

银杏查尔酮合成酶基因启动子 (*GbCHSP*) 调控元件及功能分析

李琳玲^{1,*}, 程 华^{1,*}, 程水源^{1,**}, 许 锋², 王 燕², 姜德志²

(¹黄冈师范学院生命科学与工程学院, 湖北黄冈 438000; ²长江大学园艺园林学院, 湖北荆州 434025)

摘 要: 通过染色体步移方法从银杏 (*Ginkgo biloba* L.) 基因组中克隆到查尔酮合成酶基因 (*CHS*) 翻译起始位点上游 1 711 bp 的启动子序列。生物信息学分析表明, 该启动子片段中存在多个顺式作用元件, 包括紫外/蓝光响应单元、植物激素响应单元、真菌诱导元件、MYB 结合位点、TATA-box 和 CAAT-box 等。亚克隆了 *CHS* 转录起始位点上游 1 402 bp 序列, 将其与 *GUS* 基因构建融合表达载体 pBI121 + *CHSP*, 以 pBI121-35S 作为负对照, 通过农杆菌 (LBA4404) 介导法分别转入烟草。结果表明, 银杏 *CHS* 启动子序列能驱动 *GUS* 基因在烟草中的表达, 表达具有组织特异性。*GbCHSP* 的功能研究将有助于揭示银杏叶黄酮的积累与 *GbCHS* 基因表达的分子机理。

关键词: 银杏; 查尔酮合成酶基因启动子; *GUS*; 调控元件分析

中图分类号: S 664.3

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2010) 12-1919-10

Regulatory Elements and Functional Analysis of Chalcone Synthase Gene Promoter from *Ginkgo biloba* L.

LI Lin-ling^{1,*}, CHENG Hua^{1,*}, CHENG Shui-yuan^{1,**}, XU Feng², WANG Yan², and JIANG De-zhi²

(¹College of Life Science and Engineering, Huanggang Normal University, Huanggang, Hubei 438000, China; ²College of Horticulture and Gardening, Yangtze University, Jingzhou, Hubei 434025, China)

Abstract: The regulative sequence (1 711 bp) of chalcone synthase gene promoter (*CHSP*) from *Ginkgo biloba* L. was cloned by genomic walking. In silico analysis suggested that the sequence contained several typical cis-acting elements, including UV/blue light responsive elements, phytohormone responsive elements, fungal elicitor responsive elements, MYB binding site, TATA-box and CAAT-box. A 1 402 bp promoter sequence upstream 5' of translation start site of *GbCHS* was cloned and designated as *GbCHSP*, respectively. pBI121 + *CHSP* and pBI121-35S were constructed and transformed into tobaccos by LBA4404. These results showed that pBI121 and pBI121 + *CHSP* both could drive the transient expression of *GUS* in tobaccos and pBI121 + *CHSP* expressed differentially in root, stem and leaf tissues of tobacco. These results will be help to understand the transcriptional regulatory mechanism on *GbCHS* expression and flavonoids accumulation.

Key words: *Ginkgo biloba* L.; chalcone synthase gene promoter; *GUS*; the analysis of cis-element

收稿日期: 2010-09-07; 修回日期: 2010-12-06

基金项目: 国家自然科学基金项目 (30971974); 湖北省自然科学基金重点项目 (2008CDA061)

* 为同等贡献作者

** 通信作者 Author for correspondence (E-mail: s_y_cheng@sina.com)

银杏 (*Ginkgo biloba* L.) 叶片具有重要的药用价值, 其中主要的活性成分是银杏叶黄酮 (van Beek, 2002)。查尔酮合成酶 (Chalcone synthase, CHS) 是植物类黄酮生物合成过程中第一个关键酶, 催化三分子的丙二酰 - CoA 和一分子的对香豆酰 - CoA 结合形成第一个具有 C15 结构的黄酮类化合物——查尔酮 (chalcone)。该产物进一步衍生转化产生了各类黄酮化合物 (Heller & Hahlbrock, 1980)。银杏 CHS 基因的相关研究发现, CHS 基因的转录水平受到遗传、生长条件、激素、光质、损伤等因子的影响, CHS 与银杏叶黄酮含量呈显著正相关, 是银杏叶黄酮合成过程中的关键酶基因 (Pang et al., 2005; 许锋, 2005)。

生物合成途径中基因的协同转录调控是决定代谢产物的一个重要机制, 是由转录因子和基因的上游调控序列相互作用实现的, 反式作用因子与目标基因的启动子区域结合, 在 RNA 聚合酶 II 的作用下调控 mRNA 的合成 (Dynan, 1989)。CHS 属于诱导表达型基因, 其启动子区域除了核心调控序列外, 还含有多个与逆境、激素、组织特异等诱导表达相关顺式元件, 如 ACE 元件、沉默子单元 (Silencer)、H-box、富含 AT 单元等 (Weisshaar et al., 1991; Da et al., 1993; Yu et al., 1993; Kiba et al., 1995)。在拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) CHS 基因启动子序列研究中发现有 UV-A/UV-B/蓝光响应元件, 其表达受到蓝光和紫外的强烈诱导 (Hartmann et al., 1998); 在矮牵牛 (*Petunia hybrida*)、豌豆 (*Pisum sativum*) 中 CHS 启动子中含有多个顺式元件与逆境和时空特异表达有关 (Schmid et al., 1990; van der Meer et al., 1992); 对多种植物的 CHS 启动子研究发现, CHS 基因转录调控是通过 MYB、bHLH 等转录因子结合诱导实现的 (Koes et al., 2005), 正是这些转录因子与顺式元件的相互作用, 决定了 CHS 基因的表达方式受发育和内外因子的复杂调控 (Akira et al., 2003)。尽管关于 CHS 基因启动子的研究报道较多, 但多集中于逆境生长及色素合成调控方面, 关于黄酮代谢积累与启动子功能关系研究鲜有报道。因此研究 CHS 基因上游表达调控元件与反式作用因子的相互作用是调控银杏叶黄酮积累的一个有效途径。

研究结构基因表达调控序列在银杏叶黄酮合成代谢中的作用, 将是银杏类黄酮合成代谢分子机理研究的一个重要方向。作者在前人工作的基础上 (Pang et al., 2005; 许锋, 2005; 许锋 等, 2007), 通过染色体步移克隆了银杏 CHS 基因的上游转录调控序列并做了相应的信息学分析。为进一步了解结构基因 CHS 的调控元件功能以及与所编码的转录因子之间的相互关系, 将 CHS 启动子 (CHSP) 与含有报告基因 GUS 的载体连接并转入烟草, 初步验证了 CHSP 在基因表达方面的功能。

