

## 综述 Reviews

## 植物组织特异性基因表达技术及其应用

方彦昊, 南文斌, 梁永书, 张汉马

重庆师范大学生命科学学院, 重庆市植物环境适应分子生物学重庆重点实验室, 重庆 401331

**摘要:** 研究表明在植物以及其它多细胞生物体中, 有些基因只在生长发育的特定阶段、器官、组织或细胞中表达。对这类基因的研究一方面有助于我们了解该基因自身的功能, 另一方面也可以作为工具应用到其他相关研究当中, 例如利用植物中具特异表达特性的基因的调控元件将特定基因在特定器官、组织或细胞中表达的技术, 即植物组织特异性基因表达技术。本文主要介绍目前被广泛使用的两种植物组织特异性基因表达技术, 即组织特异性启动子驱动法和GAL4/UAS激活标签法及其应用, 为今后的研究工作提供一定的参考。

**关键词:** 基因; 启动子; 组织特异性; GAL4/UAS

## Plant Tissue-Specific Gene Expression System and Its Applications

FANG Yan-Hao, NAN Wen-Bin, LIANG Yong-Shu, ZHANG Han-Ma\*

*Chongqing Key Laboratory of Molecular Biology of Plants Environmental Adaptations, College of Life Sciences, Chongqing Normal University, Chongqing 401331, China*

**Abstract:** It is known that, in plants as well as in all other multicellular organisms, there are genes that are only expressed at specific developmental stage, organs, tissues or cells. The research on those genes not only can help us to understand their functions, but also can provide valuable tools for other studies, such as developing plant tissue-specific expression systems using the regulatory elements of tissue-specifically expressed genes. In this review, we provided a brief overview of two currently widely used methods for achieving tissue-specific expression of genes in plants, i.e. tissue-specific promoters or GAL4/UAS activation tagging method, and some examples of their applications. This brief review was intended to provide guidance to future research in this important field.

**Key words:** gene; promoter; tissue-specific; GAL4/UAS

多细胞生物体内存在不同类型的器官、组织、细胞, 它们有各自的特性, 担负着不同的功能。例如, 植物根表皮中的根毛细胞, 主要负责从周围土壤中吸收水分与矿质营养。与这一功能相适应, 它们在发育过程中向外突起形成管状结构以增加其表面积和吸收水分、养分的能力(Grier-son和Schiefelbein 2002); 植物根里的内皮层细胞在发育过程中通过特殊的细胞壁加厚和特定部位胼胝质的沉积形成“凯氏带”, 阻止矿质养分向维管束和地上部分渗透, 控制皮层和维管柱之间的物质运输; 在茎和叶片中, 保卫细胞可以调节内部叶肉细胞与外部环境之间的气体交换, 这一过程需要依赖周围细胞通过K离子交换来创造一个调节气孔关闭与打开的膨压(Raschke和Fellows 1971)。这些不同类型器官、组织、细胞的形成, 以及它们

之间功能的差异, 在很大程度上取决于特异性表达的基因。因此, 研究不同器官、组织、细胞中呈特异性表达的基因, 对了解植物生长发育调控机理, 细胞类型与功能之间的关系都有重要意义。

此外, 研究组织特异性表达的基因的调控机理, 可帮助我们构建植物组织特异性表达体系, 有目的地在特定器官、组织、细胞中表达特定靶基因, 以便进行靶基因功能分析。组织特异性表达技术在植物基因工程中具有一定的应用前景, 如利用植物的特定组织细胞合成所需要的代谢产物,

收稿 2015-01-19 修定 2015-05-12

资助 “973”计划前期研究专项(2014CB160306)、重庆市教委创新团队建设基金(KJTD201307)和重庆师范大学引进人才启动基金项目(12XLR36)。

\* 通讯作者(E-mail: hanmazhang@126.com; Tel: 023-65912976)。

还可以用于作物改良的基因工程等。组织特异性表达技术是近年来植物学研究中的一个重要领域 (Ubeda-Tomas等2008; Plett等2010; Duan等2013)。本文主要介绍目前被广泛使用的两种植物组织特异性基因表达方法, 即特定启动子驱动法和GAL4/UAS激活标签法。

## 1 组织特异性启动子驱动法

### 1.1 植物组织特异性启动子

启动子是一段位于功能基因5'端上游的DNA序列, 包含特定的保守序列, 长度因基因而异。启动子上的多种顺式作用元件能识别RNA聚合酶, 并指导相应类型的RNA聚合酶与模板正确结合, 形成转录起始复合体, 控制转录的时空特性和强度, 从而精确有效地启动基因的表达。有些启动子, 如花椰菜花叶病毒(CaMV) 35S启动子(Odell等1985)、水稻*Actin1*基因的*Act1*启动子(McElroy等1990)和玉米*Ubiquitin*基因的*Ubi*启动子(Christensen等1992)等, 其调控的基因不受时空及外界因素的影响, 几乎在植物所有组织都有表达, 而且表达水平在不同组织部位没有明显差异, 被称之为组成型启动子或非特异性表达启动子。

组织特异性启动子, 又称为器官特异性启动子或细胞特异性启动子, 则不同于组成型启动子, 其所控制的基因只在或主要在特定的组织中表达。除具有一般启动子的特性外, 组织特异启动

子还具有一些调控目的基因特异表达的调控元件, 这些调控元件的位置、数目、种类决定了目的基因表达的时空专一性, 是基因特异表达所必需的。因此, 组织特异型启动子已成为转基因研究中常用的外源基因的启动元件。

