

· 合成生物技术 ·

# 人工合成根特异启动子 SRSP 的功能分析

崔文文<sup>1,2</sup>, 迟婧<sup>2</sup>, 冯艳芳<sup>1</sup>, 耿丽丽<sup>2</sup>, 刘荣梅<sup>1</sup>

1 东北农业大学 生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150000

2 中国农业科学院植物保护研究所 植物病虫害生物学国家重点实验室, 北京 100193

崔文文, 迟婧, 冯艳芳, 等. 人工合成根特异启动子 SRSP 的功能分析. 生物工程学报, 2020, 36(4): 700–706.

Cui WW, Chi J, Feng YF, et al. Construction and function of a root-specific promoter SRSP. Chin J Biotech, 2020, 36(4): 700–706.

**摘要:** 根负责吸收水分和养分, 是重要的植物组织, 但易受生物及非生物胁迫, 影响作物的生长发育和产量。设计合成根特异启动子, 可为与胁迫相关的抗性基因在作物根部的功能研究及高效表达提供候选启动子。文中将 4 拷贝的根特异性顺式作用元件 (OSE1ROOTNODULE、OSE2ROOTNODULE、SP8BFIBSP8AIB 和 ROOTMOTIFAPOX1) 以串联排列方式设计合成了一个根特异性模块 (*pro-SRS*), 并与来自 CaMV 35S 启动子的最小启动子融合, 合成一个人工合成启动子 SRSP。通过替换 CaMV 35S 启动子将 SRSP 启动子克隆到 pCAMBIA2300.1 中以驱动 GUS 表达。将携带 SRSP 启动子的构建体通过农杆菌介导的方法转化到烟草中。GUS 组织化学染色分析和实时 PCR (RT-PCR) 分析显示 SRSP 启动子在转基因烟草中赋予根特异性表达。说明顺式作用元件重复排列可实现启动子预期功能, 本研究为理性设计植物组织特异启动子奠定了理论基础。

**关键词:** 顺式作用元件, 根特异启动子, 合成启动子, *gus* 基因

## Construction and function of a root-specific promoter SRSP

Wenwen Cui<sup>1,2</sup>, Jing Chi<sup>2</sup>, Yanfang Feng<sup>1</sup>, Lili Geng<sup>2</sup>, and Rongmei Liu<sup>1</sup>

1 School of Life Sciences, Northeast Agricultural University, Harbin 150000, Heilongjiang, China

2 State Key Laboratory for Biology of Plant Diseases and Insect Pests, Institute of Plant Protection, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100193, China

**Abstract:** The responsibility of root is absorbing water and nutrients, it is an important plant tissue, but easily to be affected by biotic and abiotic stresses, affecting crop growth and yield. The design of a synthetic root-specific promoter provides candidate promoters for the functional analysis and efficient expression of stress-related genes in crop roots. In this study, a synthetic root-specific module (*pro-SRS*) was designed using tandem four-copies of root specific cis-acting elements (OSE1ROOTNODULE, OSE2ROOTNODULE, SP8BFIBSP8AIB, and ROOTMOTIFAPOX1), and fused with minimal promoter from the CaMV 35S promoter to synthesize an artificially synthetic SRSP promoter. The SRSP promoter was cloned

**Received:** June 17, 2019; **Accepted:** September 23, 2019

**Supported by:** National Natural Science Foundation of China (No. 31501711).

**Corresponding authors:** Rongmei Liu. Tel: +86-451-55190948; E-mail: 234388435@qq.com

Lili Geng. Tel: +86-10-62812642; E-mail: llgeng@ippcaas.cn

国家自然科学基金 (No. 31501711) 资助。

网络出版时间: 2019-11-07

网络出版地址: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.1998.Q.20191107.1546.001.html>

in pCAMBIA2300.1 by replacing CaMV 35S promoter so as to drive GUS expression. The constructs with SRSP promoter were transformed in tobacco by *Agrobacterium*-mediated method. SRSP promoter conferred root-specific expression in transgenic tobacco plants through Real-time PCR (RT-PCR) analysis and GUS histochemical staining analysis. It is indicated that the repeated arrangement of *cis*-acting elements can realize the expected function of the promoter. This study laid a theoretical foundation for the rational design of tissue-specific promoters.

