

陈展宇,王 阔,王晓梅,等.玉米淀粉合成酶 SSIIa 启动子的克隆及功能分析[J].华南农业大学学报,2017,38(1):15-22.

玉米淀粉合成酶 SSIIa 启动子的克隆及功能分析

陈展宇¹,王 阔²,王晓梅¹,刘相国³,崔喜艳²

(1 吉林农业大学 农学院,吉林 长春 130118; 2 吉林农业大学 生命科学学院,
吉林 长春 130118; 3 吉林省农业科学院,吉林 长春 130124)

摘要:【目的】克隆玉米 *Zea mays* 淀粉合成酶 SSIIa 启动子,并分析其功能,为进一步研究和应用 SSIIa 启动子奠定基础。【方法】通过 NCBI 上公布的玉米基因组序列,在网站 MaizeGDB 上 BLAST 查找到 SSIIa 5'侧翼序列,利用 PCR 方法从玉米 B73 中克隆 SSIIa 启动子;通过 PlantCare 在线分析启动子顺式作用元件,用特异性引物分别克隆出长度为 1 407、867、633、483 和 365 bp 的片段,与植物表达载体 pCambia3301 连接,构建 5 种 5'缺失体的植物表达载体,命名为 P1、P2、P3、P4 和 P5。用农杆菌介导法转化拟南芥 *Arabidopsis thaliana*,获得转基因拟南芥。【结果】以玉米 B73 基因组 DNA 为模板,用特异性引物 SSIIaF/SSIIaR 进行扩增,得到 2 526 bp 序列;除草剂筛选的阳性拟南芥植株 PCR 验证均检测出 *gus* 基因;GUS 组织化学分析表明,5 种类型启动子构建的表达载体在成熟期叶片、果荚中均显蓝色;*gus* 基因定量分析表明,成熟期 5 种转基因拟南芥叶片中, *gus* 基因表达量 P1 最高,其他基本一致;种子中 *gus* 基因表达量 P1 和 P2 相近,且高于 P3、P4 和 P5。【结论】成功克隆玉米 SSIIa 启动子;构建的 5 种 SSIIa 启动子缺失体表达载体在转基因拟南芥中均具有活性,长度为 1 407 bp(P1)和 867 bp(P2)的启动子具有胚乳特异性。

关键词:玉米; 淀粉合成酶; SSIIa 启动子; 克隆; 载体构建; 功能分析
中图分类号:S513 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-411X(2017)01-0015-08

Cloning and function analysis of starch synthase SSIIa promoter in maize

CHEN Zhanyu¹, WANG Kuo², WANG Xiaomei¹, LIU Xiangguo³, CUI Xiyan²

(1 Faculty of Agronomy, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 2 College of Life Science, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China; 3 Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130124, China)

Abstract:【Objective】To clone maize (*Zea mays*) starch synthase SSIIa promoter, analyze its function, and provide a basis for its future research and application. 【Method】The SSIIa 5' flanking sequence was found on Maize GDB by BLASTing the maize genome sequence published on NCBI, and the SSIIa promoter was cloned from maize B73 using PCR. We analyzed the cis elements of the promoter using PlantCare. Fragments of 1 407, 867, 633, 483, and 365 bp were cloned with specific primers, and were inserted into the plant expression vector pCambia3301, respectively. Five plant expression vectors with different 5' deletions of the SSIIa promoter were constructed and named P1, P2, P3, P4 and P5. The transgenic *Arabidopsis thaliana* plants were obtained through *Agrobacterium*-mediated transformation. 【Result】A DNA fragment of 2 526 bp was obtained by PCR amplification with maize B73 genome DNA as template and SSIIaF/SSIIaR as specific primers. The positive *A. thaliana* plants, which were screened by herbicide, had *gus* gene by PCR detection. The histochemical analysis of GUS showed that the expression vectors of five promoters were blue in leaves and pods at maturity. The quantitative analysis of *gus* gene showed that among five transgenic *A. thaliana* at maturity, the expression level of P1 in leaves

收稿日期:2016-07-31 优先出版时间:2016-12-28
优先出版网址:<http://www.cnki.net/kcms/detail/44.1110.s.20161228.0937.028.html>
作者简介:陈展宇(1972—),男,副教授,博士,E-mail: chenzhanyu2000@sina.com;通信作者:崔喜艳(1971—),女,教授,博士,E-mail: cuixiyan2005@163.com
基金项目:国家自然科学基金(31200611);吉林省应用基础研究重点实验室开放课题(20130102066JC);转基因生物新品种培育重大专项(2014ZX0801004B)

was the highest and the others were basically the same, and the expression levels of P1 and P2 in seeds were similar, both being higher than those of P3, P4 and P5. 【Conclusion】 The maize SSIIa promoter has been successfully cloned. The five constructed expression vectors with different 5' deletions of the SS IIa promoter all have activities in transgenic *A. thaliana*, and the promoters with the length of 1 407 bp (P1) and 867 bp (P2) have endosperm specificity.

