

拟南芥 *AtHAK5* 基因启动子顺式作用 元件功能域的鉴定

王 欣 杨 菊 祁 智 张彦桃

(内蒙古大学 生命科学学院 内蒙古 呼和浩特 010021)

摘要: 为鉴定 *AtHAK5* 启动子中的功能域,并进一步确定对应的转录因子。将 *AtHAK5* 编码拟南芥高亲和性钾转运体 6 个不同长度的启动子片段克隆到双元表达载体 pORE R1 中 β -葡萄糖醛酸酶(*GUS*) 报告基因的上游,构成 *promoter AtHAK5::GUS* 融合基因。通过农杆菌侵染野生型拟南芥花序,得到稳定表达该融合基因的 T3 转基因种子。通过基于 *GUS* 活性的组织化学染色法,对这些来自 T3 转基因种子、经过低钾处理的幼苗进行分析,确定 *AtHAK5* 启动子中感应低钾环境的顺式作用元件位于起始转录上游 -471 ~ -267 范围内。

关键词: 拟南芥; *AtHAK5* 基因; 启动子; 顺式作用元件

中图分类号: S634 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2013)06-0093-05

Identification of Cis-element Location in *AtHAK5* Promoter

WANG Xin, YANG Ju, QI Zhi, ZHANG Yan-tao

(College of Life Sciences, Inner Mongolia University, Huhhot 010021, China)

Abstract: *AtHAK5* encodes a high affinity K^+ transporter. Six *AtHAK5* promoter fragments with different length were cloned into the upstream of β -Glucuronidase reporter gene(*GUS*) in pORE R1 binary expression vector, which forms *promoter AtHAK5::GUS* fusion gene. The T3 generation transformed seeds stably expressing the fusion gene were gotten through *Agrobacterium*-mediated *Arabidopsis* transformation with floral dip method. The cis-elements of the *AtHAK5* promoter was located at the transcription region of 471 -267 through *GUS* activity based histochemical staining of the transformed seedlings grown on low potassium condition. This study identified the functional domain within the *AtHAK5* promoter, which sets the foundation for further finding of the corresponding transcript factor.

Key words: *Arabidopsis*; *AtHAK5* gene; Promoter; Cis-element

钾是植物生长和发育所必须的大量营养元素之一,占植物干质量的 0.8% ~ 8.0%。钾在植物细胞基质中的含量 80 ~ 200 mmol/L^[1],在酶活性功能、渗透调节、气孔运动和维持细胞膜电势平衡方面发挥重要作用^[2]。我国是钾资源严重缺乏的国家之一,目前为了解决这一问题,除了在矿产技术方面加大对钾盐资源的开发以外,培育高效吸收利用钾肥的新型植物是植物育种的任务之一。

植物根系对 K^+ 吸收是通过 2 个不同的系统进行的,分别称为高亲和性 K^+ 运输系统和低亲和性 K^+ 运输系统。高亲和性 K^+ 运输系统在外界 K^+ 浓度低(0.001 ~ 0.200 mmol/L)的条件下起作用,低

亲和性 K^+ 运输系统在外界 K^+ 浓度高(1 ~ 10 mmol/L)的条件下起作用^[3]。Santa-Maria 等^[4]鉴定出了植物 K^+ 转运体的 KUP/HAK/KT 家族,并证实 KUP/HAK/KT 转运体家族是高亲和性钾吸收转运体。Gierth 等^[5]利用基因芯片技术研究低钾条件下基因的表达情况,发现 *AtHAK5* mRNA 表达量相对于其他基因有显著升高。对含有 *promoter AtHAK5::GUS* 及 *promoter AtHAK5::GFP* 融合基因的拟南芥转基因植株进行组织化学染色及共聚焦分析证实 *AtHAK5* 基因在拟南芥根中表达,主要定位于主根的表皮和中柱细胞及侧根的表皮细胞中。同时他们对 T-DNA 插入突变体 *athak5* 分析表明, *AtHAK5* 是介导高亲

