

## 拟南芥干旱诱导型启动子 RD29A 驱动花生 *AhNCED1* 基因双元表达载体的构建

万小荣<sup>1</sup>, 李玲<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> 仲恺农业技术学院生命科学学院, 广州 510225; <sup>2</sup> 华南师范大学生命科学学院, 广州 510631

**摘要:** 从拟南芥基因组中克隆 *RD29A* 基因 5'-侧翼 520 bp 启动子区域序列, 生物信息学分析表明, 该启动子片段中存在脱水胁迫响应元件(DRE)、ABA 响应元件(ABRE)、TATA-box、CAAT-box 等顺式作用元件。构建了干旱诱导型启动子 AtRD29Ap 驱动花生 *AhNCED1* 基因的植物双元表达载体 pAtRD29Ap::AhNCED1。

**关键词:** *RD29A* 基因启动子; *NCED* 基因; 双元载体构建

## Construction of Binary Vector Harboring Peanut *AhNCED1* Gene Driven by Drought-inducible Promoter of *RD29A* Gene from *Arabidopsis*

WAN Xiao-Rong<sup>1</sup>, LI Ling<sup>2,\*</sup>

<sup>1</sup> College of Life Sciences, Zhongkai University of Agriculture and Technology, Guangzhou 510225, China; <sup>2</sup> College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou 510631, China

**Abstract:** In this paper we report the cloning of 5'-flanking promoter sequence of drought-inducible *RD29A* gene from *Arabidopsis* and its fusion with peanut *AhNCED1* gene. The 520-bp promoter sequence was analyzed bioinformatically in the database of plant *cis*-acting regulatory element (PlantCARE). The result showed that there were several important *cis*-acting elements, including TATA-box, CAAT-box, DRE (response to dehydration), ABRE (response to ABA), in the 520-bp promoter region. The binary vector harboring *AhNCED1* gene driven by AtRD29A promoter was further constructed to be used in coming plant transgene.

**Key words:** *RD29A* gene promoter; nine-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase (*NCED*) gene; binary vector construction

生物化学和遗传学实验的结果证明, 9-顺式紫黄质或 9-顺式新黄质裂解形成黄质醛是高等植物脱落酸(abscisic acid, ABA)生物合成的限速步骤, 催化该反应的 9-顺式环氧类胡萝卜素双加氧酶(nine-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase, *NCED*)则是调控 ABA 生物合成的关键酶(Nambara 和 Marion-Poll 2005; Taylor 等 2005)。自从玉米突变体 *vp14* (Tan 等 1997)中克隆 *ZmVP14* 基因(即 *NCED* 基因)以来, 已相继在番茄、菜豆(Qin 和 Zeevaart 1999)、豇豆(Iuchi 等 2000)、美国鳄梨、拟南芥(Iuchi 等 2001)、葡萄(Soar 等 2004)、柑橘(Rodrigo 等 2006)、龙胆(Zhu 等 2007)中克隆了 *NCED* 基因。干旱胁迫诱导植物叶片中 *NCED* 基因表达与 ABA 累积水平相一致(Qin 和 Zeevaart 1999; Iuchi 等 2000)。烟草中异位表达(ectopic expression)番茄 *LeNCED1* 基因可提高转基因植物 ABA 水平(Thompson 等 2000), 过表达 *AtNCED3*

基因则提高转基因拟南芥的内源 ABA 水平和抗旱性(Iuchi 等 2001)。我们从花生叶中克隆了 ABA 生物合成关键酶基因——*AhNCED1* 基因(GenBank Accession No. AJ574819), 发现其表达受干旱胁迫诱导, 在拟南芥中异位表达 *AhNCED1* 基因可提高转基因植物的 ABA 含量和抗旱性(Wan 和 Li 2005, 2006)。早期的研究已查明, 不同花生品种的抗旱性与其体内 ABA 水平呈正相关, 因此合适时地调控花生体内 ABA 水平对提高植株抗旱性有一定意义(Li 和 Pan 1996)。