目前研究人员已经在不同植物中分离并证实了多种具有组织表达特异性的启动子, 按照其驱动基因的表达部位, 可分为植物营养器官, 如根、块茎、维管组织和茎叶绿色组织等表达的组织特异性启动子, 植物生殖器官如花器、果实和种子表达的组织特异性启动子(表1)。根据调控的组织特异性基因表达模式是否受光、热等条件的诱导, 又可分为可诱导和无需诱导的组织特异性启动子, 比如水稻绿色组织特异表达的*Rca*基因和*LP2*基因的启动子要受到光的诱导(Thilmony等2009; Yang等2012)。研究人员也发现, 许多植物的内含子也有调控基因时空表达的作用, 例如拟南芥花同源基因*AGAMOUS*中内含子中有增强子序列, 它和该基因在花器官中的特异区域表达相关(Busch等1999)。水稻*OsTubA1*基因由4个外显子和3个内含子组成, 在不同的组织如根尖、幼叶和花中有表达, 而这一表达模式需要第一个内含子的调控(Jeong等2000)。矮牵牛花*PhADF1*基因中第1个内含子会增强其在维管组织的特异性高表达, 后来研究证明, 这一内含子改变*PhADF1*基因组织特异

表1 植物中一些具有组织特异性的启动子

Table 1 Some tissue-specific promoter in plant

启动子	植物	表达组织	参考文献
rbcS-3A	豌豆( <i>Pisum sativum</i> )	叶	Gilmartin和Chua 1990
PDX1 (GSE1)	水稻( <i>Oryza sativa</i> )	叶片、叶鞘和穗茎	Ye等2012
PDX1 (GSE2)	水稻( <i>Oryza sativa</i> )	叶鞘和茎	Ye等2012
LAT52	番茄( <i>Lycopersicon esculentum</i> )	花粉	Twell等1989
SK2	土豆( <i>Solanum tuberosum</i> )	雌蕊	Ficker等1997
ZmC5	玉米( <i>Zea mays</i> )	花粉	Wakeley等1998
PsTL1	梨( <i>Pyrus serotina</i> )	雌蕊	Sassa等2002
LICCR	合欢( <i>Leucaena leucocephala</i> )	维管组织	Prashant等2012
GhACT1	棉花( <i>Gossypium hirsutum</i> )	纤维细胞	Li等2005
napA	油菜( <i>Brassica napus</i> )	胚、胚乳	Ellerstrom等1996
csp1	咖啡( <i>Coffea arabica</i> )	种子	Marraccini等1999
Alpha-globulin	棉花( <i>Gossypium hirsutum</i> )	种子	Sunilkumar等2002
gbssl	小麦( <i>Triticum aestivum</i> )	种子	Kluth等2002
zE19	玉米( <i>Zea mays</i> )	种子(胚乳)	Chen等2007
RCc3	水稻( <i>Oryza sativa</i> )	根	Xu等1995
Pyk10	拟南芥( <i>Arabidopsis thaliana</i> )	根	Nitz等2001

性表达的过程是一种转录后调控机制,而且进化比较保守(Mun等2002; Jeong等2007)。

## 1.2 植物组织特异性启动子的一般研究方法

研究植物的启动子一般采用如下手段,首先通过PCR扩增法,从植物基因组中扩增已知全部或部分序列的启动子片段,然后通过PLACE (Higo等1999)和PLANTCARE (Lescot等2002)网站,对得到的启动子片段进行生物信息学分析,预测启动子的核心结构和功能,并在启动子片段的后面融合*GUS*和*GFP*等报告基因,通过瞬时和稳定的转化,对启动子的表达模式进行分析,最后通过点突变、片段缺失等分析,得到该启动子的核心调控元件(Ellerstrom等1996; Li等2005; Konishi和Yanagisawa 2010)。

cDNA微阵列的数据给开发新的启动子提供了有利条件。Ye等(2012)人利用水稻cDNA微阵列数据库CREP (Collection of Rice Expression Profiles, <http://crep.ncpgr.cn>), 鉴定得到一个只在绿色组织中特异表达的基因,与水稻基因组数据库中数据进行序列比对发现,该基因编码一个蛋白DX1。RT-PCR分析表明, *DX1*确实是在叶、叶鞘、茎和穗茎中表达,而在根、花药和胚乳中都没有表达。通过将编码区上游1 505 bp和下游558 bp序列作为该基因的候选启动子,并提交到PlantCARE网站与已有数据进行比较分析,采用片段缺失分析和凝胶阻滞实验EMSA (Electrophoretic Mobility Shift Assay), 得到位于-71至-61的序列5' CAGGACATATT 3' (GSE1)和位于+1至+86的5' ATGAACTCAA-GAGCC 3' (GSE2)的2个绿色组织特异的顺式调控元件。点突变分析表明这两个顺式调控元件都是正调控因子。

近些年来,由于基因组、转录组学技术和测序技术的快速发展,使得大规模预测启动子序列和找到发挥作用的调控原件变得可行。Verelst等人(2007)通过分析拟南芥花粉的4个发育阶段中不同组织的*ATH1*基因芯片结果,找到了很多花粉特异表达的基因,启动子分析发现约22.9%的TCP-MPG类基因启动子中含有一个MEF2基序。差异基因表达也常被用来研究组织特异的启动子,通过cDNA-AFLP (cDNA扩增长度多态性),得到具有差异表达的转录片段,通过这种方法,在马铃薯中

得到了一个具有在块茎和匍匐茎等茎组织特异表达的StCCS启动子(Trinade等2003)。转录组测序也有助于非模式物种的差异基因表达研究, Geng等(2014)通过在花生中建立一个基于高通量测序的筛选系统,获得584条根特异和316条种子特异表达的基因片段,其中的55.3%和64.6%经半定量RT-PCR验证为组织特异表达基因,并从中分离鉴定了一个根特异表达的启动子Asy。

