

香蕉凝集素基因启动子的分离、序列分析及鉴定

Isolation , Sequencing Analysis and Characterization of the Promoter of Banana Lectin Gene

徐碧玉, 刘 歌, 金志强*

XU Bi-Yu , LIU Ge and JIN Zhi-Qiang*

中国热带农业科学院生物技术研究所 热带作物生物技术国家重点实验室 海口 571101

State Key Laboratory of Tropical Crops Biotechnology , Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology , Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences , Haikou 571101 , China

摘 要 香蕉是世界上最重要的水果之一,由于香蕉果实是利用转基因方法生产重组药用蛋白或有价值的化合物的理想器官,构建能在香蕉果实中高水平表达异源蛋白质的表达载体是非常有意义的。而一个高效表达的载体,启动子则是其最重要元件之一,因此,果实特异性表达启动子的获得是香蕉作为生物反应器的前提。香蕉凝集素是一种在香蕉果实中大量存在的蛋白质,其基因被证明在果肉组织中大量表达。利用染色体步移法克隆到香蕉凝集素基因 5' 端上游的一段长 702bp 的序列,经序列测定及软件分析表明,该序列具有典型的启动子结构。此序列置换植物表达载体 pBI121 的 CaMV 35S 启动子,构建植物表达载体,命名为 pBI12,该启动子下游为 *gus* 基因。利用基因枪法转化香蕉的根、叶和果实薄片,对 *gus* 基因的瞬时表达进行测定,结果表明所获得的凝集素基因启动子,只在香蕉果肉中瞬时表达,该启动子的表达具有果实特异性,并且表达量较高。

关键词 香蕉,香蕉凝集素基因,启动子,果实特异表达

中图分类号 Q781 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)06-0945-05

Abstract Banana (*Musa* spp) is one of the most important fruit crops in the world. Banana fruit is an ideal organ for producing foreign pharmaceutical proteins and chemicals by genetic engineering. A perfect promoter driving foreign gene to express strongly and specifically in banana fruit is necessary for that. In order to isolate a banana fruit-specific expressed promoter, a fragment of 702 nt nucleotide sequence upstream 5' of banana lectin (BanLec) gene, which was demonstrated to express specifically in banana fruit previously, was isolated by using chromosomal walking in this study. Bioinformatical analysis of this sequence shows that the sequence contains some typical elements of a promoter. To identify the fruit-specific expression of this promoter, a construct was derived from pBI121, which originally CaMV 35S promoter was replaced by the 702 nt nucleotide sequence, and named as pBI12. Transformations of pBI12 to roots, leaves and fruit pieces of banana were carried out by using particle bombardment. The transient expression of *gus* showed that the *gus* expressed specifically in banana fruit with a little higher level compared with CaMV 35S. It is the first report that BanLec promoter is a potential fruit-specific expressed promoter which can further be used in transgenes into banana.

Key words Banana (*Musa* spp), banana lectin gene promoter, fruit-specific expressed promoter

Received: March 24, 2006; Accepted: August 28, 2006.

This work was supported by Grants from the Natural Sciences Foundation of Hainan Province (No. 30201) and the National Natural Sciences Foundation of China (No. 30460071).

* Corresponding author. Tel 86-898-66890347, Fax 86-898-66890978, E-mail zhiqiangjin2001@yahoo.com.cn

海南省自然科学基金资助项目(No. 30201),国家自然科学基金资助项目(No. 30460071),生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

香蕉果实是利用转基因方法生产重组药用蛋白、多肽或有价值的化合物的理想植物^[1]。外源基因能够在植物组织中实现正常乃至高效的表达, 一个重要的条件是构建能在受体植物特异组织或器官中高水平表达异源蛋白质的表达载体。而一个高效表达的载体, 启动子则是其最重要元件之一。组织特异性启动子能使外源基因在转基因植物中特定时间、特定组织表达, 使目的基因的表达产物集中, 并且表达量增加。因此, 果实特异性启动子的获得是香蕉果实作为生物反应器的前提。