本文报道从拟南芥中克隆干旱诱导基因

收稿 2007-01-08 修定 2007-03-16

资助 广东省自然科学基金(06301202)、仲恺农业技术学院博士启动基金(G2360225)和广东省自然科学基金(06025049)。

\* 通讯作者(E-mail: lilab@scnu.edu.cn; Tel: 020-85211378)。

*RD29A* 启动子片段, 将此序列在国际植物顺式作用元件数据库中进行生物信息学分析鉴定, 并构建*RD29A*启动子驱动花生*AhNCED1*基因的植物双元表达载体, 为尔后用植物基因工程技术综合适时地调控花生体内ABA水平和为花生品种改良及抗旱育种累积了基础资料。

### 材料与方法

按Wan和Li(2006)的方法培养拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L. ecotype Columbia, Col-0)。*RD29A*基因启动子片段克隆时, 采用修改的SDS(十二烷基磺酸钠)法提取拟南芥叶片基因组DNA(Wan和Li 2006)。根据Yamaguchi-Shinozaki和Shinozaki(1993, 1994)报道的拟南芥*RD29A*

基因序列(GenBank Accession No. D13044)设计一对特异引物(P1: 5' GAATTCATTCAATTT-TAATTTTACGTAT 3'; P2: 5' AGATCT-GTTTGATCCATTTTCCAAAGA 3'), 用于从拟南芥基因组中PCR扩增干旱诱导型启动子片段*AtRD29Ap*, 将PCR产物克隆到pMD 18-T载体(TaKaRa)上, 通过PCR和酶切检测获得阳性克隆(含pMD 18-*AtRD29Ap*载体)后, 送上海生工生物技术有限公司测序, 获得*AtRD29Ap*的序列。构建*AtRD29Ap::AhNCED1*融合基因时, 以来源于pCAMBIA1301的p35S::ORF为基本植物双元表达载体, p35S::ORF载体含CaMV 35S启动子驱动的花生*AhNCED1*基因完整编码框(Wan和Li 2006)。以引入的*EcoRI*和*BglIII*两个限制性内切酶酶切

