

# 苦瓜 $\alpha$ -苦瓜素基因启动子的克隆和序列分析

李志良, 郑 壮, 杨谷良, 向 福, 王书珍

(黄冈师范学院 生命科学院, 湖北 黄冈 438000)

**摘 要:**以苦瓜嫩叶为试材,采用染色体步移法,克隆了  $\alpha$ -苦瓜素基因启动子序列,并对其进行序列分析。结果表明:该启动子长 1.2 kb,含有 2 个 TATA box,2 个 CAAT box,以及参与茉莉酸甲酯代谢、防御和压力反应、热胁迫反应、光反应调节、昼夜节律调节等的顺式作用元件。

**关键词:**苦瓜;  $\alpha$ -苦瓜素; 染色体步移; 启动子

**中图分类号:**S 642.503.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)18-0099-04

苦瓜(*Momordica charantia* L.)主要分布在中国、印度、巴基斯坦、孟加拉、斯里兰卡及东南亚等区域,性味苦寒,具有极高的营养价值和药用价值<sup>[1]</sup>。苦瓜药食兼用,具有降血糖、降血脂、抗菌、免疫调节、抗肿瘤、抗 HIV 等功效,目前已经从苦瓜中分离出多种活性蛋白,如核糖体失活蛋白(ribosome inactivating proteins, RIPs)、多肽、脂类、甾醇类等药用成分<sup>[2]</sup>。RIPs 可与真核细胞核糖体大亚基的 28S rRNA 专一性相互作用,并从其特定的位点上脱去腺嘌呤,从而破坏核延伸因子与核糖体的结合,将蛋白质的合成阻止在延伸阶段<sup>[3-4]</sup>。在体外,RIPs 具有抗肿瘤、抗病毒、抗基因突变、抗癌症和广谱抗菌等多种生物学活性,并且能够增强宿主植物对病原菌的抵抗作用<sup>[5-7]</sup>。

$\alpha$ -苦瓜素( $\alpha$ -momorcharin)是从苦瓜果实和种子内分离的典型 RIPs,并且能够被胁迫条件和激素等诱导增强表达。因此,该研究拟克隆  $\alpha$ -苦瓜素基因的上游启动子序列,研究其表达调控机制,克隆相互作用的转录因子,以期后续阐述 RIPs 家族的调控网络,提高 RIPs 在基因工程领域中的应用提供理论支持。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

苦瓜嫩叶(蓝山长白品种)采自黄冈师范学院实验基地。大肠杆菌 Top10 感受态细胞为课题组保存。Genome Walking kit、克隆载体 pMD18-T、DNA 凝胶回

收试剂盒购自 TaKaRa 公司,其余生化试剂为分析级。引物由金斯瑞生物科技有限公司合成。

### 1.2 试验方法

1.2.1 苦瓜基因组 DNA 的提取 基因组 DNA 提取参照 WANG 等<sup>[8]</sup>的方法:称取 0.3 g 嫩叶,剪碎置于预冷的研钵内,液氮研磨成细粉状;加入 65 °C 预热的 3×CTAB 提取液(含 2% 的 PVP),研磨均匀后转入离心管内,于 65 °C 保温 40 min;冷却后加入等体积的氯仿:异戊醇溶液(24:1),反复颠倒混匀后离心(4 °C,12 000 r·min<sup>-1</sup>,10 min);将上清转入新离心管内,加入等体积氯仿:异戊醇(24:1),充分混匀后离心(4 °C,12 000 r·min<sup>-1</sup>,10 min),吸取上清液并加入到新离心管内;加入等体积的冷异丙醇和 1/10 体积的 NaAC 于 4 °C 静置 1 h;离心后弃上清并风干沉淀;用 70% 的乙醇洗涤沉淀,离心后弃去上清,并重复洗涤 1 次;加入 TE 缓冲液溶解 DNA,测定浓度后于 -20 °C 冰箱保存备用。

