

• 农业生物技术 •

杠柳橡胶合成关键基因 *CPT*、*SRPP* 和 *REF* 启动子克隆与表达特性分析

崔帅^{1,3}, 陈任^{2*}, 曲乐庆^{1,3*}

1 中国科学院植物研究所 植物分子生理学重点实验室, 北京 100093

2 宁夏大学生命科学学院, 宁夏 银川 750021

3 中国科学院大学, 北京 100049

崔帅, 陈任, 曲乐庆. 杠柳橡胶合成关键基因 *CPT*、*SRPP* 和 *REF* 启动子克隆与表达特性分析[J]. 生物工程学报, 2023, 39(7): 2794-2805.

CUI Shuai, CHEN Ren, QU Leqing. Cloning and characterization of the promoters of the key genes *CPT*, *SRPP* and *REF* involved in *Periploca sepium* rubber biosynthesis[J]. Chinese Journal of Biotechnology, 2023, 39(7): 2794-2805.

摘 要: 巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis*)是天然橡胶的主要来源。受热带气候条件限制, 我国巴西橡胶树种植面积有限, 天然橡胶自给率低。杠柳(*Periploca sepium*)可以合成顺式-1,4-聚异戊二烯(天然橡胶的主要成分), 是一种天然橡胶的新型替代植物, 但其合成调控机理尚不明确。本研究利用染色体步移方法, 克隆获得了杠柳顺式-1,4-聚异戊二烯合成关键酶顺式-异戊烯基转移酶(*cis*-prenyltransferase, *CPT*)、小橡胶粒子蛋白(small rubber particle protein, *SRPP*)和橡胶延长因子(rubber elongation factor, *REF*)基因的启动子序列。以 β -葡萄糖醛酸酶(β -glucuronidase, *GUS*)基因为报告基因, 利用农杆菌(*Agrobacterium*)介导稳定遗传转化法解析了这 3 个启动子的组织表达特性。结果显示, 这三者在杠柳的叶片和茎中均有表达, 特别是在叶脉和维管束位置共同表达, 提示在这些部位 *REF* 和 *SRPP* 与 *CPT* 可能相互作用, 共同完成天然橡胶的主要成分顺式-1,4-聚异戊二烯的聚合。本研究为解析杠柳中天然橡胶的生物合成机制以及培育高产天然橡胶新品种提供了理论基础。

关键词: 杠柳; 天然橡胶; 顺式-异戊烯基转移酶; 小橡胶粒子蛋白; 橡胶延长因子; 启动子

资助项目: 宁夏回族自治区重点研发计划(2019BFG02011)

This work was supported by the Key Research and Development Program of Ningxia Hui Autonomous Region (2019BFG02011).

*Corresponding authors. E-mail: CHEN Ren, chenren511@163.com; QU Leqing, lqqu@ibcas.ac.cn

Received: 2022-12-23; Accepted: 2023-04-05; Published online: 2023-04-12

Cloning and characterization of the promoters of the key genes *CPT*, *SRPP* and *REF* involved in *Periploca sepium* rubber biosynthesis

CUI Shuai^{1,3}, CHEN Ren^{2*}, QU Leqing^{1,3*}

1 Key Laboratory of Plant Molecular Physiology, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China

2 School of Life Sciences, Ningxia University, Yinchuan 750021, Ningxia, China

3 University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100049, China

Abstract: *Hevea brasiliensis* is the main source of natural rubber. Restricted by its tropical climate conditions, the planting area in China is limited, resulted in a low self-sufficiency. *Periploca sepium* which can produce natural rubber is a potential substitute plant. *cis*-prenyltransferase (*CPT*), small rubber particle protein (*SRPP*) and rubber elongation factor (*REF*) are key enzymes involved in the biosynthesis of *cis*-1,4-polyisoprene, the main component of natural rubber. In this study, we cloned the promoter sequences of *CPT*, *SRPP* and *REF* through chromosome walking strategy. The spatial expression patterns of the three promoters were analyzed using *GUS* (β -glucuronidase) as a reporter gene driven by the promoters through *Agrobacterium*-mediated genetic transformation. The results showed that *GUS* driven by *CPT*, *SRPP* or *REF* promoter was expressed in leaves and stems, especially in the leaf vein and vascular bundle. The *GUS* activity in stems was higher than that in leaf. This study provided a basis for analyzing the biosynthesis mechanism of natural rubber and breeding new varieties of high yield natural rubber.

Keywords: *Periploca sepium*; natural rubber; *cis*-prenyltransferase; small rubber particle protein; rubber elongation factor; promoter

天然橡胶是一种以顺式-1,4-聚异戊二烯为主要成分的天然高分子化合物^[1],是事关国民经济和国家安全的重要战略资源。目前天然橡胶主要来源于巴西橡胶树(*Hevea brasiliensis* Muell. Arg),其产量占全球天然橡胶总产量的 99%以上^[2]。中国是天然橡胶的消费大国,根据国际橡胶研究小组(International Rubber Study Group, IRSG)数据显示,2019 年中国天然橡胶消费量占全球的 40%,同比欧洲消费量仅占全球 13%,并随着工业化进程,中国对天然橡胶的需求将进一步增加。预计到 2030 年,中国对天然橡胶的需求量将超过 600 万 t^[3-5]。但受制于热带树

种,巴西橡胶树只能在我国海南、云南等有限地区种植,导致天然橡胶产量有限,自给率不足 20%。化学合成橡胶在强度、寿命等方面均低于天然橡胶,在短期内期望依靠合成替代天然橡胶尚无法实现^[6-7]。因此寻找新型的天然橡胶替代植物是一项非常重要的工作。

巴西橡胶树中顺式-1,4-聚异戊二烯的生物合成途径已经基本明确,尤其是甲羟戊酸(mevalonic acid pathway, MVA)^[8]、1-脱氧-D-木酮糖-5-磷酸/2-C-甲基-D-赤藓糖醇-4-磷酸/(1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate/2-C-methyl-D-erythritol-4-phosphate, DXP/MEP)^[9]和聚异戊二烯(polyisoprene)上游

的生物合成过程以及相关的关键酶和基因较为清楚^[10-12]。在此途径中,顺式-异戊烯基转移酶(*cis*-prenyltransferase, CPT)、小橡胶粒子蛋白(small rubber particle protein, SPRR)和橡胶延长因子(rubber elongation factor, REF)发挥着关键作用。CPT 主要是将异戊二烯二磷酸单元以顺式连接的形式不断聚合到橡胶分子链上,在天然橡胶链延伸时发挥重要作用^[12-15]。REF 是橡胶树乳管中比重最大的橡胶粒子膜蛋白,在乳

