

用启动子融合 GUS 的方法分析 OsUgp1 基因的表达模式

苏珍霞, 欧广亮, 李奕恒, 穆 虹

(华南农业大学 生命科学院, 广东 广州 510642)

摘要:克隆水稻尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶基因 (OsUgp1) 的启动子, 并与大肠杆菌 β -葡萄糖苷酸酶 (β -glucuronidase, GUS) 报告基因连接后转化水稻, 采用 GUS 组织化学染色检测启动子驱动 GUS 基因在水稻转化植株中的表达情况, 发现在水稻的根、茎、叶、内外稃、子房、柱头等组织, 以及减数分裂时期的花药及不同发育时期的胚乳和胚中均有表达. 通过与水稻中另一同源基因 (OsUgp2) 的启动子 GUS 融合基因在种子发育过程的表达进行比较, 发现两者有明显的差异: OsUgp1 基因在开花后 5~20 d 的胚乳和胚中表达量都比较高, 而 OsUgp2 基因几乎不表达. 进一步通过对 OsUgp1 基因和 OsUgp2 基因启动子区有关胚乳特异表达相关顺式调控元件在数量和分布位置上的差异分析, 探讨了该 2 个同源基因在种子发育中趋异表达可能的分子机制.

关键词:尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶; 启动子; β -葡萄糖苷酸酶 (GUS)

中图分类号: Q754

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2011)02-0057-05

Analysis of Expression Profile of OsUgp1 Gene by Promoter-GUS Chimeric Expression

SU Zhen-xia, OU Guang-liang, LI Yi-heng, MU Hong

(College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: Promoter of one UDP-glucose pyrophosphorylase gene (OsUgp1) was cloned, fused with β -glucuronidase (GUS) reporter gene and introduced into rice. Histochemical analysis of GUS activity was used to detect the GUS expression in transgenic rice. The result showed that GUS expressed in root, stem, leave, palea, lemma, ovary, stigma, anther at meiosis stage, developing endosperm and embryo. The expression of OsUgp1 gene in developing seed was compared with that of OsUgp2 gene. An eminent difference between OsUgp1 gene and OsUgp2 gene was found. OsUgp1 gene expressed in endosperm and embryo in the seed 5~20 d after flowering, but OsUgp2 gene almost did not express. The number and location of the cis-element related to endosperm-specific expression were analyzed in the two promoter regions, and a possible molecular mechanism of the divergent expression of two homologous genes was discussed.

Key words: UDP-glucose pyrophosphorylase; promoter; β -glucuronidase (GUS)

尿苷二磷酸葡萄糖焦磷酸化酶 (UDP-glucose pyrophosphorylase, UGPase) 是生物体内糖代谢过程中的一种重要酶类, 它广泛分布在植物、动物和细菌中, 负责催化尿苷二磷酸葡萄糖 (UDPG) 的合成与降解. 而 UDPG 是一种主要的糖核苷酸存在形式, 是蔗

糖、纤维素、半纤维素、果胶质等合成时葡萄糖基的直接供体, 是淀粉、结构多糖、糖蛋白等合成时的间接供体^[1-3]. 目前已从水稻等多种植物中克隆分离到 UGPase 基因. 在水稻基因组中有 2 个 UGPase 同源基因分别被命名为 OsUgp1 基因和 OsUgp2 基因. Os-

收稿日期: 2010-09-03

作者简介: 苏珍霞 (1983—), 女, 硕士; 通信作者: 穆 虹 (1965—), 女, 副教授, 博士, E-mail: mihong@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (30370800)

Ugp1 基因最先是从小米胚乳中克隆的^[4],之后 RNA 干涉和突变体的分析研究明确 OsUgp1 基因在花粉发育减数分裂时胼胝质的累积,种子发育过程碳水化合物代谢方面起着重要的作用^[5-6];而 OsUgp2 基因是通过缩减杂交从小米花药中克隆到的, RNA 干涉结合细胞学观察表明其在花粉成熟淀粉的累积过程中起关键的作用^[7].

