

DOI:10.3969/j.issn.1000-3142.2014.02.022

胡廷章, 杨俊年, 陈再刚, 等. 水稻 *OsGSTLc* 启动子的分离和鉴定[J]. 广西植物, 2014, 34(2):256-262Hu TZ, Yang JN, Chen ZG, et al. Isolation and identify of the rice *OsGSTLc* promoter[J]. *Guihaia*, 2014, 34(2):256-262

水稻 *OsGSTLc* 启动子的分离和鉴定

胡廷章*, 杨俊年, 陈再刚, 吴应梅

(重庆三峡学院 生命科学与工程学院, 重庆 404100)

摘要: 半定量 RT-PCR 分析表明, *OsGSTLc* 在水稻根中的表达受氯磺隆的诱导。从水稻基因组中分离到的 *OsGSTLc* 读码框上游 2 2171 bp 序列, 在起始密码 ATG 上游 -86 bp 处有 CAAT-box, 但在 CAAT-box 与读码框之间没有典型的 TATA-box。因此, *OsGSTLc* 启动子是无 TATA 框启动子。将 *OsGSTLc* 启动子 5'-端系列缺失后, 分别与 GUS 报告基因融合, 获得 *GSTL2171::GUS*、*GSTL1761::GUS*、*GSTL962::GUS* 和 *GSTL525::GUS* 表达载体, 利用农杆菌介导转化水稻, 获得转基因水稻, 均能启动下游 GUS 报告基因的表达。氯磺隆处理后, 转入 *GSTL2171::GUS*、*GSTL1761::GUS* 和 *GSTL962::GUS* 的水稻植株根部的 GUS 活性明显增加。氯磺隆诱导的应答元件在 -962~ -525 bp 的范围内。

关键词: *OsGSTLc*; 诱导; 缺失分析; 启动子; 水稻

中图分类号: Q71 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2014)02-0256-07

Isolation and identify of the rice *OsGSTLc* promoter

HU Ting-Zhang*, YANG Jun-Nian, CHEN Zai-Gang, WU Ying-Mei

(School of Life Sciences and Engineering, Chongqing Three Gorges University, Chongqing 404100, China)

Abstract: The expression of *OsGSTLc* in rice roots was induced by chlorsulfuron through semi-quantitative RT-PCR analysis demonstrated. A 2 171 bp upstream sequence of the translation start codon ATG of *OsGSTLc* gene was isolated from the genomic DNA of rice, which contained a putative CAAT-box at position -86 bp upstream of ATG, but there wasn't TATA -box between the CAAT-box and ATG. Therefore, *OsGSTLc* promoter was a TATA -less promoter. To define the core promoter sequence, a series of 5' truncation derivatives of *GSTL2171* were fused to a GUS reporter gene to construct *GSTL2171::GUS*, *GSTL1761::GUS*, *GSTL962::GUS* and *GSTL525::GUS*, respectively. The four fusion genes were introduced into rice plants by *Agrobacterium*-mediated transformation, all promoter fragments with 5'-deletion driven successfully the expression of GUS report gene. Quantitative fluorescence assays showed that the GUS activities in the roots of *GSTL2171::GUS*, *GSTL1761::GUS* and *GSTL962::GUS* transgenic rice seedlings were upregulated by chlorsulfuron. The transcriptional activation element of chlorsulfuron may be located between positions -962 and -525.

Key words: *OsGSTLc*; induction; deletion analysis; promoter; rice

谷胱甘肽转移酶 (Glutathione transferases, GSTs; EC 2.5.1.18) 在植物的初级代谢和次级代谢、胁迫耐受和细胞信号转导中行使功能, 影响植物的

生长发育。植物 GST 的主要功能在于解除外界毒素以及内源有毒代谢物的侵害, 能催化还原型谷胱甘肽的疏基与多种亲电和亲脂底物的结合, 生成水

收稿日期: 2013-07-09 修回日期: 2013-10-08

基金项目: 重庆市自然科学基金(cstc2011jjA80027, cstc2012jjA80009); 重庆市教育委员会科学技术研究项目(KJ121106, KJ131101)。

作者简介: 胡廷章, 博士, 教授, 主要从事生物化学与分子生物学研究, (E-mail) tzh2002@yahoo.com.cn。

*通讯作者

溶性的产物,从而降低底物的毒性(Edwards *et al.*, 2000; Dixon *et al.*, 2002b; Moons, 2003)。GSTF 和 GSTU 的主要功能是与包括杀虫剂、除草剂在内的异生素结合,从而解除这些异生素毒性;GSTT 主要是作为谷胱甘肽过氧化酶,还原有机氢过氧化物;DHAR 催化脱氢抗坏血酸还原成抗坏血酸;GSTL 作为植物的抗氧化酶起作用(Dixon *et al.*, 2002a; Edwards *et al.*, 2005);有些 GST 在细胞的氧化还原稳态和调节细胞程序衰老中起作用(Moons, 2005);GST 也作为细胞信号在胁迫耐受中起作用(Loyall *et al.*, 2000)。GSTZ 具有依赖谷胱甘肽的异构酶活性,催化顺丁烯二酸单酰乙酰乙酸异构化成反丁烯二酸单酰乙酰乙酸(Dixon *et al.*, 2000)。

