

# 水稻蛋白激酶基因启动子 OsSRLp 的分离及特性分析

王庆国<sup>1</sup> 王莹莹<sup>1</sup> 李臻<sup>1</sup> 潘教文<sup>1</sup> 王一帆<sup>1</sup> 李颖秀<sup>1,2</sup> 刘炜<sup>1,2,\*</sup>

(<sup>1</sup>山东省农业科学院 生物技术研究中心/山东省作物遗传改良与生理生态重点实验室, 济南 250100; <sup>2</sup>山东师范大学 生命科学院, 济南 250100;

\*通讯联系人, E-mail: wheiliu@163.com)

## Isolation and Characteristic Analysis of Protein Kinase Promoter OsSRLp from Rice

WANG Qingguo<sup>1</sup>, WANG Yingying<sup>1</sup>, LI Zhen<sup>1</sup>, PAN Jiaowen<sup>1</sup>, WANG Yifan<sup>1</sup>, LI Yingxiu<sup>1,2</sup>, LIU Wei<sup>1,2,\*</sup>

(<sup>1</sup>Biotechnology Research Center, Shandong Academy of Agricultural Sciences /Shandong Provincial Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Ecology and Physiology, Jinan 250100, China; <sup>2</sup>College of Life Sciences, Shandong Normal University, Jinan 250014, China; \*Corresponding author, E-mail: wheiliu@163.com)

**Abstract:** 【Objective】To study the construction and function of *OsSRL*, a type I casein kinase, 【Method】*OsSRL* and about 1600 bp up-stream of the gene named as OsSRLp were isolated using genomic DNA of rice Zhonghua 11. The regulatory elements of OsSRLp were analyzed using online software of PLACE, and the results showed that several key cis-elements which associated with reproductive process, signal and stress response were included. 【Results】The expression pattern analysis showed that *OsSRL* was constitutively expressed in different tissues of rice. The fusion expression vector of OsSRLp and GUS was constructed, and the vector was transformed into rice callus. After positive transgenic lines were obtained, the GUS activities were further detected, and the results showed that relative higher level expression was detected in spikelet, root and stem, as well as low expression levels in other rice tissues. The results indicated that OsSRLp possess constitutive activities with slightly variations in different rice tissues. 【Conclusion】Combined with the characteristic elements and their potential functions of OsSRLp, the results implied that *OsSRL* and its promoter OsSRLp could participate in and regulate the development and reproduction progresses of plants.

Key words: rice; promoter OsSRLp; expression pattern; GUS activity; development and reproduction

**摘 要:** 【目的】为研究水稻中 I 型酪蛋白激酶基因 *OsSRL* 启动子的结构及功能, 【方法】以水稻中花 11 基因组 DNA 为模板, 经 PCR 扩增获得基因上游约 1600 bp 序列, 命名为启动子 OsSRLp。应用 PLACE 在线软件, 分析序列中的顺式作用元件, 同时构建含有 GUS 报告基因的植物表达载体, 转化水稻。【结果】*OsSRL* 为组成型表达, OsSRLp 含有调控生殖发育、激素应答及逆境响应等多种顺式作用元件。OsSRLp 驱动的 GUS 报告基因在根、茎中均有所表达, 在小穗中表达丰度较高, 而在其他组织中表达丰度较低。【结论】OsSRLp 为组成型启动子, 其下游调控基因 *OsSRL* 可能参与水稻发育及生殖过程。

**关键词:** 水稻; 启动子 OsSRLp; 表达特性; GUS 活性; 发育及生殖

中图分类号: Q755; S511.01

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2018)04-0335-07

水稻主要通过根系吸收水分和养分, 以满足自身生长发育、新陈代谢等生理活动和蒸腾作用的需要, 根系的发生及发育在其生长发育中具有重要作用。前期研究中, 我们在水稻突变体库中筛选到一个根系发育相关突变体, 其初生根及不定根发育迟缓, 根部长度短于对照。通过构建遗传群体并进行基因定位, 克隆了位于水稻第 10 染色体上编码 I

型酪蛋白激酶的基因(*Os10g0476300*), 并将该基因命名为 *OsSRL*(*Short Root Length*)。已知 I 型酪蛋白激酶在真核生物中广泛存在, 可参与多种细胞功能及发育过程的调节<sup>[1-3]</sup>。近年来, 对 I 型酪蛋白激酶功能的研究表明, 该蛋白主要通过磷酸化作用, 在水稻开花及穗发育、根部发育、植物胞间大分子运输、激素响应等生物过程中发挥作用<sup>[4-5]</sup>。