基因的功能通常与基因的时空表达模式、亚细胞定位等直接关联. 已有研究表明 OsUgp1 和 OsUgp2 两同源基因的功能是趋异的,而有关 UGPase 基因家族同源基因时空表达的趋异及可能的分子机制鲜见有相关报道. 采用 Northern 杂交技术研究显示 OsUgp1 基因在水稻根、茎、叶、穗(不同发育时期的混合材料)和种子中表达, OsUgp2 基因在成熟花药中大量表达^[4-5]. 由于采用 Northern 杂交需要抽提一定数量的 RNA,对于一些微小的组织器官如子房、花粉、不同发育时期的胚等取材比较困难,分析难度较大. 因此,本研究采用启动子- β -葡萄糖苷酸酶(GUS)报告基因嵌合表达技术,克隆 OsUgp1 基因、OsUgp2 基因的启动子片段与 GUS 嵌合后转化水稻,详细分析 OsUgp1 基因的表达模式及与 OsUgp2 基因在种子发育过程的胚和胚乳中的表达情况. 同时结合生物信息学顺式元件的分析,在理论上对 OsUgp1 基因、OsUgp2 基因同一基因家族两成员的趋异表达的机制进行初步的探讨.

1 材料与方法

1.1 试验材料

粳稻 *Oryza sativa* L. ssp. *japonica* 品种中花 11 号作为启动子克隆和水稻转化的受体材料,转化植株生根壮苗后种植在网室田里,按常规管理. 表达载体 pCambia1300G(上海中国科学院植物生理研究所王凌健老师提供). 该载体由 pCambia1300 与 pBI221 联合改建而成,在 pCambia1300 的多克隆位点上插入了一段 pBI221 载体上的 CaMV 35S 启动子-GUS-NOS 终止子的序列.

1.2 试验方法

1.2.1 启动子的克隆与表达载体的构建 以中花 11 水稻基因组 DNA 为模板,用引物 pOsUgp1F(AAACTGCAGCCTCACGCCAATTTCACTAC)和 pOsUgp1R(AAATCTAGAGATGCGATTTCGAGAGGCTTC)扩增 OsUgp1 基因启动子区段长度 2 055 bp;用引物 pOsUgp2F(AAACTAGTATCGTCATTAGCGCTGCCGTC)和 pOsUgp2R(AAAGGATCCTGTTCTTGCCGCTGCTTCACG)扩增 OsUgp2 基因启动子区段长度 3 024 bp.

将 PCR 扩增产物及 pCambia1300G 分别用 *Pst* I 和 *Xba* I 或 *Spe* I 和 *Bam* H I 进行酶切,回收目的和载体片段再进行连接,用 OsUgp1 基因或 OsUgp2 基因启动子片段替换 pCambia1300G 载体中驱动 GUS 基因的 35S 启动子,构建启动子+GUS 表达载体,这 2 个载体分别命名为 pOsUgp1-GUS 和 pOsUgp2-GUS. 表达载体先转入大肠杆菌酶切鉴定,并送上海生物公司进行序列测定,然后转入农杆菌,并再抽质粒酶切鉴定其在农杆菌中的稳定性.

1.2.2 农杆菌介导的水稻遗传转化 参照刘巧泉等^[8]方法进行.

1.2.3 T_0 代转化植株的分子检测 将上述构建好的载体 pOsUgp1-GUS 和 pOsUgp2-GUS 分别转化粳稻品种中花 11 的愈伤组织,获得 T_0 代转化植株. 对获得的 T_0 代转化植株,分别用潮霉素抗性基因的引物 HptF(tccggagcctccgctcgaagtag)和 HptR(ctgaactcacgcgcacgtctgtc)进行 PCR 分子检测,转化植株能够扩增到大小约 750 bp 的条带.

