

网络出版时间:2014-09-10 18:19

DOI:10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.10.039

网络出版地址: <http://www.cnki.net/kcms/doi/10.13207/j.cnki.jnwafu.2014.10.039.html>

大豆豆荚特异性启动子的克隆及功能分析

宋 阳,王丕武,张学明,曲 静

(吉林农业大学 农学院,吉林 长春 130118)

[摘 要] 【目的】克隆大豆豆荚特异性启动子,并对其进行功能分析,为研究抗病虫基因在大豆荚中的特异性表达奠定基础。【方法】利用 PCR 技术克隆得到豆荚特异性启动子(Pod Specific Promoter, PSP)的核心序列,用 PSP 序列取代质粒 pBI121 中的 CaMV 35S 启动子,构建与 GUS 基因融合的豆荚特异性报告载体 pPSP-GUS,通过农杆菌介导法转化烟草“NC89”,对转基因植株进行分子生物学检测,将鉴定为阳性的植株经 GUS 组织化学染色,验证 PSP 片段的功能。【结果】所获得的豆荚特异性启动子 PSP 大小为 1 270 bp,与已报道序列的同源性为 98%,具有多种典型的启动子表达调控元件,如 A/T-rich core、CAATBOX、TATABOX、GATABOX 等。将 pPSP-GUS 质粒转化烟草后,经 PCR 和 Southern blot 检测结果显示,成功获得了转基因阳性烟草植株。GUS 活性检测结果显示,在转 pPSP-GUS 质粒的烟草根和叶片中均未检测到 GUS 活性,在萼片中可检测到低水平的 GUS 活性;而在花荚中可检测到高水平的 GUS 活性,且明显高于转 pBI121 质粒的对照植株。【结论】克隆得到的豆荚特异性启动子 PSP 片段具有启动基因在豆荚中特异性表达的功能。

[关键词] 大豆;豆荚特异性启动子;序列分析;烟草;GUS 染色

[中图分类号] S565.1

[文献标志码] A

[文章编号] 1671-9387(2014)10-0063-07

Cloning and functional analysis of soybean pod specific promoter

SONG Yang, WANG Pi-wu, ZHANG Xue-ming, QU Jing

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

Abstract: 【Objective】The aim of this study was to clone soybean pod specific promoter and analyze its functions. 【Method】The core sequence of pod specific promoter (PSP) was cloned by PCR method. The cloned PSP core sequence was fused with the GUS reporter gene to construct plant reporter vector pPSP-GUS by replacing the 35S promoter sequence in the pBI121 vector. Then the plant reporter vector was introduced into *Nicotiana tabacum* NC89 via *Agrobacterium*-mediated transformation. Molecular biological detection of the transgenic plants was conducted and functions of PSP in positive plants were validated by GUS histochemical staining. 【Result】The obtained PSP was 1 270 bp, having 98% homology with the reported sequences. It contained many typical regulatory elements for promoter expression such as A/T-rich core, CAATBOX, TATABOX, and GATABOX. PCR and Southern blot results showed that the transgenic plants were obtained successfully. GUS activity assays indicated that the expression of GUS was highly active in pods rather than in roots and leaves. The GUS activity was stronger than that of control plants. 【Conclusion】The obtained PSP fragment could express specifically in soybean pod.

Key words: soybean; pod specific promoter; sequence analysis; tobacco; GUS staining

[收稿日期] 2013-07-08

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30971805);转基因生物新品种培育重大专项(2011ZX08004-004)

[作者简介] 宋 阳(1988—),女,吉林长春人,在读硕士,主要从事大豆分子育种研究。E-mail:416053540@qq.com

[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@163.com

在转基因应用中,启动子对目标基因的表达起着重要的调控作用。根据启动子的作用方式可将其分为组成型、诱导型和组织特异型 3 类^[1]。目前组成型启动子应用最多的是 CaMV 35S 启动子,Carlos 等^[2]从大豆中分离出大豆聚泛素启动子,用其启动的 GFP 基因的表达量比 CaMV 35S 高 2~5 倍。诱导型启动子的活化受物理或化学信号刺激的诱导,能够驱动外源基因实现高效表达;其中有的诱导型启动子也有组织特异型启动子的特性,如已克隆的果实特异性表达的 E8 基因的启动子同时存在乙烯应答元件,故也可看作是乙烯诱导型启动子^[3]。组织特异型启动子能够驱动外源基因在特定部位和特定发育阶段表达,实现外源基因在空间和时间上的调控;现已分别在根、茎、叶、果实、花等几乎各种组织中克隆出其相应的组织特异型启动子^[4-8],并广泛应用于水稻、玉米、番茄、甘薯等诸多农作物的遗传转化研究中。目前组织特异型启动子在大豆中的应用较为广泛,已克隆了伴大豆球蛋白、球蛋白、凝集素等大豆种子特异性启动子,并在增加转基因植物种子营养含量的研究中得到应用^[9]。此外,大豆根部和种皮特异性启动子也都相继克隆成功^[10-11]。豆荚特异性启动子可以增加外源基因在结荚期荚中的表达量,最大程度减少对植物其他器官的不利影响,为提高基因工程育种的精确性和安全性提供了新的元件。

