

2 个蜡梅 *nsLTP* 基因启动子的克隆及其在烟草中的瞬时表达分析

马婧¹, 刘群^{1,2}, 王晓斌¹, 眭顺照¹, 李名扬¹

(¹西南大学园艺园林学院/重庆市花卉工程技术研究中心/南方山地园艺学教育部重点实验室, 重庆 400715;

²西南民族大学生命科学院, 成都 610000)

摘要: 利用 hiTAIL-PCR 法得到了 2 个蜡梅 (*Chimonanthus praecox*) 非特异性脂转移蛋白 (non-specific lipid transfer protein) 基因家族成员 *CpLTP3* 和 *CpLTP4* 翻译起始位点上游启动子序列, 长度分别为 1298bp 和 838bp。生物信息学分析表明 2 个序列均存在启动子的基本元件 TATA-box 和 CAAT-box 及多个与植物非生物胁迫相关的响应元件。在烟草叶片中的瞬时表达结果表明这两个启动子序列均具备驱动报告基因 GUS 表达的功能。

关键词: 蜡梅; 非特异性脂转移蛋白; 启动子; hiTAIL-PCR; 胁迫

Cloning and Transient Expression Assay of Two *nsLTP* Gene Promoters from *Chimonanthus praecox* in Tobacco

MA Jing¹, LIU Qun^{1,2}, WANG Xiao-bin¹, SUI Shun-zhao¹, LI Ming-yang¹

(¹ Key Laboratory of Horticulture Science for Southern Mountainous Regions, Ministry of Education / Chongqing Engineering Research Center for Floriculture / College of Horticulture and Landscape, Southwest University, Chongqing 400715;

² College of Life Science, Southwest University for Nationalities, Chengdu 610000)

Abstract: The promoter fragments of 1298bp and 838bp upstream from the 5' upper of *Chimonanthus praecox* non-specific lipid transfer protein (nsLTP) gene family member *CpLTP3* and *CpLTP4* were isolated from the genomic DNA of *Chimonanthus praecox* by hiTAIL-PCR technique respectively. Bioinformatics analysis revealed that the two sequences contained basic cis-elements such as TATA-box and CAAT-box and many elements involved in the plant abiotic stress. The result of transient expression indicated that all the sequences had the function to drive reporter gene GUS in tobacco.

Key words: *Chimonanthus praecox*; Non-specific lipid transfer protein; Promoter; hiTAIL-PCR; Stress

1975 年, Kader^[1] 首次从马铃薯块茎中分离得到非特异性脂转移蛋白 (non-specific lipid transfer protein, nsLTP), 根据分子量的不同将其分为两类: nsLTPI 和 nsLTPII。对植物非特异脂转移蛋白的研究最初集中于生物膜之间的脂类物质转运^[2-3] 和角质合成^[4-5], 随着研究的不断深入, 发现 nsLTP 蛋白在植物抗逆^[6-8]、抗虫、抗菌等方面具有重要作用^[9-10]。蜡梅 (*Chimonanthus praecox*) 为特产于我国的著名园林观赏树种和传统的香料及药用植

物, 西南大学园林花卉研究所构建了国内外第 1 个蜡梅花 cDNA 文库, 发现编码脂转移蛋白基因在蜡梅花 cDNA 文库中出现频率最高, 半定量 RT-PCR 分析表明 *nsLTP* 基因在蜡梅开花各个时期均表现较高的转录水平^[11]。在之后的研究中又克隆到了 3 个蜡梅非特异性脂转移蛋白基因家族成员, 发现不同成员的基因表达与植物抗逆性具有直接关系且存在差异^[12]。本研究拟克隆蜡梅非特异性脂转移蛋白不同家族成员的启动子, 并验证

收稿日期: 2011-09-23 修回日期: 2011-12-13

基金项目: 国家自然科学基金 (31070622, 30872068); 中央高校基本科研业务费专项资金 (XDJK2009A004)

作者简介: 马婧, 博士研究生, 研究方向为植物生物技术。E-mail: kongqi19@sohu.com

刘群 (并列第一作者), 博士研究生, 副教授, 研究方向为植物生物技术。E-mail: liuqun2567@yahoo.com.cn

通讯作者: 李名扬, 教授, 博导, 主要从事细胞工程与花卉育种研究。E-mail: limy@swu.edu.cn

其功能,为揭示不同家族成员的表达差异和探索该类基因在蜡梅开花抗寒性方面的作用机制奠定基础,并为蜡梅的基因工程抗逆性遗传改良提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料

供试蜡梅品种为罄口蜡梅,蜡梅小苗由西南大学园林花卉研究所(重庆市花卉工程技术中心),南方山地园艺教育部重点实验室繁殖培育。农杆菌侵染所用烟草为 W38 (*Nicotiana tabacum* cv. Wisconsin 38) 组培苗。大肠杆菌感受态细胞 TOP10、根癌农杆菌菌株 LBA4404、植物表达载体 pBI121 均由该研究所保存。克隆载体 pMD19-T、Taq DNA 聚合酶、各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶等购自 TaKaRa 公司(大连); DL2000、DNA Marker、质粒提取和胶回收试剂盒均购自 BioFlux 公司(杭州); PCR 引物合成及 DNA 测序均由上海生物工程有限公司完成;抗生素、 α -gluc 购自上海生物工程有限公司;其他试剂均为国产分析纯。

