

花生小 GTP 结合蛋白基因 *AhRabG3f* 启动子的盐胁迫响应元件分析

杜国宁¹, 相杰¹, 林顺钰¹, 孔祥远¹, 武秀玲², 管学东², 朱虹¹, 王晶珊¹, 乔利仙¹, 隋炯明¹, 赵春梅³

1 青岛农业大学 农学院 山东省花生产业协同创新中心 山东省旱作重点实验室, 山东 青岛 266109

2 诸城市农业农村局, 山东 诸城 262200

3 青岛农业大学 生命科学学院, 山东 青岛 266109

杜国宁, 相杰, 林顺钰, 孔祥远, 武秀玲, 管学东, 朱虹, 王晶珊, 乔利仙, 隋炯明, 赵春梅. 花生小 GTP 结合蛋白基因 *AhRabG3f* 启动子的盐胁迫响应元件分析. 生物工程学报, 2022, 38(8): 2989-2998.

DU GN, XIANG J, LIN SY, KONG XY, WU XL, GUAN XD, ZHU H, WANG JS, QIAO LX, SUI JM, ZHAO CM. Analysis of the salt-stress responsive element of the promoter of peanut small GTP binding protein gene *AhRabG3f*. Chin J Biotech, 2022, 38(8): 2989-2998.

摘 要: 为研究花生小 GTP 结合蛋白基因 *AhRabG3f* 对盐胁迫响应的分子机制, 文中克隆了花生 *AhRabG3f* 基因起始密码子上游 1 914 bp 的启动子片段 (3f-P)。将该启动子 5' 末端截短获得 5 个片段 (3f-P1–3f-P5), 长度分别为 1 729、1 379、666、510、179 bp。构建了将这 6 个启动子片段与 *gus* 基因融合的植物表达载体, 利用农杆菌介导法转化烟草。对转基因烟草进行 GUS 表达分析和酶活性检测, 结果表明, 在转入各启动子片段的烟草中, 都能检测到 *gus* 基因的表达, 其中全长启动子 3f-P 的驱动活性最弱, 而截短片段 3f-P3 的驱动活性最强。对转基因烟草进行盐胁迫处理后, 3f-P、3f-P1、3f-P2 和 3f-P3 所驱动 GUS 酶活性是未经盐诱导的 3.3、1.2、1.9、1.2 倍, 表明 *AhRabG3f* 启动子是盐诱导型的, 在 3f-P 至 3f-P3 之间可能存在对盐响应的正调控元件。通过对盐胁迫处理后各启动子片段驱动的 GUS 活性分析, 推测在 *AhRabG3f* 启动子上游 1 930–1 745 bp、682–526 bp 之间存在可能对盐响应的正调控元件 MYB、GT1 和富含 TC 的重复序列, 1 395–682 bp 之间存在可能对盐响应的负调控元件 MYC。研究结果可为利用诱导型启动子调控花生的耐盐性提供指导。

关键词: 花生; 小 GTP 结合蛋白; 启动子; 盐胁迫响应元件

Received: August 28, 2021; **Accepted:** March 29, 2022; **Published online:** April 2, 2022

Supported by: National Natural Science Foundation of China (31872875); Natural Science Foundation of Shandong Province, China (ZR2020QC120); Postgraduate Innovation Program of Qingdao Agricultural University (QNYCX20024)

Corresponding authors: ZHAO Chunmei. E-mail: meiwei2002@163.com

SUI Jiongming. E-mail: suijiongming@163.com

基金项目: 国家自然科学基金 (31872875); 山东省自然科学基金 (ZR2020QC120); 青岛农业大学研究生创新计划项目 (QNYCX20024)

Analysis of the salt-stress responsive element of the promoter of peanut small GTP binding protein gene *AhRabG3f*

DU Guoning¹, XIANG Jie¹, LIN Shunyu¹, KONG Xiangyuan¹, WU Xiuling²,
GUAN Xuedong², ZHU Hong¹, WANG Jingshan¹, QIAO Lixian¹, SUI Jiongming¹,
ZHAO Chunmei³

1 Dry-land Farming Technology Laboratory of Shandong Province, Peanut Industry Collaborative Innovation Center of Shandong Province, College of Agronomy, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong, China

