

水稻精细胞优势表达基因 *RSG6* 启动子的克隆及表达

兰利琼 苗琛* 白洁 徐莺 王胜华 唐琳 颜钊 陈放**

(四川大学 生命科学学院, 四川 成都 610064; * 现工作单位: 河南大学 生命科学学院, 河南 开封 475001; ** 通讯联系人, E-mail: chenfang@scu.edu.cn)

Cloning and Expression of Promoter Fragment of *RSG6*, an Abundantly Expressed Gene in Rice Sperm Cells

LAN Li-qiong, MIAO Chen*, BAI Jie, XU Ying, WANG Sheng-hua, TANG Lin, YAN Fang, CHEN Fang**

(College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu 610064, China; * Present address: College of Life Sciences, Henan University, Kaifeng 475001, China; ** Corresponding author, E-mail: chenfang@scu.edu.cn)

Abstract: Specific primers were designed according to the published genomic sequences of rice in GenBank and *RSG6* gene sequence of rice sperm cells. Two 5' upstream sequence of *RSG6*, 1 408 bp and 1 173 bp, were amplified by polymerase chain reaction (PCR) technique from DNA template of rice variety Guichao 2 and were named as PB and PS respectively. The results analyzed by NCBI BLAST and internet software PLANT CARE indicated that PB and PS are rather similar, and both fragments had many conservative promoter elements of higher plants, which suggested that PB and PS might perform their function to promote the specific expression of *RSG6* in rice sperm cells. Four deletion fragments, PB1, PB2, PS1 and PS2 were produced by PCR. After entry vector pBI221-PB1, pBI221-PB2, pBI221-PS1 and pBI221-PS2 were constructed, four plant expression vectors, pBIN-GUSB1, pBIN-GUSB2, pBIN-GUSS1 and pBIN-GUSS2 were then constructed. Recombined vectors were transferred into *Agrobacterium tumefaciens* EHA105, and the latter were used to transform the leaves and pollen of tobacco. GUS transient expression demonstrated that the four deletion fragments could work as promoter.

Key words: gene; rice; promoter; deletion fragment; transient expression

摘要: 利用已知的 *RSG6* 基因序列和 GenBank 中提供的 *RSG6* 前导序列设计引物, 通过基因组 DNA 的 PCR 扩增得到长度为 1 408 bp 和 1 173 bp 的两个 *RSG6* 启动子片段 PB、PS, 测定序列分析发现, PB、PS 分别位于水稻第 10 和第 4 染色体上, PB、PS 序列之间具有较高的同源性, 且都含有大量的启动子元件。通过设计带有酶切位点的引物扩增出 PB 和 PS 的各两条缺失片段 PB1、PB2、PS1、PS2, 与质粒 pBI221 连接后得到中间载体 pBI221-PB1、pBI221-PB2、pBI221-PS1、pBI221-PS2, 再与质粒 pBIN19 连接构建出双元表达载体 pBIN-GUSB1、pBIN-GUSB2、pBIN-GUSS1、pBIN-GUSS2, 转化农杆菌 EHA105, 感染烟草叶片和烟草花粉, 瞬时表达显示缺失片段 PB1、PB2、PS1、PS2 均具有启动子功能, 且 PB1、PS1 的启动效率较 PB2、PS2 高。

关键词: 基因; 水稻; 启动子; 缺失片段; 瞬时表达

中图分类号: Q754; Q943.2; S511.01

文献标识码: A

文章编号: 1001-7216(2004)04-0290-07

水稻是植物发育生物学和分子生物学研究的模式植物, 水稻基因组测序工作的完成为水稻基因功能的研究提供了极大的便利。本实验室已经成功地分离出了批量的生活精细胞, 并用抑制差减杂交 (Suppression subtractive hybridization, SSH) 技术从水稻精细胞文库中筛选到一些在精细胞中优势表达的基因^[1], *RSG6* 基因就是其中之一。通过在 GenBank 中 BLAST 得知, *RSG6* 是一个新发现基因, 在水稻有性生殖过程中发挥着重要作用^[2], 因此, 对其调控序列的研究有着重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料

水稻桂朝 2 号 (*Oryza sativa* L.) 购自四川省农业科学院, 烟草百日红 (*Nicotiana tabacum* L.) 由本

实验室长期培养保存。

1.1.2 菌株与载体

大肠杆菌 (*Escherichia coli*) JM109, 农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 由本实验室保存; 质粒 pMD18-T 购自 Takara 公司, pBI221、pBIN19 质粒由本实验室保存。

1.1.3 试剂

ExTaq 酶及 PCR 反应 Buffer、T₄ DNA 连接酶、限制性内切酶均购自 Takara 公司; X-Gluc 购自 Clontech 公司; 抗生素 (卡那霉素、利福平、安苄青霉素) 购自 GIBCOBRL; 酵母提取物、蛋白胨等购

收稿日期: 2003-08-05; 修改稿收到日期: 2003-12-22。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30270090); 教育部博士点基金资助项目 (98061001); 四川省重点科研资助项目。

