

拟南芥维管组织特异性启动子的人工构建及活性检测

刘石娟*, 王雪

曲阜师范大学生命科学学院, 山东曲阜273165

摘要: 利用组织特异性启动子驱动外源基因在维管中特异表达, 可以更有效地发挥目的基因防治病虫害的作用。在本研究中, 将维管组织特异性元件序列的串联拷贝与拟南芥蛋白酪氨酸磷酸酶1基因的缺失启动子融合, 然后通过GUS报告基因检测串联拷贝及融合启动子活性。GUS组织化学染色结果表明组织特异性元件的串联拷贝能够显著提高启动子活性, 融合启动子在转基因拟南芥维管组织中特异性高效表达。GUS酶活分析和QRT-PCR实验进一步证实该融合启动子的高表达活性, 从而为抗维管束病害植物基因工程提供优良的调控元件。

关键词: 启动子; 顺式作用元件; 组织特异性; 维管组织

植物维管组织由木质部和韧皮部组成, 用于输送水分、矿物质和有机养料, 同时也是许多植物病虫害的直接侵害目标。马铃薯青枯病、棉花黄枯萎病、香蕉枯萎病等细菌和真菌性维管束病害的病原物主要通过寄主维管束蔓延而进一步扩展到其他部位, 导致植株死亡造成严重的产量损失(Czymmek等2007; Tsuchiya 2004), 取食维管组织汁液的蚜虫等虫害也对农业生产产生严重危害(Bhatia等2011)。由于常规育种进展缓慢, 加之维管束病害难以用药剂防治, 因而至今仍为生产中亟待解决的问题。基因工程技术能够将外源基因导入受体植物以提高植株对病虫害的抗病性, 具有目标明确、育种周期短和效率高等优点, 目前已成为抗病育种的有效技术。利用维管组织特异性启动子调节目的基因在维管组织中高效特异地表达, 可以更有效地发挥目的基因防治病虫害的作用, 具有重要的实践意义(Sadeghi等2007; Saha等2006; Nagadhara等2003; Graham等1997)。

目前从病毒、细菌和植物中已分离鉴定了多个维管组织特异性启动子。例如, 竹节花(*Commelina diffusa*)黄斑驳病毒CoYMV启动子、水稻(*Oryza sativa*)东格鲁杆状病毒RTBV启动子、椰树(*Cocos nucifera*)叶腐烂病毒CFDV启动子和小麦(*Triticum aestivum*)矮缩病毒WDV启动子均来源于植物病毒并驱动外源基因在植物维管组织中特异表达(Dinant等2004; Rohde等1995; Bhattacharyya-Pakrasi等1993; Medberry等1992)。来源于发根农杆菌(*Agrobacterium rhizogenes*) Ri质粒的*RolC*启动子也是一个维管组织特异性启动子(Yokoyama等1994)。在植物中发现的维管组织特异性启动子有拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) *AtSUS1*和*AtHSPR*启动子、

玉米(*Zea mays*) *Sh1*启动子、水稻*RSs1*启动子和柑橘(*Citrus reticulata*) *CsSUS1*启动子等(Zhang等2014; Singer等2011; Martin等1993; Wang等1992; Yang和Russell 1990)。

尽管目前已鉴定了多个维管组织特异性启动子, 但真正应用于转基因研究领域的启动子还不多, 植物基因组中的维管组织特异性启动子的功能还有待于分析和鉴定。我们在前期研究中利用启动子5'端系列缺失实验发现, 拟南芥*Atlg71860*基因(protein tyrosine phosphatase 1, *AtPTP1*)的430 bp的缺失启动子(-275~+155 bp)主要在维管组织中表达(Liu等2015)。启动子序列分析发现, -275~-223 bp之间52 bp的DNA区段含有多个与维管组织特异性表达相关的顺式作用元件, 因此预期该段序列能够提高融合启动子驱动外源基因在维管组织中的表达活性。为进一步利用以上启动子片段, 人工合成该片段的串联拷贝, 并与430 bp的*AtPTP1*缺失启动子连接以构建融合启动子。然后通过GUS组织化学定位、荧光定量分析和QRT-PCR等实验分析报告基因的表达水平, 鉴定该融合启动子在维管组织中的表达活性, 为抗维管束病害植物基因工程提供可供选择的维管组织特异性高效表达启动子和元件。

材料与方法

1 材料与试剂

本实验所用拟南芥[*Arabidopsis thaliana* (L.)

收稿 2016-08-15 修定 2016-11-13

资助 国家自然科学基金(31670270和31200196)和山东省自然科学基金(ZR2011CQ016)。

* 通讯作者(E-mail: sjliu@mail.qfnu.edu.cn)。

Heynh]为哥伦比亚生态型。大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) GV3101与植物表达载体pSTART均为本实验室保存。

PCR扩增用EasyTaq DNA聚合酶和FastPfu DNA聚合酶、pEasy-Blunt克隆载体、T4 DNA连接酶以及DNA分子量标准物等购自北京TransGen Biotech公司。限制性内切酶HindIII、XbaI和SpeI等购自Thermo公司。X-Gluc、4-MU和4-MUG等购自Sigma公司。胶回收试剂盒和质粒提取试剂盒等其他主要药品、生化试剂购自上海Sangon公司。