## 1.3 植物组织特异性启动子的应用

目前,植物基因工程中使用的多是组成型启动子,其中CaMV 35S启动子主要用于双子叶植物的遗传转化, Ubi启动子主要用于单子叶植物的遗传转化。虽然这类启动子驱动的基因在转基因植物的不同组织、不同生长阶段均有高水平表达(Ranjan等2011; Park等2012),也易于构建目的基因过表达的载体,但在应用中逐渐暴露出一些问题和局限性。例如,组成型的启动子不能用于研究不同类型细胞和组织的功能,而且靶基因在发育过程的错误时间和错误空间过量表达有时会对植物生长发育产生影响(Potenza等2004)。组成型的基因表达可能会造成转基因植物生长延缓,开花延迟,减产,品质降低,甚至不育等现象(Kasuga等1999和2004; Pino等2007)。此外,在同一个植物中重复使用同一个组成型启动子驱动多个不同基因表达容易造成基因沉默现象(Palauqui等1996; Vaucheret等1998; Galili和Hofgen 2002; Lessard等2002)。

组织特异性启动子则可克服上述缺点,它们可以驱动外源基因在植物发育过程中某一特定的时空表达,使目的基因的表达产物在特定细胞或组织中积累(Jeong等2010)。伸展作用因子(*expansin*)是调控植物生长过程中细胞壁伸长的主要调节因子。在烟草中用拟南芥根系特异表达的启动子Pyk10 (Nitz等2001)驱动 $\beta$ 型伸展基因*TaEXPB23*,不仅增加了侧根的数目,而且与35S组成型启动子表达该基因的植株和野生型相比,根系生物量明显提高;在缺水胁迫条件下,与野生型相比,根系特异表达该基因的植株光合速率增加,积累的活性氧(reactive oxygen species, ROS)更少,具有较高水平的抗氧化酶的活性,使转基因植株的抗胁迫能力提高(Li等2015)。植物发达的根系会增加其



抗胁迫能力。水稻根系特异表达的RCc3启动子的分离给提高作物抗胁迫能力和作物产量提供了有效工具(Xu等1995)。Jeong等(2010)用RCc3启动子驱动水稻受干旱、高盐和脱落酸等胁迫诱导表达的*OsNAC10*基因,使其在根中过量表达,转基因水稻根直径是非转基因水稻的1.25倍,根的中柱、皮层和表皮都变大;在干旱胁迫和正常条件下,水稻产量与野生型相比都有不同程度的提高。

油菜是世界上广泛种植的油料作物,含有高不饱和的C<sub>18</sub>脂肪酸和低芥酸,具有很高的营养价值。Ellerstrom等(1996)从油菜中分离得到一个只在胚和胚乳特异表达的启动子*napA*。利用*napA*驱动调控不饱和脂肪酸合成的*LECI*和*LIL*基因,使它们在种子中特异表达,转基因植株种子含油量提高2%~20%,但油分品质没有发生明显改变,也没有影响其他主要的农业性状,而且这些改良与作物生长条件无关(Tan等2011)。

木质素是一类酚类次生代谢产物,在植物体内行使重要的生理功能,但对于造纸工业而言是有害成分,必须从木纤维中去除,木材中的木质素是形成造纸污染的主要来源。编码咖啡酸-O-甲基转移酶(*caffeic acid O-methyl-transferase*, COMT)相关基因的克隆,使研究者可以下调杨树中COMT的含量,通过RNAi可以减少转基因杨树中约90% COMT活性,木质素的含量没有受到影响,但使木质素的结构发生明显变化,转基因杨树更加适用于纸浆工业(Lapierre等1999)。在烟草中用组成型启动子35S表达木质素合成途径相关基因肉桂酰辅酶A

还原酶(*cinnamoyl-CoA reductase*, CCR)反义基因虽然可以下调CCR基因的表达,减少木质素的含量,但也会影响整个植株的生长发育,出现延迟生长,皱叶等表型;为了克服这样的困难,用维管组织特异表达的启动子LICCR和LICAD可能会避免对整个植株造成的伤害,从而实现特异性地降低木材中木质素的含量,减少造纸工业中为去除木质素而消耗的能源和化学原料(Prashant等2011, 2012)。

## 2 GAL4/UAS激活标签法

### 2.1 GAL4/UAS系统简介

GAL4/UAS双因子反式激活体系介导的基因异位表达可实现转基因的空间控制,加上适当的修饰可以实现时空双重控制。Brand和Perrimon(1993)首次在果蝇中构建GAL4/UAS体系,建立了一个可将任何外源基因以果蝇自身细胞或组织特异的方式被选择性激活表达的系统,并利用该系统来研究果蝇*even-skipped*蛋白的功能。Guyer等(1998)将修饰过的GAL4/UAS系统GAL4/C1首次运用到双子叶模式植物拟南芥中,在植物中建立了GAL4/UAS外源基因异位表达系统(图1)。

GAL4/UAS是由酵母的GAL4基因和GAL4基因的上游激活因子序列UAS两部分组成。GAL4/UAS系统的建立,首先需要将GAL4基因与组织特异性的启动子或增强子相连接,建立以细胞和组织特异性的方式调控表达的GAL4转基因系;同时将UAS与感兴趣的靶基因融合,建立带有UAS-靶基因的转基因系。在UAS-靶基因转基因系中,靶