2 Zhucheng Agricultural and Rural Bureau, Zhucheng 262200, Shandong, China

3 College of Life Sciences, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, Shandong, China

Abstract: To study the molecular mechanism of salt stress response of peanut small GTP binding protein gene *AhRabG3f*, a 1 914 bp promoter fragment upstream of the start codon of *AhRabG3f* gene (*3f*-P) from peanut was cloned. Subsequently, five truncated fragments (*3f*-P1–*3f*-P5) with lengths of 1 729, 1 379, 666, 510 and 179 bp were obtained through deletion at the 5' end, respectively. Plant expression vectors where these six promoter fragments were fused with the *gus* gene were constructed and transformed into tobacco by *Agrobacterium*-mediated method, respectively. GUS expression in transgenic tobacco and activity analysis were conducted. The *gus* gene expression can be detected in the transgenic tobacco harboring each promoter segment, among which the driving activity of the full-length promoter *3f*-P was the weakest, while the driving activity of the promoter segment *3f*-P3 was the strongest. Upon exposure of the transgenic tobacco to salt stress, the GUS activity driven by *3f*-P, *3f*-P1, *3f*-P2 and *3f*-P3 was 3.3, 1.2, 1.9 and 1.2 times compared to that of the transgenic plants without salt treatment. This suggests that the *AhRabG3f* promoter was salt-inducible and there might be positive regulatory elements between *3f*-P and *3f*-P3 in response to salt stress. The results of GUS activity driven by promoter fragments after salt treatment showed that elements included MYB and GT1 between 1 930 bp and 1 745 bp. Moreover, a TC-rich repeat between 682 bp and 526 bp might be positive *cis*-elements responsible for salt stress, and an MYC element between 1 395 bp and 682 bp might be a negative *cis*-element responsible for salt stress. This study may facilitate using the induced promoter to regulate the salt resistance of peanut.

Keywords: peanut; small GTP binding protein; promoter; salt stress-responsive element

为适应和抵抗各种非生物胁迫, 植物进化了一系列的机制, 其中之一是信号转导蛋白的激活, 小 GTP 结合蛋白是许多信号转导过程的调节器, 广泛存在于真核生物中^[1]。小 GTP 结合蛋白, 分子量约为 21–30 kDa, 具有 GTP 结合活性和 GTP 酶活性, 是一类由超过 100 个成员蛋白组成的蛋白超级家族。按照小 GTP 结合

蛋白超家族功能的不同, 将其分成 5 个亚族, 分别为 Ras、Rho/Rac、Ypt/Rab、Ran/TC4 和 Arf/Sar^[2], 其中, Rab 亚族是小 GTP 结合蛋白家族中最大的亚族^[3]。

大量研究表明 Rab 亚族蛋白参与了植物对非生物胁迫的响应^[4–9]。Rab7/RabG 蛋白是 Rab 亚族中的一个重要成员, 在早期到晚期内体

或溶酶体囊泡运输中起着非常重要的作用。拟南芥 *AtRabG3e* (*AtRab7*) 基因被高盐、高渗透压和低温等多种逆境胁迫所诱导, 而超表达 *AtRabG3e* 增强了转基因植物对高盐和渗透胁迫的耐受性, 减少了盐胁迫期间植物体内活性氧的积累^[6]。来自牧豆树的 *PjRab7* 基因在高盐、干旱等胁迫下表达上调, 在烟草中的过表达显著提高了转基因植株的耐盐能力, 相比于对照植株, 转基因植株在体内积累了更多的盐离子^[7]。水稻 *Rab7* 基因的表达受到低温、干旱、盐和脱落酸 (abscisic acid, ABA) 等不同环境因素的调控, 其在大肠杆菌中的过表达提高了菌体对盐胁迫的耐受力^[8]。珍珠粟 (*Pennisetum glaucum*) *PgRab7* 基因的表达水平也与干旱、低温、盐等胁迫信号密切相关, 转基因烟草分析表明, *PgRab7* 过量表达提高了转基因植株对盐和渗透胁迫的抗性^[9]。

我们从花生中克隆了 1 个小 GTP 结合蛋白基因 *AhRabG3f*, 研究发现该基因受低温、干旱、盐和 ABA 的诱导表达, 过量表达 *AhRabG3f* 基因提高了转基因花生对干旱和盐胁迫的耐受性^[10]。盐胁迫处理后, 对过量表达 *AhRabG3f* 的转基因花生植株进行 RNA-seq 分析, 发现 *AhRabG3f* 基因可以调控乙烯响应的 AP2、MYB、RING-H2 型锌指蛋白等转录因子, 以及大量的耐盐相关基因: 如 *LEA*、*RD22*、过氧化物酶、CBL-互作蛋白激酶、钙结合蛋白基因等的表达, 从而提高转基因花生植株的耐盐性^[11]。

为深入了解花生 *AhRabG3f* 基因对盐胁迫响应的作用机制, 本研究克隆了该基因上游的启动子序列, 构建了系列 5'末端截短启动子与编码 β -葡萄糖苷酸酶 (β -glucuronidase) 的 *gus* 基因融合的表达载体, 通过对转基因烟草的胁迫处理, 分析了启动子响应盐胁迫的顺式作用元件。