大豆(*Glycine max*)是我国重要的粮油兼用作物,有着极高的营养价值,是人们日常生活中必备的食用作物之一,但大豆又是一种极易受病虫害侵袭的作物^[12]。目前在生产上危害较大的病虫害有大豆灰斑病、荚枯病、大豆食心虫、大豆蚜虫和豆荚螟等^[13],其中大部分为害大豆粒荚,严重影响了大豆的产量和品质,因此,针对豆荚特异性启动子控制外源基因在荚中高效表达的研究具有重要的理论和实践意义。为此,本研究利用 PCR 技术,根据在 NCBI 数据库中搜索到的豆荚特异性表达的 msg 基因序列,从大豆基因组 DNA 中分离其核心启动子片段,并将该片段与 GUS 报告基因重组,构建报告表达载体,转入烟草中进行功能验证,以期研究抗病虫基因在大豆荚中的特异表达奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

供试大豆品种“吉农 28”、烟草品种“NC89”、质粒 pBI121、大肠杆菌 DH5 α (*E. coli* DH5 α)和农杆菌

EHA105 等,均由吉林农业大学植物生物技术中心提供。

试验试剂 DNA GeL Extraction Kit 凝胶回收试剂盒购自 V-gene 公司,pMD18-T Vector 载体试剂盒、DNA Marker DL2000、PCR Kit 购自 TaKaRa 公司,限制性内切酶(*Hind* III、*Xba* I)、T₄ DNA Ligase 购自 Fermentas 公司,X-gal、IPTG、X-Gluc、Triton X-100 购自北京鼎国生物公司(Sigma 分装),DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II 试剂盒购自 Roche 公司。其他试剂均为国产分析纯。

主要仪器设备有 PCR 仪、紫外及可见光分光光度仪、电泳仪、凝胶成像仪、低温离心机、恒温振荡培养箱、智能人工气候光照培养箱、超净工作台、超低温冰箱和高压灭菌锅等。

1.2 豆荚特异性启动子 PSP 片段的克隆和序列分析

取大豆品种“吉农 28”的幼嫩叶片,用 CTAB 法^[14]提取植物基因组 DNA。根据 NCBI 上发表的大豆豆荚特异性表达基因 msg(登录号:AJ239127.1)的启动子序列,用 Primer Premier 5.0 软件设计 1 对特异性引物,PSPs: 5'-GGG AAGCTT CTA-GATGAAGTCTTTAAGG-3' 和 PSPas: 5'-GGG TCTAGA TCTTGAATTCAAATAATTGC-3',其中划线部分分别为加入的 *Hind* III 和 *Xba* I 酶切位点,引物由北京三博远志生物技术有限公司合成。双酶切体系为 20 μ L,其中限制性内切酶 *Hind* III 2 μ L、限制性内切酶 *Xba* I 1 μ L、质粒 5 μ L,Buffer 2 $\times$ Tango 4 μ L,ddH₂O 8 μ L,37 $^{\circ}$ C 反应 2 h。PCR 扩增体系为 50 μ L,其中 10 $\times$ buffer 5 μ L、MgCl₂ 5 μ L、dNPT 0.8 μ L、50 pmol/L 上下游引物各 2 μ L、模板 0.1 μ g、*Taq* 酶 0.5 μ L、ddH₂O 32.7 μ L。PCR 扩增条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 8 min;94 $^{\circ}$ C 变性 50 s,45 $^{\circ}$ C 退火 50 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 50 s,32 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 扩增产物用 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 扩增和酶切鉴定获得重组质粒,对重组载体测序后进行 BLAST 分析。测序由北京三博远志生物技术有限公司完成。利用生物数据库 PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalup.html>)对测序结果正确的 PSP 序列进行启动子调控元件分析。

1.3 豆荚特异性报告载体 pPSP-GUS 的构建及遗传转化

分别对重组克隆载体 pMD18-T-PSP 和植物表达载体 pBI121 进行 *Hind* III、*Xba* I 双酶切,回收 pMD18-T-PSP 小片段和 pBI121 大片段,利用 T₄ DNA 连接酶连接,用豆荚特异性启动子 PSP 的片段替换 pBI121 的 CaMV 35S 启动子,与 GUS 报告基因融合,构建重组豆荚特异性报告载体 pPSP-GUS,具体操作参照王关林等^[14]的方法。然后采用农杆菌介导法^[15]对烟草“NC89”进行遗传转化。

1.4 转化烟草植株的分子生物学检测

采用改良的 CTAB 法,从烟草叶片中提取基因组 DNA 作为模板,以豆荚特异性报告载体 pPSP-GUS 为阳性对照,以未转化植株为阴性对照,以 PSP 基因和 GUS 基因的特异性引物进行 PCR 扩增,其中 PSP 基因的引物和 PCR 扩增条件同 1.2。GUS 基因的引物序列为 GUSs:5'-TGTGATATC-TACCCGCTTC -3'和 GUSas:5'-GGTTTTTCAC-CGAAGTTCA-3'。PCR 扩增体系为 25 μL,其中 10×buffer 2.5 μL、MgCl₂ 2.5 μL、dNPT 0.5 μL、50 pmol/L 上下游引物各 1 μL、模板 0.1 μg、*Taq* 酶 0.3 μL、ddH₂O 16.2 μL。PCR 扩增条件为:94 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 变性 40 s,54 ℃ 退火 45 s,72 ℃ 延伸 40 s,40 个循环;最后 72 ℃ 延伸 8 min。PCR 扩增产物经 1%琼脂糖凝胶电泳分离鉴定。