1.2 蜡梅基因组 DNA 的提取及启动子序列的

hiTAIL-PCR 扩增

以蜡梅幼嫩叶片为试材,CTAB 法提取总 DNA。用 Liu 等^[13]改良的 hiTAIL-PCR 法扩增蜡梅非特异性脂转移蛋白基因的启动子。以报道的蜡梅 *CpLTP3* 和 *CpLTP4* 基因(GenBank accession number: FJ904083, FJ904084) 5'端序列为基础,分别设计 3 条特异的巢式引物 RB0、RB1、RB2,结合 Liu 等^[13]文献中的简并引物 LAD 及 AC0/AC1,分别进行 3 轮扩增,所用引物序列如表 1 所示。

以 50ng 的蜡梅基因组 DNA 为预扩增模板,将预扩增的 PCR 产物稀释 50 倍作为第 1 轮 PCR 扩增的模板,第 1 轮 PCR 产物稀释 20 倍作为第 2 轮 PCR 扩增的模板。各轮引物组合、PCR 体系及反应条件如表 2 所示。将获得的 PCR 产物连接转化后送上海生工测序。

TAIL-PCR 所获序列经过同源比对确定为 *CpLTP3* 和 *CpLTP4* 基因 5'侧翼序列后,设计并合成引物以利于下一步表达载体的构建,引物序列如下: FCpLTP3pro: 5'-AAGCTTATTACGA TGGACTCCAGAGCGGC-3'(下划线部分为 *Hind*III 酶切位点); RC-pLTP3pro: 5'-GGATCCCTCCGCTTACTTACTCAGTCA

表 1 TAIL-PCR 引物

Table 1 Primers of TAIL-PCR

引物名称	引物序列(5'-3')
LAD1	ACGATGGACTCCAGAGVNVNNGGAA
LAD2	ACGATGGACTCCAGAGBNBNNNGGTT
LAD3	ACGATGGACTCCAGAGVNVNNGCCAC
LAD4	ACGATGGACTCCAGAGBDNBNNNGCAA
LAD5	ACGATGGACTCCAGAGBDNBNNNGCGT
AC0	GGACGATGGACTCCAG
AC1	ACGATGGACTCCAGAG
<i>CpLTP3</i> RB0	GACGCTACCTGCCACACGTGATTG
<i>CpLTP3</i> RB1	ACGATGGACTCCAGTCCGGCCCCACGT-GAGGAGAGGCCAACAGCAA
<i>CpLTP3</i> RB2	CAGCATCAGGCACACA ACAACTCCG
<i>CpLTP4</i> RB0	CCGTTCTACTTGTGAATGGGTGG
<i>CpLTP4</i> RB1	ACGATGGACTCCAGTCCGGCCCTACAT-GCTGCACCGGCACAGGGCC
<i>CpLTP4</i> RB2	CAGACTGTTGCGTCCGTGCCATTGC

CACT-3'(下划线部分为 *Bam*HI 酶切位点); FC-pLTP4pro: 5'-AAGCTTATTACGATGGACTCCAGAGCGGC-3'; RCpLTP4pro: 5'-GGATCCTTCATGGATTTCACAGAGAAT-TG-3'; PCR 扩增条件为: 95℃ 预变性 5min; 95℃ 变性 45s 60℃ 退火 45s 72℃ 延伸 1min 30 个循环; 72℃ 延伸 10min。PCR 产物利用离心柱型琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(BioFlux 公司)进行回收,连接到 pMD19-T 载体上,重组质粒经抗生素、 α -互补筛选和 PCR 方法检测后,送上海生物工程技术有限公司进行测序。所得序列用在线植物转录元件分析工具 PLACE (<http://www.bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html>) 和 Plant CARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 进行启动子分析,寻找可能的植物顺式作用元件。

1.3 植物表达载体的构建

利用 *Hind*III 和 *Bam*HI 分别双酶切含有目的基因的 pMD19-T 质粒和表达载体质粒 pBI121,回收酶切产物,连接后转化大肠杆菌 TOP10,挑取单菌落进行 PCR 和酶切鉴定,获得阳性克隆,分别命名为 pBI121-*CpLTP3*pro 和 pBI121-*CpLTP4*pro。将阳性质粒通过电转化法转入农杆菌 LBA4404,PCR 初步鉴定阳性菌落后抽提其中质粒,回复转化大肠杆菌 TOP10,抽提大肠杆菌质粒进行酶切鉴定。