GST 是个多基因家族,自 20 世纪 70 年代从玉米中克隆到能解除除草剂毒性的 GST 基因以来,许多 GST 和与 GST 类似的序列已经从多种植物中得到克隆(Shimabukuro *et al.*, 1970)。目前,至少从 17 种植物中分离到 GST 基因,已经发现拟南芥有 53 个 GST 基因,大豆有 25 个 GST 基因,玉米有 42 个 GST 基因,水稻有 79 个 GST 基因,毛果杨有 81 个 GST 基因(Chi *et al.*, 2011; Dixon *et al.*, 2002b; McGonigle *et al.*, 2000; Soranzo *et al.*, 2004; Wagner *et al.*, 2002)。根据蛋白同源性和基因组织结构,植物 GST 分为 φ (GSTF)、 τ (GSTU)、 ζ (GSTZ)、 θ (GSTT)、 λ (GSTL) 和脱氢抗坏血酸还原酶(DHARs)、四氯对苯二酚脱卤素酶(TCHQD)和微粒体谷胱甘肽转移酶(Microsomal-class GSTs)等 8 类(Mohsenzadeh 等, 2011)。在研究水稻 GST 家族基因功能的过程中,发现 *O_sGSTLc* 基因在水稻根中的表达受到除草剂氯磺隆的诱导。为了分析 *O_sGSTLc* 在水稻中的表达特性,研究 *O_sGSTLc* 启动子的功能,本实验从水稻基因组中分离到 *O_sGSTLc* 基因的启动子,并对该启动子进行了研究。

1 材料与方 法

1.1 材料

水稻“中华 11 号”(Oryza sativa cv. Zhonghua 11)、农杆菌 LBA4404、大肠杆菌 TOP 10 菌株和植物转化载体 pCAMBIA1301 由重庆三峡学院生命科学工程学院实验室保藏。

1.2 方法

1.2.1 材料培养和处理 取水稻种子,用自来水浸泡

2 d,种子发芽露白后,铺在纱布上;在自然条件下培养 10 d 后,转入 0.02% 的氯磺隆水溶液中培养。在转入氯磺隆水溶液后的 0、2、6、10、24 和 48 h 分别收集水稻幼苗的根和叶。

1.2.2 RNA 提取和半定量 RT-PCR 分析 用 Trizol 试剂分别提取水稻幼苗根和叶的总 RNA,取 1 μ g RNA 为模板,以 olig(dT)18 为反转录引物进行反转录,合成 cDNA。半定量 RT-PCR 是以反转录产物为模板,以引物 *O_sGSTLc sf* 和 *O_sGSTLc sr* (表 1) 扩增 *O_sGSTLc* 基因片段,以引物 ACTIN1 f 和 ACTIN1 r (表 1) 扩增持家基因 ACTIN1 片段为内参(McElroy 等, 1990),扩增条件为 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 进行 28 个循环。

表 1 PCR 扩增引物序列

Table 1 Primer sequences used for the PCR amplification

序号 Sequence No.	引物名称 Name of the primers	序列 Sequence
1	<i>O_sGSTLc sf</i>	5'-CGTTCAACAAAGCATCGTAC-3'
2	<i>O_sGSTLc sr</i>	5'-GCAAAAACTGTGGGTCTCTGT-3'
3	ACTIN1 f	5'-TCCGTGACATCAAGGAAAAG-3'
4	ACTIN1 r	5'-GATATCAACATCGCACTTCATG-3'
5	pGSTLc f1	5'-CACCCCTGCAGCCATTAGTGTGAGTGT- TTCGGTGA-3'
6	pGSTLc f2	5'-CACCCCTGCAGGAAATCGGTAGCATCT- CTTCAGGA-3'
7	pGSTLc r	5'-AACAAAGCGGTTTATCTCTCTCCTC-3'
8	p1301 f	5'-CCAGGCTTTACTCTTATGCTTCC-3'
9	p1301 r	5'-CCTAACCAAGAAAATGAAGGAGAA-3'

1.2.3 基因上游调控序列的分离 用植物 DNA 提取试剂盒提取水稻总 DNA,并以此为模板。根据 *O_sGSTLc* 读码框上游的 DNA 序列设计引物 pGSTLc f1 和 pGSTLc r,在正向引物 5'-端引入了 *Pst* I 酶切位点,扩增片段长度为 2 254 bp。将扩增到的 DNA 片段克隆到 pENTR/D-TOPO 载体上,构建的质粒命名为 pGSTLc-TOPO,测序后,利用 PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp>) 和 Plant CARE (<http://intra.psb.ugent.be:8080/PlantCARE/>) 进行序列分析。

1.2.4 植物表达载体的构建 通过 *Pst* I 和 *Nco* I 酶切位点将 pGSTLc-TOPO 载体上的 *O_sGSTLc* 读码框上游的 2 171 bp 片段插入到 pCAMBIA1301 载体上,取代 *GUS* 基因前的 35S 启动子,得到 *GSTL2171::GUS* 转植物载体;用 *Hind* III 和 *Nco* I 酶切 *GSTL2171::GUS* 质粒,回收小的 *O_sGSTLc* 启动子片段,该片段的大小为 1 761 bp。通过 *Hind* III 和 *Nco* I 酶切位点克隆到 pCAMBIA1301 载体上,得

