

香蕉果实特异性 ACC 合酶基因启动子区的克隆及其功能初探

王新力 彭学贤*

(中国科学院微生物研究所植物生物技术实验室 北京 100080)

摘 要 根据本实验室所获得的香蕉果实特异性 ACC 合酶 cDNA 序列,以改进的接头连接 PCR 方法通过两次步行从香蕉基因组中分别扩增并克隆了其基因 5' 旁侧区近端 1.2kb 和远端 1.6kb 的片段。通过拼接,构建出含有 2505bp 启动子区和转录起始位点下游 86bp 的共 2591bp 的基因 5' 旁侧区片段;其启动子区中 -34 至 -28 为推测的 TATA 盒序列, -158 至 -146 为推测的 CCAAT 盒,与其它植物基因启动子结构相类似。将 2.5kb 启动子片段与 β -葡萄糖苷酶(GUS)基因编码序列融合,用基因枪法将构建的嵌合基因转入香蕉叶、根和果实的细胞后,只在果实细胞中观察到报告基因的瞬时表达,从功能上证明了此 2.5kb 的启动子片段具有指导报告基因在香蕉果实中特异性表达的作用。同时构建 5 个含不同 5' 端缺失启动子与 GUS 融合基因的表达载体。瞬时表达结果表明可能负责果实特异性表达的调控区存在于转录起始位点至 -1111 的启动子区中,而在 -1111 至 -608 区间可能存在一个正控制区。

关键词 香蕉,果实特异性,ACC 合酶基因启动子,瞬时表达

中图分类号 Q789 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2001)03-0293-04

启动子在基因表达调控中起着重要的作用。对于植物果实相关基因启动子的研究目前主要集中于双子叶植物当中;研究较深入的有番茄的 E4 基因^[1]、E8 基因^[2]、多聚半乳糖醛酸酶(PG)基因^[3]和 2A11 基因的启动子^[4],以及苹果的果实成熟相关 1-氨基环丙烷-1-羧酸(ACC)氧化酶基因及 PG 基因启动子^[5]。虽然这些启动子都与果实成熟过程中的基因表达有关,但它们彼此之间的同源性却很小;只含有一些同源性序列,如 E4/E8 位点序列和乙烯应答元件区序列等。其中已有一些蛋白质因子结合区以及顺式作用元件序列被确定,研究发现果实特异性表达相关顺式元件和乙烯应答反应元件处于启动子的不同区域。

对于单子叶植物果实成熟相关基因启动子的研究目前还很少见报道。香蕉是进行有关研究的理想材料。我们已克隆了香蕉果实特异性 ACC 合酶 cDNA^[6],ACC 合酶是植物中乙烯生物合成途径中的关键酶之一。本文在已有工作基础上,首次克隆了 ACC 合酶启动子区;并研究此启动子区在该基因果实特异性表达调控中的作用,为进一步研究单子叶植物果实特异性基因的表达调控奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

香蕉(*Musa acuminata*)叶和根取自香蕉组培苗移栽 6 个月的幼株,香蕉果实为贮存于 10℃ 的成熟青果实。

1.2 方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 参照 Chang 等提取植物 RNA 的方法^[7]。加入核酸提取液 65℃ 保温 1h,用氯仿/异戊醇抽提后,在上清液中加入 2 倍体积 95% 乙醇沉淀 DNA。若沉淀中杂质较多,可用 2% CTAB, 1.5mol·L⁻¹ NaCl 溶液将其溶解,用氯仿/异戊醇抽提去除杂质。

1.2.2 PCR 扩增 按照 Siebert 等的改进方法^[8]进行接头连接 PCR(Adaptor-ligation PCR)扩增;用一些产生平末端的限制酶对基因组 DNA 进行酶切,酶切产物与合成的接头 DNA 序列连接,建立一系列的接头连接 DNA 库;用接头引物 AP-1 和基因特异引物 GSP-1 进行第一次 PCR 扩增,再用接头引物 AP-2 与基因特异引物 GSP-2 进行巢式 PCR(Nested PCR)扩增。第一次步行所用的基因特异引物(GSPs)是根据

收稿日期 2000-10-23,修回日期 2001-02-12。

基金项目 中国科学院“九五”重大项目子课题 Ky951-A1-302-12-09 基金资助。

* 联系作者。Tel 86-10-62522107;Fax 86-10-62560912;E-mail pengxx@sun.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>