第一作者简介: 兰利琼 (1967—), 女, 在职博士研究生。

自 OXOID;胶回收采用上海华舜小量胶回收纯化试剂盒;引物合成由北京赛百盛公司完成;其他均为进口或国产分析纯试剂。

1.2 方法

1.2.1 水稻精细胞优势表达基因 *RSG6* 启动子的克隆

1.2.1.1 水稻总 DNA 的提取

参照 McCouch 等方法提取水稻基因组 DNA^[3],并按 Stemmer 的方法进行 DNA 纯化^[4]。

1.2.1.2 引物设计

RSG6 基因的全序列在 NCBI 网站上进行 BLAST,对 *RSG6* 基因定位,再将其前面长约 1 514 bp 的序列连同 *RSG6* +120 bp 导出,用 Primer 5.0 设计软件在两端分别设计一对特异引物 PWZ、PWF,以及一对用于对产物进行检测的巢式引物 PNZ、PNF。PWZ:5'-ACATTCGGCTATTTAGCATGTGG-3';PWF:3'-ACCATCGTTTTGACTAAGTAATCTAAC-5';PNZ:5'-TAGTTGTTATCTTCAATTTGATTGGTTTC-3';PNF:3'-GGTG AAGGCTAGAGGATTTTATTATGC-5'。

1.2.1.3 PCR 扩增

扩增反应的总体系为 50 μ L,其中含有 50 mmol/L KCl,10 mmol/L Tris-HCl,0.1% Triton-100,1.5 mmol/L MgCl₂,0.25 mmol/L dNTP,0.4 μ mol/L 引物 PWZ、PWF,2.5 U ExTaq 聚合酶,80 ng 水稻基因组 DNA, pH 8.3。反应参数为:97℃ 下预变性 10 min,然后按 94℃ 下 40 s,61℃ 下 90 s,72℃ 下 90 s 进行 35 个循环,最后在 72℃ 下延伸 10 min。反应在 GeneAmp PCR System 2400 热循环仪上进行。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶电泳。

1.2.1.4 PCR 产物回收、检测

将目的片段用小量胶回收纯化试剂盒进行回收纯化。分别使用 PWZ、PWF 进行单引物 PCR 检测;以前面回收的 PCR 产物作模版,以 PNZ、PNF 作引物进行巢式 PCR 检测(PCR 参数同前),并以 PNZ、PNF 进行单引物 PCR 检测。

1.2.1.5 序列测定

将特异性得到验证的扩增片段连接到 pMD18-T 载体上,转化大肠杆菌,加 x-gal 进行蓝、白斑筛选,挑取阳性克隆增殖培养。菌落 PCR 检测后,由上海基康生物技术有限公司完成序列测定。

1.2.2 启动子元件分析

利用 PLANT CARE 网络软件进行序列的启动子元件分析。

1.2.3 缺失表达分析

1.2.3.1 扩增缺失片段

设计两端分别带有酶切位点 *Hind*Ⅲ、*Bam*H I 的 4 条引物:1-PBSF:5' ACT GGA TCC AAG GAG AAA AGA CGC AAG AGT 3';2-PBZ2:5' GTT AAG CTT TTT GAA CTC AAG ACT CTC C 3';3-PSZ2:5' GGT AAG CTT TCA AGA CCT CCA ACA TAA 3';4-PBSZ:5' CCC AAG CTT CAC TGT ATG TAC CCG CTT 3'。

以 PB、PS 为模板,分别以 4-PBSZ 与 1-PBSF、2-PBZ2 与 1-PBSF、4-PBSZ 与 1-PBSF、3-PSZ2 与 1-PBSF 为引物进行 PCR 扩增,产生两个启动子序列 PB、PS 的各两条缺失片段:PB1、PB2、PS1、PS2 (PB1、PS1 的扩增反应参数为 94℃ 下预变性 5 min,然后按 94℃ 下 30 s,70℃ 下 30 s,72℃ 下 30 s 进行 35 个循环,最后在 72℃ 下延伸 7 min;PB2、PS2 的扩增反应参数为 94℃ 下预变性 5 min,然后按 94℃ 下 30 s,63℃ 下 30 s,72℃ 下 30 s 进行 35 个循环,最后在 72℃ 下延伸 7 min)。

1.2.3.2 缺失片段分析的表达载体的构建

同时用 *Hind*Ⅲ、*Bam*H I 双酶切扩增的缺失片段和载体 pBI221,进行连接反应,以便使缺失片段定向插入到载体 pBI221 中,取代原有的 CaMV35S 启动子。重组质粒载体转化大肠杆菌,双酶切鉴定。由此构建出中间载体 pBI221-PB1、pBI221-PB2、pBI221-PS1、pBI221-PS2。*Hind*Ⅲ + *Eco*R I 双酶切 pGUSB1、pGUSB2、pGUSS1、pGUSS2 并回收全部 DNA,用 *Bgl*I 酶切前述之回收的 DNA,再电泳回收 2 500 bp 左右的片段,将其与同样经 *Hind*Ⅲ + *Eco*R I 双酶切的 pBIN19 连接,得到重组质粒 pBIN-GUSB1、pBIN-GUSB2、pBIN-GUSS1 和 pBIN-GUSS2,转化大肠杆菌 JM109,增殖培养后,提取质粒,冷冻法转化农杆菌 EHA105,同样的方法构建带有 CaMV35S 启动子的重组质粒 pBIN-GUS 作为阳性对照。

