

水稻 ADP-葡萄糖焦磷酸化酶小亚基 I 基因的启动子分析

潘晓雪^{1,2}, 姜华武^{1*}, 闫洪波^{1,2}, 李美茹¹, 吴国江¹

(1. 中国科学院华南植物园, 广州 510650; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100049)

摘要: 水稻(*Oryza sativa* L.)基因组中的 ADP-葡萄糖焦磷酸化酶小亚基(ADP-Glucose pyrophosphorylase small subunit, OsAgpS)由两个基因编码,即 *OsAgpS1* 和 *OsAgpS2*。其中 *OsAgpS1* 基因产生两个转录本 *OsAgpS1a* 和 *OsAgpS1b*,区别在第一个外显子的位置不同。通过 RT-PCR 方法分析了两个转录本在水稻组织和胚乳不同发育时期的表达特性;同时通过报告基因 *GUS* 检测了两个转录本上游转录调节区 DNA 片段的转录启动特性。结果表明,两个启动子与其下游转录本的表达模式完全一致,即 *OsAgpS1a* 转录本和 *OsAgpS1a* 上游启动子控制的 *GUS* 基因主要在胚乳中高水平表达,在叶片中有很低水平的表达;而 *OsAgpS1b* 转录本和 *OsAgpS1b* 上游启动子控制的 *GUS* 基因主要在叶片和胚乳发育早期低水平表达。这说明 *OsAgpS1* 基因产生的两个转录本是由不同的启动子控制转录的,*OsAgpS1a* 上游启动子可以作为胚乳表达用启动子。

关键词: 水稻;ADP-葡萄糖焦磷酸化酶;启动子;基因表达

中图分类号: Q74

文献标识码: A

文章编号:1005-3395(2008)03-0189-06

Promoter Analysis of the Gene Encoding ADP-Glucose Pyrophosphorylase Small Subunit I in Rice

PAN Xiao-xue^{1,2}, JIANG Hua-wu^{1*}, YAN Hong-bo^{1,2},
LI Mei-ru¹, WU Guo-jiang¹

(1. South China Botanical Garden, the Chinese Academy of Sciences, Guangzhou 510650, China;

2. Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China)

Abstract: Two distinct genes, *OsAgpS1* and *OsAgpS2*, were found to encode ADP-Glucose pyrophosphorylase small subunit in rice (*Oryza sativa* L.) genome. While *OsAgpS1* gives rise to two different transcripts, *OsAgpS1a* and *OsAgpS1b*, through alternative splicing at the first exon. The expression patterns of the two transcripts in different tissues and developing endosperms in rice were analyzed by RT-PCR. On the other hand, the spatial regulation of *OsAgpS1* gene expression by using a reporter gene *GUS* driven by two different promoters upstream the two transcripts, respectively, were analyzed. The results showed that *OsAgpS1a* transcripts and the reporter gene *GUS* driven by the *OsAgpS1a* promoter had a similar expression pattern that abundantly expressed in endosperms but very low in leaves, whereas *OsAgpS1b* transcripts and the reporter gene *GUS* driven by the *OsAgpS1b* promoter own other similar expression pattern that expressed at a low level in leaves, roots and early development endosperms of rice. These results suggested that these two different transcripts of *OsAgpS1* gene were driven by different promoters, and the promoter upstream *OsAgpS1a* could be used as an endosperm specific expression promoter in rice.

Key words: Rice (*Oryza sativa* L.); ADP-Glucose pyrophosphorylase; Promoter; Gene expression

