

星油藤关键酶基因*PvFAD3*启动子的克隆及表达激活分析

廖晓佳^{1,3}, 王晓娟², 王彬^{1,3}, 刘爱忠^{1,*}

¹中国科学院昆明植物研究所, 昆明650201; ²周口师范学院生命科学系, 河南周口466000; ³中国科学院大学, 北京100049

摘要: α -亚麻油酸(α -linolenic acid, ALA)对防治脂类代谢失调而引起的肥胖、心血管疾病、高血脂、高血压等慢性疾病具有重要的生理功能。然而, 大部分油料作物种子ALA的含量都很低, 提高种子ALA的含量一直是油料作物品质改良的重点内容之一。星油藤(*Plukenetia volubilis*)种子油中富含ALA, 是一种具有重要开发前景的油料植物, 解析其种子高效累积ALA的分子机理不仅能为星油藤的遗传改良提供理论依据, 而且能够为提高油料作物种子ALA含量的遗传育种提供理论参考。前期的研究发现星油藤种子高效累积ALA主要是由于关键酶基因*PvFAD3*高度表达的结果。为了进一步理解星油藤种子在发育过程中*PvFAD3*的被调控机理, 本研究利用染色体步移法克隆了*PvFAD3*的启动子, 并且利用生物信息学分析、鉴别了启动子潜在的关键调控元件, 并重点围绕可能调控*PvFAD3*基因表达的bZIP124转录因子, 通过酵母单杂交和烟草叶片启动子激活实验, 验证了*PvFAD3*的表达受bZIP124转录因子的调控。该研究为理解植物种子高效累积ALA的分子机理提供了新的证据。

关键词: 星油藤; α -亚麻油酸; bZIP转录因子; *FAD3*基因; 启动子区; 转录激活

植物种子油脂不仅是重要的营养成分, 也是重要的化工原料。组成植物种子油脂的脂肪酸成分多样, 有的脂肪酸(如多不饱和脂肪酸)对人体的生理代谢具有不可替代的作用。在多不饱和脂肪酸中 α -亚麻油酸(α -linolenic acid, ALA; 18C:3)是种子油脂中相对常见的一种 ω -3脂肪酸, 也是其他长链多不饱和 ω -3脂肪酸(如DHA, 22C:6和EPA, 20C:5)在体内合成的前体。这些 ω -3脂肪酸在人体脂类代谢过程中不仅具有重要的生理功能, 而且对预防肥胖、心血管疾病、高血脂、高血压等慢性疾病等均有重要影响(Shahidi和Miraliakbari 2004; Simopoulos 2008)。由于ALA是人体不能自身合成的, 只能从食物中摄取, 然而对于大部分油料作物来说, 其种子ALA的含量很低, 提高种子ALA的含量一直是油料作物品质改良的重点内容之一。星油藤(*Plukenetia volubilis*), 又名印加果(Sacha Inchi), 为大戟科攀援状多年生木质藤本植物。因为其种子富含油脂(含油率为45%~56%), 且油脂成分主要由多不饱和脂肪酸组成, 其中ALA的含量达50%以上, 因此星油藤种子油一直被看作高品质食用油, 具有重要的开发价值(Cai等2011; Gutiérrez等2011)。解析星油藤种子高效累积ALA的分子机理能够为提高油料作物种子ALA含量的遗传育种提供理论依据。

研究已经发现植物细胞或组织中不饱和脂肪酸的形成主要是一系列脂肪酸去饱和酶作用的结果, 种子储存油脂中ALA的形成主要是去饱和酶

*FAD3*起着主要作用, 即在第15位碳原子脱饱和形成双键, 从而产生ALA (Reed等2000)。在拟南芥种子中, 特异性过表达内源*FAD3*基因能够使种子中的ALA含量从19%增加到了40% (Puttick等2009); 在烟草中过表达*FAD3*基因能够导致叶片、根等组织中ALA的含量显著增加(Hamada等1998)。Dominguez等(2010)在番茄中过表达*FAD3*基因, 发现转基因植株叶片和果实中 α -亚麻酸的含量明显增加。这些研究表明*FAD3*基因是植物细胞或组织合成ALA的关键酶基因。不同植物种子油脂ALA含量差异很大, 其生理机理与*FAD3*基因的表达调控有关。然而, *FAD3*基因在不同植物中被调控的分子机理至今知之甚少。在我们前期的研究中利用星油藤不同发育时期的种子开展了转录组分析, 结果发现*PvFAD3*基因在种子发育中期(即油脂快速累积时期)相对于种子发育前期(即油脂累积初期)其表达量提高了273倍(Wang等2012), 进一步利用real-time PCR定量技术检测发现在种子发育不同时期的*PvFAD3*转录本表达量与ALA累积密切相关(Wang和Liu 2014), 强烈预示着星油藤种子高效累积ALA与*PvFAD3*的表达调控有关。

