

拟南芥逆境胁迫诱导表达基因 rd29A 启动子的克隆与序列分析

吴梅花, 张 丽, 牛一丁, 方天祺, 哈斯阿古拉

(内蒙古大学 生命科学院生物工程中心, 内蒙古自治区牧草与特色作物生物技术重点实验室, 内蒙古 呼和浩特 010021)

摘要:以拟南芥基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增得到逆境胁迫诱导表达基因 rd29A 的启动子片段, 将其克隆到 pUC19 质粒中进行序列分析。结果表明, 获得的启动子片段大小为 937 bp, 与已报道的该启动子序列比较, 其核苷酸序列同源性为 99.8%。

关键词:拟南芥; rd29A; 启动子; 抗逆基因

中图分类号:S637.01 **文献标识码:**A **文章编号:**1000-7091(2005)02-0005-03

Cloning and Sequencing of the Promoter of Stress-inducible Gene rd29A from *Arabidopsis thaliana*

WU Mei-hua, ZHANG Li, NIU Yi-ding, FANG Tian-qi, Hasi Agula

(Center of Biotechnology, College of Life Science, Inner Mongolia University, Inner Mongolia Key Laboratory of Herbage and Endemic Crop Biotechnology, Huhhot 010021, China)

Abstract: The promoter of the rd29A gene was amplified from *A. thaliana* (Columbia ecotype) genome by polymerase chain reaction and cloned into pUC19 vector. Sequence analysis showed that the obtained promoter fragment contained 937 nucleotides and showed sequence homology of 99.8% with the reported rd29A promoter.

Key words: *A. thaliana*; rd29A; Promoter; Stress-inducible gene

植物在干旱、高盐、低温等逆境条件下发生一系列生理生化及发育方面的应答反应来减少逆境对其细胞的损伤, 并且某些基因表达也将产生相应的变化^[1]。最近, 人们从研究中发现了许多逆境胁迫诱导表达基因, 并从模式植物拟南芥中鉴定克隆出 9 个独立的干旱胁迫诱导表达基因 RD (Responsive to Dehydration)^[2]。其中, rd29A 基因的表达受干旱、高盐、低温等逆境的胁迫诱导。

启动子是结构基因 5' 端上游与 RNA 聚合酶及一些反式作用因子结合的区域, 是供 RNA 聚合酶识别、结合^[3], 并确保转录精确而有效地起始的一段 DNA 序列, 其结构直接关系到转录的效率^[4]。因此启动子中会含有一些决定基因表达频率和特异

性的元件。研究表明, rd29A 基因启动子区域内含有两个与逆境胁迫应答有关的 DRE (dehydration-responsive element) 顺式作用元件。

按照各种基因表达特性的不同, 其启动子分为组成型、诱导型及特异性启动子。过去, 在转基因植物研究中, 一个组成型高效强启动子花椰菜花叶病毒 (CaMV) 35S 启动子应用较广。但是 35S 启动子调控其下游基因的组成型在某些情况下高表达, 这使得转基因植株的生长受到阻碍。近来, 诱导型 rd29A 启动子不仅应用于拟南芥、烟草中^[5], 还有研究者已应用 rd29A 启动子连接 GUS 报告基因, 导入水稻, 在逆境胁迫条件下, 也观察到转基因水稻植株中的 GUS 活性^[6]。鉴于上述原因, 本研究克隆

收稿日期: 2004-10-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30460058); 内蒙古自然科学基金资助项目 (200408020305)

作者简介: 吴梅花 (1973-), 女 (蒙古族), 内蒙古通辽人, 硕士, 主要从事植物分子生物学及基因工程研究工作; 哈斯阿古拉为通讯作者。

rd29A 基因启动子片段,为下一步用此启动子调控逆境胁迫诱导基因的表达,提高转基因植物抗逆性奠定基础。

1 材料和方法

1.1 试验材料

拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L., Columbia ecotype)种子由中国科学院遗传与发育研究所提供。大肠杆菌(*E. coli*)DH5 由本实验室保存。克隆载体 pUC19 购自华美生物工程公司。各种限制性内切酶、Taq DNA 聚合酶、dNTP、T₄DNA 连接酶、RNase A、IPTG、X-gal 均购自华美生物工程公司。UNIQ-10 型柱式胶回收试剂盒、UNIQ-10 型柱式 PCR 产物纯化试剂盒购自上海生工生物工程公司。

1.2 试验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取 取无菌培养的拟南芥幼苗叶片 0.1 g,用 SDS 法^[7]提取植物总 DNA。

1.2.2 PCR 扩增 根据文献报道的拟南芥 rd29A 启动子核苷酸序列^[8]设计合成 PCR 两端引物。

5 端引物 5'-GC GAATTC GCCATA GATG

EcoR

CAATTCAATCAAAC-3'