2 *AtPTP1*基因启动子序列分析

通过启动子在线分析软件PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) (Lescot等2002)和PLACE (<http://www.dna.afrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>) (Higo等1999)并结合人工手动搜索方法分析预测*AtPTP1*基因启动子的组织特异性元件。

3 植物表达载体的构建

根据*AtPTP1*基因启动子序列设计特异引物AtPTP1-F430: 5'CCCACTGTAGTTTTTCTGTGACGTTGC3'; AtPTP1-R430: 5'GACCGATTGACGGCGGGATCTAAC3'。采用CTAB法提取野生型拟南芥基因组DNA, 利用FastPfu PCR高保真酶以AtPTP1-F430/AtPTP1-R430引物对扩增430 bp的*AtPTP1*缺失启动子序列。PCR扩增体系为20 μ L, 反应条件为: 95°C预变性3 min; 94°C变性30 s, 53°C退火30 s, 72°C延伸45 s, 30个循环; 最后72°C延伸6 min。PCR扩增产物连接到克隆载体pEasy-Blunt上, 酶切和测序验证克隆的*AtPTP1*缺失启动子序列与TAIR网站注释的序列一致性。经验证正确后, HindIII/XbaI双酶切以上克隆载体和pSTART载体质粒, 回收目的片段。然后利用T4 DNA连接酶将*AtPTP1*缺失启动子片段与pSTART载体DNA片段连接, 筛选获得pPTP_{430pro}-GUS启动子植物表达载体。因为克隆载体pEasy-Blunt目的片段插入位点前含有HindIII和SpeI等酶切位点序列, 因此pPTP_{430pro}-GUS载体的*AtPTP1*启动子片段前端存在HindIII和SpeI等酶切位点序列, 从而方便后续的DNA片段连接实验。

人工合成两个拷贝的52 bp的*AtPTP1*基因启动子序列, 5'AAGCTTCCCACTGTAGTTTT TTCTGTGACGTTGCCCATCTTTTTTTTATAATGATGACCCACTGTAGTTTTTCTGTGACGTTGCCATCTTTTTTTTATAATGATGA $\overline{\text{ACTAGT}}$ 3', 两端添加HindIII和SpeI酶切位点, 连接到克隆载体pEasy-Blunt上, 经酶切和测序验证正确后HindIII/SpeI双酶切以上载体和pPTP_{430pro}-GUS植物表达载体, 回收目的片段后经T4 DNA连接酶将合成的串联拷贝与430 bp的*AtPTP1*启动子相连, 构建成pEnPTP_{430pro}-GUS启动子植物表达载体。

4 农杆菌介导的拟南芥遗传转化

利用CaCl₂冻融法将已验证的重组pPTP_{430pro}-GUS和pEnPTP_{430pro}-GUS载体质粒分别转化根癌农杆菌GV3101感受态细胞, 吸取100 μ L已转化农杆菌菌液均匀地涂布于含有卡那霉素和利福平的YEP固体培养基上, 于28°C培养箱中倒置培养2~3 d。菌液PCR筛选获得阳性克隆。将野生型拟南芥花序浸入含有阳性农杆菌菌液的转化介质中, 利用浸花法转化拟南芥。分别收获种子在含有卡那霉素的1/2MS平板上进行T₁代筛选, 并通过PCR鉴定转基因阳性植株。再次收获种子后进行3:1筛选阳性苗, 直至筛选到T₃代纯系。

5 GUS组织化学染色分析

GUS组织化学染色参考前人实验方法(Jefferson等1987)。配制GUS染色液(50 mmol·L⁻¹ 磷酸钠缓冲液pH 7.0、10 mmol·L⁻¹ EDTA、0.1% Triton X-100、2 mmol·L⁻¹ 铁氰化钾、2 mmol·L⁻¹ 亚铁氰化钾、1 mmol·L⁻¹ X-Gluc), 将待测植物组织浸泡于GUS染液并置于37°C培养箱中染色12 h。先后用50%、70%、100%的乙醇漂洗样品, 每次浸泡5 min。最后加入100%乙醇浸泡直至完全脱色, 然后在体视显微镜下观察实验结果并拍照记录。

6 GUS活性荧光定量测定

分别收集5株染色情况基本一致、能够代表启动子活性的转PTP_{430pro}:GUS和EnPTP_{430pro}:GUS基因拟南芥幼苗, 液氮速冻。将已经速冻的转基因拟南芥幼苗研磨成粉状, 提取GUS蛋白, 参考前人的方法计算样品中蛋白质含量(Bradford 1976)。根据Jefferson等(1987)的荧光测定法测定和计算GUS活性。以每分钟水解4-MUG生成4-MU的酶

