

水稻 *Glu B_1* 启动子克隆及序列分析

王伟权¹, 刘 莉², 王景雪²

(1. 广州医学院第一附属医院, 广东 广州 510120; 2. 山西大学 生命科学与技术学院, 山西 太原 030006)

摘要: *GluB_1* 是水稻种子谷蛋白的编码基因, 是种子成熟过程中, 由 *GluB_1* 启动子调控, 特异地在胚乳中表达的蛋白。以水稻基因组 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增得到 *Glu B_1* 启动子片段, 将其克隆在 pGEM_T Easy 载体上进行序列分析。结果表明: 获得的启动子片段的大小为 2 293 bp, 与已报道的该启动子序列相比较, 其核苷酸序列同源性为 99.2%。该启动子区域含有 ACGT 基序、AACA 基序和 GCN4 基序等胚乳特异表达必需元件。

关键词: 水稻; *GluB_1* 基因; 启动子; 谷蛋白

中图分类号: S511.035.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2006)06-0016-03

Cloning and Sequencing of the *Glu B_1* Promoter from Rice

WANG Wei_quan¹, LIU Li², WANG Jing_xue²

(1. The First Affiliated Hospital, Guangzhou Medical College, Guangzhou 510120, China;

2. School of Life Science and Technology, Shanxi University, Taiyuan 030006, China)

Abstract: The *GluB_1* promoter was amplified from *Oryza sativa* genome by polymerase chain reaction and cloned into pGEM_T Easy vector. Sequence analysis showed that the obtained promoter fragment 2 293 nucleotides and showed homology of 99.2% with the reported *Glu B_1* promoter. Also, the obtained promoter fragment includes the three *cis*-regulatory elements, ACGT_motif, AACA_motif and GCN4_motif, which are necessary to mediate endosperm expression of the *GluB_1* glutelin gene.

Key words: *Oryza sativa*; *GluB_1* gene; Promoter; Glutelin

高等植物的种子是蛋白质、淀粉、脂肪等营养物质的重要贮藏地。贮藏种子中的蛋白质即种子贮藏蛋白贮藏在蛋白体中, 且不具有酶活性。这就为利用植物种子表达特定的蛋白质产物提供了便利条件。目前已知编码种子贮藏蛋白的基因是多基因家族, 它们在种子中的表达具有高度的发育专一性和组织特异性^[1]。谷蛋白是水稻种子的主要贮藏蛋白, 占其胚乳总量的 80%^[2]。谷蛋白由一个小的多基因编码, 在单倍体基因组中大约有 10 个基因编码谷蛋白, 其基因可以被分为 *GluA* 和 *GluB* 两个亚家族^[3]。大多数的谷蛋白基因是受 5' 上游调控序列调控, 在种子成熟过程中表达的。*Glu B_1* 启动子是目前研究较多, 调控机理较为清楚的启动子之一。本研究利用 PCR 扩增技术从水稻栽培品种中分离

Glu B_1 启动子, 旨在为构建能在禾本科植物种子中表达特定蛋白质的植物表达载体奠定基础。

1 材料和方法

1.1 供试材料和试剂

1.1.1 材料 以水稻(*Oryza sativa*) 晋稻 5 号为试验材料。种子由山西农业科学院作物遗传研究所王广元副研究员惠赠。基因克隆所用的大肠杆菌(*E. coli*) 菌株为 DH5 α , 由山西大学生命科学与技术学院保存。

1.1.2 试剂 限制性内切酶, DNA 连接试剂盒, IPTG, X_{gal}, Taq DNA 聚合酶, pMD19_T 载体等购自宝生物工程(大连)有限公司等。UNIQU_10 型柱式胶回收试剂盒、UNIQU_10 型柱式 PCR 产物纯化试剂盒

收稿日期: 2006-10-10

作者简介: 王伟权(1968-), 男, 江苏人, 博士后, 主要从事分子生物学及基因工程研究工作; 王景雪为通讯作者。

购自上海生工生物工程公司。PCR 引物合成、测序均由上海英骏生物技术有限公司完成。

1.2 试验方法

1.2.1 水稻基因组 DNA 的提取 水稻种子在 25℃ 条件下发芽。水稻幼苗长到 3~4 片叶时, 采用 CTAB 法小量提取水稻幼苗叶片基因组 DNA^[4]。

