

熊冬琴, 黄子栋, 彭琦, 等. 甘蓝型油菜 *ALS* 基因启动子克隆及其瞬时表达分析[J]. 江苏农业科学, 2018, 46(23): 60–65.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.23.014

甘蓝型油菜 *ALS* 基因启动子克隆及其瞬时表达分析

熊冬琴^{1,2}, 黄子栋^{1,4}, 彭琦^{1,2}, 张维^{1,2}, 张洁夫^{1,2,3}, 浦惠明^{1,2,3}, 陈松^{1,2,3}

(1. 江苏省农业科学院经济作物研究所, 江苏南京 210014; 2. 农业部长江下游棉花与油菜重点实验室, 江苏南京 210014;
3. 江苏省现代作物生产协同创新中心, 江苏南京 210014; 4. 江苏农林职业技术学院, 江苏句容 212400)

摘要:为研究油菜 *ASL* 基因(*BnALS*)启动子的功能, 根据油菜基因组信息, 提取得到 *BnALS* 基因上游区域的碱基序列, 通过设计特异性引物对, 利用 PCR 扩增克隆得到大小为 1 048 个碱基的片段。序列分析结果显示, 该序列富含 TATA box 和 CAAT box 等启动子核心调控序列, 并有多与逆境、激素、光响应等表达相关的顺式作用元件, 如 MBS 元件、ABRE 元件、HSE 元件 CGTCA – motif, TGA – motif 等。为了进一步研究其启动子功能, 将其与 β – 葡萄糖苷酸酶(*GUS*)基因融合, 构建了植物表达载体 p1304 – P, 通过根癌农杆菌介导法转化烟草(*Nicotiana benthamiana*), 对 PCR 阳性的再生烟草苗进行 *GUS* 组化分析, 检测 *GUS* 基因在转基因烟草中的瞬时表达情况。结果表明, 克隆的 *BnALS* 基因上游序列能够驱动 *GUS* 基因在烟草根、茎、叶等组织中的表达, 推测油菜 *ALS* 基因上游的 1 048 bp 片段具有组成型表达的启动子功能。

关键词:甘蓝型油菜; *BnALS* 基因启动子; 基因克隆; 瞬时表达; 验证启动子活性

中图分类号:S634.301 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)23-0060-05

油菜是世界上最主要的油料作物之一, 也是我国重要的油料作物。我国油菜面积、总产量约占世界的 1/3, 是最大的油菜生产国。油菜油约占我国食用油市场的 50%, 是我国最主要的食用植物油。鉴于油菜在油料作物中的重要地位, 油菜科学的研究一直受到学者们的高度重视。过去几十年来, 油菜遗传改良已经取得显著成果, 高产、优质双低油菜品种在生产上已经占据主导地位。近几年来, 随着现代生物技术与分子生物学研究的飞速发展, 一些生物技术在油菜基础与应用研究中也得到了广泛应用, 如在油菜的分子标记辅助育种、高密度遗传图谱构建、重要性状基因的遗传定位与克隆, 以及基因工程改良等研究领域都取得了显著进展。

有关油菜启动子的研究近几年来不断有报道。景寅利用反向 PCR 方法扩增获得肌醇半乳糖苷合成酶基因(*BnGOLS1*)的启动子, 能驱动 β – 葡萄糖苷酸酶(*GUS*)基因在油菜组织中表达^[1]; 朱斌等用 PCR 扩增方法获得甘蓝型油菜 *MAPK7* 基因家族的启动子^[2]; 王轩鹏等根据基因组序列获得甘蓝型油菜 *RabGDI3* 基因的启动子, 该启动子能驱动报告基因 *gus* 仅在花药中特异性表达, 是组织特异性启动子^[3]; 阳永学等通过 PCR 克隆获得油菜半胱氨酸蛋白酶家族基因 *BnCP51* 的启动子序列, 通过转基因功能验证该启动子仅在花蕾、花药器官中表达, 也是一种器官特异性表达启动子^[4]; 邵铁梅等基于油菜基因组信息, 利用 PCR 方法克隆到油菜油体蛋白基因的启动子, 该启动子具有种子特异性表达特性, 这

也是继油菜 *Napin* 启动子后的又一个油菜种子特异性表达的启动子^[5]; 肖旦望等用 PCR 方法扩增获得油菜溶血磷脂酰转移酶基因(*LPAT*)启动子^[6]。随着相关研究的进一步开展, 会有越来越多的油菜启动子被发现与应用。

植物中乙酰乳酸合成酶(*ALS*)是催化分支氨基酸如缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸生物合成第一步的酶。研究发现, 抑制植物细胞内的 *ALS* 活性, 会阻碍支链氨基酸(缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸)的生物合成, 从而抑制植物细胞的分裂和生长, 严重的会导致植物死亡。基于这个原理, 一些化学公司陆续开发出了一系列 *ALS* 抑制剂类的除草剂并在生产上广泛应用。此外, *ALS* 基因也受到生物学家的普遍关注, 一些植物或作物的 *ALS* 基因被克隆^[7-8]。研究发现, *ALS* 基因编码序列发生碱基突变, 则产生对 *ALS* 抑制剂类除草剂的抗性^[9-10]。目前在油菜基因组中已经发现的 *ALS* 基因有 3 个, 即 *BnALS1*、*BnALS2*、*BnALS3*^[11]。有关油菜 *ALS* 基因的研究多集中在其抗除草剂的机制上, 而关于 *ALS* 基因启动子的研究及应用则鲜有报道。