量作为一个酶活力单位, *GUS*基因表达活性以每毫克蛋白的酶活力来计算。

7 QRT-PCR检测*GUS* mRNA表达水平

分别收集转 $PTP_{430pro}:GUS$ 和 $EnPTP_{430pro}:GUS$ 基因拟南芥幼苗置于液氮中研磨, 使用Trizol试剂提取总RNA。取10 μ g纯化后的总RNA进行RT-PCR反应, 合成的cDNA 10倍稀释后作为实时荧光定量PCR反应的模板。设计*GUS*基因荧光定量PCR引物5'TGGCCTGGCAGGAGAACT3'和5'CGTATC-CACGCCGTATTTCG3', 内参基因*ACTIN2*的荧光定量PCR引物为5'TCCCTCAGCACATTCCAG-CAGAT3'和5'AACGATTTCCTGGACCTGCCT-CATC3'。利用QRT-PCR检测*GUS*基因在转基因拟南芥幼苗中的表达水平, 每个实验重复3次。取稀释后的cDNA模板2 μ L, 加入SYRB Premix Ex Taq、基因特异上游及下游引物等成分, 在荧光定量PCR仪上进行扩增和检测, 通过溶解曲线和扩增曲线确定引物的特异性。以*ACTIN2*作为内参基因, 采用 $2^{-\Delta\Delta C_t}$ 算法进行外源基因的相对定量表达分析。

实验结果

1 *AtPTP1*启动子维管组织特异性元件分析

我们利用启动子缺失实验证实了578 bp的*AtPTP1*启动子主要在维管组织和花粉等组织中表达(Liu等2015), 尽管不能代表*AtPTP1*是一个维管组织特异性基因(*AtPTP1*也可能并不是一个维管组织特异性基因), 但是可以推知该启动子序列中可能含有与维管组织特异性表达的DNA元件。我们利用启动子在线分析软件和人工手动搜索的方法分析和预测578 bp的*AtPTP1*启动子序列中的维管组织特异性元件。通过以上方法, 鉴定出了多个与维管组织特异性表达相关的顺式作用元件(图1)。在这些调控元件中, 有3个元件位于-275~-223 bp的*AtPTP1*基因启动子序列上, 它们分别是*as-1*元件(TGACG)、OBP1结合位点(CTTT/AAAG)和*as-2*元件(TATAATGATG)。另有一个*as-1*元件位于*AtPTP1*基因的翻译起始位点附近。除了以上元件外, 在*AtPTP1*启动子的转录起始位点附近还发现了3个维管组织特异性表达调控元件NtBBF1/Dof

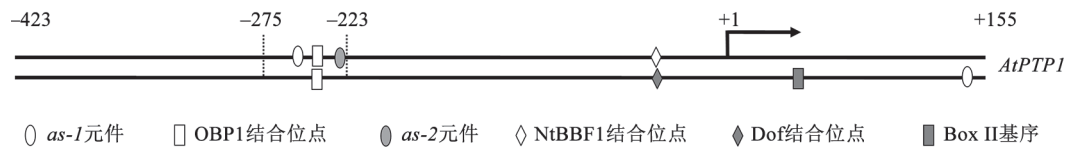


图1 拟南芥*AtPTP1*启动子中与维管组织特异性表达相关的顺式作用DNA元件示意图

Fig.1 The location of *cis* elements associated with vascular-specific expression within the *AtPTP1* promoter
箭头代表*AtPTP1*基因的转录起始位点和转录方向。数字代表*AtPTP1*启动子的5'端各起始位点与转录起始位点之间的距离。

结合位点(ACTTTA/TAAAGT)和Box II基序(TGG-CCCC) (图1)。以往研究表明这些顺式调控元件能够增强外源基因在维管组织中的表达水平(Takano等2013; Kumar等2012; Kim等2010; Saha等2007; Baumann等1999; Guevara-Garcia等1999; Lam等1989)。

2 融合启动子植物表达载体构建

PCR扩增获得*AtPTP1*基因翻译起始位点上游430 bp的启动子区段, 连接至克隆载体pEasy-Blunt上。酶切和测序验证克隆片段与TAIR网站注释的DNA序列信息完全一致。*HindIII*和*XbaI*双酶切重组子, 回收*AtPTP1*启动子片段并定向插入pSTART载体, 使之与*GUS*基因融合, 构建植物表达载体

pPTP_{430pro}-GUS (图2)。同时人工合成两个拷贝的52 bp的*AtPTP1*基因启动子片段, 两端引入*HindIII*和*SpeI*酶切位点。最终经*HindIII*/*SpeI*双酶切后插入到pPTP_{430pro}-GUS载体的*AtPTP1*启动子上游, 与其连接获得融合启动子及相应的pEnPTP_{430pro}-GUS植物表达载体(图2)。

将重组质粒pPTP_{430pro}-GUS和pEnPTP_{430pro}-GUS分别转化大肠杆菌, 经菌液PCR检测后扩繁阳性克隆, 分别提取质粒用*HindIII*和*XbaI*进行双酶切鉴定, 酶切电泳结果显示产生大约540 bp和630 bp的特异性DNA条带, 与预期的酶切片段长度一致(图3)。以上实验结果表明pPTP_{430pro}-GUS和pEnPTP_{430pro}-GUS植物表达载体构建成功。

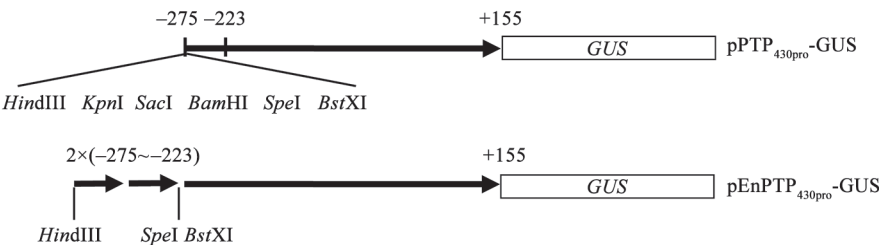


图2 pPTP_{430pro}-GUS和pEnPTP_{430pro}-GUS植物表达载体结构示意图
Fig.2 The diagram of plant expression vectors pPTP_{430pro}-GUS and pEnPTP_{430pro}-GUS
数字代表*AtPTP1*启动子的不同区段与转录起始位点之间的距离。箭头代表*AtPTP1*启动子不同区段。