表 2 TAIL-PCR 的扩增体系、反应条件

Table 2 Amplification condition for TAIL-PCR

反应 Reaction	循环体系 Cycling system(μ l)	温度条件(时间) Temperature condition (Time)	循环数 Cycle No.
预扩增 Pre-amplification	10 \times Ex-Taq Buffer	2 93 $^{\circ}$ C (2min) 95 $^{\circ}$ C (1min)	1
	25mmol/L MgCl ₂	1. 6 94 $^{\circ}$ C (30s) 60 $^{\circ}$ C (1min) 72 $^{\circ}$ C (3min)	10
	2. 5mmol/L dNTP	1. 6 94 $^{\circ}$ C (30s) 25 $^{\circ}$ C (2min) Ramping to 72(0. 5 $^{\circ}$ C / s) 72 $^{\circ}$ C (3min)	1
	20 μ mol/L LAD	1 94 $^{\circ}$ C (20s) 48 $^{\circ}$ C (1min) 72 $^{\circ}$ C (3min)	25
	6 μ mol/L ACO	1 72 $^{\circ}$ C (5min)	1
	6 μ mol/L RBO	1	
	genomic DNA	1	
	Ex-Taq DNAase	0. 2	
ddH ₂ O up to	20		
第一轮扩增 Primary reaction	10 \times Ex-Taq Buffer	1 94 $^{\circ}$ C (20s) 65 $^{\circ}$ C (1min) 72 $^{\circ}$ C (2min)	1
	25mmol/L MgCl ₂	1 94 $^{\circ}$ C (20s) 68 $^{\circ}$ C (1min) 72 $^{\circ}$ C (3min)	
	2. 5mmol/L dNTP	0. 1 94 $^{\circ}$ C (20s) 68 $^{\circ}$ C (1min) 72 $^{\circ}$ C (3min)	
	6 μ mol/L AC1	1 94 $^{\circ}$ C (20s) 50 $^{\circ}$ C (1min) 72 $^{\circ}$ C (3min)	13
	6 μ mol/L RB1	1 72 $^{\circ}$ C (5min)	1
	50 \times 1st PCR product	1	
	Ex-Taq DNAase	0. 2	
	ddH ₂ O up to	25	
第二轮扩增 Secondary reaction	10 \times Ex-Taq Buffer	2. 5 94 $^{\circ}$ C (20s) 68 $^{\circ}$ C (1min) 72 $^{\circ}$ C (3min)	7
	25mmol/L MgCl ₂	2 94 $^{\circ}$ C (20s) 68 $^{\circ}$ C (1min) 72 $^{\circ}$ C (3min)	
	2. 5mmol/L dNTP	2 94 $^{\circ}$ C (20 s) 50 $^{\circ}$ C (1min) 72 $^{\circ}$ C (3min)	
	6 μ mol/L AC1	1 72 $^{\circ}$ C (5min)	1
	6 μ mol/L RB2	1	
	10 \times 2st PCR product	1	
	Ex-Taq DNAase	0. 2	
	ddH ₂ O up to	25	

1. 4 农杆菌介导的烟草转化及启动子瞬时活性检测

以 LBA4404 空菌株为阴性对照, 以含 PBI121 载体的菌株为阳性对照, 对已构建的含蜡梅脂转移蛋白基因 2 个启动子的重组载体进行瞬时表达分析。将烟草组培苗叶片切成 1cm \times 1cm 的叶块, 在

农杆菌菌液浓度 OD₆₀₀ 为 0. 5 的侵染液中浸染 10min 后, 用无菌滤纸吸干叶片表面的菌液, 置于共培养基上 25 $^{\circ}$ C 暗培养 3d 后进行 GUS 染色分析。组织化学染色法 GUS 活性检测按 Jefferson^[14] 的方法进行。取待检测的植物组织于 1. 5ml 离心管中, 加入 GUS 染色液 1ml 以浸没组织块, 37 $^{\circ}$ C 下保温 16 ~

24h 用 70% 乙醇和 30% 乙酸的混合液脱色后取出观察染色结果。

2 结果与分析

2.1 3 轮 TAIL-PCR 产物的电泳结果

用 1% 琼脂糖胶电泳检测预扩增产物, 不同引物对组合所得到的产物在大小和丰度方面存在差异, 预

扩增 PCR 产物中 LAD1-LAD5 与 ACO、RB0 组成的引物对均检测到有大小不同的扩增产物, 并伴有拖带情况出现。将第 1 轮和第 2 轮产物在相邻泳道同时进行电泳检测如图 1 所示, 比较可以看出不同引物组合的第 1 轮和第 2 轮产物在特异性上有所差异, 在第二轮 PCR 产物中, *CpLTP3pro* 和 *CpLTP4pro* 分别有 1 条 1200bp 和 800bp 的较长特异条带。

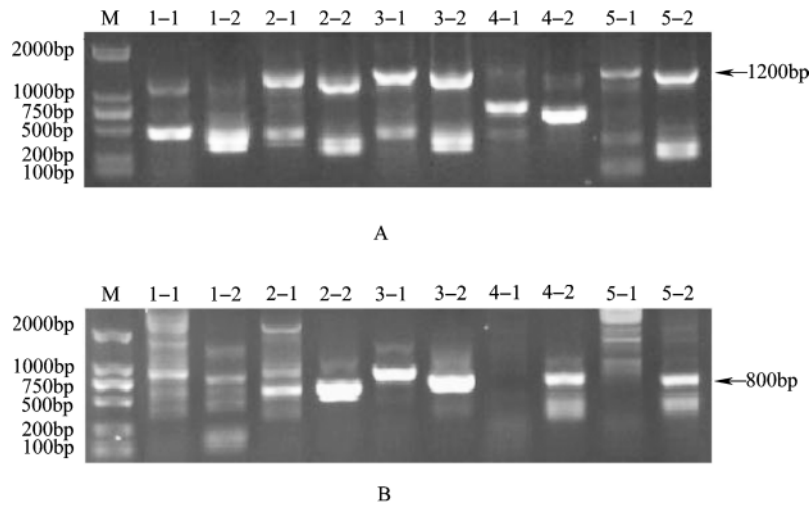


图 1 *CpLTP3pro* 和 *CpLTP4pro* 的第 1 轮和第 2 轮扩增

Fig. 1 Primary and secondary amplification of *CpLTP3pro* and *CpLTP4pro*

A: *CpLTP3pro* 第 1 轮及第 2 轮产物; B: *CpLTP4pro* 第 1 轮及第 2 轮扩增; M: DNA Marker (DL2000)

