

# 植物启动子研究进展

雒雅婧<sup>1</sup>, 李杰<sup>1</sup>, 张爽<sup>1,2</sup>, 杜克久<sup>1,2</sup>

(1. 河北农业大学 林学院,河北 保定 071000;2. 河北农业大学 林学院,河北林木种质资源与森林保护重点实验室,河北 保定 071000)

**摘要:**植物启动子是植物基因转录所需的重要调控元件。现结合近几年对启动子的相关研究,从启动子的结构及其功能、分类、克隆和功能分析方法等方面对其进行概述。重点归纳了植物组织特异性启动子的分类及其近期研究应用进展,并提出了植物启动子未来的研究重点。

**关键词:**植物启动子;组织特异性启动子;克隆方法

**中图分类号:**Q 943.2   **文献标识码:**A   **文章编号:**1001—0009(2015)22—0186—04

随着分子生物学等学科理论及技术的日益发展,基因工程广泛应用于各行业中,而启动子作为转基因中重要的顺式调控元件起到了至关重要的作用。启动子是位于基因上游的5'端侧翼区域且能够与RNA聚合酶及一些反式作用因子识别与结合的一段特异的DNA序列<sup>[1~5]</sup>。启动子是基因转录的调控中心,对启动子的深入研究不仅有利于掌握控制基因转录模式以及调控机制,还有助于调控外源基因的表达。

## 1 启动子的内部结构

启动子区域分核心启动子区与上游启动子区2个部分。核心启动子区又称为近端启动子区,是指位于距离转录起点35 bp左右区域范围。此区域包含一些重要的功能元件,能够准确的定位转录起点及方向,是基因调控的关键基础<sup>[6]</sup>。该部分主要包括转录因子TFIIB识别位点(BRE)、起始因子(Inr)、TATA-box和下游启动子元件(DPE)<sup>[6~7]</sup>。上游启动子区又称远端启动子区,是指位于核心启动子区距其转录起始位点几百至上千个核苷酸不等的上游。该部分主要包含了与下游基因的时空表达相关调控有关的调控元件,如CAAT-box、G-box等<sup>[6,8~9]</sup>。

### 1.1 TATA-box

TATA-box又称Goldberg-Hogness框,是富含AT的保守序列区域,其保守序列为TCACTATATATAG,即

**第一作者简介:**雒雅婧(1991-),女,硕士研究生,研究方向为抗虫基因研究工程。E-mail:1193159827@qq.com。

**责任作者:**张爽(1976-),女,副教授,研究方向为林木抗虫基因工程研究。E-mail:zhshsuqq@126.com。

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31000305);河北农业大学林学学科创新基金资助项目(LXXXK2014-1);河北省教育厅资助项目(QN2015182)。

**收稿日期:**2015—08—13

TATAAA序列,一般位于转录起始位点上游(-32±7)个核苷酸附近<sup>[10~11]</sup>。TATA-box是RNA聚合酶II识别的位点,也是一些反式作用因子与DNA相互作用的位点之一。TATA-box没有方向性,能决定转录起始位点并指导起始前复合物的形成<sup>[12~14]</sup>。

### 1.2 起始因子(Inr)

起始因子是另一种类型的植物基因启动子核心结构,能够与转录的起始位点相互重叠<sup>[15]</sup>。其功能与TATA-box相似,能够指导转录起始前复合物的装配并决定转录起始位点以及调节上游激活蛋白的活性<sup>[13]</sup>,因此起始因子在不含有TATA-box序列的启动子中能够行使功能。起始因子与TATA-box之间的距离对基因的转录有着至关重要的作用,并且二者之间某些特殊的碱基能够影响到转录过程<sup>[11~15]</sup>。

### 1.3 CAAT-box

CAAT-box一般位于转录起点-75 bp左右,能够决定转录起始频率和转录强度,可以激活正反2个转录方向,与顺式调控元件有着协同作用<sup>[11~16]</sup>。