到 *GSTL1761::GUS* 载体;根据 *OsGSTLc* 启动子序列设计引物 p*GSTLc* f2(表 1),用引物 p*GSTLc* f2 和 p*GSTLc* r 以 p*GSTZ2*-TOPO 质粒为模板作 PCR,PCR 产物通过 *Pst* I 和 *Nco* I 酶切位点克隆到得到 pCambia 1301 载体上,得到 *GSTL962::GUS* 载体;用 *Xba* I 和 *Nco* I 酶切 *GSTL962::GUS* 质粒,回收小的 *OsGSTLc* 启动子片段,用 *Xba* I 和 *Nco* I 酶切位点克隆到 pCambia1301 载体上,得到 *GSTL525::GUS* 载体。

1.2.5 植物转化和转基因植株的鉴定 采用冻融法将植物转化载体 *GSTL2171::GUS*、*GSTL1761::GUS*、*GSTL962::GUS* 和 *GSTL525::GUS* 分别转化农杆菌 LBA4404(Hofgen 等,1988),采用农杆菌介导共培养法转化水稻,25 mg/L 潮霉素筛选转基因水稻(Hu,2008;段承杰等,2012)。按 pCambia1301 载体 GUS 基因上游插入的启动子两侧的载体序列设计引物 p1301 f 和 p1301 r(表 1),以转基因水稻 DNA 为 PCR 模板进行 PCR 分析。

1.2.6 转基因植株的 GUS 活性定量测定 转 *GSTL2171::GUS*、*GSTL1761::GUS*、*GSTL962::GUS* 和 *GSTL525::GUS* 的水稻种子在水中培养,待种子萌发出苗 10 d,转入 0.02% 氯磺隆溶液中培养,分别在 0、6、8、10 和 12 h 收取幼苗的根和叶。参考 Jefferson *et al.*(1987)方法进行 GUS 活性检测。

2 结果与分析

2.1 *OsGSTLc* 基因诱导表达

半定量 RT-PCR 分析表明,*OsGSTLc* 在水稻根中的本底表达量(诱导 0 h)非常低,经绿磺隆处理 2 h 后表达量开始升高,诱导 6 h 时表达量达到峰值,之后逐渐下降,到 48 h 时,*OsGSTLc* 的表达量逐渐回到接近诱导之前的水平(图 1:a)。而在水稻的叶中 *OsGSTLc* 的表达不受绿磺隆影响,绿磺隆处理后表达水平没有明显变化(图 1:b)。说明 *OsGSTLc* 在水稻根中的表达受绿磺隆的诱导。

2.2 *OsGSTLc* 基因启动子的克隆

以水稻总 DNA 为模板,由引物 p*GSTLc* f 和 p*GSTLc* r 进行 PCR 扩增(表 1),将扩增产物进行琼脂糖凝胶电泳分析,得到约 2 250 bp 左右的条带。回收 PCR 产物,并与 pENTR TOPO 载体的连接、鉴定、测序。测序结果显示,扩增得到的片段包含 *OsGSTLc* 读码框上游的 2 171 bp 序列。利用

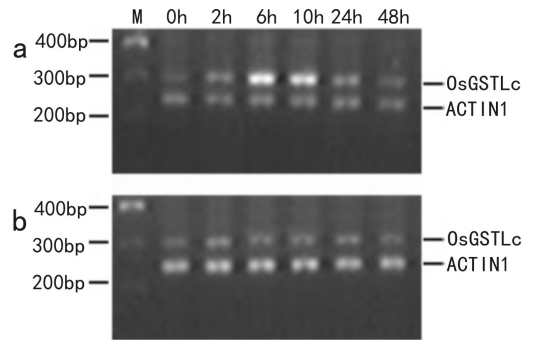


图 1 半定量 RT-PCR 分析 *OsGSTLc* 的表达 a. 根; b. 叶
Fig. 1 *OsGSTLc* gene expression by semi-quantitative RT-PCR analysis a. roots; b. leaves

PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp>) 和 Plant CARE (<http://intra.psb.ugent.be:8080/PlantCARE/>) 分析,发现在起始密码 ATG 上游-86 bp 处有推测的 CAAT-box 存在,但在 CAAT-box 与读码框之间没有典型的 TATA-box 存在(图 2)。

2.3 植物转化载体的构建

为研究 *OsGSTLc* 启动子的功能,对启动子的 5'-端侧翼序列进行系列缺失,从而得到 2 171、1 761、962 和 525 bp 的启动子片断(图 2,图 3)。用获得的这些启动子片段取代 pCambia1301 载体的 GUS 基因上游的 35S 启动子,获得不同长度的启动子与 GUS 融合的植物转化载体(图 3)。

2.4 转基因水稻植株的获得

将 *GSTL2171::GUS*、*GSTL1761::GUS*、*GSTL962::GUS* 和 *GSTL525::GUS* 载体由农杆菌 AGL0 介导转化中花 11 号水稻,经潮霉素筛选,获得 *GSTL2171::GUS*、*GSTL1761::GUS*、*GSTL962::GUS* 和 *GSTL525::GUS* 转化的植株都在 5 株以上。进行 PCR 鉴定表明,绝大部分转化株都能扩增出特异条带,证明外源基因已经整合到水稻基因组中(图 4)。

