



### 基于Tail-PCR分析AN2基因上游启动子活性

宗渊, 韦国, 石光禹, 刘宝龙, 包雪梅

#### 引用本文:

宗渊, 韦国, 石光禹, 刘宝龙, 包雪梅. 基于Tail-PCR分析AN2基因上游启动子活性[J]. 热带亚热带植物学报, 2024, 32(2): 257-263.

在线阅读 View online: <https://doi.org/10.11926/jtsb.4746>

#### 您可能感兴趣的其他文章

##### Articles you may be interested in

#### 铁皮石斛WOX转录因子的鉴定和分析

Identification and Analysis of WOX Transcription Factor in *Dendrobium officinale*  
热带亚热带植物学报. 2021, 29(3): 301-310 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4294>

#### 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

Cloning and Transcriptional Regulating Activities Analysis of A Dehydrin Promoter IpDHN-Pro from *Ipomoea pes-caprae*  
热带亚热带植物学报. 2019, 27(4): 415-422 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4011>

#### 毛竹APX家族基因鉴定和表达分析

Identification and Expression Analysis of the APX Gene Family in *Phyllostachys edulis*  
热带亚热带植物学报. 2020, 28(3): 255-264 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4155>

#### 铁皮石斛DoSMT2基因的克隆与表达分析

Cloning and Expression Analysis of *DoSMT2* Gene in *Dendrobium officinale*  
热带亚热带植物学报. 2020, 28(6): 591-598 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4234>

#### RNA干扰20S蛋白酶体 $\alpha$ 亚基基因对莱茵衣藻油脂代谢的影响

Effect of RNA Interference 20S Proteasome  $\alpha$  Subunit A Gene on Lipid Metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii*  
热带亚热带植物学报. 2020, 28(4): 329-338 <https://doi.org/10.11926/jtsb.4165>

向下翻页, 浏览PDF全文

# 基于 Tail-PCR 分析 AN2 基因上游启动子活性

宗渊<sup>1</sup>, 韦国<sup>2</sup>, 石光禹<sup>2</sup>, 刘宝龙<sup>1</sup>, 包雪梅<sup>3\*</sup>

(1. 中国科学院青海省作物分子育种重点实验室, 西宁 810001; 2. 中国科学院华南植物园, 广东省应用植物学重点实验室, 中国科学院华南农业植物分子分析与遗传改良重点实验室, 广州 510650; 3. 青海师范大学教育学院, 西宁 810016)

**摘要:** 黑果枸杞(*Lycium ruthenicum*)富含花青素, AN2 基因是调控黑果枸杞花青素合成代谢的主效基因。为解析 AN2 基因启动子的活性差异, 采用 Tail-PCR 方法分别克隆了黑果枸杞和红果枸杞(*L. barbarum*) AN2 基因起始密码子上游约 1 686 bp (*LrAN2p*)和 1 495 bp (*LbAN2p*)的序列。Plant CARE 预测表明, *LbAN2p* 和 *LrAN2p* 中分别有 133 和 137 个的顺式作用元件, 其中, 参与光调控的顺式元件分别有 11 和 15 个; 参与激素响应相关的顺式元件分别有 13 和 16 个。构建 AN2 启动子植物表达载体 pKGWFS7:LbAN2p 和 pKGWFS7:LrAN2p, 利用农杆菌介导的烟草遗传转化体系获得转基因烟草。GUS 染色结果表明, *LrAN2p* 能够驱动 GUS 在烟草中的表达, 叶片呈现蓝色, 具有较 *LbAN2p* 更强的启动活性, qRT-PCR 结果表明, *LrAN2p* 转基因烟草中 GUS 基因具有更高的转录水平, 这可能会使 AN2 基因在黑果枸杞中具有更高的表达, 激活黑果枸杞花青素合成代谢通路。这为解析枸杞果色形成及 AN2 基因的表达调控机制奠定了理论基础。

**关键词:** 黑果枸杞; 花青素; AN2; 启动子; GUS 染色

doi: 10.11926/jtsb.4746

## Analysis of AN2 Upstream Promoter Activity Based on Tail-PCR

ZONG Yuan<sup>1</sup>, WEI Guo<sup>2</sup>, SHI Guangyu<sup>2</sup>, LIU Baolong<sup>1</sup>, BAO Xuemei<sup>3\*</sup>

(1. Key Laboratory of Crop Molecular Breeding of Qinghai Province, Chinese Academy of Sciences, Xining 810001, China; 2. Guangdong Provincial Key Laboratory of Applied Botany, Key Laboratory of South China Agricultural Plant Molecular Analysis and Gene Improvement, South China Botanical Garden, Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China; 3. School of Education, Qinghai Normal University, Xining 810016, China)

**Abstract:** *Lycium ruthenicum* is rich in anthocyanin, and AN2 is the main gene regulating anthocyanin anmetabolism. In order to analyze the activity difference of AN2 gene promoter, the upstream sequence of AN2 gene start codon about 1 686 bp (*LrAN2p*) and 1 495 bp (*LbAN2p*) of *L. barbarum* were cloned by Tail-PCR method, respectively. Plant CARE predicted that there were 133 and 137 *cis*-acting elements in sequences of *LbAN2p* and *LrAN2p*, respectively, among which 11 and 15 *cis*-acting elements were involved in photoregulation, and 13 and 16 *cis*-elements involved in hormone response, respectively. The plant expression vectors pKGWFS7:LbAN2p and pKGWFS7:LrAN2p were constructed, and the transgenic tobacco was obtained by using *Agrobacterium*-mediated tobacco genetic transformation system. The results of GUS staining showed that *LrAN2p* could drive the expression of GUS in tobacco, and the leaves were blue, with stronger starting activity than *LbAN2p*. The results of qRT-PCR showed that GUS gene in *LrAN2p* transgenic tobacco had high transcription level, which might lead to high expression of AN2 gene in *L. ruthenicum*, and activating the anthocyanin anabolic pathway. Thus, these would provide a theoretical basis for understanding the mechanism of fruit color formation and AN2 gene expression.