1-1、1-2 分别代表特异引物和兼并随机引物 LAD1 组合的第 1 轮和第 2 轮扩增 PCR 产物, 同理如 2-1、2-2; 3-1、3-2; 4-1、4-2; 5-1、5-2

A: Primary and secondary amplification of *CpLTP3pro*; B: Primary and secondary amplification of *CpLTP4pro*

M: DNA Marker (DL2000); 1-1、1-2 contains products the primary and secondary amplification of LAD1-5 and

special primer pairs, respectively. 2-1、2-2; 3-1、3-2; 4-1、4-2;

5-1、5-2 are as same means as 1-1、1-2

2.2 目的片段回收及测序

切胶回收图 1-A 泳道 2-2 中 1200bp 的片段和图 1-B 中泳道 3-2 800bp 的片段, 测序后分别与蜡梅 *CpLTP3* 和 *CpLTP4* 基因进行同源性比对, 确认分别为 *CpLTP3* 和 *CpLTP4* 基因 5' 侧翼序列, 以蜡梅基因组 DNA 为模板, 如图 2 所示, 通过 PCR 扩增最终获得 *CpLTP3* 和 *CpLTP4* 基因启动子序列 1298bp 和 838bp, 并分别命名为 *CpLTP3pro* 和 *CpLTP4pro*。二者的序列差异较大, identity 值为 27.75%。其双链序列分别如图 3 所示。

2.3 启动子序列分析

通过 PLANTCARE 对获得的 *CpLTP3pro*, *CpLTP4pro* 启动子进行分析, 结果表明这两个启动子的转录因子结合位点均很多, 其调控特性比较复杂。 *CpLTP3pro* 和 *CpLTP4pro* 启动子都具有多个

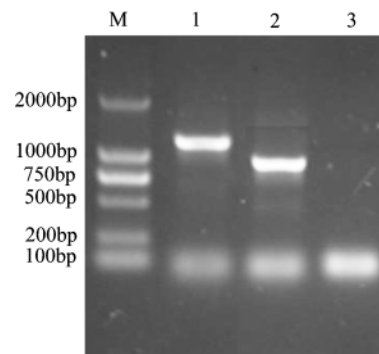


图 2 蜡梅 *CpLTP3pro* 和 *CpLTP4pro* 启动子的 PCR 扩增

Fig. 2 Amplification of *CpLTP3pro* and *CpLTP4pro* promoter

M: DNA Marker (DL2000); 1: *CpLTP3pro*;

