

# *AtTERT* 启动子结构特征及其对拟南芥 非生物胁迫抗性的影响

孙玉萍<sup>1</sup>, 王 杨<sup>1</sup>, 门璟煜<sup>1</sup>, 董 琦<sup>1</sup>, 杨 颖<sup>1</sup>, 于婷乔<sup>2</sup>, 吴晓飞<sup>2</sup>, 卢存福<sup>1</sup>, 陈玉珍<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>北京林木分子设计育种高精尖创新中心 / 北京林业大学生物科学与技术学院 / 林木育种国家工程中心, 北京 100083;

<sup>2</sup>北京大学生命科学学院, 北京 100871)

**摘要:** 端粒酶是具有逆转录酶活性的维持真核生物中染色体末端 DNA 完整性的核糖核蛋白复合物, 而端粒酶逆转录酶 (TERT, Telomerase reverse transcriptase) 是端粒酶的核心组分。目前对 TERT 启动子的研究主要集中在人体的肿瘤细胞方面, 而对植物 TERT 基因启动子的结构及 TERT 表达调控机理的研究有所缺乏。本研究通过生物信息学技术对拟南芥 TERT 启动子结构特征进行了系统分析, 并构建植物 TERT 启动子进化树; 用半定量 PCR 检测野生型和 *AtTERT* 启动子区突变体拟南芥幼苗在非生物胁迫下的 TERT 表达模式。结果表明, 系统进化分析显示 TERT 启动子在同一类群植物中有着较高的保守性; TERT 基因启动子具有多个与干旱、盐、激素等相关调控元件; 突变体 *AtTERT* 转录表达量普遍低于野生型; 同时突变体对盐、干旱胁迫抗性降低, 而对脱落酸处理不敏感。这说明 *AtTERT* 启动子含有抗旱、抗盐反应顺式作用元件, 而无响应 ABA 调控机制, 验证了对 *AtTERT* 基因启动子的顺式作用元件的预测, 并初步证明 *AtTERT* 启动子对 *AtTERT* 的转录表达具有调控作用, 对未来探讨该基因的表达调控机制提供了重要参考。

**关键词:** 拟南芥; 端粒酶逆转录酶启动子; 非生物胁迫; 非端粒功能

## Characterization of *AtTERT* Promoter and its Role in Tolerance to Abiotic Stress in *Arabidopsis thaliana*

SUN Yu-ping<sup>1</sup>, WANG Yang<sup>1</sup>, MEN Jing-yu<sup>1</sup>, DONG Qi<sup>1</sup>, YANG Ying<sup>1</sup>, YU Ting-qiao<sup>2</sup>,  
WU Xiao-fei<sup>2</sup>, LU Cun-fu<sup>1</sup>, CHEN Yu-zhen<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>Beijing Advanced Innovation Center for Tree Breeding by Molecular Design/College of Biological Sciences and Biotechnology, Beijing Forestry University/National Engineering Laboratory for Tree Breeding, Beijing 100083;

<sup>2</sup>School of Life Sciences, Pecking University, Beijing 100871)

**Abstract:** Telomerase is a ribonuclear protein complex with reverse transcriptase activity in eukaryotic cells, with significance on maintaining DNA integrity at the ends of eukaryotic linear chromosomes. The telomerase reverse transcriptase (TERT) is the key subunit of telomerase. Currently, researches on characterization of the TERT promoter is mainly focused on tumor cells, and studies of plant TERT promoter remain unclear to date. In this study, we applied bioinformatic tools to investigate the TERT promoters of *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh. and other plants, performed the phylogenetic analysis with TERT promoter sequences, and analyzed the TERT gene expression through semi-quantitative RT-PCR. The results showed that the TERT promoter was highly

收稿日期: 2018-10-08 修回日期: 2018-11-17 网络出版日期: 2019-02-11

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20190211.1239.001.html>

第一作者主要从事拟南芥端粒酶逆转录酶功能研究, E-mail: m18396851750@163.com

通信作者: 卢存福, 研究方向为植物分子细胞生物学, E-mail: lucunfu@bjfu.edu.cn

陈玉珍, 研究方向为植物生物化学与分子生物学, E-mail: chenyzhen@bjfu.edu.cn

**基金项目:** 国家自然科学基金项目 (31270737); 高等学校学科创新引智计划项目 (B13007); 长江学者和创新团队发展计划项目 (IRT13047); 北京市自然科学基金项目 (6112016)

**Foundation project:** This work was supported by the National Natural Science Foundation of China (31270737), 111 Project (B13007), Program for Changjiang Scholars and Innovative Research Team in University (IRT13047) and Beijing Municipal Natural Science Foundation (6112016)

conserved on sequence similarity in the same group of plants. The *TERT* gene promoter has several regulatory elements related associating to drought, salt and hormone were found. By RT-PCR analysis, the transcription level of *AtTERT* in *Arabidopsis* Heynh. mutants were always lower than in wild type under normal and stress conditions. In relative to the wild type, the *AtTERT* mutants became more sensitive under high salt and drought conditions, but no visible difference under abscisic acid (ABA). Taken together, our results verified the prediction of cis-acting elements of the *AtTERT* gene promoter, which might be important in responses to salt and drought stresses. The preliminary result suggestedly proved that the *AtTERT* promoter regulates the *AtTERT* gene transcription expression of *AtTERT*, providing an important reference for the future research on revealing the expression mechanism of this gene.

**Key words:** *Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.; promoter of telomerase reverse transcriptase gene; abiotic stress; non-telomere functions

端粒酶是真核生物中维持染色体末端 DNA 完整性的一类特殊的逆转录酶,其核心元件包括具有逆转录酶活性的催化亚基 TERT 和提供端粒延伸模板的 RNA (TER)<sup>[1-2]</sup>。端粒酶复合物发挥生物功能的过程主要包括蛋白亚基的组装以及与端粒酶相关蛋白的相互作用,该过程需要通过细胞核与细胞质的穿梭及大分子网络蛋白质之间的动态相互作用来实现<sup>[3-4]</sup>。近年来,越来越多的报道表明端粒酶除行使端粒 DNA 合成的典型功能之外,还有许多其他的非端粒功能,尤其是 TERT 已被证明在染色质重塑和 DNA 损伤反应中发挥作用,并作为 Wnt/ $\beta$ -连环蛋白信号通路的转录调节剂<sup>[5-6]</sup>;参与细胞的增殖和分化、抗细胞凋亡、基因表达的调控、线粒体功能的调节、胁迫应激保护等<sup>[7-10]</sup>。因此,探究端粒酶在植物生长发育中非端粒功能具有十分重要的理论与实际意义。

基因的启动子是一段具有转录起始特异性的非编码 DNA 序列,可将活化的 RNA 聚合酶准确地结合到 DNA 模板上,对转录起始起着调节和控制作用,是基因转录调控的核心区域<sup>[11-12]</sup>。hTERT 是人端粒酶的核心催化亚基,在细胞中的表达状态决定端粒酶活性<sup>[13]</sup>。黄君健等<sup>[14]</sup>采用 Panhandle PCR 技术成功克隆了人 *hTERT* 启动子,但研究结果表明 *hTERT* 启动子含有多个转录因子蛋白结合的核心序列而缺少典型启动子基本原件 TATA-box 和 CAAT-box。因此 *hTERT* 的表达可能受某些转录因子调控,癌变细胞中 *TERT* 组成型表达可能激活这些转录因子,其中 *TERT* 启动子突变与基因表达和端粒酶活性增加有直接关系<sup>[15]</sup>。司少艳等<sup>[16]</sup>克隆了小鼠 *TERT* 启动子并研究了其在肿瘤细胞中的转录调控活性。这些发现对筛选有效抑制癌变细胞的增殖和分化的药物具有重要参考意义。目前对

*TERT* 启动子的研究主要集中在肿瘤细胞<sup>[17-19]</sup>,有关植物 *TERT* 启动子调控 *TERT* 基因表达模式尚未见报道。

植物端粒酶的研究发端于 Fajkus 等<sup>[20]</sup>在烟草 BY-2 细胞检测到端粒酶活性,即在细胞提取物中检测到其可延伸 5' 端标记的端粒寡核苷酸序列 5'(TTTAGGG)<sub>6</sub>3'。之后, Oguchi 等<sup>[21]</sup>在人端粒酶逆转录酶基因 (*hTERT*) 同源结构域的基础上克隆得到了第 1 个植物端粒酶逆转录酶基因,即拟南芥 *AtTERT* 基因,并且预测开放阅读框为 3372 bp, 编码 131 kD、等电点为 9.9 的蛋白。Beilstein 等<sup>[22]</sup>又将拟南芥的端粒酶 RNA 的 2 个不同组分 TER1 和 TER2 分离出来,并证实体外 TER1 和 TER2 都可以作为端粒酶的模板行使功能,但在体内 TER1 主要与 POT1a 结合,通过促进端粒酶活性在端粒延长过程中起作用,而 TER2 与 TERT 的结合能力更强,在胁迫条件下 TER2 会抑制 TER1 介导的端粒酶活性,响应 DNA 的损伤。尽管植物端粒酶生物学研究不断取得新进展,并已在多种植物中克隆获得 *TERT* 基因<sup>[23-25]</sup>,但关于植物 *TERT* 启动子的研究甚少,植物 *TERT* 基因表达调控的机理仍待揭示。而且有关 *TERT* 突变体的研究主要集中在突变对端粒长度和端粒酶活性的影响方面<sup>[26]</sup>,对突变体的表型和非生物胁迫抗性研究的仍未见报道。因此,本研究对模式植物拟南芥端粒酶逆转录酶基因 (*AtTERT*) 启动子的结构进行了系统分析,并构建了十字花科各物种 *TERT* 启动子系统进化树;同时,检测了野生型和启动子区域 T-DNA 插入突变体拟南芥在非生物胁迫下的 *AtTERT* 表达模式及抗逆能力,初步证明 *AtTERT* 启动子对 *AtTERT* 的转录表达具有调控作用,为进一步研究 TERT 调控植物非生物胁迫抗性以及生长发育的分子机理积累了资料。

