一个棉花生殖器官优势表达基因的启动子功能分析*

任茂智①③** 陈全家①② 李 丽① 张 锐① 郭三堆①**

(① 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081; ② 新疆农业大学农学系, 乌鲁木齐 830052;
③ 上海交通大学生命学院, 上海 200030)

摘要 用棉花生殖器官优势表达启动子替代 CaMV35S 启动子是解决目前转基因抗虫棉存在“前期抗虫性强, 后期抗虫性弱”这一生产实践问题的关键. 运用反向 PCR 技术从陆地棉中分离到一个棉花生殖器官优势表达基因——腺苷酸核糖基化作用因子 1 (*Arf1*)基因的启动子序列. 该启动子具有独特的结构特征, 不仅同时包含有转录起始子(initiator), TATA box, CAAT box 和 GC box 这四种特异元件, 而且还包含有一个 5′非翻译区的内含子. 通过构建四个启动子缺失突变体, 定向替换植物表达载体 pBI121 上的 CaMV35S 启动子, 并与 GUS 基因融合, 构建了 4 个植物表达载体. 用花粉管通道技术将它们导入到棉花中, 转基因棉花后代的 GUS 染色和荧光定量分析结果表明: *Arf1* 启动子是一个典型的棉花生殖器官优势表达启动子, 它为棉花生殖器官性状的分子设计和抗虫棉的再创新提供了有用的工具.

关键词 棉花 ***Arf1*** 启动子 生殖器官 优势表达 功能鉴定

转基因抗虫棉的成功研制和广泛应用, 是中国棉花生产的一个里程碑[1]. 目前, 抗虫棉中驱动杀虫基因表达的启动子是来自花椰菜花叶病毒的CaMV35S启动子[1], 它在植株被CaMV感染期间指导35S RNA合成[2]. 从生物安全性的角度看, 与一种外源病毒的启动子相比, 利用棉花自身基因的启动子会更加安全, 更为匹配[3]. 大量实验表明: CaMV35S启动子可驱动杀虫基因在棉花所有组织中表达, 但各组织中表达强弱顺序是: 叶>根>茎>铃>花, 而棉铃虫对棉花的危害程度却是: 花>铃>叶>茎>根[4]. 据统计, 80%棉花虫害损失源于害虫取食棉花的花和果实[5]. 因此, 研究并使用棉花生殖器官特异型启动子可实现杀虫基因在棉花蕾、花、铃中高效表达, 而在其根、茎中少表达或不表达, 使毒蛋白表达组织形成物理屏障, 有效地防止害虫对于花及果实的伤害, 这样既可提高杀虫效率又可减少能量浪

2004-10-12 收稿, 2004-12-09 收修改稿
* 国家“863”计划项目(批准号: 2001AA222101 和 2001AA212011)和农业部棉花发展专项基金项目资助
** E-mail: mzren@sjtu.edu.cn, gsd@mail.caas.net.cn

费, 还可延缓害虫对抗虫物质产生耐受性.

基于以上问题, 分离棉花生殖器官优势表达启动子是转基因抗虫棉进一步发展和创新的关键. 腺苷酸核糖基化作用因子 1(*arf1*)属于小G蛋白超级家族中的ARF亚族[6]. Wing等人[7]从亚洲棉开花后 7~10 天纤维cDNA文库中分离到*arf1* 的表达序列标签(EST). 侯磊等人[8]从陆地棉花粉中分离到*arf1* 的EST序列, 并通过RNA斑点杂交证明*arf1* 主要在花粉、子房、花冠、花瓣等花器官中特异表达.

我们从陆地棉品种Y18 中分离到*arf1* 基因全长cDNA和DNA序列, 发现该基因在棉花蕾、花、铃和纤维等生殖器官中优势表达[9], 并对其结构特征、替换剪接和遗传表达进行了分析[9]. 本文在以前工作的基础上, 进一步分析了该基因启动子的特征、特性及在棉花中驱动外源基因表达的组织特异性调控元件, 为进一步利用该启动子驱动杀虫基因在棉花生殖器官中高效表达奠定了基础, 也为基因工程改良棉花生殖器官性状, 特别是抗虫基因工程提供了有用的分子工具.

1　材料和方法

1.1　植物材料和生长条件

棉花品种 Y18 作为 *arf1* 启动子克隆的植物材料和棉花转基因受体材料. 春季种于北京田间, 冬季在海南繁殖.

1.2　DNA 模板

用改良的CTAB法[10]提取陆地棉品种Y18 基因组DNA, 用于目的基因DNA序列扩增、未知序列基因组步移和Southern blot.