2: *CpLTP4pro*; 3: 阴性对照

M: DNA Marker (DL2000); 1: *CpLTP3pro*; 2: *CpLTP4pro*; 3: Blank

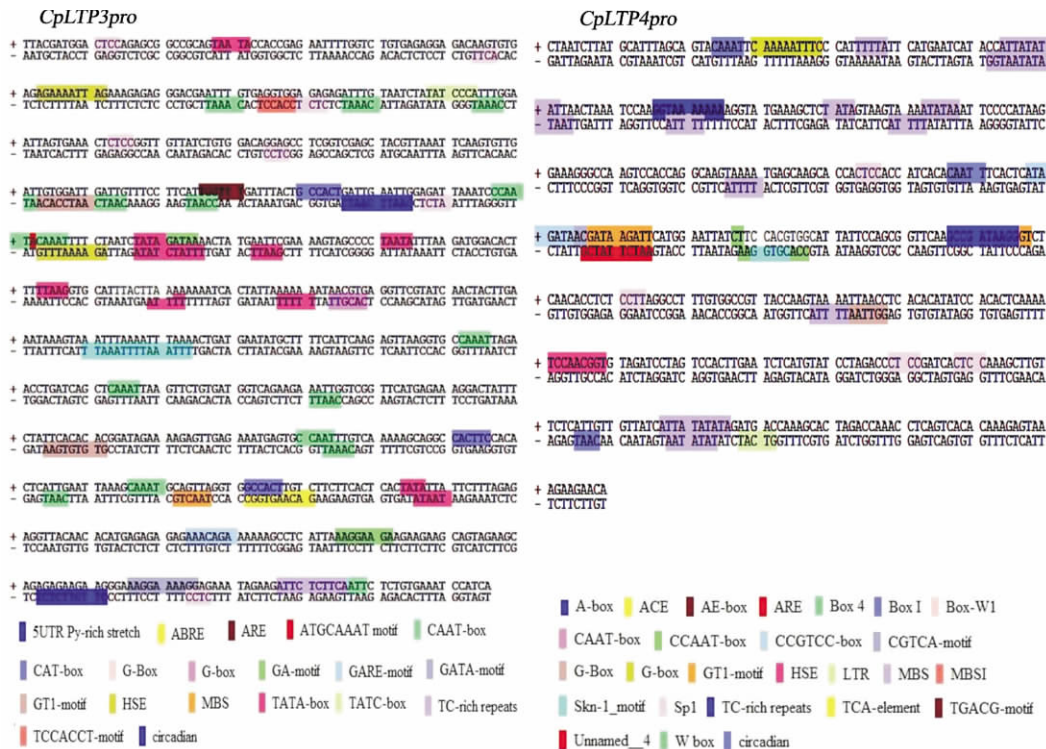


图 3 蜡梅 *nsLTP* 基因启动子 *CpLTP3pro* 和 *CpLTP4pro* 的序列分析

Fig. 3 *nsLTP* gene promoter *CpLTP3pro* and *CpLTP4pro* nucleotide sequence analysis

TATA-box, TATA-box 是 RNA 聚合酶 II 结合位点, 保证转录的精确起始, 并调控上游激活蛋白。同时, *CpLTP3pro* 和 *CpLTP4pro* 启动子上游都具有 CAAT-box, 但 *CpLTP3pro* 包括的数量相对于 *CpLTP4pro* 较少。CAAT-box 主要控制着转录起始的频率, 并增强转录, 其转录激活作用具有双向性, 作用距离不定, 是启动子、增强子区域常见作用元件, 主要转录激活因子有 NFI、CTF1、CTF2、CTF3 等多种蛋白。利用 PLACE 软件对上述 4 个启动子序列的顺式作用元件进行分析, 根据现有文献报道, 发现其中含有若干与植物非生物胁迫相关的响应元件, 两个启动子在所含的元件类型和数量上均有一定差异, 这与植物非特异性脂转移蛋白所具有的抗多种非生物胁迫的功能相一致, 具体分析结果见表 3 和图 3。

2.4 植物表达载体 pBI121-*CpLTP3pro* 和 pBI121-*CpLTP4pro* 的构建

植物表达载体 PBI121 含有 CaMV35S-GUS 融合系统, 本研究将克隆到的 2 个启动子取代植物表达载体 PBI121 的 CaMV35S, 构建表达载体 pBI121-*CpLTP3pro* 和 pBI121-*CpLTP4pro*, 对重组质粒进行双酶切鉴定, 如图 4 所示分别获得了约 1200bp 和 800bp 的预期目的片段。证明 2 个

启动子片段已分别正确插入 pBI121 载体中, 表达载体 pBI121-*CpLTP3pro* 和 pBI121-*CpLTP4pro* 构建完成。

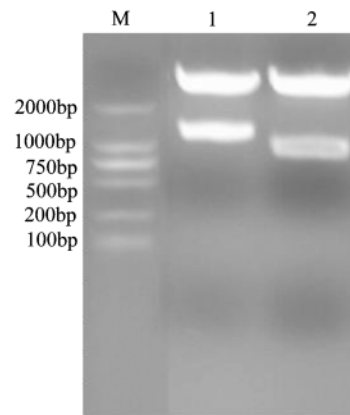


图 4 表达载体 pBI121-*CpLTP3pro* 和 pBI121-*CpLTP4pro* 的酶切验证

Fig. 4 The identification of pBI121-*CpLTP3pro* and pBI121-*CpLTP4pro* by digesting with *Bam*HI&*Hind* III

M: Marker (DL2000) 1: 表达载体质粒 pBI121-*CpLTP3pro*; 2: 表达载体质粒 pBI121-*CpLTP4pro*
3: 阴性对照
M: Marker(DL2000); 1: pBI121-*CpLTP3pro*;
2: pBI121-*CpLTP4pro*; 3: blank

表3 启动子区的调控元件分析

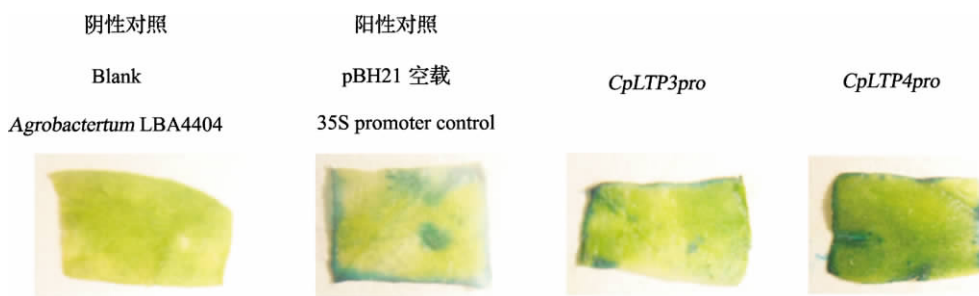
Table3 Cis-acting regulatory elements analysis of two promoter sequences