1 材料与方法

1.1 材料

试验样品采集时间为 2009 年 6 月, 载体构建于 2009 年 7 月, 转基因烟草检测时间为 2009 年 7 月至 12 月, 试验地点为湖北荆州和黄冈。

用于 DNA 提取的银杏叶片采集于长江大学银杏苗圃园 12 年生嫁接苗, 品种为家佛手。烟草 (*Nicotiana tabacum*, NC89) 培养条件为光照 16 h/暗 8 h, 150 lx, 温度为 24 °C, 相对湿度 80%。大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 Top10, 农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 及表达载体 pBI121 均为本实验室保存。

Genome Walker™ Universal Kit 购自 Clontech 公司; LA PCR™ Kit、pMD18-T Vector、限制性内切酶、Taq 酶、dNTP、DL2000、T4 DNA polymerase、Prime Script® RT reagent Kit 和 T4 DNA Ligase 均购自大连宝生物工程有限公司; DNA 回收试剂盒为 Axygen 公司产品; 植物总 RNA 提取试剂使用 Invitrogen 公司的 TRIzol® Reagent。PCR 扩增引物合成及序列测定交由上海生工生物技术服务有

限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 总 DNA 和 RNA 的提取

参考 CTAB 法(魏春红和李毅, 2006)提取银杏幼叶 DNA。烟草总 RNA 提取参照 TRIzol Reagent 说明书操作进行。

1.2.2 *CHSP* 启动子克隆

基因组酶切选用平末端限制酶 *EcoR* V、*Dra* I、*Ssp* I 和 *Pvu* II 酶切 6 h, 分别纯化回收; 回收产物与 Genome Walker™ Universal Kit 试剂盒提供的接头连接, 16 °C 条件下连接过夜, 连接产物稀释 10 倍, 置于 -20 °C 保存, 作为步移 PCR 扩增模板。步移中使用到两组巢式引物 CP1、CP2 及 CP3、CP4 (表 1, 表 2), 接头引物 AP1 和 AP2 由试剂盒提供。扩增程序参照 Clontech 公司试剂盒操作步骤进行。扩增 *GbCHSP* 部分序列连接到 pMD18-T 载体并送出测序。依据二次步移扩增序列的拼接结果, 设计全长引物 CHP1 和 CHP2 (表 1, 表 2), 扩增序列亚克隆进 pMD18-T。载体构建设计引物 CPC、CPB、CPU 和 CPD, 分别将全长序列构建到 pBI121 上。

1.2.3 *CHSP* 启动子作用元件分析

将银杏 *CHSP* 序列提交 PlantCARE 服务器(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 和 PLACE 服务器 (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>) 预测启动子保守区域中潜在的顺式作用元件。通过 McPromoter 在线预测了 *GbCHSP* 的转录起始位点。

1.2.4 烟草表达载体构建

pBI121 载体转化烟草作为阳性对照。

pBI121-35S 载体构建。提取 pBI121 质粒, 用 *Cla* I 和 *Bam* H I 酶切 8 h, 回收纯化酶切产物一部分用来构建 pBI121 + *CHSP* 载体, 一部分用 *T4* DNA polymerase 补平, 用 *T4* DNA ligase 自连, 记为 pBI121-35S, 作为转化烟草负对照。

pBI121 + *CHSP* 载体构建。将 CHP1 和 CHP2 扩增得到的 DNA 片段 *CHSP* 克隆到 pMD18-T 载体上, 得到重组质粒 pMD18 + *CHSP*。以 pMD18 + *CHSP* 质粒为基础, 用 CPC 和 CPB 扩增带酶切位点 *GbCHSP* 片段。扩增产物用 *Cla* I 和 *Bam* H I 做双酶切, 纯化后将其连接入线性载体 pBI121-35S 中, 转化大肠杆菌。菌落 PCR 以 CPU 和 CPD 为引物筛选出正向连接阳性克隆载体 pBI121 + *CHSP*, 保存阳性菌。

1.2.5 *CHSP* 转烟草及 GUS 表达鉴定

提取 pBI121 + *CHSP*, pBI121-35S, pBI121 质粒并转化农杆菌 LBA4404 (Holsters et al., 1978)。转化平板抗生素筛选浓度, 利福平为 40 mg · L⁻¹, 卡那霉素为 50 mg · L⁻¹, 并保存。

烟草培养条件为: 24 °C 下光照 16 h 间隔 8 h 暗培养, 烟草再生体系及阳性农杆菌侵染烟草方法参照 Horsch 等(1985)的叶盘法。MS 培养基筛选阳性植株抗生素浓度, 羧苄青霉素钠为 500 mg · L⁻¹; 筛选诱导芽卡那霉素浓度为 100 mg · L⁻¹, 诱导根为 80 mg · L⁻¹。提取转化烟草叶片提取总 DNA 和 RNA, 各 RNA 反转录参照 Prime Script® RT reagent Kit 说明书操作, 用 GUS1 和 GUS2 引物对 DNA 和 cDNA 分别做 PCR 和 RT-PCR, 进一步筛选阳性植株。

转化烟草 GUS 染色及脱色。将烟草 pBI121、pBI121 + *CHSP* 和 pBI121-35S 阳性转化植株取出洗净置于 GUS 染色液 (50 mmol · L⁻¹ Na₃PO₄, pH 7.0, 10 mmol · L⁻¹ EDTA, 2 mmol · L⁻¹ 5-溴-4-氯-3-吡啶-葡萄糖苷, 1 mmol · L⁻¹ KCN) 中, 37 °C 染色过夜。待染色斑点出现后, 将染色组织放入 70%乙醇中脱去叶绿素, 并固定染色。

表 1 银杏 *CHSP* 步移及分析引物
Table 1 The genomewalker and analysis primers of *GbCHSP*

| 引物名称 Name of primers | 编号 Serial number | 序列 Primer sequences (5' - 3') |
|-------------------------------------------------------------|---------------------|----------------------------------|
| 基因组步移引物 Genomewalker primers | AP1 | GTAATACGACTCACTATAGGGC |
| | AP2 | ACTATAGGGCACGCGTGGT |
| | CP1 | TGAATGCCTCCAAGCTTCCATCGCT |
| | CP2 | AGTGGCTGGACCATCCGACCTCT |
| | CP3 | GGAGGAGGCTATGGAAATTTAATGTCGT |
| | CP4 | TTAGAAGGGTAGATAACTTGTAGCTC |
| <i>CHSP</i> 全长扩增引物 Primers for <i>CHSP</i> amplification | CHP1 | TGGAACGATTGATGGAATCCGA |
| | CHP2 | CGCTCTTGCGGTCGTACTATGC |
| 载体构建引物 Primers for construction of fusion vector | CPC | GATCGATCTGGAACGATTGATGGAATCCGA |
| | CPB | AGGATCCACGCTCTTGCGGTCGTACTATGC |
| 检测引物 Primers for verification | CPU | CGAGTGCCAACGACCATGAAT |
| | CPD | ACCCACACTTTGCCGTAATGAG |
| | GUS1 | GTCAACGGGGAAACTCAGCAAG |
| | GUS2 | TGAGCGTCGCAGAACATTACAT |