本实验测定的香蕉果实特异性 ACC 合酶全长 cDNA 序列设计的: GSP-1 引物(5'-TTGGGTGCTC-CTCGCCGTAG-3')和 GSP-2 引物(5'-GTAGATCCT-CATGTGACCCG-3')。对扩增出的片段经测序证明是香蕉果实特异性 ACC 合酶基因 5' 旁侧区后,设计 GSP-3 引物(5'-AAACGTATCTGACTACTTCG-3')和 GSP-4 引物(5'-ACTACTTCGATTTGCCTTTG-3')进行第二次步行,将两次扩增片段均克隆在 pBluescript II SK⁺ 载体中,转化大肠杆菌 DH5 α 菌株,所获得的 2 个重组质粒分别命名为 pPBAC1-1 和 pBHp4。利用插入片段重叠区中的 *Afl* II 位点和载体上的 *Sal* I 位点对这两个重组质粒进行酶切和连接,将两个插入片段拼接起来,所获得的重组质粒命名为 pBASP。

1.2.3 瞬时表达载体的构建 用 *Xba* I 和 *Eco*R I 双酶切 pBI221 质粒,分离出其中含有 GUS 基因和 NOS (胭脂碱合酶基因)终止子的约 2.2kb 的片段,与 *Xba* I 和 *Eco*RI 双酶切的 pUC19 载体片段连接,转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,筛选出阳性克隆,其重组质粒命名为 pUGS。

用 *Pst* I 等限制酶、T4DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶对质粒 pPBAC1-1、pBASP 和 pUGS 进行酶切、修饰和连接,连接产物转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞,筛选含有正向插入的重组质粒。获得 5 个含不同 5' 端缺失启动子的瞬时表达载体。

1.2.4 瞬时表达检测 将香蕉果实、叶和根用 1% 氯化汞溶液消毒 10min,用灭菌蒸馏水冲洗数次,将香蕉果实和根切成薄片,香蕉叶的上表皮用手术刀刮去,置于 1/2 MS 培养基上,室温放置 4h。参照文献 [9] 制备微弹及轰击香蕉材料。射击距离为 9cm,样品室真空度为 685.8mmHg,气压力 900psi,轰击;将轰击后的香蕉材料于 25 $^{\circ}$ C 避光培养 36h。然后取 GUS 活性检测液 100mmol/L 磷酸氢钠缓冲液(pH7.0),500 μ mol/L $K_3Fe(CN)_6$,500 μ mol/L $K_4Fe(CN)_6$,0.1% X-Gluc,1mmol/L EDTA 适量,加在被基因枪轰击过的香蕉材料表面上,37 $^{\circ}$ C 保温 8h,用灭菌蒸馏水冲洗后在双目解剖显微镜下观察并照像。

2 结果与讨论

2.1 香蕉果实特异性 ACC 合酶基因启动子区的克隆与拼接

从香蕉叶中提取到 50kb 的香蕉基因组 DNA。用产生平末端的限制酶 *Dra* I、*Eco*RV、*Hinc* II、*Hpa* I、*Pvu* II、*Sca* I、*Sma* I、*Sna* BI、*Ssp* I 和 *Stu* I 对香蕉 DNA 进行酶切,酶切产物与接头 DNA 连接,构建成

作为 PCR 反应模板的“接头连接 DNA 库”。第一次步行由 *Dra* I 产生的 DNA 库中扩增出 1.2kb 片段。将其插入到 pBluescript II SK⁺ 载体的 *Eco*RV 位点上,构建成重组质粒 pPBAC1-1。完成此插入片段 1197bp 的序列测定,证明插入片段的一端与香蕉果实特异性 ACC 合酶 cDNA 5' 端的序列一致,说明重组质粒中所含插入片段确实为其基因的 5' 旁侧序列。

为了进一步获得更远端的启动子区序列,根据第一次步行所获得的序列结果,为第二次步行设计、合成了 2 个引物 GSP-3 和 GSP-4。为了能将 2 次步行扩增出的启动子区段连接起来,我们注意到 -1029 至 -1024 为 *Afl* II 的酶切位点。因此所设计的引物是位于这个位点的内侧,这样第二次步行时也能扩增出包括这一位点的片段。如果在新扩增的片段中不存在另外的 *Afl* II 位点,就可以利用这一位点将 2 次扩增出的启动子片段连接起来。第二次步行由 *Hpa* I 酶切产生的 DNA 库中扩增出 1.6kb 的 DNA 片段,构建成重组质粒 pBHp4,其插入片段长 1556bp,其中含有一个 *Afl* II 位点;序列测定表明由 *Hpa* I 产生的 DNA 库中扩增出的片段的端部序列与第一次步行获得的启动子区段的远端序列相一致,两者间有 162bp 的重叠区。将两次步行获得的序列叠加,得到 2591bp 的香蕉果实特异性 ACC 合酶基因 5' 旁侧区序列(GenBank 登记号 AF119096),见图 1。两个重组质粒的插入片段在 -1111 至 -950 区间重叠,其中 -1029 至 -1024 为 *Afl* II 的酶切位点。两个片段在 pBluescript II SK⁺ 载体中的插入方向一致,为两个片段的拼接提供了有利条件。利用这一 *Afl* II 位点和载体上的 *Sal* I 位点将两个插入片段拼接起来,获得的重组质粒 pBASP。