**Keywords:** *cis*-acting elements, root-specific promoter, synthetic promoter, *gus*

随着植物启动子中顺式作用元件功能研究的逐渐深入, 研究者可以根据生产需要, 设计合成人工启动子, 以便控制目的基因在特定时间和特定组织的精准表达, 且可避免由于克隆自植物的启动子可能引起的基因沉默, 这对于植物基因工程育种具有重要的意义<sup>[1]</sup>。

合成启动子主要通过核心启动子和上游顺式作用元件的组合设计而成<sup>[2]</sup>; 核心启动子可调节转录起始, 并维持最基本的转录水平, 合成启动子中最常用的核心启动子是 mini CaMV 35S 启动子<sup>[3-5]</sup>。上游顺式元件的多种组合可以设计合成具有不同表达特性的启动子, Dey 等<sup>[6]</sup>总结了 188 种合成的启动子, 详细描述了各启动子中各种顺式作用元件的选择和组合及它们的表达特性。顺式作用元件的排列方式影响启动子的表达特性, 并不是所有的人工合成启动子都能达到预期的设计效果。王睿等<sup>[7]</sup>将 4 种顺式作用元件 (促进基因在叶片表达的 EGATFLK、LPSE1 和 LSE1 元件与抑制基因在种子和茎秆中表达的 LPRSE1 元件) 以单拷贝、双拷贝和 3 个拷贝的形式进行不同组合排布, 以构建叶片特异表达的启动子, 其中, Syn3 启动子驱动的 *gus* 基因在种子、叶片和茎中都有表达。因此, 对顺式作用元件的选择、组合及其排列方式, 是人工合成启动子设计的关键。

植物的地下根系部分对植物的代谢及吸收起着不可或缺的作用, 可对来自土壤中水分、无机盐进行吸收利用, 为植物的生长发育和结实提供支持。但来自土壤的一些生物和非生物胁迫对植物的生长产生了较大的威胁, 如土传病害和地下害虫, 严重影响了一些重要粮食和经济作物的产量。为了增加植物抗逆性, 提高作物产量, 寻找并研究根

部特异性表达的启动子, 保证胁迫相关抗性基因在作物根部特异高效的表达具有重要意义。

本研究利用 4 种根特异性顺式作用元件 OSE1ROOTNODULE、OSE2ROOTNODU-LE、SP8BFIBSP8AIB、ROOTMOTIFTAPOX1, 以 4 个重复组合顺式排列的方式, 与 CaMV 35S 启动子核心区及 Omega 序列连接构建了一个合成启动子, 对其表达特性进行了分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

大肠杆菌 DH5 $\alpha$  细胞, 载体 pMD19T, 根瘤农杆菌 LBA4404, 烟草 *Nicotiana benthamiana*, 植物表达载体 pCAMBIA2300.1, 以上材料均由本实验室保存。

### 1.2 启动子上游 *pro-SRS* 模块合成

人工合成根特异启动子 SRSP 上游的根特异性元件由 3 个模块构成, 分别为 *pro-SRS*、CaMV 35S 启动子核心区、Omega 序列; 模块 *pro-SRS* 长度 299 bp, 具有 4 种根特异的顺式作用元件, 每种元件均为 4 拷贝数 (表 1), 该序列由金维智生物科技有限公司合成。对其上游模块进行扩增, 引物对为 proSRSPFH 和 proSRSPcd (见表 2); PCR 扩增条件如下: 94  $^{\circ}$ C 5 min; 94  $^{\circ}$ C 30 s, 54  $^{\circ}$ C 30 s, 72  $^{\circ}$ C 30 s, 30 个循环; 72  $^{\circ}$ C 5 min。

转录核心区克隆: PCR 法克隆 CaMV 35S 最小活性区与 Omega 序列, 模板分别为载体 pCMBIA2300.1 和  $\Omega$  序列, PCR 引物对则分别为 35SminiFcd/35SminiRcd 和 OmegaFcd/OmegaRB (表 2); PCR 反应体系和反应条件同上。重叠 PCR 方法合成人工启动子 SRSP: 以 proSRSPFH/OmegaRB 为引物

