

番茄 *PG* 基因启动子的序列分析

周丽英¹, 卜璐璐¹, 杨春雷¹, 侯思名², 田甜³, 杨正安¹

(1. 云南农业大学 园林园艺学院, 云南 昆明 650201; 2. 云南昆明学院 生命科学与技术系, 云南 昆明 650213;

3. 云南省昭通市巧家县农业局农技中心站, 云南 昭通 654600)

摘要:以“中蔬四号”番茄为试材, 利用 PCR 技术从“中蔬四号”番茄中扩增出 1 500 bp 的 *PG* 基因启动子, 并对启动子序列进行了生物信息学分析。结合 PLANTCARE 和 PLACE 数据库 Database 预测分析 *PG* 启动子。结果表明:*PG* 启动子具有多个典型的 TATA-Box 和 CAAT-Box 等基本元件, 以及光响应元件、热响应元件、乙烯响应元件、植物组织特异调控元件、胚乳表达相关调控元件、逆境胁迫响应元件、生理昼夜节律控制元件等, 说明番茄 *PG* 基因的表达与光、温度、激素、逆境等因素有关, 为以后深入研究 *PG* 基因的调控等研究提供理论基础。

关键词:番茄; *PG* 基因; 启动子

中图分类号:S 641.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)01-0072-04

真核生物的转录主要包括 RNA 聚合酶、顺式和反式作用因子 3 个方面的相互作用^[1]。这使得生物能够在特定的细胞或组织之中, 在植物的特定生长发育阶段, 以及特定的机体内外条件下, 并选择特定的基因完成转录表达。顺式作用元件是指 DNA 分子上对同一 DNA 分子上的基因的表达具有调节活性的特定的 DNA 或 RNA 区域。真核基因的顺式作用元件按其功能可以分为: 启动子、增强子和沉默子。其中, 启动子能够与特定的 DNA 结合蛋白来控制基因的转录起始, 在转录水平调控中的作用举足轻重。

植物组织特异性启动子是一类能在植物的某些器官或组织中特异表达外源基因的启动子类型, 例如果实特异性启动子、根特异性启动子、种子特异性启动子等^[2]。果实特异性启动子能够使外源基因在果实中高效表达, 而在其它器官或组织中不表达或少量表达, 降低了外源基因的无效表达。外源基因在细胞中表达是转基因生物技术的核心部分, 组织特异性启动子除了能使目的基因的表达产物在植物特定部位积累, 提高区域表达量, 还可以避免植物营养的浪费^[3]。研究果实特异性启动子的克隆和序列分析, 可为进一步探究果实品质形成及果实品质改良提供基础依据^[4]。分离果实成熟

特异性启动子并分析其功能, 对探讨果实成熟的分子机理有非常重大的意义^[5]。

多聚半乳糖醛酸酶 (Polygalacturonase, *PG*) 是果胶酶的一种, 它能够水解细胞壁, 软化果实, 同时也是具有组织特异性的酶^[6]。*PG* 是影响果实成熟的关键酶之一, 对果实软化起着非常重要的作用^[7]。目前关于 *PG* 基因的研究很多^[6,8-12], 但涉及番茄 *PG* 基因结构分析的研究很少。现通过 PCR 的方式, 成功克隆并得到了番茄 *PG* 启动子的基因序列, 并对序列进行生物信息学分析。

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试材料“中蔬四号”番茄、大肠杆菌 DH5 α 菌株由云南农业大学园林园艺学院生物技术重点实验室保存; pMD18-T 载体、DNA Mark DL 2 000、DNA Mark DL 5 000、IPTG、X-gal、限制性内切酶等购自 TaKaRa 公司; 植物基因组 DNA 提取试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 凝胶回收试剂盒购自庄盟生物; *Taq* 酶购自 TransGen 公司。

1.2 试验方法

1.2.1 番茄总 DNA 提取 选取新鲜幼嫩的“中蔬四号”番茄叶片, 无菌水冲洗、称重, 液氮中快速研磨成粉末, 参考 TIANGEN 公司的植物基因组 DNA 试剂盒提取步骤, 提取番茄总 DNA。

1.2.2 引物合成 根据文献报道的序列^[12] 合成引物 P1: 5'-AAG CTT CTT AAA AAG GCA AAT TG-3', P2: 5'-GGA TCC GAT ATA TTG TTA TAT GGT AT-3', 引物由上海捷瑞生物工程有限公司合成。

1.2.3 *PG* 启动子的克隆 以提取的“中蔬四号”番茄总 DNA 为模板, P1、P2 为引物进行 PCR 扩增, 反应体系

第一作者简介:周丽英(1991-), 女, 山东聊城人, 硕士研究生, 研究方向为蔬菜生物学及生物技术。E-mail: 1153469555@qq.com.