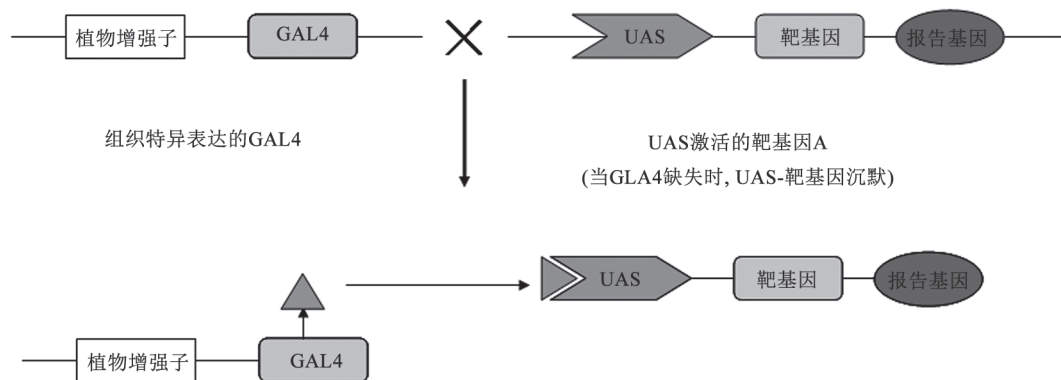


图1 GAL4/UAS系统原理示意图

Fig.1 The schematic of GAL4/UAS system

基因只需和UAS序列相连接, 不再需要特定的启动子。因为GAL4蛋白只能与UAS相结合之后才能调控GAL4基因的表达, 所以只有将2个转基因系进行杂交, 在杂交后代中, 特异性表达的GAL4才能以同样的方式调节UAS-靶基因的表达(Brand和Perrimon 1993)。

为了便于检测GAL4/UAS系统杂交子代中靶基因表达的位置, 通常采用的方式为运用GUS和GFP等报告基因建立UAS-靶基因-报告基因, 将靶基因的编码区域与报告基因融合, 整合到宿主的基因组中; 此UAS转基因系与GAL4系杂交后, 子代中报告基因由于GAL4与UAS的结合, 伴随着靶基因开始表达, 通过检测报告基因在不同细胞中的活性, 就可方便地对靶基因的表达模式进行更为准确的分析, 再对其表达产生的生物学效应做进一步的研究(Wu等2003)。此外, 为了方便在建立的GAL4系亲本中提前检测GAL4在不同细胞组织中的表达, 可将报告基因GUS或GFP融合到GAL4片段后, 随着GAL4随机的插入受体植物基因组中, 由于和它邻近的基因表达位置的不同, 就可以得到标记了绿色荧光蛋白的表达GAL4基因的株系(Laplaze等2005)。

## 2.2 植物GAL4/UAS体系的建立

### 2.2.1 拟南芥中GAL4/UAS体系构建及应用

Haseloff (1999)发现由于GAL4序列中存在高A/T含量, 这些序列会影响植物中mRNA的加工, 使GAL4不能在拟南芥中表达。为了解决这一问题, 他们用VP16代替GAL4中的激活部位, 建立了一个高A/U含量的GAL4-VP16体系, 使得其在植物前mRNA拼接过程中起到很好的识别内含子的作用, 从而在拟南芥中高效表达。GAL4-VP16随机插入到拟南芥基因组中, 其表达依赖于与它邻近的基因增强子序列。为了检测GAL4-VP16的表达, 他们还将mGFP5基因融合到这段插入片段中, 由于和它邻近的基因表达位置的不同, 这样就得到标记了绿色荧光蛋白的表达GAL4基因的不同细胞。在这些细胞中, 筛选收集到了250株只在拟南芥根尖不同细胞中稳定表达的GAL4株系(图2)。后续研究者可以将感兴趣的目标基因融合到UAS编码框后, 得到UAS-目标基因系, 通过与这些GAL4-VP16系杂交, 或者用UAS-目标基因农杆菌, 直接转化GAL4-VP16系, 获得在根尖不同细胞中稳定表达目的基因的子代, 有利于更精确地研究目的基因的功能。

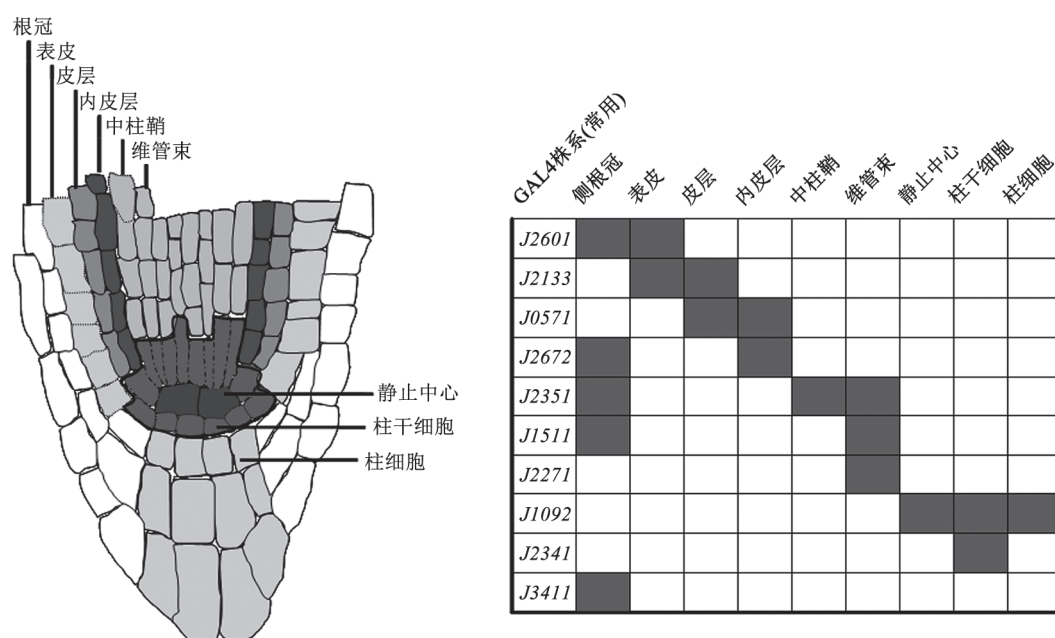


图2 拟南芥根尖组织特异表达的GAL4/UAS株系

Fig.2 Tissue-specific GAL4/UAS lines in *Arabidopsis* root tip

根据Duan等(2013)文献修改。

除上述最初筛选到的250个株系外, 其他研究者还从Haseloff等建立的GAL4-VP16株系中筛选到了新的组织特异性表达株系, 如Laplaze等(2005)筛选得到401株在侧根不同发育阶段特异性表达的株系; Gardner等(2009)筛选得到了4株在气孔保卫细胞特异表达的株系, 并发现其中大部分只在气孔保卫细胞表达, 且其表达特异性不受外界环境变化。

