

胡萝卜根特异表达水通道蛋白基因 *DcRB7* 的分离及其启动子功能分析

刘燕 郭长安 任海波 陈凡*

(中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100080. * 联系人, E-mail: fchen@genetics.ac.cn)

摘要 从胡萝卜胚 cDNA 文库中分离得到一条完整的 cDNA 片段, 序列分析表明属于水通道家族新成员, 并与烟草根特异性表达 *TobRB7* 基因高度同源, 因此命名为 *DcRB7*. Northern 杂交分析表明 *DcRB7* 在根中特异性表达. 利用反向 PCR 技术, 分离获得了 *DcRB7* 基因上游约 650 bp 的片段. 将此片段与含有 GUS 报告基因表达载体进行重组构建后, 以农杆菌介导转化烟草获得相应的转基因植株. 在对转基因烟草的 GUS 表达特性进行了组织化学鉴定和荧光定量分析后发现, 该调控区段能指导 GUS 基因在烟草根中优势表达, 并表现出干旱诱导的特性.

关键词 根 组织特异性表达 顺式作用因子 转基因植物

高等植物细胞分化的分子本质是不同基因差异表达的结果, 大多数发育调控基因的表达都具有时间性和空间性. 时间性是指特定基因的表达是不连续的、短暂的, 而空间性则是特定基因具有在生物体内特定部位表达即组织特异性表达的特性^[1]. 采用分子生物学对农作物进行遗传改良过程中, 常常期望插入的外源基因能够限制在特定的组织中表达, 从而使植物获得有用的性状, 这也就要求通过有效的组织特异性启动子对靶基因的表达进行调控^[2].

水通道蛋白是一类能促进水、甘油等小分子代谢物运输的膜通道蛋白家族, 它的发现使人们对细胞内、细胞间水分子运动有了突破性的认识. 植物水通道蛋白广泛分布于各种组织、器官, 存在于发育的各个时期, 暗示了它在整个生命活动中的重要地位^[3]. 水通道蛋白家族具有保守的结构模式, 含有 6 个跨膜螺旋区和 2 个膜内区, 其 N 端和 C 端都在胞内, 水通道蛋白具有其特定的特征基序 NPA(或 NPG), 该基序被认为与水通道蛋白的功能密切相关^[4]. 在拟南芥全基因组序列中预测出有 35 个水通道蛋白基因, 分为 PIP(plasma membrane intrinsic protein), TIP(tonoplast intrinsic protein), NIP(nodulin-26-like membrane protein)和 SIP(small and basic intrinsic protein). 这种分类大部分并没有经过亚细胞水平定位, 新发现的水通道蛋白是根据序列同源性与内含子外显子结构来分类的. 水通道蛋白的表达受发育、干旱、低温、脱落酸、生长素等的调节. 比如, 干旱、低温都会改变 *rwc1* 在水稻中的表达^[5]. 同时, 水通道蛋白的表达也

会影响植物的生长. Aharo 等人^[6]在烟草中过量表达了拟南芥 PIP1b, 结果表明, PIP1b 的过量表达显著提高了转基因烟草在有利生长条件下的生长速率、呼吸速率及光合效率, 但在盐碱或干旱的逆境环境中这种过量表达并不能对烟草的生长起到有利的影响. 水通道蛋白基因家族的各个成员都有其各自的表达模式, 大部分基因在 2 个以上组织中表达, 但也有少数基因表现为组织特异性或组织优势表达, 其中也含有根中优势表达基因^[7].

高等植物的根是进行水分运输的主要器官. 在几乎所有的根细胞中都发现了水通道蛋白, 因此水通道蛋白在根对水分的吸收功能上可能起着重要作用. 针对植物水通道蛋白基因在根中特异性表达的研究, 对于水通道蛋白参与水分吸收和转运过程的分子机制, 乃至揭示植物根的发生、分化和发育机制是不可缺少的内容. Yamamoto 等人^[8]从烟草中分离获得了 *TobRB7* 基因 (GenBank 登录号: S45406), 并证明其具有根组织特异表达特性. Nan 等人^[9]进一步证明了 *TobRB7* 的启动子是一个双向启动子, 在正反方向上均具有根组织特异性的表达调控功能. 本研究从胡萝卜胚 cDNA 文库中分离得到一段全长 cDNA 序列, 序列分析表明它含有水通道蛋白家族的特征基序, 属于水通道家族新成员, 并与烟草根特异性表达 *TobRB7* 基因高度同源, 定名为 *DcRB7*. 利用反向 PCR 技术, 进一步对 *DcRB7* 上游启动子区段进行了分离和转基因功能鉴定, 以期证明该区段对报告基因产生的组织特异性调控作用和干旱胁迫应答效应.