本研究旨在克隆油菜 *ALS* 基因的启动子区域序列, 并通过转基因瞬时表达验证其启动子活性。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 生物试剂 引物由南京擎科生物科技有限公司合成; 限制性内切酶 NEB 公司产品(NEB Ipswich, UK); 高保真 DNA 聚合酶 5 × TransStart FastPfu PCR 试剂、凝胶回收试剂盒 EasyPure® Quick Gel Extraction Kit、T/A 克隆载体 pEASY – T1 Kit 均为北京全式金生物技术有限公司产品; MS 培养基系青岛海博生物有限公司产品。

1.1.2 试验材料 油菜材料为江苏省农业科学院经济作物研究所选育的抗除草剂品系 M342; 转基因受体材料为本氏烟

收稿日期: 2018-05-02

基金项目: 国家重点研发计划(编号: 2016YFD0100202-10)。

作者简介: 熊冬琴(1994—), 男, 重庆人, 研究实习员, 研究方向为油菜种质研究与应用。E-mail: 18061792869@163.com。

通信作者: 陈松, 硕士, 研究员, 研究方向为油菜分子育种。
E-mail: chensong1963@126.com。

(*Nicotiana benthamiana*), 由江苏省农业科学院种质资源与生物技术研究所张保龙研究员提供。

1.2 试验方法

1.2.1 启动子序列克隆与启动子分析 根据油菜的 *BnALS* 基因序列, 通过美国国立生物技术信息中心 (NCBI) 网站 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) 检索其相应的油菜基因组序列, 提取 *BnALS* 基因编码区 5' 末端上游大约 1 000 个碱基的序列, 通过专业网站 (<http://molbiol-tools.ca/Promoters.htm>) 进行启动子预测分析。然后选取上游富含启动子元件的 1 000 bp 左右的序列, 设计特异性扩增引物, 并添加限制性内切酶位点, 在上游引物的 5' 末端添加限制性内切酶 *Hind* III 的酶切位点, 在下游引物的 5' 末端添加 *Nco* I 的酶切位点, 引物为 PF(5' - AAGCTT GTGGAGCTGATCTTACCGACCGAAC - 3')/PR(5' - CCATGGGGTTAGAGGAGAGAGATGATGAA - 3')。

1.2.2 启动子序列扩增、克隆、测序及分析 采用十六烷基三甲基溴化铵 (CTAB) 法提取油菜 M342 叶片的基因组 DNA。以此为模板, 用高保真 DNA 聚合酶扩增油菜 *BnALS* 基因启动子区域的碱基序列。扩增体系: 10 μ L 5 \times Trans Start FastPfu Buffer, 1 μ L 基因组 DNA, 1 μ L 10 μ mol/L PF, 1 μ L 10 μ mol/L PR, 5 μ L 2.5 mmol/L dNTPs, 1 μ L Trans Start FastPfu DNA 聚合酶, 用 ddH₂O 补足总体积到 50 μ L。PCR 程序: 95 $^{\circ}$ C 3 min, 95 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C, 5 min。用琼脂糖凝胶电泳检查扩增产物, 胶回收纯化 1 kb 左右的 PCR 产物并克隆到 T/A 载体 pEASY - T1 上, 转化大肠杆菌 DH5 α , 获得重组质粒 pEASY - P, 挑取阳性克隆送南京擎科生物科技有限公司测序。

通过 Plant CARE 网站 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 对克隆到的油菜 *BnALS* 基因上游序列进行生物信息学分析。

1.2.3 启动子功能验证表达载体构建 将第 1.2 节克隆到的启动子序列重组到 pCambia1304 载体上 *GUS* 基因的 5' 端, 这样就构成了由 *BnALS* 基因启动子驱动的 1 个完整的 *GUS* 基因表达框。分别提取克隆载体 pEASY - P 质粒和由笔者所在实验室保存的植物表达载体 pCambia1304 质粒, 用限制性内切酶 *Hind* III、*Nco* I 双酶切质粒 DNA, 回收从 pEASY - P 质粒切下的大小约为 1 000 bp 的片段, 通过连接酶的作用, 将启动子序列重组到目标载体 pCambia1304 的相应酶切位点上。双酶切反应体系: 总体积为 50 μ L, 其中含有 5 μ L 缓冲液、30 μ L 质粒 DNA 溶液、2 μ L *Hind* III、2 μ L *Nco* I、16 μ L H₂O, 于 37 $^{\circ}$ C 放置 6 h 或过夜。酶切后, 通过琼脂糖凝胶电泳, 回收相应的片段, 进行连接反应, 连接酶反应体系: 总体积为 20 μ L, 含有 5 μ L 线性化载体 DNA、5 μ L 启动子 DNA 溶液、2 μ L T₄ 连接酶缓冲液、2 μ L T₄ 连接酶、6 μ L H₂O, 于 16 $^{\circ}$ C 过夜。将连接反应产物用热激法转化大肠杆菌感受态细胞 DH5 α , 在含有卡那霉素 (Kan) 的 LB 培养基上于 37 $^{\circ}$ C 培养过夜。