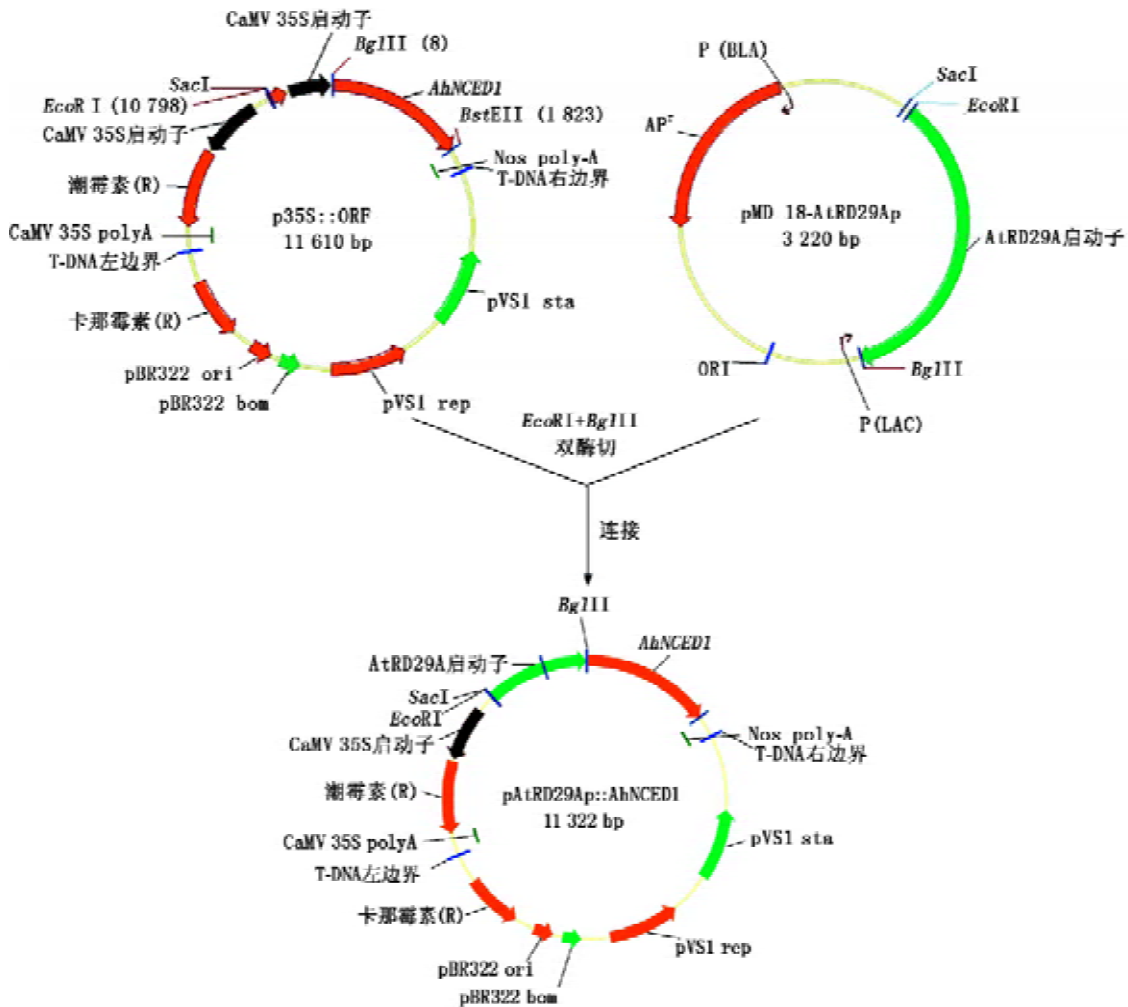


图1 *RD29A*基因启动子驱动花生*AhNCED1*基因的双元表达载体的构建

Fig.1 Construction of binary vector harboring peanut *AhNCED1* gene fused with *Arabidopsis RD29A* gene promoter

pMD 18-AtRD29Ap 载体, 获取 *RD29A* 基因启动子片段并克隆到 p35S::ORF 载体 *AhNCED1* 基因上游以替换 CaMV 35S 启动子, 构建成含 *AtRD29Ap::AhNCED1* 融合基因的植物双元表达载体 pAtRD29Ap::AhNCED1 (图 1)。

### 实验结果

#### 1 *RD29A* 基因启动子片段克隆与序列分析

以拟南芥基因组 DNA 为模板, P1 和 P2 为引物, 进行 PCR 扩增, 结果扩增出一约 500 bp 的 DNA 片段(图 2)。将此片段回收后克隆到 pMD 18-T 载体上, 通过 PCR (以 P1 和 P2 为引物)和酶切 (*EcoRI* 和 *BgIII* 双酶切)检测(图 2), 筛选并获取含 pMD 18-AtRD29Ap 载体的阳性克隆, 送上海生工生物技术有限公司测序。测序结果表明 PCR 产物为一 532 bp 的 DNA 序列, BLAST 分析(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST/>)表明, 该序列中 520 bp 的启动子片段(含 11 bp *RD29A* 基因编码区序列)与 Yamaguchi-Shinozaki 和 Shinozaki (1993) 报道的序列完全吻合。将这 520 bp 序列在国际植物顺式作用元件数据库 PlantCARE (Lescot 等 2002) 中进行生物信息学分析, 搜寻结果表明(图 3), 在该启动子序列 -114~-109 (*RD29A* 基因 ATG 上游)处有一典型的 TATA-box (Kurkela 和 Franck 1990); -144~-137 处有 ABA 响应元件(ABA response element, ABRE), 核心序列为 TACGTGTC; -252~-225 处

为一 C-repeat/DRE 元件, 响应低温、脱水胁迫 (Yamaguchi-Shinozaki 和 Shinozaki 1993); -305~-297 处有一典型的水分胁迫诱导 *RD29A* 基因表达所必需的脱水响应元件(dehydration-responsive element, DRE), 核心序列为 TACCGACAT (Yamaguchi-Shinozaki 和 Shinozaki 1994); -367~-363 处为一推测的 CAAT-box, 核心序列为 CCAAT (Yamaguchi-Shinozaki 和 Shinozaki 1993)。

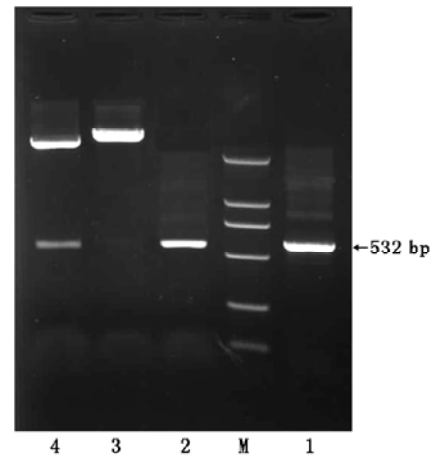


图 2 拟南芥 *RD29A* 基因启动子片段的克隆  
Fig.2 Cloning of *RD29A* gene promoter fragment from *Arabidopsis*