为了调查星油藤*PvFAD3*的表达调控机制, 本研究使用Tail-PCR技术从星油藤基因组中克隆获

收稿 2016-11-07 修定 2016-12-19

资助 国家自然科学基金(31571709)和云南省应用基础自然科学基金(2014FB172)。

* 通讯作者(E-mail: lviaizhong@mail.kib.ac.cn)。

得了*PvFAD3*基因上游2 000 bp的启动子序列,通过该启动子序列的特征分析,发现*PvFAD3*启动子中存在2个G-box顺式作用元件。同时基于我们前期的研究、根据星油藤种子在油脂快速累积时期中转录因子的表达规律,从两个不同发育时期的转录组数据中得到在油脂快速累积时期(S2期)转录上调的一些转录因子,其中一条含有bZIP结构域的转录因子Unigene1230(该转录因子和大豆中的GmbZIP124同源,因此命名为PvbZIP124)(Wang等2012),而bZIP转录因子家族能够特异性的与ACGT元件结合,如A-box(TACGTA)、C-box(GACGTC)和G-box(CACGTG)(Menkens等1995; Ji等2013; Izawa等1993),因此我们推测*PvFAD3*的表达可能受PvbZIP124转录因子的调控。本研究利用酵母单杂交和启动子激活实验初步验证了星油藤*PvFAD3*受PvbZIP124的表达调控,为理解星油藤种子高效累积ALA的分子机理提供了初步的证据。

材料与方 法

1 材料

本研究用于基因启动子克隆的植物叶片材料取自中国科学院西双版纳热带植物园实验地栽培的三年生星油藤(*Plukenetia volubilis* Linneo)植株。用于启动子激活实验的烟草是本氏烟草(*Nicotiana benthamian*),种子萌发后,栽培在实验室。所用农杆菌株为GV3101、植物表达载体PWXP 1.0以及3301vacGFPMP均于实验室保存。用于质粒保存和克隆的大肠杆菌Trans1-T1感受态细胞购自北京全式金生物技术有限公司。常规的分子生物学试剂盒,如PCR产物纯化试剂盒、DNA胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司。限制性内切酶、DNase I和T₄连接酶购自Fermentas公司。其余普通化学试剂均为国产分析纯。用于本实验相关引物是通过Primer Premier 5.0常规软件设计而来,并由昆明硕擎生物科技有限公司合成,目的基因的测序由华大基因完成。

2 *PvFAD3*基因启动子的克隆及序列分析

利用Tail-PCR的方法克隆*PvFAD3*的启动子。参照Liu等(1995)的方法设计合成11条简并引物(AD primer)AD1~AD11,并自己设计基因特异性引物PvSP1~PvSP11(表1)。以PvSP1与简并引物分别配对,进行第1次PCR扩增,所得产物稀释50倍取

1 μL作模板,以PvSP2和简并引物配对开始第2次PCR扩增;所得产物稀释50倍后取1 μL作模板,以PvSP3和简并引物配对开始第3次PCR扩增。第1轮和第3轮Tail-PCR反应参数:93°C 1 min; 95°C 1 min; 94°C 30 s/62°C 1 min/72°C 2 min, 5个循环; 94°C 30 s/25°C 3 min/72°C 2 min, 1个循环; 94°C 30 s/62°C 1 min/72°C 2 min, 6个循环; 94°C 30 s/44°C 1 min/72°C 2 min, 5个循环; 72°C 7 min 1个循环。第2轮Tail-PCR反应参数:94°C 30 s/60°C 1 min/72°C 2 min, 1个循环; 94°C 30 s/60°C 1 min/72°C 2 min, 5个循环; 94°C 30 s/44°C 1 min/72°C 2 min, 5个循环; 72°C 10 min。

将三轮PCR产物进行胶回收并测序。根据测序结果设计基因特异性引物继续向*PvFAD3*基因的5'端扩增,方法步骤及PCR程序同上,直至扩增至2 000 bp以上,本研究一共进行了3次Tail-PCR。最后根据拼接的2 000 bp以上的启动子序列设计引物(下游引物需在ATG之后设计),以星油藤的基因组DNA为模板,使用Transfastpfu进行扩增。扩增条件为:94°C, 预变性3 min; 94°C 20 s, 50°C 20 s, 72°C 2 min 30 s, 30个循环; 72°C延伸7 min。使用PCR产物纯化试剂盒进行纯化,并连接到pBlunt simple vector载体上,测序鉴定。

对获得的*PvFAD3*启动子全长序列用Plant-CARE在线分析软件(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)进行分析,预测可能存在的顺式作用元件。

3 星油藤bZIP转录因子的克隆和生物信息学分析

基于前期的转录组分析发现星油藤种子在发育过程中*PvFAD3*表达和一个Unigene1230的转录表达量都显著提高(Wang等2012),根据转录组的基因注释Unigene1230属于转录因子bZIP家族。为了进步调查该转录因子序列结构,利用转录组测序组装的序列,设计引物FLbZIP-F和FLbZIP-R(表1),经PCR扩增、测序获得该基因序列。具体包括以星油藤发育的种子为材料,提取总RNA。以Prime-Script^R反转录酶(RNase H)产生cDNA。使用Easy-Taq DNA聚合酶进行PCR扩增(94°C预变性5 min; 94°C变性30 s, 54°C退火30 s, 72°C延伸1 min, 共计35个循环; 72°C延伸7 min, 4°C保存)。PCR产物经胶回收并测序、获得基因序列。利用ORF Finder软件(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gorf/gorf.html>)分