2.6 *OsGSTLc* 启动子对氯磺隆响应的转录调节

GUS 活性分析表明,未经氯磺隆处理的转基因幼苗中,转入 *GSTL525::GUS* 的水稻幼苗根和叶的 GUS 活性最高,*GSTL962::GUS* 的水稻幼苗根和叶的 GUS 活性最低,*GSTL1761::GUS* 和 *GSTL962::GUS* 的 GUS 活性无明显差异(图 5)。

在氯磺隆处理后,转入 *GSTL2171::GUS*、*GSTL1761::GUS* 和 *GSTL962::GUS* 的水稻植株根部的 GUS 活性得到明显增强,峰值大约在绿磺


```

-2171 ccattagtgtagtggtttcgggtgaaatcattggatatatgaccatacatacgatgattc
      pGSTLc f1
-2111 tgggtgcctataatattacatagacttgggtcttattttttatgaagccatttggcacact
-2051 tgaatgatatgaaaacataacacccttcaactagaacggttagcaacaagttaggagtttg
-1991 tgctattaatagaatgtttcgtgacgttatctttccttttaacggaaaatagcacaaaag
-1931 tgccttttcatttaatagagtagaagaaaatacaacctctagggttaaagcgaaaagaga
-1871 gaggtcaccgtaagctatacactatacaagttgcgggacgaactcgtgcaatcttttagc
-1811 ccctgctaaagcccaaaggctagcctcttctttgatttttggtaggagaaaagcttggtagc
      Hind III
-1751 cacctctttgtgggtcgaaaatccgtcgatttctcaccttccagatttcccagacgactaa
-1691 caagatgagggatcgaagacccttttttaggacgttgagcgtatttgctaggctctccca
-1631 ccattgatggactgaccgagcttccctcccactgagccggcaccattgttgatcccac
-1571 ccactagcaacgaggtgtcagattatctttgtatctctcacatgggtgacgagatgcaa
-1511 ggccgtctcggctttacaacgacagagagggcaatggctgttggtttggcaactcctttc
-1451 gcaagccgggtcagacgtccaaactctattctggatgatgagctatgcatggaatttgcac
-1391 ttccccggcgcccagattttctagaacaaggagttgagacttgtgtttggcgcccgcag
-1331 cactgtgcatggtaggcccaggaggatgtgtagtgcctattacttatgaatttccaaaca
-1271 atctgggtccgggtcttctcgttgtttaagttcacattccgaaccgcttcccactagcggact
-1211 aactgggtcaacaaggttgattgtgaaatagagtctgcatcgaggggtcagggtcatgcacc
-1151 caggtgtcgtcttctttacttggcgtagggacttccctttgtctggagatcgcatag
-1091 acaagggcatgaggacttttggttgaccccatcaatccatgcagaaccgttgatgta
-1031 tggtagctcttttaagtgtgtcaaagggagcagcttttcgtgtgtgtgtacgtaggggta
-971 aaaacggtcgaaatcggtagcatctcttcaggacaacggctcgatcagccggtaattgat
      pGSTLc f2
-911 catatttatcatttaaactactcagtgctgatattaatacagatgcagaaagatattagaa
-851 aaaacaaaattttaaataagcaataaacgggtatggctcgaaaatggtaaccctttatacaaa
-791 aacggcgtttggaatttccgtaaccattttcaccctatatgcatgtatgatgcgcacac
-731 gaactcaactaggatcgaaataaaacataactacttccgtccgctcctaaaataaaggaat
-671 ttaggtggctatgaaacatcctatcacaataaatctggaaggcttatgtctaaattcat
-611 tgtaataggatgcgtcaccttcatcgaaaatttcttatattttgaaatggaggtattaat
-551 agttaggtgggtctcaacaggcctatctagacacaattccctatgtagtgagccaaggagg
      Xba I
-491 taggatagttccctccgtaatggatcgaggatgtccgtctccttaaccacttcaaaacg
-431 aacatattgtggttttgtataatttgggcccaggaaaaccgaaaacatctccctcggctc
-371 ccaccccaacaaaccaccgggttccctctggagaaatcccggaagaaagcacaggaacac
-311 aggaggatgtgcgtgacccacaccaggttctcgtccagggtgctgagcggcttgacgaac
-251 ctgaccttccgcccgaatcagctgctgacgtatcgctccgcatcaccactcacac
-191 tctctctccccatgaattcgtctgcttccctcggggccgatgctccccgtcaccactga
-131 cgcgcccctccacctccgtagttcttccgtcccatcgtcgcgcacaataaagattcgcc
      CAAT-box
-71 cgagctcgcggaagcgtcgcccgggtgcaacctcgcgacgccaagaatctctccccgtccc
-11 gcaccgtcgccATGgctgcccggccgcccgcaccggcaaggtgagcacgcgtgcccggctg
      Nco I
+50 cggcgagggtgaggagaagaataaacccgcttggtt
      pGSTLc r

```

图 2 *OsGSTLc* 启动子序列分析 下画线标出的是用于 5'-端缺失的引物和酶切位点 *Hind* III、*Xba* I、*Nco* I；阴影标出的是推测的 CAAT-box；加粗的 ATG 是翻译的起始密码。

Fig. 2 Nucleotide sequence of the *OsGSTLc* promoter The primers and *Hind* III, *Xba* I and *Nco* I site used for 5'-deletion are underlined; the putative CAAT-box is shaded gray; the translation start codon ATG is black.