**Key words:** *Lycium ruthenicum*; Anthocyanin; AN2; Promoter; GUS staining

收稿日期: 2022-11-07 接受日期: 2023-02-23

基金项目: 青海省基础 Research 计划(2021-ZJ-955Q)资助

This work was supported by the Basic Research Program of Qinghai Province (Grant No. 2021-ZJ-955Q).

作者简介: 宗渊(1991 年生), 男, 博士, 研究方向为枸杞遗传育种。E-mail: zongyuan@nwipb.cas.cn

\* 通讯作者 Corresponding author. E-mail: baoxuemei@nwipb.cas.cn

黑果枸杞(*Lycium ruthenicum*)是茄科(Solanaceae)枸杞属多年生棘刺灌木, 主要分布于青海东部、新疆北部等高海拔、盐碱地、干旱地区<sup>[1]</sup>。黑果枸杞富含花青素、黄酮、酚酸、生物碱等多种活性成分<sup>[2-3]</sup>, 具有较高的营养保健功效。宁夏枸杞(*L. barbarum*)为茄科枸杞属落叶灌木<sup>[1]</sup>, 其干燥成熟果实、根皮、叶均可入药, 富含多糖、黄酮、酚酸、生物碱等活性成分<sup>[4-5]</sup>。相较于宁夏枸杞, 大量花青素的积累促成黑果枸杞黑色果实性状, 黑果枸杞中的花青素组成由矮牵牛素、飞燕草素、芍药素和锦葵素等衍生而来<sup>[6]</sup>。

花青素是植物界普遍存在的一类水溶性的类黄酮次生代谢产物<sup>[7]</sup>, 基于苯丙烷代谢途径<sup>[8]</sup>, 由 *PAL*、*CHS*、*CHI*、*F3H*、*ANS* 等结构基因调控<sup>[9-10]</sup>。而转录因子 MYB、bHLH 和 WD40 形成的复合物 MBW 能够激活结构基因的表达, 从而促进花青素的生物合成。MYB 转录因子是调控植物花青素合成代谢的重要转录因子, 如拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的 *AtMYB75*<sup>[11]</sup>、*AtPAP1*<sup>[12]</sup>、矮牵牛(*Petunia hybrida*)的 *PhAN2*<sup>[13]</sup>、西伯利亚白刺(*Nitraria sibirica*)的 *NsMYB1*<sup>[14]</sup>等基因可正向调控花青素的合成。前期研究表明, 黑果枸杞(*Lycium ruthenicum*)与红果枸杞(*L. barbarum*)中分离出的 R2R3-MYB 转录因子 *LrAN2* 和 *LbAN2* 等位基因均正向调控花青素的生物合成<sup>[15]</sup>。过表达 *LrAN2* 紫色烟草(*Nicotiana tabacum*)中花青素生物合成代谢通路中的结构基因和多个 MYB 转录因子被激活<sup>[16]</sup>。但 *AN2* 基因在红果枸杞和黑果枸杞中产生等位变异的原因还不清楚。

启动子作为基因的上游调控因子, 能够识别并结合其转录因子, 是基因表达调控的重要作用位点<sup>[17]</sup>。虽然现在红果枸杞基因组已发表, 但尚未公开组装结果。因此对 *AN2* 基因启动子功能分析尚且无法直接进行克隆, 本研究通过 Tail-PCR 方式克隆红果枸杞和黑果枸杞中花青素合成关键基因 *LbAN2* 和 *LrAN2* 上游启动子序列, 并构建植物表达载体, 利用农杆菌介导的遗传转化体系验证其功能, 以期为进一步揭示枸杞果色形成及 *AN2* 基因的表达调控机制奠定理论基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

本实验选用的红果枸杞(*Lycium barbarum*)‘宁

杞 7 号’和黑果枸杞(*L. ruthenicum*)‘青黑杞 1 号’, 采摘于青海省都兰县诺木洪农场(96°27.2856' N, 36°26.9625' E), Samsun 烟草(*Nicotiana tabacum*)保存于中国科学院西北高原生物研究所作物分子育种重点实验室, *LrAN2* 和 *LbAN2* 基因序列由本课题组前期克隆和分离获得<sup>[15]</sup>。新鲜果实采摘后液氮冷冻, 保存于-80 °C 冰箱备用。DNA、RNA 提取试剂盒、胶回收试剂盒由天根生化科技(北京)有限公司提供, 反转录试剂盒 PrimeScript™ II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (TaKaRa Code No. 6210A)、高保真酶及限制性内切酶等由 TaKaRa (大连)公司提供, 农杆菌 GV3101 购自上海生工生物工程技术公司。

### 1.2 基因组 DNA 提取

采用天根多糖多酚植物基因组 DNA 提取试剂盒(离心柱型)对红枸杞和黑果枸杞果实进行基因组 DNA 提取。用 Nanodro 浓度测定仪测定浓度, 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测条带质量。

