

# 花生 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因启动子的克隆及功能分析

王合春<sup>1</sup>, 陈新利<sup>1</sup>, 隋炯明<sup>1</sup>, 毕英娜<sup>2</sup>, 王晶珊<sup>1</sup>, 乔利仙<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>青岛农业大学生命科学学院/山东省高校植物生物技术重点实验室, 青岛 266109; <sup>2</sup>威海恩特花木有限公司, 威海 264205)

**摘要:**植物  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶属于一种重要的植物病程相关蛋白(PR 蛋白), 容易受到激发子的诱导而积累。用 1.5 mmol/L 水杨酸(SA)对花生品种花育 20 号幼苗进行诱导处理 0.5、12、24、36、48 和 72 h 后, 提取 RNA 进行荧光定量检测  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因(*Ah-Glu*)的表达量。结果表明, 经诱导 24 h 后  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因的表达量达到最高, 是未经 SA 诱导的 1.8 倍。根据前期已克隆的花生  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因序列(GenBank JQ801335), 在其 5' 端设计 3 个嵌套的特异性引物扩增其上游启动子序列。以花育 20 号基因组 DNA 为模板, 利用 TAIL-PCR 方法, 扩增得到 973 bp 的花生  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因启动子片段, 在 NCBI 网站注册序列号为 GenBank KC290400, 并命名为 *Ah-Glu-Pro*。PLACE 和 PlantCARE 在线预测分析表明, *Ah-Glu-Pro* 序列中含有 TATA-box 和 CAAT-box 等核心元件, 还含有病原菌及水杨酸响应的顺式调控元件。根据 *Ah-Glu-Pro* 序列设计上下游引物, 采用普通 PCR 法从花育 20 号扩增得到 931 bp 的启动子序列, 命名为 *Ah-Glu-P*。将 *Ah-Glu-P* 取代 pCAMBIA1301 质粒中的 CaMV35S 启动子, 构建植物表达载体 pCAMBIA1301-*Ah-Glu-P*。通过农杆菌介导法将 pCAMBIA1301-*Ah-Glu-P* 转化洋葱表皮细胞, 经 5 mmol/L SA 诱导处理 48 h 后进行 GUS 染色。结果表明: 经 SA 诱导后的洋葱表皮细胞 GUS 组织化学染色显示为蓝色, 未经 SA 诱导的洋葱表皮细胞 GUS 组织化学染色未显示蓝色, 说明 *Ah-Glu-P* 是一个可被诱导的启动子, 可能含有对 SA 响应的顺式调控元件。

**关键词:**花生;  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因(*Ah-Glu*); 诱导型启动子; 染色体步移; 表达载体

## Cloning and Functional Analysis of the Promoter Region of $\beta$ -1,3-glucanase Gene in Peanut

WANG He-chun<sup>1</sup>, CHEN Xin-li<sup>1</sup>, SUI Jiong-ming<sup>1</sup>, BI Ying-na<sup>2</sup>, WANG Jing-shan<sup>1</sup>, QIAO Li-xian<sup>1</sup>

(<sup>1</sup>College of Life Science, Qingdao Agricultural University/Key Lab of Plant Biotechnology in Universities of Shandong Province, Qingdao 266109; <sup>2</sup>Ente Limited Garden Company of Weihai, Weihai 264205)

**Abstract:** Plant  $\beta$ -1,3-glucanase was one of the important pathogenesis-related proteins (PR-proteins), which could be accumulated when induced by elicitors. The seedlings of peanut cultivar Huayu 20 were sprayed with 1.5 mmol/L SA for 0.5 h, 12 h, 24 h, 36 h, 48 h, and 72 h. And then their total RNAs were extracted and expression level of  $\beta$ -1,3-glucanase was inspected by real-time PCR. Results showed that the expression amount of  $\beta$ -1,3-glucanase gene reached the highest after 24 h induced by SA, which was 1.8 times higher than the control that not induced by SA. In order to clone the promoter sequence of  $\beta$ -1,3-glucanase gene, three specific upstream primers were designed and synthesized according to peanut  $\beta$ -1,3-glucanase gene cDNA sequences (GenBank JQ801335). The PCR amplification were conducted using the genomic DNA of Huayu 20 as the template by TAIL-PCR method, and a 973 bp fragment was obtained and submitted in NCBI (GenBank KC290400), named by *Ah-Glu-Pro*. Promoter sequence analysis by PLACE and PlantCARE showed that the sequence contained some typical *cis*-elements, such as TATA box and CAAT box, and pathogen and SA *cis*-acting regulatory elements. A 931 bp sequence was obtained

收稿日期: 2013-01-15 修回日期: 2013-02-07 网络出版日期: 2013-08-09

URL: <http://www.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20130809.1121.006.html>

基金项目: 国家自然科学基金(31101178); 山东省中青年科学家奖励基金(BS2009NY028); 山东省自然科学基金(ZR2012CM014); 山东省自然科学基金青年基金(ZR2011CQ026)

第一作者研究方向为植物基因工程。E-mail: wanghechun0219@126.com

通信作者: 乔利仙, 研究方向为花生分子育种。E-mail: lxqiao73@163.com

and named *Ah-Glu-P*, using a pair of primers designed according to *Ah-Glu-Pro*. *Ah-Glu-P* then was inserted into pCAMBIA1301 replacing its CaMV35S promoter. The recombinant plasmid was named pCAMBIA1301-*Ah-Glu-P* and then transformed into onion epidermal cells by *Agrobacterium* -mediated transformation. GUS staining was conducted after the onion epidermal cells were induced by 5 mmol/L SA for 48 h. These results showed the onion epidermal cells appeared blue when induced by SA, while the control not induced by SA did not appear blue. The transient expression result showed that the *Ah-Glu-P* could be an inducible promoter and contain SA responsive element.