收稿日期: 2007-09-07

接受日期: 2007-12-29

基金项目: 广东省自然科学基金项目(05300499)资助

* 通讯作者 Corresponding author

细菌糖原合成与植物淀粉合成的底物是 ADP-葡萄糖 (ADP-glucose, ADP-Glc), ADP-Glc 由 ADP-Glc 焦磷酸化酶 (ADP-Glc pyrophosphorylase, AGPase) 催化合成。高等植物的 AGPase 是由两个大亚基 (AGPase large subunit; AgpL) 和两个小亚基 (AGPase small subunit; AgpS) 组成的异源四聚体, 催化部位位于小亚基而调节部位位于大亚基上^[1]。ADPase 一般位于质体中, 但是在谷物胚乳胞浆中也存在 ADPase。玉米 (*Zea mays*) *Shrunken-2*^[2] 和 *Brittle-2*^[3] 突变体, 就是由于位于胞浆中的 ADPase 的大小亚基发生突变产生的。在玉米^[4]、小麦 (*Triticum aestivum*)^[5]、大麦 (*Hordeum vulgare*)^[6] 和水稻 (*Oryza sativa*)^[7] 等谷物的 80% 以上的 ADPase 活性来自胚乳胞浆。在高等植物中, 淀粉合成的相关酶基因都发生过基因倍增并歧化成不同表达特性的类群。在水稻中有两个表达特性的类群: Group I, 倾向于在胚乳中表达, 与淀粉积累进程相一致; 而 Group II, 倾向于在叶片和其它组织以及发育早期的胚乳中表达^[8]。水稻基因组中有 4 个 ADPase 大亚基基因和 2 个小亚基基因, EST 数据表明, *AgpL1* 主要在胚乳中高丰度表达, 与玉米 *Shrunken-2* 基因同源性最高, 由之的编码产生细胞质 ADPase 的大亚基。2 个 *AgpS* 基因中, *AgpS2* (LOC_Os09g12660) 在叶片和发育早期的胚乳中表达, 属于 Group II 类群基因^[8]。*AgpS1* (LOC_Os08g25734) 有两种剪接方式, 一种具有转运肽 (*AgpS1b* 编码) 定位于质体中; 另一种没有转运肽 (*AgpS1a* 编码), 与玉米 *Brittle-2* 同源, 定位于胞浆中, 其基因突变产生 *shrunken* 胚乳表型^[9]。

在玉米中, *AgpS1a* 和 *AgpS1b* 由两个基因编码^[10], 而小麦^[11] 和大麦^[12] 与水稻一样由同一个基因编码。水稻 *AgpS1* 基因的两个转录本是由同一个启动子控制转录形成还是由不同的启动子控制形成还不清楚。本研究通过报告基因 (*GUS*) 在水稻植株中的表达特性来分析水稻 *AgpS1* 基因不同区域的启动子转录活性, 以探讨水稻 *AgpS1* 基因的两个转录本如何进行转录调节, 为深入研究 AGPase 提供科学依据。

1 材料和方法

1.1 材料

水稻 (*Oryza sativa* L. ssp. *japonica* 'Nipponbare', 日本晴) 于中国科学院华南植物园温室盆栽。

叶片和根取自 4~5 叶期植株, 叶片为第三叶。籽粒在开花后的不同时期采集 (种子开花后 5~6 d 达到最大长度, 10~11 d 达到最大宽度, 14~15 d 达到最大厚度, 20 d 黄熟), 全部为上位强势粒。用于 RNA 提取的样品经液氮速冻后于 -72℃ 保存备用。用于 GUS 检测的样品取样处理后直接反应。

1.2 半定量 RT-PCR 分析

总 RNA 用 Trizol (GIBCOBRL) 从叶片、根及花后 3~14 d 的种子中提取。PCR 模板第一链 cDNA 的合成用 2 μg 总 RNA, Olig(dT) 引物, M-MLV 逆转录酶。2 μl cDNA 用于 PCR 反应, 1% 琼脂糖胶 (含 ethidium bromide) 电泳后紫外光下显色照相。4 对特异引物对都跨内含子序列, 以排除基因组 DNA 的污染。以水稻 *Actin* 基因 (Genbank 登录号: X16280) 作为样品 RNA 浓度平衡化对照, 同时以水稻 Wx 蛋白 (*OsGBSSI*) 基因表达丰度作参考。使用的引物对如下: *AgpS1a* (S1aU, 5'-AATCTTGACCG-CAGTGTTCGATG-3'; S1L, 5'-TGCAGCGAGGACT-TCAACGA-3'); *AgpS1b* (S1bU, 5'-CGGACGCCAG-CACGAGTGTG-3'; S1L, 5'-TGCAGCGAGGACT-TCAACGA-3'); *OsGBSSI* (WxU, 5'-TCGACAACAT-CATGCGGCTCA-3'; WxL, 5'-AGCACAGGGCGT-TCCGTATCTC-3'); *Actin* (AcU, 5'-GGAAGTGG-TATGGTCAAGGC-3'; AcL, 5'-AGTCTCATGGAT-ACCCGCAG-3')。

