

厚藤脱水素基因 *IpDHN* 启动子 *IpDHN-Pro* 的克隆和调控转录活性分析

苏华香^{1,2}, 郑洁旋^{1,2}, 张会^{1,2}, 何金实³, 简曙光¹, 夏快飞¹, 陈建通¹, 张美^{1*}

(1. 中国科学院华南植物园, 广东省应用植物学重点实验室, 广州 510650; 2. 中国科学院大学, 北京 100049; 3. 海南大学热带农林学院, 海口 570228)

摘要: 为了解厚藤(*Ipomoea pes-caprae*)脱水素基因 *IpDHN* (GenBank 登录号: KX426069)启动子的转录活性和对非生物胁迫和植物激素 ABA 的响应, 通过染色体步移法克隆了 *IpDHN* 的上游启动子序列 *IpDHN-Pro*, 长度为 974 bp。构建 *IpDHN-Pro* 调控下 *GUS* 转基因载体, 转化拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)植株获得 *IpDHN-Pro::GUS* 转基因植株并进行 *GUS* 染色, 验证 *IpDHN-Pro* 启动转录活性以及在氯化钠、甘露醇、ABA 处理后拟南芥 *GUS* 基因表达变化。结果表明, 扩增获得的 *IpDHN-Pro* 序列包含多个顺式作用元件, 包括 1 个 ABRE、3 个 Myb 转录因子结合位点、富含 TC 的重复序列以及 Skn-1 基序等。转基因拟南芥 *GUS* 染色及 qRT-PCR 表明该序列可驱动 *GUS* 基因在拟南芥稳定表达, 且表达受高盐、渗透压及 ABA 的诱导。这表明 *IpDHN-Pro* 是一个盐旱、ABA 诱导的启动子序列, 可应用于相关的植物抗逆遗传工程研究。

关键词: 启动子; 盐旱诱导; ABA 诱导; 脱水素; 厚藤

doi: 10.11926/jtsb.4011

Cloning and Transcriptional Regulating Activities Analysis of A Dehydrin Promoter *IpDHN-Pro* from *Ipomoea pes-caprae*

SU Hua-xiang^{1,2}, ZHENG Jie-xuan^{1,2}, ZHANG Hui^{1,2}, HE Jin-shi³, JIAN Shu-guang¹, XIA Kuai-fei¹, CHEN Jian-tong¹, ZHANG Mei^{1*}

(1. Provincial Key Laboratory of Applied Botany, South China Botanical Garden, Guangzhou 510650, China; 2. University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China; 3. Institute of Tropical Agriculture and Forestry, Hainan University, Haikou 570228, China)

Abstract: Based on the previous research about *Ipomoea pes-caprae* cDNA library screening, a full length cDNA encoding dehydrin was characterized and named as *IpDHN* (GenBank accession: No. KX426069). In order to explore the transcriptional activity of the *IpDHN* promoter and the characteristics of this promoter region responding to abiotic stresses and ABA, the 5' upstream sequence of *IpDHN* (974 bp), named as *IpDHN-Pro* was cloned by genomic walking method, and then was subcloned into plant expression vector, in which *GUS* is under control of *IpDHN-Pro*. The transgenic *Arabidopsis* plants harboring *IpDHN-Pro::GUS* were checked by *GUS* staining assay, then the expression of *GUS* was further detected by qRT-PCR after the transgenic plants were challenged by NaCl, mannitol and ABA. The results showed that the *IpDHN-Pro* contained several *cis*-acting elements, including an ABRE, three Myb transcription factor binding sites, a TC-rich repeat, and a Skn-1 motif. The *GUS* staining and qRT-PCR showed that *IpDHN-Pro* could drive the stable expression of *GUS* gene in transgenic *Arabidopsis*, and this promoter was up-regulated by high salinity, osmotic stress and ABA treatment.

收稿日期: 2018-10-31 接受日期: 2018-12-28

基金项目: 中国科学院 A 类战略性先导科技专项(XDA13020500); 2018 年中国科学院华南植物园大学生创新计划项目(67)资助

This work was supported by the Strategic Priority Research Program of Chinese Academy of Sciences (Grant No. XDA13020500), and the 2018 Innovative Program for Undergraduate in South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences (Grant No. 67).

作者简介: 苏华香(1995~), 女, 在读硕士研究生。E-mail: suhuaxiang17@mailsucas.ac.cn

* 通信作者 Corresponding author. E-mail: zhangmei@scbg.ac.cn

Therefore, it was indicated that *IpDHN-Pro* was a salt/dehydration and ABA induced promoter sequence, and can be applied in plant genetic engineering research aiming at abiotic stress tolerance.

