

# Isolation of Salt-Inducible Promoter in Maize and Construction of Plant Expression Vector\*

Yajie Zheng, Di Feng, Yi Wei, Jinliang Liu, Baolei Jia, Yanhua Zhang, Hongyu Pan, Shihong Zhang<sup>#</sup>

College of Plant Sciences, Jilin University, Changchun  
Email: {yajiebaobei, fengdi0804}@163.com, <sup>#</sup>zhang\_sh@jlu.edu.cn

Received: May 7th, 2012; revised: May 28th, 2012; accepted: Jun. 6th, 2012

**Abstract:** The upstream nucleotide sequence of maize salt-inducible protein kinase, named STY, was isolated from the genomic DNA of B73 by PCR. Promoter sequence analysis by PlantCARE showed that it had some typical cis-elements, including TATA box and CAAT box. In addition, there were two salt responsive elements GT1-motif, various phytohormone responsive elements and stress responsive elements in the promoter sequence. The fusion gene of STY promoter and GUS were constructed and named pCAM-STY. The vector was transformed into *Agrobacterium* EHA105. The vector containing STY promoter was transferred into tobacco by *Agrobacterium tumefaciens* mediated method, function of STY promoter was analyzed by identifying activation of GUS using histochemistry staining. The results indicated that the promoter activated expression of GUS report gene, it laid the foundation to resolve the serious multi-stress problems of agriculture in northeast of China.

**Keywords:** Maize; Salt-Inducible; Promoter; Sequence Analysis; Transformation; Functional Verification

## 玉米盐诱导型启动子克隆及其植物表达载体构建\*

郑亚杰, 冯 颀, 魏 毅, 刘金亮, 贾保磊, 张艳华, 潘洪玉, 张世宏<sup>#</sup>

吉林大学植物科学学院, 长春  
Email: {yajiebaobei, fengdi0804}@163.com, <sup>#</sup>zhang\_sh@jlu.edu.cn

收稿日期: 2012年5月7日; 修回日期: 2012年5月28日; 录用日期: 2012年6月6日

**摘 要:** 首先提取 B73 玉米(*Zea mays*)的基因组 DNA, 以此为模板利用 PCR 的方法克隆玉米盐诱导蛋白激酶(STY)基因上游 1675 bp, 将其命名为 STY。从网站 PlantCARE 上的启动子预测工具在线对克隆到的启动子进行分析, 结果表明: STY 启动子中含有多种调控元件, 典型的调控元件有: TATA-box, CAAT-box 等等。另外还有 2 个盐诱导顺式作用元件 GT1-motif 和一些冷、干旱胁迫诱导有关的顺式作用元件, 以及功能未知的元件。然后将克隆到的基因与植物双元表达载体连接, 并将构建好的植物表达载体 pCAM-STY 转入根癌农杆菌 EHA105 中, 然后利用农杆菌介导法转化烟草, 经过 GUS 组织化学染色验证 STY 的诱导功能。研究表明: STY 启动子片段具有启动活性, 为解决东北地区农业生产中严重的多元逆境胁迫问题开辟了有效途径。

**关键词:** 玉米; 盐诱导; 启动子; 序列分析; 转化; 功能验证

### 1. 引言

玉米(*Zea mays*)是全世界总产量最高的粮食作

物, 由于长期受低温、干旱、盐渍等多元逆境胁迫的干扰和伤害, 形成了一些特有的抗逆机制。植物的生长发育受基因调控, 启动子是调控基因表达的关键元件之一<sup>[1,2]</sup>。目前基因工程中存在的首要问题是外源基

\*基金项目: 农业部转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX08009-062B)  
<sup>#</sup>通讯作者。

因的表达水平、表达部位等问题，而启动子在决定基因表达方面起关键作用。

东北地区现有的盐渍土地大约占耕地面积的5%<sup>[3]</sup>，而且因为灌溉不恰当、植被破坏和海水入侵等外在因素，有大面积的农田形成了次生盐渍化土壤，这已成为对世界灌溉农业可持续发展的制约因素，因此在农业生产中，急需耐盐胁迫环境下生长良好的粮食作物和植被。随着现代基因工程技术的迅速发展，植物耐盐已从传统的植物生理研究转向分子方面的研究。作物分子育种技术使得以基因水平替代原先的染色体组水平来精细地调节育种的作用成为可能。