收稿日期: 2013-06-08

基金项目: 内蒙古自治区科技厅自然科学基金面上项目(2010MS0312)

作者简介: 王 欣(1984-),女,内蒙古包头人,硕士,主要从事生化与分子生物学研究。

通讯作者: 张彦桃(1975-),女,内蒙古呼和浩特人,助理研究员,在读博士,主要从事生化与分子生物学研究。

和性钾吸收系统的主要组成成分。本研究通过确定 *AtHAK5* 启动子中感应低钾环境的顺式作用元件的功能区域,为下一步利用酵母单杂交技术鉴定在低钾条件下调节 *AtHAK5* 基因表达的转录因子奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 植物材料

拟南芥哥伦比亚野生型种子 (Col-0),内蒙古大学植物信号转导实验室保存。

1.2 菌种和质粒

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101 为本实验室保存;T/A 克隆载体 pEASY-T1 simple vector 购自北京全式金公司;表达载体 pORE R1 (STOCK: CD3-929) 菌株购自拟南芥资源中心 ABRC (*Arabidopsis Biological Resource Center*)。

1.3 主要酶及试剂

TranSTAR DNA 聚合酶、*TransZol UP* 购自北京全式金生物技术有限公司; *ExTaq* 聚合酶、*DNase I*、感受态细胞提取试剂盒、限制性内切酶、反转录试剂盒购自大连宝生物工程有限公司; T4 DNA 连接酶

为 Promega 公司产品;质粒提取试剂盒、胶回收试剂盒购自天根生化有限公司;其余试剂均为国产分析纯试剂。

1.4 CK 培养基

大量元素: 0.50 mmol/L H_3PO_4 , 2.00 mmol/L $Ca(NO_3)_2$, 1.00 mmol/L KCl, 0.75 mmol/L $MgSO_4$; 微量元素: 5.0 μ mol/L H_3BO_3 , 1.0 μ mol/L $MnCl_2$, 2.0 μ mol/L $ZnSO_4$, 0.1 μ mol/L $CuSO_4$, 0.5 μ mol/L Na_2MoO_4 ; 铁盐: 74 μ mol/L $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 74 μ mol/L $Na_2 \cdot EDTA \cdot 2H_2O$, 5 mmol/L MES (MES hydrate), 1% 蔗糖, BTP (BIS-TRIS propane) 调 pH 值至 5.8, 1.0% 琼脂糖。

1.5 方法

1.5.1 含有 promoter *AtHAK5*: : pORE R1 双元表达载体的构建 避开了所有 *AtHAK5* 启动子区域内潜在的转录因子结合位点,以相同的下游引物 (pR) 及各自的上游引物 (表 1),扩增了 6 个不同长度的 *AtHAK5* promoter 产物片段,每个片段长度差为 200 碱基左右。分别克隆于 pEASY-T1 simple vector,测序正确的质粒酶切后连接表达载体 pORE R1,获得含有 promoter *AtHAK5*: : *GUS* 融合基因的双元表达载体 promoter *AtHAK5*: : pORE R1。

表 1 本试验所使用的引物

Tab. 1 Primers used for this study

引物名称 Name of primers	序列 (5'→3') Sequences (5'→3')	用途 Purpose
p267	ACCGGATCCATTCGGAAGATGTTCTACGTAC	267 promoter
p471	ACCGGATCCTACCATCATTAGTTTACTTTGC	471 promoter
p611	GGATCCTTGTCAGATATCTTAAATAG	611 promoter
p821	ACCGGATCCACATGTAGCCGTTACACAGAC	821 promoter
p982	ACCGGATCCTGGATATGTATGAACCCTCT	982 promoter
p1172	ACCGGATCCAGATTAGCTAATTGGTACAAAATCG	1172 promoter
pR	ACAGCGGCCGCGTTTTTAACCTCTTCTTTTGCC	启动子下游引物