1 材料与方法

1.1 材料

所用花生品种为栽培种 *Tifrunner*, 烟草为栽培种 NC89, 大肠杆菌 (*Escherichia coli*) 菌株 DH5 α , 根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 GV3101, 植物双元表达载体 pCambia1301 等均为本实验室保存。pMD18-T 质粒购自 TaKaRa 公司。本试验所需引物全部由生工生物工程 (上海) 股份有限公司合成。

1.2 酶和化学试剂

氨苄青霉素 (ampicillin, AMP)、潮霉素 (hygromycin, HYG)、利福平 (rifampicin, Rif) 和乙酰丁香酮 (acetosyringone, AS) 购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司; 各种限制性内切酶和 *Taq* DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司。DNA 测序由上海桑尼生物科技有限公司完成。Ezup 柱式植物基因组 DNA 抽提试剂盒购自生工生物工程 (上海) 股份有限公司。

1.3 试验方法

1.3.1 花生基因组 DNA 的提取

以花生栽培种 *Tifrunner* 的幼嫩叶片为材料, 采用植物 DNA 抽提试剂盒提取基因组 DNA, 具体操作方法及步骤按照试剂盒说明书进行。提取的 DNA 置于 -20 °C 备用。

1.3.2 *AhRabG3f* 基因全长启动子的克隆和序列分析

根据 Peanutbase 数据库公布的基因组序列, 查找 *AhRabG3f* 基因上游的启动子序列。设计分别含有 *Hind* III 和 *Nco* I 酶切位点的上下游引物 P 和 R (表 1), 以花生基因组 DNA 为模板, 利用上述引物进行 PCR 扩增, 产物纯化回收后与 pMD18-T 载体连接, 重组质粒经 PCR 方法和酶切检测后, 送往上海桑尼生物科技有限公司进行测序验证。利用 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plant>

care/html/) 生物学数据库对获得的启动子片段进行顺式作用元件分析。

1.3.3 *AhRabG3f* 启动子片段与 *gus* 基因融合表达载体的构建

根据分析结果,设计系列截短引物(表1)依次对启动子5'末端顺式作用元件进行缺失,以含全长启动子的pMD18-T-*AhRabG3f*-*P*质粒为模板,PCR扩增获得5个5'末端系列截短的启动子片段,将各截短片断分别连接到pMD18-T载体上,测序验证。利用 *Hind* III和 *Nco* I对验证正确的6个不同长度启动子pMD18-T重组载体进行酶切,回收各启动子片段与pCAMBIA1301的*Hind* III和*Nco* I酶切载体进行连接,获得6个启动子长度片段与*gus*基因融合的系列截短表达载体,对各启动子的重组表达载体进行PCR、酶切和测序鉴定。

1.3.4 烟草的遗传转化及转基因烟草的盐胁迫处理

用冻融法将鉴定正确的系列截短载体导入根癌农杆菌GV3101菌株中,利用叶圆盘法侵染烟草NC89,获得的抗性植株用PCR法进行阳性检测。对不同的转基因烟草独立转化系,提取叶片基因组DNA,利用*gus*基因内部引物进行PCR验证,产物大小为220 bp。

T₂代转基因烟草株系经PCR鉴定后,在

表1 实验所用引物

Table 1 Primers used in this study

Primer name	Sequences (5'→3')
3f-P	ATAAAGCTTATTATCTCATCCGACTTG
3f-P1	ATAAAGCTTTAGAAAAGAAATCGCCAC
3f-P2	ATAAAGCTTACATCCAAGTTCTTTCATAG
3f-P3	ATAAAGCTTTTGTGTAAAACTTAGGTA
3f-P4	ATAAAGCTTACATGACACATAAATTTGCA
3f-P5	ATAAAGCTTGGGTTGTGTTGTGTGTGTGC
3f-R	ATACCATGGTTACTTTTTCACCGATCGC

6叶龄时,用250 mmol/L NaCl进行胁迫处理,在胁迫处理前和处理后12 h时分别取叶片进行后续试验,每个载体选取5个独立的转化株系。

1.3.5 GUS 活性检测

参照Jefferson等^[12]的方法,对转基因烟草叶片进行GUS组织化学染色。利用X-Gluc反应液处理植物叶片,样品材料加入X-Gluc反应液37℃反应24 h,将反应液吸出,用75%乙醇脱色2-3次。

参照Jefferson等^[12]的方法进行GUS荧光分析。称取0.1 g转基因烟草叶片,加入400 μL GUS酶提取缓冲液,冰浴条件下磨成匀浆。4℃离心取上清,即GUS酶粗提液。取50 μL GUS酶粗提液加入1 mL预热的GUS酶反应缓冲液中,混匀并于37℃下保温1 h,取出100 μL加入900 μL的Na₂CO₃ (0.2 mol/L)中终止反应,用FL-2500荧光分光光度计测定Ex365 nm/Em 455 nm荧光值。称取同一处理的不同植株进行测量,3次重复。蛋白含量测定按Bradford^[13]方法。

