

紫茎泽兰 *hsp90* 和 *hsp17.66* 基因启动子的克隆及其序列分析

宫伟娜^{a,b}, 万方浩^{a*}, 谢丙炎^b, 郭建英^a, 周艳^a

(中国农业科学院, a. 植物保护研究所植物病虫害生物学国家重点实验室; b. 蔬菜花卉研究所, 北京 100081)

摘要: 以入侵植物紫茎泽兰(*Ageratina adenophora* Sprengel)为材料,采用基于 PCR 方法的染色体步行和改良的热不对称交错 PCR (thermal asymmetric interlaced PCR, TAIL-PCR)两种方法分别克隆到 *hsp90* 和 *hsp17.66* 基因的 5'上游启动子序列,长度分别为 864 bp 和 1 485 bp (GenBank 登录号分别为 FJ434253 和 FJ434252)。测序结果表明:这两个启动子序列均具有 *hsp* 启动子特有的 HSE 元件,及其他一些启动子顺式作用元件,如 TATA-box, CAAT-box 等。

关键词: 紫茎泽兰; 热激蛋白基因; 启动子; 克隆; 染色体步行; TAIL-PCR

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2009)05-0451-07

Cloning and Sequence Analysis of Promoters in *hsp90* and *hsp17.66* Genes from *Ageratina adenophora*

GONG Wei-na^{a,b}, WAN Fang-hao^{a*}, XIE Bing-yan^b, GUO Jian-ying^a, ZHOU Yan^a

(a. State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection; b. Institute of Vegetables and Flowers, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: The promoter region of *hsp90* with 864 bp (GenBank No. FJ434253), from invasive weed *Ageratina adenophora* was amplified based on PCR methods, which are available as chromosome walking from a known sequence to an unknown region. Moreover, another promoter region of *hsp17.66* with 1 485 bp (GenBank No. FJ434252) was cloned by thermal asymmetric interlaced PCR (TAIL-PCR). Both of the 5'-flanking regions of *hsp90* and *hsp17.66* contained specific HSE element and several *cis*-acting elements, such as TATA-box, CAAT-box, et al.

Key words: *Ageratina adenophora*; *hsp* gene; Promoter; Clone; Chromosome walking; TAIL-PCR

紫茎泽兰(*Ageratina adenophora* Sprengel)是多年生草本植物,原产于中美洲墨西哥与哥斯达黎加,现 30 多个国家和地区有分布。20 世纪 40 年代,这种杂草从缅甸边境传入我国云南省,此后在我国西南地区迅速扩散蔓延,现已广泛分布于四川、重庆、广西、贵州等地,并有继续北移的趋势,其大面积生长严重危害了当地的农业和畜牧生产^[1]。该杂草适应能力极强,在最高气温 35℃ 以下、最冷月均温 6℃ 以上的地区均适宜其生长^[1],并且对不同海拔的生境具有极强的适应能力^[2],因而运用分

子生态理论分析紫茎泽兰的适应机制已成为近年来入侵生物学的热点之一。

热激蛋白(Heat shock protein, HSP)是一类在生物有机体受到高温等逆境刺激后大量表达的蛋白,作为分子伴侣(molecular chaperones)促进变性蛋白质的降解和清除、重新激活一些酶的活性,提高细胞的应激能力从而适应环境胁迫抗性,减轻逆境胁迫对细胞引起的伤害^[3]。紫茎泽兰的 HSP17.66 和 HSP90 分别属于小分子量热激蛋白(sHSP)和分子量为 90 kDa 的热激蛋白家族的成员。sHSP 是植

收稿日期:2008-12-09 接受日期:2009-03-10

基金项目:国家 973 计划项目(2009CB119200)资助

* 通讯作者 Corresponding author

物在高温胁迫下表达最丰富的一类热激蛋白,而 HSP90 除与生物逆境相关外,还与生物表型变化具有密切关系^[4-6]。植物热诱导基因的表达受到热调控启动子的控制^[7-8],这些启动子可以快速高效地启动与调控基因的转录^[9-10]。热激蛋白的启动子具有一系列受温度胁迫诱导的元件^[11],包括热激转录因子(Heat shock transcription factor, HSF)基因、热激转录元件(Heat shock transcription element, HSE)和热激蛋白基因,其中 HSE 位于热激蛋白基因上游,当 HSF 与其结合后,就会激活热激基因的表达^[12]。启动子可明显提高 *hsp* 基因的表达水平,目前对 *hsp* 基因的启动子研究,尤其是对 *shsp* 启动子的克隆和元件分析的研究较多^[13-15]。利用已知的 *hsp* 基因序列克隆其未知的调控序列,并通过基因工程手段研究其功能特性,为了解 *hsp* 基因的调控本质提供了有效的手段。

