

辽宁碱蓬甜菜碱醛脱氢酶基因(*BADH*)启动子分离及序列分析

Isolation of *BADH* Gene Promoter from *Suaeda liaotungensis* and its Sequence Analysis

李秋莉* 张 毅 尹 辉 李 丹

LI Qiu-Li*, ZHANG Yi, YIN Hui and LI Dan

辽宁师范大学生命科学学院,大连 116029

College of Life Science, Liaoning Normal University, Dalian 116029, China

摘 要 根据已知的辽宁碱蓬 *BADH* cDNA 5' 端序列设计两个基因特异的反向引物(BR1, BR2),通过衔接头 PCR 获得了 *BADH* 基因起始密码子上游 265 bp 的序列。根据所获得的序列设计两个基因特异的反向引物(BR3, BR4),用 BR2、BR3、BR4 分别与 4 个简并引物配对,通过 TAIL-PCR 扩增,获得了约 2 kb 的序列。经 Sequencer 软件拼接上述两段序列,获得了 *BADH* 基因起始密码子上游 2055 bp 的序列。用 TSSP-TCM 软件分析此序列,预测出转录起始点(T)位于起始密码子上游 62 bp 处,由此获得了 1993 bp 的 *SIBADH* 启动子序列。用 PLACE 软件分析此序列,发现该序列具有启动子的基本元件 TATA-box、CAAT-box,包含多个胁迫诱导元件,如盐诱导元件 GAAAAA,抗冻、缺水、脱落酸、抗寒元件 CANNTG,伤害诱导元件 ANATTNCNN,热激元件 ATAAATGT 等,是一个强的胁迫诱导启动子。

关键词 辽宁碱蓬,甜菜碱醛脱氢酶,启动子,序列分析

中图分类号 Q781 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)01-0077-05

Abstract In this study, the 5' -flanking proximal region of stress-induced gene encoding betaine aldehyde dehydrogenase was isolated by Adaptor-PCR and TAIL-PCR from halophyte *Suaeda liaotungensis*. 1993 bp sequence was obtained by sequencing. The transcription start site, which localized at 62 bases upstream of the start ATG, was predicted using TSSP-TCM program. The functional elements were analysed by PLACE programm. The *SIBADH* gene promoter contains the basic elements: TATA-box, CAAT-box, and stress-induced elements: salt responded element, cold, dehydration, ABA and frozen responded elements, WUN responded elements and HSE. Obtaining the promoter of betaine aldehyde dehydrogenase gene from *Suaeda liaotungensis* provides a foundation for analyzing the stress-induced promoter elements, studying the relationship between structure and function of the promoter, and investigating the molecular mechanism of *BADH* gene regulation.

Key words *Suaeda liaotungensis*, betaine aldehyde dehydrogenase, promoter, sequence analysis

启动子是基因表达调控的重要顺式作用元件,是转录中最主要的一种调节方式,在某种程度上决定基因表达的时空顺序。同时,启动子也是基因工

程表达载体的一个重要元件,要使克隆的基因能够在寄主细胞中特异性地表达,必须使用含有特异表达启动子的载体。所以分离启动子、弄清楚启动子

Received: September 15, 2005; Accepted: November 3, 2005.

This work was supported by the grants from the Science & Technology Foundation of Liaoning Province(No. 20031060) and the Educational Department of Liaoning Province(No. 2004F091).

* Corresponding author. Tel: 86-411-84258681; E-mail: liqili@dl.cn

辽宁省科技基金资助项目(No. 20031060) 辽宁省教育厅资助项目(No. 2004F091)