### 1.3 PCR 和 Tail-PCR

PCR 扩增以 DNA 为模板, 使用高保真酶 Prime STAR Max Premix (2×)扩增, PCR 反应体系为: 25 μL PrimeSTAR Max Premix (2×)、正反向引物各 0.5 μL、23 μL ddH<sub>2</sub>O 和 1 μL cDNA。PCR 反应程序为: 98 °C 10 s, 55 °C 5 s 或 15 s, 72 °C 1 min, 共 30 个循环。Tail-PCR 根据已知的 *LrAN2* 序列, 在其 5'端设计 3 个向外的巢式引物 AN2-R9、AN2-R8 和 AN2-R4, 使用 Genome Walking Ki 试剂盒(TaKaRa, Code No. 6108)进行 Tail-PCR 扩增, 反应体系与反应条件参考 Liu 等<sup>[18]</sup>的方法。PCR 和 Tail-PCR 产物在 1%琼脂糖凝胶电泳上进行检测, 回收目的条带, 将目的基因连接至载体 pEASY®-Blunt Cloning Kit, 转化大肠杆菌 DH5α, 菌落 PCR 鉴定的阳性单克隆送至生工(上海)测序。设计差异引物, 对采自 8 个地点的红果枸杞和 7 个地点的黑果枸杞的基因组 DNA 进行扩增, 并用聚丙烯酰胺凝胶电泳进行条带检测。本试验中用到的引物见表 1。

### 1.4 生物信息学分析

使用 AlignX 软件进行序列比对和拼接。为解析 *LbAN2p* 和 *LrAN2p* 启动子区域顺式作用元件差异, 对 *LbAN2p* 和 *LrAN2p* 序列进行分离克隆, 用 Plant CARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)软件进行启动子顺式作用元件分析<sup>[19]</sup>。

### 1.5 启动子表达载体构建及烟草遗传转化

使用 Gateway 载体构建技术, 通过 BP 反应体

表1 引物

Table 1 Primers

引物 Primer	序列 Sequence (5'~3')	用途 Purpose
AN2-F1	ATGATGAATACTAGTGTTAC	核心序列的扩增 Amplification of core sequence
AN2-R1	CTAATTCAGTAGATTCCATAG	
AN2-R9	ACCAGCTCTAATGGGAACCTTGATGC	第一轮 Tail-PCR Round 1 Tail-PCR
AN2-R4	CTTGATGCCAATTTTCCTTCACCGT	第二轮 Tail-PCR Round 2 Tail-PCR
AN2-R8	GCACCTTTCCTCACTCCAGATGATT	第三轮 Tail-PCR 及测序 Round 3 Tail-PCR and sequencing
AN2Pro-F5	GTTGAGGAAGGAACAAGCCAC	
AN2Pro-R10	GTGGCTTGTTCCTTCCTCAAC	
LbAN2Pro-F1	AAACACCTTCCACTTTCAACCTG	gDNA 启动子 PCR 产物测序 PCR Product sequencing of gDNA promoter
LrAN2Pro-F1	ATAGTAATAATAACATCTAGTGAC	
AN2Pro-R1	ATAGTAATAATAACATCTAGTGAC	
AN2PCY-F	TACATGCTACCAAACGAGA	差异序列扩增 Differential sequence amplification
AN2PCY-R	CAACCTAAAGGGTCCATAT	
NtActinF	AATGATCGGAATGGAAGCTG	荧光定量分析 qRT-PCR analysis
NtActinR	TGGTACCACCACTGAGGACA	
RT-GUSF	ATGGTCCGTCCTGTGAAAAC	
RT-GUSR	AACGCTGATCAATTCCACAG	

系将启动子序列连接在中间载体 pDONR207 中, 测序后提取质粒, 继续进行 LR 反应完成构建表达载体 pKGWFS7:LbAN2p 和 pKGWFS7:LrAN2p。将表达载体转化 DH5 $\alpha$  大肠杆菌感受态细胞, 选择阳性单克隆, 测序正确后提取质粒备用。利用液氮冻融法将重组质粒转化 GV3101 农杆菌感受态细胞, 在含有抗性(100 mg/L 卡那霉素、100 mg/L 利福平)的 LB 固体培养基上于 28 °C 培养 48 h 后进行菌落 PCR 鉴定, 挑取阳性单克隆在 LB 液体培养基(100 mg/L 卡那霉素、100 mg/L 利福平)中于 28 °C、200 r/min 下摇菌 48 h, OD 值为 0.8 时, 采用叶盘法进行烟草遗传转化<sup>[20]</sup>, 经共培养、分化培养、生根培养后炼苗、移栽获得转基因植株。使用 GUS 染色试剂盒浸泡 F<sub>1</sub> 代烟草叶片<sup>[21]</sup>, 37 °C 避光浸泡过夜, 无水乙醇洗脱叶绿素后观察并拍照。

### 1.6 qRT-PCR

采用天根 RNAprep Pure 多糖多酚植物总 RNA 提取试剂盒(离心柱型), 提取野生型烟草和转基因烟草叶片总 RNA。使用反转录试剂盒(TaKaRa), 将 cDNA 稀释 100 倍备用。以 *NtActin* 为内参基因, 荧光引物 RT-GUSF、RT-GUSR 由 Primer Premier 5 设计(表 1), 反应条件及反应体系参考文献<sup>[22]</sup>。烟草叶片中 GUS 基因的相对表达量采用 2<sup>- $\Delta\Delta$ CT</sup> 法计算, 3 次生物学重复, 计算结果通过 Graphpad prims 8.3 作图。