表 2 PCR 扩增程序
Table 2 The processes of PCR

| PCR | 引物 Primers | 程序 Procedure |
|--------------------------------------------|----------------|------------------------------------------------|
| 步移PCR Genomewalker PCR | AP1, CP1 (CP3) | 98 ℃, 8 s; 68 ℃, 180 s; 32 cycles |
| | AP2, CP2 (CP4) | 94 ℃, 40 s; 58 ℃, 40 s; 72 ℃, 180 s; 32 cycles |
| <i>CHSP</i> 全长扩增 Full length amplification | CHP1, CHP2 | 94 ℃, 40 s; 57 ℃, 40 s; 72 ℃, 120 s; 32 cycles |
| 载体构建 Construction of fusion vector | CPC, CPB | 94 ℃, 30 s; 61 ℃, 40 s; 72 ℃, 120 s; 32 cycles |
| 检测扩增 Verification by PCR | CPU, CPD | 94 ℃, 30 s; 58 ℃, 40 s; 72 ℃, 2 min; 35 cycles |
| | GUS1, GUS2 | 94 ℃, 30 s; 58 ℃, 40 s; 72 ℃, 2 min; 35 cycles |

2 结果与分析

2.1 *CHSP* 上游 DNA 序列获得及验证

以银杏叶片的总 DNA 为模板，经过步移引物 CP1 和 CP2 的两轮 PCR 扩增，得到了一条长度约 900 bp 的 *CHS* 基因的上游序列（图 1，A）。获得序列经测序并与 *CHS* 基因序列比对，发现位于 *CHS* 基因起始密码子 ATG 上游序列长度为 800 bp。为了获得更完整的表达调控区域以确保其顺式元件功能，以此序列作为模板设计引物 CP3 和 CP4，继续扩增上游序列，得到一条长度约为 1 000 bp 的 DNA 序列（图 1，B），测序结果表明该序列与第一次序列有 203 bp 的重复区域，经过序列拼接得到翻译起始位点上游 1 711 bp 非编码序列，以此为基础扩增出 *CHSP* 全长序列并连接入 pMD18-T 保存（图 1，C）。

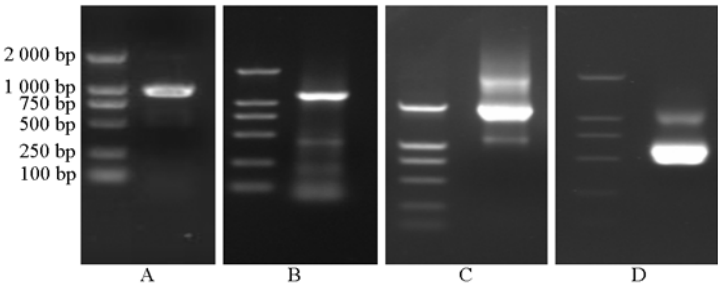


图 1 *GbCHS* 启动子扩增及载体构建电泳

A. 第一次步移产物；B. 第二次步移；C. 全长 *CHSP* 扩增；D. pBI121 + *CHSP* 载体构建检测。

Fig. 1 The promoter sequence of *GbCHS* and vector construction

A. The first-time amplification of genomewalker; B. The nested amplification; C. Full length amplification; D. Checking of pBI121 + *CHSP*.

2.2 启动子顺式作用元件预测和序列分析

将银杏 *CHSP* 提交 PlantCARE 服务器进行分析, 预测结果见图 2。转录起始位点预测表明, *CHSP* 转录可能位于翻译起始位点上游 98 bp 的碱基 (CCAATTG) 处 (图 2), 通过对上游编码序列分析发现, 转录起始位点上游 -44 bp 处有 1 个 TATA-box, -96 bp 处含有 1 个 CAAT-box 顺式作用元件, 推测该区域可能构成了 *CHS* 基因启动子的核心序列 (图 2)。

```

1  TGGAACGATT GATGGAATCC GACCTCCCAGAAATAAGTAGGAGGTCAATGAAGAAGGATGT TCCTCAATCA
   Blue or UV light      Q-element
71  AATATCCAATTGATCACCAC GTCGGTATTGTAAATACGCAGTTACGAATAATCCGGCCAAAGTGATAGGA
   MYB-binding
141  ATTAGACCTAACACAATTCC GGATGGCAAAGCTTCAATCATTTCAATTCAAAAGGAATAAA TAGAGTTGAT
   ERE
211  ATCTACACCGGATAGTACCC AATACTACGGGATGAGTAAGTTTCAGACGCGTGCCCTATAGTAAGTATAGG
   ABRE-1      Ca-Cis
281  GCACGCGTGGTCGACGGCCCC GGGCTGGTAAAAAATAAAGAGGCTCAC TCACAATATGAGCCATAACA
   Ca-Cis      CBF
351  TAATCCAATAATGTACAAATTAACATAATGTAATATTACATAAGAAGGTGGCTAAAAT AAAATACAAT
   CPB
421  GCCACATAAT GAAGCACTAC AAAC TAATAA CATCACTACAAAGCCCCGAAGAGCTAGAGC TAACACATGT
   ABRE-1
491  CATAAGCAAAACGTAAC TCGAGACCACCCAGTACGGGAGGT CCGTCC-box
561  CCCTCGCTGCTGGGAATGCC ACGTCAACCAACCCCACTGGCAAGCGGGGGGTAAAACGTGCAACAGTG
   TGA-box      MeJA-RE      RS-1
631  TGCGCCTTGAATTGTTTCTACAATGTTAAATCTCCATAGCCTCCTCCAAATGGTCAAC GTGAAGTAAC
   AE-box
701  ATTGTGTAATTTCAATGACC CCACATCAAAGGATATATATGTTTCATCTCTGAAAGCTACAAGGTATCTAC
   W-box
771  CATTCTAATAATCGGTGTTGT TGGGTGTGTGCATGTGCAAATTACAAATTATTTGTCTCTGAAAGTTGTTAA
   CPB      ARF
841  TAATAAATCGGATGCGCCTA TGGTGTGCACCTTAGAATTATTTTACAACATTAATTTCTGTAGCCTCT
   W-box      Blue or UV light
911  TTCAAATGGTCAACGTAAAATAACATTGTGTAATTTCAATGACCCACATCAAAGAATA TCTATGTTCA
   CPB
981  TCTCCGAGAGCTACAAGTTA TCTACCTTCTTAATATCAATGTTGTTAGATGCATGTGTATGCAAATTACA
   AE-box
1051  AACTATTGTTTCTAAAAATT ATTAATAATAAATCGGATACACCTACAATGTAAACCTTGAAATTGTTTGT
   W-box
1121  ACGACATTAAATTTCCATAG CCTCCTCCAAAATGGTTAATGTAAAGTAACATTGTATAATTTCAATGACC
   MeJA-RE      EEC
1191  CCACGTCAAAAGAAATCTAC GCTTATCTCGGAGAGTTACAAGGTATCTGT CATTCCAATATTGATGTTGT
1261  TGGACGCATGTGTGTACAAA TTACAAATTATTATCTCTACCCGTCGTTAATAATAAATGAAATGCAGTCA
   GC-motif      CIR
1331  TAATTGCGCCTTAAATTTGT TTGTACGATATTAAAT CCCCCTGGCCTCCAAAATGATCAT CGTAAAGTAA
   W-box
1401  AGTAAGATTATGTAATTTCAATGACCCCATATCAAAGGATATCTCCGTTTCATCTGGGATA GCTACATGGT
   W-box
1471  ATCCGCCATTCCAATATCAG CTTTGAACAGTGCAGCAGCAGTGCCTTCAATCTAACCTCGCGAGTGCCAA
   ABRE      -96
1541  CGACCATGAATTCTGCGGTG GCGAATGAGTATAAACTTGGCAGCGGCAGAGACCCCATATGTTCTCGCAA
   -44
1611  GCTCCAATTGCCATTGTTT GTACAACGAGTTTCTCTGGCTTGAATTCCTCTGCCTCCGAGAGCATTCAT
   +1
1681  CGCAGTATTGCATAGTACGA CCGCAAGAGCGATGGAAGACTTGGAGGCATTCAGGAAGGCACAGAGGTCTG
1751  GATGGTCCAGCCACTA