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

的分子本质是研究基因表达调控、构建基因工程表达载体的关键。

甜菜碱是一种无毒的小分子渗透调节剂,在盐碱、干旱、高温、寒冷等条件下,许多生物积累甜菜碱。在植物中,甜菜碱是由胆碱经两步酶催氧化形成的,催化第二步反应的酶是甜菜碱醛脱氢酶(betaine aldehyde dehydrogenase, BADH),正常情况下该酶的表达量很低,但在低温、干旱和盐碱的条件下,BADH 活性显著提高,在 300 mmol/L NaCl 条件下,菠菜植株的 BADH 活性提高约 3 倍^[1]。用 250 mmol/L NaCl 处理中亚滨藜,其 BADH mRNA 水平比对照高约 2 倍,BADH 基因的表达受盐诱导^[2]。目前已克隆了几种植物的 BADH 基因,并已在转基因植物中得到表达,转基因植物的抗盐性有不同程度的提高^[3-5],但结果并不理想。在转基因植物中 BADH 基因是受 CaMV 35S 启动子调控表达的,是组成型表达,所以转基因植物的抗盐能力是有限的。为了进一步提高转基因植物的抗盐能力,必须分离 BADH 基因启动子,找到调控 BADH 基因表达的关键作用元件,分析其对 BADH 基因表达的调控机制。在此基础上,使用 BADH 基因自身特有的启动子调控 BADH 基因在转基因植物中的表达,突破抗盐基因工程中外源基因组成型表达的局限。Yin X 等^[6] (2002) 从盐生植物 *Atriplex centralasiatica* 中分离了 *AcBADH* 基因启动子(1.2 kb),分析发现启动子中有许多胁迫相关的功能元件,如 GC-box、HSE、WUN-motif、MRE 等,并通过 5' 端缺失发现-1115 bp ~ -890 bp 和-462 bp ~ -230 bp 两个区段受盐强烈诱导,是一个较强的盐诱导启动子。

本研究就是在已知的辽宁碱蓬 *BADH* cDNA 序列^[5]的基础上,分离 *SIBADH* 基因启动子,并对其进行序列分析,找出该启动子的功能元件,分析其与 *AcBADH* 基因启动子的异同,以期用于研究 *BADH* 基因的表达调控机制,构建胁迫诱导高效表达的基因工程表达载体。

1 材料与方法

1.1 材料

植物材料辽宁碱蓬种子采自大连海边,在实验室栽培;菌种为本实验室保存,pMD18-T 载体、各种酶、试剂和试剂盒购自 TaKaRa(大连)公司;引物自行设计并由 TaKaRa(大连)公司合成。

1.2 方法

1.2.1 辽宁碱蓬总 DNA 的提取:以辽宁碱蓬叶片

为材料,采用 CTAB 法提取其总 DNA^[7]。

1.2.2 衔接头 PCR 扩增:根据已知的辽宁碱蓬 *BADH* cDNA 序列^[5]设计两个基因特异的嵌套反向引物 BR1 5'-AGCTGTTGCTGCTGGAATTT-3'、BR2 5'-TCGTTTGATGGGTTCCTCTCC-3'。用 TaKaRa LA PCRTM *in vitro* Cloning Kit 进行衔接头 PCR 扩增。首先用 *EcoR* I 酶切辽宁碱蓬总 DNA,加 *EcoR* I Cassette,然后以 BR1 和 Cassette Primer C1 进行一次 PCR,以第一次 PCR 产物为模板,BR2 和 Cassette Primer C2 为引物进行二次 PCR 扩增,最后回收 PCR 产物片段,测序获得 *BADH* 基因上游序列。

1.2.3 TAIL-PCR 扩增:根据 1.2.2 中获得的 *BADH* 基因上游序列设计两个反向特异引物 BR3、BR4(表 1),用 BR2、BR3、BR4 分别与 4 个 AD 引物(表-1)配对进行 TAIL-PCR 扩增。首先以基因组 DNA 为模板,BR2 为下游引物,4 组 AD 引物为上游引物进行 TAIL-PCR,反应体系及反应条件见表 2 和表 3;然后以 First TAIL-PCR 产物为模板,BR3 为下游引物,4 组 AD 引物为上游引物进行 TAIL-PCR;再以 Second TAIL-PCR 产物为模板,BR4 为下游引物,4 组 AD 引物为上游引物进行 TAIL-PCR,二、三次 PCR 的反应体系及反应条件与第一次 PCR 的相同。最后将一、二、三次 TAIL-PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳,回收合适片段,测序。