## 2 结果和分析

### 2.1 枸杞 AN2 基因启动子的分离

利用 Tail-PCR 方法, 根据枸杞 AN2 基因的 cDNA 及 gDNA 序列设计 F 端引物, 以红果枸杞和黑果枸杞基因组 DNA 为模板进行扩增, 根据获得的核心序列, 设计 Tail-PCR 的特异性引物, 分离到黑果枸杞和红果枸杞 AN2 基因起始密码子上游约 1 686 和 1 495 bp 的序列, 命名为 *LrAN2p* 和 *LbAN2p* (图 1)。序列比对结果表明, 黑果枸杞在 573~584 bp 处有 12 bp 的“CATGAAGAGGAC”插入, 设计差异引物对不同采样点的红果枸杞和黑果枸杞基因组 DNA 进行扩增(图 1: D), 结果表明红果枸杞和黑果枸杞的 PCR 产物差异明显, 条带清晰, 可有效区分红果枸杞和黑果枸杞。

### 2.2 顺式元件分析

利用 Plant CARE 在线软件对 *LbAN2p* 和 *LrAN2p* 进行顺式作用元件分析(图 2)。结果表明, 从 *LbAN2p* 和 *LrAN2p* 氨基酸序列中分别检测到 133 和 137 个的顺式作用元件, 除启动子所具备的 43 和 47 个 TATA-box、20 和 22 个 CAAT-box 之外, 尚有 70 和 68 个参与 AN2 基因表达调控的顺式作用元件, 其中 *LbAN2p* 中有 24 个可预测功能的顺式作用元件, *LrAN2p* 中有 30 个, 如参与光调控的分别有 11 和 15 个, 包括 G-box、G-Box、GT1-motif、GATA-motif、MRE 等; 与激素响应相关的分别有 13 和 16 个, 如赤霉素响

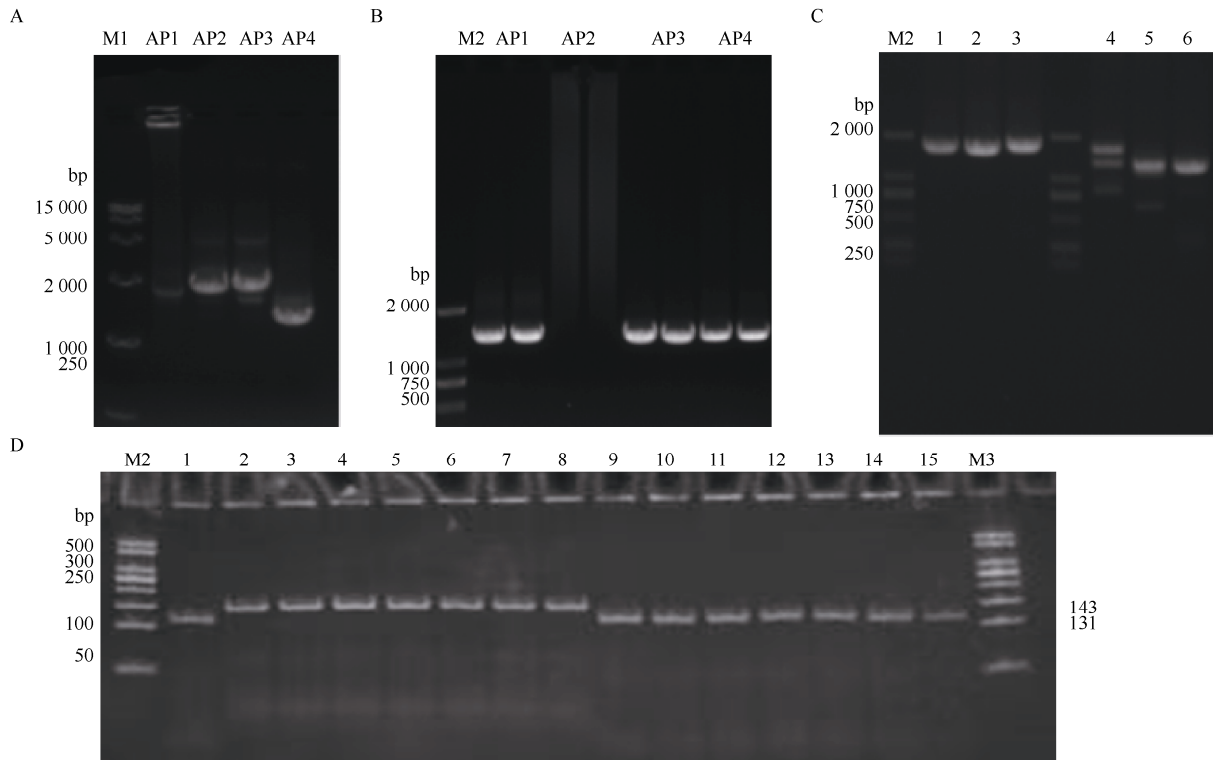


图 1 *AN2* 基因启动子的 Tail-PCR (A, B)、PCR 产物(C)及不同产地枸杞的 PCR 产物(D)电泳图谱。A: 红果枸杞; B: 黑果枸杞; M1: DL15000 DNA Marker; M2: DL2000 DNA Marker; M3: 50 bp DNA Ladder Marker; AP1、AP2、AP3 和 AP4 为兼引物; 图 C 中 1~3 为红果枸杞; 4~6 为黑果枸杞; 图 D 中 1、9~15 为红果枸杞; 2~8 为黑果枸杞。