表1 实验中所用引物

Table 1 Sequences of primers used in the study

类型	名称	序列(5'→3')
Tail-PCR引物 基因特异性引物	PvSP1	TTGTACCCTGAGCAGCCCAGTAGAGT
	PvSP2	GCAGCCAAAGCAATGACAACAAGAAC
	PvSP3	TTGAAAGGAGGAGGATTGCTAGGGTC
	PvSP4	GACAGAGGAAGAGCTAGAGCAGAAAAG
	PvSP5	TTTTTGGTTCCTCCTCCTTTCATTG
	PvSP6	CAAAGTGAATGTCTATCTGGCAAAAAGC
	PvSP7	CATCGTGAATACAACCAGTCAAGCATA
	PvSP8	TCATACCATAAAAGTGATACATAAATCTAG
	PvSP9	TCTTTTAGATATTAGAATTACTTAGGCTAT
	PvSP10	AGCTAAGGAGATTTTACATTCCATGATAG
	PvSP11	AAIAGTCCATATTAACCTTGTATCCATTT
简并引物	AD1	NTCGASTWTSWGGT
	AD2	NGTCGASWGANAWGAA
	AD3	WGTGNAGWANCANAGA
	AD4	TGWNAGWANCASAGA
	AD5	AGWGNAGWANCAWAGG
	AD6	CAWCGICNGAIASGA
	AD7	TCSTNCGNACNTWGGA
	AD8	STTGNTASTNCTNTGC
	AD9	WCAGNTGWTNGTNGCT
	AD10	TCTTICGNACITNGGA
	AD11	TTGIAGNACIANAGG
启动子全长引物	FLFAD3-F	TGACTATAAGACCCTTTACCACCTGAT
	FLFAD3-R	TTGTACCCTGAGCAGCCCAGTAGA
植物表达载体构建引物	pFAD3-F	AActgcagACTTCTAGGTTGTGACCCGACC
	pFAD3-R	CATGccatggTCCTTCAACAGAGACAGAGGAAGA
	pbZIP-F	GGgtaccATGGCATCCTCTAGTGGG
	pbZIP-R	GCtctagaTCAATACTGAATAAGATCAGGGGA
bZIP全长引物	FLbZIP-F	GGGTACCATGGCATCCTCTAGTGGG
	FLbZIP-R	GCTCTAGATCAATACTGAATAAGATCAGGGGA

析基因全长, 经NCBI blast同源基因搜索和比较、分析该序列的特点。利用ExPASy在线软件(<http://web.expasy.org/protparam/>)进行bZIP氨基酸序列的特征分析。

4 植物表达载体的构建与鉴定

根据植物表达载体质粒图谱和已获得的*PvFAD3*启动子、*PvbZIP124*序列设计引物pFAD3-F、pFAD3-R和pbZIP-F、pbZIP-R (表1), 使用Tks Gflex™ DNA Polymerase进行扩增, 扩增条件为: 94°C, 预变性 2 min; 98°C 10 s, 55°C 15 s, 68°C 30 s, 30 个循环; 68°C延伸7 min, 反应完成后使用1%琼脂糖电泳检测PCR产物。将空载体PWXP1.0和3301vacGFPMP菌种划线并扩大培养后提质粒, 分别用*KpnI*、*XbaI*

和*PstI*、*NcoI*双酶切, 利用T₄ DNA连接酶把所得胶回收产物进行定向连接, 连接产物转化大肠杆菌感受态Trans1-T1涂Kan⁺抗性LB板生长过夜, 挑选阳性克隆, 经PCR验证后测序。把构建好的效应载体命名为p35s::PvbZip124, 把含599 bp *PvFAD3*启动子的报告载体命名为pPvFAD3::GFP (图1)。

5 酵母单杂交实验

将人工合成的G-box元件E1 (TACGTCACGTA)、E2 (TACGTG), 突变的G-box元件ME1 (TATTT-CACGTA)、ME2 (TATCTG) 3次串联后(表2)用*HindIII*和*SalI*双酶切分别构建到pAbAi载体(分别记为pAbAi-pFAD3-E1/-E1m, pAbAi-pFAD3-E2/-E2m) (图2)。同时根据*PvbZIP124*的编码序列设

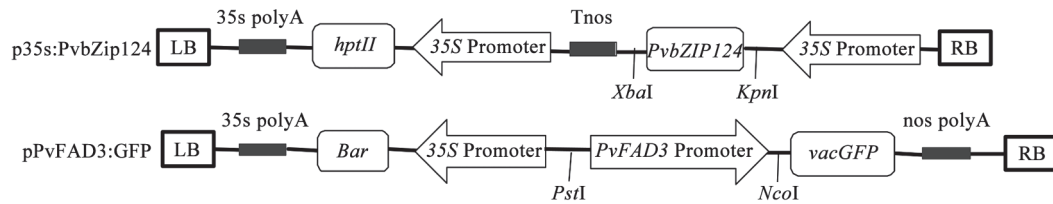


图1 植物表达载体结构示意图

Fig.1 The structural diagram of plant expression vector

表2 酵母单杂交ACGT元件合成序列

Table 2 Oligonucleotide synthesized ACGT element with flanking sequences for yeast one-hybrid assay