Key words: maize; starch synthesis enzyme; SSIIa promoter; cloning; vector construction; function analysis

在基因工程相关研究中,对淀粉合成相关酶及基因方面的研究已经取得了一定的进展^[1],但启动子作为基因表达的重要调控区域,在淀粉相关研究中报道相对较少。选择合适的启动子是有目的地表达外源基因面临的重要科学问题,也是培育安全、高效转基因作物的首要问题^[2]。淀粉是玉米 *Zea mays* 中的主要物质,玉米中淀粉含量的高低直接影响玉米的产量^[3],直链淀粉与支链淀粉的比例影响淀粉的品质^[4],玉米淀粉是一种优良并且可靠的淀粉来源,全世界 80% 淀粉来源于玉米^[5],玉米淀粉在化工、医药、纺织、造纸和建筑等领域得到广泛的应用,淀粉的需求量在日益增加,因此提高玉米淀粉含量和改良玉米淀粉品质已成为重要议题,对于玉米淀粉的研究具有显著的社会效益和经济效益^[6-7]。

淀粉是在胚乳造粉质体中经一系列酶的配合作用合成的,其中淀粉合成酶在其合成中起到决定性作用,可溶型淀粉合成酶主要包括 SS I、SS II、SS III^[8-10],其中 SS I 和 SS III 的表达已相继被证明具有胚乳特异性。玉米淀粉合成酶 SSIIa 是淀粉合成酶中的关键酶,能够参与玉米支链淀粉的合成^[11],对其启动子的研究有助于从调控水平上改善及改变 SSIIa 活性及作用,进而实现增产及改良目的,完善淀粉代谢网络调控的研究。

本研究克隆并分析 SSIIa 启动子,构建 5 个缺失体植物表达载体,采用三亲杂交法将目标质粒转入农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens*,用蘸花法将农杆菌转入拟南芥 *Arabidopsis thaliana*,使用除草剂筛选获得阳性植株。PCR 检测鉴定拟南芥阳性植株,采用 GUS 染色和 *gus* 基因定量分析启动子的作用部位和活性,以期通过基因工程手段提高玉米淀粉含量,改良淀粉品质提供候选特异性启动子,并为玉米 SSIIa 启动子功能研究提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

玉米 B73 种子由吉林省农业科学院农业生物技术研究所提供,盆栽砂培,取三叶期的叶片提取基因组

<http://xuebao.scau.edu.cn>

DNA, -20 ℃ 保存备用。植物表达载体 pCambia3301 由吉林农业大学生命科学学院生物化学与分子生物学实验室保存。

基因组 DNA 提取试剂盒 (Bio Teke)、限制性内切酶 *EcoR* I、*Bgl* II 和 *LA Taq* 均购自 TaKaRa 生物有限公司,质粒提取试剂盒及 DNA 凝胶回收试剂盒为 AxyGEN 公司产品。

克隆 SSIIa 基因所用上游引物 SS II aF: 5'-TGTCAGACTGGTTAGTGGAGC-3';下游引物 SSIIaR: 5'-AGAAGGTGGAGGAAGAGGACG-3'。

构建不同长度启动子表达载体的上游引物如下:

SSIIaF1: 5'-CGGAATTCCTTGACTGGCATCCTTCCTA-3',

SSIIaF2: 5'-CGGAATTCCTAGAAAGATGTCCCACAGAGA-3',

SSIIaF3: 5'-CGGAATTCCTAGCCTATGCTTACCTTTCAG-3',

SSIIaF4: 5'-CGGAATTCACGCCATTTCCATCGTGCCA-3',

SSIIaF5: 5'-CGGAATTCCTCGCTGGGCTGCCGTAGGTA-3',

共同的下游引物为 SSIIaR: 5'-GAAGATCTGGCGGCGGATCGATCG-3'。

下划线分别为 *EcoR* I (GAATTC) 和 *Bgl* II (AGATCT) 的酶切位点序列。

gus 基因检测所用上游引物 GUS-F: 5'-TTCCTGATTAACCACAAACC-3';下游引物 GUS-R: CGGTTGCTTGGCAATACTCC。

gus 基因的定量分析所用 β -Actin 内参基因上游引物 Actin-F: 5'-TGCCAATCTACGAGGGTTTC-3';下游引物 Actin-R: 5'-GCTCTGCTGTTGTGGTGAAC-3';目的 *gus* 基因上游引物 qGUS-F: 5'-CTCACACCGATACCATCAGC-3';下游引物 qGUS-R: 5'-TACCTT-

CTCTGCCGTTTCCA-3'。

1.2 SSIIa 启动子的克隆及序列分析

利用试剂盒提取玉米 B73 三叶期叶片基因组 DNA,根据玉米数据库 (<http://www.maizegdb.org.ssr/>) 公布信息,BLAST 找到 SS II a 基因 5'侧翼序列,利用 Primer 5.0 软件设计克隆引物 SSIIaF 和 SSIIaR,采用常规 PCR 方法扩增 SS II a 基因 5'侧翼序列,PCR 条件为:95 ℃ 5 min; 94 ℃ 30 s,69.7 ℃ 40 s, 72 ℃ 150 s,35 个循环;72 ℃,15 min。扩增产物连接到 pMD-18T 载体上,转化到大肠埃希菌 DH5α,挑取单菌落经 PCR 鉴定后送至上海生工生物工程公司测序,测序结果与已知序列比对后,利用 PlantCare (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 启动子在线分析软件分析及预测启动子顺式作用元件等功能元件信息^[12]。