**Key words:** Peanut;  $\beta$ -1,3-glucanase gene (*Ah-Glu*); inducible promoter; genome walking; expression vector

植物受病原菌侵染会诱导产生多种防卫反应,尤其是产生各种水解酶及病程相关蛋白(PR蛋白), $\beta$ -1,3-葡聚糖酶是PR蛋白中重要的水解酶,在植物抵御真菌病害的防卫反应中发挥着重要作用<sup>[1]</sup>。 $\beta$ -1,3-葡聚糖是真菌细胞壁的重要结构成分,许多真菌的菌丝尖端 $\beta$ -1,3-葡聚糖暴露在表面,能够直接受到 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶的攻击<sup>[2]</sup>。体外抑菌试验表明, $\beta$ -1,3-葡聚糖酶对菌丝生长具有抑制作用<sup>[3]</sup>。 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶的同工酶在物理性质、酶活性和细胞内的位置各不相同。这些同工酶大体分为3种<sup>[4]</sup>,第1种为碱性同工酶,主要在植株的液泡中组成型表达并积累;第2种是酸性同工酶,正常植株中不存在,但可由病原菌和化学物质诱导产生,主要在细胞间隙表达积累;第3种主要以烟草中细胞外表达的酸性 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶(PR-Q)和番茄中细胞内表达的碱性 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶为代表<sup>[5]</sup>。

正常环境条件下,植物体内成熟的组织细胞中, $\beta$ -1,3-葡聚糖酶的含量较少,活性很低。但是, $\beta$ -1,3-葡聚糖酶可以被激发子诱导产生,如病原菌(病毒、类病毒、细菌和真菌)的侵染、真菌细胞壁组分以及一些化学试剂(如脱乙酰几丁质、水杨酸和某些盐溶液等)的处理等均可诱导 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶的产生和积累<sup>[6-8]</sup>。

J. M. Caehinero 等<sup>[9]</sup>对霍尔斯轴霜霉(*Plasmodium halgedii*)侵染的向日葵研究表明,侵染后向日葵中 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性明显升高,且在根部出现了多种 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶的同工酶,且接种前后的同工酶谱不同。R. P. Niedz 等<sup>[10]</sup>在蜜桔胚愈伤组织和悬浮细胞的组织培养中发现,通过改变培养基质的碳源就能够诱导产生高水平的 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶,活性达6周之长的培养组织显著地抑制了指状青霉(*Penicillium digitatum*,一种产后的病原真菌)的侵染。贺立红等<sup>[11]</sup>以湛秋48和粤油5号为试验材料,在荚果发育初期用茉莉酸甲酯(methyl jasmonate)处理,再进行干旱处理,并于干旱处理2周后接种黄曲霉菌,取成熟种子测定几丁质外切酶、几

丁质内切酶、 $\beta$ -1,3-葡聚糖苷酶和苯丙氨酸解氨酶(PAL, phenylalanine ammonia-lyase)活性。结果表明,MJ能诱导上述几种酶活性,从而增强花生种子抗黄曲霉的侵染能力。

花生生产过程中存在多种病害,常见病害如黑斑病、褐斑病、网斑病、锈病和黄曲霉病等,严重影响着花生的产量和品质<sup>[12-13]</sup>。本研究通过荧光定量PCR法检测 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶的表达量,分析水杨酸诱导后 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶的表达情况。同时,为探明花生 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因在抵御真菌性病害中所起的作用以及该基因启动子的驱动表达特性,从花生中克隆 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因的启动子序列,分析启动子序列中重要的顺式调控元件,通过农杆菌介导的遗传转化法转化洋葱表皮细胞,瞬时表达分析花生 $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因启动子的诱导启动功能。为今后从转录因子调控基因表达入手,通过调控实现花生内源 $\beta$ -1,3-葡聚糖基因的高效表达提供理论基础,同时为在花生遗传转化过程中特异诱导表达启动子的有效利用提供理论依据。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料及主要试剂

供试花生品种花育20号由青岛农业大学生命科学学院生物技术实验室保存;洋葱。大肠杆菌(*E. coli*) DH5 $\alpha$ 、根瘤农杆菌 EHA105 和 pCAMBIA1301 质粒均由青岛农业大学生命科学学院生物技术实验室保存;Xba I、Bgl II、pMD18-T 克隆载体、rTaq、T<sub>4</sub>连接酶、Genome Walking Kit 试剂盒和 PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit 试剂盒均购自 TaKaRa 公司;X-gluc、EZ-10 Spin 柱式 DNA 凝胶回收试剂盒和 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒购自上海生物工程公司;RNApure 超纯总 RNA 快速提取试剂盒购自艾德莱生物公司;水杨酸为国产分析纯。由 TaKaRa 公司完成 PCR 引物合成;由北京六合华大基因科技股份有限公司完成 DNA 序列测定。