名称	序列
FAD3-E1	AGCTTTGTTACGTCACGTTAGTGATGTTACGTCACGTTAGTGATGTTACGTCACGTTAGTGAG
FAD3-E1m	AGCTTTGTTATTTTCATTTAGTGATGTTATTTTCATTTAGTGATGTTATTTTCATTTAGTGAG
FAD3-E2	AGCTTCATTTTACGTGTCCTCCATTTTACGTGTCCTCCATTTTACGTGTCCTCG
FAD3-E2m	AGCTTCATTTTATCTGTCCTCCATTTTATCTGTCCTCCATTTTATCTGTCCTCG

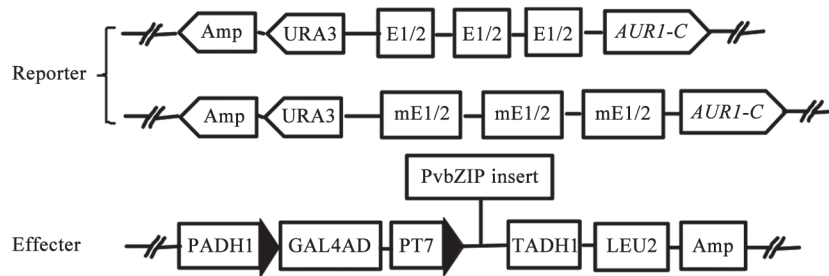


图2 酵母表达载体结构示意图

Fig.2 The structural diagram of yeast expression vector

m表示突变; E1/2表示E1和E2顺式作用元件的3次重复。

引物, 在正向和反向引物的两端分别引入*Sma*I和*Bam*HI酶切位点, 双酶切后构建到pGADT7载体(记为pGADT7-PvbZIP)(图2)。将构建好的报告载体与bZIP文库表达载体共同转化酵母菌株Y1H, 在SD/-Ura/-Leu平板上筛选转化子, 获得的阳性克隆在SD/-Ura/-Leu/+200 ng·mL⁻¹ AbA平板上进行检测。如果可以结合, 则共转化的酵母具有AbA抗性, 不被AbA抑制生长; 如果不能结合, 则共转化的酵母的生长被AbA强烈抑制。

6 农杆菌介导的烟草转化及启动子激活实验

用化学法制备农杆菌感受态, 用冻融法把构建好的表达载体和报告载体转化进农杆菌GV3101。在含有Kan⁺、Rif⁺抗性的LB平板上筛选出的阳性单克隆接种在LB液体培养中(50 mg·mL⁻¹利福平, 50 mg·mL⁻¹卡那霉素) 28°C摇床中震荡培养过夜,

悬浮菌时用10 mmol·L⁻¹ 2-(N-morpholine)-ethanesulfonic acid (MES; pH 5.6)、10 mmol·L⁻¹ MgCl₂和200 μmol·L⁻¹ acetosy-ringone (AS, 乙酰丁香酮)的水溶液, 洗涤2次, 调农杆菌悬浮物到OD≈1.2, 并将需要混合的两种农杆菌混合(1:1), 单独注射的农杆菌悬浮物调节OD≈0.6, 室温静置3~5 h, 用10 mL注射器注射到2~4周大小的本氏烟草叶片, 在22~25°C, 16 h光照, 8 h黑暗的培养室中培养24~48 h后用荧光显微镜观察结果。

实验结果

1 星油藤*PvFAD3*基因启动子的克隆和顺式作用元件分析

我们利用Tail-PCR的方法来获得*PvFAD3*启动子的序列。第一次Tail-PCR扩增利用*PvFAD3*基因

上5' UTR区域设计的PvSP3引物和任意兼并引物AD1, 并测序获得483 bp长度的序列; 第二次Tail-PCR扩增利用已获得的序列设计引物PvSP6和任意兼并引物AD5, 并测序获得670 bp长度的延伸; 第三次Tail-PCR扩增利用第二次PCR获得的序列设计引物PvSP10和任意兼并引物AD8并测序获得新增1 049 bp长度的序列。为了获得启动子全长的序