1.2.3.3 重组质粒在烟草叶片及烟草花粉中的瞬时表达检测

以含重组质粒 pBIN-GUSB1、pBIN-GUSB2、pBIN-GUSS1、pBIN-GUSS2 和 pBIN-GUS(阳性对照)以及不含重组质粒的农杆菌(阴性对照)侵染烟草无菌苗的叶片和烟草花粉。

1)烟草叶片在 MS₀ 固体培养基上共培养 4 d,彻底清洗后用 X-Gluc 染色液^[5] (1 mmol/L X-gluc;100 mmol/L 磷酸缓冲液,pH 7.0;10 mmol/L

EDTA;1 mmol/L 铁氰化钾;1 mmol/L 亚铁氰化钾;0.1% Triton-100)整体染色过夜,以70%乙醇脱色,徒手切片,用 Olympus 显微镜观察拍照。

2)长约3 cm的烟草花蕾经75%乙醇和0.1%的升汞消毒后,剥取其花药,轻捣释放花粉,花粉在含18%蔗糖的BK液体培养基上与农杆菌共培养2 d后,彻底清洗,用X-Gluc染色液染色过夜,在Olympus显微镜下统计染成蓝色的花粉数量并拍照。

2 结果与分析

2.1 RSG6 基因启动子的扩增

以PWZ、PWF为引物扩增出大小分别约为1 200 bp和1 400 bp的两个片段PS、PB(图1-A),两个片段胶回收后用PNZ、PZF引物进行巢式PCR检测,分别得到大小约为680 bp和720 bp的两个片段(图1-B),与预期设计的片段大小相同,证明了扩增产物的特异性。序列测定结果:PB为1 408 bp,切去3'端RSG6基因序列后为1 372 bp(图2);PS为1 173 bp,切去3'端RSG6基因序列后为1 137 bp(图3)。

2.2 启动子序列分析

序列PB、PS序列测定结果见图2和图3,通过NCBI在GenBank中BLAST结果显示,它们分别位于第10和第4染色体上,同源性分别为94%、93%。利用OMIGA2.0对PB与PS两片段序列进行相似性分析,发现这两个序列的相似性是比较高的。

网络PLANTCARE软件分析显示PB、PS均

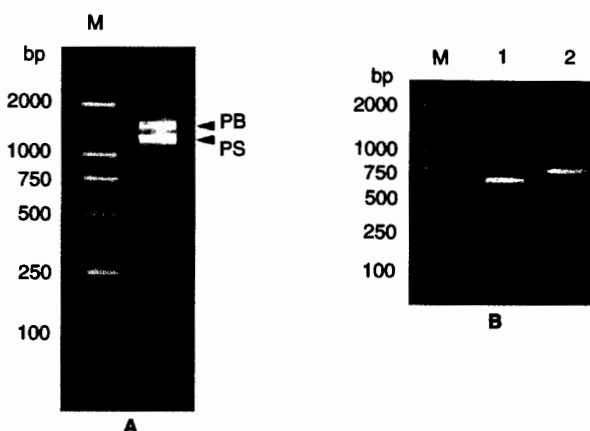


图1 启动子片段的扩增及其检测

Fig. 1. Amplification and detection of promoter fragments.

A—PCR扩增产生PB、PS两个片段;B—巢式PCR检测(1、2分别为以PS、PB为模板的产物)。

A, Two fragments, PB and PS were produced by PCR; B, Detection was done by nest-PCR. Lane M, DL 2000 DNA marker; Lane 1, Production of PCR using PB as template; Lane 2, Production of PCR using PS as template.