目前,启动子克隆的方法较多,多数采用染色体步行技术^[16-18],但操作方法繁琐,且需要进行模板的酶切、环化等多个环节。热不对称交错 PCR (thermal asymmetric interlaced PCR, TAIL-PCR)是一种能够在较短的时间内获得已知序列侧翼 DNA 片断的方法^[19-21],为优化启动子克隆提供了有力手段。本研究根据紫茎泽兰 *hsp17.66* 和 *hsp90* 的 cDNA 序列,选用染色体步行和 TAIL-PCR 技术两种方法,分别克隆了两个 *hsp* 基因的启动子序列,并分析了其顺式作用元件,为紫茎泽兰 *hsp* 基因的调控机制研究奠定基础。

1 材料和方法

1.1 研究材料

紫茎泽兰(*Ageratina adenophora* Sprengel)种子采自云南省沧源县,种植于中国农业科学院蔬菜花卉研究所的日光温室,培养温度为 25℃,光暗周期为 16 h/8 h。

1.2 DNA 提取

选取温室培育的紫茎泽兰幼苗的新鲜叶片,用 CTAB 法提取其基因组 DNA^[22]。

1.3 染色体步行法克隆 *hsp90* 启动子

引物设计 根据 Clontech 公司 Genomewalker, Universal Kit (Catalog: K180721),设计合成寡核苷酸序列 JT1 和 JT2,用于基因上游调控区染色体步行接头的合成;根据 JT1,设计接头

扩增引物 AD1 和 AD2 (序列见表 1)。根据我们在 GenBank 中登陆的紫茎泽兰 *hsp90* 基因 cDNA 序列(EU269070),在其靠近 5' 端区设计两个反向引物 GSP1 和 NGSP1 (表 1)。

基因组总 DNA 的酶切 酶切反应体系为 50 μL,含有 10 × buffer 5 μL,基因组 DNA 2.5 μg,内切酶 *EcoR* V (或 *Dra* I, *Pvu* II, *Ssp* I) 2 μL,用 H₂O 定容。

接头的制备与连接 20 μmol/L 寡核苷酸 JT1 和 JT2 在 10 × PCR buffer (含 MgCl₂) 中建立如下退火体系:95℃ 变性 5 min,然后在室温下保持 1 h,转入 4℃ 保持 1 h,后保存于 -20℃ 备用。取 2 μL 酶切产物和 2.4 μL 制备的接头,加 0.8 μL 的 10 × ligation buffer 和 ligase 后用 H₂O 定容至 8 μL,于 16℃ 连接过夜,连接结束后,于 70℃ 水浴 5 min,终止连接反应,-20℃ 贮存备用。

PCR 反应 第一轮 PCR 扩增,体系总体积 20 μL,含有 10 × PCR buffer (含 MgCl₂) 2 μL,10 μmol/L 引物 AD1 2 μL,10 μmol/L 引物 GSP1 2 μL,10 mmol/L dNTPs 1 μL,DNA 酶切产物和接头的连接产物 5 μL,5 U μL⁻¹ *Taq* 酶 0.1 μL,H₂O 定容至 20 μL。扩增条件:94℃ 25 s,72℃ 4 min,7 个循环;94℃ 25 s,67℃ 4 min,32 个循环;67℃ 延伸 4 min。取 1 μL 第一轮 PCR 产物于 49 μL H₂O 中作为第二轮 PCR 的模板,20 μL 体系含有:10 × PCR buffer (含 MgCl₂) 2 μL,10 μmol/L 引物 AD2 2 μL,10 μmol/L 引物 NGSP1 2 μL,10 mmol/L dNTPs 1 μL,模板 1 μL,5 U μL⁻¹ *Taq* 酶 0.1 μL,用 H₂O 定容至 20 μL。扩增条件:94℃ 25 s,72℃ 4 min,5 个循环;94℃ 25 s,67℃ 4 min,22 个循环;67℃ 延伸 4 min。将 PCR 扩增得到的目的条带经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,纯化回收后连接到 pGEM-T (Promega, USA) 载体上,转化大肠杆菌 DH5α,后将鉴定为阳性的克隆交北京诺赛生物技术有限公司测序。

1.4 TAIL-PCR 克隆 *hsp17.66* 的启动子

引物设计与随机引物合成根据 GenBank 上的紫茎泽兰 *hsp17.66* 的 cDNA 序列(EU269067)设计特异引物 GSPA、GSPB、GSPC1、GSPC2、GSPC3。通过 RAPD 随机引物库筛选合成 TAIL-PCR 的 15 条随机引物^[23-24](表 1)。

