

# 生菜 *rbcS* 基因启动子序列的克隆与分析

董 浩 赵轶君 李红民

(西北大学 生命科学院 陕西省生物技术重点实验室 西部资源生物与现代生物技术教育部重点实验室 陕西 西安 710069)

**摘要:** 根据其他植物中已知的光合作用关键酶 1,5-二磷酸核酮糖羧化/加氧酶小亚基编码基因(*rbcS*) 及其启动子序列设计简并引物,以生菜叶片基因组 DNA 为模板,利用 PCR 扩增技术获得生菜 *rbcS* 上游 1 046 bp 的序列元件 (GenBank 登录号: JQ741945)。序列分析表明,该序列元件包含植物启动子所必需的核心元件 CAAT-box 和 TATA-box,同时包含具有参与光应答、茉莉酸应答、脱落酸应答、乙烯应答、热胁迫应答及分生组织激活等相关的多种调控元件。序列比对表明,该序列与菊科、茄科、豆科 3 种科属多种植物的 *rbcS* 启动子序列存在较高同源性。该启动子的获得为开展以生菜作为外源蛋白表达宿主的相关研究奠定了良好基础。

**关键词:** 生菜; 1,5-二磷酸核酮糖羧化/加氧酶; 启动子; 序列分析

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2013)01-0088-05

## Cloning and Sequence Analysis of the Lettuce *rbcS* Promoter

DONG Hao ZHAO Yi-jun LI Hong-min

(College of Life Science, Northwest University, Shanxi Provincial Key Laboratory of Biotechnology, Key Laboratory of Resource Biology and Biomimicry in Western China, Ministry of Education, Xi'an 710069, China)

**Abstract:** The 1 046 bp 5' upstream regions of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit gene(*rbcS*) was amplified from lettuce genome DNA by PCR under the direction of the primers, which were designed based on the *rbcS* gene and the promoter sequence of other plants. Sequencing analysis indicated that the fragment contains core elements CAAT-box and TATA-box, as well as the elements sensitive to light, MeJA, abscisic acid, ethylene and heat stress. Meristem expression regulatory element was also found in the cloned *rbcS* promoter sequence. Furthermore, the *rbcS* promoter sequence of lettuce is similar to the *rbcS* promoters isolated from other plants of *Asteraceae*, *Solanaceae* or *Fabaceae*. This work provides strong support for high-level expression of recombinant proteins in lettuce.

**Key words:** Lettuce; Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small subunit; Promoter; Sequence analysis

生菜(*Lactuca sativa*) 又名莴苣,属菊科莴苣属(*Lactuca*),是一种广受欢迎的可生食蔬菜,具有极佳的口感和极高的营养价值。因其生长周期短、易繁殖,在重组蛋白的表达方面显示出独特优势,受到国内外研究者的广泛关注。由于生菜中表达的重组蛋白可在其叶片中被稳定储存和运输,并能通过口服途径被人体或动物机体有效吸收而无需高温处理,对于疫苗和抗体等多肽类药物更为有益,目前已有多种疫苗<sup>[1-2]</sup>、抗体<sup>[3]</sup>及功能性蛋白<sup>[4-6]</sup>在生菜

中成功表达。但是,与其他植物表达系统一样,生菜用作外源蛋白的表达宿主同样面临表达量不足的瓶颈问题。影响外源基因在植物细胞中表达效率的因素很多,其中启动子在基因表达效率的调控中起着关键作用。因此,选择高效的植物内源性启动子对于转基因表达水平的提高尤为重要。

1,5-二磷酸核酮糖羧化/加氧酶(Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase, Rubisco)是参与光合作用和光呼吸过程的关键酶,由 8 个大亚基

收稿日期: 2012-10-25

基金项目: 陕西省教育厅 2009 年度重点实验室科研计划项目(09JS079); 陕西省科技厅 2011 年度社会发展攻关项目(2011K12-61); 陕西省教育厅重点实验室重点科研计划项目(11JS085)

