

网络出版日期:2018-07-18

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/61.1220.S.20180717.1349.014.html>

甘蓝型油菜种子特异表达油体蛋白启动子 P_{BnOA03} 的克隆及功能分析

王海兰,贾庆利,赵翠珠,杨 铮,王 凯,

刘香伶,唐 通,宋 欢,张 猛

(西北农林科技大学 农学院,陕西杨凌 712100)

摘 要 为了改良油菜种子的性状,常常需要研究种子特异表达目的基因的情况。在分析油菜油体蛋白表达模式的基础上,选择种子特异高表达的油体蛋白,根据甘蓝型油菜基因组序列设计引物,利用 PCR 技术从基因组中克隆到一段 715 bp 的启动子序列。启动子顺式元件分析表明,这一克隆序列具有 CAAT-box 和 TATA-box 启动子基本元件,另外含有 ABA 响应元件等多种顺式元件。进一步利用 GUS 报告基因在拟南芥中对该启动子的功能进行鉴定,结果表明,在转基因株系的幼苗、根、茎、叶、花和种子发育前期及成熟种子中没有检测到 GUS 基因明显表达,在种子发育的中后期检测到 GUS 基因的表达逐渐增强。说明这个启动子的表达调控具有一定的种子特异性。

关键词 甘蓝型油菜;油体蛋白;启动子;GUS 染色;拟南芥

中图分类号 Q785; S635.3

文献标志码 A

文章编号 1004-1389(2018)08-1152-09

转基因技术是基因功能分析和外源基因在植物中稳定表达的一种不可或缺的强大工具。在植物遗传工程中,引入的靶基因通常需要在特定的时期或组织器官中表达,这些问题通常通过特异表达的启动子来解决。启动子在起始和调节基因转录中有着重要的作用,也是分子育种中的重要研究部分。目前已有很多启动子被鉴定,并在农业基因工程中用来控制基因的表达。例如 CaMV 35S 启动子^[1]、RuBisCo 大型亚基启动子^[2]和 NOS 启动子^[3]。在大多数情况下,目标基因是被一个组成型启动子所驱动而表达。例如 CaMV 35S,这一启动子在植物的大部分组织中都具有较强的表达水平。然而,转基因产物的连续合成和大量的积累,会对转基因植物的代谢过程造成干扰,从而产生一些不良的多效性反应^[4],有时还会对组织产生毒性^[5]。因此,有效利用特异表达的启动子,将会极大地满足转基因作物的需求^[6]。这类启动子被称为组织特异性启动子^[7],包括叶片、茎、根、果实、花粉和种子等特异性启动子。

油菜(*Brassica napus* L.)是重要的油料作物

之一,是植物油和植物蛋白的重要来源,在中国乃至全世界都有广泛的种植^[8]。油菜种子的产量及其品质直接关系到油菜的经济价值,除了作为食用油,油菜籽还可作为生物能源,这也是用来解决未来能源危机的途径之一。因此,可以通过构建一个种子特异性的启动子来让基因在油菜种子中特异性表达,从而达到改良油菜种子特性、提高油菜的产量和改良油菜脂肪酸组分的目的^[9]。目前,油菜中报道的特异性启动子的研究相对来说较少,并且大部分还受到专利的保护。因此,油菜组织特异性启动子的研究,对于油菜及其他作物的基因工程改良方面都会具有极其重要的作用。甘蓝型油菜在种子特异性启动子的研究方面主要注重于油菜籽的特性改良,近些年来应用最多最广泛的属于 napin 启动子。napin 是十字花科植物中重要的储藏蛋白,由多基因编码,在种子发育后期开始表达。最早在 1987 年,Josefsson 等^[10]克隆到编码储藏蛋白 napA 的基因;随后 Ericson 等^[11]克隆到 *napB* 上游序列,发现了和拟南芥同源性较高的一些保守区域;Zhang 等^[12]从油菜基

收稿日期:2018-03-29 修回日期:2018-05-03

基金项目:陕西省国际合作重点项目(2012KW-17);国家自然科学基金(31270295)。

第一作者:王海兰,女,在读硕士,从事作物遗传育种研究。E-mail:1539451050@qq.com

通信作者:张 猛,男,博士,教授,从事植物油脂代谢与油料作物基因工程研究。E-mail:zhangmeng@nwsuaf.edu.cn

因组中分离出来 300 bp 的 *napin B* 基因,经序列分析表明,该序列含有与种子特异相关的高度保守的顺式元件,在烟草中转化并通过 *GUS* 报告基因分析表明,它在胚和胚乳中特异性表达。另外,亚细胞定位及表达分析发现, *FAE1* 能在胚珠中特异性表达^[13]。随后有研究者对 *FAE1* 的上游区域进行研究,发现上游序列中含有较多与种子特异表达相关的顺式作用元件,例如 RY-repeat^[14]、G-box 和 E-box^[15-16]。

油体蛋白(Oleosin)是一类存在于油体表面的小分子蛋白^[17],存在种子特异表达和非特异表达两种类型。本研究中,利用转录组数据,在对甘蓝型油菜种子中油体蛋白基因的表达模式进行分析的基础上,选择种子特异表达的油体蛋白,开展启动子 P_{BnOA03} 的克隆、序列分析以及转基因株系的功能验证。这种种子特异表达的启动子,可以作为农作物基因工程种子改良新的工具。该启动子顺式元件的分析,也为以后油体蛋白的调控研究提供重要信息。