## 1 材料与amp;方法

### 1.1 试验材料

本试验所用植物材料为哥伦比亚 Columbia (Col-0) 拟南芥。拟南芥启动子区域突变体 *S\_201* 种子购于拟南芥生物资源中心 (ABRC)。TERT 基因结构及突变体信息均来自 NCBI 和 SALK 网站。

### 1.2 试剂及仪器

反转录试剂盒购于天根生化科技有限公司; RNA 提取试剂盒购自拜尔迪生物科技有限公司。所用到的仪器包括 Eppendorf 低温离心机、LX-200 旋涡振荡器、研钵、TECHNEPCR 仪、Bio-Rad 电泳仪、TU-1810 紫外可见分光光度仪、DDS-307 电导仪、SANYO 光照培养箱、凝胶成像系统。

### 1.3 生物信息学分析的数据来源与分析方法

**1.3.1 启动子序列的获取** 从 PHYTOZOME 及 NCBI 数据库中基因上游调控序列, 截取基因翻译起始位点上游 2 kb 序列。

**1.3.2 程序和数据库** 在线核酸数据库: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>, <https://phytozome.jgi.doe.gov/pz/portal.html#>; 启动子转录起始位点分析软件: [http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html); 启动子顺式作用元件分析软件: <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>, <https://sogo.dna.affrc.go.jp/cgi-bin/sogo.cgi?lang=en>; CpG 岛预测分析: <http://www.urogene.org/cgi-bin/methprimer/methprimer.cgi>。

**1.3.4 数据分析方法** 利用 BDGP 在线软件分析启动子转录起始位点, 利用 Plant CARE 和 NEW PLACE 分析拟南芥及其他十字花科物种 TERT 基因 5' 非编码区的基本元件和顺式作用元件, 利用 Methprime 2.0 对 TERT 启动子进行 CpG 岛预测。利用 Clustal W 对各物种的 TERT 启动子序列进行多序列比对, 舍弃冗余序列, 使用 Mega 5.0 软件中 Phylogeny 的邻接法 (Neighbor Joining) 构建系统发育树 (Bootstrap=1000), 得到十字花科不同物种 TERT 启动子序列的系统进化关系。

### 1.4 拟南芥幼苗非生物胁迫处理

将野生型及突变体拟南芥种子在超净工作台中用 75% 的酒精消毒 1 min, 2.0% 次氯酸钠溶液消毒 3 min, 无菌水冲洗 3~5 次, 转移到无菌滤纸上, 待种子干燥后将其点在 MS 培养基上, 密封后于 4 °C 冰箱春化 2 d, 再置于拟南芥培养室培养。将生长 7 d 的拟南芥幼苗分别移至添加 NaCl、甘露醇、ABA 的 MS 固体培养基中, 参考文献 [27-29], 检测不同处理浓

度、时间的胁迫效应, 最终确定 150 mmol/L NaCl 及 180 mmol/L 甘露醇胁迫处理 5~7 d, 用 50 μmol/L ABA 处理 9 d; 将生长 6 周的拟南芥幼苗于 42 °C [30] 光照培养箱中热激处理 48 h 后观察表型变化并统计存活率, 试验重复 3 次, 取 3 次试验结果的平均值, 误差线为 3 次试验结果的标准差, 用 SPASS 软件进行单因素方差分析。

### 1.5 RT-PCR 检测拟南芥 *AtTERT* 的表达量

**1.5.1 引物设计** 拟南芥 Actin 2 是一个组成型表达基因 (GenBank 登录号 NC 003074), 可作为内参基因标定 *AtTERT* 基因的相对表达水平 [31]。利用 Primer 5.0 分别设计基因表达的引物 (表 1), 用于后续 RT-PCR 试验。

表 1 RT-PCR 的引物

Table 1 The primers used for RT-PCR

引物名称 Primer	引物序列 Primer sequence
Actin2-F	GACTTCTGGGCATCTGAATCT
Actin2-R	AAGCTCTCCTTTGTTGCTGTT
<i>AtTERT</i> -F	CTTCTTACCAGTTGCTTCGT
<i>AtTERT</i> -R	CCGCTTGAGAAGAACTCCC

**1.5.2 提取拟南芥总 RNA 并反转录获得基因组 cDNA** 用 BIOMIGA 试剂盒提取拟南芥总 RNA, 具体步骤按照说明书操作。提取得到的 RNA 质量和完整性用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。RNA 浓度用核酸定量仪 NanoDrop2000 测定, 之后保存于 -80 °C 冰箱备用。用反转录试剂盒 [QuantScript RT Kit (KR103)] 反转录获得拟南芥总 cDNA, 具体步骤按照说明书操作, 并用 Actin 引物 (表 1) 进行 PCR 反应, 验证 cDNA 的质量。将获得的 cDNA 保存于 -20 °C 冰箱中备用。

**1.5.3 拟南芥 *AtTERT* 基因 PCR 扩增** PCR 扩增体系为 25 μL: 上下游引物 (10 mmol/L) 各 0.5 μL, 10× Mix 12.5 μL, 模板 1 μL, ddH<sub>2</sub>O 补足至 25 μL。反应条件为 95 °C 预变性 5 min, 95 °C 变性 30 s, 退火 55 °C 30 s, 72 °C 延伸 1 min, 30 个循环; 72 °C 延伸 10 min; 4 °C 终止反应。

**1.5.4 PCR 产物的电泳和半定量分析** 取 10 μL PCR 产物分别点样至 1% 的琼脂糖凝胶电泳样品孔中, 在 1×TAE 电泳缓冲液中检测 PCR 产物, 电泳胶板在凝胶成像系统 (Bio-Rad) 下成像, 目的条带用 Quality One 软件灰度处理后, 参考文献 [32], 以未做处理拟南芥野生型幼苗中 *AtTERT* 表达量基准为 “1”, 计算相对表达量。