含有大量的启动子元件。图2、图3显示的仅是同源性为100%的和在水稻基因中已知的启动子元件。

2.3 表达载体的构建

表达载体构建过程见图4。带有酶切位点的引物分别从PB、PS中扩增出大小为543、188、593、

```

1 ACATTGCGCTATTAGCATG TGGCCGACGG GATATATCAA TGAGTGAGAGTTAAGAATA CCACTCGGAA ATGGTTTAA; TGGCCGACG GGGTATATTA
101 GTAACCGAGA GGTTTAAITTT AACCTCTCGGA AATTATCAIT AGTGGCCGACGGGTATATT AATAACCGAG TGGTTTAAIT CAACTCTCGG AAATTATTTAT
201 TAGTGGCCGA CAGTGTATAT TAGTAACCGA GGGGTTTAAIT TTAAGTCTCGGAAATGATTA TTAGTGGCCG ACGGGGTATA TTAGTAACCG AGGGGTTTAA
301 TTTAACTCTC GGAAATGATTT AITAGTGGCC GACGGGGTAT AITAGTAACCGAGGGGTTTA ATATAACTCT CGGAATTTAT TATTAGTGAC TGACAGGGTA
401 TATTAGTAAC CGATGGGTTT AATATACCTC TCGGAAATGG TTATAAGTTCGGAAGGTACA GGAAAAAAT ACCGAGAGGA CATAACTTTA CCGATGGTTC
501 ACAATGGTAC CTTTGCAAT AATATGTGAC AAAGAGAACT ATATTGCAT TAAAAAATG TAATATAATA TGTACTGTAG GCTATACTG AAAAAAACA
601 AACGTCCCTA TATATAGJAA CTTTGTITTT TTTAAATCTT TATTITAGATCAAAITGAAG TATATACAG TGGGCACAAT AAATTAATAG ACTCTCTAGT
TATCCAT_C-motif
701 CTTTACCATA TTAACCATAT AGTGTGTTATC TTCAATTIGA TTGGTTTCAT AITGAAGACA TCTGTGCTT AGCATCAAAG ATAGTATATA TGCTTATCCA
I-box CAAT-box P-box
801 ITTITATCTCATATATCCTC TTCGTACGAG TTAITCTCAT AGCCAATTTT CTCTTTTTC ATTTCATTAA CTCGGCCCCC TGCCCACTGT ATGTACCCGC
CAAT-box I-box TATC-box Prolamin_box CAAT-box CAAT-box RY-element
901 TTCATGGCAC CTTTGTAGTT ACGTCCCAAT CTCATAAAT ATTATCTCAT TTCTTTTCAA ATGCAATGGT ATACGATAT TTTTCACATG ATACAACCAT
TATA-box Box-W1 TGA-box CGTCA-motif3-AF1_binding_sit
1001 GTATGCTCAT GTATGTTTC ATTAAGAGAG TTTATAACTT TGACCAGATAGTTTATGAA ATGGCATGCA TTTACGTCAA ACTAAAGAGA ACATTATCCA
CAAT-box CAAT-box TGACG-motif Box_4 GA-motif TATCCAT_C-motif CAAT-box LTR
1101 ATAGTATTAATAATTGTGCAA AAAAAATCAT GAGCATAAAA ATGTGGCCAT ATTTTATTA TATTATCTAT TTTGTAAGCA TGAATGAATA CAATCCGAAA
CAAT-box C-repeat_DRE GC-motif I-box
1201 TTTTAAAAAA TATATATTT AGTCTTGGG TTTGAACCTA AGACTCTCCA ATTCGCAGAG TGTGGCCGAC GGTTTCCTTA TTCGCGCCCA CTTCCGATAT
TATC-box GC-motif CAAT-box RY-element G-Box TATA-box I-box 3-AF1_binding_sit
1301 CCTAAATAA TACGCGCGCA AATTCGCCGC CCACGTGATA AGTAATATAT AACTCTTTCG TCTTTCTCCT TT

```

图2 PB序列及缺失片段的启动子元件分析

Fig. 2. Sequence of PB and promoter element analysis of deletion fragments.

1 ACAITCGGCT ATTTAGCATG TGGCCGACGG GATATATCAG TGAGTGAGAG TTATAAGATA CCACTCGGAA ATGATTATAA GTGGCCGACG GGGTATATTA
101 GTAATCGAGA GGTTTAATTT AACTCTCGGA AATTATTAIT AGTGCTGAC GGGGTATATT AATAACCGAG GGGTATAATT TAACTCTCGA AAATTATTAT
201 TAGTGGCCGA TAGGGTATAT TAGTAACCGA GGGGTITTAAT TTAACCTCTCG GAAATGATTA TAAGTGGCCG ACGGGGTAGA TTAGTAACCG AGGGGTITAA
301 TATAACTCTC GAAAATTATT ATTAGTGACC GACGGGGTAT ATTAGTAACC GAGGGGTATA TTAATGGACT CTCTAGTCTT TACCATATTA ACCCATATGT
401 TGTITATCTTC AATTGGAITG GTTTCATATA TAAGACATCT TGTGCTTAGC ATCAAAGATA GTATATATGC TTATCCATTT TATTCTCATA TAICTCTCTC
501 GTGCGAGITTA TTATCATAGC CAATTTTCTC CTITTTTCATT TCAITCTTCT CGGCCCCCTG CCCACTGTAT GTACCCGCTT **ATGGCA CAA CGTCCAATC**
601 TCATAAAATTA **TTATCTCGTT TCTTTACAAA TGCAAT**GTAT AAGATTATTT TTCACATGAT TAAACCATGT ATGCTCAI **T** ATGTTCCGAT TAAAAGAGTT
701 **TATAACTTTG ACCAGGTGAG** TAGTTTATGA AATGGCATGC **ATTACGTC** AACTGAAGAG AACATTATTC **AATAG** ATTA **AAATTG**TGCC AAAAAGCATA
801 **AAAAATGTGGC CATAT** ITAT **TAATATTATC TACTATTTTG TAAGCATGAT GTATATATAC AATCCAAAAT TTTAAAAAAT ATATGTCAAA** TGTITGGGTTT
901 GAACTCAAGA CCTCCACAT **AAATAATAGT TCCAAACCAG CTGAGCTCAG CCTTGACAC TGAACAAAGA GGCACCAAAA TATTAAGTA CGTGTTAGTG**
1001 **ACCTAAAAAT TTCCAATTG** CAGTGTGGCC GA CAGTTTCC TTATTCGCGC CCACTTCCGA TCTCTAAAA TAATACGCGC **GCAAATTAGC CGCCACCGC**
1101 ATAAGTATAT **ACTCTACTC TTGCGCCTTT TCTCCTT**