列、并确证三次扩增的序列位于*PvFAD3*基因启动子上, 分别在第三次扩增所得序列的5'端外侧设计引物FLFAD3-F和*PvFAD3*基因的ORF内设计的引物FLFAD3-R (表1), 通过PCR扩增和测序, 获得并验证2 202 bp长度的DNA序列, 结合*PvFAD3*基因原有的5' UTR区域的86 bp序列, 共获得了*PvFAD3*基因5'上游序列2 288 bp (图3), 供进一步的分析。

```

-1 500 ATGTAAATAAATTATTACTAAAGGTTCAATATTTTCATTATTTTCGTTTTTGAATTTT
-1 440 ATCGATAAGAAATAACAATTTTTTTATTTATGCTGAAACTATTTATGTTTCTTGTCTTT
          5' UTR Py-rich stretch
-1 380 AATAAAATTTATTTTGACAGATTATTTTTTATTTCTCTATCTTAATTTCAATTGTTAT
-1 320 TAAAGAAAGCTATATATGGTGAGTTCAAATAGATAAATGCTAAAATATGTTAGCAATATG
          GA-motif
-1 260 AATGTTATGTAAAATCAAAGGAAATGGATAACAACGGTTAATATGGACTATTATTAAGACT
          GT1-motif
-1 200 AAAAAAATATTGAGATGTGGATATCTATCATGGAATGTAAAAATCTCCTTAGCTTAAGG
-1 140 CTAAACTAATCTAACAATCTAACCTAAAATTTTCCAGAAAAGTAAGACTTAAACTTAAATAA
          ATCT-motif          MRE          TCA-element
-1 080 ATATCTTATTTATAGCCTAAGTAATCTAATATCTAAAAGAAACGTGATATATAAATAA
-1 020 AAAAACAACTAAAAAGCATTGATATCTAATTTAAGTGTTAAGAGTGCTTGTTTTTAGA
-960 GTGTAAGTTACATGTTTAACTTTTCATCTAATAACTAGATTTATGATCACATTTTATGG
-900 TATGAAAAGATAGTTAGTTTCTTACAATTCATTTAGGAATAACCTAAAATAAAAGGTA
          MBSII          TC-rich repeats          MRE
-840 AACATAAGGACATTTAATGATTTTCTTACCTTCCCTTCATGTCTAATTTATTATAAT
          Box4
-780 TAAAATAGCAAATAAAATTCCTAAATAAGCTAAAATATTGTTGAAGTAGCATTATAAGTT
-720 ATCACAAGTCGAATAGGATAGACCGGATCACATTTTGTGCCATAGCTTGGATCACAATCA
-660 AGCCTATTACATAGATCTTAACCTGCACCTCAGACACAACCTATTTACAATTTGCGCCA
-600 CACTTTCTAGGTTGTGACCCGACCTCTTGTCCAAGACAACCTTTTTTGAAAAATATGAA
-540 ATTTATGCTTGACTGGTTGTATTACGATGAACATGTTCTTTCCATTTAAGTTGCTTTCA
-480 ATTGAGACCTCCGGTTAATATGAAATTTGGCATTGTATAAAAAATGGAGATTTCATAATCAT
          GT1-motif          Gap-box
-420 GCTTTTGCCAGATAGACATTGAGTTGAAAGTTGCAAGTTATGAAAATATGGCTGGAGGTT
-360 GGTACCATTACGGGAATAGACAGGAGCAATCGAAATGACAGAATAGCTTCCCGATCT
-300 GCATCAATGAAAGGAGAGGAGGAACCAAAAAATGGAATCCTCTTCTCTCAGCATGAACA
-240 TTGTTAGAAGTGAACAATTTGGCTGCGATTTACAATATTGTTACGTCACGTAGTACTC
          CGTCA-motif G-box
-180 ACATGAACTACCCATGTGCACCATTTTACGTGCTTCTCCCTAGCTAACTCATTATA
          G-box          Sp1
-120 TATATCTATGTGTATAAGTTATATAGGTCGGTGGCTTTAGCAGAATTCAGCAGCAGCTAC
          TATA-box
-60 CCACTCAACCCCTCTCTCTCTTCTGCTCTAGCTCTTCTCTGCTCTGTTGAAGGA
          5' UTR Py-rich stretch          GARE-motif
+1 ATGCAGACCATGGATATTTTC

```

图3 *PvFAD3*启动子的序列特征

Fig.3 The *cis* acting elements within the *PvFAD3* promoter region

方框: 转录起始点; 加粗: 翻译起始子; 下划线: 保守的顺式调控元件。

采用PLANTCARE软件对启动子序列顺式作用元件进行分析,结果显示了转录起始位点在-88位的“A”碱基(图3),鉴别了多样的顺式作用元件,在-124~-117位点含有启动子特征性的TATA-box序列结构,应该是RNA聚合酶的结合位点,能够保证转录的精确起始。特别是,分析结果显示了该启动子中含有多个潜在的信号应答元件和结合位点,如光响应元件(Sp1、ATCT-motif、GT1-motif和Gap-box等)、激素响应顺式元件(如ABA响应顺式元件ABRA、赤霉素响应顺式元件GARE-motif、水杨酸响应顺式元件TCA-element),这些分析显示*PvFAD3*基因的表达可能受多种因素的表达调控。我们注意到在-153至-158位点含有一个G-Box(TACGTG)顺式作用元件,在-195至-198位点也含有一个G-Box核心序列ACGT。因为在大部分转录因子和启动子上顺式作用元件结合、以激活启动子基因的表达主要发生在启动子-500 bp以内区域(Warnatz等2010),根据*PvFAD3*启动子-500 bp以内区域的顺式元件分布特点,我们重点关注了能够与G-Box结合,调控基因表达的转录因子。研究已经发现G-Box顺式元件和植物特有的转录因子

bZIP具有专一性的结合(Menkens等1995),而且在我们前期的转录组数据分析发现在星油藤种子ALA快速累积过程中*PvFAD3*基因的表达和一个bZIP转录因子(*Unigene1230*)的表达都显著提高(Wang等2012),预示了该bZIP转录因子很可能是*PvFAD3*基因转录的直接调控因子。因此,我们进一步开展了bZIP转录因子(*Unigene1230*)的克隆,及其对*PvFAD3*基因的转录激活研究。