1 材料与方法

() 实验材料和cDNA表达文库构建. 本研究采用的胡萝卜(*Daucus carota* L)为日本国分大长人参品种. 按照Qi等人^[10]发表的方法获得胡萝卜体细胞胚, 并以解调控 48 h的胡萝卜体细胞胚为材料, 构建cDNA表达文库. 烟草(*Nicotiana tabacum* L)NC89用于基因转化的宿主, 其种子购于中国农业科学院.

() 质粒载体和生化试剂. 植物二元表达载体pCAMBIA1305.1为澳大利亚CAMBIA公司产品. 克隆载体pGEM-T Easy Vector Systems购自Promega公司. PCR试剂购自上海生工公司. 限制性内切酶和基因工程用工具酶购自Promega公司和华美公司. 其他试剂均为国产分析纯.

() Northern杂交分析. 采用异硫氰酸胍-巯基乙醇联合变性法提取胡萝卜成体根、叶、叶柄的总RNA, 通过甲醛变性凝胶电泳和DNA印迹技术将RNA转移至尼龙膜(Zeta-Probe Blotting Membrane, Bio-Rad公司)上. 采用Promega公司“primer-a-gene”标记试剂盒和 α -³²P-dATP对探针进行同位素随机引物标记. 杂交过程参照Bio-Rad公司提供的使用说明书.

() 反向PCR获取5'端上游调控序列. 根据*DcRB7*基因cDNA序列设计寡核苷酸引物, 采用反向巢式PCR方法扩增*DcRB7*基因5'端上游调控序列. 4条引物分别由赛百胜公司合成(P1: 5'-GGCTGCCAA-TTGATATCTTC-3'; P2: 5'-CTGAGTTTATTGCCACC-CTT-3'; P3: 5'-CTCCGATTGTTTAACTTCTTCT-3'; P4: 5'-CCGAAGGTGTAGTGTGTTGAGAT-3'). 采用CTAB法从胡萝卜叶片中提取基因组DNA. *Hind* 消化胡萝卜基因组DNA, 稀释DNA浓度至2ng/L后, 进行自身环化连接, 环状DNA经乙醇沉淀后溶解作为PCR扩增反应的模板. 以P1, P2为引物进行PCR扩增. 反应程序: 94 预变性5 min; 94 , 1 min, 50 , 1 min, 72 , 3 min, 25个循环; 72 延伸10 min. 将第1次PCR产物稀释100倍作为模板, 以P3, P4为引物, 进行第2次PCR扩增, 条件参数与第1次相同. PCR产物与pGEM-T Easy Vector连接后转化至大肠杆菌XL1-Blue菌株中. 分离获得阳性克隆, 并通过核苷酸序列测定进行鉴定.

() 烟草转化及再生植株的筛选. 重组构建的植物表达载体, 按照Bevan等人^[11]的方法转入根癌土壤农杆菌EHA105, 通过利福平抗性和卡那霉素抗

性筛选获得阳性根癌土壤杆菌, 并进一步提取质粒DNA确认阳性克隆. 参照Horsch等人^[12]的方法, 利用农杆菌介导叶盘法将重组构建的植物表达载体导入烟草, 在MS培养基中加入羧苄青霉素和卡那霉素对再生植株进行筛选. 提取再生植株的基因组DNA, 通过PCR反应来进一步鉴定转基因植株.

() GUS表达活性荧光定量分析和组织化学检测. 参照Jefferson等人^[13]的方法, 通过荧光光度计, 对转基因阳性烟草植株的各组织部位进行GUS表达活性荧光定量分析, 蛋白质的浓度测定采用Bradford^[14]的方法. 同样, 参照Jefferson等人^[13]的方法, 对转基因阳性烟草植株进行组织化学染色检测.