2 结果与分析

2.1 *AhRabG3f* 启动子的克隆和生物信息学分析

根据Peanutbase数据库公布的基因组序列,查找*AhRabG3f*基因上游的启动子序列,设计引物,扩增获得起始密码子上游1 914 bp的DNA片段,命名为3f-P,与pMD18-T载体连接,经筛选获得重组质粒,命名为pMD18T-3f-P(图1)。经测序验证,克隆的3f-P序列与Peanutbase中报道的序列一致。

根据Peanutbase数据库公布的基因组序列,查找两个野生种*A. duranensis*和*A. ipaensis*中*AhRabG3f*基因上游1 914 bp的启动子序列,通过DNAMAN分析表明栽培种*Tifrunner*与野生种*A. duranensis*和*A. ipaensis*有较高同源性,

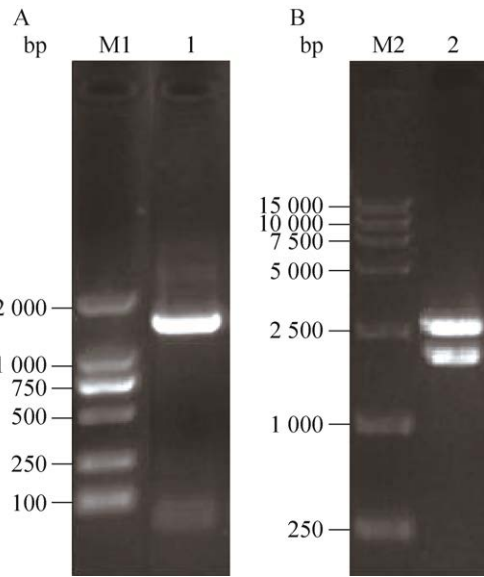


图1 *AhRabG3f* 启动子的 PCR 扩增 (A) 及克隆载体酶切鉴定 (B)

Figure 1 PCR amplification of promoter *AhRabG3f* (A) and restriction identification of clone vector (B). M1: DL 2 000; 1: PCR amplification of promoter *AhRabG3f*; M2: DL 15 000; 2: restriction identification of the clone vector.

同源性分别为 73.75%、77.41% (图 2)。通过生物学数据库 PlantCARE 对 *AhRabG3f*-P 启动子

进行功能元件预测分析, 发现了大量的顺式作用元件 (图 3), 如 ABRE、MYB、MYC、GT1、TC-rich repeat 和 HSE 等。

2.2 *AhRabG3f* 启动子系列截短片段与 *gus* 基因融合表达载体的构建

根据对 *AhRabG3f* 启动子顺式作用元件的分析结果, 以 pMD18-T-3f-P 质粒为模板, 分别以正向引物 3f-P、3f-P1、3f-P3、3f-P3、3f-P4、3f-P5 与反向引物 3f-R 配对进行 PCR 扩增, 获得 6 个长度不同的启动子片段 (启动子区域分别为 -1 930 至 -16 bp、-1 745 至 -16 bp、-1 395 至 -16 bp、-682 至 -16 bp、-526 至 -16 bp 和 -195 bp 至 -16 bp, 起始密码子 ATG 为 +1) (图 4), 用 *Hind* III 和 *Nco* I 分别酶切这些启动子片段, 替换掉 pCambia1301 载体中的 35S 启动子, 获得与 *gus* 基因融合的 6 个截短表达载体, 分别命名为 pCAM-3f-P、pCAM-3f-P1、pCAM-3f-P2、pCAM-3f-P3、pCAM-3f-P4 和 pCAM-3f-P5, 利用 *Hind* III 和 *Noc* I 对重组载体进行双酶切, 结果均能切出相应大小的片段 (图 5)。利用冻融法将各截短植物表达载体转化农杆菌 GV3101。