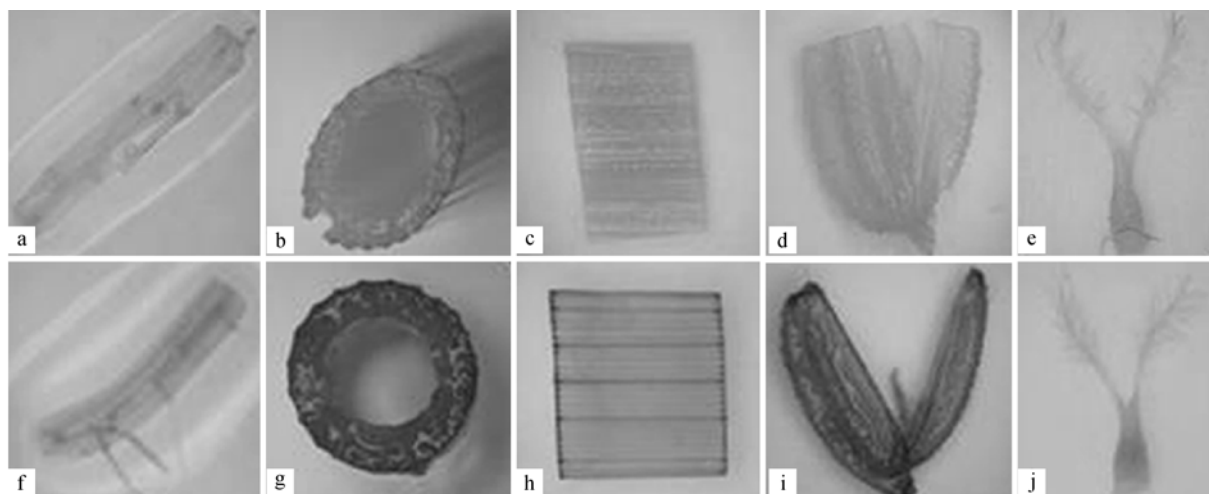
1.2.4 GUS 基因表达活性的组织化学检测 参照 Jefferson 等^[9]的方法进行. 将待测样品置于适量的 GUS 组织化学染色液(每毫升含 N,N-二甲基甲酰胺 1~2 滴;5-溴-4-氯-3-吲哚- β -D 葡萄糖苷酸酯 X-Gluc 1 mg;0.1 mol·L⁻¹ 磷酸缓冲液(pH7.0)980 μ L;5 mmol·L⁻¹ 铁氰化钾 10 μ L;5 mmol·L⁻¹ 亚铁氰化钾 10 μ L;Triton X-100 1 μ L)中,在 37℃ 条件下保温过夜. 反应完毕后,在解剖镜或显微镜下进行观察. 对含有叶绿素较多的样品(如叶片),将染色后的样品置于 φ 为 70% 乙醇中脱去叶绿素的颜色后,再进行观察.

1.2.5 启动子区功能元件的生物信息学分析 利用 PLACE 数据库^[10]和 PlantCARE 数据库^[11],分析水稻基因 OsUgp1 和 OsUgp2 启动子序列中顺式作用调控元件.

2 结果与分析

2.1 OsUgp1 启动子驱动 GUS 基因在水稻不同组织中的表达

为了判断 OsUgp1 基因的时空表达模式,克隆这个基因的启动子片段构建表达载体 pOsUgp1-GUS,转化水稻愈伤组织共获得 8 个株系共 30 株 T_0 代转化植株,对 PCR 检测 hpt 基因阳性的植株,取不同组织进行 GUS 组织化学染色,结果(图 1)显示:作为阴性对照的非转基因植株各组织均没有检测到 GUS 活性,而在 pOsUgp1-GUS 转化植株的根、茎、叶、穗、子房和柱头各组织中均有检测到 GUS 的活性. GUS 活



a~e:非转化水稻;f~j:pOsUgp1-GUS 转化获得的 T_0 代植株;a,f:根;b,g:茎;c,h:叶片;d,i:小穗;e,j:子房和柱头.

