

# 烟草维管束发育相关基因 *Nvas* 启动子顺式作用元件鉴定

谭艳平 叶 莲 何福收 褚 巍 邵敏敏

(中南民族大学 生命科学学院, 国家民委生物技术重点实验室,  
武陵山区特色资源植物种质保护与利用湖北省重点实验室, 武汉 430074)

**摘 要** 为研究烟草维管束发育相关基因 *Nvas* 启动子顺式作用元件, 将克隆得到的 *Nvas* 启动子 ATG+1 ~ -463 区域分为 10 个不同长度的片段与 *GFP* 报告基因融合构建了植物表达载体并完成了 5' 端缺失分析. 利用根癌农杆菌介导转化 W38 型烟草叶盘, 得到了含有不同长度 *Nvas* 启动子片段的转基因烟草植株. 体视显微镜下观察到含 *Nvas* 启动子-216 ~ -463 区域的转基因烟草均有绿色荧光蛋白的表达, 表达部位集中在维管束组织. 结果表明 *Nvas* 启动子能使外源基因在维管束组织中特异表达. 该启动子活性高于 CaMV35S, 在 ATG+1 ~ -216 区域存在核心启动子元件, 在 -337 ~ -379 区域存在能增强启动子活性的元件.

**关键词** 启动子; 烟草; 维管束; 缺失分析

中图分类号 Q781 文献标识码 A 文章编号 1672-4321(2018)02-0031-05

## Identification for Promoter Cis-acting Element of Vascular Bundle Development Related Gene *Nvas* in *Nicotiana tobacum*

Tan Yanping, Ye Lian, He Fushou, Chu Wei, Shao Minmin

(Hubei Province Key Laboratory for the Plant Germplasm Conservation and Utilization of Wuling Mountainous Area, Key Laboratory of State Ethnic Affairs Commission for Biological Technology, College of Life Sciences, South-Central University for Nationalities, Wuhan 430074, China)

**Abstract** In order to study the promoter cis-acting element of vascular bundle related gene *Nvas* in *Nicotiana tobacum*, *Nvas*'s promoter sequence (ATG+1 ~ -463) was divided into ten fragments of different lengths and fused with *GFP* to construct plant expression vector and complete the deletion analysis at 5' end. Transgenic plants were obtained by *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. The results of the stereomicroscope showed that the green fluorescence were observed in vascular bundle in -216 ~ -463 transgenic plants. The expression results revealed the *Nvas* promoter could make the genes express in vascular bundle specifically, which had a higher promoter activity than CaMV35S. A key promoter element exist in ATG+1 ~ -216 region and an element could enhancing promoter activity may exist in the -337 ~ -379 region.

**Keywords** promoter; *Nicotiana tobacum*; vascular bundle; deletion analysis

启动子是 DNA 上一段能起始基因转录的序列, 分为组成型启动子、诱导型启动子和组织器官特异型启动子. 组成型启动子如花椰菜花叶病毒 35S 启动子 (CaMV35S) 能使外源基因在转基因植株各部位稳定、

持续表达<sup>[1]</sup>, 这种特性会造成植物体内大量的营养浪费. 组织特异型启动子能使外源基因只在特定的组织中表达, 克服组成型启动子的缺点<sup>[2]</sup>. 在应用上越来越多地选择利用合适的组织特异型启动子来降低外

收稿日期 2018-01-20

作者简介 谭艳平(1976-), 男, 副教授, 博士, 研究方向: 植物遗传学, E-mail: yanptan@mail.scuec.edu.cn

基金项目 湖北省自然科学基金(2018CFB81)