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料为陕西省油菜杂交中心提供的甘蓝型油菜‘秦油 7 号’;野生型拟南芥为 Columbia 生态型 Col-0;试验所用大肠杆菌为 DH5 α ;农杆菌菌株为 GV3101,表达载体为 pBI121。

质粒提取试剂盒、凝胶回收试剂盒购置于 Omega 公司;T₄ DNA Ligase、限制性内切酶购置于 Takara 公司;DH5 α 大肠杆菌感受态细胞、高保真 DNA 聚合酶购置于全式金公司;DNA Marker 购置于西安擎科生物公司;试验中所涉及的引物均使用 Primer Premier 5.0 软件设计合成,由西安擎科生物公司合成。

1.2 甘蓝型油菜油体蛋白基因在组织中的表达量分析

通过表达量分析网站(https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi?PROGRAM=blastn&BLAST_PROGRAMS=megaBlast&PAGE_TYPE=BlastSearch&BLAST_SPEC=SRA&SHOW_DEFAULTS=on)对备选基因在油菜种子不同发育时期和在根、子叶、叶片等不同组织的表达量进行分析。首先,在 NCBI 的 SRA 中搜索相关的信息,找到油菜表达的转录组数据库,获得其 SRX 号以及表达数据(N);其次,在 SRA 的 BLAST 页面

中,将备选的基因序列与 SRX 进行比对,表达量选择参数为:Max target sequences=20 000、Expect threshold=0.000 000 000 1、indentity>100%,从而选择出该基因的表达数据(N₁);最后,计算 FPKM(Fragments per kilobase of exon model per million mapped reads)值, $FPKM = N_1 \times 10^5 / N$ 。

1.3 启动子克隆

1.3.1 DNA 提取 将油菜种子点播于营养土[V(基质):V(珍珠岩):V(蛭石)=3:1:1]中,待其生长 20 d 左右,用 CTAB 法^[18]提取叶片的 DNA。

1.3.2 引物设计及基因克隆 参考拟南芥油体蛋白在种子及其他组织的表达模式,在油菜数据库寻找甘蓝型油菜的同源基因。根据这些同源基因的序列,利用甘蓝型油菜转录组数据库资料,分析相应基因在不同组织中的表达水平。选择种子特异表达且表达量最高的一个基因或重复基因,找到该基因的上游序列位置,在其末端与该基因起始密码子的区段内设计引物 BnOA03-F/R(所涉及引物信息详见表 1)。以所提取的油菜 DNA 为模板进行扩增,反应体系为:在 50 μ L 的体系中加入 1.5 μ L 油菜 DNA,4 μ L dNTP,10 μ L 5 $\times$ PS Buffer,0.5 μ L Primer star,31.5 μ L 超纯水以及 1.5 μ L BnOA03-F/R 引物。经过 95 $^{\circ}$ C 预变性 4 min 后,95 $^{\circ}$ C 变性 30 s,57 $^{\circ}$ C 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min 30 s,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 再延伸 5 min。10 g/L 琼脂糖凝胶电泳,经紫外显影显示 PCR 产物与目标片段大小一致。用凝胶回收试剂盒回收 PCR 产物,再经 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切回收产物和 PMD19-T 后,进行 T₄ 连接和大肠杆菌转化,最后进行菌体 PCR,选择符合要求的菌液提取质粒进行测序。

1.4 启动子序列分析

将克隆的启动子 P_{BnOA03} 的序列在启动子在线分析软件 PLACE(<https://sogo.dna.affrc.go.jp/cgi-bin/sogo.cgi?lang=en&pj=640&action=page&page=newplace>)上进行分析,并对分析得到的顺式作用元件进行分类总结。

1.5 表达载体构建

对经过测序的质粒和表达载体 pBI121 进行 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切处理,37 $^{\circ}$ C 酶切 4 h,分别回收质粒和表达载体 pBI121 的酶切产物。利用 T₄ DNA 连接酶连接,反应体系为:1 μ L 回收

表 1 PCR 引物序列
Table 1 PCR primer sequences

引物名称 Primer name	引物序列(5'→3') Primer sequence(5'→3')	下划线 Underline	扩增长度/bp PCR product length	退火温度/℃ Annealing temperature
BnOA03-F	CCAAGCTTATTCTGCGTATTTCCAAACTGAG	<i>Hind</i> Ⅲ		58.5
BnOA03-R	CTCTAGAATGCACGTGTAAAGCGTATACAT	<i>Xba</i> I	715	57.4
BnOA03-Fy	TTTGATGCCTCCTTCGTG	—		54.5
BnOA03-Ry	CGGATTTCGAATCTTCCT	—	310	55.6

启动子质粒片段,6 μL 回收 pBI121 片段,2 μL 5×T₄ Buffer,1 μL T₄连接酶,在 PCR 中 25 ℃反应 10 min。然后用热激法进行大肠杆菌 DH5α 转化。从过夜培养的平板中挑取单克隆于 1 mL 含有 50 mg/L 的卡那霉素液体 LB 培养基中培养。以单克隆的菌液为模板,用 BnOA03-Fy/Ry 引物进行 PCR 扩增鉴定。然后将正确菌液扩繁提取质粒,经冻融法将质粒转入农杆菌 GV3101 感受态细胞中,经验证引物 BnOA03-Fy/Ry 检测后,用于遗传转化。