Key words: Promoter; Salt/osmotic stress induced; ABA induced; *Dehydrin*; *Ipomoea pes-caprae*

厚藤(*Ipomoea pes-caprae*)是广泛分布于热带亚热带滨海地区的多年生藤本盐生植物,隶属于旋花科(Convolvulaceae)番薯属^[1]。厚藤抗逆性强,对营养物质和水的利用效率极高,具有良好的固沙能力和耐海水冲刷能力,在岛礁防风固沙、绿化及生态重建等方面发挥重要作用^[2]。厚藤作为优异的野生植物资源,具有较大的开发潜力及应用价值,同时也可作为一种研究植物抗逆分子机理、发掘抗逆基因的材料进行深入研究。

脱水素(dehydrin, DHN)是植物胚胎发育晚期丰富蛋白(late embryogenesis abundant proteins, LEA)家族成员,该家族蛋白通常富含较高比例的亲水性氨基酸,是一类高度稳定的亲水性蛋白^[3]。研究表明,LEA 基因(包括脱水素基因)通常在植物组织遭遇缺水胁迫时广泛诱导表达,在种子发育晚期的脱水过程中,以及植物组织遭受高盐、干旱、冷冻基因 ABA 处理时表达上调^[4]。脱水素可归于 LEA_II 类蛋白^[5],目前已经鉴定的植物脱水素蛋白的分子量为 9~200 kDa^[6-7],且通常含有 1~3 种具有不同重复的保守结构域。根据各个保守序列在蛋白中的分布数目,脱水素可分为 Kn、SKn、KnS、YnKn 和 YnSKn (n 表示重复数)^[8]5 个亚组。

有研究表明,当植物遭受能导致细胞脱水的相关逆境时,如高渗透压或高盐胁迫以及冷冻时,脱水素基因都能够在细胞内大量表达^[9]。脱水素基因针对逆境胁迫的转录调控是该类基因行使其正常的生物学功能的第一步,而基因的转录主要决定于其启动子序列。胁迫诱导的基因启动子通常含有多个/种胁迫调控的顺式作用元件,包括 ABA 应答元件 ABRE (ABA-responsive elements), C-重复/干旱应答/低温应答元件 CRT/DRE/LTRE (C-repeat/drought-responsive/low-temperature-responsive element), 转录因子 MYB 或 MYC 结合元件 MYBPE/MYCPE (myeloblastosis/myelocytomatosispromoter elements)^[8]。如黄瓜(*Cucumis sativus*)^[9]、葡萄(*Vitis vinifera*)^[10-11]、小麦(*Triticum aestivum*)^[12]、大麦(*Hordeum vulgare*)^[13]的脱水素基因启动子中含有多个不同逆境胁迫应答元件,并且这些脱水素基因的表达均受到相应的胁迫环境的调控。综上所述,基因的转录调控受启动

子区域的顺式作用元件的影响,而鉴定具有特定逆境胁迫应答元件的启动子在逆境胁迫的植物遗传改良中具有重要的应用潜力。

本实验室在前期研究中已经克隆了厚藤脱水素的 cDNA 序列,并根据其 cDNA 序列发掘出该基因对应的基因组序列。实时定量 RT-PCR 表明 *IpDHN* 是一个受胁迫诱导的耐盐耐旱功能基因^[14]。据此,本试验拟通过染色体步移法克隆厚藤 *IpDHN* 基因的启动子序列,分析启动子中的顺式作用元件,进一步构建 *IpDHN-Pro/pBI101.2* 植物表达载体,并转化拟南芥植株,探讨启动子的表达模式,为启动子序列应用于针对高盐/干旱胁迫的植物转基因育种和培养高盐/干旱抗逆作物提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

厚藤(*Ipomoea pes-caprae*)的成年植株取材于中国科学院华南植物园温室群(23°18'75.91" N, 113°37'02.38" E)。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)生态型为 Col-0,栽培温度 25°C,相对湿度 70%,光照强度为 120~150 $\mu\text{mol m}^{-2}\text{s}^{-1}$,光暗周期为 16 h/8 h。大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 DH5 α ,植物表达载体 pBI101.2 和农杆菌株 GV3101 均为本实验室保存。载体构建所需要的克隆载体 pGEM T 购于 Promega (上海)公司,基因侧翼序列扩增所用的试剂盒为 Genome Walking Kit (TaKaRa Bio USA)。载体无缝克隆所用的 In-Fusion HD Cloning Kit 购于 Clontech (TaKaRa Bio USA)公司。总 RNA 的提取依照 HiPure Plant RNA Kits (Magen)的说明书进行。cDNA 链的合成依照 TransScript One-Step gDNA Removal and cDNA Synthesis SuperMix (全式金公司)进行。qRT-PCR 反应参照 TransStart[®] Top Green qPCR Super-Mix (全式金公司)进行。其他试剂及仪器均为分子生物学实验室常用试剂及设备。

1.2 方法

基因组 DNA 的提取 取健康生长的厚藤小苗叶片 0.1 g,放入研钵中加入液氮研磨至粉末,采

用北京天恩泽基因科技有限公司的植物基因组 DNA 提取试剂盒 One-Tube Plant DNAOUT (货号: 60705) 提取基因组 DNA。采用电泳检测和紫外分光光度计的方法检测基因组 DNA 的纯度和浓度, 并用 ddH₂O 将 DNA 的浓度调整至 100 ng μ L⁻¹。

***IpDHN* 基因组序列的获取** 根据厚藤 *IpDHN* 的 cDNA 阅读框序列, 设计引物对 DHNF 和 DHNR (5'-ATGGCGGAGGAGTGCCACC-3'和 5'-TTAATGGCATTCCCCACCCTT-3'), 以厚藤基因组 DNA 为模板, 扩增 *IpDHN* 的基因组序列。PCR 反应结束后, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 从 PCR 产物中挑选明亮条带, 依照 Magen 公司 HiPure Gel Pure DNA Kits 说明书进行琼脂糖凝胶电泳回收, 并连接于 T 载体上。将反应产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态菌株。挑取单克隆, 提取质粒, 送生物公司进行测序。