作者简介: 董 浩(1988-),男,山西晋城人,在读硕士,主要从事细胞生物学植物转基因研究。

通讯作者: 李红民(1972-),女,陕西咸阳人,副教授,博士,主要从事基因工程上游技术及天然活性成分作用机理研究。

(*rbcL*) 和 8 个小亚基(*rbcS*) 组成,被认为是高等植物叶片中含量最丰富的蛋白质,占叶片可溶性总蛋白的 50% 左右<sup>[7]</sup>,间接说明该酶的编码基因被高效表达。其中大亚基由叶绿体基因编码,小亚基由核基因编码,且小亚基为受光调控的叶片组织特异性表达。目前已有多种植物的 *rbcS* 基因被成功分离,因其极高的表达量,其启动子已被作为一种高效率的植物组织特异性启动子用于天花病毒疫苗等重组蛋白的表达,而且叶部启动效率较 CaMV35S 启动子要强<sup>[8]</sup>。本研究旨在克隆生菜 *rbcS* 基因的启动子序列,用于重组蛋白植物表达载体的构建,为在生菜中表达重组蛋白如血管生成抑制因子 Arresten 等奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

供试生菜品种为美国结球生菜组培无茵苗。

试验所用 *Taq* DNA 酶、pMD-18T 克隆载体、限制性内切酶、DNA Marker 等分子生物学试剂均购自大连宝生物公司(TaKaRa);引物的合成和 DNA 序列测定也由大连宝生物公司(TaKaRa)完成;其他试剂均为国产分析纯。

### 1.2 试验方法

1.2.1 生菜 *rbcS* 基因启动子的扩增 生菜叶片基因组 DNA 的提取,参照汤文开<sup>[9]</sup>植物 DNA 提取改进法进行。

根据已知烟草的 *rbcS* 基因及其启动子全序列(GenBank: ID X02353),通过软件 Oligo 6.0 设计简并引物,引物序列为:

启上: 5'-GGNAACGANATAAGGNC-3'

启下: 5'-CATTNNTAATNACACTNAGACANAAA G-3'

PCR 扩增反应体系为 50  $\mu$ L,其中 5  $\mu$ L 10  $\times$  *Taq* DNA Polymerase Buffer, 4  $\mu$ L 2.5 mmol/L dNTPs,引物各 1.5  $\mu$ L(10  $\mu$ mol/L), 2  $\mu$ L 生菜基因组 DNA, 1.5  $\mu$ L *Taq* DNA Polymerase (2 U/ $\mu$ L), 34.5  $\mu$ L 无菌水。PCR 反应循环参数为: 94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 60  $^{\circ}$ C 45 s, 72  $^{\circ}$ C 45 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 5 min, 4  $^{\circ}$ C 保存。

1.2.2 PCR 产物凝胶回收及序列测定 PCR 扩增产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳后切胶回收(操作按照试剂盒说明书进行),回收片段与 pMD-18T 载体连接后转化宿主菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  感受态细胞,在含 50 mg/mL 氨基青霉素的 LB 平板上于 37  $^{\circ}$ C 培养 12 ~ 16 h。随机挑取单克隆,经扩大培养后提取质粒

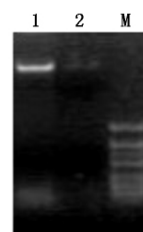
DNA(操作按照试剂盒说明书进行),经酶切和 PCR 反应检测后,委托大连宝生物公司(TaKaRa)测序。

1.2.3 序列分析 参照植物顺式调控元件数据库 PlantCare<sup>[10]</sup>和 PLACE<sup>[11]</sup>对获得的序列进行启动子元件分析,序列比对及同源性分析借助 BLASTn 和 DNASTAR 软件完成。