在植物中胁迫诱导基因的表达调控主要是通过转录因子与其启动子序列相互作用而实现。因此，胁迫诱导型启动子在植物抵御逆境胁迫反应中的作用越来越受到人们的重视。选择适宜的启动子来驱动目的基因在转基因植物中表达，已成为植物基因工程研究的热点问题之一。针对不同的目的基因，人们选用不同的启动子，从而使靶基因在特定组织或条件下选择性表达，以利于转基因植物的正常生长发育<sup>[4,5]</sup>。对植物在盐逆境下表达的耐盐基因启动子研究表明，不同耐盐基因的启动子往往含有相同的顺式作用元件，并受相同的作用因子的调控。这为我们提供了另外一条研究植物耐盐机制的途径。

本研究从玉米B73中克隆得到了盐诱导型启动子(STY)，构建了表达载体，转化农杆菌，并对其活性进行了初步验证，为以后开展利用转基因技术改良玉米抗逆品质研究奠定基础。

## 2. 材料与方法

### 2.1. 材料

#### 1) 材料

供试玉米品种为“B73”，由本实验室保存。

#### 2) 菌株

植物表达载体 pCAMBIA1301 质粒、大肠杆菌(*E. coli*)DH5 $\alpha$ 、根癌农杆菌(*A. tumefaciens*)EHA105 均为本实验室保存。

#### 3) 试剂

克隆载体 pMD18-T Vector、Ex Taq 和 T4 DNA Ligase 以及限制性内切酶均购自大连宝生物公司；引物的合成、测序由上海生物工程技术有限公司完成；

PCR 产物回收采用多功能 DNA 纯化回收试剂盒，购自北京百泰克生物技术有限公司；酚、氯仿等有机溶剂以及其它试剂均为进口或国内分析纯；硫酸卡那霉素(Kan)、氨苄霉素(Amp)、利福平(Rif)等抗生素均购自北京鼎国生物技术公司。

### 2.2. 方法

#### 2.2.1. 目的基因的选择

在 NCBI 网站上查找“inducible promoter”，将搜索到的启动子在玉米基因组数据库 (<http://www.maizegdb.org>)中通过序列比对找出该启动子在玉米基因组中的上游序列，通过启动子在线预测网站 PLACE (<http://www.dna.af2frc.go.jp/PLACE/signal.Scan.html>) 和 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/wetools/plantcare/html>) 对序列进行分析，由此来确定目的基因。

#### 2.2.2. 目的片段的扩增

利用Primer5.0 对STY启动子序列设计引物，然后由上海生物有限公司合成。具体为上游引物STY-F: 5'-CGGAATTCGGTGTACAAATAGGTTCTTGG-3'(下划线为*EcoR* I酶切位点)，下游引物为STY-R: 5'-CATGCCATGGATGATACAGGTGGAGTAC-3'(下划线为*Nco* I酶切位点)。采用CTAB法<sup>[6]</sup>提取玉米幼苗叶片总DNA以此为模板进行PCR扩增，反应条件为：94℃预变性，5 min；94℃，30 s；50℃，30 s；72℃，1 min；35 个循环；72℃延伸 10 min。用1%琼脂糖凝胶电泳检测PCR扩增产物，并用胶回收试剂盒纯化回收。将回收的片段与pMD18-T连接，连接产物转化*E. coli*感受态细胞，提取质粒，经过PCR和酶切验证为阳性重组质粒，送上海生工生物工程公司测序。利用DNAMAN软件对测序结果进行同源性比对，证明已成功克隆到STY启动子基因。

#### 2.2.3. 植物表达载体的构建

将测序后的阳性克隆质粒、植物表达载体 pCAMBIA1301 质粒用限制性内切酶 *EcoR* I 和 *Nco* I 分别进行酶切，37℃过夜，1.0%琼脂糖凝胶电泳检测后，回收目的片段以及载体大片段。将含有 *EcoR* I 和 *Nco* I 酶切位点粘性末端的目的片段、pCAMBIA1301 载体大片段进行连接，将构建好的质粒 pCAM-STY 用

冻融法转入根癌农杆菌菌株 EHA105。

#### 2.2.4. 农杆菌介导法转化烟草

先将无菌烟草切成大约 0.5 cm × 0.5 cm 小块, 将小块烟草平放于预分化培养基中, 25℃, 放入组培室培养 1~2 d。将预培养过的烟草叶片放入菌液中, 抽真空 5~10 min 左右取出叶片置于无菌滤纸上吸去附着的菌液。然后把叶片放于 MS 培养基上, 25℃暗培养 3 d。经过共培养的叶片转移到含有选择压的分化培养基中(含有潮霉素的 MS 培养基), 置于组培室中培养。每 10 d 更换一次培养基, 直到长出抗性芽。

