedling

### 3 讨论

利用病原诱导响应元件合成植物启动子具有广泛的应用前景。如用于 SAR 信号转导途径的研究;目标遗传学中突变体筛选的分子标记以及作物遗传改良等。植物基因表达调控序列-启动子通常具有许多顺式作用元件,每个元件赋予基因1到多个表达特征,从而赋予基因复杂的表达模式。克服这种复杂性的策略之一是在合成启动子中只使用单一的或少数几个作用元件。已报道了一些合成启动子能够在瞬时表达系统中被激发子所诱导<sup>[3-4]</sup>。

病原诱导启动子为合成启动子提供了丰富的“原材料”。大量病原诱导基因及其启动子已得到了深入的研究<sup>[2]</sup>,其中顺式作用元件 GCC 类元件和 W-boxes 元件<sup>[5]</sup>研究得最清楚。W-box [(T)TGAC(C/T)]是植物特有的超基因家族 WRKY 转录因子的结合位点。越来越多的证据表明, W-boxes 是许多病原诱导植物基因的主要顺式作用元件。串连排列的 W-box 往往与病原的诱导特性有关。

W-boxes 或其多拷贝序列可在瞬时表达系统中,赋予最小启动子激发子诱导表达的效果。在植

由图3可见,拟南芥中 SAR 启动子具有组织和发育的特异性:在真叶中, SAR 几乎只在叶毛中表达,而在叶脉中无表达(图3A);在茎中不表达或表达很低,但在根茎交接处有较高的表达(图3B);在根系的多数根段中表达(图3C);在幼叶中的活性低于在老叶(图3C)。

物中,单独的 W-boxes 即可行使病原诱导功能,含 W-box 的 E17 启动子可在转基因拟南芥中快速响应病原物的侵染。同样,包含4拷贝 GCC box 的合成启动子在烟草中响应乙烯的诱导。最近研究表明,转录因子 WRKY 结合位点(W-box)或转录因子 AP2/ERF 结合位点(GCC-like box)足以使启动子获得病原诱导特性,不同结合位点可产生的区别主要在于病原特异性、本底表达水平和响应速度<sup>[4]</sup>。一些 GCC 类元件和 WRKY 转录因子参与了伤诱导基因的表达<sup>[6]</sup>。伤诱导和病原诱导信号网络存在某些共同节点。WRKY 和 AP2/ERF 代表了两大类植物特有的转录因子基因家族,反映了植物需要更多为适应环境而进行调节。与此相一致的是, W-box 和 GCC-like box 的响应作用在植物中相当保守,来自不同植物的同类调节元件在不同植物中均具有相似的响应特征<sup>[4]</sup>。并且“W-box”经常出现在 PR 基因的启动子中,如在拟南芥 *NPR1* 基因启动子中串连排列,它们特异性地被水杨酸诱导的 DNA 结合蛋白 WRKY (AtWRKY18) 识别<sup>[7]</sup>;烟草叶片中 *ERF3* 基因的伤诱导活性也可能由 W-box 所介导<sup>[8]</sup>。

许多光调节基因含有 GT-1 结合位点,如

*RBCS*、*PHYA*、*RCA*、*PETA*、*CHS15*<sup>[9]</sup>。GT-1 能够稳定 TFIIA-TBP-DNA (TATA box) 复合体, GT-1 的激活机制可能是 TFIIA 与 GT-1 的直接相互作用<sup>[10-11]</sup>, GT-1 类因子与 PR-1a 启动子的结合影响水杨酸诱导基因的表达水平<sup>[12]</sup>。E-box 是油菜 (*Brassica napus* L.) 储存蛋白 *napA* 基因高表达所必须的, 与干旱和 ABA 响应有关<sup>[13]</sup>。

我们利用烟草抗病基因中的调节元件, 组合构建成启动子, 并且其在毛刺、子叶、根和根茎交接处组成型表达。启动子包含 W-BOX、GT-1-BOX 和 E-BOX, 调节区来自烟草 *sar2.8b* 基因中的一段重复序列, 该序列并不是 *sar2.8b* 病原诱导表达所必须的<sup>[14]</sup>, 本研究结果说明, 该重复序列可能赋予启动子组织表达的特异性。

## 参考文献

- [1] Zhang F(张锋), Cui B M(崔百明). The primary function analysis of the cotton auxin response factor [J]. *Chin Agri Sci Bull*(中国农学通报), 2007, 23(7): 84-87.(in Chinese)
- [2] 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.
- [3] Rushton P J, Somssich I E. Transcriptional control of plant genes responsive to pathogens [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 1998, 1: 311-315.
- [4] Rushton P J, Reinstadler A, Lipka V, et al. Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen- and wound-induced signaling [J]. *Plant Cell*, 2002, 14: 749-762.
- [5] Eulgem T, Rushton P J, Robatzek S, et al. The WRKY superfamily of plant transcription factors [J]. *Trends Plant Sci*, 2000, 5: 199-206.
- [6] Suzuki K, Suzuki N, Ohme-Takagi M, et al. Immediate early induction of mRNAs for ethylene-responsive transcription factors in tobacco leaf strips after cutting [J]. *Plant J*, 1998, 15: 657-665.
- [7] Yu D, Chen C, Chen Z. Evidence for an important role of WRKY DNA binding proteins in the regulation of *NPRI* gene expression [J]. *Plant Cell*, 2001, 13: 1527-1540.
- [8] Nishiuchi T, Shinshi H, Suzuki K. Rapid and transient activation of transcription of the *ERF3* gene by wounding in tobacco leaves: Possible involvement of NtWRKYs and autorepression [J]. *J Biol Chem*, 2004, 279: 55355-55361.
- [9] Terzaghi W B, Cashmore A R. Light-regulated transcription [J]. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1995, 46: 445-474.
- [10] Gourrierec J, Li Y F, Zhou D X. Transcriptional activation by *Arabidopsis* GT-1 may be through interaction with TFIIA-TBP-TATA complex [J]. *Plant J*, 1999, 18: 663-668.
- [11] Zhou D X. Regulatory mechanism of plant gene transcription by GT-elements and GT-factors [J]. *Trend Plant Sci*, 1999, 4: 210-214.
- [12] Buchel A S, Brederode F T, Bol J F, et al. Mutation of GT-1 binding sites in the Pr-1A promoter influences the level of inducible gene expression *in vivo* [J]. *Plant Mol Biol*, 1999, 40: 387-396.
- [13] Stalberg K, Ellerstrom M, Ezcurra I, et al. Disruption of an overlapping E-box/ABRE motif abolished high transcription of the *napA* storage-protein promoter in transgenic *Brassica napus* seeds [J]. *Planta*, 1996, 199: 515-519.
- [14] Song F, Goodman R M. Cloning and identification of the promoter of the tobacco *sar2.8b* gene, a gene involved in systemic acquired resistance [J]. *Gene*, 2002, 290: 115-124.