GCN4_motif CAAT-box
I-box Prolamin_box TATA-box CAAT-box CAAT-box
TATA-box Box-W1 GC-repeat RY-element TGA-box CGTCA-motif TGACG-motif CAAT-box CAAT-box GCN4_motif
TATA-box Box_4 I-box TATA-bo TATA-box TATA-box CAAT-box TATA-box TATA-box GCN4_motif CAAT-box
TATA-box
ABRE G-Box G-box
TATA-box CAAT-box CAAT-box C-repeat_DRE GC-motif GC-motif CAAT-box Sp1
TATA-box P-box

图 3 PS 序列及缺失片段的启动子元件分析
Fig. 3. Sequence of PS and promoter element analysis of deletion fragments.

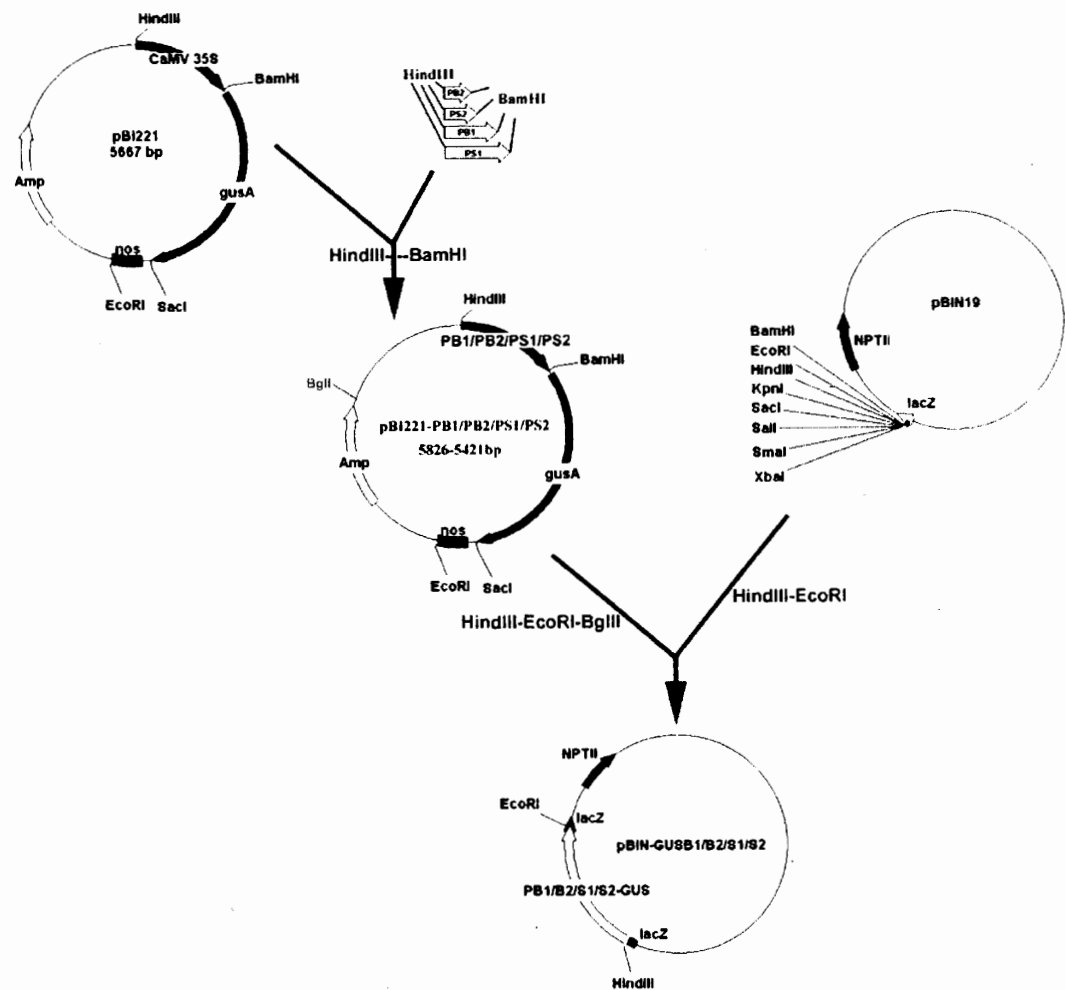


图 4 载体构建流程
Fig. 4. Construction of recombined vector.

