

大豆种子特异性启动子的克隆及功能分析

付永平,周海涛,王丕武

(吉林农业大学 农学院,吉林 长春 130118)

【摘要】 【目的】从大豆中克隆得到 β -伴球蛋白 α 亚基基因的启动子序列 7 α P,并对其进行功能分析。【方法】利用 PCR 技术从大豆基因组 DNA 中分离 β -伴球蛋白 α 亚基基因启动子序列 7 α P,将其与 GUS 基因融合,构建种子特异性表达载体 p7 α P-GUS,通过根癌农杆菌介导法转化烟草(*Nicotiana tabacum*) NC89,对再生植株进行 PCR、Southern blot 检测和 GUS 组织化学分析。【结果】序列分析表明,7 α P 长度为 1 382 bp,其中含有多种子特异性启动子的序列元件,如 RY 重复序列元件、E-box、SEF1-motif、SEF4-motif、(CA)_n、Dc3 启动子结合因子和 ACGT 序列元件及一些诱导物应答元件。转基因植株的 PCR 和 Southern blot 结果显示,成功地获得了转基因阳性植株;GUS 活性检测表明,仅能在种子中检测到 GUS 活性,而在根、茎和叶等其他组织中均未检测到 GUS 活性。【结论】大豆 β -伴球蛋白 α 亚基基因上游 1 382 bp 片段具有种子特异性启动子功能,7 α P 为种子特异性启动子。

【关键词】 大豆;种子特异性启动子;功能分析;GUS 染色;烟草

【中图分类号】 S565.103;Q785

【文献标识码】 A

【文章编号】 1671-9387(2009)12-0105-07

Cloning and identification of the seed specific promoter from soybean

FU Yong-ping,ZHOU Hai-tao,WANG Pi-wu

(College of Agriculture, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118, China)

Abstract: 【Objective】 This paper aimed to clone and identify the seed-specific promoter of α subunit gene from soybean. 【Method】 In this study, the promoter region of α subunit gene was isolated from the genomic DNA of soybean Jinong 18 by PCR method. The cloned promoter 7 α P was fused to the GUS reporter gene to construct plant expression vector p7 α P-GUS, which was introduced into *Nicotiana tabacum* NC89 via *Agrobacterium*-mediated gene transfer. Analysis of PCR, Southern blot and GUS activities was employed to screen the specific expression. 【Result】 Sequencing analysis showed that the length of the cloned fragment 7 α P was 1 382 bp, GenBank accession No. FJ572966. 7 α P contained all of the motifs, such as RY repeat element, E-box, SEF1-motif, SEF4-motif, (CA)_n, Dc3 and ACGT motif etc. as well as some inductor responder elements, which constituted the seed-specific promoter activity. PCR and Southern blot results showed that the transgenic plants were obtained successfully. GUS activity assays indicated that expression of GUS was active only in seeds, and didn't exist in the other tissues such as roots stems and leaves. 【Conclusion】 The cloned 1 382 bp fragment 7 α P of α subunit gene from soybean is seed-specific promoter.

Key words: soybean; seed-specific promoter; functional identification; GUS staining; tobacco

在农作物品质和产量的基因工程改良中,为了达到改良品质或提高产量的目的,常常需要在组织

细胞中超量或抑制一些基因的表达,而转基因表达的调控主要通过合适的启动子来实现。目前,用于

* [收稿日期] 2009-03-27

[基金项目] 国家转基因专项(J99-13-001);教育部博士点基金项目(20070193005)

[作者简介] 付永平(1981—),女,吉林长春人,博士,主要从事大豆分子育种研究。E-mail: yongpingf@yahoo.com.cn

[通信作者] 王丕武(1958—),男,吉林长春人,教授,博士生导师,主要从事作物遗传育种研究。E-mail: peiwuw@yahoo.com.cn

农作物遗传转化的启动子多属组成型表达启动子(如 CaMV 35S 启动子等^[1]),由于其为组成型表达,故容易对农作物的生长造成不良影响,导致农作物农艺性状较差。随着分子生物学技术的发展,人们已经从农作物中分离到多种组织特异性启动子,如叶^[2]、花^[3]、根^[4]和种子^[5]特异性表达启动子等,从而使外源基因在农作物的特定部位或发育阶段能够产生有用蛋白质或其他代谢产物。种子特异性启动子(Seed-specific promoter)可以控制外源基因在农作物种子中的高效表达,提高目的基因表达产物的有效浓度,最大限度地减少对农作物其他代谢途径的影响。此外,我国主要粮食作物和油料作物如水稻、玉米和大豆等,其主要的食用部位均为种子。因此,种子特异性启动子的研究和应用在定向改良农作物品质性状方面具有重要的理论和实践意义。