#### 2.2.5. 启动子功能的验证

对转化的烟草进行筛选。将获得的转基因的烟草叶片进行 GUS 染色<sup>[7]</sup>, 加 GUS 染色液(100 mM 磷酸钠缓冲液 pH7.0, 3 mg/mL X-Gluc, 0.06% Triton X-100, 5 mM 铁氰化钾, 5 mM 亚铁氰化钾 0.5 M 的 EDTA, 20%的甲醇)37℃染色 24 h 后, 将处理后的材料转入脱色液中 50 度水浴 1 h, 直至背景呈阴性对照即呈白色为止。肉眼下观察, 照相。

### 3. 结果与分析

#### 3.1. STY 启动子的克隆

提取玉米 B73 幼苗叶片总 DNA, 然后以此为模板, 根据目的基因上游启动子序列设计特异性引物, 对其进行 PCR 扩增。扩增产物经 1.0%琼脂糖凝胶电泳进行检测。结果发现, 在 1675 bp 的位置上有一个特异性条带, 该条带测序结果与预期相一致, 并命名为 STY。将该条带回收纯化后, 与 pMD18-T 载体相连, 经过 PCR(图 1)及质粒酶切鉴定, 获得阳性重组质粒, 命名为 pMD18-STY。将阳性重组质粒酶切后回收目的片段, 测序结果与预期相一致, 证明已经克隆到目的片段 STY。

#### 3.2. STY 启动子序列分析

通过在线对获得的 STY 启动子序列进行分析, 结果表明: STY 启动子中含有多种调控元件(图 2), 典型的调控元件有: TATA-box, 它是 RNA 聚合酶 II 结合的位点<sup>[8,9]</sup>; CAAT-box, 与转录起始频率有关<sup>[10]</sup>等等。另外还有 2 个盐诱导顺式作用元件 GT1-motif 和一些冷、干旱胁迫诱导有关的顺式作用元件, 如 MBS

元件参与干旱反应, 是 MYB 结合位点<sup>[11]</sup>和其它与光、热应答有关的顺式作用元件, CGTCA-motif 是参与对茉莉酸甲酯响应的顺式作用元件, 这种信号分子在植物抗逆机制中发挥重要作用<sup>[12,13]</sup>, 以及功能未知的元件。由预测的结果来看, STY 启动子含有多个与逆境胁迫(盐、冷、干旱)诱导有关的顺式作用元件, 可能是一个与逆境胁迫有关的启动子。

#### 3.3. 植物表达载体的构建

将植物双元表达载体 pCAMBIA1301 和 pMD18-STY 分别用 *EcoR* I 和 *Nco* I 双酶切后, 将目的片段与酶切后的 pCAMBIA1301 载体大片段用 T4 DNA ligase 进行连接, 得到植物表达载体。将构建好的植物表达载体转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 对重组阳性质粒进行菌液 PCR 验证(图 3)和双酶切(图 4)验证, 都获得预期大小为 1675 bp 的目的片段, 证明该植物表达载体构建正确, 命名为 pCAMBIA1301-STY。

#### 3.4. 植物表达载体转化农杆菌

将构建好的植物表达载体 pCAMBIA1301-STY 质粒转入热激农杆菌感受态中, 挑取阳性菌落振荡培养, 用菌液进行 PCR 验证, 结果表明, 扩增出了 1675 bp 的目的条带; 对菌液提取质粒后, 转入大肠杆菌感受态细胞中, 同样挑取阳性菌落振荡培养, 提取质粒进行酶切验证, 也得到了 1675 bp 的目的条带。以上结果表明, 已经成功地将真核表达载体转入了农杆菌, 以便后期的活性及功能验证。

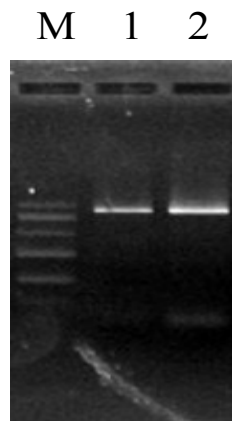


Figure 1. PCR magnification of STY. Lanes 1 and 2 are PCR product of STY. The size of the lanes are 1849 bp, 1470 bp, 1090 bp, 738 bp, and 424 bp

