

研究报告

A Letter

大豆球蛋白 G1 启动子的克隆及表达活性分析

张庆林¹ 赵艳² 翟莹¹ 李晓薇¹ 张艳¹ 苏连泰¹ 王英¹ 李景文¹ 王庆钰^{1*}

¹ 吉林大学植物科学学院, 长春, 130062; ² 齐齐哈尔大学生命科学与农林学院, 齐齐哈尔, 161006

* 通讯作者, wqy414cn@yahoo.com.cn

摘要 利用 PCR 的方法从大豆品种“吉豆 2 号”基因组 DNA 中克隆得到大豆球蛋白启动子 *G1p*, 长度约为 686 bp, PLACE 在线启动子预测工具分析表明, 序列中含有多种典型的种子特异性表达元件。将克隆得到的 *G1p* 取代 pCAMBIA1301 中的 *CaMV35S* 启动子, 构建于 *G1p* 与 GUS 基因融合表达的载体 pCAM-*G1p*, 通过农杆菌介导的方法在大豆根、茎、叶和种子中进行瞬时表达分析结果显示, 仅能在种子中检测到 GUS 活性, 而在根、茎和叶其他组织中基本检测不到 GUS 活性。说明 G1 基因上游 686 bp 片段具有种子特异性启动子的功能, *G1p* 是一个比较高效的种子特异性启动子。

关键词 大豆, 球蛋白 G1, 瞬时表达, 启动子

Cloning and Activity Analysis of Soybean G1 Promoter

Zhang Qinglin¹ Zhao Yan² Zhai Ying¹ Li Xiaowei¹ Zhang Yan¹ Su Liantai¹ Wang Ying¹ Li Jingwen¹ Wang Qingyu^{1*}

¹ College of plant science, Jilin University, Changchun, 130062; ² College of Life Science and Agroforestry, Qiqihaer University, Qiqihaer, 161006

* Corresponding author, wqy414cn@yahoo.com.cn

DOI: 10.3969/mpb.009.000457

Abstract The *G1p* promoter of soybean G1 was isolated from the genomic DNA of soybean Jidou2 by PCR method. Promoter sequence analysis by PLACE showed that the cloned fragment contained a lot of the motifs than constituted the seed-specific cis-elements. Replacing *CaMV35S* promoter of pCAMBIA1301 with the *G1p* fragment. Transient expression by *Agrobacterium tumefaciens* mediated method, the histochemical GUS analysis and fluorometric GUS analysis the expression of the GUS activity. GUS activity assays indicated that expression of GUS was active only in seeds, but not in roots stems and leaves, which suggests the *G1p* is a efficient seed-specific promoter.

Keywords Soybean, Glycinin G1, Transient expression, Promoter

种子特异性启动子是只有在植物种子成熟中、后期大量表达其下游基因, 能够调控外源基因在种子中特异性表达, 使所驱动基因在种子中专一性表达(王关林和方宏筠, 2002), 最大限度的减少对农作物其他代谢途径的影响、种子中含有丰富的碳水化合物、特别是淀粉、蛋白质及脂肪。因此, 种子特异性启动子的研究和应用在定向改良农作物品质性状方面具有重要的理论和实际意义。

近年来粮食作物中已克隆的种子特异性启动子主要有: ADP-葡萄糖焦磷酸化酶启动子(Qu and Takaiwa, 2004)、油体蛋白启动子(Kohno-Murase et al.,

2006)、小麦淀粉粒结合淀粉合成酶启动子(Kluth et al., 2002)、油菜 napin 蛋白启动子(Zhang et al., 2002)、油酸去饱和酶基因启动子(Li et al., 2007)等。这些启动子在植物转基因研究应用中显现出了非常显著的效果。

大豆球蛋白是大豆贮藏蛋白的主要成分, 在大豆种子发育过程中逐渐积累, 真核生物数据库中显示, 该基因启动子序列中有较多的种子特异性表达元件。本研究利用 PCR 技术, 从大豆基因组 DNA 中分离到球蛋白基因启动子序列 *G1p*, 长度为 686 bp, 将其与含有 GUS 报告基因的 *pCAMBIA1301* 构建,