β -伴球蛋白是大豆种子贮藏蛋白的主要组成成分,是由 α 、 α' 和 β 3 个亚基组成的三聚体蛋白,占种子总蛋白的 30%^[6]。对 α' 和 β 亚基基因转录调控元件的研究已经十分透彻^[7], α' 亚基基因启动子和 β -亚基基因启动子均具有种子特异性启动子活性,并且 α' 亚基基因启动子的活性很强,但是目前对 α 亚基基因转录调控元件的深入报道还比较少^[8]。为此,本研究利用 PCR 技术,从大豆基因组 DNA 中分离到大豆 β -伴球蛋白 α 亚基基因 1 382 bp 的启动子序列 7 α P,将其与含有 GUS 报告基因的表达载体重组后,利用农杆菌介导法转化烟草,并对植株的种子特异性启动子活性进行了 PCR 和 Southern blot 检测及 GUS 组织化学鉴定,以期进一步将目的基因导入大豆,实现大豆种子特异性表达,从而为大豆品质分子改良的研究和应用奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

试验在吉林农业大学生物技术中心实验室进行。

1.1.1 菌种和质粒 菌种 *E. coli* DH5 α 、植物表达载体 pBI121、根癌农杆菌 EHA105,均由吉林农业大学生物技术中心实验室提供;pMD18-T Vector,购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 植物材料 大豆品种吉农 18,由吉林农业大学生物技术中心实验室提供。

1.1.3 试剂与酶 PCR 扩增试剂、限制性内切酶(*Hind* III、*Bam*H I)、 T_4 DNA 连接酶、DNA Marker DL-2000 分子量标准,均购自 MBI 公司;基因组 DNA 提取试剂盒,购自 TaKaRa 公司;DIG High

Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I,购自 Roche 公司。其他试剂均为国产分析纯。

1.1.4 主要仪器设备 恒温振荡培养箱、低温离心机、移液枪、PCR 仪、电泳仪、凝胶成像仪、光照培养箱、超净工作台、超低温冰箱、pH 酸度计等。

1.2 7 α P 启动子片段的克隆和序列分析

采用改良的 CTAB 法^[9],从大豆中提取大豆基因组 DNA。参照已发表的序列(AB237643),人工设计扩增引物。设计的引物序列为:上游引物 P1:5'- GGG AAG CTT TGC TTG GAT TTG GAC CAG AC-3'(*Hind* III);下游引物 P2:5'- TTT GGA TCC TAG GAT ATT GAA CTA GTT CT-3'(*Bam*HI)。其中划线部分为加入的酶切位点。PCR 扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 8 min;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,68 $^{\circ}$ C 退火 150 s,32 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 min。

PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分离,用 V-gene 凝胶回收试剂盒纯化后连入克隆载体 pMD18-T Vector,连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,通过蓝白斑筛选,挑取白斑提取质粒 DNA,通过 PCR 和酶切鉴定获得重组质粒,将 PCR 和酶切鉴定均正确的重组克隆载体命名为 pMD18-T-7 α P。测序由北京三博远志生物技术有限公司完成,并用 DNASIS 和 DNAMAN 软件对其进行序列分析。

1.3 p7 α P-GUS 种子特异性表达载体的构建

以植物表达载体 pBI121 为基础,用大豆种子特异性启动子 7 α P 替换其上的 CaMV35S 启动子,与 GUS 报告基因融合构建得到重组种子特异性表达载体 p7 α P-GUS。利用 *Hind* III、*Bam*H I 分别双酶切 pMD18-T-7 α P 和 pBI121,并分别回收 pMD18-T-7 α P 小片段和 pBI121 大片段,用 T_4 DNA 连接酶连接,转化大肠杆菌 DH5 α ,然后提取质粒 DNA,经 PCR、酶切和测序鉴定正确后,获得重组种子特异性表达载体 p7 α P-GUS。

1.4 农杆菌介导烟草的遗传转化

制备根癌农杆菌 EHA105 的感受态细胞,通过液氮冻融法^[10]将重组种子特异性表达载体 p7 α P-GUS 转化到农杆菌 EHA105 中,采用农杆菌介导法对烟草 NC89 进行遗传转化。烟草转化参照 Horsch 等^[11]的叶盘法进行。用 100 mg/L 卡那霉素对转化植株进行筛选,转化烟草的筛选培养基为 MS 附加 2 mg/L 6-BA、0.5 mg/L IAA、100 mg/L 卡那霉素、100 mg/L 羧苄青霉素和 100 mg/L 氨苄青霉素;诱导生根培养基为 1/2 MS 附加 100 mg/L 卡那霉素、80 mg/L 羧苄青霉素和 80 mg/L 氨苄青霉素。