Fig. 1 Electrophoretic map of Tail-PCR (A, B), PCR products (C) of the promoter of *AN2* gene and PCR products (D) from different places of *Lycium*. A: *L. barbarum*; B: *L. ruthenicum* A: 红果枸杞; B: 黑果枸杞; M1: DL15000 DNA Marker; M2: DL2000 DNA Marker; M3: 50 bp DNA Ladder Marker; AP1, AP2, AP3 and AP4 were primers; 1-3: *L. barbarum*; 4-6: *L. ruthenicum* in C; 1, 9-15: *L. barbarum*; 2-8: *L. ruthenicum* in Figure D.

应元件 ABRE、生长素响应元件 AuxRR-core 和水杨酸响应元件 CGTCA-motif。此外，与 *LbAN2p* 相比，*LrAN2p* 在第 573~584 位插入了 12 bp 的“CATG-AAGAGGAC”，使其具有更多的 CAAT-box。

### 2.3 启动子活性分析

为研究 *LbAN2* 和 *LrAN2* 基因启动子活性，将构建好的表达载体 pKGWFS7:LbAN2p 和 pKGWFS7:

*LrAN2p* 转化农杆菌 GV3101 后，利用农杆菌介导的遗传转化体系侵染烟草。对阳性转基因烟草进行 GUS 染色，以野生型 Samsun 烟草叶片为阴性对照。结果表明，pKGWFS7:*LrAN2p* 载体表达后，GUS 蛋白进入烟草表皮细胞，整个叶片呈现蓝色，pKGWFS7:*LbAN2p* 转基因烟草叶片染色后未观察到蓝色，肉眼观测 GUS 蛋白几乎没有表达(图 3)。

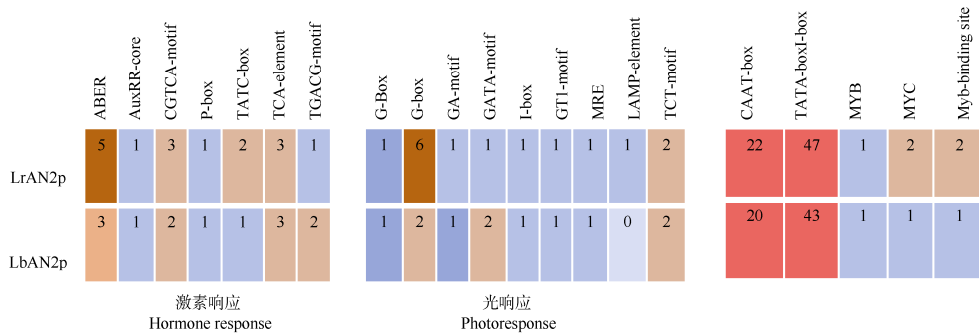


图 2 *LbAN2p*、*LrAN2p* 的顺式作用元件

Fig. 2 Number of *cis*-acting elements in *LbAN2p* and *LrAN2p*

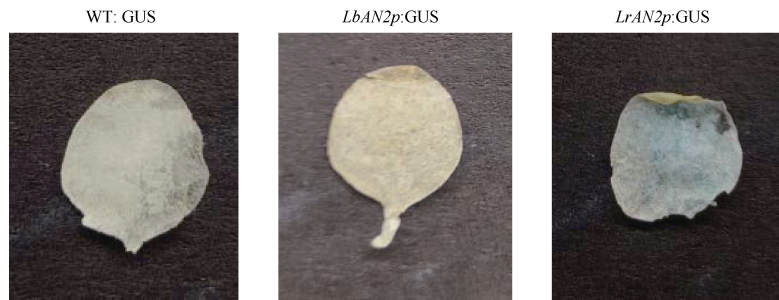
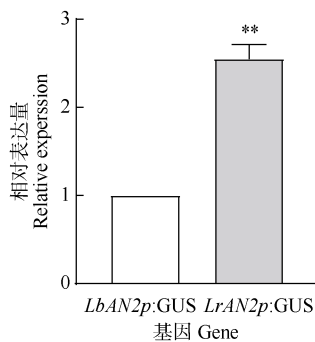


图 3 烟草叶片的 GUS 染色

Fig. 3 GUS staining of tobacco leaves

## 2.4 qRT-PCR

以 *NtActin* 为内参基因, 采用 qRT-PCR 对转基因烟草叶片中 *GUS* 基因的表达模式进行分析(图 4)。结果表明, 以 *LbAN2p:GUS* 烟草中 *GUS* 基因的相对表达量为对照, *LrAN2p:GUS* 转基因烟草叶片中 *GUS* 基因转录水平是 *LbAN2p:GUS* 烟草叶片的 2.55 倍, 差异显著( $P < 0.01$ )。

图 4 转基因烟草中 *GUS* 基因的相对表达量Fig. 4 Relative expression of *GUS* gene in leaves of transgenic tobacco