表 1 TAIL-PCR 扩增引物

Table 1 The primers used in TAIL-PCR

BR3	5'-TGAGAGTAGAGGATAGCGAG-3'
BR4	5'-GATACTACGTGGCGACTTG-3'
BR5	5'-GGCGGTGTCCACTAAAAGTAC-3'
AD1	5'-NTCGASTWTSCWGTT-3'
AD2	5'-NGTCGASWGANAAGAA-3'
AD3	5'-WGTGNAGWANCANAGA-3'
AD4	5'-AGWGNAGWANCAGAG-3'

Note : N :A/C/G/T ; S :C/G ; W :A/T

表 2 TAIL-PCR 扩增反应组分

Table 2 The composition of TAIL-PCR

Genomic DNA	1 μL
10 × LA Buffer(Mg ²⁺)	5 μL
dNTP(2.5mmol/L)	8 μL
LA Taq	1 μL
BR2(20pmol/L)	0.5 μL
AD primer(100pmol/L)	1 μL
dH ₂ O	Up to 50 μL

表 3 TAIL-PCR 扩增反应步骤
Table 3 TAIL-PCR procedure

1 ×	93 ℃	1min	95 ℃	1min		
1 ×	94 ℃	30s	62 ℃	1min	72 ℃	2min
1 ×	94 ℃	30s	25 ℃	1min	72 ℃	2min
			60℃			
15 ×	94℃	30s	60℃	1min	72℃	2min
	94℃	30s	60℃	1min	72℃	2min
	94℃	30s	44℃	1min	72℃	2min
1 ×	72℃	5min	4℃	∞		

1.2.4 软件序列分析 :用 Sequencer 软件将两种方法获得的序列进行拼接 ,获得全长序列。用 TSSP-TCM 软件^[8]预测转录起始点、用 PLACE 软件^[9]分析启动子序列中各功能元件。

1.2.5 全长启动子片段的克隆 :根据全长序列设计引物 ,PCR 获得全长启动子片段 ,将该片段克隆到 pMD18-T 载体 ,以备后面的研究使用。

2 结果与讨论

2.1 *BADH* 基因上游 DNA 序列的获得

通过衔接头 PCR 法获得约 400 bp 的片段(图 1) ,该序列的 3'端近 200 bp 的序列与 *BADH* cDNA 5'端序列一致 ,说明该片段确实是 *BADH* 基因上游的启动子片段 ,该片段包含了 *BADH* 基因起始密码子上游 265bp 的序列。

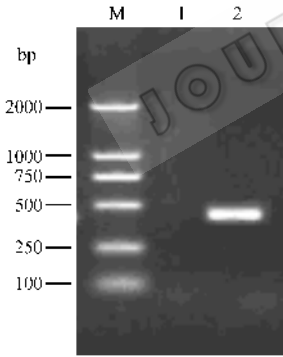


图 1 衔接头 PCR 产物电泳图
Fig. 1 Results of adapter PCR

M : DNA marker DL2 000 ; 1 : 1st PCR product ; 2 : 2nd PCR product .

由于衔接头 PCR 法所获得的序列较短 ,我们希望获得更长的序列 ,以期获得功能最强的启动子 ,获得足够多的与抗性相关的功能元件 ,所以我们又采用 TAIL-PCR 的方法进行了扩增。TAIL-PCR(热不对称 PCR)是一种用来分离与已知序列临近的未知 DNA 序列的分子生物学技术 ,非常适用于已知基因的启动子分离 ,已经有一些成功的报道^[10-12]。通过三次 TAIL-PCR ,我们获得了 4 组扩增产物(图 2) ,其中以 AD2 为引物的扩增结果最好 ,我们回收了以 AD2 为引物的第二次扩增片段(5 号片段) ,测序获