我们利用 5'RACE 技术确定了香蕉果实特异性的 ACC 合酶 cDNA 的转录起始位点^[6],将该 ACC 合酶 cDNA 序列(GenBank 登记号 AF109927)与其基因的 5' 旁侧区序列相比较,可以看出香蕉果实特异性 ACC 合酶基因中 +75 至 +77 为翻译起始密码子,在 5' 非翻译区内不存在内含子序列;推测的 TATA 盒与 CCAAT 盒分别于 -34 至 -28 与 -158 至 -146 的区段上。-760 至 -748 的序列与矮牵牛(*Petunia hybrida*)中一种 Myb 蛋白质结合位点的序列^[10]一致(以 MYB.Ph 表示),-734 至 -707 的序列与 GCN4 蛋白质结合位点的序列相似(以 GCN4-like 表示),两段序列间隔 13bp。这种结构与谷类醇溶蛋白基因启动子中胚乳盒的结构^[11]类似,只是胚乳盒中除了 GCN4 类似模块(GLM)之外还有一个 DoF 蛋白质的

.....-2311 ACCTCCCCAC -2302.....-1939 AACCAACCAC -1931.....
 P P
 -1812 TATATTACCTACAA -1799..... -1772 GTGGAAT AATTACTCTT-1756
 SBF-1 Athb-1
 -1680 AATATTAATTTTAC -1667..... -1579 CAGGTAGGT -1571...
 SBF-1 P
-1552 CCTAATAATTTATT -1539
 Athb-1
 ATTTGTCTCA CGAGATCGAA ATATATAATT AGAAAAGTGTG ACATGACAAG -756
 TCAGTTATTC TATAACCATA GTTTTGATT CATGACTCAT CGTGACATTT -706
 MYB. Ph GCN4-like
 TGAGCCTAAA TGGATCTAAA TATTAAGAAA ACCAATTGTTG AATTTTCCTT -356
 SBF-1
 CTTTCGCAAA CAGCATGTCA TCGATGAGAT TAAGGTTTAC AAAGAGCGGC -306
 GCACAATTTT GTTTTGGGAT AAATAATTCT GTGCTTACAA TATAGAAGAC -256
 Athb-1 SBF-1
 TTCGAGTCTGA AAGCGACTCC CGAGTTCCGA ACACGTTCATT GTTGCCGCCA -206
 ACACTGAAGC TTCCTATTTG GCGTCACCTG TCGATGTTAC GCGCATCTCA -156
 TCGCCAAATCA CGTCCATGAT TTACACGCTG CCGGATCGAC TCGGTTTCCA -106
 CCAAT-box
 TGTCTTCTT TTCCAGCCTG AAGTCTCTT TGTGTACCTC TTTGGATGTT -56
 TGAATGTTCT CGGGATTTGC CTATTAATGG TCATCGGAAT CGACTCTTGC -6
 TATA-box
 +1
 AAATGCGAGC AGCTGCTTCT CCTTCTTCT CTCTGCTCGC TTCAGCCTTT +45
 TCCGGTACGT ACCTGAGATA ACGGGTCACTAGGATCTA C +86
 M R I Y

图 1 香蕉果实特异性 ACC 合酶基因启动子区部分序列

Fig.1 Partial sequence of promoter region of banana fruit-specific ACC synthase gene

结合位点,而不是 Myb 蛋白质的结合位点。此外还有多处序列与法国菜豆沉默子结合因子-1^[12](以 SBF-1 表示)、拟南芥同源异形盒蛋白 1^[13](以 Athb-1 表示)和玉米激活因子 P^[14](以 P 表示)的结合位点相一致,见图 1。

与 GenBank 中番茄 PG 基因(M37304、X07410)、E8 基因(X13437)、番茄果实特异蛋白基因(M37631)、苹果果实 ACC 氧化酶基因(AF030859)、苹果 PG 基因(AF031233)和猕猴桃 PG 基因(L12019)启动子序列相比较,相似性只有 21.9%~25.0%;但这些基因启动子序列之间的相似性也都在 29.0% 以下。在香蕉果实特异性 ACC 合酶基因启动子中也未发现与番茄 E4/E8 位点及乙烯应答元件相一致的序列。