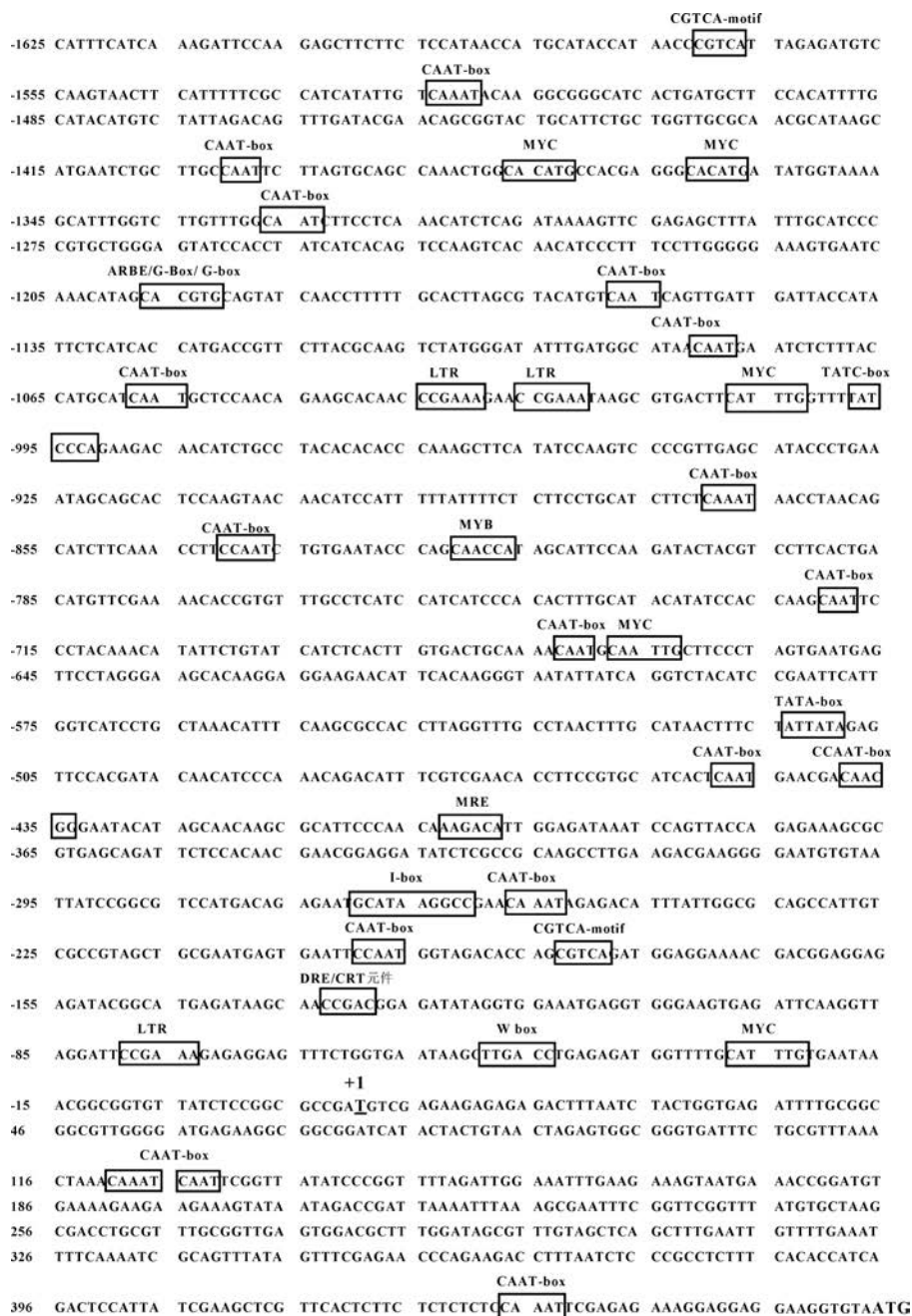
## 2 结果与分析

### 2.1 拟南芥 *AtTERT* 基因启动子分析

用NCBI在线软件对*AtTERT*基因结构进行分析,结果显示该基因Gene ID: 831548,在GenBank数据库中位于NC\_003076.8(5538180..5543657)上,位于5号染色体,基因序列全长为5478 bp。

在NCBI数据库中,对*AtTERT*基因进行序列

比对分析,找出*AtTERT*基因5'端上游2 kb左右的核苷酸序列,并利用BDGP([http://www.fruitfly.org/seq\\_tools/promoter.html](http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html))在线软件预测*AtTERT*基因的转录起始位点,预测出2个位点,位于*AtTERT*基因起始密码子ATG上游673 bp和464 bp处,分值为0.96和0.98,碱基分别为A和T,ATG上游的464 bp处的“T”可能是转录起始位点,将该处记为“+1”(图1)。



T代表转录起始位点,标记为+1;数字表示相对于转录起始位点+1的位置;ATG表示起始密码子;方框代表顺式作用元件

T represents the transcriptional start site which is defined as +1, Numbers indicate the positions relative to the transcription start site, ATG represents the starting codon, Boxes represent cis-acting elements

图1 *AtTERT*启动子顺式作用元件

Fig.1 Cis-acting elements in *AtTERT* promoter

## 2.2 *AtTERT* 启动子顺式作用元件分析

使用 PlantCARE 和 NEW PLACE 在线软件对 *AtTERT* 基因启动子序列进行转录调控元件分析,发现该基因启动子序列中除了含有多个启动子的核心元件 TATA-box、控制转录频率及效率的增强子元件 CAAT-box 之外,5' 上游远端调控序列还存在多个与非生物胁迫和激素相关的顺式作用元件,典型的调控元件有低温响应元件 LTR<sup>[33]</sup>、参与干旱诱导相关的元件 MBS<sup>[34]</sup>、与高盐及病原体诱导作用有关的 GT1GMSCAM<sub>4</sub><sup>[35]</sup> 元件、通过调控干旱、高盐

或低温胁迫基因的表达实现抵御干旱、激素、寒冷胁迫应答的 MYC<sup>[36]</sup> 和 DRE/CRT<sup>[37]</sup> 元件;脱落酸响应元件 ABRE、赤霉素应答元件 GARE-motif 和 TATC-box<sup>[34]</sup>,乙烯响应元件 ERE<sup>[33]</sup> 及生长素响应元件 TGA-element<sup>[38]</sup>。此外,还含有若干光响应元件如 ACE<sup>[34]</sup>、G-B (b) ox<sup>[34]</sup>、TCT-motif<sup>[39]</sup>,厌氧诱导必需的顺式作用调控元件 ARE<sup>[34]</sup>,真菌诱导响应元件 W-box<sup>[40]</sup>,与分生组织表达有关的顺式作用元件 CAT-box<sup>[34]</sup> 等,而不含伤害诱导元件 WUN-motifs<sup>[41]</sup> 和热激元件 HSE<sup>[34]</sup> (表 2)。

表 2 *AtTERT* 启动子顺式作用元件

Table 2 Cis-acting elements of the *AtTERT* promoter

元件名称 Element name	序列 Sequence	位置 Location	功能 Function
ABRE	(C)ACGTG	-1192	脱落酸响应元件
ACE	GACACGTATG	-1476 (-)	光响应元件
ARE	AAACCA	-999 (-), -31 (-)	厌氧诱导必需的顺式作用调控元件
CAAT-box	CAAT/CAAAT/CCAAT	-1520, -1308, -1324, -1155, -1078, -1055, -866, -837, -718, -665, -670, -446, -253, -196, +121, +126, +434	启动子和增强子区的共同顺式作用元件
CAT-box	GCCACT	+90 (-)	与分生组织表达有关的顺式作用调控元件
CCAAT-box	CAACGG	-439	MYBHv1 结合位点
CGTCA-motif	CGTCA	-1567, -179	参与 MeJA 反应性的顺式作用调节元件
G-B (b) ox	CACGTG	-1192	光响应元件
GARE-motif	TCTGTTG	-1044 (-)	赤霉素响应元件
I-box	GCATAAGGCC	-261	光响应元件的部分
LTR	CCGAAA	-74, -1030, -1019	低温响应元件
MBS	CAACTG	-1149 (-)	参与干旱诱导的 MYB 结合位点
MRE	AACCTAA	-398	参与光反应 MYB 结合位点
TATA-box	ATTATA	-509	转录起始 -30 核心启动子元件
TATC-box	TATCCCA	-992	参与赤霉素反应的顺式作用元件
TCT-motif	TCTTAC	-1182	光响应元件的部分
TGA-element	AACGAC	-439, -163	生长素响应元件
W box	TTGACC	-44	真菌诱导子响应元件
ERE	ANTTCAAA	+317 (-)	乙烯响应元件
MYC	CANNTG	-23, -663, -1003, -1357, -1372	干旱、低温及 ABA 应答元件
GT1GMSCAM4	GAAAA	-1175 (-)	外源盐诱导元件
DRE/CRT	CCGAC	-129	干旱、高盐或低温胁迫元件

### 2.3 启动子 CpG 岛分析

用 Methprimer 2.0 对 *AtTERT* 基因启动子进行分析发现该序列有 2 个 CpG 岛: 一个在 1226~1519 bp

处,长 294 bp; 另外一个在 1612~1727 bp 处,长 116 bp。2 个 CpG 岛均大于 100 bp, G+C 含量大于 50%, CpG 观察值 / 预测值大于 0.6 (图 2)。

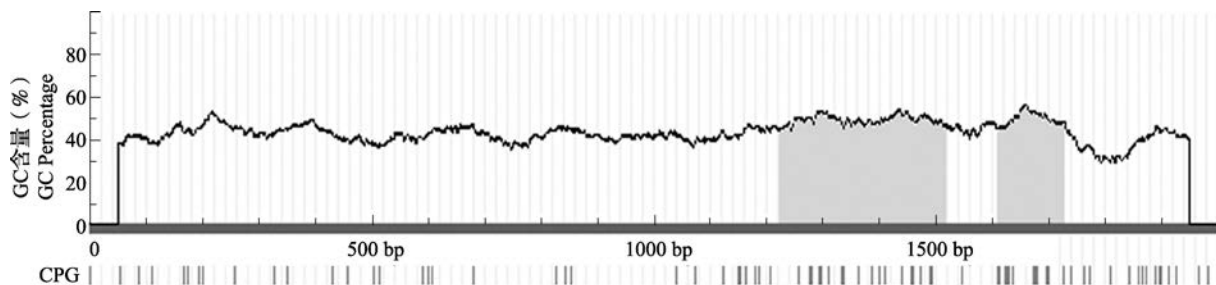


图 2 *AtTERT* 启动子 CpG 岛预测  
Fig.2 CpG islands of *AtTERT* promoter sequences

### 2.4 植物 *TERT* 启动子同源性及系统进化

为充分地了解拟南芥所在科,即十字花科不同物种 *TERT* 基因启动子结构特征及图通物种间同源关系,对 NCBI 及 PHYTOZOME 数据库上可以搜索到的所有 *TERT* 基因启动子进行了聚类分析,共搜索到 *TERT* 基因启动子拟南芥属 (*Arabidopsis thaliana* (L.) Heynh.、*Arabidopsis halleri* (L.) O'Kane & Al-Shehbaz 及 *Arabidopsis lyrata* (L.) O'Kane & Al-Shehbaz subsp. *lyrata*) 3 条; 亚麻芥属 (*Camelina sativa* (L.) Crantz LOC104705979/LOC104735722) 2 条; 芥属 (*Capsella rubella* Reut. 和 *Capsella grandiflora* Boiss.) 2 条; 芸苔属 (*Brassica*

