

水稻 rTGA4 转录因子的启动子特征分析

连梓伊^{1,2} 杨郁文² 陈天子² 张保龙² 刘蔼民²

(1. 南京农业大学 农学院, 江苏 南京 210095; 2. 江苏省农业科学院 农业生物技术所, 江苏省农业生物学重点实验室, 江苏 南京 210014)

摘要: TGA 转录因子通过与 *NPR1* 基因协同作用参与植物对病害的防御作用。从水稻突变体 HX-3 基因组中分离到一个 TGA 转录因子 rTGA4 的 5'非翻译区 1 995 bp 的序列 (pTGA), 该序列与日本晴基因组序列仅有 94% 的相似性。经 PLACE 和 PlantCARE 序列分析表明: 该片段含有典型的 TATA-box、CAAT-box 等基本转录元件, 以及脱落酸、乙烯、茉莉酸甲酯、赤霉素以及病原菌响应元件等。将得到的 pTGA 利用 T/A 克隆法连接到植物表达载体 pCXGUS-T/A 上, 通过花序浸染法转化拟南芥, 并对转基因拟南芥进行分子检测及 GUS 组织化学染色。结果表明, 在苗期时 GUS 主要在幼苗根尖表达, 在其他部位均没有表达; 而在成熟期 GUS 在多处均有表达, 特异性并不明显, 表明该启动子是受生长发育阶段调控的组织特异性启动子。通过对 rTGA4 启动子的特征研究, 为进一步克隆 HX-3 中的抗性基因以及利用奠定基础。

关键词: 水稻; TGA 转录因子; 启动子; 拟南芥; GUS 染色

中图分类号: Q78 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2013)04-0001-06

Characterization of the Promoter of a Rice rTGA4 Like Transcription Factor

LIAN Zi-yi^{1,2}, YANG Yu-wen², CHEN Tian-zi², ZHANG Bao-long², LIU Ai-min²

(1. College of Agricultural, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China; 2. Institute of Biotechnology, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Provincial Key Laboratory of Agrobiotechnology, Nanjing 210014, China)

Abstract: The family of TGA transcription factors cooperates with *NPR1* to play a very important role in disease defence. A 1 995 bp sequence of the 5'UTR of a new TGA transcription factor rTGA4 was isolated from rice mutant HX-3 genomic DNA and named pTGA, which shows 94% similarity to the genomic sequence of nipponbare. Sequence analysis of the promoter by PLACE and Plant CARE showed that the cloned fragment contained such some basic transcription element TATA and CAAT-Box, and some putative cis-elements, such as abscisic acid responsive, ethylene responsive, MeJA responsive, gibberellin-responsive and pathogen responsive elements. Then an expression vector was constructed by connecting the pTGA with pCXGUS-T/A and it was transformed to *Arabidopsis thaliana* by *Agrobacterium*-mediated method. The transgenic plants were analyzed by PCR amplification and GUS staining. We found that *GUS* gene was mainly expressed in shoot tip of seedling and did not detect GUS activity in other parts, but the specific expression was lost during mature period. So we consider that the pTGA is a tissue specific promoter which is regulated by growth stage. Characterization of the promoter of the rTGA4 lays a foundation for cloning the resistant gene in HX-3 and its further application.

Key words: Rice; TGA transcription factors; Promoter; *Arabidopsis*; GUS staining

转录因子在植物生长和发育期间的转录水平调控上起着重要的作用, 指导 DNA 和蛋白质相互作用, 从而调控基因的表达。TGA 转录因子因其含有 TGACG/as-1 (Activation sequence 1) 元件而得名^[1]。该类启动子通过与 *NPR1* 基因协同作用参与植物对

病害的防御作用。具体作用方式为 *NPR1* 寡聚体中的半胱氨酸残基分子间二硫键被水解还原, 形成 *NPR1* 单体, *NPR1* 单体具完整的核定位序列, 使其能够转移到细胞核内并与结合在 *PR-1* 基因启动子区的 TGA 类转录因子相互作用, 调控 *PR* 基因的表达

收稿日期: 2013-03-26

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30971830); 江苏省农业综合开发科技推广项目 (2012KJ-06)

作者简介: 连梓伊 (1988-), 女, 吉林白城人, 在读硕士, 主要从事作物遗传育种研究。

通讯作者: 刘蔼民 (1956-), 男, 江苏徐州人, 研究员, 硕士, 主要从事水稻生理研究。

张保龙 (1973-), 男, 安徽淮南人, 副研究员, 博士, 主要从事植物抗病育种研究。

和系统性抗性(SAR)的产生^[2]。由于该类启动子与基础防御基因 *PR1*、*NPR1* 作用关系紧密,在抗病研究中的关键性与重要性逐渐显现。据报道,在拟南芥中至少存在 10 个 TGA 类转录因子,并将它们分为 5 类,其中 TGA1 和 TGA4 是第 1 类;TGA2、TGA5 和 TGA6 是第 2 类,并与 *NPR1* 直接作用;TGA3 和 TGA7 是第 3 类;PERIANTHIA 属于第 4 类;TGA9/TGA10 是第 5 类^[3]。在水稻中,通过酵母双杂交获得了 3 个可以与拟南芥 *NPR1* 结合的 TGA 转录因子,分别命名为 *rTGA2.1*、*rTGA2.2* 和 *rTGA2.3*。其中野生型的 *rTGA2.1* 基因在水稻对细菌性病原菌的基础抗病中主要起负调节作用^[4]。