收稿日期: 2017-10-26; 修改稿收到日期: 2017-12-28。

基金项目: 山东省自然科学基金面上项目(2016ZRC02178); 山东省自然科学基金资助项目(ZR2014CQ024); 山东省农业科学院青年英才计划资助项目(2016-2018); 山东省农业科学院重大科技成果培育计划资助项目(2015CGPY10); 国家重点研发计划资助项目(2016YFD0100903)。

启动子对其下游基因在植物特定组织、发育阶段以及不同环境下的表达具有重要的调控作用。以往的研究已经从植物病毒和植物中分别分离到组成型启动子、组织专一性启动子及诱导型启动子<sup>[6]</sup>。其中,花椰菜花叶病毒(CaMV) 35S 启动子、肌动蛋白(Actin)启动子和泛素(Ubiquitin)启动子等,具有调控下游基因长期、稳定、高效表达的特点,在研究中也得到广泛应用<sup>[7]</sup>。启动子的克隆和关键顺式作用元件鉴定对研究基因表达调控具有重要意义,也可为进一步解析基因功能提供线索<sup>[8-9]</sup>。本研究参照数据库中水稻基因组序列,获得了 *OsSRL* 基因上游约 1600 bp 的调控序列作为基因启动子区。应用生物信息学的方法,对其中关键顺式作用元件进行分析、归类,并构建含有 GUS 报告基因的启动子表达载体转化水稻,经抗性筛选获得转基因株系。通过对水稻各组织进行 GUS 染色分析,对启动子的表达调控及基因的表达模式进行分析、鉴定,旨在对解析启动子的作用及表达调控规律,深入研究其下游基因的表达特性及生物学功能提供参考。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及试剂

以水稻品种中花 11 为试验材料,种子经水培萌发后,置于人工气候箱中,在(28±1)℃、12 h 光照/12 h 黑暗光周期下生长;采集生长至两周的幼苗,经液氮速冻后于-70℃下保存,用于之后水稻基因组 DNA 的提取。在水稻营养生长及生殖生长的不同阶段分别对各组织进行取样,选取成熟的水稻种子,水稻幼苗期的根、幼叶,营养生长期的茎、叶片、叶鞘和灌浆期的小穗于-70℃下保存,用于之后各组织 RNA 的提取及反转录。

植物双元表达载体 pCAMBIA1300+pBI101、根癌农杆菌 LBA4404 均由本实验室保存。各种限制性内切酶、*Taq* DNA 聚合酶、*T<sub>4</sub>* DNA 连接酶、反转录试剂盒等均购自 TaKaRa 公司;DNA 标记、质粒小提试剂盒、胶回收试剂盒均为 Transgen 公司产品(购自山东济南雨同生物科技有限公司);其余试

剂为进口或国产分析纯。引物由上海英潍捷基公司合成,序列测定由山东省农业科学院生物技术研究中心测序室完成。

### 1.2 基因 *OsSRL* 的表达模式分析

分别对保存于-70℃下的水稻材料,包括成熟种子、幼根、幼苗、茎、叶片、叶鞘和灌浆期的小穗提取 RNA,之后各样品分别取 4 μg 进行反转录。反转录后的单链 cDNA 经分装后,于-20℃下保存备用。参照 *OsSRL* 序列,以引物 *OsSRL*-RT1(5'-CAGGGAGAACAAGAATCTGAC-3') 及引物 *OsSRL*-RT2(5'-CTTATTGGTAGAACCCATCTG-3') 进行 RT-PCR;以水稻 *Actin* 为内标,引物为 *OsActin1*(5'-GAAGTGGTATGGTCAAGGCTG-3') 及 *OsActin2*(5'-ACACGGAGCTCGTTGTAGAAG-3')。经对反转录产物定量后,以定量的第一链 cDNA 为模板进行 PCR,体系 30 μL,94℃下 5 min,之后 94℃下 30 s、56℃下 30 s、72℃下 1 min 共 35 个循环,72℃下延伸 10 min。检测不同组织中 *OsSRL* 基因表达情况。基因在各组织中的相对表达量进一步应用 Image J 1.45S 进行量化分析。

### 1.3 基因 *OsSRL* 启动子区的分离

已知基因 *OsSRL* 定位于水稻第 10 染色体上。利用基因序列在 NCBI 数据库(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)进行 BLASTN 检索,在基因序列上游选取约 1600 bp 片段设计特异性引物 *OsSRLp*-1(5'-AAGCCATACCTCCAAACACACC-3') 和引物 *OsSRLp*-2(5'-GTAAAACGCGCAATATCAAAGC-3'),以水稻中花 11 基因组 DNA 为模板,经 PCR 扩增,获得启动子 *OsSRLp* 片段。PCR 程序如下:95℃下 5 min、之后 4℃下 3 min、进一步经 94℃下 45 s、58℃下 45 s、72℃下 3 min,共 35 个循环,最后 72℃下 15 min。进一步应用 PLACE 软件(<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>)对其中的转录调控元件进行分析。