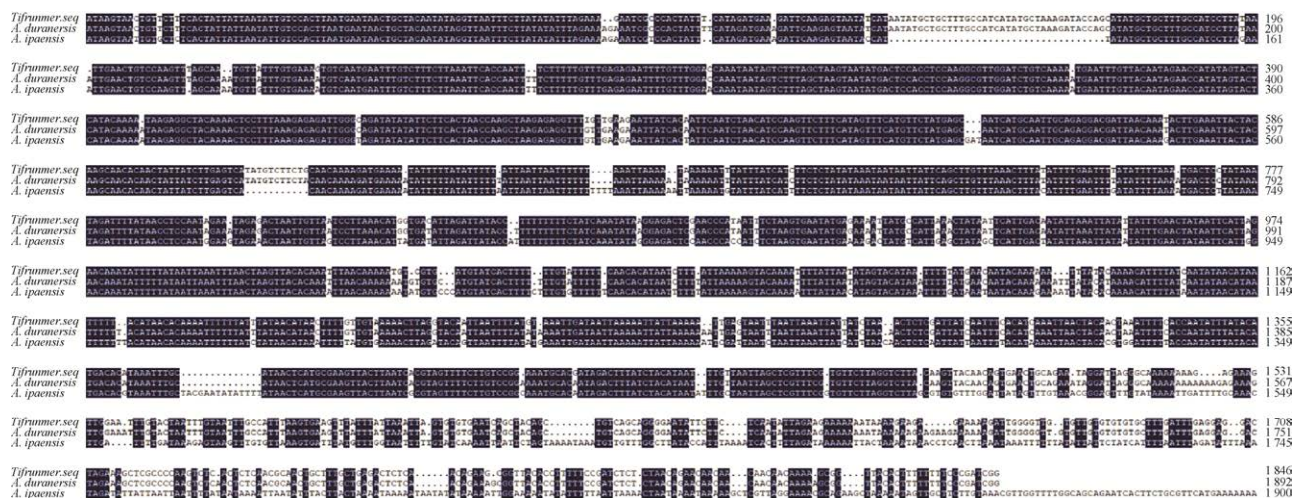


图2 栽培种与野生种 *A. duranensis* 和野生种 *A. ipaensis* 序列的比对结果

Figure 2 Multiple sequence alignment for *Tifrunner* with *A. duranensis* and *A. ipaensis*.



图3 *AhRabG3f* 启动子中的功能元件预测及截短引物的设计位点 箭头表示引物序列及方向；下划线部分表示推测的顺式调控元件序列

Figure 3 Prediction of functional elements and design of primers used for truncating the *AhRabG3f* promoter. Arrow indicates primer sequence and direction; the underlined part shows the sequence of the predicted *cis*-regulatory elements.

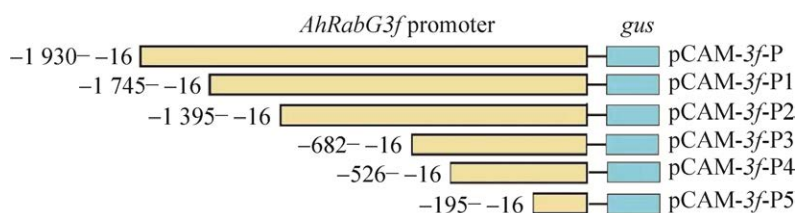


图 4 *AhRabG3f* 启动子各片段与 *gus* 基因融合的示意图

Figure 4 Schematic structure of *gus* chimeric genes under the control of various segments of the *AhRabG3f* promoter.

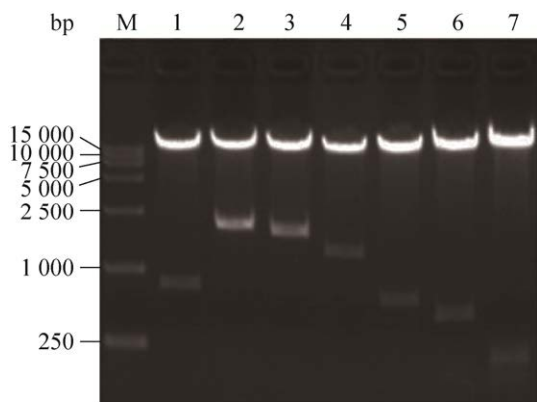


图 5 重组载体的双酶切验证

Figure 5 Verification of recombinant vectors by double enzyme digestion. M: marker DL2 000; 1–7: double enzyme digestion of pCAMBIA1301, pCAMBIA1301-RabG3f full-length promoter and 5'-terminal truncated promoter vectors.

2.3 携带 *AhRabG3f* 启动子系列片段的转基因烟草的 GUS 组织化学检测

利用农杆菌介导法将携带 *AhRabG3f* 全长启动子及系列截短载体 pCAM-3f-P, -P1, -P2, -P3, -P4, -P5 转化烟草, 获得了转基因烟草植株 (图 6)。

为检测 *AhRabG3f* 启动子各截短片段的启动活性, 对各截短载体转化的烟草叶片进行 GUS 组织化学染色。结果如图 7 所示, 转入不同长度启动子的烟草叶片中, 均检测到 GUS 蛋白的表达, 表明各启动子截短片段均具有启动 *gus* 基因表达的功能。但 GUS 表达量有明显差异, 其中转入截短片段 3f-P1 与 3f-P3 的烟草叶片的 GUS 染色最深, 而转入全长启动子 3f-P 的烟草叶片的 GUS 染色最浅。