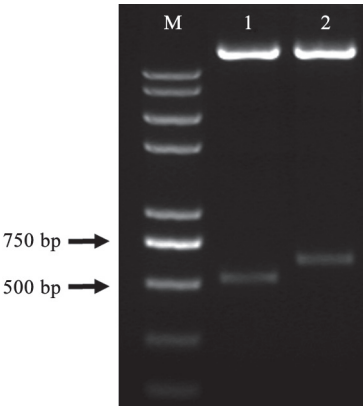


图3 植物表达载体pPTP_{430pro}-GUS和pEnPTP_{430pro}-GUS的酶切鉴定

Fig.3 Restriction enzyme digestion analysis of pPTP-
430pro-GUS and pEnPTP_{430pro}-GUS
1: pPTP_{430pro}-GUS HindIII/XbaI酶切; 2: pEnPTP_{430pro}-GUS HindIII/XbaI酶切; M: Trans2K Plus II DNA分子量标准物。

3 组织化学染色分析*EnPTP₄₃₀*融合启动子活性

将植物表达载体pPTP_{430pro}-GUS和pEnPTP_{430pro}-GUS分别转化根癌农杆菌, 利用浸花法侵染拟南芥, 最终分别筛选获得各10株左右T₃代转基因纯合株系。对以上T₃代转基因植株进行GUS组织化学染色分析, 以确定染色情况基本一致、能够代表启动子活性的转基因株系。组织化学染色结果显示, 分别有6和5株转PTP_{430pro}:GUS和EnPTP_{430pro}:GUS基因纯合株系染色情况基本一致。在这些转基因拟南芥中, PTP₄₃₀启动子和EnPTP₄₃₀融合启动子主要在根、茎、叶和花萼等器官的维管组织中表达。与含有PTP₄₃₀启动子的对照植株相比, 转EnPTP₄₃₀融合启动子拟南芥不同组织的GUS染色明显加深(图4)。以上实验结果表明EnPTP₄₃₀融合启动子是一个维管组织特异性高表达启动子。

4 GUS荧光定量分析*EnPTP₄₃₀*融合启动子活性

分别挑选5株染色情况基本一致的转PTP_{430pro}:GUS和EnPTP_{430pro}:GUS基因株系进行酶活分析。提取转基因拟南芥幼苗的总蛋白, 进行GUS活性的荧光定量分析, 以检测PTP₄₃₀启动子和EnPTP₄₃₀融合启动子的转录活性。GUS荧光定量分析表明转PTP_{430pro}:GUS和EnPTP_{430pro}:GUS基因拟南芥幼苗中的GUS酶活分别为1 163.4和5 157.5 pmol·mg⁻¹·min⁻¹, EnPTP₄₃₀启动子驱动的GUS基因表达水平明显高于PTP₄₃₀启动子(图5)。以上实验结果表明2个拷贝的*AtPTP1*启动子短序列与PTP₄₃₀启动子融合后大大提高了后者的启动活性, 可以作为增强子提高外源基因在维管组织的表达活性。

5 QRT-PCR分析*EnPTP₄₃₀*融合启动子活性

为更准确的测定启动子活性, 我们选取转PTP_{430pro}:GUS和EnPTP_{430pro}:GUS基因拟南芥幼苗为材料, 分别提取总RNA, 采用QRT-PCR进一步检测EnPTP₄₃₀启动子驱动的GUS报告基因的mRNA表达水平。QRT-PCR分析结果显示*AtPTP1*基因启动子短片段串联拷贝能够增强430 bp的*AtPTP1*启动子活性, 两者融合后的EnPTP₄₃₀启动子驱动GUS基因的mRNA表达水平明显高于PTP₄₃₀启动子, 其活性是后者的4.5倍左右(图6)。因此, 本研究从转录水平上进一步证实上述GUS荧光定量测定结果的准确性, EnPTP₄₃₀融合启动子确实是一个维管组织特异性高表达启动子。

讨 论

蚜虫不仅刺吸维管组织汁液, 而且传播多种病毒病, 限制了油菜等经济作物的产量和质量的进一步提高(Koramutla等2016)。茄科劳尔氏菌和尖孢镰刀菌等病原菌在维管组织中繁殖并广泛扩