转化 EHA105, 分别侵染大豆各个组织进行瞬时表达, 通过 *G1p* 启动子在各个组织中的 GUS 组织化学分析, 研究 *G1p* 启动子的表达强度和表达特性, 为进一步应用奠定基础。

1 结果与分析

1.1 G1 基因启动子片段的克隆

以大豆基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增得到 G1 基因启动子片段长为 686 bp (图 1), 将扩增片段连接到 pMD18-T 中, 酶切鉴定正确(图 2)。

1.2 *G1p* 启动子的生物信息学分析

利用在线软件 Neural Network Promote Prediction 对大豆启动子 *G1p* 进行生物信息学分析, 序列中含有可能与转录起始频率有关(李杰等, 2006)的 CAAT 盒和 RNA 聚合酶 的结合位点(Mena et al., 1998)的

TATA 盒, 还含有多个典型的种子特异性表达元件(图 3) 如 RY repeat (存在单、双子叶植物种子特异表达基因启动子中(Moreno-Risueno et al., 2008)) E-box (参与三酰基甘油合成和常存在于植物种子特异性表达基因启动子(Kim et al., 2007)) SEF4 motif (胚特异蛋白 SEF4 结合位点(Chung et al., 2008))和多个顺式作用元件 CAAT (Wu et al., 2000)、TATAA (Chamberland et al., 1992)等。这些作用元件可能对 *G1p* 的启动作用有重要影响。

1.3 *G1p* 启动子表达载体的构建

植物表达载体 pCAMBIA1301 含有 CaMV35S-GUS 融合系统, 本研究将克隆的 *G1p* 启动子取代植物表达载体 pCAMBIA1301 的 *CaMV35S*, 构建表达载体 pCAM-*G1p* (图 4), 进行双酶切鉴定(图 5), 获得了 686 bp 大小的片段, 表明 *G1p* 启动子已正确插入 pCAMBIA1301 中。表达载体 pCAM-*G1p* 构建完成。

通过冻融法将质粒 pCAM-*G1p* 和 pCAMBIA1301 转化根瘤农杆菌 EHA105 中, PCR 鉴定(图 6), 表明已转入农杆菌中, 用于下一步农杆菌介导大豆。

1.4 GUS 活性检测

1.4.1 GUS 组织化学染色

GUS 组织化学染色结果表明(图 7): 无侵染的大豆各个组织几乎没有被染出颜色, 侵染 pCAMBIA1301 载体的大豆各个组织都被染出了蓝色, 而侵染 pCAM-*G1p* 载体的大豆种子中被染成蓝色, 其他组织和无侵染的大豆相同, 说明载体 pCAM-*G1p* 只能驱动 GUS 基因在大豆种子中表达, 具有种子特异性。

1.4.2 GUS 荧光定量分析

荧光分析表明(图 8): 阴性对照的大豆各个组织中荧光表达量都比较低, 侵染载体 pCAM-*G1p* 的大豆根、茎、叶中荧光表达量和阴性对照相差不多, 而种子中的荧光表达量较阴性对照提高比较明显。结果表明: 启动子 *G1p* 在大豆根、茎和叶中几乎没有启动 GUS 基因表达, 在种子中能比较明显的启动 GUS 基因表达, 是一个种子特异性启动子。

2 讨论

从大豆基因组 DNA 中分离得到大豆种子特异性启动子 *G1p*, 长度为 686 bp, 利用生物数据库对启动子 *G1p* 序列进行分析, *G1p* 启动子具有多个重要的顺式作用元件和种子特异性元件, 这些作用元件对该启动子的表达调控可能有很大影响, 有必要对