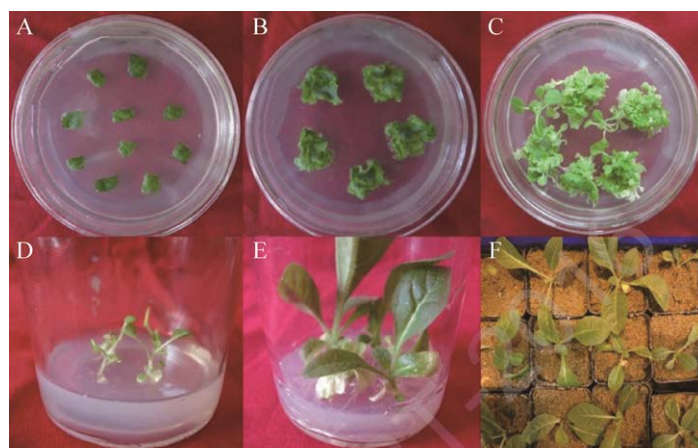


图 6 *AhRabG3f* 启动子系列片段转化基因烟草 A: 外植体暗培养 3 d; B: 经 Hyg 筛选 7 d 后的抗性外植体; C: 抗性苗再生 (3–4 周); D: 获得的抗性苗; E: 抗性苗生根; F: 抗性苗驯化移栽

Figure 6 Series of *AhRabG3f* promoter segments were transformed into tobacco. (A) Explants after dark culture for 3 d. (B) Hyg-resistant explants after Hyg screening for 7 d. (C) Regeneration of Hyg-resistant seedlings (3–4 weeks). (D) Hyg-resistant seedlings. (E) Hyg-resistant seedlings produce roots. (F) Domestication and transplanting of Hyg-resistant seedlings.

2.4 不同长度 *AhRabG3f* 启动子对 NaCl 胁迫的转录调节

为分析 *AhRabG3f* 启动子全长及各截短片段对 NaCl 胁迫响应的调节机制, NaCl 处理后, 对系列 5'末端截短启动子驱动的 GUS 荧光活性进行检测, 结果发现: 未受胁迫处理时, 携带各载体的转基因烟草的 GUS 荧光活性分析结果与组织化学染色结果基本一致 (图 7-8), *3f*-P3 的驱动活性最强, *3f*-P1 次之, *3f*-P4 与 *3f*-P5 的表达活性相近, *3f*-P 的驱动活性最弱 (图 8)。当用 250 mmol/L NaCl 处理转基因烟草后, 除 *3f*-P4 与 *3f*-P5 外, 携带其他片段的转基因烟草中 GUS

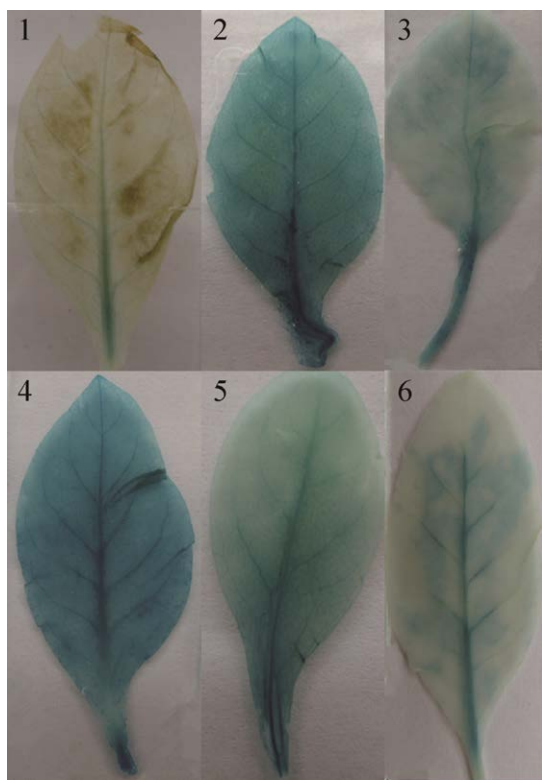


图 7 转基因烟草叶片 GUS 染色结果 1-6 分别代表携带 pCAM-*3f*-P、-P1、-P2、-P3、-P4、-P5 载体的转基因烟草叶片

Figure 7 GUS staining results of transgenic tobacco leaves. 1-6 represent transgenic tobacco leaves harboring pCAM-*3f*-P, -P1, -P2, -P3, -P4, -P5 vectors, respectively.