得了近 2 kb 的 DNA 序列。

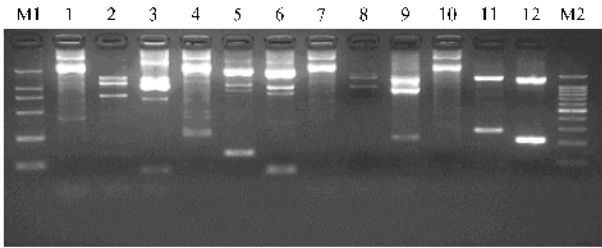


图 2 三次 TAIL-PCR 产物电泳图
Fig. 2 Results of TAIL-PCR

M1 : DNA marker DL2 000 ; 1 , 2 , 3 : products of first , second , tertiary TAIL-PCR using AD1 primer ; 4 , 5 , 6 : products of first , second , tertiary TAIL-PCR using AD2 primer ; 7 , 8 , 9 : products of first , second , tertiary TAIL-PCR using AD3 primer ; 10 , 11 , 12 : products of first , second , tertiary TAIL-PCR using AD4 primer ; M2 : 100 bp DNA ladder marker .

用 Sequencer 软件将两次测序获得的序列进行拼接 ,获得了 *BADH* 基因起始密码子上游 2055 bp 的全长序列(该序列已被 GenBank 收录 ,登录号为 DQ104698)。根据全长序列设计引物 ,PCR 获得了全长片段 ,将此全长片段克隆到 pMD18-T 载体上 ,获得了目的重组子 pMD18-T-PB(资料略)。

2.2 *BADH* 基因上游 DNA 序列的分析

用 TSSP-TCM 软件分析 *BADH* 基因起始密码子上游序列 ,预测出转录起始点为 T ,位于起始密码子上游 62 bp 处 ,这与普遍认为的转录起始点为 A 不同 ,但与 Yin X 等^[6]通过引物延伸和 5'-RACE 法测定的结果一致 ,说明我们预测的转录起始点基本正确 ,由此我们获得了 *BADH* 基因上游 1993 bp 的启动子序列 ,比 Yin X 等^[6]获得的 *AcBADH* 启动子长 800 bp ,且没有同源性。用 PLACE 软件分析此序列 ,发现该序列具有启动子的基本转录元件 :TATA-box 位于 - 29bp 和 - 106bp 处 ,CAAT-box 位于 - 55bp、- 156bp 和 - 175bp 处 ,还发现该序列包含多个胁迫诱导元件 :3 个盐诱导元件 GAAAAA ,分别位于 - 189bp、- 1184bp 和 - 1480bp 处 ;5 个抗冻、抗寒、缺水 and 脱落酸诱导元件 CANN TG ,分别位于 - 182bp、- 764bp、- 1109bp、- 1142bp、- 1152bp 和 - 1601bp 处 9 个伤害诱导元件 ANATTNCNN 和 11 个热激应答元件(各元件的位置如图 3 所示) ,而 Yin X 等^[6]报道的启动子序列中没有明显的盐诱导元件。

以上序列分析结果表明 ,我们所分离的启动子是一个强的胁迫诱导启动子 ,这与 *BADH* 基因的胁迫表达是一致的。在胁迫条件下 ,该启动子能否驱动其下游基因在转基因植物中高效表达 ,哪个区段的作用更明显 ,这些尚需进行进一步研究 ,此项工作正在进行中。