3 端引物 5'-GC GGTACC AAAGATTTT

Kpn

TTCTTTCCAA TAGAAGTAAATC-3'

以拟南芥基因组 DNA 为模板,在特异引物的作用下通过 PCR 扩增得到 rd29A 启动子片段。PCR 扩增反应条件为:94 变性 30 s,54 退火 1 min,72 延伸 2 min,共 30 个循环。扩增完毕,取 5 μL PCR 产物进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测。扩增片段用 UNIQ-10 型柱式 PCR 产物纯化试剂盒纯化。

1.2.3 rd29A 启动子片段的克隆 纯化的 PCR 产物用 *EcoR* 和 *Kpn* 双酶切,与经 *EcoR* 和 *Kpn* 酶处理的 pUC19 质粒连接。用连接物转化用 CaCl₂ 法制备的大肠杆菌 DH5 感受态细胞,在含有 Amp、IPTG 和 X-gal 的 LB 平板上挑选白色菌落,用快速提质粒法筛选出重组子。

1.2.4 重组质粒的酶切分析及序列测定 随机挑取 3 个独立的重组克隆,分别命名为 pRDP1,2,3,重组质粒用 *BamH* 和 *Xab* 双酶切,用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测,检测正确的重组质粒用 ABI 377 DNA 自动序列分析仪测定核苷酸序列。

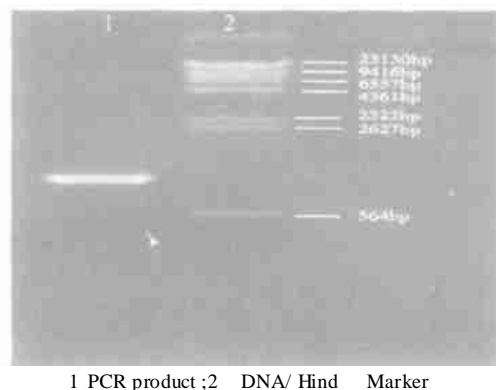
2 结果与分析

2.1 启动子片段的 PCR 扩增

PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分析,检测得到一条长约 1 kb 的特异扩增带(图 1)。

2.2 重组质粒的酶切鉴定

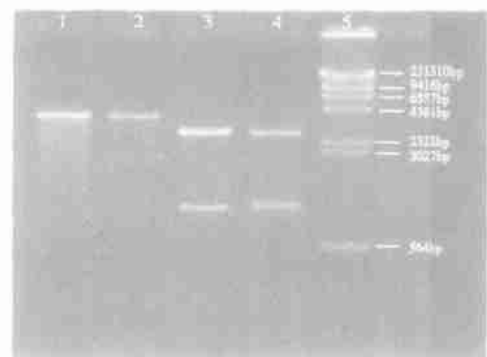
在 PCR 的两引物中设计有 *EcoR* 和 *Kpn* 双酶切位点,用这两种酶酶切可以鉴定重组质粒中的插入片段。筛选出的重组质粒经 *EcoR* 和 *Kpn* 双酶切后进行琼脂糖凝胶电泳产生 2 条带,一条带约为 2.7 kb,系为克隆载体;另一条带约为 1 kb,与 PCR 产物大小一致,系为启动子片段。再经质粒上的 *Xba* 和启动子序列上的 *Bgl* 双酶切后进行琼脂糖凝胶电泳也产生 2 条带,一条带略大于 2.7 kb,一条带略小于 1 kb。另外,分别用 *EcoR* 和 *Kpn* 单酶切后均产生大小约 3.7 kb 长的一条带。这也说明重组质粒上插入有启动子片段(图 2)。



1 PCR product; 2 DNA/ Hind Marker

图 1 rd29A 启动子 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of rd29A promoter PCR product



1 pRDP5/ *Kpn* digestion; 2 pRDP5/ *EcoR* digestion; 3 pRDP5/ *Xba* / *Bgl* digestion; 4 pRDP5/ *Kpn* / *EcoR* digestion; 5 DNA/ Hind Marker