***IpDHN* 基因 5'侧翼序列的克隆** 根据 *IpDHN* 基因的基因组序列, 参照 Genome Walking Kit 的操作指南, 设计两个特异性引物 SP1: 5'-TCCTTATACTCCACCCCATG-3'和 SP2: 5'-GCAGTGGGGCTTCTTCTCCT-3'。以厚藤基因组 DNA 为模板, 用 SP1、SP2 对应染色体步移的第 1、2 轮随机引物进行染色体步移克隆 *IpDHN* 基因 5'侧翼序列。两轮 PCR 结束后, 用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 从 PCR 产物中挑选明亮条带, 依照 Magen 公司 HiPure Gel Pure DNA Kits 说明书进行琼脂糖凝胶电泳回收, 并连接于 T 载体上。将反应产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态菌株。挑取单克隆, 提取质粒, 送生物公司进行测序, 并保存正确质粒(命名为 *IpDHN-Pro-pGEM T*)备用。

生物信息学分析 采用启动子分析数据库 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 和植物顺式作用元件分析数据库 PLACE (<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/?action=newplace>) 对 *IpDHN* 基因的 5'侧翼序列进行启动子功能预测及顺式作用元件进行分析。

***IpDHN-Pro::GUS* 转基因拟南芥的获取** 以厚藤基因组 DNA 为模板, 设计引物 *IpDHNProF*: 5'-CGACTCTAGAGGATCCAGTGGGGCTTCTTCTCCT-3'和 *IpDHNProR*: 5'-ACCTACCCGGGGATCCGCTCCTCCGCAGGCTTCTG-3'对厚藤脱水素基因 *IpDHN* 的启动子序列进行 PCR 扩增(下划线表示 *Bam*HI 酶切位点)。PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳回收; 同时采用 *Bam*HI 单酶切处理植物表达载体 pBI101.2, 回收线性化质粒。回收后 *IpDHN-*

PRO 启动子 PCR 片段和线性化 pBI101.2 质粒经 Nanodrop 公司紫外分光光度计测定浓度, 采用无缝克隆技术进行 DNA 片段和载体的同源重组连接。按照说明书的方法将反应产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态菌株。挑取单克隆, 提取质粒, 经测序鉴定为正确的阳性克隆后, 命名为 *IpDHN-Pro/pBI101.2*, 保存质粒备用。经测序分析正确后, *IpDHN-Pro/pBI101.2* 重组质粒采用冻融法转入农杆菌 GV3101 中。以野生型拟南芥作为转基因材料, 采用花序侵染的方法, 通过 GV3101 农杆菌介导转化拟南芥。将所获得的拟南芥转基因 T₃ 代种子放于含有 50 μ g mL⁻¹ 卡那霉素的 MS 培养基上进行筛选。获取 T₃ 代纯合体拟南芥进行后续分析。

***IpDHN-Pro* 的转录活性验证** 取生长 10 d 的转基因拟南芥 T₃ 代植株和开花拟南芥的不同部位, 置于 GUS 染色反应液中处理 3 h 以上, 采用组织化学法进行染色检测, 之后用 95% 的乙醇退色 48 h 后利用 LEICA DM2500 体式显微镜拍照。配制 1 mL 的 GUS 染液可以按照以下操作进行, 即取 1.5 mL 的空离心管, 首先加入 309 μ L 的 ddH₂O, 再依次加入 500 μ L 0.2 mol L⁻¹ 的磷酸钠缓冲液(pH 7.0), 1 μ L 的 Triton X-100, 10 μ L 的 50 mmol L⁻¹ 亚铁氰化钾溶液, 10 μ L 的 50 mmol L⁻¹ 铁氰化钾溶液, 20 μ L 0.2 mol L⁻¹ 的 EDTA-Na₂ 溶液(pH 7.0), 100 μ L 的甲醇, 以及 50 μ L 10 mg mL⁻¹ X-Gluc 溶液(溶于二甲基甲酰胺), 并充分混匀。

***IpDHN-Pro* 对胁迫和激素信号的响应** 取生长 10 d 的转基因拟南芥 T₃ 代植株(MS 培养基平板上), 分别加入 200 mmol L⁻¹ NaCl、300 mmol L⁻¹ 甘露醇和 0.1 mmol L⁻¹ ABA 进行高盐、渗透压和激素处理 24 h, 以 ddH₂O 处理的幼苗为对照, 取幼苗进行 GUS 组织化学染色并拍照。收集处理的拟南芥小苗各 0.5 g 提取总 RNA, 采用两步法以总 RNA 为模板进行逆转录 cDNA。根据罗氏荧光定量 PCR LightCycler480 使用方法进行 Real time RT-PCR, 检测 *GUS* 基因的表达情况。*GUS* 基因的引物为 *GUS-RTF*: 5'-ACGGGGAAACTCAGCAAGC-3'和 *GUS-RTR*: 5'-TGAGCGTCGCAGAACATTACAT-3'。内参基因为拟南芥肌动蛋白基因 *AtACT2* (At3g 18780)。*AtACT2* 基因的引物为 *ACT2-RTF*: 5'-GGTAACATTGTGCTCAGTGGTGG-3'和 *ACT2-RTR*: 5'-AACGACCTTAATCTTCATGCTGC-3'。qRT-PCR 扩增程序为: 95 $^{\circ}$ C 预变性 30 s; 95 $^{\circ}$ C 15 s, 60 $^{\circ}$ C 35 s, 40 次循环, 绘制溶解曲线。采用 Excel 2003 统计数据, 样