对 PCR 检测为阳性的转基因植株,采用 CTAB 法大量提取叶片基因组 DNA,然后进行 Southern 杂交检测。以纯化的 PSP 基因为模板制备探针,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 II 试剂盒说明书操作。

1.5 转基因植株的 GUS 活性组织染色

选取转基因植株的根部、叶片、萼片和花萼等部位的组织样品进行 GUS 组织化学分析,GUS 染色按照 Jefferson^[16]的方法进行。以转 pBI121 质粒烟草(GUS 基因由 CaMV 35S 启动子驱动)和未转化烟草作为对照,观察转 pPSP-GUS 质粒烟草(GUS 基因由豆荚特异性启动子 PSP 驱动)根部、叶片、萼片和花萼等各组织中的 GUS 表达活性。

2 结果与分析

2.1 大豆豆荚特异性启动子 PSP 片段的克隆

以大豆“吉农 28”植株幼嫩叶片总 DNA 为模板进行 PCR 扩增,扩增出大小约 1 270 bp、特异性强、单一的扩增带(图 1A),结果与预期相符。将 PCR 产物电泳回收后连入克隆载体获得 pMD18-T-PSP。重组克隆载体 pMD18-T-PSP 的 PCR 结果(图 1B)和 *Hind* III、*Xba* I 双酶切结果(图 1C)表明,获得的片段长度与目的片段大小一致,说明扩增片段已成功连入克隆载体中。

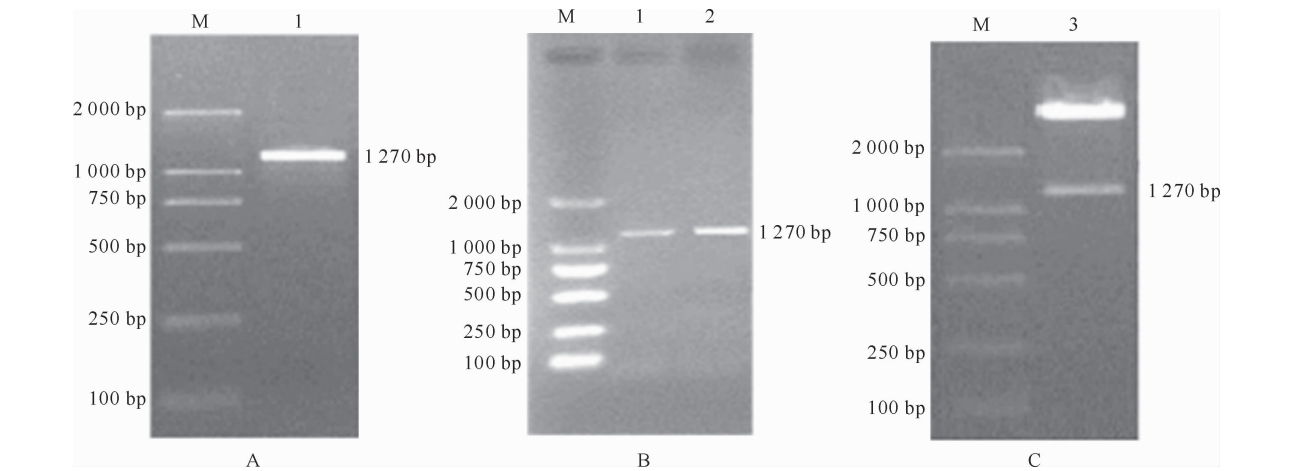


图 1 大豆豆荚特异性启动子 PSP 片段的电泳结果

A. PSP 基因的 PCR 产物;B. pMD18-T-PSP 的 PCR 产物;C. pMD18-T-PSP 的酶切鉴定;

M. DNA 分子质量标准;1~2. PCR 产物;3. *Hind* III /*Xba* I 双酶切产物

Fig.1 Electrophoresis of soybean pod specific promoter (PSP) fragment

A. PCR product of PSP gene;B. PCR product of pMD18-T-PSP;C. Restriction identification of pMD18-T-PSP;

M. DNA Marker;1-2. PCR product;3. pMD18-T-PSP digested by *Hind* III and *Xba* I

2.2 大豆豆荚特异性启动子 PSP 片段的序列分析

对重组克隆载体 pMD18-T-PSP 的插入片段 PSP 进行测序,序列分析结果表明,该片段长 1 270 bp(图 2),与已发表的 msg 基因序列(登录号为

AJ239127.1)的同源性为 98%。利用生物数据库 PLACE 对 PSP 序列进行启动子调控元件分析,结果表明,PSP 中含有多在其他植物启动子中存在的通用启动子元件和豆荚特异表达所必需的调控元件(表 1)。其中包括:4 个 A/T-rich core、11 个 CAATBOX、10 个 TATABOX,这些常见的通用元件参与基因的增强表达,在决定启动子转录效率上有着很强烈的作用,能够在相对较低的水平上引发转