1.2.2 *Glu B_1* 启动子的分离 根据文献报道的 *Glu B_1* 启动子核苷酸序列, 设计合成 PCR 两端引物。

5' 端引物: 5'_GGGGAATTCACAGATTCTTGCTA_CCAACAAC_3' *EcoR* I

3' 端引物: 5'_GGGGATCCAGTTCAAAGACA_GACCAAGCTAG_3' *BamH* I

以水稻基因组 DNA 为模板, 在上述特异引物的作用下, 通过 PCR 扩增得到 *Glu B_1* 启动子片段。PCR 扩增反应的条件是: 94℃ 4 min; 94℃ 30 s; 55℃ 30 s; 72℃ 2 min 30 s。重复 30 个循环。最后 72℃ 延伸 10 min。扩增结束后, 取 5 μL PCR 产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳进行检测。扩增片段用 U-NIQ_10 型柱式 PCR 产物纯化试剂盒纯化。

1.2.3 *Glu B_1* 启动子的克隆 纯化后的 PCR 产物用 pGEM_T Easy Vector System II 试剂盒 (Promega, Madison, WI, USA), 将 PCR 产物连接到 pGEM_T Easy 载体上。连接产物转化用 CaCl₂ 法制备的大肠杆菌 DH5α 感受态细胞, 转化产物涂布在含有氨苄青霉素、IPTG 和 X_{gal} 的 LB 培养基平板上筛选转化子。提取白色菌落的质粒 DNA, 琼脂糖凝胶电泳检测筛选出重组子。

1.2.4 重组质粒的酶切分析及序列测定 随机挑取 5 个单克隆, 用 *Sal* I 酶酶切, 用 1.2% 琼脂糖凝胶电泳进行检测, 正确的克隆送上海英骏生物技术有限公司测序。

2 结果与分析

2.1 *Glu B_1* 启动子片段的分离

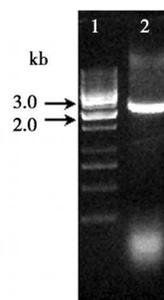
以水稻基因组 DNA 为模板, *Glu B_1* 启动子两端序列为特异引物, 用 PCR 扩增的方法, 从水稻总 DNA 中扩增 *Glu B_1* 启动子。PCR 产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳检测, 得到一条长约 2.3 kb 的特异扩增带 (图 1)

2.2 重组质粒的酶切鉴定

在 PCR 的两引物中设计有 *EcoR* I 和 *BamH* I 酶切位点。因此用这两种酶双酶切鉴定重组质粒中的插入片段。鉴定结果表明: 筛选出的重组质粒经

EcoR I + *BamH* I 双酶切后进行琼脂糖电泳产生两条带, 其中一条带约 2.3 kb, 与 PCR 产物大小相同, 为启动子片段。另一条为克隆载体片段 (图 2_A)。根据已发表的 *Glu B_1* 启动子序列, 我们发现在 *Glu B_1* 启动子中含有两个 *Sal* I 酶切位点。两个位点之间的核苷酸对为 730 bp。因此, 我们用 *Sal* I 酶切重组质粒进行鉴定, 结果得到预期的酶切片段 (图 2_B)。

以上结果说明, 得到的重组质粒带有插入片段。该重组质粒命名为 pTGluBP, 并送上海英骏生物技术有限公司测序。

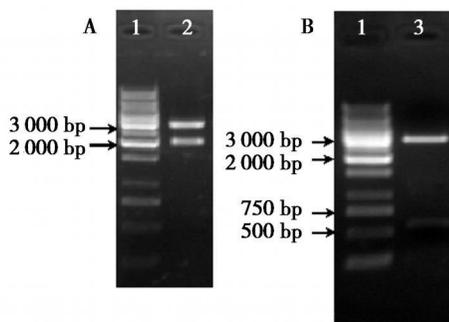


1. 分子量标记; 2. PCR 产物

1. Molecular marker; 2. PCR product

图 1 *Glu B_1* 启动子 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 Agarose gel electrophoresis of *Glu B_1* promoter PCR product



1. Molecular marker; 2. pTGluBP/ *EcoR* I + *BamH* I digestion;

3. pTGluBP/ *Sal* I digestion

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

测序结果表明: PCR 扩增到的 *Glu B_1* 启动子片段全长是 2 293 bp, 与已发表的 *Glu B_1* 启动子序列 (AY427569)^[5,6] 相比较, 核苷酸的同源性达到 99.2%。将测序结果输入 PlantCARE 数据库^[7], 检索结果表明: 克隆到的 *Glu B_1* 启动子核苷酸序列中含有启动子区域的特征元件 TATATA_{box}^[8]。同时还含有在胚乳中特异表达所必需的正调控元件