### 1.4 *OsSRLp* 表达载体的构建及水稻遗传转化

将经 PCR 获得的启动子 *OsSRLp* 片段正向与经 *Sma* I 酶切的质粒载体 pCAMBIA1300+pBI101 连接,获得重组质粒 p*OsSRLp*(图 1)。

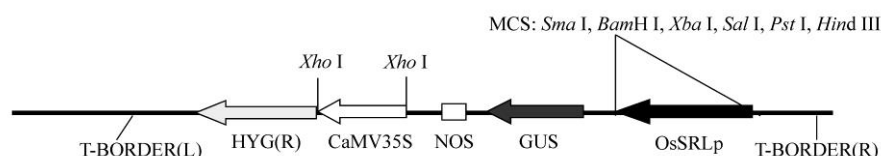


图 1 植物双元表达载体 p*OsSRLp* 的 T-DNA 区结构

Fig. 1. Structure of T-DNA region of binary vector of p*OsSRLp*.

将测序正确的植物表达载体 pOsSRLp 经液氮冻融法<sup>[10]</sup>导入根癌农杆菌菌株 LBA4404 感受态细胞中,进一步转化水稻愈伤组织,经潮霉素抗性筛选,获得转基因阳性株系。

### 1.5 DNA 提取及转基因植株的 PCR 检测

取经潮霉素抗性筛选获得的再生水稻植株幼叶叶片,参照 CTAB 法<sup>[11]</sup>提取基因组 DNA,取 2  $\mu$ L DNA 样品进行琼脂糖凝胶电泳,检测浓度及纯度。

应用启动子 OsSRLp 上游引物 OsSRLp-1 及 GUS 报告基因的下游引物 5'-AGACTTCGCGCTGATACCAG-3'进行 PCR 扩增,检测、鉴定 T<sub>0</sub> 代转基因阳性株系。收获的种子经 40 mg/L 潮霉素抗性筛选,获得 T<sub>1</sub> 代阳性株系。以 T<sub>1</sub> 代阳性植株为材料,对所收获的 T<sub>2</sub> 阳性植株的种子进行 GUS 组织化学染色,分析启动子的表达调控模式。

### 1.6 GUS 组织化学染色

GUS 染色参照 Jefferson<sup>[12]</sup>的方法进行。分别对水稻萌发期的胚根、胚芽、茎、幼穗及灌浆成熟期的种子等材料进行染色分析。将各材料置于 37℃ 下 GUS 染液中染色过夜,之后用 75% 的乙醇脱色至阴性对照为白色,样品于体视显微镜(LEICA S-系列)下观察染色结果,照相并记录。

