

特异性启动子在植物基因工程中的应用

Specific Promoters Used in Plant Gene Engineering

于翠梅¹, 马莲菊², 张宝石^{1*}

YU Cui-Mei¹, MA Lian-Ju² and ZHANG Bao-Shi^{1*}

1 沈阳农业大学 遗传育种系, 沈阳 110161

2 沈阳师范大学 生物系, 沈阳 110034

1 Department of Genetics and Breeding, Agricultural University, Shenyang 110161, China

2 Department of Biology, Shenyang Normal University, Shenyang 110034, China

摘 要 选择特异性启动子构建植物表达载体,是实现基因表达三维调控的重要策略,并已应用于植物品质改良基因工程、抗性基因工程及植物生物反应器等领域。文章综述了特异性启动子的结构、类型、研究方法以及在植物基因工程研究中的应用进展和发展前景。

关键词 特异性启动子,植物基因工程,转基因植物

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)06-0882-09

Abstract The choice of specific promoters used within a transgene construct is a vital strategy to achieve the transgene regulation in the temporal, spatial and measurable manner. The strategy has been widely used in diverse aspects of plant gene engineering, such as quality improvement, resistance breeding and bioreactor. In this paper, we describe the structure feature, classification and research method of the specific promoter and its application progresses in plant gene engineering.

Key words specific promoter, plant gene engineering, transgene plant

自 1983 年首次获得转基因植物以来,植物基因工程的技术在解决人类所面临的粮食、能源和环境危机等方面发挥了很大的作用并显示了良好的前景。然而,在其发展过程中也不可避免地遇到一些问题,例如外源基因在受体植物内往往会出现表达效率低、表达产物不稳定甚至基因失活或沉默等现象,导致转基因植物无法投入实际应用。另外,转基因植物安全性问题也逐步引起人们的关注^[1]。选择特异性的启动子构建植物表达载体,用以调控外源基因在植物体内定时、定位、定量表达是解决上述问题的一个重要策略。本文就已经取得的进展进行综述。

1 特异性启动子概述

启动子是指 RNA 聚合酶及一些反式作用因子识别并与之结合从而正确有效地起始转录的一段特异性的 DNA 序列。不同的启动子使基因具有不同的表达特性。能够使基因在大多数的细胞类型中表达的启动子称为组成型启动子,例如花椰菜花叶病毒(CaMV) 35S 启动子、肌动蛋白(actin)和泛素(ubiquitin)启动子等。使基因表达能够对特异条件产生响应的启动子为特异性启动子。在以往的转基因植物中使用较多的是组成型表达启动子,它们是植物基因工程中应用最早、最广泛的一类启动子,特点是表达具有持续性,表达量基本恒定。也正由于

这种特点使得外源基因产物可能对植物的生长发育产生不利影响,甚至导致死亡。此外,重复使用同一种启动子驱动两个或两个以上的外源基因可能引起基因沉默或共抑制现象^[2]。为了使外源基因在植物体内高效发挥作用,同时又可减少对植物的不利影响,目前人们对特异性启动子的研究和应用越来越重视。

1.1 特异性启动子的结构与功能

植物特异性启动子主要由保守的基本启动子核心序列及其上游特异性的顺式作用元件组成。一般情况下,基本启动子包含转录起始位点和 TATA-box 结构。转录起始位点一般为 A,两侧常为嘧啶碱基。TATA-box 的保守序列为 TATA[A/T] A[A/T],大都位于转录起始点 -25bp ~ -30bp 之间,是 RNA 聚合酶 II 的识别和结合位点,它决定了转录起始的精确性。而上游特异性的顺式作用元件与特异性的转录因子相结合调控基因表达的强度或特异性。因此不同类型的启动子的差异可归结为顺式作用元件与转录因子的差异,而同一类型的启动子又具有一些保守的序列。

在组织特异性启动子中,种子特异性表达的玉米醇溶蛋白基因启动子含有一段结合核因子的 15 个碱基的保守序列^[3],它与其他种子特异性基因(如豌豆球蛋白基因、谷类储藏蛋白基因及玉米蔗糖合成酶基因^[4])的启动子的保守元件相似,该序列包含了一个保守的 RY 基序(CATGCATG),它对于种子特异性基因的表达有重要作用^[5]。植物叶特异性表达的 1,5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶小亚基(Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit, *rbcS*)基因启动子中 GTGGTTAAT 序列、AT-1 box、L-box 顺式元件也具有高度保守性^[6]。菜豆富含甘氨酸的蛋白质(*Grp1.8*)基因启动子中位于 -205 至 -199bp 的 CTGCATG 序列与木质部特异性表达有关^[7],而这一序列也存在于菜豆 *Grp1.0* 基因和与之亲缘关系甚远的火炬松木质部特异表达的 *PtX3H6* 和 *PtX14A9* 基因启动子中^[8]。在韧皮部特异性表达的杨树树皮贮藏蛋白基因、笋瓜韧皮部蛋白 2 基因和豌豆谷氨酰胺合成酶基因启动子中都存在着保守的(G/C)(G/C)ATG 序列^[9]。

在诱导启动子中,光响应启动子通常存在 GT-1、GATA、G-box 等顺式元件的共同作用,热响应启动子使得基因的表达水平在受到热冲击后迅速大幅度地提高,其中含有的热冲击响应元件(HSE),在植物、动物和酵母中有一定保守性^[10];低温响应启动

子则含有保守的 CCGAC 序列^[11];干旱响应启动子包含保守的干旱响应元件(DRE, TACCGACAT)和 ABA 应答因子(ABRE, ACGTGGTC)^[12];植物在遭到水淹时产生缺氧胁迫,低氧响应启动子中含有的缺氧响应元件(ARE)^[13],使得相关基因因发生缺氧而诱导表达;激素应答启动子中则包含激素应答元件(HRE)^[14]等。