本的 C_t 值取 3 次重复的平均值。

2 结果和分析

2.1 *IpDHN* 启动子 *IpDHN-Pro* 的克隆

根据厚藤 *IpDHN* 的 cDNA 序列, 在起始密码子和终止密码子处设计引物, 以基因组 DNA 为模板, PCR

扩增获得 *IpDHN* 序列片段。回收片段连接于 T 载体上测序, 并和 *IpDHN* 的 cDNA 序列阅读框进行比较, 可知 *IpDHN* 序列中含有 1 个 264 bp 的内含子序列(图 1)。

采用染色体步移法设计基因特异引物 SP1 和 SP2, 参考 Genome Walking Kit 说明书, 以厚藤基因组 DNA 为模板, 经两轮 PCR 扩增获得 1 条明亮的 DNA 条带, 大小约为 1 kb (图 2)。

```

ATGGCGGAGGAGTGCCACCATAACCAGAAGCCTGCGGAGGAGCAAGTGCGTGTCAAGGCTGAGGACAAGGGGTTGCTTGACTTCTTGGGG
AAGAAGGAGGAGGAGAGAGAGAGCCACTGCGCGGAGGAGGAAGCCATTTCCGCGAGTTTGGGGAGAAGGTTTCATGTCTCCGAGCCGCCG
CATGGGGTGGAGTATAAGGAGGAGAAGATAAAGCTCCACCGCTCCTCCAGCAGCTCTAGTAGTTCTGTAAAGTATTATATCCATCGATCTC
TCTGTCAATTTTGATGACTGATTAATCTCTTTGGATTATTTCTTTTGGGTTTACATCTGGTAAATCTTACATTACAATTCTAGTTGGTA
AATGATTACGAATTAGTCTAGATTATTTAAATTTATTAGTGAGAGTCAAACCTCTAATCAGTCTAAATTTTATATTATTTTATAGGCTTT
TTTATTGTGGTTATCAAGTCAATAATCTGTCCAGTTTGACGGGATGAAGTTTGGCAGAGCGAGGAGGAATATGAAGAGGATGGAGTG
ATCAAGAAGAAAAAGAAGGAGAAGAAGGGGTTGAAGGAGAAGATCAAGGAGAACTCTCCGGCGAATCAAAGGAAGAGCAGAAGGGTGAA
GTTGACACCAGCGTTCCGGTGGAGAAATGCGAGGACGAGGAGCCGAGGAGAAGAAGGGGTTCTTGGACAAGATCAAGGAGAAGCTCCCC
GGAGGAGGGCATAAGAAGGCTGAGGAGGAAGTCCCTGCGCCGCTCCTCCGGCACCGCGGCACCGGCAGCTGAGCACCTCGAGGGGGAG
CCCCAAAAGGGTTCTTGGACAAGATCAAGGAGAAGCTGCCTGGGTACCACCCAAAGACTGAAGAAGAAAAGGGGATAGAGAAAGAGAAG
GGTGGGAATGCCATTAA
  
```

图 1 *IpDHN* 基因序列。阴影部分为 *IpDHN* 基因的内含子; 下划线分别为引物 SP2 和 SP1 序列。

Fig. 1 Sequence of *IpDHN*. The sequence in gray is the intron, and the underlined sequences are primers SP2 and SP1.

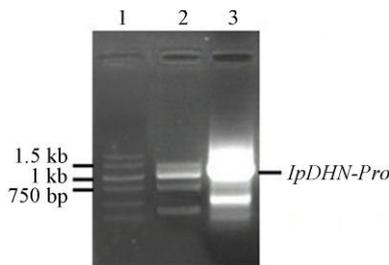


图 2 *IpDHN* 启动子片段的 PCR 扩增。1: 标准 DNA; 2: 第一轮 PCR; 3: 第二轮 PCR。

Fig. 2 PCR of *IpDHN* promoter. 1: Standard DNA marker; 2: The first PCR; 3: The second PCR.

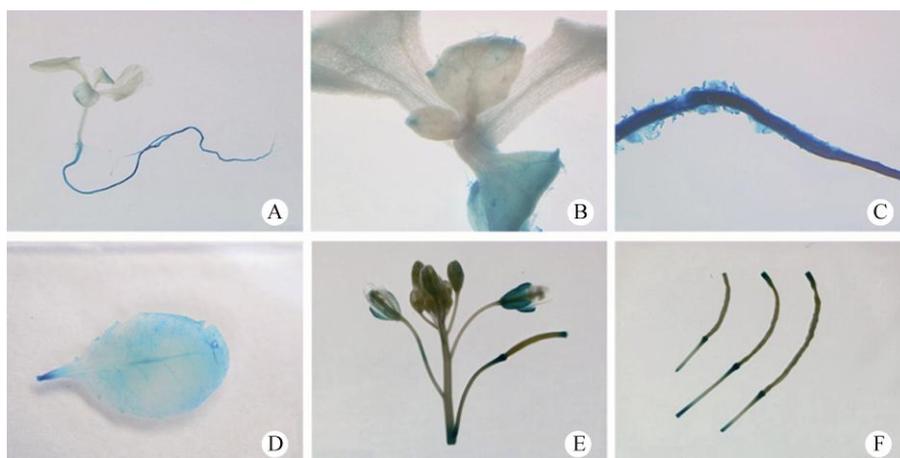
将该片段回收后连接于 T 载体上测序, 即获得长度为 974 bp 的 *IpDHN* 的 5'侧翼启动子序列, 将其输入在线分析软件 PlantCARE 和 PLACE, 该序列除了含有真核生物转录启动核心元件 TATA-box (TATA 盒)和 CAAT-box (CAAT 盒)外, 还存在一些其他的顺式作用元件(图 3)。起始转录必需的 TATA-box 位于起止密码子 ATG 上游 178 个碱基处(-178 bp); 而调控转录起始频率的 CAAT-box 位于起止密码子 ATG 上游 140 个碱基处(-140 bp)。在 ATG 上游 48 个碱基处(-48 bp)含有 1 个脱落酸应答元件(abscisic