## 2 结果与分析

### 2.1 生菜 *rbcS* 基因启动子序列的克隆

在试验设计的简并引物引导下,以美国结球生菜基因组 DNA 为模板(图 1),扩增获得了特异性较强的一个产物,经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,该产物大小在 1 kb 左右,与预期的片段大小相符(图 2)。切胶回收 PCR 产物后与 pMD18T 载体连接重组,经双酶切检测的重组质粒(图 3)委托大连宝生物(TaKaRa)生物工程有限公司测序,序列测定结果见图 4。

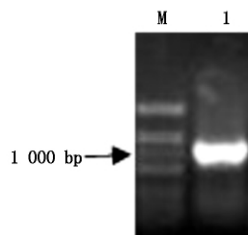


M. DL2000; 1. 2. 基因组 DNA。

M. DL2000; 1. 2. Genomic DNA.

图 1 生菜基因组 DNA

Fig. 1 Genomic DNA from lettuce

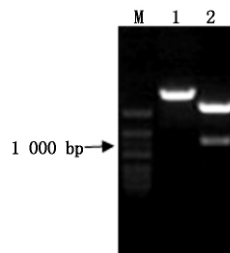


M. DL2000; 1. *rbcS* 基因启动子。

M. DL2000; 1. *rbcS* promoter.

图 2 生菜 *rbcS* 基因启动子扩增片段

Fig. 2 PCR amplification of lettuce *rbcS* promoter



M. DL2000; 1. *rbcS* 启动子质粒克隆; 2. 双酶切检测。

M. DL2000; 1. *rbcS* promoter plasmid; 2. Double digestion.

图 3 双酶切检测生菜 *rbcS* 基因启动子的克隆化

Fig. 3 Double digestion of lettuce *rbcS* promoter plasmid

1 TGTGGGAACGAGATAAGGGCGAAGTGCCTAGTAGCCTGCTATTAAAAATATATCCACAATTATAATGT  
I-box TATA-box CAAT-box  
71 ATTTGAAGATTAGTCAATTCGTCCAAAATTCAGGACTAAGTATCTTGAATTTTGTATCCTGAATTTTGG  
141 GGCTACTAATTTGGAACCTCAGGACTTAATGTCCTAAATTTTGTAGCCGCTAATTTGAAATTCAGGACTAA  
211 GTGTTTGAATTTTGAAGTCTTATTCGAAATGCAAGACTAAGTGACATGGATTTTGAAGTCTAAT  
281 TAATATTCAGGACATAAGATTCGAATTTTCAGACATAATTTTAACTTTAGGGCAGCATGTCCTGAAGT  
351 TTGAATCTTGAGGTCTAAACTTCAAGATGCAGCGTCTTGAAGTTAAAGTGAAGTGGCTAATCTTTAAATA  
421 CTTGTAACTGTGGATACATTTTAAATAATATATTTTAAAGCGGCTACCTGGTATCATCTTCACGAGAA  
TATA-box  
491 TTTTCCAAGTTAATTGTAAAGGAAATAGTGGTGTTCATCAAGTTATGGACAATATAAGGAAGCAAACAG  
CAAT-box  
561 TACTCTAGCTATCAAATTAGTTTCCACTTCTAAACCATGAATATTAGGAAAAACAAGAAACAAACAAAT  
AE-box TATA-box  
631 ATACATAAACAATACGGCTAAAGCCCAAGGAAAAGGGACTCTAAAAAATTAACCAACCTCAATCACACA  
L-box CAAT-box  
701 TTCATATCCTCTTCTACCTCATCTAGGATGAGATAAGATTACTGAGGTGCTTACACGTGGCACCTCCAT  
GATA-motif ABRE  
771 TGTGGTGAATAAAGAGTGGCTTAGCTCAAAAATATATTTTCCAACCTTTTCATGTGTGGATATTAAG  
TATA-box G-Box  
841 TTTTGTGTAGTGAATCAAGAACCACATAATCCAATGGTTAGCTTTATTCAGATGAGGGGGTTGTTGAT  
CAAT-box  
911 TTTTGTCTCGTCAGATATAGGAAATATGTAAACCTTATCATATATATAGGGTGGTGGCAACTATGCAA  
CGTCA-motif TATA-box  
981 TGACCATATTGGAAGTTAAAGGAAAAGAGAGAAAGAGAAATCTTTCTGAATCGTCGACCTGCAGGCATG