源转入基因的沉默风险,更有效地得到稳定且性状优良的转基因作物<sup>[3]</sup>。植物从地下根部到地上部分是由维管系统连接,维管系统在支撑植物向上生长以及水分和营养物质的运输上起到了关键作用,但是许多病虫害也能利用维管束系统在植物体内传播,影响植物的生长发育。研究维管束组织特异型启动子可以使靶基因在维管束系统中特异表达,从而调节维管束生长发育,增强植物维管束病虫害的防控能力<sup>[4-7]</sup>。Singer 等发现脐橙蔗糖合成酶 1(*CsSUS1p*) 启动子可以驱动外源基因在维管束韧皮部表达,可应用于防治维管束疾病<sup>[8]</sup>。许兰珍等发现豇豆富甘氨酸蛋白基因(*GRP*) 启动子具有较强的韧皮部组织特异性,可以应用于柑橘抗黄龙病基因工程育种<sup>[9]</sup>。前期研究克隆了一个烟草维管束发育相关基因 *Nvas* 启动子序列,经预测 ATG+1 至-463bp 区域以内含有维管束特异启动子顺式作用元件和核心启动子区。为了弄清该启动子的各个元件,将该基因启动子 ATG+1~-463 区域分为 10 个 5'端缺失片段并构建植物双元表达载体<sup>[10,11]</sup>。通过检测报告基因 *GFP* 的表达情况,鉴定启动子的各个元件,并进一步探究 *Nvas* 启动子不同区段的生物学功能。

## 1 材料与方法

### 1.1 实验材料、试剂与仪器

载体 W38 型烟草种子,大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 、根癌农杆菌 EHA105、载体 PUD18-T、植物表达载体 pCAMBIA1302 均由中南民族大学国家民委生物技术重点实验室提供。

限制性内切酶 *Hind* III、*Nco*I、T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司,DNA 聚合酶(*Taq* 酶、*exTaq* 酶)购自 TaKaRa 公司,其他常用化学试剂购自国药集团。

Thermal Cycler PCR 仪(BIO-RAD, T100 型),Shandon Crytome FSE 冷冻切片机,Nikon SMZ1500 体式显微镜。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 引物设计

在 *Nvas* 启动子 ATG 翻译起始位点上游+1~-463 区域内不同位点设计 10 个 5'缺失载体引物(表 1,1-11)及 pCAMBIA1302 上 *GFP* 设计引物(表 1)用于阳性鉴定和实时荧光定量 PCR(表 1,12-17)。

表 1 PCR 引物序列

Tab.1 Oligos sequences of PCR

序号	引物编号	位点	序列(5'-3')
1	R	+1	CATGCCATGGGAAGTAAGAGTTGGTTACTCTTC
2	F1	-216	CCCAAGCTTTGTACTTGTGGGAAATTTGTGGC
3	F2	-243	CCCAAGCTTGTCTAATTGCAGGAAATGAGAT
4	F3	-264	CCCAAGCTTCTTTACCTTCAAAATTTAATGTC
5	F4	-284	CCCAAGCTTCAACTGTCTCTCTCAGATC
6	F5	-316	CCCAAGCTTCTGTTTCTACTCTCTCTATCG
7	F6	-337	CCCAAGCTTCCACAACAAAAGCAATTTCTCTC
8	F7	-379	CCCAAGCTTCATTTTCTTCAAATGAAATGAACCG
9	F8	-402	CCCAAGCTTAATACAAGAGATATGTGTATGATC
10	F9	-436	CCCAAGCTTATGAACCTTTTACATGATCAAATC
11	F10	-463	CCCAAGCTTATCCGTTACAAATGTTATTTTAGC
12	gfpF	GFP	CTTGTGAATTAGATGGTGATG
13	gfpR	GFP	ATGTATACGTTGTGGGAGTTG
14	L25F	L25 ribosomal protein	CCCCTCACCACAGAGTCTGC
15	L25R	L25 ribosomal protein	GCACGGCAGGAAACTCACC
16	qrtF	GFP	CGTGCAACTCGCTGATCATT
17	qrtR	GFP	ATGCCATGTGTAATCCGAGC