1.5 转化再生植株的 PCR 和 Southern 杂交检测

1.5.1 PCR 检测 采用改良的 CTAB 法,从烟草叶片中提取基因组 DNA,将其作为模板,以种子特异性表达载体 p7αP-GUS 为阳性对照,以未转化植株为阴性对照,以 7αP 启动子、*npt* II 基因和 *GUS* 基因的特异性引物进行 PCR 扩增,其中 7αP 引物和 PCR 扩增条件同 1.2。*npt* II 基因和 *GUS* 基因的引物及其序列分别为:*npt* II-S:5'-GGTGGAGAGGCTATTTCG-3',*npt* II-AS:5'-GAACTCGTCAAGAAGGC-3' (退火温度 55 ℃);*GUS*-S:5'-TGTGATATCTACCCGCTTC-3',*GUS*-AS:5'-GGTTTTTCACCGAAGTTCA-3' (退火温度 54 ℃)。扩增条件为:94 ℃预变性 5 min;94 ℃变性 50 s,退火 50 s (*npt* II 退火温度 55 ℃,*GUS* 退火温度 54 ℃),72 ℃延伸 1 min,28 个循环;最后 72 ℃延伸 8 min。PCR 扩增产物经琼脂糖凝胶电泳分离鉴定。

1.5.2 Southern 杂交检测 对 PCR 初步检测的转基因植株,采用基因组 DNA 提取试剂盒提取其叶片基因组 DNA,然后进行 Southern 杂交检测。具体方法是:将 PCR 检测呈阳性的植株基因组 DNA 经 *Hind* III 酶切过夜,消化后用 8 g/L 琼脂糖凝胶进行分离,再用 20×SSC 转移到尼龙膜,80 ℃固定 2 h 后与探针杂交。以纯化的 7αP 启动子为模板制备探针,采用随机引物标记法进行标记,杂交及检测的其他步骤均按照 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 所述方法进行。

1.6 GUS 活性的组织染色

选取转基因植株的各个部位进行 GUS 组织化学分析,GUS 的染色按照 Jefferson^[12]的方法进行;将待测材料的根、茎、叶、种子及对照分别放入 1.5 mL 的 Eppendorf 中,加入 GUS 染色液,37 ℃保温过夜,根可直接观察,茎、叶用体积分数 75%乙醇脱色至阳性对照为白色,种子则放在 10 倍显微镜下染色观察,并照相记录结果。

2 结果与分析

2.1 大豆种子特异性启动子 7αP 片段的克隆及重组克隆载体的构建

在 PCR 扩增时,由于大豆种子特异性启动子中含有很多 AT 碱基,普通的 PCR 扩增条件得不到目的片段,本研究通过多次改变 PCR 反应条件,最终利用两点法扩增得到目的片段 7αP。确定的 PCR 最佳反应条件为:94 ℃预变性 8 min;94 ℃变性 1 min,68 ℃退火 150 s,32 个循环;最后 72 ℃后延伸

30 min。经 PCR 扩增后,PCR 产物在 10 g/L 琼脂糖凝胶上电泳,得到 1 条约 1 382 bp 的特异性条带,电泳结果与预期结果相符(图 1)。

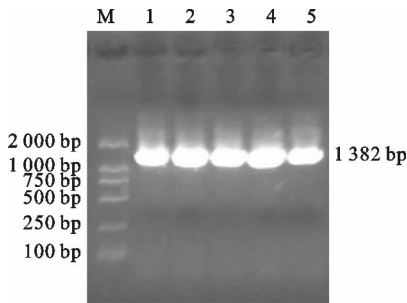


图 1 大豆种子特异性启动子 7αP 片段 PCR 产物的电泳结果

M. DNA 分子量标准;1~5. PCR 产物

Fig. 1 Electrophoresis of PCR product of soybean seed-specific promoter fragment 7αP

M. DNA Marker;1-5. PCR product

将 PCR 产物电泳回收后连入克隆载体 pMD18-T Vector,获得重组克隆载体 pMD18-T-7αP,经 PCR 扩增和 *Hind* III、*Bam*H I 双酶切鉴定,结果(图 2)表明,获得的片段长度与目的片段大小一致,说明目的片段 7αP 已成功连入克隆载体 pMD18-T Vector 中。