1.5.2 含有 promoter *AtHAK5*: : *GUS* 融合基因的转基因 T3 纯合体的获得 含有 promoter *AtHAK5*: : *GUS* 融合基因的农杆菌菌株侵染野生型拟南芥,将获得的 T1 杂合种子在含有卡那霉素的抗性培养基上进行筛选,长出 4 片真叶的植株为杂合体 (Aa),单株收种得到 T2 种子。利用卡那霉素的抗性培养基筛选会发生 (AA: Aa): 死 (aa) = 3: 1 的分离。收获的 T3 种子在含有卡那霉素抗性培养基上筛选单基因纯合突变体 (AA)。

1.5.3 转化植株的组织化学染色检测 将收获后的 T3 种子播种于 CK 培养基 (1 mmol/L KCl) 上,竖直光照培养 8 d (根长 2 ~ 3 cm)。将竖直培养的苗子从 CK 培养基转至低钾诱导培养基 (50 μ mol/L

KCl) 48 h 后进行组织化学染色。

2 结果与分析

2.1 *AtHAK5* promoter 潜在转录因子结合位点预测

选取 *AtHAK5* 基因上游 1 249 碱基的启动子区域,通过 PlantCARE (植物启动子数据库) 分析潜在的转录因子结合位点 (图 1)。

利用 plantCARE 数据库得出该启动子区域内潜在的转录因子结合位点 (图 1 中方框序列)。表 2 为该启动子区域内可能存在的 13 个上游元件或应答元件,除了真核生物常有的普通顺式作用元件 CAAT-box 和 TATA-box 外,还有 4 个参与光反应的应答元件 (ACE、Box4、GAG 和 Box I),1 个乙炔响

应元件(ERE) 、1 个生长素响应元件(AuxRR-core) 、 (ABRE) 、1 个分生组织表达元件(CAT-box) 和 2 个 1 个茉莉酸响应元件(CGTCA) 、1 个 ABA 响应元件 干旱诱导的应答元件(MBS 和 ABRE) 。