TGCGCCTATATATCCGAGAAGTTACAAAAAAGGACTAAGGTCTCAGGGCACATTTAACCA	-1934
CTGACATGAATCAAGCTTTACCTATTCGTTACACTATATATCCCTTGACCCTCCTCAAGA	-1874
CTCAAGAGG <u>TGAAAATTG</u> AAAAGTATATATGTATGAGTGTAAGACAAATTGATAATGGCA	-1814
HSE	
TCATCTATTAATCCAGTGTTAGGTGAGCTATCTTTCGACGAAGTGATA <u>TAAACTTT</u> G	-1754
HSE	
TTTGGTAAAC TGTTAGTCCATTTTTTTGGTTTTATGAATATTGTTTTGTATTCTTATAA	-1694
CATTAATCAGATAGGCGTGCATGCAGTGTTAGGCAATGG <u>AGATTACT</u> TGGGCCTCCA	-1634
WUN-motif	
GCTACTTTTTTGTCTATGTTCTCAGCC <u>C</u> ACTTGATATTCTACAATTTGTGGGCCTCCAA	-1574
Cold, dehydration, ABA and frozen-motif	
TAATCATATTTGTTCTATAGTTTAAGTTGGTTTTCTC <u>ACATTTCAGAGTCCACAAAGAT</u>	-1514
WUN-motif	
<u>TGCCACCC</u> AAAAATAATAATATATCATAG <u>GAAAAATTT</u> TTCATTTTTTTCGAAATCATC	-1454
WUN-motif Salt-motif HSE	
TTACTTACTT <u>ATAAAATGT</u> TGCAATTTT <u>ATAAAATTT</u> CTTATGCAAGGTATTATGTGGAA	-1394
HSE HSE WUN-motif	
CAATAAGACTTTTGCATAGTTGATGCTTTAATAAGAAATTGATATCATTTTATCAGTAAA	-1334
TAATATTAAAGTTGGCTTAGTTTTGATTTGGGCTTTGGCTTTCAGAATTACTGAGTATTT	-1274
GTTGAAAAGCTTCATGCTTA <u>ATAAAATTA</u> AAACAACCACGATTAAAGATTTAAAGTAACC	-1214
HSE	
CTATAATATCACATTAGAGACCATAGAA <u>AAAAAATAA</u> AAAAAGAAGAGAAAAGAAA <u>CATT</u>	-1154
Salt-motif HSE Cold, dehydration, ABA and frozen-motif	
<u>TG</u> AATA <u>CACCTG</u> CTTCTGCTTGTTGGTGGTTAGAAAATGA <u>CATTG</u> CTAATGTCCAATC	-1094
Cold, dehydration, ABA and frozen-motif	
TTAGAAAATGAAGGTAGACATTCGTCCATAATTTTCAATAAAGTACAAAAGTAAAGAGTC	-1034
ATTTTCGATTAATTTTGGGAAGAAGCCAAGAAGGGTTTGGTGGCACCGTTGAATTGCAA	-974
CCATTAATTAATAATGACTAGAAAAAGAAAAGAGATGTCAGCCGCATACATACATTGA	-914
TGAGATTTATCAACTCAATGCACCTCTTTTTCTATGCCACATACTCGCATATATAACT	-854
AGTTTTATGT GCACGCGATGCGTGCTTAACGCTA <u>TGAAAATTG</u> TATATAATATGTATTAG	-794
HSE	
C <u>ATAAAATTT</u> TTATTTGGTATATTT <u>CATGTG</u> CAAACGATTAACAATGAAATCGAAGAATA	-734
HSE WUN-motif Cold, dehydration, ABA and frozen-motif	
ATTATATGAATTCCTTTAGAGAGTAATGTCTTTTGATTTGAATTTACACAAATTAAATT	-674
ATCATGTATAAATGTATAATAAATGTACTCTTGATTTTAAATTAAGAAAGGGTGATTTAG	-614
ACAAATCATGTCATAACTTT <u>TAAATTTCATTAAGGGTAAAGTAGGTATTTTAGTGACAC</u>	-554
WUN-motif	
CGCCACCG <u>CCGCGC</u> GCCTCCCCCTTCCCTTATATAATAAAGATATTAGTGGACTGTTTCT	-494
GTGGAGCCAAAAATATATAATTTGGTTTTAACACACTACGAGTTCGAGTAGCAATACCAA	-434
TACAGTAATTTGGTATTGCCAAAT <u>ATATTTCTT</u> AAATACGAAGTACATATCATAAAT <u>ATA</u>	-374
WUN-motif	
TTTCATTTTGAAGTTTCTCTATTTCATGTACCTT <u>ATATTTC</u> AAAAGTAACAAATATAAAAG	-314
WUN-motif WUN-motif	
AACAGAGGGAGTAGGAACGACAAACGAGTACTATACTACTACGTAGCAATTATATTTAAA	-254
TTCAATCTTTTCTATACAATTACAGTTATATCCAATAAAGTACGGAGTA <u>ATAAAATGTG</u>	-194
HSE	
<u>AAAAAA</u> <u>CAAATG</u> GAA <u>CAAT</u> GAGTGATGTTGTCAC <u>CAAT</u> ACACTATGTCTTTATCGAGATG	-134
Salt motif Cold, dehydration, ABA and frozen-motif CAAT-box	
AAAGTGAAATTATTAGAGGGACATATAAAGGATGCTGCAAGTCGCCACGTAGTATCCCAA	-74
TATA-box	
CCTGATCTAAAGAGT <u>CAAT</u> TAATGTCCAAATTAAGGTCTCTTATAAAACCTCGCTATCCT	-14
CAAT-box TATA-box	
CTACTCTCACTCTTTGCTTCCCACTCTATTTCTCTCTCCCATTTTCATCATCAACTCAA	47
TTTCATTCTGCAACAATG	