水稻突变体 HX-3 是以感病杂交稻恢复系明恢 63 的成熟胚为外植体,利用离体筛选技术获得的抗水稻白叶枯病的细胞突变体^[5]。我们从该突变体中分离到一个新的 TGA 转录因子,该基因与 *rT-*

GA2.1 的相似性为 45%,是一个新的 TGA 转录因子。通过结构分析发现,该基因属于第 1 类 TGA 转录因子,将其命名为 *rTGA4*。本试验克隆水稻突变体 HX-3 中该 TGA 转录因子的启动子,期望通过对该启动子特征的相关分析,为克隆 HX-3 中的抗性基因以及进一步利用奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

植物材料水稻突变体 HX-3 拟南芥哥伦比亚型 (*Arabidopsis thaliana* ecotype columbia) 均由江苏省农业生物学重点实验室提供。大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 、农杆菌菌株 LBA4404、植物表达载体 pCXGUS-T/A (pCX-T/A Series Expression SystemTM) 均为江苏省农业生物学重点实验室保存。*Taq* DNA 聚合酶和连接酶购自 Takara 公司, X-gluc 购自北京鼎国公司。

表 1 引物序列

Tab. 1 The primers sequences in the paper

| 引物名称 Primers name | 引物序列(5'→3') Sequence of primers | 扩增长度/bp Length of fragment | 退火温度/℃ Annealed temperature |
|----------------------|------------------------------------|-------------------------------|--------------------------------|
| P1(R) | TTAGCGGCGATACGTTATACCTT | 1 995 | 59 |
| P2(F) | TTCCTGGATGATTGAACGGATTC | | |
| P3(R) | TGACTGAGACAGACAGCCGACC | 701 | 59 |
| P4(F) | CTAACTCAACAGCCCAGGTCCG | | |
| 35S2 | CGACTCAATGACAAGAAGAAAATC | 1 900 | 59 |

1.2 水稻 DNA 的提取和转录因子启动子的克隆

以水稻突变体 HX-3 叶片为材料,采用改良的 CTAB 法提取总 DNA^[6]。从水稻全基因组数据库上查找到 TGA 转录因子序列,根据 TGA 转录因子 5'侧翼序列,利用 Primer 5 软件设计特异引物(表 1)。其中,引物 P1 及 P2 用于从基因组中扩增启动子片段,并构建载体。引物 P3 和 P4 用于转基因植株检测。35S2 和 P2 用于检测所构载体插入片的方向

性是否正确。PCR 扩增反应条件为:94℃ 预变性 3 min;94℃ 变性 30 s,59℃ 退火 50 s,72℃ 延伸 2 min,35 个循环;72℃ 延伸 10 min。PCR 产物按 Axygen 公司 PCR 纯化试剂盒说明书纯化后,依据 TA 克隆方法将启动子片段与 TA 克隆载体 PGEM-T Easy Vector 连接,并转入大肠杆菌感受态细胞 DH5 α 中,挑取阳性克隆测序。对测序验证正确的重组克隆载体命名为 T-pTGA。

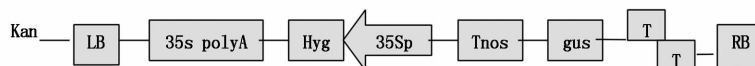
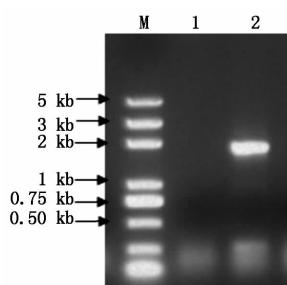


图 1 pTGA-GUS 图示

Fig. 1 The diagram of pTGA-GUS



M. 分子量标记; 1. 水对照; 2. HX-3 基因组扩增产物。

M. Molecular marker; 1. Control; 2. Fragment amplified from HX-3 genome.

图 2 HX-3 中 *rTGA4* 启动子的扩增片段

Fig. 2 The *rTGA4* promoter amplified from HX-3 genome

1.3 TGA 转录因子启动子序列分析

利用 PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html/>)^[7-8] 和 PlantCARE 在线启动子分析软件 (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 对该启动子潜在的功能进行预测。

1.4 植物表达载体 pTGA-GUS 的构建及农杆菌转化

以测序正确的克隆质粒 T-pTGA 为模板, P1 和 P2 为引物, 用高保真酶 Ex *Taq*(可以直接加 A) 进行 PCR 扩增, PCR 产物按 Axygen 公司 PCR 纯化试剂