表1 使用的引物

Table 1 Primers used in PCR

引物 Primer	序列 Sequence	长度 Size (bp)
JT1	GTAATACGACTCACTATAGGGCACGCGT-GGTCGACGGCCCCGGGCTGGT	49
JT2	PO4-ACCAGCCC-NH2	8
AD1	GT AATACGACTCACTATAGGGC	22
AD2	ACTATAGGGCACGCGTGGT	19
GSP1	CATCAGACGAGT TACTGATGAGTTTAC	27
NGSP1	GACTCAGCAACTGGTTGATCTCAGCTTG	28
GSPA	CCCTGTCGTCTTCAACCTCCAC	22
GSPB	CGGCCTTGAACACATGAGCTTC	22
GSPC1	GTTTCCTTCCAATCCACACGGG	23
GSPC2	TTGAAACGATGGATGAAGATGG	22
GSPC3	CACCGAATAAGCTTGGGACGAT	22
AP1	GGTGCTCCGT	10
AP2	CGATGAGCCC	10
AP3	CTATCGCCGC	10
AP4	CGCAGACCTC	10
AP5	ACGGTCCCTG	10
AP6	GTGTGCCCA	10
AP7	TGGTCACTGA	10
AP8	ACGGTACACT	10
AP9	GCAAGTAGCT	10
AP10	CGGCCCTGT	10
AP11	CACATGCTTC	10
AP12	TCACGATGCA	10
AP13	TCGTAGCCAC	10
AP14	TGCTGCAGGT	10
AP15	TCTCGATGCA	10

TAIL-PCR 反应 5个特异性巢式引物分别与每种随机引物组合进行 TAIL-PCR 扩增,反应体系及反应条件如下。

第一轮 PCR 扩增,体系总体积 20 μL ,含有 10 \times PCR buffer (含 MgCl_2) 2 μL ,20 $\mu\text{mol/L}$ 随机引物 AP 2 μL ,20 $\mu\text{mol/L}$ 引物 GSPA 0.2 μL ,50 $\mu\text{mol/L}$ dNTPs 1.6 μL ,20 ng μL^{-1} DNA 1 μL ,5 U μL^{-1} *Taq* 酶 0.5 μL , H_2O 定容至 20 μL 。扩增条件:93 $^\circ\text{C}$ 1 min;95 $^\circ\text{C}$ 1 min;94 $^\circ\text{C}$ 30 s,62 $^\circ\text{C}$ 1 min,72 $^\circ\text{C}$ 2.5 min,5个循环;94 $^\circ\text{C}$ 30 s;25 $^\circ\text{C}$ 3 min;72 $^\circ\text{C}$,3 min;72 $^\circ\text{C}$ 2.5 min;94 $^\circ\text{C}$ 10 s,68 $^\circ\text{C}$ 1 min,72 $^\circ\text{C}$ 2.5 min,2个循环;94 $^\circ\text{C}$ 10 s,29 $^\circ\text{C}$ 1 min,72 $^\circ\text{C}$ 2.5 min,15个循环;72 $^\circ\text{C}$ 延伸 5 min。取 1 μL 第一轮 PCR 产物于 49 μL H_2O 中稀释作为第二轮 PCR 的模板,20 μL 体系含有:10 \times PCR buffer (含 MgCl_2) 2 μL ,

20 $\mu\text{mol/L}$ 随机引物 AP 2 μL ,20 $\mu\text{mol/L}$ 引物 GSPB 0.2 μL ,50 $\mu\text{mol/L}$ dNTPs 0.4 μL ,5 U μL^{-1} *Taq* 酶 0.1 μL ,用 H_2O 定容至 20 μL 。扩增条件:94 $^\circ\text{C}$ 10 s,64 $^\circ\text{C}$ 1 min,72 $^\circ\text{C}$ 2.5 min,94 $^\circ\text{C}$ 10 s,64 $^\circ\text{C}$ 1 min,72 $^\circ\text{C}$ 2.5 min,94 $^\circ\text{C}$ 10 s,29 $^\circ\text{C}$ 1 min,72 $^\circ\text{C}$ 2.5 min,12个循环;72 $^\circ\text{C}$ 延伸 5 min。将第三轮 PCR 产物取 1 μL 到 9 μL H_2O 中稀释作为第二轮 PCR 的模板,25 μL 体系含有:10 \times PCR buffer (含 MgCl_2) 2.5 μL ,20 $\mu\text{mol/L}$ 随机引物 AP 0.2 μL ,20 $\mu\text{mol/L}$ 引物 GSPC1/C2/C3 0.2 μL ,50 $\mu\text{mol/L}$ dNTPs 1.6 μL ,5 U μL^{-1} *Taq* 酶 0.1 μL ,用 H_2O 定容至 25 μL 。扩增条件:94 $^\circ\text{C}$ 15 s,29 $^\circ\text{C}$ 30 s,72 $^\circ\text{C}$ 2 min,20个循环;72 $^\circ\text{C}$ 延伸 5 min。用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物大小,将第三轮 PCR 扩增得到的片段回收并测序。