1.3　*Arf1* 启动子片段缺失设计和植物表达载体构建

根据 *arf1* 启动子结构特征和表达调控元件分布(图 1), 采用 5′端缺失的策略设计了 AF1, AF2, AF3, AF4 和 AR1 等 PCR 引物(表 1), 扩增 A1, A2, A3 和 A4 四种启动子缺失片段, 为便于克隆测序及植物表达载体构建, 并能避开启动子片段内部限制性内切酶识别位点, 在正向引物的 5′端引入 *Hin*dⅢ的酶切位点, 在反向引物 AR1 的 5′端设计了 *Xba* Ⅰ酶切位点(表 1). 采用高保真 Taq 酶从棉花基因组中扩增相应的启动子片段, 并克隆到pUC19载体上. 测序结果无误后, 分别定向替换 pBI121 上的 CaMV35S 启动子, 并与 GUS 基因融合, 构建成 4 个植物表达载体 pBIA1GUS, pBIA2GUS, pBIA3GUS 和 pBIA4GUS.

1.4　花粉管通道法操作程序和转基因植株的 Kan 筛选流程

将 4 种植物表达载体经花粉管通道法[3]导入棉花品种Y18 中, 收获T_0代种子后, 在海南高密度种植, 经过 3 轮卡那霉素筛选, 拔除阴性植株, 阳性植株挂牌记录.

1.5　GUS 基因 PCR 扩增和 Southern blot 分子检测

从卡那霉素抗性植株的幼叶中提取基因组 DNA, 根据 pBI121 载体上的 GUS 基因序列, 设计一对 PCR 检测和 Southern blot 探针的引物 GF1 和 GR1(表 1). PCR 程序为 94℃, 1 min, 55℃, 1 min 和 72℃, 2 min, 共 35 个循环.

1.6　GUS 基因的组织化学鉴定

对PCR阳性植株进行GUS基因的组织化学鉴定, GUS染色方法按照Jefferson等人[11]的方法进行.

1.7　GUS 基因荧光定量分析

从每种载体的GUS组织化学染色阳性植株群体中随机选取 4 株作为GUS基因荧光定量分析的材料, 方法步骤详见Cote等人[12].

1.8　GUS 基因 Southern blot 分子检测

从每种载体的 GUS 阳性植株群体中选取 GUS 活性最强的植株进行 Southern blot, 探针模板用 GUS 基因内部特异引物(表 1), 具体步骤参见地高辛标记及检测试剂盒系统Ⅱ.