ACGT 基序、ACA 基序和 GCN4 基序^[9-12] (图 3)。

以上结果说明, 所得到的 *Glu B 1* 启动子含有 RNA 聚合酶 II 识别位点、启动子区域的特征元件以及种子特异表达所必需的特征元件, 具备有控制基因在种子中特异表达的能力。

```

ACAGATTCTTGCTACCAACAACCTTCACAAAGTAGTAGTCAACCAAACTATGCTAAGGAATCACCTCACTTC
CGCCCATGACCGGTGAGCAGCACTGTTCAACAGTTTGTATCTCTACAAAGATGACACTTACCTACAC
AACCGCCATAACTGCTAGTTACCCAGCCCATGCAAAATAGCCACGCTTGTGACTTAAGGGGATTTCGGCGACA
AGGCATTTCGAAAGCCACACAAGGACCACTTATGAAAATGGAAGGGTCCCAACAGCAACAAACAAGTTA
GGTCCCAACCACTGTTGTCAGGAAAAATCCAAGGGTCTCCCAACACCCCAAGCAAAATCACTGTC
TCCATTTGGCATAAAGATTGGCTGACCTAGCTAATTACTCAGCCAGGCATGTCAAAATCAACCACTGTTGTC
ACACATGTTAGTTGGAGAAATTTAAAGAAAAGGAATCGTCCATATGAGCAAGAAGCAGAAACCAATACC
ACCAGTACTTCTACCGAAATACGAGTTTGTAACTCATTTTTCGAAAGCAACCCGACCGGTTGTCGGG
GTTTTCCAGGGATTGTTAAACCAAGTTTACCCTAGTTGATGATTCATTAATTTGAGGAGGCATGTTGTT
ATCCGCTACTGAGGGCAAGAATACTGAGACCTGATGTTAGTTCGACCAAGGAGGTTAATGCGAGCAATGT
AGGTGGGGCTGTGTTGTTATATGCAACCTGCGGCAACATTTCAATGTTAAATTAAGAGATGTGCAATTTTGA
GAAATGAAATCTAGTTTCAAAATATGGCTCAAAATCAAAAGGTGACCTACCTTGTGATATCTTTCAG
CTTCTTCTCGTATTCGGCGCATGAGCACTTCTTGGCTCGGAAGCTACACCTGGAACGAGATAACTCAAC
AAAACGCAACGAAAGGCTCGTATTAGTAGTACTAGTGTCCACTAGATATGATCTCGATTTTGTAGGA
ATTTTAGAAGTTGAAACAGAGTCAATGAAACAGACAGTTGAAGAGATATGGATTTTCAAGATTAATGATTTC
TCTGTCTAAAGAAAAAAGTATTATTGAATTAATGAAAAAGAAAAAGGGGATGGCTCTGCTGCT
TTTTGGGCTGAAGCGGCTGTGGCCAGCTGCTGCGTGGCCACAGCGGCAACACACAGCGGAGCAGC
TACGACGACGGGGACCGAGTGGACGGACGAGGATGGCTTAGGACGAGTGCACAAGGCTAGTGGAC
TCGGTCCCGCGGTATCCCGAGTGTCCACTGCTGCAACACGATTACATAGACCGGAGCAGCGG
GGAGCGCTCTAGGTGACCGGGAAGCAAAATCGTCCGCTGGTGGTGAATTTGAGTACACGGCCCAAGTGA
GCCTCACAGCTCCCGTGGTACAGATGTGAAAAATATCATAATATGTTTTCAAATAGTTAAATAATA
TATAGGCAAGTTATATGGTCAATAAGCAGTAAAAAGGCTTATGACATGGTAAATTACTTACCACAATATG
CCTTACTGCTCGATATATTTTACATGACAACAAGTTTACAAGTACGTCATTTAAAAATACAGTTACTTATCA
ATTGATGTTATCAAGTAAATGACAACAACCTACAAATTTGCTATTTTGAAGAACACTTAAAAAATCAA
TAGGCAAGTTATATGCAATAACTGCAAGAAAGGCTTATGACATGGAAAAATACATACCACAATATGCTT
TAATTCGGGTATTTTCAAGACAACAAGTATAAGTATGTCATTTAAAAAACCAAGTACTTATCAAT
GTCAAGTAAATGAAAAACCACTACAAATTTGTTATTTTGAAGAACCACTAAATATCAAAATATAGCTTGC
TACGCAAAATGACAACATGCTTACAAGTATTATCACTTAAAGTTAGACTCATCTTCTCAAGCATAAAGCG
TTTATGGTCAAAAAACAAATAATGACAAGGCAAGATACATACATATAAGAGATGGATAGACATTTCT
TTAAACAAAACCTTATTTGTTATTACTCCAAAAGCAACGAAAGTTTGTGATGGCTGAGTCAAGAAATGATAGTT
CAATCTTGAAGATTTGCTTCTTCTTTGTAAGTGTGTTTAACTACAAGCCATATATGTTGCTAGCTGGCA
CAAACTATATCACCATGATCCCAAGATGCTTTTTTATGCTATATAAAGTACTGCTGCTGCTTTGAACTC
ACATCAATTAGCTTAAGTTTCCATAAGCAAGTACAAATAGCT
    
```

