

三七鲨烯环氧酶基因(SE)启动子的瞬时表达分析

卢荣江, 刘迪秋, 葛锋*, 陈朝银

昆明理工大学生命科学与技术学院, 昆明650500

摘要: 采用PCR方法扩增鲨烯环氧酶(SE)基因启动子序列, 研究SE基因在三七生物合成途径中的表达调控规律。为了确认启动子表达的最佳启动区域, 构建SE启动子430、922、1 323和1 872 bp的5'端缺失片段, 并将这些缺失片段分别与葡萄糖苷酸酶(GUS)基因融合, 构建植物表达载体。采用农杆菌介导法转化烟草, 在烟草叶片中进行瞬时表达分析。组织化学染色和GUS荧光定量分析结果显示, 4个不同长度片段的启动子均有启动活性, 且随着缺失长度增加启动活性呈增加趋势。

关键词: 三七; 鲨烯环氧酶; 启动子; 瞬时表达

Transient Expression Analysis of Squalene Epoxidase Gene (SE) Promoter from *Panax notoginseng*

LU Rong-Jiang, LIU Di-Qiu, GE Feng*, CHEN Chao-Yin

Faculty of Life Science and Technology, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China

Abstract: In order to study the expression and regulation of squalene epoxidase (SE) gene in the biosynthesis pathway in *Panax notoginseng*, the SE promoter was cloned by PCR method. To determine the optimal promoter sequence for gene expression, SE promoter was deleted from its 5' end to form promoter fragments with 430, 922, 1 323 and 1 872 bp. Such fragments were fused to a β -glucuronidase (GUS) gene. The fused genes were transformed into *Nicotiana tabacum* using *Agrobacterium tumefaciens*-mediated method for transient expression. Histochemical staining and GUS quantitative fluorometric assays demonstrated that the four different length fragments of the promoter had promoter activities and the activities were increased with the deleted length of promoters.

Key words: *Panax notoginseng*; squalene epoxidase; promoter; transient expression

启动子在基因的转录起始和转录频率的调控中起决定性作用, 控制结构基因的表达起始时间和表达程度的强弱。目前, 确定启动子的功能区段, 较为有效的方法是5'端缺失分析, 该方法通过PCR扩增将已知的启动子缺失为5'端不同长度的区段, 然后将这些缺失区段与报告基因(如葡萄糖苷酸酶基因和绿色荧光蛋白基因等)连接, 构建启动子融合报告基因表达载体, 再转化受体(烟草或拟南芥), 通过检测报告基因的瞬时表达情况进而确定启动子不同缺失区段的功能(郑晓瑜等2011)。

三七为五加科人参属植物, 根入药, 主产于我国云南省文山州。其活性成分包括皂苷、三七素、糖类、氨基酸、黄酮、油脂及微量元素等, 其中, 三七总皂苷是三七主要的活性成分。根据国内外学者对三七总皂苷的研究, 其具有降低心肌耗氧量、改善心肌缺血、抗心律失常、降血

压、降血脂、防动脉粥样硬化、抗肝纤维化、抗肥胖等功效, 同时在神经系统、物质代谢以及消炎、抗肿瘤等诸方面都有较好的药理活性, 尤其在防治心脑血管疾病疗效显著(Ng 2006; 张云峰等2006)。三七为多年生植物, 生长周期长, 对生长环境要求苛刻, 适宜种植三七的面积十分有限。同时, 三七种植病虫害严重, 在一定程度上制约了三七产业的可持续发展(Guo等2010)。随着基因工程和分子生物学技术的进步和发展, 与三七皂苷合成途径相关酶的基因得以克隆(石磊等2010), 但由于三七皂苷具有种类多、结构复杂的特点, 使得调控三七皂苷合成途径的代谢流遗传操作存在