责任作者:杨正安(1974-), 男, 云南昆明人, 博士, 副教授, 现主要从事蔬菜生物技术与遗传育种等研究工作。E-mail: 454483788@qq.com.

基金项目:云南省自然科学基金资助项目(2011FB049); 国家自然科学基金资助项目(31260481, 31460516)。

收稿日期:2015-07-24

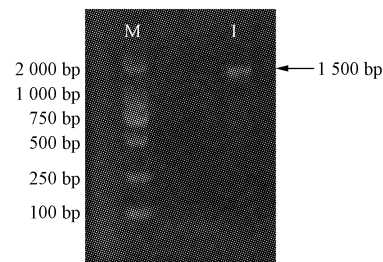
为:DNA 模板 100 ng,引物各 1 μ L(10 μ mol/L),2 \times Easy Taq PCR SuperMix 12.5 μ L,ddH₂O 至 25 μ L。扩增程序:94℃预变性 4 min,94℃变性 30 s,52℃退火 1 min,72℃延伸 1 min,35 个循环,72℃延伸 10 min。PCR 产物参照 ZOMANBIO 公司凝胶回收试剂盒说明回收纯化,连接按 TaKaRa 公司 pMD18-T 载体连接说明书进行,连接产物转入大肠杆菌 DH5 α 中,经蓝白斑筛选、质粒 PCR、经 *Hind* III 和 *Bam*HI 酶切验证,得到阳性克隆,送上海华大基因进行测序。

1.2.4 序列分析 利用 PLANTCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)和 PLACE(<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>)对启动子的元件进行分析^[13-15]。

2 结果与分析

2.1 PG 启动子片段的克隆与序列分析

利用 PCR 扩增番茄 PG 启动子获得了 1 条约 1 500 bp 的清晰条带,条带大小与预期相符(图 1、2)。测序结果表明,克隆得到的 PG 启动子大小为 1 485 bp,利用 BLAST 对比,与已发表的番茄 PG 基因(Genbank 登录号 M37304)的核酸同源性为 99%,存在 10 处差异,可能是由于品种不同所致。利用 TSSP 预测 PG 启动子的转录起始位点,预测出 2 个位点,位于+382 处和+1 414 处,LDF 值分别为 0.10 和 0.14,碱基都为 A,+382 有可能是转录起始位点(图 3)。

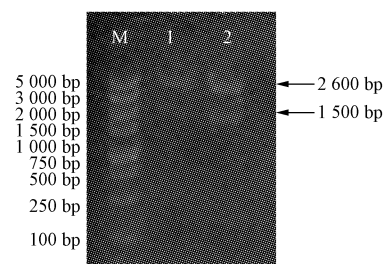


注:M, DL 2 000 分子量;1, PG。

Note:M, DL 2 000 marker;1, PG.

图 1 PG 启动子扩增结果

Fig. 1 PCR amplification results of PG promoter



注:M, DL 2 000 分子量标准;1,2, PG。

Note:M, DL 2 000 marker;1,2, PG.