利用这些保守元件一方面可以推测新基因的功能,另外将其有序的组合,并与目的基因融合构建植物表达载体最终应用于基因工程研究中。

1.2 启动子的研究方法

启动子分析方法主要分为两大类,一是通过实验测定方法,二是通过计算机预测方法。

1.2.1 实验测定方法 实验测定启动子及其顺式调节元件的最常用方法是构建启动子(或拟启动子)报告基因系统。其过程为:构建启动子(或拟启动子)片段与报告基因的表达载体,然后通过合适的检测系统,测定报告基因的表达水平,最终确定启动子的表达特性或定位启动子顺式作用元件。构建启动子片段采用缺失(包括 5'系列缺失、3'系列缺失和中间缺失)突变(对特定序列的点突变、整段取代和扫描突变)和功能获得实验。常用的报告基因有 β -葡萄糖醛酸苷酶(β -glucuronidase, GUS)、氯霉素乙酰转移酶(Chloramphenicol acetyl transferase, CAT)、荧光素酶(Luciferase, LUC)和绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)。用于启动子-报告基因表达特性检测的系统有原生质体转化、基因枪轰击和农杆菌介导的瞬间表达检测以及转基因植物的稳定表达检测。

此外,免疫共沉淀(Chromatin immunoprecipitation, ChIP)法也是常用的启动子分析方法^[15]。它是指活体细胞,经过甲醛的处理,使得转录因子与 DNA 分子上的结合位点共价交联在一起,通过超声波等机械手段将 DNA 分子破碎成小片段,然后利用某种转录因子的抗体免疫沉淀蛋白-DNA 复合物,最后纯化分离出与该种转录因子结合 DNA 片段,并对其 PCR 扩增和凝胶分析以获得启动子及其顺式元件的序列信息。

随着基因芯片(Gene chip)技术诞生和发展^[16],在 ChIP 技术基础上,结合 Gene chip 技术,又发展成为 ChIP-chip 技术^[17],意在基因组范围内分析蛋白质和 DNA 的相互作用。它是将 ChIP 方法分离出的 DNA 扩增,加上荧光标记,然后与 gene chip 杂交,而这个 gene chip 上包含有整个基因组的基因间或启

动子序列。

1.2.2 计算机预测方法 虽然采用实验验证研究启动子是最为简单而准确的方法,但其耗时昂贵。将计算机技术应用于启动子研究领域,不但可以节省人力和物力资源,而且在较短时间内获得大量的关于启动子及其调节元件的信息。因此计算机预测方法已经成为启动子研究的一个重要手段。

无论预测启动子还是识别其中的调控元件,首先要建立具有覆盖面宽广而且序列信息较为完整的数据库。同时数据库之间可以建立相互链接,有助于信息的快速查找。EPD是由瑞士的实验癌症研究所(ISREC)和生物信息研究所(SIB)共同维护、注释的非冗余真核生物聚合酶 II 启动子的数据库^[18]。它是一个较为综合性的数据库,分为 6 大类:植物启动子、线虫启动子、拟南芥启动子、软体动物启动子、棘皮类动物启动子和脊椎类动物启动子,共 2997 个条目。此外,还有专用于预测植物调控元件的数据库,如 PLACE^[19]和 PlantCARE^[20]。

接下来就可以结合不同的研究目的而选择适合的数据库进行查询和搜索。通过数据库搜索获得已知序列的特征,就可以预测未知序列的性质、结构及功能。在数据库搜索时基于特定数学算法而开发出一些不同的预测软件,这些预测软件的可靠性可以通过对数据库中已知序列的验证来进行评价。Fickett 等对已知的 24 个启动子用常用的启动子预测软件(如 Promoter2.0、NNPP、PromoterScan 等)预测,结果表明这些软件预测的假阳性率高达 80%,而真阳性率很少超过 50%^[21]。因此逐步改进数学算法,以开发高精度的预测软件的研究是启动子研究的一个重要领域。

1.3 特异性启动子类型

特异性启动子主要可分为诱导型启动子和组织特异性启动子。诱导型启动子是指能够接受某些物理或化学信号刺激而转录调控目的基因高量表达的一类启动子。根据不同信号刺激又可划分环境响应启动子和化学诱导启动子。环境响应启动子使得植物在生长发育中能够在一定程度上对光、温度、水和氧气等作出响应以维持其正常的生命活动。化学诱导启动子是一类能对植物激素、病原物诱导子及其它化学物质作出响应的启动子^[22]。诱导型启动子常以诱导信号命名,如光、热、冷、创伤、生长素和真菌诱导启动子等。

组织特异性启动子有时也称为器官特异性启动子,这种启动子调控基因只在某些特定的组织部位

或器官中表达,并往往表现出发育调节的特性。这种特异性通常以特定组织的细胞结构和化学、物理信号为基础,因此,这类转录调控序列与诱导性启动子有一定的共同点。这类启动子研究较多的有根特异启动子、茎特异启动子、叶特异启动子、花特异启动子、果实特异性表达启动子、种子特异性表达启动子以及特化器官特异性表达启动子如块茎和根瘤特异性表达启动子等。

由于植物生长环境及基因表达的复杂性,大多数基因的表达式是受多种因素调控,如拟南芥的 RD29A 基因启动子中同时存在受冷、干旱、盐及脱落酸等因素诱导的顺式元件^[23]。有些组织特异性启动子同时也是诱导型启动子,如水稻的 *rbcS* 启动子^[6]和叶绿体的果糖-1,6-二磷酸醛缩酶(*AldP*)基因启动子^[24],既包含叶特异表达元件,又带有光调控的顺式元件。小麦种子特异性表达的 α -淀粉酶(*amy*)基因启动子同时受到赤霉素特异性地调控表达^[25]。玉米乙醇诱导的启动子 *Adh1* 具有组织特异性表达方式^[26]。大多数果实特异性基因启动子的表达同时受到乙烯的调控^[27-28]。根特异性基因启动子还会受到盐浓度的影响^[29]。

大多数植物启动子都是单一方向的转录,1994 年,James 等首次在植物中发现了双向启动子,即一个启动子同时表达两个基因^[30]。双向启动子应用于植物基因工程,不但可以大幅度提高转基因效率,还可以避免因使用具有同源关系的启动子转入多个基因而造成的基因沉默现象。然而,自然界存在的双向启动子一般活性较低,因此将单向启动子人工改造成为双向启动子对于植物基因工程研究和应用具有重要意义^[31]。