收稿 2014-12-11 修定 2015-03-06

资助 国家自然科学基金项目(31260070)。

* 通讯作者(E-mail: gefeng@tsinghua.org.cn; Tel: 0871-65920621)。

一定困难。随着研究的不断深入,将来有可能通过组合生物合成技术获得三七皂苷,为三七产业的可持续发展奠定基础。

药用植物体内少数前体物质如乙酸、莽草酸和甲羟戊酸可以产生黄酮类、固醇类、萜类、皂苷类等次生代谢产物(秦玉芝等2007)。三七皂苷为四环三萜皂苷,是三七重要的次生代谢产物,在胞质中以乙酰辅酶A为前体的甲羟戊酸途径合成。三七皂苷合成途径大部分相关酶基因已克隆,其功能已经在原核及真核细胞中得以验证,然而对三七皂苷合成途径中的转录调控研究不多。鲨烯环氧酶(squalene epoxidase, SE)被认为是三七皂苷合成途径的关键限速酶之一,该酶基因已被克隆(石磊等2010),但其启动子功能研究至今尚未开展。根据已克隆的SE基因启动子(卢荣江等2014),我们拟进一步分析其启动子的功能,以期更好地明确SE基因在整个三七皂苷合成途径中的地位。本研究根据SE基因启动子序列,设计特异性引物,扩增出SE基因的启动子全长及3段不同长度5'端缺失片段并分别构建融合葡萄糖苷酸酶(β -glucuronidase, GUS)基因的植物表达载体,通过瞬时表达对该启动子的功能进行初步分析,以期为将来研究启动子的顺式作用元件与相关转录因子的互作提供依据。

材料与方法

1 实验材料与主要试剂

用于基因组DNA提取的三七[*Panax notoginseng* (Burk.) F. H. Chen]植株采自云南省文山州,烟草(*Nicotiana tabacum*)、大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 α 、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105和pBI121质粒载体由本实验室保存。克隆载体pGEM-T Easy购自Promega公司,胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、GUS组织化学染色底物5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-葡萄糖苷酸(5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronide, X-Gluc)和GUS活性检测底物4-甲基伞形酮- β -D-葡萄糖醛酸苷(4-methylumbelliferyl- β -D-glucuronide, 4-MUG)等购自上海生工生物工程有限公司。LA *Taq*酶、T4 DNA连接酶以及限制性酶切酶等相关试剂购自TaKaRa生物工程有限公司。

2 三七SE基因启动子的克隆

采用经改良的CTAB法(李荣华等2009)提取三七基因组DNA,溶于含RNase A的TE缓冲液中,经1.0%的琼脂糖凝胶电泳鉴定表明提取的基因组DNA完整,可应用于后续实验。根据已克隆的SE基因启动子序列设计引物(卢荣江等2014),扩增SE基因启动子5'端不同长度片段。上游引物分别为:SEP-D, 5'-aagcttGTGTTGCATATTTTTGAGTGCTTTC-3'; SEP-C, 5'-aagcttCATATACAAACATGCATAACCGCGG-3'; SEP-B, 5'-aagcttAAATACCGAACGCCCAAACCCCATATA-3'; SEP-A, 5'-aagcttGGAGAATCCTAATATGCCCCACACA-3'。下游引物为:SEP-DOWN, 5'-ggatccGGTGTTGGTTGGACGTTTCACGTTTC-3'。分别在上游和下游引物的5'末端引入HindIII和BamHI酶切位点。以三七基因组DNA为模板,用SEP-D和SEP-DOWN特异性引物扩增启动子全长序列。50 μ L的PCR反应体系含:1 μ L (200 ng)纯化后的三七基因组DNA、5 μ L 10 \times LA *Taq*缓冲液、4 μ L dNTPs (2.5 mmol \cdot L $^{-1}$)、上游和下游引物各0.5 μ L (10 μ mol \cdot L $^{-1}$)、0.5 μ L LA *Taq* (5 U \cdot μ L $^{-1}$)、38.5 μ L ddH $_2$ O。PCR反应程序如下:94 $^{\circ}$ C预变性5 min; 94 $^{\circ}$ C变性30 s, 59 $^{\circ}$ C退火30 s, 72 $^{\circ}$ C延伸2 min, 共32个循环;最后72 $^{\circ}$ C保温10 min。