1.2.4 烟草转基因试验 为了进一步验证所克隆启动子的生物学功能, 将构建的表达载体 pCambia1304 - P 转入农杆菌 EHA105, 利用叶盘转化法转染烟草。具体试验过程如下:

1.2.5 农杆菌的准备 挑取携带载体 pCambia1304 - P 的

农杆菌 EHA105 的单菌落, 接种于 5 mL 含有 20 mg/L 利福平 (Rif) 和 50 mg/L Kan 的 LB 液体培养基中, 28 $^{\circ}$ C 振荡培养过夜。取活化过夜的农杆菌, 按 1 : 50 的比例稀释到含有 20 mg/L Rif 和 50 mg/L Kan 的 YEB 液体培养基中, 继续培养至 $D_{600\text{nm}}$ 约为 0.6 ~ 0.8。于 6 000 r/min 离心 5 min, 收集菌体, 用 1/2 MS 液体培养基洗涤 1 次菌体, 并将其稀释至 $D_{600\text{nm}}$ 为 0.30 ~ 0.35。

1.2.6 烟草叶盘的遗传转化 选取苗龄约为 30 d 的烟草无菌苗, 在无菌条件下用手术刀切取大小约为 0.8 cm² 的烟草叶片为外植体, 投入已经准备好的农杆菌菌液中, 振荡侵染 5 min 后, 取出并用滤纸吸干附着于叶片表面的残液, 然后放在共培养基 (1 \times MS, 3% 蔗糖, 1% 琼脂粉, 2.0 mg/L BA, 0.5 mg/L IAA, pH 值为 5.8) 上的暗处, 温度设为 25 $^{\circ}$ C, 共培养 48 h。

1.2.7 转基因烟草苗的再生 将共培养后的烟草外植体转到芽诱导培养基 (配方为 1 \times MS + 3% 蔗糖 + 2.0 mg/L BA + 0.5 mg/L IAA + 500 mg/L 羧苄青霉素 + 20 mg/L 潮霉素 + 1% 琼脂粉, pH 值为 5.8) 上进行芽诱导培养, 每隔 2 ~ 3 周继代 1 次。继代用的培养基同芽诱导培养基。待不定芽长出后, 且芽长为 1.0 ~ 1.5 cm 时, 将芽切下换到生根培养基 (配方为 1 \times MS + 3% 蔗糖 + 0.5 mg/L IAA + 500 mg/L 羧苄青霉素 + 20 mg/L 潮霉素 + 1% 琼脂粉, pH 值为 5.8) 上诱导生根。

1.2.8 转基因烟草植株的 PCR 鉴定 取转基因处理的再生烟草苗叶片, 用 CTAB 法提取基因组 DNA, 另取非转基因烟草苗叶片 DNA 作为阴性对照。用特异性引物进行 PCR 鉴定。引物序列: PGF, 5' - CGTTCACAAACTCATTCATCATCTC - 3'; PGR, 5' - TTTGATGCCGTTCTTTTGCTTGTCG - 3'。20 μ L 扩增反应体系: 10 μ L 2 \times Tag master mix, 1 μ L DNA 模板, 1 μ L 引物 PGF, 1 μ L 引物 PGR, 7 μ L H₂O。反应程序: 94 $^{\circ}$ C 4 min, 94 $^{\circ}$ C 40 s, 55 $^{\circ}$ C 40 s, 72 $^{\circ}$ C 40 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 5 min, 用琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

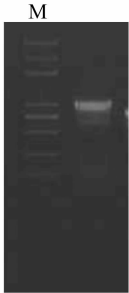
1.2.9 GUS 活性检测 用北京 Solarbio 生物科技有限公司生产的 GUS 染色液试剂盒定性检测 *GUS* 基因的表达活性。将转基因烟草 PCR 阳性单株幼苗完整取出, 去除根部的琼脂, 用无菌水清洗后, 将植株浸泡在 GUS 显色液中, 于室温下放置 3 ~ 6 h 后, 用无水乙醇进行脱色处理, 镜检拍照。以非转基因幼苗作为对照。

2 结果与分析

2.1 油菜 *ALS* 基因启动子序列的克隆与分析

本研究根据 *BnALS* 基因上游序列设计特异性引物, 通过 PCR 扩增油菜基因组 DNA 的方法获得大小约为 1 000 bp 的片段, 详见图 1。对该片段进一步克隆、测序, 实际获得长度为 1 048 bp 的 *BnALS* 基因上游序列 (序列 1), 详见图 2。