盒说明书纯化后,依据 TA 克隆方法将启动子片段与 pCXGUS-T/A 连接。挑选阳性克隆的质粒,用冻

融法转化农杆菌 LBA4404。转化子经 PCR 验证后保存备用。将该载体命名为 pTGA-GUS(图 1)。

| | | |
|-----------|--|------|
| pTGA | TTAGCGGCGATACGTTATACCTTAGTGTCAATTACTTTGGCACCACCTCTTGTAGGATTAAATGTAAGAAGTTACAAAT | 80 |
| 日本晴 | TTAGCGGCGATACGTTATACCTTAGTGTCAATTACTTTGGCACCACCTCTTGTAGGATTAAATGTAAGAAGTTACAAAT | 80 |
| Consensus | ttagcgggcgatacgtttataccttagtgtcaattactttggcaccacacctctt gtaggattaaatgtaagaagttaacaa t | |
| pTGA | CTTCGATTTGATATGGGTACAACATAGTAAATTTATCGAGCTAACAAAAAACTAAGTATTTATAAGTAAATTTCTAATGT | 160 |
| 日本晴 | CTTCGATTTGATATGGGTACAACATAGTAAATTTATCGAGCTAACAAAAAACTAAGTATTTATAAGTAAATTTCTAATGT | 160 |
| Consensus | cttcgatttgatagtggttacaacatagtaaaattatcgagctaacaaaaaaactaagattttataagtaaaattctaattgt | |
| pTGA | TTAGGACTTACATGGACCGTCGAGGTAAACGCTTGGAAACATCGGCCGCCAATGCAGATGCTCCAGGTGCTTGGGTCTCG | 240 |
| 日本晴 | TTAGGACTTACATGGACCGTCGAGGTAAACGCTTGGAAACATCGGCCGCCAATGCAGATGCTCCAGGTGCTTGGGTCTCG | 240 |
| Consensus | ttaggacttacatggacccgtcgaggt aacgcttggaaacatcgggcgccaatgcagatgctccaggtgcttgggtctcgc | |
| pTGA | ATGCGATGGTGTCTGGTTCTAACACATTAGATCTCGGCACCAATTGGCGCGAGTTAAGGATCTGTATTTGCAATAAGTTT | 320 |
| 日本晴 | ATGCGATGGTGTCTGGTTCTAACACATTAGATCTCGGCACCAATTGGCGCGAGTTAAGGATCTGTATTTGCAATAAGTTT | 320 |
| Consensus | atgccatgggtgtctggttctaacacatttagatctcggcaccaaattggcgcgagtttaaggatc gtaatttgcaataaagttt | |
| pTGA | TCGTGATGGTCTATCTGTAATAATATGTTATCTAAAGGGTCAAAAGTATAAAAAAATCCACGTTTAAAGCCACATCTACT | 400 |
| 日本晴 | TCGTGATGGTCTATCTGTAATAATATGTTATCTAAAGGGTCAAAAGTATAAAAAAATCCACGTTTAAAGCCACATCTACT | 398 |
| Consensus | tcgtgatggtctat tgtaaaaatgtttatctaaaggt caaagtataaaaaa atccacgtttaagccacatctact | |
| pTGA | CATCTAGAAATACTCAATGACGCAAAAAGCAAATTAGATCAATCCTTATTTTGAGACCCAAATACTATTTTAAACCACT | 480 |
| 日本晴 | CATCTAGAAATACTCAATGACGCAAAAAGCAAATTAGATCAATCCTTATTTTGAGACCCAAATACTATTTTAAACCACT | 478 |
| Consensus | catctagaaatactcaatgacgcaaaaaagcaaattagatcaatccttattttgagacccaaatactatttttaaaccaat | |
| pTGA | AACTTGAATTTGAATATCTTATCACCATGCGCCTGCCAGCCCTCATTCACATGAATCTTCTGATCCTTAGAGAAAA | 560 |
| 日本晴 | AACTTGAATTTGAATATCTTATCACCATGCGCCTGCCAGCCCTCATTCACATGAATCTTCTGATCCTTAGAGAAAA | 558 |
| Consensus | aaacttgaatttgaatatacttaccatgcgctgccagccctcattccacatgaatcttctgatccttagagaaaa | |
| pTGA | AAATGAATTTGTTTCACTGCTGCTCAGTGTAGAGCTTGGTCATACACCCTAATTCCTTCTGCTCACTTGGTAAATTA | 640 |
| 日本晴 | AAATGAATTTGTTTCACTGCTGCTCAGTGTAGAGCTTGGTCATACACCCTAATTCCTTCTGCTCACTTGGTAAATTA | 638 |
| Consensus | aaatgaatttggctcaatgcactgctcagtgagagcttggctcatcaccaactaattccttctgctcacttggtaattaa | |