2 特异性启动子在植物基因工程中的应用

2.1 植物品质改良基因工程

作物的品质改良是目前植物转基因技术的研究热点。随着生活水平的不断提高,人们不仅要求食品的数量,还更加要求食品的质量,如食品的营养性、口感甚至观感。

2.1.1 植物营养品质改良 Stark 等人利用淀粉生物合成的关键性酶 ADP 葡萄糖焦磷酸化酶(*AGPP*)基因和 CMV35 启动子构建了一个嵌合基因,导入烟草、番茄和马铃薯中,结果得到极少的转基因植物,表明 *AGPP* 基因的组成性表达对植物的生长、发育是有害的,它很可能改变了植物不同组织之间源库

与沉积的关系。后来改用块茎特异表达的 Patatin 基因的启动子来构建嵌合基因,就得到了相当多的转基因马铃薯。转基因马铃薯块茎中淀粉的含量比传统的马铃薯提高了 35%^[32]。

Momma 等将大豆球蛋白(AlaB1b)基因与水稻谷蛋白(Gt1)基因启动子构建嵌合基因导入水稻中,结果转基因水稻种子中蛋白质和几乎所有的氨基酸含量均高于非转基因植株,而其他性状如稻米的外形、矿物质含量则没有改变^[33]。Zheng 等利用 Gt1 基因启动子将菜豆球蛋白(β -phaseolin)基因特异表达于水稻种子的内胚乳中,也获得了高蛋白质含量的水稻种子^[34]。

植物类胡萝卜素是广泛存在于自然界中的一类色素。在许多花和果实中,类胡萝卜素用以吸引昆虫、鸟类或其它动物来帮助授粉和传播种子,对园艺植物的观赏性和经济价值也起着重要的作用。此外 β -胡萝卜素和含 β -环的胡萝卜素是人类及动物体内维生素 A(Retinol)合成的前体。许多其它非维生素 A 类胡萝卜素如叶黄素(lutein)和玉米黄质(Zeaxanthin)能抑制、清除体内自由基,可以延缓衰老和预防肿瘤、血栓、动脉粥样硬化等疾病。近年来,应用类胡萝卜素合成相关基因的转基因植物研究取得了很大的进展。

Fraser 等人利用多聚半乳糖醛酸酶启动子,使修饰后的欧氏杆菌(*Erwinia chrysanthemi*)的八氢番茄红素合成酶(*CrtB*)基因在番茄果实中特异性表达。转基因番茄植株中的类胡萝卜素含量较野生型番茄增加 2~4 倍^[35]。Shewmaker 等人将 *CrtB* 基因在油菜种子中特异性过量表达,转基因油菜种子中的类胡萝卜素含量较野生型油菜增加了 50 倍^[36]。Dharmapuri 等人为提高番茄果实中的玉米黄质含量,将番茄果实特异性启动子驱动下的番茄红素 β -环化酶(*LycB*)和辣椒的胡萝卜素 β -羟化酶(*BCH*)基因导入番茄,使转基因番茄果实中玉米黄质和 β 隐黄质含量增加 100 多倍^[37]。瑞士植物研究所 Ye 等利用水稻成熟种子特异性表达的谷蛋白基因启动子将维生素 A 原(β -胡萝卜素)合成途径的 3 个关键酶,即 *CrtB*、*LycB* 及细菌八氢番茄红素去饱和酶(*crtI*)基因同时导入水稻,获得了胚乳呈黄色的“金色水稻”。首次实现了通过植物基因工程使水稻种子产生本不存在的类胡萝卜素,为作物营养品质改良提供了一个良好的范例^[38]。

铁是人体必需的微量元素,缺铁可导致缺铁性贫血的发生和不良怀孕等。WHO 数据显示,世界上

有近 37 亿人口缺铁,缺铁已成为影响世界上 30% 人口的严重营养问题。Goto 等用水稻种子谷蛋白启动子(*GluB-1*)将大豆铁蛋白基因全序列导入水稻中,实现大豆铁蛋白基因在水稻种子胚乳中特异而稳定地表达,所获得转基因富铁水稻种子胚乳铁含量最高可以比未转基因对照高 3 倍^[39]。

2.1.2 植物营养吸收品质改良 植酸是一种抗营养因子,同时它也是植物体内磷的主要存在形式,其绝大部分不能被单胃动物消化吸收,而随粪便排出体外造成环境磷污染。研究表明,种子中的植酸一般占总磷的 70% 左右^[40]。利用种子特异性启动子,在粮食作物中表达重组植酸酶,创造低植酸的转基因作物,对于提高食品营养价值,促进人类健康具有重大的现实意义。Lucca 等利用 *Gt1* 启动子将曲霉属(*Aspergillus fumigatus*)的植酸酶基因及菜豆的铁蛋白基因、富含半胱氨酸的金属硫蛋白基因导入水稻,获得了 3 种基因均在水稻胚乳中特异性表达的转基因水稻,显著提高了水稻对铁的吸收,增加了含铁量^[41]。Coello 等将大肠杆菌的植酸酶基因连同一段液泡定位表达信号肽序列在胚特异性启动子的控制下转化拟南芥,在转基因植株干种子中检测到了植酸酶的活性,且内部植酸的水平有所降低,无机磷酸盐的含量相对提高^[42]。Ponstein 等构建了含有植酸酶基因的油菜籽实特异性表达载体,进行转化研究,结果在 95% 的 T1 代转基因籽实中检测到了植酸酶活性,该酶能抵抗胃蛋白酶的降解,具有大规模生产的潜力^[43]。