250 bp 的缺失片段 PB1、PB2、PS1、PS2，将它们与经酶切去掉 35S 启动子的 pBI221 质粒相连接得到中间载体 pBI221-PB1、pBI221-PB2、pBI221-PS1、

pBI221-PS2，经 *Hind* III、*Bam* H I 双酶切检测证实中间载体构建正确。pBI221-PB1、pBI221-PB2、pBI221-PS1、pBI221-PS2 经 *Hind* III、*Eco* R I 双酶

切后产生两条均约为 2 500 bp 的片段,难以区分获得目标条带。故用载体上有酶切位点而启动子片段中没有酶切位点的 *Bgl* I 酶继续酶切,凝胶电泳回收其中唯一的约 2 500 bp 条带,即目的片段 PB1/PB2/PS1/PS2-GUS,与同样经 *Hind* III、*Eco*R I 双酶切后的 pBIN19 连接,即获得分别由启动子片段 PB1、PB2、PS1、PS2 驱动的带有 GUS 报告基因的植物表达型二元载体 pBIN-GUSB1、pBIN-GUSB2; pBIN-GUSS1、pBIN-GUSS2。阳性对照为 pBI221 质粒经过上述同样的处理后得到的 pBIN-GUS。这些重组质粒经大肠杆菌 JM109 菌株扩增后转入农杆菌 EHA105,并得到酶切检测证实。

2.4 启动子片段在烟草叶片和花粉中的瞬时表达

与农杆菌共培养 4 d 后的烟草叶片经过染色、徒手切片,显微镜下观察到其细胞中都有蓝色颗粒出现(图 5),而阴性对照叶片不显色,说明 4 种缺失片段 PB1、PB2、PS1、PS2 均有启动子功能。从叶片上显色的面积和颜色的深浅上看,阳性对照中 GUS 基因的表达更强烈一些。

与农杆菌共培养 2 d 后的烟草花粉经染色,都有变成蓝色的花粉出现。其变蓝花粉的比例不同,启动子片段为 PB1、PB2、PS1、PS2 和 CaMV35S 的处理样本中变成蓝色的花粉的百分率分别为 9.92%、5.61%、11.06%、6.57% 和 10.34%,缺失片段 PS1 的启动效率略高于 CaMV35S,而较短的缺失片段 PB2、PS2 的启动效率都较低。观察还发现,在含启动子片段 PB2、PS2 的处理样本中没有像含启动子片段 PB1、PS1 和 CaMV35S 的处理样本中的那种染成深蓝色的花粉颗粒,这似乎也可以从一个侧面证实较短的缺失片段 PB2、PS2 的启动效率较低。

3 讨论

植物基因的表达有其时间和空间的特异性,近几年来,在高等植物中对种子蛋白基因、光调控基因、激素诱导基因、环境伤害(如缺氧、外伤害、病原体伤害)等诱导基因及其他一些相关基因的启动子进行了较为深入的研究,证实启动子作为一种基因表达的顺式作用元件在植物基因调控中扮演着十分重要的角色^[6~12]。精细胞在植物生殖过程中担负着识别、受精、遗传物质传递等重要使命,在其完成生长、发育及受精作用的过程中,必定有一系列的基因特异地表达^[11]。对这些基因的结构、功能与调控的研究是了解植物双受精机制的关键之一。

RSG6 基因是水稻精细胞中优势表达的基因,从前期的研究结果看,其表达活动起始于二细胞花粉时期,在成熟花粉的精细胞中活性最强,这种表达的时空性与其他基因一样是受其启动子影响的。Southern Blot 分析显示 RSG6 基因在水稻基因组中不止一个拷贝^[2]。现在对其启动子的扩增也得到两个片段:PB 和 PS,并发现它们分别位于第 10 和第 4 染色体上,且这两个序列有较高的相似性,说明 RSG6 基因的各拷贝有着同源性较强的启动子;利用 PLANT CARE 网络软件对其序列进行分析,显示 PB、PS 这两个片段都包含了大量的启动子元件,特别值得一提的是,在 PB 的第一 29 位点上和 PS 的 -32 位点上出现了 TATA-box,它是转录起始的核心启动元件,在高等真核生物中 TATA-box 位于转录起始位点上游(32±7)bp 处^[13]。应该说,本研究克隆到的 PB、PS 中 TATA-box 出现的位置是符合一般规律的,但除此之外,在 PB 和 PS 的上游还多次出现了 TATA-box,如 PB 的 -341 处、PS 的 -134、-218、-265、-286、-302、-337 处,其作用和意义何在,我们尚不清楚。在 PS 的 -56、-124、-251、-268、-278、-368、-505、-517、-544 处、PB 的 -54、-172、-182、-261、-272、-409、-413、-448、-531 处都有 CAAT-box,它通常是启动子和增强子区域的顺式作用元件。这么多 CAAT-box 的出现,应该对 RSG6 基因的优势表达起到了非常重要的作用。ABRE 是脱落酸反应的顺式活动元件,GC-motif 是缺氧特异诱导反应中类增强子,CGTCA-motif 和 TGACG-motif 是已知功能的在 MeJA 反应中充当顺式调节的元件,G-Box 则在光反应中作顺式调节元件,GA-motif、I-box、Sp1 都是光反应元件,GCN4_motif 是胚乳表达中的顺式调节元件,P-box 是赤霉素反应元件,TATC-box 则是赤霉素反应的顺式活动元件,Prolamin_box 是与 GCN4(酿酒酵母中的转录因子之一,能激活组氨酸生物合成基因的转录)相偶联的顺式调节元件,R_Y-element 是种子特异调控中的顺式作用元件,TGA-box 是植物生长素反应元件之一。这么多启动子元件出现在 PB、PS 序列中,而许多启动子元件原本就是在水稻中发现的,如:Sp1、Prolamin_box、P-box、GCN4_motif,这些都暗示了 PB、PS 的启动子功能,且说明 PB、PS 这两个启动子片段对水稻精细胞优势表达基因 RSG6 具有多种调控方式。