1.3 SSIIa 启动子植物表达载体的构建

克隆的 SSIIa 启动子经序列分析后,依据功能元件所在位置,设计 5 对引物 SS II aF1 和 SS II aR、SSIIaF2 和 SS II aR、SS II aF3 和 SS II aR、SS II aF4 和 SSIIaR、SSIIaF5 和 SSIIaR,并在上下游引物两侧分别加上 EcoR I 和 Bgl II 酶切位点,扩增 SSIIa 启动子序列的长度分别为 1 407、867、633、483 和 365 bp,用于构建 5 个不同长度 SSIIa 启动子缺失的植物表达载体^[13]。扩增 5 种长度启动子序列的退火温度分别为 56.5、56.5、56.5、62.9 和 62.9 ℃。将 PCR 产物与植物表达载体 pCAMBIA3301 分别双酶切后,16 ℃ 过夜连接,构建 5 种重组载体(命名为:P1、P2、P3、P4 和 P5),分别转化大肠埃希菌 DH5α,挑取经 PCR 及酶切验证后的阳性克隆菌液,送至上海生工生物工程公司测序。

1.4 拟南芥的遗传转化

哥伦比亚型拟南芥,农杆菌 EHA105 和含 HELP 质粒菌株均由吉林农业大学生命科学学院生物化学与分子生物学实验室提供,德国泥炭土、蛭石、MS 盐、SilwetL-77、6-苄氨基嘌呤(6-BA)、B5 维生素、蔗糖、利福平(Rif)抗生素、Kan 抗生素等试剂,以及 LB 培养基和 YEP 培养基均购置于上海生工生物工程公司。

三亲杂交法将重组植物表达载体导入农杆菌,植物材料培养于人工气候室,拟南芥长至开花期采用农杆菌介导的花序侵染法侵染拟南芥,收获种子,种植,用除草剂筛选阳性植株,作为功能验证试验材料^[13]。

1.5 SSIIa 启动子在拟南芥中的功能分析

1.5.1 gus 基因的 PCR 检测 提取含 5 种不同类型启动子的转基因拟南芥阳性植株(以非转基因拟南芥为对照)的叶片基因组 DNA,以其为模板,植物表达载体 pCAMBIA3301 上的 gus 基因为目标基因设计的引物(GUS-F,GUS-R)进行 PCR 扩增,序列长度为 402 bp,经 10 g · L⁻¹ 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.5.2 转基因植株的 GUS 组织化学分析 分别取转 P1、P2、P3、P4 和 P5 载体的阳性植株和野生型拟南芥,成熟期后分别取叶片和果荚进行 GUS 染色,参照 Jefferson 方法^[14](略有改动),具体步骤包括:

1)清洗:使用无菌水清洗样品,去除样品表面杂物;

2)染色:将材料放置培养皿中,使样品完全浸入到 GUS 染色液中,置于 37 ℃ 培养箱中过夜;

3)脱色:将染色材料置于体积分数为 80% 的乙醇溶液中脱色,期间视乙醇溶液颜色及时更换乙醇溶液,直至拟南芥材料完全脱色(绿色褪去,呈现白色)。脱色后的材料拍照观察,记录。

1.5.3 gus 基因的定量分析 提取上述不同试验材料成熟期叶片和种子的 RNA,反转录成 cDNA 为模板,以 β-Actin 基因为内参,实时荧光定量 PCR 法测定 gus 基因的表达,3 次重复,采用 2^{-ΔΔCt} 法进行分析,计算 gus 基因的相对表达量^[15]。

2 结果与分析

2.1 SSIIa 启动子克隆及分析结果

用玉米 B73 基因组 DNA 为模板,SSIIaF, SSIIaR 为引物进行克隆,得到 2 526 bp 序列(见图 1A),与 pMD18T 连接,转化后摇菌,菌液 PCR 验证结果如图