## 2 启动子类型

根据启动子的作用方式可分为组成型启动子、诱导型启动子和组织特异性启动子3种类型<sup>[4~5]</sup>。

### 2.1 组成型启动子

组成型启动子(constitutive promoter)一般在植物各部位都可以表达,使结构基因的表达大体恒定在一定的水平上,不受时空限制和物质的诱导<sup>[17]</sup>。如花椰菜花叶病毒35S启动子(CaMV 35S promoter)、肌动蛋白启动子(Actin promoter)、玉米泛素启动子(Ubiquitin promoter)、章鱼碱合酶基因OSC启动子和胭脂碱合酶基因NOS启动子等。花椰菜花叶病毒35S启动子(CaMV35S promoter)是目前广泛应用的组成型启动子,其具有启动活性强、表达量高等特点,在双子叶植物中应用具有显

著效果<sup>[18~20]</sup>。

## 2.2 诱导型启动子

诱导型启动子(inducible promoter)是指在受到外界因素诱导刺激下从而提高基因转录水平的启动子。因此,可根据诱导因子的不同分为光诱导型启动子、温度诱导型启动子、创伤诱导型启动子、激素诱导型启动子、真菌和共生菌诱导型启动子。该类启动子可以根据需要通过诱导信号来调控基因在特定的部位、时期、环境下表达,可以快速有效的调控转录基因的开关,从而提高转录速率<sup>[21~24]</sup>。

## 2.3 组织特异性启动子

组织特异性启动子能够调控外源基因在特定的组织或器官中进行表达,并且通常可以表现出发育调节的特性,故又被称为器官特异性启动子。该启动子可以启动特定部位受体的外源基因的表达且提高区域表达量,避免了植物体内营养不必要的浪费。目前在植物的根、茎、叶、花、果实、种子等组织器官中均获得了组织特异性启动子。

**2.3.1 根特异性启动子** 根是植物不可缺少的进行吸收水分及营养物质的主要器官。而对根特异性启动子的研究可调控植物的高渗耐受性、植物修复及根际分泌等功能<sup>[25~28]</sup>。现今已经研究出多种根特异性启动子并已广泛应用于生产中。关淑艳<sup>[26]</sup>从玉米基因组DNA中扩增出1 846 bp的ZmGLU1P序列具有根部特异性启动子的功能。姚秋林等<sup>[27]</sup>从MH63的基因组DNA中扩增出长度为1 950 bp上游启动子P<sub>12</sub>,并证明其具有根特异性和时间差异性,可用于根特异性表达和根作用相关基因的研究。李志邈等<sup>[28]</sup>研究表明在LeGRP2基因上游1 959 bp的调控序列具有较强的表达活性,并且可在拟南芥的根部特异表达。赵红玉等<sup>[29]</sup>利用GUS活性检测得出的OsO4g24469基因上游启动子能够调控目的基因在水稻根尖表达,证明其具有较强的组织特异性。

**2.3.2 种子特异性启动子** 种子是植物营养的积累,并且是主要粮食作物和油料作物的主要食用部位。因此,加强对种子特异性启动子的研究和应用,能够有效的改良农作物品质。而对于种子特异性启动子的研究有助于调控外源基因的表达,利于表达产物的分离。周佳佳等<sup>[2]</sup>从棉花种子克隆出的D34启动子,含有启动子的基本元件TATA框、CAAT框和种子特异性启动子元件E-box、G-box、B-box、AACAA基序等。魏雯雯等<sup>[30]</sup>从“吉农17”大豆基因组中分离得到长度约为1 268 bp大豆种皮特异性启动子片段SCSP,并证实该片段具有在种皮能够强烈表达。付永平等<sup>[31]</sup>从大豆基因DNA中分离的种子启动子7<sub>a</sub>序列长度约为1 382 bp,并通过启动GUS基因在烟草中的表达,证明了其具有种子特异性。房孝

良等<sup>[32]</sup>用水稻品种“中花11”的基因组DNA为模板,获得了长度为1 400 bp左右的OsESP1。并通过组织化学染色法,初步证明了OsESP1具有水稻种胚特异性。