2 *PvbZIP124*基因的克隆与序列结构分析

获得全长*PvbZIP124*基因的开放阅读框(ORF)486 bp,编码161个氨基酸。利用该基因氨基酸序列在GenBank中进行BLASTp同源性检索,结果发现该序列和大豆(*Glycine max*)中的GmbZIP124 (NP_001238344.1)和GmbZIPATB2 (NP_001236565.1)、苜蓿(*Medicago truncatula*)中的MtbZIP124 (XP_013466147.1)以及拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中的AtbZIP44 (NP_177672.2)和AtbZIP2 (NP_179408.1)基因序列高度同源。氨基酸多序列比对表明植物bZIP具有较高的保守性,分析发现*PvbZIP124*含有bZIP转录因子家族特有的Basic区域和Leucine zipper的序列特征(Jakoby等2002; Yang等2009)(图4)。



图4 星油藤*PvbZIP124*和其他物种的氨基酸序列比对

Fig. 4 Multiple amino acid sequence alignment of *PvbZIP124* from *Plukenetia volubilis* and similar amino acid sequences from other plants

完全一致的氨基酸用黑色表示;保守的氨基酸用深灰色表示;相似的氨基酸用灰色表示;倒三角形表示保守亮氨酸的位置;正方形表示距离亮氨酸拉链区第一个亮氨酸-10位置的氨基酸,对于DNA结合特异性是重要的。

3 *PvFAD3*基因的转录激活验证

为了检验转录因子*PvbZIP124*能否激活*PvFAD3*的表达,我们首先开展了酵母单杂交试验。将*PvFAD3*启动子的这2个ACGT为核心元件(对应的ACGT突变序列作为对照)及其部分侧翼序列串联重复3次(图2),并标记为E1和E2,之后克隆到pAbAi载体上构成报告载体。每一个报告载体都与pGADT7-

*PvbZIP*效应载体一起共转入到Y1HGOLD酵母菌株中。结果如图5所示,当共转化pGADT7-*PvbZIP*之后,转化了突变元件的pAbAi-pFAD3-E1m, pAbAi-pFAD3-E2m以及阴性对照p53-AbAi的酵母被200 ng·mL⁻¹的AbA所抑制,而转化了pAbAi-pFAD3-E1、pAbAi-pFAD3-E2和阳性对照pGADT7-P53/p53-AbAi的酵母在SD/-Ura/-Leu/+200 ng·mL⁻¹ AbA的

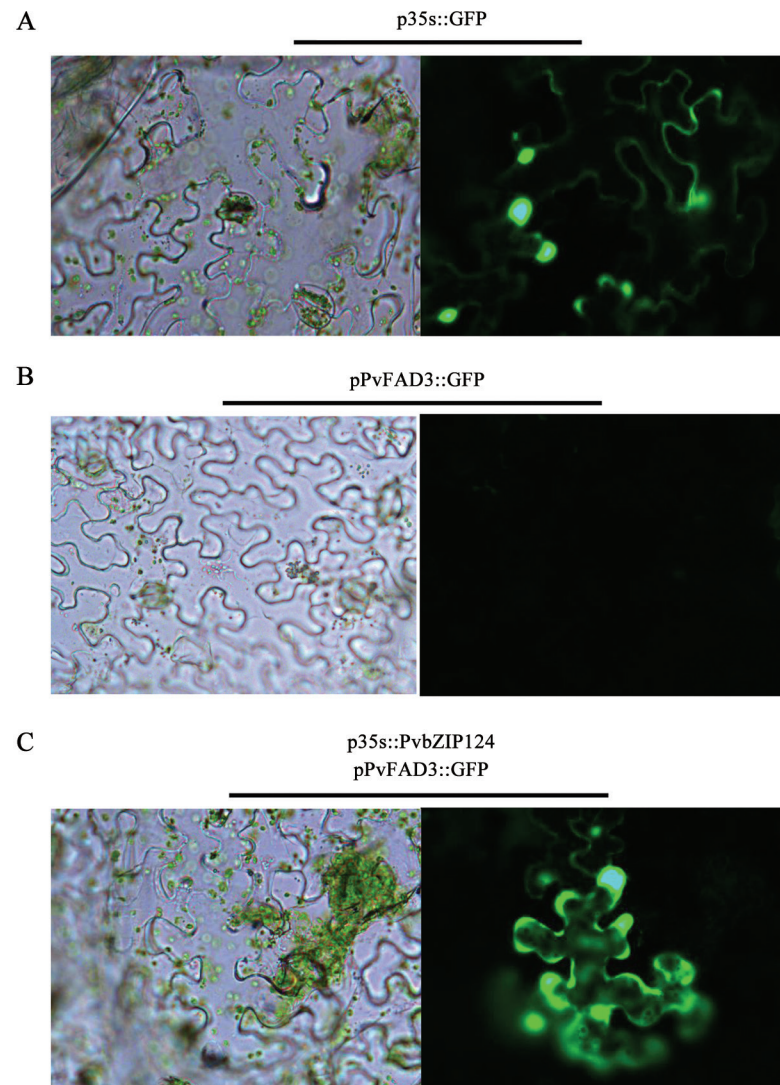


图6 用烟草瞬时表达实验分析PvbZIP124对*PvFAD3*的转录激活作用

Fig.6 Interaction of PvbZIP124 and *PvFAD3* in transient tobacco assay

A: 把35S强启动*GFP*表达的p35s::GFP载体作为阳性对照; B: 把*PvFAD3*启动*GFP*表达的pPvFAD3::GFP载体作为阴性对照; C: 共转化报告载体pPvFAD3::GFP和效应载体p35s::PvbZIP124结果图。