这些制备并经过验证的细胞和组织特异表达的GAL4-VP16株系为研究植物信号传导及其作用机制提供了有效工具。赤霉素(gibberellin, GA)可以通过促进拟南芥根中细胞的有丝分裂来调节分生组织大小, 进而调控根细胞的伸长, 维持根生长。为了确定GA是通过分生区中哪些细胞来控制根细胞的增殖, Ubeda-Tomas等(2008, 2009)利用上述Haseloff等建立的在不同根组织中表达的GAL4-VP16株系, 包括*J0571* (在皮层和内皮层表达)、*Q2500* (内皮层)、*J0631* (根伸长区)和*J2341* (根柱干细胞), 使突变基因*GAI*在这些组织中特异性表达, 结果发现在柱干细胞和伸长区细胞中表达*GAI*后, 分生组织大小与野生型一样; 而在皮层或内皮层中表达*GAI*则导致分生组织明显变小, 从而说明GA是通过促进内胚层中细胞的增殖来控制根分生组织的大小, 控制根的生长。同样Duan等(2013)利用Haseloff等建立的株系研究高盐胁迫对拟南芥幼苗侧根的抑制作用中的细胞特异性。他们在前期研究中发现ABA参与这一抑制作用。为了验证ABA的这一调控是否具有组织特异性, 作者首先利用上述Haseloff等建立的在不同根细胞中表达的GAL4/UAS株系, 特异表达能引起ABA不敏感的突变基因*abil-1*, 发现在这一调控中ABA信号传导主要在内皮层和皮层; 然后他们进一步利用内皮层和皮层特异表达的启动子, 锁定了内皮层为ABA信号传导的关键场所。

Haseloff等建立的组织特异性表达株系也被用来研究植物对环境因子的响应机理。如Moller等(2009)利用在拟南芥根中细胞特异性表达的GAL4/UAS株系研究钠离子转运蛋白的组织特异性表达对植物抗盐性的影响。作者选用两种在根和中柱中稳定表达的GAL4株系, *J2731* (只在主根和侧根的中柱鞘表达)和*E2586* (在主根和侧根的

维管柱和中柱表达), 使*HKT*基因在这些细胞中特异表达。发现在根中柱细胞中表达*HKT1.1*会增强钠离子流入的能力, 减少钠离子从根中到茎中的转移, 并导致茎中钠离子浓度降低, 使植物的抗盐能力增强。Plett等(2010)用在表皮和皮质细胞层特异表达的GAL4株系发现在拟南芥根表皮和皮层特异表达*HKT1.1*会增加茎中钠离子的积累。

### 2.2.2 水稻GAL4/UAS体系构建及应用

Wu等(2003)在水稻‘中花11’和‘中花15’中建立了GAL4-VP16/UAS体系, 将经过修饰的GUS报告基因(GUS Pluse)放在6×UAS启动子上, 用来检测基因在不同位置的表达, 得到了约31 443株F<sub>1</sub>代有GUS标记的单株(表2)。通过用GAL4/VP16编码区的引物进行PCR扩增和GAL4/VP16特异探针进行核酸杂交验证, 大部分F<sub>1</sub>代GAL4株系都有T-DNA插入, 其中约有一半为单拷贝插入。

表2 水稻组织特异表达的GAL4/UAS株系及GUS表达模式  
Table 2 Examples of GUS staining patterns in tissue-specific GAL4/UAS lines of rice

GAL4株系	GUS表达区
<i>a101/f856</i>	雌蕊
<i>a130</i>	外稃和颖片的尖
<i>a137</i>	茎结、雄蕊、雌蕊、花序
<i>a140/f2271</i>	雄蕊和雌蕊除外的结构
<i>a171</i>	茎节间、叶鞘
<i>a201/f2080</i>	花药
<i>f1381</i>	茎结、外稃和颖片的尖
<i>f1478</i>	外稃和颖片
<i>F1951</i>	穗颈节、叶、外稃和颖片
<i>F2000</i>	叶
<i>f2257</i>	茎结、雌蕊、茎节间、外稃和颖片
<i>f2439</i>	叶耳
<i>f2471</i>	穗颈节、雄蕊、雌蕊、叶耳

参考Wu等(2003)文献修改。

由于GUS标记需要经过组织化学染色、固定等步骤才能确定表达位置。Johnson等(2005)以GFP为报告基因, 得到具有不同表达强度的GFP转化株, 在水稻中建立了一个可快速、跟踪检测的GLA4/UAS系统。Plett等(2010)利用Johnson等人建立的水稻GAL4-GFP系统中在木质和皮层有GFP特异表达的*AGF03*和*AOHB03*株系, 将拟南芥*HKT1.1*基因在这些GAL4系中特异表达。发现当