管中高表达,与 CPT 共同协作完成顺式-聚异戊二烯的延长^[16-18]。SPRR 与 REF 氨基酸序列具有高度同源性,与小橡胶颗粒密切相关,对异戊二烯二磷酸单元聚合到橡胶分子链上发挥积极作用^[19]。也有研究认为,SRPP 单独存在时也可以完成长链橡胶分子的生物合成^[19-22](图 1)。

杠柳(*Periploca sepium* Bunge)为萝藦科杠柳属双子叶缠绕灌木。其茎叶乳汁中含有顺式-聚异戊二烯。由于其适应范围广,有望成为天然橡

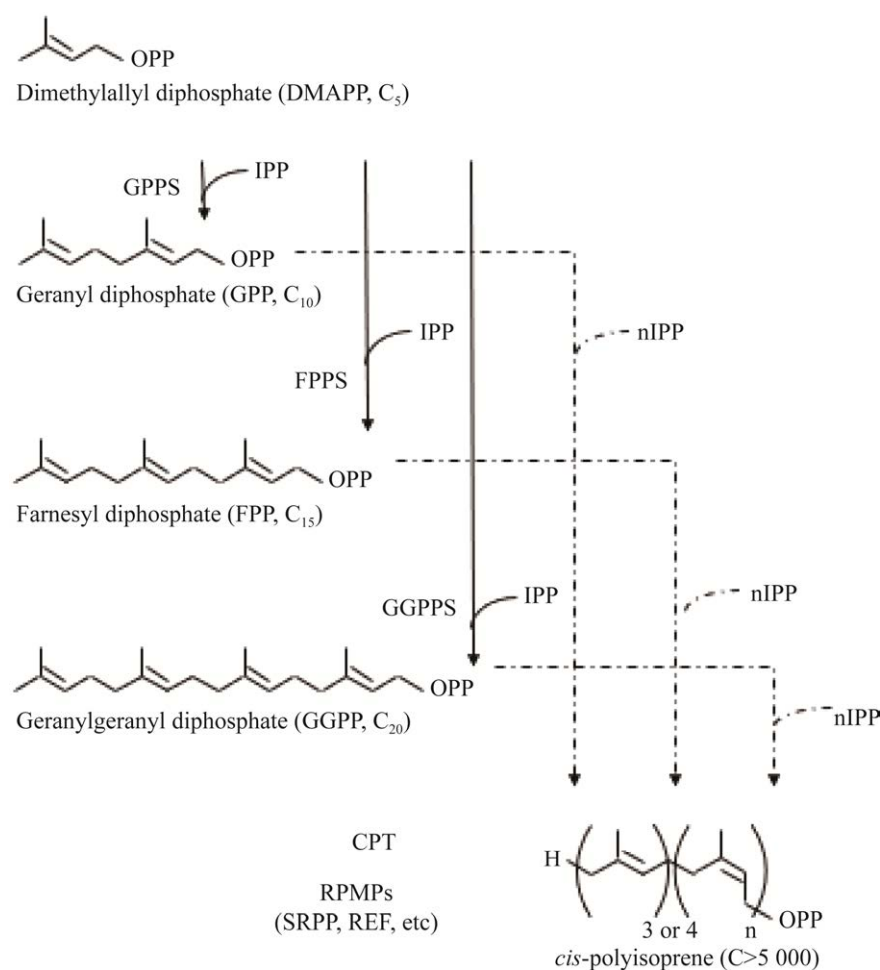


图 1 顺式-聚异戊二烯的生物合成途径 GPPS: 牻牛儿基二磷酸合酶; FPPS: 法尼基二磷酸合酶; GGPPS: 双牻牛儿基二磷酸合酶; CPT: 顺式-异戊二烯基转移酶; RPMPs: 橡胶粒子膜蛋白; SPRR: 小橡胶粒子蛋白; REF: 橡胶延长因子

Figure 1 Biosynthetic pathway of *cis*-polyisoprene. GPPS: Geranyl diphosphate synthase; FPPS: Farnesyl diphosphate synthase; GGPPS: Geranylgeranyl diphosphate synthase; CPT: *cis*-prenyltransferase; RPMPs: Rubber particle membrane proteins; SPRR: Small rubber particle protein; REF: Rubber elongation factor.

胶的替代植物^[20,23]。但目前在杠柳中,对橡胶粒子膜上进行的橡胶分子合成的详细过程,尤其是对顺式-异戊烯基转移酶 *CPT* 和橡胶粒子膜蛋白的作用机理仍不是很清楚。目前转基因杠柳研究多使用花椰菜花叶病毒 35S 启动子(*cauliflower mosaic virus 35S promoter*),由于其为组成型表达启动子,造成转基因杠柳全株组织都积累了聚异戊二烯,影响了正常的生长发育^[24]。因此迫切需要寻找杠柳组织特异性表达启动子,驱动天然橡胶生物合成关键基因。

本研究在通过转录组测序和染色体步移技术等生物信息学方法,明确了杠柳顺式-1,4-聚异戊二烯生物合成途径的关键酶 *CPT*、*SRPP*、*REF* 及其基因 *PsCPT*、*PsSRPP* 和 *PsREF* 的启动子序列。分别通过测序验证后,构建该序列驱动 β -葡萄糖醛酸酶(β -glucuronidase, *GUS*)基因载体,以杠柳茎段为外植体,采用农杆菌(*Agrobacterium*)介导法进行遗传转化,获得转基因植株。观察 *GUS* 染色情况,进而分析关键基因 *PsCPT*、*PsSRPP* 和 *PsREF* 在杠柳中的组织表达情况,为解析顺式-异戊烯基转移酶 *CPT* 和橡胶粒子膜蛋白的作用机理提供理论基础。

1 材料与方法

1.1 实验材料

杠柳无菌苗由宁夏大学陈任实验室保存。

1.2 实验试剂

TransStart[®] *FastPfu* DNA Polymerase 和大肠杆菌(*Escherichia coli*)感受态 *Trans1-T1* Phage Resistant Chemically Competent Cell 试剂盒购自北京全式金生物技术股份有限公司, dNTPs、QuickCut[™] *Hind* III 和 QuickCut[™] *Xba* I 购自北京六合通经贸有限公司, Axygen DNA 凝胶回收