1.2.2  $\alpha$ -苦瓜素基因片段的克隆 根据 GenBank 登录的  $\alpha$ -苦瓜素基因序列(GI19527)设计引物,上游引物序列(F):5'-ATGAGTAGATTCTCAGTTCTC-3',下游引物序列(R):5'-TTAGGGCATTCTAGTAGCTC-3'。PCR 扩增体系为 25  $\mu$ L,体系中含基因组 DNA 100 ng,上下游引物各 0.5  $\mu$ L (10  $\mu$ mol·L<sup>-1</sup>),dNTPs 0.5  $\mu$ L (2.5 mmol·L<sup>-1</sup> each),Taq DNA 聚合酶 1 U,10×buffer 2.5  $\mu$ L,其余体积用灭菌的蒸馏水补充。PCR 的扩增条件:94 °C 预变性 5 min,35 个循环扩增(94 °C 变性 40 s,54 °C 退火 40 s,72 °C 延伸 60 s),然后 72 °C 延伸 7 min。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,目的条带回收后连经 TA 克隆转化大肠杆菌 Top10 感受态细胞,经蓝白斑筛选阳性克隆子后交由测序公司测序。

1.2.3 染色体步移克隆启动子序列 采用 *Dra*I、*Eco*RV、*Stu*I、*Pvu*II 4 种限制性内切酶酶切苦瓜基因组 DNA,获得平末端 DNA 片段。利用 T4 DNA 连接酶将酶切 DNA 产物与接头相连接,得到染色体步移文库,并用 TE 缓冲

**第一作者简介:**李志良(1983-),男,本科,助教,现主要从事植物分子生物学等研究工作。E-mail:lizhiliang04@163.com.

**责任作者:**王书珍(1984-),女,博士,讲师,现主要从事植物遗传学等研究工作。E-mail:wangshuzhen710@whu.edu.cn.

**基金项目:**黄冈师范学院科学研究资助项目(2014022203);黄冈师范学院发展规划处资助项目(xfg2015C22);大别山特色资源开发湖北省协同创新中心团队资助项目(2015TD07)。

**收稿日期:**2016-04-26

液 20 倍稀释液作为 PCR 扩增的模板。按照 Clontech 生物公司的 Genome Walker™ Universal Kit 试剂盒提供的序列信息合成上下游接头 (Adaptor-L: 5'-GTAAT-ACGACTCACTATAGGGCAGCGTGGTTCGACGGCCCGG GCTGGT-3'; Adaptor-R: 5'-PO<sub>4</sub>-ACCAGCCC-NH<sub>2</sub>-3')。依据接头长序列设计并合成引物 APD1 和 APD2, 以及依据 α-苦瓜素基因信息合成的特异引物 GSP1 和 GSP2, 具体序列信息见表 1。采用 Touch-Down PCR 扩增目的 DNA 片段, 扩增体系 20 μL, 150 ng 基因组 DNA 模板, 2.0 μL 引物 (10 pmol · L<sup>-1</sup>, 第 1 轮: APD1+GSP1, 第 2 轮: APD2+GSP2), 1.0 μL dNTPs (10 mmol · L<sup>-1</sup>), 1 U 热启动 *Taq* DNA 聚合酶, 2 μL 10×buffer, 采用灭菌的去离子水补齐体积。PCR 扩增程序: 94 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 30 s, 68 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 1 个循环; 94 °C 变性 30 s, 67 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 1 个循环; 94 °C 变性 30 s, 66 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 1 个循环; 94 °C 变性 30 s, 65 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 1 个循环; 94 °C 变性 30 s, 64 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 1 个循环; 94 °C 变性 30 s, 63 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 1 个循环; 94 °C 变性 30 s, 62 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 1 个循环; 94 °C 变性 30 s, 61 °C 退火 30 s, 72 °C 延伸 60 s, 25 个循环; 72 °C 扩增延伸 5 min。将第 1 轮扩增产物稀释 50 倍后作为第 2 轮 PCR 的模板, 扩增程序为 94 °C 预变性 5 min, 35 个循环扩增 (94 °C 变性 35 s, 56 °C 退火 40 s, 72 °C 延伸 90 s), 然后 72 °C 再延伸 7 min。回收扩增片段, TA 克隆并测序分析。