图4 生菜15-二磷酸核酮糖羧化/加氧酶小亚基(*rbcS*)基因启动子序列

Fig. 4 The sequence of lettuce *rbcS* promoter

## 2.2 生菜 *rbcS* 基因启动子的序列分析

对测序结果进行序列分析,结果表明,克隆得到的为1条长1049 bp的核苷酸序列,BLASTn比对结果显示,所克隆序列与已公布的烟草 *rbcS* 基因启动子同源性达到99%。后经 PlantCare 和 PLACE 植物顺式调控元件数据库分析,表明所克隆序列包含植物启动子所必需的多种调控元件(表1)。其中真核生物启动子的核心元件 CAAT-box 和 TATA-box 在该序列的多个位点出现(图4),二者共同介导真核生物 RNA 聚合酶参与的 *rbcS* 基因转录过程的起始和调节。此外,该序列中还存在多种特异性的启动子调控元件。如参与光应答的多种元件: AE-box(+616)、ATCT-motif(-732)、Box I(-193)、G-Box(+755; -821)、GATA-motif(+657; -943; +731)、GT1-motif(-680)、I-box(+11; +733; -941)、L-box(+677)、MNF1(-330)、Sp1(-960)、Box II(+753)<sup>[12-15]</sup>;茉莉酸应答相关调控元件 CGTCA-motif(+918)<sup>[16]</sup>;脱落酸应答相关调控元件 ABRE(+754)<sup>[17]</sup>;乙烯应答相关元件 ERE(-193)<sup>[18]</sup>;热胁迫应答相关元件 HSE(-302)<sup>[19]</sup>;分生组织激活相关调控元件 CAT-box(-789)<sup>[20]</sup>等。该结果说明,生菜15-二磷酸核酮

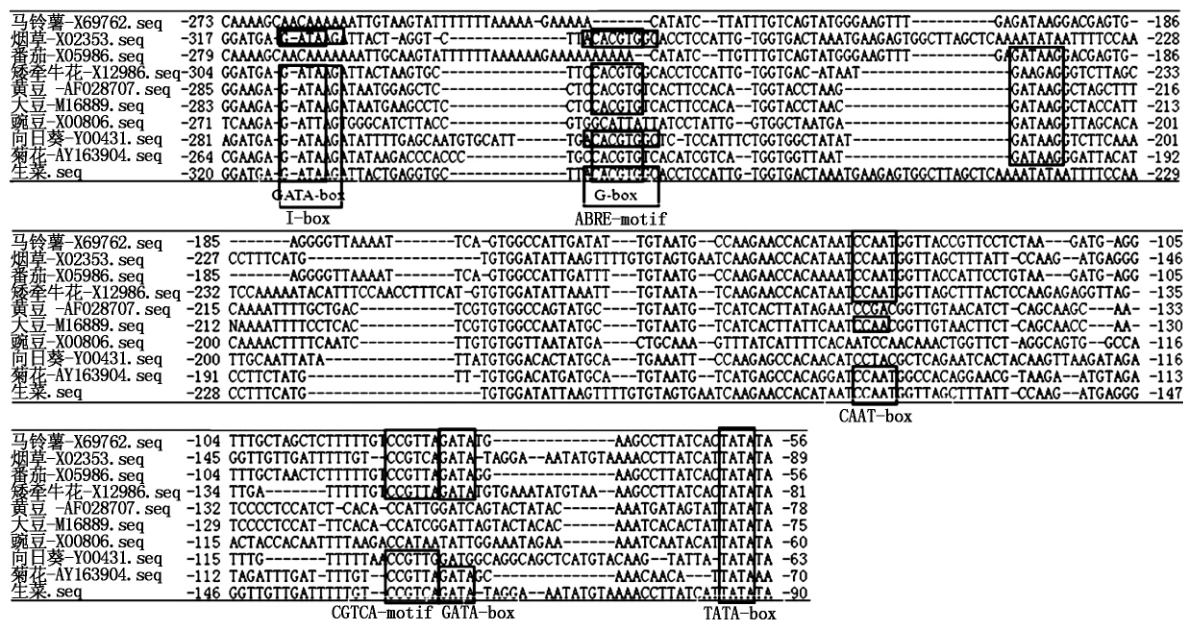
糖羧化/加氧酶小亚基(*rbcS*)基因起始密码子上游1046 bp的启动子调控序列已经被成功克隆。目前该序列已上传至 GenBank,登录号为 JQ741945。

