一个水稻高效表达启动子 Os252 的分离

Isolation and Analysis of a High Expression Promoter in Rice

钟晓丽[1,2],张 丞[1],崔永兰[1],沈英嘉[1],张永明[2],杨仲南[1*]

ZHONG Xiao-Li[1,2], ZHANG Cheng[1], CUI Yong-Lan[1], SHEN Ying-Jia[1], ZHANG Yong-Ming[2] and YANG Zhong-Nan[1*]

1 上海师范大学 生命与环境科学学院,上海 200234
2 上海师范大学 旅游学院环境工程系,上海 200234
1 *College of Life and Envionment Science*, *Shanghai Normal University*, *Shanghai* 200234, *China*
2 *College of Tourism*, *Shanghai Normal University*, *Shanghai* 200234, *China*

摘 要 植物基因的表达受启动子的控制,高效表达启动子的分离及功能分析不仅是植物基因工程研究的重要研究方面,也是表达调控研究的重要内容。根据 EST 数据克隆了一个预测在水稻茎中高效表达的启动子 Os252。将该启动子与 GUS 基因构建成表达载体并转入水稻。转基因水稻 PCR 分析表明,GUS 基因已经成功地整合进水稻基因组中。GUS 组织化学分析表明,Os252 能启动 GUS 基因在水稻叶、茎以及胚乳中表达。进一步 GUS 酶活性的测定表明,叶和胚乳中 Os252 启动子活性分别是 35S 启动子的 1.9 和 2.5 倍。由于 Os252 来自于水稻,在叶和胚乳中活性高于 35S 启动子,因此该启动子可望用于水稻基因工程研究。

关键词 水稻,高效表达,启动子分离

中图分类号 Q943 **文献标识码** A **文章编号** 1000-3061(2007)05-0836-05

journals.im.ac.cn

Abstract The expression of plant gene is controlled by its promoter. The isolation and the function analysis of promoter are important for studying the genetic engineering and the regulation expression of plant genes. In this paper, we cloned a promoter, Os252, which was predicted to be highly expressed in the stem of rice from the EST database. After the construction of the Os252::GUS expression vector, it was transformed into rice. The integration of transgenes into transgenic rice genome was confirmed through PCR analysis. X-Gluc staining showed that Os252 can promote GUS gene expression in leaf, stem and matured seed. GUS enzyme activities driven by Os252 promoter in leaf and seed are about 190% and 250% of that driven by the 35S promoter. Thus, the Os252 promoter can be applied for rice genetic engineering.

Key words rice (*Oryza sativa L*), high expression, isolation of promoter

真核生物基因表达调控是分子生物学的研究热点之一。转录水平的调控,是基因表达调控中最有效的、最直接的调控,在此过程中,启动子是最重要的顺式元件。启动子是指基因中一段可与 RNA 聚合酶及其它一些影响转录的反式因子结合实现准确有效起始转录的 DNA 序列。因此启动子的分离及功能分析不仅是植物基因表达调控研究的重要内容,也是植物基因工程研究的一个重要方面。目前

Received: January 31, 2007; Accepted: March 14, 2007.

This work was supported by the grant from Shanghai Educational Development Foundation, and the Shuguang Program Project of Shanghai Educational Committee, and the National Basic Research Program of China (No.2005CB120802).

* Corresponding author. E-mail: znyang@shnu.edu.cn

上海市教育发展基金会及上海市教委曙光计划,国家重点基础研究发展计划(973)(No. 2005CB120802)资助。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

已经从植物病毒和植物本身分离到组成型启动子[1]，组织专一性启动子[2]及诱导型启动子[3]，Elumalai Sivamani 等还从水稻中分离得到了大小为 808 bp 的编码多聚遍在蛋白的基因 rubi3[4]，这些启动子已经成为植物基因工程的重要工具。从花椰菜花叶病毒分离出来的 35S 启动子是目前植物遗传操作中最常用的启动子，该启动子能较强地启动基因在双子叶植物中的表达，但是该启动子在单子叶植物中表达相对较弱。

