

水稻糖基水解酶基因 *GH27* 启动子克隆及初步分析

刘莉, 赵丽娜, 林拥军*

(华中农业大学 作物遗传改良国家重点实验室 湖北 武汉 430070)

摘要: 通过生物信息学方法找到水稻中与拟南芥 β -葡糖苷酶类基因同源的糖基水解酶基因 *GH27*。Northern 检测结果显示该基因在衰老晚期的叶片中大量表达。利用 PCR 技术克隆 *GH27* 基因的启动子 (P_{GH27}) 序列, 构建启动子 P_{GH27} 与报告基因 *GUS* 融合基因的表达载体 $P_{GH27}::GUS$, 并通过农杆菌介导法转化水稻品种中花 11, *GUS* 染色结果表明该启动子 P_{GH27} 可以有效地驱动 *GUS* 基因在转基因愈伤组织和水稻植株老叶中表达。

关键词: 水稻; 糖基水解酶; 启动子; 衰老

中图分类号: S511.032 文献标志码: A 文章编号: 1000-2286(2010)05-0987-05

Cloning and Preliminary Analysis of Promoter of Rice Glycosyl Hydrolase Gene *GH27*

LIU Li, ZHAO Li-na, LIN Yong-jun*

(National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

Abstract: A glycosyl hydrolase gene *GH27* which was associated with rice senescence was identified by bioinformation technology. The expression level of *GH27* increased in late senescent leaves through Northern blot analysis which indicated the promoter P_{GH27} may be senescence specific. P_{GH27} was cloned using PCR method, and the sequence was analyzed. An expression vector containing the $P_{GH27}::GUS$ fusion gene was constructed and transferred into rice variety "Zhonghua 11" by Agrobacterium-mediated method. A strong expression of *GUS* was observed in both transgenic calli and senescing leaves.

Key words: rice; glycosyl hydrolase; promoter; senescence

叶片是植物进行光合作用, 吸收水和 CO_2 产生能量的主要场所, 也是植物体合成氨基酸、抗氧化剂、各种营养物质的工厂。一旦叶片衰老, 其光合能力显著下降, 细胞物质降解、输出, 最终细胞器解体、细胞死亡^[1-2]。作物的产量很大程度上受到叶片衰老的影响。因此, 对启动和调控这一过程的分子机制及衰老信号的传递途径进行研究具有重要意义。

收稿日期: 2010-08-10

基金项目: 国家“863”计划项目(2007AA10Z188)

作者简介: 刘莉(1981—), 女, 博士, 主要从事水稻培育研究。

* 通讯作者: 林拥军(1963—), 男, 博士, 教授, 博士生导师。1985年本科毕业于江西农业大学农学专业, 毕业后留校执教。1997年考入华中农业大学生命科学技术学院攻读“生化与分子生物学”专业博士学位, 2001年毕业。2001年8月调入华中农业大学生命科学技术学院从事科研和教学工作。现主持的科研项目有: (1) 国家重大科技专项“抗虫转基因水稻新品种培育”; (2) 国家公益性行业科技专项“水稻褐飞虱综合防控技术研究”; (3) 国家863重点项目“重要应用价值特异与诱导性启动子的分离与鉴定”。主要研究方向: (1) 抗虫基因的挖掘及转基因抗虫水稻培育; (2) 水稻转基因新技术和新方法; (3) 水稻叶片衰老相关基因的分离克隆及其分子机制的研究; (4) 高光效水稻的分子设计。E-mail: yongjunlin@mail.hzau.edu.cn。