试剂盒 AP-GX-50 购自上海百赛生物技术股份有限公司(北京分公司), StarPrep 快速质粒小提试剂盒购自北京康润诚业生物科技有限公司, EasyGeno 重组克隆试剂盒购自天根生化科技(北京)有限公司, *GUS* 染色试剂盒购自中科瑞泰(北京)生物科技有限公司。 *GUS* 定量检测试剂盒和 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒购自柏吉(湖北)生物科技有限公司。其他常规试剂购自国药集团化学试剂有限公司。

1.3 杠柳基因组 DNA 提取

采用 CTAB 法提取杠柳新鲜叶片的基因组 DNA^[25]。取 2 μ L 用 Nano-300 微量分光光度计检测 DNA 的浓度和纯度,另取 2 μ L 用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测所提 DNA 的完整性。

1.4 目的基因启动子序列获得与验证

参照 TaKaRa 的 Genome Walking kit 的方法,根据 *PsCPT*、*PsSRPP* 和 *PsREF* 基因编码区序列设计特异性嵌套巢式引物 *CPT*-0a/*CPT*-01a/*CPT*-2a、*REF*-0a/*REF*-1a/*REF*-2a 和 *SRPP*-0a/*SRPP*-01a/*SRPP*-2a, 引物序列见表 1。其中 AP1/AP2/AP3/AP4 是试剂盒中自带的 4 条简并引物,以杠柳基因组 DNA 为模板,使用 AP1/AP2/AP3/AP4 分别与 *CPT*-0a、*SRPP*-0a 和 *REF*-0a 进行第 1 轮扩增,反应体系 50 μ L;以第 1 轮 PCR 反应的产物为模板,分别用 AP1/AP2/AP3/AP4 与 *CPT*-1a、*SRPP*-1a 和 *REF*-1a 进行第 2 轮扩增;反应体系 50 μ L;以第 2 轮 PCR 反应的产物为模板,分别用 AP1/AP2/AP3/AP4 与 *CPT*-2a、*SRPP*-2a 和 *REF*-2a 进行第 3 轮扩增;反应体系 50 μ L。将第 2 轮和第 3 轮的扩增产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳分离检测,选择条带特异的样品由北京擎科生物科技有限公司进行测序。将测序结果分别与 *PsCPT*、*PsSRPP* 和 *PsREF* 基因编码区序列进行比对。

表 1 染色体步移、同源重组和鉴定引物序列
Table 1 Primer sequences for genome walking, homologous recombination and detection

Primer name	Sequence (5'→3')
CPT-0a	ATTCAACTTCTTCGGGGCGC
CPT-1a	GAGAGCCAAATATCCAAACC
CPT-2a	CCATCCATGATAAACGCAAT
SRPP-0a	CACAGGAGAAGATTTTGGGT
SRPP-1a	GAAAAATCATGGAATCCCCC
SRPP-2a	GATCAACTGGAAACAAACCC
REF-0a	CTTTTCAGCCGTCAGTATCACT
REF-1a	TCGAAAGGAACGTCATGGAAC
REF-2a	CGTAAATCGTGCCGAAGTATAC
RCCPT-F	ACCATGATTACGCCAAGCTTCCAAGCT TGTTAAAGGGACTTG
RCCPT-R	CCACCCGGGGATCCTCTAGAATCAAGG TGCTAGAATATCTTC
RCSRPP-F	ACCATGATTACGCCAAGCTTTTCGTCTT CTCGCACTAACTTA
RCSRPP-R	CCACCCGGGGATCCTCTAGAAGGAAAA AGATGAAATAAATAT
RCREF-F	ACCATGATTACGCCAAGCTTTGTCAAT CAAGGTCTGTAATTT
RCREF-R	CCACCCGGGGATCCTCTAGATTGCCGA GAGAGTTCTCGAAGC
PF	CCCCAGGCTTTACACTTTAT
PR	CTTTCCCACCAACGCTGATC

1.5 载体构建

首先获取重组片段,以杠柳基因组 DNA 为模板,分别用引物 RCCPT-F/R、RCREF-F/R 和 RCSRPP-F/R 进行 PCR 扩增,引物序列见表 1。用 1.0%的琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物,选择特异性条带回收。50 μ L PCR 反应体系包括 2.5 mmol/L dNTPs 4 μ L, 5 \times TransStart[®] FastPfu 缓冲液 10 μ L, TransStart[®] FastPfu DNA 聚合酶 1 μ L, 10 μ mol 正向和反向引物各 2 μ L, 杠柳基因组 DNA 模板 2 μ L, 加水至 50 μ L。PCR 反应程序为: 95 $^{\circ}$ C 5 min; 95 $^{\circ}$ C 30 s, 58 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 60 s, 共 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。

然后酶切质粒 pBI121 进行片段化,反应体

系为: pBI121 质粒 30 μ L, QuickCut[™] Hind III 和 QuickCut[™] Xba I 各 2.5 μ L, 10 \times QuickCut Green 缓冲液 5 μ L, 加水至 50 μ L, 轻轻混匀后置于 37 $^{\circ}$ C 烘箱孵育 15 min。用 1.0%的琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物,将大片段 pBI121 骨架进行回收。将 pBI121 骨架与重组片段进行同源重组,反应体系为: pBI121 骨架 1 μ L, 重组片段 4 μ L, 2 \times EasyGeno Assembly Mix 5 μ L, 加水至 10 μ L, 轻轻混匀后离心至管底,在 PCR 仪中 50 $^{\circ}$ C 处理 15 min。反应结束后取 5 μ L 转化大肠杆菌感受态细胞。随机挑选 5 个菌斑提取质粒后使用 QuickCut[™] Hind III 和 QuickCut[™] Xba I 双酶切进行鉴定,并取 10 μ L 送北京擎科生物科技有限公司进行测序鉴定。

