

白菜 *BcRALF* 基因启动子的分离

阮玉蓉, 胡 帅, 王芳展, 刘振宁, 刘亚培, 余小林*

(浙江大学蔬菜研究所, 农业部园艺植物生长发育与品质调控重点开放实验室, 杭州 310058)

快速碱化因子 (Rapid Alkalinization Factors, RALF) 是最早从烟草叶片中发现的一类多肽信号类物质。本研究在已分离得到白菜 *BcRALF* 基因全长序列的基础上, 采用TAIL-PCR技术克隆获得白菜 *BcRALF* 基因的启动子序列, 利用PLACE、PlantCARE和DNAMAN等植物转录元件分析软件对克隆到的启动子序列进行分析, 寻找转录因子结合位点和作用元件。通过启动子缺失分析法研究该启动子的结构和功能, 并比较不同类型启动子对 *BcRALF* 基因的驱动差异, 为精确调控 *BcRALF* 基因在植物体内的表达和深入分析 *BcRALF* 基因的生物学功能奠定研究基础。

材料为白菜‘矮脚黄’核不育两用系。TAIL-PCR 方法如下: 取 50 ng 白菜 DNA, 在 20 μ L 体系中, 以 SP1 与 6 个简并引物分别配对, 进行第 1 次 PCR 扩增, 所得产物稀释 40 倍后取 1 μ L 作模板, 以 SP2 和相应的简并引物开始第 2 次 PCR 扩增, 所得产物稀释 10 倍后取 1 μ L 作模板, 以 SP3 和相应的简并引物开始第 3 次 PCR 扩增。5'端 3 个特异引物序列分别如下, SP1: 5'-CTAGAGATTGACCA CGACAACGAT-3'; SP2: 5'-TAAACTGTGATCTCCATGAAG-3'; SP3: 5'-AGAGCCAATAACACCACAAG-3'。

通过 TAIL-PCR 初步获得了与理论相符即第 2 和第 3 次扩增产物之间的大小差距与 SP2 和 SP3 之间的大小差距相当的扩增产物。将第 1 组的第 3 轮扩增产物中的目的片段回收, 并分别克隆到 T 载体上。经转化、蓝白斑筛选及酶切检测, 获得目的重组子。结果显示, 该 *BcRALF* 基因启动子序列为 792 bp, 其碱基 A、G、T、C 所占比例依次是 34.34%、13.26%、33.33%和 19.07%; A + T 的比例为 67.68%, C + G 的比例为 32.32%, 符合启动的碱基组成。该启动子区含有丰富的顺式作用元件。该序列含有 TATA box 等启动子特有元件, 分别在-50、-459 有 2 个 TATA box, TATA box 其核心序列为 TATA (A/T), 是 RNA 聚合酶 II 识别的位点, 也是一些反式作用因子与 DNA 相互作用的位点之一; 该序列在-13、-122、-558、-632 位置存在 4 个 GATA box, 是 35S 启动子特有元件; 在-264 处有 1 个 EBOX 元件 CANNTG; 在-480 处存在 1 个 YTCANTYY 元件; 在-264 位置存在 1 个 MYC 识别位点; 同时在-135 和-761 处还存在 2 个 MYB 识别位点 WAACCA; 在-508 位置有 1 个 ACGT 元件; 在-783 位置有 TATCCA 元件。此外, 在启动子的反向互补链上也发现一些重要的功能元件, 如 2 个 POLLEN1LELAT52 元件、1 个 I-box 元件 GATAA、1 个 WRKY710S 元件 TGAC、4 个 TATA box、5 个 GATA box、2 个 GTGA 元件、1 个 MYC 识别位点, 调节盐和病原物诱导下基因表达的抗性相应元件。目前正通过瞬间或稳定表达转基因的方法确定该启动子的表达特性。

关键词: 白菜; 快速碱化因子 (RALF); 启动子; 分离

中图分类号: S 634.3

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2011) S-2538-01

收稿日期: 2011-09-12

基金项目: 教育部留学回国人员科研启动基金项目 (2009-1001); 浙江省自然科学基金项目 (Y3090294); 浙江省人事厅留学回国基金项目 (J20090028)

* 通信作者 (E-mail: xlyu@zju.edu.cn; Tel: 0571-88982354)