通过 Plant CARE 网站 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 对克隆到的 *BnALS* 基因上游序列进行生物信息学分析, 结果显示, 该序列含有与启动子相关的多种顺式作用元件, 如 CAAT - box、TATA - box 等, 表明该序列具有真核细胞启动子的结构特征。部分顺式作用元件的情况见表 1。



M—DNA marker 2K plus, 从上到下的条带大小依次为 5 000、3 000、2 000、1 000、750、500、250、100 bp

图1 *BnALS* 基因启动子 PCR 扩增产物电泳结果

5'-GTGGAGCTGATCTTACCGACCGAACCTCTTCGCCATCTCCTGAGATTTTGTAGAAAATGGAAAGAAGGGAAGCAAAAGAGA 80
MBS CAAT box TATA-box
ATAATCATGGATTGAAATAACTGGAAACAATAAAGTAATAAAAGATTCAAGGAATCGCTTAATCAGAAATCAAAGTGTA 160
TATA-box CAAT box Box4
AAAAAATTAGAAACCATAAAGTAATAATAGGAAATCTCCAATTAATTTGCCAAGACATATCACCTGCGA TGTATTTCATA 240
CGTCA-motif
CACATTCGAGTGATAGAGAAGGAACCGTTTCCGTTGATAGAAGAGAAGGCAAAACGTCAGATTGATGATCTACAAAG 320
ABRE- motif/G-box
AAATCATCAGCTGAATTGAAAATCTCGAAGTTCATAGCTGGTTACAGAGATCGAAGGAGAAGCCTTTTCGATTCAAGTGT 400
TATA-box CCAAT box
GGAAGAAGAACAGGAACCTCTAAAGTTTGTGCTTTGGTCTTGCTGGCCAAACTCAGAGCCCAACGTAATAACCAACGGGAAG 480
GCN4-motif
CCCATCAACATTTGCGTTTAATGAAACCATGAGTTTCGTTCTGAATGACATGTGTGTCAGCAGCGGGGAAATCCACTTATC 560
TATA-box TGA-element HSE
TATATAAAGTTTCACGCTCAAGTTGAACGACTTAGTAACATGGAAGCTGAGGTAGATAGTCTAAGAGTGAAGAAAATTC 640
TATA-box TATA-box CAAT-box
TCTTTATAATAATAGATATTGTAGCCTAAACGTTCTTAGTGCACATTTTAAATGCAAAATATATTACGGATTGGTCCTA 720
TATA-box
ATTTCTGTAATAATAAACTACTTTCATTGTTTTATATAAAATAACTCTATTGCTGCAGTTTCCCAACTTTGTTGCTTAGATT 800
CAAT-box CAAT-box TATA-box
CAGGTCTCACAATCAAGAAATCAAGAACAGTTAGATCCACAAATTTCTACATTTTATTAATAAGTGAAGTACAAAAAAC 880
TATA-box
GAGATTAGATTGTTTCTATTTCATCCATAATTAATAAAAAAAGACCAAAACAAAAATCATATTCCAAGGTATT 960
TATA-box G-box + 转录起始位点
TTCGTAACAAACAAACCCCTCACAAGTCTCGTTTATAAAACGATTACGTTTCAAACTCATTATCATCTCTCTCTC 1 040
CTCTAACCC-3' 1 048 ATG

HSE 为热激应答元件, MBS 为干旱胁迫响应元件, MYB 为转录因子结合位点;
下划线部分表示调控元件, 上方为对应名称; 右侧数字表示碱基位置

图2 序列1获得的启动子序列及部分主要相关顺式作用元件

表1 ALS 启动子序列含有的主要相关顺式作用元件

| 元件名称 | 位置 | 序列 | 功能 |
|---------------|--------------------|------------|--------------------|
| ABRE - motif | 328 bp | CACGTG | 脱落酸响应元件 |
| Box4 | 202 bp | ATTAAT | 光响应元件 |
| CAAT - box | 696、840 bp | CAAAAT | 启动子区或增强子区域的顺式作用元件 |
| | 810 bp | CAAT | 启动子区或增强子区域的顺式作用元件 |
| CGTCA - motif | 296 bp | CGTCA | 甲基茉莉酸响应元件 |
| G - box | 328 bp | CACGTG | 顺式光响应元件 |
| | 1 008 bp | CACGTT | 顺式光响应元件 |
| HSE | 631 bp | AGAAAATTCG | 顺式热激响应元件 |
| TATA - box | 116、183、186、465 bp | TAATA | 启动子核心元件 |
| | 562 bp | ATATAA | 启动子核心元件 |
| | 647、650 bp | TAATA | 启动子核心元件 |
| | 687 bp | TTTTA | 启动子核心元件 |
| | 753 bp | ATATAA | 启动子核心元件 |
| | 858、912 bp | TAATA | 启动子核心元件 |
| | 996 bp | TATAAA | 启动子核心元件 |
| TGA - element | 586 bp | AACGAC | 生长素响应元件 |
| MBS | 97 bp | TAACGTG | MYB 结合位点, 参与干旱诱导过程 |