2 结果和分析

2.1 *hsp90* 启动子克隆

两轮巢式 PCR 后,从紫茎泽兰的 *Dra* I 和 *Ssp* I 酶切体系中扩增到两条目的条带,后者扩增到的条带略大于 *Dra* I 酶切体系的扩增产物,约 900 bp (图 1)。回收凝胶后测序,分析确定该产物为启动子序列。

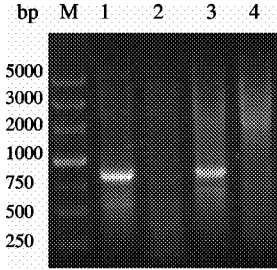


图 1 紫茎泽兰 *hsp90* 启动子克隆的第二轮 PCR 结果

Fig. 1 Map of the second round PCR for cloning *hsp90* promoter

- 1: *Dra* I Library; 2: *Pvu* II Library; 3: *Ssp* I Library;
- 4: *EcoR* V Library; M: DL2000 DNA plus ladder.

2.2 *hsp17.66* 启动子克隆

由于 C1、C2、C3 引物分别与距离 5' 端的起始密码子 ATG 距离为 143 bp、97 bp 和 6 bp,因此在第三轮 PCR 中与随机引物的扩增产物也应存在相应差异,推测特异条带大小应该是 C1 > C2 > C3。经过特异引物与 15 条随机引物的 TAIL-PCR,检测到 AP10 与 GSPC1、C2、C3 的 PCR 产物均有特异条带,并且存在大小差异(图 2),与预计结果相符。回收凝胶大小为 1 500 bp 左右的特异片段后测序,分析确定该产物为启动子序列。

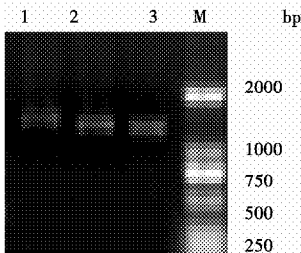


图 2 用 TAIL-PCR 克隆紫茎泽兰 *hsp17.66* 启动子的第三轮 PCR 结果

Fig. 2 Map of the third round PCR of *hsp17.66* promoter cloned by TAIL-PCR

- 1: AP10-C1; 2: AP10-C2; 3: AP10-C3; M: DL2000 DNA ladder.

2.3 *hsp90* 和 *hsp17.66* 启动子序列的分析

测序结果表明,获得的 *hsp90* 启动子序列长度为 864 bp,含有基因编码序列 55 bp,实际获得的启动子区域长度为 809 bp;TAIL-PCR 获得的 *hsp17.66*

启动子序列为 1 485 bp,包含基因编码序列 28 bp,实际获得启动子区域长度为 1 457 bp。

序列经启动子分析软件 PlantCARE (<http://intra.psib.ugent.be:8080/PlantCARE>) 分析,扩增得到的 *hsp90* 和 *hsp17.66* 启动子序列中均存在多种类型的顺式作用元件,如 TATA-box,其中包括许多转录因子结合的顺式调控序列(图 3 和 4),进一步证实该序列位于各自基因的启动子区域。