表 1 染色体步移相关引物序列信息

Table 1 Information of primer pairs used in chromosome walking

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequences(5'-3')	退火温度 Tm/°C	碱基数 Total base/nt
APD1	GTAATACGACTCACTATAGGGC	59	22
APD2	ACTATAGGGCAGCGTGGT	55	19
GSP1	TTTGTTCATCTACGGCCACT	61	21
GSP2	TCTACGGCCACTGTGATGG	56	19

1.2.4 启动子序列的生物信息学分析 采用在线软件 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 分析获得的启动子序列, 寻找转录因子结合位点 (transcription factor-binding sites, TFBS)。在 NCBI 的核酸数据库内对 α-苦瓜素启动子序列进行 Blast 分析, 查找同源序列。

## 2 结果与分析

### 2.1 苦瓜基因组 DNA 提取和酶切

提取的苦瓜基因组 DNA 在 1.0% 的琼脂糖凝胶上均是完整的 DNA 带, 分子量远大于 10 kb (图 1)。紫外分光光度计检测发现提取的基因组 DNA 浓度为

4.9 μg · μL<sup>-1</sup>, OD<sub>260</sub>/OD<sub>280</sub> 为 1.784 1, 可以用于后续研究。将基因组 DNA 用 *Dra*I、*Eco*RV、*Stu*I、*Pvu*II 4 种稀有内切酶切成片段大于 3 kb 的弥散条带 (图 2)。

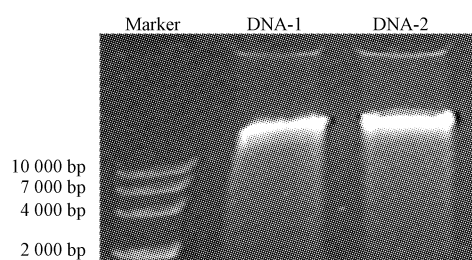


图 1 苦瓜叶片基因组 DNA 的提取

Fig. 1 Genomic DNA of *M. charantia* leaves

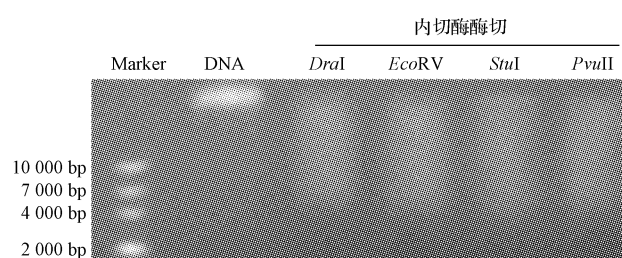


图 2 苦瓜叶片基因组 DNA 的酶切

Fig. 2 Enzyme digestion of *M. charantia* leaf DNA

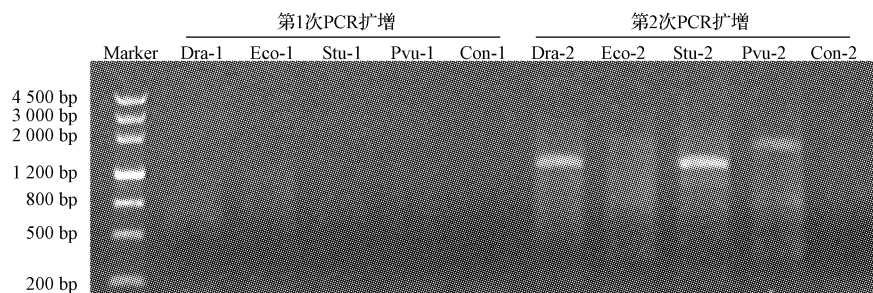
### 2.2 染色体步移获得 α-苦瓜素基因上游启动子序列

接头连接产物经 Touchdown PCR 扩增, 4 种酶切 DNA 库均有弥散带型出现, 而不含引物的阴性对照样品无明显可见的条带 (图 3)。第 2 轮特异 PCR 扩增后, 除 *Eco*RV 库外, *Dra*I、*Stu*I、*Pvu*II 库内均有大小为 1 200~2 000 bp 的特异性 DNA 条带出现, 并且 *Pvu*II 库扩增的 DNA 产物比 *Dra*I 和 *Stu*I 库片段大。 *Stu*I 库扩增的目的 DNA 片段带型整齐、亮度高。