表 1 在 *pro-SRS* 模块中的四种根特异的顺式作用元件Table 1 Four root-specific *cis*-acting elements in the *pro-SRS* module

<i>cis</i> -acting elements	Sequence motif	Function	References
OSE2ROOTNODULE	CTCTT	Root-specific	Ishiguro S and Nakamura K (1992) <sup>[9]</sup>
SP8BFIBSP8AIB	ACTGTGTA	Root-specific	Elmayan T and Tepfer M (1995) <sup>[10]</sup>
OSE1ROOTNODULE	AAAGAT	Root-specific	Vieweg MF, et al. (2004) <sup>[11]</sup>
ROOTMOTIFTAPOX1	ATATT	Root-specific	Zhang C, et al. (2004) <sup>[12]</sup>

表 2 设计启动子所需的引物

Table 2 Primers required to design the promoter

Primer name	Sequence (5'-3')	Size (bp)
proSRSFH	aagcttGATTATTTACTCTTGTAAT	313
proSRSRcd	GAAGGATAGTGGGATTGCAAGAAGCATGCTT	
35SminiFcd	AAGCATGCTTCTTGCAATCCCCTATCCCTC	62
35SminiRcd	AATTGTTGTAAAAATTCCTCTCCAAATGAAATG	
OmegaFcd	CATTTCAATTTGGAGAGGAATTTTACAACAATT	66
OmegaRB	ggatccTGTAATTGTAATAGTAATTG	
gusJDF	CCTCATCAACAACAAACC	270
gusJDR	CTGCCTTCGCCGAGTCCC	
EF1a	TGGTGTCTCAAGCCTGGTAT	106
EF1b	ACGCTTGAGATCCTTAACCGC	
GF	GGAAAGGACTGGAAGAGAAGTG	124
GR	TCCGATATGGTTGCGGATTT	

Lower case bases indicate added restriction enzyme sites.

(表 2), 3 个序列产物为模板进行 PCR 扩增; PCR 反应体系和反应条件同上。

### 1.3 重组植物表达载体的构建及对烟草的遗传转化

将启动子及植物表达载体 pCAMBIA2300.1 用 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切后连接, 重组载体通过电击法转化至农杆菌 LBA4404 中; 农杆菌介导的对烟草遗传转化采用叶盘法<sup>[8]</sup>。

### 1.4 抗性苗的 PCR 鉴定及 T1 代植株的 RT-PCR 分析

SDS 法提取烟草基因组, 利用 *gus* 基因引物 *gus*JDF/*gus*JDR (表 2) 进行 PCR 鉴定。收获 PCR 阳性植株种子进行 RT-PCR 分析, Trizol 法分别提取转基因烟草根、茎与叶片的总 RNA, 反转录成 cDNA, 进行 RT-PCR 验证; 烟草内参基因引物 EF1a/EF1b, *gus* 基因引物 GF/GR 序列详见表 2。

### 1.5 烟草 GUS 组织化学染色

对转基因烟草 T<sub>0</sub> 和 T<sub>1</sub> 代植株 GUS 染液染色, 37 °C 避光温育 12 h, FAA 固定液固定 2 h, 无水乙醇进行脱色 24 h, 超纯水清洗后用 vhx-2000 型超景深三维显微镜下观察 GUS 染色情况及拍照, 并将染色的根进行横切与纵切, 显微镜观察。

## 2 结果与分析

### 2.1 根特异启动子 SRSP 设计与合成

为了分析顺式作用元件以多个重复紧密排列的方式, 是否能够发挥预期的功能, 设计合成的启动子含有 OSE1ROOTNODULE、OSE2ROOTNODULE、SP8BFIBSP8AIB、ROOTMOTIFTAPOX1 四个根特异元件, 并以 4 个重复组合的方式顺序排列 (图 2)。SRSP 启动子除了含有上游的 *pro-SRS* 片段, 还含有 35S 核心区和 Ω 序列 (图 2)。对 3 个启动