将PCR产物经1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测,胶回收试剂盒回收纯化片段后连接pGEM-T载体,热激转化大肠杆菌DH5 α ,涂布于含有氨苄青霉素(100 mg \cdot L $^{-1}$)的LB固体培养基,于37 $^{\circ}$ C倒置培养12 h,挑取单克隆置于含有氨苄青霉素(100 mg \cdot L $^{-1}$)的LB液体培养基中,于37 $^{\circ}$ C摇床振荡培养8 h,进行菌液PCR检测,将阳性克隆菌株送往上海生工生物工程有限公司测序。提取测序结果正确的单克隆菌株质粒,并以其为模板,用SEP-C、SEP-B和SEP-A分别与SEP-DOWN配对形成的3对引物进行PCR,扩增启动子的缺失片段,PCR反应体系和程序与扩增全长相同。

3 植物表达载体的构建

采用质粒提取试剂盒分别提取pGEM-T-SEPD、pGEM-T-SEPC、pGEM-T-SEPB、pGEM-T-SEPA和pBI121载体质粒,同时分别对重组质粒pGEM-T-SEPD、pGEM-T-SEPC、pGEM-T-

SEPB、pGEM-T-SEPA和空质粒pBI121使用HindIII和BamHI进行双酶切,回收目的片段,采用T4 DNA连接酶连接,使不同SE启动子区段定向替换pBI121载体上的CaMV35S启动子。将获得的连接产物热激转化大肠杆菌DH5 α ,所获得重组质粒经硫酸卡那霉素(50 mg·L⁻¹)筛选和菌液PCR检测后,提取阳性菌株质粒并进行双酶切验证,获得p430、p922、p1323和p1872融合GUS基因的植物表达载体。

4 农杆菌介导转化烟草

采用CaCl₂冻融法将构建好的植物表达载体转化根癌农杆菌EHA105感受态细胞中,于28℃倒置培养2~3 d,挑取单克隆,菌液用PCR检测获得阳性菌株。用打孔器将烟草叶片打出一个圆形叶盘,形成切口后置于农杆菌菌液(*A*₆₀₀约为0.6)中,室温侵染15 min,期间轻微摇晃。用无菌滤纸将叶片表面的多余农杆菌菌液吸干,平铺于含有乙酰丁香酮(20 mg·L⁻¹)的MS固体培养基,于28℃暗培养2 d。用无菌水将侵染后的烟草叶片洗涤数次,再用干净的滤纸吸干备用(一部分用于组织化学染色,另一部分用于GUS荧光定量分析)。采用Jefferson等(1987)的方法对组织材料进行GUS组织化学染色,37℃染色过夜,然后使用75%乙醇进行脱色处理,期间更换数次至阴性对照无绿色残留,观察并拍照。GUS活性检测缓冲液中包含50 mmol·L⁻¹磷酸钠缓冲液(pH 7.0)、10 mmol·L⁻¹ Na₂EDTA、0.1% (V/V) Triton X-100、0.1 mol·L⁻¹ K₄Fe(CN)₆、0.1 mol·L⁻¹ K₃Fe(CN)₆、0.5 mg·mL⁻¹ X-Gluc和20%甲醇。

5 GUS活性荧光检测

将处理好的烟草叶片迅速置于液氮中并研磨成粉末,参考Jefferson等(1987)的方法进行GUS活性的荧光定量分析,每个片段分别取3个叶盘,每个叶盘均进行3次重复。取GUS蛋白提取物上清液10 μ L,采用考马斯亮蓝法测定样品的蛋白含量(Bradford 1976),以每min水解4-MUG生成1 nmol 4-甲基伞形酮(4-MU)的酶量为1个活力单位,GUS活性以每mg总蛋白的酶活力计算,表示为nmol (4-MU)·min⁻¹·mg⁻¹ (蛋白)。