*napus* L.、*Brassica oleracea* var. *capitata* L. 及 *Brassica rapa* L. *turnip mustard/field mustard*) 4 条; 山萮菜属 (*Eutrema salsugineum* (Pall.) Al-Shehbaz & S.I.Warwick) 及 *Boechera* Á.L.öve & D.L.öve 属 (*Boechera stricta* (Graham Al-Shehbaz)) 各 1 条, 总共 13 条进行分析。利用 BDGP、Phytozome 和 NEW PLACE 以及 Methprimer 2.0 在线网站对 *TERT* 启动子序列分别对转录起始位点、启动子基本元件 (TATA-box 和 CAAT-box 等)、非生物胁迫相关顺式作用元件 (DRE/CRT 元件、MYC、GT1GMSCAM4、HSE、MBS、ABRE、LTR) 以及 CpG 岛的数量进行预测 (表 3)。结果显示,选取

表 3 十字花科植物 *TERT* 启动子顺式作用元件分析

Table 3 Cis-acting elements analysis of *TERT* promoters from Cruciferous plant

物种 Species	起始位点 Starting site	基本元件 Core elements	非生物胁迫元件 Abiotic stress element							CpG 岛数量 Number of CpG islands
			DRE/CRT	MYC	GT1GMSCAM <sub>4</sub>	HSE	MBS	ABRE	LTR	
<i>Arabidopsis thaliana</i>	+	+	+	+	+	—	+	+	+	2
<i>Arabidopsis lyrata</i> subsp. <i>lyrata</i>	+	+	—	+	+	—	+	+	+	2
<i>Arabidopsis halleri</i>	—	无 TATA-box	—	+	+	—	+	+	+	0
<i>Boechera stricta</i>	+	+	—	+	+	—	+	+	+	3
<i>Brassica napus</i>	+	+	+	+	+	—	+	+	+	2
<i>Brassica oleracea capitata</i>	+	+	+	+	+	—	+	+	+	2
<i>Camelina sativa</i> LOC104705979	+	+	+	+	+	—	+	+	+	3
<i>Camelina sativa</i> LOC104735722	+	+	+	+	+	—	+	—	—	3
<i>Capsella rubella</i>	+	+	—	+	—	—	+	+	+	1
<i>Capsella grandiflora</i>	+	+	—	+	—	—	+	+	+	2
<i>Eutrema salsugineum</i>	+	+	+	+	—	—	+	+	+	2
<i>Brassica rapa</i> ( <i>turnip mustard</i> )	+	+	+	+	+	—	+	+	+	1
<i>Brassica rapa</i> ( <i>field mustard</i> )	+	+	+	+	+	—	+	+	+	1

+: 预测的启动子序列中有该顺式元件; —: 预测的启动子序列中无该元件

+: indicates the presence of cis-acting element in the predicted promoter sequence, —: indicates the absent of this element

的序列(除 *Arabidopsis halleri* (L.) O'Kane & Al-Shehbaz) 均包含 *TERT* 基因的启动子必要元件, 响应干旱、高盐或低温及激素应答的非生物胁迫顺式作用元件, 而不含有热激元件 HSE (ATAAATGT)。将筛选出的序列用 Phylogeny (Bootstrap=1000) 构建 *TERT* 启动子系统进化树(图 3)。结果表明, *TERT* 启动子主要有 2 个遗传分支, 其中芸苔属单独位于系统发生树的一进化支上, 该属各物种间具有高度保守性, 同源性保持 97% 以上; 其余各属同位于系统发生树的另一进化枝上, 每属的各个物种间及不同属之间仍然保持较高的同源性, 拟南芥 *AtTERT* 启动子与同属的鼠耳芥 (*Arabidopsis halleri* (L.) O'Kane & Al-Shehbaz) 及玉山筷子芥 (*Arabidopsis lyrata* (L.) O'Kane & Al-Shehbaz subsp.

*lyrata*) 亲缘关系最近, 其次是山蓴菜属, 而与 *Boechera* Å.Löve & D.Löve 属、亚麻芥属、芥属相对较远。从整个系统进化树上看, *TERT* 启动子在十字花科不同种植物间具有较高保守性。

## 2.5 启动子区域突变对 *AtTERT* 基因表达响应非生物胁迫及 ABA 的影响

为揭示 *TERT* 启动子顺式作用元件对 *TERT* 表达的调控作用, 选取生长 20 d 野生型及 T-DNA 插入启动子区域突变体 *S\_201* (插入位点在起始密码子 ATG 上游 1000 bp) 拟南芥叶片检测 *AtTERT* 转录表达, 从图 5 可以看出野生型 *AtTERT* 相对表达量是突变体 *S\_201* 的 1.18 倍, 表明 T-DNA 插入影响了 *TERT* 基因的正常表达。

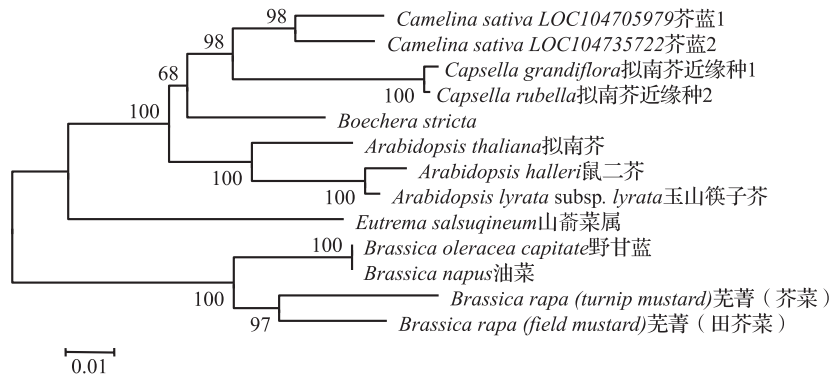
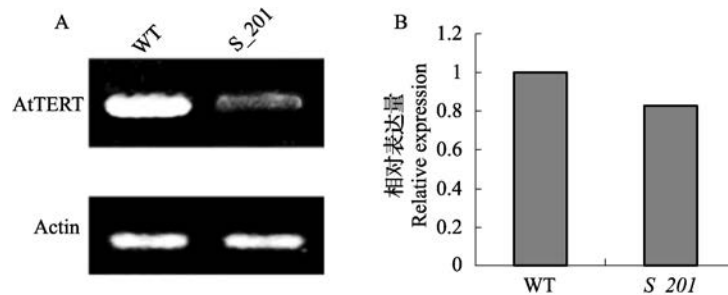


图 3 十字花科不同物种 *TERT* 启动子系统进化树分析

Fig.3 Phylogenetic tree constructed by *TERT* promoter sequences from different plant species in *Cruciferae* Juss.



A: *AtTERT* 基因 RT-PCR 电泳图; B: *AtTERT* 的相对表达量

A: RT-PCR analysis of *AtTERT* gene expression, B: The relative expression of *AtTERT*

图 4 拟南芥野生型 (WT) 及启动子区域突变体 (*S\_201*) *AtTERT* 基因的表达

Fig.4 *AtTERT* gene expression in wild type and *AtTERT* promoter mutant of *Arabidopsis* Heynh.

### 2.5.1 盐胁迫下 *AtTERT* 表达

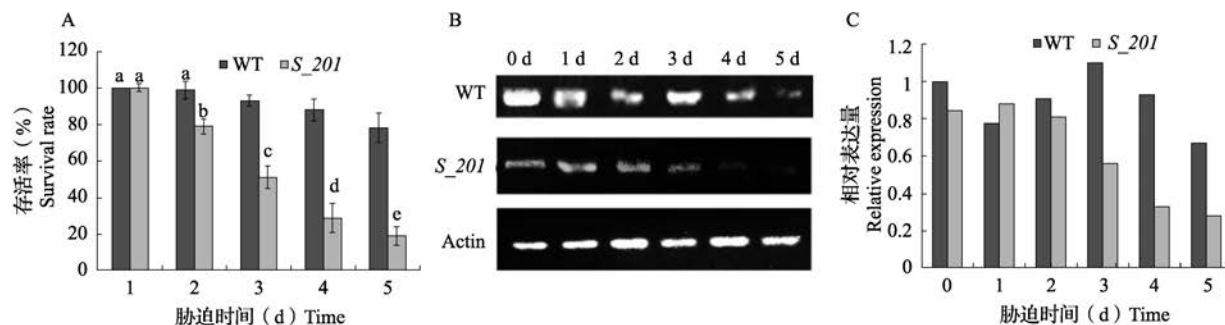
如图 5 所示, 分别将野生型拟南芥和 *S\_201* 突变体于 150 mmol/L NaCl 下处理 1~5 d。结果发现突变体在 3 d 后明显失绿, 5 d 后其存活率仅为 19%, 而野生型存活率高达 78%。比较两者的 *AtTERT* 表达(图 5B、C) 发现随着胁迫时间的延长, 自第 3 天开始, *S\_201* 突变体 *AtTERT* 表达量明显低于野生型, 表明 *AtTERT* 能够响应外界高盐环境的刺激, 但启动子突变改变了 *AtTERT* 表达对盐胁迫的响应模式并导致抗盐性