图 1. STY 启动子的 PCR 扩增。1、2: PCR 扩增, Marker 自上到下 1849 bp、1470 bp、1090 bp、738 bp、424 bp

玉米盐诱导型启动子克隆及其植物表达载体构建

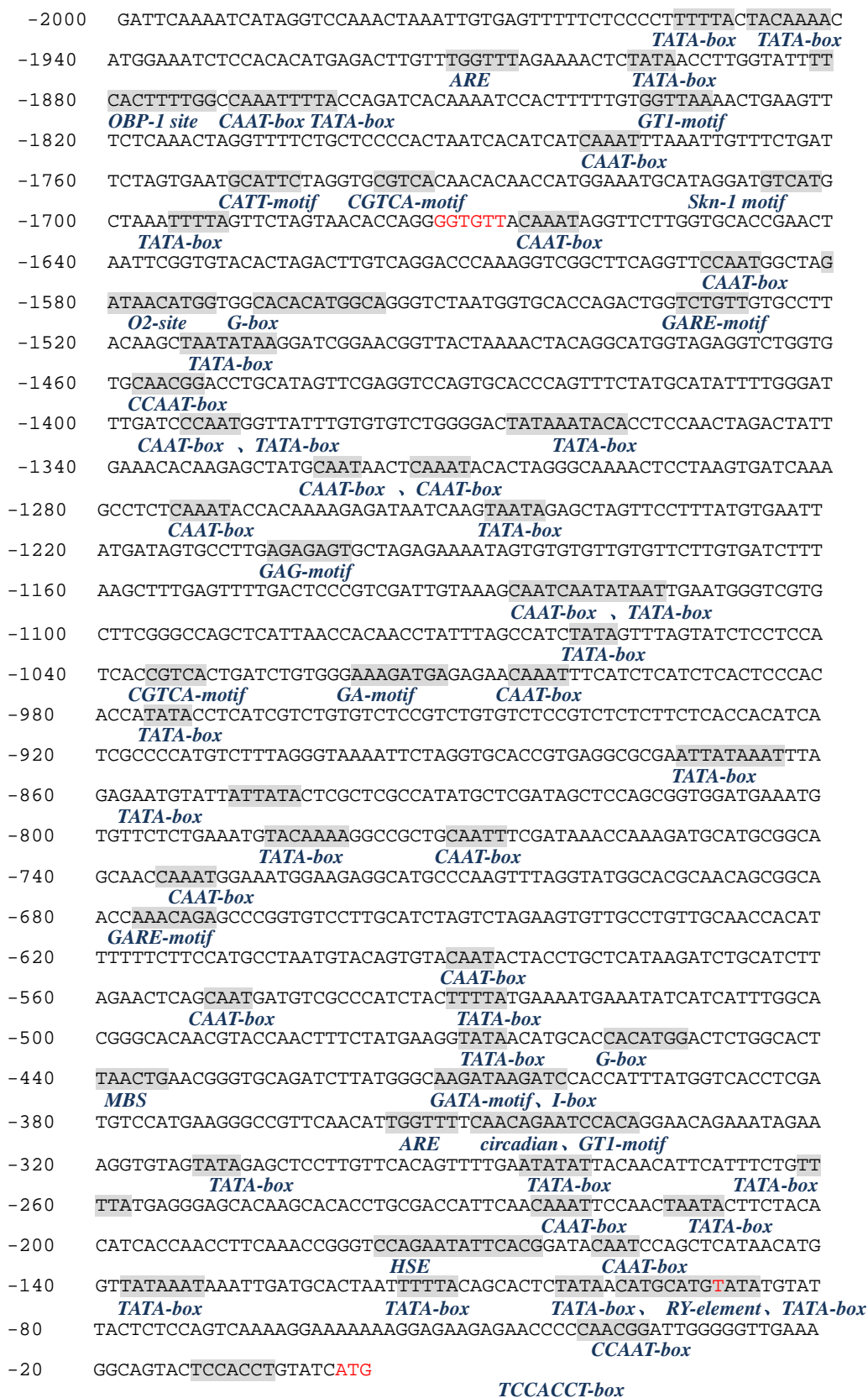


Figure 2. The analysis of STY promoter sequence  
图 2. STY 启动子序列及分析



Figure 3. Verification of pCAMBIA1301-STY plasmid. Lane 1 to 4 are PCR products of STY. The size of the lanes are 1849 bp, 1470 bp, 1090 bp, 738 bp, and 424 bp, 280 bp  
 图 3. pCAMBIA1301-STY 质粒 PCR 验证。1~4:PCR 扩增, Marker 自上到下大小为: 1849 bp、1470 bp、1090 bp、738 bp、424 bp、280 bp