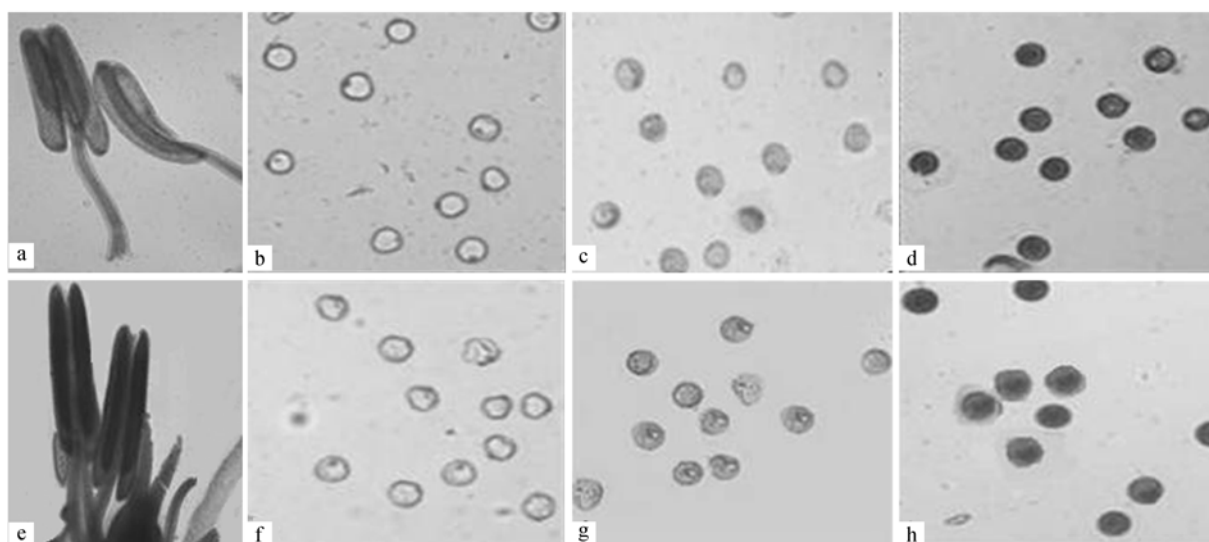
图 1 水稻植株中不同组织 GUS 活性的检测

Fig. 1 Detection of GUS activity in different organs of rice

性除在根中较弱外,在茎、叶、子房、柱头、穗的内外稃中表达量均比较高.

为了研究基因 OsUgp1 在水稻花粉发育不同时期的表达情况,分别取水稻减数分裂期的花药及单核、二核和成熟 3 个不同时期的游离花粉进行 GUS 活性染色,结果(图 2)显示:非转基因阴性对照的花

药及 3 个不同时期的游离花粉中均没有检测到 GUS 的显色反应.对于 pOsUgp1-GUS 的转化植株,减数分裂期的花药染色较深,表明具有高的 GUS 活性,而在单核小孢子到成熟期的花粉粒中均没有检测到 GUS 活性.



a~d:非转化水稻;e~h:pOsUgp1-GUS 转化获得的 T_0 代植株;a,e:减数分裂时期花药;b,f:单核小孢子;c,g:二核花粉;d,h:成熟花粉.

图 2 水稻不同发育时期花药和花粉中 GUS 活性的检测

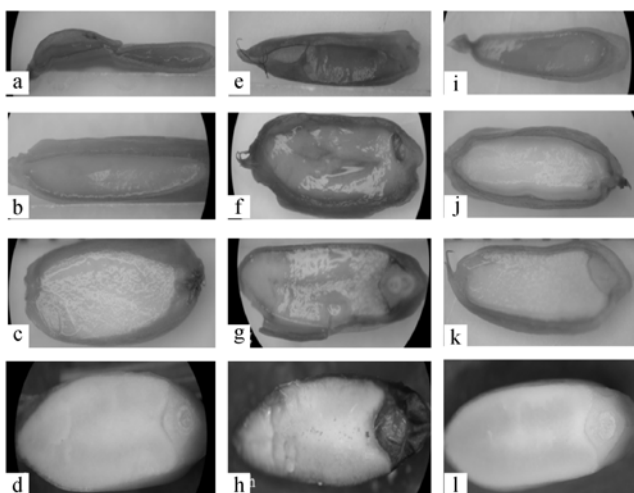
Fig. 2 Detection of GUS activity in anther and pollens at different developmental stage of rice

2.2 OsUgp1 和 OsUgp2 基因启动子驱动 GUS 基因在水稻种子发育过程中的表达

取开花后 5、10、15 和 20 d 的种子纵切,放在浸有染液的滤纸上进行染色,然后在解剖镜下观察胚乳和胚的染色情况,结果见图 3.从图 3 可以看到,非转化植株各个时期的胚和胚乳及种子外壳上均没有

染色,而 pOsUgp1-GUS 转基因植株开花 5 d 的胚乳已有明显的 GUS 活性,在开花 10 和 15 d 的胚乳中染色明显且较均匀,在开花 10 和 15 d 的胚中染色较深,而在开花 20 d 的胚乳中染色变浅,但同时胚中却染色最深.为了与水稻 UGPase 基因家族另一同源基因 OsUgp2 进行比较,同时也对 OsUgp2 基因启动子驱