香蕉凝集素(Banana lectin, BanLec)是在成熟香蕉果实中的一种主要蛋白, 据测算每克果肉至少含有 10 μ g 高度稳定的和对蛋白酶有抗性的凝集素^[2]。我们采用 RT-PCR 及竞争性 PCR 的方法, 对凝集素基因在香蕉不同器官中的表达进行了定量研究, 实验结果表明香蕉凝集素基因只在果肉中表达, 而且随着采后成熟过程而表现出发育特异性, 在成熟度 IV 的果肉中, 表达量最高, 每微克总 RNA 中包含有 68ng BanLec 基因的转录本^[3]。根据前期的研究, BanLec 基因的启动子很可能是果实特异高效表达启动子。本研究的目的是克隆 BanLec 基因 5' 上游的启动子序列, 通过构建携带 *gus* 基因的植物融合表达载体, 转化香蕉不同组织以检测启动子特性, 以期获得应用于香蕉转基因的果实特异表达启动子。

1 材料和方法

1.1 实验材料和试剂

1.1.1 实验材料: 香蕉果实采自热带作物生物技术国家重点实验室实验基地。

1.1.2 试剂: Universal GenomeWalker Kit 购自基因公司(Gene Company), 其它试剂购自华美公司。

1.2 实验方法

1.2.1 凝集素启动子的分离:

(1) 香蕉基因组 DNA 的提取参照傅荣昭的方法^[4]。

(2) 香蕉凝集素启动子扩增

准备 4 个 1.5mL 的离心管, 放入 2.5 μ g 香蕉基因组 DNA, 分别用 *Dra* I、*Eco*R V、*Pvu* II、*Stu* I 进行酶切。按 Universal GenomeWalker Kit 提供的方法对酶切产物进行纯化。纯化后基因组 DNA 与 GenomeWalker Adaptors 连接。

根据我们克隆并已登录在基因库中的 BanLec 基因的序列(登录号: AY103481), 按照 Universal GenomeWalker Kit 的要求设计两个特异引物:

Primer 1 5'-TGGGGAGTACCACCGCTGCCACCGAAGTGT-3'

Primer 2 5'-TCCGTTCCCTCCCCATGCTCCCACCTTGAT-3'

依据 Universal GenomeWalker Kit 提供的方法及反应条件, 利用特异引物 Primer 1、Primer 2 与试剂盒提供的接头引物进行第一轮和第二轮 PCR。

1.2.2 序列测定与分析: 扩增片段与 pGEM-T Easy Vector 连接, 得到 pGEM-T-Lec 载体, 转化 *E. coli* DH5 α 筛选重组子酶切鉴定, 于上海生物工程公司测序; 利用 Promoter predictions、PlantCARE 软件进行启动子功能预测。

1.2.3 植物表达载体 pBIL2 构建: 根据测序结果及酶切位点分析, 设计该启动子序列 5' 和 3' PCR 扩增引物 Primer 3 和 Primer 4, 并分别加上 *Hind* III 和 *Bam* H I 酶切位点:

Primer 3 5'-GCAAGCTTTGGTATCTATTTATGAAATC-3'
Hind III

Primer 4 5'-GGGGATCCGACGTCGACACACGACG-3'
Bam H I

以 pGEM-T-Lec 质粒 DNA 为模版进行 PCR, PCR 产物和 pBI121 质粒 DNA 分别用 *Hind* III 和 *Bam* H I 进行双酶切。酶切产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 回收经酶切的 PCR 产物(约 700bp) 和 pBI121 酶切产物的大片段(约 11kb)。将回收的 PCR 产物及 pBI121 酶切大片段连接获得含有凝集素启动子植物表达载体 pBIL2, *Hind* III 和 *Bam* H I 进行双酶切鉴定。