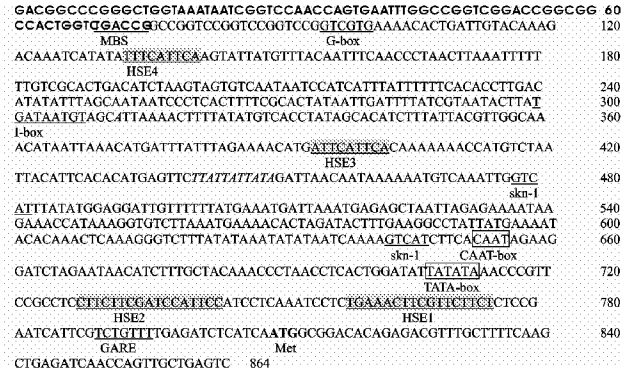


图 3 紫茎泽兰 *hsp90* 启动子序列

Fig. 3 The promoter sequence of *A. adenophora hsp90*

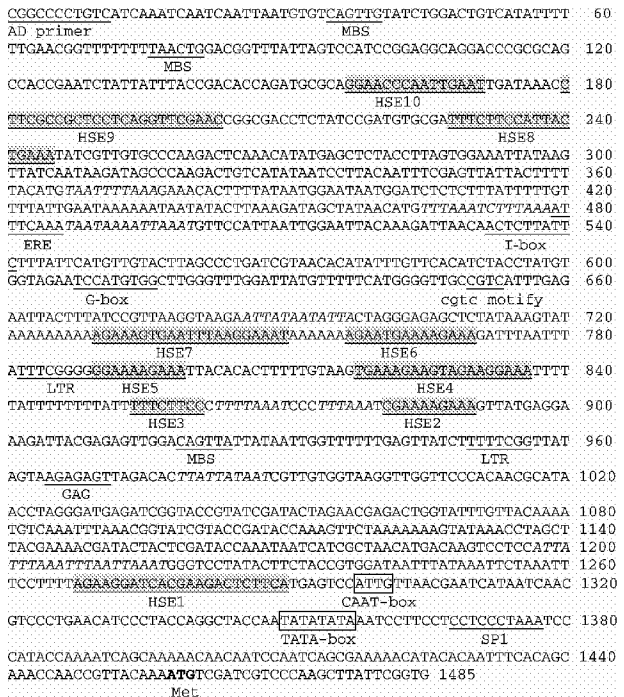


图 4 紫茎泽兰 *hsp17.66* 启动子序列

Fig. 4 The promoter sequence of *A. adenophora hsp17.66*

分析 *hsp90* 启动子序列,转录起始位点位于起始密码子 ATG 上游 -7,保守的 TATA-box 位于 -101,CAAT-box 位于 -158 处。TATA-box 近端的 1 个 AT-rich 区位于 -189、其它的 AT-rich 区分别在

-369、-498、-519、-639。*hsp90* 启动子包括 46 个 HSE,其核心序列为 5'-nGAAn-3'或其反向互补序列。最近端的 HSE1 (TTTCATTCA)位于-51;HSE2 (A TTCA TTCA)位于-82;远端的 HSE3(C TTCTTCGA-TCCATTCC)、HSE4 (TGAAACTTCGTTCTTCT)位于-416~-677。此外,还有许多与光效应有关的元件(如 I-box、ACE、G-box、GARE motif)以及干旱等其它胁迫相关的元件(如 MYB 的 MBS 元件、GARE 元件)。该启动子的 GenBank 登录号为 FJ434253。

hsp17.66 启动子序列中保守的 TATA-box 位于起始密码子 ATG 上游-108,TATA-box 近端的 1 个 AT-rich 区分别位于-212、其它的 AT-rich 区分布在-261、-479、-536、-595、-747、-974、-993、-1030 和-1091。*hsp17.66* 启动子区包括 10 个 HSEs,最近端的 HSE1 (AGAAGGATCACGAAGACTCTTCA)位于-190;最集中的区域在-577~-728,共有 6 个热激元件,分别是 HSE2 (GAAAAGAAA),位于-577;HSE3 (TTTCTTCC),位于-604;HSE4 (TGAAAGAAGTAGAAGG),位于-640;HSE5 (GGAAAAGAA),位于-668;HSE6 (AGAATGAAAAGAAA),位于-701;HSE7 (GAAA GTGAATTTAAGGAAA),位于-728;其中 HSE5 和 HSE6 是完美的结构;最远端还有 3 个热激元件,分别是 HSE8 (T TTCTTCCATTACT GAAA),位于-1230;HSE9 (CTTCGCGCTCCTCAGGTTT GAAC),位于-1278;HSE10 (GGAACCCAATTGAAT),位于-1301。此外,还有许多与光效应有关的元件(I-box、G-box、MBS)、低温的应答元件、乙烯转录因子的结合区,该启动子 GenBank 的登录号为 FJ434252。

3 讨论

基于 PCR 的染色体步行方法进行启动子克隆,可有效地得到已知序列的 5'侧翼序列。本研究利用巢式特异引物,经过两轮 PCR 获得紫茎泽兰 *hsp90* 约 900 bp 的启动子序列。但是受到选择合适的酶切位点和运用不同接头的局限,选择的酶切位点决定了扩增序列的长短,很难得到较为完整的区域,扩增产物多数小于 1 000 bp,对启动子的研究还存在一定的局限性。因此本研究采用 TAIL-PCR 的方法克隆紫茎泽兰 *hsp17.66* 启动子,简化操作过程,提高扩增效率,并得到了较长的启动子序列。