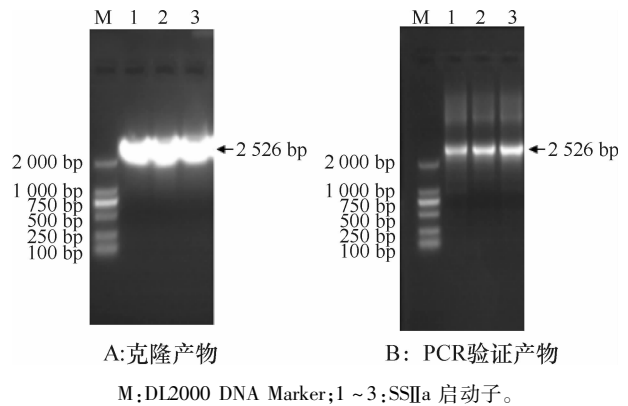


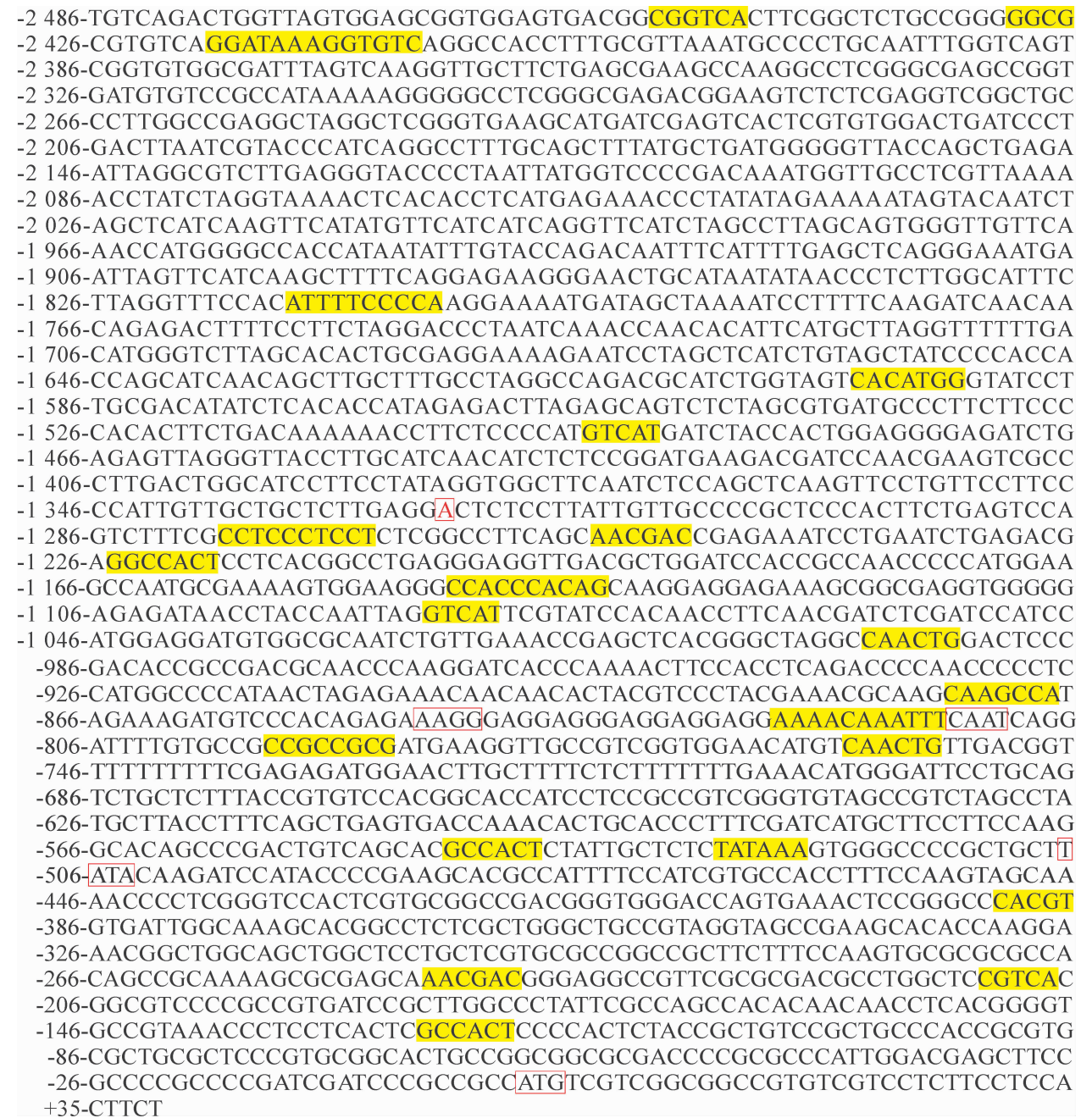
图 1 SSIIa 启动子克隆和 PCR 验证的电泳结果

Fig.1 Electrophoresis results of SSIIa promoter cloning and PCR amplification

1B 所示,将验证好的阳性克隆测序表明,获得的 2 526 bp 中有 1 个碱基突变,与参考序列比对一致性为 99.96%,经 PlantCare 软件分析表明此碱基的差异并未在启动子功能元件处,不影响启动子的功能。

核酸测序结果及功能元件分析结果如图 2 所示,经 PlantCare 软件分析发现,SSIIa 序列含有众多启动子必需的顺式作用元件,具体元件信息如表 1 所示,其中包括 TATA-box,CAAT-box 等元件。该序

列存在 9 个 TATA-box,离 *SSIIa* 基因 ATG 最近的为处于 504 bp 处的 TATA-box(图 2 红色方框中显示),除此之外,分析还发现了众多重要的功能元件和结合位点(表 1),例如 1) MBS: MYB 结合位点,能够响应水分、盐、低温等逆境胁迫; 2) Skn-1-motif 和 GCN4-motif: 胚乳表达所需的顺式作用元件; 3) motif IIb: 参与脱落酸响应的功能元件; 4) O₂-site: 参与玉米醇溶蛋白代谢调控的功能元件。这些功能元件的



附有黄色底纹的序列为相关顺式作用元件,由上至下红色方框内依次为克隆突变碱基、胚乳特异性表达功能元件、参与抗旱诱导的 MYB 结合位点、TATA-box、SSIIa 基因起始密码子 ATG。