1.6 拟南芥转化及阳性苗鉴定

采用蘸花法转化拟南芥(方法参考 Clough 等^[19])。转化大约 25 d 后收取种子,将收获的 T1 代种子消毒后撒播至含有 50 mg/L 的卡那霉素的 1/2 MS 平板上,一周后筛选阳性苗,移栽至营养土中,置于 22 ℃,16/8 h 光周期的培养室进行生长。

待植株正常生长至抽薹时,用 CTAB 法提取叶片 DNA,用 BnOA03-Fy/Ry 引物进行 PCR 扩增,以确定转基因阳性植株。

1.7 转基因阳性植株 GUS 染色

将 T1 代植株收获的种子在含有卡那霉素的 1/2 MS 培养基上撒播,观察生长,选择有 3∶1 分离比的单位点插入转基因株系用于后续研究。将挑选的转基因阳性植株转移至营养土,分别取其萌发 5 d 的幼苗,开花时期的茎、茎生叶、莲座叶和花,以及生长至成熟阶段的种子,分别为开花后 4、7、11、15、18、21 d 的角果,对这些组织进行 GUS 染色。另外选择实验室带有 GUS 报告基因的转基因拟南芥材料作为阳性对照。染色液成分为:50 mmol/L NaPO₄ (pH=7.2),0.5 mmol/L K₃Fe(CN)₆,0.5 mmol/L K₄Fe(CN)₆,2 mmol/L X-Gluc。GUS 染色方法参见 Jefferson 等^[20]方法,用体式显微镜观察拟南芥不同组织的 GUS 染色情况并拍照。

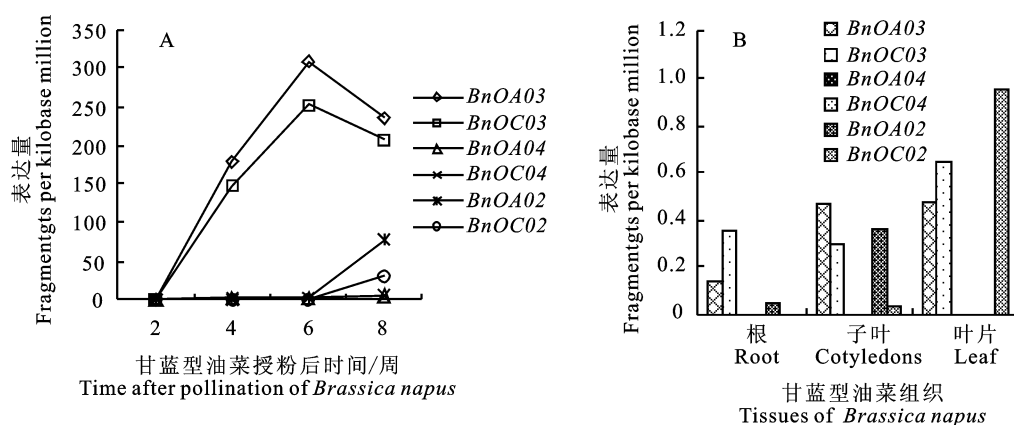
2 结果与分析

2.1 甘蓝型油菜油体蛋白的表达模式分析

在拟南芥的 15 个油体蛋白中有 11 个油体蛋白基因的表达模式可以搜索到。对这 11 个油体蛋白进行分类分析,发现有 3 种类型,种子特异、非种子特异以及组成型表达。参考拟南芥油体蛋白的表达模式,选择不同类型的油体蛋白进行分析。为了简洁,本文仅列出几个有代表性的油体蛋白的结果。拟南芥 OLE(AT2G25890)在种子中表达较高且在其他组织中也有表达,它在甘蓝型油菜中存在 2 个同源基因,分别命名为 *BnOA04* 和 *BnOC04*;拟南芥 OLE(AT5G56100)在根、茎、叶和种子中都有较高表达,它在甘蓝型油菜中存在 2 个同源基因,分别命名为 *BnOA02*、*BnOC02*;拟南芥 OLE(AT3G01570)是一个种子特异表达的油体蛋白,它在甘蓝型油菜中存在 2 个同源基因,分别命名为 *BnOA03*、*BnOC03*。根据它们的编码区序列,分析这些同源基因在油菜组织中的表达量,结果见图 1。图 1-A 中的数据来源于对甘蓝型油菜种子不同发育时期研究的 4 个数据库。从图 1-A 可以看出,基因 *BnOA03* 的表达量在授粉后 2 周开始成倍增加,在第 6 周达到最高,6 周之后虽然表达量下降,但是其表达水平较其他基因依然较高;其同源基因 *BnOC03* 的表达趋势与其一致,但是表达量稍低于 *BnOA03*。其余基因在种子整个发育时期表达量都较低。图 1-B 中子叶和叶片的数据来源于 3 个数据库,根的数据来源于一个数据库。从图 1-B 中可以看出,油菜油体蛋白基因在根、子叶和叶片中的表达量都较低,甚至不表达。根据表达量分析结果,最终本研究选择 *BnOA03* 油体蛋白基因为目标基因。

2.2 启动子克隆及序列分析

以所提取的油菜 DNA 为模板,利用引物 BnOA 03-F/R 进行扩增。10g/L 琼脂糖凝胶电



A. 油体蛋白基因在油菜种子授粉后不同时间的表达量 The expression of oleosin gene at different time after pollination of *Brassica napus*; B. 油体蛋白基因在油菜不同组织中的表达量 The expression of oleosin gene at different tissues of *Brassica napus*