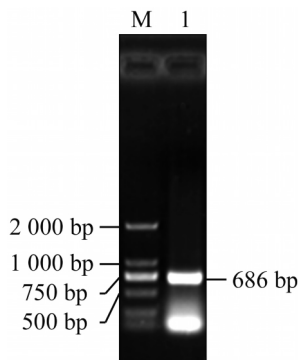


图 1 *G1p* 扩增产物

注: M: 2 000 bp DNA marker; 1: PCR 产物

Figure 1 PCR amplification of *G1p*

Note: M: 2 000 bp DNA marker; 1: PCR amplification of *G1p*

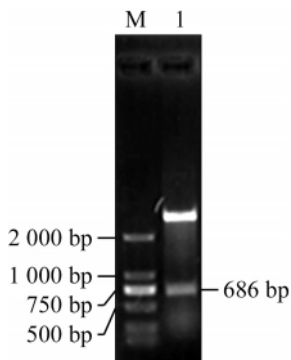


图 2 pMD18-*G1p* 酶切鉴定

注: M: 2 000 bp DNA marker; 1: *EcoR* 和 *Nco* 双酶切片段

Figure 2 Restriction enzyme digestion identification of pMD18-*G1p*

Note: M: 2 000 bp DNA marker; 1: *EcoR* and *Nco* digestion of pMD18-*G1p*

```

TAGCCTAAGT ACGTCTCAA AATGCCAACA AATAAAAAA AAGTTGCTTT AATAATGCCA    60
      ACGTBOX ACGT                                DOF

AAACAAATTA ATAAACACT TACAACACCG GATTTTTTTT AATTAAAATG TGCCATTTAG    120
GATAAATAGT TAATTTTTT AATATTATT TAAAAAGCCG TATCTACTAA AATGTTTTT    180
      GT1      SEF4      TATA      DOF                                SEF4

TTTGGTTGA AAATTATTAAT ATGTTTAAAT CAACCAATC TATCAAAATT AACTAAAAA    240
      GT1 TATA                                CAATBOX1

AAAAATAAGT GTACGTGGTT AACATTAGTA CAGTAATATA AGAGGAAAAT GAGAAATTAA    300
      ACGT                                GT1

GAAATTGAAA GCGAGTCTAA TTTTTAAATT ATGAACCTGC ATATATAAAA GAAAGAAAAG    360
      CAATBOX1 DOF      SEF4                                TATA DOF DOF DOF

AATCCAGGAA GAAAGAAAT GAACCATGC ATGGTCCCCT CGTCATCAG AGTTTCTGCC    420
      DOF      RY-REPEAT

ATTGCAATA GAAACACTGA AACACCTTCT CTTTGTCACT TAATGAGATG CTGAAGCCAC    480
      E-BOX CAATBOX1

CTCACACCAT GAACTTCATG AGGTGTAGCA CCCAAGCCTT CCATAGCCAT GCATACTGAG    540
                                      RY-REPEAT

AATGTCTCAA GCTCAGCACC CTACTTCTGT GACGTCGTCC CTCATTACC TTCCTCTCTT    600
                                      ACGT

CCCTATAAAT AACCACGCCT CAGGTCTCTCC GCTTCACAAC TCAAACATTC TCTCCACTGG    660
      TATA

CCCTTAAACA CTCATCAGTC ATCACC    686
    
```

图 3 *G1p* 序列的生物信息学分析

注: 方框部分, 下划线部分为推定的顺式作用元件

Figure 3 Bioinformatics analysis of DNA sequences of *G1p*

Note: Box section and underlined are the putative cis-acting elements

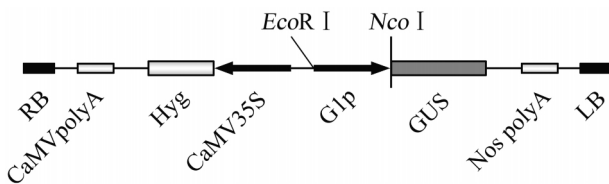


图 4 pCAM-*G1p* 表达载体结构示意图

Figure 4 Construction of expression vector pCAM-*G1p*

这些作用元件进行进一步分析。

在基因工程的研究中, 基因的表达是十分复杂的过程, 启动子能够调控基因的表达。目前最常用的启动子是组成型启动子, 组成型启动子具有强启动功能, 但有很多缺点, 不仅造成了资源的浪费, 还有可能影响植物的正常生长, 如基因的组成性表达会给植物带来很大负担, 打破植物本身代谢的平衡, 有事会产生 RNAi 干涉现象, 严重时会造成植物死亡等(张春晓等, 2004) 相比之下组织特异性表达启动子能够使基因在特定组织中表达, 特异性启动子可以驱使基因在特定组织中表达, 克服组成型启动

