

甘蔗 *ScMOC1* 基因启动子的克隆与瞬时表达分析

李旭娟¹, 林秀琴¹, 字秋艳¹, 李纯佳¹, 徐超华¹, 吴转娣¹, 朱建荣¹,
刘洪博¹, 方志存², 刘新龙¹

(¹ 云南省农业科学院甘蔗研究所 / 云南省甘蔗遗传改良重点实验室, 开远 661699;

² 屏边苗族自治县农业和科学技术局, 云南屏边 661200)

摘要: *MOC1* 属于植物特有的 GRAS 家族蛋白基因, 是调控植物腋芽形成发育的关键基因。启动子对基因转录效率起直接调控作用, 其功能分析可以精确定位基因的表达部位、发育阶段和调控机制, 克隆甘蔗腋芽形成发育关键基因 *ScMOC1* 的启动子序列, 研究其功能对该基因表达调控机制具有重要意义。本研究以我国主栽甘蔗品种新台糖 22 号 (ROC22) 的基因组 DNA 为模板, 通过基因组步移和巢式 PCR 技术克隆到 *ScMOC1* 起始密码子 ATG 上游 1874 bp 的启动子序列。PlantCARE 在线分析预测表明, 该序列包含多个真核生物启动子必需的核心元件 TATA-box、CAAT-box 以及与光响应、激素响应和分生组织表达等相关的顺式作用元件, 推测 *ScMOC1* 启动子可通过激素诱导调控 *ScMOC1* 表达, 且该启动子可能通过分生组织表达顺式调控元件 CAT-box 参与 *ScMOC1* 对甘蔗分蘖的调控。将获得的启动子序列替换 pBI121 质粒中的 CaMV35S 启动子驱动下游 *GUS* 基因表达进行活性分析, 结果表明: 本研究克隆的启动子片段能驱动 *GUS* 基因在甘蔗嫩叶中瞬时表达。5' 缺失分析表明该启动子的基础启动子序列在起始密码子 ATG 上游 350~500 bp 之间。该结果为后续 *ScMOC1* 的调控机制研究奠定了良好的基础。

关键词: 甘蔗; *ScMOC1* 启动子; 克隆; 瞬时表达分析

Cloning and Transient Expression Analysis of *ScMOC1* Promoter in Sugarcane

LI Xu-juan¹, LIN Xiu-qin¹, ZI Qiu-yan¹, LI Chun-jia¹, XU Chao-hua¹, WU Zhuan-di¹,
ZHU Jian-rong¹, LIU Hong-bo¹, FANG Zhi-cun², LIU Xin-long¹

(¹ Sugarcane Research Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences / Yunnan Key Laboratory of Sugarcane

Genetic Improvement, Kaiyuan 661699; ² Bureau of Agriculture and Science and Technology

of Pingbian Miao Autonomous County, Pingbian Yunnan 661200)

Abstract: *MOC1* encodes for a plant-specific GRAS family protein, and this gene plays key role in the formation and development of axillary bud. Since the gene promoter is directly involved into transcriptional regulation, functional analysis can accurately locate the expression site, development stage and regulation mechanism of gene. Cloning the sequence and function analysis of *ScMOC1* promoter will be of great significance in illustrating the regulation mechanism of *ScMOC1*. In this study, the 1874 bp promoter sequence upstream of *ScMOC1* was isolated from the genomic DNA of sugarcane main cultivar ROC22 by using nested PCR and genomic walking methods. This isolated fragment was verified to be the promoter of *ScMOC1* via sequence structure analysis. The results indicated that *ScMOC1* promoter contained a few of core elements of the eukaryotic

收稿日期: 2018-10-15 修回日期: 2018-11-04 网络出版日期: 2018-11-26

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20181122.1044.002.html>

第一作者研究方向为甘蔗分子遗传学, E-mail: lixujuan2011@163.com

通信作者: 刘新龙, 研究方向为甘蔗分子遗传学, E-mail: lxlgood868@163.com

基金项目: 国家自然科学基金青年项目 (31601362); 云南省应用基础研究计划青年项目 (2015FD063); 云南省中青年学术技术带头人后备人才 (2014HB038)

Foundation project: National Natural Science Foundation Youth Project (31601362), Yunnan Applied Basic Research Program Youth Project (2015FD063), Yunnan Young and Middle-aged Academic and Technological Leaders Reserve Talents (2014HB038)

promoter such as TATA-box, CAAT-box, several light, hormone responsive elements and a *cis*-acting regulatory element related to meristem expression (CAT-box). We speculated that the *ScMOC1* promoter could regulate the expression of *ScMOC1* in a manner of hormone treatment, required for the sugarcane tillering regulation by the CAT-box *cis*-acting element. By constructing the target promoter into pBI121 plasmid that contains a GUS reporter, the results showed that this promoter could result in transient expression of *GUS* gene in sugarcane young leaves, and the deletion analysis indicated that the basic promoter sequence of the promoter was between 350 bp and 500 bp upstream of the starting codon ATG of *ScMOC1*. Thus, these results obtained above will provide the foundation information for *ScMOC1* on transcriptional regulation.