子模块进行克隆，模板分别为合成 pro-SRS 片段、植物表达载体 pCAMBIA2300.1 和 Ω 序列，进行 PCR 扩增后分别得到 pro-SRS 片段为 313 bp、35S 核心启动子片段 62 bp 和 Ω 序列片段 66 bp (图 1，泳道 1 条带、泳道 2 条带、泳道 3 条带)，重叠 PCR 扩增得到 434 bp 的人工启动子 SRSP 片段 (图 1，泳道 4 条带)。为了与后续的载体连接，在合成启动子两端引入了 *Hind* III 和 *Bam*H I 的双酶切位点，如图 2 所示。

## 2.2 含有 SRSP 启动子表达载体的构建

将与 pMD-19T 载体连接得到的重组质粒 pMD-SRSP 与基础载体 pCAMBIA.2300.1 进行双酶切 (*Bam*H I 和 *Hind* III) 并回收，将得到启动子片段与载体 pCAMBIA.2300.1 连接，获得表达载体 p2300.1-SRSP (图 3A)。将表达质粒转化至农杆菌 LBA4404，进行菌液 PCR 验证，扩增条带与预计启动子大小片段一致 (图 3B)。

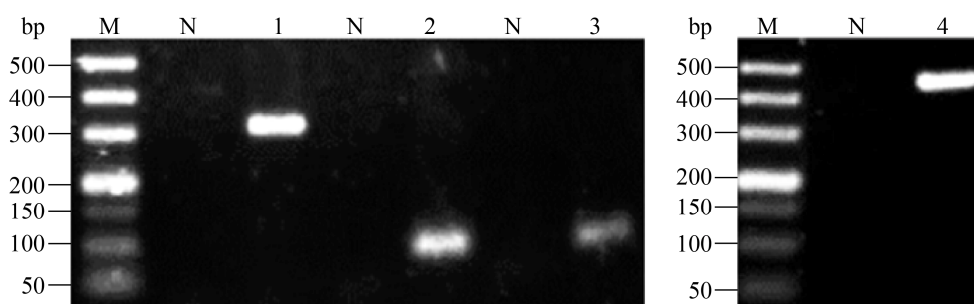


图 1 pro-SRS、35S-mini promoter、Ω 模块及启动子 SRSP 序列 PCR 扩增结果

Fig. 1 PCR amplification results of pro-SRS, 35S-mini promoter, Ω module and promoter SRSP. M: DNA marker; 1: PCR amplification results of the pro-SRS module; 2: PCR amplification results of 35S-mini promoter; 3: PCR amplification results of the Ω module; 4: overlapping PCR amplification of the artificial promoter SRSP fragment; N: negative control.