2 结果与讨论

2.1 *DcRB7* 基因的分离与基因表达模式分析

对胡萝卜体细胞胚cDNA表达文库进行随机提取克隆, 对分离的克隆进行内删除和提取质粒DNA, 然后进行核苷酸序列测定. 对其中一条全长cDNA序列进行比较分析后发现, 它含有水通道蛋白家族的特征基序, 属于水通道家族新成员, 其推测的氨基酸序列与烟草根特异性表达*TobRB7*基因序列具有约81%的同源性(图1), 将该基因命名为*DcRB7*.

分别从胡萝卜成体根、叶、叶柄提取总RNA, 以随机引物法标记的*DcRB7*cDNA全长作为探针进行Northern杂交. 在总RNA量基本一致的情况下, *DcRB7*在胡萝卜成体根中的表达明显高于胡萝卜叶和叶柄的表达(图2). 结果表明, *DcRB7*为根特异性表达的基因.

2.2 *DcRB7* 基因5'端调控序列的克隆和分析

利用反向PCR技术, *DcRB7*上游启动子区段进行了克隆和分离. 在2次PCR扩增后, 分离获得一条大约1.3 kb的单一片段, 将此反向PCR产物与pGEM-T Easy Vector连接后转化*E. coli* DH5 α , 获得阳性克隆命名为pGEM-DcRB7P. 经酶切分析及核苷酸序列测定, 确认获得*DcRB7*基因上游-601~+48 bp共约649 bp的启动子区段(GenBank登录号: AY518203, 图3(a)).

采用植物顺式元件查询数据库(PLACE)对所获*DcRB7*上游启动子区段进行分析^[15], 结果显示该区段内包含4个Dof蛋白结合位点、3个rolD基序和1个as-1基序, 它们都与基因根特异性表达调控有关. Dof蛋白是植物中一类具有锌指结构的转录因子, 其

TobRB7	1	MVRIAFGSIG	DSFSVGSILKA	YVAEFTATLL	FVFAGVGSAT	AYNKLTDAAA	LDPAGLVAVA
		,* ,,*	**,* ****	*,*****	*****	*,*,*****	*****,*
DcRB7	1	MVKISTGSLG	DSL.SHGSLKS	YLAEFTATLL	FVFAGVGSAT	AFNXLTDAG	LDPAGLVATA
TobRB7	61	VAHAFALFVG	VSTAANTS GG	HLNPAVTLGL	AVGGNITLIT	GFFYWIAQLL	GSTVACL LK
		*****	** ,*****	*****,*	*****,*	*,*** ,**	
DcRB7	61	VAHAFALFVG	VSMAANIS GG	HLNPAVTFGL	AVGGNITLIT	GFFYWIAQVL	GATVASFLN
TobRB7	121	YVTNGLAVPT	HGVAAGLNGL	QGVVMEITIT	FALVYTVYAT	AADPKKGSIG	TIAPTATGFI
		,* ,**	*,* ,** ,	,** ,*****	*****	*****	*****
DcRB7	121	FGTGGKAVPI	HEVGAGLGAA	EGVVFETIT	FALVYTVYAT	AADPKKGSIG	TIAPTATGFI
TobRB7	181	VGANTLAAGP	FSGGSMNPAR	SFGPAVVAGD	FSQNWYIWAG	PLIGGGLAGF	TYGDVFTGCH
		*****	*****	*****,*	** ,** ,*	***** ,	..***** ,
DcRB7	181	VGANTLAAGP	FSGGSMNPAR	SFGPAVAAGD	FSGHWIYWVG	PLIGGGLAGL	VFGDVFTGSY
TobRB7	241	TPLPTSEDYA					
		...*,*					
DcRB7	241	AAVPASDYVD	Y				