编号 No.	位点名称 Site name	数量 Amount		序列 Sequence	位点功能 Function of site
		<i>CpLTP3pro</i>	<i>CpLTP4pro</i>		
1	TATA-BOX	21	15	核心序列 TATA	转录起始处是启动子核心元件
2	CAAT-BOX	3	23	CAATT 或 CAAT 或 CAAAT 或 CCAAT	启动子、增强子区域普通顺式作用元件
3	5UTRPy-rich stretch	0	1	TTCCTCTCTCT	提高转录水平顺式作用元件
4	AAGAA-motif	1	0	GGTAAAGAAA	燕麦中发现,功能未知
5	ABRE	2	1	GACACGTGGC	脱落酸应答顺式调控元件
6	ACE	1	0	ACGTGGA	光应答元件
7	ARE	0	1	TGTTTT	厌氧诱导的必须顺式调控元件
8	ATCT-MOTIF	1	0	AATCTGATCG	部分光应答元件保守序列
9	ATGCAAAT motif	0	1	ATACAAAT	与 TGAGTCA 序列相关的顺式调控元件
10	Box II	2	0	CCACGTGC 或 TCCACGTGGC	部分光应答元件
11	CAT-BOX	0	3	GCCACT	分生组织表达顺式调控元件
12	CCAAT-box	1	0	CAACGG	MYBHv1 结合位点
13	G-BOX	7	2	TAACACG	光、厌氧生活和 ABA 的应答元件;与花特异表达有关;受光和紫外线诱导调控
14	GA-MOTIF	1	2	ATAGATAA	部分光应答元件
15	GARE-MOTIF	0	1	AAACAGA	赤霉素应答元件
16	GATA-MOTIF	1	1	GATAGGG 或 AAGGATAAGG	部分光应答元件也是 ASF-2 结合位点
17	GT1-MOTIF	2	2	GGTTAA	GT-1 结合起关键作用与光应答有关元件
18	HSE	1	2	AAAAAATTTTC	热应答元件
19	I-box	2	0	GATAAGATT	部分光应答元件
20	MSA-like	1	0	TCCAACGGT	与细胞周期调控有关的顺式调控元件
21	MBS	0	1	TAACTG	与干旱相关的 MYB 结合位点
22	Skn-I_motif	1	0	GTCAT	胚乳表达必须的顺式调控元件
23	TATC-BOX	0	1	TATCCCA	赤霉素应答元件
24	TC-RICH REPEATS	0	1	ATTTTCTTCA	胁迫相关应答元件
25	rbcS-CMA7a	1	0	GTCGATAAAGG	部分光应答元件
26	chs-CMA1a	0	1	TACTTAA	部分光应答元件
27	circadian	1	1	CAANNNNATC	昼夜节律顺式调控元件

2.5 瞬时表达技术检测启动子活性

重组载体转入农杆菌后,以 LBA4404 空菌株为阴性对照,以含 pBI121 载体的菌株为阳性对照,对已构建的含蜡梅 *nsLTP* 基因 2 个启动子的重组载体进行瞬时表达分析。从图 5 中可以看

出,在农杆菌侵染后的烟草叶片中均检测到 *GUS* 基因的产物,表明所克隆的 2 个蜡梅 *nsLTP* 基因的启动子序列均具有启动子功能,同时也表明在非诱导条件下,各启动子也均具有驱动下游报告基因表达的能力。

图5 *CpLTP3pro* 和 *CpLTP4pro* 启动子的瞬时活性检测Fig. 5 Detection of transient expression of *CpLTP3pro* and *CpLTP4pro* promoters

3 讨论

虽然用随机引物进行染色体步行的技术提出较早,但是由于无法有效地控制由随机引物引发的非特异性产物的产生,这种方法一直未能得到广泛应用。本试验中所用克隆启动子的 TAIL-PCR 方法是 Liu 等^[13]在传统的 TAIL-PCR 方法基础上经过改良的 hiTAIL-PCR,它结合利用 TAIL-PCR 和抑制 PCR 的原理,预扩增反应中利用 5'带尾巴的高筒并倍数的 LAD 引物在靶序列上创造结合位点;两端均为 LAD 引物和两端均为特异引物产生的较短的非特异产物(<300bp)的扩增受到抑制,第 1 轮 TAIL-PCR 中利用 5'带尾巴的第 1 轮特异引物抑制较短的特异产物的扩增,并利用 2 轮高温、1 轮低温交替的超级 PCR 循环提高特异产物的扩增效率,降低两端均为 LAD 引物的非特异产物(无论大小)的扩增^[15]。利用目前已报道的 5 条 TAIL-PCR 随机引物 LAD1~LAD5 与蜡梅特异引物进行组合扩增,通过比较分析发现不同的 LAD 随机引物在扩增蜡梅脂转移蛋白基因启动子时,条带差异较大,其中 LAD2 和 LAD3 在蜡梅基因组 DNA 的扩增效果优于其他随机引物,经过两轮 PCR 扩增后能够得到较长的特异片段。为了提高 TAIL-PCR 扩增的特异性,本试验在特异引物的设计上进行了两处重要改进:首先,特异引物 RB0 的退火温度高于 60℃,RB1 和 RB2 高于 68℃ 低于 72℃,且 3 条特异引物 RB0、RB1、RB2 退火温度依次升高,使第 1 轮及第 2 轮 TAIL-PCR 中的非特异扩增片段得不到进一步有效扩增,提高终产物扩增的特异性;其次,设计特异引物时适当提高 G、C 含量,尤其是在 3'末端,整个引物中尽量避免三碱基以上的重复序列,这样可以很大程度地减少特异引物的自身非特异扩增。通过随机引物的筛选及特异引物设计的改进,提高了 TAIL 超级循环中特异扩增的效率;操作简单,模板 DNA 需求量低,仅需 20~50ng,但对模板纯度要求较高,不同纯度 DNA 模板扩增效果有较大差异。