单子叶植物中的禾本科植物包括许多重要经济作物如水稻、高粱、玉米、甘蔗、小麦和大麦，其中水稻是世界上最重要的粮食作物之一。由于水稻基因组小而被广泛选为模式植物，水稻的基因组学和功能基因组的研究为水稻的遗传改良打下良好的基础。目前，陆桂华[5]等从水稻种分离到花药专一性表达的启动子，王金发[6]等分离到一段具有启动子功能的重复序列，但水稻高效表达启动子的分离研究工作并不多，因此，从水稻中分离高效表达的启动子具有重要的经济价值。

为了从禾谷类植物中寻找高效表达的启动子，本文根据网上 EST 数据挑选并克隆了一个预测在茎中高效表达的启动子 Os252，并构建了 GUS 表达载体转入水稻，得到了转基因植株，经 GUS 组织化学染色及 GUS 酶活性的测定，表明 Os252 启动子在水稻的叶，茎和种子的胚乳中都有较强的表达。本文分离了一种水稻高效表达启动子，以克服现有启动子在单子叶植物中表达相对较弱或在禾谷类植物本身含有较多拷贝的缺陷，可应用于水稻的遗传改良和产业化研究。

1 材料和方法

1.1 实验材料和试剂

粳稻品种日本晴（*O. sativa japonica*）（本实验室提供）；农杆菌 EHA105 菌株和大肠杆菌 DH5α 菌株（本实验室提供）；质粒载体：pMD18-T vector（购自 TaKaRa 公司），pCAMBIA1301（购自 CAMBIA 公司）；限制性内切酶和基因工程用工具酶均购自 TaKaRa 公司；试剂均为国产分析纯；引物由上海生工公司合成。Os252 启动子引物序列如下：

F：5′-AGTTTATGTGCTTATACAGATGAG-3′；

R：5′-GGTTGAATAAGGAGGAAGC-3′。

1.2 质粒提取、DNA 片段克隆、重组质粒鉴定

参照分子克隆实验指南[7]。

1.3 DNA 片段回收

采用 BioDev 公司回收试剂盒，并按其说明书进行操作。

1.4 愈伤组织诱导及遗传转化

“日本晴”愈伤组织的诱导及农杆菌介导的水稻转化参照刘巧泉[8]等的方法进行。

1.5 水稻叶片总 DNA 抽提

采用 CTAB 法[9]。

1.6 转基因植株的 PCR 检测

转基因植株采用 Hyg 和 GUS 引物进行 PCR 鉴定。Hyg 引物序列为 HF，5′-GATCGTTATGTTTATCGGCACT-3′；HR，5′-TTGGCGACCTCGTATTGG-3′，PCR 程序：94℃ 30s，54℃ 30s，72℃ 30s，40 个循环，产物大小为 500bp；GUS 引物序列为 HF，5′-ACTTACGTGGCAAAGGATT-3′ HR，5′-GCGTCGCAGAACATTACA-3′，PCR 程序：94℃ 30s，52℃ 1min，72℃ 30s，40 个循环，产物大小为 500bp。

1.7 GUS 染色方法

参照 Jefferson[10]等的方法并做了适当改进，用二甲基甲酰胺把 X-Gluc 配成 20mmol/L 母液；50mmol/L 的磷酸缓冲液（pH7.0）成分为：铁氰化钾（1mmol/L）、亚铁氰化钾（1mmol/L）、Na_2EDTA（10mmol/L）；按磷酸缓冲液∶甲醇∶X-Gluc（40∶10∶1）的比例配成染色液。取转基因水稻再生植株少量叶片，茎组织和切开表皮的成熟种子于 96 孔板中，把染色液加入管中，加的量以浸没材料为准。密封，37℃染色 2d，70%乙醇脱色数次，观察染色结果。

1.8 GUS 酶活性的测定

参照 Jefferson（1987）[11]方法提取转基因水稻叶、茎及胚乳组织的总蛋白，用分光光度计测出 A_{280} 值并通过标准曲线计算出蛋白浓度，用底物 MUG 与蛋白溶液反应，用荧光分光光度计测出不同反应时间的荧光强度从而得出 GUS 酶的反应速度，通过公式计算出酶活力。