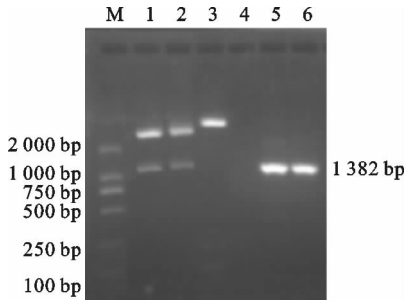


图 2 重组克隆载体的 PCR 和酶切鉴定

M. DNA 分子量标准;1~2. *Hind* III/*Bam*H I 双酶切;

3. pMD18-T-7αP 质粒;4. 阴性对照;5~6. PCR 产物

Fig. 2 Restriction identification of the recombinant clone

M. DNA Marker;1-2. pMD18-T-7αP digested by *Hind* III and *Bam*H I ;

3. Plasmid of pMD18-T-7αP;4. Negative control;5-6. PCR product

2.2 种子特异性启动子 7αP 片段的序列分析

对重组克隆载体 pMD18-T-7αP 的插入片段 7αP 进行测序,序列分析结果表明,该片段长 1 382 bp,与已发表的基因序列的同源性为 99%,GenBank 注册号为 FJ572966。利用生物数据库(<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>)对 7αP 序列进行启动子调控元件分析,结果表明,7αP 中包含多种在种子中特异性表达的调控元件(图 3),其中包括 1 个 SEF1 结合位点(ATATTTA(T/A)(A/

T)),1 个 SEF4 结合位点((A/G)TTTTT(A/G))、5 个 RY 重复序列(CATGCA,CATGCA(C/T),或者 CATGCATG)、6 个 E-box (CANNTG)、7 个 (CA)_n、1 个 De3 启动子结合因子(DPBF)和 3 个 ACGT。7 α P 中还含有一些诱导物(Elicitor)应答元件,包括 4 个 W-box((T)TG AC(C))、16 个 AACA (AAACAA)、1 个 GCN4(GCAAAA)和 2 个 GT-1

基序(GAAAAA)。此外,7 α P 中同时包括 α , α' , β 3 个亚基因启动子的核心保守序列 Box I (TCT-TCCGTCACATCAATTTTGTTCATTCAACACC CGTCAACT)、Box II (TGCACATCAACAC)、Box III (GGCTGATCAAGATCGCCGCGTC)和 Box IV (GACAAAATGCAACCTCACC)。由此可以推测,克隆的片段为大豆种子特异性启动子。