图 2 玉米 SSIIa 启动子的序列分析

Fig. 2 Sequence analysis of maize SSIIa promoter

存在,说明玉米 *SSIIa* 基因能够受到多种生物及非生物胁迫的诱导及影响,而且拥有胚乳特异性表达的功能元件。该启动子相关功能元件的研究,对于玉米*SSIIa*基因的表达调控途径的探究及开发胚乳特异型启动子具有重要意义。

表 1 SSIIa 启动子区顺式作用元件
Tab.1 Cis-acting elements of SSIIa promoter

元件名称	序列	元件功能	元件位置
CAAT-box	CAATT、CAAAT、 CAAT	启动子和增强子区常见的顺式作用元件	-2 380、-1 094、-2 088、-1 165、 -1 377、-1 166、-1 095、-1 915、 -2 013、-1 032、-815
CAT-box	GCCACT	与分生组织表达相关的作用元件	-1 225、-546、-127
CE3	GACGCGTGTC	参与 ABA 和 VP1 响应的作用元件	-2 430
CG-motif	CCATGGGG	光响应元件	-1 945
G-box	CACATGG	光响应元件	-1 601、-392
I-box	GGATAAGGTG	光响应元件	-2 419
MBS	CGGTCA	MYB 结合位点	-2 452
Skn-1-motif	GTCAT	胚乳表达所需的作用元件	-1 497、-1 087
GCN4-motif	CAAGCCA	胚乳表达调控作用元件	-875
Sp1	CC(G/A)CCC	光响应元件	-1 279、-1 145
TATA-box	TAATA、TATA、 ATATAA、	核心启动子元件(在转录起始位点上游)	-1 850、-2 028、-1 389、-1 847、 -1 931、-1 848、-2 030、-529、-508
TC-rich repeats	ATTTTCTCCA	参与防御和应激反应的作用元件	-1 815
TGA-element	AACGAC	生长素响应的作用元件	-1 256、-247
TGACG-motif	TGACG	参与茉莉酸甲酯响应的作用元件	-2 458、-1 198、-754
ABRE	CACGTG	参与脱落酸响应的元件	-392
CGTCA-motif	CGTCA	参与茉莉酸甲酯响应的作用元件	-213
GARE-motif	TCTGTTG	赤霉素应答作用元件	-1 029
HSE	AAAAAATTTTC	参与热胁迫应答的作用元件	-824
MBS	CAACTG	参与抗旱诱导的 MYB 结合位点	-1 000、-761
O ₂ -site	GATGATGTGG	参与玉米醇溶蛋白代谢调控的作用元件	-1 044
motif IIb	CCGCCGCGCT	脱落酸响应元件	-796

2.2 SSIIa 启动子功能元件分析及构建缺失体设计

本研究成功克隆了玉米淀粉合成酶启动子 *SSIIa* 的 2 526 bp 片段,并利用 PlantCare 软件对其进行分析^[16],针对此片段上的顺式作用元件分别设计了 5 种 5'缺失载体,其中:构建缺失体 P1 中含有 8 个常见顺式作用元件(CAAT),3 个与分生组织表达相关的元件 CAT-box,3 个茉莉酸甲酯响应的元件 CGTCA-motif 和 TGACG-motif,3 个光响应元件 GAG-motif 和 SP1,1 个赤霉素应答元件 GARE-motif,2 个胚乳表达相关作用元件 GCN4-motif 和 Skn-1 motif,1 个热响应作用元件 HSE,2 个参与抗旱诱导的 MYB 结合位点 MBS,1 个参与玉米醇溶蛋白代谢调控的作用元件 O₂-site,2 个 TATA-box,2 个生长素响应元件 TGA-element,1 个脱落酸响应元件 motif IIb。

缺失体 P2 包括 2 个常见顺式作用元件 (CAAT),2 个与分生组织表达相关的元件 CAT-box,

2 个茉莉酸甲酯响应的元件 CGTCA-motif 和 TGACG-motif,1 个光响应元件 GAG-motif,1 个热响应作用元件 HSE,1 个参与抗旱诱导的 MYB 结合位点 MBS,2 个 TATA-box,1 个生长素响应元件 TGA-element,1 个脱落酸响应元件 motif IIb。

缺失体 P3 包括 2 个与分生组织表达相关的元件 CAT-box,1 个茉莉酸甲酯响应的元件 CGTCA-motif,2 个 TATA-box,1 个生长素响应元件 TGA-element。

缺失体 P4 包括 1 个与分生组织表达相关的元件 CAT-box,1 个茉莉酸甲酯响应的元件 CGTCA-motif,1 个生长素响应元件 TGA-element。

缺失体 P5 包括 1 个与分生组织表达相关的元件 CAT-box,1 个茉莉酸甲酯响应的元件 CGTCA-motif,1 个生长素响应元件 TGA-element,P4 与 P5 功能元件相同但 P5 与 P4 相比缺少预测到的转录起始位点(TSS)序列。

2.3 不同长度 SSIIa 启动子 5'缺失体植物表达载体构建

根据 SSIIa 启动子分析结果,分别使用设计的缺失体引物进行 PCR 扩增,扩增结果如图 3A 所示。采用 *EcoR* I、*Bgl* II 分别对 5 种不同长度 SSIIa 启动子的 PCR 产物和植物表达载体 pCAMBIA3301 进行双酶切,分别构建了 5 个缺失体植物表达载体,转化