2 结果

2.1 启动子的克隆及载体构建

根据网上 EST 数据库（http://www.estarray.org）分析，发现编码延长因子 EF1-α 的基因 *Os03g08010* 在茎中高效表达。我们设计引物，以野生型‘日本晴’为模板，PCR 扩增该基因上游 1018bp DNA 片段，命名为 Os252（图 2）。将该片段克隆进 pMD18-T vector。为了构建启动子分析载体，将双元载体 pCAMBIA1301 上 GUS 基因上游 35S 启动子用 *Hin*dⅢ和 *Nco*Ⅰ 切除，经 T4 DNA 聚合酶末端填平并自连构成 pCAM-Gus 载

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

体。然后将克隆进 T 载体的 Os252 启动子用 *Bam*HⅠ和 *Sal*Ⅰ切下,连接到 pCAM-Gus 上相应的酶切位点中获得启动子分析载体 pCAM252GUS(图 1,3)。阳性对照载体采用 pCAMBIA1301(含有 35S 启动子)。

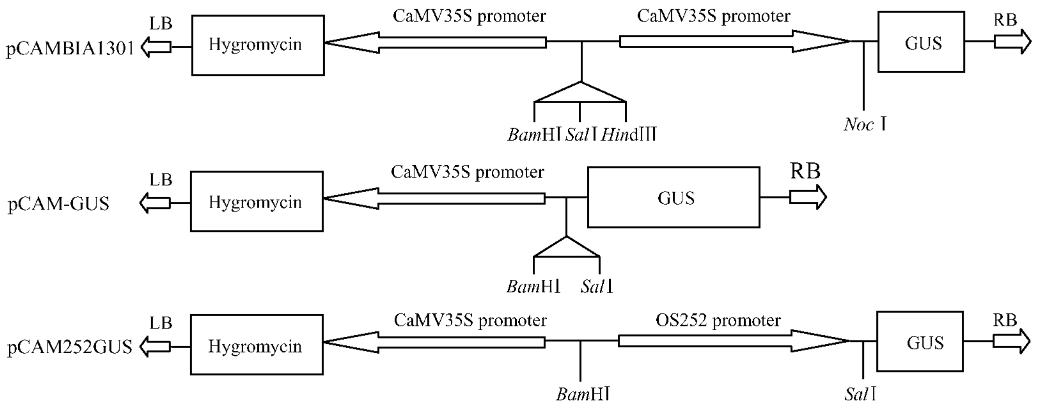

图 1 pCAM252GUS 双元载体的构建

Fig. 1 Construction of the binary vector pCAM252GUS

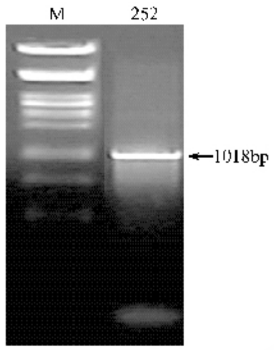

图 2 Os252 PCR 扩增片段

Fig. 2 The PCR fragment of Os252

M:λDNA/*Pst* Ⅰ marker;252:Os252.

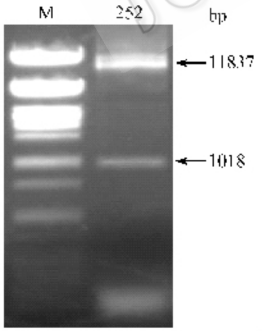

图 3 Os252 表达载体的酶切鉴定

Fig. 3 Examination of the binary vector pCAM252GUS

M:λDNA/*Pst* Ⅰ marker;252:pCAM252GUS/*Bam*HⅠ, *Sal* Ⅰ.