2　结果与分析

2.1　*Arf1* 基因启动子的序列结构特征

以起始密码子ATG的A为 0, *arf1* 的转录起始子位于−752 bp处, 在 0~−752 这段 5′端非翻译序列中, 存在一个 513 bp (−10~−527 bp)的具有替换剪接现象的内含子[9](图 1). 在起始密码子ATG和转录起始子

```
   1 TGATCACGGT TCCTTTTCTT CCTTCTCAGC AAAAGCCTAT GGCTAACATC AAAATGACCA TTGATGAATG CAGGGCAACA GCGAACCAGG TTTTTTATTT
 101 TGTAGGGCTG CAAAATACTA CTGCAACGAT TGCATGTGCA TTGAACAATG TACTGCCAGC AGCCACATTT CTCCTCGCAG CCATTTGCAG GTCCCAATGT
 201 CATATTTTGG TACTTAAATT CTACAAAAAA AAATTTGGGT TTCATCTGAT AAATTGTCGA ATTTGATGTT CAATATATAG ACAAGAAGCT GTGGGGATAA
 301 AGAAAGCATC AGGGCAGGCT AAGGTAATAG GTACTTTGGT ATGTGTTGGT GGAGCTATGT TGCTGTCATT TTACCATGGA CACATCATCG GCATAGGTGA
 401 ATCCAGCATT CACTGGAACT ATGCCAATAA AATGGCAAAT TCAAGTCCCA GCCCTAGTGG TTCAAACTTC TTCCTGGGTC CTTTCCTTGT AATGGCCAGT
 501 GCTGTTGCTT GGGCACTATG GTTCATAATC CAGGGACAAA CAAGCAAGAG CTTCCCAGCT CCTTACACAA GCACTACTCT AATGTGCTTC ATGGCGAGCA
 601 TTGAGTGTAC AATAATCGGC ATATTTTCAG ACCCCAAGCC ATCTGCTTGG TCATTGAGCT CCAGCATGAG GCTTATTGCA GCTCTTTATG CGGTAAGCAT
 701 AACATATATC TATATCGATA TCGATATCGA TATCGATATC GATATCGATA TCTATATATA TTATATTATC AGTTTCGTAA TGGTTTATGT ATGATGTATC
 801 TTTCAGGGAA TTATATGTAA TGCAGTAGCA TTCTGCGTAA TGTCATGGTG CATCCAGAAA AGAGGTCCTC TCTATGTCTC AGTGTTCAGC CCTTTGCTGC
 901 TTGTCATTGT GGCTATTCTA AGTTGGGCCC TGCTTCGTGA GAAGCTATAT GTGGGAACGT ACGTTCGTAC ACACATTATG CTAACCCCTA TCACCAAAAG
1001 TTAAAACTCC TTATTATTAA TTAATTATTT ATTGGGTATT GATTAAATTG CAATGATGGG ACAGTGTTGT AGGGTCACTG CTGATAGTTG GTGGACTGTA
1101 TGCTGTCCTG TGGGGAAAAG ATAAAGAGAT GAAACAGATG AAAGGCAATG AAAAAGGAGG AGGAGGAGGA GAGCAAGTAG TAGTAGAAGA AGGGGCAGTG
1201 GAAGTCACTA AAGCTGGTGA CAGAGATCAT GACTTGGAGA TGCAGTCGCA GCAAGGCGGC GGCGCCCGTG GTTAACTAGG GCGTACGGAA TCCAAAAAAA
                                                            GC box
1301 GGAATGTTAA CATATATGTA TGAATGTAGA ACGCTGCTGT GACACCCCAG CAGAGTGTTT TAGTGGGTTT TATTTTGTTC TTGGATCCAG CTGTTAAAGA
1401 GTTTTTAGTA TGTTTAGCTA TTATTAATAA TAATCTTTCT TTCCTCATTA CAAAACAAGG CAAAGCTACC TCCAAATTTG ATGTTCCTTA AACCATATTT
1501 TAAATGATTG TACTTTCAAT TTGGTCATAT CCAATGTGAT TATATATTAA ACCATCTTAA AATAACTTAT ATAAATACCC AAAGTGTTTG CCCCAACATA
                                     CAAT box                                  TATA box
1601 TGTTAAAAAA ATATTAGCAT CCGTACTTAC TTTGACCATA ATTGATTAAT TTAAAGAATA AAAAAATCTG TGAAAAAGAC GAAGGTGATT GGGATTTCCA
                                 initiator
1701 AAACGGCAGC GTTTGGATCT AATCAAAGGG CATCGCAACG TTTTAAGAAA ACCTAATCTG AAATCACTCA CCCCCGCCTC CAGCTCCTCC AATTGCGTAA
1801 TAAATAGCCC CGAAGCCCAA CCCCTTCCCC CATTGAATTT GATATTTTGT GAGTGTTAAA CATTGTTTGC CTTTCATTTC TTTCTCTATT CCTTGTTGCT
1901 TCCTCGGCAG CCTCTCGGTT TCTGAGTAAT GTATTAATCT TATCTCTGTG TTGCTTCTGC ATGTTTGCAT TTGTTTAGAT TTCTCTGTCT AAATAGAAGT
2001 CCTTCCTTGC TTTGATTTGT GTATGGGCCT TTCTCTAATT GATTCCAGAT CTAGATCTGG ATCTTGGTTT TCTTTGTTCT GCTTTGATCT GCTCATTTCA
2101 TTCTATATGA TATGATATTG TTGCTGATGT AGATCTGTTT GTTTAGATTT GTATTGCTTT GCAAGATTTT CTCAAATGAA ATTGTTTTTA ATGTTGTTCA
2201 ACTCTTTATT TTGGCAATGT CATGCGTTTT TAAAATGAAA AATGGGGGCT TTACTGTATT TATTATGTGT ATATAATAGG GTCCTATGGT TTTTGTTCCT
2301 TTTTTATATG GTATCAATTG GATGAATAAG TTAGGATTGA CCACATCTTG TATTTCTGGT GTCAGCGAAG ATAAAAAAGG ATGGGGCTGT CTTTTGCTAA
                                                                                  Kozak sequence
2401 GCTGTTTAGT CGACTGTTTG CCAAGAAAGA GATGCGAATT CTTATGGTGG GTCTTGATGC TGCTGGTAAG ACCACCATTT TGTACAAGCT CAAGCTCGGT
```

图 1 棉花 *arf1* 基因 5′ 端上游表达调控序列

加框部分为典型启动子保守序列. 在转录起始子结构后面的序列: 阴影部分为外显子, 阴影部分之间非阴影部分为内含子

表 1 本研究所用的引物

用途	引物名称及序列
启动子片段缺失	AF1: 5′-GGGAAGCTTTCCTTTTCTTCCTTCTCAGC-3′
	AF2: 5′-GGGAAGCTTCATGCTTGGGATACTCTGAAA-3′
	AF3: 5′-GGGAAGCTTCCATGAAAAGGGGAGACACA-3′
	AF4: 5′-CCCAAGCTTTGCCAAGCCCAAGACAAA-3′
	AR1: 5′-CCCTCTAGAAGAGCCGATATTACCACCACTAC-3′
	AR2: 5′-CCCTCTAGACGTTGCGATGCCCTTTGATTAG -3′
GUS 基因扩增	GF1: 5′-GGGCAGGCCAGCGTATCGTG-3′
	GR1: 5′-CCCGTTGACTGCCTCTTCGCT-3′