大肠埃希菌感受态细胞后,以菌液为模板进行菌液 PCR 验证(图 3B),分别提取质粒进行双酶切验证,结果见图 3C。说明不同长度 SSIIa 启动子植物表达载体构建成功,分别命名为: pCAMBIA-3301-P1、pCAMBIA-3301-P2、pCAMBIA-3301-P3、pCAMBIA-3301-P4 和 pCAMBIA-3301-P5,以下简称为 P1、P2、P3、P4 和 P5。

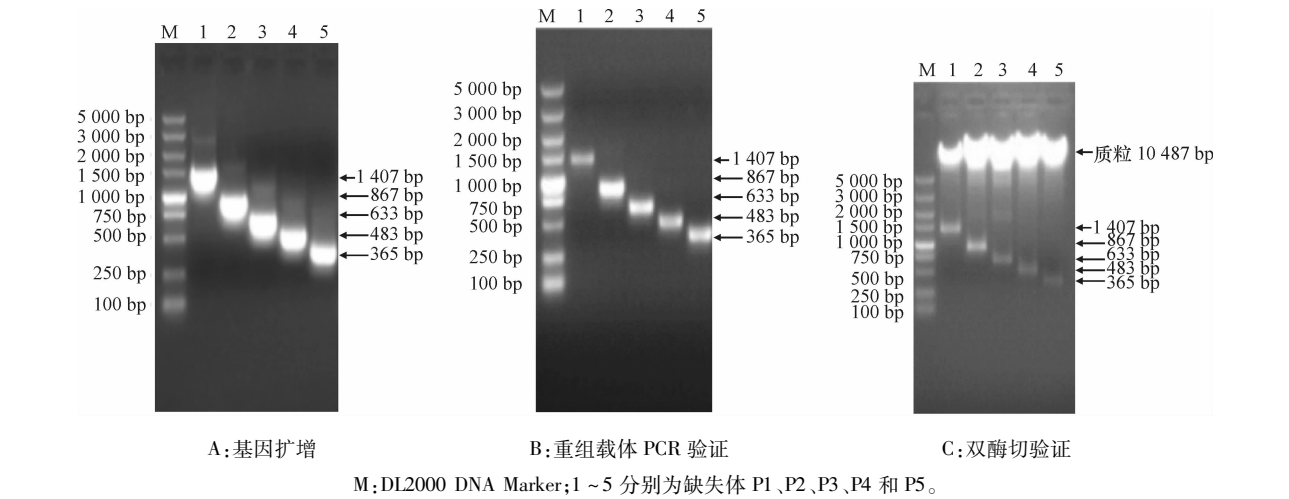


图 3 不同长度 SSIIa 启动子片段的扩增、重组载体 PCR 验证及双酶切验证结果

Fig.3 Amplification of SSIIa promoter fragments of different length, PCR verification of recombinant vectors and double enzyme digestion verification

2.4 SSIIa 启动子在拟南芥中的功能分析

2.4.1 *gus* 基因的 PCR 检测 用除草剂喷洒拟南芥,获得的抗性植株分别提取基因组 DNA,以其为模板,*gus* 基因为目标基因进行 PCR 检测,结果见图 4,由缺失体 P1~P5 均扩增出 402 bp 的条带,而非转基因对照的扩增结果为阴性,证明所采样的拟南芥均为成功转化不同长度启动子的阳性植株。

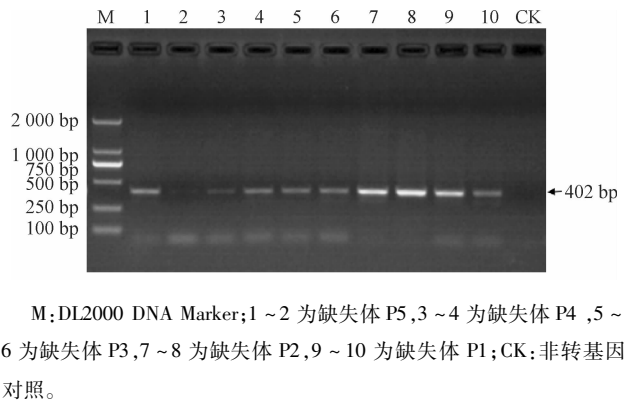


图 4 不同表达载体 *gus* 基因 PCR 扩增验证电泳结果

Fig. 4 PCR detection results of *gus* gene in different expression vectors by electrophoresis

2.4.2 转基因植株的 GUS 组织化学分析 在成熟期阶段,分别采取叶片和果荚为试验材料进行 GUS

<http://xuebao.scau.edu.cn>

染色,结果见图 5,野生型拟南芥(CK)叶片未见蓝色,5 种类型不同转启动子的拟南芥叶片均呈现不均匀蓝色;野生型拟南芥果荚未见蓝色,转基因拟南芥果荚均有蓝色,且不同长度启动子的果荚,蓝色深浅不同,P1 和 P2 果荚染色较深,P3、P4 和 P5 果荚染色较浅。