Figure 4. Verification of pCAMBIA1301-STY plasmid cutting by *EcoR* I, *Nco* I. 1: Recombinant plasmid; 2: pCAMBIA1301-STY plasmid cutting by *EcoR* I, *Nco* I. The size of the lanes are 1849 bp, 1470 bp, 1090 bp, 738 bp, and 424 bp, 280 bp  
 图 4. pCAMBIA1301-STY 质粒酶切验证。1: 重组质粒; 2: 重组质粒 *EcoR* I、*Nco* I 酶切, Marker 自上到下大小为: 1849 bp、1470 bp、1090 bp、738 bp、424 bp、280 bp

### 3.5. 启动子功能验证

将 STY 侵染过的玉米胚经过盐诱导后放入 GUS 染色液中做瞬时表达, 观察玉米胚, 发现染成蓝色(图 5)将转化的烟草叶片放入 GUS 染色液中, 37°C 染色过夜, 放置脱色液中 50 度水浴 1 小时后观察烟草叶片被 X-Gluc 溶液染成蓝色(图 6), 说明启动子 STY 能启动 GUS 表达, 具有启动活性。

## 4. 讨论

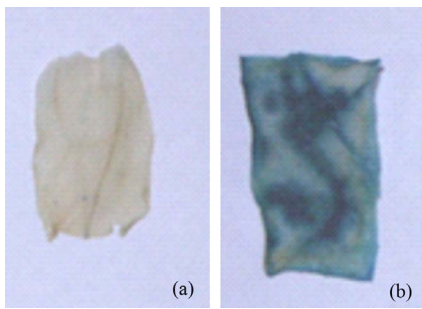
农作物在生产中经常受到非生物胁迫因子的胁迫如盐碱化、洪涝、干旱、低温等, 严重影响农作物的产量。在这些非生物胁迫中, 土壤盐碱化、干旱、低温是主要的胁迫因子, 制约着农作物的生长发育、影响农作物的质量和产量。盐胁迫和干旱使植物缺乏水分, 导致植物细胞的渗透势有所降低, 产生大量活性氧进而迫害植物。因此, 研究组织逆境诱导型启动子意义重大。目前在植物的遗传转化中使用广泛的启动子有花椰菜花叶病毒(CaMV)的 35 S 启动子、水稻肌动蛋白基因(Actin1)的启动子和玉米泛素基因(ubiquitin)的启动子<sup>[14]</sup>。该类型的启动子能够对外源基因在特定胁迫条件下的表达进行调控, 减少对转基因植物生长的发育和产量的影响, 也避免转基因产物对受体生物和环境产生副作用。

在适宜的条件下, 外源基因通过基因枪轰击法转话后数小时就可以检测到其产物的表达, 并在 1~2 d 内达到最高峰, 然后又慢慢地降低至完全消失, 这种外源基因可以在短时间内得以表达的情况称之为瞬



Figure 5. The results of maize embryos using gus staining: (a) 35 S promoter (positive control); (b) STY promoter uninduced (negative control); (c) STY promoter induced by salt  
 图 5. 瞬时表达的玉米胚的 GUS 染色结果: (a) 35 S 启动子(阳性对照); (b) 未诱导的 STY 启动子(阴性对照); (c) 经过盐诱导的 STY





**Figure 6. The results of the transgenic tobacco leaves using gus staining: (a) The wide tobacco leaf; (b) The transgenic tobacco leaf**  
**图 6. 转基因烟草叶片 GUS 染色结果: (a) 未侵染烟草叶片; (b) pCAM-STY 烟草叶片**