Key words: Sugarcane; *ScMOC1* promoter; cloning; transient expression analysis

甘蔗是重要的糖料兼能源作物, 培育高产高糖、抗病抗逆性强的品种是甘蔗育种工作者的共同努力方向^[1]。当前, 通过挖掘优异基因, 并借助分子辅助手段改良品种已成为育种十分有效的途径。*MOC1* 属于植物特有的 GRAS 家族蛋白基因, 是调控植物腋芽形成发育的主效基因, 阻断该基因表达会导致腋芽形成数量减少或无法形成, 而过表达会出现多腋芽情况^[2-3]。甘蔗属于靠腋芽进行无性繁殖的作物, 腋芽形成数量及质量对甘蔗下种量、出苗率、分蘖表现都有重要的影响, 因此可通过腋芽形成发育调控来提高甘蔗产量并降低种植成本。鉴于 *MOC1* 在腋芽形成发育过程中的重要作用, 可通过调控该基因的表达来调控腋芽的形成发育进而改良甘蔗产量。目前李旭娟等^[4]已从甘蔗中克隆出该基因的同源基因 *ScMOC1*, 并对其表达特征进行了分析, 证实了该基因在甘蔗腋芽形成发育过程中发挥作用。为了后续更有效地开发利用该基因, 有必要对控制该基因的表达调控元件开展研究, 因启动子位于基因上游, 是控制基因表达起始时间和表达程度的关键^[5], 故是后续研究的重点。

从甘蔗中分离克隆基因的启动子, 对其进行功能研究, 鉴定出能够高效驱动目的基因表达的启动子并阐明其分子机制是提高甘蔗基因表达效率的重要途径^[6]。近年来, 甘蔗中许多与糖代谢相关的启动子已相继被克隆出来^[7], 如牛俊奇等^[8-9]克隆到的甘蔗可溶性酸性转化酶 (*SoSAlI*) 基因 5' 侧翼部分启动子序列和中性 / 碱性转化酶基因 (*SoNIN1*) 5' 侧翼启动子序列; 雷美华等^[10]克隆到的蔗糖合成酶 (*SS*) 基因的启动子序列; 周平等^[11]克隆到的甘蔗蔗糖磷酸合成酶 *SPS III* 的基因组 DNA 片段及其 5' 侧翼序列; 吴自明等^[12]克隆出甘蔗蔗糖转运蛋白基因 *SUT4* 的启动子序列等。鉴于此, 本研究克隆了甘蔗 *ScMOC1* 的启动子, 并对其进行了序列结构分析、功能元件预测和活性检测, 以期后续该

启动子对 *ScMOC1* 的表达模式调控和甘蔗分子辅助育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

以我国重要的主栽品种新台糖 22 号 (ROC22) 为研究材料, 该材料由国家甘蔗种质资源圃提供。

大肠杆菌 DH5 α 、农杆菌 GV3101 感受态细胞由本实验室保存, 基因组步移试剂盒 Genome WalkerTM Universal Kit 和 Advantage 2 PCR Enzyme System 购自宝生物公司, pBI121 质粒、Taq 酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、植物基因组 DNA 提取试剂盒及常规药品等购自北京全式金生物技术有限公司, 其他所有化学试剂均为分析纯。

1.2 甘蔗 *ScMOC1* 启动子序列的克隆

1.2.1 基因组 DNA 提取 利用植物基因组 DNA 提取试剂盒 (全式金, 北京) 提取 ROC22 新鲜幼嫩叶片基因组 DNA, 用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 质量, Bio Drop Lite PC 超微量可见紫外分光光度计检测 DNA 质量和浓度, 质量合格的 DNA 样品 -20 °C 保存备用。

1.2.2 启动子克隆 使用基因组步移试剂盒 GenomeWalkerTM Universal Kit 克隆 *ScMOC1* 基因的启动子序列, 所有试验步骤按照试剂盒说明书进行。首先使用 *DraI/EcoRV/PvuII/StuI* 4 种限制性内切酶酶切并纯化 ROC22 基因组 DNA, 再将酶切并纯化的 DNA 分别与试剂盒里面的步移接头 Genomewalker Adapter 连接, 制备好 4 种不同的基因组步移模板。然后根据课题组前期克隆的 *ScMOC1* 基因序列 (KP876558) 的 5' 端设计步移引物 pMOC1-R1 和内巢引物 pMOC1-R2 (表 1), 分别与试剂盒提供的接头引物 AP1 和 AP2 进行两轮 PCR 扩增, PCR 使用 Advantage 2 PCR Enzyme System, 扩增条件为 94 °C 25 s, 72 °C 3 min, 5 个循环; 94 °C 25 s, 67 °C 3 min, 20 个循环; 67 °C,