acid-response element; ABRE; TACGTG); 而在 ATG 上游 52、718 和 925 个碱基处(-52、-718 和-925 bp) 还有 3 个 Myb 转录因子结合位点(myeloblastosis-binding sites, MBS1 和 MBS2; CGGTCA 或 CAAC-TG); ATG 上游 767 个碱基处(-767 bp)含有植物防御反应相关的富含 TC 的重复序列(TC-rich repeat regulatory element; ATTTTCTCCA)。此外, 在 ATG 上游 246 个碱基处(-246 bp)含有一个种子胚乳特异表达的顺式作用元件 Skn-1 基序(Skn-1 motif; GTCAT)。

2.2 启动子 *IpDHN-Pro* 的起始转录活性

为探明 *IpDHN-Pro* 序列是否具有转录活性, 将 *IpDHN-Pro* 连接至植物启动子表达载体 pBI101.2 中, 并通过农杆菌介导的拟南芥转基因试验, 验证其是否在拟南芥中具有启动基因转录的活性。选取经卡那霉素筛选的 T_3 代纯合体转基因拟南芥, 分别对其根、茎、叶、花、荚果和幼苗进行 GUS 染色。结果表明(图 4), GUS 阳性信号在拟南芥的主根中最强, 在莲座叶的叶中也有一定的表达, 而在幼苗的下胚轴中几乎不表达; 在成年植株叶片上有显色, 且表达量一般; 在花序中有较低的表达, 在发

- 974 bp GCAGTGGGGCTTCT
 - 960 bp TCTCCTTATACTCCACCCCATGCAGCTCCCGGAGACCGGTCA CAGCTTGTCTGTAAGCGGA
 Myb结合位点1(玉米)
 - 900 bp TGCCGGGAGCGGACAAGCCCGTCAGGGCGCGTCAGCGGGTGTGGCGGGTGTCCGGGGCTG
 - 840 bp GCTTA ACTATGCGGCATCAGAGCAGATTGTACTGAGAGTGCACCATATGCGGTGTGAAAT
 - 780 bp ACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAT ACCGCATCAGGCGCCATTCCGCATTCAGGCTGCG
 富含TC的重复序列(烟草)
 - 720 bp CAACCTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAAGG
 Myb结合位点2(拟南芥, 参与干旱诱导表达)
 - 660 bp GGGGTGTGCTGCAAGGCGATTAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTCACGACGTTG
 - 600 bp TAAAACGACGGCCAGTGCCAAGCTCTCGAGAAGCTTACTCCAAGAATATCAAAGATACAG
 - 540 bp TCTCAGAAGACCAAAGGGCTATTGAGACTTTTCAACAAAGGTAATATCGGGAAACCTCC
 - 480 bp TCGGATTCCATTGCCAGCTATCTGTACATCATCAAAGGACAGTAGAAAAGGAAGGTG
 - 420 bp GCACCTACAAATGCCATCATTGCGATAAAGGAAAGGCTGTCGTTCAAGATGCCTCTGCCG
 - 360 bp ACAGTGGTCCCAAAGATGGACCCCAAGGAGCATCGTGGAAAAAGAACGTTTC
 - 300 bp CAACCACGTCTTCAAAGCAAGTGGATTGATGTGATATCTCCACTGACGTAAGGGATGACG
 胚乳表达原件Skn-1基序(水稻)
 - 240 bp CACAATCCCACTATCCTTCGCCCCAAGCTTGGGCCCAAGCTTGGGTGCGCCCCACGGAT
 - 180 bp GGATATAAGAATAAAGGCATTCGCGTGCAGGATTCACCCGTTGCTCTCACCTTTTCGC
 转录起始核心元件TATA盒
 - 120 bp TGTACTCTCTCGCCACACACACCCCTCTCCAGCTCCGTTGGAGCTCCGGACAGCAGCAG
 - 60 bp GCGCGGGGCGGT CACGTA GTAAGCAGCTCTCGGCTCCCTCTCCCTTGCTCCGTGGATCC
 Myb结合位点1(玉米)/脱落酸应答原件(拟南芥)
 +1 bp ATC
 翻译起始密码子

图3 启动子 *IpDHN-Pro* 序列和顺式作用元件Fig. 3 Sequence of *IpDHN-Pro* and the *cis*-acting elements图4 转 *IpDHN-Pro*/pBI101.2 拟南芥植株 GUS 组织染色。A: 幼苗; B: 真叶; C: 主根; D: 叶片; E: 花序; F: 角果。Fig. 4 GUS staining of transgenic *Arabidopsis* with *IpDHN-Pro*/pBI101.2. A: Seedling; B: True leaves; C: Axial root; D: Leaf; E: Inflorescence; F: Silique.