实验结果

1 三七SE基因启动子的克隆

以纯化的三七基因组DNA为模板,经PCR扩增克隆出一条约为1.8 kb大小的特异性条带(图1),和预期大小一致。将目的片段纯化后,连接pGEM-T载体,经过菌液PCR验证后,获得阳性克隆,测序结果显示,该序列长度为1 872 bp。以pGEM-T-SEPD质粒为模板,用3条缺失片段的特异性引物分别进行PCR扩增,1.0%的琼脂糖凝胶电泳检测,结果见图1。

2 pBI121-SEP植物表达载体的构建及制备pBI121-SEP的工程菌

为验证SE基因启动子的功能,根据已经克隆的SE启动子序列,分别设计5条引物,同时分别在5'端引入相应的酶切位点,PCR获得SE基因5'上游不同长度片段,将这4个片段分别定向替换pBI121载体上的CaMV35S启动子,通过双酶切、连接并转化大肠杆菌DH5 α 后进行菌液PCR检测,最后经双酶切检测(图2),结果显示已成功获得启动子不同片段的植物表达载体(图3)。选取pBI121空载体作为阳性对照,采用CaCl₂冻融法,将这4个不同长度的启动子重组子和pBI121空载体转化根癌农杆菌EHA105感受态细胞中,菌液经PCR检测,获得阳性克隆菌株。

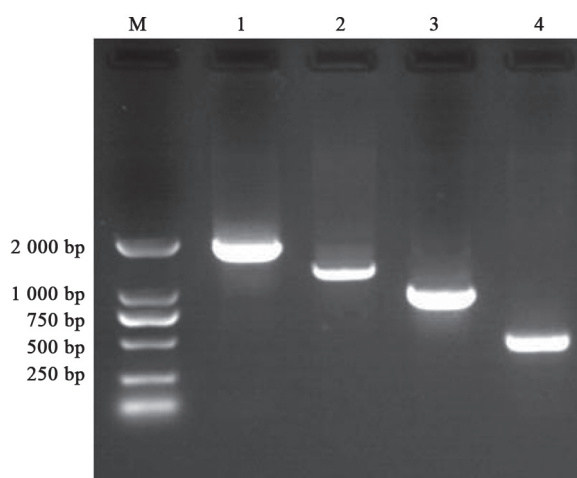


图1 PCR产物的琼脂糖凝胶电泳检测

Fig.1 Agarose gel electrophoresis of PCR products
M: DL 2000 DNA Marker; 1~4: 不同长度5'片段扩增产物。

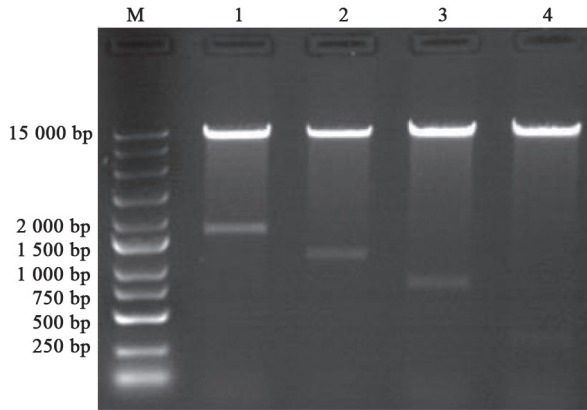


图2 缺失表达载体的HindIII和BamHI双酶切检测
Fig.2 Double enzyme digestion of expression vectors using HindIII and BamHI