1.3 启动子表达载体构建与转基因水稻

克隆 *AgpS1a* 启动子引物对为: P1U, 5'-CT-TCAAACCGAATATCACTCATAG-3'; P1L, 5'-AG-AATTACAAAGAAAACCGTACTC-3'。DNA 片段长度为 2 004 bp。克隆 *AgpS1b* 启动子引物对为: P2U, 5'-GCACAGCCCTTGATCACAATACAG-3'; P2L, 5'-GGGGTGGAGAAGACGAGAAG-3'。DNA 片段长度为 1 648 bp。具体分布位置见图 2。通过基因组 PCR 扩增出 DNA 片断, 克隆到 pMD18-T 载体中; *Pst* I 和 *Bam* HI 双酶切, 转接到 pCAMBIA1391Z 载体上, 分别命名为 P1 和 P2。应用农杆菌介导转基因方法将其转化到水稻 (日本晴) 中。

1.4 GUS 基因表达的组织化学检测

根和叶片的染色: 将植物材料剪切成 0.5~1.0 cm 的长度, 放置在 1.5 ml 离心管中, 加入 500 μl 的 GUS 反应液, 37℃ 放置 4~6 h, 70% 乙醇脱色后照相。

种子染色:将一张滤纸用铅笔画成 2 cm × 2 cm 的方格,放入 12 cm × 12 cm 的方形培养皿中,加入约 5 ml GUS 反应液使滤纸完全湿润,但不要有液体流动。将待检测的种子从中间分别作横切和纵切后,将切面向下放到滤纸上。盖好培养皿,37℃ 放置 1 h(P1)或 2 h(P2)。将培养皿底部反向上照相(横切),或取出种子照相(纵切)。GUS 染色液为 0.1 mol/L 磷酸盐缓冲液(pH 7.0),1 mmol/L EDTA (pH 8.0),0.5 mmol/L $K_3[Fe(CN)_6]$,0.5 mmol/L $K_4[Fe(CN)_6]$,1 mmol/L X-Gluc(5-溴-4-氯-3-吲哚葡萄糖醛酸苷)。

2 结果和分析

2.1 水稻 *AgpS1* (*OsAgpS1*) 的表达分析

分别以 *OsAgpS1a* 和 *OsAgpS1b* 转录本的 5'-特异序列区设计引物,通过 RT-PCR 方法对其表达

的组织特异性进行了分析。结果表明,*OsAgpS1a* 主要在胚乳中表达,在叶片和根中只有很微量的表达(图 1A)。在胚乳发育早期表达较低,随着胚乳发育其表达量也增加,在胚乳发育后期又有下降趋势(图 1B)。相反,*OsAgpS1b* 在叶片中有较高的表达丰度(图 1A),同时在胚乳发育早期表达丰度较高,但是随着胚乳的发育,其表达量明显下降(图 1B)。水稻 Wx 基因(*OsGBSSI*)主要在胚乳发育的中后期表达,胚乳发育的早期表达丰度较低,与先前的报道相一致^[8],表明各 RT-PCR 样品的 cDNA 浓度平衡化是可信的。本结果说明 *OsAgpS1b* 主要在胚乳发育早期起作用,主要合成早期临时性淀粉,属于淀粉合成酶的 Group II 类群基因。而 *OsAgpS1a* 则在胚乳灌浆期起作用,与水稻种子贮藏淀粉的合成相关,属于淀粉合成酶的 Group I 类群基因。