| pTGA | AAAGTTGAAACGGAATGCCATGCATGGAGACCCCAACCTCTCCTTTTCGCTCGCCTTTAGTAGTGGTCTAGCAACTTTA | 720 |
| 日本晴 | AAAGTTGAAACGGAATGCCATGCATGGAGACCCCAACCTCTCCTTTTCGCTCGCCTTTAGTAGTGGTCTAGCAACTTTA | 718 |
| Consensus | aaagtggaaacggaatgcccatgcattggagaccccaacctctccttttcgctcgccctttagtagtggcttagcaacttta | |
| pTGA | CTTGTTTTTTTCTTGTTCCGAGCGAGAGCGAGTTAGCTAACGTCACAAGCTAAGCTACTGATCAAGATTATTTATTTGCA | 799 |
| 日本晴 | CTTGTTTTTTTCTTGTTCCGAGCGAGAGCGAGTTAGCTAACGTCACAAGCTAAGCTACTGATCAAGATTATTTATTTGCA | 798 |
| Consensus | gttggtttttt ccttggttccgagcgagagcgagttagctaaacgtcacaaagctaagctactgatcaagattattatttga | |
| pTGA | CGCTTGCCCCCCTAAGTTCCCTAACACTAACTCTGCTAGCTAAGAGTAAGATTGCTGTGATCGGGAGATGCTACCGG | 875 |
| 日本晴 | CGCTTGCCCCCCTAAGTTCCCTAACACTAACTCTGCTAGCTAAGAGTAAGATTGCTGTGATCGGGAGATGCTACCGG | 878 |
| Consensus | cgcttggccccctaaagttccctaacactaa tgctagctaaagaagtaagatttgctgtgatcgggagatgctaccgg | |
| pTGA | ACAAGTATTGTTTCTTGTTAGCTTATAATTTTGCGGATTTCTGATACATCCGAGCGGATCTCTCA...GTTAG | 955 |
| 日本晴 | ACAAGTATTGTTTCTTGTTAGCTTATAATTTTGCGGATTTCTGATACATCCGAGCGGATCTCTCA...GTTAG | 955 |
| Consensus | acaagtattgtttcttggttagcttataattttggcgattcttgatactacatccg ggcggatc t a gtag | |
| pTGA | CTAGAGAGTTTGAATATCTAATAATTTTACTGTTTTCACCTTTT CCATTAAATTTTAACTACAAGTTTCTCTATTAGAT | 1034 |
| 日本晴 | CTAGAGAGTTTGAATATCTAATAATTTTACTGTTTTCACCTTTT CCATTAAATTTTAACTACAAGTTTCTCTATTAGAT | 1035 |
| Consensus | ctagagagt tgaataaa ctatacaa actatag acctcttttaattggagctatgacaaaattt agtggagctcta | |
| pTGA | TGGGGCTCCTATAGTTGCAACACCAATAATAGGGGCTCGAGACCTCAAGCCCTATGGTGGATCCGCCAACATCCATT | 1113 |
| 日本晴 | TGGGGCTCCTATAGTTGCAACACCAATAATAGGGGCTCGAGACCTCAAGCCCTATGGTGGATCCGCCAACATCCATT | 1115 |
| Consensus | tgggg ctccat gttgcaacacaaataataggggctcgagacctca agccctatggtggatccgccaaactccattt | |
| pTGA | GCAGATATTAGCAATAT TTTTCTACTGTTTTCACCTTTT CCATTAAATTTTAACTACAAGTTTCTCTATTAGAT | 1193 |
| 日本晴 | GCAGATATTAGCAATAT TTTTCTACTGTTTTCACCTTTT CCATTAAATTTTAACTACAAGTTTCTCTATTAGAT | 1195 |
| Consensus | gcagatatttagcaaat ttttttactgttttcaactttg ccattaa atttttaaactacaagtctctattaaagt | |
| pTGA | CTTTTATTTTATCCGACCTTGGTTAGTTCAACATCAAAATAAAAAATAGAGGGAGTATTTAATATGATT...CAAACCG | 1273 |
| 日本晴 | CTTTTATTTTATCCGACCTTGGTTAGTTCAACATCAAAATAAAAAATAGAGGGAGTATTTAATATGATT...CAAACCG | 1273 |
| Consensus | cttt ttttttattccgacgttgggttagttcaaacatacaataaaaaaatagagggagttatttaattgatt caaacgg | |
| pTGA | CATTTCATCCCGTGGACAAATATAACTTTCCGGTCATAATACACTAGCAAAAACAATAAAAGTTGTTACTACTAGATTCCA | 1353 |