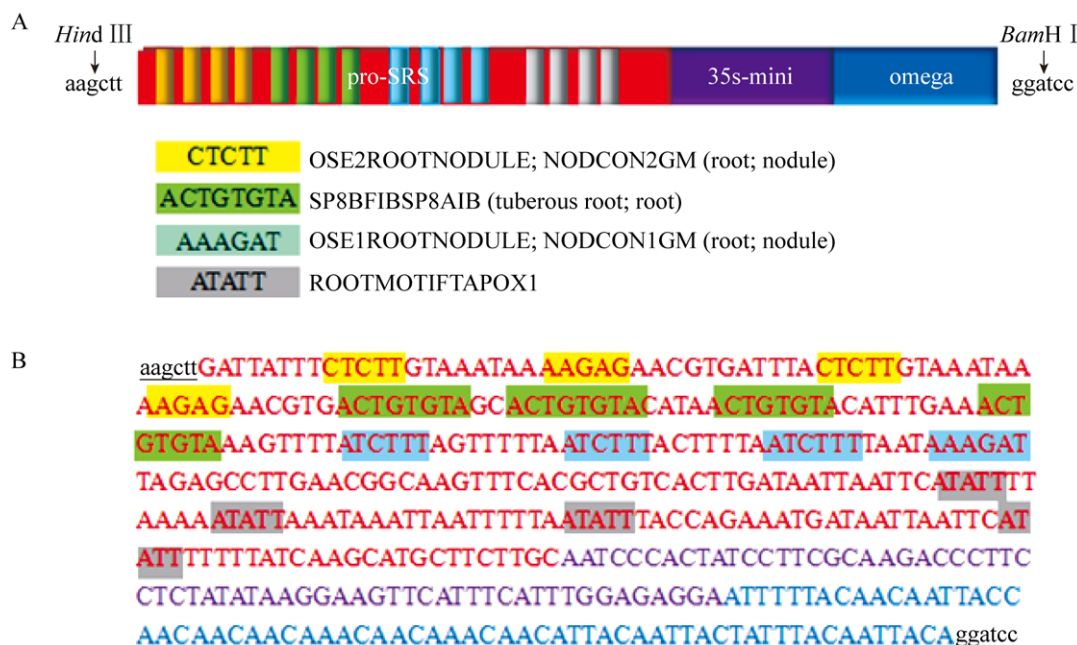


图 2 人工合成根特异性启动子 SRSP 结构示意图

Fig. 2 Schematic diagram of artificially synthesized root-specific promoter SRSP. (A) Arrangement of *cis*-elements in the synthetic module. (B) Nucleotide sequence of the SRSP module.

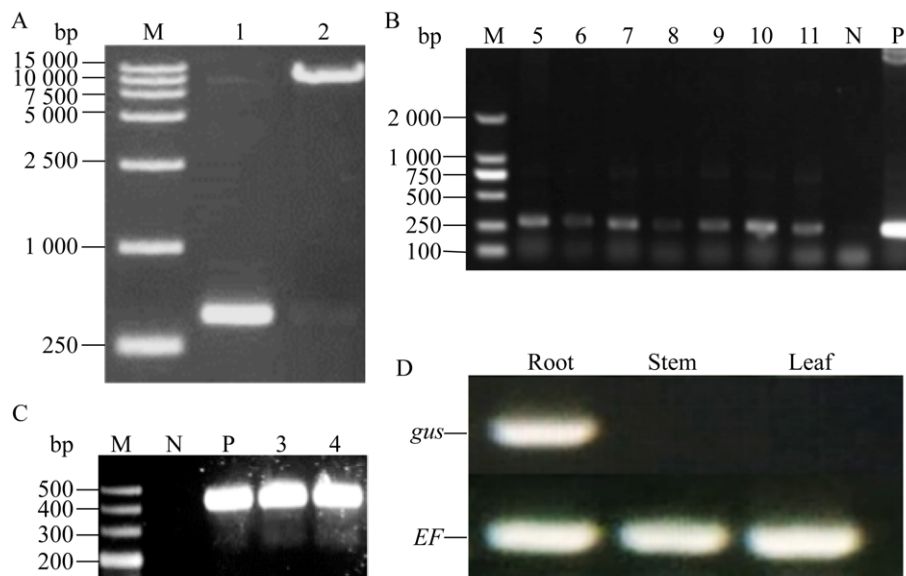


图3 重组载体 *p2300.1-SRSP* 的构建和  $T_1$  转基因烟草的 RT-PCR 分析

Fig. 3 Construction of recombinant vector *p2300.1-SRSP* and RT-PCR analysis of  $T_1$  transgenic tobaccos. (A) Double restriction enzymes digestion of *p2300.1-SRSP*. (B) PCR identification of transformed *Agrobacterium*. (C) PCR identification of  $T_1$  transgenic tobaccos. (D) RT-PCR results of  $T_1$  transgenic tobaccos. M: DNA marker; 1: SRSP promoter; 2: *p2300.1-SRSP/BamHI+HindIII*. 3–4: PCR analysis of *Agrobacterium tumefaciens* strains transformed with vectors *p2300.1-SRSP*. 5–11: PCR identification of  $T_1$  transgenic tobaccos. N: negative control (ddH<sub>2</sub>O); P: positive control.