## 3 结论和讨论

黑果枸杞作为西北特色植物资源, 因其药食同源、高经济价值和高营养价值而越来越被重视, 人们通过口服、泡茶等方式摄入大量花青素, 从而提高机体免疫力, 而黑果枸杞高花青素积累的分子机制研究在近 2 年才开展, 研究人员通过转录组测序技术在黑果枸杞中筛选出 *LrAN2*, 证实 *LrAN2* 在果实中的特异表达激活了花青素的合成, 表达谱分析也证实黑色果实的形成伴随着花青素的逐步积累以及 *LrAN2* 转录水平的提高, 而转基因烟草分析结果表明, *LrAN2* 和 *LbAN2* 两个等位基因诱导烟草合成花青素积累的能力不一, *LrAN2* 功能更强<sup>[15-16]</sup>, 初步推测黑果枸杞和红果枸杞中 *AN2* 基因上游启动子

区域存在活性差异, 从而导致 *LbAN2* 功能性远弱于 *LrAN2*。

基因启动子区域含有的顺式作用元件能够控制该基因表达的起始时间和程度<sup>[23]</sup>。本研究采用 Tail-PCR 法获得了 *LbAN2* 和 *LrAN2* 基因起始密码子上游约 1 686 和 1 495 bp 的序列, 与 *LrAN2p* 相比, *LbAN2p* 序列含有更多的顺式作用元件。*LrAN2p* 中 12 bp “CATGAAGAGGAC”的插入, 使得 *LrAN2p* 具有更多的 CAAT-box, 这可作为有效区分红果枸杞和黑果枸杞的分子标记, 在今后枸杞新品系育种工作中提供可靠的标记方式之一。此外, 光环境也是影响花青素生物合成的重要环境因素<sup>[24]</sup>, 黑果枸杞中更多的光响应元件更有利于激活 *LrAN2* 基因的表达, 促进花青素的合成。前期研究表明, 花青素的合成积累可以使植物在干旱、紫外辐射、缺水、低温、缺氧等多种环境胁迫下, 增加植株抗逆性<sup>[25-26]</sup>。而 *LrAN2p* 中 ABRE 元件显著多于 *LbAN2p*, ABRE 是脱落酸特异结合响应元件, 脱落酸在植物中抗逆研究较多<sup>[27]</sup>, 这也从侧面推测 *LrAN2* 与黑果枸杞抗旱、耐盐碱息息相关<sup>[25,28]</sup>。*LrAN2p* 中有 6 个 G-box 元件, 远多于 *LbAN2p*, G-box 已证实参与茉莉酸、脱落酸、乙烯响应<sup>[29]</sup>, 最终诱导植株的抗病及花青素和生物碱的合成积累。由此可以推测 *LrAN2* 基因不仅能够产生 MBW 蛋白, 也有可能和茉莉酸或脱落酸响应基因互作产生植物抗逆的蛋白, 从而提高黑果枸杞在西北荒漠地区的抗逆性。

将启动子序列构建到含有 *GUS* 报告基因的载体上, 利用烟草进行遗传转化, 可确定启动子区域的活性差异。薛惠敏等<sup>[30]</sup>构建了 pBI121-LsANSpro:GUS 融合表达载体, 瞬时转化拟南芥(*Arabidopsis thaliana*), 其根、叶片和花显示蓝色, 可知启动子 LsANSPro 具有启动下游基因的作用。罗香怡等<sup>[31]</sup>构建了紫粒小麦(*Triticum aestivum*)的 *TaMYC1* 启动



子植物表达载体 TaMYC1p:GUS 和 TaMYC1w:GUS 并转入本氏烟草, 结果表明 *TaMYC1p* 启动子的活性要远高于 *TaMYC1w*, 推测其与紫粒小麦中 *TaMYC1* 转录水平较高和花青素含量较高有关。甘蓝型油菜 (*Brassica napus*) 的 *BnaFIL* 启动子在早花材料和晚花材料表达存在差异, 说明启动子的驱动效果对油菜开花早晚进行了调控, 导致 *BnaFIL* 在不同材料中的表达效果不一致<sup>[32]</sup>。在本研究中, GUS 染色结果表明, *LrAN2p* 能够启动下游 *GUS* 报告基因在烟草叶片中的表达, 说明该启动子具有明显的启动激活基因转录的能力, 而 *LbAN2p* 转基因烟草染色后, 叶片不呈现蓝色, 说明 *LbAN2p* 启动激活基因转录的能力远弱于 *LrAN2p*, qRT-PCR 结果也在表达量水平上证实了这一推论。*AN2* 基因的启动子在红果枸杞和黑果枸杞中的表达效果差异显著, 由此推断, *AN2* 在不同材料中的差异表达可能是由启动子驱动决定的, 也是黑果枸杞花青素合成代谢通路被激活的原因之一。这为后续黑果枸杞花青素生物合成代谢研究奠定了可靠的理论依据。