M: 15000 DNA Marker; 1~4: 5'序列缺失的表达载体。

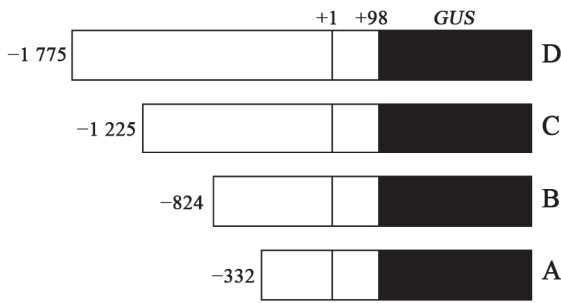


图3 SE基因启动子驱使GUS报告基因的表达载体构建示意图

Fig.3 Construction of GUS reporter gene expression vector driven by SE promoter

A~D: 分别为SE启动子p430、p922、p1323和p1872片段。

3 SE启动子不同长度片段在烟草中的瞬时表达分析

基于瞬时表达的简便快捷且可靠性特点,我们将构建好的4个植物表达载体转化烟草并进行GUS组织化学染色分析及荧光定量检测。以烟草的叶片为受体材料,经过GUS组织染色发现,4个缺失片段均显示不同程度的启动活性,且随着启动子缺失长度的增加GUS活性呈增加趋势。瞬时表达结果显示,SE基因启动子不同长度片段均可驱使下游GUS基因的表达(图4),说明该启动子序列具有启动必备的作用元件,能驱使下游基因的表达。

4 SE启动子5'端缺失片段的表达活性分析

GUS活性定量分析结果显示,缺失-1774~

-824的区段对启动子的GUS活性无显著影响,而缺失-824~-332区域的片段导致GUS活性迅速升高(图5)。这表明,在SE启动子中,位于-824~-332的区域可能存在决定启动子启动活性负调控的顺式元件,对整个启动子的活性起重要作用。此外,阳性对照的GUS活性最高,阴性对照无GUS活性,p430、p922、p1323和p1872的启动子均有活性,分别为阳性对照的71.18%、24.47%、20.94%和21.12%。

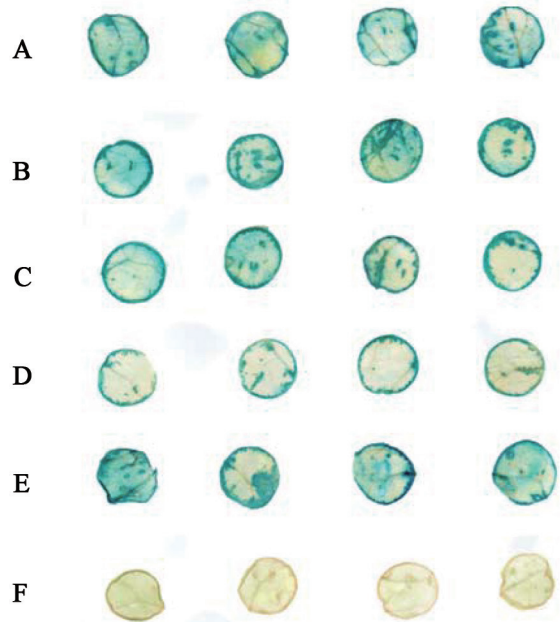


图4 转SE启动子的烟草叶片GUS组织化学染色

Fig.4 Histochemical GUS staining of leaves from *N. tabacum* transformed by SE promoter

A~D: 分别为SE启动子p430、p922、p1323和p1872片段; E: pBI121空载体(阳性对照); F: 野生型(阴性对照)。

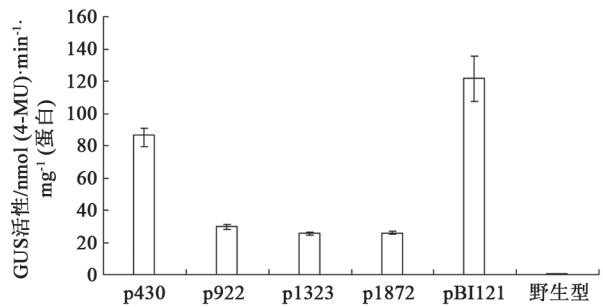


图5 SE启动子5'缺失片段在烟草中GUS活性荧光定量分析
Fig.5 GUS quantitative fluorometric assays of 5' end deletions of SE promoter in *N. tabacum*