植物糖基水解酶(glycosyl hydrolase , GH) 参与植物生长发育及对环境应答反应的多种信号传导过程, 在植物生命活动中发挥着重要的生物学功能^[3]。白三叶草中的 β - 葡糖苷酶是糖基水解酶家族的一个成员, 和配糖物存在于植物细胞壁不同的区域中, 当叶片组织受到机械损伤时, 它们之间就会发生作用^[4]。水稻中 β - 葡糖苷酶在生物和非生物逆境中都有作用^[5]。2003 年, Gepstein 等用抑制差减杂交法分离了近 800 个仅在拟南芥衰老叶片中特异表达的 cDNA 克隆, 结果显示这些基因参与了大分子物质代谢、氧化和解毒代谢、防御和信号传导等过程, 并且不同类型的基因在衰老的不同阶段表达、参与复杂的衰老途径, 其中包含 β - 葡糖苷酶类蛋白基因(登陆号为 At4g27830)。本实验利用生物信息学知识, 在水稻中寻找与拟南芥 β - 葡糖苷酶类蛋白基因高度同源的 GH27 基因, 预测了该基因启动子所在区域, 对其结构进行预测分析, 并用 GUS 报告基因表达体系和 Northern 杂交等方法对其加以分析和验证。

1 材料和方法

1.1 材料

粳稻品种中花 11 种子, 日本晴 BAC 文库克隆 OSJNBa0090H02, 大肠杆菌 *Escherichia coli*. 菌株 DH α , 农杆菌 *Agrobacteri tumefaciens* 菌株 EHA105 和 pCAMBIA1381 载体质粒, 均由本实验室保存和提供。各种限制性内切酶和聚合酶购自 Takara 公司; 质粒回收、胶回收试剂盒购自 Promega 公司; PCR 引物由上海生工合成。

1.2 野生型叶片 GH27 基因表达检测

Trizol 法(Life Technologies , Gaithersbur Maryland , USA) 抽提野生型水稻不同时期叶片 RNA。取 20 μ g RNA 做 Northern^[6] 进行基因 GH27 表达分析。探针引物为 GH27 引物 GH27 - F(5' - gaagggatactgcgtgtggt - 3') 和 GH27 - R(5' - cagttggctatcaggaagg - 3')。

1.3 GH27 基因启动子 P_{GH27} 的克隆及载体的构建

根据 GH27 基因上游的启动子序列设计引物 GH27 - F(5' - cgggatcccactagacgaggcaggcaat - 3') 和

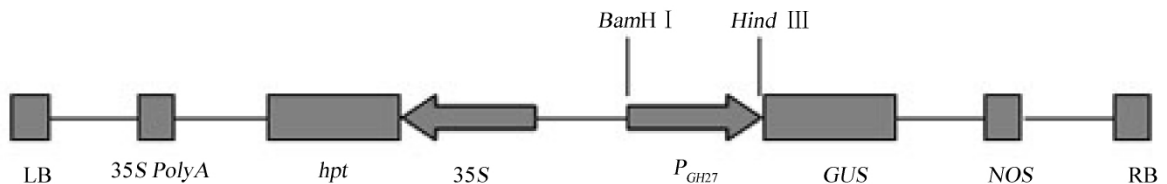


图 1 表达载体结构 P_{GH27} - GUS 示意图

Fig. 1 The native promoter constructs and predicted structure of P_{GH27} - GUS

GH27 - R(5' - cccaagctttaatgetcgggtgtgtcttg - 3') 在引物上分别引入 BamH I 和 Hind III 的酶切位点, 以日本晴 BAC 文库克隆 OSJNBa0090H02 为模板进行 PCR 扩增。反应参数为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 56 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 循环 30 次; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。将 PCR 产物克隆到 pCAMBIA1381 载体的 BamH I 和 Hind III 酶切位点之间, 构建成含有 P_{GH27}: GUS 融合基因的植物表达载体, 命名为 P_{GH27} - GUS(图 1)。

1.4 农杆菌介导的粳稻品种中花 11 的遗传转化

用构建好的农杆菌工程菌株浸染中花 11 成熟种子诱导的胚性愈伤组织。水稻组织培养、农杆菌介导转化以及抗性愈伤组织的筛选与抗性植株再生等操作严格参照本实验室粳稻遗传转化手册^[7]。