录,决定起始点的位置和核心启动子中的定位^[17]。该序列中还包含了 9 个组织特异性表达必需的 GATABOX^[18]和一些诱导物应答元件,包括 11 个 GT1CONSENSUS(GRWAAW)、6 个 GTGANTG10(GTGA)、5 个 IBOXCORE(GATAA)和 3 个 POLLEN1LELAT52(AGAAA)等。由此可以推测,克隆的片段具有启动基因在豆荚中特异性表达的功能。

1	ACCCGGGGAT	CCTCTAGAGA	TTTCTTGAAT	TCAAATAATT	GCACACAAC
51	ATCAGTTATC	TGAAAGCAAC	TATCACTGGC	TTGTCATGTT	TGAGCATACG
101	AGACACCTAT	ATATAGAGGC	TCAAATGGTC	GTGGTTTTTC	ACATCTTAAA
151	CTTAACATTG	TTTTATCTTT	GTCTTCTTTT	CTCAATGTAT	TAATACAATG
201	AGAATTTCTT	TTGAAAAAAG	ACAAAAAATA	CTTTCAAAGT	TGAAAAAATG
251	ATGAACGGCT	AAAAGGGAAA	ATGAAGAAGT	AAATATTGAA	TTTCCCTTTC
301	CTCTTCTACT	ATTATTAAAG	AATAAGTGGG	CACAAACGTA	AAAATTAAAT
351	ATGTCATATT	ATATACTGTT	GCAATGAAAG	TGTAAAACTA	TTATCCTATT
401	GTTATGAAAT	CATAAATTAT	AATATGTGAT	AAATTTATTG	ATTTTTTTTAT
451	ATCATTCCAA	TGATAATTTT	TGTTTGATTG	ATGGTGTAGC	TTAATAGTAT
501	TATTCTTTTC	CCTTTACATA	TGAAACAAAG	TTTTGGTATT	TCAAAAAATA
551	GAAAGAAAAAC	AATTATTATT	AAGTGTCATT	TTTATGTTTA	TTTTTCAGTGA
601	AATATATATG	TAAAAAATAA	GTTTGTTATT	AATAAGCAAG	CGATATAGAA
651	TTTGAATTCT	GACTTTGGAT	ATAAAATAAA	TCATAATGAA	AGGAGAGTAC
701	TTACCTTAAG	TGTGCTCACG	ATTTCTAATG	AATATTAATC	GTTACTTTCA
751	ATAGTAATTA	TTTTTATATCA	ATACCATAAT	CAACAATATA	TATCTATATA
801	TAAAAATGGA	TTGGTAGACA	CTAAAAAATT	ATTGGACACC	TAGTGAAAGA
851	AATGAGATAA	AAGGGTGGCT	AGATATGATA	ATCAAGAAGA	ATATGATTGA
901	TATTAATGAG	ATGTTTGGAG	TGAAGATGTG	ACATCCTCTA	CCCCGACATA
951	TATGTATATA	TAAATAAAAT	ATATAAAAT	ATTGGAAAAAC	AAATTACACAT
1 001	GGCTAAAAGG	TTCACATCCA	CTGCACTATT	ATCAATTAAA	ACTTATTAAA
1 051	AACATATTCG	GCTCAAAATA	AGTCCGTCAA	AATTTATAAA	AATATTTTGT
1 101	TAAATCAGTG	AGGTAAAATA	AAATAGATTA	ACATGATAAA	ATTAATATAA
1 151	AAACTTATTA	TCCAATGTCA	CATCCTATCA	GAGCATGTG	TCCCGACATC
1 201	CTTCAGCACA	ATATTCCTTA	AAGCAGTTCA	TCTAGAATCG	TCGACCTGCA
1 251	GGCATGCAAG	CTTGCACTGC			

图 2 大豆豆荚特异性启动子 PSP 片段的核苷酸序列
Fig. 2 Nucleotide sequence of soybean pod specific promoter (PSP)

表 1 大豆豆荚特异性启动子中可能存在的相关调控元件

因子/位置名称 Factor or site name	位置 Site	信号序列 Signal sequence
CAATBOX	183,196,372,458,560,749,769,784,1 033,1 163,1 209	CAAT
A/T-rich core	32,107,542,577	CWWWWWWWWG
GATABOX	428,462,642,668,856,872,877,899,1 135	GATA
GT1CONSENSUS	213,242,266,267,428,462,856,877,984,1 112,1 135	GRWAAW
GTGANTG10	426,597,843,920,928,1 108	GTGA
IBOXCORE	428,462,856,877,1 135	GATAA
POLLEN1LELAT52	550,554,848	AGAAA
TATABOX2	959	TATAAAT
TATABOX3	188,733,901	TATTAAT
TATABOX4	797,957,970	TATATAA
TATABOX5	588,758	TTATTTT
TATABOXOSPAL	626	TATTTAA

2.3 豆荚特异性报告载体 pPSP-GUS 的构建

植物表达载体 pBI121 是含有 CaMV 35S-GUS 融合基因系统的双元载体。为了研究豆荚特异性启动子 PSP 的功能,利用限制性内切酶 *Hind* III、

Xba I 分别双酶切 pMD18-T-PSP 和 pBI121,用所克隆的 PSP 片段取代植物表达载体 pBI121 中的 CaMV 35S 组成型启动子,构建豆荚特异性报告载体 pPSP-GUS,所得结果如图 3 所示。