2.2 启动子功能验证表达载体的构建

为了进一步验证所克隆的 *BnASL* 基因上游序列是否具有启动子功能, 将该序列重组到 pCAMBIA1304 载体上 *GUS* 基因的 5' - 端, 这样就构成了由 *BnALS* 基因的上游序列驱动的 1 个完整的 *GUS* 基因表达框。分别提取获得的克隆载体 pEASY - P 质粒和笔者所在实验室保存的植物表达载体 pCAMBIA1304 质粒, 并用限制性内切酶 *Hind*Ⅲ、*Nco*Ⅰ 双酶切质粒 DNA, 回收从 pEASY - P 质粒上切下的大小约为 1 000 bp 的片段, 重组到双酶切线性化的 pCAMBIA1304 载体上, 获得重组载体 pCAMBIA1304 - P。重组载体经限制性内切酶酶切验证, 可以得到 1 个大小约为 1 kb 的片段, 证明启

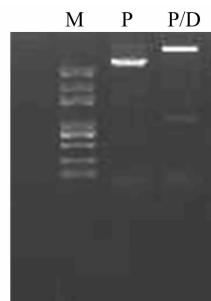
动子序列已经重组到目标载体上(图3)。经测序分析可知,所克隆的启动子序列准确插入相应的酶切位点,无缺失、错配现象,表明该重组载体可以用于转基因功能的验证工作。

2.3 烟草转基因试验

为了进一步验证所克隆的油菜 *BnALS* 基因上游序列的启动子功能,将构建的表达载体 pCambia1304-P 转入农杆菌 EHA105,利用叶盘转化法转染烟草。烟草叶片经过农杆菌侵染、抗性芽诱导、抗性芽生根等阶段的再生培养,最终获得转基因烟草幼苗,其过程详见图4。

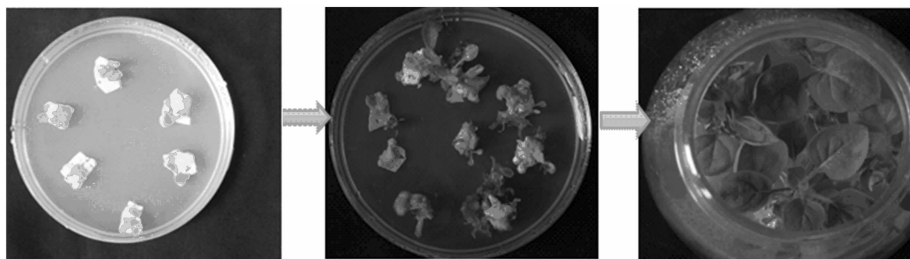
2.4 转基因烟草植株的 PCR 鉴定

利用设计的特异性 PCR 引物扩增再生幼苗的基因组 DNA,鉴定转基因阳性单株。由图5可以看出,经过PCR检

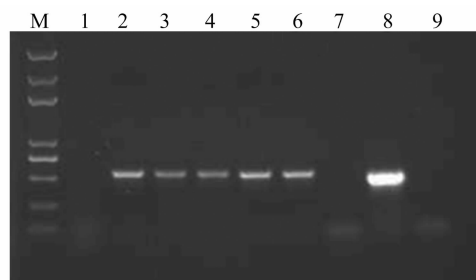


M—DNA marker 2K plus, 从上到下的条带大小依次为 5 000、3 000、2 000、1 000、750、500、250、100 bp;
P—重组质粒pCambia1304-P; P/D—双酶切质粒

图3 限制性内切酶的双酶切图谱

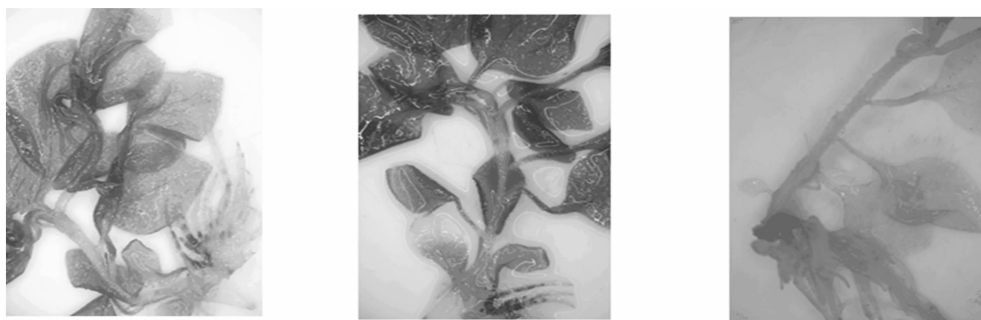


从左到右依次为烟草转化过程中的抗性芽诱导及生根培养
图4 烟草抗性苗的筛选过程



M—DNA marker 2K plus, 从上到下的条带大小依次为 5 000、3 000、2000、1 000、750、500、250、100 bp;
1~7—再生苗; 8—质粒DNA对照; 9—非阴性对照