用盐胁迫处理时,与对照相比,水稻皮层中特异表达*HKT1.1*的转化株(*AOHB03*)干重明显增加,根中钠离子增加,茎中钠离子浓度变低;而木质部中*HKT1.1*的特异表达转化株(*ASGF03*)干重减轻,茎中钠离子浓度升高,而根中降低。这些结果与在拟南芥中得到的结果相同,说明钠离子在特定细胞中的转运与植物抗盐性间的关系在拟南芥和水稻中非常相似。可见组织特异性表达这一研究工具在粮食作物的重要农艺性状研究中具有广阔的应用前景。

### 3 讨论与展望

虽然现在已经分离得到了许多细胞或组织特异的启动子,但对于多细胞和组织器官复杂的高等植物来说,还是远远不够的,而且启动子具有物种特异性,在不同物种中其驱动表达的基因位置可能存在差异。目前,由于转录组、蛋白质组和基因组测序技术的发展,给分离更多的特异性启动子提供大量数据,尤其是转录组数据的分析可以帮助我们更快的认识基因在时间和空间的表达模式,进而开发更多新的有用的特异性启动子(Potenza等2004; Shelonkov和Korotkov 2009),实现对外源基因表达的定时、定点、定量三维精确调控,使其在可控条件下为基础研究和作物性状改良创造更多可能(Jeong等2010; Ye等2013; Li等2015)。

由于GAL4-UAS系统在建立时GAL4基因是随机插入基因组的,这就使它存在不可避免的缺点:(1)单一株系在多个不同细胞和组织中都有目的基因的表达;(2)这种多细胞表达的组是随机的,强弱不同,不是研究想要的组合;(3)得到的不同组织特异的GAL4群体可能不能完全包含研究所需要的全部细胞类型。因此,在研究特定基因的功能或信号响应和应答的特异组织定位时,不仅需要筛选分离和验证更多细胞或组织特异的启动子,建立和扩大组织特异的GAL4/UAS群体,优化得到有规律或实验所需的细胞表达组合,还要将组织特异的启动子和GAL4/UAS株系结合起来,利用各自特点先通过在多个不同细胞和组织中都有目的基因表达的GAL4/UAS株系,将信号响应目标细胞定位到很小的区间(一到两种细胞类型),再通过已知的细胞特异的启动子驱动目的基因在其表达,最终将响应特定信号的细胞类型确定下来。

目前文献中报道和广泛使用的GAL4/UAS系统大多是以果蝇(Brand和Perrimon 1993)、老鼠(Mallo 2006)、斑马鱼(Halpern等2008)、拟南芥(Haseloff 1999)和水稻(Wu等2003)等模式生物建立的,主要用于研究特定基因的功能或者信号响应的特异组织定位,或者在特定细胞或组织中表达致死的基因,达到切除靶细胞的作用(Brand和Perrimon 1993)。随着测序技术和遗传转化技术的进步,使得GAL4/UAS技术日益成熟,我们有望在更多的动植物中建立这种细胞和组织特异表达的库,用于改良作物的产量和品质,疾病治疗等。

### 参考文献

- Brand AH, Perrimon N (1993). Targeted gene expression as a means of altering cell fates and generating dominant phenotypes. *Development*, 118: 401-415
- Busch MA, Bomblies K, Weigel D (1999). Activation of a floral homeotic gene in *Arabidopsis*. *Science*, 285: 585-587
- Chen X, Wang Z, Wang J, Wang M, Zhao L, Wang G (2007). Isolation and characterization of Brittle2 promoter from *Zea Mays* and its comparison with Ze19 promoter in transgenic tobacco plants. *Plant Cell Tiss Org*, 88: 11-20
- Christensen AH, Sharrock RA, Quail PH (1992). Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol Biol*, 18: 675-689
- Duan L, Dietrich D, Ng CH, Chan PM, Bhalerao R, Bennett MJ, Dinneny JR (2013). Endodermal ABA signaling promotes lateral root quiescence during salt stress in *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell*, 25: 324-341
- Ellerstrom M, Stalberg K, Ezcurra I, Rask L (1996). Functional dissection of a napin gene promoter: identification of promoter elements required for embryo and endosperm-specific transcription. *Plant Mol Biol*, 32: 1019-1027
- Ficker M, Wemmer T, Thompson RD (1997). A promoter directing high level expression in pistils of transgenic plants. *Plant Mol Biol*, 35: 425-431
- Galili G, Hofgen R (2002). Metabolic engineering of amino acids and storage proteins in plants. *Metab Eng*, 4: 3-11
- Gardner MJ, Baker AJ, Assie JM, Poethig RS, Haseloff JP, Webb AA (2009). GAL4 GFP enhancer trap lines for analysis of stomatal guard cell development and gene expression. *J Exp Bot*, 60: 213-226
- Geng L, Duan X, Liang C, Shu C, Song F, Zhang J (2014). Mining tissue-specific contigs from peanut (*Arachis hypogaea* L.) for promoter cloning by deep transcriptome sequencing. *Plant Cell Physiol*, 55: 1793-1801
- Gilmartin PM, Chua NH (1990). Spacing between GT-1 binding sites within a light-responsive element is critical for transcriptional activity. *Plant Cell*, 2: 447-455