图 1 甘蓝型油菜油体蛋白表达分析

Fig. 1 Expression analysis of oleosins in *Brassica napus*

泳结果见图 2-A, PCR 产物为 715 bp, 其结果与油菜数据库获得的片段大小一致。该启动子命名为 P_{BnOA03} 。

对启动子序列进行在线分析, 结果见图 3 和表 2。 P_{BnOA03} 启动子中含有水稻胚乳特异性表达顺式调控元件 Skn-1 基序^[21]、ABRE 应答元件^[22]、对转录起始有重要作用的 TATA-BOX^[23]、与储藏蛋白基因有关的 E-BOX^[15] 和与激素调节有关的 W-BOX^[22] 等顺式元件。CAAT-BOX 对基因的转录起到很强的激活作用^[24], 也可以通过与其他顺式作用元件的协同来达到调控基因高效表达的作用。除此之外, P_{BnOA03} 启动子中还存在与种子特异性相关的顺式

元件 RY-motif^[14]、与光效应有关的 G-BOX 和 T-BOX 顺式元件^[16]。启动子中存在的这些顺式元件, 将为今后研究该启动子的调控提供重要的信息。

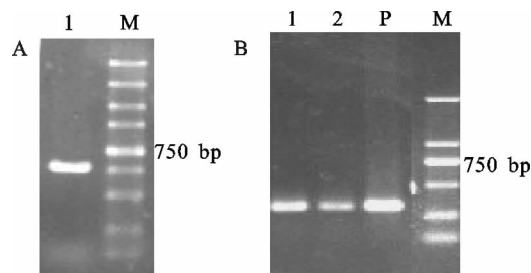
2.3 植物表达载体构建及拟南芥转化

对连接启动子序列的中间载体 PMD19-T 和 pBI121 进行双酶切, 分别回收酶切产物, 利用 T_4 DNA 连接酶连接, 然后用热激法进行大肠杆菌 DH5 α 转化, 并进行单克隆菌落 PCR 鉴定。经电泳检测显示 P_{BnOA03} 启动子成功连入 pBI121 (图 2-B)。经测序确认后, 转入农杆菌 GV3101 感受态细胞, 重组载体图如图 4-A。验证后进行拟南芥转化。经过抗性培养基筛选得到 37 株 T1 代转基因植株, 提取筛选到的这些植株叶片 DNA, 利用 $BnOA03$ -Fy/Ry 引物进行 PCR 检测。以质粒为阳性对照, 野生型拟南芥 DNA 为阴性对照。检测结果见图 4-B。

根据上图 PCR 的结果显示, 筛选转基因阳性苗。

2.4 启动子功能分析

对 8 个 T1 代株系的叶片、茎、花器和发育种子进行初步 GUS 染色。结果表明, 在营养器官和花器中均无 GUS 染色, 而在种子发育中后期有 GUS 染色, 表明该启动子具有活性。进一步对试验中得到的 T2 转基因株系进行系统的 GUS 染色。结果显示, 在培养基上生长了 5 d 的幼苗 (图 5-B) 中的各个部位都没有发现 GUS 基因的明显表达 (以 5 d 幼苗为阳性对照如图 5-A); 在茎 (图 5-C)、茎生叶 (图 5-D)、莲座叶 (图 5-E)、花 (图 5-F) 中没有发现 GUS 染色, 其中花器的雌蕊



A: PCR 扩增启动子 P_{BnOA03} 片段 Fragment of P_{BnOA03} promoter amplified by PCR; M. DNA marker 5000; 1. PCR 扩增启动子 P_{BnOA03} 片段 Fragment of P_{BnOA03} promoter amplified by PCR)

B: PCR 扩增筛选阳性克隆电泳图 PCR screen of positive clones; M. DNA marker 2000; 1-2. 挑选的阳性克隆菌落 PCR 产物 PCR products of positive clones; P. 质粒对照 Plasmid