图 2 重组质粒的酶切鉴定

Fig. 2 Restriction enzyme digestion analysis of recombinant plasmid

2.3 序列分析

为了提高序列分析精确度,随机选取了 3 个独立的克隆,分别从两端进行测序,获得了 3 个完整的 rd29A 基因启动子核苷酸序列(图 3)。其中一个

rd29A 基因启动子核苷酸序列与 Yamaguchi 等人所报道的 rd29A 基因序列比较,有 2 个核苷酸不同,其核苷酸的同源性为 99.8%。其他两个克隆则差异稍大,同源性分别为 97.3%和 96.2%。

```

GC GAATTC GC CATAGATACA ATTCAATCAA ACTGAAATTT CTGCAAGAAT CTCAAACACG GAGATCTCAA
AGTTTGAAAAG AAAATTTTATT TCTTCGACTC AAAACAAACT TACGAAATTT AGGTAGAAGT TATATACATT
ATATTGTAAT TTTTGTAAAC AAAATGTTTT TATTATTATT ATAGAATTTT ACTGGTTAAA TTAATAATGA
ATAGAAAAGG TGAATTAAAG GGAAGAAGGA GGTAAACATT TTCTTCTATT TTTTCATATT TTCAAGATAA
ATTATTGTAA AAGTTTACAA GATTTCATT TGACTAGTGT AAATGAGGAA TATTCTCTAG TAAGATCAAT
ATTTTCATCTA CTTCTTTTAT CTTCTACCAG TAGAGGAATA AACAATATTT AGCTCCTTTG TAAATACAAA
TTAATTTTCG TTCTTGACAT CATTCAATTT TAATTTTACG TATAAAATAA AAGATCATAC CTATTAGAAC
GATTAAAGAG AAATACAATT CGAATGAGAA GGATGTGCCG TTTGTATATA TAAACAGCCA CACGACGTAA
ACGTAAAATG ACCACATGGT GGGCCAATAG ACATGGACCG ACTACTAATA ATAGTAAAGT ACATTTTAGG
ATGGAATAAA TATCATACCG ACATCAGTTT TGAAAAGAAA GGGAAAAAAA GAAAAATAA ATAAAAGATA
TACTACCGAC ATGAGTTCCA AAAAGCAAAA AAAAAGATCA AGCCGACACA GACACGCGTA GAGAGCAAAA
TGACTTTGAC GTCACACCAC GAAAACA GAC GCTTCATACG TGTCCTTTA TCTCTCTCAG TCTCTCTATA
AACTTAGTGA GACCTCCTC TGTTTTACTC ACAAATATGC AAAGTAGAAA ACAATCATCA GGAATAAAGG
GTTTGATTAC TTCTATTGGA AAGAAAAAAA TCTTT GGTACC GC
  
```

图 3 rd29A 基因启动子片段的核苷酸序列

Fig. 3 Nucleotide sequence of rd29A gene promoter

3 讨论

启动子作为转录水平上的一种重要调控元件,在植物基因表达的时间及空间上受到严格的调控,并对外源基因在转化植物中的表达起至关重要的作用^[9]。近年来,高等植物基因表达调控的研究不断深入,主要集中在光调控基因、激素诱导基因、逆境胁迫诱导基因及其他一些相关基因上^[10]。其中,逆境胁迫诱导表达基因 rd29A 的启动子作为一种诱导型启动子在植物抗逆性研究中应用越来越广泛。国内外已利用 rd29A 启动子调控一些转录因子在转化烟草、拟南芥等植物中的表达,并获得了转基因植物的高度抗逆性。因此,rd29A 启动子有可能成为目前在植物抗逆性研究中适用性很强的一种逆境诱导型启动子。

本试验所克隆的 rd29A 启动子片段序列与已报道的序列具高度同源性,这为 rd29A 启动子在植物抗逆基因工程研究中的应用奠定了基础。

参考文献:

[1] Mie Kasuga, Qiang Liu, Setsuko Miura, et al. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor[J]. Nature Biotechnology, 1999, 17(3): 287 - 291.

[2] Kazuo Yamaguchi-Shinozaki, Kazuo Shinozaki. Characterization of the expression of a desiccation-responsive rd29 gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants[J]. Mol Gen Genet, 1993, 236: 331 - 340.

[3] 胡廷章. 植物基因环境效应启动子[J]. 重庆三峡学院学报, 2002, 18(5): 125 - 128.

[4] 朱玉贤, 李毅. 现代分子生物学[M]. 北京: 高等教育出版社, 1997.

[5] 孙晓红, 陈明杰. 启动子克隆概述[J]. 食用菌学报, 2002, 9(3): 57 - 62.

[6] 刘强, 赵南明, Kazuo Yamaguchi-Shinozaki, 等. DREB 转录因子在提高植物抗逆性中的作用[J]. 科学通报, 2000, 45(1): 11 - 16.

[7] 魏群. 分子生物学实验指导[M]. 北京: 高等教育出版社, 1999. 69 - 70.

[8] Kazuo Yamaguchi-Shinozaki, Kazuo Shinozaki. A novel cis-acting element in an arabidopsis gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress[J]. The Plant Cell, 1994, 6: 251 - 264.

[9] 周晓红, 陈晓光, 张晓东, 等. 番茄果实特异性 E8 启动子的克隆与序列分析[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(1): 25 - 28.

[10] 苗琛, 兰利琼, 鲍锦库, 等. 水稻精细胞基因 RSSG 58 启动子的克隆分析及表达载体构建[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2003, 40(1): 153 - 157.