通过在烟草中的瞬时表达,可以看到这 4 个缺失片段 PB1、PB2、PS1、PS2 都是具有启动子功能

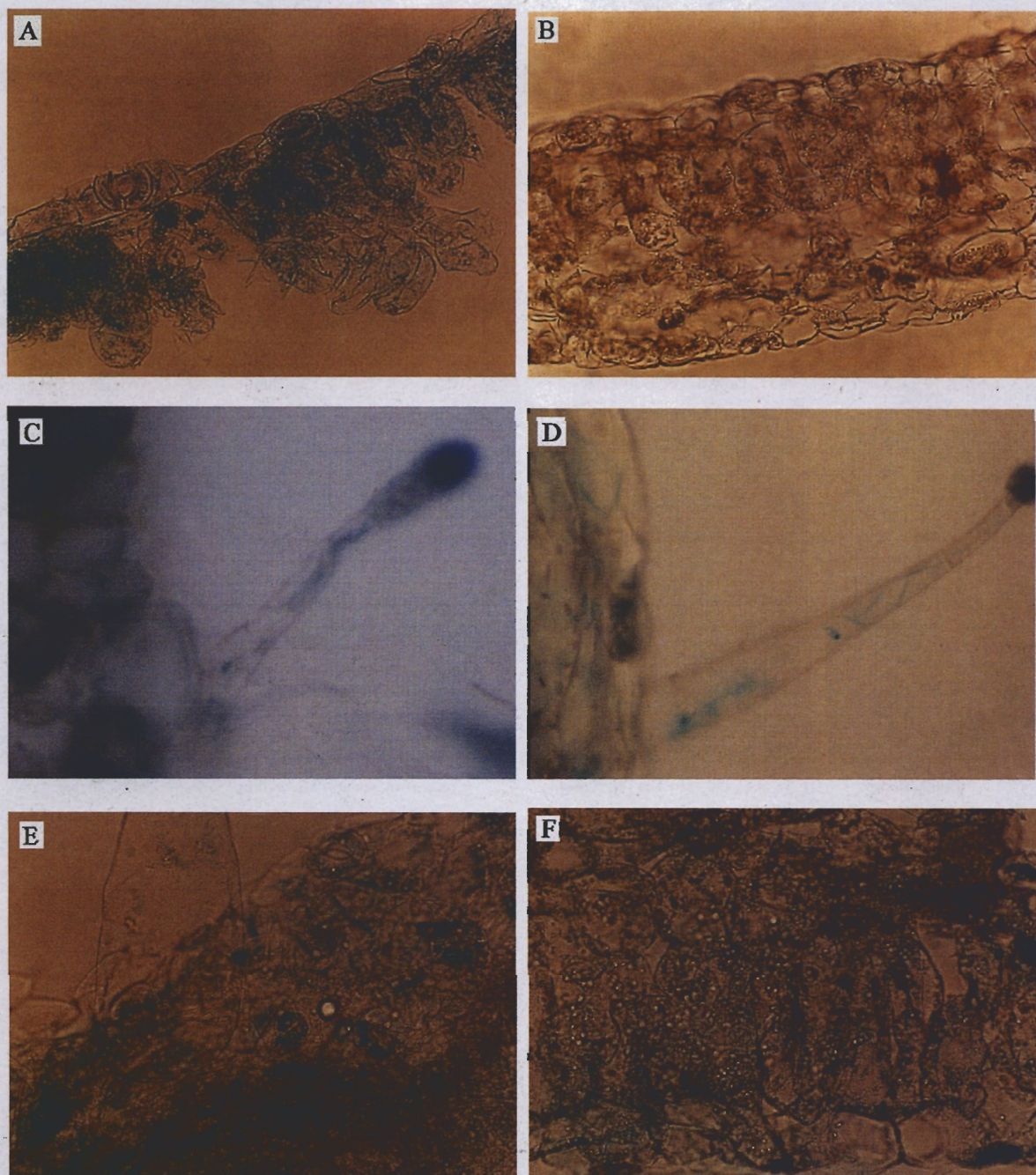


图5 *GUS* 基因在烟草叶片中的瞬时表达

Fig. 5. Transient expression of *GUS* gene in tobacco leaves.