动 GUS 基因表达的 T_1 代转化植株胚和胚乳中的 GUS 活性进行了检测,除在开花 10 和 15 d 的胚中观察到有很浅的兰色外,其余材料的胚乳和胚中均未检测到 GUS 活性。



a~d: 非转化水稻; e~h: pOsUgp1-GUS 转化获得的 T_0 代; i~l: pOsUgp2-GUS 转化获得的 T_1 代; a, e, i: 开花 5 d 后种子(纵切); b, f, j: 开花 10 d 后种子(纵切); c, g, k: 开花 15 d 后种子(纵切); d, h, l: 开花 20 d 后种子(纵切)。

图3 水稻开花后 5~20 d 种子中 GUS 活性的检测

Fig. 3 Detection of GUS activity of rice developing grain at 5–20 d after anthesis

2.3 OsUgp1 和 OsUgp2 基因启动子序列功能元件的生物信息学分析

上述启动子驱动 GUS 基因在种子发育过程胚和胚乳中的表达研究结果显示, OsUgp1 与 OsUgp2 基因的表达式有明显的差异。鉴此,为了探讨两同源基因该趋异表达可能的分子机制,本文利用 PLACE 数据库和 PlantCARE 数据库对 OsUgp1 和 OsUgp2 两基因启动子序列的顺式作用元件进行了分析比较,发现这 2 个启动子区段中所包含的各种元件种类的差异不是很大,但大多数元件的数目和位置有明显的差异。分析显示 OsUgp1 基因启动子区域存在 3 个胚乳特异元件 AACAAC^[12], 其中, 2 个分布在翻译起始位点(+1)上游 -0.5 ~ -1.0 kb, 1 个位于 -1.5 ~ -2.0 kb; OsUgp1 基因启动子区域还存在 5 个胚乳特异表达相关元件 GTCAT^[13], 其中 2 个反向位于 -0.3 ~ 0.7 kb, 2 个正向、1 个反向较集中分布在 -1.3 ~ 1.4 kb(图 4); 而 OsUgp2 启动子区则只含有 1 个胚乳特异元件 AACAAC, 位于翻译起始位点上游 -0.5 以内, 还有 2 个反向的胚乳特异表达相关元件 GTCAT 位于 -0.5 和 -1.3 kb 位置附近(结果未示)。

```

1 agtgaatcaaacatcgccctcagcgaatttcactacaaaattcctacgacactctttgg
60 catgcaacgtgttagccttcaaagaatatccatcggtatcactcgacatcgctccattgtt
120 ttttctatccaaagagaattttatcgaggtgttgtaagtagctacactcttcttcaa
180 ccatcatggatccaaacataaaaagtgaccaagataatcactctttttgaaacctaaga
240 taatgatctctccattgcacaaaagaatgcacgatttaattccttccaattttgaacat
300 gacactgtgtcagctgtactgtgttatcaacaagtcacatgtaagatcatggttagc
360 atcacagaaaaggagactcagatctttcgccatgcagtgtaattttgcacatcctggt
420 caaaaatagtcacatccacacggccacacgttgctcttgctctgtgtttgtgtataagca
480 tgctaaagattgcattttccagctctgtcaacattgacaaaagaatggcattttgtgaca
540 gaaatgccaatattgatacttaaaaggaaatgaaaggacacccacaacatttttttct
600 ttgaatgaaccgcagagacagtgccagatttcgtatcaagaatatagcaaatgaa
660 ctgcaccaatattgggttccatgagtttgccggtcatttttagcaatgacatggggccacat
720 ggccatctctcaccgggaacaaagaacaaattcaaccaagtatcacaggagagaaggcca
780 gcaatctgttcttctgtcagctgggatacgaagaagaaggagcattgtgtcctcaatgc
840 ttgaatattgggaatgggaattgcacgataatgtctataggtagtacactgtgtcga
900 taatctttcacttttagttgattttgtcatcaatcagacatgatttccacatgagattg
960 tgaacaataatcaacgcctaaactccgcaactcttctgttctctgtgtcagatt
1020 agtatttttctcttgcgactaaacatagctttcagatcagatgcaccgacagactgat
1080 aacatgtgctttgtgcaaccattatgcaataatttaagtgcaaatgacacgtgagcaag
1140 cgaggcgaggatgccatgtctgaacttcaaacgagctcaaccgggtacagtaactgtctt
1200 gcaatgcaaacctgaaaagcatcgtaaaatcgaaatttaattcttaaggcggaagatcag
1260 tagcacaacacaaatgaaaatacagaacacttcaaaaattagcgatcagttatgcag
1320 ggatcaccgaaccgaggagcaagcaggaagatgcttcggagaacaaacacactgcatctt
1380 cagagttcagagaacaagagatgacacagctctgttgctcctgacgaactgtgtggtt
1440 cgttgaattcggggagaccgattttagagtggtgctgtctctctctgaaatacctt
1500 aacgaactttttaattctcatgagatgtcgtaagacattgacagatttccaatttaacg
1560 cctaattgttcaattccaggaccagattcagatcacaaatccaaccacaataacacat
1620 ctgaattcagactttacttgcttttcttcaaaaacaacagcttataatcatgatttagaa
1680 acagaaagagagtttaattacacagacggccacacgagggcagcagcccaatgacacgctg
1740 tcagcaacagacttgcaacagcttgccgcttccgtcgtcgtcgtcagatcacgacccgacg
1800 gtgcccggcggccgagccaaaagttagacggcgacggtaacggcgtcaccgtccccgc
1860 ccgcccagctgtccgggacccaccccaacgcgtcagcggcgccgacacatcccggaacatt
1920 ccgtcacggcggttgggcgacgggacggaatcccgccgcccctataaagaaccccgct
1980 tgcattttctctgcacacacacacgctcgcactcctctctctcatctgacatatctcc
2040 tccgctcctttcgaagcctctcgaatcgcatcgccgagccggATGcggtcaccgcccagc