图3 BADH 基因启动子序列

Fig. 3 The promoter sequence of *S1BADH* gene

The shadow indicates the transcription start site. The start codon is shown in bold letters. Potential functional elements predicated by PLACE software are underlined or boxed.

REFERENCES(参考文献)

- [1] Weigle P, Weretilnyk EA. Betaine aldehyde oxidation by spinach chloroplast. *Plant Physiol*, 1986, **82**: 753 – 759
- [2] Chen X(陈秀娟), Wang JL(王峻岭), Zhao YX(赵彦修) *et al.* The research on cDNA Fragment of Betaine Aldehyde Dehydrogenase(*BADH*) gene in *Atriplex centralasiatica* Iljin. *Acta Phytophysiological Sinica*(植物生理学报), 2001, **27**(4): 309 – 312
- [3] Guo Y(郭岩), Zhang L(张莉), Xiao G(肖岗) *et al.* Expression of betaine aldehyde dehydrogenase gene and salinity tolerance in rice transgenic plant. *Science China*(中国科学 C 辑), 1997, **27**: 151 – 155
- [4] Guo BH(郭北海), Zhang YM(张艳敏), Li HJ(李洪杰) *et al.* Transformation of Wheat with a gene encoding for the betaine aldehyde dehydrogenase. *Acta Bot Sin*(植物学报), 2000, **42**: 279 – 283
- [5] Li QL, Gao XR, Yu XH *et al.* Molecular cloning and characterization of betaine aldehyde dehydrogenase gene from *Suaeda liaotungensis* and its use in improved tolerance to salinity in transgenic tobacco. *Biotechnology Letters*, 2003, **25**(17): 1431 – 1436
- [6] Yin X, Zhao Y, Luo D *et al.* Isolating the promoter of a stress-induced gene encoding betaine aldehyde dehydrogenase from the halophyte *Atriplex centralasiatica* Iljin. *Biochim Biophys Acta*, 2002, **1577**(3): 452 – 456
- [7] Doyle JJ, Doyle JL. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 1990, **12**: 552 – 555
- [8] Shahmuradov IA, Solovyev VV, Gammernan AJ. Plant promoter prediction with confidence estimation. *Nucleic Acids Research*, 2005, **33**: 1069 – 1076
- [9] Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M *et al.* Plant cis-acting regulatory DNA elements(PLACE) database. *Nucleic Acids Research*, 1999, **27**(1): 297 – 300
- [10] Liu YG, Norihiro Mitsukawa, Teruko Oosumi *et al.* Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junctions by thermal asymmetric interlaced PCR. *The Plant Journal*, 1995, **8**(3): 457 – 463
- [11] Terauchi R, Kahl G. Rapid isolation of promoter sequences by TAIL-PCR: the 5'-flanking regions of *Pal* and *Pgi* genes from Yams(*Dioscorea*). *Mol Gen Genet*, 2000, **263**: 554 – 560
- [12] Liu ZH(刘召华), Guo HN(郭洪年), Zheng GY(郑光宇) *et al.* Cloning of ACA gene promoter and preliminary study of its function. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 2005, **21**(1): 139 – 143