2.2 所克隆的香蕉果实特异性 ACC 合酶基因启动子区的功能鉴定

在香蕉果实特异性 ACC 合酶基因启动子内转录起始位点处 -2 至 +4 为一 PstI 位点, BstXI、BamHI、XbaI 和 EcoRI 位点分别位于 -2255、-1897、-1607 和 -608 处。利用 pPBAC1-1 和 pBASP 中的这些酶切位点,构建了以 GUS 基因为报告基因

含 2.5kb 启动子区及其 5' 缺失的 6 个瞬时表达载体,因此在瞬时表达载体 pUGBA、pUGBN、pUGBB、pUGXB、pUGAF 和 pUGE 中分别含有约 2.5kb、2.3kb、1.9kb、1.6kb、1.1kb 和 0.6kb 的启动子区,图 2 所示为表达载体中所包含的启动子区段。

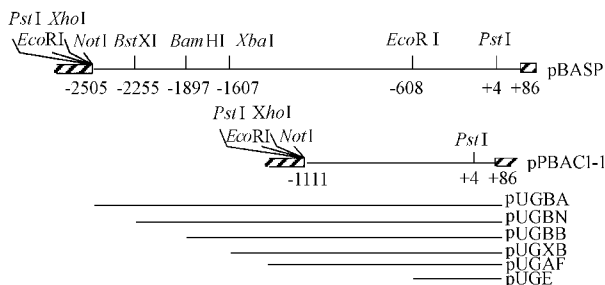


图 2 瞬时表达载体中所含启动子区段

Fig.2 Promoter region in promoter-GUS chimeric genes for transient expression assay

在瞬时表达试验中,以不含有启动子片段的 GUS 基因载体质粒(pUGS)为阴性对照转化香蕉材料,在基因枪轰击后的香蕉果实、叶和根中均未观察到出现蓝色斑点(见文前彩版 I-A)。以含有水稻 Actin 基因启动子与 GUS 融合基因的 pMG9 表达载体为阳性对照,在香蕉的果实、叶和根中均能观察到蓝色斑点(见文前彩版 I-B),说明作为单子叶植物组成型表达的水稻 Actin 基因启动子能指导基因在香蕉不同器官中的表达。

用含有 2.5kb 香蕉果实特异性 ACC 合酶启动子区的瞬时表达载体 pUGBA 转化香蕉材料,只在香蕉果实中出现浅的蓝色斑点,而在香蕉叶和根中未观察到蓝色斑点(见文前彩版 I-C)。瞬时表达结果清楚地表明我们克隆的香蕉果实特异性 ACC 合酶基因 5' 旁侧区确实具有启动子功能,并且具有指导基因在果实中特异性转录的活性。

用 5 种从 5' 端缺失的启动子表达载体转化香蕉材料,在香蕉叶和根中也均未检测到 GUS 基因的表达。在香蕉果实方面,除了用 pUGE 轰击的果实上未观察到 GUS 基因表达之外,由其余 4 个缺失构建物轰击的果实中都出现同等程度的蓝色斑点。因此香蕉果实特异性 ACC 合酶基因 -1111 启动子区(pUGAF)就具有与 -2505 启动子区(pUGBA)相同的指导基因果实特异性表达的功能;可能在 -1111 至 -608 区段具有一个正控制元件,其缺失后(pUGE)使报告基因的表达水平降低而用组织化学染色法检测不到。负责果实特异性的元件究竟位于启动子的哪个区段内,还需要通过将此启动子的不同区段与