### 2.3 RT-PCR 分析转基因 $T_1$ 代烟草 GUS 表达特性

对获得的 PCR 阳性植株进行移栽, 并收获种子。种植转 *p2300.1-SRSP* 烟草的  $T_1$  代植株, 提取基因组并进行 PCR 鉴定, 结果 7 株抗性苗均能扩增出 250 bp 左右的 *gus* 基因 (图 3C)。分别提取  $T_1$  代转基因烟草根、茎与叶片的总 RNA, 反转录, RT-PCR 结果表明, 只有根部可以扩增出 *gus* 基因 (图 3D), 说明 SRSP 启动子驱动的 *gus* 基因只在根部进行转录表达。

### 2.4 转基因植株的 GUS 染色

对其  $T_0$  代和  $T_1$  代烟草植株进行 GUS 化学组织分析, 超景深显微镜下观察 (图 4), 染色结果显示转基因烟草根部全部染成蓝色, 叶片未染成蓝色, 说明 SRSP 启动子驱动 *gus* 基因在烟草根部的特异表达。根部切片结果表明, 韧皮部染色较深, 维管柱的其余结构如木质部也被染成蓝色

(图 5), *gus* 基因在韧皮部表达量高, 髓部无表达; 根部表皮几乎未被染成蓝色, *gus* 基因在表皮中表达量很少, 形成层也有基因的表达, 纵切中根的皮肤层呈现弥散分布。

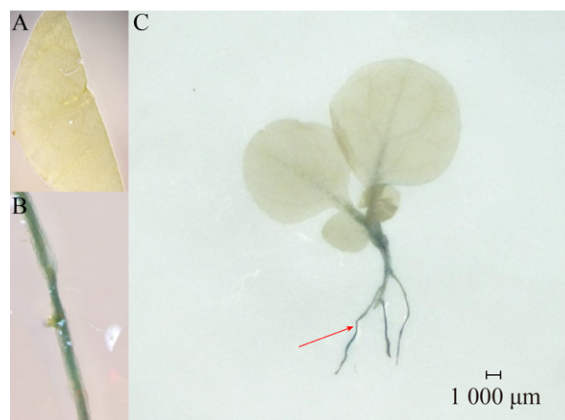


图4 转 SRSP 的烟草的 GUS 组织染色

Fig. 4 GUS staining of transgenic plants of SRSP tobaccos. (A) Leaf of  $T_0$  generation tobaccos. (B) Root of  $T_0$  generation tobaccos. (C)  $T_1$  generation tobaccos.



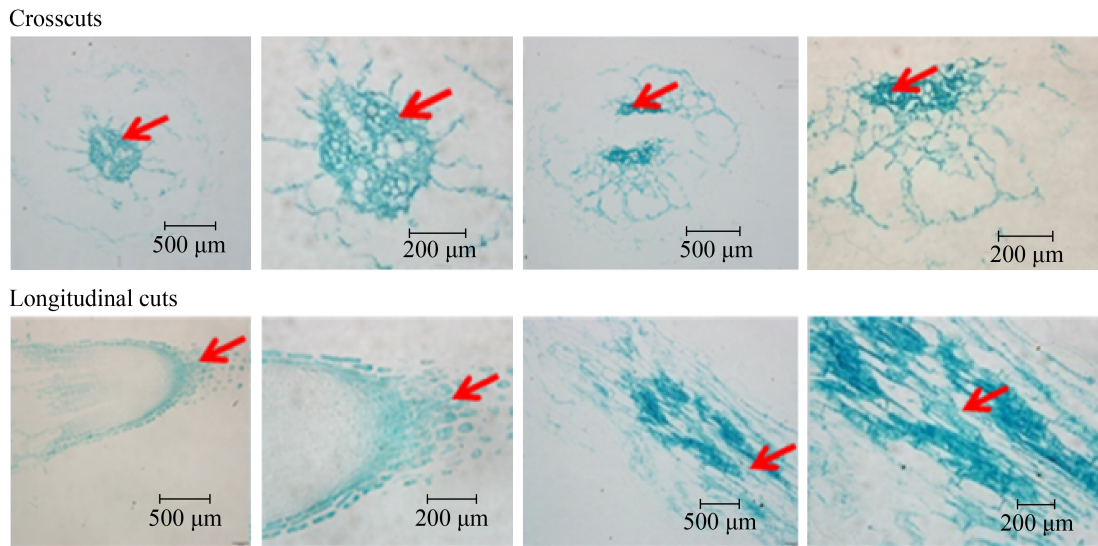


图 5 转 SRSP 烟草 GUS 染色后的根部的横切图与纵切图

Fig. 5 Cross-cuttings and longitudinal sections of roots after transfection of SRSP tobaccos GUS.