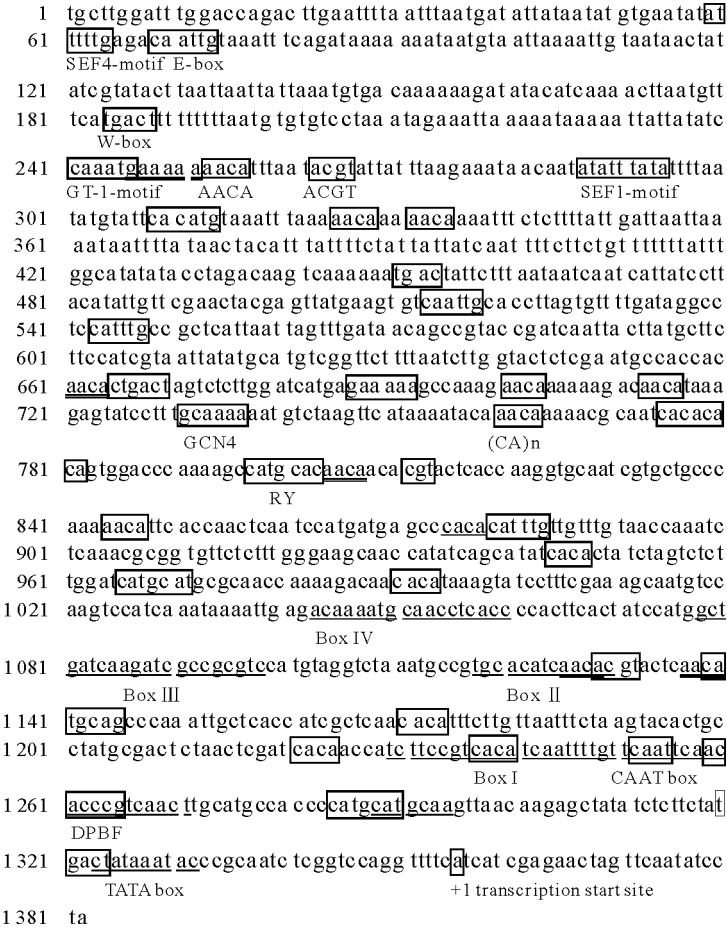


图 3 α 亚基因的上游启动子序列

Fig. 3 Nucleotide sequence of the upstream region of the α subunit gene

2.3 p7 α P-GUS 种子特异性表达载体的构建

植物表达载体 pBI121 是含有 CaMV35S-GUS 融合基因系统的二元载体。为了研究 β -伴球蛋白 α 亚基因启动子的功能,本研究用所克隆的启动子

7 α P 取代植物表达载体 pBI121 的 CaMV35S 组成型启动子,构建种子特异性表达载体 p7 α P-GUS,所得结果如图 4 所示。

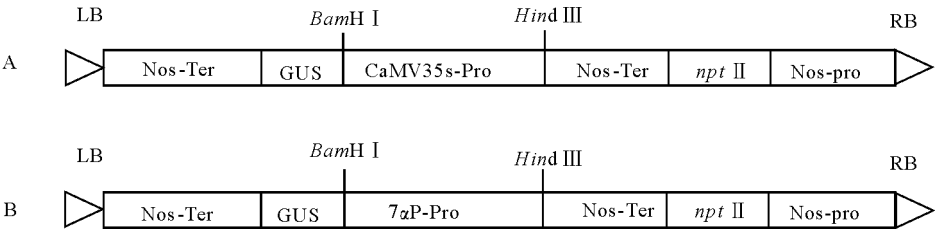


图 4 植物表达质粒 pBI121(A)、p7 α P-GUS(B)的 T-DNA 区结构

Fig. 4 Structure map of T-DNA region of plant expression vector pBI121(A) and p7 α P-GUS(B)

利用限制性内切酶 *Hind*Ⅲ、*Bam*H I 分别双酶切 pMD18-T-7 α P 和 pBI121,将 pMD18-T-7 α P 小片段和 pBI121 大片段用 T₄ DNA 连接酶连接,转化大肠杆菌 DH5 α ,筛选出 10 个阳性克隆,经 PCR 和双酶切鉴定,得到 1 条约 1 382 bp 的特异性条带(图 5),与预期片段大小一致。由此可见,本研究成功地构建了由该启动子驱动报告基因 *GUS* 的种子特异性表达载体 p7 α P-GUS。

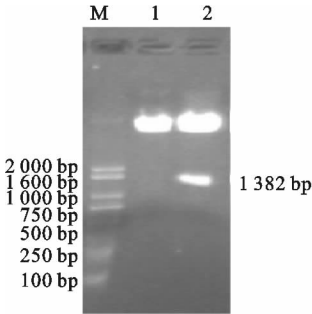


图 5 大豆种子特异性表达载体 p7 α P-GUS 的 PCR 和酶切鉴定

M. DNA 分子量标准;1. *Hind*Ⅲ/*Bam*H I 双酶切;2. PCR

Fig. 5 Identification of seed-specific expression vector p7 α P-GUS

M. DNA Marker;1. p7 α P-GUS digested by *Hind*Ⅲ and *Bam*H I ;2. PCR

2.4.1 PCR 检测 从卡那霉素抗性植株幼叶中提取基因组 DNA,用克隆大豆 β -伴球蛋白 α 亚基基因启动子 7 α P 所用引物(P1、P2)及 *npt*Ⅱ 基因和 *GUS* 基因的特异性引物进行 PCR 检测。结果表明,在再生抗性植株中,共有 8 株扩增出 7 α P 启动子、*npt*Ⅱ

2.4 转化再生植株的获得及 PCR 和 Southern 杂交检测

将种子特异性表达载体 p7 α P-GUS,通过液氮冻融法转化到根癌农杆菌 EHA105 中,对转化得到的单菌落进行 PCR 检测(图 6),然后采用农杆菌介导法对烟草 NC89 进行遗传转化研究,获得了批量具有卡那霉素抗性的转化植株。

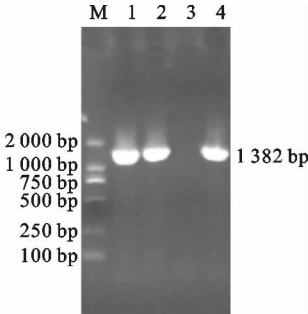


图 6 p7 α P-GUS 转入根癌农杆菌的 PCR 检测

M. DNA 分子量标准;1~2. p7 α P-GUS 导入农杆菌;3. 水阴性对照;4. p7 α P-GUS 质粒阳性对照

Fig. 6 PCR analysis of p7 α P-GUS in *Agrobacterium*

M. DNA Marker;1~2. p7 α P-GUS introduced into *Agrobacterium*;3. Negative control of water;4. Positive control of plasmid p7 α P-GUS