将 pMD18-T-PSP 小片段和 pBI121 大片段用 T₄ DNA 连接酶连接,转化大肠杆菌 DH5 α ,经 PCR 和双酶切鉴定,得到 1 条约 1 270 bp 的特异性条带

(图 4),与预期片段大小一致,表明已成功构建由该启动子驱动报告基因 GUS 的豆荚特异性报告载体 pPSP-GUS。

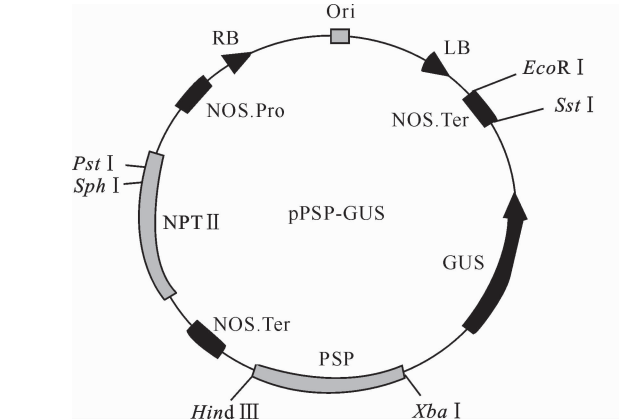


图 3 豆荚特异性报告载体 pPSP-GUS 的构建
Fig. 3 Construction of pod specific reporter vector pPSP-GUS

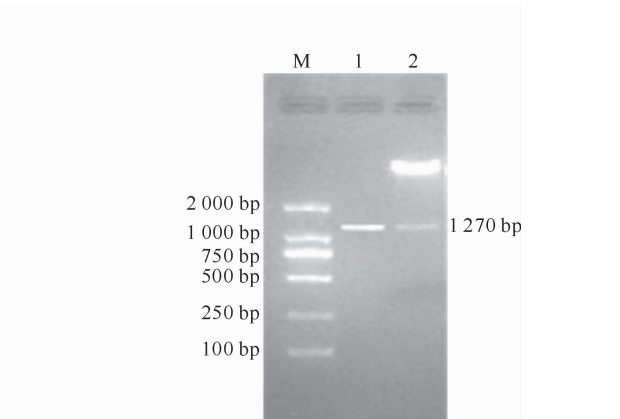


图 4 豆荚特异性报告载体 pPSP-GUS 的 PCR 和酶切鉴定
M. DNA 分子质量标准;1. PCR 产物;2. *Hind* III/*Xba* I 双酶切
Fig. 4 Identification of pod specific reporter vector pPSP-GUS
M. DNA Marker;1. PCR product;
2. pPSP-GUS digested by *Hind* III and *Xba* I

2. 4 报告载体 pPSP-GUS 的转化及分子检测

采用农杆菌介导法对烟草“NC89”进行遗传转化,获得了具有卡那霉素抗性的转化植株 72 株。从再生抗性植株中随机选取 42 株提取叶片基因组 DNA,分别用豆荚特异性启动子 PSP 的特异性引物

和 GUS 基因的特异性引物进行 PCR 检测,分别扩增出大小为 1 270 bp 的 PSP 片段(图 5A)和 1 007 bp 的 GUS 片段(图 5B),结果得到 PCR 阳性植株 35 株,阳性率达 83. 3%。

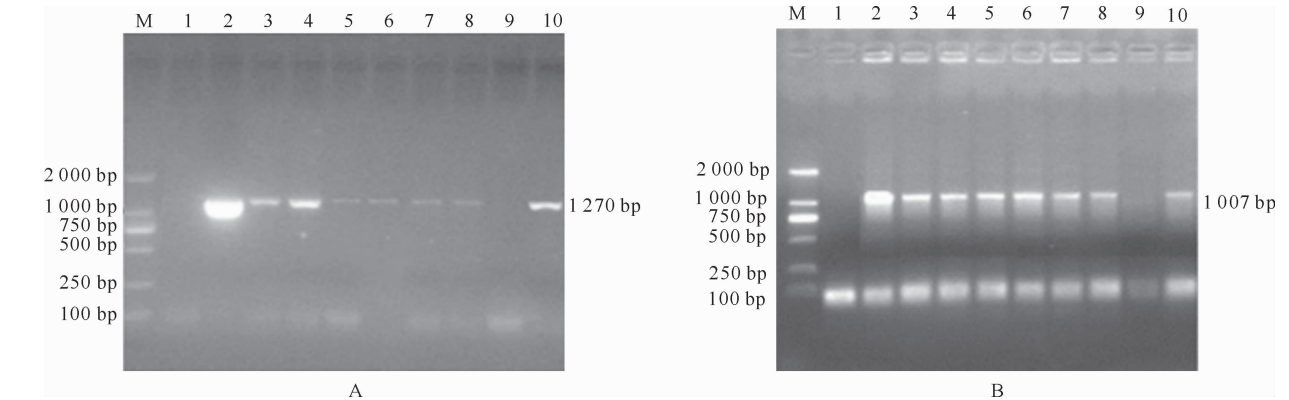


图 5 转入报告载体 pPSP-GUS 烟草的 PCR 检测
A. PSP 基因的 PCR 检测;B. GUS 基因的 PCR 检测;
M. DNA 分子质量标准;1. 未转基因植株(阴性对照);2. 质粒阳性对照;3~10. 转基因阳性植株