7 min。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测并使用全式金的 EasyPure Quick Gel Extraction Kit 回收纯化后与 T-载体连接转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,挑取阳性克隆并测序分析。

以已制备好的步移模板为 PCR 模板,在上述扩增得到的片段 5' 端设计引物 pMOC1-R3 与接头引

物 AP2 配对使用继续步移扩增,PCR 扩增条件、回收转化测序等同上。根据两次步移得到的拼接序列设计启动子全长扩增引物 pMOC1-F 和 pMOC1-R,以保存的 ROC22 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增获得启动子的全长序列并测序,引物序列见表 1。

表 1 启动子克隆和缺失片段扩增 PCR 引物

Table 1 PCR primers used for promoter isolation and deletion fragment construction

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence (5'-3')	用途 Function
AP1	GTAATACGACTCACTATAGGGC	接头引物
AP2	ACTATAGGGCACGCGTGGT	
pMOC1-R1	CGCTGTTGCCGCTGCTGCCGTT	步移引物
pMOC1-R2	GCCATTGTTGTGTGTCGGTGTCCGAGTC	
pMOC1-R3	GCTTCCGTGACAGGACATCCTCATCTGC	
pMOC1-F	TGGATTAGCGGTTGGTGAC	全长扩增引物
pMOC1-R	CATAGCTTCGACGGTCCGTTTC	
pMOC1-A-FHI	gcagAAGCTTTGGATTAGCGGTTGGTGAC	加酶切位点的启动子全长及缺失片段正向引物
pMOC1-B-FHI	ggacAAGCTTTCTCCATCCACCCATCGTC	
pMOC1-C-FHI	gcacAAGCTTCACTCACTCACCCCTTGCTG	
pMOC1-D-FHI	gcagAAGCTTCTCTACCCCTCTGAGTTTACAC	
pMOC1-E-FHI	gaacAAGCTTTAGGGGTATAGCTGATGAGCTG	
pMOC1-RBm	gataGGATCCCATAGCTTCGACGGTCCGTTTC	加酶切位点的启动子全长及缺失片段反向引物

1.3 *ScMOC1* 启动子序列结构分析

启动子全长序列通过 NCBI 的 BLASTn 进行比对分析,然后通过在线软件 PlantProm (<http://www.softberry.com/cgi-bin/programs/promoter/tssplant.pl>) 预测其转录起始位点 (TSS),最后通过在线软件 Plant CARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 进行顺式作用元件预测分析。

1.4 *ScMOC1* 启动子缺失体构建与瞬时表达分析

根据所得启动子序列及顺式作用元件分析结果设计带酶切位点的正向引物 pMOC1-A-FHI、pMOC1-B-FHI、pMOC1-C-FHI、pMOC1-D-FHI、pMOC1-E-FHI 和反向引物 pMOC1-RBm (表 1)。以测序正确的含启动子全长片段的质粒为模板,分别用 5 条正向引物和反向引物配对进行 PCR 扩增带酶切位点的启动子全长序列及不同长度的 5' 缺失体片段并测序分析。

使用全式金 Easy Pure Plasmid MiniPrep Kit 提取植物二元表达载体 pBI121 质粒 DNA (14758 bp),然后利用 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切并回收大片段作为新载体。同样方法提取含启动子各片段的载体质

粒 DNA,用 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切并回收目的条带。最后用 T4 DNA 连接酶将回收的载体大片段分别与启动子各酶切回收片段两两连接并转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,转化培养后挑取单克隆摇菌测序分析并提取正确克隆质粒 DNA 酶切鉴定,最终构建好重组载体。

利用冻融法将重组载体和 pBI121 空载体 (阳性对照) 分别转化农杆菌 GV3101 感受态细胞,菌液 PCR 鉴定阳性克隆后挑单菌落过夜摇菌,然后按 1:100 扩大培养至 OD₆₀₀ 为 1.0 左右,用 1/2 MS 重悬至 OD₆₀₀ 为 0.6 后侵染预先无菌操作切成 0.5 cm² 小块的甘蔗嫩叶。侵染后的外植体于含 2,4-二氯苯氧乙酸 (2,4-D, 3 mg/L) 和乙酰丁香酮 (AS, 100 μ mol/L) 的固体 1/2 MS 培养基上 25 $^{\circ}$ C 黑暗条件下共培养 3 d,随后转至含 2,4-D (3 mg/L) 和特美汀 (Timentin, 300 mg/L) 的固体 MS 上 25 $^{\circ}$ C 黑暗条件下选择培养 4 d。最后将培养好的外植体放入含泊洛沙姆 (1 mg/L) 的 *GUS* 染色液中,37 $^{\circ}$ C 过夜浸泡后用 75% 的乙醇脱色,观察记录染色情况并拍照,具体操作方法参考许莉萍^[13] 的专利 (稍作修改)。