1.3 基因枪法对香蕉不同器官转化 pBIL2 及 *gus* 基因的组织化学染色定位

将香蕉果实用 1% 氯化汞溶液浸泡 10min, 用灭菌蒸馏水冲洗数次再将其徒手切成大小 0.5cm²、厚度 0.5~1mm 的薄片; 纵剖香蕉组培苗的根并将叶切为(0.5~1)cm² 小块。将根、叶片和果实薄片均匀置于 1/2MS 培养基上室温放置 3h, 每皿约放置 40 块, 重复 6 皿。按照 Jefferson 等人^[5]的方法, 以 H₂O 包被的微弹为阴性对照, pBI121 质粒 DNA 包被的微弹为阳性对照, 分别取轰击后的香蕉根、叶片和果实薄片于 26 $^{\circ}$ C 暗培养 24~48h。然后进行组织化学染色和基因枪轰击后 24h 的转化材料 GUS 活性比色测定, 以 GUS 提取液中每 mg 总蛋白在 1min 中生成对硝基苯酚的微摩尔数为一个酶活单位。

2 结果与分析

2.1 BanLec 基因上游 DNA 序列分离

利用 4 个内切酶分别对香蕉基因组 DNA 进行酶切, 两个酶切完全, 另两个酶切不完全(图

1)。酶切产物经与接头连接,分别作为 PCR 扩增的模板,经过两轮 PCR 扩增,4 个模板均扩增出条带(图 2),选取分子量最大条带(*EcoRV* 酶切)回收、测序。

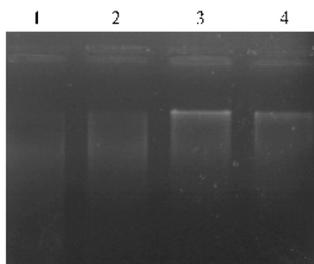


图 1 香蕉基因组 DNA 酶切电泳图

Fig. 1 Gel electrophoresis of digested banana genomic DNA

1: *Dra* I; 2: *EcoRV*; 3: *Pvu* II; 4: *Stu* I.

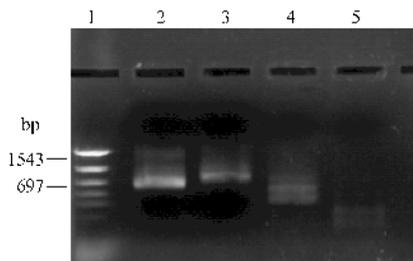


图 2 酶切产物第 2 轮 PCR 电泳图

Fig. 2 Gel electrophoresis of the secondary PCR products using digested banana genomic DNA as templates

1: *Dra* I; 2: *EcoRV*; 3: *Pvu* II; 4: *Stu* I.

2.2 序列分析

通过测序,获得 BanLec 基因启动子序列 702bp(图 3)。采用 Promoter predictions、PlantCARE 等软件进行基础启动子区及调控元件分析,结果表明在 -89 ~ -138bp, -221 ~ -270bp 和 -499 ~ -548bp

存在三处可能的基本启动子区。预测距离转录起始密码子 ATG 最近的转录起始点为 A,位于起始密码子上游 126bp 处,这与普遍认为的转录起始位点为 A 相一致。该序列具有启动子的基本转录元件:TATA-box 位于 -159、-523、-546、-570 和 -655 处;CAAT-box 位于 -93、-128、-224、-284 和 -532 处,此外还含有脱落酸响应的顺式作用因子 ABA 反应元件 ABRE,分别位于 -250、-287 和 -413 处;与茉莉酸响应有关的顺式调节元件 CGTCA-motif 位于 -412 处;赤霉素应答相关元件 P-box 位于 -84 处;赤霉素反应顺式元件 TATC-box 位于 -193 处;水杨酸反应顺式元件 TCA-element 位于 -549 处;茉莉酸响应相关顺式调节元件 TGACG-motif 位于 -656 处等。以上元件的预测概率除 TATA-box -159 处为 0.867、TATA-box-523 处为 0.909 外,其余均为 1.0。