将扩增获得的 *Stu*I 库的 DNA 片段回收, 与 T 载体连接后转化大肠杆菌。按第 2 轮巢式 PCR 的反应条件进行菌液 PCR, 挑选有阳性条带的克隆测序。将得到的序列去除载体序列后得到了 α-苦瓜素基因上游 1 230 bp 的启动子序列 (图 4)。

### 2.3 α-苦瓜素基因启动子序列分析

PlantCARE 在线软件分析发现, α-苦瓜素基因启动子内含有 2 个位于转录起始位点-30 区域的核心启动子元件 TATA box, 即保证转录的精确起始的 RNA 聚合酶结合位点; 2 个启动子及增强子区域的顺式作用元件 CAAT box; 1 个参与茉莉酸甲酯代谢通路的顺式作用元件 CGTCA-motif; 参与防御和压力反应的顺式作用元件 TC-rich repeats; 以及参与热胁迫反应的顺式作用元件 HSE。此外, α-苦瓜素基因启动子内还含有参与胚乳和芽发育的 GCN4<sub>4</sub>-motif 和 as-2-box 元件, 参与光反应的 ATCT-motif、Box 4、TCT-motif 和 GA-motif, 以及参与昼夜节律调控的顺式作用元件 circadian (图 4 和表 2)。

图3  $\alpha$ -苦瓜素基因启动子的巢式PCR扩增Fig. 3 Nested PCR amplification of  $\alpha$ -momorcharin gene promoter

```

-1085  GCAAATTCTG GCTCAAAATT TTGTTTCCAT GTTTGGGTTT ATCAATACGT CAATTAGGT
                                           CGTCA-motif
-1025  ATAGAACTCT AAAAAATTC GTATCTCGAT CAATTTAAAT TTTGGATTAT TTGAATGGGT
      TCT-motif HSE
-965   GTGTTTCCTT CGAGTCCTTG AATGTAACGT TGCTAATTTT CTGGGTATCG ATATAGTGGA
-905   TCGAAACAAGC CAAGAATCTC CCGACTTAGT TCATTTCATC TTTTCCTCTC CCATCAATTT
      GCN4-motif
-845   ACACAAAAGT CGAATCTATC GGGATCGGTG AGGGTTAGGA TTCAGCCAAA AATATGGTTG
-785   CAGTAATGAT ATTTTACAA TATTTATATT GATAATATAC AATAATATTA ATAATGGAAC
                                           Box 4
-725   ATCAATAAAT AAATAAGGAA ATGGTGGGTT CAACCATTAT CTTGTTTCT TAGAACTCAA
                                           TC-rich repeats
-665   GGACAAAAGTA GTACATCTTA GAAGAGATCA TGTCAAGTA AGGTCGTAAT TAAGTTAATG
-605   TGTTTTAATC ACATAAAATA TGGAAATAAG AAGAAAAGTA AAGAAAGAAG AAATTAAGA
-545   ATGAGATGTT TTAGATTAAA AAAACGCTAA ATATGTATTT TAGTCTCTAA TATTTTAGTG
-485   TTTTCAATT GGTTCCTTAT GTAATGAACT GTTTTCAAT TAAGTCCTTA TTGCAACAAA
                                           CAAT-box
-425   TGTAAAAATT AATTGACATA ATAAATAAAA GAGACTTAAT TGAAACTAAG AGTTTAAAA
-365   GATTATAGAC TCCAATTAA AAAATACCTC AACATTAGAA CTAAACATA TATTTAATCT
      CAAT-box
-305   AAAATATACT AGTAACTAGC TATTGTAAGG TACATTTATT TTTTATATAT AATATAAATA
-245   AATTATTAGG TAAATATGCT GTATTTGTAA GGTGATGACA AACAAAGTCT CATATTAACT
-185   AGGGAAGAT GATCATGTAT ATATAAGAAA AGATAATTAT GTCCATTGGT ATGAAATTTT
      GA-motif as-2-box
-125   TTGGGTGAAA TCCAAAAGCA AAGCCATGAG GGTACTAGCG GTACAACATG AGACCTTATA
-65    GATCTCTATA AAACCATAG CTTGAGATGA TCATAAGCA TCTCCAACT AATCCACTGT
      TATA-box TATA-box circadian/ATCT-motif
-5     GAAAGATG