2 结果与分析

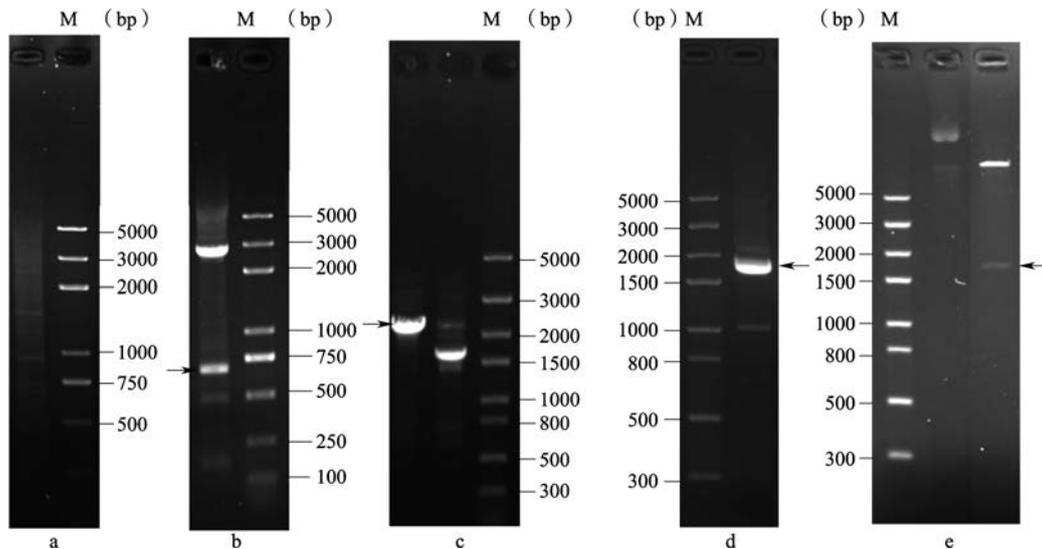
2.1 *ScMOC1* 启动子的克隆及载体构建

用 AP1 和 pMOC1-R1 引物, 分别以 4 种不同酶切并加接头的基因组 DNA 为模板进行第 1 轮 PCR, 结果均得到弥散的条带。再将第 1 轮 PCR 产物稀释 50 倍后各取 2 μ L 为模板, 分别用引物 AP2 和 pMOC1-R2 进行巢式 PCR 并电泳。结果显示用 *EcoRV* 酶处理的模板经两轮 PCR 后在 3000 bp 和 700 bp 附近出现两条清晰的条带(图 1), 将 2 条条带分别切胶纯化并克隆测序, 仅小条带正确, 大小为 644 bp(图 1b 箭头所指片段), 与 *ScMOC1* 的 5'UTR 有一段 189 bp 的重叠区域, 但太短。在所获得的序列 5' 端设计引物 pMOC1-R3, 与 AP2 配对使用, 以 *EcoRV* 酶切并加接头的基因组 DNA 为模板, PCR 扩增得到 1 条 2100 bp 的条带(图 1c 箭头所指片段), 克隆测序分析显示所获得的序列为 *ScMOC1* 上游启动子序列。为了进一步验证扩增序列的真实性, 将获得的两段序列拼接, 使用根据拼接序列设计的启动子全长扩增引物 pMOC1-F、pMOC1-R 以 ROC22 基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增, 最终获得一条 1800 bp 左右的启动子片段(图 1d 箭头所示)。该片段克

隆测序正确后提取质粒并以之为模板, 利用引物 pMOC1-A-FHI、pMOC1-RBm PCR 扩增并克隆测序分析, 最终获得带有酶切位点的启动子全长片段 A-1874 bp, 提取质粒、酶切回收后与以同样酶切处理的载体 pBI121 连接转化、提取质粒并鉴定, 重组质粒提取及酶切产物电泳结果如下图 1-e, 箭头所指条带为重组载体上切下来的启动子全长片段。

2.2 *ScMOC1* 启动子序列分析

转录起始位点(TSS)预测显示所得启动子序列的 TSS 位于 ATG 上游第 342 个碱基处(图 2 加粗 A 处), 预测所得的 TSS score 为 1.9952, TSS 到 ATG 间的序列为 *ScMOC1* 的 5' UTR 区(图 2 浅灰色突出显示标注), 该区段对基因表达也起重要调控作用。顺式作用元件预测发现 *ScMOC1* 启动子包含多个启动子必须的核心元件 TATA-box、CAAT box。此外, 还含有多个光响应元件(G-Box), 3 个脱落酸响应元件(ABRE)、1 个水杨酸响应元件(TCA-element), 1 个生长素响应元件(TGA-element)以及 1 个与分生组织表达有关的调控元件(CAT-box)和少数 DRE core、MYB 等功能未知元件, 启动子序列及顺式作用元件预测结果如图 2、表 2 所示。