图 2 PG 启动子 Hind III 和 BamHI 酶切验证

Fig. 2 Identification of PG promoter using Hind III and BamHI enzyme digestion

```

1   AAGCTTCTTAAAGGCAAATTGATTAATTTGAAGTCAAAATAATTAATTATAACAATGGTGAAGCACCTTAAGAAACCAT
81  AGTTTGAAAGGTTAC[CAAT]GCGCTATATATTAATCAACTTGATAATATA[AAAAAATTTCAAT]TCGAAAAGGGCTAAAA
      CAAT-Box                                     HSE   CAAT-Box
161 TATTCTCAAAGTATTCGAAATGGTACAAACTACCAT[CCGTCC]ACCTATTGACTCCAAAATAAAATTATTATCCACCTTT
      CCGTCC-Box
241 GAGTTTAAATTTGACTACTTATATA[CAAT]TCTAAATTTAACTATTTTAATACTTTTAAAAATACATGGCGTTCAAATA
      CAAT-Box
321 TTTAATATAATTTAATTTTGAATATCATTATAAACCAACCACTACCAACTCATTAAATC[CCACCC]AAATT
      Sp1
401 GTACTATCAAAATTTGCTCTAAACACTACTAAAACAAGACGAAATTTGTCGAGTCCGAATCGAAGCAC[CAAT]CTAATTTAG
      CAAT-Box
481 GTTGAGCCGCATGTTTAGGAGGACACTTT[CAAT]AGT[ATTTTTTCA]AGCATGAATTTGAAATTTAAGATTAATGGTAAAG
      CAAT-Box TC-rich repeats
561 AAGTAGTACATCCCGAATTAATTCATGCCTTTTTAAATATAATTATATAAATATTATGATTTGTTTTAAATATTAATA
641 CTTGAATATGTTATTTTAAAAAATTATCTATTAAGTACCATCACATAATTGAGACGAAGGAATAATTAAGATGAACAT
721 AGTGTTTAATTAGTAATGGATGGGTAGTAAATTTTATAAATTAT[CAAT]AAGTTAAATTATAACAAATATTTGAGC
      CAAT-Box
801 GCCATGTATTTTAAAAAATATTAATAGTTTGAATTTAAACCGTTAGATAAATGGT[CAAT]TTTGAACCCAAAAGTGGAT
      CAAT-Box
881 GAGAAAGGGTATTTTAGAGC[CAAT]AGGGGGATGAGAAAGGATATTTTGAAGC[CAAT]ATGTGATGGATGGAGGATAATTT
      CAAT-Box CAAT-Box
961 GTATCATTTCTAATACTTTAAAGATATTTAGGTCATTTCCCTTCTTTAGTTTATAGACTATAGTTAGTTCATCGAA
1 041 TATCATCTATTATTTCCGCTCTAAATATTTTATTTTATAAATTTTAAAAAATAGATT[ATTTTTTCCA]TTTAACCTTT
      TC-rich repeats
1 121 GATTGTAATTAATTTTAAAAAATTACCAACATATAAATAAATAATTAATTTTAAACAAGAATTGTAACATAATATTTTTTT
1 201 AATTATTTCAAAATAAATATTTTAAACATCATATAAAGAAATACGACAAAAAATTTGAGACGGGAGAGA[CAAGCCA]GA
      GCN4-motif
1 281 CAAAAATGTCCAAGAACTCTTTCGTCTAAATATCTCTCATCCAACTAATATAATACCCATTA[CAAT]TAACCATATTGA
      CAAT-Box Box-W1
1 361 [CC]AACTCAAACCCCTTAAATCT[TATAAAT]AGACAAACCCCTCCCATACCTCTTATCATAAAAAATAAATCTTTTTCA
      TATA-Box
1 441 ATAGACAAGTTTAAAAACCATACCATATAACAATATATCGGATCC

```

注:*表示转录起始位点。

Note:The promoter transcription start site is indicated by *.

图 3 PG 启动子序列及主要元件分布

Fig. 3 The sequences of PG promoter

2.2 PG 启动子的顺式元件分析

结合 PLANTCARE 和 PLACE 数据库预测分析 PG 启动子的顺式作用元件,发现该序列具有多个典型的 TATA-Box 和 CAAT-Box 等基本元件,光响应元件 3-AF1 binding site、AT1-motif、ATCT-motif、Box 4、Box I、GA-motif、GT1-motif、Sp1、MRE,乙烯响应元件

ERE、植物分生组织特异调控元件 CCGTCC-box、胚乳表达相关调控元件 GCN4_motif、Skn-1_motif、厌氧诱导所需的顺式作用元件 ARE、真菌诱导响应元件 Box-W1、热响应元件 HSE、逆境胁迫响应元件 TC-rich repeats、生理昼夜节律控制元件 circadian、转录因子 WRKY 家族结合位点 W box 等。主要顺式元件分析见表 1。

表 1 PG 启动子区的顺式作用元件

Table 1 The important cis-acting regulatory elements in the PG promoter sequences

