

甘草 *GuPIP1* 基因启动子的克隆及序列分析

王芳*, 董乐, 袁建军, 黄周英, 林鸾

泉州师范学院化学与生命科学学院, 福建泉州 362000

提要: 从甘草叶中提取总DNA, 并用染色体步行技术克隆甘草 *GuPIP1* 基因5'端上游调控区序列(GenBank accession No. EU 262597)。采用生物信息学方法进行序列分析表明, 该序列具有典型的启动子结构, 具干旱和ABA激素调控序列等顺式作用元件。

关键词: 甘草; 质膜水通道蛋白基因; 启动子; 干旱和ABA激素调控序列

Cloning and Sequence Analysis of the *GuPIP1* Gene Promoter from Chinese Licorice (*Glycyrrhiza uralensis* F.)

WANG Fang*, DONG Le, YUAN Jian-Jun, HUANG Zhou-Ying, LIN Luan

School of Chemistry and Life Science, Quanzhou Normal College, Quanzhou, Fujian 362000, China

Abstract: In this paper a 613-bp promoter sequence of *GuPIP1* transcription factor from the genomic DNA of Chinese licorice (*Glycyrrhiza uralensis* F.) was cloned by using chromosomal walking. Bioinformatical analysis of this sequence showed that the sequence contained some typical elements of a promoter, drought- and ABA-responsive elements. The *GuPIP1* gene promoter from Chinese licorice (*Glycyrrhiza uralensis* F.) has been successfully cloned (GenBank accession No. EU 262597).

Key words: Chinese licorice (*Glycyrrhiza uralensis* F.); *GuPIP1*; promoter; drought- and ABA-responsive elements

迄今为止, 作为细胞膜上选择性高效转运水分子的特异孔道的水通道蛋白(aquaporin, AQP)已相继在拟南芥、烟草、玉米、豌豆、水稻等多种植物中得到克隆。植物基因组测序揭示, 植物水通道蛋白是一个超家族: 拟南芥中有38个水通道蛋白基因编码的35种水通道蛋白同源物, 玉米和水稻中分别有35和33个水通道蛋白基因(Chaumont等2001; Johanson等2001)。蛋白数据库显示, 大量水通道蛋白同源物广泛存在于单子叶和双子叶、C₃和C₄代谢植物中, 氨基酸序列的同源性分析表明, 它们可能是水通道蛋白(Higuchi等1998)。Johanson等(2001)根据氨基酸序列同源性和亚细胞定位将其划分为4个家族, 即: 质膜内在蛋白(plasma membrane intrinsic proteins, PIPs) (Kammerloher等1994)、液泡膜内在蛋白(tonoplast membrane intrinsic proteins, TIPs) (Karlsson等2000)、类Nodulin26 (NOD26)膜内在蛋白(NOD26-like intrinsic proteins, NIPs) (Weaver等1991)和小分子碱性膜内在蛋白(small basic intrinsic proteins, SIPs) (Chaumont等2001)。植物水通

道蛋白在植物种子萌发、细胞伸长、气孔运动、受精等过程中调节水分的快速跨膜运输(Chrispeels等2001)。植物水通道蛋白中有些呈组成型表达, 而大多数是受环境因子, 如干旱、盐害、激素和光质等诱导表达的, 即植物水通道蛋白的表达是受调控的。有研究表明, 植物主要通过调控细胞质膜水通道蛋白的表达消除水分供应中的波动(Törnroth等2006)。我们以real-time PCR研究表明, 甘草(*Glycyrrhiza uralensis* F.)质膜水通道蛋白*GuPIP1*的表达受干旱、ABA和NaCl的胁迫而上调(Wang等2007)。本文从甘草叶中提取总DNA, 并用染色体步行技术克隆甘草*GuPIP1*基因5'端上游调控区序列, 以期能为确切了解甘草*GuPIP1*基因的表达调控机制奠定基础。

收稿 2007-11-13 修定 2008-04-06

资助 福建省科技厅青年科技人才创新项目(2006F3113)、福建省教育厅科技计划(2007JA07151)、泉州市科技局技术与开发项目(2007N6)、泉州师范学院科研启动基金和泉州师范学院开放实验基金(07080107)。