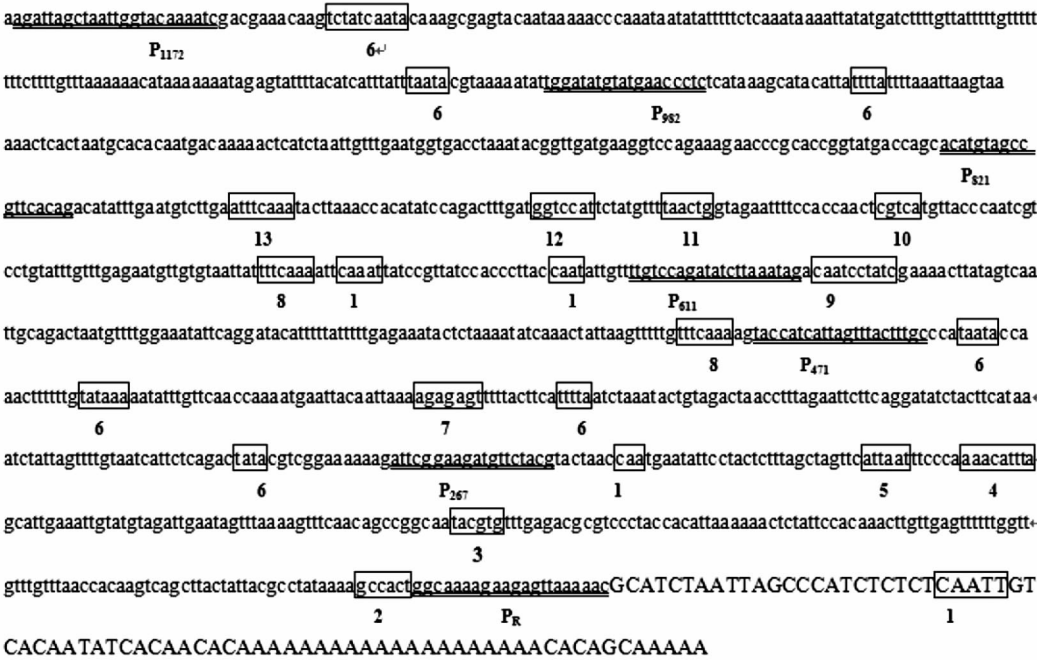


图 1 潜在转录因子结合位点分析

Fig.1 Binding sites of potential transcription factor

表 2 *AtHAK5* promoter 中潜在的元件

Tab.2 Cis-element found in *AtHAK5* promoter

序号 Sequence number	序列 Sequence	位点名称 Name of cis-element	功能 Function
1	CAAT	CAAT-box	普通顺式作用元件
2	GCCACT	CAT-box	分生组织表达
3	TACGTG	ABRE	ABA 响应
4	AAAACGTTTA	ACE	光反应
5	ATTAAT	Box 4	光反应
6	TATA	TATA-box	-30 转录起始
7	AGAGAGT	GAG	光反应
8	TTTCAAA	Box I	光反应
9	CAANNNNATC	circadian	生理控制
10	CGTCA	CGTCA	茉莉酸响应
11	TAACTG	MBS	干旱诱导
12	GGTCCAT	AuxRR-core	生长素应答
13	ATTTCAAA	ERE	乙烯应答

2.2 含有 promoter *AtHAK5*: :pORE R1 双元表达载体的构建

将 *AtHAK5* 基因 6 个不同长度启动子片段克隆到双元表达载体 pORE R1 中 β-葡萄糖醛酸酶

(*GUS*) 报告基因的上游。在合适的诱导条件下 ,上游的 *AtHAK5* promoter 可以启动下游 *GUS* 基因的表达 通过组织化学染色法可以对启动子的活性进行检测。构建结果如图 2 所示。

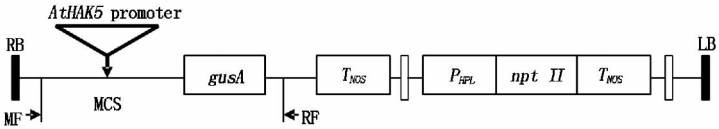


图 2 表达载体的构建

Fig.2 Construction of expression vector

2.3 转基因植株的获得

将收获的种子以转基因片段长度命名,以字母 A~Z 进行编号。转基因植株筛选结果如表 3 所示。T2 分别筛选到 10,18,2,10,11 株阳性苗,分别单株

收种后播于卡那霉素抗性培养基,筛选得到 T3 单基因纯合体,分别为 267H-7-(2,9)、471S-10-(8,10、12)、611Q-12-8、821B-7-3、982G-40-(7,12)、1172 J-10-(7,11)。

表 3 转基因植株筛选结果

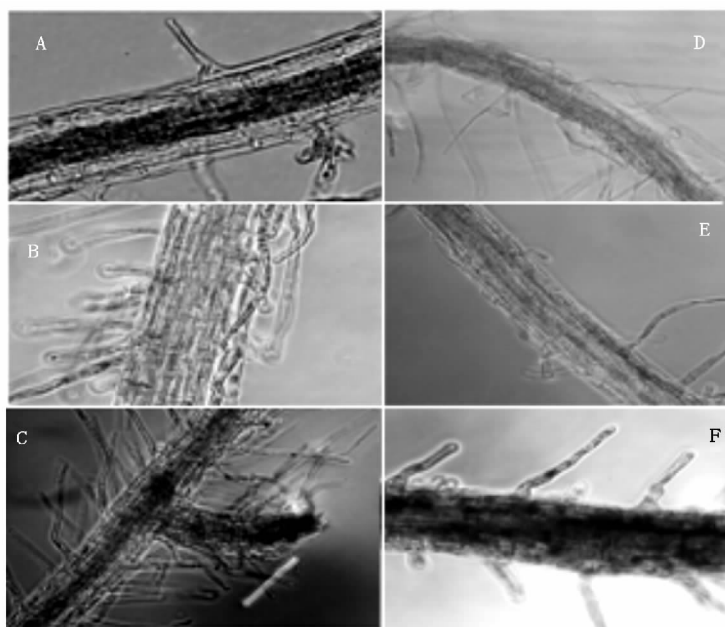
Tab.3 Screening results of transgenic plants