元件名称 Element name	位置 Location	序列 Sequence	功能 Function
3-AF1 binding site	-1 309	AAGAGATATTT	光响应元件 Light responsive element
A-box	+198	CCGTCC	顺式作用元件 Cis-acting regulatory element
ARE	-74, -354	TGGTTT	厌氧诱导所需的顺式作用元件 Cis-acting regulatory element essential for the anaerobic induction
AT1-motif	+1 064	AATTATTTTAT	部分光响应组件 Part of a light responsive module
ATCT-motif	+469	AATCTAATCT	参与光响应的保守 DNA 部分元件 Part of a conserved DNA module involved in light responsiveness
Box 4	+23, +548, +109, +1 128, +43, +577, +375, +1 162	ATTAAT	参与光响应的保守 DNA 部分组件 Part of a conserved DNA module involved in light responsiveness
Box I	-83, -535	TTTCAAA	光响应元件 Light responsive element
Box-W1	-855, +1 357	TTGACC	真菌诱导响应元件 Fungal elicitor responsive element
CAAT-box	+54, +96, +267, +467, +510, +770, +858, +901, +933, +1 345	CAAT	启动子和增强子区基本顺式作用元件 Common cis-acting element in promoter and enhancer regions
CCGTCC-box	+198	CCGTCC	植物分生组织特异调控元件 Cis-acting regulatory element related to meristem specific activation
ERE	-535	ATTTCAAA	乙烯响应元件 Ethylene-responsive element
GA-motif	-666	ATAGATAA	部分光响应元件 Part of a light responsive element
GCN4_motif	+1 272	CAAGCCA	胚乳表达相关顺式作用元件 Cis-regulatory element involved in endosperm expression
GT1-motif	-1 347, -1 348	GGTTAAT	光响应元件 Light responsive element
HSE	+131	AAAAAATTC	热响应元件 Cis-acting element involved in heat stress responsiveness
MRE	-477	AACCTAA	光响应 MYB 结合位点 MYB binding site involved in light responsiveness
OBP-1 site	-869	TACACTTTTGG	顺式作用元件 Cis-acting regulatory element
Skn-1_motif	+993	GTCAT	胚乳表达相关顺式作用元件 Cis-acting regulatory element required for endosperm expression
Sp1	+390	CC(G/A)CCC	光响应元件 Light responsive element
TATA -box	+1 383	TATAAAT	转录起始位点-30 区核心启动子 Core promoter element around -30 of transcription start
TC-rich repeats	+517, +1 102	ATTTTCTTCA	逆境胁迫响应元件 Cis-acting element involved in defense and stress responsiveness
W box	-855, +1 357	TTGACC	转录因子 WRKY 家族结合位点 The binding site for the WRKY family of transcription factors transcription factor
Circadian	-6	CAANNNNATC	生理昼夜节律控制元件 Cis-acting regulatory element involved in circadian control

3 讨论

启动子因其重要的调控作用及优点受到越来越多的关注,对其结构、功能等的研究也越来越深入,成为分子生物学的一大研究热点。

该研究成功克隆了番茄 PG 启动子,利用生物信息学的方法对该启动子进行分析,初步了解了 PG 启动子所具有的顺式作用元件及其功能,发现番茄 PG 启动子具有多个典型的 TATA -Box 和 CAAT-Box 等基本元件,热响应元件,胚乳表达元件,真菌诱导响应元件,生理昼夜节律控制元件,厌氧诱导所需的顺式作用元件,逆境

胁迫元件,转录因子 WRKY 家族结合位点 W box,以及多个光响应元件等,为后期将外源基因转入番茄植株,特异表达外源基因奠定了基础。PG 启动子中的顺式作用元件如光响应元件、热响应元件、生理昼夜节律控制元件,这些元件跟果实的成熟都是相关的^[16-18]。这也是 PG 启动子能在果实中特异表达的理论上的佐证。

植物通过感知多种环境信号如光、温度和水分等来调节其自身的正常生长和发育,只有许多顺式元件协同作用才能使一个基因在特定的时空中表达,这些作用元件是否都发挥作用,哪些功能元件是表达外源基因的必