#### 1.2.2 启动子 5'缺失载体的构建

以 W38 型烟草 DNA 为模板,通过 PCR 技术以 F1~F10 和 R 引物 62℃ 扩增 35 个循环得到长度不同的 5'缺失片段,回收连接到 pMD18-T 载体上<sup>[12,13]</sup>并热激转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 。提取筛选出来的单菌落质粒,利用对应的引物进行 PCR 扩增检测,将阳性样品进行测序。提取测序成功的样品质粒,用

限制性内切酶 *Hind* III 和 *Nco*I 双酶切,回收酶切产物连接到同样双酶切割的双元载体 pCAMBIA1302 上,以各启动子 5'缺失片段替换 pCAMBIA1302 载体的 CaMV35S 启动子与 *GFP* 报告基因融合,构建植物双元表达启动子 5'缺失载体,构建图如图 1。热激转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ ,选取阳性菌落,提取质粒,利用对应

的引物进行 PCR 扩增测序检测载体。

### 1.2.3 根癌农杆菌介导叶盘法转化烟草

将构建成功的 5' 端缺失载体电击转化农杆菌 EHA105 筛选出转化成功的农杆菌。取在 1/2MS 培养基上萌发 1 ~ 2 个月的 W38 型烟草无菌叶片, 用玻璃试管压成直径 1 cm 的圆形叶盘, 利用农杆菌菌液侵染烟草叶盘<sup>[14]</sup>。然后在潮霉素选择培养基上培养 5 ~ 6 周, 分化培养基分化出烟草小芽, 最后移到生根培养基上继续培养, 待长出烟草植株后移置于蛭石中栽培。

### 1.2.4 转基因烟草阳性鉴定

CTAB 法提取转基因烟草叶片基因组 DNA, pCAMBIA1302 质粒作为阳性对照, W38 型烟草基因组 DNA 作为阴性对照, 通过 PCR 技术以 *gfpF* 和 *gfpR* 引物 61 °C 扩增 35 个循环筛选阳性植株。

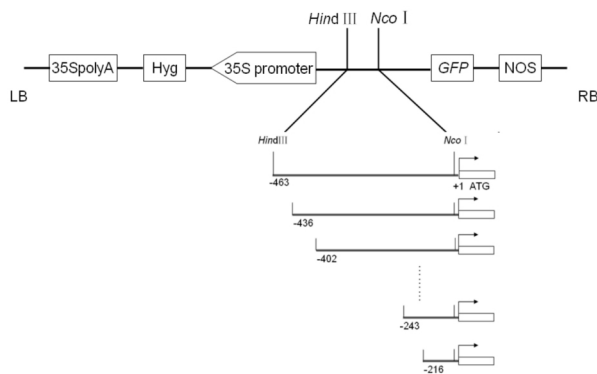
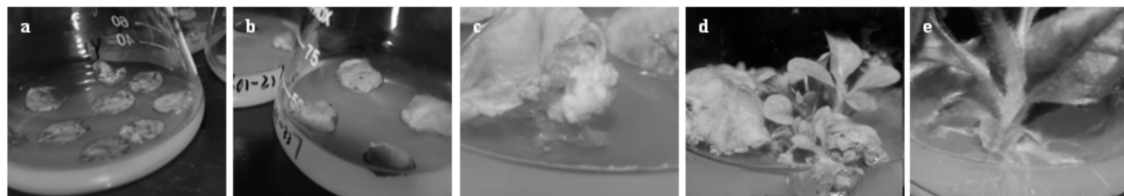


图 1 *Nvas* 启动子 5' 缺失载体结构图

Fig.1 Vector construction of 5' deletion of *Nvas*'s promoter

### 1.2.5 GFP 荧光观察

取阳性烟草植株幼嫩叶片的叶柄部分, 冷冻切片横切成 25  $\mu$ m 的薄片置于载玻片上, 在体视显微镜下 10000 ms 曝光观察绿色荧光。



a) 叶盘预培养; b) 叶盘农杆菌共培养; c) 叶盘选择培养; d) 愈伤组织分化出苗; e) 转基因烟草生根培养

图 3 农杆菌介导 W38 型烟草叶盘遗传转化

Fig.3 The transformation in W38 *Nicotiana tobacum* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