序列分析结果表明,我们所分离的启动子含有多个不同激素作用元件,而这些激素基本为诱导成熟类激素,这是否与该基因只在成熟的香蕉果实中高量表达的特点有关,还需进一步研究证明。经数据库比对及查新未见有该序列的报道(正在申报国家发明专利,公开号 CN1644694)。

2.3 pBIL2 载体的构建

构建的含有香蕉 BanLec 基因启动子序列及携带 *gus* 基因的植物表达载体 pBIL2 如图 4 所示,酶切鉴定表明载体构建成功。

2.4 瞬时表达结果

以香蕉幼叶、根和果实薄片为受体材料,基因枪轰击后,受体材料培养 24h,染色结果如图 5 所示。pBI121 包被的微弹轰击的材料,叶片、根和果实薄片

```

TTGACTATACAATTTCACTCATGGTTGACTTACCGTGCTGGTATCTA[TTTATGAA]ATCTTGAGTTTAAT
GTTTCTATTAATTTATTT[TTTATA]AATCTTAAAAGATCCTAGAACGTTAATCCCTTTGGGATC[AA
TATA]TAAAAGTGACATACGACT[TAGAAAA]AATCAAATAAAAATTAA[ATATAAA]TATATATTTATG
AAGAATAAATTTAAATTTTGTATTACTTAATCATATCCTACATATCTACGATCTGCACCATCAAAAC
CAAAAAAAAAAGGGGGTTATCTCTCCAACGTAGCCGAAGTATTGAACTCTCAAGTCCCCCAA
CACGTTTCCATGTGTGCGACCGCCACGCCATATCCTTATCCGCTCCTCTTTAATATTGACCACAC
CACCATCCGTGATCGTGCAGCAGTACGTTCTTCGTCGTCGAGAGGCTCTACACGACCTCGTCA
CGTGATACACGCTTTCCCTCGAGGAAGCCACGGGCGAGGGGGTGAGCGGTACACCTCCATTCC
ACCCCGACATCAGAGCCATGGCGATCC[GCTATA]GGTAGCCTCTCTCCCTCTTCCCAACATTA
TCTTCTGCAGAAGAAAGGGAGGAGTTTGGTACACACAACCGATGGTGAGAGGCTCTCTATA
CACACATAGTTTCTGTCTGTGGAACAGTTTGGTTACCTCCGTGCGTCGTGTGTCGACGTC

```

图 3 BanLec 基因启动子序列

Fig. 3 Nucleotide sequence of cloned BanLec gene promoter

Predicted basic elements of promoter, C C A: potential initial points of transcription, TATA: TATA box.

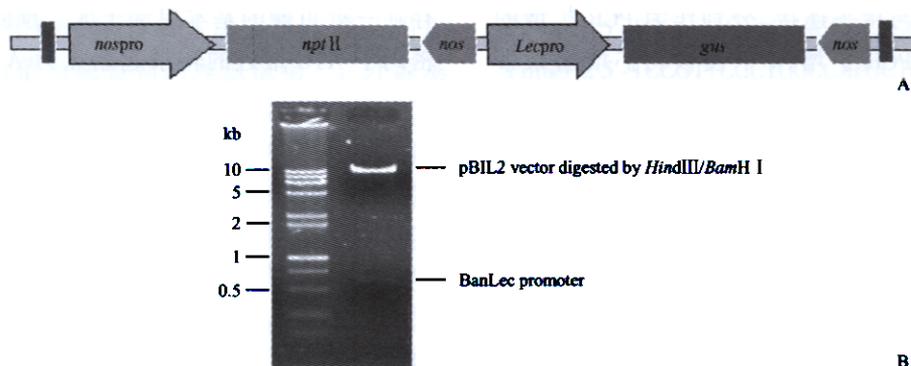


图 4 pBIL2 载体构建及酶切鉴定图

Fig. 4 Construction and characterization of pBIL2 by digestion by *Hind*III/*Bam*H I

A: construct of pBIL2; B: gel electrophoresis of digested pBIL2.