植物来源的非淀粉多糖(NSPs),如 β -葡聚糖和木聚糖,是单胃动物饲料中的抗营养因子。这两种多糖可被相应的 β -葡聚糖酶和木聚糖酶降解而消除其抗营养特性。Jensen 等利用胚乳特异的大麦醇溶蛋白基因的启动子(*Hor31*)及其信号肽,介导葡聚糖酶基因在大麦中表达。重组酶可以定位于种子的贮存液泡中,酶蛋白的表达量最高为 40 μ g/mg 可溶蛋白^[44]。Patel 等人利用胚乳特异启动子介导来源于瘤胃真菌(*Neocallimastix patriciarum*)的木聚糖酶(*XYNA*)基因在大麦种子中高效表达。再生大麦都没有出现异常性状,可以正常发芽繁殖。转基因植株的后代也表现了良好的遗传稳定性^[45]。Dai 等利用叶片特异启动子,将嗜酸耐热菌(*Aciditgermus cellulolyticus*)的高耐热性 β -葡聚糖酶 E1 在烟草叶绿体中特异表达,蛋白表达量最高可达总可溶蛋白的 1.35%^[46]。

2.1.3 植物口味品质改良 无籽果实品质高、口味

好,深受人们喜爱。在子房中表达生长素生物合成途径的某些基因可以诱导单性结实。Rotino 等已将金鱼草(*Antirrhinum majus*)子房特异性表达的启动子 pDefH9 与编码色氨酸单加氧酶(*IaaM*)基因融合,并将其导入茄子和烟草中,获得了单性结实的转基因植株^[47]。毛自朝等利用番茄中果实特异性启动子 2A12 驱动编码异戊烯基转移酶(*ipt*)基因,调节果实内源激素的含量,不仅可获得无籽果实,还能改善果实的品质^[48]。

1990 年 Witty 等报道,转入 T-甜蛋白基因的马铃薯须根具有一种新的特异性风味和 T-甜蛋白的口味^[49]。Penarrubia 等利用果实特异性表达启动子 E8 将 M-甜蛋白基因转入番茄中,得到有甜蛋白表达的番茄,甜蛋白与蔗糖摩尔甜度比为 1:100000 甜度热。这种番茄热量低,不易被细菌利用,对糖尿病、心血管疾病患者是很好的糖替代品^[50]。

2.1.4 培育雄性不育系新品种 利用杂种优势可以显著地提高作物产量,改善作物品质,而作物雄性不育系的选育是杂种优势利用的关键。采用基因工程创造雄性不育的主要策略是将花粉或花药组织特异性启动子与外源基因嵌合,构建表达载体转化植物来阻断花粉发育的过程而达到雄性不育的目的^[51]。目前已经分离出多种花粉或花药启动子,例如烟草花药绒毡层启动子 TA29、TA26 及 TA13^[52];水稻绒毡层启动子 Osg6B^[53];拟南芥绒毡层启动子 A3、A8 及 A9^[54];番茄花粉特异性启动子 lat 52 和 lat 59^[55]等,都可用于植物雄性不育基因工程研究中。Mariani 等将花药绒毡层启动子 PTA29,与来自于淀粉芽孢杆菌胞外 RNA 酶基因(即细胞毒素(*Barnase*)基因融合,导入烟草和油菜后获得雄性不育的工程植株。随后他们又将 *Barnase* 基因的抑制剂(*Barstar*)基因与 TA29 启动子融合,获得 TA29-*Barstar* 转基因油菜,而这种油菜正是 TA29-*Barnase* 的雄性不育油菜的恢复系,这为植物杂种优势利用开辟了一条新途径^[56, 57]。

2.2 特异性启动子用于抗性基因工程

2.2.1 抗病基因工程 通过基因工程将抗病基因转入异源植物,具有高效、快速的优点,如 Belbahri 等利用烟草的病原菌诱导基因 *hsr203J* 的启动子与青枯菌(*Ralstoniasolanacearum*)*popA* 诱导子基因相连,转入烟草植株,发现诱导表达的 *popA* 基因定位在 HR 且转基因植株对卵菌病原体具有高度抗性^[58]。

然而由于抗病基因介导的抗性具有小种专化性的特点,即一个抗病基因仅能对含相应无毒基因的

病原菌产生抗性。由此,de Wit 提出了一种非专化的抗病二元系统,即在一种植物中转入某种抗病基因和相应病原的无毒基因,将抗病基因置于一组成型表达的启动子之下,无毒基因则置于一受病原诱导的启动子之下,当病原侵染植物时,两种基因表达的产物相互作用,最终引起受侵染部位组织的过敏反应,进而植物获得整体的抗病性^[59]。Gunter Strittmatter 等利用受马铃薯晚疫病病原真菌(*Phytophthora infestans*)诱导的 PR 蛋白启动子 Prp-1 来控制 *Barnase* 基因表达,同时利用置于 CaMV 35S 启动子控制下的 *Barstar* 基因来消除 *Barnase* 基因背景表达造成的对植物细胞的伤害,最终获得了抗病的转基因马铃薯植株^[60]。吕华飞等通过融合水稻 *Act1* 基因的启动子核心元件及马铃薯和小麦 *Gst1* 基因启动子区的受病原诱导调控元件序列而人工构建了具有稻瘟菌诱导活性的嵌合启动子^[61]。毛盛旸等将该诱导性启动子与 *Barnase* 基因融合,再与由 CaMV 35S 启动子驱动的 *Barstar* 的构件融合转化水稻,从而获得了具有明显的抗致病性真菌和一定程度的抗细菌危害的较广谱抗性的转基因水稻品种^[62]。

2.2.2 抗虫基因工程 在植物抗虫方面,采用诱导型或组织特异性表达的启动子,调控抗虫基因只在害虫侵害时或只在植物易受害虫侵害的部位或只在一定的条件下(如化学调节剂)高效表达,不但避免抗虫基因对人体或非目标生物的伤害,提高了生物安全性,而且还可以提高抗虫的效果,减少耐受性昆虫的发展。Williams 等将受水杨酸诱导表达 PR-LA 基因启动子与苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*-Bt)杀虫晶体蛋白基因构建嵌合基因,转化烟草。在正常情况下,转基因烟草不表达 Bt 基因。当害虫达到一定密度时,喷施水杨酸,使 Bt 基因迅速表达杀虫晶体蛋白(ICPs),并杀死害虫,这样由于害虫不经常接触 ICPs,从而不易产生适应性和抗性^[63]。1993 年 Koziel 等将 Bt 基因与只能在绿色组织中表达的玉米 PEP 羧化酶启动子连接,用基因枪法转化玉米,获得了高水平表达的抗虫玉米,而且能够稳定遗传^[64]。