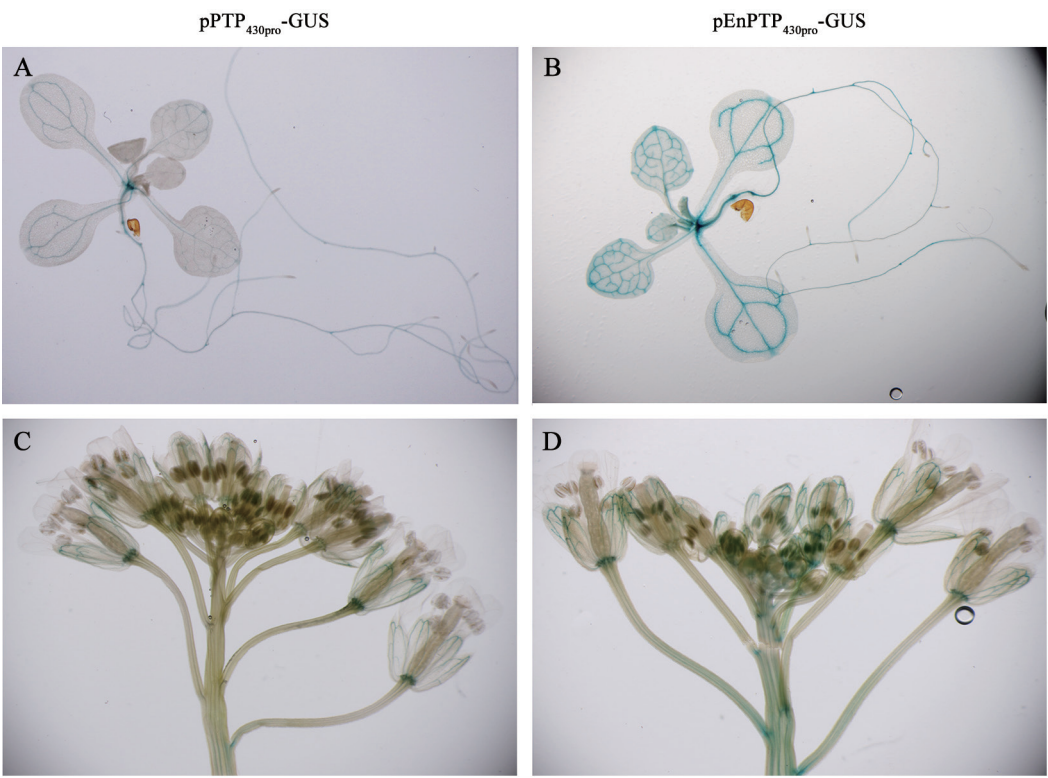


图4 转 $PTP_{430pro}:GUS$ (A, C)和 $EnPTP_{430pro}:GUS$ (B, D)拟南芥的组织化学染色分析
Fig.4 Histochemical localization of GUS activity in transgenic *A. thaliana* plants containing the $PTP_{430pro}:GUS$ (A, C) and the $EnPTP_{430pro}:GUS$ (B, D)

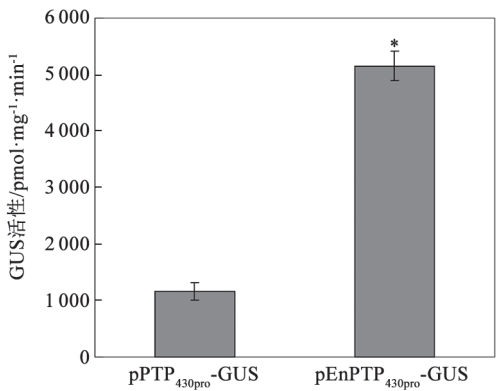


图5 转 $PTP_{430pro}:GUS$ 和 $EnPTP_{430pro}:GUS$ 基因拟南芥幼苗的GUS活性分析

Fig.5 GUS activities in the seedlings of the $PTP_{430pro}:GUS$ and the $EnPTP_{430pro}:GUS$ transgenic *A. thaliana* plants
数据=平均值±标准方差, n=5, *表示显著性差异, t检验 $P \leq 0.05$ 。

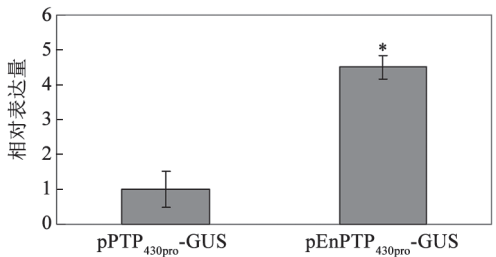


图6 QRT-PCR检测 PTP_{430} 和 $EnPTP_{430}$ 启动子驱动GUS基因在转基因拟南芥幼苗中的相对表达水平

Fig.6 QRT-PCR analysis of relative GUS expression in the seedlings of the $PTP_{430pro}:GUS$ and the $EnPTP_{430pro}:GUS$ transgenic *A. thaliana* plants

数据=平均值±标准误差, n=3, *表示显著性差异, t检验 $P \leq 0.05$ 。

散, 堵塞和破坏维管系统, 最终导致植物枯萎死亡 (Czymmek等2007; Tsuchiya 2004)。尤其是由茄科劳尔氏菌引起的青枯病是一种毁灭性病害, 一旦发生难以控制, 往往造成作物大面积死亡甚至绝

收(Tsuchiya 2004)。对于以上病虫害, 当前主要采用化学药物方法进行防治, 不仅成本高而且化学农药的施用易造成环境污染, 破坏生态平衡。因此培育和利用抗病抗虫品种成为经济有效的途径 (Feng等2004)。在植物基因工程中, 利用组成型启动子如 $CaMV35S$ 启动子驱动外源基因在受体植物