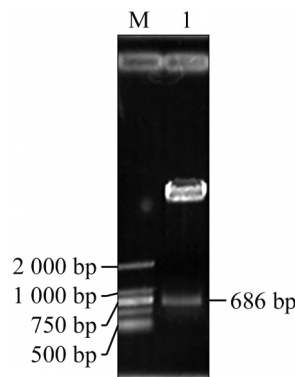


图 5 pCAM-*G1p* 酶切鉴定

注: M: 2 000 bp DNA marker; 1: *EcoR* 和 *Nco* 双酶切片段

Figure 5 Restriction enzyme digestion identification of pCAM-*G1p*

Note: M: 2 000 bp DNA marker; 1: *EcoR* and *Nco* digestion of pCAM-*G1p*

子的弊端。

由于组织特异性启动子有无与伦比的优越性, 因而近些年克隆了很多组织特异性启动子, 也有不

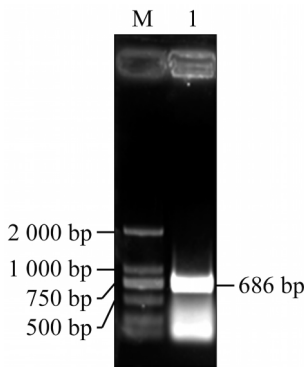


图 6 农杆菌菌液 PCR 鉴定

注: M: 2 000 bp marker; 1: 转 pCAM-G1p 质粒

Figure 6 Identification plant expression vectors in *Agrobacterium* EHA105 using PCR

Note: M: 2 000 bp marker; 1: *Agrobacterium* EHA105 with plant expression vectors pCAM-G1p

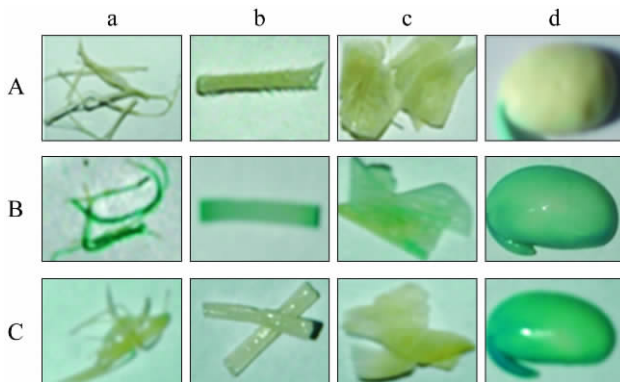


图 7 大豆不同组织的 GUS 组织化学染色分析

注: A: 未侵染的大豆; B: GUS 基因由 *CaMV35S* 启动子驱动; C: GUS 基因由 *G1p* 启动子驱动; a: 根; b: 茎; c: 叶; d: 种子

Figure 7 Histochemical analysis of GUS activity in different organs of soybean

Note: A: No-transformed soybean; B: The GUS gene driven by *CaMV35S*; C: The GUS gene driven by *G1p*; a: Root; b: Stem; c: Leaf; d: Seed

少应用与实践中,组织型启动子的应用具有重要意义。本试验将 *G1p* 启动子片段取代 35S 启动子,与 GUS 基因融合,成功构建了植物种子特异表达载体,转化农杆菌中,通过 GUS 基因在大豆各个组织中表达,GUS 组织化学染色和荧光定量分析表证明其具有较强的种子特异性,为理论研究和实践操作提供了一个较有效的种子特异性启动子。

3 材料和方法

3.1 材料及试剂

所用大豆为“吉豆 2 号”为吉林大学植物科学学

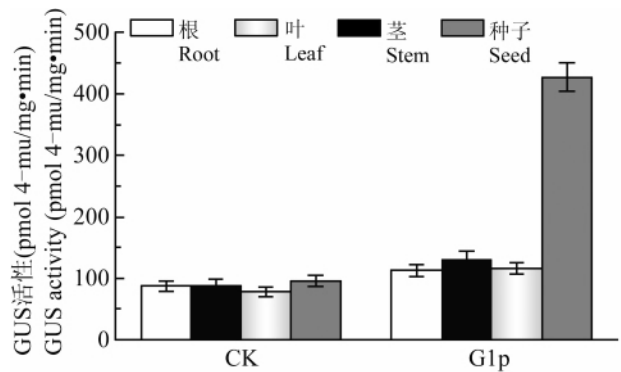


图 8 *G1p* 融合 GUS 基因表达载体在大豆组织中的 GUS 活性分析

注: CK: 负对照; *G1p*: 侵染 pCAM-*G1p* 表达载体大豆组织

Figure 8 GUS activity analysis transformed by the vecotes with *G1p* fused to GUS reporter gene in different organs of soybean