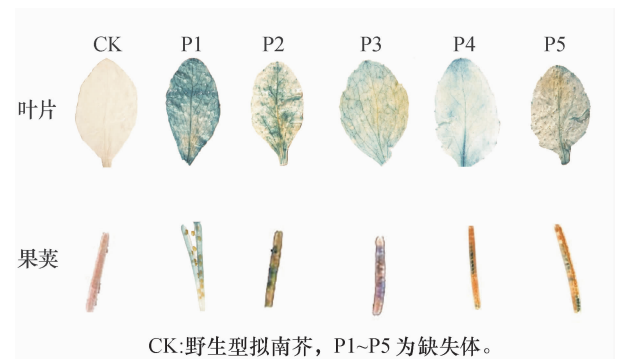


图 5 成熟期转基因拟南芥植株叶片和果荚 GUS 组织化学染色

Fig. 5 Histochemical analysis of GUS activities in leaves and pods of transgenic *Arabidopsis thaliana* plant at maturity

2.4.3 *gus* 基因的定量分析 转基因植株经组织化学染色分析后,可以初步判断启动子驱动的 *gus* 基因

的表达部位和大致表达强度,但并不能判断启动子的活力大小,为了进一步明确5种启动子的活性,利用荧光定量PCR技术从转录水平上检测各启动子驱动的 *gus* 基因的表达情况,图6所示为成熟期5种转基因植株叶片和种子 *gus* 基因相对表达量。由图6可知,野生型拟南芥(CK)叶片和种子中 *gus* 基因均不表达,这与 GUS 染色结果一致。5种转基因叶片中, *gus* 基因表达量 P1 最高,其他基本一致。种子中 *gus* 基因 P1 和 P2 表达量相近,高于 P3、P4 和 P5, P5 表达量最低。P1 和 P2 中含有胚乳特异性表达的功能元件。本研究结果表明,缺失胚乳表达功能元件可导致所驱动的 *gus* 基因在种子中表达量下降(P3、P4 和 P5)。SSIIa 启动子具有的胚乳特异性,种子 *gus* 基因表达量差异可能与功能元件的数量有关^[16]。

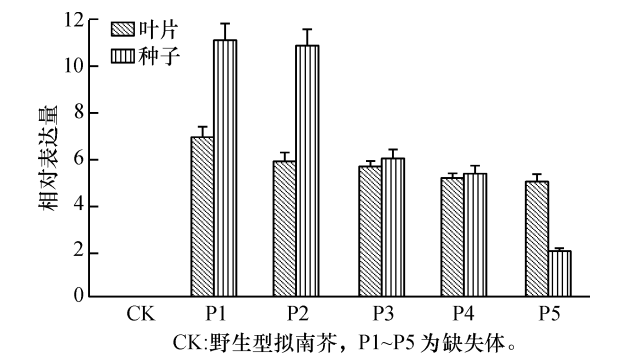


图6 成熟期转基因拟南芥叶片和种子中 *gus* 基因的相对表达量

Fig. 6 Relative expression levels of *gus* gene in leaves and seeds of transgenic *Arabidopsis thaliana* plant at maturity

3 讨论与结论

2009 年玉米基因组测序工作的完成,为玉米功能基因及启动子序列的克隆带来了极大的方便。本试验利用玉米淀粉合成酶基因 *SS II a* 核酸序列, BLAST 分析出 *SS II a* 5'上游 DNA 序列,设计特异引物,利用常规 PCR 方法克隆了 2 526 bp *SS II a* 基因 5'侧翼序列,与 NCBI 中公布的玉米基因组序列比对后,一致性为 99.96%。

目前,对玉米 SSIIa 启动子的研究报道较少^[17],但 Harn 等^[8]1998 年最先从玉米胚乳中成功的克隆了 *zmSS II a* 和 *zmSS II b* 的 cDNA, *SS II a* 在玉米淀粉代谢网络中也主要在胚乳中行使功能,参与支链淀粉的合成;任红丽等^[18]与 Hu 等^[19]分别鉴定了玉米可溶性淀粉合成酶基因的 SS I 和 SS III 启动子均为胚乳特异性启动子;Li 等^[20]研究表明籼稻 SSIIa 启

动子为胚乳特异性启动子。以上研究结果预示本研究克隆的玉米 SSIIa 启动子可能具有胚乳特异性。

本研究结果经 PlantCare 在线分析软件分析,发现其除具有典型启动子基本顺式作用元件之外,还含有胚乳特异性表达功能元件,抗旱诱导结合位点,光诱导元件等胁迫诱导顺式作用元件。为了研究部分顺式作用元件的功能,构建了5个缺失载体,主要研究胚乳特异性功能元件、抗旱诱导 MYB 结合位点等的功能。重新设计5种类型的引物,扩增 SSIIa 启动子序列的长度分别为 1 407 bp (P1)、867 bp (P2)、633 bp (P3)、483 bp (P4) 和 365 bp (P5),用于构建5个不同长度 SSIIa 启动子缺失的植物表达载体,分别转化拟南芥,通过基因组 PCR 检测,均扩增出 402 bp 的条带,可证明所采样的拟南芥均为成功转化不同长度启动子的阳性植株。利用 GUS 化学法对转基因阳性拟南芥成熟期叶片和果荚进行染色,初步验证了 *gus* 基因表达部位和大致表达强度;通过荧光定量技术对转基因阳性拟南芥成熟期叶片和种子进行 *gus* 基因定量表达,证明了长度为 1 407 bp (P1) 和 867 bp (P2) 的 SSIIa 启动子具有胚乳特异性。