## 2.3 *rbcS* 基因启动子的同源性比对

对生菜 *rbcS* 启动子-380到-70核心区进行 BLASTn 分析,发现该启动子与菊科的向日葵(Y00431)、菊花(AY163904)、茄科的番茄(X05986)、矮牵牛花(X12986)、马铃薯(X69762)、烟草(X02353)以及豆科的黄豆(AF028707)、大豆(M16889)、豌豆(X00806)等科属植物的 *rbcS* 启动子的许多核心元件都存在高度相似性。图5所示为各类植物 *rbcS* 启动子核心区的序列比对结果,揭示出这3类科属植物在进化过程中 *rbcS* 基因启动子结构序列的同源性演变。此外,根据 GenBank 公布的数据显示这几种同源性植物中 *rbcS* 基因启动子驱动的 *rbcS* 蛋白亚基的表达量也不尽相同,其中番茄、矮牵牛花、大豆、黄豆、和菊花的 *rbcS* 表达量非常高,而马铃薯则相对要低得多。与之相关,前几种植物 *rbcS* 基因启动子的相似性也较后者要高,由此或可推测, *rbcS* 蛋白在这几种植物中的高表达与其启动子的高度同源性存在着密不可分的联系。

表 1 生菜 *rbcS* 基因启动子推定顺式作用元件Tab.1 Putative cis-acting elements of lettuce *rbcS* promoter

调控序列 Cis-acting element	位置(链) Location (chain)	序列 Sequence	功能 Function
5UTR Py-rich stretch	-1 007	TTTCTCTCTCTCTC	高转录活性相关顺式调控元件
ABRE	+754	ACACGTGGC	脱落酸应答相关顺式调控元件
AE-box	616	AGAAACAA	光应答相关元件
ARE	-592	TGCTTT	厌氧诱导所需顺式调控元件
ATCT-motif	-732	AATCTAATCT	光应答保守 DNA 序列
Box I	-193	TTTCAAA	光应答相关元件
CAAT-box	+871; -502; +691; +58; -769; +541	CCAAT	启动子和增强子区顺式调控元件
CAT-box	-789	GCCACT	分生组织激活相关顺式调控元件
CGTCA-motif	+918	CGTCA	茉莉酸应答相关顺式调控元件
ERE	-193	ATTTCAAA	乙烯应答相关元件
G-Box	+755; -821	CACGTG	光应答相关顺式调控元件
GATA-motif	+657; -943; +731	AAGGATAAGG	部分光应答元件
GT1-motif	-680	GGTTAA	光应答相关元件
HSE	-302	AGAAAATTTCG	热胁迫应答相关顺式调控元件
I-box	+11; +733; -941	GATAAGATT	部分光应答元件
L-box	+677	AAATTAACCAAC	部分光应答元件
MNF1	-330	GTGCCC( A/T ) ( A/T)	光应答相关元件
O2-site	-862	GATGATGTGG	醇溶蛋白代谢应答相关元件
Skn-1-motif	-980	GTCAT	胚乳表达相关元件
Sp1	-960	CC( G/A ) CCC	光应答相关元件
TATA-box	+956; +925; +806; +630; +544; +451; +63; +50	TATA	转录起始位点上游 30 bp 处启动子中心元件
TGACG-motif	-918	TGACG	茉莉酸应答相关顺式调控元件
box II	+753	TCCACGTGGC	部分光应答元件