1.5 T₀ 代转基因植株的拷贝数检测

取 T₀ 代阳性转基因植株叶片用 CTAB 法抽提基因组 DNA。Hind III 酶切 5 μ g DNA, 用 Liu 等^[8] 人的方法进行 Southern 杂交。杂交探针为潮霉素磷酸转移酶基因(hpt) 片段。

1.6 GUS 的表达检测

分别取转基因水稻的愈伤组织和叶片切成适当大小, 浸入适量的 GUS 染液, 37 $^{\circ}$ C 过夜, 然后用酒精脱色, 观察转基因材料的表达特性。

2 结果与分析

2.1 *GH27* 基因启动子 P_{GH27} 结构特征

根据序列的同源性分析, 找到拟南芥衰老特异性基因 β -葡糖苷酶类蛋白基因在水稻基因组的最高同源基因位于第 5 染色体的日本晴克隆为 OSJNBa0090H02 上, NCBI 上的基因登陆号是 AK105546。用基因预测软件 Softberry (<http://www.softberry.com/berry.phtml>) 分析结果表明, 上游 1.3 kb 左右为启动子区。用 PLACE Signal Scan program (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE>) 软件分析启动子序列, 在 -666 - 647 位置(将翻译起始密码子 ATG 中的 A 定义为 +1 位) 有一个 TATA box, 上游 -227 - 223 位置发现 CAAT box 序列, -33 处的 G 为可能的转录起始位点。

经进一步的结构分析后, 还在 P_{GH27} 启动子序列中发现了 8 个响应细胞分裂素 (cytokinin, CTK) 信号的转录调控因子 ARG (Arabidopsis responsere gulator) 结合位点^[9]; 6 个响应脱落酸顺式作用位点, 它们多是响应干旱和寒冷胁迫的 MYB、MYC 蛋白因子识别的保守序列^[10-11]; 3 个 WRKY71OS 的结合位点^[12] 和 3 个植物伤害响应元件^[13]; -459 - 456 位置和 -452 - 449 的 ACGT 顺式作用元件, 也早已证明存在于多种植物的响应不良环境胁迫基因的启动子中^[14]。

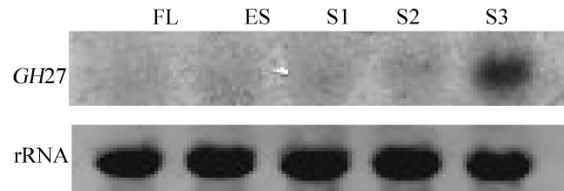
2.2 野生型叶片 *GH27* 基因表达模式

从图 2 可以看出, *GH27* 基因在成熟叶片中几乎没有表达, 随着衰老的深入, 叶片中 *GH27* 基因的表达不断增加, 当叶片衰老到达晚期时表达活性达到高峰期, 证明 P_{GH27} 启动子确实是叶片衰老特异性表达启动子。

2.3 转化载体的构建和转化植株的获得

本实验用 PCR 技术从日本晴 BAC 文库克隆 OSJNBa0090H02 扩增 P_{GH27} 启动子, 然后用 *Bam*HI 和 *Hind* III 双酶切扩增片段, 16 °C 与 pCAMBIA1381 连接, 构建了 $P_{GH27} : GUS$ 融合基因的植物表达载体, P_{GH27} 启动子大小约为 1.3 kb。