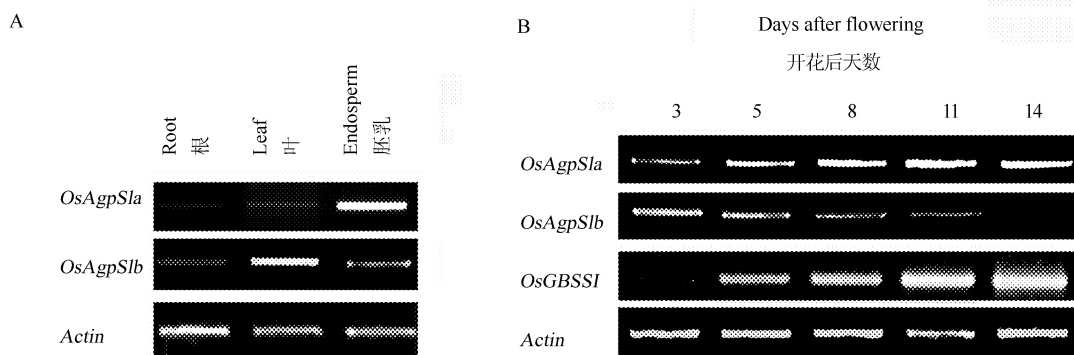


图1 水稻 *AgpS1a* 和 *AgpS1b* 表达的 RT-PCR 分析

Fig. 1 RT-PCR analysis of *AgpS1a* and *AgpS1b* in rice

A. 根、叶和胚乳中的特异表达 Expression in roots, leaves, and endosperms;

B. 在不同发育时期的胚乳中的表达 Expression in endosperms at different development stage.

2.2 水稻 *AgpS1* 基因启动子分析

为了确定水稻 *AgpS1* 基因的两个不同转录本是由相同的启动子控制还是由不同的启动子控制,首先利用生物信息学方法分析了 *AgpS1* 基因的上游区域序列。通过 <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html> 网站上的 A Database of Plant Cis-acting Regulatory DNA Elements 在线分析,发现在 *AgpS1a* 第一外显子上游 30 bp 左右有一个推测的启动子区(图 2, Putative Promoter 1),核心序列为

TATAAAT。在 *AgpS1a* 第一内含子区,*AgpS1b* 的第一外显子上游也具有推测的启动子区(图 2, Putative Promoter 2),核心序列为 TATTTAA。说明水稻的 *AgpS1a* 和 *AgpS1b* 转录本可能是由不同的启动子控制转录的。为了确定 *AgpS1a* 第一内含子区是否具有转录活性,以及它与 *AgpS1a* 上游启动子的表达特性,我们克隆了这两个启动子区间(图 2, P1U/P1L;P2U/P2L),连接到 pCAMBIA1391Z 载体,通过报告基因 *GUS* 转基因水稻来进行分析检测。