原因, 即相对于其他ALA含量低的种子而言星油藤种子高效累积ALA可能主要是*FAD3*基因在转录水平有更高的表达。在当前的研究中, 我们围绕解析*PvFAD3*基因在转录水平的表达调控机理。通过分析*PvFAD3*基因启动子区域(特别是-500 bp的区域)顺式作用元件的特点与分布鉴别了G-box的序列位点, 并通过酵母单杂交实验和启动子激活实验, 验证PvbZIP124转录因子能够通过结合*PvFAD3*基因启动子部分的G-box位点, 从而激活其表达。虽然, 研究已经发现bZIP转录因子家族能够

特异性的与ACGT元件结合, 如A-box (TACGTA)、C-box (GACGTC) 和G-box (CACGTG) (Menkens等1995; Ji等2013; Izawa等1993), 而且在拟南芥的研究中发现AtbZIP67能够特异性调控*AtFAD3*基因的表达, 从而提高种子中ALA的含量(Mendes等2013), 但是当比较PvbZIP124氨基酸序列和拟南芥bZIP成员的同源性, 发现PvbZIP124主要和拟南芥的AtbZIP2和AtbZIP44同源(如图2所示), 这两个成员在拟南芥中都属于S-group, 而AtbZIP67属于A-group (Jakoby等2002), 说明bZIP转录因子在发

育的种子中对*FAD3*基因的调控可能具有物种特异性。

基因的表达调控通常受多种顺式作用元件和反式作用因子的相互协调而实现的, 虽然基于当前的研究我们可以得出结论星油藤在种子发育过程中*PvFAD3*基因的高表达应该与*PvbZIP124*转录因子的调控有关, 但是脂肪酸合成途径涉及多个脂类基因的参与, ALA的合成需要亚油酸(C18:2)为底物, 因此星油藤种子中高效累积ALA的分子机理应该是多个基因共同作用的结果。