基因和 *GUS* 基因的目的条带,与阳性对照 p7 α P-GUS 扩增产生的条带在同一位置,而阴性对照植株无扩增条带产生,该结果初步表明获得了转基因阳性植株(图 7)。

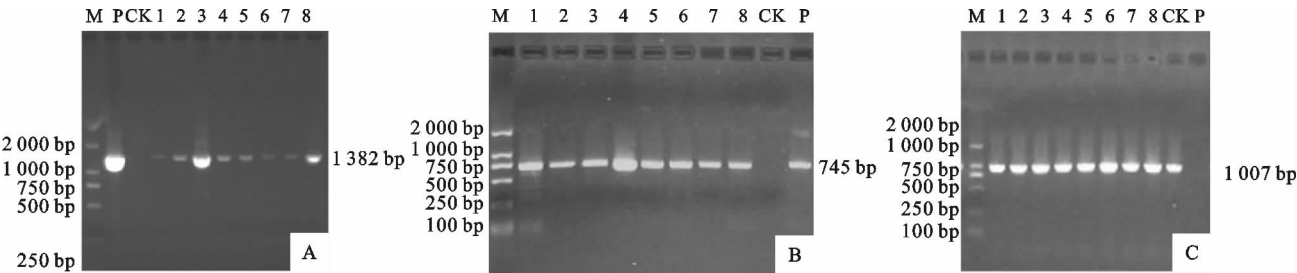


图 7 转基因烟草的 PCR 检测

A. 7 α P 启动子的 PCR 检测;B. *npt*Ⅱ 基因的 PCR 检测;C. *GUS* 基因的 PCR 检测;

M. DNA 分子量标准;P. p7 α P-GUS 质粒阳性对照;CK. 未转基因植株(阴性对照);1~8. 转基因阳性植株

Fig. 7 PCR analysis of transgenic tobaccos

A. PCR analysis of 7 α PA promoter;B. PCR analysis of *npt*Ⅱ gene;C. PCR analysis of *GUS* gene;M. DNA Marker;

P. Positive control of plasmid p7 α P-GUS;CK. Negative control of non-transformed plant;1~8. Putative transgenic plants

2.4.2 Southern 杂交检测 随机选取 2 株经 PCR 初步检测为阳性的转基因植株,以未转化植物为对照,分别提取总 DNA,经 *Hind*Ⅲ 单酶切,并将回收纯化的 7 α P 启动子片段经 DIG 标记后作为探针,然

后经过酶切、电泳、印迹、杂交、洗膜及显色等进行 Southern 杂交检测,结果表明,PCR 检测为阳性的 2 株转基因烟草均具有明显的杂交信号,而选取的未转基因对照植株无杂交信号产生(图 8),进一步证

明这 2 株转基因植株是转基因阳性植株,说明外源基因 7αP 启动子序列已经整合到烟草的基因组中。分析 Southern 杂交结果可知,2 株转基因烟草植株中的杂交带大小有所不同,显示外源基因的整合位点不尽相同;另外还可断定所检测的 2 株植株的外源基因整合形式均为单拷贝形式。

2.5 转基因烟草的 GUS 活性检测

对 PCR 和 Southern 杂交检测为转基因阳性烟草的 2 株,植株进行 GUS 活性的组织化学染色,结果表明,转 p7αP-GUS 种子特异性表达载体的转基因烟草种子具有很强的 GUS 活性,而其他部位均未检测到 GUS 活性,表现出明显的组织特异性(图 9-A);在转 pBI121(GUS 基因由 CaMV35S 启动子驱动)植物表达载体的转基因烟草的各个部位均检测到 GUS 活性(图 9-B),而在非转基因烟草的各个部位均未能染色,表明其无 GUS 活性(图 9-C)。以上结果表明,转基因烟草的 GUS 基因,是在种子特异性启动子 7αP 的调控下特异性表达的,证明大豆 β-

伴球蛋白 α 亚基基因上游 1 382 bp 的片段,具有种子特异性启动子的功能。

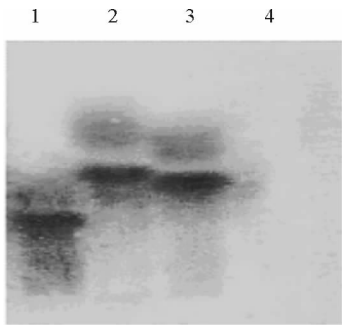


图 8 转基因烟草的 Southern blot 检测
1. 阳性对照;2~3. 转基因植株;
4. 阴性对照(未经转化的烟草植株)

Fig. 8 Southern blot analysis of transgenic tobaccos that carrying the p7αP-GUS construct
1. Positive control;2~3. Transgenic tobaccos;
4. Non-transformed plant as negative control