Note: CK: Negative control; *G1p*: Soybean tissues transformed with expression vector pCAM-*G1p*

院植物种质资源与利用研究室保存,取 4~5 叶龄幼苗叶片提取总基因组 DNA。

大肠杆菌 DH5 α 、植物表达载体 pCAMBIA1301、根瘤农杆菌 EHA105 由吉林大学植物科学学院植物种质资源与利用研究室保存。pMD-18T 载体购自 TaKaRa 公司。

试剂和酶均购自 TaKaRa ,DNA 回收试剂盒购于维特洁公司 ,DNA 序列测定、PCR 引物由北京六合华大基因科技股份有限公司完成 5- 溴 -4- 氯 -3- 吡啶葡萄糖苷酸(X-Gluc)购自上海生工生物工程公司 ,4-MU 和 4-MUG 购自 Sigma 公司,其它试剂均为进口或国产分析纯。

3.2 G1 启动子的克隆和序列分析

采用改良的 CTAB 法,从大豆幼苗叶片中提取大豆基因组 DNA,根据 GenBank 中大豆球蛋白 G1 基因的上游启动子序列,设计和合成引物序列:上游引物 G1- 上:5'-GGGAATTCTAGCCTAAGTACGTACTCAAATGC-3' (*EcoR*);下游引物 G1- 下:5'-GAACCATGGGGTGATGACTGATGAGTGTTTAAGG-3' (*Nco*) 划线部分为酶切位点。连入克隆载体 pMD18-T 中,进行酶切鉴定和测序,正确的重组克隆载体命名为 pMD18-T-*G1p*。利用植物顺式元件数据库 PLACE (plant cis-acting regulatory DNA elements, <http://www.dna.affrc.go.jp/htdocs/PLACE/>) (Higo et al., 1999)对 *G1p* 启动子进行生物信息学分析。

3.3 GUS 瞬时表达载体的构建

测序正确的 pMD18-T-*G1p* 质粒经 *EcoR* 和

Nco 双酶切后插入到 pCAMBIA1301 相应位点上, 得到 *GIp* 和 GUS 基因融合的表达载体 pCAM-*GIp*。阳性对照为由 *CaMV35S* 启动 GUS 基因的质粒 pCAMBIA1301。利用冻融法将上述两个表达载体转化根瘤农杆菌 EHA105 中, PCR 鉴定。

3.4 农杆菌介导的大豆各组织的转化

按照胡新文等(Hu et al., 2009)的方法, 含有 pCAM-*GIp* 和 pCAMBIA1301 质粒的农杆菌 EHA105 分别侵染大豆根、茎、叶和种子, 阴性对照为无侵染的大豆根、茎、叶和种子。

3.5 GUS 活性检测

按照 Jefferson (Jefferson, 1987)选取大豆各个组织进行 GUS 组织化学染色和荧光定量分析, 取出部分大豆组织加入 GUS 染色液, 37°C 温育过夜, 75%乙醇脱色, 观察染色情况。另一部分大豆各组织, 在研钵中用液氮研磨成粉末, 加入提取缓冲液, 4°C 离心, 上清液为 GUS 蛋白粗提液。取出部分加 GUS 反应底物 4-MUG, 进行荧光活性测定, 进行三次重复, 计算 GUS 活性值。