利用 *gfpF* 和 *gfpR* 引物扩增转基因烟草基因组 DNA, pCAMBIA1302 质粒作为阳性对照检测, W38 型烟草基因组 DNA 作为阴性对照, 电泳结果如图 4。

### 1.2.6 GFP 报告基因相对表达量检测

提取阳性转基因烟草 RNA, 反转录成 cDNA。实时荧光定量 PCR 技术检测 GFP 报告基因的相对表达量<sup>[15]</sup>。以 *L25 ribosomal protein* 为烟草内参基因, 以 *qrtF*、*qrtR* (表 1) 引物 95 °C 30 s, 95 °C 3 s, 60 °C 30 s, 进行 40 个循环, 收集荧光信号检测 GFP 报告基因相对表达量, 每个基因设置 3 个重复。

## 2 结果与分析

### 2.1 *Nvas* 启动子 5' 缺失表达载体的构建

利用表 1 中设计的引物在 W38 型烟草基因组 DNA 中扩增得到 5' 端缺失片段, 经扩增测序等一系列步骤后, 成功连接到载体 pCAMBIA1302 并热激转化 DH5 $\alpha$ 。提取筛选出来的单菌落质粒, 利用对应的引物进行 PCR 扩增选取阳性菌落, 结果见图 2。阳性菌测序结果表明 10 个启动子 5' 缺失载体均构建成功。根据片段位点, 将载体命名为 P-216, P-243, P-264, P-284, P-316, P-337, P-379, P-402, P-436, P-463。

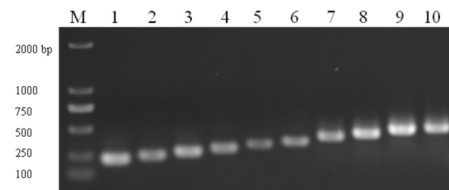


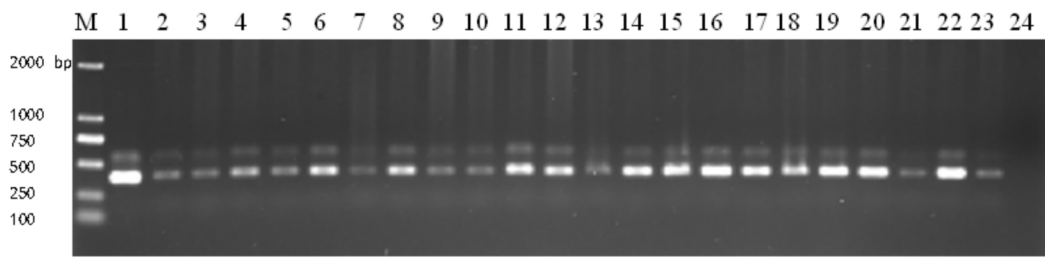
图 2 *Nvas* 启动子 5' 缺失表达载体质粒 PCR 电泳结果

Fig.2 The result of PCR for expression vectors with 5' deletion of *Nvas*'s promoter