育角果的基部和顶端有较强的表达。这说明该启动子可能属于根、叶丰富的启动子, 在拟南芥中具备转录活性且正常生长条件下启动转录活性较低。

2.3 启动子 *IpDHN-Pro* 转录活性的影响因素

为进一步探索 *IpDHN-Pro* 的功能, 对转 *IpDHN-Pro*/pBI101.2 拟南芥进行高盐、干旱、外源激素

ABA 等胁迫处理, 然后进行 GUS 染色。在未经处理的对照拟南芥幼苗中, GUS 阳性信号较弱, 但经 $200 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaCl}$ 、 300 mmol L^{-1} 甘露醇和 0.1 mmol L^{-1} ABA 分别处理 24 h 后, 拟南芥幼苗的 GUS 信号明显增强(图 5), 这表明在高盐、干旱和外源激素 ABA 处理下, *IpDHN-Pro* 启动转录的活性有所增强, 造成葡萄糖苷酸酶 GUS 在植株体内活性增强。

为了证明 GUS 活性的增强是由于 GUS 基因的表达上调引起的, 我们同时采用 qRT-PCR 方法分析了胁迫处理后的拟南芥幼苗 GUS 基因表达情况。在高盐、高渗透压和外源激素 ABA 处理下 GUS 基因的表达上调, 且表达量分别上调了 4、2 和 2 倍(图 6)。这进一步证明, 在启动子 *IpDHN-Pro* 的控制下, GUS 基因的表达受到了高盐、干旱和外源激素 ABA 等胁迫的诱导, 即我们所克隆获得的厚藤脱水素 *IpDHN* 基因中 974 bp 的 5'侧翼序列为启动子序列, 具有起始转录的活性, 且其调控 GUS 基因的转录受高盐、干旱、外源激素 ABA 等胁迫的上调影响。

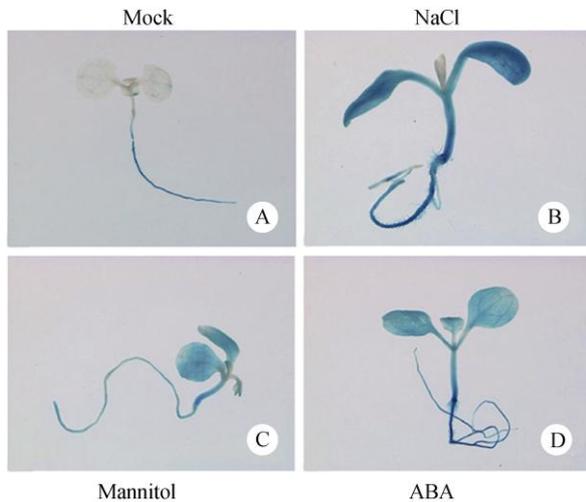


图 5 转基因拟南芥幼苗在胁迫处理 24 h 后的 GUS 活性。A: 对照; B: $200 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaCl}$; C: 300 mmol L^{-1} 甘露醇; D: 0.1 mmol L^{-1} ABA。

Fig. 5 GUS activity in transgenic *Arabidopsis* seedlings under stress for 24 h. A: Control; B: $200 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaCl}$; C: 300 mmol L^{-1} mannitol; D: 0.1 mmol L^{-1} ABA.

3 讨论

脱水素基因是植物体内受盐、干旱胁迫诱导的抗逆标志基因^[3,8,15], 有大量研究证明该类基因与植物耐盐、耐旱、抗冻等抗逆性密切相关^[16]。高盐和干旱是植物生长过程中最常见的逆境胁迫, 通常会

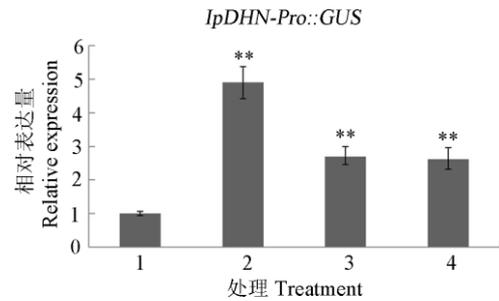


图 6 qRT-PCR 分析转基因拟南芥幼苗胁迫处理 24 h 后 GUS 基因的表达。1: 对照; 2: $200 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaCl}$; 3: 300 mmol L^{-1} 甘露醇; 4: 0.1 mmol L^{-1} ABA。**: $P < 0.01$ 。

Fig. 6 Expression of GUS in transgenic *Arabidopsis* seedlings under stress by qRT-PCR. 1: Control; 2: $200 \text{ mmol L}^{-1} \text{ NaCl}$; 3: 300 mmol L^{-1} mannitol; 4: 0.1 mmol L^{-1} ABA. **: $P < 0.01$.