A—CaMV35S启动子驱动的 *GUS* 阳性对照; B—阴性对照; C—缺失片段 PB1 驱动的 *GUS* 基因表达; D—缺失片段 PB2 驱动的 *GUS* 基因表达; E—缺失片段 PS1 驱动的 *GUS* 基因表达; F—缺失片段 PS2 驱动的 *GUS* 基因表达。

A, Positive sample with CaMV35S promoter; B, Negative sample; C, D, E and F, Expression of *GUS* gene with deletion fragments, PB1, PB2, PS1 and PS2, working as promoter respectively.

的,只是表达的强弱似乎有差异,在营养器官——叶片中,4个缺失片段的启动效率似乎都弱于CaMV35S启动子;而在生殖器官——成熟花粉的瞬时表达实验中,由于花蕾的取材时间为9月,经FDA检测,有活力的花粉仅约42%,多数花粉吸

育,故瞬时表达率普遍偏低。不过,统计显示,缺失片段PS1的启动效率似乎还略高于CaMV35S启动子,据此我们初步判断,*RSG6*基因启动子的启动效率在成熟花粉中比在叶片中高,因此,我们推测,*RSG6*基因在不同组织、不同时期的表达量的差异

很可能就源于其启动子在不同组织中表达强弱的差异。当然,目前的瞬时表达的研究只是一个初步的结果,因为 GUS 显色的深浅并不能作为判断表达效率的准确标准^[14],只有通过获取经重组质粒转化的转基因植株,并对 GUS 基因在转基因植株中的稳定表达进行定量分析,才能对这一推测进行验证。目前,我们正在进行系列启动子片段在水稻和烟草中的稳定表达研究,结果将在近期另文发表。

参考文献:

- Gou X P(苟小平), Xu Y(徐 莺), Tang L(唐 琳), *et al.*. Representative cDNA library from isolated rice sperm cells. *Acta Bot Sin*(植物学报), 2001, 43(10): 1093—1096.
- Bai Y(白 斌), Xu Y(徐 莺), Tang L(唐 琳), *et al.*. Molecular cloning and preliminary study of a gene differentially expressed in rice sperm cells. *Acta Bot Sin*(植物学报), 2003, 45(3): 346—351.
- Stemmer W P C. A simple method of DNA purification. *Bio Technology*, 1991, 10(6): 726.
- Twell D, Yamaguchi J, Wing R A, *et al.*. Promoter analysis of genes that are coordinately expressed during pollen development reveals pollen-specific enhancer sequences and shared regulatory elements. *Genes & Dev*, 1991, 5(3): 496—507.
- Clark M S. Translated by Gu H Y(顾红雅), Qu L J(翟礼嘉), Chen Z L(陈章良). Protocol of Plant Molecular Biology(植物分子生物学实验手册). Beijing: High Education Press(高等教育出版社), 1998. (in Chinese)
- Chen W, Provart N J, Glazebrook J, *et al.*. Expression profile matrix of *Arabidopsis* transcription factor genes suggests their putative functions in response to environment stresses. *Plant Cell*, 2002, 14(3): 559—574.
- He Y, Gan S. Identical promoter elements are involved in regulation of the *OPRI* gene by senescence and jasmonic acid in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 2001, 47(5): 595—605.
- Yamaguchi S, Smith M W, Brown R G, *et al.*. Phytochrome regulation and differential expression of gibberellin 3-beta-hydroxylase genes in germinating *Arabidopsis* seeds. *Plant Cell*, 1998, 10: 2115—2126.
- Li Y K(李一琨), Wang J F(王金发). Advances of the studies on plant promoter. *Chinese Bull Bot*(植物学通报), 1998, 15(suppl): 1—6. (in Chinese with English abstract)
- Wang S J, Lan Y C, Chen S F, *et al.*. Wound-response regulation of the sweet potato sporamin gene promoter region. *Plant Mol Biol*, 2002, 48(3): 223—231.
- Singh M B, Xu H L, Bhalla P L, *et al.*. Developmental expression of polyubiquitin genes and distribution of ubiquitinated proteins in generative and sperm cells. *Sex Plant Reprod*, 2002, 14: 325—329.
- Wang S H(王胜华), Xu Y(徐 莺), Cheng F(陈 放), Zhou K D(周开达). Clone and transient expression of the promoter of pollen-specific gene in rice (*Oryza sativa* L.). *J Sichuan Univ*(四川大学学报), 2001, 38(4): 554—559. (in Chinese with English abstract)
- McCouch S R, Kochert G, Yu Z Y, *et al.*. Molecular mapping of rice chromosome. *Theor Appl Genet*, 1988, 76: 815—829.
- Wang G L(王关林), Fang H J(方宏筠). The Gene Engineering Principle and Technique of Plant(植物基因工程原理与技术). Beijing: Science Press(科学出版社), 1998. (in Chinese)