M: DL2000 DNA marker; 1: 以拟南芥基因组 DNA 为模板的 PCR 扩增 *RD29A* 基因启动子片段; 2: PCR 检测 pMD 18-AtRD29Ap 载体; 3: pMD 18-AtRD29Ap 质粒(酶切负对照); 4: *EcoRI* 和 *BgIII* 双酶切检测 pMD 18-AtRD29Ap 载体。

```

1  ATTCAATTTTAATTTTACGTATAAAATAAAAGATCATACCTATTAGAACGATTAAGGAGA
61  AATACAATTCGAATGAGAAGGATGTGCCGTTTGTATAATAAACAGCCACACGACGTAA
120 ACGTAAAATGACCACATGATGGGCCAATAGACATGGACCGACTACTAATAATAGTAAGT
      CAAT-box
179 TACATTTTAGGATGGAATAAATATCATACCGACATCAGTTTTGAAAGAAAAGGGAAAAA
      DRE
238 AAGAAAAAATAAATAAAAGATATACTACCGACATGAGTTCCAAAAAGCAAAAAAAAAAG
      C-repeat/DRE
296 ATCAAGCCGACACAGACACGCGTAGAGAGCAAAATGACTTTGACGTCACACCACGAA
353 AACAGACGCTTCATACCGTGTCCCTTTATCTCTCTCAGTCTCTCTATAAACTTAGTGAGAC
      ABRE                                TATA-box
413 CCTCTCTGTTTTACTCACAAATATGCAAACTAGAAAACAATCATCAGGAATAAAGGGT
472 TTGATTACTTCTATTGGAAAGAAAAAATCTTTGGAAAATGGATCAAAC
      起始密码子
    
```

图 3 PlantCARE 数据库中搜寻的拟南芥 *RD29A* 基因启动子片段

Fig.3 The 520-bp sequence of *Arabidopsis RD29A* gene promoter submitted to the database of plant *cis*-acting regulatory element (PlantCARE)

由此表明, 所克隆的 *RD29A* 基因上游 5' 端序列为包含各种顺式作用元件的启动子片段(*AtRD29Ap*)。

## 2 *AtRD29Ap::AhNCED1* 融合基因构建

用 *EcoRI* 和 *BglII* 双酶切 pMD 18-*AtRD29Ap* 载体, 回收酶切得到的 *AtRD29Ap* 启动子片段, 连接于同样经 *EcoRI* 和 *BglII* 双酶切的植物双元表达载体 p35S::ORF 上, 替换 p35S::ORF 载体上驱动 *AhNCED1* 基因的 CaMV 35S 启动子, 得到含 *AtRD29Ap::AhNCED1* 融合基因的植物双元表达载体 p*AtRD29Ap::AhNCED1* (图 1)。对 p*AtRD29Ap::AhNCED1* 载体 *AtRD29Ap* 与 *AhNCED1* 基因结合区 (junction area) 测序, 结果表明, 在 *AhNCED1* 基因起始密码子 ATG 之前插入了一 18 bp 序列 (ATGGATCAAACAGATCTC, 其中 ATGGATCAAAC 11 bp 序列为 *RD29A* 基因编码区序列, AGATCTC 序列是根据 p35S::ORF 载体设计的), 不会改变 *AhNCED1* 基因的读码框; *AhNCED1* 基因的功能保守区域在 3' 端, 5' 端插入 18 bp 序列后没影响到 *AhNCED1* 基因的功能结构域。

对构建的 p*AtRD29Ap::AhNCED1* 载体进行 PCR 和酶切检测, 结果以 P1 和 P2 为引物可特异地扩增出 532 bp 的 PCR 产物; *EcoRI* 和 *BglII* 双酶切 p*AtRD29Ap::AhNCED1* 载体可切下相应大小的 DNA 片段(图 4)。说明已构建了干旱诱导型启动子 *AtRD29Ap* 驱动花生 *AhNCED1* 基因的植物双元表达载体。