## 1.2 方法

**1.2.1 水杨酸对花生幼叶的诱导处理** 水杨酸(SA, salicylic acid)用蒸馏水配制成终浓度为1.5 mmol/L,用1 mol/L NaOH将溶液pH值调至7.0并加入0.1%的Tween 20以增加药剂与喷雾叶片的粘附性。对照为清水并加入0.1%的Tween20。供试材料花育20号幼苗生长到3~4片叶时,喷雾SA至供试叶片的正反两面,直至整株叶片全部湿润,室温下处理0.5、12、24、36、48和72h后采收4片叶,液氮速冻后,-70℃保存备用。对照植株喷施含0.1% Tween 20的水溶液,试验重复2次。

**1.2.2 花生总RNA的提取和荧光定量PCR检测** 用RNApure超纯总RNA快速提取试剂盒提取花育20号叶片的RNA,计算 $A_{260}/A_{280}$ 值,并用1%琼脂糖凝胶电泳检测RNA的质量,-70℃保存备用。取4 μL RNA按照宝生物公司的PrimeScript™ 1st Strand cDNA Synthesis Kit说明,将样品及对照组的RNA反转录成cDNA。放入-20℃保存。由上海美吉生物公司使用上海睿安生物 SybrGreen qPCR Master Mix (2X)采用两步法在ABI 7500 FAST型荧光定量PCR仪上进行反应。其引物对 Ah-Glu-F:5'-CTTAT-GCTTCTCCAGATTGCT-3'; Ah-Glu-R:5'-GAGGAC-CTGTATGTTGGAATCA-3'。内参基因是花生持家基因 Actin,其引物对是 Actin-F:5'-GTGGCCGTACAAC-TGGTATYGT-3'; Actin-R:5'-ATGGATGGCTG-GAAGAGAACT-3'。扩增程序为:95℃预变性2 min;95℃变性10 s,60℃延伸40 s,40个循环,循环结束后,缓慢升至95℃,制备溶解曲线。每个反应设2个重复。相对表达量的计算参照K. J. Livak等<sup>[14]</sup>的 $2^{-\Delta\Delta Ct}$ 法。

**1.2.3 DNA提取** 采用CTAB法<sup>[15]</sup>提取花生叶片基因组DNA。

**1.2.4 Ah-Glu-Pro的克隆及序列分析** 根据花生β-1,3-葡聚糖酶基因cDNA 5'端序列,设计3个嵌套的特异性引物 SP1:5'-GCGACATGTGATTCTAGCAA-CAAG-3'、SP2:5'-GCTGGAAAATTGGAGTTCTGT-CAC-3'、SP3:5'-GAAGAGCAAAAGACGAACCTGG-3'为一套巢式引物,Genome Walking Kit试剂盒中的AP1~AP4为4个随机引物。以花育20号DNA为模板,PCR反应体系和程序参照Genome Walking Kit说明书。3轮PCR产物通过1%琼脂糖凝胶电泳检测,切下第3轮的特异性条带,回收试剂盒纯化回收,连接到pMD18-T克隆载体上,转化大肠杆菌DH5α,挑取阳性克隆测序,测序得到的结果与β-1,

3-葡聚糖酶基因cDNA 5'端序列拼接,得到的上游启动子序列命名为Ah-Glu-Pro。按照Ah-Glu-Pro测序结果分别在该片段两端设计合成2条引物,上游引物Glu-F:5'-TCTAGACGAGTTTGGAGTTCATTT-TATCTTT-3'(下画线表示XbaI酶切位点),下游引物Glu-R:5'-AGATCTTAACATAACAACGAGAGGT-GAAGCTG-3'(下画线表示BglII酶切位点),以花育20号DNA为模板,进行PCR扩增。反应程序:94℃预变性5 min;94℃变性40 s;56℃退火40 s;72℃延伸1 min;35个循环;72℃延伸10 min。1%琼脂糖凝胶电泳检测,SanPrep柱式DNA胶回收试剂盒纯化回收,进行TA克隆,转化大肠杆菌DH5α,对得到的重组质粒筛选并测序,命名为Ah-Glu-P。

**1.2.5 Ah-Glu-Pro序列分析** 利用DNAMAN软件对测序结果比对,利用植物顺式元件数据库PLACE (plant cis-acting regulatory DNA elements, www.dna.affrc.go.jp/PLACE/)<sup>[16]</sup>和数据库Plant-CARE (plant cis-acting regulatory element, http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/)<sup>[17]</sup>分析其可能的顺式作用元件。

## 1.3 表达载体的构建

测序正确的pMD18-T-Ah-Glu-P质粒经XbaI和BglII双酶切与经同样酶双酶切后的pCAMBIA1301大片段相连接,转化至大肠杆菌DH5α,选取阳性克隆,提取质粒,PCR及双酶切检测,正确的质粒命名为pCAMBIA1301-Ah-Glu-P,并将载体通过冻融法转化至农杆菌菌株EHA105中。