蚜虫是以刺吸式口器吸取植物韧皮部内的汁液维持生存。Yuan 等采用韧皮部特异性启动子 CoYMV 驱动雪花莲凝集素(*GNA*)基因在烟草韧皮部内特异性表达,获得较 35S 启动子更佳抗蚜效果^[65]。

由于叶绿体基因组的高拷贝性,定点整合进叶

绿体基因组的外源基因往往会得到高效率表达。例如 McBride 等人首次利用叶绿体 16srRNA 基因启动子 P_{rrn} 将 Bt 毒素基因转入烟草,在转基因烟草叶子中检测到高表达量的杀虫晶体蛋白^[66]。Kota 等利用 P_{rrn} 启动子将 Bt 毒素基因也转入到烟草叶绿体中,转基因烟草不仅能抗敏感昆虫,而且能够百分之百地杀死那些产生了高抗性的昆虫^[67]。

2.2.3 抗逆基因工程 环境响应启动子应用于抗逆分子育种中,只有当植物处在胁迫环境时,转基因才高效表达,而在正常条件下,则转基因表达很弱或根本不表达,这样无疑更有利于转基因植物的生长。赵恢武等将来自拟南芥诱导性启动子 Prd29A 与海藻糖-6-磷酸合酶基因(*TPS*)融合转入烟草中,转基因烟草的耐旱性明显提高^[68]。

在逆境条件下,一些逆境相关的转录因子会激活许多抗逆功能基因同时表达,从而更为有效地提高植物的抗逆性。Kasuga 等利用组成性强启动子 CaMV35S 驱动来自拟南芥的转录因子 DREB1A 或 CBF1,在转基因拟南芥中表达,能增强植物抗寒力,但在正常生长条件下有严重的生长抑制现象。他们改用 rd29A 启动子后,不仅更有效地提高了抗寒力,而且对植物的生长影响甚微^[69]。高世庆等将 rd29A 启动子驱动 DREB1A 基因在小麦中特异性表达,获得了耐旱和耐寒的转基因小麦植株^[70]。

2.2.4 抗杂草基因工程 目前,防除杂草最常用而有效的方法是喷洒除草剂,因而作物中要转入大量的抗除草剂基因,而这些基因可能会通过花粉的传播与受精逐渐漂入野生近缘种或近缘杂草而产生难以控制的“超级杂草”。同时除草剂还会带来严重的环境污染,因此,建立更有效的控制杂草的新技术策略已成为农业生物研究的热点。Stanilaus 和 Cheng 等设计构建了一种“基因表达盒”,即利用热激蛋白启动子调控 *Barnase* 基因表达,同时又将 *Barstar* 基因在 CaMV 35s 启动子控制下插入到 *Barnase* 基因表达盒的上游,从而阻止 *Barnase* 毒性基因的表达。只有到周围环境温度升高时,热激蛋白启动子活性恢复,启动 *Barnase* 基因的表达,引起植株死亡。他们将这样的基因表达盒导入烟草后形成转化体,在热处理前转化体生长良好,但在 42℃ 条件下,由于 *Barnase* 基因被启动和表达,转化体 3h 后便死亡。这种基因表达盒可转入农田休闲期间种植的覆盖作物中,使其在晚春时节(夏播作物播种之前)自行死亡,从而免去化学除草剂的使用^[71]。

2.3 植物生物反应器

植物生物反应器是指以转基因植物为“化工厂”,通过大规模种植生产具有重要功能的蛋白质如药用蛋白、抗体、疫苗、工业用酶、生物可降解塑料及其它一些次生代谢产物等。王玉华等利用水稻叶绿体基因启动子将聚羟基脂肪酸酯(polyhydroxyalkanoates, PHAs)基因特异表达于烟草叶绿体,为植物生产生物降解塑料开辟新途径^[72]。

在植物生物反应器中,最受人们关注同时研究进展也最快的是生产各种转基因植物疫苗。Tackaberry 等利用水稻种子特异性表达的启动子 GT3 驱动巨细胞病毒(Human cytomegalo virus, HCMV)疫苗糖蛋白 B(Glycoprotein B, gB)基因在烟草种子中特异性表达,转基因烟草产生的 gB 与细胞感染 HCMV 产生的 gB 性质相似^[73]。马铃薯是表达外源基因的重要生物反应器。宋东光等将马铃薯块茎专一性表达的 *patatin* 启动子与乙肝病毒表面抗原(HBSAg)基因构建载体转化马铃薯茎段,获得高 HBSAg 蛋白表达的转基因植株^[74]。

Sandhu 等通过番茄果实特异性启动子 E8 的控制,将呼吸道合胞病毒 F 抗原基因(RSV-F)表达于番茄,鼠吃了转基因番茄后产生了免疫反应,在其血浆和黏膜中检测出 RSV-F^[75]。最近,江晓玲等也利用 E8 启动子,在番茄果实中特异性表达霍乱肠毒素 B 亚单位基因(*CTB*),口服免疫后的小鼠血液和肠道黏膜中均检测到抗 CTB 抗体^[76]。基因表达调控与免疫学的有效结合,使得转基因植物口服疫苗有望在不久的将来问世。

我们克隆并功能分析了胡萝卜直根特异表达的液泡转化酶 II 型同工酶(*sII*)基因的启动子,找到其行使功能的最佳长度及增强区序列,以构建胡萝卜直根特异性表达的高效植物表达载体,并将用于胡萝卜表达轮状病毒抗原蛋白的植物生物反应器研究中,从而实现利用转基因胡萝卜生产口服疫苗这一最终目标。