图 1 *DcRB7* 基因与 *TobRB7* 基因编码氨基酸序列的同源性比较

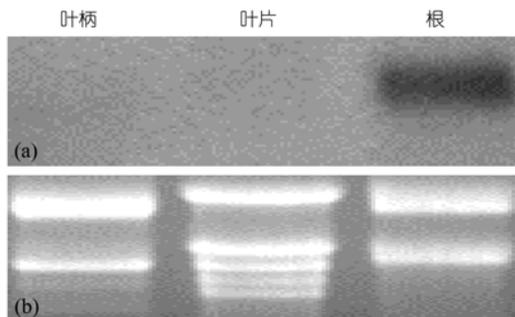


图 2 胡萝卜 *DcRB7* 基因在不同组织中的表达模式
(a) Northern 杂交图; (b) 总 RNA 的甲醛电泳图

中大部分成员通过结合到特定基因的启动区上, 调控这些基因呈现根组织特异性表达以及植物激素诱导表达^[16]. *RoID* 启动子能启动 GUS 报告基因在根中优势表达, 其表达量远高于在叶和茎中的表达^[17]. 启动子元件激活序列 as-1 被认为参与了植物基因组织特异性和信号应答的转录调控, 含有基本亮氨酸拉链结构的蛋白 TGA 因子可以特异地结合 as-1 元件, 可能是介导这些转录的调控因子^[18]. 比较 *TobRB7* 和 *DcRB7* 的上游调控序列, 发现可以找到一些类别相同的基序, 尽管位置和数量上有一定差异(图 3(b)). 结果表明, 一些转录因子, 如 Dof 蛋白、TGA 因子可能通过与 *DcRB7* 上游顺式作用元件相互作用, 参与了该基因的根特异性表达.

2.3 基因表达载体的构建及转基因烟草植株的获得

pCAMBIA1305.1 为带有 *CaMV35S-GUS* 融合报告基因的双元表达载体. 采用 *Hind* 和 *Nco* 对 pCAMBIA1305.1 载体进行双酶切消化, 去除载体本身带有的 *CaMV35S* 启动子片段. 同时, 将 pGEM-DcRB7P 用 *Hind* 和 *Nco* 双酶切消化后回收含有 *DcRB7* 基因上游启动子约 650 bp 的片段, 并与载体片段连接, 构建植物表达载体 pDcRB7P. 用 *EcoR* 完全消化 pDcRB7P 并自身连接, 得到在 *GUS* 基因前不含有任何启动子区段的植物表达载体 pDcRB7N (图 4). 带有 *CaMV35S* 启动子的 pCAMBIA1305 和不含有任何启动子区段的 pDcRB7N 分别作为组成型启动子阳性对照和空载体阴性对照, 用于分析 *DcRB7* 基因上游启动子区段驱动 *GUS* 表达的功能.

上述植物表达载体分别转化根癌土壤农杆菌 EHA105, 在确认阳性转化克隆后, 利用农杆菌介导叶盘法将重组构建的植物表达载体导入烟草, 经过组织培养和筛选获得第 1 代转基因烟草植株. 提取再生植株的基因组 DNA, 通过 PCR 反应确认获得相应的转基因植株(结果未显示).