## 1.4 洋葱表皮细胞的遗传转化

无菌条件下,取洋葱的鳞茎,将其切成若干个1 cm<sup>2</sup>的小块,用镊子剥取洋葱的表皮,并用无菌水浸泡,无菌滤纸吸干表面的液体,铺在MS固体培养基上。28℃暗培养24 h后,将预培养后的洋葱表皮在农杆菌pCAMBIA1301-Ah-Glu-P(OD<sub>600</sub>=0.6~0.8)中浸泡15 min,无菌滤纸吸干表面的菌液,转入MS培养基上进行共培养,培养温度25℃,16 h光照/8 h黑暗,取出共培养3 d的洋葱表皮,浸泡在5 mmol/L SA中48 h后进行GUS染色。

## 1.5 GUS染色

取待检测的洋葱表皮于5 mL离心管中,加入GUS染色液(X-gluc 0.1 mol/L磷酸缓冲液pH7.0、1 mmol/L EDTA、5 mmol/L铁氰化钾、5 mmol/L亚铁氰化钾、Triton-100、N,N-二甲酰胺)浸没组织块,37℃下保温过夜,用70%乙醇脱色后取出观察染色结果。未经SA诱导的洋葱表皮亦作为对照进行

GUS 染色。

## 2 结果与分析

### 2.1 SA 处理下 *Ah-Glu* 的表达量

用 1.5 mmol/L SA 溶液处理花育 20 号幼叶,提取 RNA 后用实时荧光定量 PCR 检测 *Ah-Glu* 的表达情况(图 1),花生 *Ah-Glu* 基因扩增曲线呈规则的 S 形,基线平整、指数区明显,复孔间扩增曲线基本重

叠,*Ah-Glu* 基因的溶解曲线均显示单一的特异峰(图 1),说明扩增产物特异性高,无引物二聚体及非特异性扩增。图 2 显示,SA 处理 0.5 h 时 *Ah-Glu* 的表达量较对照组有小幅度的提高;处理 12 h 时 *Ah-Glu* 的表达量反而下降;处理 24 h 时 *Ah-Glu* 的表达量达到最大值,明显高于对照组;处理 36 h 时 *Ah-Glu* 的表达量又有所降低;随后的时间段内,*Ah-Glu* 呈现增减交替表达的情况。

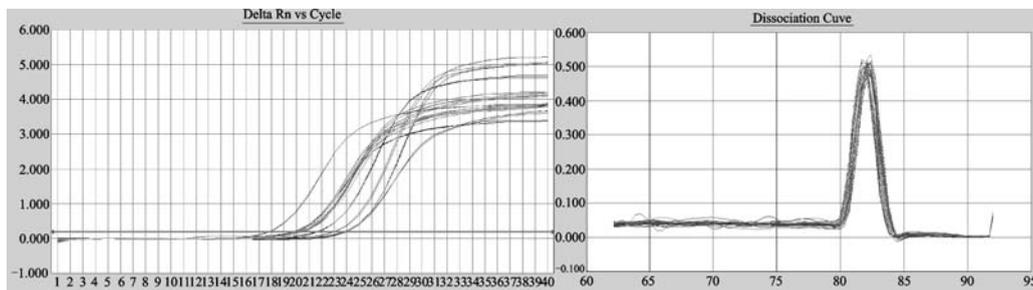


图 1 荧光定量 PCR 扩增曲线和溶解曲线

Fig. 1 Real-time quantitative PCR amplification curves of *Ah-Glu*

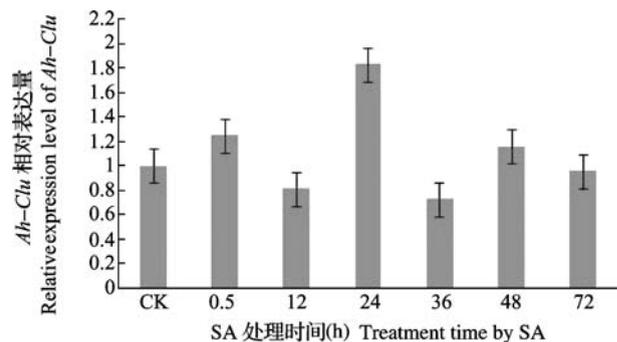


图 2 SA 处理下 *Ah-Glu* 的表达

Fig. 2 Expression of *Ah-Glu* induced by SA

### 2.2 启动子 *Ah-Glu-P* 的克隆

用 TAIL-PCR 方法,以花育 20 号基因组 DNA 为模板,以 SP3 和 AP1 为引物扩增出 1 条特异片段(图 3),SP3 与 AP2、AP3、AP4 组合均扩增出非特异性条带。扩增片段经回收测序后与  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因 cDNA 5' 端序列拼接,得到 *Ah-Glu-Pro* 序列(973 bp)并获得 GenBank 登录号: KC290400。根据 *Ah-Glu-Pro* 基因 ATG 上游已知近端序列,以 Glu-F 和 Glu-R 为引物进行普通 PCR 扩增,得到大约 900 bp 的目的片段,1% 琼脂糖凝胶电泳检测目的条带(图 4a),切胶回收,TA 克隆后转入大肠杆菌中,挑取阳性克隆,质粒 PCR 检测得到 900 bp 左右的目的片段,双酶切验证获得 900 bp 左右的目的片段及大于 2000 bp 的大片段(和载体大小相符)(图 4b),测序后获得不含 ATG 的启动子序列,大小为 931bp,命名为 *Ah-Glu-P*。