降低。

### 2.5.2 干旱胁迫下 *AtTERT* 表达

分别将野生型拟南芥和 *S\_201* 突变体于 180 mmol/L 甘露醇胁迫处理 7 d。结果显示, 干旱处理 3 d 突变体开始出现白化而野生型仍可以正常生长, 处理 7 d 突变体存活率为 21% 而野生型存活率为 72% (图 6A)。RT-PCR 结果显示, *AtTERT* 在野生型中的表达量高于突变体(图 6B、C)。 *AtTERT* 启动子区突变导致拟南芥抗干旱能力降低。





A: 150 mmol/L NaCl 胁迫处理幼苗的存活率, 不同字母代表差异显著,  $P < 0.05$ ; B: RT-PCR 检测经 150 mmol/L NaCl 胁迫处理的拟南芥幼苗 *AtTERT* 基因表达; C: 150 mmol/L NaCl 胁迫处理拟南芥幼苗 *AtTERT* 相对表达量

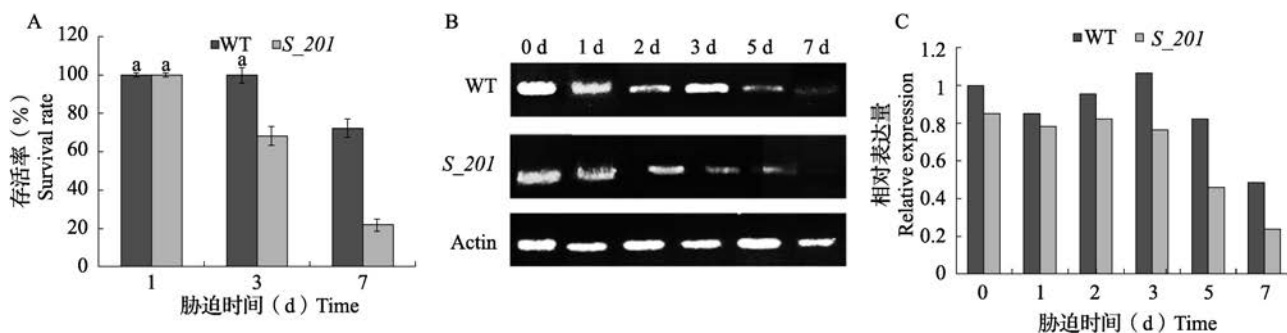
A: Survival rate of seedlings under 150 mmol/L NaCl stress, and the different lowercase letters represent significant difference at  $P < 0.05$ ,

B: RT-PCR analysis of *AtTERT* gene expression of *Arabidopsis* Heynh. seedlings under 150 mmol/L NaCl stress,

C: The relative expression of *AtTERT* in *Arabidopsis* Heynh. seedlings under 150 mmol/L NaCl stress

图 5 野生型 (WT) 及突变体 (S<sub>201</sub>) 拟南芥盐胁迫下 *AtTERT* 基因的表达

Fig.5 *AtTERT* gene expression in wild type (WT) and promoter mutant (S<sub>201</sub>) *Arabidopsis* Heynh. seedlings under NaCl stress



A: 180 mmol/L 甘露醇胁迫处理幼苗的存活率, 不同字母代表差异显著,  $P < 0.05$ ; B: RT-PCR 检测经 180 mmol/L 甘露醇胁迫处理的拟南芥幼苗 *AtTERT* 基因表达; C: 180 mmol/L 甘露醇胁迫处理拟南芥幼苗 *AtTERT* 相对表达量

A: Survival rate of seedlings under 180 mmol/L mannitol stress, and the different lowercase letters represent significant difference at  $P < 0.05$ ,

B: RT-PCR analysis of *AtTERT* gene expression of *Arabidopsis* Heynh. seedlings under 180 mmol/L mannitol stress,

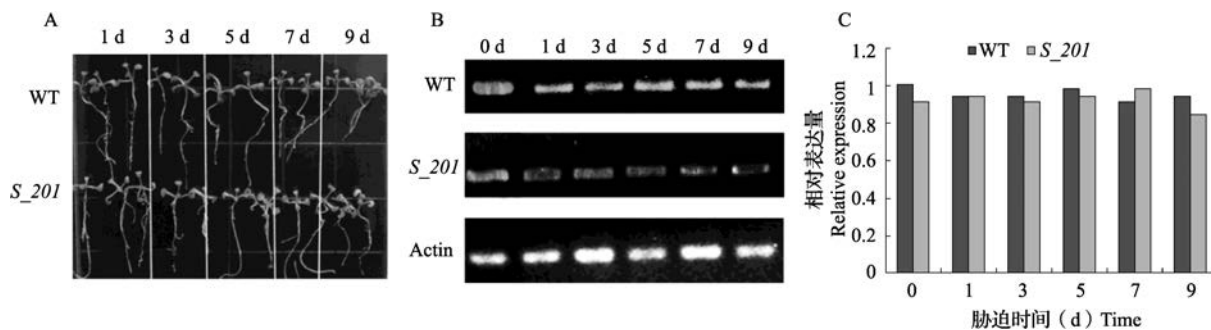
C: The relative expression of *AtTERT* in *Arabidopsis* Heynh. seedlings under 180 mmol/L mannitol stress

图 6 甘露醇胁迫下拟南芥野生型 (WT) 及启动子区域突变体 (S<sub>201</sub>) *AtTERT* 基因的表达

Fig.6 *AtTERT* gene expression in wild type (WT) and promoter mutant (S<sub>201</sub>) *Arabidopsis* Heynh. seedlings under mannitol stress

**2.5.3 ABA 处理下 *AtTERT* 表达** 如图 7 所示, 将野生型拟南芥和 S<sub>201</sub> 突变体于 50  $\mu\text{mol/L}$  ABA 下处理 9 d, 野生型和突变体没有明显表型差异。随着

ABA 处理时间增加, 野生型和 S<sub>201</sub> 的 *AtTERT* 表达量未出现显著性差异, 表明 *AtTERT* 对 ABA 不敏感。



A: 50  $\mu\text{mol/L}$  ABA 胁迫处理幼苗的表型; B: RT-PCR 检测经 50  $\mu\text{mol/L}$  ABA 胁迫处理的拟南芥幼苗 *AtTERT* 基因表达;

C: 50  $\mu\text{mol/L}$  ABA 胁迫处理拟南芥幼苗 *AtTERT* 相对表达量

A: Seedling phenotypes under 50  $\mu\text{mol/L}$  ABA stress, B: RT-PCR analysis of *AtTERT* gene expression of *Arabidopsis* Heynh. seedlings under 50  $\mu\text{mol/L}$  ABA stress, C: The relative expression of *AtTERT* in *Arabidopsis* Heynh. seedlings under 50  $\mu\text{mol/L}$  ABA stress

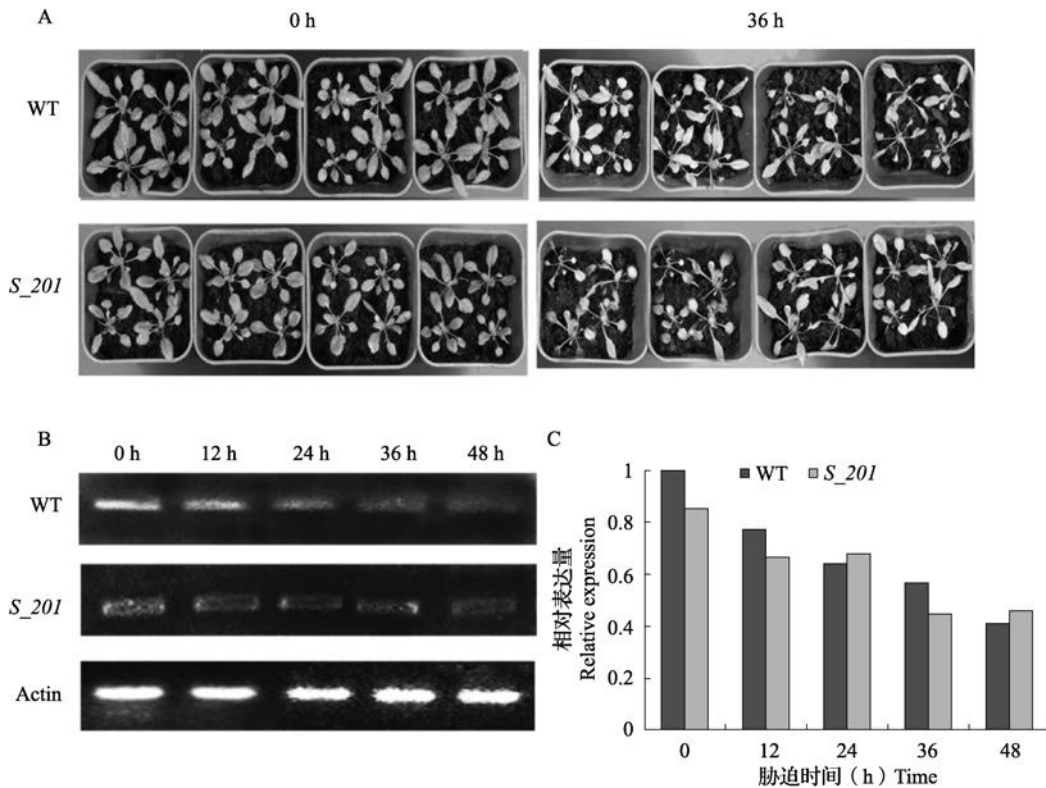
图 7 拟南芥野生型 (WT) 及启动子区域突变体 (S<sub>201</sub>) ABA 处理下 *AtTERT* 基因的表达