需元件,该启动子是否顺利表达外源基因,目前尚不确定,还需进一步验证。

参考文献

- [1] BARKHEM T, HALDOSÉN L A, GUSTAFSSON J Å, et al. Ps2 gene expression in HepG2 cells; complex regulation through crosstalk between the estrogen receptor, an estrogen-responsive element, and the activator protein 1 response element[J]. Molecular Pharmacology, 2002, 61(6): 1273-1283.
- [2] 路静, 赵华燕, 何奕昆, 等. 高等植物启动子及其应用研究进展[J]. 自然科学进展, 2004(8): 17-23.
- [3] 糜赛男, 曹明富. 植物组织特异性启动子的研究进展[J]. 生物学教学, 2010, 35: 7.
- [4] 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.
- [5] 李孟娇. 柑橘果实成熟特异启动子的分离与功能初步分析[D]. 临安: 浙江农林大学, 2013.
- [6] 寇晓虹, 朱本忠, 罗云波, 等. 番茄果实中乙烯与多聚半乳糖醛酸酶的关系[J]. 植物生理与分子生物学报, 2004(6): 675-680.
- [7] 薛炳辉, 束怀瑞. 多聚半乳糖醛酸酶(PG)与果实成熟软化研究进展[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2002, 33(2): 252-256.
- [8] 魏潇, 刘威生, 刘宁, 等. 果实软化相关 PG 基因的进化分析和基因组定位[J]. 园艺学报, 2011(9): 1791-1799.
- [9] 何勇, 尹俊, 李连国. 甜瓜多聚半乳糖醛酸酶(PG)基因反义表达载体

的构建[J]. 内蒙古农业大学学报(自然科学版), 2004(2): 81-85.

- [10] 薛炳辉, 束怀瑞. 多聚半乳糖醛酸酶(PG)与果实成熟软化研究进展[J]. 山东农业大学学报(自然科学版), 2002, 33(2): 252-256.
- [11] 黄永红, 梅眉, 曾继吾, 等. 甜瓜多聚半乳糖醛酸酶反义基因植物表达载体的构建及其转化烟草的研究[J]. 果树学报, 2007, 24(4): 492-495.
- [12] 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(2): 355-360.
- [13] 刘玉瑛, 张江丽. 几个真核生物启动子计算机预测数据库资源概述[J]. 湖南农业科学, 2007(4): 70-71, 74.
- [14] 刘玉瑛, 张江丽. 真核生物启动子预测相关数据库资源概述[J]. 安徽农业科学, 2007(24): 7418-7419.
- [15] 胡翔, 周建林. 真核生物基因启动子的计算机预测及其软件资源[J]. 激光生物学报, 2004(6): 465-467.
- [16] BUTLER J E F, KADONAGA J T. Enhancer-promoter specificity mediated by DPE or TATA core promoter motifs[J]. Genes Dev, 2001, 15: 2515-2519.
- [17] JUVEN GERSHON T, HSU J Y, KADONAGA J T. Caudal, a key developmental regulator, is a DPE-specific transcriptional factor[J]. Genes Dev, 2008, 22: 2823-2830.
- [18] BUTLER J E F, KADONAGA J T. The RNA polymerase II core promoter: a key component in the regulation of gene[J]. Genes Dev, 2002, 16: 2583-2592.

Cloning and Sequence Analysis of Polygalac-turonase (PG) Promoters in Tomato

ZHOU Liying¹, BU Lulu¹, YANG Chunlei¹, HOU Siming², TIAN Tian³, YANG Zheng'an¹

(1. Gardening College, Yunnan Agricultural University, Kunming, Yunnan 650201; 2. Department of Lifescience and Technique, College of Kunming, Kunming, Yunnan 650213; 3. Extension Center of Agricultural Technology of Qiaojia County, Zhaotong, Yunnan 654600)

Abstract: Taking tomato variety of 'Zhongshu No. 4' as material, 1 500 bp PG gene promoter was amplified in tomato leaves using PCR, and bioinformatics analysis of PG promoter sequences was conducted. The results showed that by PLANTCARE database and PLANTCARE database showed that PG gene promoter had number of typical core elements such as TATA -Box, CAAT -Box, photoresponse element, thermal response element, ethylene response element, regulatory element related to tissue specific activation, regulatory element involved in endosperm expression, element involved in defense and stress responsiveness, circadian rhythm controlling element and so on, all of which laid the groundwork for such research on the future regulation of PG genes.

Keywords: *Solanum lycopersicum*; polygalac-turonase gene; promoter