2.2 水稻遗传转化和转基因植株的获得

上述植物表达载体分别转化根癌农杆菌 EHA105,在确认阳性克隆后,通过农杆菌介导叶盘法将他们导入水稻,实验发现,将转化共培养后的愈伤在筛选培养基上筛选 2 次(每次 2 周),把具有抗性的愈伤组织转入分化培养基上培养 10d 左右开始出现绿点,2~3 周后出现小苗,待苗长到 3~5cm 时移入生根培养基上生根壮苗。实验得到含 Os252 启动子的抗性植株共 12 棵。

2.3 转基因植株的 PCR 鉴定

以 12 棵转基因水稻叶片总 DNA 为模板,潮霉素基因上设计的引物和 GUS 基因上设计的引物进行 PCR 扩增,结果显示都含有目的基因 500bp 左右的条带,而野生型及水作为阴性对照没有条带(图 4a,b)。

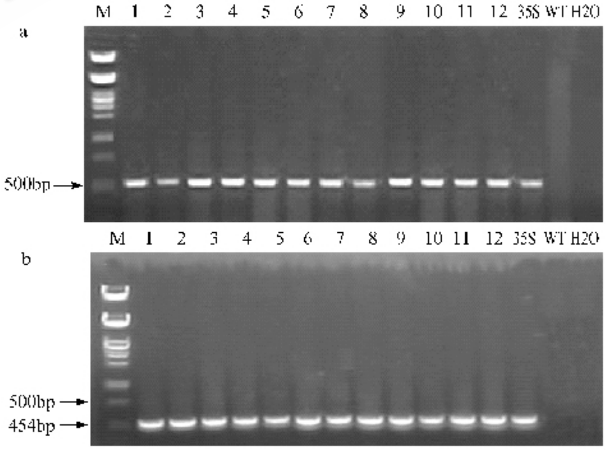

图 4 转基因植株潮霉素基因(a)和 Gus 基因(b)PCR 检测

Fig. 4 PCR analysis of hygromycin gene (a) and Gus gene (b) in transgenic plants

M:λDNA/*Pst* Ⅰ marker;1~12:hygromycin-resistant plants; WT:the wide type(negative control);H_2O:water(negative control).

2.4 GUS 融合基因在转基因植株中的组织特异性表达

对 12 棵 Os252 的启动子转基因水稻的不同组织进行 GUS 染色,检测其中的 GUS 活性。其中 Os252 启动子有 6 棵植株的叶子、茎及胚乳等组织中 GUS 染色均呈阳性(图 5)。从 PCR 及 GUS 鉴定结果可以看出 Os252 启动子已成功插入水稻基因组中并启动 GUS 基因表达。

journals.im.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

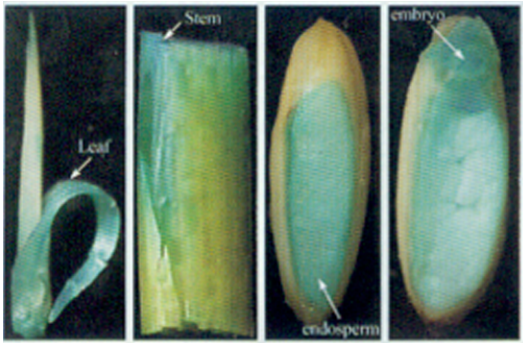

图 5　各组织的 GUS 染色

Fig. 5　GUS-staining of various tissues

2.5　GUS 酶活性在转基因水稻中的测定

提取有 GUS 表型的 6 棵转基因水稻叶、茎及胚乳组织的总蛋白，用分光光度计测出 A_{280} 值，通过 BSA 制定标准曲线，算出转基因植株单株各组织总蛋白含量。取 100μL 蛋白提取液加入已预热的 0.5mL MUG 溶液于 37℃水浴中反应，每间隔 10min 取 100μL 反应液加入含有 900μL Na_2CO_3 终止反应液中终止反应，用荧光分光光度计在 455nm 的发射光，365nm 的激发光，狭缝宽度 5mm 的条件下测出每个时间段的荧光强度，由反应时间和荧光强度关系曲线求出斜率，则每 μL 蛋白提取液反应速度为：$10 \times 0.8 \times$ 斜率 $\times [(V+500)/V] \times [1000/V]$，酶活力即是反应速度与蛋白的比值，结果如图 6~9。