| 日本晴 | CATTTCATCCCGTGGACAAATATAACTTTCCGGTCATAATACACTAGCAAAAACAATAAAAGTTGTTACTACTAGATTCCA | 1353 |
| Consensus | catcttcacccgtggacaaatataactttcggtcataatacactagcaaaaaacaataaaagttgtactactagattcca | |
| pTGA | AAACCACTTTGCAAAATTAATTCAGGAACAA.....TTTTTCCCATGAG.....CA | 1433 |
| 日本晴 | AAACCACTTTGCAAAATTAATTCAGGAACAA.....TTTTTCCCATGAG.....CA | 1399 |
| Consensus | aaaccactttgcaaatattcaaggaaacaa ttttcccatgag ca | |
| pTGA | AGTTTAAATAGTATAGCCAACTACTAGT CCAATTTATCTATAGCCAACTAGTAGCTCATTTCATACAATAGTTACATACT | 1513 |
| 日本晴 | AGTTTAAATAGTATAGCCAACTACTAGT CCAATTTATCTATAGCCAACTAGTAGCTCATTTCATACAATAGTTACATACT | 1479 |
| Consensus | agtttaatagtatagccaaactactagt ccaatttatctatagccaaactagtagctcattcacaatagttacatact | |
| pTGA | ACACTATTAAATAATATCCACCTGTATACACACACACCGTCTTGGAGTCCGTGCTACAGCTGCTATATAAATCTGTAGC | 1593 |
| 日本晴 | ACACTATTAAATAATATCCACCTGTATACACACACACCGTCTTGGAGTCCGTGCTACAGCTGCTATATAAATCTGTAGC | 1559 |
| Consensus | acactatttaata at tccacgtgtcatacacacacc cgt ttggagtcctgtctacagctg ctataaatctgttagc | |
| pTGA | CTGCTATCTCTCTCCTCCTCCTCCTTCTCTTAAATATGTTTGCAGCTGG TTATAGCCTGCTATTATACATGCTCTT | 1673 |
| 日本晴 | CTGCTATCTCTCTCCTCCTCCTCCTTCTCTTAAATATGTTTGCAGCTGG TTATAGCCTGCTATTATACATGCTCTT | 1620 |
| Consensus | ctgct a tcttctta aatatgtttgcagctgg ttatagcctgctatt tac tgcctt | |
| pTGA | AGACGGTTGACCTTTTCTTGTGTTGGGAATCGTGAGGCAGATGGTGGAGAGATCTGCCGTTTACTTTGATCCAAAGGT A | 1753 |
| 日本晴 | AGACGGTTGACCTTTTCTTGTGTTGGGAATCGTGAGGCAGATGGTGGAGAGATCTGCCGTTTACTTTGATCC AAGGT A | 1700 |
| Consensus | agacggttgacctttttcttgttgggaatcgtgaggcagatggtggagagatctgccgtttactttgatcc aaggt a | |
| pTGA | AAACACACACAAAGCTTGGCCCACTCCACCACCTGGGTGGTAGCCAGTGTTCGTCTCGGCCCAAGATCGATGCAGC | 1833 |
| 日本晴 | AAACACACACAAAGCTTGGCCCACTCCACCACCTGGGTGGTAGCCAGTGTTCGTCTCGGCCCAAGATCGATGCAGC | 1778 |
| Consensus | aaacacacac aagcttggcccaactccaccacctgggtggtagccagtgttcgtctcgcccaagaatcgatgcagc | |
| pTGA | CAGCAAGTGCAATGCAAGCTCCCCCAATTTATGCTCCGATACTCCAATCGCCATCTCGGAAATGCTGTCGCTGTTCCCT | 1913 |
| 日本晴 | CAGCAAGTGCAATGCAAGCTCCCCCAATTTATGCTCCGATACTCCAATCGCCATCTCGGAAATGCTGTCGCTGTTCCCT | 1858 |
| Consensus | cagcaagtgcgaatgcgaagctcccccacattattgtccgatactccaatcgccatctcggaatgctgctgcgtgttcct | |
| pTGA | GCCTACGAGCGAGAGAGAAATCTCATCTCGATGCTGAACAAGTAATTTTCCCGGTTCTGAATCCGTTCAATCATCCAGC | 1993 |
| 日本晴 | GCCTACGAGCGAGAGAGAAATCTCATCTCGATGCTGAACAAGTAATTTTCCCGGTTCTGAATCCGTTCAATCATCCAGC | 1938 |
| Consensus | gcctacgagcgagagagagaatctcatctcgatgctgaacaagtaattttcccggttctgaatccggttcaatcatccagg | |
| pTGA | A | 1994 |
| 日本晴 | A | 1939 |
| Consensus | a | |