1.6 农杆菌介导的杠柳遗传转化

参考 Chen 等^[26]创建的方法对杠柳进行农杆菌转化。将构建好的载体转化 EHA105 农杆菌感受态细胞,28 $^{\circ}$ C 黑暗培养 2 d 后挑选单菌落。取 20 mL 含有卡那霉素的 LB 液体培养基过夜培养农杆菌,使农杆菌生长至对数生长期,OD₅₅₀ 在 0.6–1.2 之间;用 PsCo-7 培养基[MS 基本培养基+3%蔗糖+0.1 μ mol/L 1-萘乙酸(1-naphthaleneacetic acid, NAA)+1 μ mol/L 6-苄氨基嘌呤(6-benzylaminopurine, BAP)+20 mg/L 乙酰丁香酮(acetosyringone)+150 mg/L 二硫苏糖醇(dithiothreitol, DTT)]将农杆菌浓度调整至 OD₅₅₀ 为 0.25,取继代 3–4 周的杠柳无菌苗茎段,切成 7 mm 小段后放入菌液感染 3 min,用滤纸吸干多余菌液,置于 PsCo-7 固体(+0.7%琼脂)共培养基,每皿 30–40 个,22 $^{\circ}$ C 暗黑培养 3 d;将茎段转移至愈伤和不定芽诱导培养基 PsSCK1 (MS 基本培养基+3%蔗糖+0.1 mmol/L NAA+1 mmol/L BAP+125 mg/L 羧苄青霉素+25 mg/L 卡那霉素+0.7%琼脂)中,每个培养皿 20 个,25 $^{\circ}$ C 16 h 光照下进行愈伤组织、不定芽诱导和选拔;培养 1 个

月后,取生长良好、具有荧光的愈伤组织置于新的愈伤和不定芽诱导培养基上继代培养。对愈伤组织进行预分化和分化,直至生长出绿点和小苗,然后转接到生根培养基上培养生根。

1.7 GUS 染色和观察

取小苗的叶片和茎段装入 2 mL 离心管中,加入 GUS 染色液,使其全部浸没在染色液中,37 °C 烘箱过夜,取出后用 70% 的酒精进行脱色,直至透明,以非转基因植株为对照。在体视镜或显微镜下观察并拍照。用 5.0% 的低熔点琼脂糖包埋茎段,用振荡切片机切成厚度 80 μm 的切片,在显微镜下观察并拍照。

1.8 GUS 活性测定

参照 GUS 定量检测试剂盒的方法,分别取转化小苗的叶片和茎段约 100 mg 进行 GUS 定量检测,以非转基因植株为对照,在激发波长 365 nm,发射波长 456 nm 下使用酶标仪检测荧光值。并采用 Bradford 蛋白浓度测定试剂盒的方法检测提取液中蛋白浓度。据此计算 GUS 活性。

2 结果与分析

2.1 染色体步移技术获得 *PsCPT*、*PsSRPP* 和 *PsREF* 上游非编码序列

分别在 *PsCPT* 的编码区距离 ATG 起始密码子 290、190 和 120 bp 的位置,设计特异性巢式引物 CPT-0a、CPT-1a 和 CPT-2a; 分别在 *PsSRPP* 的编码区距离 ATG 起始密码子 281、200 和 64 bp 的位置,设计特异性巢式引物 SRPP-0a、SRPP-1a 和 SRPP-2a; 分别在 *PsREF* 的编码区距离 ATG 起始密码子 421、239 和 127 bp 的位置,设计特异性巢式引物 REF-0a、REF-1a 和 REF-2a。分别以上述 3 组特异性巢式引物与试剂盒中自带的简并引物组合,以杠

柳基因组 DNA 为模板,扩增 *PsCPT*、*PsSRPP* 和 *PsREF* 的上游启动子区序列。将 Genome Walking 的第 2 轮和第 3 轮扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶进行电泳分离,选择条带特异的样品由北京擎科生物科技有限公司进行测序。经与 *PsCPT*、*PsSRPP* 和 *PsREF* 基因序列进行比对,分别获得了 *PsCPT*、*PsSRPP* 和 *PsREF* 上游 931、559 和 942 bp 启动子序列(图 2)。

利用 PlantCare (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)在线分析 *PsCPT*、*PsSRPP* 和 *PsREF* 的启动子顺式作用元件。结果发现,3 个基因的启动子均含有基本核心元件 TATA-box 和 CAAT-box 以及多个顺式作用元件(图 2)。

2.2 载体构建

根据 Genome Walking 测序序列,设计同源重组引物,分别将 *PsCPT*、*PsSRPP* 和 *PsREF* 基因起始密码子上游 931、559 和 942 bp DNA 序列,通过同源重组的方法,构建到 pBI121 载体中,替换掉 *GUS* 前的 35S 启动子,分别得到载体 pCPT-GUS、pSRPP-GUS 和 pREF-GUS (图 3)。通过酶切和测序验证载体构建正确。

2.3 杠柳的遗传转化

以杠柳无菌苗茎段作为外植体,采用农杆菌介导法转化载体 pCPT-GUS、pSRPP-GUS 和 pREF-GUS。用 PsCo-7 培养基进行共培养,22 °C 暗培养 3 d。然后将茎段转移至愈伤和不定芽诱导培养基 PsSCK1 中,25 °C 16 h 光照下培养 4 周,之后选择生长良好的抗性愈伤组织转移至新的至愈伤和不定芽诱导培养基 PsSCK1 中,直至抗性愈伤组织上生长出不定芽。然后将不定芽转移至不含植物激素的愈伤和不定芽诱导培养基 PsSCK1 中继续生长,获得再生植株(图 4)。