图 2 油体蛋白启动子 P_{BnOA03} 的克隆及检测

Fig. 2 Cloning of promoter P_{BnOA03} and identification of positive colony

1 CAGGGCTTGG AAGATTCTGC GTATTTCCAA ACTGAGGGAG GCAGCTTGTG ATTCA**GTGAT**

61 CAGAAGCTTG AAATCAAGGA TTTGTAGCAA AGTAA**GTGAT** CAAAGAGTTA TAAGAATGTG

121 GAGATT**CAAT** TCAAGCACAA GACAGATCTC GTTC**TGCATG** GATCTTGAAG **CCAATTACAT**

181 GATATGTACT AAGTTTGGTA AAAC**CAGTTC** TTGGTCAGTC TCCTGCAGAG TCTGTTTCGAT

241 ATCACTTCGG GATTTTATTT TGAAGTGATT AGCAGAGGGA TCCCCTTTAA **TGATGCGGT**

301 ACGCATTCTT AATTGTCCGT CTCAGCCCGT TCATTGGTAT CATCGGATTG **GCAATCTTCC**

361 TCTCTTCCAA **AGTTTCAAAA** GAGGAAATGA AACTTGTTAC TCATGCAAGG TTCTCAGGTG

421 CCACGTCTCT CCTT**IACGTG** **TCACGTCTC** GCAGCATGTC GCCCATCTAT ATTACAACAA

481 **ACCCAATTCC** ATTACTTAAA CCTTAAAAAG GCAGAAGCAA CTAATCCGCA ACATCTTGCT

541 TTTAGTTTCT TGCCTAACAA AGATTTAGCT TGGAGGATTA ATGGCGGACG TTCGCACACA

601 TGCTCACCAG GTTCA**AGTGC** ACCCTCTACG CCAGCAGGAA GGAGGCATCA **AGTGGTTTA**

661 TCCCAGAGC GGGCCTTCTT CCACTCAGGT TC**CTTTTAA** TTACACCATC CTTGGAATCT

721 **CAGCATATAT** TAATACAACA **AATATGAATA** TCATATGTAT **ACGCTTTACA** **CGTGCATGCA**

781 GGTTCCTAGCA **GTGATCGCCG** GTGTACCGGT TGGAGGGAC

红色代表 Skn-1 基序 Red represents Skn-1motif; 棕色代表 ABRE Brown represents ABRE; 蓝色代表 G-BOX Blue represents G-BOX; 绿色代表 GTGA-motif Green represents GTGA-motif; 橙色代表 T-box Orange represents T-box ; 紫色代表 CAAT-BOX Purple represents CAAT-BOX; 粉色代表 RY-motif Pink represents RY-motif; 黄色代表 W-BOX Yellow represents W-BOX; 灰色代表 TATA-BOX Gray represents TATA-BOX

图 3 P_{BnOA03} 启动子序列分析

Fig. 3 Sequence analysis of P_{BnOA03} promoter

表 2 P_{BnOA03} 启动子的表达元件分析

Table 2 Analysis of regulatory elements in P_{BnOA03} promoter

编号 Number	转录因子名称 Element name	碱基序列 Base sequence	启动子位置中的序列分布 Location in promoter sequence	功能 Function
1	ABRE	ACGTG	(+)443,782; (-)429,449,781	参与 ABA 反应顺式调控元件 The cis regulatory element participates in the ABA reaction
2	CAAT-BOX	CAAT	(+)129,174,357,492 (-)294,317,338,	基础启动子序列 The basic promoter sequence
3	TATA-BOX	TATATAA	(+)740; (-)741	基础启动子序列 The basic promoter sequence
4	T-box	ACTTTG	(-)89,374,659,	减少光激活基因转录产物 Reduce gene transcription products in light activation
5	G-BOX	AACGTG	(-)449	参与光反应的顺式作用元件 The cis regulatory element participates in light reaction
6	Skn-1 motif	TTTTTC	(-)133	水稻胚乳特异性顺式调控元件 Cis regulatory elements of rice endosperm specific
7	GTGA-motif	GTGA	(+)48,56,97,804; (-)246,448,614	源于烟草花粉延迟发育基因 <i>g10</i> Late pollen gene <i>g10</i> of tobacco pollen
8	RY-repeat	CATGCA	(+)408,787; (-)157,785	甘蓝型油菜中种子特异性表达所需 Seed specific expression in <i>Brassica napus</i>
9	GATA-BOX	GATA	(+)184; (-)343 ,761	CaMV 35S 启动子中的顺式元件 The cis element of CaMV 35S promoter
10	W-BOX	TTGAC	(+)205	参与水杨酸诱导 WRKY DNA 结合蛋白的表达 Participate in expression of WRKY DNA binding protein
11	E-BOX	CANNTG	(-)510,765	油菜种子储藏蛋白 Storage-protein gene of <i>Brassica napus</i> seed

注：“(+)和(-)”表示正义链和反义链。
Note：“(+)，(-)”indicated sense strand and antisense strand.