图3 rTGA4 启动子序列与登录的日本晴序列的相似性比较

Fig. 3 Comparison of the promoter sequence of rTGA4 with that of nipponbare

TTAGCGGCGATACGTTATACCTTAGTGTCAATTACTTTGGCACCAATCCTTAGTAGG
ATTAAATGTAAGAAGTTACAAATCTTCGATTTGATATGGGTACAACATAGTAAATAT
CGAGCTAACAAAAAACTAAGTATTATAAGTAAATTCTAATGTTTAGGACTTACATG
GACCGTCGAGGTTAACGCTTGGAAACATCGGCCGCCAATGCAGATGCTCCAGGTG
CTTGGGTCTCGATGCCATGGTGTCTGGTTCTAACACATTAGATCTCGGCACCAATTG
GCGCGAGTTAAGGATCCGTATTTGCAATAAGTTTTCTGTATGGTCTATTTGTAAATA
TGTTATCTAAAGGGTCCAAAGTATAAAAAAAATCCACGTTTAAGCCACATCTACTCA
TCTAGAAATACTCAATGACGCAAAAAGCAAATTAGATCAATCCTTATTTTGAGACCCA
AATACTATTTTTTAACCACTAAGTTGAATTGAATATCTTATCACCATGCGCCTGCC
AGCCCTCATTCCACATGAATCTTCTGATCCTTAGAGAAAAAATGAATTTGTTTCATG
CACTGCTCACGTGAGAGTCTTGGTCATACACCACTAATCCTTCTGCTCACTTGGTA
AATTAAGGTTGAAACGGAATGCCTCATGCATGGAGACCAACCTCTCCTTTTCGT
CTGCCCTTAGTAGTGGTCTAGCAACTTTAGTTGTTTTTCTTGGTTCCGAGCGAGA
GCGAGTTAGCTAAcgtcaCAAGCTAAGCTACTGATCAAGATTATTATGCACGCTTGCC
CCCCTAAGTTCTAACACTAATGCTAGCTAAAGAAGTAAGATTTGCTGTGATCG
GGAGATGCTACCGGACAAGTGATTTGTTTCTTGGTTAGCTTATAATTTTGGCGATTTT
TGATACTACATCCGGGGCGGATCTATGAAAGGTTAGCTAGAGAGTTCTAAAAAAC
TATACAAAATATAGTACCTCTTTAATGGACGTATGACAAAATTTTAGTGAGGCTCT
ATGGGGCTCCTATAGTTGCAACACCAATAAGGGGCTCGAGACCTCAGAGCCCTA
TGGTGGATCCGCCAACATCCATTTGCAGATATTTAGCAATATATTTTTTTACTGTTT
CACTTTGGCCATTAACATTTTTAACTACAATGTCTCTATTAAGATCTTATTTTTTAT
CCGACGTTGGTTAGTTCAAACATCAAATAAAAAATAGAGGGAGTATTTAATATG
ATTTCAAAcgtcaTTTCATCCCGTGGACAAATATAACTTCGGTCAATAACACTAGC
AAAAACAATAAAAAGTTGTACTACTAGATTCCAAACCCTTTGCAAATTAATTCAAG
GAACAAGATTTCTTTCCCATGAGTAACCAATCCCTGTAACCTTTGTTAGAGCAAGT
TTAATAGTATAGCCAACACTACTAGTTCAATTTATCTATAGCCAATCTAGTAGCTCATT
CATACAATAGTTACATACTACACTATTAATATATTATCCACCTGTCATACACACACCA
CGTTTTGGAGTCCGTGCTACAGCTGGCTATAAATCTGTAGCCTGCTAATCTTCTCTC
ACCTCATTTATCTTCTTAAATATGTTTGCAGCTGGTTATAGCCTGCTATTATACATG
CTCTTAGACGGTTGACCTTTTTCTTGTGGGAATCGTGAGGCAGATGGTGGAGAGA
TCTGCCGTTTACTTTGATCCCAAGGTCAAACACACACACAAGCTTGGCCCACCACT
CCACCACCTGGGTGGTAGCCAGTGTTCTGCTCGGCCAGAAATCGATGCAGCCAGC
AAGTGCAATGCAAGCTCCCCACAATTATTGCTCCGATACTCAATCGCCATCTGC
GAAATGCTGTGCTGTTCTGCTACGAGCGAGAGAGAGAAATCTCATCTCGATGCT
GAACAAGTAATTTTCCCGGTTCTGAATCCGTTCAATCATCCAGGAA

_____. 脱落酸响应元件 (ABRE); ☐. 抗病相关的真菌诱导响应元件 (Box-W1); ☐.

乙烯响应元件 (ERE); ☐. 干旱诱导的 MYB 结合位点 (MBS); 胚乳表达
所必需的顺势作用调节元件 (Skn-1_motif); 小写字母. 茉莉酸甲酯响应的顺式调节元
件 (CGTCA-motif); 光响应元件 (GAG-motif); - - - - . 光响应元件
(BOX-4); _____. TATA-box; ☐. CAAT-box.

_____. Cis-acting element involved in the abscisic acid responsiveness (ABRE); ☐. Fungal elicitor
responsive element (Box-W1); ☐. Ethylene-responsive element (ERE); ☐. MYB Binding
Site (MBS); Cis-acting regulatory element required for endosperm expression (Skn-1_motif);
Lowercase. Cis-acting regulatory element involved in the MeJA-responsiveness (CGTCA-motif);
Part of a light responsive element (GAG-motif); - - - - . Part of a conserved DNA module involved in light
responsiveness (BOX-4); _____. Core promoter element around -30 of transcription start (TATA-box);
☐. Common cis-acting element in promoter and enhancer regions (CAAT-box).