```

图4  $\alpha$ -苦瓜素启动子区域序列以及转录因子的结合位点Fig. 4 Analysis of  $\alpha$ -momorcharin gene promoter sequence and the binding site of transcription factor

DNAMAN 软件分析发现该序列内 A 和 T 碱基居多,分别为 36.0%和 32.6%;C 和 G 碱基的含量分别为 14.4%和 17.0%。在 NCBI 数据库内进行 Blast 在线检索,并未发现同源度较高(大于 70%)的相似序列。

### 3 讨论

核糖体失活蛋白(ribosome-inactivating proteins, RIPs)是一类具有 RNA N-糖苷酶活性的毒蛋白,到目前为止,已经在 350 多种植物中发现了 110 个不同类型的 RIPs,其中以葫芦科、大戟科、禾本科、石竹科等物种内最为丰富<sup>[9]</sup>。RIPs 在植物的多个器官内都有分布,但

组织差异较大,通常以种子和果实中含量最多,其次是根、茎和叶。RIPs 基因的表达受植株的发育时期以及环境条件的影响,在环境压力、病毒感染、衰老等情况下,RIPs 的表达量会有所提高<sup>[10]</sup>。

启动子是调控基因转录的重要元件,启动子驱动基因的组成型表达常会造成作物体内物质和能量的大量浪费,对转基因植株的生长、发育、产量以及品质产生负面影响。启动子的生物学功能研究是探求基因表达调控机制的重要部分。在一些与逆境有关的启动子序列中,除了 TATA 盒、CAAT 盒、GC 盒等核心序列元件外,还含有脱落酸相应元件(ABA-responsive



表 2 应用 PlantCARE 软件在线预测的启动子顺式作用元件

Table 2 Prediction of promoter cis acting element with online software PlantCARE

位点名称 Site name	比对物种 Compared organism	位置 Position	序列 Sequence	功能 Function
ATCT-motif	<i>Pisum sativum</i>	-20	AATCTAATCC	参与光反应的保守 DNA 模块的部分序列
Box 4	<i>Petroselinum crispum</i>	-739	ATTAAT	参与光反应的保守 DNA 模块的部分序列
CAAT-box	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-354	CCAAT	启动子、增强子区域普通顺式作用元件
		-429	CAAAT	
CGTCA-motif	<i>Hordeum vulgare</i>	-1 038	CGTCA	参与茉莉酸甲酯代谢通路的顺式作用元件
GA-motif	<i>Helianthus annuus</i>	-181	AAAGATGA	光反应信号的部分序列
GCN4-motif	<i>Oryza sativa</i>	-900	CAAGCCA	参与胚乳表达的顺式作用元件
HSE	<i>Brassica oleracea</i>	-1 015	AAAAAATTTC	参与热胁迫反应的顺式作用元件
TATA -box	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-59	TATAAA	转录起始-30 核心启动子元件
	<i>Glycine max</i>	-33	TAATA	
TC-rich repeats	<i>Nicotiana tabacum</i>	-682	GTTTCTTAC	参与防御和压力反应的顺式作用元件
TCT-motif	<i>Arabidopsis thaliana</i>	-1 019	TCTTAC	光反应信号元件的部分序列
As-2-box	<i>Nicotiana tabacum</i>	-154	GATAATGATG	参与芽特异性表达和光反应的
Circadian Element	<i>Lycopersicon esculentum</i>	-21	CAANNNNATC	参与昼夜节律调控的顺式作用元件

element)、乙烯响应元件(ethylene responsive element, ERE)、光诱导元件等<sup>[11]</sup>。所克隆的  $\alpha$ -苦瓜素启动子序列,除了 TATA box、CAAT box、激素调控元件外,还发现了参与防御、压力反应、热胁迫等顺时作用元件,以及参与光反应、昼夜节律调控、胚乳和芽发育的 DNA 基序。