Fig.7 *AtTERT* gene expression in wild type (WT) and promoter mutant (S<sub>201</sub>) *Arabidopsis* Heynh. seedlings under ABA stress



**2.5.4 热胁迫下 *AtTERT* 的表达** 分别将生长 6 周的野生型及突变体拟南芥幼苗置于 42 °C 的光照培养箱中处理 0 h、12 h、24 h、36 h、48 h, 结果发现突变体与野生型对热胁迫的反应没有明显差异。处

理 36 h 后拟南芥叶片失水皱缩但仍然存活(如图 8A), 48 h 后两者几乎均死亡。比较 *AtTERT* 表达量, 可发现在野生型和突变体拟南芥均随着热激时间延长而下降(图 8B、C), 但两者之间无显著差异。



A: 热胁迫处理幼苗的表型; B: RT-PCR 检测经热胁迫处理的拟南芥幼苗 *AtTERT* 基因表达;

C: 热胁迫处理拟南芥幼苗 *AtTERT* 相对表达量

A: Seedling phenotypes under heat stress, B: RT-PCR analysis of *AtTERT* gene expression of *Arabidopsis* Heynh. seedlings under heat stress,

C: The relative expression of *AtTERT* in *Arabidopsis* Heynh. seedlings under heat stress

图 8 拟南芥野生型 (WT) 及启动子区域突变体 (*S\_201*) 热胁迫下 *AtTERT* 基因的表达

Fig.8 *AtTERT* gene expression in wild type (WT) and promoter mutant (*S\_201*) *Arabidopsis* Heynh. seedlings under heat stress

### 3 讨论

为提高植物的抗逆性、进行作物改良, 近年来人们越来越重视植物内源性启动子的研究, 以更好地调节基因功能<sup>[42]</sup>。目前关于 *TERT* 启动子的研究主要集中于肿瘤细胞<sup>[17-20]</sup>, 而植物 *TERT* 启动子的研究报道相对匮乏。本研究 *TERT* 启动子进化关系的分析显示, *TERT* 启动子在十字花科不同植物之间具有较高保守性, 在每属的各个物种间同源性更高, 其保守性与物种遗传距离基本一致<sup>[43]</sup>。研究表明, 矮牵牛 *AGL15* 同源基因启动子区保守性与物种的遗传距离不一<sup>[44]</sup>; 而 *napin* 基因启动子在拟南芥、萝卜、白菜、油菜、甘蓝型油菜等不同芸苔属物种之间却保持较高的保守性<sup>[45]</sup>。鉴于 *TERT* 在真核生物属于单拷贝基因, 而且本研究结果表明, *TERT*

启动子在十字花科各属植物间保持高度的保守性, 因此, *TERT* 启动子可作为植物进化分类依据的分子标记。

抗逆基因非翻译区上游的启动子胁迫应答调控元件有效调控逆境应答基因的表达, 靶基因顺式作用元件通过与反式作用因子的结合是基因表达调控的关键环节<sup>[46-47]</sup>。这些复杂的调节网络介导植物目标基因在干旱、寒冷及盐胁迫下的表达, 提高抗逆性<sup>[48]</sup>。如玉米 *ZmZIP71* 基因启动子包含有低温、高温及厌氧等逆境响应相关的元件, 经分析发现, *ZmZIP71* 基因受干旱、盐和冷等逆境条件诱导表达参与逆境胁迫的应答<sup>[49]</sup>; 核桃的 *JrATG18a* 基因启动子中含有高温、低温、干旱及 ABA 等相关顺式作用元件, 在高温、低温及干旱胁迫下, *JrATG18a* 基因可以被不同程度的诱导, 表

明其参与核桃的生长发育及逆境响应过程<sup>[50]</sup>。本研究发现拟南芥 *AtTERT* 基因上游 2 kb 启动子含有盐、干旱、低温及激素响应元件,而试验结果证明 *AtTERT* 基因可以被高盐、干旱诱导,而对 ABA 不敏感且其表达被热激抑制;同时野生型拟南芥幼苗抵抗非生物胁迫的能力及 *AtTERT* 表达水平明显高于启动子区域突变体 S\_201,说明 *AtTERT* 启动子影响 *AtTERT* 表达从而改变拟南芥的抗逆性。这与其他基因启动子突变影响基因表达特性具有相似性。如大白菜自交系 06-247 和 He102 抽薹开花性状显著差异的主要原因之一是由启动子突变造成的<sup>[51]</sup>。这些结果说明 *AtTERT* 启动子区域的顺式作用元件组成及其调控靶基因表达响应潜势,与检测到的胁迫条件下 *AtTERT* 基因表达模式的变化具有高度的吻合性,也说明 *AtTERT* 基因在不同胁迫条件下诱导表达与逆境响应调控具有重要关系。

*hTERT* 通过作为在  $\beta$ -catenin 转录调节复合物中起辅助因子和响应 Wnt 信号的基因启动子结合<sup>[8]</sup>调节 Wnt/ $\beta$ -catenin 信号通路来影响靶基因的转录<sup>[5-6]</sup>;而且 *hTERT* 启动子区域突变形成的核苷酸可与 E-twenty-six (ETS) 转录因子结合,ETS 因子无法作用于丝裂原活化蛋白激酶 (MAPK) 信号转导通路而导致 MAPK 失调<sup>[52]</sup>。植物细胞响应逆境胁迫(盐、干旱、热激及胁迫激素 ABA)主要通过影响参与信号通路传导的蛋白激酶活性,主要有 SnRKs、MAPKs 及 CPKs,调节细胞代谢及基因表达来提高植物的抗逆性<sup>[53]</sup>。本研究中,*TERT* 基因上游启动子含有多个逆境相关的顺式作用元件,且 *AtTERT* 基因可以被盐、旱诱导,表现出较高的表达水平,因此推测 *AtTERT* 基因在参与逆境响应过程中也会涉及其作为胁迫信号通路的转录调节剂影响蛋白激酶活性,与离子运输、基因表达及蛋白代谢具有重要的联系。另外,在 *AtTERT* 启动子内,还有其他激素相关的响应元件,如 GARE-motif<sup>[35]</sup>和 TATC-box<sup>[35]</sup>、ERE<sup>[40]</sup>、TGA-element<sup>[35]</sup>及微生物诱导相关调控元件,如 W-box<sup>[40]</sup>等(表 2)。这些顺式作用元件的存在暗示 *AtTERT* 启动子可能不仅仅响应非生物胁迫,也可能会响应生物胁迫的诱导,这一推测还待进一步验证。对 *AtTERT* 基因启动子及功能进行研究,为进一步研究 *AtTERT* 调控拟南芥非生物胁迫抗性以及生长发育的分子机理积累了新资料。后续将继续对 *AtTERT* 进行深入研究,为改良植物抗逆性提供依据。