图5 转基因烟草的 PCR 扩增结果



左侧的2个图为转基因烟草苗; 右侧的1个图为非转基因烟草苗对照

图6 转基因烟草 GUS 活性定性检测结果

的表达。

3 讨论

与其他真核生物一样,植物启动子区域最具特征的就是 TATA box 序列,这是 RNA 聚合酶 II 识别的位点,也是一些反式作用因子与 DNA 相互作用的位点之一。TATA box 与转录

测,有 5 株幼苗扩增到与质粒对照相同的阳性条带,2 株幼苗未扩增到相应的条带。

2.5 GUS 基因表达活性检测

以 PCR 结果为阳性的转基因再生烟草幼苗及非转基因处理的烟草幼苗对照,用 GUS 显色试剂盒进行 GUS 基因表达活性的定性检测。将烟草幼苗完整取出,浸泡在 GUS 基因显色液中,于室温下放置 3~6 h 后,用无水乙醇脱除背景色,如果有 GUS 基因表达活性,组织就会出现蓝色反应。结果显示,转基因烟草全株均出现明显的蓝色反应,而非转基因幼苗则呈淡淡的黄色,转基因烟草 GUS 活性定性检测结果见图6。以上结果表明,本研究克隆的 *BnALS* 基因上游序列具有较强的组成型表达活性,能驱动报告基因在烟草幼苗各个器官中

起始点之间的碱基长度是转录精确起始的必需因素,植物启动子的 TATA box 多在转录起始点上游(32 ± 7) bp 处^[12]。TATA box 通过与转录因子 TF II D 的识别结合而发挥功能,决定 RNA 聚合酶起始转录的位点,以及介导前转录复合物的形成并起始转录;起始因子(initiator,简称 Inr)是基因启动子核心结构的第 2 种类型,与转录起始位点重叠^[13]。Inr 元件并

无十分严格的同源顺序,其中最关键的核苷酸是处于 +1 位置的 A 和 +3 位置的 T。Inr 在功能上与 TATA 框类似,常通过与 TFIID 的结合决定转录起始点的位置起始转录,并能介导上游至少一部分激活因子的调控作用;CAAT box 是 Shirsat 等于 1989 年在豌豆 *legA* 基因启动子中发现的 1 个增强转录的元件,一般位于 -75 bp 附近,其保守序列为 GGC/TCAATCT^[14]。CAAT box 控制着转录起始的频率,其对基因转录的激活作用存在双向性,且作用距离不固定;GC box 通常位于 -90 bp 附近,保守序列为 GGGCGG,可有多拷贝,并能以任何方向存在而不影响其功能。Kuwahara 等研究发现,GC box 需要与另一特异的转录因子(SPI)结合才能促进基因转录^[15]。植物启动子的顺式元件除了 CAAT box 和 GC box 以外,不同来源的启动子通常还具有种属特异的或者仅局限于某种基因家族特有的调节序列。

本试验根据油菜 *BnALS* 基因上游序列设计特异性引物,通过 PCR 扩增获得的 *ALS* 基因上游的 1 048 个碱基序列中包含多个 TATA box 和 CAAT-box 启动子核心序列,仅在正义链上就检测到 11 处 TATA box 序列和 3 个 CAAT-box,这些启动子的核心序列可能决定了转录的起始、方向和转录效率。根据植物基因转录起始位点通常与上游 TATA-box 的距离为(32±7) bp,以及转录起始碱基多为 A 碱基的规律,推测本试验克隆的启动子起始位点可能是位于 1 026 bp 或 1 028 bp 处的 A 碱基。此外,*BnALS* 基因上游区域还含有其他多种转录调控元件,主要有激素响应元件、脱落酸响应元件 ABRE-motif、甲基茉莉酸响应元件 CGTCA-motif 和生长素等激素响应元件 TGA-element,说明 *ALS* 基因在激素响应过程中可能起作用。此外,还有非生物胁迫响应元件 HSE 和 MBS,因此可见,*ALS* 基因也可能参与干旱或热激反应的应答。另外,还发现多个光响应元件,暗示 *ALS* 基因的表达可能还受到光的调控。

人们研究启动子的目的主要是为了弄清一些结构基因的表达与调控模式,除此以外,启动子在植物基因工程研究领域也有重要的应用价值。启动子对外源基因的表达水平影响很大,是基因工程表达载体中的重要元件。目前在植物基因工程中应用最多的启动子是来自花椰菜花叶病毒(CaMV)的 35S 启动子和农杆菌胭脂碱合酶基因的 nos 启动子^[16]。这 2 个组成型表达的启动子常用于双子叶植物基因工程,而在单子叶植物中应用较多的是来自玉米的 Ubi1 启动子^[17]和水稻的 Act1 启动子^[18]。人们不断开发研究新启动子应用于植物的基因工程,目的是为了在植物中更高效地表达目的基因。重复使用同一种组成型启动子驱动 2 个或 2 个以上的外源基因表达可能会引起基因沉默或者发生共抑制^[19]。另外,将从病毒基因组中克隆的启动子序列应用到植物基因工程中,可能会引起人们对转基因植物生物安全性的担忧,因此,从植物本身克隆活性强的组成型启动子也就成了植物基因工程研究的一个重要方面。Shirasawa-Seo 等从拟南芥中克隆了色氨酸合成酶亚基(PTSB1)和植物光敏色素 B 基因的启动子(PPHYB),替代 CaMV35S 的组成型启动子,二者分别与 *GUS* 基因融合表达,活性甚至高于 35S 启动子,驱动 *NPTII* 基因表达,具有相同的效果,可以认为拟南芥的 PTSB1 和 PPHYB 启动子是植物来源的可替代 35S 启动子的强组成型启动子^[20]。本