为了更好地利用基因工程发展抗病抗逆植物、进行作物改良,近年来人们高度重视从植物本身克隆内源性启动子,以更好地调控植物基因表达^[16]。许多抗逆基因能够同时被多种逆境诱导表达,因为在编码基因的启动子序列中存在一些与逆境诱导相关,参与基因转录调控的顺式作用元件^[17]。目前,多个 *nsLTP* 基因的启动子被分离,1991 年 Roth 等^[18]和 Linnestad 等^[19]分别从玉米和大麦中分离得

到非特异性脂转移蛋白基因 *LTPII* 和 *LTP1* 启动子,并发现他们都具有 MYB 和 MYC 结合位点,大麦 *LTP1* 的启动子驱动 *LTP1* 基因特异表达在种子成熟和萌发过程中的糊粉层;Sohal 等^[20]从油菜基因组 DNA 中分离得到非特异性脂转移蛋白基因启动子,并对拟南芥进行转化后发现在光照和病毒感染后,该启动子能够驱动报告基因表达;Canevascini 等^[21]对烟草 *LTP1* 启动子活性分析表明烟草 *LTP1* 主要表达在成熟气生组织的表皮层,但在幼嫩组织中表达在茎尖和花分生组织,在幼嫩的根表皮中也有表达。Hsu 等^[22]通过构建一系列 5'端缺失的棉花脂转移蛋白基因 *Ltp6* 启动子表达载体研究其启动活性,结果表明该启动子只在表皮毛中启动报告基因 *GUS* 表达;小麦 *TaLTP1* 基因在干旱和高盐胁迫被高效诱导,分析启动子区,发现在起始密码子上游 337bp 处具有 MYB 转录因子的顺式结合元件,进一步分析表明这个顺式元件是 *TaLTP1* 基因的主要胁迫响应元件^[23];Jung 等^[24]发现辣椒 *CaLTPIII* 的启动子区存在许多抗性响应元件:如低温响应元件(LTRE-1)、干旱响应元件(DPBF)、病原物响应元件(W-box)、乙烯响应元件(ERE box)、水胁迫元件(MYB)。本实验室在之前的研究中对蜡梅非特异性脂转移蛋白基因家族的 4 个成员 *CpLTP1*、*CpLTP2*、*CpLTP3*、*CpLTP4* 基因在干旱、高盐、低温和 ABA 诱导下的表达变化进行分析,结果表明 *CpLTP1*、*CpLTP2*、*CpLTP3* 基因表达都不同程度下调,而 *CpLTP4* 基因表达明显上调^[25]。这些结果表明 *nsLTP* 对病原物的侵染和低温、干旱的胁迫具有防御功能并且高度表达在植物易受病原物攻击的部位,这与它的植物防御功能相一致,这些不同植物 *nsLTP* 启动子的分离和鉴定对进一步研究 *nsLTP* 基因的表达调控方式、机制具有重要意义。本研究通过 hiTAIL-PCR 扩增获得 *CpLTP3* 和 *CpLTP4* 基因的启动子序列,长度分别为 1298bp 和 838bp。对获得的启动子序列进行分析,发现除基本的启动元件及大量的与增强转录效率有关的 CAAT 盒外,还存在许多对不同信号和胁迫条件应答的元件。这些潜在的与胁迫应答相关的顺式作用元件,暗示这两个启动子很可能属于多胁迫诱导启动子。但这些作用元件是否都能真正介导蜡梅脂转移蛋白基因对外界相关胁迫的应答,还需要加以证实。启动子活性分析表明 *CpLTP3pro* 和 *CpLTP4pro* 都能够驱动 *GUS* 基因的表达,前期的基因定量表达已表明 *CpLTP4* 基因受到干旱、高盐和 ABA 诱导,*CpLTP3* 基因在胁迫下

表达受抑制^[12],与启动子元件分析中发现大量胁迫响应元件的特征相一致。基因的表达调控是一个非常复杂的过程,只有将参与调控的顺式作用元件以及一些重要的转录因子的功能充分阐明后,蜡梅脂转移蛋白基因家族不同成员启动子的调控机理才有可能得以清楚的解释。

试验中也曾采用不同的胁迫处理条件,如采用 ABA、NaCl、PEG、4℃、37℃、GA₃ 处理,分析这些启动子瞬时表达的差异,但在此过程中发现,即使采用同一处理方法的同一处理水平,不同叶盘的显色反应都存在一定差异,因此认为瞬时表达试验只能定性确定这些序列能否驱动报告基因表达,但并不能准确稳定地反应其在不同胁迫环境下驱动目标基因表达的差异。不同启动子在不同胁迫条件下驱动目标基因表达差异的量化还需要进一步的稳定表达来完成,这项工作正在进行当中,而瞬时表达检测则为其打下了一定的基础。