* E-mail: dwf320@163.com; Tel: 0595-28131268

材料与方法

甘草(*Glycyrrhiza uralensis* F.)种子购自内蒙古赤峰市农科院。Universal GenomeWalker Kit 购自 Clontech 公司, 其他试剂购自厦门泰京公司。大肠杆菌 DH5 α 为本实验室保存。

甘草种子消毒后, 于 40 ℃ 水中浸泡 12 h, 然后于 25 ℃ 恒温培养箱中暗催芽 3 d。胚根长至 0.5 cm 时, 移到光照培养箱中培养于 Hoagland 营养液[5 mmol·L⁻¹ Ca(NO₃)₂, 5 mmol·L⁻¹ KNO₃, 2 mmol·L⁻¹ MgSO₄, 0.025 mmol·L⁻¹ FeSO₄-EDTA] 中, 光/暗为 16 h/8 h, 光照强度为 100 μ mol·m⁻²·s⁻¹, 昼夜温度为 24 /22 ℃, 相对湿度为 70%。培养期间无任何水分胁迫。培养 30 d 后取叶, 参照 CTAB 方法(姚伟等 2004)并稍加改进, 提取甘草中总基因组 DNA。

引物设计与合成参照我们克隆并已登录在 GenBank 中的 *GuPIP1* 基因的全长编码区 cDNA 序列 (accession No. AY781788), 按照 Universal GenomeWalker Kit 的要求设计 2 个特异引物: 引物 1: 5'-AGCGGCTGTCTCTCCGGGAAGTTGTC-3' 和引物 2: 5'-GACACATCTTGTTCCCTTCCCTCCATC-3'。特异引物 1、2 分别位于 AY781788 序列的 120~146 和 84~110, 由上海生物工程公司合成。

甘草 *GuPIP1* 基因的启动子扩增时, 取 4 个 1.5 mL 的离心管, 放入 2.5 μ g 甘草基因组 DNA, 分别用 *Dra*I、*Eco*RV、*Pvu*I 和 *Stu*I 进行酶切。按 Universal GenomeWalker Kit 提供的方法对酶切产物进行纯化。纯化后基因组 DNA 与 GenomeWalker Adaptors 连接。依据 Universal GenomeWalker Kit 提供的方法及反应条件, 利用特异引物 1、引物 2 分别与试剂盒提供的接头引物进行第 1 轮和第 2 轮 PCR。

扩增片段与 pCR[®]2.1-TOPO[®] TA 克隆载体连接, 得到 pCR[®]2.1-TOPO[®]-T-*GuPIP1*-P 载体, 转化大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α , 筛选重组子酶切鉴定, 由上海生物工程公司测序。

GuPIP1 基因启动子序列调控元件分析以植物顺式调控元件数据库 PlantCARE 和 PLACE 完成。

结果与讨论

1 甘草 *GuPIP1* 基因上游 DNA 序列分离

用 4 个内切酶分别对甘草基因组 DNA 进行酶

切, 3 个酶切完全(*Dra*I、*Stu*I 和 *Pvu*I), 1 个酶切不十分完全(图 1)。酶切产物经与接头连接, 分别作为 PCR 扩增的模板, 经过 2 轮 PCR 扩增后 *Eco*RV 酶切的模板能扩增出特异条带(图 2), 该片段经琼脂糖凝胶回收连接到 pCR[®]2.1-TOPO[®] TA 载体上, 筛选阳性克隆并测序。

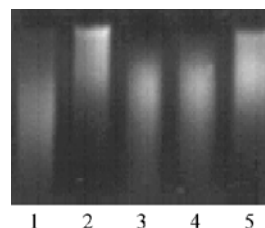


图 1 甘草基因组 DNA 酶切电泳图谱

Fig.1 Gel electrophoresis of digested *G. uralensis* genomic DNA
1: *Dra*I; 2: *Eco*RV; 3: *Stu*I; 4: *Pvu*I; 5: 对照(试剂盒提供)。

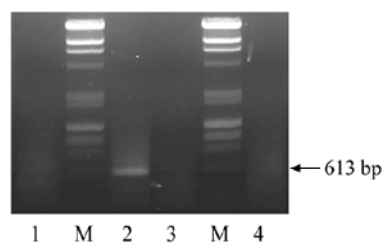


图 2 酶切产物第 2 轮 PCR 电泳图谱

Fig.2 Gel electrophoresis of the secondary PCR products using digested genomic DNA as templates
1: *Dra*I; 2: *Eco*RV; 3: *Stu*I; 4: *Pvu*I; M: 分子量标准。