试验克隆到了 *BnALS* 基因启动子序列,通过生物信息学软件预测了启动子元件组成,并构建了与 *GUS* 基因融合的植物表达载体,通过转基因烟草的瞬间表达分析,初步结果显示,所克隆的启动子序列能驱动 *GUS* 基因在烟草幼苗多个器官中表达,表明该序列具有较强的组成型启动子的表达活性。

参考文献:

- [1] 景寅,李煦,汪晓峰. 甘蓝型油菜 *BnGOSLI* 基因启动子的克隆、序列分析及瞬时表达[J]. 植物生理学报,2012,48(1):67-74.
- [2] 朱斌,陆俊杏,彭茜,等. 甘蓝型油菜 *MAPK7* 基因家族及其启动子的克隆与表达分析[J]. 作物学报,2013,39(5):789-805.
- [3] 王轩鹏,李振波,童超波,等. 甘蓝型油菜 *RabGDI3* 基因启动子的克隆和功能验证[J]. 中国油料作物学报,2013,35(2):109-116.
- [4] 阳永学,李振波,童超波,等. 甘蓝型油菜半胱氨酸蛋白酶基因 *BnCP51* 及其启动子的克隆与表达[J]. 中国油料作物学报,2016,38(4):406-414.
- [5] 邵铁梅,安胜军,仵陶,等. 油菜油体蛋白基因启动子的克隆及其在油菜中的功能验证[J]. 江苏农业科学,2016,44(6):71-73.
- [6] 肖旦望,刘少锋,刘聪,等. 甘蓝型油菜 *BnLPAT4* 启动子的克隆及表达分析[J]. 分子植物育种,2016,14(6):1455-1461.
- [7] Fang L Y, Gross P R, Chen C H, et al. Sequence of two acetohydroxyacid synthase genes from *Zea mays*[J]. Plant Molecular Biology,1992,18(6):1185-1187.
- [8] Grula J W, Hudspeth R L, Hobbs S L, et al. Organization, inheritance and expression of acetohydroxyacid synthase genes in the cotton allotetraploid *Gossypium hirsutum*[J]. Plant Molecular Biology,1995,28(5):837-846.
- [9] Hart S E, Saunders J W, Penner D. Semidominant nature of monogenic sulfonyleurea herbicide resistance in sugar beet (*Beta vulgaris*)[J]. Weeds Sci,1993,41(3):317-324.
- [10] Newhouse K, Singh B, Shaner D, et al. Mutations in corn (*Zea mays* L.) conferring resistance to imidazolinone herbicides[J]. Theor Appl Genet,1991,83(1):65-70.
- [11] Rutledge R G, Quellet T, Hattori J, et al. Molecular characterization and genetic origin of the *Brassica napus* acetohydroxyacid synthase multigene family[J]. Molecular & General Genetics,1991,229(1):31-40.
- [12] Joshi C P. An inspection of the domain between putative TATA box and translation start site in 79 plant genes[J]. Nucleic Acids Research,1987,15(16):6643-6653.
- [13] Michael C, Stephen T S. Transcriptional regulation in eukaryotes concepts, strategies, and techniques[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press,2001:52-61.
- [14] Shirsat A, Wilford N, Croy R, et al. Sequences responsible for the tissue specific promoter activity of a pea legumin gene in tobacco[J]. Molecular & General Genetics,1989,215(2):326-331.
- [15] Kuwahara J, Yonezawa A, Futamura M, et al. Binding of transcription factor Sp1 to GC box DNA revealed by footprinting analysis: different contact of three zinc fingers and sequence recognition mode[J]. Biochemistry,1993,32(23):5994-6001.

王霞霞,高平,李栋,等.银杏愈伤组织诱导及其双黄酮含量的测定[J].江苏农业科学,2018,46(23):65-67.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2018.23.015

银杏愈伤组织诱导及其双黄酮含量的测定

王霞霞¹,高平¹,李栋¹,郝旺林¹,何真²

(1. 吕梁学院生命科学系,山西吕梁 033000; 2. 山西省农业科学院,山西太原 030006)