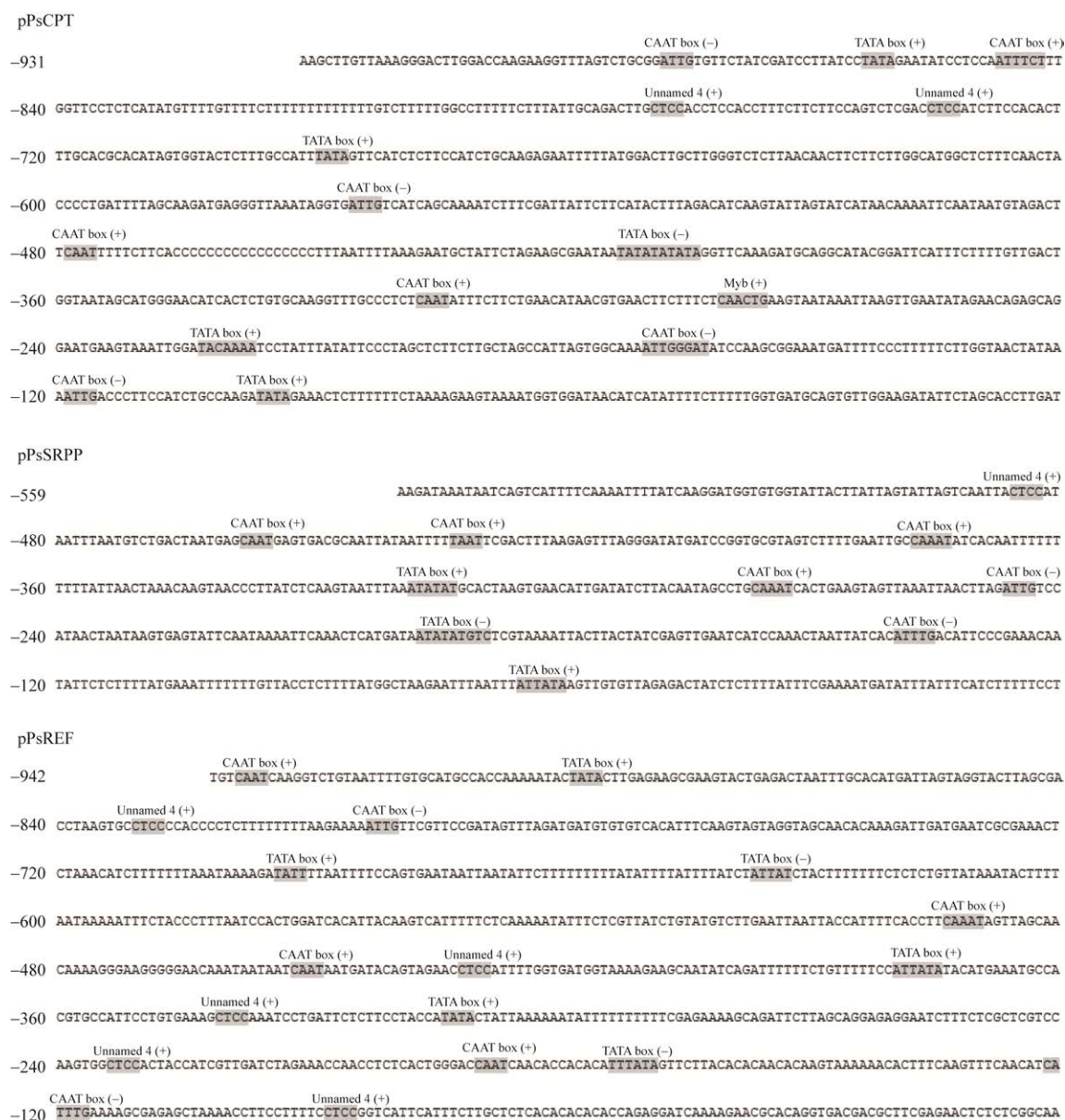


图2 *PsCPT*、*PsSRPP* 和 *PsREF* 启动子序列及其顺式元件 pPsCPT: *PsCPT* 启动子序列; pPsSRPP: *PsSRPP* 启动子序列; pPsREF: *PsREF* 启动子序列

Figure 2 Sequences of *PsCPT*, *PsSRPP* and *PsREF* promoters and their *cis*-elements. pPsCPT: Sequences of *PsCPT* promoter; pPsSRPP: Sequences of *PsSRPP* promoter; pPsREF: Sequences of *PsREF* promoter.

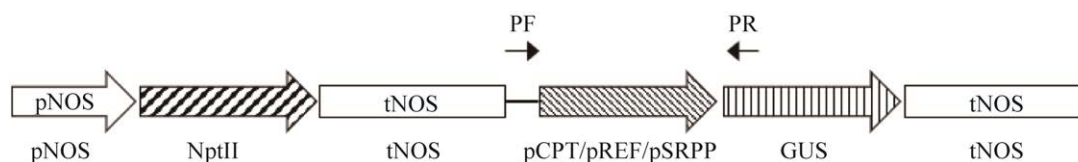


图3 载体构建示意图 黑色箭头显示鉴定引物位置

Figure 3 Construction of vectors. Black arrow shows the site of identification primer.

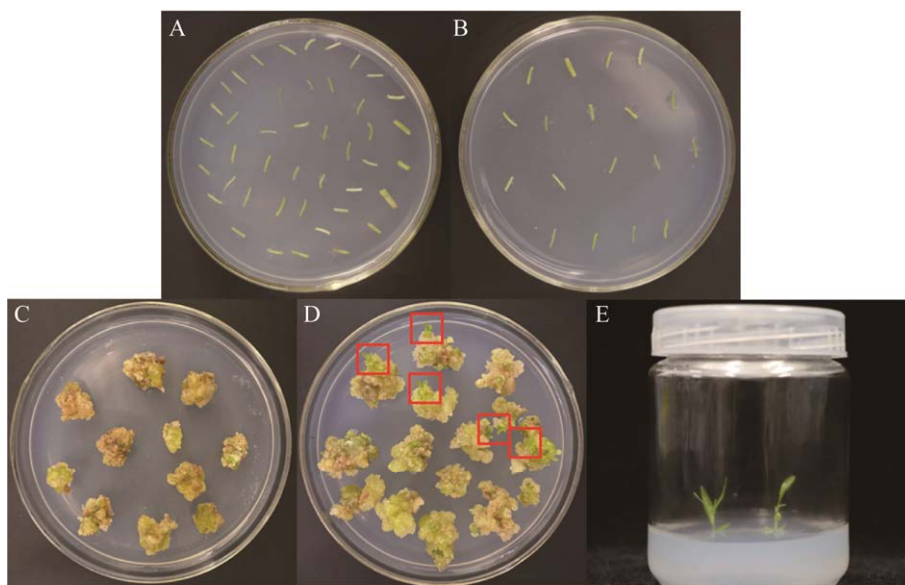


图 4 转 *GUS* 基因植株培育 A: 22 °C 共培养 3 d. B: 愈伤和不定芽诱导. C: 愈伤和不定芽诱导 4 周. D: 愈伤和不定芽诱导 8 周. 红色边框显示为不定芽. E: 不定芽继代培养

Figure 4 Regeneration of transgenic plants with *GUS* gene. A: Co-culture at 22 °C for 3 days. B: Callus and adventitious bud induction. C: Callus and adventitious buds were induced for 4 weeks. D: Callus and adventitious buds were induced for 8 weeks. The red border shows the adventitious buds. E: Subculture of adventitious buds.