在显微镜下均观察到蓝色(图 5:上)。pBIL2 包被的微弹轰击的材料,叶片、根在显微镜下没有观察到蓝色,而果实薄片在果肉中观察到蓝色,蓝色范围较大且稍深(图 5:中)。水包被的微弹轰击的材料,叶片、根和果实薄片在显微镜下均未观察到蓝色(图 5:下)。gus 基因瞬时表达结果显示,pBIL21 上的 35S 启动子是组成型启动子,我们所获得的凝集素基因启动子是果实特异表达启动子,且表达活性从 GUS 染色看略强于 35S 启动子在果实中的表达。

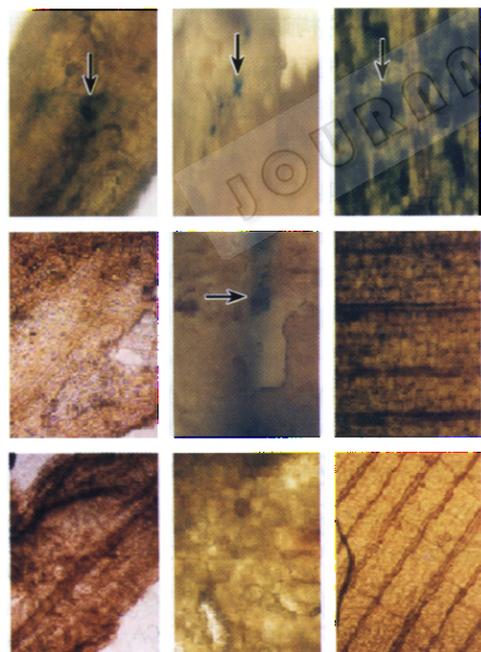


图 5 pBIL2 载体在香蕉不同器官中瞬时表达结果

Fig.5 Transient expression of pBIL2 in different organs of banana Upper: gus expression in root, fruit and leaf sections of banana transformed with pBIL21; Middle: gus expression in root, fruit and leaf sections of banana transformed with pBIL2; Lower: gus expression in root, fruit and leaf sections of banana transformed with H₂O. The arrows point to the positions of gus expression.

2.5 pBI121 与 pBIL2 转化香蕉不同材料中 GUS 活性检测

基因枪转化后 24h 取不同反应时间、相同重量的基因枪轰击的果实薄片制备 GUS 提取液,酶反应后测得 415nm 处两种果实转化材料 GUS 提取液不同反应时间的光吸收值,将其换算成消光产物量后对时间作图(图 6)。

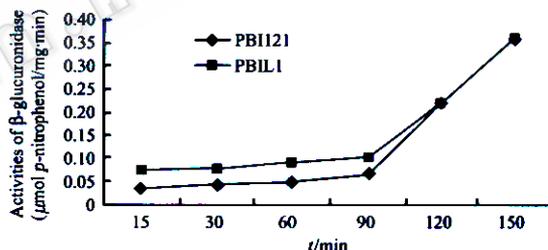


图 6 GUS 酶活性变化曲线图

Fig.6 Curve of GUS enzyme activity in fruit at different times after transformation

GUS 酶活力曲线图表明,pBIL2 质粒轰击的果实片在 15~90min GUS 活性高于 pBI121 质粒轰击的果实片,120~150min 两个质粒轰击样品的 GUS 活性基本一致。说明 BanLec 基因启动子在果实中的启动活性高于 35S 启动子,而且持续的时间较长。