摘要:为了提高银杏中双黄酮的提取量,满足市场对双黄酮的需求,通过正交试验建立银杏诱导愈伤组织和增殖体系,采用高效液相色谱法测量愈伤组织中双黄酮的含量。试验结果表明:最适合的外植体为叶片,最适消毒组合为 10% NaClO 消毒 6 min,75% 乙醇消毒 40 s;诱导愈伤组织最佳培养基为 0.4 mg/L KT + 1.0 mg/L 6-BA + 1.0 mg/L 2,4-D;愈伤组织增殖最佳培养基为 1.5 mg/L KT + 1.0 mg/L 6-BA + 2.0 mg/L 2,4-D + 1.5 mg/L NAA;通过诱导愈伤组织提取双黄酮得率为 15.622 mg/g,比银杏叶中双黄酮含量高,可避免自然条件的限制。

关键词:银杏;愈伤组织;诱导;激素;高效液相色谱法;双黄酮

中图分类号:S664.304+.3 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2018)23-0065-03

银杏(*Ginkgo biloba* L.)为银杏科银杏属落叶乔木,别称白果、公孙树、鸭脚树、蒲扇^[1-3],素有裸子植物“活化石”之称,为中国独存的珍稀名贵树种^[4-6]。银杏及其愈伤组织中含有黄酮、双黄酮等黄酮类化合物^[7],对心脑血管疾病具有独特疗效^[8-9],因此银杏叶提取物及其制剂在国际市场上供不应求^[3]。自然条件下,银杏叶中黄酮含量也较高^[10]。但银杏栽培需要大量面积,生长周期长,且易受多种外界条件影响^[11-12]。近年我国研究人员发现诱导的银杏愈伤组织中也含有黄酮类物质,目前有利用银杏愈伤组织的细胞悬浮培养来生产黄酮类次生代谢产物的研究^[13-15]。从愈伤组织中提取黄酮类物质,能有效缩短生产周期,满足工业化生产需要^[1],对黄酮类物质生产量提高和加工产业发展有重大意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

银杏叶片、叶柄、树皮等外植体均采自吕梁学院校园内银杏树。

1.2 试验方法

采用 $L_9(3^4)$ 正交设计表选择最适合外植体的消毒配比,

外植体(A)选择叶片、叶柄、树皮。将 10% 次氯酸钠消毒时间(B)设计为 3 个梯度 3、6、9 min,将 75% 乙醇消毒时间(C)设计为 3 个梯度分别为 40、50、60 s(表 1)。

表 1 外植体和消毒时间的正交设计因素和水平

| 水平 | 因素 | | |
|----|-------|---------------------|-----------------|
| | A:外植体 | B:10% 次氯酸钠消毒时间(min) | C:75% 乙醇消毒时间(s) |
| 1 | 叶片 | 3 | 40 |
| 2 | 叶柄 | 6 | 50 |
| 3 | 树皮 | 9 | 60 |

采用 $L_9(3^4)$ 正交设计表选择诱导银杏愈伤组织最适宜激素种类和浓度配比,KT 水平设置为 0、0.2、0.4 mg/L,6-BA 水平设置为 0.5、1.0、1.5 mg/L,2,4-D 水平设置为 0、0.5、1.0 mg/L(表 2)。

表 2 诱导愈伤组织的正交设计因素和水平

| 水平 | 因素 | | | |
|----|------------|--------------|---------------|--|
| | D:KT(mg/L) | E:6-BA(mg/L) | F:2,4-D(mg/L) | |
| 1 | 0.0 | 0.5 | 0.0 | |
| 2 | 0.2 | 1.0 | 0.5 | |
| 3 | 0.4 | 1.5 | 1.0 | |

采用 $L_9(3^4)$ 正交设计表选择愈伤组织增殖最适宜激素浓度配比,KT 水平设置为 1.0、1.5、2.0 mg/L,6-BA 水平设置为 0.5、1.0、1.5 mg/L,2,4-D 水平设置为 0.0、1.0、2.0 mg/L,NAA 水平设置为 0.5、1.0、1.5 mg/L(表 3)。

收稿日期:2018-03-14

基金项目:山西省高等学校教学改革项目(本科)(编号:J2013114);

吕梁学院自然科学基金(编号:IRQN201611)。

作者简介:王霞霞(1986—),女,山西吕梁人,助教,从事园林植物栽培、养护和应用研究。E-mail:619170001@qq.com。

[16] Benfey P N, Chua N H. The cauliflower mosaic virus 35S promoter: combinatorial regulation of transcription in plants [J]. Science, 1990, 250(4983): 959-966.

[17] Christensen A H, Sharrock R A, Quail P H. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation [J]. Plant Molecular Biology, 1992, 18(4): 675-689.

[18] McElroy D, Zhang W, Cao J, et al. Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation [J]. The Plant Cell, 1990, 2

(2): 163-171.

[19] Kumpatla S P, Chandrasekharan M B, Lyer L M, et al. Genome intruder scanning and modulation system and transgene silencing [J]. Trends in Plant Science, 1998, 3(3): 97-104.

[20] Shirasawa - Seo N, Mitsuahara I, Nakamura S, et al. Constitutive promoters available for transgene expression instead of CaMV 35S RNA promoter; *Arabidopsis* promoters of tryptophan synthase protein subunit and phytochrome B [J]. Plant Biotechnology, 2002, 19(1): 19-26.