图 3 *Glu B 1* 基因启动子序列分析结果

Fig. 3 Nucleotide sequence of *Glu B 1* gene promoter

3 讨论

利用植物转基因技术不仅能够选育抗病、抗虫、抗生物逆境等作物新品种, 还能够特异地表达人类所需要的蛋白质。近年来利用转基因植物表达医用等蛋白已经引起了人们的注意^[13]。因此, 组织特异性启动子将会在今后的基因工程研究中起到重要作用。Qu 等分析了包括 *Glu B 1* 启动子的 15 种水稻种子贮藏蛋白启动子, 证明 *Glu B 1* 启动子是在胚乳中特异表达, 并具有相对较高的启动子活性^[5]。Takagi 等利用 *Glu B 1* 启动子成功地在水稻中表达了鼠源 T 细胞表位抗原^[14]。

本研究利用 PCR 扩增的方法, 从栽培水稻中扩增到 *Glu B 1* 启动子, 序列分析的结果说明, 该序列与已经发表的序列同源性高达 99% 以上, 其个别碱基的突变可能是由于我们所用的品种不同所致。同时该序列中含有启动子特征序列和胚乳表达的必需元件。因此, 克隆到的 *Glu B 1* 启动子可以用于进一步的植物转基因和分子生物学研究。

参考文献:

- Bevan M, Colot V, Hammond-Kosack M, et al. Transcriptional control of plant storage protein genes [J]. *Biological Sciences*, 1993, 324: 209-215.
- 魏琦超, 周 蕾, 杨贤松, 等. 种子贮藏蛋白的基因启动子及其应用研究概述 [J]. *河南农业科学*, 2005, (12): 10-13.
- Takaiwa F, Yamanouchi U, Yoshida H, et al. Characterization of common cis-regulatory elements responsible for the endosperm-specific expression of members of the rice glutelin multigene family [J]. *Plant Mol Biol*, 1996, 30: 1207-1221.
- Tai T H, Tanksley S D. A rapid and inexpensive method for isolation of total DNA from dehydrated plant tissue [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1990, 8: 297-303.
- Qu L Q, Takaiwa F. Evaluation of tissue specificity and expression strength of rice seed component gene promoters in transgenic rice [J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2004, 2: 113-125.
- Masumura T, Kidzu K, Sugiyama Y, et al. Nucleotide sequence of a cDNA encoding a major rice glutelin [J]. *Plant Molecular Biology*, 1989, 12: 723-725.
- Rombauts S, Dehais P, Van Montagu M, et al. PlantCARE, a plant cis-acting regulatory element database [J]. *Nucleic Acids Res*. 1999, 27(1): 295-296.
- 李一琨, 王金发. 高等植物启动子研究进展 [J]. *植物学通报*, 1998, 15(增刊): 1-6.
- Yoshihara T, Washida H, Takaiwa F. A 45-bp proximal region containing AACA and GCN4 motif is sufficient to confer endosperm-specific expression of the rice storage protein glutelin gene, *GluA_3* [J]. *FEBS letters*, 1996, 383(3): 213-218.
- Washida H, Wu C, Suzuki A, et al. Identification of cis-regulatory elements required for endosperm expression of the rice storage protein glutelin gene *GluB_1* [J]. *Plant Molecular Biology*, 1999, 40: 1-12.
- Zhao Y, Leisy D J, Okita T W. Tissue-specific expression and temporal regulation of the rice glutelin *Gt3* gene are conferred by at least two spatially separated cis-regulatory elements [J]. *Plant Mol Biol*, 1994, 25: 429-436.
- Wu C Y, Suzuki A, Washida H, et al. The GCN4 motif in a rice gene is essential for endosperm-specific gene expression and is activated by *Opaque_2* in transgenic rice plants [J]. *The Plant Journal*, 1998, 14: 673-683.
- Strefield S J, Jilka J M, Hood E E, et al. Plant-based vaccines: unique advantages [J]. *Vaccine*, 2001, 19(17-19): 2742-2748.
- Takagi H, Hiroi T, Yang L, et al. A rice-based edible vaccine expressing multiple T cell epitopes induces oral tolerance for inhibition of Th2-mediated IgE responses [J]. *PNAS*, 2005, 29: 17525-17530.