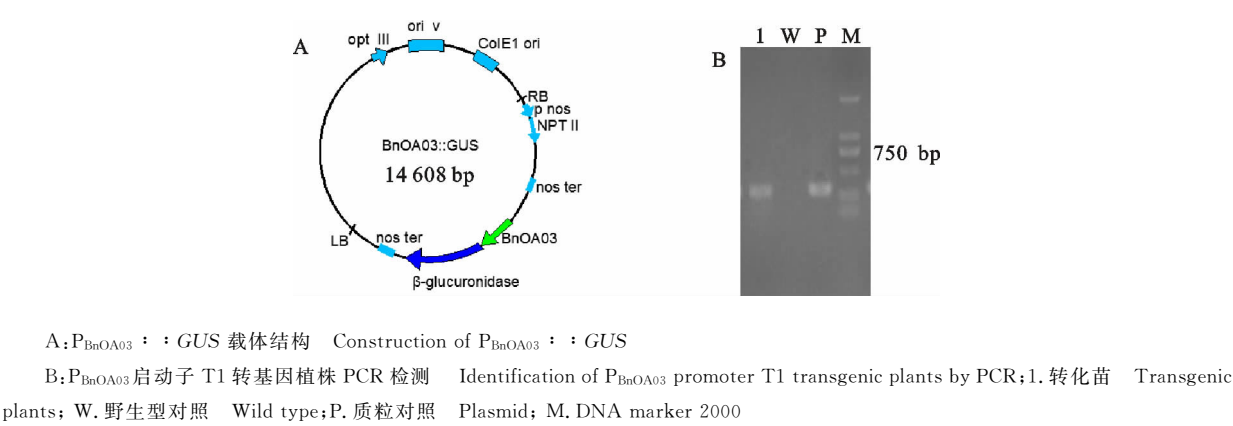


图 4 启动子表达载体构建及阳性植株检测

Fig. 4 Binary vector construction and identification of positive plants

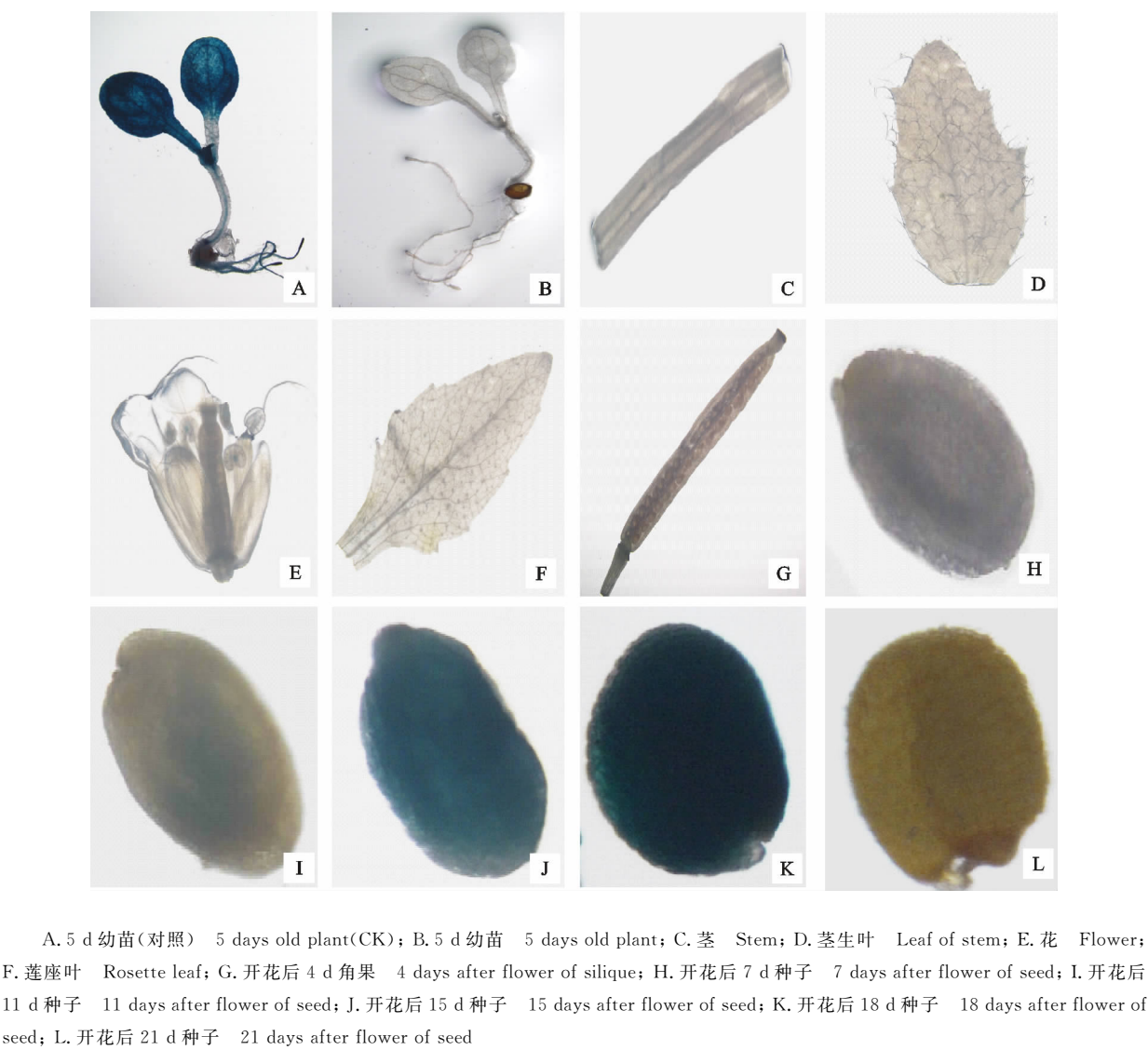


图 5 $P_{BnOA03}::GUS$ 转基因拟南芥植株中 GUS 染色

Fig. 5 GUS assay of $P_{BnOA03}::GUS$ Arabidopsis tissues

柱头部分、花瓣和雄蕊的花药、花丝也没有发现 GUS 染色信号。

不同时期角果的 GUS 染色结果中表明,野生型在各个时期都未检测到背景 GUS 染色;在转化启动子的材料中,开花后 4 d 的种荚和株柄(图 5-G)没有 GUS 染色,在开花后 7 d 的种荚中剥离的种子(图 5-H)也没有发现有 GUS 染色;在开花后 11 d 的角果中,种荚和株柄没有染色,而在剥离的种子(图 5-I)中发现有 GUS 的浅着色;开花后 15 d 的角果中,种荚和株柄都没有染色,在种子中(图 5-J)可以检测到有明显 GUS 染色;开花后 18 d 的角果中,种荚和株柄均没有染色,而在种子中(图 5-K)发现较深的 GUS 染色;开花后 21 d 的角果中,种荚、株柄和种子中(图 5-L)都没有检测到 GUS 染色信号。这些染色结果与 T1 代阳性植株的染色结果一致。这些结果表明 P_{BnOA03} 启动子是一个在种子发育中后期进行启动基因表达的种子特异性启动子。