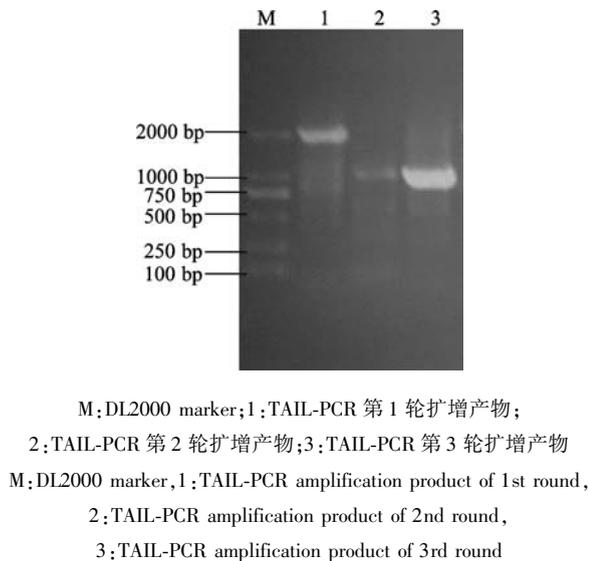
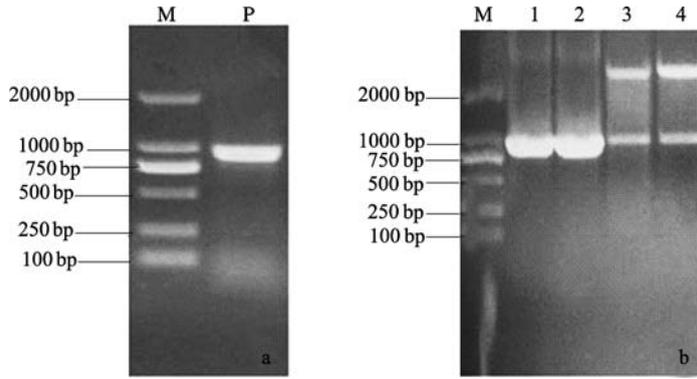


图 3 引物 SP3 和 AP1 的 3 轮 TAIL-PCR 扩增结果

Fig. 3 TAIL-PCR amplification result of primer SP3 and AP1 in three rounds

### 2.3 启动子 *Ah-Glu-P* 的生物学分析

对获得的 *Ah-Glu-P* 启动子序列进行分析。结果表明,*Ah-Glu-P* 启动子含有多种调控元件(图 5),典型调控元件有:CAAT-box(可能与转录起始频率有关<sup>[18]</sup>)和 TATA 盒(RNA 聚合酶 II 的结合位点<sup>[19-20]</sup>)。还有一些重要的与抗病反应有关作用元件,如 GT-1 motif(在病原菌诱导基因表达中起重要作用<sup>[21]</sup>)、GRWAAW(参与水杨酸诱导基因的表达<sup>[22]</sup>)、ACAGT(参与抗病反应,是 BELL 转录因子



a: *Ah-Glu-P* 的 PCR 扩增产物; b: pMD18-T-*Ah-Glu-P* 重组质粒 PCR 及双酶切鉴定; M: DL2000 marker; P: PCR 产物; 1, 2: PCR 扩增产物; 3, 4: *Xba* I 和 *Bgl* II 双酶切产物  
a: PCR amplification results of *Ah-Glu-P*, b: PCR and the double restriction enzyme digestion identification of pMD18-T-*Ah-Glu-P* recombinant plasmids, M: DL2000 marker, P: PCR amplification of *Ah-Glu-P*, 1, 2: Products of PCR of pMD18-T-*Ah-Glu-P*, 3, 4: Products of double digestion by *Xba* I and *Bgl* II

图 4 PCR 及重组质粒酶切鉴定

Fig. 4 PCR amplification and the identification of recombinant plasmids

结合位点<sup>[23]</sup>、W-box (WRKY 家族转录因子能特异地与 W-box 结合, 调控病程相关蛋白质的表达<sup>[24-25]</sup>)。GAAAAA、GATAAA、CTTTTT、TGAC 和 ACAGT 这些功能元件暗示了 *Ah-Glu-P* 在抗病反应中的作用。此外,