**2.3.3 茎特异性启动子** 茎是植物的支撑骨架,是营养合成及运输的通道,也是植物进行光合作用的重要部位。茎特异性启动子按其部位不同又分为韧皮部特异表达启动子、木质部特异表达启动子和块茎特异表达启动子<sup>[33]</sup>。1)韧皮部特异表达启动子。韧皮部是植物维管组织中负责将植物体内光合产物及有机养料从叶运输到其它组织器官,从而成为许多植物病虫害所重点侵害的部位。因此,加强对韧皮部特异启动子结构和功能的研究可以为植物的抗病、抗虫基因工程提供高效的启动元件<sup>[34]</sup>。罗晓丽等<sup>[35]</sup>研究表明dENP启动子能够驱动的外源基因在棉花韧皮部中高效表达,从而可用于棉花的抗病、抗蚜虫等转基因研究。许兰珍等<sup>[36]</sup>通过试验构建出GRP启动子,启动子活性较强,在柑橘韧皮部中能够高效表达,有望应用于柑橘抗黄龙病的基因工程育种中。贺郭等<sup>[37]</sup>通过试验表明杨树NAC068基因启动子能够调控次生维管组织中外源基因的特异表达,从而可用于维管组织中有目的的调控外源基因的表达。刘玲玲等<sup>[38]</sup>通过GFP在烟草维管组织中能够瞬时表达,表明BSP具有维管组织特异性。2)木质部特异表达启动子。木质部是维管植物的运输组织,是将根吸收的水分及无机离子向上运输的通道,并且具有支持植物体的作用。目前已经发现并对其进行功能验证的木质部特异性启动子有美洲山杨树的COMT基因启动子<sup>[39]</sup>,分别从意大利214杨、加杨、毛白杨中分离的YCesAP、JCesAP和MDCesAP等启动子<sup>[40~43]</sup>。3)块茎特异表达启动子。陈国梁等<sup>[44]</sup>研究得出patatin基因启动子及GBSS启动子将作为马铃薯品质改良的基因工程研究中的一种重要的顺式作用元件。杨加伟等<sup>[45]</sup>从马铃薯的基因组中扩增得到了长约1 019 bp的启动子片段,并经序列分析表明该片段含有典型的启动子元件,如TATA-box,以及一些组织特异性的相关响应元件,具有组织特异性启动子的特征。

**2.3.4 果实特异性启动子** 通过对果实启动子的研究来调控外源基因在果实中的高效表达,从而改良果实性状品质已成为当前基因工程的研究热点。目前果实启动子的研究报道相对较多,如番茄PG启动子、2A11启动子、E4/E8启动子,番茄和桃ACO1启动子等<sup>[25,46]</sup>。毛娟等<sup>[47]</sup>研究表明,甜瓜CmACO1启动子能够驱动GUS基因在转基因甜瓜的花药和成熟果果皮中特异表达,具有组织特异性。

## 3 启动子克隆方法

在植物基因工程中,由于启动子对外源基因的表达有重要的调控作用,所以构建相应的表达载体是精确表

达外源基因的重要基础,获得适宜的启动子是研究基因表达的重中之重。不同植物基因组的组成及其复杂程度不同,启动子的克隆方法也不尽相同。目前,启动子克隆方法大体可分为利用基因组文库筛选启动子、利用启动子探针质粒载体筛选启动子、利用启动子捕获方法分离和鉴别启动子和利用 PCR 技术克隆启动子等<sup>[48-49]</sup>。

### 3.1 利用基因组文库筛选启动子

基因组文库筛选启动子是应用较早的一种克隆启动子方法,但此方法有需要构建质量高的基因组文库和用同位素标记探针,工作量大,操作复杂,所需时间长,并且需要已知基因部分序列等缺点,故较少应用<sup>[50]</sup>。

### 3.2 利用启动子探针质粒载体筛选启动子

启动子探针载体筛选启动子包括检测单元和转化单元 2 个部分,是目前常用的分离基因启动子的工具型载体。它利用缺失启动子的产物所易检测的报告基因系统,通过构建启动子探针的质粒载体来克隆具有启动子功能的 DNA 片段。此方法无需知道具体的基因序列,能够随机筛选启动子,无需设计引物,从而获得大量的启动子片段<sup>[3,51]</sup>。

### 3.3 利用启动子捕获方法分离和鉴别启动子

随着基因标记技术的发展,近年来兴起的一种新的克隆启动子的方法——启动子捕获(promoter trap)技术,此技术类似于利用报告基因筛选启动子<sup>[52]</sup>。