## 讨 论

NCED 催化 9-顺式环氧类胡萝卜素裂解成为黄质醛是高等植物 ABA 生物合成的关键步骤。*AhNCED1* 是干旱胁迫下花生叶片中调控 ABA 生物合成的关键基因, 在拟南芥中异位表达 *AhNCED1* 基因提高了转基因植物的 ABA 含量和抗旱性(Wan 和 Li 2005, 2006)。许多研究(刘吉升和李玲 2006; 万小荣和李玲 2006)表明, 不同花生品种的抗旱性与其体内 ABA 水平呈正相关, 干旱胁迫下, 抗旱性强的花生品种中 *AhNCED1* 基因表达水平高于抗旱性相对弱的品种, 与 ABA 累积水平一致。因而综合适时地调控花生体内 ABA 水平对提高植株抗旱性有作用。

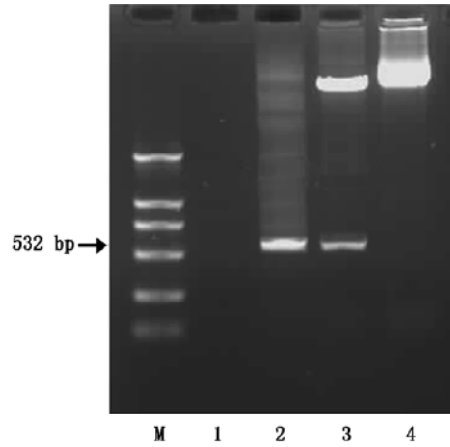


图 4 p*AtRD29Ap::AhNCED1* 载体的 PCR 和酶切检测

Fig.4 PCR and double digestion check of the binary vector of p*AtRD29Ap::AhNCED1*

M: DL2000 DNA marker; 1: PCR 系统负对照; 2: PCR 检测 p*AtRD29Ap::AhNCED1* 载体; 3: *EcoRI* 和 *BglII* 双酶切检测 p*AtRD29Ap::AhNCED1* 载体; 4: p*AtRD29Ap::AhNCED1* 质粒(酶切负对照)。

选择适宜的启动子来驱动目的基因在转基因植物中表达已成为植物基因工程研究的热点问题之一。针对不同的目的基因, 人们选用不同的启动子, 从而使靶基因在特定组织或条件下表达, 以利转基因植物的正常生长发育(赵恢武等 2000; 刘强等 2000)。拟南芥 *RD29A* 基因的启动子被认为是干旱、高盐和低温诱导型启动子, 具 DRE 及 ABRE, 在逆境时可驱动靶基因大量表达, 从而提高转基因植物的抗逆性, 因此, 它已成为植物抗逆基因工程中首选的启动子。本文克隆了拟南芥 *RD29A* 基因上游 5' 侧翼 520 bp 序列, 此种启动子片段的生物信息学分析表明, 其中包括分别对脱水胁迫、ABA 响应的 DRE、ABRE 等顺式作用元件(图 3)。进一步构建了 *RD29A* 基因启动子驱动花生 *AhNCED1* 基因的植物双元表达载体 p*AtRD29Ap::AhNCED1* (图 1 和图 4)。干旱虽能诱导 *AhNCED1* 基因表达, 但在抗旱性弱的品种中诱导表达量低, 故我们选用拟南芥 *RD29A* 基因启动子, 构建 *AtRD29Ap::AhNCED1* 融合基因, 使转基因植物仅在干旱条件下大量表达目的基因, 以利转基因植物的正常生长发育。我们将本文构建的 p*AtRD29Ap::AhNCED1* 载体转入抗旱性较弱花生品种后的结果表明, 干旱胁迫下转基因花生植

株中内源 ABA 累积水平明显高于野生型, 抗旱性增强; 正常生长条件下, 两者无显著区别(资料未列出)。这些为采用植物基因工程综合适时地调控花生体内 ABA 水平、改良花生品种和抗旱育种奠定了基础。