箭头所指条带为目的条带; a: 以 *EcoRV* 酶切后的 ROC22 基因组 DNA 为模板, AP1 和 pMOC1-R1 为引物第 1 轮 PCR 结果; b: 第 1 轮 PCR 产物稀释后为模板, 以 AP2 和 pMOC1-R2 为引物巢式 PCR 结果; c: 以 ROC22 基因组 DNA 为模板, AP2 和 pMOC1-R3 为引物 PCR 结果; d: 以 ROC22 基因组 DNA 为模板扩增的启动子全长; e: 重组载体质粒提取及酶切鉴定结果 The arrows mark the target bands. a: The first round of PCR product which used the ROC22 genomic DNA digestion by *EcoRV* enzyme as template and AP1, pMOC1-R1 as primers, b: the nested PCR results which used the first round of PCR product dilution as template and AP2 and pMOC1-R2 as primers, c: the PCR results which used the genomic DNA of ROC22 as template and AP2, pMOC1-R3 as primers, d: the full length of the promoter amplified by ROC22 genomic DNA as the template, e: the results of the recombinant vector plasmid extraction and enzyme digestion identification

图 1 启动子 PCR 扩增及酶切鉴定电泳图

Fig. 1 PCR amplification and digestion of promoter fragment



图中末尾 ATG 为起始密码子; 粗体 A 为转录起始点 TSS; 末尾浅灰色突出显示序列为 5' UTR 区。启动子相关顺式作用元件用深灰色突出显示并附上元件名称。CAAT-box 用浅灰色突出显示标注。TATA-box 加下划线标注
 ATG at the end of the figure is the start codon, bold A is the transcription start site (TSS), the light gray at the end highlights the partial sequence as the 5' UTR region. The promoter related *cis*-acting elements are highlighted in dark gray and the component names are attached. CAAT-boxes highlights the label in light gray, and TATA-boxes highlight the label with underlines

图 2 *ScMOCI* 启动子区序列 (正反义链) 及顺式作用元件 Plant CARE 分析结果
 Fig.2 The *cis*-acting element of *ScMOCI* promoter region (positive antisense chain) analysis by Plant CARE

表 2 *ScMOCI* 启动子顺式作用元件分析Table 2 Analysis of the *cis*-acting elements of the *ScMOCI* promoter

元件名称 Element Names	位置(正链/反链) Position (positive chain / antisense chain)	序列 Sequence	数量 Number	功能 Function
ABRE	144(+),145(+),704(-)	CACGTG, ACGTG GCAACGTGTC,	3	脱落酸响应元件
AT~TATA-box	329(+), 1042(-)	TATATA	2	
CAAT-box	10(+),11(+),128(+),138(+),139(+),164(-),270(+),453(-),542(+),569(+),648(-),674(+),676(-),745(+),746(+),762(+),763(+),832(-),845(+),846(+),930(-),954(+),969(-),982(-),1004(-),1025(-),1032(-),1054(+),1056(-),1082(+),1275(+),1276(+),1328(+),1559(+)	CCAAT, CAAT, CAAAAT	34	启动子和增强子区域中常见的顺式作用元件
CAT-box	1615(-)	GCCACT	1	分生组织表达顺式元件
DRE core	1876(+)	GCCGAC		未知
G-Box	144(+) 1792(-)	CACGTG CACGAC	2	光响应顺式作用元件
GA-motif	339(-)	ATAGATAA	1	光响应元件的一部分
GT1-motif	691(+)	GGTTAA	1	光响应元件
I-box	337(-),1400(-),547(-)	AGATAAAGG, GGATAAGGTG, AAGATAAGGCT	3	光响应元件的一部分
MYB	91(+),1248(-),653(-),1498(+)	CAACCA, TAACCA	4	未知
Sp1	1843(+)	GGGCGG	1	光响应元件
TATA-box	72(+),82(+),171(-),172(+),244(-),245(-),246(-),247(+),295(+),296(-),297(+),328(-),329(+),330(+),331(+),344(+),387(+),616(+),617(+),721(-),723(+),813(-),815(+),965(+),966(+),990(+),991(-),992(-),1041(-),1042(-),1043(-),1044(-),1175(-),1638(-)	TATA, TATAA, TATAAAA, ATTATA	34	转录起始位点附近 -30 左右的核心启动子
TCA-element	94(+)	CCATCTTTTT	1	水杨酸响应顺式元件
TCCC-motif	1415(+) 1506(+)	TCTCCCT	2	光响应元件的一部分
TGA-element	1849(+)	AACGAC	1	生长素响应元件

2.3 启动子缺失体克隆及载体构建

为了明确启动子的核心功能区域,根据序列分析结果对获得的启动子片段进行不同程度的 5' 缺失。通过 PCR 扩增获得 4 个 5' 端不同长度缺失片段 B-1120 bp、C-588 bp、D-431 bp 和 E-337 bp 并分

别用这些片段成功替换了 pBI121 上的 CaMV35S 启动子,重组表达载体局部示意图如图 3 所示:所有载体均含有 TGA- element,启动子全长 A 及缺失体 B、C、D 依次呈现出 MYB 元件递减的关系,而缺失体 E 缺失了 CAT-box。