2.4 胡萝卜 *DcRB7* 基因 5'端调控序列对 *GUS* 基因表达的调控

在经过组织培养形成完整的转基因烟草植株后,

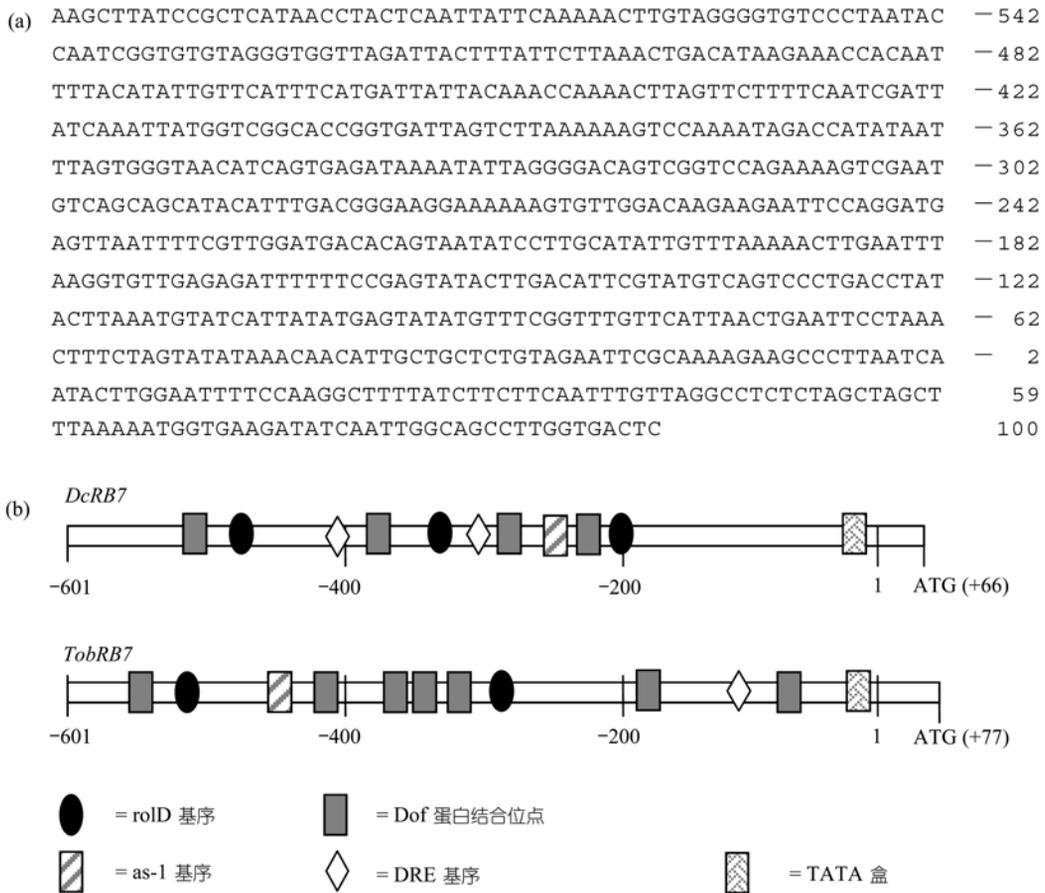


图3 *DcRB7* 基因的上游调控序列(a)以及 *DcRB7* 基因和 *TobRB7* 基因启动子保守基序的比较示意图(b)

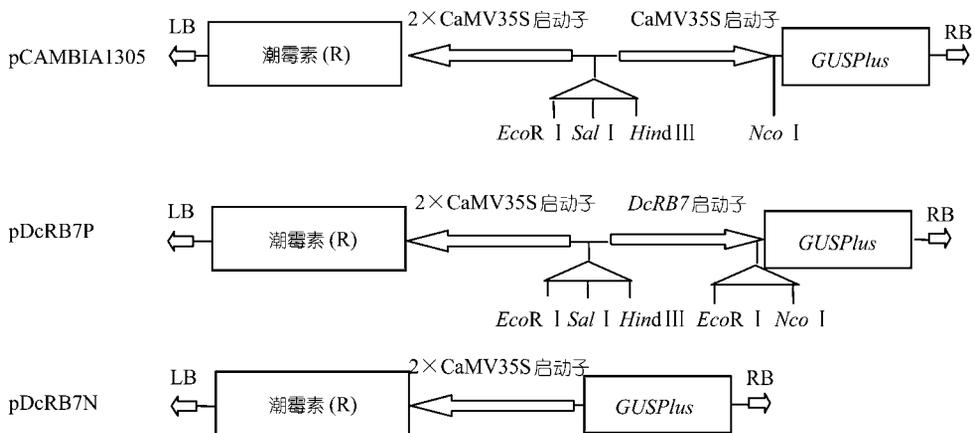


图4 pCAMBIA1305 表达载体和 *GUS* 基因融合表达载体的构建

采用组织化学染色的方式对 *GUS* 基因的表达进行了检测。经组织化学染色后发现，pCAMBIA1305 和 pDcRB7P 的转基因植株均可以观察到代表 *GUS* 基因

表达产物的深蓝色，而 pDcRB7P 的转基因植株仅在根系中呈现蓝色，pCAMBIA1305 的转基因植株则整个植株呈现蓝色。结果表明，*CaMV35S* 启动子和