讨 论

SE作为三七皂苷生物合成途径的关键限速酶,对调控三七皂苷合成起至关重要的作用,而启动子是精确调控基因在植物体内表达的重要元件。克隆SE启动子并进行序列分析发现该启动子序列中含有大量的顺式作用元件,包括各种生物与非生物响应元件以及与部分转录因子的结合位点。表明该启动子可能通过响应外界各种生物或非生物胁迫驱使SE基因的表达,进而提高三七总皂苷的含量。构建融合GUS报告基因的植物表达载体,利用农杆菌介导转化烟草并进行瞬时表达,经组织化学染色和GUS荧光定量检测发现,SE启动子缺失片段均具有启动活性,可驱使下游GUS基因的表达,4个片段具有完整的核心启动元件(TA-TA-box)和上游启动元件(CAAT-box)。随着缺失片段长度的逐渐增加,其启动子的活性呈增强趋势。此外,长启动子片段与短启动子片段启动活性存在差异,可能是由于启动子某区段内有与负调控相关的顺式作用元件,该区段的缺失将导致下游结构基因的表达水平上调。长度为430 bp的启动子缺失片段具有更强的启动子活性,可为将来进一步开发短片段启动子提供重要参考。

随着高通量测序技术的广泛应用以及代谢组学和基因工程的迅速发展,合成生物学研究进入更深层次发展阶段。研究三七皂苷生物合成途径相关酶基因的功能,为通过合成生物学技术生产三七皂苷提供最基本的技术参考。近年来,Dai等(2013)在酿酒酵母中构建原人参二醇的生物合成途径,发现鲨烯环氧酶在调控萜类化合物的生物合成中起关键性作用,进一步明确SE基因在三七皂苷合成途径中的地位。皂苷等萜类活性物质的合成生物学研究的关键技术方法之一即为克隆基因元件,所谓基因元件是指具有特定功能的核苷酸序列或氨基酸,构成了一个最基本、最为简单的生物模块,进而形成遗传系统,启动子是重要基因元件之一。随着中药基因组学的发展,将会挖掘大量的参与次生代谢产物合成相关基因,为中药合成生物学的发展研究提供基因元件(黄璐琦等2014;刘夺等2013)。然而,目前仅有少数几次生代谢途径的基因解析得较清楚,如紫杉醇(Guerra-Bubb等2012;Jiang等2012)、青蒿素(Newman等

2006;Dietrich等2009)、丹参酮(Gao等2009;Dai等2012;Cui等2011)、人参皂苷(Chen等2011;Sun等2010),大多数药用植物的活性组分生物合成途径的了解甚少。因此,挖掘与药用植物活性成分相关的基因元件显得尤为重要,本研究通过克隆三七鲨烯环氧酶基因的启动子并融合GUS报告基因,组织化学染色和GUS活性测定表明该序列具有启动活性,为将来深入解析三七皂苷合成途径以及通过组合生物合成技术实现异源表达奠定基础。

研究三七皂苷生物合成途径中关键酶SE基因的启动子,证实了SE基因的启动子具有启动活性,为进一步探究SE启动子的功能与特性,需获得稳定表达的转基因株系。我们下一步的研究重点是探索关键酶基因启动子中重要作用元件与相关转录因子的互作。