参照本实验室粳稻遗传转化方法, 以中花 11 为受体进行了遗传转化, 用潮霉素筛选抗性愈伤, 共得到转化植株 60 棵。

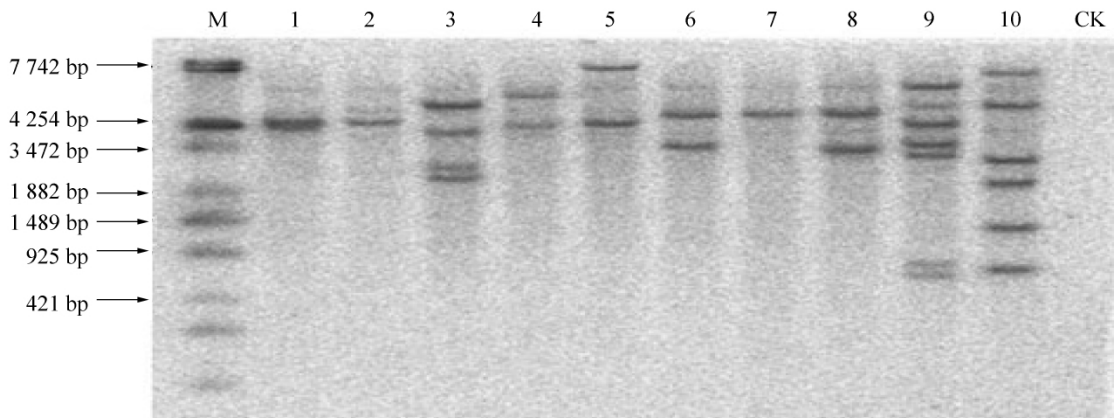


FL 成熟的完全伸展叶片; ES, 叶绿素含量达 90% 的早期衰老叶片; S1, 叶绿素含量 70% 的早期衰老叶片; S2, 叶绿素含量达 60% 的中期衰老叶片; S3, 叶绿素含量达 40% 的晚期衰老叶片。

FL, mature fully expanded leaves; ES, early senescence leaves with 90% chlorophyll; S1, senescing leaves with 70% chlorophyll; S2, senescing leaves with 60% chlorophyll; S3, senescing leaves with 40% chlorophyll.

图 2 *GH27* 基因的表达情况

Fig. 2 Expression pattern of gene *GH27*



M: λ - EcoT14 I; 1 - 10: 转基因植株; CK: 野生型植株。

M: λ - EcoT14 I; 1 - 10: transgenic plants; CK: untransgenic plant.

图 3 Southern 杂交检测转基因 T_0 代植株的拷贝数

Fig. 3 The copy number of T_0 transformants determined by Southern blot analysis

2.4 T_0 代转基因植株 P_{GH27} 基因的拷贝数检测

取 5 μg 基因组 DNA 酶切进行 Southern 杂交 结果显示 $P_{GH27}:GUS$ 基因分别以 1-7 个拷贝整合到受体材料的基因组中(图 3) 1、2 和 7 号单株是单拷贝的。

2.5 GUS 基因的表达检测

利用 GUS 组织化学染色法 对转基因水稻的愈伤组织和叶片进行染色。愈伤时期取样检测结果表明 在经转化的水稻愈伤组织检测到较强的 GUS 基因表达(图 4A)。对 T_0 代单拷贝转基因植株不同时期的叶片 GUS 染色 结果显示 P_{GH27} 能驱动 GUS 基因在水稻衰老叶中高水平表达 但是在幼嫩叶片中表达比较弱(图 4B)。