3 展望

启动子是精确调控外源基因在植物体内表达的“开关”。随着植物转基因技术的广泛应用,快速分离和鉴定植物体内各种特异启动子已经成为植物基因工程研究的热点和难点。近年来,将实验测定和计算机预测方法的有效结合,大量的特异性启动子已被克隆和功能分析,并已广泛应用于植物基因工程^[77]。然而,应用中也暴露出一些问题。例如

天然的特异性启动子大多表达水平不高,而且不能满足人们的多种需要。因此对现有的天然启动子人工改造,利用不同种类启动子中特异性顺式调控元件及增强子序列去构建高活性的,同时受多种因素调控的复合式启动子将是一个十分重要的解决问题途径。此外,与特异性启动子相互作用的转录因子的研究和应用,也会大幅度提高启动子的转录活性。相信特异性启动子一定会在植物基因工程研究中发挥愈来愈重要的作用。

REFERENCES(参考文献)

[1] Eaglesham A ,Pueppke SG ,Hardy RWF *et al.* Genically modified food and the consumer. NABC Report 13. New York : National Agricultural Biotechnology Council 2001

[2] Elmayan T ,Vaucheret H. Expression of single copies of a strongly expressed 35S transgene can be silenced post-transcriptionally. *Plant J* ,1996 ,**9** :787 – 797

[3] Baumlein H ,Nagy I ,Villarroel R ,Inze D ,Wobus U. Cis-analysis of a seed protein gene promoter : the conservative RY repeat CATGCATG within the legumin box is essential for tissue-specific expression of a legumin gene. *The Plant Journal* ,1992 **2** (2) :233 – 239

[4] Werr W ,Frommer WB ,Maas C *et al.* Structure of the sucrose synthase gene on chromosome 9 of *Zea mays* . *EMBO J* ,1985 ,**4** : 1373 – 1380

[5] Dickinson CD ,Evens RP ,Nielsen NC. RY repeats are conserved in the 5'-flanking regions of legume seed-protein genes. *Nuc Acid Res* ,1988 ,**16** : 371

[6] Nomura M ,Katayama K ,Nishimura A. The promoter of *rbcs* in a C3 plant (rice) directs organ-specific , light-dependent expression in a C4 plant (maize) , but does not confer bundle sheath cell-specific expression. *Plant Mol Biol* ,2000 ,**44** (1) :99 – 106

[7] Keller B ,Heierli D. Vascular expression of the *grp1.8* promoter is controlled by three specific regulatory elements and one unspecific activating sequence. *Plant Mol Biol* ,1994 ,**26** :747 – 756

[8] Loopstra CA , and RR Sederoff. Xylem-specific gene expression in loblolly pine. *Plant Molecular Biology* ,1995 **27** :277 – 291

[9] Liu YH(刘昱辉) ,Jia SR(贾士荣). Vascular-specific Promoters and cis-regulatory Elements , *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报) ,2003 ,**19** :131 – 135

[10] Diaz-Martin J , Almoguera C , Prieto-Dapena P *et al.* Functional interaction between two transcription factors involved in the developmental regulation of a small heat stress protein gene promoter. *Plant Physiol* 2005 ,**139** (3) :1483 – 1494

[11] Yamaguchi-Shinozaki K , Shinozaki K. Organization of cis-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends Plant Sci* 2005 ,**10** (2) :88 – 94

[12] Busk PK , Pages M. Regulation of abscisic acid-induced transcription. *Plant Mol Biol* ,1998 ,**37** (3) :425 – 435

[13] Abel S , Ballas N , Wong LM *et al.* DNA elements responsive to auxin. *Bioessays* ,1996 ,**18** (8) :647 – 654

[14] Dolfems R ,Peacock WJ ,Dennis ES. Diferential interactions of promoter elements in stress responses of the A rabadopsis cuth gene. *J PlantPhysiol* ,1994 ,**105** :1075 – 107

[15] Orlando V. Mapping chromosomal proteins in vivo by formaldehydecrosslinked-chromatin immunoprecitation. *Trends Biochem Sci* ,2000 ,**25** :99 – 104

[16] Schena M , Shalon D , Davis S *et al.* Quantitative monitoring of gene expression patterns with a complementary DNA microarray. *Science* ,1995 ,**270** :467 – 470

[17] Shannon MF ,Rao S. Transcription. Of chips and ChIPs. *Science* ,2002 **296** :666 – 669

[18] Praz V , Perier R , Bonnard C *et al.* The Eukaryotic Promoter Database , EPD : new entry types and links to gene expression data. *Nucleic Acids Res* ,2002 **30** (1) :322 – 324

[19] Higo K , Ugawa Y , Iwamoto M *et al.* Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database : 1999. *Nucleic Acids Res* ,1999 **27** :297 – 300

[20] Lescot M , De'hais P , Thijs G *et al.* PlantCARE , a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res* ,2002 ,**30** :325 – 327

[21] Fickett JW , Hatzigeorgiou AG. Eukaryotic promoter recognition. *Genome Research* ,1997 ,**7** (9) :861 – 878

[22] Gatz C ,Lenk I. Promoters that respond to chemical inducers. *Trends in Plant Science* ,1998 **3** :352 – 358

[23] Narusaka Y ,Nakashima K ,Shinwari Z K *et al.* Interaction between two cis-acting elements , ABRE and DRE , in ABA-dependent expression of Arabidopsis *rd29A* gene in response to dehydration and high-salinity stresses. *Plant J* 2003 **34** (2) :137 – 148

[24] Kagaya Y , Nakamura H , Hidaka S. The promoter from the rice nuclear gene encoding chloroplast aldolase confers mesophyll-specific and light-regulated expression in transgenic tobacco. *Mol Gen Genet* ,1995 ,**248** (6) :668 – 674

[25] Huttly AK , Martienssen RA , Baulcombe DC. Sequence heterogeneity and differential expression of the alpha-Amy2 gene family in wheat. *Mol Gen Genet* ,1988 ,**214** (2) :232 – 240

[26] Kyoza J ,Olive M ,Peacock WJ *et al.* Promoter elements required for developmental expression of the maize *Adh1* gene in transgenic rice. *Plant Cell* ,1994 **6** (6) :799 – 810