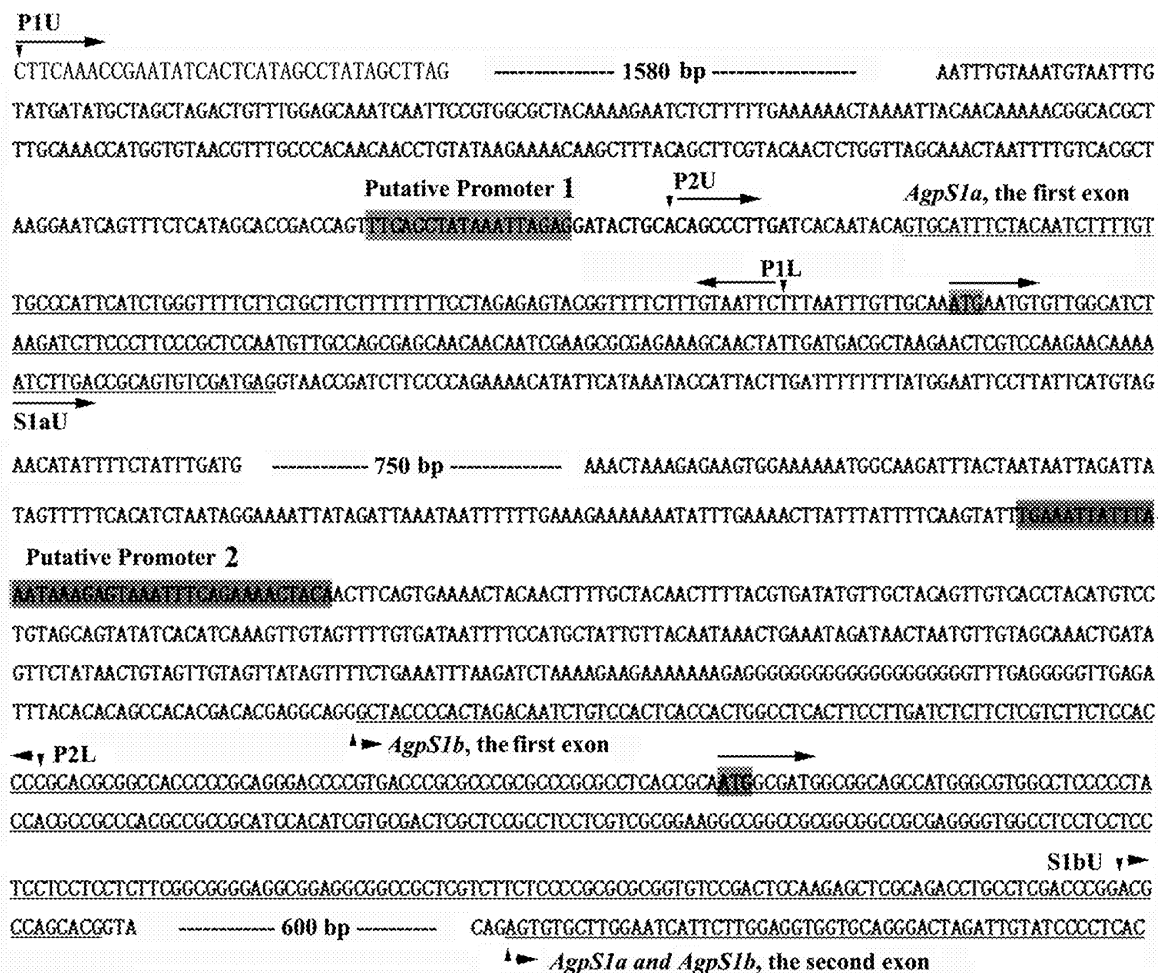


图 2 水稻 *AgpS1* 基因启动子区域序列

Fig. 2 The sequence of promoter region of *AgpS1* in rice

下划线序列: 外显子区域 Underlined sequences: exon region; 黑色加深区域: 推测的启动子基序和翻译起始密码子 Blacked region: the putative promoter motif and initiation codon; P1U/P1L, P2U/P2L, S1aU, S1bU: PCR 引物和在 *AgpS1* 基因上位点 the PCR primers and their loci on *AgpS1* gene.

2.3 两个启动子在种子中的表达

从 8 个转基因水稻株系当代种子横切后 GUS 活性显色结果表明, 开花后 10 d 胚乳中 P1 (*AgpS1a* 上游启动子)表现出很高的转录活性, 反应 10 min 后就有 GUS 反应产生的蓝色产物, 30 min 达到饱和, 蓝色产物向种子四周扩散。相反 P2(*AgpS1b* 上游启动子)表现出较低的转录活性, 反应 1 h 后 GUS 反应产生的蓝色产物还难以分辨, 反应 2 h 后才可以看到明显的蓝色产物出现(图 3)。在图 3 中有部分转基因水稻胚乳没有显色, 在转 P1::GUS 的水稻株系籽粒中对比明显, 用 70% 乙醇脱色后更加清楚, 说明这些种子没有 GUS 基因插入, 外源基因的插入在转基因当代种子中发生分