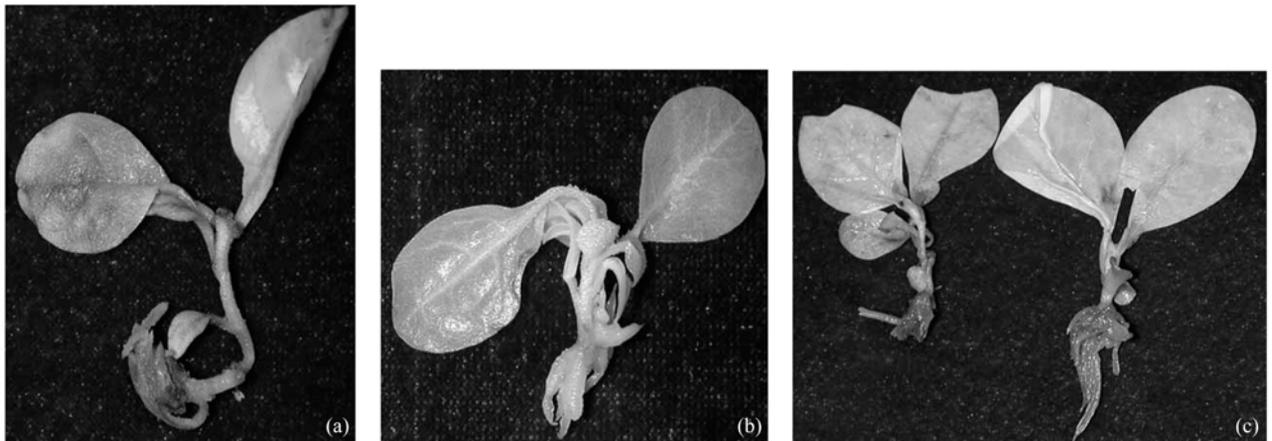


图 5 转基因烟草植株 *GUS* 基因表达的组织化学染色
(a) pCambia1305; (b) pDcRB7N; (c) pDcRB7P

DcRB7 基因 5'端调控区段均可以驱动 *GUS* 基因在转基因烟草中表达, 而 *DcRB7* 基因 5'端调控区段可以驱动 *GUS* 基因在烟草根部特异性表达(图 5(a)~(c)). 作为空载体阴性对照的 pDcRB7N 转基因植株(图 5(b)) 和非转基因植株的空对照, 都未检测出 *GUS* 基因表达.

为了进一步说明 *DcRB7* 基因 5'端调控区段对 *GUS* 基因表达的调控作用, 对含有 pDcRB7P, 和融合表达载体的转基因烟草植株的根、茎、和叶, 分别进行了 *GUS* 表达活性的荧光定量分析. 同时, 以含有 pCambia1305 载体和含有 pDcRB7N 载体的转基因植株, 以及不含有任何表达载体的烟草 NC89 培育植株作为阳性对照、阴性对照和空白对照, 对其根、茎、和叶也分别进行了 *GUS* 表达活性的荧光定量分析. 由于 *DcRB7* 基因具有水通道蛋白的特征基序, 我们推测这段序列编码的蛋白质是水通道蛋白家族的成员. 因此我们对 pDcRB7P 转基因植株进行了干旱处理, 并对处理后的植株进行了荧光测定.

先后完成 4 次独立基因转化, 对每一种阳性转化植株选取了 10~15 株进行检测. 数据显示, 在 CaMV35S 启动子指导下, *GUS* 基因在转基因植株根、茎、叶中的表达量基本相同. *DcRB7* 基因 5'端调控区段可以驱动 *GUS* 基因在根中优势表达, 其表达量远高于茎、叶中的表达. 在干旱诱导下, *GUS* 基因在根、茎、叶中的表达都会加强, 但仍然在根中优势表达. 在阴性对照 pDcRB7N 转基因植株和空白对照 NC89

中, *GUS* 基因表达极低(图 6). 结果表明, *DcRB7* 基因 5'端调控区段可以驱动下游基因在根中优势表达, 而且表现出干旱诱导的特性.

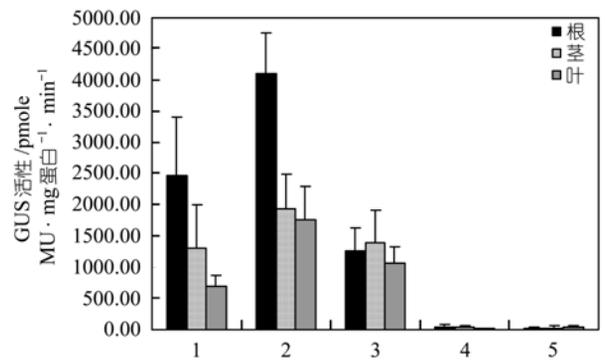


图 6 转基因植株的 *GUS* 荧光定量分析

1 示 pDcRB7P 转基因植株; 2 示经干燥处理的 pDcRB7P 转基因植株; 3 示 pCambia1305 转基因植株; 4 示 pDcRB7N 转基因植株; 5 示空白对照