中组成型表达往往会造成营养浪费,同时还会给植物的生长发育带来不良影响。为降低外源基因过量表达对植物的不利影响,最大限度的发挥外源基因的作用,能够驱动外源基因在特定组织和器官中表达的组织特异启动子的研究和应用越来越受到研究者的重视(方彦昊等2015; Wang等2016)。

目前,虽然分离获得了很多组织特异性启动子,但是在植物维管组织中特异表达的启动子还是比较少,而且活性也比较低,在转基因育种实践中的应用并不高。因此植物维管组织高效特异性表达启动子还有待于分离鉴定,或者在现有启动子研究基础上对其改造加以利用。由于启动子的活性主要取决于顺式作用元件的种类和数目(Wang等2016; Hernandez-Garcia和Finer 2014),因此对现有启动子进行改造构建融合启动子时首先需要分析启动子的序列结构、鉴定顺式作用元件,进而利用相关DNA元件构建符合转基因育种需求的组织特异性融合启动子。

在前期研究中,我们发现52 bp的*AtPTP1*启动子区段能够赋予*AtPTP1*缺失启动子在维管组织特异表达的特性(Liu等2015)。利用人工手动搜索和在线软件分析预测这个52 bp的启动子区域可能含有的维管组织特异性调控元件。分析结果表明此区含有多个与维管组织特异性表达相关的DNA元件,包括*as-1*元件、OBP1结合位点和*as-2*元件。*as-1*元件能够增强外源基因在维管组织中特异性表达(Kumar等2012; Guevara-Garcia等1999; Lam等1989)。*as-2*元件和OBP1结合位点与*as-1*元件相互作用,影响其活性(Gomez-Ros等2012; Chen等1996; Zhang等1995; Lam和Chua 1990)。在*AtPTP1*启动子上,*as-1*元件和*as-2*元件、OBP1结合位点紧密相邻(图1),推测三者相互作用,共同调控*AtPTP1*启动子的维管组织表达特性。除了以上元件外,在*AtPTP1*启动子中还发现了NtBBF1/Dof结合位点和Box II基序,这些顺式作用元件均为维管特异性表达调控元件,与基因在维管组织中的表达有着直接关系(Takano等2013; Kim等2010; Saha等2007; Baumann等1999)。

我们在前期研究中还发现,site II元件(-224~-219 bp)抑制了430 bp的*AtPTP1*缺失启动子在花粉和维管等组织中的表达水平(Liu等2015)。当缺失掉-275~-223 bp的DNA区段后(缺失了site II元

件的部分序列),378 bp的*AtPTP1*启动子片段活性增强(Liu等2015)。综合以上实验分析推知,抑制430 bp的*AtPTP1*启动子活性的序列至少应该扩展为含有site II元件的-275~-219 bp的DNA区段。据此我们推测:-275~-223 bp序列需要与-222~-219 bp序列组合形成完整的site II元件才能起抑制作用;当与其他序列进行组合而不能形成site II元件时,可能并不抑制基因表达活性,甚或改变融合启动子的组织表达部位。基于以上分析,我们人工合成52 bp的*AtPTP1*启动子序列的串联拷贝,并与430 bp的*AtPTP1*缺失启动子连接构建融合启动子。利用GUS组织化学染色证实该融合启动子能够在维管组织中特异性高效表达,其活性远高于430 bp的*AtPTP1*缺失启动子,是一个维管组织特异性高表达启动子。以上这种特定DNA序列或元件在不同DNA环境中的作用或活性不同的现象已被多个研究小组证实。例如在转基因拟南芥叶片中,site II元件能够分别赋予*AtCox5b-2* (拟南芥细胞色素C氧化酶亚基基因5b-2)、*AtCox6b-3* (拟南芥细胞色素C氧化酶亚基基因6b-3)和*AtCytC-2* (拟南芥细胞色素C基因2)的启动子特异地只在叶尖、叶脉或整个叶片中表达,在其他组织中的表达也略有不同(Gonzalez等2007)。表明site II元件在不同的DNA环境中作用不同,在*AtCox5b-2*和*AtCox6b-3*启动子中,site II元件与不同的DNA序列相互作用进而抑制了启动子在叶片的其他部位中表达。另有研究者发现ocs元件在*mas1* (甘露碱合成酶基因1)和*mas2* (甘露碱合成酶基因2)启动子片段中的作用也不同(Guevara-Garcia等1999)。例如,在*mas-2BC*启动子片段中ocs元件起增强作用,然而在*mas1BC*启动子片段中却起抑制作用。在本文中,我们还通过GUS荧光定量分析和QRT-PCR实验从mRNA和蛋白水平上分析外源报告基因的表达活性,试验结果表明*EnPTP₄₃₀*融合启动子能够驱动GUS基因高效表达,进一步证明我们获得了维管组织特异高效表达启动子,能够驱动外源基因在维管组织中特异性表达,从而为抗维管束病虫害植物基因工程提供优良的调控元件。

参考文献

- Baumann K, De Paolis A, Costantino P, Gualberti G (1999). The DNA binding site of the Dof protein NtBBF1 is essential for tis-