2.4 转 *GUS* 基因杠柳的 PCR 鉴定

以非转基因杠柳为对照, 提取转 *GUS* 基因再生植株 DNA, 以 PF 和 PR 为引物进行 PCR 检测。结果显示, 分别获得转 pCPT-*GUS*、pSRPP-*GUS* 和 pREF-*GUS* 阳性再生植株有 42、20 和 44 株(图 5)。

2.5 *PsCPT*、*PsSRPP* 和 *PsREF* 启动子组织表达特性分析

取杠柳转化苗的叶片和茎段进行 *GUS* 染色, 检测 *PsCPT*、*PsSRPP* 和 *PsREF* 启动子的组织表达特性。结果显示, 转 *PsCPT*、*PsSRPP* 和 *PsREF* 启动子驱动 *GUS* 基因在杠柳的叶片和茎中均有表达。进一步进行切片观察发现, *GUS* 基因主要在叶脉和茎的维管组织中表达, 而其他组织中表达较弱, 在根中不表达(图 6)。这些结果显示 *PsCPT*、*PsSRPP* 和 *PsREF* 基因具有叶脉和茎维管束特异性表达启动子, 且其

时空表达特性相似。该结果与巴西橡胶树茎段横切片免疫组化显示 *SRPP* 和 *REF* 与乳管的位置高度重叠的报道一致^[27]。*PsSRPP*、*PsREF* 和 *PsCPT* 在杠柳叶片和茎中的表达位置高度重叠, 这验证了 *PsSRPP*、*PsREF* 可能在杠柳叶片和茎中与 *PsCPT* 共同协作完成顺式-聚异戊二烯的延长。

2.6 *PsCPT*、*PsREF* 和 *PsSRPP* 启动子表达活性分析

以非转基因杠柳为对照, 取转 pCPT、pREF 和 pSRPP 载体的杠柳转化苗茎段和叶片进行 *GUS* 活性检测。结果显示, 非转基因杠柳中的茎段和叶片中均无 *GUS* 活性, 转 pCPT、pSRPP 和 pREF 载体植株的叶片中的 *GUS* 活性分别为(1.76±0.11)、(2.32±0.18)和(0.91±0.05) μmol 4-MU/(min·mg protein)。茎段中 *GUS* 活性分别为(1.95±0.05)、(1.32±0.21)和

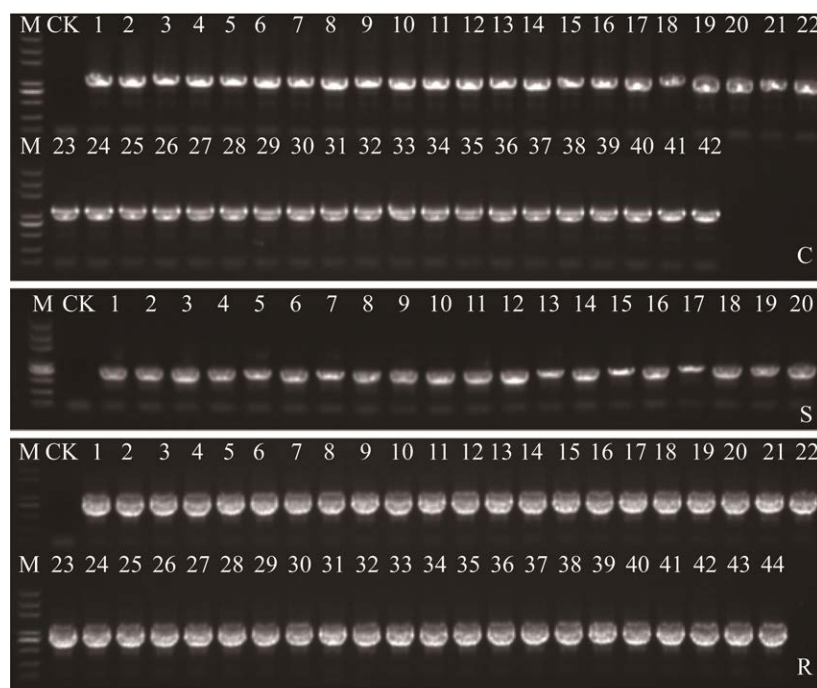


图5 转基因植株 PCR 鉴定 CK: 非转基因对照. M: 2000 plus DNA 分子量标记. C: 转 pCPT-GUS 载体的转化植株. S: 转 pSRPP-GUS 载体的转化植株. R: 转 pREF-GUS 载体的转化植株

Figure 5 PCR analysis of promoter in transgenic plants. CK: Non-transgenic plants. M: 2000 plus DNA molecular marker. C: Regenerated plants of pCPT-GUS. R: Regenerated plants of pREF-GUS. S: Regenerated plants of pSRPP-GUS.

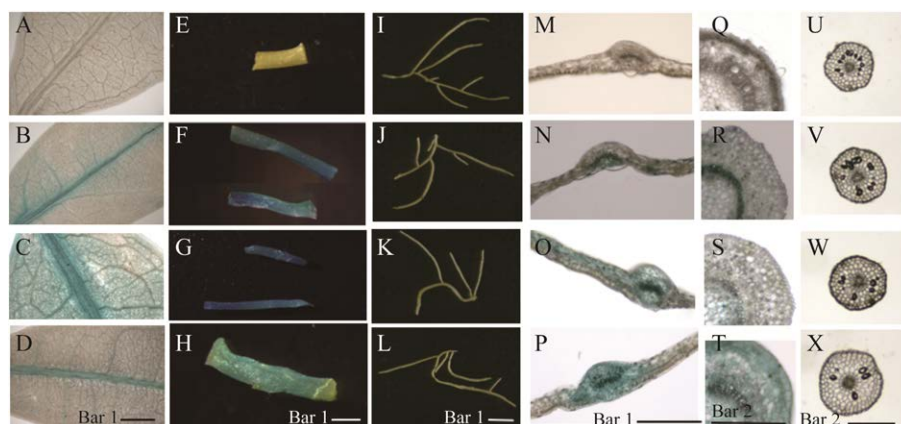


图6 转基因植株 GUS 染色分析 A-D: 对照及转 *PsCPT*、*PsSRPP* 和 *PsREF* 启动子杠柳转化苗的叶片 GUS 染色. E-H: 茎 GUS 染色. I-L: 根 GUS 染色. M-P: 叶片 GUS 染色切片. Q-T: 茎 GUS 染色切片. U-X: 根 GUS 染色切片. Bar 1=1 mm. Bar 2=0.1 mm

Figure 6 Histochemical analysis of GUS expression in leaf and stem of transgenic plants. A-D: GUS staining assay of leaves of control and plantlets transformed with *PsCPT*, *PsSRPP* and *PsREF* promoters. E-H: GUS staining assay of stems. I-L: GUS staining assay of roots. M-P: Leaf sections of GUS staining analysis. Q-T: Steam sections of GUS staining analysis. U-X: Roots sections of GUS staining analysis. Bar 1=1 mm. Bar 2=0.1 mm.