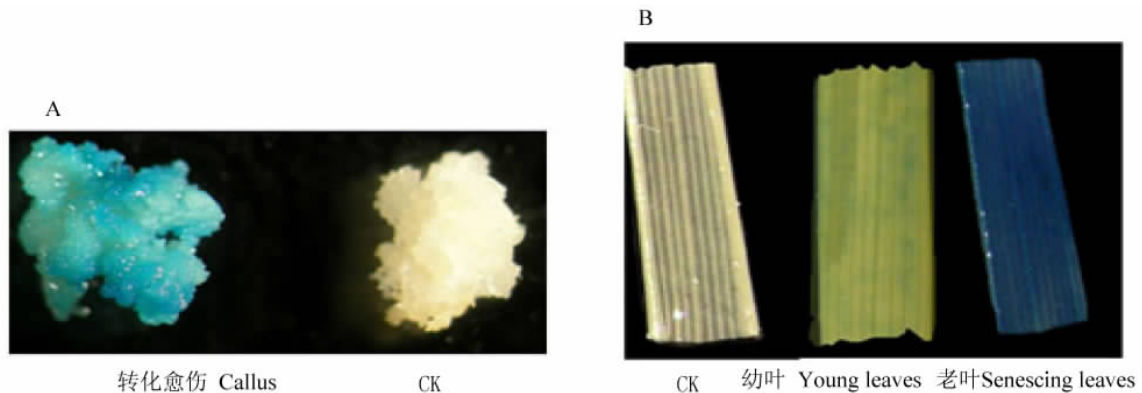


图 4 $P_{GH27}:GUS$ 融合基因在愈伤组织中及叶片的表达

Fig. 4 Transient expressions of $P_{GH27}:GUS$ fusion gene

3 讨 论

本文利用生物信息学手段 对 P_{GH27} 启动子结构进行预测 发现 P_{GH27} 中有多种逆境响应元件和 ABA 响应元件的存在 提示水稻生长发育过程中所遭受的一些逆境胁迫以及由此引发的内源激素 尤其是 ABA 的含量变化可能在转录水平调节 $GH27$ 基因的表达 从而通过 $GH27$ 基因所介导的信号路径调控水稻叶片的衰老进程。

$GH27$ 基因的表达分析结果显示 该基因在成熟叶片中低表达 而在衰老叶片中高量表达 证实 $GH27$ 基因是一个衰老诱导表达基因。我们分离了启动子 P_{GH27} 并将其与报告基因 GUS 融合 以进一步深入研究 P_{GH27} 的时空表达特点。在转基因愈伤组织和衰老叶片中 都检测到了较强的 GUS 基因表达 (图 4) 而在幼嫩叶片中几乎没有表达 验证了 P_{GH27} 具有较强的衰老启动活性。这种发育阶段特异性的启动子对于转基因育种具有重要意义 有助于我们将目标基因控制在特定的发育阶段表达 避免基因过量表达对植物体的伤害。同时 特异性启动子的克隆和应用为在植物中特异性的表达外源基因奠定了基础。

参考文献:

- [1] Buchanan - Wollaston V, Earl S, Harrison E, et al. The molecular analysisi of leaf senescence-A genomics approach [J]. Plant Biotechnol J 2003, 1(1): 3-22.
- [2] Yen C H, Yang C H. Evidence for programmed cell death during leaf senescence in plants [J]. Plant Cell Physiol, 2007, 39(9): 922-927.
- [3] Barleben L, Ma X, Koepke J, et al. Expression, purification, crystallization and preliminary X-ray analysis of strictosidine glucosidase, an enzyme initiating biosynthetic pathways to a unique diversity of indole alkaloid skeletons [J]. Biochim Biophys Acta, 2005, 1747(1): 89-92.
- [4] Barrett T, Suresh C G, Tolley S P, et al. The crystal structure of a cyanogenic β -glucosidase from white clover, a family 1 glycosyl hydrolase [J]. Structure, 1995, 3(9): 951-960.
- [5] Rodjana O, Busarakum P, Tassanee O, et al. Analysis of rice glycosyl hydrolase family 1 and expression of Os4bglu12 β -glucosidase [J]. BMC Plant Biology, 2006, 6: 33-52.

- [6] Liu L, Zhou Y, Zhou G, et al. Identification of early senescence – associated genes in rice flag leaves [J]. *Plant Mol Biol*, 2008, 67: 37 – 55.
- [7] 林拥军 陈浩 曹应龙 等. 根癌农杆菌介导的牡丹江 8 号高效转基因系统的建立 [J]. *作物学报* 2002, 28(3): 294 – 300.
- [8] Liu K D, Wang J, Li H B, et al. A genome – wide analysis of wide – compatibility in rice and the precise location of the S5 locus in the molecular map [J]. *Theor Appl Genet*, 1997, 95: 809 – 814.
- [9] Ross E J, Stone J M, Elowaky C G, et al. Activation of the *Oryza sativa* non – symbiotic haemoglobin – 2 promoter by the cytokinin – regulated transcription factor, ARR1 [J]. *J Exp Bot* 2004, 55(403): 1721 – 1731.
- [10] Abe H, Yamaguchi – Shinozaki K, Urao T, et al. Role of arabidopsis MYC and MYB homologs in drought and abscisic acid – regulated gene expression [J]. *The Plant Cell*, 1997, 9: 1859 – 1868.
- [11] Abe H, Urao T, Ito T, et al. Arabidopsis AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling [J]. *Plant Cell* 2003, 15(1): 63 – 78.
- [12] Zhang Z L, Xie Z, Zou X, et al. A rice WRKY gene encodes a transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway in aleurone cells [J]. *Plant Physiol* 2004, 134(4): 1500 – 1513.
- [13] Nishiuchi T, Shinshi H, Suzuki K. Rapid and transient activation of transcription of the ERF3 gene by wounding in tobacco leaves: Possible involvement of NtWRKYs and autorepression [J]. *J Biol Chem* 2004, 279: 55355 – 55361.
- [14] Foster R, Izawa T, Chua N H. Plant bZIP Proteins gather at ACGT elements [J]. *Fesb J*, 1994, 8(2): 192 – 200.