通过该预测程序还发现, 该启动子中还含有其他与光 (AAAACGTTTA、GACCTG 和 GTAAGA)、热 (GTAATTTTT) 应答有关的顺式作用元件, 以及 CTCC、CCTC 和 AACGGGCAG 等功能未知的元件。

```

-973  CGAGTTTGGGA  GTTCATTTTA  TCITTTGCCA  ATTTCAATTAT  TCAGGGCATA  AGATCGCATA
-931  ACCCATGGTG  Glu-F AAGTTCTGAT  CAAT-box GACATTTTACA  ACGAACTTGA  AAATAAAGAT  TGAAGTGAAA
-853  AATATTTTTT  TATTTTTTTT  W-box AGAAAAGTTG  GGAATTGAGA  AAGACGTGTA  AAATGAAAAT  GT-1 motif
-793  GAGGTGTGAG  TGGAGTGGCA  CGCTTTTACC  CTGACACACT  CCAACGGGCA  GCAATGTTGG  CAAT-box
-733  GTTTTTTTTT  TTTTTTGGCT  TTATTATGTG  TTGTTGGTGT  CTTCTCCTCG  CCCGCTATAC  CAAT-box
-673  ATTCAACACA  ATAAATAAAT  TAAATACTAA  TCATTTAGAA  ATAAAATTCT  ACAATAATTC  IATA-box
-613  AGGTAGAGTA  CAAT-box AATTCAAATT  CAGATGGACA  CAAAATTGTA  TCATTTGATC  AAGTACTCAA  CAAT-box
-553  AAAGATTCTA  ACTTCTAAGA  ATTTTATGCA  AGTAAACAT  TTATCAATT  AAACATATGA  CAAT-box
-493  TTAGTAGCCA  TGCTCTCAT  ATAACAGTTT  AATGTTATAT  TATTTTCATTC  TCATATTTAT  CAAT-box
-433  ATAAATTGTA  TCATTATGGA  ATAATTACTT  GAAC TAGTGA  GATAAAGCTG  AATTTGTTTT  IATA-box
-373  TTTTTTTTTA  TTATTATTAA  ATAAAGTTGC  GGTACATGT  AATTTTTTTA  GGTATATACT  IATA-box
-313  TTTTAAAATT  AGATTATACT  TCGTTTTTTT  TTTTTTATAA  TAATGTGAGG  AGATGTAAGA  IATA-box
-253  GAAGTAAAGT  AGAGTGTGTC  TGAGTGAAGT  TGAAGCTCTT  AAAAAAATC  ATCACACTGT  IATA-box
-193  AATGTGACTG  TGTTAGCTCC  GACAGAGAAA  GAGAAGGAGC  CGTCGTTACT  TTTTCTGCGC  CAAT-box
-133  ATCGGAACGT  TAGGTGAGGA  GGTCAAAGCT  TCAACAACGA  AGAAGAAGAA  GTAGAAGCTT  GRWAAW
-73  CAGCTTCAGC  TTCACCTCTC  GTTGTAGTT  ACAAGTAAAG  TTGGGGGCAG  AGCCGCAGAG  GRWAAW
-13  GCAGCTGCAC  ATG  Glu-R
    
```

花生 *Ah-Glu-Pro* 序列; 箭头表示引物序列及方向; 下划线部分示 CAAT-box、TATA-box 及推测的顺式调控元件序列并予以标注, 如: GT-1 motif、ACAGT 和 W-box 在病原菌诱导的基因表达中起作用; 矩形框内表示 GRWAAW (水杨酸诱导的基因表达有关); GAAAAA、GATAAA、CTTTTT、TGAC 和 ACAGT 与抗病反应有关

*Ah-Glu-Pro* sequences from peanut, Arrow showed the sequences and orientation of primer, CAAT box, TATA box and putative cis-acting elements were showed by underline. For example, GT-1 motif, ACAGT, and W box played roles in the gene expression induced by pathogen, Therectangle frame showed GRWAAW that was related to the gene expression induced by SA, GAAAAA, GATAAA, CTTTTT, TGAC, and ACAGT was related to the disease resistance response

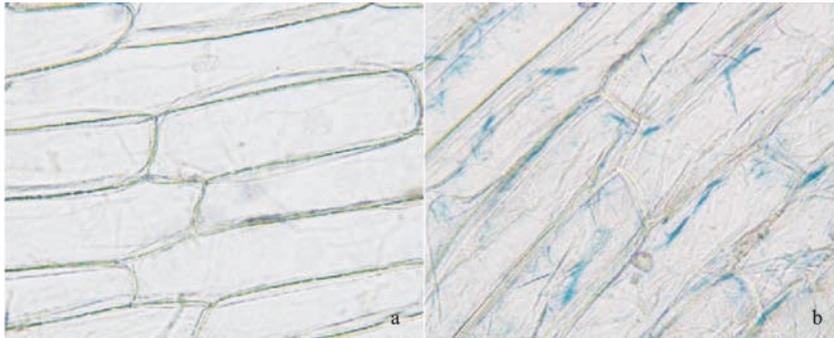
图 5 *Ah-Glu-Pro* 序列的生物信息学分析

Fig. 5 Bioinformatic analysis of DNA sequences of *Ah-Glu-Pro*

## 2.4 花生 *Ah-Glu-P* 瞬时表达活性分析

将  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因启动子片段替换 pCAMBIA1301 中驱动 *GUS* 基因表达的组成型启动子 CaMV35S, 获得 pCAMBIA1301*Ah-Glu-P* 片段(含 *GUS* 基因), 通过冻融法将质粒 pCAMBIA1301-*Ah-Glu-P* 转化根瘤农杆菌 EHA105。采用农杆菌介导法转化洋

葱表皮, 共培养 3 d 后, 经 5 mmol/L SA 诱导 48 h, 对照组未经 SA 诱导, 进行 GUS 染色分析。对照组洋葱表皮细胞不能着色(图 6a), 表明无 GUS 活性, 而 5 mmol/L SA 处理的洋葱表皮有明显的 GUS 活性表达(图 6b), 说明 *Ah-Glu-P* 是一个受诱导表达的诱导型启动子, 而且启动子中有 SA 响应元件。



a: 未处理的洋葱表皮细胞 GUS 染色; b: 5 mmol/L SA 处理的洋葱表皮细胞 GUS 染色

a: GUS staining result of onion epidermis cells without 5 mmol/L SA, b: GUS staining result of onion epidermis cells treated by 5 mmol/L SA