```

引物 pOsUgp1F/R 位置以下划线表示; 翻译起始密码 ATG 以大写和加粗表示; 预测的胚乳特异表达相关的顺式作用元件“aacaac”和“atgac”分别加粗并下加双线和波纹线表示

图4 OsUgp1 基因启动子区核苷酸序列

Fig. 4 Nucleotide sequence of OsUgp1 gene promoter

3 讨论

水稻基因组中 2 个 UGPase 同源基因 OsUgp1、OsUgp2 分别位于第 9 和第 2 染色体上。本研究利用启动子驱动 GUS 基因表达技术得到的 OsUgp1 基因表达模式的结果显示, OsUgp1 基因在水稻根、茎、叶、小穗、雌蕊(子房, 柱头)等均检测到 GUS 活性。同时,在花粉发育减数分裂时期的花药检测到明显的 GUS 活性,而在单核至成熟花粉中则不再能检测到 GUS 活性,在开花 5~20 d 的种子发育过程胚乳和胚中有明显的表达。与之前 Northern 杂交研究结果发现 OsUgp1 基因在根、茎、叶、穗(不同发育时期穗的混合材料)和开花后的 10~15 d 的胚乳中表达量较高,及免疫组化研究结果表明 OsUgp1 基因表达产物主要分布在减数分裂前后过程中的花粉母细胞中的研究结果相一致^[4-5]。先前关于 OsUgp2 基因的表达模式,采用 Northern、RNA 原位杂交、免疫组化研究及启动子-GUS 等不同方法的研究结果表明: OsUgp2 基因偏爱在二核至成熟的花粉中表达^[7,14]。本研究进一步发现 OsUgp1 基因在种子发育过程中的表达

模式与 OsUgp2 基因完全不同。

上述一系列研究显示水稻 UGPase 基因家族 2 个同源基因 OsUgp1 和 OsUgp2 的时空表达有比较大的差异。同源基因不同的表达模式,预示着其功能的趋异。Chen 等^[5]的研究表明,OsUgp1 基因被干涉后,花粉发育减数分裂时期胼胝质的形成受阻,花粉败育。还有研究报道 OsUgp1 基因突变后会引发雄性不育和胚乳的白化,种子内淀粉的累积异常^[6]。这些研究说明 OsUgp1 基因在花粉发育和种子的碳水化合物代谢方面具有重要的作用。而通过针对启动子干涉的功能研究结果显示:OsUgp2 基因在水稻花粉成熟过程淀粉的累积中发挥重要的作用^[7]。由此可见,水稻 UGPase 基因家族的重复基因在进化过程中,这 2 个同源基因发生了亚功能化,相辅相成,在水稻生长发育的不同阶段发挥着重要的功能。它们主要功能的差异与其表达模式的差异是相对应的。