名称 Name	T1 种子 Seeds of T1	T2 种子 Seeds of T2	T3 种子 Seeds of T3
267pro: GUS	267A-T	267D-5、267G-9、267H-7、267M-3、267P-2	267H-7-(2,9)
471pro: GUS	471A-T	471B-(10,12)、471I-2、471S-(10,12)	471S-10-(8,10,12)
611pro: GUS	611A-T	611B-(5,6,9)、611D-(7,10)、611F-7、611H-9、611P-12 611Q-(2,9,12)、611S-(2,3,6,9) 611S-(10,11,13)	611Q-12-8
821pro: GUS	821A-T	821B-7、821D-11	821B-7-3
982pro: GUS	982A-T	982 A-(10,12)、982D-7、982 E-(3,10)、982 G-(3,10)、982M-7 982P-3、982T-2	982G-40-(7,12)
1172pro: GUS	1172A-T	1172 B-(7,9)、1172 D-(3,7,12)、1172 F-3、1172 J-(9,10) 1172 M-12、1172 P-(5,9)	1172 J-10-(7,11)

2.4 转基因植株的组织化学染色检测结果

将稳定表达 *promoter AtHAK5::GUS* 的拟南芥

T3 植株,低钾处理后进行组织化学染色,结果如图 3。



A~F 分别为 267 pro: GUS、471 pro: GUS、611 pro: GUS、821 pro: GUS、982 pro: GUS、1172 pro: GUS
A~F. 267 pro: GUS 471 pro: GUS 611 pro: GUS 821 pro: GUS 982 pro: GUS 1172 pro: GUS.

图 3 拟南芥转基因植株根部的组织化学染色

Fig.3 GUS staining in *Arabidopsis* transgenic plants root

在本试验中每个不同启动子的片段长度定义为相应启动子的名称,启动子片段与 *GUS* 形成的融合基因名称则定义为相应转基因植株的名称。根据 T3 植株 *GUS* 组织化学染色结果,转基因植株 267 *promoter::GUS* 的根部没有蓝色(图 3-A),转基因植株 471 *promoter::GUS*(图 3-B)、611 *promoter::GUS*(图 3-C)、821 *promoter::GUS*(图 3-D)、982 *promoter::GUS*(图 3-E)、1172 *promoter::GUS*(图 3-F) 的根部均有蓝色。由此看出 267 *promoter* 不足以启动下

游基因的表达,而 471 *promoter* 完全可以启动下游 *GUS* 基因的表达而使拟南芥根部变蓝。所以可以判定 *AtHAK5 promoter* 顺式作用元件位于转录起始位点上游 -471 ~ -267 区域内。

3 讨论

钾和氮都是植物重要的大量元素,是植物生长和基因表达变化的重要的信号分子。为了证实氮响应的基因表达的顺式作用元件,Konishi 等^[6]分析了

拟南芥编码亚硝酸还原酶基因 *NIR1* 的启动子, 确定相对于起始位点 -188 到 -1 区域至少存在一个与氮依赖活性相关的必需的顺式作用元件, 氮转运体 NRT2.1 和/或 NRT2.2 起着重要作用。目前研究已知 *AtHAK5* 是受低钾调控诱导表达的基因, 并且依赖于过氧化物的产生^[7]。Schachtman 等研究发现, 转录因子 RAP2.11 可以在低钾条件下与 *AtHAK5* 启动子中的 ERE 结构域和 GCC-box 相结合, 从而启动 *AtHAK5* 基因表达, 使植物充分吸收外界环境中有限的钾离子, 以维持植物的正常生长和发育^[8]。