对 *DcRB7* 上游启动子区段的分析表明, 在该区段中除了含有与根特异性表达相关的元件之外, 还存在 2 个干旱应答元件 DRE (dehydration-responsive element). DREBs/CBFs 反式作用因子特异地与 DRE/CRT 顺式作用元件的核心基序 G/ACCGAC 相互作用, 介导参与环境胁迫的基因表达^[19]. 这个结果暗示, *DcRB7* 基因 5'端调控区段除了参与根特异性表达的调控之外, 还可能存在干旱胁迫方面的协同调控. 这与 *DcRB7* 基因编码的水通道蛋白的功能可能密切

相关。因此, 我们还将进一步确定该顺式作用元件, 同时分离相应的反式激活因子, 研究分子构型对反式激活因子和顺式作用元件的相互作用的影响, 这样才有可能真正从分子水平上解释植物组织特异性表达与环境胁迫表达的协同调控。

致谢 本工作为国家重点研究发展计划(批准号: 2003CB114300), 国家自然科学基金(批准号: 30370700)和中国科学院创新工程(批准号: KSCX2-SW-311)的资助项目。

参 考 文 献

- Hasegawa P M, Bressan R A, Zhu J K. Plant cellular and molecular responses to high salinity. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2000, 51: 463~499[DOI]
- Wu N H, Diao F Q. Transcription factors and developmental control in plants. *Chinese Science Bulletin*, 1999, 44: 1921~1925
- Baiges I, Schaffner A R. Plant aquaporins. *Physiologia Plantarum*, 2002, 115: 175~182[DOI]
- Park J H, Saier M H Jr. Phylogenetic characterization of the MIP family of transmembrane channel proteins. *J Membr Biol*, 1996, 153: 171~180[DOI]
- Li L G, Li S F. Molecular cloning of a novel water channel from ice: Its products expression in *Xenopus oocytes* and involvement in chilling tolerance. *Plant Science*, 2000, 154: 43~51[DOI]
- Aharon R, Shahak Y. Overexpression of a plasma membrane aquaporin in transgenic tobacco improves plant vigor under favorable growth conditions but not under drought or salt stress. *Plant Cell*, 2003, 15: 439~447[DOI]
- Quigley F, Rosenberg J M, Shachar-Hill Y, et al. From genome to function: The Arabidopsis aquaporins. *Genome Biol*, 2001, 3: RESEARCH0001
- Yamamoto Y T, Taylor C G, Acedo G N, et al. Characterization of cis-acting sequences regulating root-specific gene expression in tobacco. *Plant Cell*, 1991, 3: 371~82[DOI]
- 南兰, 林慧馨, 关育成, 等. 根特异性表达顺式激活序列在转基因烟草中的功能分析. *科学通报*, 2002, 47(1): 49~53[摘要][PDF]
- 齐眉, 黄美娟, 陈凡, 等. 酵母单杂交系统分离胡萝卜生长素应答元件结合因子. *中国科学, C辑*, 2002, 32(2): 105~112[摘要][PDF]
- Bevan M. Binary Agrobacterium vectors for plant transformation. *Nucleic Acids Res*, 1984, 12: 8711~8721
- Horsch R B, Fraley R T, Rogers S G, et al. Inheritance of functional foreign genes in plants. *Science*, 1984, 223: 496~498
- Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W. GUS fusions: Beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J*, 1987, 6: 3901~3907
- Bradford M M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72: 248~254
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, et al. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database:1999. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27: 297~300[DOI]
- Yanagisawa S. The Dof family of plant transcription factors. *Trends Plant Sci*, 2002, 7: 555~560 [DOI]
- Elmayan T, Tepfer M. Evaluation in tobacco of the organ specificity and strength of the rolD promoter, domain A of the 35S promoter and the 35S2 promoter. *Transgenic Res*, 1995, 4: 388~396
- Krawczyk S, Thurow C, Niggeweg R, et al. Analysis of the spacing between the two palindromes of activation sequence-1 with respect to binding to different TGA factors and transcriptional activation potential. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30: 775~781[DOI]
- Dubouzet J G, Sakuma Y, Ito Y, et al. OsDREB genes in rice, *Oryza sativa* L, encode transcription activators that function in drought-, high-salt- and cold-responsive gene expression. *Plant J*, 2003, 33: 751~763[DOI]

(2004-04-12 收稿, 2004-06-07 收第 1 次修改稿,
2004-10-10 收第 2 次修改稿)