引起植物失水, 造成细胞内水平衡失衡, 进而影响植物的生长和发育。对于农作物而言, 由于高盐和干旱引起的农作物生长不良, 进而造成农作物减产和品质下降是农业生产过程中的常见问题。因此, 在植物基因工程育种中, 通过上调一些抗逆基因的表达, 提高植物或作物的抗逆性, 是一种最为行之有效的办法。

启动子是调控基因表达的主要因素, 而启动子序列所包含的顺式作用元件通常能够决定该基因的转录受哪些转录因子调控, 并在何种情况下启动转录或改变转录强度。我们的前期研究表明, 厚藤 *IpDHN* 基因是一个典型的受盐旱等非生物胁迫及 ABA 诱导的抗逆功能基因^[14], 结合厚藤这一物种的极端耐盐耐旱性, 我们推测 *IpDHN* 基因的表达调控可能在厚藤抗逆性中发挥了重要作用。基于以上假设, 本研究克隆并分析了 *IpDHN* 基因的启动子序列, 为深入了解厚藤的抗逆生物学特征奠定基础, 也为植物抗逆遗传工程提供了可操作的遗传物质基础。

目前, 盐生植物已成为克隆耐盐基因和盐害诱导启动子的主要来源^[17]。厚藤是一种典型的热带亚热带盐生植物, 我们通过对厚藤 *IpDHN* 基因的启动子区域(974 bp)进行鉴定, 其含有多个与植物非生物逆境胁迫相关的顺式作用元件, 如 ABRE、MBS 以及富含 TC 的重复调控元件等。ABRE 是 ABA 信号中关键的基因转录顺式应答元件^[18], 广泛参与调控植物功能基因应答 ABA 信号及渗透压胁迫^[19-20]。MBS 主要通过与转录因子 MYB 结合, 而很多 MYB 转录因子均与植物应答干旱胁迫和 ABA 信号密

切相关^[21-22]。富含 TC 的重复调控元件主要参与调控植物防御反应和抗逆应答^[23], 暗示了 *IpDHN* 基因的启动子序列 *IpDHN-Pro* 具备广泛抗逆应答特征。PlantCARE 软件预测结果表明, *IpDHN-Pro* 序列还存在 1 个胚乳诱导表达元件 *Skn-1*^[24], 表明 *IpDHN* 基因能够在种子发育后期胚乳发育中表达, 符合 *IpDHN* 基因作为 *LEA* 基因家族成员这一基本特征。

本研究还成功获得 *IpDHN-Pro* 调控 *GUS* 表达的转基因拟南芥。通过对拟南芥不同组织部位的化学染色分析, *IpDHN-Pro* 具有在拟南芥中广泛调控基因表达的特征, 但正常生长条件下, *GUS* 表达水平较低, 表明我们所克隆的 *IpDHN-Pro* 序列具备基本的起始基因转录功能, 是一个有活性的启动子; 通过对转基因拟南芥幼苗进行高盐、渗透压胁迫及 ABA 处理, 转基因拟南芥植株的 *GUS* 染色活性增强; 同时 qRT-PCR 分析表明 *GUS* 的表达显著增强。这表明 *IpDHN-Pro* 启动子可驱动外源 *GUS* 基因受干旱或高盐和外源激素 ABA 的诱导。同时, 也验证了前期对厚藤 *IpDHN* 基因表达研究的结论^[14]。

本研究通过对克隆获得的 974 bp 的 *IpDHN* 基因的 5'侧翼序列进行初步的生物信息学分析, 鉴定出一部分可能的启动子顺式作用元件。通过转基因和 *GUS* 组织化学染色研究, 阐明了该启动子序列具有起始基因转录的功能, 证明 *IpDHN-Pro* 序列驱动 *GUS* 基因在拟南芥的不同组织中表达有差异, 以下胚轴、主根和叶片中的表达较强, 在角果中的表达微弱, 而在花序中几乎无表达, 是 1 个根和叶丰富表达的启动子; *GUS* 染色试验进一步证明该启动子能够在高盐、干旱和外源激素 ABA 等胁迫下增强细胞内 *GUS* 活性; qRT-PCR 分析表明 *IpDHN-Pro* 序列驱动的 *GUS* 基因的表达受高盐、干旱和外源激素 ABA 诱导, 均不同程度的上调表达。这为植物抗逆遗传工程育种中利用特定胁迫诱导的启动子调控植物抗逆性奠定理论基础。