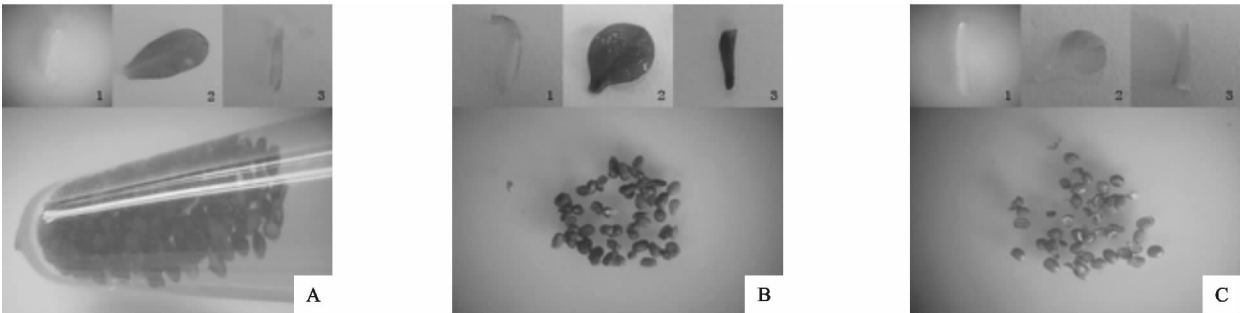


图 9 转基因烟草的 GUS 组织化学染色

A. 转 p7αP-GUS 质粒烟草不同组织的 GUS 化学染色结果;B. 转 pBI121 质粒烟草不同组织的 GUS 化学染色结果;
C. 未转化烟草不同组织的 GUS 化学染色结果;
1. 根部的 GUS 活性检测;2. 叶片的 GUS 活性检测;3. 茎部的 GUS 活性检测;4. 种子的 GUS 活性检测

Fig. 9 GUS expression in transgenic tobaccos

A. Histochemical staining of GUS activity in diffent organs of transgenic tobaccos carrying the p7αP-GUS;
B. Histochemical staining of GUS activity in diffent organs of transgenic tobaccos carrying the pBI121;
C. Histochemical staining of GUS activity in diffent organs of non-transformed tobacco as negative control;
1. X-Gluc staining of GUS activity in root;2. X-Gluc staining of GUS activity in leaf;
3. X-Gluc staining of GUS activity in stem segment;4. X-Gluc staining of GUS activity in seeds

3 讨 论

本试验从大豆基因 DNA 中分离了 1 382 bp 的大豆种子启动子 7αP 序列,通过启动 GUS 基因在烟草中的表达,证明 7αP 具有种子特异性。GUS 基因融合表达系统是用于研究植物基因启动子活性最常用的方式^[13],在 GUS 组织化学染色试验过程中,对于含叶绿素的被检材料需要进行脱色处理,脱色后

的对照材料呈黄白色,而转化材料虽经脱色处理但蓝色并不消失。由于种子具有种壳,为使底物更好地进入细胞,本试验将种子用刀片切开,从而获得了理想的染色结果。

启动子的表达效率以及时空表达模式,是启动子上的顺式作用元件与相应的转录因子协同作用的结果。启动子驱动基因表达需要多个顺式元件,这些元件的种类、数量及彼此之间的顺序与距离,都可

能影响基因的转录与否或转录程度。本试验利用生物数据库(<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>)对启动子 7 α P 序列进行分析,结果表明,7 α P 具有真核生物启动子的重要顺式作用元件和种子特异表达序列,这些调控元件多数以多拷贝的形式存在,如:(1)5 个 RY 重复序列。RY 重复序列 CATGCA(C/T)被称为 Legumin box(CATGCATG)或者是 6 bp 序列(CATGCA),其是核蛋白的结合位点,广泛存在于种子特异性表达基因的启动子中,是种子特异表达所必需的序列^[14]。(2)6 个 E-box。其保守的序列模式为 CANNTG,是一种重要的种子特异性转录调控功能的序列元件^[15]。(3)3 个 ACGT 元件。该元件存在于多种植物种子贮藏蛋白基因的启动子序列中,是种子特异性表达所必需的一种调控元件^[16]。(4)7 个 (CA) n 元件。研究表明^[17], (CA) n 元件对种子的特异性表达有重要作用。Stalberg 等^[18]对 (CA) n 元件作删除分析时发现,其缺失会大大降低转录活性。(5)1 个 SEF4(Soybean embryo factor)(RTTTTTR)和 1 个 SEF1(ATATTTAWW)。Allen 等^[19]研究表明,它们是大豆 β 伴球蛋白基因的增强子。此外,该序列还包括一些诱导物应答元件,如 4 个 W-box(TGACT)、16 个 AA-CA(AAACAA)、1 个 GCN4(GCAAAA)和 2 个 GT-1 基序(GAAAAA)。有研究表明,它们可能参与基因的增强表达^[20]。从以上分析结果可以看出,7 α P 启动子中存在负责种子特异性表达的调控元件,能在种子中特异性启动 *GUS* 基因的表达。