```

图 2 银杏 *CHS* 基因启动子区域序列及预测转录因子结合位点

Fig. 2 Nucleotide sequence (part) and in silico prediction of TBFs of the *GbCHS* promoter region

分析还发现 *GbCHSP* 含有多个光强、紫外、干旱、水分、伤害、金属离子和细胞周期诱导响应元件 (图 2)。其中光强和紫外响应元件序列为 AGAATA (-1 350 和 -414 bp) (Thum et al., 2001), 标记为 Blue 或 UV-A light; 另外, 在 *GbCHSP* 上还发现与欧芹 (*Petroselinum crispum*) 中一致的光调控相关序列 GCCACGTCA (-801 bp) (Block et al., 1990)。抗逆性相关的调控元件有多个: 脱水相关单元 CBF (GTCGAC) (Svensson et al., 2006) 位于 -1 089 bp 处; Ca 离子调控响应单元 Ca-Cis (MACGYGB) (Kaplan et al., 2006) 位于 -1 332、-997 和 -106 bp; 其中包含一个黄化和脱水诱导相关元件为 ABRE-like (ACGT) (Simpson et al., 2003); 抗病响应单元 BIHD (TGTCA) (Luo et al., 2005) 分别位于 -1 251、-1 126 和 -376 bp; 抗氧化响应单元 (RGTGACNNNGC) (Rushmore et al., 1991) 位于 -1 036 bp 处; 氧胁迫和铜离子响应元件 CuRE (GTAC) (Quinn et al., 2000, 2002)。

与组织特异表达相关的有: K 离子通道调节组织特异表达基因 *STK-1* (TAAAG, - 221 bp) (Plesch et al., 2001); 组织特异性表达相关 CCGTCC-box (- 1 081 bp) (Saha et al., 2007); 与维管组织合成相关 BS-1 单元 (AGCGGG, - 1 010 bp) (Lacombe et al., 2000); MYB 结合位点 (TAACTG, - 1 505 bp) (Urao et al., 1993); MYC 结合位点 (CAACGTG, - 927 bp) (Zhu et al., 2003); 生理周期调节相关 CIR (CAANNNNATC, - 235 bp) (Piechulla et al., 1998)。转录信号增强方面, 含有一个衣藻 (*Chlamydomonas reinhardtii*) 碳酸酐酶转录增强元件 EEC (GANTTNC, - 391 bp) (Yoshioka et al., 2004) 和一个转录增强信号 Q-Element (AGGTCA, - 1 573 bp) (Hamilton et al., 1998)。

另外, 不同激素 (ABA、auxin、GA、ethylene 等) 响应顺式作用元件也在上游序列中有发现 (图 2)。生长素响应元件有 2 个: 1 个是 ARF 结合位点 (TGTCTC) (Inukai et al., 2005), 位于 - 792 bp 处; 另 1 个是 TGA-box (TGACGTGGC) (Liu et al., 1994), 位于 - 1 036 处; 与细胞分裂素相关的 CPB 位点 (CTAATA) (Fusada et al., 2005) 有 3 个, 分别位于 - 1 170、- 839 和 - 604 bp 处; ABA 响应因子 ABRE (ACACNNG) (Lopez-Molina & Chua, 2000) 有 2 个, 分别位于 - 1 399 和 - 1 131 bp; W-box 单元与损伤诱导和赤霉素信号传递相关 (TGACCCC) (Nishiuchi et al., 2004; Zhang et al., 2004; Xie et al., 2005), 分别位于 - 663, - 428 和 - 192 bp; 与乙烯利响应相关单元为 ERE (AWTTCAAA) (Rawat et al., 2005), 位于 - 1 429 bp 处。

2.3 功能验证表达载体构建

为了更精确地鉴定银杏 *CHS* 基因上游编码序列调控基因表达模式的可靠性, 将 *CHSP* 连接到去除 CaMV 35S 启动子的 pBI121 载体上, 构建 pBI121 + *CHSP* 经检测引物确定 *CHSP* 已经正向插入到 *GUS* 基因上游, 检测扩增序列扩增大小为 500 bp (图 1, D), 与设计大小一致。去除 35S 启动子的 pBI121 载体作为负对照, pBI121 载体作为正对照 (图 3)。