参考文献

- Cai ZQ, Yang Q, Tang SX, Dao XS (2011). Nutritional evaluation in seeds of a woody oil crop *Plukenetia volubilis* Linneo. *Acta Nutr Sin*, 33 (2): 193–195 (in Chinese with English abstract) [蔡志全, 杨清, 唐寿贤, 刀祥生(2011). 木本油料作物星油藤种子营养价值的评价. *营养学报*, 33 (2): 193–195]
- Dominguez T, Hernandez ML, Pennycooke JC, Jiménez P, Martínez-Rivas JM, Sanz C, Stockinger EJ, Sánchez-Serrano JJ, Sanmartín M (2010). Increasing ω -3 desaturase expression in tomato results in altered aroma profile and enhanced resistance to cold stress. *Plant Physiol*, 153 (2): 655–665
- Gutiérrez LF, Rosada LM, Jiménez Á (2011). Chemical composition of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds and characteristics of their lipid fraction. *Grasas Y Aceites*, 62 (1): 76–83
- Hamada T, Kodama H, Takeshita K, Utsumi H, Iba K (1998). Characterization of transgenic tobacco with an increased α -linolenic acid level. *Plant Physiol*, 118 (2): 591–598
- Izawa T, Foster R, Chua NH (1993). Plant bZIP protein DNA binding specificity. *J Mol Biol*, 230 (4): 1131–1144
- Jakoby M, Weisshaar B, Dröge-Laser W, Vicente-Carbajosac J, Tiedemann J, Kroje T, Parcy F (2002). bZIP transcription factors in *Arabidopsis*. *Trends Plant Sci*, 7 (3): 106–111
- Ji X, Liu G, Liu Y, Zheng L, Nie X, Wang Y (2013). The bZIP protein from *Tamarix hispida*, ThbZIP1, is ACGT elements binding factor that enhances abiotic stress signaling in transgenic *Arabidopsis*. *BMC Plant Biol*, 13 (3): 1–13
- Lee JH, O'Keefe JH, Lavie CJ, Harris WS (2009). Omega-3 fatty acids: cardiovascular benefits, sources and sustainability. *Nat Rev Cardiol*, 6 (12): 753–758
- Liu YG, Mitsukawa N, Oosumi T, Whittier RF (1995). Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *Plant J*, 8 (3): 457–463
- Mendes A, Kelly AA, van Erp H, Shaw E, Powers SJ, Kurup S, Eastmond PJ (2013). bZIP67 regulates the omega-3 fatty acid content of *Arabidopsis* seed oil by activating fatty acid desaturase3. *Plant Cell*, 25 (8): 3104–3116
- Menkens AE, Schindler U, Cashmore AR (1995). The G-box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins. *Trends Biochem Sci*, 20 (12): 506–510
- O'Quin JB, Bourassa L, Zhang D, Shockey JM, Gidda SK, Fosnot S, Chapman KD, Mullen RT, Dyer JM (2010). Temperature-sensitive post-translational regulation of plant omega-3 fatty-acid desaturases is mediated by the endoplasmic reticulum-associated degradation pathway. *J Biol Chem*, 285 (28): 21781–21796
- Puttick D, Dauk M, Lozinsky S, Smith MA (2009). Overexpression of a FAD3 desaturase increases synthesis of a polymethylene-interrupted dienoic fatty acid in seeds of *Arabidopsis thaliana* L. *Lipids*, 44 (8): 753–757
- Reed DW, Schäfer UA, Covello PS (2000). Characterization of the *Brassica napus* extraplastidial linoleate desaturase by expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Plant Physiol*, 122 (3): 715–720
- Shahidi F, Miraliakbari H (2004). Omega-3 (*n*-3) fatty acids in health and disease: Part 1-cardiovascular disease and cancer. *J Med Food*, 7 (4): 387–401
- Simopoulos AP (2008). The importance of the omega-6/omega-3 fatty acid ratio in cardiovascular disease and other chronic diseases. *Exp Biol Med*, 233 (6): 674–688
- Warnatz HJ, Querfurth R, Guerasimova A, Cheng X, Haas SA, Hufton AL, Manke T, Vanhecke D, Nietfeld W, Vingron M, et al (2010). Functional analysis and identification of *cis*-regulatory elements of human chromosome 21 gene promoters. *Nucleic Acids Res*, 38 (18): 6112–6123
- Wang CT, Xu YN (2010). The 5' untranslated region of the *FAD3* mRNA is required for its translational enhancement at low temperature in *Arabidopsis* roots. *Plant Sci*, 179 (3): 234–240
- Wang X, Liu A (2014). Expression of genes controlling unsaturated fatty acids biosynthesis and oil deposition in developing seeds of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.). *Lipids*, 49 (10): 1019–1031
- Wang X, Xu R, Wang R, Liu A (2012). Transcriptome analysis of Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis* L.) seeds at two developmental stages. *BMC Genomics*, 13 (1): 1–17
- Yang Y, Gao SQ, Tang YM, Ye XF, Wang YB, Liu MY, Zhao CP (2009). Advance of bzip transcription factors in plants. *J Triticeae Crops*, 29 (4): 730–737 (in Chinese with English abstract) [杨颖, 高世庆, 唐益苗, 冶晓芳, 王永波, 刘美英, 赵昌平(2009). 植物 bZIP 转录因子的研究进展. *麦类作物学报*, 29 (4): 730–737]

Cloning of the promoter of the key enzyme gene *PvFAD3* from Sacha Inchi and its transcriptional activation analyses

LIAO Xiao-Jia^{1,3}, WANG Xiao-Juan², WANG Bin^{1,3}, LIU Ai-Zhong^{1,*}

¹Kunming Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Kunming 650201, China; ²Department of Life Sciences, Zhoukou Normal University, Zhoukou, Henan 466000, China; ³University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: The α -linolenic acid (ALA) is essential in diet because of its functions in taking precautions against disturbance of lipid metabolism. The content of ALA, however, is low in most of oilseeds. Increasing the ALA content is critical to enhance the oil quality for genetic improvement and breeding in oilseed crops. Still, the molecular mechanism of ALA biosynthesis in oilseeds remains uncertain. Sacha Inchi (*Plukenetia volubilis*) is a potential oilseed crop because its seed oil is rich in ALA (ca. 50%). Dissecting the molecular mechanism underlying ALA biosynthesis in Sacha Inchi seeds would provide the information serving for genetic improvement and breeding toward enhancing the oil quality in oilseed crops. Our previous study has revealed that the high expression of key enzyme gene *PvFAD3* encoding the desaturase which makes the formation of ALA is responsible for the high content of ALA in the developing seeds of Sacha Inchi. Further, in order to investigate how *PvFAD3* is regulated in the developing seeds of Sacha Inchi, we cloned the promoter region of *PvFAD3* gene using the Tail-PCR technology, and analyzed the main *cis*-elements within the promoter by bioinformatics methods in this study. We identified the transcription factor bZIP124, which might be a key factor to regulate the expression of *PvFAD3* gene. Finally, we experimentally confirmed that the transcriptional activation of *PvFAD3* using the yeast one hybrid technique and the transcriptional activation experiment in tobacco leaf. This study would add novel insights in understanding the regulatory mechanisms of ALA biosynthesis in Sachi Inchi seeds.

Key words: Sacha Inchi; α -linolenic acid (ALA); bZIP transcription factor; *FAD3* gene; promoter region; transcriptional activation

Received 2016-11-07 Accepted 2016-12-19

This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (Grant No. 31571709) and the Yunnan Applied and Natural Science Foundation (Grant No. 2014FB172).

*Corresponding author (E-mail: liuaizhong@mail.kib.ac.cn).