### 3 讨论

植物基因工程中,启动子的选取和使用对基因的表达起着至关重要的作用,启动子作为调控基因转录表达的重要序列,其应用非常广泛<sup>[13-14]</sup>。组织特异性启动子可以调控外源基因在特定的组织或器官中表达,因而避免了因外源蛋白的组成型表达对植物造成的毒害及营养的浪费<sup>[15-16]</sup>。但天然的组织特异启动子数量有限,且具有一定局限性,随着转基因作物叠加基因策略的应用,可能会产生同源依赖性的基因沉默现象(Homology-dependent gene silencing, HDGS)和不良重组的产生<sup>[17]</sup>。因此,设计人工合成启动子,其可在特定时间和空间精准表达的特点,更易于满足研究者的需求。

启动子通过不同的顺式作用元件对下游基因起到调控作用,这些顺式作用元件的种类、数量及排列方式都可能影响下游基因的转录水平<sup>[18]</sup>。Liu 等<sup>[19]</sup>的研究表明 4 个重复的诱导调控元件可在人工启动子中发挥功能,构建的启动子均可受相应的激素(乙烯、水杨酸、茉莉酸甲酯)诱导表达。顺式作用元件之间需要一定的间隔从而提高转录因子的附着率,有研究表明 5 bp 的间隔可

使元件与转录因子进行正常的结合而调控基因表达,而 4 个拷贝数的顺式作用元件就可提高原基因表达水平的 30 倍<sup>[20]</sup>。Mohan 等<sup>[21]</sup>构建了 1 个根特异性合成启动子模块 SynR,此模块含 7 个顺式作用元件(1×MYB core、2×ROOT MOTIF、1×ELRECOREPC、1×MAR 框、1×ARFAT 元件、1×LEAFYATAG);每个元件间隔 10 bp,间隔序列为 TCATAACGCT。本研究的结果发现 4 个拷贝数的根特异性元件 OSE1ROOTNODULE、OSE2ROOTNODULE、SP8BFIBSP8AIB、ROOTMOTIFTAPOX1 进行组合,顺式作用元件的间隔序列在 2-22 bp 之间,能保证其发挥功能,构建的合成启动子能驱动报告基因在烟草根部的特异表达,为组织特异性启动子设计中顺式作用元件的选择和排列组合方式提供理论指导。

### 4 结论

本研究构建了一个由 4 种根特异表达顺式作用元件重复排列构成的人工启动子 SRSP,RT-PCR 及 GUS 染色的结果表明,该启动子驱动 *gus* 报告基因在 T<sub>0</sub> 和 T<sub>1</sub> 代烟草根部的特异表达。为利用组织特异表达顺式作用元件构建高效、稳定和可控的组织特异性启动子奠定了基础。