TAIL-PCR 通过 3 个嵌套的特异性引物分别和

简并引物组合进行连续的 PCR 循环,利用不同的退火温度选择性地扩增目标片段,此方法不需要 PCR 前的酶切等操作且特异性高,但随机简并引物结合位点有限,对于不同的侧翼序列,需要使用一定数量的随机引物进行筛选,以保证目的序列的有效扩增。本研究没有采用常用的根据高等植物保守氨基酸设计简并引物的方法,而是直接采用 RAPD 所用的 10 bp 的随机引物,通过筛选分析合成 15 个随机引物进行 TAIL-PCR^[23,25],提高了随机引物与模板的有效结合几率。此外,常用的 TAIL-PCR 是运用 3 个巢式 PCR 特异引物和随机引物结合,用来提高扩增产物的特异性^[19,26],但是第一轮 PCR 产生的非特异性产物较多,虽然第二轮非特异性会降低,第三轮 PCR 产物仍很难确定特异产物条带。因此,我们设计了 5 个巢式特异引物进行 TAIL-PCR,其中 3 个特异引物用于第三轮 PCR,较常规仅使用一条引物的方法,较大提高了第三轮反应的扩增成功率。不用检测第一轮和第二轮的 PCR 产物,直接可以从第三轮 PCR 产物的大小判断特异产物条带,避免了非特异条带的干扰,能够更准确地获得目的条带。实验证明,通过改变随机引物与引物组合方法,既可以有效地扩增到较完整的侧翼序列,又可以提高产物特异性,因此选用 TAIL-PCR 进行启动子克隆是有效的方法,但是此方法 TAIL-PCR 反应需要较多的引物组合,需要选择相当数量的随机引物。目前通过改进这两种方法,如 self-formed adaptor PCR (SEFA PCR)和结合抑制 PCR 的 hi TAIL-PCR^[27-28],可以快速、有效地克隆基因组中较长的未知序列。

本研究克隆了紫茎泽兰 *hsp90* 和 *hsp17.66* 基因的启动子序列,分析表明其除具有保守的 TATA-box 及 CAAT-box 外,还具有典型的 HSE 元件。热激蛋白基因的转录活性依赖于热激因子 HSF 与高度保守的热激元件 HSE 的相互作用。HSF 与 HSE 的稳定结合至少需要两个五核苷酸核心(nGAAn)重复,单个 nGAAn 无法稳定结合 HSF^[29]。在紫茎泽兰 *hsp90* 和 *hsp17.66* 启动子中存在 2 个以上的 nGAAn 重复,尤其是 *hsp17.66* 启动子有 10 个重复,因而在响应温度等胁迫时可以快速地与 HSF 结合,激活 *hsp* 基因的表达,实验也表明 *hsp17.66* 可以快速响应高温,而且持续时间长达 4 h(未发表数据)。这两个启动子序列中也存在很多 AT-rich 区,分别集中于-369 至-639,-261 至-1091,AT-rich

元件在许多植物基因的量化表达中起重要作用,因此这些 AT-rich 区可能对该基因的表达具有增强作用^[30],类似的 AT-rich 区在番茄 (*Lycopersicon esculentum*) *shsp* 启动子也被发现^[31]。除了 HSE、AT-rich、TATA-box、GAAT-box 外,*hsp90* 启动子中还存在与生长发育调控相关的作用元件如 *skn-1*。植物 HSP 的表达还受特定的发育阶段所调控,如小麦 (*Triticum aestivum*) 胚的发育依赖的 HSP 和向日葵 (*Helianthus annuus*) 中只受发育调节而不受热诱导的 *HaHsp17.6G1*^[32-33],受发育调节的 HSP 可能与种子耐脱水性、胚发育、耐热性、寿命形成及维持都有密切关系。紫茎泽兰 *hsp90* 和 *hsp17.66* 启动子中还存在许多光反应元件如 *sp1*、G-box、I-box、box II,植物在温度逆境条件下,线粒体和叶绿体等细胞器受到严重破坏,许多功能性蛋白发生不可逆的错误折叠和聚集,不能正常地进行光合作用,此时诱导表达的 HSP 可以发挥其分子伴侣的功能,修复或清除损伤蛋白、保护呼吸电子传递系统,有研究表明叶绿体 sHSP 在高温下可减轻对光合作用的光抑制,对光系统有保护作用^[34]。

此外 *hsp17.66* 的启动子具有乙烯应答元件 (ERE)、低温应答元件 (LTR) 和 G-box 结构,其中 G-box 是常存在于脱落酸 (ABA) 应答元件中的反式作用因子,*shsp* 启动子受热激、低温以及外源 ABA 的诱导^[11,15,31,35-37],可以推测紫茎泽兰 *hsp17.66* 的启动子在低温和外源 ABA 应答过程中起重要作用。