## 2 结果与分析

### 2.1 基因 *OsSRL* 启动子区的分离

以中花 11 基因组 DNA 为模板,经特异引物的 PCR 扩增,获得启动子区片段 OsSRLp(图 2)。

### 2.2 基因 *OsSRL* 在水稻各组织中的表达模式

利用 RT-PCR 的方法分析基因 *OsSRL* 的表达模

```

OsSRLp-1
1  AAGCCATACCTCCAAACACACC TTTAAGAGCAAGGATAATAGTGAGCTAT
51  AAGCCAACCATAAACTTATTATGTGAAAAAGAAAGATAAAGAAAAAATG
101 AAGCGCTAACTCTTATGCAAAAGCTAGCTCTACATATGCCCTAAATATAT
151 GTATTAAGTTCATAGTGAGAGAAAGAGAGGGAAAAATAGAATAACCTT
201 AACTAGTAACCTACTCCCTCTGTCCACTCGCTAAGACGCGGTCAAATTT
251 CGCATAGTCTTCAAACTAATCTTTTACTTTAAATTTCTCACATACTACA
301 ATGTTTCATAGCAACAAAATCGCAATCATATGAAAATAAATATAATAATA
351 ATCCAATGACATTATCTTTATCCCAAGAAAAATAATTTATAATAAACTAT
401 TTATTGGTCAAATATTTAAATAGTTAAATTTTAAATATGTGCGCATCTT
451 AATGAATAGGACAGAAAGGAGCATTATACATGTTAGCTCTAATACGAGCTT
501 ACCGTTATAGCCAGTACTCACCTCCGTTTCTAAATATTAAGAATCTAAGAT
551 ATCGGATGAGGCATTTCTGTCCAGATTCATAGCAAGAAATTTTATCC
601 TACCATATATTCTTATATTTTGGAACTGAAACAGATGGATTCTTATCTC
651 CCTCCATCTACTTTTGATAGTCATATTTTCTGACACACAGACCAAGG
701 ATAAGTGATTCTACTTATCATCCATTTATATATGCTACTAGTTATTCCTC
751 GTAAACAAACGATTCAATTAATATTTACATTTCTCGATGCCCATGTAGCTA
801 ATCTTGTTGGAAGAATGGAGAGACACGCATTAAATACAAGAAAGCTATT
851 AAGATGATAAGTTGTTAGATTGAAATATGCCTATCAAAAATAAATTTTTC
901 AGATTTGAAAATATGACTATCAAAAGTAGATGGAGGGAGTATTTTGAAC
951 GGATGGAGCACTAGTTTAGCTCGATCTTATTAACCGGTTTCTCGGGGAC
1001 CTAAGACTAAAAAACTTCCACCACGCCACCAACCACCATGCCTCCC
1051 TTCCCTTCCCTTCCCTTGGAAACCACCAACGCATGCGAACGCCCGCGC
1101 CGCGCGCGCCCTCCCTCCCAACCATTCCTTCTCGCCGCTCCCTCCGCAA
1151 CCCACCAACCTTCTCTCCCTTCCCGGTTGAGGCGCGGCGTCGATG
1201 CGATCCTGCCGCGGCATCGCATCCGCTGCGTAGCTCGGCGGCGGGGGGT
1251 GCGCGGACTTCTTCTCTTTCTTTTCTTTTCTTCTGGCTTAGCTCCGATC
1301 CTGCGCTGATTGATCATCCTCCGGTAGGTTCTGTATCTTGTAGAGGAAG
1351 ATGATGATTTGGGATTTTTTTTGTGTTTTTTTTCATGTTGATTTTGCAGA
1401 TTTCGGTGGCTTTTTTTTGTGCTGGTGTCTGCTCGACCATGCTGGCA
1451 GGTTCCTCATCTAAGAGGTGATGCTGCTTCAGCAATTGGCAGCTAGCTA
1501 ACTCTTTAGACCAAAGAAGATTCTGTGGTTATATGCAACAGAGAAGCG

OsSRLp-2
1551 CATTCTT GCTTTGATATTGCGGTTTTAC CGGGTCGGCAGCGATCAGGGT
1601 GTGGTGACCA
  
```

示分离启动子区的 PCR 引物 OsSRLp-1 和 OsSRLp-2 的核苷酸序列。

The nucleotide sequences of primers OsSRLp-1 and OsSRLp-2.

图 2 启动子 OsSRLp 的 DNA 序列

Fig. 2. DNA sequence of promoter OsSRLp.

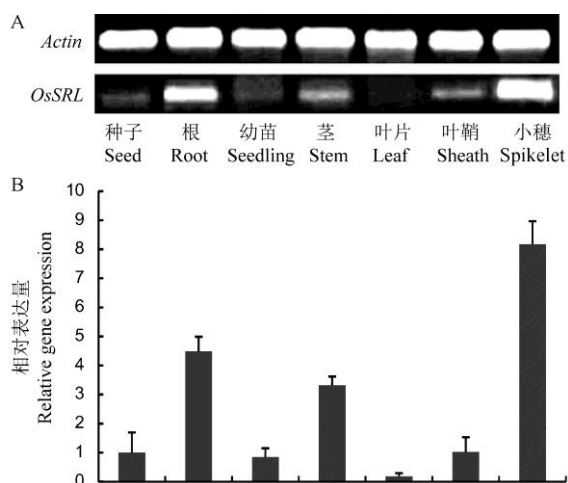


图3 *OsSRL* 表达模式及其在组织中的相对转录水平  
Fig. 3. The expression patterns of *OsSRL* and its relative transcription levels in different rice tissues.

式(图3),发现 *OsSRL* 在水稻成熟种子、幼苗期的根、幼叶、营养生长期的根、茎、叶、叶鞘和灌浆期的小穗中都有转录,且在根、茎及小穗中表达较强,在收获后的成熟种子及营养生长期的叶鞘中也有表达,但在营养生长期的叶中表达较弱,整体表现为组成型表达(图3-A)。基因在各组织中相对表达量分析显示,其在水稻灌浆期的小穗中表达量较高,比收获的成熟种子中基因的表达量高出近10倍;在根及茎中的表达量也较高,是收获的成熟种子中基因表达量的近5倍,在其他各组织中的表达则相对较弱(图3-B)。

### 2.3 启动子 *OsSRLp* 中顺式作用元件分析

应用 PLACE 数据库,对启动子 *OsSRLp* 中所包含的调控元件进行分析、检索,获得了部分已知功能的顺式作用元件,其中包含基因上游的一个 TATA 盒,即 RNA 聚合酶结合位点之一,此元件的存在可保证基因转录的精确起始;基因上游还存在多个 CAAT 盒,可对基因转录频率进行调控。此外,在 *OsSRLp* 中还存在多种与植物生殖发育、激素及环境响应相关的调控元件(表1)。