2 序列分析

测序后分析表明, 获得 *GuPIP1* 基因启动子序列 613 bp (图 3)。采用 Promoter predictions 和 PlantCARE 等软件进行基础启动子区及调控元件分析的结果表明, 该序列具有启动子的基本转录元件: TATA-box 位于 -122、-488 和 -524 处; CAAT-box 位于 -90、-200、-242、-284 和 -346 处; GATA-box 位于 -40、-226、-278、-526、-533 和 -569 处; 此外还含有 A-box 和抑制子元件 WRKY710S 以及多个与非生物胁迫相关的顺式作用元件(表 1)。

序列分析结果表明, 所分离的启动子含有多处 DPBFCOREDCDC3、MYB1AT、MYB2CONSENSUSAT 和 MYBCORE 等元件, 此类元件均为干旱和脱落酸响应的顺式作用反应元

```

-613 ATCCGCGAATACCCGCGAATTCACGGGTACTCACTAAAATCTAGATAACGAGTACCCACACGGGTATGGGACAAATACAGATAACGGAT
                                     GATA-box                                     GATA-box GATA-box
-523 ATATTAAACGAGACGAGTAACAAGAAGCTACTAATATATCCGACTCCGCCGATTTACCTCCCTAATTAGAAACTAAATGAGATCACCC
    TATA-box                                     TATA-box                                     CAAT-box
-493 GAACCTCTCTGAAATTAAGTGACTTTTTTACAAATTCGATCGTGTATTCTCTCTCCCGTGCTGTGCCAGAACATGGTGGGGCCGGG

-343 AAATACATGGCTAGCGCCGCGCAGCTAGGACAGCGTGTGTGCGATCGAAATTAATTCCAATCATATCCCTCCAGCGAAAGGGACCGAT
                                     CAAT-box GATA-box
-253 TCATGAATATGATTGGACGCCAAAAAGATAAGAAACCAACCTCTACAAAATCCAATACATGGGACCCACCGCACCACCGATCTCTCTA
    CAAT-box GATA-box CAAT-box
-163 GTCAGTCACTGCTTTTGTGATTAGTTTTAACCCAACTGGTTATAAAATGAAACACCTCACATACACTCTCATCAATCATCAGCAGCACC
                                     TATA-box CAAT-box
-73 ACAAGTACTCCATCAGCTTCATTACAGCAAGAGATAAGGTGTGA AATTAATTAACCCTAAAAAGGAAGATG
                                     GATA-box
    
```

图3 甘草 *GuPIPI* 基因启动子序列

Fig.3 Nucleotide sequence of cloned *GuPIPI* gene promoter from *G. uralensis*

表1 甘草 *GuPIPI* 基因启动子顺式元件预测

Table 1 Predicting *cis*-acting elements of the *GuPIPI* gene promoter from *G. uralensis*

调控序列名称	位置(链)	序列	特性
TATA-box	-122; -488; -524	TATA	距转录起始位点30个碱基的启动子中心元件
A-box	-239(-)	CCTGCC	顺式调控元件
WRKY71OS	-451; -467	TGAC	抑制子元件
ARE	-220(-)	TGGTTT	厌氧胁迫必需的顺式调控元件
AT1-motif	-33(-)	ATTAATTTTACA	光应答相关元件
Box 4	-27(+); -292(+)	ATTAAT	光应答相关元件
CAAT-box	-90(+); -200(+); -242(-); -284(+); -346(-)	CAAT	启动子和增强子区的顺式调控元件
GATA-box	-40(+); -226(+); -278(-); -526(+); -533(+); -569(+)	GATA	启动子和增强子区的顺式调控元件
TCA-element	-15(+); -6(-)	CAGAAAAGGA CCATCTTTTT	水杨酸应答顺式调控元件
GA-motif	-10	AAGGAAGA	光应答相关元件
GT1-motif	-127(-)	GGTTAA	光应答相关元件
DPBFCOREDCDC3	-555(+)	ACACNNG	干旱和脱落酸应答相关元件
MYB1AT	-118	WAACCA	干旱和脱落酸应答顺式调控元件
MYB2CONSENSUSAT	-531	YAACKG	干旱和脱落酸应答顺式调控元件
MYBCORE	-83	CNGTTR	干旱和脱落酸应答顺式调控元件
I-box	-41(+); -227(+)	AGATAAG	光应答相关元件
MNF1	-368(+)	GTGCC	光应答相关元件
CIRCADIAN	-384(+)	CAANNATC	昼夜节律顺式调控元件