其它启动子融合,根据这种嵌合启动子的功能,或利用接头步查突变(Adaptor scan mutation)的方法进行分析才能确定^[1,15]。

致谢:感谢本实验室莽克强先生和中山大学黄学林教授给予本工作的大力帮助。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Xu R ,Goldman S ,Coupe S *et al* . Ethylene control of E4 transcription during tomato fruit ripening involves two cooperative *cis* elements. *Plant Mol Biol* ,1996 **31** :1117 ~ 1127
- [2] Deikman J ,Xu R ,Kneissl M L *et al* . Separation of *cis* elements responsive to ethylene ,fruit development ,and ripening in the 5'-flanking region of the ripening-related E8 gene. *Plant Mol Biol* ,1998 **37** : 1001 ~ 1011
- [3] Nicholass F J ,Smith C J S ,Schuch W *et al* . High levels of ripening-specific reporter gene expression directed by tomato fruit polygalacturonase gene-flanking regions. *Plant Mol Biol* ,1995 **28** :423 ~ 435
- [4] Van Haaren M J J ,Houck C M . A functional map of the fruit-specific promoter of the tomato 2A11 gene. *Plant Mol Biol* ,1993 **21** :625 ~ 640
- [5] Atkinson R G ,Bolito K M ,Wright M A *et al* . Apple ACC oxidase and polygalacturonase ripening-specific gene expression and promoter analysis in transgenic tomato. *Plant Mol Biol* ,1998 **38** :449 ~ 460
- [6] Wang XI(王新力) ,Peng XX(彭学贤) ,Li H(李宏) . Cloning and sequence of cDNA encoding ACC synthase specifically expressed in banana fruit. *Chinese Journal of Biotechnology(生物工程学报)* , 2000 **16** (2):134 ~ 136
- [7] Chang S ,Puryear J ,Cairney J . A simple and efficient method for isolating RNA from pine tree. *Plant Mol Biol Repr* ,1993 **11** :113 ~ 116
- [8] Siebert P D ,Chenchik A ,Kellogg D E *et al* . An improved PCR method for walking in nucloned genomic DNA. *Nucl Acids Res* ,1995 **23** : 1087 ~ 1088
- [9] Xu S H(徐淑平) ,Wei Z M(卫志明) . Introduction to method of microprojectile bombardment and its application. *Plant Physiology Communications(植物生理学通讯)* ,1998 **34** :41 ~ 43
- [10] Solano R ,Nieto C ,Avila I *et al* . Dual DNA binding specificity of a petal epidermis-specific MYB transcription factor(MYB. Ph3) from *Petunia hybrida*. *EMBO J* ,1995 **14** :1773 ~ 1784
- [11] Albani D ,Hammond-Kosack M C U ,Smith C *et al* . The wheat transcriptional activator SPA :a seed-specific bZIP protein that recognizes the GCN4-like motif in the bifactorial endosperm box of prolamin genes. *Plant Cell* ,1997 **9** :171 ~ 184
- [12] Lawton M A ,Dean S M ,Dron M *et al* . Silencer region of a chalcone synthase promoter contains multiple binding sites for a factor SBF-1 , closely related to GT-1. *Plant Mol Biol* ,1991 **16** :235 ~ 249
- [13] Sessa G ,Morelli G ,Ruberti I . The Athb-1 and -2 HD-Zip domains homodimerize forming complexes of different DNA binding specificities. *EMBO J* ,1993 **12** :3507 ~ 3517
- [14] Grotewold E ,Drummond B J ,Bowen B *et al* . The myb-homologous P gene controls phlobaphene pigmentation in maize floral organs by directly activating a flavonoid biosynthetic gene subsetRL. *Cell* ,1994 , **76** :543 ~ 553
- [15] Shinshi H ,Usami S ,Ohme-Takagi . Identification of ethylene-responsive region in the promoter of a tobacco class I chitinase gene. *Plant Mol Biol* ,1995 **27** :923 ~ 932

Cloning of Promoter of Banana Fruit-specific ACC Synthase Gene and Primary Study on its Function

WANG Xin-Li PENG Xue-Xian

(*Plant Biotechnology Laboratory ,Institute of Microbiology , Chinese Academy of Sciences ,Beijing 100080 ,China*)

Abstract Based on our cDNA sequence of ACC synthase gene expressed specifically in banana fruit ,we cloned the 5'-flanking proximal region of 1197 bp and distal region of 1556 bp via walking on unknown region of genomic DNA by an improved adaptor ligation PCR ,and created a 2591 bp fragment containing a promoter region of 2505 bp and a transcriptional region of 86bp. The entire 2.5kb promoter and 5 different 5' deletion variants were fused to the GUS(β -glucuronidase) cDNA sequence and introduced into leaf ,root and fruit cells of banana plant via particle bombardment separately. The results of transient gene expression assay indicated that the obtained promoter region could direct fruit-specific gene expression. The regulatory region for fruit-specificity was possibly located in the region from -1111 to +1 and a positive regulatory region may locate between nucleotide -1111 to -608.

Key words ACC synthase , fruit-specific , promoter , banana , transient expression

Received :October 23 ,2000

This work was supported by Grant from the Key Project of the Chinese Academy of Sciences(KY951-A1-302-12-09).

* Corresponding author. Tel 86-10-62522107 ,Fax 86-10-62560912 ,E-mail pengxx@sun.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>