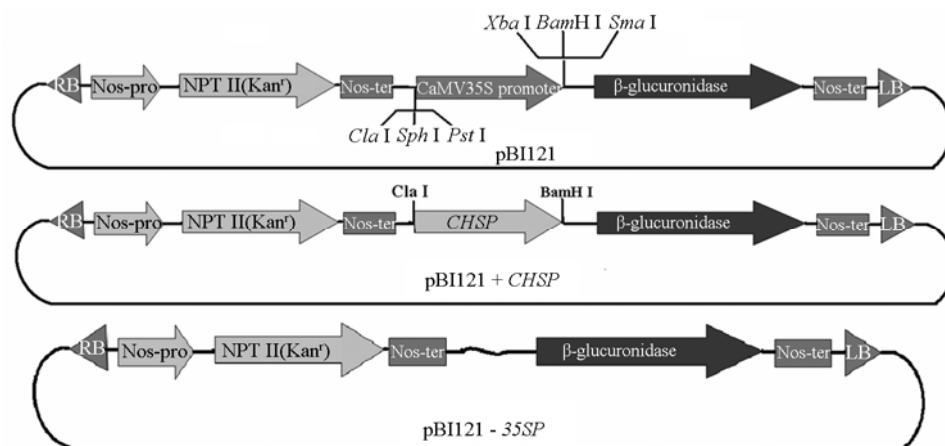


图 3 *CHSP* 表达载体及正负对照载体的构建

Fig. 3 Construction of expression vectors

2.4 转化阳性烟草 GUS 染色分析

转基因烟草为单株烟草苗来源无性系材料。将无性系分化苗随机取 1 株作为 GUS 染色对照, 经染色反应及脱叶绿素后基本呈现无色 (图 4, A)。

pBI121 + *CHSP* 转基因烟草 GUS 染色: 抗生素初步筛选, 发现整块愈伤组织团及不定芽都有较高的 GUS 活性 (图 4, E)。通过抗生素和 PCR 及 RT-PCR 筛选到得到 10 株转化再生苗阳性植株。随机选取 6 株进行 GUS 染色反应, 其中 2 株生长 15 d 叶片和茎部大量着色, 根部基本无明显着色

(图 4, A、B); 另 1 株生长 15 d 叶位着色较深, 茎部和根部着色较浅 (图 4, C); 第 3 株生长 30 d, 叶片组织有染色, 其他组织部位不明显; 第 4、5、6 株部分叶片、茎顶端分生组织及其愈伤组织染色较深 (图 4, E ~ G)。切片显示, pBI121 + *CHSP* 阳性植株中, GUS 活性主要集中于靠近叶脉细胞、部分叶片区域细胞、维管束细胞、部分韧皮部细胞及根部顶端分生组织 (图 4, J ~ M)。

pBI121 转基因烟草 GUS 染色: 获得 3 株阳性苗。从中随机选取 1 株, GUS 染色反应显示其叶茎根中都有大量的 GUS 活性, 其中茎部和叶脉着色较深, 叶和根部着色相对较浅 (图 4, H)。

pBI121-35S 转基因烟草 GUS 染色: 获得 4 株阳性苗。选取 1 株进行 GUS 组织化学染色, 发现在顶端叶片有斑点状染色区域, 根部顶端有较浅的染色出现, 而茎部基本无 GUS 活性 (图 4, I)。

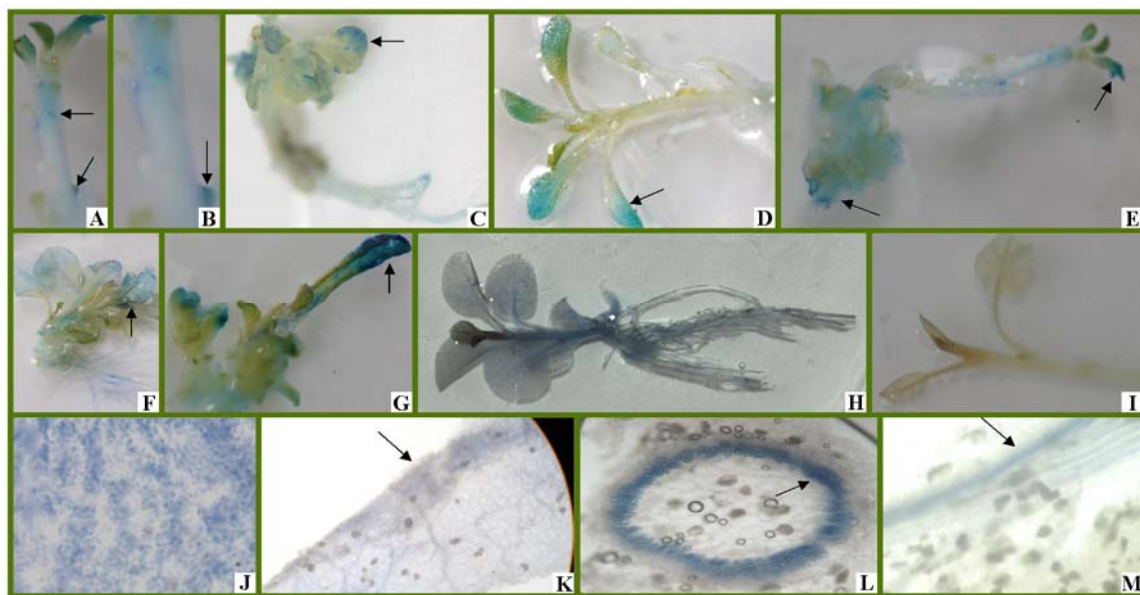


图 4 *GbCHS* 启动子转基因烟草 GUS 组织化学染色

A ~ G: 转 pBI121 + *CHSP* 烟草阳性苗; H: 转 pBI121 烟草阳性苗; I: 转 pBI121-35S 烟草再生植株;

J ~ M: 转 pBI121 + *CHSP* 烟草叶、茎、根部组织。

Fig. 4 Characterization of GUS reporter gene expression under the control of the *GbCHSP* and 35S promoter in transgenic tobacco plants

A - G: The transgenic tobacco with pBI121 + *CHSP*; H: Tobacco plants transformed with pBI121; I: pBI121-35S transgenic tobacco;

J - M: GUS activity in leaf, stem, root tissues of transgenic tobacco.