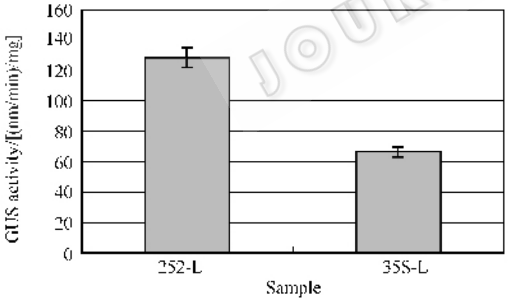

图 6　不同启动子在转基因植株叶子中 GUS 酶活性比较

Fig. 6　GUS activity of leaves of transgenic rice plants carrying Os252 and 35S promoters

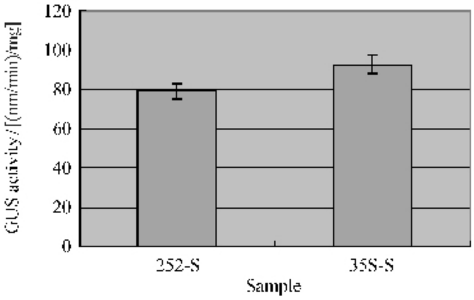

图 7　不同启动子在转基因植株茎中 GUS 酶活性比较

Fig. 7　GUS activity of stems of transgenic rice plants carrying Os252 and 35S promoters

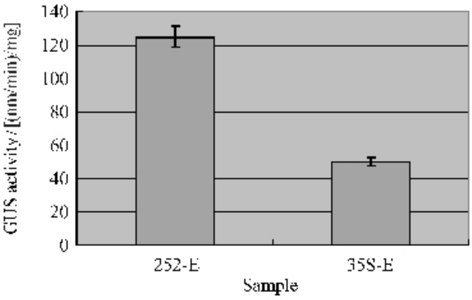

图 8　不同启动子在转基因植株胚乳中的 GUS 酶活性比较

Fig. 8　GUS activity of endosperms of transgenic rice plants carrying Os252 and 35s promoters

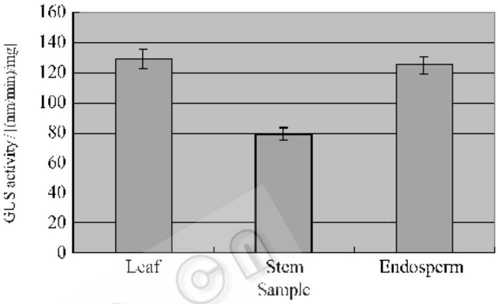

图 9　OS252 启动子在转基因植株不同组织中 GUS 酶活性比较

Fig. 9　GUS activity of different tissiues of transgenic rice plants carrying Os252 promoter

L: leaf; S: stem; E: endosperm.

从图中可看出，Os252 启动子在转基因水稻叶子中的酶活性约是 35S 启动子的 1.9 倍，在胚乳中的酶活性是 35S 的 2.5 倍左右，而在茎中的酶活性约为 35S 的 85%。

3　讨论

启动子作为一种基因表达的顺式作用元件在植物基因调控中扮演着十分重要的角色，而植物基因的表达受启动子的控制并有其时间和空间的特异性[12-15]，目前国际上普遍使用的 CaMV35S 启动子还不能满足某些特定的需要，而且由于启动子同源而造成的外源基因失活现象在多基因转化时较为普遍[16]，因此开发新型高效启动子尤为必要。水稻是植物发育生物学和分子生物学研究的模式植物，水稻基因组测序工作的完成为水稻基因功能的研究提供了极大的便利，但目前关于水稻高效表达启动子分离的工作研究得并不深入。

延长因子 I(EF1) 是一个富含赖氨酸的蛋白，主要作用于蛋白翻译过程中，它们依赖于 GTP 催化氨酰 tRNA 结合到 80S 核糖体上，水稻的 EF1 包含 4 个亚基，分别是 EF1-α、EF1-β、EF1-β′ 和 EF1-γ。EF1-α 与氨酰 tRNA 及 GTP 结合形成三元复合物，而 EF1-

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn

β、EF1-β′和 EF1-γ 则催化 EF1-α 上的 GDP/GTP 之间的转换,促使氨酰 tRNA 与核糖体结合。这些过程在生物体的每个组织中都不可或缺,故而 EF1-α 在水稻中应该是一个组成型表达的基因。