- Grierson C, Schiefelbein J (2002). Root hairs. The Arabidopsis Book, 1: e0060
- Guyer D, Tuttle A, Rouse S, Volrath S, Johnson M, Potter S, Gorchach J, Goff S, Crossland L, Ward E (1998). Activation of latent transgenes in *Arabidopsis* using a hybrid transcription factor. *Genetics*, 149: 633~639
- Halpern ME, Rhee J, Goll MG, Akitake CM, Parsons M, Leach SD (2008). Gal4/UAS transgenic tools and their application to zebrafish. *Zebrafish*, 5: 97~110
- Haseloff J (1999). GFP variants for multispectral imaging of living cells. *Method Cell Biol*, 58: 139~151
- Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, Korenaga T (1999). Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database: 1999. *Nucleic Acids Res*, 27: 297~300
- Jeon JS, Lee S, Jung KH, Jun SH, Kim C, An G (2000). Tissue-preferential expression of a rice alpha-tubulin gene, *OsTubA1*, mediated by the first intron. *Plant Physiol*, 123: 1005~1014
- Jeong JS, Kim YS, Baek KH, Jung H, Ha SH, Do CY, Kim M, Reuzeau C, Kim JK (2010). Root-specific expression of OsNAC10 improves drought tolerance and grain yield in rice under field drought conditions. *Plant Physiol*, 153: 185~197
- Jeong YM, Mun JH, Kim H, Lee SY, Kim SG (2007). An upstream region in the first intron of petunia actin-depolymerizing factor 1 affects tissue-specific expression in transgenic *Arabidopsis* (*Arabidopsis thaliana*). *Plant J*, 50: 230~239
- Johnson AA, Hibberd JM, Gay C, Essah PA, Haseloff J, Tester M, Guiderdoni E (2005). Spatial control of transgene expression in rice (*Oryza sativa* L.) using the GAL4 enhancer trapping system. *Plant J*, 41: 779~789
- Kasuga M, Liu Q, Miura S, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (1999). Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor. *Nat Biotechnol*, 17: 287~291
- Kasuga M, Miura S, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K (2004). A combination of the *Arabidopsis DREB1A* gene and stress-inducible rd29A promoter improved drought- and low-temperature stress tolerance in tobacco by gene transfer. *Plant Cell Physiol*, 45: 346~350
- Kluth A, Sprunck S, Becker D, Lorz H, Lutticke S (2002). 5' deletion of a gbss1 promoter region from wheat leads to changes in tissue and developmental specificities. *Plant Mol Biol*, 49: 669~682
- Konishi M, Yanagisawa S (2010). Identification of a nitrate-responsive *cis*-element in the *Arabidopsis* NIR1 promoter defines the presence of multiple *cis*-regulatory elements for nitrogen response. *Plant J*, 63: 269~282
- Lapierre C, Pollet B, Petit-Conil M, Toval G, Romero J, Pilate G, Lepelle JC, Boerjan W, Ferret VV, De Nadai V et al (1999). Structural alterations of lignins in transgenic poplars with depressed cinnamyl alcohol dehydrogenase or caffeic acid *O*-methyltransferase activity have an opposite impact on the efficiency of industrial kraft pulping. *Plant Physiol*, 119: 153~164
- Laplaze L, Parizot B, Baker A, Ricaud L, Martiniere A, Auguy F, Franche C, Nussaume L, Bogusz D, Haseloff J (2005). GAL4-GFP enhancer trap lines for genetic manipulation of lateral root development in *Arabidopsis thaliana*. *J Exp Bot*, 56: 2433~2442
- Lescot M, Dehais P, Thijs G, Marchal K, Moreau Y, Van de Peer Y, Rouze 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. *Nucleic Acids Res*, 30: 325~327
- Lessard PA, Kulaveerasingam H, York GM, Strong A, Sinskey AJ (2002). Manipulating gene expression for the metabolic engineering of plants. *Metab Eng*, 4: 67~79
- Li AX, Han YY, Wang X, Chen YH, Zhao MR, Zhou S, Wang W (2015). Root-specific expression of wheat expansin gene *TaEX-PB23* enhances root growth and water stress tolerance in tobacco. *Environ Exp Bot*, 110: 73~84
- Li XB, Fan XP, Wang XL, Cai L, Yang WC (2005). The cotton ACTIN1 gene is functionally expressed in fibers and participates in fiber elongation. *Plant Cell*, 17: 859~875
- Mallo M (2006). Controlled gene activation and inactivation in the mouse. *Front Biosci*, 11: 313~327
- Marraccini P, Deshayes A, Pétiard V, Rogers WJ (1999). Molecular cloning of the complete 11S seed storage protein gene of *Coffea arabica* and promoter analysis in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol Bioch*, 37: 273~282
- McElroy D, Zhang W, Cao J, Wu R (1990). Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. *Plant Cell*, 2: 163~171
- Moller IS, Gilliam M, Jha D, Mayo GM, Roy SJ, Coates JC, Haseloff J, Tester M (2009). Shoot Na<sup>+</sup> exclusion and increased salinity tolerance engineered by cell type-specific alteration of Na<sup>+</sup> transport in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 21: 2163~2178
- Mun JH, Lee SY, Yu HJ, Jeong YM, Shin MY, Kim H, Lee I, Kim SG (2002). Petunia actin-depolymerizing factor is mainly accumulated in vascular tissue and its gene expression is enhanced by the first intron. *Gene*, 292: 233~243
- Nitz I, Berkefeld H, Puzio PS, Grundler FM (2001). Pyk10, a seedling and root specific gene and promoter from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci*, 161: 337~346
- Odell JT, Nagy F, Chua NH (1985). Identification of DNA sequences required for activity of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*, 313: 810~812
- Palauqui JC, Elmayan T, De Borne FD, Crete P, Charles C, Vaucheret H (1996). Frequencies, timing, and spatial patterns of co-suppression of nitrate reductase and nitrite reductase in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol*, 112: 1447~1456
- Park SH, Bang SW, Jeong JS, Jung H, Redillas MC, Kim HI, Lee KH, Kim YS, Kim JK (2012). Analysis of the APX, PGD1 and R1G1B constitutive gene promoters in various organs over three homozygous generations of transgenic rice plants. *Planta*, 235: 1397~1408
- Pino MT, Skinner JS, Park EJ, Jeknic Z, Hayes PM, Thomashow MF, Chen TH (2007). Use of a stress inducible promoter to drive ectopic AtCBF expression improves potato freezing tolerance while minimizing negative effects on tuber yield. *Plant Biotechnol J*, 5: 591~604
- Plett D, Safwat G, Gilliam M, Skrumsager MI, Roy S, Shirley N, Jacobs A, Johnson A, Tester M (2010). Improved salinity tolerance