图 5 生菜 *rbcS* 基因启动子与其他同源物种 *rbcS* 启动子核心区序列比对Fig.5 DNA sequence relationship of the *rbcS* promoter from lettuce to other homologous promoters in the region -380 to 0

### 3 讨论

Rubisco 是高等植物叶片中含量最为丰富的一种关键蛋白酶,其小亚基成员 *rbcS* 基因启动子是一种光诱导型的组织特异性调控元件,具有较高的启动效率。已有研究表明,来自菊科的 Rubisco 小亚

基成员 *rbcS* 与来自茄科和豆科的 *rbcS* 亚基之间存在较高的同源性,而它们的启动子之间也存在着不同程度的相似性<sup>[21-22]</sup>。本研究旨在获得生菜 *rbcS* 基因的高效启动子元件,以提高在生菜等植物叶片中转基因产物的表达量。为此,我们参照已公布的茄科植物烟草 *rbcS* 基因启动子序列设计特异性引

物通过 PCR 方法从生菜叶片基因组 DNA 中扩增出了生菜的 *rbcS* 启动子序列。

*rbcS* 基因启动子是一种光诱导型启动子, 生物信息学分析表明, 生菜 *rbcS* 基因启动子内部存在着多种参与光应答的相关元件, 包括 AE-box、Box I、Box II、G-Box、I-box、L-box、GATA-motif、GT1-motif、ATCT-motif、MNF1、Sp1 等。其中多数调控元件均为光诱导型启动子的保守序列, 在多种植物 *rbcS* 基因启动子中都有发现。这些光应答保守序列的存在使得生菜叶片中 Rubisco 蛋白的表达受到良好的光周期调节, 进而协同参与到生菜生长的昼夜节律调控当中。生菜属于半耐寒性蔬菜, 喜冷凉湿润的气候条件, 不耐炎热。序列分析表明, 生菜 *rbcS* 基因启动子内部存在高温胁迫应答相关元件 HSE, 推测 HSE 可能与内源激素脱落酸应答相关元件协同作用, 促使生菜植株对高温等逆境胁迫及时做出应答, 并通过自身相关激素水平的变化调控叶片中 Rubisco 蛋白的表达, 进而在光呼吸和光合作用等代谢水平产生变化以抵抗不利环境的影响。此外, 生菜叶片的生长对乙烯极为敏感, *rbcS* 基因启动子区的乙烯应答元件 ERE 和茉莉酸应答相关元件 CGTCA-motif 有助于生菜对体内外环境中乙烯浓度的变化及病原性微生物和虫害的侵染等外界刺激做出反应, 从而在转录水平对叶片蛋白 Rubisco 的表达进行调控。

综上所述, 生菜 *rbcS* 基因启动子的转录调控活性可能受到光信号及植物激素脱落酸、乙烯、茉莉酸等多种信号途径的协同作用。该启动子的获得, 为利用其介导植物转基因提高外源基因表达量奠定了基础。目前, 利用该启动子与 GFP 蛋白基因构建融合基因表达载体, 进而评价其在植物叶片中启动效率的工作正在进行当中。