参考文献

- [1] MIRYEGANEH M, TAKAYAMA K, TATEISHI Y, et al. Long-distance dispersal by sea-drifted seeds has maintained the global distribution of *Ipomoea pes-caprae* subsp. *brasiliensis* (Convolvulaceae) [J]. PLoS One, 2014, 9(4): e91836. doi: 10.1371/journal.pone.0091836.
- [2] OUYANG P Y, LIU N, ZHANG W W, et al. Biological and ecophysiological characteristics of a beach plant *Ipomoea pes-caprae* [J]. J Hunan Univ Sci Technol (Nat Sci), 2011, 26(4): 117-121. doi: 10.3969/j.issn.1672-9102.2011.04.025.
- [3] GRAETHER S P, BODDINGTON K F. Disorder and function: A review of the dehydrin protein family [J]. Front Plant Sci, 2014, 5: 576. doi: 10.3389/fpls.2014.00576.
- [4] HAND S C, MENZE M A, TONER M, et al. LEA proteins during water stress: Not just for plants anymore [J]. Annu Rev Physiol, 2011, 73: 115-134. doi: 10.1146/annurev-physiol-012110-142203.
- [5] BIES-ETHÈVE N, GAUBIER-COMELLA P, DEBURES A, et al. Inventory, evolution and expression profiling diversity of the LEA (late embryogenesis abundant) protein gene family in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Mol Biol, 2008, 67(1/2): 107-124. doi: 10.1007/s11103-008-9304-x.
- [6] CLOSE T J. Dehydrins: Emergence of a biochemical role of a family of plant dehydration proteins [J]. Physiol Plant, 1996, 97(4): 795-803. doi: 10.1111/j.1399-3054.1996.tb00546.x.
- [7] OUELLET F, HOUDE M, SARHAN F. Purification, characterization and cDNA cloning of the 200 kDa protein induced by cold acclimation in wheat [J]. Plant Cell Physiol, 1993, 34(1): 59-65. doi: 10.1093/oxfordjournals.pcp.a078400.
- [8] HANIN M, BRINI F, EBEL C, et al. Plant dehydrins and stress tolerance: Versatile proteins for complex mechanisms [J]. Plant Signal Behav, 2011, 6(10): 1503-1509. doi: 10.4161/psb.6.10.17088.
- [9] ZHOU Y, HU L F, XU S Y, et al. Identification and transcriptional analysis of dehydrin gene family in cucumber (*Cucumis sativus*) [J]. Acta Physiol Plant, 2018, 40(8): 144. doi: 10.1007/s11738-018-2715-7.
- [10] YANG Y Z, HE M Y, ZHU Z G, et al. Identification of the dehydrin gene family from grapevine species and analysis of their responsiveness to various forms of abiotic and biotic stress [J]. BMC Plant Biol, 2012, 12: 140. doi: 10.1186/1471-2229-12-140.
- [11] VAZQUEZ-HERNANDEZ M, ROMERO I, ESCRIBANO M I, et al. Deciphering the role of CBF/DREB transcription factors and dehydrins in maintaining the quality of table grapes cv. autumn royal treated with high CO₂ levels and stored at 0°C [J]. Front Plant Sci, 2017, 8: 1591. doi: 10.3389/fpls.2017.01591.
- [12] ZHU W N, ZHANG L S, LÜ H, et al. The dehydrin *wzy2* promoter from wheat defines its contribution to stress tolerance [J]. Funct Integr Genomics, 2014, 14(1): 111-125. doi: 10.1007/s10142-013-0354-z.
- [13] ABEDINI R, GHANEGOLMOHAMMADI F, PISHKAMRAD R, et al. Plant dehydrins: Shedding light on structure and expression patterns of

- dehydrin* gene family in barley [J]. *J Plant Res*, 2017, 130(4): 747–763. doi: 10.1007/s10265-017-0941-5.
- [14] ZHANG H, ZHENG J X, SU H X, et al. Molecular cloning and functional characterization of the dehydrin (*IpDHN*) gene from *Ipomoea pes-caprae* [J]. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 1454. doi: 10.3389/fpls.2018.01454.
- [15] HARA M. The multifunctionality of dehydrins: An overview [J]. *Plant Signal Behav*, 2010, 5(5): 503–508. doi: 10.4161/psb.11085.
- [16] KOSOVÁ K, VÍŤÁMVÁS P, PRÁŠIL I T. Wheat and barley dehydrins under cold, drought, and salinity: What can LEA-II proteins tell us about plant stress response? [J]. *Front Plant Sci*, 2014, 5: 343. doi: 10.3389/fpls.2014.00343.
- [17] MISHRA A, TANNA B. Halophytes: Potential resources for salt stress tolerance genes and promoters [J]. *Front Plant Sci*, 2017, 8: 829. doi: 10.3389/fpls.2017.00829.
- [18] HOBO T, ASADA M, KOWYAMA Y, et al. ACGT-containing abscisic acid response element (ABRE) and coupling element 3 (CE3) are functionally equivalent [J]. *Plant J*, 1999, 19(6): 679–689. doi: 10.1046/j.1365-3113x.1999.00565.x.
- [19] MISHRA S, SHUKLA A, UPADHYAY S, et al. Identification, occurrence, and validation of DRE and ABRE *cis*-regulatory motifs in the promoter regions of genes of *Arabidopsis thaliana* [J]. *J Integr Plant Biol*, 2014, 56(4): 388–399. doi: 10.1111/jipb.12149.
- [20] WATANABE K A, HOMAYOUNI A, GU L K, et al. Transcriptomic analysis of rice aleurone cells identified a novel abscisic acid response element [J]. *Plant Cell Environ*, 2017, 40(9): 2004–2016. doi: 10.1111/pce.13006.
- [21] URAO T, YAMAGUCHI-SHINOZAKI K, URAO S, et al. An *Arabidopsis myb* homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence [J]. *Plant Cell*, 1993, 5(11): 1529–1539. doi: 10.1105/tpc.5.11.1529.
- [22] ABE H, URAO T, ITO T, et al. *Arabidopsis* AtMYC2 (bHLH) and AtMYB2 (MYB) function as transcriptional activators in abscisic acid signaling [J]. *Plant Cell*, 2003, 15(1): 63–78. doi: 10.1105/tpc.06130.
- [23] GERMAIN H, LACHANCE D, PELLETIER G, et al. The expression pattern of the *Picea glauca* *Defensin 1* promoter is maintained in *Arabidopsis thaliana*, indicating the conservation of signalling pathways between angiosperms and gymnosperms [J]. *J Exp Bot*, 2012, 63(2): 785–795. doi: 10.1093/jxb/err303.
- [24] FAUTEUX F, STRÖMVIK M V. Seed storage protein gene promoters contain conserved DNA motifs in Brassicaceae, Fabaceae and Poaceae [J]. *BMC Plant Biol*, 2009, 9: 126. doi: 10.1186/1471-2229-9-126.