离, 正好可以作为 GUS 显色的阴性对照, 表明本反应体系检测 GUS 活性是可靠的。

从种子纵切后 GUS 活性显色结果(图 4)表明, P1 在开花后 5 d 的胚乳中就有表达, 在开花后 10 d 达到高峰, 之后开始下降。由于酶水平的高峰期一般滞后于核酸表达, 这种表达模式与 *OsAgpS1a* 转录本的 RT-PCR 分析结果是一致的。此外, P1 在水稻胚中没有表达。P2 在开花后 5 d 的胚乳中也有表达, 并随着胚乳发育其活性下降, 在开花后 20 d 的胚乳中 GUS 活性非常低。这种表达模式与 *OsAgpS1b* 转录本的 RT-PCR 分析结果相一致。同样, P2 在水稻胚中也没有表达。

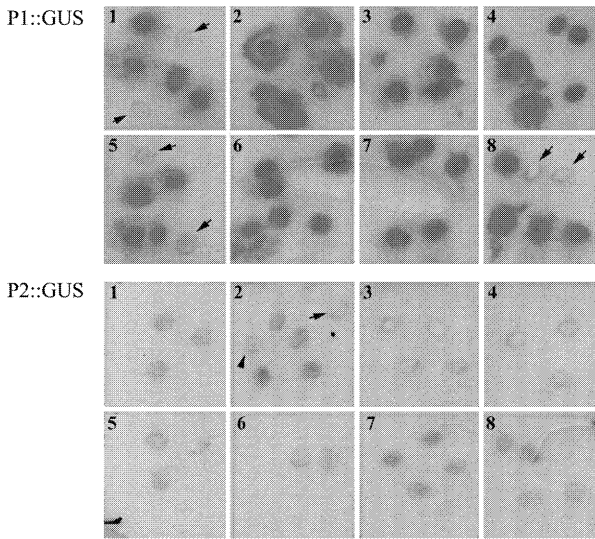


图 3 两个启动子控制的 GUS 基因在水稻胚乳中的表达
Fig. 3 The GUS expressions in rice endosperms droven by two different promoters

P1::GUS: *AgpS1a* 启动子接 GUS *AgpS1a* promoter + GUS;
P2::GUS: *AgpS1b* 启动子接 GUS *AgpS1b* promoter + GUS.
1~8: 胚乳横切, 不同转基因水稻株系开花后 10 d 种子 The transverse sections of endosperms come from 10 days after flowering of different transgenic rice lines; 箭头指示没有 GUS 活性的籽粒 The arrows indicate the grains without GUS activity.

2.4 两个启动子在叶片和根中的表达检测

从 GUS 显色结果可以看出, P1 和 P2 两个启动子在叶片中都有表达(图 5), 在不同转基因水稻株系中 GUS 活性变化较大, 可能与其插入位点不同有关。P1 和 P2 两个启动子在叶片中的转录活性明显比在胚乳中的要低, 反应 2 h 难以检测到 GUS 活性, 反应 4 h 后才有蓝色产物。从总体上看, 在叶片中 P2 启动的 GUS 活性明显要比 P1 高, 说明叶片中 GUS 活性也与 *OsAgpS1a* 和 *OsAgpS1b* 两个转录本的 RT-PCR 结果相一致。P2 启动的 GUS 活性在根中较弱, 反应 6 h 后才有蓝色产物, 而 P1 启动的 GUS 活性在反应 6 h 后没有被检测到(图 5)。说明 P2 启动子活性在根和叶中明显高于 P1 启动子活性。

3 讨论

水稻种子特别是未成熟种子使用滤纸法检测 GUS 活性是一个较好的方法。如果不去种皮, GUS 染液很难渗透进入胚乳, 不利于真实检测出胚和胚乳中 GUS 的活性。如果去种皮, 由于水稻未成熟种子胚乳呈半液体状, 胚乳细胞在溶液中很容易分散。在试管中反应时, GUS 作用产生的蓝色产物大