基因家族作为一种典型的基因重复产物,家族成员功能趋异或表达模式多样化已被广泛观察到^[15],但有关趋异表达的机制目前鲜见有清楚的研究结果。基于 OsUgp1 基因与 OsUgp2 基因在种子发育过程中表达的显著差异,分析启动子区顺式作用元件,发现两者在胚乳特异表达等相关元件的数量和分布的位置上,确实存在明显的差异。在 OsUgp1 基因启动子区发现了共 8 个胚乳特异表达相关调控元件,而在 OsUgp2 基因启动子区仅发现 3 个胚乳特异表达相关调控元件。启动子区顺式作用元件的种类、数量、所在的位置,还有转录因子的作用等因素综合决定了基因的表达特性。OsUgp1 基因启动子区 8 个胚乳特异表达相关调控元件中,决定 OsUgp1 基因在水稻种子中大量表达的关键元件,还有待于缺失突变和点突变等的进一步研究来揭示。

参考文献:

- [1] REES A T, LEJA M, MACDONALD F D, et al. Nucleotide sugars and starch synthesis in spadix of *Arum maculatum* and suspension cultures of *glycine max* [J]. *Phytochem*, 1984, 23(11): 2463-2468.
- [2] KLECZKOWSKI L A. Glucose activation and metabolism through UDP-glucose pyrophosphorylase in plants [J]. *Phytochem*, 1994, 37(6): 1507-1515.
- [3] EIMERT K, VILAND P, KILIAN A, et al. Cloning and characterization of several cDNAs for UDP-glucose pyrophosphorylase from barley (*Hordeum vulgare*) tissues [J]. *Gene*, 1996, 170(2): 227-232.
- [4] ABE T, NIYAMA H, SASAHARA T. Cloning of cDNA for UDP-glucose pyrophosphorylase and the expression of mRNA in rice endosperm [J]. *Theoretical and Applied Genetics*, 2002, 105(2): 216-221.
- [5] CHEN Rong-zhi, ZHAO Xiao, SHAO Zhe, et al. Rice UDP-glucose pyrophosphorylase1 is essential for pollen callose deposition and its cosuppression results in a new type of thermosensitive genic male sterility [J]. *Plant Cell*, 2007, 19(3): 847-861.
- [6] WOO M O, HAM T H, JI H S, et al. Inactivation of the UGPase1 gene causes genic male sterility and endosperm chalkiness in rice (*Oryza sativa* L.) [J]. *Plant J*, 2008, 54(2): 190-204.
- [7] MU Hong, KE Jian-hao, LIU Wei, et al. UDP-glucose pyrophosphorylase2 (*OsUgp2*), a pollen-preferential gene in rice, plays a critical role in starch accumulation during pollen maturation [J]. *Chin Sci Bull*, 2009, 54(2): 234-243.
- [8] 刘巧泉, 张景六, 王宗阳, 等. 根瘤农杆菌介导的水稻高效转化系统的建立 [J]. *植物生理学报*, 1998, 24(3): 259-271.
- [9] JEFFERSON R A, KAVANAGH T A, BEVAN M W. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants [J]. *EMBO J*, 1987, 6(13): 3901-3907.
- [10] HIGO K, UGAWA Y, IWAMOTO M, et al. Plant cis-acting regulatory DNA elements (PLACE) database [J]. *Nucleic Acids Res*, 1999, 27(1): 297-300.
- [11] LESCOT M, DE'HAIS P, THIJS G, et al. PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences [J]. *Nucleic Acids Res*, 2002, 30(1): 325-327.
- [12] WU Chuan-yin, WASHIDA H, ONODERA Y, et al. Quantitative nature of the Prolamin-box, ACGT and AACA motifs in a rice glutelin gene promoter; minimal cis-element requirements for endosperm-specific gene expression [J]. *Plant J*, 2000, 23: 415-421.
- [13] TAKAIWA F, OONO K, WING D, et al. Sequence of three members and expression of a new major subfamily of glutelin genes from rice [J]. *Plant Mol Biol*, 1991, 17(4): 875-885.
- [14] 黄子英. 水稻花粉特异表达 UGPase 基因启动子的功能分析 [D]. 广州: 华南农业大学生命科学学院, 2005.
- [15] CRISTIAN C D, HARTL D L, ACHAZ G. Cis-regulation and protein evolution in orthologous and duplicate genes [J]. *Genome Research*, 2004, 14(8): 1530-1536.

【责任编辑 李晓卉】