参考文献

- [1] Kader J C. Lipid transfer protein in plants [J]. *Ann Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* ,1996 ,47: 627-654
- [2] Gincel E ,Simorre J P ,Caille A ,et al. Three-dimensional structure in solution of a wheat lipid-transfer protein from multidimensional¹H-NMR data [J]. *Eur J Biochem* ,1994 ,226: 413-422
- [3] Gomar J ,Petit M C ,Sodano P ,et al. Solution structure and lipid binding of a nonspecific lipid transfer protein extracted from maize seeds [J]. *Prot Sci* ,1996 ,5: 565-577
- [4] Meijer E A ,Vries S C ,Sterk P ,et al. Characterization of the non-specific lipid transfer protein EP2 from carrot (*Daucus carota* L.) [J]. *Mol Cell Biochem* ,1993 ,123: 159-166
- [5] Pyee J ,Kolattukudy P E. The gene for the major cuticular wax-associated protein and three homologous genes from broccoli (*Brassica oleracea*) and their expression patterns [J]. *Plant J* ,1995 ,7: 49-59
- [6] Plant A L ,Cohen A ,Moses M S ,et al. Nucleotide sequence and spatial expression pattern of a drought-and abscisic acid-inducible gene of tomato [J]. *Plant Physiol* ,1991 ,97: 900-906
- [7] Torres-Schumann S ,Godoy J A ,Pintor-Toro J A. A probable lipid transfer protein gene is induced by NaCl in stems of tomato plants [J]. *Plant Mol Biol* ,1992 ,18: 749-757
- [8] Verdoy D ,Lucas M M ,Manrique E ,et al. Differential organ-specific response to salt stress and water deficit in nodulated bean (*Phaseolus vulgaris*) [J]. *Plant Cell Environ* ,2004 ,27: 757-767
- [9] Thoma S ,Hecht U ,Kippers A ,et al. Tissue-specific expression of a gene encoding a cell wall localized lipid transfer protein from *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Physiol* ,1994 ,105: 35-45
- [10] Nielsen K K ,Nielsen J E ,Madrid S M. New antifungal proteins from sugar beet (*Beta vulgaris* L.) showing homology to non-specific lipid transfer proteins [J]. *Plant Mol Biol* ,1996 ,31: 539-552
- [11] 睦顺照,李名扬,蒋安,等. 蜡梅花 cDNA 文库构建及其高频出现脂转移蛋白 cDNA 的表达 [J]. *中国农业科学* ,2007 ,40 (3): 644-648
- [12] 刘群,马婧,祝钦波,等. 蜡梅非特异性脂转移蛋白基因 *nsLTP* 家族 3 个成员的分子特征及非生物胁迫应答分析 [J]. *农业生物技术学报* ,2009 ,17 (6): 1027-1034
- [13] Liu Y G ,Chen Y L. High-efficiency thermal asymmetric interlaced PCR for amplification of unknown flanking sequences [J]. *Biotechniques* ,2007 ,43 (5): 649-656
- [14] Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants: The *GUS* gene fusion system [J]. *Plant Mol Biol* ,1987 ,5 (4): 387-405
- [15] Liu Y G ,Whittier R F. Thermal asymmetric interlaced PCR: Automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking [J]. *Genomics* ,1995 ,25: 674-681
- [16] 路静,赵华燕,何奕昆,等. 高等植物启动子及其应用研究进展 [J]. *自然科学进展* ,2004 ,14 (8): 856-862
- [17] 张毅,尹辉,李丹. 植物启动子的化学因素诱导元件 [J]. *植物生理与分子生物学* ,2007 ,43 (4): 787-794
- [18] Roth B A ,Goff S A ,Klein T M ,et al. C1 and R-dependent expression of the maize *Bz1* gene requires sequences with homologies to mammalian myb and myc binding sites [J]. *Plant Cell* ,1991 ,3: 317-325
- [19] Linnestad C ,Lonneborg A ,Kalla R ,et al. Promoter of a lipid transfer protein gene expressed in barley aleuronic cells contains similar Myb and Myc recognition sites as the maize Bz-McC allele [J]. *Plant Physiol* ,1991 ,97: 841-843
- [20] Sohal A K ,Pallas J A ,Jenkins G I. The promoter of a Brassicana-pus lipid transfer protein gene is active in a range of tissues and stimulated by light and viral infection in transgenic *Arabidopsis* [J]. *Plant Mol Biol* ,1999 ,41: 75-87
- [21] Canevascini S ,Caderas D ,Mandel T ,et al. Tissue-specific expression and promoter analysis of the tobacco *ltp1* gene [J]. *Plant Physiol* ,1996 ,112: 513-524
- [22] Hsu C Y ,Creech R G ,Jenkins J N ,et al. Analysis of promoter activity of cotton lipid transfer protein gene *LTP6* in transgenic tobacco plants [J]. *Plant Sci* ,1999 ,143: 63-70
- [23] Jang C S ,Lee H J ,Chang H J ,et al. Expression and promoter analysis of the *TaLTP1* gene induced by drought and salt stress in wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. *Plant Sci* ,2004 ,167: 995-1001
- [24] Jung H W ,Lim C W ,Hwang B K. Isolation and functional analysis of a pepper lipid transfer protein III (CALTPIII) gene promoter during signaling to pathogen, abiotic and environmental stresses [J]. *Plant Sci* ,2006 ,170: 258-266
- [25] 刘群. 蜡梅非特异性脂转移蛋白基因 *nsLTP* 家族成员克隆及其抗逆功能分析 [D]. 重庆: 西南大学 ,2009