温度逆境影响植物正常的生长发育,植物通过调节自身相应的机制来适应外界的逆境。热激蛋白有助于提高植物抗逆性,HSP 在植物中普遍存在而且含量丰富,除高温诱导外,还受低温胁迫、重金属、UV 射线等诱导^[11,37]。在这些胁迫下,*hsp* 基因的表达主要由启动子中的热激转录元件 (HSE) 调控^[10,29]。这些顺式作用元件在 *hsp* 基因表达中的作用不断被认识,不同的 HSE 重复序列和特异序列对于 *hsp* 基因在不同胁迫环境下的诱导表达至关重要^[38-39]。基于这两类启动子的元件推测和分析,可以进一步构建 5' 缺失的 *hsp90* 和 *hsp17.66* 启动子与 *gus* 基因的融合载体,更深入研究紫茎泽兰 *hsp* 基因启动子的功能序列,利于揭示紫茎泽兰对环境条件的应答机理。

参考文献

[1] Wan F H (万方浩), Zheng X B (郑小波), Guo J Y (郭建英). Biology and Management of Invasive Alien Species in Agriculture and

- Forestry [M]. Beijing: Science Press, 2005: 651-661. (in Chinese)
- [2] Su X H (苏秀红), Qiang S (强胜), Song X L (宋小玲). Comparison of *Eupatorium adenophorum* heat tolerances of different geographical populations [J]. Acta Bot Boreal-Occid Sin (西北植物学报), 2005, 25(9): 1766-1771. (in Chinese)
- [3] Vierling E. Roles of heat shock proteins in plants [J]. Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 1991, 42: 579-620.
- [4] Rutherford S L, Lindquist S. Hsp90 as a capacitor for morphological evolution [J]. Nature, 1998, 396: 336-342.
- [5] Queitsch C, Sangster T A, Lindquist S. Hsp90 as a capacitor of phenotypic variation [J]. Nature, 2002, 417: 618-624.
- [6] Sangster T A, Queitsch C. The HSP90 chaperone complex, an emerging force in plant development and phenotypic plasticity [J]. Curr Opin Plant Biol, 2005, 8: 86-92.
- [7] Schoffl F, Rieping M, Baumann G, et al. The function of plant heat shock promoter elements in the regulated expression of chimaeric genes in transgenic tobacco [J]. Mol Gen Genet, 1989, 217: 246-253.
- [8] Ainley W M, Key J L. Development of a heat shock inducible expression cassette for plants: Characterization of parameters for its use in transient expression assays [J]. Plant Mol Biol, 1990, 14: 949-967.
- [9] Vierling E, Kimpel J A. Plant responses to environmental stress [J]. Curr Opin Biotechnol, 1992, 3: 164-170.
- [10] Nover L, Bharti K, Doring P, et al. *Arabidopsis* and the heat stress transcription factor World: How many heat stress transcription factors do we need? [J] Cell Stress Chaperones, 2001, 6: 177-189.
- [11] Sun W, van Montagu M, Verbruggen N. Small heat shock proteins and stress tolerance in plants [J]. Biochim Biophys Acta, 2002, 1577: 1-9.
- [12] Huang X F (黄祥富), Huang S Z (黄上志), Fu J R (傅家瑞). Regulation of expression and functions of the heat shock proteins of plant [J]. Chin Bull Bot (植物学通报), 1999, 16(5): 530-536. (in Chinese)
- [13] Chen S C, Liu H W, Lee K T, et al. High-efficiency *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of heat inducible *sHSP18.2-GUS* in *Nicotiana tabacum* [J]. Plant Cell Rep, 2007, 26: 29-37.
- [14] Saidi Y, Andrija F, Mickhail C, et al. Controlled expression of recombinant proteins in *Physcomitrella patens* by a conditional heat-shock promoter: A tool for plant research and biotechnology [J]. Plant Mol Biol, 2005, 59: 697-711.
- [15] Sun A Q, Yi S Y, Yang J Y, et al. Identification and characterization of a heat-inducible *fisH* gene from tomato (*Lycopersicon esculentum* Mill) [J]. Plant Sci, 2006, 170: 551-562.
- [16] Guo H, Xiong J. A specific and versatile genome walking technique [J]. Gene, 2006, 381: 18-23.
- [17] Reddy P S, Mahanty S, Kaul T, et al. A high-throughput genome-walking method and its use for cloning unknown flanking sequences [J]. Anal Biochem, 2008, 381(2): 248-253.
- [18] Ren M, Chen Q, Li L, et al. Successive chromosome walking by compatible ends ligation inverse PCR [J]. Mol Biotechnol, 2005, 30(2): 95-102.