植物响应低钾胁迫是一个复杂的生物学过程, 对 rap2.11 突变体分析表明, *AtHAK5* 的表达量没有显著降低, 说明 RAP2.11 可能和其他转录因子协同作用影响 *AtHAK5* 的表达^[9]。本试验通过构建不同长度 *AtHAK5* promoter 和 *GUS* 基因的融合表达载体, 获得转基因拟南芥 T3 稳定表达的纯合体植株, 组织化学染色方法鉴定了 *AtHAK5* promoter 中响应低钾信号的转录因子与其结合位点的区域, 下一步可以利用酵母单杂交方法鉴定在低钾条件下调节 *AtHAK5* 基因表达的转录因子奠定了基础。

参考文献:

- [1] Maathuis F J. Physiological functions of mineral macronutrients [J]. *Curr Opin Plant Biol* 2009, 12: 250–258.
- [2] Maathuis F J, Sanders D. Plasma membrane transport in context: making sense out of complexity [J]. *Curr Opin Plant Biol*, 1999, 2: 236–243.
- [3] Epstein E, Rains D W, Elzam O E. Resolution of dual mechanisms of potassium absorption by *Barley* roots [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1963, 49: 684–692.
- [4] Santa-Maria G E, Rubio F, Dubcovsky J, et al. The *HAK1* gene of *Barley* is a member of a large gene family and encodes a high-affinity potassium transporter [J]. *Plant Cell*, 1997, 9: 2281–2289.
- [5] Gierth M, Mäser P, Schroeder J I. The potassium transporter *AtHAK5* functions in K^+ deprivation-induced high-affinity K^+ uptake and *AKT1* K^+ channel contribution to K^+ uptake kinetics in *Arabidopsis* roots [J]. *Plant Physiol* 2005, 137: 1105–1114.
- [6] Konishi M, Yanagisawa S. Identification of a nitrate-responsive cis-element in the *Arabidopsis NIR1* promoter defines the presence of multiple cis-regulatory elements for nitrogen response [J]. *Plant J* 2010, 63: 269–282.
- [7] Shin R, Schachtman D P. Hydrogen peroxide mediates plant root cell response to nutrient deprivation [J]. *Proc Natl Acad Sci* 2004, 101: 8827–883.
- [8] Min J K, Daniel R, Ryoung Shin, et al. The *Arabidopsis* AP2/ERF transcription factor RAP2.11 modulates plant response to low-potassium conditions [J]. *Mol Plant*, 2012, 5(12): 1042–1057.
- [9] Diza-Martin J, Almoguera C, Prieto-Dapena. Functional interaction between two transcription factors involved in the developmental in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2005, 139: 1483–1494.

欢迎订阅 2014 年《山西农业科学》

《山西农业科学》是山西省农业科学院主办的大农业学术性期刊(中国科技核心期刊), 主要栏目有: 宏观农业、调查研究、生物技术、遗传育种、耕作栽培、生理生化、资源与环境、植物保护、畜牧兽医、水产渔业、贮藏与加工、信息技术、文献综述等。主要读者对象为: 农业研究机构科研人员、农业院校师生、涉农部门农业技术推广工作者。

本刊为月刊, 大 16 开本, 96 页码。每期定价 8.00 元, 全年 96.00 元。国内统一刊号 CN14–1113/S, 邮发代号 22–24。

欢迎订阅, 欢迎投稿!

通讯地址: 太原市长风街 2 号

邮 编: 030006

电 话: 0351–7089783

E-mail: sxnykx@126.com