图 4 rTGA4 转录因子启动子序列分析

Fig. 4 Sequence analysis of rTGA4 transcription factor promoter

1.5 拟南芥转化和转化株的分子检测

含有阳性克隆的农杆菌菌液 20 μ L 加入到 5 mL
的液体 LB (含卡那霉素 50 mg/L 利福平 50 mg/L)

培养基中 28 $^{\circ}$ C、130 r/min 培养 24 h。转接到 250 mL
的 LB (含卡那霉素 50 mg/L 利福平 50 mg/L) 液体
培养基中 28 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养 24 h, 至 OD 达到

0.8 ~ 1.2 μ 200 r/min 离心 10 min 弃上清, 用 10% 的蔗糖重悬菌体, 再次 6 200 r/min 离心 10 min 弃上清, 将菌体重悬于等体积 (250 mL) 的 10% 的蔗糖溶液中, 加入 0.02% 的 Silwet-70, 用花序侵染法^[9]转化拟南芥, 收获种子, 在含有潮霉素抗性 (25 mg/L) 的 1/2 MS 培养基上筛选, 获得抗性植株。以抗性拟南芥植株叶片 DNA 为模板, 以 P3 (R) 和 P4 (F) 为引物, 进行 PCR 扩增。

1.6 GUS 组织化学染色

参照 Jefferson 方法^[10]进行 GUS 组织化学染色, 取苗期及开花期的阳性拟南芥植株 (22 °C, 16 h 光照) 进行 GUS 染色 (100 mmol/L 磷酸盐缓冲液 (pH 值 7.2), 0.5 mmol/L 高铁氰化钾, 0.5 mmol/L 亚铁氰化钾, 10 mmol/L X-gluc (5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D-葡萄糖苷), 0.1% Triton X-100 (聚乙二醇辛基苯基醚)) 37 °C 过夜, 75% 乙醇脱色后, 在体式镜 (Nikon DIGITALCAMERA Dxm 1200F) 下观察。

2 结果与分析

2.1 启动子克隆

用引物 P1 和 P2 扩增水稻突变体 HX-3 基因组 DNA, PCR 产物约 1 900 bp (图 2)。测序结果显示目的条带大小为 1 995 bp, 该片段与日本晴基因组序列 (登录号: emb1 AL606657.4) 仅有 94% 的相似性, 在 2 个位置分别出现 28, 19 bp 的插入 (图 3)。

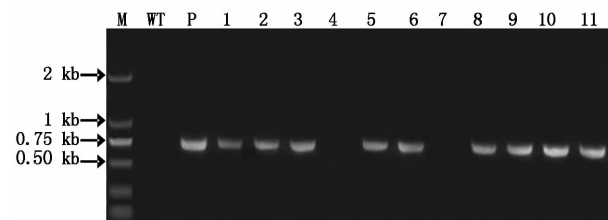
2.2 TGA 转录因子启动子的序列特征

用 PLACE Signal Scan program 和 PlantCARE 软件分析启动子序列, 发现序列中含有 CAAT-box、TA-TA-box 等启动子区域特征元件。进一步分析表明, 该启动子区域还含有脱落酸响应元件 (ABRE), 乙烯响应元件 (ERE), 茉莉酸甲酯响应的顺式作用元件 (CGTCA-box)。抗病相关的真菌诱导响应元件 (Box-W1)。干旱诱导的 MYB 结合位点 (MBS), 与胚乳表达相关的顺式作用元件 (Skn-1_motif), 以及一些光响应元件 (Box4、GAG_motif) 表明该启动子可能与植物抗病、抗旱等功能有关 (图 4)。

2.3 转基因植株的获得和 rTGA4 启动子的特征分析

通过 PCR 扩增鉴定, 共获得 9 株转基因植株 (图 5)。对获得的 T₁ 转基因植株进行 GUS 染色, 发现在苗期时, pTGA 驱动 GUS 基因仅在幼苗根尖表达, 表明其为一个组织特异性启动子; 而在成熟期时, 在拟南芥根、茎节、叶脉、柱头、花药与花丝的连接处以及果荚背缝线中都能检测到 GUS 活性, 在其他组织或器官中未见表达 (图 6), 表明该启动子同时表现出发

育调节的特性。



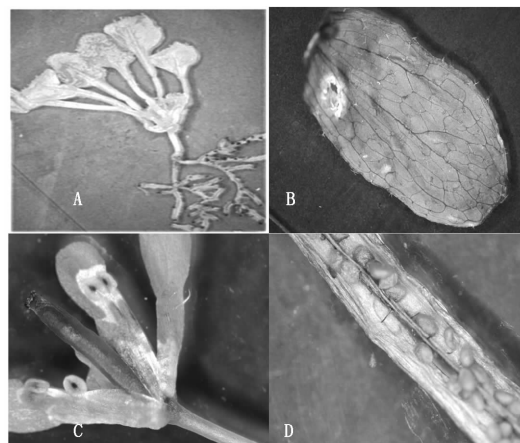
M. DL2000 DNA Marker; WT. 野生型; P. 阳性质粒; 1 ~ 11. 再生植株。

M. DL2000 DNA Marker; WT. Wild type;

P. Positive plasmid; 1 ~ 11. Regeneration plants.

图 5 转基因拟南芥 PCR 鉴定结果

Fig. 5 The result of transgenic *Arabidopsis* by PCR analysis



A. GUS 在苗期根尖表达; B. GUS 在成熟期叶脉表达; C. GUS 在柱头、花药与花丝的连接处表达; D. GUS 在果荚背缝线有表达。

A. GUS expression in root tip of seedling; B. GUS expression in leaf vein of rosette; C. GUS expression in stigma the joint of anther and thrium; D. GUS expression in dorsal suture of the fruit pod.