(1.37 ± 0.10) $\mu\text{mol 4-MU}/(\text{min} \cdot \text{mg protein})$ (图 7), 根中均无 GUS 活性。说明 *GUS* 基因和启动子序列均成功转入对应再生植株中, 并且稳定表达。

3 讨论与结论

杠柳是少数可以合成天然橡胶的植物之一, 由于其具有耐寒、适应范围广等特性, 有望成为橡胶树的替代/补充植物。目前, 对杠柳中顺式聚异戊二烯合成调控机理研究还局限在功能基因的克隆与鉴定。在巴西橡胶树中, 天然橡胶以颗粒形式存在于乳胶液中, 乳胶液是乳管中的液体细胞质。*CPT*、*SRPP* 和 *REF* 是橡胶粒子的主要结合蛋白, 在乳管中表达并相互作用, 在橡胶分子合成的起始、延伸和终止的一系列酶促反应中起着非常重要的作用, 共同促使顺式-1,4-聚异戊二烯的聚合^[8-9]。本研究以 *PsCPT*、*PsSRPP* 和 *PsREF* 基因的编码区序列为基础, 采用染色体步移法克隆获得了其启动子序列(图 2)。*PsCPT*、*PsSRPP* 和 *PsREF* 启动子驱动的 *GUS* 报告基因在转基因杠柳叶片和茎中均可以检测到(图 6), 证明已经获得了具有功能的启动子序列。*PsCPT*、*PsSRPP* 和 *PsREF* 启动子主要在叶脉和茎维管束中表达, 在根中

不表达(图 6), 具有组织特异性表达特征。*PsCPT* 和 *PsREF* 启动子在茎中的表达活性较高, 而 *PsSRPP* 启动子在叶片中表达活性高于其在茎中的活性(图 7)。*PsSRPP* 和 *PsREF* 的组织表达特性与 *PsCPT* 相同, 暗示了 *PsSRPP* 和 *PsREF* 在这些位置协同 *PsCPT* 完成顺式-聚异戊二烯的延长。在杠柳中 *PsCPT*、*PsREF* 和 *PsSRPP* 均在叶片和茎中表达, 说明三者可能是协同作用于天然橡胶的合成。但是乳管中并没有 *PsCPT*、*PsREF* 和 *PsSRPP* 的表达, 显示了橡胶颗粒可能并不是在乳管中合成, 乳管可能只是负责对乳汁颗粒的运输。

如何提高聚异戊二烯的含量已成为杠柳源橡胶产业化应用的瓶颈因子。近期研究显示, 杠柳中过量表达 *PsCPT* 可以极显著提高聚异戊二烯含量^[23], 证明了过量表达橡胶合成途径关键基因是提高杠柳天然橡胶含量的有效途径。启动子是最重要的调控元件, 直接决定基因的表达时空特性和表达强度。使用 35S 启动子驱动目的基因转化杠柳可以有效提高杠柳中天然橡胶的含量, 但由于转基因植株中目的基因组成型表达, 导致杠柳所有组织和器官中都过量表达了聚异戊二烯, 抑制了杠柳植株的正常生长发育, 使得地上部位生物量显著降低, 实际上对有效提高天然橡胶产量效果并不理想^[24]。*PsCPT*、*PsSRPP* 和 *PsREF* 启动子主要在叶脉和茎维管束中表达, 而在根中不表达(图 6), 其驱动的目的基因可在叶脉和茎维管束中表达, 避免在其他组织中积累对植株生长的不良影响, 同时有效提高杠柳地上组织中目的基因的表达, 达到总体上提高聚异戊二烯产量的效果。本研究获得的启动子为今后利用现代生物学技术加强聚异戊二烯合成途径中单个或多个关键基因表达, 培育天然橡胶含量大幅提高的杠柳新材料提供了重要调控元件。

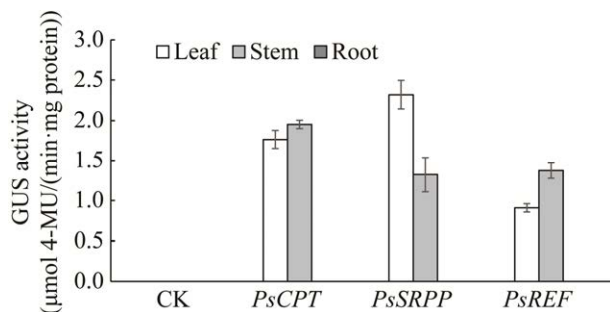


图 7 *PsCPT*、*PsSRPP* 和 *PsREF* 启动子表达活性
Figure 7 GUS activities expressed by various promoters in leaf and stem of transgenic plants.