参考文献

Chamberland S., Daigle N., and Bernier F., 1992, The legumin boxes and the 3' part of a soybean beta-conglycinin promoter are involved in seed gene expression in transgenic tobacco plants, *Plant Molecular Biology*, 19(6): 937-949
Chung K.J., Hwang S.K., Hahn B.S., Kim K.H., Kim J.B., Kim Y.H., Yang J.S., and Ha S.H., 2008, Authentic seed-specific activity of the *Perilla oleosin* 19 gene promoter in transgenic Arabidopsis, *Plant Cell Reports*, 27(1): 29-37
Higo K., Ugawa Y., Iwamoto M., and Korenaga T., 1999, Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database, *Nucleic Acids Res.*, 27(1): 297-300
Hu X.W., Liu S.X., Guo J.C., Li J.T., Duan R.J., and Fu S.P., 2009, Embryo and anther regulation of the mabinlin sweet protein gene in *Capparis masakai* Lévl, *Funct Integr Genomics*, 9(3): 351-361
Jefferson R.A., 1987, Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system, *Plant Molecular Biology Reporter*, 5(4): 387-405
Kim M.J., Kim J.K., Shin J.S., and Suh M.C., 2007, The SebHLH transcription factor mediates trans-activation of the SeFAD2 gene promoter through binding to E- and G-box elements, *Plant Molecular Biology*, 64(4): 453-466

Kluth A., Sprunck S., Becker D., Lörz H., and Lütticke S., 2002, 5' deletion of a *gbss1* promoter region from wheat leads to changes in tissue and developmental specificities, *Plant Molecular Biology*, 49(6): 669-682
Kohno-Murase J., Iwabuchi M., Endo-Kasahara S., Sugita K., Ebinuma H., and Imamura J., 2006, Production of trans-10, cis-12 conjugated linoleic acid in rice, *Transgenic Res.*, 15(1): 95-100
Li J., Zhang F.C., Wang W.Q., and Huang L.Y., 2006, Advance in the study of higher plant promoter, *Shengwu Jishu Tongxun (Letters in Biotechnology)*, 17(4): 685-688 (李杰, 张福城, 王文泉, 黄丽云, 2006, 高等植物启动子的研究进展, *生物技术通讯*, 17(4): 685-688)
Li L.Y., Wang X.L., Gai J.Y., and Yu D., 2007, Molecular cloning and characterization of a novel microsomal oleate desaturase gene from soybean, *Journal of Plant Physiology*, 164(11): 1516-1526
Mena M., Vicente-Carbajosa J., Schmidt R.J., and Carbonero P., 1998, An endosperm-specific DOF protein from barley, highly conserved in wheat, binds to and activates transcription from the prolamins-box of a native B-hordein promoter in barley endosperm, *The Plant J.*, 16(1): 53-62
Moreno-Risueno M.A., González N., Dfaz I., Parcy F., Carbonero P., and Vicente-Carbajosa J., 2008, FUSCA3 from barley unveils a common transcriptional regulation of seed-specific genes between cereals and Arabidopsis, *Plant Journal*, 53(6): 882-894
Qu L.Q., and Takaiwa F., 2004, Evaluation of tissue specificity and expression strength of rice seed component gene promoters in transgenic rice, *Plant Biotechnol. J.*, 2(2): 113-125
Wang G.L., and Fang H.J., eds., 2002, *Plant genetic engineering*, Science Press, Beijing, China, pp.744-745 (王关林, 方宏筠, 编著, 2002, 植物基因工程原理和技术第二版, 科学出版社, 中国, 北京, pp.744-745)
Wu C.Y., Washida H., Onodera Y., Harada K., and Takaiwa F., 2000, Quantitative nature of the Prolamin-box, ACGT and AACA motifs in a rice glutelin gene promoter: minimal cis-element requirements for endosperm-specific gene expression, *Plant Journal*, 23(3): 415-421
Zhang C.X., Wang W.Q., Jiang X.N., and Chen X.M., 2004, Review on plant gene promoters, *Yichuan Xuebao (Acta Gene. Sin.)*, 31(12): 1455-1464 (张春晓, 王文棋, 蒋湘宁, 陈雪梅, 2004, 植物基因启动子研究进展, *遗传学报*, 31(12): 1455-1464)
Zhang Y.J., Li L., and Song Y.R., 2002, Identification of seed-specific promoter nap300 and its comparison with 7S promoter, *Progress in Natural Science*, 12(10): 737-741