图 6 rTGA4 转录因子启动子驱动的 GUS 基因在转基因拟南芥中的表达

Fig. 6 Expression of GUS chimeric gene driven by the promoter of rTGA4 in transgenic *Arabidopsis*

3 讨论

本研究以水稻突变体 HX-3 为材料, 获得了 rTGA4 转录因子上游大约 2 000 bp 的启动子片段, 序列分析显示该片段含有典型的 TATA-box、CAAT-box 等基本转录元件, 此外, 还含有脱落酸响应元件, 乙烯响应元件, 茉莉酸甲酯响应的顺式作用元件, 赤霉素响应元件, 抗病相关的真菌诱导响应元件等。此外该启动子序列中还含有干旱诱导的 MYB 结合位点以及光响应元件等, 说明该启动子很可能与逆境调控相关。序列分析之后, 构建含有 GUS 报告基因的植物表达载体 pTGA-GUS, 并对转基因植株进行 GUS 染色, 发现在苗期时, 该启动子主要在拟南芥的根部特异表达, 而在成熟期拟南芥的多个组织中都检测到了 GUS 活性, 表明 pTGA 是受生长发育阶段调控的组织特异性启动子。Klinedinst 等^[11]研究发现, 烟草的 TGA 1a 基因只在根尖的分

生组织特异表达,并认为分生组织中高浓度的 TGA 因子有助于植株应对高速分裂细胞产生的氧化应激反应^[12]。本研究结果与其一致。TGA1 和 TGA4 属于第 1 类 TGA 转录因子,拟南芥 *tga1-1 tga4-1* 双突变体对假单胞菌属致病菌 *Pseudomonas syringae*^[13] 和卵菌 *Hyaloperonospora arabidopsidis* 更敏感^[14]。说明这类 TGA 转录因子在抗病反应中起了关键作用。通过对 rTGA4 启动子的特征研究为进一步克隆 HX-3 中的抗性基因以及利用奠定基础。另外,rTGA4 启动子具有器官和发育表达特性,对此,可以有针对性地利用该启动子,为转基因育种研究提供工具。

参考文献:

- [1] Katagiri F, Seipel K, Chua N H. Identification of a novel dimer stabilization region in a plant bZIP transcription activator [J]. Molecular Cell Biology, 1992, 12: 4809 – 4816.
- [2] Kesarwani M, Yoo J, Dong X. Genetic interactions of TGA transcription factors in the regulation of pathogenesis-related genes and disease resistance in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology 2007, 144: 336 – 346.
- [3] Jakoby M, Weisshaar B, Droge-Laser W, et al. bZIP transcription factors in *Arabidopsis* [J]. Trends Plant Science 2002, 7: 106 – 111.
- [4] Fitzgerald H A, Canlas P E, Chern M S, et al. Alteration of TGA factor activity in rice results in enhanced tolerance to *Xanthomonas oryzae* pv. *Oryzae* [J]. Plant J, 2005, 43 (3): 335 – 347.
- [5] 高东迎, 许志刚, 陈志谊, 等. 体细胞突变体 HX-3 抗水稻白叶枯病基因的鉴定 [J]. 遗传学报, 2002, 29(2): 138 – 143.
- [6] 李美玲, 严成其, 陈剑平, 等. 同源序列法克隆植物抗病基因研究进展及其在野生稻中的应用 [J]. 生物技术通讯, 2010, 21: 126 – 129.
- [7] Prestridge D S. SIGNAL SCAN: A computer program that scans DNA sequences for eukaryotic transcriptional elements [J]. Cabios, 1991, 7: 203 – 206.
- [8] Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, et al. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database [J]. Nucleic Acids Research, 1999, 27: 297 – 300.
- [9] Clough S J, Bent A F. Bent Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium* mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. The Plant Journal, 1998, 16(6): 735 – 743.
- [10] Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants: the *gus* gene fusion system [J]. Plant Molecular Biology Report, 1987, 5: 387 – 405.
- [11] Klinedinst S, Pascuzzi P, Redman J, et al. A xenobiotic-stress-activated transcription factor and its cognate target genes are preferentially expressed in root tip meristems [J]. Plant Molecular Biology, 2000, 42: 679 – 688.
- [12] Zhang B, Singh K B. Ocs element promoter sequences are activated by auxin and salicylic acid in *Arabidopsis* [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1994, 91: 2507 – 2511.
- [13] Kesarwani M, Yoo J, Dong X. Genetic interactions of TGA transcription factors in the regulation of pathogenesis-related genes and disease resistance in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiology, 2007, 144: 336 – 346.
- [14] Shearer H L, Cheng Y T, Wang L, et al. Arabidopsis Clade I TGA transcription factors regulate plant defenses in an NPR1-independent fashion [J]. Molecular Plant Microbe Interaction, 2012, 25(11): 1459 – 1468.