之间具有大量富含 AT 序列(图 1). 在−813 bp 处具有典型的 TATA 盒结构(图 1), 在−844 bp 和−854 bp 处具有两个典型 CCAAT 盒(图 1). 在−1126 bp 处具有一个 14 bp 典型的 GC 盒, 在−1670~−1624 这段 46 bp 的特殊序列中, 包含有 10 个反向重复序列和 4 个正向重复序列(图 2(a)), 这段序列可连续构成 7 个 *Taq* Ⅰ和 7 个 *Eco*RⅤ酶的识别位点. 根据这些特异序列的分布, 可将 *arf1* 核心启动子定位在−639~−854 bp 之间. 在核心启动子上游还有一个典型的 GC box 和一个特殊的回文结构序列, 其下游存在一个具有替换剪接的内含子. 为研究上下游这些特异序列的作用, 我们根据这些特征设计了 4 个启动子片段缺失突变体(图 2(a)): A1: 全长为 2292 bp 的启动子片段, 包括 5′ 端非翻译序列中的内含子序列、核心启动子、GC 盒、上游 46 bp 回文序列和远上游序列(图 2(a)); A2: 全长为 1562 bp 的启动子片段, 缺失掉 A1 中的远上游序列和 46 bp 回文序列(图 2(a)); A3: 全长为 819 bp 的缺失掉 A2 中的内含子序列; A4: 全长为 390 bp 的核心启动子, 即缺失掉 A3 中的 GC 盒序列(图 2(a)).

2.2 *Arf1* 基因启动子片段缺失及 4 种植物表达载体构建

用反向引物 AR1 与正向引物 AF1, AF2, 反向引物 AR2 与正向引物 AF3 和 AF4 组成引物对, 采用高

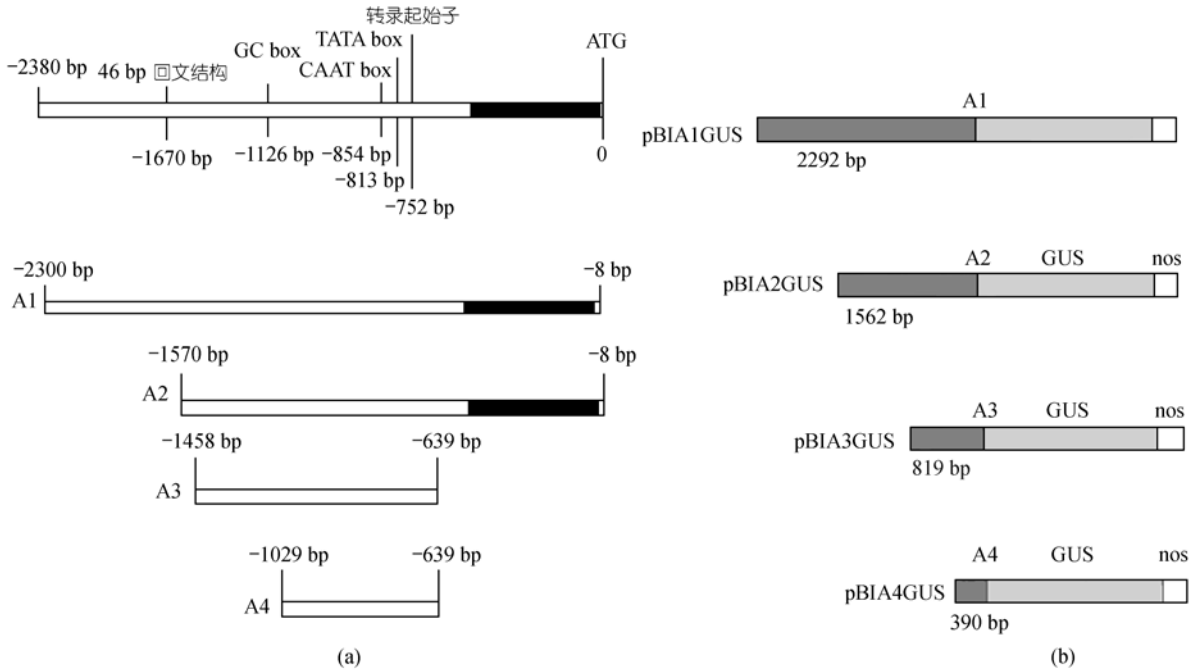

图 2　*Arf1* 启动子结构特征示意图和 4 种植物表达载体的构建示意图

(a) *Arf1* 启动子结构特征和各保守元件分布, 黑色部分为内含子区域. A1 ~ A4 分别示 4 个 5′ 端片段缺失突变体. (b) A1 ~ A4 定向替换 pBI121 上的 CaMV35S 启动子并与 GUS 基因融合后形成 4 个植物表达载体 pBIA1GUS, pBIA2GUS, pBIA3GUS 和 pBIA4GUS