## 参考文献

- [1] Chan H, Wang Y, Feigon J. Progress in human and tetrahymena telomerase structure. *Annual Review of Biophysics*, 2017, 46 (1): 199-225
- [2] Jiang J, Wang Y, Sušc L, Chan H, Basu R, Zhou Z H, Feigon J. Structure of Telomerase with Telomeric DNA. *Cell*, 2018, 173, 1179-1190
- [3] Tomlinson R L, Abreu E B, Ziegler T, Ly H, Counter C M, Terns R M, Terns M P. Telomerase reverse transcriptase is required for the localization of telomerase RNA to cajal bodies and telomeres in human cancer cells. *Molecular and Cellular Biology*, 2008, 19: 3793-3800
- [4] Majerská J, Schrupfová P P, Dokládál L, Schořová S, Stejskal K, Obořil M, Honys D, Kozáková L, Polanská P S, Sýkorová E. Tandem affinity purification of *AtTERT* reveals putative interaction partners of plant telomerase *in vivo*. *Protoplasma*, 2018, 255 (2): 1-16
- [5] Masutomi K, Possemato R, Wong J M Y, Wong J M Y, Currier J L, Tothova Z, Manola J B, Ganesan S, Lansdorp P M, Collins K, Hahn W C. The telomerase reverse transcriptase regulates chromatin state and DNA damage responses. *Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2005, 102 (23): 8222-8227
- [6] Park J, Venteicher A S, Hong J Y, Choi J, Jun S, Shkreli M, Chang W, Meng Z J, Cheung P, Ji H, McLaughlin M, Veenstra T D, Nusse R, McCrea P D, Artandi S E. Telomerase modulates Wnt signalling by association with target gene chromatin. *Nature*, 2009, 460 (7251): 66-72
- [7] Doksan Y, De L T. Telomere-internal double-strand breaks are repaired by homologous recombination and PARP1/Lig3-dependent end-joining. *Cell Reports*, 2016, 17 (6): 1646-1656
- [8] 刘颖, 吴晓飞, 门璟煜, 卢存福. 端粒酶的非端粒功能研究进展. *中国细胞生物学学报*, 2016 (5): 640-646  
Liu Y, Wu X F, Men J Y, Lu C F. Development of non-telomere function of telomerase. *Chinese Journal of Cell Biology*, 2016 (5): 640-646
- [9] Ding D, Zhou J, Wang M, Cong Y S. Implications of telomere-independent activities of telomerase reverse transcriptase in human cancer. *FEBS Journal*, 2013, 280 (14): 3205-3211
- [10] Chiodi I, Mondello C. Telomere-independent functions of telomerase in nuclei, cytoplasm, and mitochondria. *Frontiers in Oncology*, 2012, 2 (133): 133
- [11] Heidenreich B, Rachakonda P S, Hemminki K, Kumar R. *TERT*, promoter mutations in cancer development. *Current Opinion in Genetics & Development*, 2014, 24 (24C): 30-37
- [12] 李素云, 李佳, 王莉莉, 钟嘉宏, 陈青, 熊文芳, 曾小微, 贺修胜. *STGC3* 基因启动子生物信息学分析及载体构建. *中南医学科学杂志*, 2017, 45 (1): 48-53  
Li S Y, Li J, Wang L L, Zhong J H, Chen Q, Xiong W F, Zeng X W, He X S. Bioinformatics analysis of *STGC3* gene promoter and construction of dual luciferase report gene expression Vector. *Medical Science Journal of Central South China*, 2017, 45 (1): 48-53
- [13] Sumit B, Linghe X, Zaug A J, Powell N M, Dancik G M, Scott C, Costello J C, Dan T, Cech T R. *TERT* promoter mutations and telomerase reactivation in urothelial cancer. *Science*, 2015, 347 (6225): 1006-1010

- [ 14 ] 黄君健,李杰之,林坚,蒋晓山,高朝晖,黄翠芬.人端粒酶催化亚基 *hTERT* 基因启动子的克隆.生物技术通讯,1999,10(3):167-170  
Huang J J, Li J Z, Lin J, Jiang X S, Gao C H, Huang C F. Cloning and characterization of human telomerase catalytic subunit (*hTERT*) gene promoter. Letters in Biotechnology, 1999, 10(3): 167-170
- [ 15 ] Huang D S, Wang Z, He X J, Diplas B H, Yang R, Killelac P J, Meng Q, Ye Z Y, Wang W, Jiang X T, Xu L, Hed X L, Zhao Z S, Xu W J, Wang H J, Ma Y Y, Xia Y J, Li L, Zhang R X, Jin T, Zhao Z K, Xu J, Yu S, Wu F, Liang J, Wang S, Jiao Y, Yan H, Tao H Q. Recurrent *TERT* promoter mutations identified in a large-scale study of multiple tumor types are associated with increased *TERT* expression and telomerase activation. European Journal of Cancer, 2015, 51(8): 969-976
- [ 16 ] 司少艳,梁爽,宋淑军,冯凯,刘俊丽,张军,路浩君,张铭.小鼠 *TERT* 启动子的克隆及在肿瘤细胞中的转录活性研究.现代肿瘤医学,2010,18(2):226-229  
Si S Y, Liang S, Song S J, Feng K, Liu J L, Zhang J, Lu H J, Zhang M. Cloning of *mTERT* promoter and its transcriptional activity in tumor cells. Modern Oncology, 2010, 18(2): 226-229
- [ 17 ] Bell R J, Rube H T, Xavier-Magalhães A, Costa B M, Mancini A, Song J S, Costello J F. Understanding *TERT* promoter mutations: a common path to immortality. Molecular Cancer Research, 2016, 14(4): 315
- [ 18 ] 代丽丽,张国安,崔文.*BRAF*<sup>V600E</sup>和*TERT*启动子突变与甲状腺乳头状癌的关系.济宁医学院学报,2018,41(4):290-293  
Dai L L, Zhang G A, Cui W. The correlation between *BRAF*<sup>V600E</sup> mutation and *TERT* promoter mutation with papillary thyroid carcinoma. Journal of Jinning Medical College, 2018, 41(4): 290-293
- [ 19 ] Horn S, Figl A, Rachakonda P S, Fischer C, Sucker A, Gast A, Kadel S, Moll I, Nagore E, Hemminki K, Schadendorf D, Kumar R. *TERT* Promoter Mutations in Familial and Sporadic Melanoma. Science, 2013, 339(6122): 959-961
- [ 20 ] Fajkus J, Kovařík A, Královics R. Telomerase activity in plant cells. FEBS Letters, 1996, 391, 307-309
- [ 21 ] Oguchi K, Liu H, Tamura K, Takahashi H. Molecular cloning and characterization of *AtTERT*, a telomerase reverse transcriptase homolog in *Arabidopsis thaliana*. FEBS Letters, 1999, 457: 465-469
- [ 22 ] Beilstein M A, Brinegar A E, Shippen D E. Evolution of the *Arabidopsis* telomerase RNA. Frontiers in Genetics, 2012, 3(188): 188
- [ 23 ] 张徐俞,王瑾瑜,郑广顺,张俊琦,卢存福.盐胁迫下沙冬青细胞端粒酶活性的变化与DNA稳定性的关系.生物技术通讯,2014(10):134-138  
Zhang X Y, Wang J Y, Zheng G S, Zhang J Q, Lu C F. Effects of salt stress on telomerase activity in relation to DNA stability of *Ammopiptanthus mongolicus* cells. Biotechnology Bulletin, 2014(10): 134-138
- [ 24 ] 孙丽春,杨颖,于婷乔,孙玉萍,高海波,王瑾瑜,门璟煜,卢存福,陈玉珍.沙冬青端粒酶逆转录酶基因(*AmTERT*)克隆及表达分析.中国细胞生物学学报,2018,40(7):1088-1100  
Sun L C, Yang Y, Yu T Q, Sun Y P, Gao H B, Wang J Y, Men J Y, Lu C F, Chen Y Z. Cloning and expression analysis of telomerase reverse transcriptase (*AmTERT*) gene from *Ammopiptanthus mongolicus*. Chinese Journal of Cell Biology, 2018, 40(7): 1088-1100
- [ 25 ] Heller-Uszynska K, Schnippenkoetter W, Kilian A. Cloning and characterization of rice (*Oryza sativa* L.) telomerase reverse transcriptase, which reveals complex splicing pattern. The Plant Journal, 2002, 31(1): 75-86
- [ 26 ] Fojtova M, Peska V, Dobsakova Z, Mozgova I, Fajkus J, Sykorova E. Molecular analysis of T-DNA insertion mutants identified putative regulatory elements in the *AtTERT* gene. Journal of Experimental Botany, 2011, 62(15): 5531-5545
- [ 27 ] 陆玉建,高春明,郑香峰,钮松召.盐胁迫对拟南芥种子萌发的影响.湖北农业科学,2012,51(22):5099-5104  
Lu Y J, Gao C M, Zheng X F, Niu S Z. Effects of salt stress on germination of *Arabidopsis thaliana* seeds. Hubei Agricultural Sciences, 2012, 51(22): 5099-5104
- [ 28 ] 刘晨旭,刘戡,刘杰,高越瑶,周蕴薇.过量表达甘菊*CBF1*基因提高拟南芥抗旱耐盐能力.草业科学,2018,35(6):1400-1408  
Liu C X, Liu Y, Liu J, Gao Y Y, Zhou Y W. Overexpression of chrysanthemum *lavandulifolium* *CBF1* gene enhances resistance to drought and salt tolerance in *Arabidopsis thaliana*. Prantacultural Science, 2018, 35(6): 1400-1408
- [ 29 ] 黄胜男,张计育,莫正海,郭忠仁,王刚,宣继萍,贾晓东.猕猴桃丙酮酸脱羧酶2基因(*AdPDOC*)的克隆与功能分析.园艺学报,2015,42(S1):2610  
Huang S N, Zhang J Y, Mo Z H, Guo Z R, Wang G, Xuan J P, Jia X D. Cloning and function assay of macaque peach pyruvate decarboxylase 2 gene (*AdPDOC*). Acta Horticulturae Sinica, 2015, 42(S1): 2610
- [ 30 ] 宋倩娜,刘琛,高振蕊,李莹,张弛,崔敏龙.热激启动子18.2在金鱼草中启动下游基因表达最适温度条件的筛选.生态学杂志,2014,33(9):2436-2441  
Song Q N, Liu C, Gao Z R, Li Y, Zhang C, Cui M L. Optimal temperature for *hsp18.2* promoter in gene expression of anthocyanin biosynthesis of *Antirrhinum majus*. Chinese Journal of Ecology, 2014, 33(9): 2436-2441
- [ 31 ] 王文娟,王建武,王海庆.拟南芥*Atkin8a*和*Atkin8b*基因表达特性.西北植物学报,2011,31(4):654-658  
Wang W J, Wang J W, Wang H Q. Expression Analysis of *AtKin-8a* and *AtKin-8b* Kinesin Genes in *Arabidopsis thaliana*. Acta Botanica Boreali-occidentalia Sinica, 2011, 31(4): 654-658
- [ 32 ] Oguchi K, Tamura K, Takahashi H. Characterization of *Oryza sativa*, telomerase reverse transcriptase and possible role of its phosphorylation in the control of telomerase activity. Gene, 2004, 342(1): 57-66
- [ 33 ] 于兰芳,周硕,张双喜,记玉洁,刘永伟.葡萄*F-box*基因*VvF-box5*的基因结构与表达分析.植物遗传资源学报,2018,19(2):361-369  
Yu L F, Zhou S, Zhang S X, Ji Y J, Liu Y W. Gene Structure and Expression Analysis of *F-box* Gene *VvF-box5* in Grapevine (*Vitis vinifera* L.). Journal of Plant Genetic Resources, 2018, 19(2): 361-369
- [ 34 ] 马婧,刘群,王晓斌,睦顺照,李名扬.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.植物遗传资源学报,2012,13(4):601-608