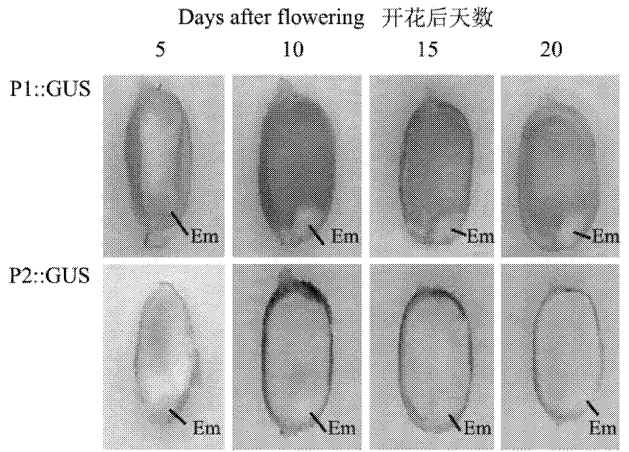


图 4 两个启动子控制的 GUS 基因在水稻胚乳发育过程中的表达

Fig. 4 The GUS expressions in rice endosperms at different development stage droved by two different promoters

Em: 胚 Embryo; P1::GUS: *AgpS1a* 启动子接 GUS *AgpS1a* promoter + GUS; P2::GUS: *AgpS1b* 启动子接 GUS *AgpS1b* promoter + GUS; 转基因水稻株系 P1::GUS-2 和 P2::GUS-2 的胚乳纵切 The longitudinal sections of endosperms come from transgenic rice lines of P1::GUS-2 and P2::GUS-2.

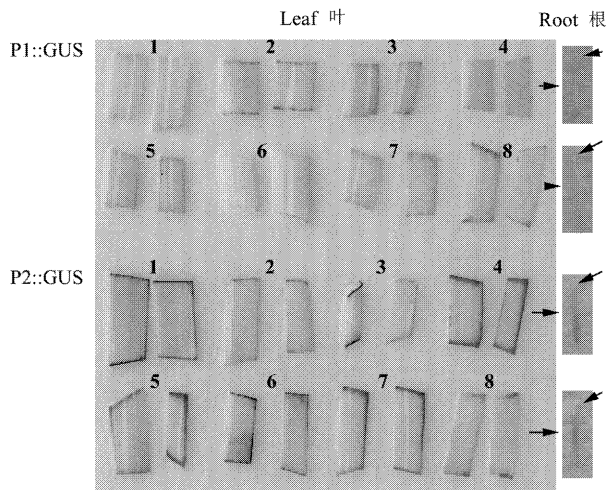


图 5 两个启动子控制的 GUS 基因在水稻叶片和根中的表达

Fig. 5 The GUS expressions in rice leaves and roots droven by two different promoters

P1::GUS, *AgpS1a* 启动子接 GUS *AgpS1a* promoter + GUS;
P2::GUS, *AgpS1b* 启动子接 GUS *AgpS1b* promoter + GUS.
1~8: 不同转基因水稻株系 Different transgenic rice lines; 根来源于转基因水稻株系 4 号和 8 号 Roots come from transgenic lines 4 and 8, respectively.

多数会扩散到 GUS 染液中, 同时胚乳也容易解体, 因此不利于观察和照相记录。本实验将种子分别横切和纵切后, 切口向下放在预先用 GUS 染液湿

润的滤纸上,这样未成熟的胚乳组织可以得到支撑,GUS反应产生的蓝色产物大多在胚乳切口,如果GUS活性很高,反应产物也只会扩散在种子四周(图3),因此便于观察和照相记录。

水稻的 *AgpS1a* 和 *AgpS1b* 由同一个基因编码,但是两个不同的转录本可能是由不同的启动子控制转录的,而不是由同一个启动子控制转录后由前体RNA的不同剪切方式剪接形成的。其主要证据之一是 *AgpS1a* 5' 特异序列 RT-PCR 分析表明 *AgpS1a* 主要在胚乳中表达,在开花的5~11 d的胚乳中达到高峰,而后稍有下降,在叶片中表达较弱(图1)。由P1启动的GUS基因,在叶片中表达较弱(图5),胚乳中高水平表达(图3),在开花10 d的胚乳中最高,之后下降(图4)。P1启动的GUS基因表达模式与RT-PCR检测到的 *AgpS1a* 的表达模式一致。二是P2启动的GUS基因表达模式与RT-PCR检测到的 *AgpS1b* 的表达模式一致,在叶片中有一定水平的表达,高于 *AgpS1a/P1::GUS* 的表达水平,在胚乳中的表达较弱,在胚乳发育早期表达,在胚乳发育中后期表达减弱。