表达活性都有明显提高。其中, 携带全长启动子 *3f*-P 的转基因烟草中, GUS 活性增加最显著, 达到 222.5 MU/(min·mg protein), 是未经 NaCl 诱导的 3.3 倍; 在 NaCl 诱导后, *3f*-P1、*3f*-P2 和 *3f*-P3 所驱动 GUS 酶活性分别达到 195.5、199.3 和 244.0 MU/(min·mg protein), 是未经 NaCl 诱导的 1.2、1.9 和 1.2 倍, 说明在 *3f*-P 至 *3f*-P3 内部可能存在对 NaCl 响应的正调控元件。在 NaCl 胁迫处理后, *3f*-P1 所驱动 GUS 酶活性是 *3f*-P 的 87.9%, *3f*-P4 所驱动 GUS 酶活性是 *3f*-P3 的 43.2%, 推测在 *3f*-P-*3f*-P1 和 *3f*-P3-*3f*-P4 可能存在对 NaCl 响应的正调控元件; *3f*-P3 所驱动 GUS 酶活性是 *3f*-P2 的 1.22 倍, 推测 *3f*-P2-*3f*-P3 之间的序列中可能存在对 NaCl 响应的负调控元件。

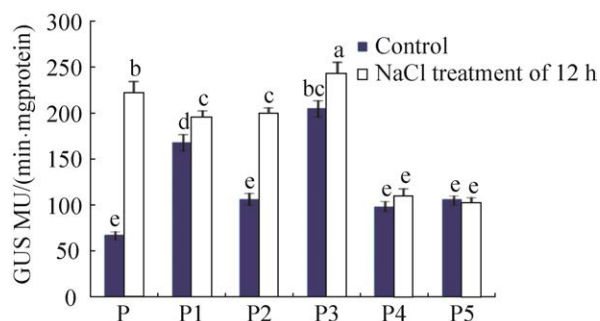


图 8 NaCl 处理前后转基因烟草叶片 GUS 酶活性的定量检测

Figure 8 Quantification of GUS activity of transformed tobacco leaves. Bars are the standard deviations (SD) of three independent replicates ($n=3$). Error bars labels with different letters indicate significant differences at $P<0.05$ between treatments according to Duncan's test.

3 讨论

本研究对花生小 GTP 结合蛋白基因 *AhRabG3f* 的启动子驱动活性进行了研究, 发现受 NaCl 诱导后, *3f*-P 所驱动 GUS 酶活力是未

经 NaCl 诱导的 3.3 倍, 说明 *AhRabG3f* 启动子是一个可受 NaCl 诱导的启动子。受 NaCl 诱导后, *3f*-P1 所驱动 GUS 酶活力是未经 NaCl 诱导的 1.15 倍, 是经同样条件诱导后 *3f*-P 所驱动 GUS 酶活力的 87.9% (图 8), 推测在 *3f*-P-*3f*-P1 之间可能存在对 NaCl 响应的正调控元件。根据软件预测结果, P1 与 P 相比缺失了 2 个元件 GT1-motif 和 MYB。大豆 *CaM* 基因 *SCaM-4* 的胁迫诱导表达依赖于顺式作用元件 GT-1, 该元件通过与 GT-1 like 转录因子相互作用调控 *SCaM-4* 基因在盐胁迫下发挥作用^[14]。拟南芥 *AtRD22* 基因的启动子有响应干旱和高盐诱导的 MYB 元件^[15]; 拟南芥 *Atmyb2* 转录因子可与 MYB 元件结合调控靶基因对不同胁迫的应答^[16]。因此我们推测存在于 *3f*-P-*3f*-P1 中的 GT1-motif 和 MYB 元件可能是两个对 NaCl 响应的正调控元件。

受 NaCl 诱导后, *3f*-P2 所驱动 GUS 酶活力是 *3f*-P3 所驱动 GUS 酶活力的 81.7% (图 8), 推测在 *3f*-P2 至 *3f*-P3 之间可能存在对 NaCl 响应的负调控元件。P3 与 P2 相比缺失了多个元件, 如 MYC、HSE 和 ABRE 等, 该结果与大豆 *GmDREB3* 启动子有对多种逆境胁迫响应起重要作用的负调控元件 MYC 一致^[17]。

受 NaCl 诱导后, *3f*-P3 所驱动 GUS 酶活力是 *3f*-P4 所驱动 GUS 酶活力的 2.3 倍 (图 8), 推测在 *3f*-P3-*3f*-P4 之间可能存在对 NaCl 响应的正调控元件。*3f*-P4 与 *3f*-P3 相比缺失了 TC-rich repeat、T-box 等元件, 盐芥 *TsVPI* 启动子为典型的盐胁迫启动子, 其中顺式作用元件 TC-rich element 被确定为盐胁迫响应重点区域^[18]。因此我们推测该区域的 TC-rich repeat 可能是对 NaCl 响应的正调控元件。

存在于 *3f*-P-*3f*-P4 之间的 ABRE、HSE 等正调控元件也是赋予 *AhRabG3f* 启动子对 NaCl 诱导有响应的重要原因。后续研究将对这些重