隆处理后 6 h 左右, GUS 活性是未经处理的 3~4 倍(图 7), 而叶中的 GUS 活性没有多大变化(图 6)。在转入 *GSTL525::GUS* 的水稻植株的根和叶, GUS 活性几乎不受绿磺隆的影响(图 5)。

3 结论与讨论

生物和非生物胁迫会诱导一些植物 GST 的表达。如受炭疽病 (*Colletotrichum orbiculare*) 感染

的烟草, 其中 NbGSTU1 和 NbGSTU3 的表达得到增强(Dean *et al.*, 2005)。非生物因素如冷、热、重金属离子、盐、PEG、 H_2O_2 、甲基紫精、脱落酸、水杨酸、生长素、细胞分裂素可引起一些 GST 的响应, 除草剂和除草剂安全剂也会诱导一些 GST 表达(胡廷章等, 2007)。在一些情况下, GST 因对一般的细胞损伤或除草剂和化学毒素引起的氧化胁迫反应而受到诱导(Urbanek *et al.*, 2005)。玉米中的 GST 可促使除草剂阿特津脱毒, 就是因为除草剂形成的氧

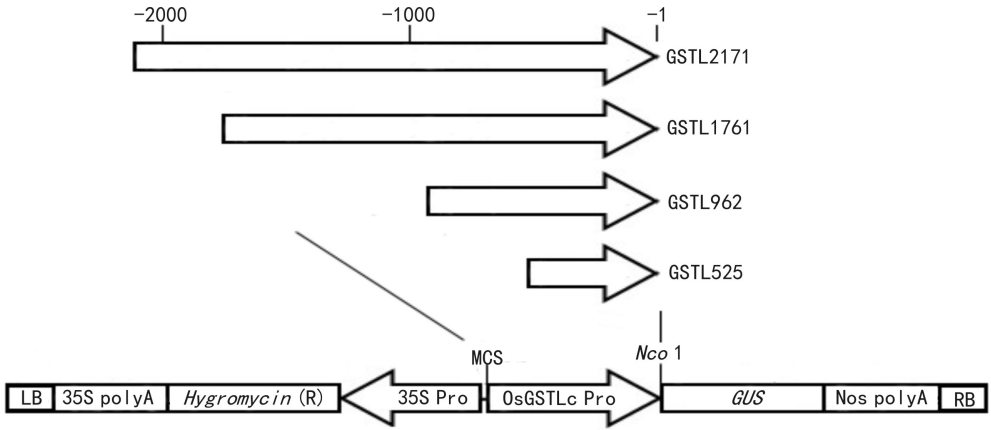


图 3 *OsGSTLc* 启动子与 GUS 融合的植物转化载体
 Fig. 3 Schematic diagram of plant expression cassettes

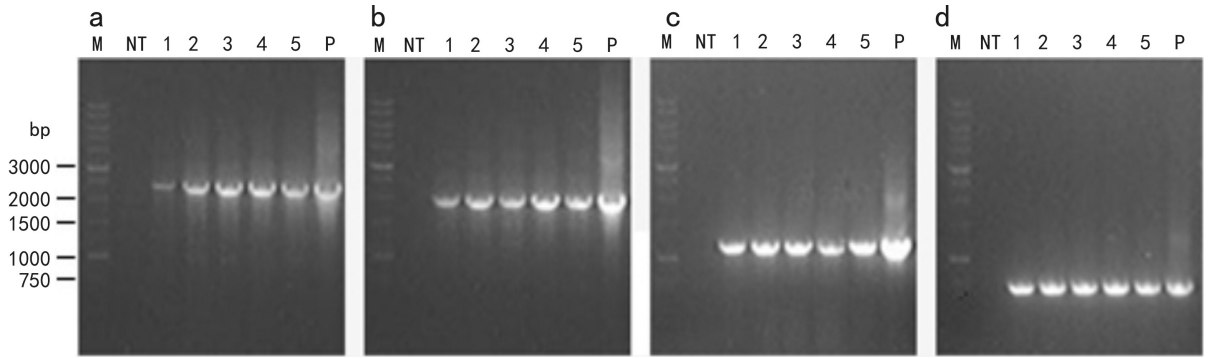


图 4 转基因水稻植株 DNA 的 PCR 检测 a. *GSTL2171::GUS*; b. *GSTL1761::GUS*; c. *GSTL962::GUS*; d. *GSTL525::GUS*.
 M. DNA marker; NT. 非转基因植株(阴性对照); 1~5. 转基因植株; P. 表达载体(阳性对照).
 Fig. 4 PCR analysis of transgenic rice a. *GSTL2171::GUS*; b. *GSTL1761::GUS*; c. *GSTL962::GUS*; d. *GSTL525::GUS*. M. DNA marker; NT. Non-transgenic rice; 1-5. Independent transgenic lines; P. Expression vector.