Fig. 5 PCR analysis of transgenic tobaccos with pPSP-GUS
A. PCR analysis of PSP gene;B. PCR analysis of GUS gene;

M. DNA Marker;1. Non-transgenic plant (Negative control);2. Positive control of plasmid;3-10. Positive transgenic plant

随机选取 4 株经 PCR 检测为阳性的转基因植株,以未转化烟草植株为对照,进行 Southern 杂交检测,结果表明,PCR 检测为阳性的 4 株转基因烟草均具有明显的杂交信号,而未转基因对照植株无杂交信号产生(图 6),进一步证明这 4 株转基因植

株是转基因阳性植株,说明外源基因 PSP 目的片段已经整合到烟草的基因组中,整合形式均为单拷贝形式。其中标号为 4 和 6 的转基因植株外源基因整合位点基本相同,标号为 3 和 5 的转基因植株与其他 2 株的外源基因整合位点均不相同。

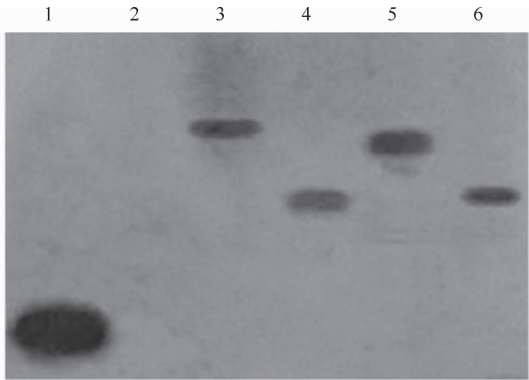


图 6 转入报告载体 pPSP-GUS 烟草的 Southern 杂交检测
1. 阳性对照;2. 阴性对照(未转基因植株);3~6. 转基因植株
Fig. 6 Southern blot analysis of transgenic tobaccos with pPSP-GUS
1. Positive control;2. Non-transgenic plant (Negative control);3-6. Transgenic tobaccos

2.5 转基因烟草的 GUS 活性检测

对 PCR 和 Southern 杂交检测为阳性的转基因烟草植株进行 GUS 活性组织化学染色,结果(图 7)表明,在未转化烟草植株的根部、叶片、萼片和花荚中均未检测到 GUS 活性。在转 pBI121 质粒烟草的根部、叶片、萼片和花荚中均检测到了 GUS 活性。在转 pPSP-GUS 豆荚特异性报告载体的转基因烟草的根和叶片中检测不到 GUS 活性,而在其萼片和花荚中检测到了 GUS 活性;且在其萼片和花荚中检测到了 GUS 活性;且在转基因烟草萼片部位的 GUS 活性表达效果明显低于转 pBI121 表达载体(GUS 基因由 CaMV 35S 启动子驱动)的对照,而在其花荚中的表达效果远远高于转 pBI121 表达载体的烟草植株。以上结果表明,转基因烟草的 GUS 基因是在豆荚特异性启动子 PSP 的调控下特异性表达的,证明所克隆的 1 270 bp 的 PSP 基因片段具有豆荚特异性启动子的功能。

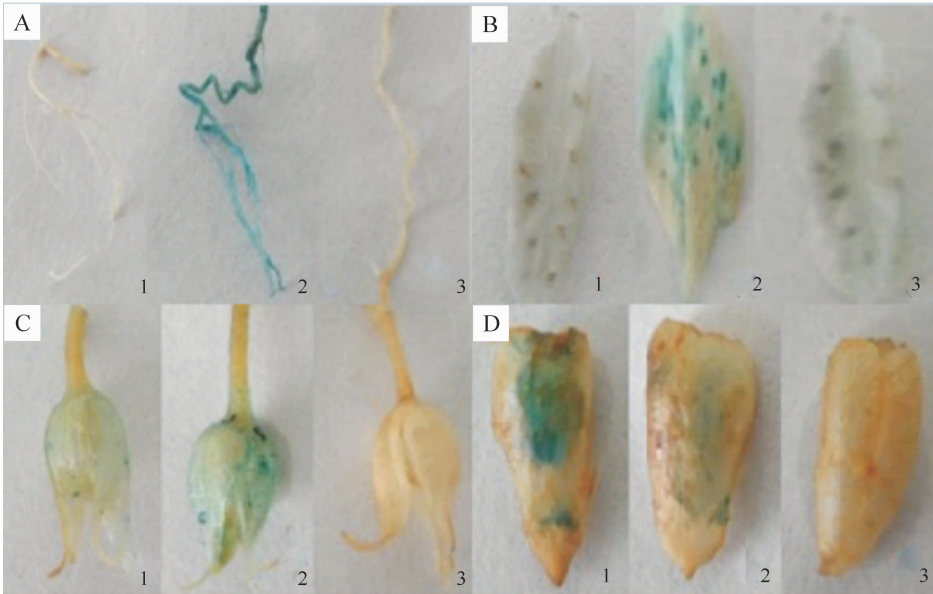


图 7 转入报告载体 pPSP-GUS 烟草的 GUS 组织化学染色
A. 根部;B. 叶片;C. 萼片;D. 花荚;
1. 转 pPSP-GUS 质粒烟草;2. 转 pBI121 质粒烟草对照;3. 未转化烟草对照
Fig. 7 GUS expression in transgenic tobaccos pPSP-GUS
A. Root;B. Leaf;C. Sepal;D. Pod;
1. Transgenic tobaccos carrying pPSP-GUS;2. Transgenic tobaccos carrying pBI121;3. Non-transgenic plant (Negative control)