件, 因此推测该启动子受干旱和 ABA 诱导表达。这与我们通过 real-time PCR 研究甘草质膜水通道蛋白 *GuPIPI* 表达的结果(Wang 等 2007)一致。此外还有与光响应有关的顺式调节元件 GA-motif 和 I-box 等及节律调控反应顺式元件 CIRCADIAN, 因此认为, 该启动子可能是一个受日夜节律周期调控的启动子。这些调控元件的真实性还有待进一步证明。经数据库比对和查新还未见有该序列的报道, 已登录 GenBank (Accession No. EU

262597)。

总之, 高等植物基因表达调控的研究已不断深入, 但干旱逆境胁迫诱导基因的研究还很少。水通道蛋白在植物逆境应答中起作用, 对其基因受环境因子调控的研究越来越受到人们的关注。而选择合适的特异性启动子是开展耐干旱和脱水转基因研究的重要环节。获得诱导型的启动子以调节抗旱基因的表达, 方可以更有效的发挥目的基因的作用, 这对保持植物本身的抗逆性和生理状

态来说是十分有利的。本文在这种思路的基础上,开展甘草中质膜水通道蛋白 *GuPIPI* 启动子的克隆和其功能的初步分析结果,可能对甘草 *GuPIPI* 基因的进一步研究和转基因研究选择启动子有一定的参考价值。由于目前所获得的启动子序列长度有限,我们正以染色体步行的方法,以期获得更长的启动子序列,用突变和缺失的方法对所预测调控元件的功能进行更深入的研究。

参考文献

- 姚伟, 耿广良, 余爱丽, 张木清, 陈如凯(2004). 一种改良的转基因甘蔗基因组 DNA 提取方法. 热带亚热带植物学报, 12 (3): 257~260
- Chaumont F, Barrieu F, Wojcik E, Chrispeels MJ, Jung R (2001). Aquaporins constitute a large and highly divergent protein family in maize. *Plant Physiol*, 125 (3): 1206~1215
- Chrispeels MJ, Morillon R, Maurel C, Gerbeau P, Kjellbom P, Johansson I (2001). Aquaporins in plants: structure, function, regulation, and roles in plant water relations. *Curr Top Membr* 51: 277~334
- Higuchi T, Suga S, Tsuchiya T, Hisada H, Morishima S, Okada Y, Maeshima M (1998). Molecular cloning, water channel activity and tissue specific expression of two isoforms of radish vacuolar aquaporin. *Plant Cell Physiol*, 39 (9): 905~913
- Johanson U, Karlsson M, Johansson I, Gustavsson S, Sjövall S, Fraysse L, Weig AR, Kjellbom P (2001). The complete set of genes encoding major intrinsic proteins in *Arabidopsis* provides a framework for a new nomenclature for major intrinsic proteins in plants. *Plant Physiol*, 126 (4): 1358~1369
- Kammerloher W, Fischer U, Piechottka GP, Schäffner AR (1994). Water channels in the plant plasma membrane cloned by immunoselection from an expression system. *Plant J*, 6 (2): 187~199
- Karlsson M, Johansson I, Bush M, McCann MC, Maurel C, Larsson C, Kjellbom P (2000). An abundant TIP expressed in mature highly vacuolated cells. *Plant J*, 21 (1): 83~90
- Törnroth-Horsefield S, Wang Y, Hedfalk K, Johanson U, Karlsson M, Tajkhorshid E, Neutze R, Kjellbom P (2006). Structural mechanism of plant aquaporin gating. *Nature*, 439 (7077): 688~694
- Wang F, Jiang Y, Feng XC, Xu LN, Li MT, Liang HT, Li YM, Zhu N, Liu YL, Ma TH (2007). Molecular cloning of a *Glycyrrhiza uralensis* F. aquaporin *GuPIPI* that is up-regulated in response to drought, salt and ABA stress. *Chem Res Chin Univ*, 23 (1): 52~57
- Weaver CD, Crombie B, Stacey G, Roberts DM (1991). Calcium-dependent phosphorylation of symbiosome membrane proteins from nitrogen-fixing soybean nodules. *Plant Physiol*, 95 (1): 222~227