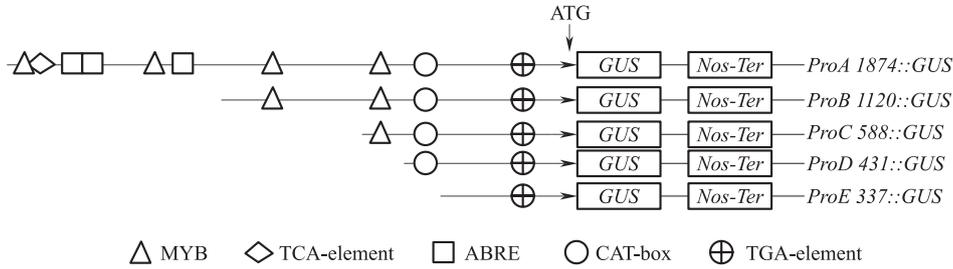


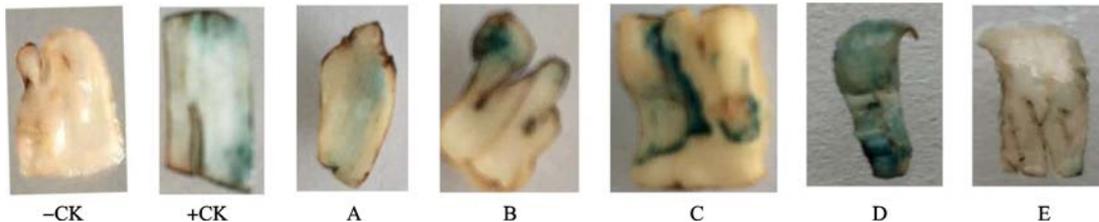
图3 *ScMOCI* 启动子 5' 端连续缺失片段融合 *GUS* 报告基因表达载体 *ProScMOCI::GUS* 示意图

Fig.3 Truncated constructs of *ScMOCI* promoter in fusion with *GUS* reporter *ProScMOCI::GUS*

2.4 启动子瞬时表达分析

将构建好的重组载体转化根癌农杆菌 GV3101 感受态细胞后,以 GV3101 空菌株菌液浸染为阴性对照(图 4-CK),含 pBI121 载体的菌液浸染为阳性对照(图 4+CK),对已构建好的含 *ScMOCI* 启动子全长及其缺失体的重组载体进行瞬时表达分析并进行 *GUS* 染色。-CK 没有显色,+CK 出现明显的蓝色,*ScMOCI* 启动子全长片段(图 4A)和包含 CAT-box 的 3 个缺失体(图 4B、C、D)浸染后的甘蔗嫩

叶中均呈现出不同程度的显色反应,且随着片段的变短(MYB 元件数量的递减),显色更明显,但不包含 CAT-box 缺失体 E 没有明显的显色反应。初步表明,所克隆到的 *ScMOCI* 启动子可驱动 *GUS* 基因在甘蔗幼嫩叶片中瞬时表达,其核心区域在启动子片段 D 长度区域附近也就是起始密码子 ATG 上游 350~500 bp 之间,CAT-box 在启动子功能发挥中扮演重要的角色,功能未知的 MYB 元件可能对 *ScMOCI* 启动子活性有抑制作用。



-CK: GV3101 空菌株为阴性对照;+CK: 转 pBI121 空载体阳性对照;A、B、C、D、E: 分别为转入启动子全长片段 A、缺失体 B、C、D、E 并瞬时表达的甘蔗嫩叶 *GUS* 染色结果

-CK: *GUS* staining results of sugarcane young leaves infected with agrobacterium liquid as a negative control, +CK: Positive control of *GUS* staining results with transgenic pBI121 empty vector, A, B, C, D, E are *GUS* staining results of sugarcane young leaves transfected into full length fragment A, deletion B, C, D and E of promoter and transiently expressed respectively

图4 启动子及缺失体驱动 *GUS* 在甘蔗嫩叶中瞬时表达染色结果

Fig.4 *GUS* reporter gene expression by transiently expressing truncated *ScMOCI* promoter in sugarcane young leaves

3 讨论

启动子根据转录模式可分成 3 大类:组成型启动子(Constitutive promoter)、诱导型启动子(Inducible promoter)和组织器官特异性启动子(Tissue or organ specific promoter)^[4]。植物组成型启动子在启动外源基因表达中具有高效、广谱和稳定性强等优点,但其驱动外源基因高效、持续表达可能造成资源浪费或植物生长受影响^[14-16],开发一些诱导型启动子和组织特异性启动子可很好避免上述现象。启动子功能分析可以精确定位基因的表达部位、发育阶段和调控机制,预测基因的功能,另外内