这些调控元件中,主要包括参与种子及贮藏蛋白相关生物学过程的 CANBNNAPA 元件、EBOXBNNAPA 元件以及 DOFCOREZM 元件,其中 DOFCOREZM 元件序列为 AAAG,在 *OsSRLp* 中出现8次,主要通过参与碳代谢从而间接参与贮藏蛋白相关生物学过程;同时,还鉴定到部分在植物生长节律性调节、开花及花粉发育等生殖生长过程中起调控作用的顺式作用元件,如 CIACADIANLELHC、MYBPLANT、MYBPZM 及

MYBST1 元件;部分具有响应生长素等植物激素及光信号的顺式作用元件,如生长素响应元件 CATATGGMSAUR、NTBBF1ARROLB,及部分参与光响应的作用元件如 GT1CONSENSUS 等,也存在于 *OsSRLp* 中。这些具有多种调控作用的顺式作用元件的存在,显示 *OsSRLp* 可参与调控多种生物过程,其所调控的下游功能基因,在植物生长发育及环境响应等多方面均具有一定的作用,尤其在光形态建成、花发育、生物节律性的维持、生长素响应及其信号转导途径、光调控的信号转导等过程。

### 2.4 转基因植株的鉴定及 GUS 组织化学染色

经潮霉素抗性筛选,获得  $T_1$  代转基因株系,进一步应用启动子 *OsSRLp* 特异性引物进行 PCR 鉴定,最终获得6个转基因阳性株系。

鉴定为阳性的  $T_1$  代转基因株系,收种后,经潮霉素抗性筛选获得抗性苗,以之为材料,分别取种子萌发期的胚根、胚芽、抽穗扬花期的小穗及灌浆成熟期的种子进行 GUS 染色,分析其表达特性。

结果显示,在水稻种子的萌发期,转基因植株胚根、胚芽的根尖部位有显示 GUS 活力的蓝色出现(图4-H、I),且胚芽鞘及胚芽尖端也可见较明显的蓝色(图4-H),显示该部位具有一定的 GUS 活性;随幼苗进入营养生长后,成熟植株叶片也可见 GUS 染色呈阳性(图4-G)。当水稻由营养生长转入生殖生长后,取扬花期的小穗进行 GUS 染色,结果显示,小穗的稃片(图4-K)、颖花(图4-L)及雄蕊的花药(图4-L)、雌蕊的柱头及子房基部(图4-M)等,均有显示 GUS 活力的蓝色出现,显示这些组织中均具有较高的 GUS 活力水平。而在对照材料中,相应组织均未检测到显示 GUS 活力的蓝色(图4-A~F)。灌浆成熟期的种子经取材后纵切置于 GUS 液中染色,结果显示种子的胚及胚乳中均有显示 GUS 酶活性的蓝色出现,但在种胚中能染出较强的蓝色,表明灌浆后初步成熟的种子其胚中具有较强的 GUS 酶活性;胚乳中也可检测到蓝色出现,表明该部位也具备一定的 GUS 酶活(图4-N),而对照种子,其纵切后经 GUS 染色,均未在种胚及胚乳中检测到显示 GUS 活性的蓝色(图4-G)。综合以上结果,初步显示启动子 *OsSRLp* 在水稻各组织中具有组成型的表达模式,且结合 GUS 染色强弱的不同,说明启动子在植物各组织中驱动下游基因表达的强度有所不同,在具有较活跃分生能力的组织中,如胚根、胚芽的尖端及种子的胚等部位,表达强度较高,显示启动子在调控下游基因参与水稻特定的营养及

表 1 启动子 OsSRLp 中的部分顺式作用元件  
Table 1. Partical cis-elements in promoter of OsSRLp.