3 讨论

本研究通过提取大豆品种“吉农 28”全基因组 DNA,利用 PCR 方法成功克隆了大豆豆荚特异性启动子 PSP 的核心片段,大小为 1 270 bp。通过在线软件分析发现,该片段含有典型的启动子元件和组织特异性表达启动子必需的元件,其中包括参与

和光响应有关的花荚形成及开花过程的 GATABOX^[19],许多光响应启动子都包含 GATABOX 和与其有关的核蛋白。有研究表明,启动子中控制基因组织特异性表达的序列一般位于 TATABOX 附近^[20],本研所得 PSP 片段的 9 个 GATABOX 中有 6 个位于 TATABOX 附近。根据其结构特点初步推测所克隆得到的片段为大豆豆荚

特异性启动子。

GUS 活性检测结果显示,由 pPSP-GUS 豆荚特异性报告载体启动的 GUS 基因在转基因烟草的根和叶片中检测不到 GUS 活性,但其可以在花萼和萼片中表达,且在花萼中的表达效果明显高于萼片,结合 PSP 片段中启动子元件和序列位置的特点,推测其参与花萼形成,能够驱动外源基因在萼片部位低水平表达,在花萼中高效表达,在植物的根和叶片部位基本不表达,证实 PSP 片段确有豆荚特异性表达功能。

本研究克隆得到的豆荚特异性启动子序列,大小为 1 270 bp,与吴书音等^[21]分离的 Pmsg 启动子片段相比,虽少约 1 000 bp,但典型的启动子元件和组织特异性表达启动子必需元件均包含在内,且 GUS 活性在花萼中的表达效果明显,并构建了豆荚特异性报告表达载体 pPSP-GUS,这为进一步研究抗病虫基因在大豆荚中的特异表达奠定了基础。

[参考文献]

- [1] 聂丽娜,夏兰琴,徐兆师,等. 植物基因启动子的克隆及其功能研究进展 [J]. 植物遗传资源学报,2008,9(3):385-391.
Nie L N, Xia L Q, Xu Z S, et al. Progress on cloning and functional study of plant gene promoters [J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2008, 9(3): 385-391. (in Chinese)
- [2] Carlos M H, Adriana P M, Robert A B, et al. A soybean (*Glycine max*) polyubiquitin promoter gives strong constitutive expression in transgenic soybean [J]. Plant Cell Rep, 2009, 28: 837-849.
- [3] Deikman J, Kline R, Fischer R L. Organization of ripening and ethylene regulatory regions in a fruit-specific promoter from tomato (*Lycopersicon esculentum*) [J]. Plant Physiol, 1992, 100(4):2013-2017.
- [4] Noh S A, Lee H, Huh G H, et al. A sweetpotato SRD1 promoter confers strong root-, taproot-, and tuber-specific expression in *Arabidopsis*, carrot, and potato [J]. Transgenic Research, 2012, 21(2):265-278.
- [5] Singer S D, Hily J M, Cox K D. 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 [J]. Planta, 2011, 234(3):623-637.
- [6] 刘 莉. 水稻叶片衰老特异性启动子的克隆和利用及剑叶早期衰老上升表达基因的鉴定 [D]. 武汉:华中农业大学,2008.
Liu L. Cloning and application of a senescence-specific promoter in rice leaf and identification of early senescence-associated genes in flag leaves [D]. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2008. (in Chinese)
- [7] Carine G, Mourad A M, Aline L M, et al. Regulation of the fruit-specific PEP carboxylase S1PPC2 promoter at early stages