源启动子也是植物基因工程中表达载体的重要元件,根据不同目的需要各种不同类型的启动子驱动目的基因在转基因植物中定时、定位表达。因此启动子序列的功能研究对于阐明基因功能及植物基因工程都具有非常重要的意义。*ScMOCI* 属植物特有的 GRAS 家族的 VHIID 转录因子,该家族成员参与了植物侧枝形成、根辐射方向结构分布、光信号传导、植物激素赤霉素的信号传导和植株高度控制等多种重要的生理和发育过程^[2-4]。本研究从甘蔗品种 ROC22 中克隆到 *ScMOCI* 5' 上游 1874 bp 的启动子序列,通过生物信息学进行启动子顺式作用元件预测显示 *ScMOCI* 启动子中除包含大量 CAAT-

box、TATA-box 等启动子特征元件外,还包含大量与光反应有关的顺式作用元件和生长素、脱落酸、水杨酸等应答元件,由此可推测该启动子可能为诱导型启动子,可通过激素诱导 *ScMOC1* 表达,这与张吉贞^[17]、杜丽君^[18]的研究结果类似。另外,*ScMOC1* 启动子中还包含与分生组织表达有关的顺式调控元件 CAT-box,分蘖的发生与分生组织的形成密切相关,因此,该元件可能是参与 *ScMOC1* 调控分蘖的关键元件。这些结果均符合 GRAS 家族蛋白参与光信号传导、植物激素赤霉素信号传导和分蘖调控等多种重要的生理和发育过程等特点。

GUS 活性分析表明,*ScMOC1* 启动子可驱动 *GUS* 基因在甘蔗嫩叶中表达,初步证明我们所克隆的启动子具有活性。缺失分析表明 *ScMOC1* 启动子的核心区域在 ATG 上游 350~500 bp 之间,短于 350 bp 则没有活性,而随着序列长度增加,启动子活性逐渐减弱,说明该启动子较长序列中可能存在一些抑制元件。小麦 *MOC1* 启动子中 CAT-box 被破坏后转基因植株中检测不到 *GUS* 活性,说明小麦中 CAT-box 调控元件可能决定启动子的表达部位并对其活性有重要意义^[18]。本研究中,缺失体 -BCD 均包含 CAT-box 且均有活性,而缺失体 -E 刚好缺失了 CAT-box, *GUS* 染色结果表明其没有活性,因此推测甘蔗中 CAT-box 是其启动子活性和功能的关键元件;此外,随着片段的变短(MYB 元件数量的递减),*ScMOC1* 启动子活性逐渐增强,推测未知功能的 MYB 元件可能对 *ScMOC1* 活性有抑制作用。但实际是否如我们预测、该启动子是否具有组织特异性、是否受激素诱导以及与是否参与 *ScMOC1* 调控甘蔗分蘖等问题还有待进一步研究分析。