顺式作用元件 <i>cis</i> -element	位置及序列 Sites(bp) and sequence	生物学功能 Biological function
生长素响应 Auxin response		
CATATGGMSAUR	133, 326 CATATG	大豆 SAUR (Small Auxin-Up RNA) 15A 基因启动子 NDE 元件中序列; 参与生长素响应 Sequence in NDE element in soybean SAUR (Small Auxin-Up RNA) 15A gene promoter; Involved in auxin responsiveness
NTBBF1ARROLB	277 ACTTTA	发根农杆菌 <i>rolB</i> 基因中 <i>NtBBF1</i> (烟草中 Dof 蛋白)结合位点, 参与组织表达特异性及生长素诱导表达调控 Tissue-specific and auxin regulated expression of the <i>rolB</i> oncogene in plants
胚及贮藏蛋白相关 Embryo and storage protein related		
CANBNNAPA	13 CNAACAC	油菜中贮藏蛋白基因核心(CA)元件; 调控基因表达的胚及胚乳特异性 Core of (CA) <sub>n</sub> element in storage protein genes in <i>Brassica napus</i> ; embryo- and endosperm-specific transcription of napin gene
EBOXBNNAPA	133, 326, 632, 1484 CANNTG	油菜中 napA 贮藏蛋白基因的 E 盒 E-box of napA storage-protein gene of <i>Brassica napus</i>
DOFCOREZM	78, 82, 88, 120, 172, 842, 923, 1514 AAAG	Dof1 和 Dof2 转录因子, 参与玉米碳代谢相关基因的表达调控 Dof1 and Dof2 transcription factors are associated with expression of multiple genes involved in carbon metabolism in maize
生物节律相关 Biorhythm related		
CIACADIANLELHC	311 CAANNNNATC	番茄 LHC 启动子区元件, 参与昼夜节律调控 Identification of tomato LHC promoter regions necessary for circadian expression
光响应 Light response		
GT1CONSENSUS	35, 75, 85, 91, 180, 181, 331, 377, 907 GRWAAW	光调节基因保守 GT-1 结合位点 Consensus GT-1 binding site in many light-regulated genes
HBOXCONSENSUSPV	599 CCTACCNNNNNNNCT	菜豆 <i>chs15</i> 启动子区中 H 盒保守序列; 在光调节及激发子诱导中起作用 Consensus sequence of H-boxes found in bean <i>chs15</i> gene promoter; Essential for both light regulation and elicitor induction
IBOX	700, 856 GATAAG	光调节基因上游保守序列 Conserved sequence upstream of light-regulated genes
IBOXCORE	35, 85, 700, 856 GATAA	单子叶及双子叶植物中高度保守的光调节基因上游序列 Conserved upstream-sequence of light-regulated genes of monocots and dicots
开花调控 Flowering process control		
MYBPLANT	103 MACCWAMC	激活类苯基丙烷生物合成基因转录的花特异的 MYB 蛋白 A flower-specific MYB protein activates transcription of RT phenylpropanoid biosynthetic genes
MYBPZM	54, 599, 1033 CCWACC	通过激活类黄酮从而调控玉米花器官鞣红色素沉积的 MYB 同源 P 基因 The MYB-homologous P gene controls phlobaphene pigmentation in maize floral organs by directly activating a flavonoid
MYBST1	34, 699 GGATA	<i>MybSt1</i> (土豆中 MYB 同源基因)结合位点核心元件 A novel DNA binding protein with homology to MYB oncoproteins containing only one repeat can function as a transcriptional activator
花粉发育 Pollen development		
POLLEN1LELAT52	80, 90, 170, 376, 586, 840 AGAAA	受各阶段特异性及依赖性激活元件调控, 负责调控花粉特异表达的调控元件 Pollen-specific transcription is developmentally regulated by multiple stage-specific and co-dependent activator elements
其他 Others		
TATA BOX2	340 TATAAAT	豌豆 legA 5' 上游 TATA 盒; 与甘薯贮藏蛋白 A 相关, 调控基因转录起始 TATA box in the 5' upstream region of pea legA gene; Related with Sporamin A protein of sweet potato
CAAT BOX1	299, 322, 354, 1484 CAAT	烟草中决定豆球蛋白启动子的组织特异性 Sequences responsible for the tissue specific promoter activity of a pea legumin gene in tobacco

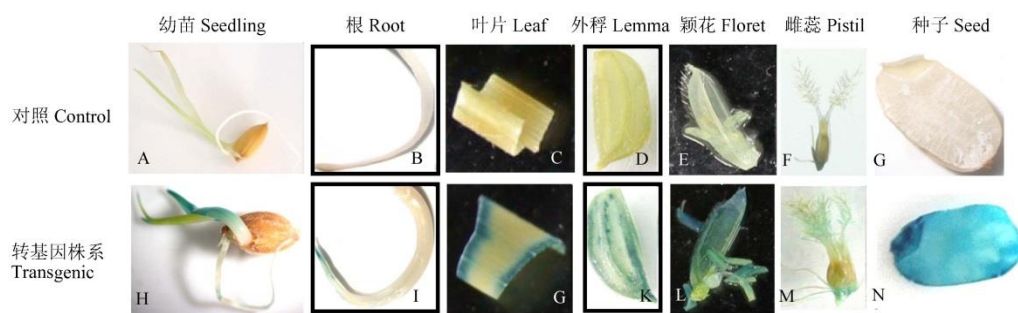


图4 水稻幼苗及各组织的 GUS 染色结果

Fig. 4. GUS staining of rice seedlings and tissues.