## REFERENCES

- [1] Mehrotra R, Gupta G, Sethi R, et al. Designer promoter: an artwork of *cis* engineering. *Plant Mol Biol*, 2011, 75(6): 527–536.
- [2] Bilas R, Szafran K, Hnatuszko-Konka K, et al. *Cis*-regulatory elements used to control gene expression in plants. *Plant Cell, Tissue Organ Cult*, 2016, 127(2): 269–287.
- [3] Bhullar S, Chakravarthy S, Advani S, et al. Strategies for development of functionally equivalent promoters with minimum sequence homology for transgene expression in plants: *cis*-elements in a novel DNA context versus domain swapping. *Plant Physiol*, 2003, 132(2): 988–998.
- [4] Bhullar S, Datta S, Advani S, et al. Functional analysis of cauliflower mosaic virus 35S promoter: re-evaluation of the role of subdomains B5, B4 and B2 in promoter activity. *Plant Biotechnol J*, 2007, 5(6): 696–708.
- [5] Bhullar S, Datta S, Burma PK. Delayed *trans*-inactivation of synthetic domain a 35S promoters by “tobacco 271 locus” due to reduced sequence homology. *Plant Mol Biol Rep*, 2011, 29(1): 1–11.
- [6] Dey N, Sarkar S, Acharya S, et al. Synthetic promoters in planta. *Planta*, 2015, 242(5): 1077–1094.
- [7] Wang R, Zhu ML, Gao FY, et al. Designing, construction and functional characterization of tissue-specific synthetic promoter in rice. *Acta Agronom Sin*, 2017, 43(6): 789–794 (in Chinese).  
王睿, 朱梦琳, 高方远, 等. 水稻组织特异型人工合成启动子的设计、构建及功能鉴定. *作物学报*, 2017, 43(6): 789–794.
- [8] Feng YF. Cloning and function of peanut root-specific promoters[D]. Linfen: the Normal University of Shanxi, 2016 (in Chinese).  
冯艳芳. 花生根特异启动子的克隆及功能分析[D]. 临汾: 山西师范大学, 2016.
- [9] Ishiguro S, Nakamura K. The nuclear factor SP8BF binds to the 5'-upstream regions of three different genes coding for major proteins of sweet potato tuberous roots. *Plant Mol Biol*, 1992, 18(1): 97–108, doi: 10.1007/BF00018460
- [10] Elmayan T, Tepfer M. Evaluation in tobacco of the organ specificity and strength of the *rolD* promoter, domain A of the 35S promoter and the 35S<sup>2</sup> promoter. *Transgenic Res*, 1995, 4(6): 388–396.
- [11] Vieweg MF, Frühling M, Quandt HJ, et al. The promoter of the *Vicia faba* L. Leghemoglobin gene *VfLb29* is specifically activated in the infected cells of root nodules and in the arbuscule-containing cells of mycorrhizal roots from different legume and nonlegume plants. *Mol Plant-Microbe Interact*, 2004, 17(1): 62–69.
- [12] Zhang C, Pan SF, Chen H, et al. Characterization of *NtRELI*, a novel root-specific gene from tobacco, and upstream promoter activity analysis in homologous and heterologous hosts. *Plant Cell Rep*, 2016, 35(4): 757–769.
- [13] Bisht NC, Jagannath A, Gupta V, et al. A two gene—two promoter system for enhanced expression of a restorer gene (*barstar*) and development of improved fertility restorer lines for hybrid seed production in crop plants. *Molecular Breeding* 2004, 14(2): 129–144.
- [14] Gurr SJ, Rushton PJ. Engineering plants with increased disease resistance: how are we going to express? *Trends Biotechnol*, 2005, 23(6): 283–290, doi: 10.1016/j.tibtech.2005.04.009.
- [15] Porto MS, Pinheiro MPN, Batista VG, et al. Plant promoters: an approach of structure and function. *Mol Biotechnol*, 2014, 56(1): 38–49.
- [16] Stoger E, Williams S, Keen D, et al. Constitutive versus seed specific expression in transgenic wheat: temporal and spatial control. *Transgenic Research*, 1999, 8(2): 73–82.
- [17] Moshelion M, Altman A. Current challenges and future perspectives of plant and agricultural biotechnology. *Trends Biotechnol*, 2015, 33(6): 337–342.
- [18] Szabados L, Charrier B, Kondorosi A, et al. New plant promoter and enhancer testing vectors. *Mol Breed*, 1995, 1(4): 419–423.
- [19] Liu WS, Mazarei M, Rudis MR, et al. Rapid *in vivo* analysis of synthetic promoters for plant pathogen phyto-sensing. *BMC Biotechnol*, 2011, 11: 108.
- [20] Rushton PJ, Reinstädler A, Lipka V, et al. Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen- and wound-induced signaling. *Plant Cell*, 2002, 14(4): 749–762.
- [21] Mohan C, Jayanarayanan AN, Narayanan S. Construction of a novel synthetic root-specific promoter and its characterization in transgenic tobacco plants. *3 Biotech*, 2017, 7: 234.

(本文责编 陈宏宇)