水稻 *AgpS1a* 上游启动子可以作为胚乳表达用启动子。组织特异性表达启动子是研究基因功能和改变植物特异性状的重要工具。如果通过基因工程手段改变水稻种子淀粉性状和稻米品质,需要导入的目的基因只在胚乳专一表达,而在其他组织中不表达或极微量表达,从而只作用于胚乳而对其他组织的生长发育不造成明显影响。这样就需要有胚乳专一表达的启动子。水稻 *AgpS1a* 上游启动子P1在水稻胚乳中高水平表达,并且与胚乳发育时期相一致(图4),在根中几乎不表达,在叶片中也只有很低水平的表达(图5)。通过其后代进一步检测后我们将确定水稻 *AgpS1a* 上游启动区P1是否可以作为水稻胚乳表达用启动子。

参考文献

- [1] Smith A M, Denyer K, Martin C. The synthesis of the starch granule [J]. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1997, 48: 67-87.
- [2] Bhavé M R, Lawrence S, Barton C, et al. Identification and molecular characterization of *shrunk-2* cDNA clones of maize [J]. *Plant Cell*, 1990, 2: 581-588.
- [3] Preiss J, Danner S, Summers P S, et al. Molecular characterization of the *Brittle-2* gene effect on maize endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase subunits [J]. *Plant Physiol*, 1990, 92: 881-885.
- [4] Denyer K, Dunlap F, Thorbjørnsen T, et al. The major form of ADP-glucose pyrophosphorylase in maize endosperm is extra-plastidial [J]. *Plant Physiol*, 1996, 112: 779-785.
- [5] Tetlow I J, Davies E J, Vardy K A, et al. Subcellular localization of ADP-glucose pyrophosphorylase in developing wheat endosperm and analysis of the properties of a plastidial isoform [J]. *J Exp Bot*, 2003, 54: 715-725.
- [6] Thorbjørnsen T, Villand P, Denyer K, et al. Distinct isoforms of ADP-glucose pyrophosphorylase occur inside and outside the amyloplasts in barley endosperm [J]. *Plant J*, 1996, 10: 243-250.
- [7] Sikka V K, Choi S-B, Kavakli H, et al. Subcellular compartmentation and allosteric regulation of the rice endosperm ADP-glucose pyrophosphorylase [J]. *Plant Sci*, 2001, 161: 461-468.
- [8] Dian W, Jiang H, Wu P. Evolution and expression analysis of starch synthase III and IV in rice [J]. *J Exp Bot*, 2005, 56: 623-632.
- [9] Kawagoe Y, Kubo A, Satoh H, et al. Roles of isoamylase and ADP-glucose pyrophosphorylase in starch granule synthesis in rice endosperm [J]. *Plant J*, 2005, 42: 164-174.
- [10] Hannah L C, Shaw J R, Giroux M J, et al. Maize genes encoding the small subunit of ADP-glucose pyrophosphorylase [J]. *Plant Physiol*, 2001, 127: 173-183.
- [11] Burton R A, Johnson P E, Beckles D M, et al. Characterization of the genes encoding the cytosolic and plastidial forms of ADP-glucose pyrophosphorylase in wheat endosperm [J]. *Plant Physiol*, 2002, 130: 1464-1475.
- [12] Thorbjørnsen T, Villand P, Kleczkowski L A, et al. A single gene encodes two different transcripts for the ADP-glucose pyrophosphorylase small subunit from barley (*Hordeum vulgare*) [J]. *Biochem J*, 1996, 313: 149-154.