#### 参考文献:

- [1] Pniewski T, Kapusta J, Bociag P *et al.* Low-dose oral immunization with lyophilized tissue of herbicide-resistant lettuce expressing hepatitis B surface antigen for prototype plant-derived vaccine tablet formulation [J]. *Journal of Applied Genetics* 2011 52: 125 – 136.
- [2] Davoodi-Semiromi A, Schreiber M, Nalapalli S, *et al.* Chloroplast-derived vaccine antigens confer dual immunity against cholera and malaria by oral or injectable delivery [J]. *Plant Biotechnology Journal* 2010 8: 223 – 242.
- [3] Negrouk V, Eisner G, Lee H I *et al.* Highly efficient transient expression of functional recombinant antibodies in lettuce [J]. *Plant Science* 2005 169: 433 – 438.
- [4] Li J, Chen M, Liu X W *et al.* Transient expression of an active human interferon- $\beta$  in lettuce [J]. *Scientia Horticulturae* 2007 112: 258 – 265.
- [5] Boyhan D, Daniell H. Low-cost production of proinsulin in tobacco and lettuce chloroplasts for injectable or oral delivery of functional insulin and C-peptide [J]. *Plant Biotechnology Journal* 2011 9: 585 – 598.
- [6] Cui L J, Chen Y H, Shen G A *et al.* Expression of bioactive thymosin alpha 1 (T $\alpha$ 1) in marker-free transgenic lettuce (*Lactuca sativa*) [J]. *Plant Molecular Biology Reporter* 2011 29: 466 – 472.
- [7] 刘德兵, 魏军亚, 李 飞, 等. 香蕉 *rbcS* 基因启动子的克隆及序列分析 [J]. *西北植物学报* 2010 30(2): 0237 – 0242.
- [8] Sharma A K, Sharma M K. Plants as bioreactors: Recent developments and emerging opportunities [J]. *Biotechnology Advances* 2009 27: 811 – 832.
- [9] 汤文开, 谭 新, 张 辉, 等. 一种快速简单高效提取植物 DNA 的方法 [J]. *华中师范大学学报: 自然科学版* 2007 41(3): 447 – 449.
- [10] Lescot M, Déhais P, Thijs G *et al.* PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences [J]. *Nucleic Acids Research* 2002 30(1): 325 – 327.
- [11] Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M *et al.* Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database [J]. *Nucleic Acids Research* 1999 27(1): 297 – 300.
- [12] Menkens A E, Schindler U, Cashmore A R. The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins [J]. *Trends Biochem Sci* 1995 20: 506 – 510.
- [13] Giuliano G, Pichersky E, Malik V S *et al.* An evolutionarily conserved protein binding sequence upstream of a plant light-regulated gene [J]. *Proc Natl Acad Sci USA* 1988 85: 7089 – 7093.
- [14] Green P J, Kay S A, Chua N H. Sequence-specific interactions of a pea nuclear factor with light-responsive elements upstream of the *rbcS-3A* gene [J]. *EMBO J* 1987 6: 2543 – 2549.
- [15] Gilmartin P M, Sarokin L, Memelink J *et al.* Molecular light switches for plant genes [J]. *Plant Cell* 1990 2: 369 – 378.
- [16] Rouster J, Leah R, Mundy J, *et al.* Identification of a methyl jasmonate-responsive region in the promoter of a lipoxygenase 1 gene expressed in barley grain [J]. *The Plant Journal* 1997 11(3): 513 – 523.
- [17] Mundy J, Yamaguchi-Shinozaki K, Chua N H. Nuclear proteins bind conserved elements in the abscisic acid-responsive promoter of a rice *rab* gene [J]. *PNAS* 1990 87(4): 1406 – 1410.
- [18] Ohme-Takagi M, Shinshi H. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylene-responsive element [J]. *The Plant Cell February* 1995 7(2): 173 – 182.
- [19] Benjamin I J, Kröger B, Williams R S. Activation of the heat shock transcription factor by hypoxia in mammalian cells [J]. *PNAS* 1990 87: 6263 – 6267.
- [20] Chaubet N, Flénet M, Clément B *et al.* Identification of cis-elements regulating the expression of an Arabidopsis histone *H4* gene [J]. *The Plant Journal* 1996 10(3): 425 – 435.
- [21] Meagher R B, Berry-Lowe S, Rice K. Molecular evolution of the small subunit of ribulose biphosphate carboxylase: nucleotide substitution and gene conversion [J]. *Genetics* 1989 123: 845 – 863.
- [22] Outchkourov N S, Peters J, de Jong J *et al.* The promoter terminator of chrysanthemum *rbcS1* directs very high expression levels in plants [J]. *Planta* 2003 216: 1003 – 1012.