图 6 洋葱表皮细胞 GUS 染色结果

Fig. 6 The GUS staining result of onion epidermis cells

## 3 讨论

在植物抗病反应过程中, 抗病信号由内源信号分子从受侵染部位传导至整株植物, 引起相应的系统性抗性, 因而, 内源信号分子在植物抗病信号传导途径中起着重要作用<sup>[26]</sup>。水杨酸是一种小分子酚类化合物, 是获得系统性抗性(SAR, systemic acquired resistance)的重要信号分子<sup>[27]</sup>。现已明确, SA 可作为系统信号分子, 并在蛋白质磷酸化/去磷酸化机制调节下, 实现信号级联与传递, 最终通过调控转录因子(WRKY)转录而激活相关防卫基因表达<sup>[28-30]</sup>。已有相关报道, 高度非亲和互作水稻品系 C101LAC 的  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶活性在 SA 处理 8 h 后开始上升, 在 12 h 和 48 h 时均出现 1 个高峰, 分别是对照的 1.48 倍和 1.82 倍<sup>[31]</sup>。本研究花生幼叶中  $\beta$ -1,3 葡聚糖酶的表达量, 在 SA 诱导后 0~12 h、12~36 h 和 36~72 h 3 个时间段内, 均表现为先增高再降低的增减交替变化趋势, 并于 0.5 h、24 h 和 48 h 时各出现 1 个高峰, 分别是未经 SA 诱导的 1.2 倍、1.8 倍和 1.2 倍, 诱导后 24 h 的表达量达到最高。不同基因被诱导表达的特点不尽相同, 所以对花生  $\beta$ -1,3 葡聚糖酶诱导表达的特点仍需进一步研究确认。

本研究利用 TAIL-PCR 和普通 PCR 方法, 首次在花生中克隆了  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因启动子序列

*Ah-Glu-P*, 并将其与 *GUS* 基因相连构建了植物表达载体, 采用农杆菌介导法转化洋葱表皮细胞, 选用 5.0 mmol/L SA 进行诱导, 可以驱动转基因洋葱表皮细胞 *GUS* 基因的表达, 说明 *Ah-Glu-P* 是一个可被 SA 诱导的启动子。启动子驱动基因表达需要多个不同的作用元件, 这些元件的种类、数量及彼此之间的顺序与距离都可能影响基因的转录程度。本研究利用 PLACE 和 PlantCARE 在线预测了该启动子中重要的顺式调控元件, 后续研究将构建该启动子的系列缺失序列, 分析不同缺失启动子片段诱导表达活性的强弱, 确定启动子序列中重要的顺式调控元件, 为在花生遗传转化过程中特异诱导表达启动子的有效利用提供理论依据。

## 参考文献

- [1] Boller T. Hydrolytic enzymes in plant disease resistance [M]// Kosuge T, Nester E W. Plant-microbe interaction. New York: Macmillan, 1985, 12: 385-413
- [2] Selitrennikoff C P. Antifungal proteins [J]. Appl Environ Microbiol, 2001, 67: 2883-2894
- [3] Kim Y J, Hwang B K. Isolation of a basic 34 kD  $\beta$ -1,3-glucanase with inhibitory activity against *Phytophthora capsici* from pepper stems [J]. Physiol Mol Plant Pathol, 1997, 50: 103-115
- [4] Ward E R, Payne G B, Moyer M B, et al. Differential regulation of  $\beta$ -1,3-glucanase messenger RNAs in response to pathogen infection [J]. Plant Physiol, 1991, 96: 390-397
- [5] Payne G, Ward E, Gaffney T, et al. Evidence for a third structural class of  $\beta$ -1,3-glucanase in tobacco [J]. Plant Mol Biol, 1990, 15: 797-808
- [6] 蒋选利, 李振岐, 康振生.  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶与植物的抗病性