- sue-specific and auxin-regulated expression of the *rolB* oncogene in plants. *Plant Cell*, 11: 323–333
- Bhatia V, Uniyal PL, Bhattacharya R (2011). Aphid resistance in *Brassica* crops: challenges, biotechnological progress and emerging possibilities. *Biotechnol Adv*, 29: 879–888
- Bhattacharyya-Pakrasi M, Peng J, Elmer JS, Laco G, Shen P, Kaniewska MB, Kononowicz H, Wen F, Hodges TK, Beachy RN (1993). Specificity of a promoter from the rice tungro bacilliform virus for expression in phloem tissues. *Plant J*, 4: 71–79
- Bradford MM (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 72: 248–254
- Chen W, Chao G, Singh KB (1996). The promoter of a H_2O_2 -inducible, *Arabidopsis* glutathione *S*-transferase gene contains closely linked OBF- and OBP1-binding sites. *Plant J*, 10: 955–966
- Czymmek KJ, Fogg M, Powell DH, Sweigard J, Park SY, Kang S (2007). *In vivo* time-lapse documentation using confocal and multi-photon microscopy reveals the mechanisms of invasion into the *Arabidopsis* root vascular system by *Fusarium oxysporum*. *Fungal Genet Biol*, 44: 1011–1023
- Dinant S, Ripoll C, Pieper M, David C (2004). Phloem specific expression driven by wheat dwarf geminivirus V-sense promoter in transgenic dicotyledonous species. *Physiol Plant*, 121: 108–116
- Fang YH, Nan WB, Liang YS, Zhang HM (2015). Plant tissue-specific gene expression system and its applications. *Plant Physiol J*, 51 (6): 797–805 (in Chinese with English abstract) [方彦昊, 南文斌, 梁永书, 张汉马(2015). 植物组织特异性基因表达技术及其应用. *植物生理学报*, 51 (6): 797–805]
- Feng DX, Deslandes L, Keller H, Revers F, Favery B, Lecomte P, Hirsch J, Olivier J, Marco Y (2004). Isolation and characterization of a novel *Arabidopsis thaliana* mutant unable to develop wilt symptoms after inoculation with a virulent strain of *Ralstonia solanacearum*. *Phytopathology*, 94: 289–295
- Gomez-Ros LV, Gabaldon C, Lopez Nunez-Flores MJ, Gutierrez J, Herrero J, Zapata JM, Sotomayor M, Cuello J, Ros Barcelo A (2012). The promoter region of the *Zinnia elegans* basic peroxidase isoenzyme gene contains *cis*-elements responsive to nitric oxide and hydrogen peroxide. *Planta*, 236: 327–342
- Gonzalez DH, Welchen E, Attallah CV, Comelli RN, Mufarreh EF (2007). Transcriptional coordination of the biogenesis of the oxidative phosphorylation machinery in plants. *Plant J*, 51: 105–116
- Graham MW, Craig S, Waterhouse PM (1997). Expression patterns of vascular-specific promoters *RoIC* and *Sh* in transgenic potatoes and their use in engineering PLRV-resistant plants. *Plant Mol Biol*, 33: 729–735
- Guevara-Garcia A, Lopez-Bucio J, Herrera-Estrella L (1999). The mannopine synthase promoter contains vectorial *cis*-regulatory elements that act as enhancers and silencers. *Mol Gen Genet*, 262: 608–617
- Hernandez-Garcia CM, Finer JJ (2014). Identification and validation of promoters and *cis*-acting regulatory elements. *Plant Sci*, 217–218: 109–119
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T (1999). Plant *cis*-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res*, 27: 297–300
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987). GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J*, 6: 3901–3907
- Kim HS, Kim SJ, Abbasi N, Bressan RA, Yun DJ, Yoo SD, Kwon SY, Choi SB (2010). The DOF transcription factor Dof5.1 influences leaf axial patterning by promoting *Revoluta* transcription in *Arabidopsis*. *Plant J*, 64: 524–535
- Koramutla MK, Bhatt D, Negi M, Venkatachalam P, Jain PK, Bhattacharya R (2016). Strength, stability, and *cis*-motifs of *in silico* identified phloem-specific promoters in *Brassica juncea* (L.). *Front Plant Sci*, 7: 457
- Kumar D, Patro S, Ghosh J, Das A, Maiti IB, Dey N (2012). Development of a salicylic acid inducible minimal sub-genomic transcript promoter from Figwort mosaic virus with enhanced root- and leaf-activity using TGACG motif rearrangement. *Gene*, 503: 36–47
- Lam E, Benfey PN, Gilmarin PM, Fang RX, Chua NH (1989). Site-specific mutations alter *in vitro* factor binding and change promoter expression pattern in transgenic plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 86: 7890–7894
- Lam E, Chua NH (1990). ASF-2: a factor that binds to the cauliflower mosaic virus 35S promoter and a conserved GATA motif in *Cab* promoters. *Plant Cell*, 1: 1147–1156
- Lescot M, Dehais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y, Rouze P, Rombauts S (2002). PlantCARE, a database of plant *cis*-acting regulatory elements and a portal to tools for *in silico* analysis of promoter sequences. *Nucleic Acids Res*, 30: 325–327
- Liu SJ, Yue QJ, Zhang W (2015). Structural and functional analysis of an asymmetric bidirectional promoter in *Arabidopsis thaliana*. *J Integr Plant Biol*, 57: 162–170
- Martin T, Frommer WB, Salanoubat M, Willmitzer L (1993). Expression of an *Arabidopsis* sucrose synthase gene indicates a role in metabolization of sucrose both during phloem loading and in sink organs. *Plant J*, 4: 367–377
- Medberry SL, Lockhart BE, Olszewski NE (1992). The commelina yellow mottle virus promoter is a strong promoter in vascular and reproductive tissues. *Plant Cell*, 4: 185–192
- Nagadhara D, Ramesh S, Pasalu IC, Rao YK, Krishnaiah NV, Sarma NP, Bown DP, Gatehouse JA, Reddy VD, Rao KV (2003). Transgenic indica rice resistant to sap-sucking insects. *Plant Biotechnol J*, 1: 231–240
- Rohde W, Becker D, Randles JW (1995). The promoter of coconut foliar decay-associated circular single-stranded DNA directs phloem-specific reporter gene expression in transgenic tobacco. *Plant Mol Biol*, 27: 623–628
- Sadeghi A, Broeders S, De Greve H, Hernalsteens JP, Peumans WJ, Van Damme EJ, Smagghe G (2007). Expression of garlic leaf lectin under the control of the phloem-specific promoter *Asus1* from *Arabidopsis thaliana* protects tobacco plants against the tobacco aphid (*Myzus nicotianae*). *Pest Manag Sci*, 63: 1215–1223
- Saha P, Chakraborti D, Sarkar A, Dutta I, Basu D, Das S (2007). Characterization of vascular-specific *RSs1* and *rolC* promoters for their utilization in engineering plants to develop resistance