### 3.4 利用 PCR 技术克隆启动子

利用 PCR 扩增来克隆启动子,操作快速简便,是近年来被较多应用的启动子克隆方法。由于 PCR 反应的模板以及条件的不同,通过对 PCR 反应条件改良又可衍生出不同的方法,如环状 TALL-PCR、PCR、接头介导 PCR 和反向 PCR 等<sup>[53-54]</sup>。

## 4 启动子功能分析方法

启动子有效的调控着基因的转录环节,对外源基因的表达有着至关重要的作用,因此加强对启动子功能序列的分析具有十分重要的作用。随着基因工程技术飞速发展,对启动子的本质有效的分析,从而有效的选择利用启动子成为关键。启动子的功能分析大体分为生物信息学分析法和试验分析法 2 种。前者主要利用生物信息学对启动子进行初步预测分析启动子序列<sup>[55-58]</sup>;后者主要通过试验研究启动子内部的顺式元件及其对应功能,主要包括瞬间表达分析、转化分析法、点突变分析<sup>[59]</sup>、酵母单杂交分析<sup>[60]</sup>、凝胶阻滞分析和 RNA 干涉技术、染色体免疫共沉淀法等<sup>[61]</sup>。

随着转基因技术日趋成熟,启动子作为调控外源基因准确表达的钥匙逐渐成为当今研究的热点。组成型启动子虽然常被应用于植物基因工程中,但由于组成型启动子长期高效的在植物所有组织中调控基因表达在一定程度上造成了植物营养浪费并阻遏植物生长。因

此对组织特异性启动子及诱导型启动子的研究便成为解决问题的关键。目前对这 2 种类型启动子的研究大多处于启动子的发掘与功能验证阶段,加强对启动子的克隆和顺式作用元件具体序列及其功能的研究成为重中之重,以便早日获得强势启动子应用于基因工程中。

## 参考文献

- [1] 孙芳芳,宋洪元.植物诱导型启动子研究进展[J].南方园艺,2014,25(2):51-56.
- [2] 周佳佳,孙觅真,张素青,等.棉花种子特异性启动子的克隆及序列分析[J].山东农业科学,2014,46(6):6-10.
- [3] 于文静,王玉富,邱财生,等.韧皮部特异性启动子研究概况[J].中国麻业科学,2010,32(2):116-122.
- [4] 李田,孙景宽,刘京涛.植物启动子研究进展[J].生物技术通报,2015,31(2):18-25.
- [5] 文添龙,刘雪梅,冀亚萍,等.高等植物胁迫诱导型启动子的研究进展[J].西北植物学报,2014,34(1):206-214.
- [6] SMALE S T,KADONAGA J T. The RNA polymerase II core promoter[J]. Annual Review of Biochemistry,2003,72:449-479.
- [7] BENFEY P N,REN L,CHUA N H. Tissue-specific expression from CaMV 35S enhancer subdomains in early stages of plant development[J]. EMBOJ,1990,9(6):1677-1684.
- [8] SHAHMURADOV I A,GAMMERMAN A J,HANCOCK J M,et al. PlantProm:a database of plant promoter sequences[J]. Nucleic Acids Research,2003,31:114-119.
- [9] 李峥.山核桃 CcLFFY 基因启动子的克隆及功能分析[D].临安:浙江农林大学,2012.
- [10] JOSHI C P. An inspection of the domain between putative TATA-box and translation start site in 79 plant genes[J]. Nucleic Acids Research,1987,15(16):6643-6653.
- [11] 李一醜,王金发.高等植物启动子研究进展[J].植物学通报,1998,15(增刊):1-6.
- [12] 张春晓,王文祺,蒋湘宁,等.植物基因启动子研究进展[J].遗传学报,2004,31(12):1455-1464.
- [13] 胡廷章,罗凯,甘丽萍,等.植物基因启动子的类型及其应用[J].湖北农业科学,2007,1(46):149-151.
- [14] 李吉涛,郭建春.种子特异性启动子的研究进展[J].安徽农业科学,2008,36(4):1382-1385.
- [15] MICHEAL CAREY S T S. Transcriptional regulation in eukaryote concepts,strategiesand techniques[M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press,2001.
- [16] 唐晓凤.菊花泛素延伸蛋白基因启动子处优护的克隆和功能初探[D].雅安:四川农业大学,2009.
- [17] DUTT M,ANANTHAKRISHNAN G,JAROMIN M K,et al. Evaluation of four phloem-specific promoters in vegetative tissues of transgenic citrus plants[J]. Tree Physiol,2012,32(1):83-93.
- [18] 张龙,黄真池,欧阳乐军,等.植物人工启动子研究进展[J].广东农业科学,2014(6):150-153.
- [19] 尹涛,张上隆,刘敬梅,等.果实特异性启动子研究现状及其应用[J].农业生物技术学报,2009,17(2):355-360.
- [20] 魏晶,毛伟华,林拥军,等.1 个新水稻组成型启动子的克隆与功能鉴定[J].华中农业大学学报,2012,2(31):139-146.
- [21] 董浩,赵铁君,李红民,等.生菜 *rbcS* 基因启动子序列的克隆与分析[J].华北农学报,2013,28(1):88-92.
- [22] 王志新,赵琳,李文滨,等.植物诱导型启动子的研究进展[J].大豆科