参考文献

- [1] 李晓君,武媛丽,张焱珍,杨本鹏,张树珍. 甘蔗 *ShSAP1* 基因的启动子克隆与序列分析. 中国农学通报, 2014, 30(12): 272-278
Li X J, Wu Y L, Zhang Y Z, Yang B P, Zhang S Z. Cloning and sequence analysis of *ShSAP1* promoter from sugarcane. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2014, 30(12): 272-278
- [2] Li X Y, Qian Q, Fu Z M, Wang Y H, Xiong G S, Zeng D L, Wang X Q, Liu X F, Teng S, Fujimoto Hiroshi, Yuan M, Da Luok, Bin H, Li J Y. Control of tillering in rice. Nature, 2003, 422(6932): 618
- [3] 涂田莉. 小麦分蘖相关基因 *TaMOC1* 的分离及功能分析. 泰安: 山东农业大学, 2017
Tu T L. Isolation and functional analysis of *TaMOC1* in *Triticum aestivum* L. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2017
- [4] 李旭娟,李纯佳,徐超华,刘洪博,吴转娣,林秀琴,陆鑫,毛钧,字秋艳,刘新龙. 甘蔗 *MOC1* 基因(*ScMOC1*)的克隆与表达分析. 植物遗传资源学报, 2017, 18(4): 734-746
Li X J, Li C J, Xu C H, Liu H B, Wu Z D, Lin X Q, Lu X, Mao J, Zi Q Y, Liu X L. Cloning and expression analysis of the *MOC1* gene (*ScMOC1*) in sugarcane (*Saccharum officinarum*). Journal of Plant Genetic Resources, 2017, 18(4): 734-746
- [5] 李田,孙景宽,刘京涛. 植物启动子研究进展. 生物技术通报, 2015, 31(2): 18-25
Li T, Sun J K, Liu J T. Research advances on plant promoter. Biotechnology Bulletin, 2015, 31(2): 18-25
- [6] 汤方,涂慧珍. 真核启动子研究进展. 林业工程学报, 2015, 29(2): 7-12
Tang F, Tu H Z. Research advances on eukaryotic promoter. Journal of Forestry Engineering, 2015, 29(2): 7-12
- [7] 张锦,刘新龙,李纯佳,刘洪博,朱建荣,李旭娟. 甘蔗启动子研究进展. 中国糖料, 2018(1): 53-56
Zhang J, Liu X L, Li C J, Liu H B, Zhu J R, Li X J. Research progress on sugarcane promoter. Sugar Crops of China, 2018(1): 53-56
- [8] 牛俊奇,王爱勤,黄静丽,朱惠,李杨瑞,杨丽涛. 甘蔗可溶性酸性转化酶(*SoSAlI*)基因的克隆及表达分析. 中国农业科学, 2013, 46(24): 5248-5260
Niu J Q, Wang A Q, Huang J L, Zhu H, Li Y R, Yang L T. Cloning and expression analysis of a soluble acid invertase gene (*SoSAlI*) of sugarcane. Scientia Agricultura Sinica, 2013, 46(24): 5248-5260
- [9] 牛俊奇,王爱勤,黄静丽,李杨瑞,杨丽涛. 甘蔗中性/碱性转化酶基因 *SoNINI* 的克隆和表达分析. 作物学报, 2014, 40(2): 253-263
Niu J Q, Wang A Q, Huang J L, Li Y R, Yang L T. Cloning and expression analysis of sugarcane alkaline/neutral invertase gene *SoNINI*. Acta Agronomica Sinica, 2014, 40(2): 253-263
- [10] 雷美华,叶冰莹,王冰梅,黄祖新,张华,许莉萍,陈由强,陈如凯. 甘蔗蔗糖合成酶基因的克隆. 应用与环境生物学报, 2008, 14(2): 177-179
Lei M H, Ye B Y, Wang B M, Huang Z X, Zhang H, Xu L P, Chen Y Q, Chen R K. Cloning of sucrose synthase gene from sugarcane (*Saccharum officinarum* L.). China Journal of applied Environment Biology, 2008, 14(2): 177-179
- [11] 周平,何炜,金光,高玉娜,叶冰莹,陈由强,陈如凯. 甘蔗 *SPS III* 基因组 DNA 及 5' 侧翼序列的克隆与分析. 农业生物技术学报, 2014, 22(1): 1-9
Zhou P, He W, Jin G, Gao Y N, Ye B Y, Chen Y Q, Chen R K. Cloning and sequence analysis of sucrose phosphate synthase genomic DNA and 5'-flanking sequence from sugarcane (*Saccharum* spp.). Journal of Agricultural Biotechnology, 2014, 22(1): 1-9
- [12] 吴自明,江安庆,张积森,叶冰莹,陈由强. 甘蔗 *ShSUT4* 基因及其 5' 侧翼序列的克隆与序列分析. 亚热带农业研究, 2012, 8(2): 126-130
Wu Z M, Jiang A Q, Zhang J S, Ye B Y, Chen Y Q. Cloning and sequence analysis of sucrose transporter 4 DNA and 5' flanking sequence from sugarcane. Subtropical Agriculture Research, 2012, 8(2): 126-130
- [13] 许莉萍. 一种提高农杆菌介导的甘蔗 *GUS* 瞬时表达率方法: 中国, CN201110435405. 2011-12-23

- Xu L P. An improved agrobacterium mediated method for transient expression rate of sugarcane *GUS*: China, CN201110435405. 2011-12-23
- [14] Li F, Han Y Y, Feng Y N, Xing S C, Zhao M R, Chen Y H, Wang W. Expression of wheat expansin driven by the *RD29* promoter in tobacco confers water-stress tolerance without impacting growth and development. *Journal of Biotechnology*, 2013, 163: 281-291
- [15] Pino M T, Skinner J S, Park E J, Jeknic Z, Hayes P M, Thomashow M F, Chen T H. Use of a stress inducible promoter to drive ectopic *AtCBF* expression improves potato freezing tolerance while minimizing negative effects on tuber yield. *Plant Biotechnology Journal*, 2007, 5: 591-604
- [16] 秦丽霞, 李静, 张换样, 李盛, 竹梦婕, 焦改丽, 吴慎杰. 棉花半乳糖基转移酶基因 *GhGalT1* 启动子的克隆及表达分析. 作物学报, 2018, 44 (2): 218-226
- Qin L X, Li J, Zhang H Y, Li S, Zhu M J, Jiao G L, Wu S J. Cloning and expression analysis of galactosyl transferase gene *GhGalT1* promoter in cotton. *Acta Agronomica Sinica*, 2018, 44 (2): 218-226
- [17] 张吉贞. 水稻 *MOC1* 基因启动子的克隆与诱导物的筛选. 儋州: 华南热带农业大学, 2005
- Zhang J Z. Clone of *MOC1* promoter and its inductive material selection in rice. Danzhou: South China University of Tropical Agriculture, 2005
- [18] 杜丽君. 小麦 *TaMOC1* 基因的启动子分析及 CRISPR-Cas9 突变体的获得. 泰安: 山东农业大学, 2018
- Du L J. Promoter analysis of *TaMOC1* gene and obtaining of the CRISPR-Cas9 mutants in *Triticum aestivum* L.. Tai'an: Shandong Agricultural University, 2018