- of tomato fruit development [J]. PLoS one, 2012, 17(5): e36795.
- [8] Imai A, Takahashi S, Nakayama K, et al. The promoter of the carotenoid cleavage dioxygenase 4a-5 gene of *Chrysanthemum morifolium* (CmCCD4a-5) drives petal-specific transcription of a conjugated gene in the developing flower [J]. Plant Physiol, 2013, 170(14):1295-1299.
- [9] 赵 艳, 刘晓鑫, 张庆林, 等. 大豆种子特异性启动子研究进展 [J]. 大豆科学, 2010, 29(1):151-156.
Zhao Y, Liu X X, Zhang Q L, et al. Advances of studies on seed-specific promoters of soybean [J]. Soybean Science, 2010, 29(1):151-156. (in Chinese)
- [10] Choi D W, Song J Y, Oh M H, et al. Isolation of a root-specific cDNA encoding a ns-LTP-like protein from the roots of bean (*Phaseolus vulgaris* L.) seedlings [J]. Plant Mol Biol, 1996, 30(5):1059-1066.
- [11] 魏雯雯, 王丕武, 付永平, 等. 大豆种皮特异性启动子的克隆及功能分析 [J]. 大豆科学, 2010, 29(3):390-393.
Wei W W, Wang P W, Fu Y P, et al. Cloning and identification of the seedcoat specific promoter from soybean [J]. Soybean Science, 2010, 29(3):390-393. (in Chinese)
- [12] Miranda V D, Coelho R R, Viana A A, et al. Validation of reference genes aiming accurate normalization of qPCR data in soybean upon nematode parasitism and insect attack [J]. Bio Med Central, 2013, 13(6):196-204.
- [13] 王 娟, 刘 森, 王志坤, 等. 大豆抗病、虫转基因研究进展 [J]. 大豆科学, 2011, 30(5):865-873.
Wang J, Liu M, Wang Z K, et al. Advances in transgenic soybean resistant to disease and pest [J]. Soybean Science, 2011, 30(5):865-873. (in Chinese)
- [14] 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)
- [15] Pathi K, Tula S, Tuteja N. High frequency regeneration via direct somatic embryogenesis and efficient Agrobacterium-mediated genetic transformation of tobacco [J]. Plant Signal Behav, 2013, 8(6):e24354.
- [16] Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system [J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1987, 5(4):387-405.
- [17] Sugihara F, Kasahara K, Kokubo T. Highly redundant function of multiple AT-rich sequences as core promoter elements in the TATA-less RPS5 promoter of *Saccharomyces cerevisiae* [J]. Nucleic Acids Research, 2011, 39(1):59-75.
- [18] Turbendian H K, Gordillo M, Tsai S Y, et al. GATA factors efficiently direct cardiac fate from embryonic stem cells [J]. Development, 2013, 140(8):1639-1644.
- [19] Jose C R, Isabel M P, Francisco J F. The GATA family of transcription factors in *Arabidopsis* and rice [J]. Plant Physiol, 2004, 134(4):1718-1732.

Pisum sativum using protein- and PCR-based markers [J]. Theoretical and Applied Genetics, 2004, 408(7): 1309-1321.

[10] Burstin J, Deniot G, Potier J, et al. Microsatellite polymorphism in *Pisum sativum* [J]. Plant Breeding, 2001, 120(4): 311-317.

[11] 宗绪晓, 关建平, 王述民, 等. 中国豌豆地方品种 SSR 标记遗传多样性分析 [J]. 作物学报, 2008, 34(8): 1330-1338.

Zong X X, Guan J P, Wang S M, et al. Genetic diversity among Chinese pea (*Pisum sativum* L.) landraces revealed by SSR markers [J]. Acta Agronomica Sinica, 2008, 34(8): 1330-1338. (in Chinese)

[12] 李 玲, 孙文松. 国内豌豆种质资源的形态多样性分析 [J]. 辽宁农业科学, 2010(2): 22-25.

Li L, Sun W S. Morphological diversity analysis of Chinese pea (*Pisum sativum* L.) germplasm [J]. Liaoning Agricultural Sciences, 2010(2): 22-25. (in Chinese)

[13] 贺晨帮, 宗绪晓. 豌豆种质资源形态标记遗传多样性分析 [J]. 植物遗传资源学报, 2011, 12(1): 42-48.

He C B, Zong X X. Genetic diversity of pea (*Pisum sativum* L.) resources revealed by morphological traits [J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2011, 12(1): 42-48. (in Chinese)

[14] 刘娟娟, 李鸣雷, 赵惠贤, 等. 陕西大豆资源遗传多样性及变异特点研究 [J]. 植物遗传资源学报, 2010, 11(3): 326-334.

Liu M J, Li M L, Zhao H X, et al. Genetic diversity and variation trait of Shaanxi soybean landraces [J]. Journal of Plant Genetic Resources, 2010, 11(3): 326-334. (in Chinese)

[15] 刘娟娟, 胡胜武, 赵惠贤, 等. 基于农艺性状和 RAPD 片段的陕西大豆种质资源遗传多样性研究 [J]. 西北农业学报, 2009, 18(5): 159-166.

Liu M J, Hu S W, Zhao H X, et al. Genetic diversity of Shaanxi soybean landrace based on agronomic traits and RAPD data [J]. Acta Agriculturae Boreali-Occidentalis Sinica, 2009, 18(5): 159-166. (in Chinese)

[16] Gemechu K, Mussa J, Getnet D. Extent and pattern of genetic diversity for morpho-agronomic traits in Ethiopian highland pulse landraces: I. Field pea (*Pisum sativum* L.) [J]. Genetic Resources and Crop Evolution, 2005, 52: 539-549.

(上接第 69 页)

[20] 糜赛男, 曹明富. 植物组织特异性启动子的研究进展 [J]. 生物学教学, 2010, 35(7): 2-4.

Mi S N, Cao M F. The research progress on tissue specific promoter in plants [J]. Biology Teaching, 2010, 35(7): 2-4. (in Chinese)

[21] 吴书音, 郭玉双, 柏 锡, 等. 豆荚特异性启动子 Pmsg 的克隆及抗大豆食心虫植物表达载体的构建 [J]. 东北农业大学学报, 2008, 39(3): 58-63.

Wu S Y, Guo Y S, Bai X, et al. Clone of the pod-specific promoter and construction of expression vectors resistant to soybean bean pod borer [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2008, 39(3): 58-63. (in Chinese)