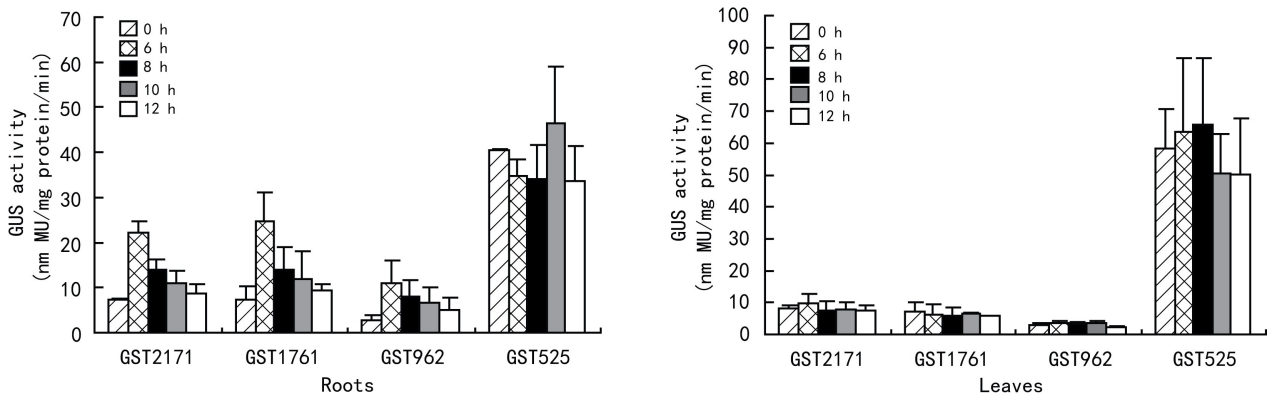


图 5 转基因水稻幼苗的 GUS 活性分析 数据是 3 个转基因独立株系测得的平均值±SD; * 表示标记的氯磺隆处理与未处理水稻的 GUS 活性达到 $P < 0.05$ 差异水平。
 Fig. 5 Analysis of GUS activity of transgenic rice seedlings The average GUS activity and standard deviations were obtained from three independent transgenic lines; * denote differences between mean values measured in the indicated rice seedlings treated by chlorsulfuron compared to untreated rice seedlings are $P < 0.05$.

胁迫能诱导 GST 大量表达 (Shimabukuro *et al.*, 1970), 其它如磺酰脲类、异丙甲草胺、硫胺甲酸亚

砷、氯乙酰苯胺和联苯醚类等除草剂也可诱导 GST 表达 (胡廷章等, 2007)。而在另一些情况下, GST

的诱导则是其对特异胁迫作用的响应, 激发起植物的防御反应, 如经除草剂安全剂处理的禾谷类植物, 通过增加包括 GST 在内的解毒酶表达而增强其对除草剂的耐受性 (Davies *et al.*, 1999)。 *OsGSTLc* 在水稻根中的表达受绿磺隆的诱导, *OsGSTLc* 很可能在解除除草剂毒性方面发挥作用。

真核生物有 3 种 RNA 聚合酶, 每一种都有自己特定的启动子类型。 Pol-I 负责 rRNA 转录, Pol-II 负责 tDNA 和 5SrDNA 的转录, 其启动子位于转录的 DNA 序列之内, 称为下游启动子。 Pol-III 负责编码蛋白质基因和部分 snRNA 基因的转录。 Pol-II 启动子分为含有 TATA box 的启动子 (TATA promoter) 和不含有 TATA box 的启动子 (TATA-less promoter) 两大类 (左永春等, 2009)。 在 *OsGSTLc* 启动子的 CAAT-box 与读码框之间没有典型的 TATA-box 存在, 因此, *OsGSTLc* 启动子是无 TATA 框启动子。 由于 *OsGSTLc* 基因编码的是蛋白质, 因此, Pol-III 启动子存在不含 TATA box 的启动子。 绝大多数植物启动子正确表达需要 TATA box, 而在没有 TATA box 的启动子中, 在调控基因表达的过程中, 可能存在着某些替代机制, 涉及到某种蛋白质因子与启动子中的某些 DNA 序列相互作用。 如 AC2 转座酶基因启动子无 TATA box, TPASE 抑制转座作用是通过与起始点上游 100~180 bp 处结合而实现 (Fridlender *et al.*, 1996)。

未经氯磺隆处理的转基因幼苗中, 转入 *GSTL525::GUS* 的水稻幼苗根和叶的 GUS 活性最高; 当启动子的长度从 525 bp 延长到 962 bp, 转基因水稻幼苗的根和叶的 GUS 活性最低; 而启动子的长度再延长到 1 761 bp, 其 GUS 活性有所升高, 但较 *GSTL525::GUS* 的低得多; 当启动子的长度延长到 2 171 bp 时, 转基因水道幼苗根和叶的 GUS 活性没有多大变化, 其 GUS 活性与 1 761 bp 启动子的相似。 这些结果说明在起始密码 ATG 上游 -1 761~-1 bp 的范围存在完整的启动子; 在 -525~-1 bp 和 -1 761~-962 bp 有增强基因表达的元件, 在 -962~-525 bp 的范围内存在抑制基因表达的元件; 在 -962~-525 bp 存在的抑制基因表达元件非常强, 其抑制能力远远超过了在 -525~-1 bp 和 -1 761~-962 bp 存在的增强基因表达元件的增强能力。 在绿磺隆处理后, 转 *GSTL525::GUS* 水稻植株的根和叶中, GUS 活性几乎不受绿磺隆的影响;