要的顺式调控元件进行定点突变以及酵母单杂交分析, 为利用诱导型启动子调控花生的耐盐性提供理论依据。

4 结论

本研究对花生小 GTP 结合蛋白基因 *AhRabG3f* 进行了 5' 末端全长及系列截短片段的驱动功能分析, 证实是一个可受 NaCl 诱导的启动子, 在该启动子中同时存在正、负两种调控元件。结合软件预测结果, 推测在启动子 *3f*-P-*3f*-P1 和 *3f*-P3-*3f*-P4 内部存在可能对 NaCl 响应的正调控元件 MYB、GT1 和 TC-rich repeat; 在 *3f*-P2-*3f*-P3 之间存在可能对 NaCl 响应的负调控元件 MYC。

REFERENCES

- [1] Takai Y, Sasaki T, Matozaki T. Small GTP-binding proteins. *Physiol Rev*, 2001, 81(1): 153-208.
- [2] Pereira-Leal JB, Seabra MC. Evolution of the Rab family of small GTP-binding proteins. *J Mol Biol*, 2001, 313(4): 889-901.
- [3] Clerk A, Sugden PH. Small guanine nucleotide-binding proteins and myocardial hypertrophy. *Circ Res*, 2000, 86(10): 1019-1023.
- [4] Mukhopadhyay A, Funato K, Stahl PD. Rab7 regulates transport from early to late endocytic compartments in *Xenopus* oocytes. *J Biol Chem*, 1997, 272(20): 13055-13059.
- [5] Bolte S, Schiene K, Dietz KJ. Characterization of a small GTP-binding protein of the rab 5 family in *Mesembryanthemum crystallinum* with increased level of expression during early salt stress. *Plant Mol Biol*, 2000, 42(6): 923-935.
- [6] Mazel A, Leshem Y, Tiwari BS, et al. Induction of salt and osmotic stress tolerance by overexpression of an intracellular vesicle trafficking protein AtRab7 (AtRabG3e). *Plant Physiol*, 2004, 134(1): 118-128.
- [7] George S, Parida A. Over-expression of a Rab family GTPase from phreatophyte *Prosopis juliflora* confers tolerance to salt stress on transgenic tobacco. *Mol Biol Rep*, 2011, 38(3): 1669-1674.
- [8] Nahm MY, Kim SW, Yun D, et al. Molecular and

- biochemical analyses of OsRab7, a rice Rab7 homolog. *Plant Cell Physiol*, 2003, 44(12): 1341-1349.
- [9] Agarwal PK, Agarwal P, Jain P, et al. Constitutive overexpression of a stress-inducible small GTP-binding protein PgRab7 from *Pennisetum glaucum* enhances abiotic stress tolerance in transgenic tobacco. *Plant Cell Rep*, 2008, 27(1): 105-115.
- [10] Song L, Li R, Xiang XH, et al. Overexpression of stress-inducible small GTP-binding protein AhRab7 (AhRabG3f) in peanut (*Arachis hypogaea* L.) enhances abiotic stress tolerance. *J Food Agric Environ*, 2012, 10(3): 888-894.
- [11] Sui JM, Li G, Chen GX, et al. Digital expression analysis of the genes associated with salinity resistance after overexpression of a stress-responsive small GTP-binding RabG protein in peanut. *Genet Mol Res*, 2017, 16(1): gmr16019432.
- [12] Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J*, 1987, 6(13): 3901-3907.
- [13] Bradford, MM. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*, 1976, 72(1/2): 248-254.
- [14] Park HC, Kim ML, Kang YH, et al. Pathogen-and NaCl-induced expression of the SCaM-4 promoter is mediated in part by a GT-1 box that interacts with a GT-1-like transcription factor. *Plant Physiol*, 2004, 135(4): 2150-2161.
- [15] Iwasaki T, Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. Identification of a *cis*-regulatory region of a gene in *Arabidopsis thaliana* whose induction by dehydration is mediated by abscisic acid and requires protein synthesis. *Mol Gen Genet*, 1995, 247(4): 391-398.
- [16] Urao T, Yamaguchi-Shinozaki K, Urao S, et al. An *Arabidopsis* myb homolog is induced by dehydration stress and its gene product binds to the conserved MYB recognition sequence. *Plant Cell*, 1993, 5(11): 1529-1539.
- [17] 王薇. 抗逆相关转录因子基因 GmDREB3 启动子分析及兼抗白粉病、条锈病小麦分子标记检测[D]. 乌鲁木齐: 新疆农业大学, 2009.
- Wang W. Promoter analysis of stress-related transcription factor gene, GmDREB3 and characterization of wheat line resistant to stripe rust and powdery mildew by molecular markers[D]. Urumqi: Xinjiang Agricultural University, 2009 (in Chinese).
- [18] Sun QH, Gao F, Zhao L, et al. Identification of a new 130 bp *cis*-acting element in the TsVP₁ promoter involved in the salt stress response from *Thellungiella halophila*. *BMC Plant Biol*, 2010, 10(1): 1-12.

(本文责编 郝丽芳)