3 讨论

本研究通过染色体步移方法克隆了 *CHS* 基因转录起始位点上游 1 402 bp 的启动子序列, 命名为 *CHSP*, 对其调控区域进行了生物信息学分析。为了进一步研究 *CHSP* 调控区的功能, 构建了 pBI121 + *CHSP* 表达载体, 并转入烟草中做初步功能鉴定。

在银杏叶片类黄酮的合成代谢过程中, 内源激素与黄酮含量变化具有一定相关性。其中乙烯和脱落酸是促进类黄酮合成的, 乙烯和脱落酸含量的升高有利于银杏叶黄酮的积累 (王燕和程水源, 2002; 程水源 等, 2004)。而 *CHSP* 含有 ERE、DPBF 元件, 预示乙烯和脱落酸促进银杏叶黄酮的积累与 *CHSP* 中的 ERE 元件和多个 DPBF 元件诱导 *CHS* 表达量升高有关。*CHSP* 中含有 3 个 WRKY 因子的作用元件 W-box 单元, 而 WRKY 的转录水平受到 GA 的抑制作用 (Zhang et al., 2004), 因此推测较高浓度的外源 GA 抑制 WRKY 的表达, 从而抑制 *CHSP* 的转录调节作用。早期研究表明, 植物体内源 GA 含量高时不利于类黄酮的合成 (Hinderer et al., 1984), 银杏叶黄酮的积累也受到内

源 GA 的抑制 (程水源 等, 2004)。因此 GA 对银杏叶黄酮积累的抑制作用与 *CHS* 基因表达量下降有关。拟南芥中发现, 外源 CTKs 有利于提高 *CHS* 基因的表达水平 (Deikman & Hammer, 1995)。银杏叶中内源 CTKs/ABA 比值变化能影响叶黄酮的积累 (程水源 等, 2004), 银杏 *CHSP* 上含有 CTKs 绑定蛋白结合元件 CPB 单元, 说明银杏叶 *CHS* 表达水平的变化与 CTKs 和其他激素相互作用有关。在 *CHSP* 中发现的多个 ARF 因子集合单元和 TGA-box 都涉及到生长素对基因表达的调节控制, 生长素与 ARF 蛋白结合后作用于启动子区域正向调节基因的转录 (Liu et al., 1994), 因此可以预测生长素有利于银杏叶 *CHS* 的转录水平提升, 但是否有利于叶黄酮积累还需进一步研究。

黄酮积累受外界多种环境因子的影响, 在 *CHSP* 的分析中也体现了这一点。*CHSP* 扫描结果显示有多个与拟南芥中相似的紫外响应因子结合位点。在银杏中, *CHS* 基因的表达水平受到紫外的上调 (Pang et al., 2005), 这与 *CHSP* 中的紫外响应单元密切相关。银杏 *CHSP* 含有多个 Ca-Cis 单元, 该单元包括 ABRE-like 基序, ABRE 四聚体结合到 Ca 响应顺式元件上, 从而启动与胞质 Ca 离子浓度改变相关的信号转导, Ca^{2+} 能介导多种信号转导 (Kaplan et al., 2006), 因此环境因子对 *CHS* 表达量的影响可能通过 *CHSP* 中的 ABRE 单元来起作用。低浓度的 Cu^{2+} 能提高银杏盆栽苗的叶黄酮含量并延长最佳采收期 (王燕 等, 2007), *CHSP* 中含有一个 CuRE 基序, 该顺式元件受到 Cu^{2+} 信号转到蛋白的正诱导作用 (Quinn et al., 2000), 因此推测, Cu^{2+} 引起的黄酮含量的积累与 CuRE 调节 *CHS* 转录本升高有关。烟草受到外界伤害时, WRKY 因子能够迅速结合到顺式元件 W-box 上诱导相关基因的表达 (Nishiuchi et al., 2004)。*CHSP* 中含有 3 个明显的 W-box, 这为伤害刺激下 *CHS* 表达量和黄酮含量升高提供了分子依据 (Pang et al., 2005)。

转 pBI121 + *CHSP* 基因烟草 GUS 染色分析中, 叶片和茎部组织大量着色, 说明 *CHSP* 具有完整的启动子功能, 启动 *GUS* 基因在烟草不同组织表达, 表达结果与银杏中 *CHS* 基因的组织表达模式 (Pang et al., 2005) 基本一致。从 *CHSP* 的扫描分析结果发现, 其启动子区域也含有组织特异性表达调控元件 STK-1、Q-Element 和 CCGTCC-box, 在玉米中, 两种特异 DOF 因子与 STK-1 的结合能调节叶组织和光合作用相关基因的表达 (Yanagisawa & Sheen, 1998), 而 Q-element 的存在能提高基因在花粉中的表达量 (Hamilton et al., 1998)。这暗示银杏 *CHS* 基因的不同组织表达模式与 *CHSP* 中的 STK-1 顺式作用元件和 Q-element 密切相关。大豆 *CHS* 启动子驱动的 *GUS* 在烟草茎和根的维管束细胞中大量表达 (Schmid et al., 1990)。在 *GbCHSP* 中发现有与维管束合成相关的顺式作用元件 BS-1, 并且转 pBI121 + *CHSP* 基因烟草组织染色也证实在叶脉、茎部和根部维管束中有大量的 GUS 活性。类黄酮积累和木质素合成都属于苯丙烷代谢途径分支, 因此 *GbCHSP* 有可能参与调节银杏类黄酮积累和木质素合成动态平衡的作用。目前关于黄酮类化合物合成的生理周期调节的报道较少, 在番茄中发现的 CIR 调控单元是控制与光周期及生物钟相关基因 *LHC* 表达的 1 个调控元件 (Piechulla et al., 1998), 拟南芥种子萌发时, 光线, 特别是蓝光和紫外强烈诱导黄酮合成基因的表达 (Kubasek et al., 1992), 银杏 *CHS* 的转录水平同样受到蓝光和 UV-B 的诱导 (Pang et al., 2005)。因此, *CHSP* 中发现的 CIR 调节单元对 *CHS* 基因响应光周期调控起到了重要作用。

References

- Akira N, Yoko I, Masumi Y. 2003. Spatial and temporal expression of chalcone synthase and dihydroflavonol 4-reductase genes in the asiatic hybrid lily. *Plant Science*, 165 (4): 759 - 766.
- Block A, Dangl J L, Hahlbrock K, Schulze-Lefert P. 1990. Functional borders, genetic fine structure, and distance requirements of *cis* elements mediating light responsiveness of the parsley chalcone synthase promoter. *PNAS*, 87 (14): 5387 - 5391.
- Cheng Shui-yuan, Wang Yan, Li Jun-kai, Fei Yong-jun, Zhu Gui-cai. 2004. Study on the relationship between the endogenous hormones and flavonoids in *Ginkgo biloba* leaf. *Scientia Silvae Sinicae*, 40 (6): 45 - 49. (in Chinese)
- 程水源, 王 燕, 李俊凯, 费永俊, 朱桂才. 2004. 内源激素含量与银杏叶中类黄酮含量的关系. *林业科学*, 40 (6): 45 - 49.