3 讨论

本试验中共得到 8 个转基因系,对得到的转基因系的 T1 代植株幼叶和不同发育时期的种子进行 GUS 染色,在叶片等组织中没有发现 GUS 染色,而在种子发育的中后期检测到 GUS 染色。在得到的 8 个转基因系中有 7 个系在种子开花后的 11、15、18 d 中能检测到逐渐增强的 GUS 基因活性,其中,2 个系在开花后 21 d 还可以检测到有部分的 GUS 染色信号。在 T2 代时各组织和种子的 GUS 活性检测与 T1 代一致。这之前分析的基因在油菜授粉后不同周期的种子中的表达趋势一致。

但在本研究中,GUS 基因活性在种子开花后 11 d 时开始有信号,但信号不强,到 18 d 有信号增强的过程。然而,拟南芥种子在发育的过程中,开花后 11~15 d 时,是其合成油脂和储藏物质的主要阶段。也就是说,该启动子在拟南芥上表达的高峰相对油菜来讲,出现延迟表达的情况。本研究中,分析出现这种情况的原因可能有:(1)拟南芥和油菜虽均属十字花科、有一定的亲缘关系,但是随着植物发生进化,拟南芥属于阿拉伯属,而油菜属于芸薹属。此外,油菜在进化时基因组远较拟南芥复杂^[25]。(2)油菜种子在授粉后 50 d 左右获得成熟种子,而拟南芥在开花后 23 d 左右就可以获得成熟种子,拟南芥的发育周期为

油菜的一半,而本试验参照油菜的发育周期构建的启动子,在容易转化的拟南芥上进行验证,这可能是表达时期出现延后的原因之一^[25]。(3)本试验所构建的启动子约 700 bp。在克隆启动子时,完整的克隆了基因上游直到另一个基因的全部序列。但考虑到基因的表达调控是一个非常复杂的过程,不能排除启动子序列之外还存在其他的辅助调控序列,这些序列有可能对该基因的表达有修饰作用。在进行该启动子的后续研究中,可尝试在其他植物上进行验证分析,例如,克隆油菜基因的启动子选择烟草^[14]来验证,它的种子成熟的周期与油菜大体相近,为授粉后的 40 d 左右,或者用油菜^[26]本身来验证,这些后续研究将有助于分析出现这一情况的原因。

参考文献 Reference:

- [1] COVEY S N, LOMONOSSOFF G P, HULL R. Characterisation of cauliflower mosaic virus DNA sequences which encode major polyadenylated transcripts [J]. *Nucleic Acids Research*, 1981, 9(24): 6735-6747.
- [2] MAZAREI M, YING Z, HOUTZ R L. Functional analysis of the Rubisco large subunit Δ N-methyltransferase promoter from tobacco and its regulation by light in soybean hairy roots [J]. *Plant Cell Reports*, 1998, 17(12): 907-912.
- [3] AN G, COSTA M A, MITRA A, et al. Organ-specific and developmental regulation of the nopaline synthase promoter in transgenic tobacco plants [J]. *Plant Physiology*, 1988, 88(3): 547-552.
- [4] GITTINS J R, JAMES D J. Transgene expression driven by heterologous ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase small-subunit gene promoters in the vegetative tissues of apple (*Malus pumila* Mill.) [J]. *Planta*, 2000, 210(2): 232-240.
- [5] CHAN M T. Tomato plants ectopically expressing *Arabidopsis* CBF1 show enhanced resistance to water deficit stress [J]. *Plant Physiology*, 2002, 130(2): 618-626.
- [6] TU C H, LIU W P, HUANG L L, et al. Cloning and transcriptional activity of a novel ovarian-specific promoter from rat retrovirus-like elements [J]. *Archives of Biochemistry & Biophysics*, 2009, 485(1): 24-29.
- [7] POPA C, NICOLA A, RÜDE U. Targeting transgene expression in research, agricultural, and environmental applications: promoters used in plant transformation [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2004, 40(1): 1-22.
- [8] 傅廷栋. 油菜科学研究与生产有关问题的思考 [C]//中国作物学会油料作物专业委员会七次会员代表大会暨学术年会综述与摘要集. 武汉: 华中农业大学, 2013: 1-5.