时表达。这种分析方法是检测一个启动子是否拥有启动活性最常用的方法。运用 GUS 的瞬间表达系统对于一些转录因子的相互作用和特异启动子对于基因的调控特性可以很好的进行检测<sup>[15,16]</sup>。Kawagoe 等<sup>[17]</sup>在云扁豆蛋白基因启动子的调控下,发现 *uldA* 基因的瞬时表达与烟草转基因的植株中所形成的稳定表达一致。本研究利用瞬时表达的方法验证 STY 启动子调控下的 GUS 基因表达活性,说明启动子 STY 能启动 GUS 表达,具有启动活性。

玉米是我国主要的粮食作物,在农业生产中占据重要地位,同时对逆境比较敏感,其抗逆启动子的研究较为广泛且相对来说比较成熟,因此我们选择从玉米中分离并克隆逆境诱导启动子,验证其活性并找出功能区域。本研究通过常规 PCR 方法从玉米中分离了高盐诱导型 STY 启动子,序列分析表明该启动子区存在大量的植物逆境应答元件,如响应干旱失水应答元件 MYB/MYC,盐诱导顺式作用元件 GT1-motif 和一些冷、干旱胁迫诱导有关的顺式作用元件;在 STY 启动子序列中出现的这些与逆境应答相关的顺式作用元件预示着该基因可能在植物的逆境应答中发挥重要作用。通过叶盘转化法转化烟草,GUS 染色初步表明 STY 具有一定的启动活性,要找到具有特定调控功能的区域(逆境诱导)还应该构建缺失表达载体,用同样的方法进行 GUS 表达分析,所以还有待于进一步

完善,从而为探明玉米逆境胁迫启动子表达调控序列及其调控机制的研究奠定基础。

## 参考文献 (References)

- [1] 宋扬,周军会,张永强.植物组织特异性启动子研究[J].生物技术通报,2007,6:21-24.
- [2] 李一焜,王金发.高等植物启动子研究进展[J].植物学通报,1988,15(增刊):1-6.
- [3] 赵明范.世界土壤盐渍化现状及研究趋势[J].世界林业研究,1994,7(1):84-86.
- [4] 赵恢武,陈杨坚,胡鸾雷等.干旱诱导性启动子驱动的海藻糖-6-磷酸合酶基因载体的构建及转基因烟草的耐旱性[J].植物学报,2000,42(6):616-619.
- [5] 关淑艳,赵丽娜,王丕武等.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,2011,39(5):145-153.
- [6] M. G. Murray, W. F. Thompson. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8(19): 4321-4325.
- [7] J. E. Matilde, P. Pascual and P. Pere. Expression of the promoter of HyPRP, an embryo-specific gene from *Zea mays* in maize and tobacco transgenic plants. *Gene*, 2005, 356: 146-152.
- [8] C. P. Joshi. An inspection of the domain between putative TATA box and translation start site in 79 plant genes. *Nucleic Acids Research*, 1987, 15(16): 6643-6653.
- [9] J. E. Butler, J. T. Kadonaga. The RNA polymerase II core promoter: A key component in the regulation of gene expression. *Genes & Development*, 2002, 16: 2583-2592.
- [10] 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.
- [11] T. Urao, K. Yamaguchi-Shinozaki, S. Urao, et al. An arabidopsis myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell*, 1993, 15: 1529-1539.
- [12] T. Senarata, D. Touehell, E. Bunn, et al. Acetyl salicylic acid (Aspirin) and salicylic acid induce multiple stress tolerance in bean and tomato plants. *Plant Growth Regulation*, 2000, 30(2): 157-161.
- [13] T. Janda, G. Szalai, I. Tari and E. Padi. Hydroponic treatment with salicylic acid decrease the effects of chilling injury in maize (*Zea mays* L) plants. *Planta*, 1999, 208: 175-580.
- [14] L. Jie, L. Yumin, X. Lexun, et al. A structurally novel salt-regulated promoter of duplicated carbonic anhydrase gene 1 from *Dunaliella salina*. *Molecular Biology Reports*, 2010, 37(2): 1143-1157.
- [15] M. Schwall, G. Feix. Zein promoter activity in transiently transformed protoplasts from maize. *Plant Science*, 1998, 56: 161-166.
- [16] B. C. Clarke, R. Appels. A transient assay for evaluating promoters in wheat endosperm tissue. *Genome*, 1998, 41: 865-871.
- [17] Y. Kawagoe, B. R. Campell and N. Murai. Synergism between CACGTG (G-box) and CACCTG cis-elements is required for activation of the bean seed storage protein  $\beta$ -phaseolin gene. *Plant Journal*, 1994, 5(6): 885-890.