## 参考文献

- [1] GUO B Z. Economic Flora of Qinghai [M]. Xining: Qinghai People's Press, 1987. [郭本兆. 青海经济植物志 [M]. 西宁: 青海人民出版社, 1987.]
- [2] LIU Z G, DONG B M C L, LIU C, et al. Variation of anthocyanin content in fruits of wild and cultivated *Lycium ruthenicum* [J]. Ind Crops Prod, 2020, 146: 112208. doi: 10.1016/j.indcrop.2020.112208-16.
- [3] ZHENG J, DING C X, WANG L S, et al. Anthocyanins composition and antioxidant activity of wild *Lycium ruthenicum* Murr. from Qinghai-Tibet Plateau [J]. Food Chem, 2011, 126(3): 859–865. doi: 10.1016/j.foodchem.2010.11.052.
- [4] RUKEYA JIAPAER, SUN Y J, ZHONG L Z, et al. A review of phytochemical composition and bio-active of *Lycium barbarum* fruit (Goji) [J]. J Chin Inst Food Sci Technol, 2013, 13(8): 161–172. [如克亚·加帕尔, 孙玉敬, 钟烈州, 等. 枸杞植物化学成分及其生物活性的研究进展 [J]. 中国食品学报, 2013, 13(8): 161–172. doi: 10.16429/j.1009-7848.2013.08.001.]
- [5] JIANG X F. Overview on chemical constituents and pharmacological research of medlar [J]. J Jiangxi Univ TCM, 2013, 25(3): 98–100. [江旭锋. 枸杞子化学成分及其药理学研究概况 [J]. 江西中医学院学报, 2013, 25(3): 98–100. doi: 10.3969/j.issn.1005-9431.2013.03.032.]
- [6] LI J, YANG F, LUAN G X, et al. Research progress on ingredient and pharmacological activities of anthocyanins from *Lycium ruthenicum* [J]. W China J Pharm Sci, 2022, 37(3): 331–336. [李婧, 杨芳, 栾广祥, 等. 黑果枸杞的花青素类成分及其药理作用的研究进展 [J]. 华西药理学杂志, 2022, 37(3): 331–336. doi: 10.13375/j.cnki.wcjps.2022.03.022.]
- [7] TANAKA Y, SASAKI N, OHMIYA A. Biosynthesis of plant pigments: anthocyanins, betalains and carotenoids [J]. Plant J, 2008, 54(4): 733–749. doi: 10.1111/j.1365-313X.2008.03447.x.
- [8] AMRHEIN N. Novel inhibitors of phenylpropanoid metabolism in higher plants [M]// LUCKNER M, SCHREIBER K. Regulation of Secondary Product and Plant Hormone Metabolism. Oxford: Pergamon Press, 1979: 173–182. doi: 10.1016/B978-0-08-023179-2.50020-4.
- [9] BOSS P K, DAVIES C, ROBINSON S P. Analysis of the expression of anthocyanin pathway genes in developing *Vitis vinifera* L. cv Shiraz grape berries and the implications for pathway regulation [J]. Plant Physiol, 1996, 111(4): 1059–1066. doi: 10.1104/pp.111.4.1059.
- [10] DONG Y H, BEUNING L, DAVIES K, et al. Expression of pigmentation genes and photo-regulation of anthocyanin biosynthesis in developing Royal Gala apple flowers [J]. Funct Plant Biol, 1998, 25(2): 245–252. doi: 10.1071/PP97108.
- [11] KREYNES A E, YONG Z H, ELLIS B E. Developmental phenotypes of *Arabidopsis* plants expressing phosphovariants of *AtMYB75* [J]. Plant Signal Behav, 2021, 16(1): 1836454–68. doi: 10.1080/15592324.2020.1836454.
- [12] CHHON S, JEON J, KIM J, et al. Accumulation of anthocyanins through overexpression of *AtPAP1* in *Solanum nigrum* Lin. (black nightshade) [J]. Biomolecules, 2020, 10(2): 277–293. doi: 10.3390/biom10020277.
- [13] GERATS A G, FARCY E, WALLROTH M, et al. Control of anthocyanin synthesis in *Petunia hybrida* by multiple allelic series of the genes *An1* and *An2* [J]. Genetics, 1984, 106(3): 501–508. doi: 10.1093/genetics/106.3.501.
- [14] BAO X M, ZONG Y, HU N, et al. Functional R2R3-MYB transcription factor *NsMYB1*, regulating anthocyanin biosynthesis, was relative to the fruit color differentiation in *Nitraria sibirica* Pall. [J]. BMC Plant Biol, 2022, 22(1): 186–198. doi: 10.1186/s12870-022-03561-5.
- [15] ZONG Y, ZHU X B, LIU Z G, et al. Functional MYB transcription factor encoding gene *AN2* is associated with anthocyanin biosynthesis in *Lycium ruthenicum* Murray [J]. BMC Plant Biol, 2019, 19(1): 169–178. doi: 10.1186/s12870-019-1752-8.
- [16] ZONG Y, LI S M, XI X Y, et al. Comprehensive influences of overexpression of a MYB transcription factor regulating anthocyanin biosynthesis on transcriptome and metabolome of tobacco leaves [J]. Int J Mol Sci, 2019, 20(20): 5123–5136. doi: 10.3390/ijms20205123.
- [17] SHEN Z Y, ZHANG C, DONG B, et al. Cloning and expression