- Ma J, Liu Q, Wang X B, Sui S Z, Li M Y. Cloning and transient expression assay of two *nsLTP* gene promoters from *Chimonanthus praecox* in Tobacco. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2012, 13(4): 601-608
- [35] 李濯雪, 陈信波. 植物组织特异性启动子及相关顺式作用元件研究进展. *生物学杂志*, 2015, 32(6): 91-95
- Li Z X, Chen X B. Research advances in plant tissue specific promoters and related Cis-acting elements. *Journal of Biology*, 2015, 32(6): 91-95
- [36] 杨献光, 梁卫红, 齐志广, 马闻师, 沈银柱. 植物非生物胁迫应答的分子机制. *麦类作物学报*, 2006, 26(6): 158-161
- Yang X G, Liang W H, Qi Z G, Ma W S, Shen Y Z. Molecular mechanisms of plant responses to abiotic stresses. *Journal of Triticeae*, 2006, 26(6): 158-161
- [37] 刘春, 麻浩. 拟南芥非生物胁迫应答基因表达的调节子研究概况. *生物技术通讯*, 2009, 20(2): 273-278
- Liu C, Ma H. General review in the study on regulons for abiotic stress-responsive gene expression in *Arabidopsis thaliana*. *Letters in Biotechnology*, 2009, 20(2): 273-278
- [38] 范贝, 刘明晓, 李慧杰, 张雪, 王晓梅, 崔喜艳. 拟南芥 *AAP* 基因家族的生物信息学分析. *生命的化学*, 2016(3): 372-378
- Fan B, Liu M X, Li H J, Zhang X, Wang X M, Cui X Y. Bioinformatics analysis of *AAP* gene family in *Arabidopsis thaliana*. *Chemistry of Life*, 2016(3): 372-378
- [39] 邢冉冉, 潘秋红. ‘赤霞珠’葡萄 *Vv5GT3* 基因启动子的克隆及其对光照的响应. *基因组学与应用生物学*, 2016, 35(11): 3128-3134
- Xing R R, Pan Q H. Molecular cloning and light response of the *Vv5GT3* gene promoter from cabernet sauvignon (*Vitis vinifera* L.). *Genomics and Applied Biology*, 2016, 35(11): 3128-3134
- [40] 周丽英, 卜璐璐, 杨春雷, 侯思名, 田甜, 杨正安. 番茄 *PG* 基因启动子的序列分析. *北方园艺*, 2016(1): 72-75
- Zhou L Y, Bu L L, Yang C L, Hou S M, Tian T, Yang Z A. Sequence analysis of *PG* gene promoter from tomato. *Northern Horticulture*, 2016(1): 72-75
- [41] 郑晓瑜, 郭晋艳, 张毅, 李秋莉. 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*, 2011, 47(2): 129-135
- Zheng X Y, Guo J Y, Zhang Y, Li Q L. Research advances in plant tissue specific promoters and related Cis-acting elements. *Plant Physiology Journal*, 2011, 47(2): 129-135
- [42] 路静, 赵华燕, 何奕昆, 宋艳茹. 高等植物启动子及其应用研究进展. *自然科学进展*, 2004, 14(8): 856-862
- Lu J, Zhao H Y, He Y K, Song Y R. Progress of promoters and their application in higher plants. *Progress in Natural Science*, 2004, 14(8): 856-862
- [43] 张哲, 黄建勋, 戚继. 基于低拷贝核基因的组分特征研究十字花科植物的系统发生关系. *生物技术通报*, 2016(12): 86-95
- Zhang Z, Huang J X, Qi J. Revealing deep phylogeny of *Brassicaceae* using composition analysis of low-copy nuclear genes. *Blotechnology Bulletin*, 2016(12): 86-95
- [44] 郭余龙, 闫明旭, 陈君, 马婧, 李名扬. 矮牵牛 *PMADS9* 基因启动子的克隆及分析. *植物遗传资源学报*, 2011, 12(2): 275-280
- Guo Y L, Yan M X, Chen J, Ma J, Li M Y. Cloning and characterization of the *PMADS9* gene promoter from petunia. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2011, 12(2): 275-280
- [45] 刘建民, 李运涛, 甘露, 李红, 栗茂腾. *napin* 基因启动子克隆及进化分析. *生物技术通报*, 2008(S1): 188-191
- Liu J M, Li Y T, Gan L, Li H, Li M T. Cloning and phylogenetic analysis of *napin* promoter. *Blotechnology Bulletin*, 2008(S1): 188-191
- [46] 杨晓娜, 赵昶灵, 李云, 李会容, 苏丽, 周燕琼. 启动子序列克隆和功能分析方法的研究进展. *云南农业大学学报: 自然科学*, 2010, 25(2): 283-290
- Yang X N, Zhao C L, Li Y, Li H R, Su L, Zhou Y Q. Research advance in the methods of cloning and function-analyzing of promoters. *Journal of Yunnan Agricultural University: Natural Science*, 2010, 25(2): 283-290
- [47] 张雪梅, 姚文静, 赵凯, 姜延波, 周博如. 杨树 *NAC7* 转录因子基因应答盐胁迫表达. *东北林业大学学报*, 2017, 45(8): 6-9
- Zhang X M, Yao W J, Zhao K, Jiang Y B, Zhou B R. Expression analysis of *NAC7* transcription factor gene from *populus simonii* × *P.nigra* in response to salt stress. *Journal of Northeast Forestry University*, 2017, 45(8): 6-9
- [48] 周金鑫, 胡新文, 张海文, 黄荣峰. ABA 在生物胁迫应答中的调控作用. *农业生物技术学报*, 2008, 16(1): 169-174
- Zhou J X, Hu X W, Zhang H W, Huang R F. Regulatory role of ABA in plant response to biotic stresses. *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2008, 16(1): 169-174
- [49] 刘彦丹, 王天宇. 玉米逆境胁迫响应基因 *ZmbZIP71* 的克隆与表达分析. *植物遗传资源学报*, 2011, 12(5): 775-781
- Liu Y D, Wang T Y. Isolation and expression analysis of a stress-responsive gene *ZmbZIP71* in Maize (*Zea mays* L.). *Journal of Plant Genetic Resources*, 2011, 12(5): 775-781
- [50] 陈淑雯, 郝茜珣, 贾彩霞, 赵爱国, 李大培, 杨桂燕. 核桃 *WD40* 转录因子 *JrATG18a* 基因的克隆及逆境响应. *植物遗传资源学报*, 2018, 19(5): 979-986
- Chen S W, Hao Q X, Jia C X, Zhao A G, Li D P, Yang G Y. Identification and stress response analysis of a *WD40* transcription factor *JrATG18a* gene from *Juglans regia*. *Journal of Plant Genetic Resources*, 2018, 19(5): 979-986
- [51] 刘栓桃, 张志刚, 李巧云, 王淑芬, 赵智中, 卢金东, 张晓燕, 徐文玲, 刘贤娟, 付卫民. 光敏色素 B 基因 (*PHYB*) 启动子突变及与大白菜开花时间的关联分析. *农业生物技术学报*, 2014, 22(7): 853-861
- Liu S T, Zhang Z G, Li Q Y, Wang S F, Zhao Z Z, Lu J D, Zhang X Y, Xu W L, Liu X X, Fu W M. Association analysis between phytochrome B Gene (*PHYB*) promoter mutations and flowering time in chinese cabbage (*Brassica rapa* L. ssp. *pekinensis*). *Journal of Agricultural Biotechnology*, 2014, 22(7): 853-861
- [52] 殷德涛, 余坤. *TERT* 启动子突变与甲状腺乳头状癌临床病理学特征关系的研究进展. *中国普外基础与临床杂志*, 2018, 25(10): 1157-1160
- Yin D T, Yu K. Advances in the relationship between *TERT* promoter mutation and clinicopathological features of papillary thyroid carcinoma. *Chinese Journal of Bases and Clinics in General Surgery*, 2018, 25(10): 1157-1160
- [53] Zhu J K. Abiotic stress signaling and responses in plants. *Cell*, 2016, 167(2): 313-324