[27] Cordes S , Deikman J , Margossian LJ *et al.* Interaction of a developmentally regulated DNA-binding factor with sites flanking two different fruit-ripening genes from tomato. *Plant Cell* ,1989 ,**1** (10) :1025 – 1034

[28] Lincoln JE , Fischer RL. Diverse mechanisms for the regulation of ethylene-inducible gene expression. *Mol Gen Genet* ,1988 ,**212** (1) :71 – 75

[29] Bastola DR , Pethe VV , Winicov I. Alfin 1 , a novel zinc-finger protein in alfalfa roots that binds to promoter elements in the salt-inducible *MsPRP2* gene. *Plant Mol Biol* ,1998 ,**38** (6) :1123 – 1135

[30] Jame SK ,Pietro P. A seed-specific Brassica napus oleosin promoter interacts with a G-box-specific protein and may be bi-directional. *Plant Mol Biol* ,1999 **41** (2) :327 – 340

- [31] Zhang CX(张春晓), Wang WQ(王文棋), Jiang XN(蒋湘宁) *et al.* Review on plant gene promoters. *Acta Genetica Sinica(遗传学报)* 2004 **31**(12): 1455 – 1464
- [32] Stark DM, Timmerman KP, Barry GF *et al.* Regulation of the amount of starch in plant tissues by ADP-glucose pyrophosphorylase. *Science*, 1992, **258**: 287 – 292
- [33] Momma K, Hashimoto W, Ozawa S *et al.* Quality and safety evaluation of genetically engineered rice with soybean glycinin: analyses of the grain composition and digestibility of glycinin in transgenic rice. *Bioscience Biotechnology and Biochemistry*, 1999 **63**(2): 314 – 318
- [34] Zheng ZW, Sumi K, Tanaka K *et al.* The bean seed storage protein beta-phaseolin is synthesized, processed, and accumulated in the vacuolar type- II protein bodies of transgenic rice endosperm. *Plant Physiology*, 1995, **109**(3): 777 – 786
- [35] Fraser PD, Romer S, Shipton CA *et al.* Evaluation of transgenic tomato plants expressing an additional phytoene synthase in a fruit-specific manner. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99**(2): 1092 – 1097
- [36] Shewmaker CK, Sheehy JA, Daley M *et al.* Seed specific overexpression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects. *Plant J*, 1999, **20**(4): 401 – 412
- [37] Dharmapuri S, Rosati C, Pallara P *et al.* Metabolic engineering of xanthophyll content in tomato fruits. *FEBS Lett*, 2002, **519**: 30 – 34
- [38] Ye AI, Babili S, Kloti A *et al.* Engineering the provitamin A(β -carotene) biosynthetic pathway into(carotenoid-free) rice endosperm. *Science* 2000 **287**: 303 – 305
- [39] GOTO F, YOSHIHARA T, SHIGEMOTO N *et al.* Iron fortification of rice seed by the soybean ferritin gene. *Nature Biotechnology*, 1999, **17**: 282 – 286
- [40] Brinch-Pedersen H, Sorensen LD, Holm PB. Engineering crop plants: getting a handle on phosphate. *Trends in Plant Science*, 2002, **7**: 118 – 125
- [41] Lucca P, Hurrell R, Potrykus I. Genetic engineering approaches to improve the bioavailability and the level of iron in rice grains. *Theor Appl Genet*, 2001, **102**: 392 – 397
- [42] Coello P, Maughan JP, Mendoza A *et al.* Generation of low phytic acid Arabidopsis seeds expressing an *E. coli* phytase during embryo development. *Seed Science Research*, 2001, **11**: 285 – 291
- [43] Ponstein AS, Bade JB, Verwoerd TC *et al.* Stable expression of Phytase(phyA) in canola(Brassica napus) seeds: towards a commercial product. *Molecular Breeding*, 2002, **10**: 1 – 2, 31 – 44
- [44] Jensen L, Olsen O, Kops O *et al.* Transgenic barley expressing a protein engineered, thermostable β (1, 3-1, 4)-glucanase during germination. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, **93**: 3487 – 3491
- [45] Patel M, Johnson JS, Brettell RS *et al.* Transgenic barley expressing a fungal xylanase gene in the endosperm of the developing grains. *Molecular Breeding* 2000 **6**(1): 113 – 123
- [46] Dai Z, Hooker B, Anderson D *et al.* Expression of Acuditgermus cellulolyticus endoglucanase E1 in transgenic tobacco: biochemical characteristics and physiological effects. *Transgenic Research*, 2000, **9**: 43 – 54
- [47] Rotino GL, Perri E, Zottini M *et al.* Genetic engineering of parthenocarpic plants. *Nature Biotech*, 1997, **15**: 1398 – 2001
- [48] Mao ZZ(毛自朝), Yu QX(于秋菊), Zhen WC(甄伟) *et al.* Effects of *ipt* gene expression driven by fruit-specific promoter on development in transgenic tomato. *Chinese Science Bulletin(科学通报)* 2002 **47**(6): 444
- [49] Witty M. Preprothaumatin II is processed to biological activity in Solanum tuberosum. *Biotechnol Lett*, 1990, **12**: 131 – 136
- [50] Penarubia L, Aguilar M, Margossian L, Fischer RL. An antisense gene stimulates ethylene hormone production during tomato fruit ripening. *Plant Cell*, 1992, **4**(6): 681 – 687
- [51] Wang YH(王永飞), Ma SM(马三梅), Han YK(韩毅科) *et al.* Progress of engineering male sterility in plant. *Heredity(遗传)*, 2001, **23**(3): 276 – 280
- [52] Koltunow AM, Truettner J, Cox KH *et al.* Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development. *Plant Cell*, 1990, **2**(12): 1201
- [53] Tsuchiya T, Okumura K, Honda T *et al.* Significance of late diastolic potential preceding Purkinje potential in verapamil-sensitive idiopathic left ventricular tachycardia. *Circulation*, 1999, **99**: 2408 – 2413
- [54] Ludwig SR, Oppenheimer DG, Silflow CD *et al.* The 1-tubulin gene in *Arabidopsis thaliana*: primary structure and preferential expression in flowers. *Plant Mol Biol*, 1988, **10**: 311 – 321
- [55] Eyal Y, Curie C, McCormick S. Pollen specificity elements reside in 30 bp of the proximal promoters of two pollen-expressed genes. *Plant Cell*, 1995, **7**: 373 – 384
- [56] Mariani C, De Beuckeleer M, Truettner J *et al.* Induction of male sterility in plants by a chimaeric ribonuclease gene. *Nature*, 1990, **347**: 737 – 741
- [57] Mariani C, Gossele V, De Beuckeleer M *et al.* A chimaeric ribonuclease-inhibitor gene restores fertility to male sterile plants. *Nature*, 1992, **357**: 384 – 387
- [58] Belbahri L, Boucher C, Candresse T *et al.* Local accumulation of the ralstonia solanacearum PopA protein in transgenic tobacco renders a compatible plant-pathogen interaction incompatible. *Plant J*, 2001, **28**(4): 419 – 430
- [59] de Wit PJGM. Molecular characterization of gene-for-gene systems in plant-fungus interactions and the application of avirulence genes in control of plant pathogens. *Annu Rev Phytopathol*, 1992, **30**: 391 – 418
- [60] Strittmatter G, Janssens J, Opsomer C *et al.* Inhibition of fungal disease development in plants by engineering controlled cell death. *Bio/Technology*, 1995, **13**: 1085 – 1089
- [61] Lü H(吕华飞), Ming XT(明小天), Qu LJ(瞿礼嘉) *et al.* Construction of chimeric inducible promoters by elicitors of rice fungal blast pathogen and their expression in transgenic rice. *Chinese Science Bulletin(科学通报)* 2000 **45**: 242 – 246
- [62] Mao SX(毛盛吻), Gu HY(顾红雅), Qu LJ(瞿礼嘉) *et al.* Obtaining transgenic rice resistant to rice fungal blast disease by controlled cell death strategy. *Chinese Science Bulletin(科学通报)* 2003 **48**(16): 1751 – 1759