REFERENCES

- [1] TANGPAKDEE J, TANAKA Y. Why rubber trees produce polyisoprene—a possible role of natural rubber in the *Hevea* tree[J]. Journal of Rubber Research, 1998, 1(2): 77-83.
- [2] BEILEN JB, POIRIER Y. Establishment of new crops for the production of natural rubber[J]. Trends in Biotechnology, 2007, 25(11): 522-529.
- [3] 许灿光, 石靓, 钟鑫. 2016 年中国天然橡胶市场分析与判断[J]. 热带农业科学, 2016, 36(12): 92-97.
XU CG, SHI L, ZHONG X. Analysis of natural rubber market in China in 2016[J]. Chinese Journal of Tropical Agriculture, 2016, 36(12): 92-97 (in Chinese).
- [4] 陈明文. 我国天然橡胶产业发展形势与因应策略[J]. 农业经济问题, 2016, 37(10): 91-94, 112.
CHEN MW. The current situation and coping strategies of China's natural rubber industry[J]. Issues in Agricultural Economy, 2016, 37(10): 91-94, 112 (in Chinese).
- [5] 何长辉, 莫业勇, 刘锐金. 中国天然橡胶生产能力预测分析(2019–2025 年)[J]. 林业经济问题, 2020, 40(3): 320-327.
HE CH, MO YY, LIU RJ. Forecasting of natural rubber production capacity in China (2019–2025)[J]. Issues of Forestry Economics, 2020, 40(3): 320-327 (in Chinese).
- [6] 于冰, 高宇, 丛海林, 张秀兰, 彭乔虹, 杨淑静. 聚异戊二烯橡胶的合成与改性研究进展[J]. 化工新型材料, 2017, 45(6): 14-16.
YU B, GAO Y, CONG HL, ZHANG XL, PENG QH, YANG SJ. Research progress in synthesis and modification of polyisoprene[J]. New Chemical Materials, 2017, 45(6): 14-16 (in Chinese).
- [7] CORNISH K. Similarities and differences in rubber biochemistry among plant species[J]. Phytochemistry, 2001, 57(7): 1123-1134.
- [8] SANDO T, TAKAOKA C, MUKAI Y, YAMASHITA A, HATTORI M, OGASAWARA N, FUKUSAKI E, KOBAYASHI A. Cloning and characterization of mevalonate pathway genes in a natural rubber producing plant, *Hevea brasiliensis*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2008, 72(8): 2049-2060.
- [9] SANDO T, TAKENO S, WATANABE N, OKUMOTO H, KUZUYAMA T, YAMASHITA A, HATTORI M, OGASAWARA N, FUKUSAKI E, KOBAYASHI A. Cloning and characterization of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate (MEP) pathway genes of a natural-rubber producing plant, *Hevea brasiliensis*[J]. Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry, 2008, 72(11): 2903-2917.
- [10] ARCHER BL, AUDLEY BG. New aspects of rubber biosynthesis[J]. Botanical Journal of the Linnean Society, 1987, 94(1/2): 181-196.
- [11] YASUYUKI T. Structure and biosynthesis mechanism of natural polyisoprene[J]. Progress in Polymer Science, 1989, 14(3): 339-371.
- [12] 刘卫平, 王敏杰, 韩玉珍, 赵德刚. 天然橡胶的生物合成机制[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(4): 382-388.
LIU WP, WANG MJ, HAN YZ, ZHAO DG. Biosynthesis mechanism of natural rubber[J]. Plant Physiology Communications, 2002, 38(4): 382-388 (in Chinese).
- [13] ASAWATRERATANAKUL K, ZHANG YW, WITITSUWANNAKUL D, WITITSUWANNAKUL R, TAKAHASHI S, RATTANAPITTAYAPORN A, KOYAMA T. Molecular cloning, expression and characterization of cDNA encoding *cis*-prenyltransferases from *Hevea brasiliensis*[J]. European Journal of Biochemistry, 2003, 270(23): 4671-4680.
- [14] CORNISH K, BACKHAUS RA. Rubber transferase activity in rubber particles of guayule[J]. Phytochemistry, 1990, 29(12): 3809-3813.
- [15] CORNISH K, SILER DJ. Characterization of *cis*-prenyl transferase activity localised in a buoyant fraction of rubber particles from *Ficus elastica* latex[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 1996, 34(3): 377-384.
- [16] DENNIS MS, LIGHT DR. Rubber elongation factor from *Hevea brasiliensis*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1989, 264(31): 18608-18617.
- [17] GOYVAERTS E, DENNIS M, LIGHT D, CHUA NH. Cloning and sequencing of the cDNA encoding the rubber elongation factor of *Hevea brasiliensis*[J]. Plant Physiology, 1991, 97(1): 317-321.
- [18] CORNISH K, WOOD DF, WINDLE JJ. Rubber particles from four different species, examined by transmission electron microscopy and electron-paramagnetic-resonance spin labeling, are found to consist of a homogeneous rubber core enclosed by a contiguous, monolayer biomembrane[J]. Planta, 1999, 210(1): 85-96.
- [19] OH SK, KANG H, SHIN DH, YANG J, CHOW KS, YEANG HY, WAGNER B, BREITENEDER H, HAN KH. Isolation, characterization, and functional analysis

- of a novel cDNA clone encoding a small rubber particle protein from *Hevea brasiliensis*[J]. Journal of Biological Chemistry, 1999, 274(24): 17132-17138.
- [20] 刘祥. 杠柳顺式-1,4-聚异戊二烯生物合成关键基因 *PsIPPI* 和 *PsCPT* 的克隆及功能分析[D]. 银川: 宁夏大学硕士学位论文, 2017.
- LIU X. Molecular cloning and functional analysis of key genes *PsIPPI* and *PsCPT* associated with *cis*-1,4-polyisoprene biosynthesis in *Periploca sepium*[D]. Yinchuan: Master's Thesis of Ningxia University, 2017 (in Chinese).
- [21] YAMASHITA S, YAMAGUCHI H, WAKI T, AOKI Y, MIZUNO M, YANBE F, ISHII T, FUNAKI A, TOZAWA Y, MIYAGI-INOUE Y, FUSHIHARA K, NAKAYAMA T, TAKAHASHI S. Identification and reconstitution of the rubber biosynthetic machinery on rubber particles from *Hevea brasiliensis*[J]. eLife, 2016, 5: 19022.
- [22] BROWN D, FEENEY M, AHMADI M, LONOCE C, SAJARI R, Di COLA A, FRIGERIO L. Subcellular localization and interactions among rubber particle proteins from *Hevea brasiliensis*[J]. Journal of Experimental Botany, 2017, 68(18): 5045-5055.
- [23] 路国栋, 刘祥, 刘慧, 张君, 张虹, 郎思睿, 陈任. 杠柳顺式-1,4-聚异戊二烯生物合成关键基因 *PsIPPI* 和 *PsCPT* 的克隆及功能分析[J]. 基因组学与应用生物学, 2022, 41(5): 1079-1090.
- LU GD, LIU X, LIU H, ZHANG J, ZHANG H, LANG SR, CHEN R. Cloning and functional identification of the key genes *PsIPPI* and *PsCPT* for *cis*-1,4-polyisoprene biosynthesis in *Periploca sepium*[J]. Genomics and Applied Biology, 2022, 41(5): 1079-1090 (in Chinese).
- [24] BENFEY PN, CHUA NH. The cauliflower mosaic virus 35S promoter: combinatorial regulation of transcription in plants[J]. Science, 1990, 250(4983): 959-966.
- [25] SURZYCKI S. Preparation of genomic DNA from plant cells[M]//Basic Techniques in Molecular Biology. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 2000: 57-78.
- [26] CHEN R, GYOKUSEN M, NAKAZAWA Y, SU YQ, GYOKUSEN K. Establishment of an *Agrobacterium*-mediated transformation system for *Periploca sepium* Bunge[J]. Plant Biotechnology, 2010, 27(2): 173-181.
- [27] SANDO T, HAYASHI T, TAKEDA T, AKIYAMA Y, NAKAZAWA Y, FUKUSAKI E, KOBAYASHI A. Histochemical study of detailed laticifer structure and rubber biosynthesis-related protein localization in *Hevea brasiliensis* using spectral confocal laser scanning microscopy[J]. Planta, 2009, 230(1): 215-225.

(本文责编 陈宏宇)