### 2.2 转基因烟草阳性鉴定

将 p-216 等 10 个载体经农杆菌介导成功侵染烟草叶盘后, 在潮霉素选择培养基上筛选培养后, 最终获得转基因烟草共 80 株 (图 3)。

结果说明 5' 端缺失表达载体转化 W38 型烟草成功, 共得到阳性转基因植株 36 株。



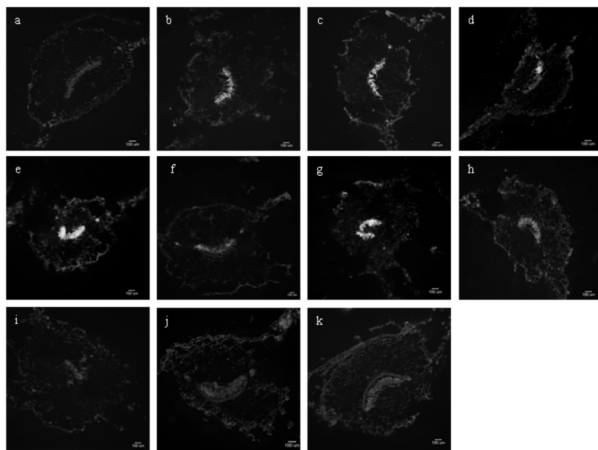
M: DL2000; 1-2: p-216; 3-4: p-243; 5-6: p-264; 7-8: p-284; 9-10: p-316; 11-12: p-337; 13-14: p-379; 15-16: p-402; 17-18: p-436; 19-20: p-463; 21-22: p35S; 23: 阳性对照; 24: 阴性对照

图 4 转基因烟草植株 PCR 鉴定

Fig.4 The identification of the *Nicotiana tobacum* transgenic plants by PCR

### 2.3 转基因烟草 GFP 荧光观察

5'端缺失载体阳性转基因烟草叶柄荧光结果如图 5. p-216 ~ p-463 均可观察到绿色荧光,且荧光集中在维管束部位,而 CaMV35S 在叶柄其他细胞中也能观察到绿色荧光. 结果表明 *Nvas* 启动子为组织特异性启动子,能驱动外源基因在维管束组织特异表达. -216 区域以内存在核心启动子元件和维管束特异组织表达元件.



a) p-216; b) p-243; c) p-264; d) p-284; e) p-316; f) p-337; g) p-379; h) p-402; i) p-436; j) p-463; k) p35S

图 5 不同长度 *Nvas* 启动子片段转基因烟草叶柄 GFP 荧光观察结果

Fig.5 The GFP expression in *Nicotiana tobacum* transformed with different length of *Nvas*'s promoter fragments

### 2.4 转基因烟草 GFP 相对表达量检测

以 CaMV35S 启动子 p35S *GFP* 的表达量为 1, 各 5'端缺失表达载体的 *GFP* 相对表达量结果如图 6. *Nvas* 启动子驱动 *GFP* 表达的启动子活性明显高于 CaMV35S,表明该启动子为强启动子. ATG+1 ~ -216 以内存在核心启动子元件及维管束组织特异表达元件. p-379、p-402 相对表达量显著增高,说

明在-337 ~ -379 区域内存在能增强启动子活性的元件, -402 ~ -436 区域有拮抗作用的元件.

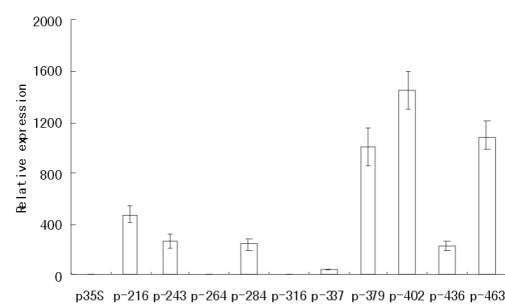


图 6 不同长度 *Nvas* 启动子片段转基因烟草 *GFP* 相对表达量结果

Fig.6 The relative expression result of *GFP* in *Nicotiana tobacum* transformed with different length of *Nvas*'s promoter fragments

## 3 结语

越来越多的研究通过寻找合适的启动子来解决外源基因在转基因植物中的表达问题. 常用的组成型启动子如 CaMV35S 启动子、Ubiquitin 启动子等能使外源基因在植物体整个生命周期及所有器官均表达. 诱导型启动子能使外源基因在特定诱导条件下表达. 组织特异型启动子能使外源基因在植株特定部位表达,从而避免了组成型启动子长期高效表达外源基因而造成的生长发育负效应问题<sup>[2]</sup>. 应用不同组织特异型启动子有针对性地驱动不同的外源基因,实现多外源基因共转化植株<sup>[2]</sup>,从而得到能健康生长、性状优良的品种. 组织特异型启动子 *Nvas* 的顺式元件以及表达部位和活性是本研究主要关注的问题, *Nvas* 启动子-216 ~ -463 区域均能驱动 *GFP* 基因在烟草维管束组织中特异表达, ATG+1 ~