参考文献

- 黄璐琦,高伟,周雍进(2014).合成生物学在中药资源可持续利用研究中的应用.药学学报,49(1):37~43
- 李荣华,夏岩石,刘顺枝,孙莉丽,郭培国,缪绅裕,陈健辉(2009).改进的CTAB提取植物DNA方法.实验室研究与探索,28(9):14~16
- 刘夺,张莹,周晓,元英进(2013).合成生物技术生产甾体激素中间体的研究展望.生命科学,25(10):958~965
- 卢荣江,刘迪秋,葛锋,陈朝银(2014).三七SE基因启动子的克隆及序列分析.植物生理学报,50(10):1535~1540
- 秦玉芝,赵小英,邓克勤,李旭,刘选明(2007).甾醇生物合成中的关键酶——环氧角鲨烯环化酶的分子生物学研究.生命科学,11(1):10~15
- 石磊,葛锋,刘迪秋,陈朝银(2010).三七总皂苷生物合成与关键酶调控的研究进展.西北植物学报,30(11):2358~2364
- 张云峰,魏东,邓雁如,郭祀远,陈峰(2006).三萜皂苷的生物活性研究新进展.中成药,28(9):1349~1353
- 郑晓瑜,郭晋艳,张毅,李秋莉(2011).植物非生物胁迫诱导启动子顺式作用元件的研究方法.植物生理学报,47(2):129~135
- Bradford MM(1976).A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding. Anal Biochem,72:248~254
- Chen S, Luo H, Li Y, Sun Y, Wu Q, Niu Y, Song J, Lv A, Zhu Y, Sun C et al(2011).454 EST analysis detects genes putatively involved in ginsenoside biosynthesis in *Panax ginseng*. Plant Cell Rep,30(9):1593~1601
- Cui GH, Huang LQ, Tang X, Zhao J(2011).Candidate genes involved in tanshinone biosynthesis in hairy roots of *Salvia miltiorrhiza* revealed by cDNA microarray. Mol Biol Rep,38(4):2471~2478
- Dai ZB, Liu Y, Huang LQ, Zhang XL(2012).Production of miltiradiene by metabolically engineered *Saccharomyces cerevisiae*. Biotechnol Bioeng,109(11):2845~2853
- Dai ZB, Liu Y, Zhang XN, Shi MY, Wang BB, Wang D, Huang LQ,

- Zhang XL (2013). Metabolic engineering of *Saccharomyces cerevisiae* for production of ginsenosides. *Metab Eng*, 20: 146~156
- Dietrich JA, Yoshikuni Y, Fisher KJ, Woolard FX, Ockey D, McPhee DJ, Renninger NS, Chang MC, Baker D, Keasling JD (2009). A novel semi-biosynthetic route for artemisinin production using engineered substrate-promiscuous P450_{BM3}. *ACS Chem Biol*, 4 (4): 261~267
- Gao W, Hillwig ML, Huang L, Cui G, Wang X, Kong J, Yang B, Peters RJ (2009). A functional genomics approach to tanshinone biosynthesis provides stereochemical insights. *Org Lett*, 11 (22): 5170~5173
- Guerra-Bubb J, Croteau R, Williams RM (2012). The early stages of taxol biosynthesis: an interim report on the synthesis and identification of early pathway metabolites. *Nat Prod Rep*, 29 (6): 683~696
- Guo HB, Cui XM, An N, Cai GP (2010). Sanchi ginseng (*Panax notoginseng* (Burkill) F. H. Chen) in China: distribution, cultivation and variations. *Genet Resour Crop Evol*, 57 (3): 453~460
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987). GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J*, 6 (13): 3901~3907
- Jiang M, Stephanopoulos G, Pfeifer BA (2012). Downstream reactions and engineering in the microbially reconstituted pathway for taxol. *Appl Microbiol Biotechnol*, 94 (4): 841~849
- Newman JD, Marshall J, Chang M, Nowroozi F, Paradise E, Pitera D, Newman KL, Keasling JD (2006). High-level production of amorpho-4,11-diene in a two-phase partitioning bioreactor of metabolically engineered *Escherichia coli*. *Biotechnol Bioeng*, 95 (4): 684~691
- Ng TB (2006). Pharmacological activity of sanchi ginseng (*Panax notoginseng*). *J Pharm Pharmacol*, 58 (8): 1007~1019
- Sun C, Li Y, Wu Q, Luo HM, Sun YZ, Song JY, Lui EM, Chen SL (2010). *De novo* sequencing and analysis of the American ginseng root transcriptome using a GS FLX titanium platform to discover putative genes involved in ginsenoside biosynthesis. *BMC Genomics*, 11: 262