3 讨论

外源基因在转基因植株中的表达受启动子的控制,常用的组成型启动子(如 35S 启动子)将会使基因在转基因植株中不同组织、不同时间均衡表达,会使基因表达的产物造成浪费^[6]。果实作为人们食用的果树植物的主要器官,对其生理学及分子生物学的研究在不断深入。特别是近几年植物抗病疫苗研究的兴起,使植物果实对某种产物的特异表达成为研究的热点内容。与之对应,果实特异启动子的克

隆的研究也在不断深入。目前果实特异启动子的研究,主要集中在番茄中^[7-9],香蕉果实中报道克隆了 ACC 氧化酶和 ACC 合成酶基因的启动子^[10,11],*gus* 基因表达检测证明为果实特异表达。

用 Promoter predictions 及 Plant core 软件对本文分离的 BanLec 基因启动子顺式作用元件分析,该启动子含有 ABRE、ATC-motif、CGTCA-motif、P-box、TATC-box、TCA-element、TGACG-motif 等元件。ABRE 为脱落酸响应的顺式作用因子 ABA 反应元件,此启动子共有三处含有此元件,因此推测该启动子受 ABA 诱导表达。此外还有与茉莉酸响应有关的顺式调节元件、赤霉素应答相关元件、赤霉素反应顺式元件、水杨酸反应顺式元件、植物激素响应元件、茉莉酸响应相关顺式调节元件等,该启动子具有如此多的激素应答及反应顺式元件,应该是一个受多种激素调控的启动子。

本研究所获得的 BanLec 基因启动子,从现在的结果看,是一个具有潜力的香蕉果实特异表达启动子,但由于目前所获得的启动子序列长度有限,我们正在采用染色体步移的方法,以期获得更长的启动子序列,采用突变和缺失的方法对这些元件的功能进行更深入的研究及应用于香蕉的转基因研究中。

REFERENCES (参考文献)

[1] Richter L, Mason HS, Artzen CJ. Transgenic plants created for oral immunization against diarrheal diseases. *J Travel Med* 1996 **3** 52-56

[2] Peumans WJ, Zhang W, Barre A *et al.* Fruit-specific lectins from banana and plantain. *Planta*.2000 **211** 546 - 554

[3] Jin ZQ(金志强), Zhang DY(张德有), Xu BY(徐碧玉). Cloning and developmental and tissue-specific expression of banana (*Musa acuminata* AAA) lectin gene. *Acta Genetica Sinica*(遗传学报), 2004 **31**(5) 508 - 512

[4] Fu RZ(傅荣昭), Sun YR(孙勇如), Jia SR(贾世荣). Plant Genetic Transformation. Beijing: Chinese Science and Technology Press (中国科学技术出版社), 1994. pp. 134 - 143

[5] Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW. β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene marker in high plant. *EMBO J*, 1987, **6**(13) 3901 - 3907

[6] Robinson DJ, Environmental risk assessment of release of transgenic plants containing virus-derived inserts. *Transgen Res*, 1996 **5** 359 - 362

[7] Penarrubia L, Kim R, Giovannoni J *et al.* Production of the sweet protein monellin in transgenic plants. *Bio/Technol*, 1992, **10** 561 - 564

[8] Bird CR, Smith CJS, Ray JA *et al.* The tomato polygalacturonase gene and ripening-specific expression in transgenic plants. *Plant Mol Biol*, 1998, **11** 651 - 662

[9] Chengappa S, Guilleroux M, Phillips W *et al.* Transgenic tomato plants with decreased sucrose synthase are unaltered in starch and sugar accumulation in the fruit. *Plant Mol Biol*, 1990, **40** 213 - 221

[10] Wang XI(王新力), Peng XX(彭学贤). Cloning of promoter of banana fruit ripening-related ACO1 and primary study on its function. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2001, **17**(4) 428 - 431

[11] Wang XI(王新力), Peng XX(彭学贤). Cloning of promoter of banana fruit-specific ACC synthase gene and primary study on its function. *Chinese Journal of Biotechnology* (生物工程学报), 2001, **17**(3) 293 - 296