保真 Taq 酶从棉花基因组中扩增出了 A1, A2, A3 和 A4 四个启动子片段. 克隆、测序表明 4 个 PCR 扩增启动子片段的序列完全正确. 通过分别定向替换 pBI121 上的 CaMV35S 启动子, 与 GUS 基因融合, 构建了 4 个植物表达载体: pBIA1GUS, pBIA2GUS, pBIA3GUS 和 pBIA4GUS (图 2(b)). 再用 AF1, AF2, AF3, AF4 和 GUS 基因内部特异引物 GR1 组成引物对, PCR 鉴定各个构建好的植物表达载体, 结果完全正确.

2.3　花粉管通道法介导的转基因棉花植株的获取

将pBIA1GUS, pBIA2GUS, pBIA3GUS和pBIA4-GUS等 4 个植物表达载体用子房注射法导入棉花品种Y18 中, 共注射约 1 万多朵花, 共获得 5.22 kg T_0代种子, 各个载体获得的种子数如表 2 所示. 在海南高密度种植 pBIA1GUS, pBIA2GUS, pBIA3GUS 和 pBIA4GUS 4 个载体转基因T_0代材料. 出苗后, 经卡那霉素 3 轮筛选鉴定, 共获得抗卡那霉素阳性植株如表 2 所示. 从各卡那霉素抗性阳性植株的叶片中提取 DNA, 用GUS基因的两条特异引物GF1 和GR1 扩增, 结果如表 2 和图 3 所示.

2.4　PCR 阳性植株 GUS 组织化学分析

选取 PCR 阳性植株的各种器官进行 GUS 组织化学分析, 结果表明: *arf1* 基因 4 个启动子 A1, A2, A3 和 A4 在棉花根和茎中几乎不表达; 在叶中表达强度较弱; 在棉花的蕾、花和铃中强烈表达(图 4(a)). 它们各自在棉花生殖器官中表达特征是: A2 在整个生殖器官蕾、花、铃中表达量最高(图 4A), A1 次之, A3 在棉花花瓣、子房、胚珠等组织中 GUS 活性很低, 其他部位与 A2 相似, A4 的表达谱与 A3 相同, 但强度有所减弱.

2.5　转基因棉株 GUS 荧光定量分析

根据 GUS 染色结果, 从每一种载体的 GUS 阳性植株中选取 4 株进行 GUS 荧光定量分析. 结果表明: 以 pBI35SGUS 的 GUS 活性为对照, 在棉花的生殖器官中, pBIA4GUS 的 GUS 活性增加了 2.6 倍, pBIA3GUS 增加了 3.1 倍, pBIA2GUS 增加了 4.5 倍, pBIA1GUS 增加了 4.0 倍(表 3, 图 4(b)). 在棉花叶中, pBI35SGUS 的 GUS 活性是 pBIA1GUS 的 6.3 倍, pBIA2GUS 的 6.6 倍, pBIA3GUS 的 14.7 倍, 是

表 2 转基因后代阳性结果统计表[a)]

载体名	注射棉花/朵	收获种子/kg	粒数/万	Kana 抗性阳性植株	PCR 阳性植株	GUS 阳性植株	转化率/%
pBIA1GUS	3000	1.42	1.4	14	14	14	0.11
pBIA2GUS	2950	1.4	1.4	13	13	13	0.1
pBIA3GUS	2700	1.3	1.3	6	6	6	0.05
pBIA4GUS	2500	1.1	1.1	4	4	4	0.04