- Da C E, Klein L, Schmelzer E. 1993. BPF1, a pathogen induced DNA binding protein involved in the plant defense response. *Plant Journal*, 24 (4): 125 - 135.
- Deikman J, Hammer P E. 1995. Induction of anthocyanin accumulation by cytokinins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiology*, 108 (1): 47 - 57.
- Dynan W. 1989. Modularity in promoters and enhancers. *Cell*, 58 (1): 1 - 4.
- Fusada N, Masuda T, Kuroda H, Shimada H, Ohta H, Takamiya K. 2005. Identification of a novel cis-element exhibiting cytokinin-dependent protein binding *in vitro* in the 5'-region of NADPH-protochlorophyllide oxidoreductase gene in cucumber. *Plant Molecular Biology*, 59 (4): 631 - 645.
- Hamilton D A, Schwarz Y H, Mascarenhas J P. 1998. A monocot pollen-specific promoter contains separable pollen-specific and quantitative elements. *Plant Molecular Biology*, 38 (4): 663 - 669.
- Hartmann U, Valentine W J, Christie J M, Hays J, Jenkins G I, Weisshaar B. 1998. Identification of UV/blue light-response elements in the *Arabidopsis thaliana* chalcone synthase promoter using a homologous protoplast transient expression system. *Plant Molecular Biology*, 36 (5): 741 - 754.
- Heller W, Hahlbrock K. 1980. Highly purified "flavanone synthase" from parsley catalyzes the formation of naringenin chalcone. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 200 (2): 617 - 619.
- Hinderer W, Petersen M, Seitz H U. 1984. Inhibition of flavonoid biosynthesis by gibberellic acid in cell suspension cultures of *Daucus carota* L. *Planta*, 160 (6): 544 - 549.
- Holsters M, Waele D, Depicker A, Messens E, Montagu M, Schell J. 1978. Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens*. *Molecular and General Genetics MGG*, 163 (2): 181 - 187.
- Horsch R B, Fry J E, Hoffmann N L, Eichholtz D, Rogers S G, Fraley R T. 1985. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 227 (4691): 1229 - 1231.
- Inukai Y, Sakamoto T, Ueguchi-Tanaka M, Shibata Y, Gomi K, Umemura I, Hasegawa Y, Ashikari M, Kitano H, Matsuoka M. 2005. Crown rootless1, which is essential for crown root formation in rice, is a target of an AUXIN RESPONSE FACTOR in auxin signaling. *Plant Cell*, 17 (5): 1387 - 1396.
- Kaplan B, Davydov O, Knight H, Galon Y, Knight M R, Fluhr R, Fromm H. 2006. Rapid transcriptome changes induced by cytosolic Ca^{2+} transients reveal ABRE-related sequences as Ca^{2+} -responsive *cis* elements in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 18 (10): 2733 - 2748.
- Kiba A, Toyoda K, Ichinose Y. 1995. Specific inhibition of cell wall bound ATPase by fungal suppressor from mycosphaera rellapiodes. *Plant Cell Physiology*, 36 (4): 809 - 817.
- Koes R, Verweij W, Quattrocchio F. 2005. Flavonoids: A colorful model for the regulation and evolution of biochemical pathways. *Trends in Plant Science*, 10 (5): 236 - 242.
- Kubasek W, Shirley B, McKillop A, Goodman H, Briggs W, Ausubel F. 1992. Regulation of flavonoid biosynthetic genes in germinating *Arabidopsis* seedlings. *Plant Cell*, 4 (10): 1229 - 1236.
- Lacombe E, van Doorselaere J, Boerjan W, Boudet A M, Grima-Pettenati J. 2000. Characterization of cis-elements required for vascular expression of the cinnamoyl CoA reductase gene and for protein-DNA complex formation. *The Plant Journal*, 23 (5): 663 - 676.
- Liu Z B, Ulmasov T, Shi X, Hagen G, Guilfoyle T J. 1994. Soybean GH3 promoter contains multiple auxin-inducible elements. *Plant Cell*, 6 (5): 645 - 657.
- Lopez-Molina L, Chua N H. 2000. A null mutation in a bZIP factor confers ABA-insensitivity in *Arabidopsis thaliana*. *Plant and Cell Physiology*, 41 (5): 541 - 547.
- Luo H, Song F, Goodman R M, Zheng Z. 2005. Up-regulation of *OsBIHD1*, a rice gene encoding BELL homeodomain transcriptional factor, in disease resistance responses. *Plant Biology*, 7 (5): 459 - 468.
- Nishiuchi T, Shinshi H, Suzuki K. 2004. Rapid and transient activation of transcription of the *ERF3* gene by wounding in tobacco leaves: Possible involvement of NtWRKYs and autorepression. *Journal of Biological Chemistry*, 279 (53): 55355 - 55361.
- Pang Y, Shen G, Wu W, Liu X, Lin J, Tan F, Sun X, Tang K. 2005. Characterization and expression of chalcone synthase gene from *Ginkgo biloba*. *Plant Science*, 168 (6): 1525 - 1531.
- Piechulla B, Merforth N, Rudolph B. 1998. Identification of tomato *Lhc* promoter regions necessary for circadian expression. *Plant Molecular Biology*, 38 (4): 655 - 662.
- Plesch G, Ehrhardt T, Mueller-Roeber B. 2001. Involvement of TAAAG elements suggests a role for Dof transcription factors in guard cell-specific gene expression. *The Plant Journal*, 28 (4): 455 - 464.
- Quinn J M, Barraco P, Eriksson M, Merchant S. 2000. Coordinate copper- and oxygen-responsive *Cyc6* and *Cpx1* expression in *Chlamydomonas* is mediated by the same element. *Journal of Biological Chemistry*, 275 (9): 6080 - 6089.
- Quinn J M, Eriksson M, Moseley J L, Merchant S. 2002. Oxygen deficiency responsive gene expression in *Chlamydomonas reinhardtii* through a copper-sensing signal transduction pathway. *Plant Physiology*, 128 (2): 463 - 471.
- Rawat R, Xu Z F, Yao K M, Chye M L. 2005. Identification of cis-elements for ethylene and circadian regulation of the *Solanum melongena* gene