本研究对5种启动子的功能比较分析只是初步结果,利用 P1 和 P2 联合考察胚乳特异性功能元件的作用,对其功能的深入探讨,如利用 P2 和 P3 联合考察抗旱诱导 MYB 结合位点的作用,利用 P3 和 P4 联合考察启动子中 TATA 序列是否为此启动子行使功能的 TATA-box 等功能的深入研究,还有待后续实验验证。通过对以上5种启动子缺失体功能的进一步研究,期望能够明确 SSIIa 启动子中部分顺式作用元件的功能,为 SSIIa 启动子的应用提供理论依据,为组织特异性启动子的开发和应用提供候选启动子,为玉米淀粉代谢网络调控的研究提供基础。

参考文献:

[1] MÜLLER-RÖBER B T, KOßMANN J, HANNAH L C, et al. One of two different ADP-glucose Pyrophosphorylase genes from potato responds strongly to elevated levels of sucrose[J]. Mol Gen Genet, 1990, 224(1): 136-146.

[2] NAOMI S S, ICHIRO M. Constitutive promoters available for trans-gene expression instead of CaMV35S RNA promoter: *Arabidopsis* promoters of tryptophan synthase protein subunit and phytochrome B[J]. Plant Biotechnol-nar, 2002, 19(1): 19-26.

[3] 覃鸿妮,蔡一林,孙海燕,等. 种植密度对不同株型玉米蔗糖代谢和淀粉合成相关酶活性的影响[J]. 中国生态

<http://xuebao.scau.edu.cn>

- 农业学报, 2010, 18(6): 1183-1188.
- [4] 崔喜艳, 胡广宇, 孙小杰, 等. 1 个新的玉米半透明皱缩胚乳突变体的遗传分析及基因定位[J]. 华南农业大学学报, 2014, 35(5): 31-35.
- [5] 张军杰, 黄玉碧. 玉米可溶性淀粉合成酶研究进展[J]. 玉米科学, 2006, 14(6): 151-154.
- [6] 王振华, 亢伟民, 张新. 高淀粉玉米及其开发利用[J]. 玉米科学, 2002, 10(3): 90-92.
- [7] 彭泽斌, 田志国. 高淀粉玉米的产业化潜力分析[J]. 作物杂志, 2003(6): 10-12.
- [8] HARN C, KNIGHT M, RANAKRISHNAN A, et al. Isolation and characterization of the zSSIa and zSSIb starch synthase cDNA clones from maize endosperm[J]. Plant Mol Biol, 1998, 37(4): 639-649.
- [9] KNIGHT M E, HARN C, LILLEY C E, et al. Molecular cloning of starch synthase I from maize (W64) endosperm and expression in *Escherichia coli* [J]. Plant J, 1998, 14(5): 613-622.
- [10] GAO M, WANAT J, STINARD P S, et al. Characterization of *dull1*, a maize gene coding for a novel starch synthase[J]. Plant Cell, 1998, 10(3): 399-412.
- [11] BLAETH S L, YAO Y, KLUCINEC J D, et al. Identification of mutator insertional mutants of starch-branching enzyme 2a in corn[J]. Plant Physiol, 2001, 125(3): 1396-1405.
- [12] 相恒佐. 毛百合 *GPAT* 基因启动子的克隆和功能鉴定[D]. 沈阳: 沈阳农业大学, 2014: 15-16.
- [13] 佟珊珊. 根特异性启动子表达 *AAP1-bar* 双价基因在玉米新材料创制中的应用研究[D]. 长春: 吉林农业大学, 2014.
- [14] JEFERSON G, RLCARDO J. S, ARTHUR G F, et al. Iron homeostasis related genes in rice[J]. Genet Mol Biol, 2003, 26(4): 477-497.
- [15] THOMAS D S, KENNETH J L. Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method[J]. Nature, 2008, 3(6): 1101-1108.
- [16] 崔喜艳, 陈众峰, 范贝, 等. 栽培大豆 *rbcS* 启动子的克隆及在转基因烟草中功能缺失分析[J]. 西北农林科技大学学报, 2015, 43(5): 114-121, 128.
- [17] 曾礼华, 汪瀚宇, 谢程程, 等. 玉米淀粉合成酶基因 *GBSS* 启动子的克隆与鉴定[J]. 植物生理学报, 2015, 51(9): 1433-1439.
- [18] 任红丽, 黄玉碧. 玉米淀粉合成酶 I 基因 (*zs1*) 启动子载体构建及胚乳瞬时表达[D]. 雅安: 四川农业大学, 2005.
- [19] HU Y F, LI Y P, ZHANG J, et al. *PzsS3a*, a novel endosperm specific promoter from maize (*Zea mays* L.) induced by ABA [J]. Biotechnol Lett, 2011, 33(7): 1465-1471.
- [20] LI Q F, SUN S S, LIU Q Q. Characterization of the spatial and temporal expression of the *OsSSII-3* gene encoding a key soluble starch synthase in rice[J]. J Sci Food Agr, 2013, 93(13): 3184-3190.

【责任编辑 庄 延】