- [J]. 西北农业学报, 2005, 14(4): 135-139
- [7] Munch-Garhoff S, Neuhaus J M, Boller T, et al. Expression of  $\beta$ -1, 3-glucanase and chitinase in healthy, stem-rust-affected and elicitor-treated near-isogenic wheat lines showing Sr5- or Sr24-specified race-specific rust resistance[J]. *Planta*, 1997, 201: 235-244
- [8] Zemanek A B, Ko T S, Thimmapuram J. Changes in  $\beta$ -1, 3-glucanase mRNA in peach in response to treatment with pathogen culture filtrates, wounding and other elicitors[J]. *Plant Physiol*, 2002, 159: 877-889
- [9] Caehinero J M, Cabello F, Jorin J, et al. Induction of different chitinase and beta-1, 3-glucanase isoenzymes in sunflower (*Helianthus annuus* L.) seedlings in response to infection by *Plasmodium halstedii*[J]. *Eur J Plant Pathol*, 1996, 102: 401-405
- [10] Niedz R P, Doostdar H, Mc-Collum T G. Plant defensive proteins and disease resistance in citrus[J]. *Proc Florida State Hort Soc*, 1995, 107: 79-82
- [11] 贺立红, 宾金华. 花生采前茉莉酸甲酯处理对成熟种子黄曲霉抗性的影响[J]. *河南农业科学*, 2006(8): 51-55
- [12] 孙大容. 花生育种学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1998: 34-37
- [13] 乔利仙, 刘文平, 王晶珊. 网斑病菌侵染对花生几丁质酶诱导的研究[J]. *花生学报*, 2010, 39(1): 24-27
- [14] Livak K J, Schmittgen T D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the  $2^{-\Delta\Delta C_T}$  Method[J]. *Methods*, 2001: 402-408
- [15] Clark M S, 顾红雅, 瞿礼嘉. 植物分子生物学试验手册[M]. 北京: 高等教育出版社, 1998: 4-11
- [16] Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, et al. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database [J]. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27: 297-300
- [17] Lescot M, Déhais P, Thijs G, et al. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences[J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30: 325-327
- [18] 李杰, 张福城, 王文泉, 等. 高等植物启动子的研究进展[J]. *生物技术通讯*, 2006, 17(4): 685-688
- [19] Joshi C P. An inspection of the domain between putative TATA box and translation start site in 79 plant genes[J]. *Nucleic Acids Res*, 1987, 15: 6643-6653
- [20] Butler J E, Kadonaga J T. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene expression[J]. *Gene Dev*, 2002, 16: 2583-2592
- [21] Park H C, Kim M L, Kang Y H, et al. Pathogen- and NaCl-induced expression of the SCaM-4 promoter is mediated in part by a GT-1 box that interacts with a GT-1-like transcription factor[J]. *Plant Physiol*, 2004, 135: 2150-2161
- [22] Buchel A S, Brederode F T, Bol J F, et al. Mutation of GT-1 binding sites in the Pr-1A promoter influences the level of inducible gene expression in vivo[J]. *Plant Mol Biol*, 1999, 40: 387-396
- [23] Luo H, Song F, Goodman R M, et al. Up-regulation of *OsBIHDI*, a rice gene encoding BELL homeodomain transcriptional factor, in disease resistance responses[J]. *Plant Biol*, 2005, 7: 459-468
- [24] Laloi C, Mestres-Ortega D, Marco Y, et al. The *Arabidopsis* cytosolic thioredoxin *h5* gene induction by oxidative stress and its W-box-mediated response to pathogen elicitor[J]. *Plant Physiol*, 2004, 134: 1006-1016
- [25] Eulgem T, Rushton P J, Robatzek S, et al. The WRKY superfamily of plant transcription factors [J]. *Trends Plant Sci*, 2000, 5: 199-206
- [26] 尹辉, 李丹, 张毅, 等. 植物基因启动子的克隆方法及其应用[J]. *分子植物育种*, 2006, 4(3): 85-91
- [27] 贾燕涛. 植物抗病信号转导途径[J]. *植物学通报*, 2003, 20(5): 602-608
- [28] Ryals J, Uknes S, Ward E. Systemic acquired resistance [J]. *Plant Physiol*, 1994, 104: 1109-1112
- [29] Li J, Brader G, Palva T. The WRKY70 transcription factor: A node of convergence for jasmonate-mediated and salicylate-mediated signals in plant defense[J]. *Plant Cell*, 2004, 16: 319-331
- [30] 王磊, 高晓清, 朱冬华, 等. 植物 WRKY 转录因子家族基因抗病相关功能的研究进展[J]. *植物遗传资源学报*, 2011, 12(1): 80-85
- [31] 张智慧, 聂燕芳, 何磊, 等. 外源水杨酸诱导水稻相关防御酶活性及内源水杨酸含量的变化[J]. *华中农业大学学报*, 2010, 29(5): 541-545

## 欢迎订阅 2014 年《草业科学》

《草业科学》是由中国草学会和兰州大学草地农业科技学院共同主办的综合性科技期刊。该刊为中文核心期刊、中国科技核心期刊和中国农业核心期刊,是《中国核心期刊(遴选)数据库》、中国科学期刊文献数据库、英国 CABI 等数据库的固定源期刊。

本刊主要报道草业科学领域最新基础研究与技术研究成果和国内外草业科技政策动态,结合草业科学学科发展和科技期刊的定位,目前主要设有专论、前植物生产层、草人诗记、植物生产层、动物生产层、后生物生产层、基层园地、业界信息等栏目,不仅为高校、科研单位的师生提供交流平台,同时为基层科技人员的成果交流创造机会。另外,本刊广告服务项目范围为畜牧机械、草种、化学药剂、仪器设备以及科研机构、重点实验室、高科技农业企业的形象广告等。

月刊,大 16 开本,亚芬纸印刷,彩色封面覆膜,国内外公开发售,邮发代号 54-51,每期定价 12 元,全年 144 元。全国各地邮局均可订阅,也可直接与编辑部联系订阅。

地址:(730020)兰州市城关区嘉峪关西路 768 号《草业科学》编辑部

电话:0931-8912486 传真:0931-8912486

E-mail:cykx@lzu.edu.cn

网址:http://cykx.lzu.edu.cn