(上接第 986 页)

相似系数(0.849 1) 最大, 与绿皮花毛竹的遗传相似性最小(相似系数为 0.676 5) 油毛竹是一份具有一定遗传背景的特殊种质。假毛竹在聚类分析中未成为“外类群”需要进一步研究。

最新公布的第 7 次全国森林资源清查资料显示, 我国现有毛竹林面积 386.83 万 hm^2 , 是我国特有、分布和栽培面积最大的核心经济竹种, 在长期的自然变异、生产经营中产生了很多类型, 具有很丰富的遗传变异^[3, 8-13], 国内宜尽早开展系统的毛竹遗传格局、种质收集、种质保育工作。基于毛竹种质分子序列测定数据的联合分析有待另文续以。

参考文献:

- [1] 卢启泉. 四类平菇种质资源的分子标记分析 [D]. 福州: 福建农林大学, 2004.
- [2] 应正河. RAPD、SRAP 和 ISSR 标记在香菇种植资源的应用及其 SCAR 标记的建立 [D]. 福州: 福建农林大学, 2006.
- [3] 丁雨龙. 刚竹属 (*Phyllostachys*) 系统分类的研究 [D]. 南京: 南京林业大学, 1998.
- [4] 孙志娟, 项艳, 汪结明, 等. 刚竹 ISSR 反应体系的正交优化 [J]. *竹子研究汇刊* 2007, 26(4): 17 – 21.
- [5] Li G, Quiros C F. Sequence – related amplified polymorphism(SRAP) a new marker system based on a simple PCR reaction: its application to mapping and gene tagging in Brassica [J]. *Theor Appl Genet* 2001, 103: 455 – 461.
- [6] 任立宁, 郭起荣, 何高峰, 等. 竹子 SRAP – PCR 体系的建立与优化 [J]. *中南林业科技大学学报*, 2010(4): 56 – 60, 79.
- [7] 师丽华, 杨光耀, 林新春, 等. 毛竹种下等级的 RAPD 研究 [J]. *南京林业大学学报* 2002, 5(3): 65 – 68.
- [8] 赵起僧, 朱政德. 中国竹亚科一些属种的整理 [J]. *植物分类学报*. 1980, 2(18): 20 – 36.
- [9] 魏瑜. 毛竹等 36 种竹类植物的 RAPD 分析 [D]. 福州: 福建师范大学学报, 2005.
- [10] 张守锋. 毛竹 (*Phyllostachys edulis*) 遗传多样性研究 [D]. 南京: 南京林业大学, 2005.
- [11] 阮晓赛. 毛竹种源及栽培变种遗传变异的 AFLP 和 ISSR 分析 [D]. 临安: 浙江林学院, 2008.
- [12] 廖国华. 毛竹黄、白笋个体的 RAPD 指纹图谱分析 [J]. *福建农业学报*, 2003(01).
- [13] 郭小勤, 李犇, 阮晓赛, 等. 利用 ACGM 分子标记研究 10 个毛竹不同栽培变种的遗传多样性 [J]. *林业科学*, 2009(4): 28 – 32.