FU T D. Rapeseed thinking about the problems of relevant

- scientific research and production of rapeseed[C]//Conference proceeding of Chinese oil crops professional committee of seven times the member representative. Wuhan: Huazhong Agricultural University, 2013: 1-5.
- [9] VOELKER T A, WORRELL A C, ANDERSON L, *et al.* Fatty acid biosynthesis redirected to medium chains in transgenic oilseed plants[J]. *Science*, 1992, 257(5066): 72-74.
- [10] JOSEFSSON L G, LENMAN M, ERICSON M L, *et al.* Structure of a gene encoding the 1.7 S storage protein, napin, from *Brassica napus* [J]. *Journal of Biological Chemistry*, 1987, 262(25): 12196-201.
- [11] ERICSON M L, MURÉN E, GUSTAVSSON H O, *et al.* Analysis of the promoter region of napin genes from *Brassica napus*, demonstrates binding of nuclear protein in vitro, to a conserved sequence motif[J]. *FEBS Journal*, 1991, 197(3): 741-746.
- [12] ZHANG J Y, LI L, SONG Y R, *et al.* Identification of seed-specific promoter nap300 and its comparison with 7S promoter[J]. *Progress in Natural Science: Materials International*, 2002, 12(10): 737-741.
- [13] WHITFIELD H V, MURPHY D J, HILLS M J. Sub-cellular localization of fatty acid elongase in developing seeds of *Lunaria annua*, and *Brassica napus* [J]. *Phytochemistry*, 1993, 32(2): 255-258.
- [14] ELLERSTRM M, STLBERG K, EZCURRA I, *et al.* Functional dissection of a napin gene promoter; identification of promoter elements required for embryo and endosperm-specific transcription[J]. *Plant Molecular Biology*, 1996, 32(6): 1019-1027.
- [15] BOBB A J, CHERN M S, BUSTOS M M. Conserved RY-repeats mediate transactivation of seed-specific promoters by the developmental regulator PvALF[J]. *Nucleic Acids Research*, 1997, 25(3): 641-647.
- [16] OUWERKERK P B F, MEMELINK J. A G-box element from the *Catharanthus roseus*, strictosidine synthase(*Str*) gene promoter confers seed-specific expression in transgenic tobacco plants[J]. *Molecular and General Genetics*, 1999, 261(4-5): 635-643.
- [17] MURPHY D J, HERNÁNDEZ-PINZÓN I, PATEL K. Role of lipid bodies and lipid-body proteins in seeds and other tissues[J]. *Journal of Plant Physiology*, 2001, 158(4): 471-478.
- [18] MURRAY M G, THOMPSON W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8(19): 4321-4325.
- [19] CLOUGH S J, BENT A F. Floral dip: a simplified method for agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Journal*, 1998, 16(6): 735-743.
- [20] JEFFERSON R A, KAVANAGH T A, BEVAN M W. GUS fusions; beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants[J]. *European Molecular Biology Organization Journal*, 1987, 6(13): 3901-3907.
- [21] MORITA A, UMEMURA T, KUROYANAGI M. Functional dissection of a sugar-repressed K-amylase gene (RAmy1A) promoter in rice embryos[J]. *FEBS Letters*, 1998, 423: 81-85.
- [22] MANAVELLA P A, DEZAR C A, ARIEL F D, *et al.* Two ABREs, two redundant root-specific and one W-box cis-acting elements are functional in the sunflower HAHB4 promoter[J]. *Plant Physiology & Biochemistry*, 2008, 46(10): 860-867.
- [23] 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.
- [24] WEIS L, REINBERG D. Transcription by RNA polymerase II; initiator-directed formation of transcription-competent complexes[J]. *Faseb Journal Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology*, 1992, 6(14): 3300-3309.
- [25] LAGERCRANTZ U. Comparative mapping between *Arabidopsis thaliana* and *Brassica niga* indicates that *Brassica* genomes have evolved through extensive genome replication accompanied by chromosome fusions and frequent rearrangements[J]. *Genetics*, 1998, 150(3): 1217-1228.
- [26] EZCURRA I, ELLERSTRM M, WYCLIFFE P, *et al.* Interaction between composite elements in the nap A promoter; both the B-box ABA-responsive complex and the RY/G complex are necessary for seed-specific expression [J]. *Plant Molecular Biology*, 1999, 40(4): 699-709.

Cloning and Function Analysis of Oleosin Promoter P_{BnOA03} from *Brassica napus*

WANG Hailan, JIA Qingli, ZHAO Cuizhu, YANG Zheng, WANG Kai,
LIU Xiangling, TANG Tong, SONG Huan and ZHANG Meng

(College of Agronomy, Northwest A&F University, Yangling Shaanxi 712100, China)

Abstract In order to improve the traits of oilseed, we often need gene specific expression in certain tissues-based on the analysis of expression pattern of oleosins. Based on the analysis of expression pattern of rapeseed oleosins, one seed-specific oleosin gene with higher transcripts level was chosen in this research. Primers were designed according to the genomic sequence of *B. napus* and a 715 bp promoter sequence was amplified from *Brassica napus* genomic by PCR. According to promoter online analysis software, this 715 bp promoter sequence contained some promoter basic elements, such as CAAT-box and TATA-box, and also contained a variety of cis elements such as ABA response element. Furthermore, GUS reporter gene was used to identify the function of the promoter in *Arabidopsis thaliana*. Histochemical staining of GUS activity showed that obvious expression of GUS was not detected in seedling, root, stem, leaf, flower and the seed during early and mature development stages; but high expression levels were found in developing seed at middle and late stages. These results indicate that the promoter of P_{BnOA03} functions in a seed-specific pattern.

Key words *Brassica napus* L.; Oleosin; Promoter; GUS staining; *Arabidopsis thaliana*

Received 2018-03-29

Returned 2018-05-03

Foundation item Key Project of Shaanxi International Cooperation(No. 2012KW-17); National Natural Science Foundation of China(No. 31270295).

First author WANG Hailan, female, master student. Research area: crop biotechnology and breeding research. E-mail: 1539451050@qq.com

Corresponding author ZHANG Meng, male, Ph. D, professor. Research area: plant lipid metabolism and oil crops genetic engineering research. E-mail: zhangmeng@nwsuaf.edu.cn

(责任编辑:成敏 Responsible editor: CHENG Min)