- against hemipteran insect pests. *Planta*, 226: 429–442
- Saha P, Dasgupta I, Das S (2006). A novel approach for developing resistance in rice against phloem limited viruses by antagonizing the phloem feeding hemipteran vectors. *Plant Mol Biol*, 62: 735–752
- Singer SD, Hily JM, Cox KD (2011). The *sucrose synthase-1* promoter from *Citrus sinensis* directs expression of the β -glucuronidase reporter gene in phloem tissue and in response to wounding in transgenic plants. *Planta*, 234: 623–637
- Takano M, Haque MA, Odaira S, Nakata K, Sasaki N, Nyunoya H (2013). Overexpression of a tobacco Dof transcription factor BBF1 stimulates the transcription of the tobacco mosaic virus resistance gene *N* and defense-related responses including ROS production. *Plant Biotechnol*, 30: 37–46
- Tsuchiya K (2004). Molecular biological studies of *Ralstonia solanacearum* and related plant pathogenic bacteria. *J Gen Plant Pathol*, 70: 385–387
- Wang MB, Boulter D, Gatehouse JA (1992). A complete sequence of the rice sucrose synthase-1 (*RSs1*) gene. *Plant Mol Biol*, 19: 881–885
- Wang Q, Zhu Y, Sun L, Li L, Jin S, Zhang X (2016). Transgenic Bt cotton driven by the green tissue-specific promoter shows strong toxicity to lepidopteran pests and lower Bt toxin accumulation in seeds. *Sci China Life Sci*, 59: 172–182
- Yang NS, Russell D (1990). Maize sucrose synthase-1 promoter directs phloem cell-specific expression of *Gus* gene in transgenic tobacco plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 87: 4144–4148
- Yokoyama R, Hirose T, Fujii N, Aspuria ET, Kato A, Uchimiya H (1994). The *rolC* promoter of *Agrobacterium rhizogenes* Ri plasmid is activated by sucrose in transgenic tobacco plants. *Mol Gen Genet*, 244: 15–22
- Zhang B, Chen W, Foley RC, Büttner M, Singh KB (1995). Interactions between distinct types of DNA binding proteins enhance binding to *ocs* element promoter sequences. *Plant Cell*, 7: 2241–2252
- Zhang L, Yang T, Li X, Hao H, Xu S, Cheng W, Sun Y, Wang C (2014). Cloning and characterization of a novel *Athspr* promoter specifically active in vascular tissue. *Plant Physiol Biochem*, 78: 88–96

Construction and functional analysis of a synthetic vascular-specific promoter in *Arabidopsis*

LIU Shi-Juan*, WANG Xue

College of Life Sciences, Qufu Normal University, Qufu, Shandong 273165, China

Abstract: Precise control of transgene expression from vascular-specific promoters is preferred for the production of engineered plants with pests and disease resistance. In this study, a synthetic plant promoter was created by combining two copies of the vascular-specific elements with the truncated promoter of the *Arabidopsis* protein tyrosine phosphatase 1 gene. The activity of this synthetic promoter was estimated by using promoter-*GUS* transgene approach. GUS histochemical staining showed that direct repeats of vascular-specific elements caused a large increase in promoter activity and the synthetic promoter directed vascular-specific expression in the transgenic *Arabidopsis thaliana* plants. GUS fluorometric analysis and QRT-PCR assay further confirmed the high activity of the fusion promoter, which provides novel promoter elements for engineering pests and disease resistance in crops.

Key words: promoter; *cis* acting element; tissue-specific; vascular tissue

Received 2016-08-15 Accepted 2016-11-13

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant Nos. 31670270 and 31200196) and the Shandong Provincial Natural Science Foundation (Grant No. ZR2011CQ016).

*Corresponding author (E-mail: sjliu@mail.qfnu.edu.cn).