- 技,2011(3):5-9.
- [23] 王旭静,李为民,唐巧玲,等.中棉(*Gossypium arboreum*)光诱导基因Gacab启动子在转基因烟草中的功能缺失分析[J].作物学报,2009,35(6):1006-1012.
- [24] 魏桂民,张金文,王蒂,等.马铃薯*Sgtl*基因启动子的结构及功能分析[J].中国生物化学与分子生物学报,2013,29(10):969-977.
- [25] 贺红霞,陈亮,林春晶,等.组织特异性启动子在作物基因工程中的研究进展[J].中国农学通报,2014,30(9):225-231.
- [26] 关淑艳.玉米根部特异性启动子的克隆及功能分析[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2011,39(5):147-153.
- [27] 姚秋林,林拥军.一个水稻根时空差异表达启动子的克隆及功能分析[J].农业生物技术学报,2011,19(2):214-220.
- [28] 李志邈,杨悦俭,杨飞,等.番茄根特异表达基因LeGRP2启动子的克隆及其在拟南芥的表达分析[J].中国农业科学,2010,43(9):1877-1882.
- [29] 赵红玉,徐磊,魏溪涓,等.一个新水稻根尖特异表达启动子的分离与鉴定[J].中国水稻科学,2014,28(4):351-357.
- [30] 魏雯雯,王丕武,付永平,等.大豆种皮特异性启动子的克隆及功能分析[J].大豆科学,2010,29(3):390-393.
- [31] 付永平,周海涛,王丕武,等.大豆种子特异性启动子的克隆及功能分析[J].西北农林科技大学学报(自然科学版),2009,37(12):105-118.
- [32] 房孝良,刘炜,安静,等.水稻种胚特异性启动子OsESP1的克隆及其表达特性[J].作物学报,2011,37(10):1904-1909.
- [33] 宋扬,周军会,张永强,等.植物组织特异性启动子研究[J].生物技术通报,2007,6(5):21-24.
- [34] 胡桂兵,张上隆,徐昌杰,等.笋瓜韧皮部特异性启动子的克隆分析及新型植物表达载体构建[J].江西农业大学学报,2005(27):4-8.
- [35] 罗晓丽,陈晓英,肖娟丽,等.南瓜韧皮部特异性启动子在转基因棉花中的表达[J].棉花学报,2007,19(6):431-435.
- [36] 许兰珍,彭爱红,何永睿,等.异源韧皮部特异启动子在转基因枳中的表达[J].园艺学报,2014,41(1):1-8.
- [37] 贺郭,王敏杰,陈洪亮,等.杨树维管组织特异启动子的克隆与启动活性分析[J].林业科学研究,2010,23(2):177-183.
- [38] 刘玲玲,张金文.维管特异表达启动子BSP的克隆与活性检测[J].中国农学通报,2012,28(27):178-182.
- [39] TIIMOUUEU H, HAGGMAN H, TSAI C J. The seasonal activity and the effect of mechanical bending and wounding on the PtCOMT promoter in *Betula pendula* Roth [J]. Plant Cell Reports, 2007(26):1205-1214.
- [40] 张爽,武会,杜克久,等.几个杨树木质部特异启动子的分离与序列分析[J].蚕业科学,2009,35(2):219-222.
- [41] 张爽,武会,王志刚,等.杨树木质部特异启动子MDCesAP的改造及功能检测[J].蚕业科学,2010,36(2):304-307.
- [42] 张爽,武会,杜克久.几个杨树木质部特异启动子片段表达载体的构建与功能分析[J].蚕业科学,2012,38(2):199-203.
- [43] 赵金凤,李杰,张爽,等.杨树木质部特异启动子5'端侧翼序列缺失表达载体构建及转化烟草的研究[J].蚕业科学,2013,39(5):858-861.
- [44] 陈国梁,陈宗礼,齐向英,等.马铃薯块茎组织特异性启动子GBSS的克隆及序列分析[J].长江蔬菜,2011(8):25-27.
- [45] 杨加伟,李伟,葛正龙,等.马铃薯块茎特异性启动子克隆及其驱动的hIL12表达载体构建[J].遵义医学院学报,2014,37(4):387-392.