- encoding cysteine proteinase. *Plant molecular biology*, 57 (5): 629 – 643.
- Rushmore T H, Morton M R, Pickett C B. 1991. The antioxidant responsive element. Activation by oxidative stress and identification of the DNA consensus sequence required for functional activity. *Journal of Biological Chemistry*, 266 (18): 11632 – 11639.
- Saha D, Prasad A, Sujatha T, Kumar V, Jain P, Bhat S, Srinivasan R. 2007. In silico analysis of the lateral organ junction (*loj*) gene and promoter of *Arabidopsis thaliana*. *In Silico Biology*, 7 (1): 7 – 19.
- Schmid J, Doerner P, Clouse S, Dixon R, Lamb C. 1990. Developmental and environmental regulation of a bean chalcone synthase promoter in transgenic tobacco. *Plant Cell*, 2 (7): 619 – 631.
- Simpson S D, Nakashima K, Narusaka Y, Seki M, Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. 2003. Two different novel *cis*-acting elements of *erd1*, a *clpA* homologous *Arabidopsis* gene function in induction by dehydration stress and dark-induced senescence. *The Plant Journal*, 33 (2): 259 – 270.
- Svensson J T, Crosatti C, Campoli C, Bassi R, Stanca A M, Close T J, Cattivelli L. 2006. Transcriptome analysis of cold acclimation in barley *Albina* and *Xantha* mutants. *Plant Physiology*, 141 (1): 257 – 270.
- Thum K E, Kim M, Morishige D T, Eibl C, Koop H-U, Mullet J E. 2001. Analysis of barley chloroplast *psbD* light-responsive promoter elements in transplastomic tobacco. *Plant Molecular Biology*, 47 (3): 353 – 366.
- Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao S, Shinozaki K. 1993. An *Arabidopsis myb* homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell*, 5 (11): 1529 – 1539.
- van Beek T. 2002. Chemical analysis of *Ginkgo biloba* leaves and extracts. *Journal of Chromatography A*, 967 (1): 21 – 55.
- van der Meer I M, Brouwer M, Spelt C E, Mol J N, Stuitje A R. 1992. The TACPyAT repeats in the chalcone synthase promoter of *Petunia hybrida* act as a dominant negative *cis*-acting module in the control of organ-specific expression. *The Plant Journal*, 2 (4): 525 – 535.
- Wang Yan, Cheng Shui-yuan. 2002. Study on the effects of regulating measures on the flavonoids contents in *Ginkgo biloba* leaves. *Hubei Agricultural Science*, 40 (5): 103 – 105. (in Chinese)
- 王 燕, 程水源. 2002. 提高银杏叶黄酮含量的调控措施. *湖北农业科学*, 40 (5): 103 – 105.
- Wang Yan, Li Lin-ling, Xu Feng, Liu Wei-hong, Cheng Shui-yuan. 2007. Effects of some metal ions on phenylalanine ammonia-lyase activities and flavonoids content of *Ginkgo biloba* leaves in the potted orchard. *Journal of Nanjing Forestry University: Natural Sciences Edition*, 31 (2): 68 – 72. (in Chinese)
- 王 燕, 李琳玲, 许 锋, 刘卫红, 程水源. 2007. 金属离子对盆栽银杏叶 PAL 酶活及黄酮含量的影响. *南京林业大学学报: 自然科学版*, 31 (2): 68 – 72.
- Wei Chun-hong, Li Yi. 2006. Isolation of total DNA from plant. *Experimental techniques in modern molecular biology*. Beijing: Higher Education Press. (in Chinese)
- 魏春红, 李 毅. 2006. 植物总 DNA 的提取. *现代分子生物学实验*. 北京: 高等教育出版社.
- Weisshaar B, Armstrong G A, Block A. 1991. Light inducible and constitutively expressed DNA binding proteins recognizing a plant promoter element with functional relevance in light responsiveness. *EMBOJ*, 10 (7): 1777 – 1786.
- Xie Z, Zhang Z L, Zou X, Huang J, Ruas P, Thompson D, Shen Q J. 2005. Annotations and functional analyses of the rice *WRKY* gene superfamily reveal positive and negative regulators of abscisic acid signaling in aleurone cells. *Plant Physiology*, 137 (1): 176 – 189.
- Xu Feng. 2005. Molecular cloning and expression of chalcone synthase gene and phenylalanine ammonia-lyase gene from *Ginkgo biloba* [M. D. Dissertation]. Wuhan: Huazhong Agricultural University: 52 – 53. (in Chinese)
- 许 锋. 2005. 银杏查尔酮合成酶基因和苯丙氨酸解氨酶基因的克隆及表达 [硕士论文]. 武汉: 华中农业大学: 52 – 53.
- Xu Feng, Cheng Shui-yuan, Wang Yan, Li Lin-ling, Cheng Shu-han. 2007. Efficient amplification and sequence analysis of chalcone synthase gene from *Ginkgo biloba* by thermal asymmetric interlaced PCR. *Journal of Fruit Science*, 24 (2): 237 – 243. (in Chinese)
- 许 锋, 程水源, 王 燕, 李琳玲, 程述汉. 2007. TAIL-PCR 方法快速克隆银杏查尔酮合成酶基因及序列分析. *果树学报*, 24 (2): 237 – 243.
- Yanagisawa S, Sheen J. 1998. Involvement of maize Dof zinc finger proteins in tissue-specific and light-regulated gene expression. *Plant Cell*, 10 (1): 75 – 90.
- Yoshioka S, Taniguchi F, Miura K, Inoue T, Yamano T, Fukuzawa H. 2004. The novel Myb transcription factor LCR1 regulates the CO₂-responsive gene *Cah1*, encoding a periplasmic carbonic anhydrase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell*, 16 (6): 1466 – 1477.
- Yu L M, Lamb C J, Dixon R A. 1993. Purification and biochemical characterization of proteins which bind to the H box *cis*-element implicated in transcriptional activation of plant defense genes. *Plant Journal*, 3 (6): 805 – 809.
- Zhang Z L, Xie Z, Zou X, Casaretto J, Ho T D, Shen Q J. 2004. A rice *WRKY* gene encodes a transcriptional repressor of the gibberellin signaling pathway in aleurone cells. *Plant Physiology*, 134 (4): 1500 – 1513.
- Zhu Y, Cai X L, Wang Z Y, Hong M M. 2003. An interaction between a MYC protein and an EREBP protein is involved in transcriptional regulation of the rice *Wx* gene. *Journal of Biological Chemistry*, 278 (48): 47803 – 47811.