在基因工程研究中,基因的表达调控是一个十分复杂的过程,启动子过强或过弱都有可能影响到基因的表达并对其他基因的表达产生影响。挑选一个组织特异性强、表达模式与强度适当的启动子,往往是基因工程试验成败的关键。完整的或较长的启动子中含种子特异性序列元件的拷贝数更多,这些种子特异性序列元件拷贝数的多少与启动子活性的强弱有关^[7],据此推测,完整的或较长的 α 亚基基因启动子可能会有很高的活性。本试验克隆得到 1 382 bp 的 α 亚基基因启动子序列,与财音青格乐等^[8]分离到的 666 bp 的该基因的启动子序列相比,多约 760 bp,其中包含很多新增的调控元件。较长的 α 亚基基因启动子序列是否具有更高的活性,这还有待于进一步研究。

[参考文献]

[1] 焦改丽,孟钊红,郭三堆,等.花椰菜花叶病毒(CaMV)35S 启动

子在转基因棉花中的表达[J].作物学报,2004,30(11):1135-1139.

Jiao G L, Meng Z H, Guo S D, et al. Expression of CaMV 35S promoter in transgenic cotton [J]. Acta Agronomica Sinica, 2004, 30 (11): 1135-1139. (in Chinese)

[2] Marraccini P, Courjault C, Caillet V, et al. Rubisco small subunit of *Coffea arabica*: cDNA sequence, gene cloning and promoter analysis in transgenic tobacco plants [J]. Plant Physiol Biochem, 2003, 41(9): 17-25.

[3] 常小丽,刘雅莉,王跃进,等.百合花特异启动子 PchsA 表达载体的构建及功能分析[J].西北农林科技大学学报:自然科学学报,2009,37(2):135-140.

Chang X L, Liu Y L, Wang Y J, et al. Construction and function analysis of the expression vector of the flower-specific promoter PchsA from lily [J]. Journal of Northwest A&F University: Natural Science Edition, 2009, 37(2): 135-140. (in Chinese)

[4] 李桂兰,王文颇,臧少先,等.拟南芥黑芥子酶基因根特异性表达启动子的克隆[J].河北农业大学学报,2005,28(1):52-55.

Li G L, Wang W P, Zang S X, et al. Cloning of root specific expression promoter of myrosinase (pyk10) gene from *Arabidopsis thaliana* [J]. Journal of Agricultural University of Hebei, 2005, 28(1): 52-55. (in Chinese)

[5] Ma Q H, Wang X M, Wang Z M. Expression of isopentenyl transferase gene controlled by seed-specific Lectin promoter in transgenic tobacco influences seed development [J]. J Plant Growth Regul, 2008, 27(1): 68-76.

[6] Beachy R N, Jarvis N P, Barton K A. Biosynthesis of subunits of the soybean 7S storage protein [J]. Journal of Molecular and Applied Genetics, 1981, 1(1): 19-27.

[7] Fujiwara T, Beachy R N. Tissue-specific and temporal regulation of a beta-conglycinin gene: roles of the RY repeat and other cis-acting elements [J]. Plant Mol Biol, 1994, 24(2): 261-272.

[8] 财音青格乐,李明春,蔡易,等.大豆种子特异性启动子的克隆及序列分析[J].作物学报,2005,31(1):11-17.

Cai Y Q G L, Li M C, Cai Y, et al. Isolation and sequencing analysis of the seed-specific promoter from soybean [J]. Acta Agronomica Sinica, 2005, 31(1): 11-17. (in Chinese)

[9] 王关林,方宏筠.植物基因工程[M].北京:科学出版社,2002: 744.

Wang G L, Fang H J. Plant genetic engineering [M]. Beijing: Science Press, 2002: 744. (in Chinese)

[10] Hofen R, Willmitzer L. Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation [J]. Nucleic Acids Research, 1988, 16: 9877.

[11] Horsch R B, Fry J E, Hoffman N L. A simple and general method for transferring gene into plant [J]. Science, 1985, 227 (4691): 1229-1231.

[12] Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants: the *GUS* gene fusion system [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1987, 5(4): 387-405.