- [46] 尹涛,张上隆,刘敬梅,等.果实特异性启动子研究现状及其应用[J].农业生物技术学报,2009,17(2):355-360.
- [47] 毛娟,陆璐,陈佰鸿,等.甜瓜CmACO1启动子组织特异性表达研究[J].园艺学报,2013,40(6):1101-1109.
- [48] 郑丽莉.玉米PAB5基因启动子的克隆与功能分析[D].合肥:安徽农业大学,2011.
- [49] 李俊英.大豆PKS4基因及其启动子的克隆、表达载体构建及植物转化[D].长春:吉林农业大学,2012.
- [50] 王保全.桃PpERS1,PpADC基因克隆、鉴定及PtADC转基因功能分析[D].武汉:华中农业大学,2012.
- [51] 王纪.香蕉果实特异表达启动子的分离鉴定[D].海口:海南大学,2010.
- [52] 徐超.绿豆8S球蛋白基因启动子的克隆及分析[D].广州:暨南大学,2011.
- [53] 赵丽娜.玉米根部特异性启动子的克隆及功能分析[D].长春:吉林农业大学,2011.
- [54] 辛鲁生,阳江华,唐朝荣,等.一种启动子克隆的改良Adaptor-PCR方法及在橡胶树上的应用实例[J].植物研究,2012,32(3):296-303.
- [55] 祝梅.枳CBFI类似基因(PtCBFD)启动子功能分析[D].武汉:华中农业大学,2009.
- [56] 周延清,张喻,张永华,等.植物基因启动子的克隆研究[C].遗传学进步促进粮食安全与人口健康高峰论坛论文集,2012.
- [57] 姚叶.转cAPX基因杨树的获得及cAPX基因启动子序列的克隆与分析[D].济南:山东师范大学,2013.
- [58] 辛鲁生.橡胶树SUT基因HbSUT3与HbSUT5启动子的克隆与功能分析[D].海口:海南大学,2012.
- [59] 王莹.结缕草胁迫诱导型启动子d29A的克隆及其功能鉴定[D].北京:北京林业大学,2008.
- [60] 马守东,洪源,成军.酵母单杂交技术的原理及应用[J].世界华人消化志,2003,11(4):450-451.
- [61] 杨晓娜,赵昶灵,李云,等.启动子序列克隆和功能分析方法的研究进展[J].云南农业大学学报,2010,25(2):283-290.

## Research Progress on Plant Promoter

LUO Yajing<sup>1</sup>, LI Jie<sup>1</sup>, ZHANG Shuang<sup>1,2</sup>, DU Kejiu<sup>1,2</sup>

(1. Forestry Institute, Agriculture University of Hebei, Baoding, Hebei 071000; 2. Hebei Key Laboratory of Forest Tree Germplasm Resources and Forest Protection/Forestry Institute, Agriculture University of Hebei, Baoding, Hebei 071000)

**Abstract:** Plant promoter is an important part in regulatory mechanism of plant gene transcription. Combining with the related research of the promoter in recent years, the structure and function of promoter, classification, cloning and functional analysis are carried on the summary. The classification and the recent research progress of the plant tissue-specific promoters are summarized in the paper. Furthermore, the future research emphasis of plant promoters was put forward.

**Keywords:** plant promoter; tissue-specific promoters; clone method