-216 区域有能启动基因表达的核心启动子元件以及维管束特异表达元件, -337 ~ -379 区域有能显著增强启动子活性的元件. 该启动子驱动活性明显高于 CaMV35S, 在基因工程中能驱动外源基因在维管束组织中特异高效表达. 有望应用于防治维管束病害, 提高作物抗病性.

## 参 考 文 献

- [1] 王梦阳,魏宪辉,王金菁,等. Prd29A 与 CaMV35S 启动子调控转胡萝卜 *AFP* 基因提高烟草抗寒性[J]. 农业生物技术学报, 2017, 25(8): 1265-1277.
- [2] 贺红霞,陈亮,林春晶,等. 组织特异性启动子在作物基因工程中的研究进展[J]. 中国农学通报, 2014, 30(9): 225-231.
- [3] Gao S J, Damaj M B, Park J W, et al. A novel sugarcane bacilliform virus promoter confers gene expression preferentially in the vascular bundle and storage parenchyma of the sugarcane culm [J]. *Biotechnol Biofuels*, 2017, 10: 172.
- [4] 杨郁文,张保龙,陈天子,等. 棉花 PGHNBS 启动子维管束特异表达元件的分离及功能研究[J]. 江苏农业学报, 2012, 28(6): 1223-1228.
- [5] 张明菊,王红梅,王书珍,等. 植物对维管束病原菌的防卫反应机制研究进展[J]. 植物生理学报, 2015, 51(5): 601-609.
- [6] 李梦阳,彭冠云,邓彪,等. 水稻维管束的研究进展[J]. 植物生理学报, 2017, 53(9): 1586-1590.
- [7] Zhang B L, Ouyang Y N, Xu J Y, et al. Cadmium remobilization from shoot to grain is related to pH of vascular bundle in rice [J]. *Ecotoxicol Environ Saf*, 2018, 147: 913-918.
- [8] Singer S D, Hily J M, Cox K D. The sucrose synthase-1 promoter from *Citrus sinensis* directs expression of the  $\beta$ -glucuronidase reporter gene in phloem tissue and in response to wounding in transgenic plants [J]. *Planta*, 2011, 234(3): 623-637.
- [9] 许兰珍,彭爱红,何永睿,等. 异源韧皮部特异启动子在转基因烟草中的表达[J]. 园艺学报, 2014, 41(1): 1-8.
- [10] 李圣彦,郎志宏,黄大昉. 真核生物启动子研究概述[J]. 生物技术进展, 2014, 4(3): 158-164.
- [11] Niu G L, Gou W, Han X L, et al. Cloning and functional analysis of phosphoethanolamine methyltransferase promoter from maize (*Zea mays* L.) [J]. *Int J Mol Sci*, 2018, 19(1): E191.
- [12] 覃永华,沙干,明金,等. 水稻基因 *ST1* 的克隆及原核表达[J]. 中南民族大学学报(自然科学版), 2017, 36(2): 35-37.
- [13] 陈思礼,陈洁,吴汇兰. 鱼腥藻 PCC7120 染色体 *MazEF* 同源基因对 *asr0757/alr0758* 的初步研究[J]. 中南民族大学学报(自然科学版), 2016, 35(1): 29-33+54.
- [14] 赵莉,钟鸣,马慧,等. 农杆菌介导的烟草高效遗传转化体系的建立[J]. 江苏农业科学, 2011, 39(3): 67-68, 74.
- [15] 王红莹,杜嫚. 斑马鱼母源凝集素基因 *zfol* 的克隆和表达分析[J]. 中南民族大学学报(自然科学版), 2016, 35(3): 26-29.

(责任编辑 姚春娜)