生殖生长过程中发挥作用。

### 3 讨论

基因正常而有规律的表达保证了真核生物生长发育的正常进行,其中转录水平的调控,是基因表达调控中最有效、最直接的调控方式<sup>[13,14]</sup>。鉴于功能基因与启动子在结构及位置上的相关性,故在获得基因序列信息及开展基因功能研究的同时,获得基因上游启动子区,并进一步分析该区段中所包含的关键调控元件,通过解析启动子所驱动的报告基因的表达情况,从而解析其下游调控基因的表达模式及生物学功能,是近年来开展基因功能研究的有效途径<sup>[13]</sup>。

以往研究显示,I型酪蛋白激酶是一类具有独特理化特性的丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶,可参与到包括基因表达、生长及形态建成、生物节律性的维持及细胞增殖等多种细胞调节过程中<sup>[1-4]</sup>。前期研究中,我们在水稻中获得一根发育异常突变体,结合表型及分子标记,定位到该突变基因属于I型酪蛋白激酶家族,命名为*OsSRL*,其碱基突变可导致水稻初生根长度短于对照,侧根数目减少,植株矮化。为了进一步解析该基因的功能,本研究分离获得了其上游约1600 bp序列并命名为*OsSRLp*,以之作为基因的启动子区开展研究。

本研究发现*OsSRLp*包含大量参与植物生殖发育及节律调控的特征元件。其中涉及到营养生长相关的DOFCOREZME元件、EBOXBNNAPA元件及CANBNNAPA元件10余个,其中,DOFCOREZME元件作为Dof蛋白的结合位点,可能在调控植物种子萌发及光应答等多种生命过程中起作用<sup>[15,16]</sup>。*OsSRLp*包含7类节律调节及环境及激素响应元件,其中GT1CONSENSUS盒9个,已知在响应光信号过程中发挥作用<sup>[17-19]</sup>。涉及到4类开花及花粉发育

等生殖相关的元件,其中POLLEN1LELAT52元件在*OsSRLp*中出现6次,已知在调控、转录激活花粉发育过程中发挥作用<sup>[20]</sup>。以往研究也显示,水稻中组成型表达的I型酪蛋白激酶OSCK11,可通过响应激素处理及外界信号,从而参与植物发育,影响水稻根系的生长<sup>[1-2]</sup>。*Hd16*基因则可通过对光照及激素信号产生响应,从而对开花时间及花的育性进行调控<sup>[5]</sup>。而本研究将为进一步从植物发育、生殖及对外界信号响应等方面解析*OsSRL*基因功能提供理论依据及指导。

*OsSRL*基因为组成型表达,除了在灌浆成熟期的小穗中表达强度较高,在其他组织中的表达相对较弱。该基因的启动子*OsSRLp*所驱动的报告基因的表达模式则显示,在扬花期的小穗中,包括雌蕊、雄蕊、稃片等部位,均具有较强的GUS酶活性,显示启动子在以上部位均具有较强的驱动及调控能力。推测启动子*OsSRLp*可通过对下游基因的表达进行调控,从而参与水稻的生殖调控过程。另外,在水稻萌发期的胚根及胚芽顶端及灌浆成熟期的种子的胚中均可检测到较强的GUS活力水平,已知这些部位作为植物的顶端分生组织或分生能力很旺盛的部位,在植物的生长及发育过程中均具有重要作用,而启动子在这些部位所具有的较强的驱动下游基因表达的能力,显示启动子及其下游基因均参与了植物的生长及发育的调控。同时,*ossrl*突变体对干旱及ABA等胁迫处理较对照敏感(未发表),结合其根部发育迟缓等表型特征,推测基因在调控植株吸水及水分利用、叶片气孔发育及导度、及植株蒸腾失水等方面可能具有一定的作用。下一步将结合启动子中所包含的几类特征元件,进一步分析*OsSRLp*在不同发育阶段及外界处理下的表达特征及响应强度;同时构建基因*OsSRL*的植物表达载体,在获得转基因株系的基础上,结合突变株的表型分析,深入解析启动子的表达调控特性及其下