### 参考文献

- 刘吉升, 李玲(2006). 不同品种花生的抗旱能力及其与内源 ABA 的关系. 植物生理学通讯, 42 (6): 1115~1116
- 刘强, 赵南明, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2000). DREB 转录因子在提高植物抗逆性中的作用. 科学通报, 45 (1): 11~16
- 万小荣, 李玲(2006). 脱水胁迫下抗旱性不同花生品种中某些生理生化指标变化比较. 植物生理学通讯, 42 (6): 1117~1118
- 赵恢武, 陈杨坚, 胡鸢雷, 高音, 林忠平(2000). 干旱诱导性启动子驱动的海藻糖-6-磷酸合酶基因载体的构建及转基因烟草的耐旱性. 植物学报, 42 (6): 616~619
- Iuchi S, Kobayashi M, Taji T, Naramoto M, Seki M, Kato T, Tabata S, Kakubari Y, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2001). Regulation of drought tolerance by gene manipulation of 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase, a key enzyme in abscisic acid biosynthesis in *Arabidopsis*. Plant J, 27: 325~333
- Iuchi S, Kobayashi M, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2000). A stress-inducible gene for 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase involved in abscisic acid biosynthesis under water stress in drought-tolerant cowpea. Plant Physiol, 123: 553~562
- Kurkela S, Franck M (1990). Cloning and characterization of a cold- and ABA-inducible *Arabidopsis* gene. Plant Mol Biol, 15 (1): 137~144
- Lescot M, Déhais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y, Rouzé P, Rombauts S (2002). PlantCARE: a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences. Nucl Acids Res, 30 (1): 325~327
- Li L, Pan RC (1996). Increasing yield and drought resistance of groundnut using plant growth regulators. In: Achieving High Groundnut Yields. Proceedings of an International Workshop, Andhra Pradesh, India, 147~155
- Nambara E, Marion-Poll A (2005). Abscisic acid biosynthesis and catabolism. Annu Rev Plant Biol, 56: 165~185
- Qin X, Zeevaart JAD (1999). The 9-cis-epoxycarotenoid cleavage reaction is the key regulatory step of abscisic acid biosynthesis in water-stressed bean. Proc Natl Acad Sci USA, 96: 15354~15361
- Rodrigo MJ, Alquezar B, Zacarias L (2006). Cloning and characterization of two 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase genes, differentially regulated during fruit maturation and under stress conditions, from orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck). J Exp Bot, 57 (3): 633~643
- Soar CJ, Speirs J, Maffei SM, Loveys BR (2004). Gradients in stomatal conductance, xylem sap ABA and bulk leaf ABA along canes of *Vitis vinifera* cv Shiraz: biochemical and molecular biological evidence indicating their source. Funct Plant Biol, 31: 659~669
- Tan BC, Schwartz SH, Zeevaart JAD, McCarty DR (1997). Genetic control of abscisic acid biosynthesis in maize. Proc Natl Acad Sci USA, 94: 1235~1240
- Taylor IB, Sonneveld T, Bugg TDH, Thompson AJ (2005). Regulation and manipulation of the biosynthesis of abscisic acid, including the supply of xanthophyll precursors. J Plant Growth Regul, 24: 1~21
- Thompson AJ, Jackson AC, Symonds RC, Mulholland BJ, Dadswell AR, Blake PS, Burbidge A, Taylor IB (2000). Ectopic expression of a tomato 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene causes over-production of abscisic acid. Plant J, 23 (3): 363~374
- Wan XR, Li L (2005). Molecular cloning and characterization of a dehydration-inducible cDNA encoding a putative 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase in *Arachis hypogaea* L. DNA Seq, 16 (3): 217~223
- Wan XR, Li L (2006). Regulation of ABA level and water-stress tolerance of *Arabidopsis* by ectopic expression of a peanut 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase gene. Biochem Biophys Res Commun, 347 (4): 1030~1038
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1993). Characterization of the expression of a desiccation-responsive *rd29* gene of *Arabidopsis thaliana* and analysis of its promoter in transgenic plants. Mol Gen Genet, 236: 331~340
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1994). A novel cis-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low temperature, or high-salt stress. Plant Cell, 6: 251~264
- Zhu C, Kauder F, Romer S, Sandmann G (2007). Cloning of two individual cDNAs encoding 9-cis-epoxycarotenoid dioxygenase from *Gentiana lutea*, their tissue-specific expression and physiological effect in transgenic tobacco. J Plant Physiol, 164 (2): 195~204