- analysis of the promoters of *OjLCYB* and *OjLCYE* in *Osmanthus fragrans* [J]. *Biotechnol Bull*, 2018, 34(1): 137–143. [沈子又, 张超, 董彬, 等. 桂花 *OjLCYB* 和 *OjLCYE* 启动子的克隆和活性分析 [J]. *生物技术通报*, 2018, 34(1): 137–143. doi: 10.13560/j.cnki.biotech.bull.1985.2017-0706.]
- [18] LIU Y G, WHITTIER R F. Thermal asymmetric interlaced PCR: Automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking [J]. *Genomics*, 1995, 25(3): 674–681. doi: 10.1016/0888-7543(95)80010-J.
- [19] GAO L, TIAN Y, CHEN M C, et al. Cloning and functional characterization of epidermis-specific promoter *MtML1* from *Medicago truncatula* [J]. *J Biotechnol*, 2019, 300: 32–39. doi: 10.1016/j.jbiotec.2019.05.013.
- [20] HORSCH R B, FRY J E, HOFFMANN N L, et al. A simple and general method for transferring genes into plants [J]. *Science*, 1985, 227(4691): 1229–1231. doi: 10.1126/science.227.4691.1229.
- [21] Fernández-Piñán S, López J, Armendariz I, et al. *Agrobacterium tumefaciens* and *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of potato and the promoter activity of a suberin gene by GUS staining [J]. *JoVE*, 2019 (145): e59119–e59128. doi: 10.3791/59119.
- [22] LAI Y S, SHIMOYAMADA Y, NAKAYAMA M, et al. Pigment accumulation and transcription of *LhMYB12* and anthocyanin biosynthesis genes during flower development in the Asiatic hybrid lily (*Lilium* spp.) [J]. *Plant Sci*, 2012, 193–194: 136–147. doi: 10.1016/j.plantsci.2012.05.013.
- [23] LU J, ZHAO H Y, HE Y K, et al. Advances in promoters in higher plants and their applications [J]. *Prog Nat Sci*, 2004, 14(8): 856–862. [路静, 赵华燕, 何奕昆, 等. 高等植物启动子及其应用研究进展 [J]. *自然科学进展*, 2004, 14(8): 856–862. doi: 10.3321/j.issn:1002-008X.2004.08.003.]
- [24] WANG F, WANG X J, ZHAO S N, et al. Light regulation of anthocyanin biosynthesis in horticultural crops [J]. *Sci Agric Sin*, 2020, 53(23): 4904–4917. [王峰, 王秀杰, 赵胜男, 等. 光对园艺植物花青素生物合成的调控作用 [J]. *中国农业科学*, 2020, 53(23): 4904–4917. doi: 10.3864/j.issn.0578-1752.2020.23.015.]
- [25] WANG H X, LIU T Y, ZHUANG W B, et al. Research advances in the function of anthocyanin in plant stress response [J]. *J Agric Biotechnol*, 2020, 28(1): 174–183. [王鸿雪, 刘天宇, 庄维兵, 等. 花青素在植物逆境响应中的功能研究进展 [J]. *农业生物技术学报*, 2019, 28(1): 174–183. doi: 10.3969/j.issn.1674-7968.2020.01.018.]
- [26] LIU L, DU H, TANG X F, et al. The roles of MYB transcription factors on plant defense responses and its molecular mechanism [J]. *Hereditas*, 2008, 30(10): 1265–1271. [刘蕾, 杜海, 唐晓凤, 等. MYB 转录因子在植物抗逆胁迫中的作用及其分子机理 [J]. *遗传*, 2008, 30(10): 1265–1271. doi: 10.3724/SP.J.1005.2008.01265.]
- [27] LIU H J, LIU Y, LIU L. Progress of research on the influence of abscisic acid in plant resistance [J]. *Biotechnol Bull*, 2008(6): 7–9. [刘红娟, 刘洋, 刘琳. 脱落酸对植物抗逆性影响的研究进展 [J]. *生物技术通报*, 2008(6): 7–9.]
- [28] SHI X W. Identification and analysis of MicroRNA related to adversity stress and anthocyanin biosynthesis in sweet potato [D]. Jinzhong: Shanxi Agricultural University, 2018. [石晓雯. 甘薯逆境胁迫和花青素合成相关 microRNA 及其靶基因的鉴定和分析 [D]. 晋中: 山西农业大学, 2018.]
- [29] SA Q L, LI W B, SUN Y R. Transcriptional regulation of the G-box and G-box-binding proteins in plant gene expression [J]. *Plant Physiol Commun*, 2003, 39(1): 89–92. [萨其拉, 李文彬, 孙勇如. G-box 和 G-box 结合蛋白在植物基因诱导表达中的转录调控作用 [J]. *植物生理学通讯*, 2003, 39(1): 89–92. doi: 10.13592/j.cnki.ppj.2003.01.028.]
- [30] XUE H M, ZHOU Y L, GAO Y H. Cloning and promoter function analysis of the anthocyanins synthase gene (*LsANS*) in *Lycoris sprengeri* [J]. *Chin J Agric Biotechnol*, 2022, 30(8): 1468–1479. [薛惠敏, 周洋丽, 高燕会. 换锦花花青素合成酶基因(*LsANS*)的克隆及启动子功能分析 [J]. *农业生物技术学报*, 2022, 30(8): 1468–1479. doi: 10.3969/j.issn.1674-7968.2022.08.003.]
- [31] LUO X Y, ZONG Y, CAO D, et al. Cloning and functional analysis of promoter of *TaMYC1* gene in common wheat [J]. *Mol Plant Breed*, 2022, 20(8): 2456–2462. [罗香怡, 宗渊, 曹东, 等. 普通小麦中 *TaMYC1* 基因启动子的克隆和功能分析 [J]. *分子植物育种*, 2022, 20(8): 2456–2462. doi: 10.13271/j.mpb.020.002456.]
- [32] CHEN J, HU R, LIU Y, et al. Cloning and expression analysis of *BnaFIL* gene promoter in *Brassica napus* L. [J]. *Acta Agric Boreali-Sin*, 2022, 37(3): 53–59. [陈静, 胡蓉, 刘勇, 等. 甘蓝型油菜 *BnaFIL* 基因启动子的克隆与表达分析 [J]. *华北农学报*, 2022, 37(3): 53–59. doi: 10.7668/hbxb.20192788.]