a) 注射后蕾铃脱落率为 60%; 籽指约为 10 g

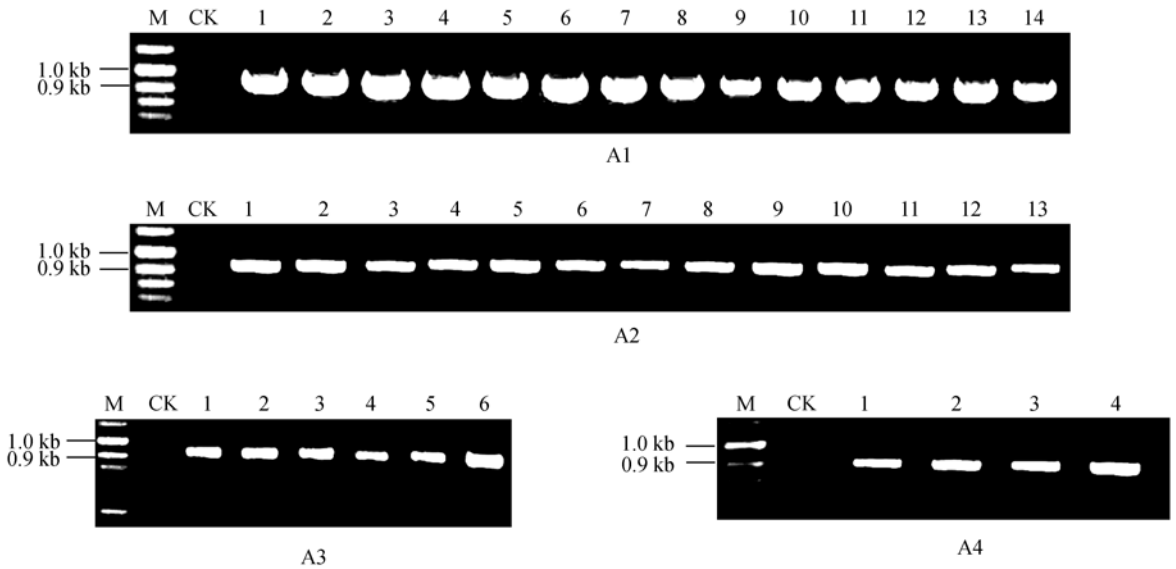

图 3 Kana 抗性植株 GUS 基因 PCR 检测结果

A1~A4 分别示 4 个植物表达载体 pBIA1GUS, pBIA2GUS, pBIA3GUS 和 pBIA4GUS 转化棉花后所获得的 Kana 抗性植株, 用 GF1/GR1 引物对 PCR 扩增的结果

表 3 *Arf1* 和 35S 启动子在棉花各组织中的 GUS 活性

	pBI35SGUS	pBIA1GUS	pBIA2GUS	pBIA3GUS	pBIA4GUS
花	1432±132.7	6400±550.3	6497±486.7	4493±519.8	3737±400.1
纤维	1944±156.8	4452±330.1	4508±304.1	3859±316.6	2955±259.4
铃壳	1356±131.4	4203±410.5	4639±321.9	3751±345.4	2879±266.5
叶	5987±450.5	806±69.2	894±53.5	407±50.1	309±21.8

a) 各数据为 4 个转基因植株同一组织的平均值和标准差, 单位为pmol(min • μg^{-1}蛋白)

pBIA4GUS 的 19.4 倍(表 3, 图 4(b)).

2.6 转基因棉株的 Southern blot

从各载体的转基因植株中选取 GUS 活性最强的单株, pBIA1GUS-8, pBIA2GUS-11, pBIA3GUS-1, pBIA4GUS-2, 大量提取基因组 DNA, 并用 *Eco*R Ⅰ 过夜充分消化基因组 DNA. 以 GUS 基因特异引物 GF1 和 GR1 扩增的 GUS 内部 910 bp 特异片段为探针进行地高辛标记. Southerm blot 结果如图 5 所示, 结果显示, 各个载体均以多拷贝形式整合在棉花基因组中.

3 讨论

3.1 *Arf1* 基因启动子的表达特异性元件和表达增强元件的分布和定位

通常情况下, 一个特异表达基因的启动子至少应该具有转录起始子, TATA box, CAAT box和GC box这 4 种特异元件的一种, 但同时具有这四种元件的启动子非常罕见[13]. 另外, 很多研究表明, 内含子

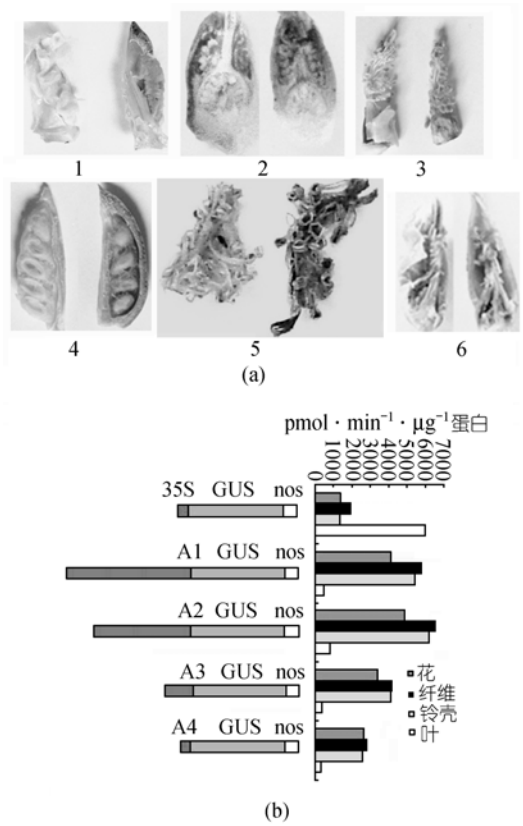

图 4　*Arf1* 启动子驱动 GUS 基因在棉花各组织中表达分析

(a) 每幅图的左边为未转基因棉花对照 GUS 染色, 右边为转基因棉花 GUS 染色. 1~5 示 *arf1* 基因启动子 A2 在棉花中驱动 GUS 基因强烈表达的组织化学染色, 1 示幼铃; 2 示幼蕾; 3 示花; 4 示棉铃; 5 示花丝. 6 示 *Arf1* 基因最小启动子 A4 在花中驱动 GUS 基因表达的组织化学染色. (b) 以 CaMV35S 启动子为对照, *arf1* 各启动子片段在棉花各组织中驱动 GUS 基因荧光定量表达分析