根据 EST 数据库分析,水稻中编码 EF1-α 的 *Os03g08010* 基因在茎中高效表达,但实验发现该基因启动子在茎中的活性并没有 35S 启动子高。相反,Os252 启动子在转基因水稻的叶子和成熟种子的胚乳中活性比 35S 分别高 1.9 和 2.5 倍,这可能是由于 EST 预测结果并不能真实反映该基因在不同部位的表达情况。因此,我们所分离的 Os252 启动子是一个叶和胚乳高效表达的启动子,可用于水稻的基因工程研究。由于该启动子是从水稻中分离出来的,因此,该启动子具有可靠的安全性。而水稻胚乳组织即是供食用的稻米,若将作物遗传改良的外源基因导入可以提高稻米品质,并且为基因工程提供了更便捷稳定的途径。

从以上实验数据分析表明,本试验成功地从水稻中分离出一个在水稻中高效表达的启动子,这为水稻的遗传改良提供了基础,同时若用于农业生产或其他产业化研究将具有重要的经济价值。

致 谢 感谢朱骏博士在研究工作以及写作中给予的帮助。

REFERENCES(参考文献)

[1] Odell JT, Nagy F, Chua NH. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*, 1985, **313**:810–812.

[2] Van Tunen AJ, Mur LA, Brouns GS, *et al*. Pollen and anther-specific chi promoters from Petunia: tendem promoter regulation of the chiA gene. *Plant Cell*, 1990, **2**:393–401.

[3] Zuo J, Chua NH. Chemical-inducible system for regulated expression of plant genes. *Curr Opin Biotechnol*, 2000, **11**:146–151.

[4] Sivamani Elumalai, Qu Rongda. Expression enhancement of a rice polyubiquitin gene promoter. *Plant Mol Biol*, 2006, **60**:225–239.

[5] Lu GH(陆桂华), Zhang JL(张景六), Hong MM(洪孟民). Anther specific expression of the chimeric gene of RTS promoter and coding region of β-glucuronidase gene in transgenic rice (*Oryza saliva* L.). *Acta Phytophysiologica Sinica*(植物生理学报), 2000, **26**(2):164–170.

[6] Wang JF(王金发), Li YK(李一琨), He HQ(何海琼), *et al*. Promoter function of a rice repetitive DNA sequence RRD3 in transgenic plants. *Acta Botanica Sinica*(植物学报), 2000, **42**:1057–1061.

[7] Sambrook J, Russell D (黄培堂等译). Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd ed. Beijing:Science Press, 2002.

[8] Liu QQ(刘巧泉), Zhang JL(张景六), Wang CY(王崇阳), *et al*. A highly efficient transformation system mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in rice(*Oryza saliva* L.). *Acta Phytophysiologica Sinica*(植物生理学报), 1998, **24**(3):259–271.

[9] Murray MG, Thompson WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res*, 1980, **19**:4321–4325.

[10] Jefferson RA, Burgess SM, Hirsh D. Beta-glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker. *Proc Natl Acad Sci*, 1986, **83**:8447–8451.

[11] Jefferson RA. Assay chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep*, 1987, **4**(5):397–405.

[12] Chen W, Provart NJ, Glazebrook J, *et al*. Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environment stresses. *Plant Cell*, 2002, **14**(3):559–574.

[13] He Y, Gan S. Identical promoter elements are involved in regulation of the OPR1 gene by senescence and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 2001, **47**(5):595–605.

[14] Yamaguchi S, Smith MW, Brown RG, *et al*. Phytochrome regulation and differential expression of gibberellin 3-beta-hydroxylase genes in germinating *Arabidopsis* seeds. *Plant Cell*, 1998, **10**:2115–2126.

[15] Li YK, Wang JF. Advances of the studies on plant promoter. *Chinese Bull Bot*, 1998, **15**(suppl):1–6.

[16] Li XG, Xie YQ, Zhu Z. In2 activation of foreign genes in transgenic plants. *Biotech Bull*, 1998, **3**:1–8.

journals.im.ac.cn

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 http://journals.im.ac.cn