- [19] 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: 674-681.
- [20] Luo L J(罗丽娟), Shi J S(施季森). TAIL-PCR: A simple and efficient method to isolate DNA segments adjacent to known sequence [J]. *J Nanjing For Univ (Nat Sci)*(南京林业大学学报:自然科学版), 2003, 27(4): 87-90.(in Chinese)
- [21] Liu Y G, Chen Y, Zhang Q. Amplification of genomic sequences flanking T-DNA insertions by thermal asymmetric interlaced polymerase chain reaction [J]. *Methods Mol Biol*, 2005, 286: 341-348.
- [22] Liu X J(刘晓净), Wang H Y(王海燕), Zhang G L(张根良), et al. Improved CTAB method for extraction of genome DNA from *Alpinia oxyphylla* Miq [J]. *Acta Agri Jiangxi*(江西农业学报), 2007, 19(8): 111-114.(in Chinese)
- [23] Williams J G, Kubelik A R, Livak K J, et al. DNA polymorphisms amplified by arbitrary primers are useful as genetic markers [J]. *Nucleic Acids Res*, 1990, 18: 6531-6535.
- [24] Elkoum K, Aradaib I, El-Sanousi S. PCR-based randomly amplified polymorphic DNA (RAPD) finger printing for detection of genetic diversity among Sudanese isolates of *Haemophilus somnus* [J]. *Veterinarski Arhiv*, 2003, 73 (6): 315-321.
- [25] Terauchi R, Kahl G. Rapid isolation of promoter sequences by TAIL-PCR: The 5' flanking regions of *Pal* and *Pgi* genes from yams (*Dioscorea*) [J]. *Mol Gen Gene*, 2000, 263: 554-560.
- [26] Liu Y G, Mitsukawa N, Oosumi T, et al. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR [J]. *Plant J*, 1995, 8: 457-463.
- [27] Liu Y G, Chen Y. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences [J]. *Biotechniques*, 2007, 43(5): 649-650, 652, 654.
- [28] Wang S M, He J, Cui Z L, et al. Self-formed adaptor PCR: A simple and efficient method for chromosome walking [J]. *Appl Environ Microbiol*, 2007, 73(15): 5048-5051.
- [29] Amin J, Ananthan J, Voellmy R. Key features of heat-shock regulatory element [J]. *Mol Cell Biol*, 1988, 8(9): 3761-3769.
- [30] Baumann G, Raschke E, Bevan M, et al. Functional analysis of sequences required for transcriptional activation of a soybean heat shock gene in transgenic tobacco plants [J]. *EMBO*, 1987, 6(5): 1161-1166.
- [31] Yi S Y(伊淑莹), Sun A Q(孙爱清), Zhao C M(赵春梅), et al. Cloning and functional analysis of a multiple stress-inducible *LeMTshsp* promoter from tomato (*Lycopersicon esculentum*) [J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), 2007, 29(2): 223-230.(in Chinese)
- [32] Helm K W, Abernathy R H. Heat shock proteins and their mRNAs in dry and early imbibing embryos of wheat [J]. *Plant Physiol*, 1990, 93: 1626-1633.
- [33] Carranco R, Almoguera C, Jordano J. A plant small heat shock protein gene expressed during zygotic embryogenesis but noninducible by heat stress [J]. *J Biol Chem*, 1997, 272: 27470-27475.
- [34] Heckathorn S A, Downs C A, Sharkey T D, et al. The small, methionine-rich chloroplast heat-shock protein protects photosystem II electron transport during heat stress [J]. *Plant Physiol*, 1998, 116: 439-444.
- [35] Coca M A, Almoguera C, Thomas T L, et al. Differential regulation of small heat-shock genes in plants: Analysis of water-stress-inducible and developmentally activated sunflower promoter [J]. *Plant Mol Biol*, 1996, 31: 863-876.
- [36] Liu J, Shono M. Molecular cloning the gene of small heat shock protein in the mitochondria and endoplasmic reticulum of tomato [J]. *Acta Bot Sin*, 2001, 43(2): 138-145.
- [37] Marta B, Garcia A, Cubas P, et al. Distinct heat-shock element arrangements that mediate the heat shock, but not the late-embryogenesis induction of small heat-shock proteins, correlate with promoter activation in root-knot nematode feeding cells [J]. *Plant Mol Biol*, 2008, 66: 151-164.
- [38] Almoguera C, Prieto-Dapena P, Jordano J. Dual regulation of a heat shock promoter during embryogenesis: Stage-dependent role of heat shock elements [J]. *Plant J*, 1998, 13: 437-446.
- [39] Almoguera C, Rojas A, Diaz-Martin J, et al. A seed-specific heat-shock transcription factor involved in developmental regulation during embryogenesis in sunflower [J]. *J Biol Chem*, 2002, 277: 43866-43872.