对基因的表达具有重要调控作用[13]. 有趣的是, 在 *arf1* 启动子中, 不仅同时包含有转录起始子, TATA box, CAAT box和GC box这四个特异性元件, 而且, 其下游−8 ~ −639 这段序列中还含有一个内含子, 这些信息显示: 该启动子表达谱和表达强度方面具有独特性.

对 A1, A2, A3 和 A4 四个 *arf1* 启动子缺失突变体的转基因后代进行 GUS 染色和荧光定量分析结果表明: A1 和 A2 的表达谱和表达强度比较相似, 它们在棉花的整个生殖器官中都能驱动 GUS 基因高效表达, A1 和 A2 两者区别在于−1570 ~ −2300 这个含有 46 bp 回文结构的区域. 结果显示, 该区域并不能进一步提高 GUS 基因的表达活性, 说明这段序列对基因表达

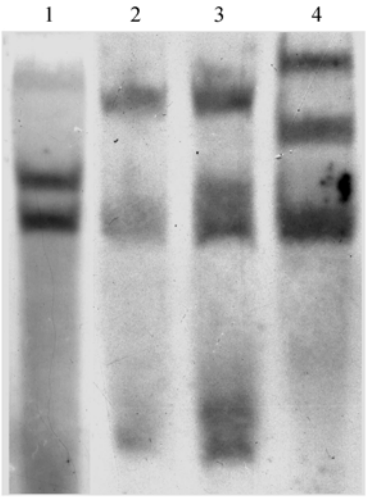

图 5　GUS 基因在棉花基因组中的整合分析.

1~4 分别示 pBIA1GUS-11, pBIA2GUS-1, pBIA3GUS-2 和 pBIA4GUS-5 四株转基因棉花 GUS 基因 Southern blot 分析

活性没有增强作用. A3 和 A4 启动子在棉花的蕾壳、柱头、花药、铃壳和纤维中驱动 GUS 活性很高, 但花瓣、子房、胚珠中 GUS 活性很低, 这说明−8 ~ −639 这段含有内含子序列的区域中具有增强该启动子在棉花花瓣、子房、胚珠等组织中表达的元件, 而且, A3 的 GUS 活性是 A4 的 1.3 倍, 说明 −1029 ~ −1456 这段含有 GC box 序列的区域具有增强该启动子在棉花生殖器官中表达强度的调控元件, 因此, 我们可以将 *arf1* 基因的核心启动子定位于−8 ~ −639 bp 之间, 其下游内含子序列和上游调控序列能够特异增强该启动子在生殖器官的特定组织中表达.

3.2　棉花 *Arf1* 启动子的应用价值

BT毒蛋白基因已经广泛应用在植物抗虫基因工程中, 杀虫基因在植物体内的“开”和“关”、表达量的“多”和“少”, 以及在“何地”和“何时”表达等, 完全根据害虫出现的时间、地点和多少来决定, 这是第二、三代植物抗虫基因工程开发及生物安全的核心内容和关键技术[14]. 启动子在基因表达调控中起关键性作用, 它在很大程度上决定目的基因表达的时间、空间和强度[15~17]. 目前, 植物基因工程广泛应用的启动子是组成型启动子, 它们驱动外源基因在植物各种组织和所有发育阶段表达[18,19], 这无

疑增加了植物的代谢负担, 并造成物质和能量的巨大浪费, 往往还会引起植物形态发生改变, 甚至影响植物生长发育[20,21]. 因此, 采用特异性启动子取代组成型启动子, 使外源基因能够定时、定点、定量地在植物中表达是植物基因工程研究的重要内容, 这就需要从主要农作物中分离诱导特异性启动子和组织特异性启动子. 通过鉴定决定它们特异性的元件, 并将各种特异元件组装起来形成一种能定时、定量和定点驱动目的基因表达的复合启动子, 以满足人们特别的需要.