在前期研究中发现, $\alpha$ -苦瓜素表达具有器官特异性和环境因素诱导性。寻找病原菌诱导性启动子是作物抗病基因工程的重要策略。因此,对  $\alpha$ -苦瓜素启动子的克隆和序列元件分析,是进一步发掘启动子功能的基础,同时对后期克隆相应的转录因子至关重要,对 RIPs 基因工程的发展更是意义重大。该研究为后续分析 RIPs 家族的转录表达调控机制奠定基础,也丰富了 RIPs 家族基因调控研究的案例。

### 参考文献

- [1] 黄如葵,孙德利,张曼,等. 苦瓜遗传多样性的形态学性状聚类分析[J]. 南方农业学报,2008,3(3):351-356.
- [2] 杜小凤,吴传万,王连臻,等. 苦瓜营养成分分析及采收期对苦瓜营养品质的影响[J]. 中国农学通报,2014,30(1):226-231.
- [3] DOMASHEVSKIY A V,GOSS D J. Pokeweed antiviral protein,a ribosome inactivating protein;activity,inhibition and prospects[J]. Toxins,2015,7(2):274-298.

- [4] WANG S Z,ZHANG Y B,LIU H G,et al. Molecular cloning and functional analysis of a recombinant ribosome-inactivating protein (alpha-momorcharin) from *Momordica charantia*[J]. Appl Microbiol Biot,2012,96(4):939-950.
- [5] 袁燕,毛宇,黄晓麒,等. 核糖体失活蛋白研究新进展[J]. 天然产物研究与开发,2007,1(1):169-174.
- [6] WANG S,ZHENG Y,YAN J,et al. Alpha-momorcharin;a ribosome-inactivating protein from *Momordica charantia*, possessing DNA cleavage properties[J]. Protein and Peptide Letters,2013,20(11):1257-1263.
- [7] CAO D,YUN S,LING W,et al. Alpha-momorcharin ( $\alpha$ -MMC) exerts effective anti-human breast tumor activities but has a narrow therapeutic window *in vivo*[J]. Fitoterapia,2014,100:139-149.
- [8] WANG S Z,PAN L,HU K,et al. Development and characterization of polymorphic microsatellite markers in *Momordica charantia* (Cucurbitaceae)[J]. American Journal of Botany,2010,97(8):75-78.
- [9] WANG S,LI Z,LI S,et al. Ribosome-inactivating proteins (RIPs) and their important health promoting property[J]. RSC Advances,2016(6):46794-46805.
- [10] CHAUDHRY B,MÜLLER-URI F,CAMERON-MILLS V,et al. The barley 60 kDa jasmonate-induced protein (JIP60) is a novel ribosome-inactivating protein[J]. Plant J,2003,6(6):815-824.
- [11] LI Q,FARRÉ G,NAQVI S,et al. Cloning and functional characterization of the maize carotenoid isomerase and  $\beta$ -carotene hydroxylase genes and their regulation during endosperm maturation[J]. Transgenic Res,2010(19):1053-1068.

## Cloning and Analysis of $\alpha$ -momorcharin Gene Promoter From *Momordica charantia* L.

LI Zhiliang,ZHENG Zhuang,YANG Guliang, XIANG Fu,WANG Shuzhen  
(College of Life Science,Huanggang Normal University,Huanggang,Hubei 438000)

**Abstract:** Taking tender leaf of *M. charantia* as material,a total of 1.2 kb alpha-momorcharin gene promoter was cloned by chromosome walking. The results showed that two TATA boxes,two CAAT boxes,and elements involving in jasmine acid methyl ester metabolism,defense, stress response, heat stress response, light response regulator, circadian rhythm regulation,had been identified.

**Keywords:** *Momordica charantia* L.;  $\alpha$ -momorcharin; chromosome walking; promoter