- [63] Williams S, Friedrich L, Dincher S *et al.* Chemical regulation of *Bacillus thuringiensis* delta-endotoxin expression in transgenic plants. *Bio/technology*, 1992, **10**: 540 – 543
- [64] Koziel MG, Beland GL, Bowman C *et al.* Field performance of elite transgenic maize plants expressing an insecticidal protein derived from *Bacillus thuringiensis*. *Bio/technology*, 1993, **11**: 194 – 200
- [65] Yuan Z, Zhao C, Zhou Y, Tian Y. Aphid-resistant transgenic tobacco plants expressing modified gna gene. *Acta Botanica Sinica*, 2001, **43**: 592 – 597
- [66] McBride KE, Svab Z, Schaaf DJ *et al.* Amplification of a chimeric *Bacillus thuringiensis* gene in chloroplasts leads to an extraordinary level of an insecticidal protein in tobacco. *Bio/Technol*, 1995, **13**: 362 – 365
- [67] Kota M, Daniell H, Varma S *et al.* Over-expressing of the *Bacillus thuringiensis* (Bt) Cry2Aa2 protoxin in chloroplasts confers resistance to plants against susceptible and Bt-resistant insects. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, **96**: 1840 – 1845
- [68] Zhao HW(赵恢武), Chen YJ(陈杨坚), Hu YI(胡鸢雷) *et al.* Construction of a trehalose-6-phosphate synthase gene driven by drought-responsive promoter and expression of drought-resistance in transgenic tobacco. *Acta Botanica Sinica*(植物学报), 2000, **42**(6): 616 – 619
- [69] Kasuga M, Liu Q, Miura S *et al.* Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nature Biotech*, 1999, **17**: 287 – 291
- [70] Gao SQ(高世庆), Xu HX(徐惠君), Cheng XQ(程宪国) *et al.* Improvement of wheat drought and salt tolerance by expression of a stress-inducible transcription factor *GmDREB* of soybean (*Glycine max*). *Chinese Science Bulletin*(科学通报), 2005, **50**(23) 2617 – 2625
- [71] Stanilaus MA, Cheng CL. Genetically engineered self-destruction: An alternative to herbicides for cover crop systems. *Weed Science*, 2002, **50**: 794 – 801
- [72] Wang YH(王玉华), Wu ZY(吴忠义), Zhang XH(张秀海) *et al.* Stable transformation of phaC2 gene in tobacco chloroplast genome. *Journal of Agricultural Biotechnology*(农业生物技术学报), 2006, **14**(2): 213 – 218
- [73] Tackaberry ES, Dudani AK, Prior F. Development of biopharmaceuticals in plant expression systems: cloning, expression and immunological reactivity of human cytomegalovirus glycoprotein B(UL55) in seeds of transgenic tobacco. *Vaccine*, 1999, **17**(23-24) 3020 – 3029
- [74] Song DQ(宋东光), Wang GQ(王光清), Wang XM(汪训明) *et al.* Expression of the HBsAg Gene Under the Control of a Patatin Promoter in Potato (*Solanum tuberosum*). *High Technology Letters*(高技术通讯) 2000, **10**(2): 18 – 20
- [75] Sandhu JS, Krasnyanski SF, Domier LL *et al.* Oral immunization of mice with transgenic tomato fruit expressing respiratory syncytial virus-F protein induces a systemic immune response. *Transgenic Res* 2000, **9**(2): 127 – 135
- [76] Jiang XI(江晓玲), He ZM(贺竹梅), Chen QC(陈清) *et al.* Transgenic tomato plant expressing cholera toxin B protein specifically in fruit as edible vaccine. *Agricultural Sciences in China*(中国农业科学) 2004, **37**(8): 1188 – 1192
- [77] Potenza C, Aleman L, Sengupta-Gopalan C. Invited Review: Targeting Transgene. Expression In Research, Agricultural, And Environmental Applications: Promoters Used In. Plant Transformation. *In Vitro Cell Dev Biol Plant* 2004, **40**: 1 – 22