对棉花而言, 害虫对其根和茎几乎不构成威胁, 虽然害虫取食棉叶, 但对产量影响不大, 重大的直接经济损失在于害虫对蕾、花、铃等生殖器官地危害. 根据害虫危害规律设计杀虫基因在棉花蕾、花、铃中高效表达, 在叶中适量表达, 在根、茎中不表达, 是抗虫棉进一步创新的重要课题. 只有利用棉花生殖器官优势表达启动子替换 CAMV35S 启动子, 才能实现这一目标. 我们的试验结果显示, 与 CaMV35S 相比, *arf1* 在棉花生殖器官中的表达量远远高于 CaMV35S 启动子, 在棉花叶中的表达量低于 CaMV35S 启动子, 但仍有适量表达, 在棉花的根和茎中几乎不表达. 因此, 可以利用 *arf1* 基因的启动子替代 CaMV35S 启动子驱动杀虫基因在棉花中表达, 以解决转基因抗虫棉“前期抗虫性高, 后期抗虫性下降”的实际问题. 当然, 在生产上, 不同的年份虫情不同, 如何使杀虫基因在害虫大爆发的年份多表达, 在害虫不爆发的年份不表达, 使之既能完全满足生产需要, 又能减少能量浪费和代谢负担, 这需要在 *Arf1* 启动子中加上诱导型启动子元件, 如除草剂等化学药物诱导表达元件, 所以, 棉花组织特异性和诱导特异性启动子元件地分离和综合利用是棉花分子设计的重要内容.

参 考 文 献

1 郭三堆, 崔洪志, 夏兰芹, 等. 双价抗虫转基因棉花研究. 中国农业科学, 1999, 32(3): 1~7

2 Odell J T, Nagy F, Chua N H. Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. Nature, 1985, 313(28): 810~812[DOI]

3 贾士荣, 郭三堆, 安道昌. 转基因棉花.北京: 科学出版社, 2001. 45~47

4 夏兰芹, 郭三堆. Bt杀虫基因在转基因双价抗虫棉中的整合与遗传稳定性. 科学通报, 2001, 46(7): 565~568[摘要] [PDF]

5 张天真, 唐灿明. 转Bt基因抗虫棉品种的推广利用与棉铃虫抗性的治理. 科学通报, 2000, 45(2): 119~127 [PDF]

6 Lee M H, Min M K, Lee Y J, et al. ADP-Ribosylation factor 1 of Arabidopsis plays a critical role in intracellular trafficking and maintenance of endoplasmic reticulum morphology in Arabidopsis. Plant Physiol, 2002, 129(4): 1507~1520[DOI]

7 Wing R A, Frisch D, Yu Y. An integrated analysis of the genetics, development, and evolution of the cotton fiber. 2000, GenBank Accession Number BF272643

8 侯 磊, 肖月华, 李先碧, 等. 棉花洞 A 雄性不育系花药发育的 mRNA 差别显示. 遗传学报, 2002, 29(4): 359~363

9 任茂智, 陈全家, 张 锐, 等. 棉花腺苷酸核糖基化作用因子 1 (*arf1*)的结构特征、替换剪接和遗传表达分析. 遗传学报, 2004, 31(8): 850~857

10 Huang J, Ge X, Sun M. Modified CTAB protocol using a silica matrix for isolation of plant genomic DNA. Biotechnique, 2000, 28: 432~434

11 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(13): 3901~3907

12 Cote C, Rutledge R G. An improved MUG fluorescent assay for the determination of GUS activity within transgenic tissue of woody plants. Plant Cell Rep, 2003, 21(6): 619~624

13 Weaver R F. Molecular Biology. New York: McGraw-Hill Companies, Inc., 2002. 281~551

14 Emrich R. Discussion of current status of commercialization of plant biotechnology in the global marketplace. Plant Physiol, 2003, 160: 727~734

15 Komarnytsky S, Borisjuk N. Functional analysis of promoter elements in plants. Genet Eng (N Y), 2003, 25: 113~141

16 Muller F, Tora L. The multicoloured world of promoter recognition complexes. EMBO J, 2004, 23(1): 2~8[DOI]

17 Hochheimer A, Tjian R. Diversified transcription initiation complexes expand promoter selectivity and tissue-specific gene expression. Genes Dev, 2003, 17(11): 1309~1320[DOI]

18 Lam E. Analysis of tissue-specific elements in the CaMV 35S promoter. Results Probl Cell Differ, 1994, 20: 181~196

19 Sunilkumar G, Mohr L, Lopata F E, et al. Developmental and tissue-specific expression of CaMV 35S promoter in cotton as revealed by GFP. Plant Mol Biol, 2002, 50(3): 463~474[DOI]

20 Battraw M J, Hall T C. Histochemical analysis of CaMV 35S promoter-beta-glucuronidase gene expression in transgenic rice plants. Plant Mol Biol, 1990, 15(4): 527~538[DOI]

21 de Mesa M C, Santiago-Domenech N, Pliego-Alfaro F, et al. The CaMV 35S promoter is highly active on floral organs and pollen of transgenic strawberry plants. Plant Cell Rep, 2004, 23(1-2): 32~38