- of rice through cell type-specific expression of AtHKT1;1. *PLoS ONE*, 5: e12571
- Potenza C, Aleman L, Sengupta-Gopalan C (2004). Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: promoters used in plant transformation. *In Vitro Cell Dev-Pl*, 40: 1~22
- Prashant S, Srilakshmi SM, Pramod S, Gupta RK, Anil KS, Rao KS, Rawal SK, Kavi KP (2011). Down-regulation of *Leucaena leucocephala* cinnamoyl CoA reductase (LICCR) gene induces significant changes in phenotype, soluble phenolic pools and lignin in transgenic tobacco. *Plant Cell Rep*, 30: 2215~2231
- Prashant S, Sunita MSL, Sirisha VL, Bhaskar VV, Rao AM, Narasu ML, Kishor PK (2012). Isolation of cinnamoyl CoA reductase and cinnamyl alcohol dehydrogenase gene promoters from *Leucaena leucocephala*, a leguminous tree species, and characterization of tissue-specific activity in transgenic tobacco. *Plant Cell Tiss Org*, 108: 421~436
- Ranjan R, Patro S, Kumari S, Kumar D, Dey N, Maiti IB (2011). Efficient chimeric promoters derived from full-length and sub-genomic transcript promoters of Figwort mosaic virus (FMV). *J Biotechnol*, 152: 58~62
- Raschke K, Fellows MP (1971). Stomatal movement in *Zea mays*: Shuttle of potassium and chloride between guard cells and subsidiary cells. *Planta*, 101: 296~316
- Sassa H, Ushijima K, Hirano H (2002). A pistil-specific thaumatin/PR5-like protein gene of Japanese pear (*Pyrus serotina*): sequence and promoter activity of the 5' region in transgenic tobacco. *Plant Mol Biol*, 50: 371~377
- Shelenkov A, Korotkov E (2009). Search of regular sequences in promoters from eukaryotic genomes. *Comput Biol Chem*, 33: 196~204
- Sunilkumar G, Connell JP, Smith CW, Reddy AS, Rathore KS (2002). Cotton alpha-globulin promoter: isolation and functional characterization in transgenic cotton, *Arabidopsis*, and tobacco. *Transgenic Res*, 11: 347~359
- Tan H, Yang X, Zhang F, Zheng X, Qu C, Mu J, Fu F, Li J, Guan R, Zhang H et al (2011). Enhanced seed oil production in canola by conditional expression of *Brassica napus* LEAFY COTYLEDON1 and LEC1-LIKE in developing seeds. *Plant Physiol*, 156: 1577~1588
- Thilmony R, Guttman M, Thomson JG, Blechl AE (2009). The LP2 leucine-rich repeat receptor kinase gene promoter directs organ-specific, light-responsive expression in transgenic rice. *Plant Biotechnol J*, 7: 867~882
- Trindade LM, Horvath BM, Bergervoet MJ, Visser RG (2003). Isolation of a gene encoding a copper chaperone for the copper/zinc superoxide dismutase and characterization of its promoter in potato. *Plant Physiol*, 133: 618~629
- Twell D, Wing R, Yamaguchi J, McCormick S (1989). Isolation and expression of an anther-specific gene from tomato. *Mol Gen Genet*, 217: 240~245
- Ubeda-Tomas S, Federici F, Casimiro I, Beemster GT, Bhalerao R, Swarup R, Doerner P, Haseloff J, Bennett MJ (2009). Gibberellin signaling in the endodermis controls *Arabidopsis* root meristem size. *Curr Biol*, 19: 1194~1199
- Ubeda-Tomas S, Swarup R, Coates J, Swarup K, Laplaze L, Beemster GT, Hedden P, Bhalerao R, Bennett MJ (2008). Root growth in *Arabidopsis* requires gibberellin/DELLA signalling in the endodermis. *Nat Cell Biol*, 10: 625~628
- Vaucheret H, Béclin C, Elmayan T, Feuerbach F, Godon C, Morel JB, Mourrain P, Palauqui JC, Vernhettes S (1998). Transgene-induced gene silencing in plants. *Plant J*, 16: 651~659
- Verelst W, Saedler H, Munster T (2007). MIKC\* MADS-protein complexes bind motifs enriched in the proximal region of late pollen-specific *Arabidopsis* promoters. *Plant Physiol*, 143: 447~460
- Wakeley PR, Rogers HJ, Rozycka M, Greenland AJ, Hussey PJ (1998). A maize pectin methylesterase-like gene, *ZmC5*, specifically expressed in pollen. *Plant Mol Biol*, 37: 187~192
- Wu C, Li X, Yuan W, Chen G, Kilian A, Li J, Xu C, Li X, Zhou DX, Wang S et al (2003). Development of enhancer trap lines for functional analysis of the rice genome. *Plant J*, 35: 418~427
- Xu Y, Buchholz WG, DeRose RT, Hall TC (1995). Characterization of a rice gene family encoding root-specific proteins. *Plant Mol Biol*, 27: 237~248
- Yang Z, Lu Q, Wen X, Chen F, Lu C (2012). Functional analysis of the rice rubisco activase promoter in transgenic *Arabidopsis*. *Biochem Biophys Res Commun*, 418: 565~570
- Ye R, Zhou F, Lin Y (2012). Two novel positive cis-regulatory elements involved in green tissue-specific promoter activity in rice (*Oryza sativa* L ssp.). *Plant Cell Rep*, 31: 1159~1172