游基因的作用及功能, 为揭示 I 型酪蛋白激酶的生物功能, 开展水稻分子设计育种提供理论指导。

### 参考文献:

- [1] Liu W, Xu Z H, Luo D, Xue H W. Roles of OsCKI1, a rice casein kinase I, in root development and plant hormone sensitivity. *Plant J*, 2003, 36(2): 189-202.
- [2] Liu W, Ji S X, Fang X L, Wang Q G, Li Z, Yao F Y, Hou L, Dai S J. Protein Kinase LTRPK 1 influences cold adaptation and microtubule stability in rice. *J Plant Growth Regul*, 2013, 32(3): 483-490.
- [3] Borgal L, Rinschen M M, Dafinger C, Hoff S, Reinert M J, Lamkemeyer T, Lienkamp S S, Benzing T, Schermer B. Casein Kinase 1 $\alpha$  phosphorylates the *Wnt* regulator *Jade-1* and modulates its activity. *J Biol Chem*, 2012, 289(38): 26344-26356.
- [4] Kwon C T, Kim S H, Kim D, Paek N C. The rice floral repressor *Early flowering1* affects spikelet fertility by modulating gibberellin signaling. *Rice*, 2015, 8(1): 58.
- [5] Hori K, Oqiso-Tanaka E, Matsubara K, Yamanouchi U, Ebana K, Yano M. *Hd16*, a gene for casein kinase I, is involved in the control of rice flowering time by modulating the day-length response. *Plant J*, 2013, 76(1): 36-46.
- [6] 张中保, 卢敏, 李会勇, 张登峰, 刘颖慧, 石云素, 宋燕春, 王天宇, 黎裕. 玉米干旱诱导表达基因 *ZmCKS2* 的克隆与表达分析. 作物学报, 2010, 36(6): 945-952.  
Zhang Z B, Lu M, Li H Y, Zhang D F, Liu Y X, Chi Y S, Song Y C, Wang T Y, Li S. Isolation and expression analysis of a drought-induced gene *ZmCKS2* in maize (*Zea mays* L.). *Acta Agron Sin*, 2010, 36(6): 945-952. (in Chinese with English abstract).
- [7] Wingender E, Chen X, Hehl R, Karas H, Liebich I, Matys V, Meinhardt T, Pruss M, Reuter I, Schacherer F: TRANSFAC: An integrated system for gene expression regulation. *Nucleic Acids Res*, 2000, 28(1): 316-319.
- [8] Tao Y B, He L L, Niu L J, Xu Z F. Isolation and characterization of the *Jatropha curcas* PETALA1 (*JcAP1*) promoter conferring preferential expression in inflorescence buds. *Planta*, 2016, 244(2): 467-478.
- [9] Srinath T, Reddy V D, Rao KV. Isolation and functional characterization of a novel stress inducible promoter from pigeonpea (*Cajanus cajan* L.). *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2017, 128(2): 457-468.
- [10] Hofgen R, Willmitzer L. Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Res*, 1988, 16(20): 9877.
- [11] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Res*, 1980, 8(19): 4321.
- [12] Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants: The *GUS* gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep*, 1987, 5(4): 387-405.
- [13] 房孝良, 刘炜, 安静, 王庆国. 水稻种胚特异性启动子 *OsESPI* 的克隆及其表达特性. 作物学报, 2011, 37(10): 1904-1909.  
Fang X L, Liu W, An J, Wang Q G. Isolation and characterization of an embryo-specific promoter *OsESPI* from rice. *Acta Agron Sin*, 2011, 37(10): 1904-1909. (in Chinese with English abstract)
- [14] Qi X, Zhang Y, Chai T. Characterization of a novel plant promoter specifically induced by heavy metal and identification of the promoter regions conferring heavy responsiveness. *Plant Physiol*, 2007, 143(1): 50-59.
- [15] Yanagisawa S. *Dof1* and *Dof2* transcription factors are associated with expression of multiple genes involved in carbon metabolism in maize. *Plant J*, 2000, 21(3): 281-288.
- [16] 蔡晓峰, 张余洋, 张俊红, 李汉霞, 叶志彪. 植物 *Dof* 基因家族功能研究进展. 植物生理学报, 2013, 49(1): 1-12.  
Cai X F, Zhang Y Y, Zhang J H, Li H X, Ye Z B. Advances in research on function of the *Dof* gene family in plant. *Plant Physiol J*, 2013, 49(1): 1-12. (in Chinese with English abstract)
- [17] Green P J, Yong M H, Cuozzo M, Kano-Murakami Y, Silverstein P, Chua N H. Binding site requirements for pea nuclear protein factor GT-1 correlate with sequences required for light-dependent transcriptional activation of the *rbcS-3A* gene. *EMBO J*, 1988, 7(13): 4035-4044.
- [18] Lam E, Chua N H. GT-1 binding site confers light responsive expression in transgenic tobacco. *Science*, 1990, 248(4954): 471-474.
- [19] Gourrierc J L, Delaporte V, Ayadi M, Li Y F, Zhou D X. Functional analysis of *Arabidopsis* transcription factor *GT-1* in the expression of light-regulated genes. *Genom Lett*, 2002, 1(2): 77-82.
- [20] Filichkin S A, Leonard J M, Monteros A, Liu P P, Nonogaki H. A novel endo- $\beta$ -mannanase gene in tomato *LeMAN5* is associated with anther and pollen development. *Plant Physiol*, 2004, 134(3): 1080-1087.