GSTL2171::GUS、*GSTL1761::GUS* 和 *GSTL962::GUS* 转基因水稻植株根部的 GUS 活性明显增强, 其峰值大约在处理 6 h; 而叶中的 GUS 活性没有多大变化。 这说明在 -962 bp~-525 bp 的范围内, 存在绿磺隆诱导 *OsGSTLc* 基因在水稻根表达的元件。 结果与半定量 RT-PCR 分析一致, 即 *OsGSTLc* 在水稻幼苗根中的表达受到氯磺隆的诱导。

有关 GST 基因家族启动子的研究报道较少。 拟南芥 GST6 基因的表达受到生长素、水杨酸和 H_2O_2 的诱导, 其启动子具有 1 个 *ocs* 元件, OBF1 能够促进 *ocs* 元件结合因子 (OBF) 与 *ocs* 元件结合 (Chen 等, 1996)。 在转基因马铃薯中, 玉米 GST-27 启动子可以驱动 GUS 报告基因的表达, 安全剂 R329148 (3-二氯乙酰基-2, 2, 5-三甲基-1, 3-噻烷酮) 的诱导使叶中 GUS 报告基因的表达提高 40 倍, 而在茎、根和块茎的表达是组成型的, 不受诱导 (Robertson *et al.*, 2000)。

在氯磺隆处理后 6 h *OsGSTLc* 基因大量表达, 说明该基因对氯磺隆处理的应答反应快。 另外, 该启动子在受诱导后的表达水平不是很高, 仅使基因的表达水平提高了 3~4 倍。 这些特点有利于该启动子在实际生产中的应用。 因为在一些转基因植物中, 外源基因的过度表达往往会破坏植物自身体内的平衡, 从而影响植物的正常生长发育。 在研究和生产中, 用一个受氯磺隆诱导的中度表达的启动子引入外源基因, 则有利于解决外源基因在植物中过度表达的问题, 使外源基因在转基因植物的表达得到很好控制。 本研究为 *OsGSTLc* 启动子的应用和 *OsGSTLc* 基因功能的深入研究奠定了基础。

参考文献:

- Chen W, Chao G, Singh KB. 1996. The promoter of a H_2O_2 -inducible, Arabidopsis glutathione S-transferase gene contains closely linked OBF- and OBP1-binding sites[J]. *Plant J*, **10** (6): 955-66
- Chi Y, Cheng Y, Vanitha J, *et al.* 2011. Expansion mechanisms and functional divergence of the glutathione s-transferase family in sorghum and other higher plants[J]. *DNA Res*, **18**(1): 1-16
- Davies J, Caseley JC. 1999. Herbicide safeners: a review[J]. *Pestic Sci*, **55**: 1043-1058
- Dean JD, Goodwin PH, Hsiang T. 2005. Induction of glutathione S-transferase genes of *Nicotiana benthamiana* following infection by *Colletotrichum destructivum* and *C. orbiculare* and involvement of one in resistance[J]. *J Exp Bot*, **56**: 1 525-1 533
- Dixon DP, Cole DJ, Edwards R. 2000. Characterisation of a zeta class glutathione transferase from *Arabidopsis thaliana* with a

- putative role in tyrosine catabolism[J]. *Arch Biochem Biophys*, **384**:407—412
- Dixon DP, Davis BG, Edwards R. 2002a. Functional divergence in the glutathione transferase superfamily in plants. Identification of two classes with putative functions in redox homeostasis in *Arabidopsis thaliana*[J]. *J Biol Chem*, **277**(34):30 859—30 869
- Dixon DP, Laphorn A, Edwards R. 2002b. Plant glutathione transferases[J]. *Genome Biol*, **3**(3):30 004. 1—30 004. 10
- Duan CJ(段承杰), Luo DP(罗荡平), Luo XM(罗雪梅), et al. 2012. Over-expression of *Arabidopsis thaliana* AtNPR1 gene in rice enhances the rice resistance to bacterial blight and blast diseases(转拟南芥 AtNPR1 基因增强水稻对水稻白叶枯病和稻瘟病的抗性)[J]. *Guihaia*(广西植物), **32**(6):800—805
- Edwards R, Dixon DP. 2000. The role of glutathione transferases in herbicide metabolism[M]//Cobb AH, Kirkwood RC. Herbicides and their mechanisms of action. Sheffield: Sheffield Academic Press;33—71
- Edwards R, Dixon DP. 2005. Plant glutathione transferases[J]. *Methods Enzymol*, **401**:169—186
- Fridlender M, Harrison K, Jones JDG, et al. 1996. Repression of the Ac transposase gene promoter by Ac transposase[J]. *Plant J*, **9**:911—917
- Hu TZ(胡廷章), Zhou DX(周大祥), Luo K(罗凯). 2007. Structure and biological function of glutathione transferases and their genes in plants(植物谷胱甘肽转移酶的结构与功能及其基因表达)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), **43**(1):195—200
- Hofgen R, Willmitzer L. 1988. Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation[J]. *Nucleic Acids Res*, **16**(20):9 877
- Hu TZ. 2008. OsLEA3, a late embryogenesis abundant protein gene from rice, confers tolerance to water deficit and salt stress to transgenic rice[J]. *Russ J Plant Physiol*, **55**(4):530—537
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW. 1987. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants[J]. *EMBO J*, **6**(13):3 901—3 907
- Loyall L, Uchida K, Braun S, et al. 2000. Glutathione and a UV light-induced glutathione S-transferase are involved in signaling to chalcone synthase in cell cultures[J]. *Plant Cell*, **12**:1 939—1 950
- McElroy D, Rothenberg M, Wu R. 1990. Structural characterization of a rice actin gene[J]. *Plant Mol Biol*, **14**(2):163—171
- McGonigle B, Keeler SJ, Lau SM, et al. 2000. A genomics approach to the comprehensive analysis of the glutathione S-transferase gene family in soybean and maize[J]. *Plant Physiol*, **124**:1 105—1 120
- Mohsenzadeh S, Esmaili M, Moosavi F, et al. 2011. Plant glutathione S-transferase classification, structure and evolution[J]. *Afr J Biotechnol*, **10**(42):8 160—8 165
- Moons A. 2003. Osgstu3 and osgtu4, encoding tau class glutathione S-transferases, are heavy metal- and hypoxic stress-induced and differentially salt stress-responsive in rice roots[J]. *FEBS Lett*, **553**(3):427—432
- Moons A. 2005. Regulatory and functional interactions of plant growth regulators and plant glutathione S-transferases (GSTs)[J]. *Vitam Horm*, **72**:155—202
- Robertson N, Paine JA, Sonnewald U, et al. 2000. Expression of the chemically inducible maize GST-27 promoter in potato[J]. *Potato Res*, **43**:335—345
- Shimabukuro RH, Swanson HR, Walsh WC. 1970. Glutathione conjugation. Atrazine detoxification mechanism in corn[J]. *Plant Physiol*, **46**:103—107
- Soranzo N, Sari Gorla M, Mizzi L, T et al. 2004. Organisation and structural evolution of the rice glutathione S-transferase gene family[J]. *Mol Genet Genomics*, **271**(5):11—21
- Urbanek H, Majorowicz H, Zalewski M, et al. 2005. Induction of glutathione S-transferase and glutathione by toxic compounds and elicitors in reed canary grass[J]. *Biotechnol Lett*, **27**:911—914
- Wagner U, Edwards R, Dixon DP, et al. 2002. Probing the diversity of the *Arabidopsis* glutathione S-transferase gene family[J]. *Plant Mol Biol*, **49**(5):515—532
- Zuo YC(左永春), Li QZ(李前忠). 2009. Analysis of plant TATA and TATA-less promoters by using sequence and structure features(基于序列和结构特征分析植物 TATA 和 TATA-less 启动子)[J]. *Prog Biochem Biophys*(生物化学与生物物理进展), **36**(7):863—871

(上接第 275 页 Continue from page 275)

- from 1982 to 2003(1982—2003 年藏北高原草地生态系统 NDVI 与气候因子的相关分析)[J]. *Resour Sci*(资源科学), **31**(11):1 988—1 998
- Zou XY, Li S, Zhang CL, et al. 2002. Desertification and control plan in the Tibet Autonomous Region of China[J]. *J Arid Environ*, **51**(2):183—198
- Zhou HK(周华坤), Zhou XM(周兴民), Zhou XQ(赵新全). 2000. A preliminary study of the influence of simulated greenhouse effect on a kobresia humilis meadow(模拟增温效应对矮嵩草草甸的影响的初步研究)[J]. *Acta Phytocool Sin*(植物生态学报), **24**(5):547—553
- Zhou KS(周刊社), Du J(杜军), Yuan L(袁雷). 2010. Responses of climatic potential grassland productivity to climatic change in an alpine meadow area over the Nujiang Basin, Tibet from 1980 to 2008(西藏怒江流域高寒草甸气候生产潜力对气候变化的响应)[J]. *Acta Pratacult Sin*(草业学报), **19**(5):17—24
- Zhou L(周立), Wang QJ(王启基), Zhou Q(周琪). 1995. Study of alpine meadow ecosystem(高寒草甸生态系统研究)[M]. Beijing(北京): Science Press(科学出版社):219—252
- Zhou NF(周宁芳), Qin NS(秦宁生), Tu QP(屠其璞), et al. 2005. Analyses on regional characteristics of temperature changes over Qinghai-Xizang Plateau in recent 50 years(近五十年青藏高原地面气温变化的区域特征分析)[J]. *Plateau Meteorol*(高原气象), **24**(3):344—349
- Zhou R(周睿), Yang YH(杨元合), Fang JY(方精云). 2007. Responses of vegetation activity to precipitation variation on the Tibetan Plateau(青藏高原植被活动对降水变化的响应)[J]. *Acta Univ Peking: Sci Nat Edit*(北京大学学报·自然科学版):771—775