

油菜 *Oleosin* 基因启动子的克隆、分析及瞬时表达

王伟权, 李树俊, 朱欣琪, 丘志慧, 施力汛, 张哲 (仲恺农业工程学院农业与生物学院, 广东广州 510225)

**摘要** 以甘蓝型油菜幼苗为材料, 根据油脂蛋白 *Oleosin* (O20) 基因的启动子序列设计引物, PCR 扩增了长度为 935 bp 的片段, 将该片段连接到 pBI101 载体, GUS 瞬时染色结果表明, 该片段可以驱动 *GUS* 基因在油菜幼苗根部特异性表达。油菜油脂蛋白是一个蛋白质家族, 为进一步鉴别扩增到的 935 bp 油脂蛋白启动子, 该研究利用油菜基因组信息进行序列对比, 结果表明 935 bp 的启动子和 *Oleosin* (O20) 的启动子序列之间有较多的变异, 但和油菜 1 号染色体上的序列完全一致; 1 号染色体上紧跟的编码框序列和油脂蛋白 *Oleosin* (O20) 的编码框序列也完全一致, 但油脂蛋白 *Oleosin* (O20) 的基因组序列要比油菜 1 号染色体的基因组序列短。通过 PLACE 和 PlantCARE 软件对 935 bp 启动子进行了扫描预测, 结果表明该启动子中含有许多顺式作用元件, 尤其是脱落酸、茉莉酸甲酯和水杨酸这 3 个与激素有关的元件; 将该研究扩增到的另一个 928 bp 长度的启动子与 935 bp 的启动子相比, 前者启动子区域水杨酸顺式作用元件缺少了 1 个碱基, 同时也缺失了 1 个碱基的片段, 这些序列的变化可能是该启动子丧失活力的原因。

**关键词** 启动子; 油菜; 瞬时表达; *Oleosin*

**中图分类号** S188 **文献标识码** A

**文章编号** 0517-6611(2020)22-0115-05

**doi**: 10.3969/j.issn.0517-6611.2020.22.030



开放科学(资源服务)标识码(OSID):

Cloning, Analysing and Transient Expressing *Oleosin* Gene Promoter in *Brassica napus*

WANG Wei-quan, LI Shu-jun, ZHU Xin-qi et al (College of Agriculture and Biology, Zhongkai University of Agricultural and Engineering, Guangzhou, Guangdong 510225)

**Abstract** According to the young seedlings of *Brassica napus* as materials, *Oleosin* promoters designed by the oil protein *Oleosin* (O20) sequence with length of 935 bp and 928 bp were amplified by PCR. GUS staining showed that 935 bp lipid protein *Oleosin* promoter can drive the specific expression of *GUS* gene in *B. napus* seedlings root. Comparing 935 bp with *Oleosin* (O20) promoter sequences, we found that there is a lot of variation between them. Because *B. napus* oil protein is a protein family, when utilizing *B. napus* genome sequencing information to be compared to confirm the oil protein promoter, we found that the promoter sequence amplified with length of 935 bp and the sequence of *B. napus* chromosome 1 were completely consistent. Then comparing coding sequences predicted behind chromosome 1, we found that the coding sequences behind the 1 chromosome is exactly the same with that of the *Oleosin* (O20) oil protein. While there are differences in their genome sequence, the 935 bp promoter sequence on chromosome 1 is much larger than that of the *Oleosin* (O20). There is no comparison of their genome sequence in this paper. Studying thoroughly the promoter amplified of 935 bp through the PLACE and the PlantCARE website, we have found many cis-acting elements. Three components related to abscisic acid, methyl jasmonate and salicylic acid are notable. Because we also amplified a promoter with length of 928 bp, the promoter can not drive the expression of the *GUS* gene. Analysing and comparing the sequence of 935 bp and 928 bp, we found that a base lacked in the promoter TCA motif of 928 bp. The loss of these sequential changes may cause the loss of the vitality of the promoter. In summary, we have successfully obtained a tissue specific promoter of *B. napus* that can be used for scientific research and production.

**Key words** Promoter; *Brassica napus*; Transient expression; *Oleosin*

植物作为生产药用蛋白或其他具有重要价值蛋白的生物反应器, 为人类提供一个更加安全和廉价的生产系统, 是植物基因工程的发展方向, 从而使传统农业生产和现代生物技术紧密结合, 大幅度地提高农产品对人类的服务功效及市场竞争力, 增加农民收入, 促进农业的可持续发展。用各种农作物为载体的植物生物反应器产品可通过种子、果实或块茎表达, 便于贮藏、运输和利用<sup>[1]</sup>。

油脂蛋白 *Oleosin* 是依附于油体表面的属于碱性高度疏水的小分子嵌入蛋白, 在植物种子成长或后熟过程中可大量特异性表达, 是一个蛋白质家族, 最早在芥菜中被发现, 随后不同油料作物(大豆、芝麻、油菜等)、不同树木(油棕、可可、柑橘等)以及其他植物如玉米、水稻、拟南芥等的 *Oleosin* 基因序列和氨基酸序列被陆续报道<sup>[2-3]</sup>。油脂蛋白受到广泛关注, 其原因有三个方面, 一是通过融合外源营养价值高的肽链, 改善种子的营养成分, 提高种子食用或作为饲料的品质, 如利用该技术成功表达有生物活性的鱼生长激素; 二是生产

回收获得外源蛋白, 需在 *Oleosin* 与外源蛋白间加上合适的蛋白酶酶切位点, 目前已通过该系统成功获得有生物活性的 GUS<sup>[4]</sup>、木聚糖酶<sup>[5]</sup> 和水蛙素<sup>[6]</sup>, 在加拿大利用油菜生产水蛙素已进入商业化阶段<sup>[7]</sup>; 三是不通过切割回收过程, 直接生产固定化酶<sup>[8]</sup>。此外, 油质蛋白具有稳定油体的生物学特性, 它们可以对食品、化妆品、油漆等产品中的乳液起到稳定作用<sup>[9]</sup>。更有研究初步确定 *Oleosin* 基因是调控谷子干旱胁迫的候选基因, 可能受干旱或脱落酸(ABA)、茉莉酸甲酯(MeJA)诱导表达<sup>[10]</sup>。

瞬时表达(transient expression)是一种快速地研究不同启动子在特定基因表达、蛋白质亚细胞定位及基因互作的一种重要手段, 对比传统转基因技术中的转化周期长、效率低及不稳定性, 其外源 DNA 不需要整合到宿主细胞染色体上, 因此转化更容易、更快速, 转化效率更高。植物细胞几天内可进行多个基因的表达及高效传递<sup>[11]</sup>, 尤其是合成生物学的发展使瞬时表达有了更大的应用前景。

该研究根据网上已经克隆的 *Oleosin* 基因的启动子序列设计引物, 并扩增 *Oleosin* 基因的启动子, 然后连接到 pBI101 载体上, 对油菜幼苗进行瞬时表达, 为油脂蛋白的生产应用

**作者简介** 王伟权(1968—), 男, 江苏宜兴人, 副教授, 博士, 从事分子生物学研究。李树俊(1998—), 男, 广东广州人, 从事分子生物学研究。王伟权与李树俊为共同第一作者。

**收稿日期** 2019-09-26; **修回日期** 2020-04-13

奠定基础。

1 材料与方法

1.1 菌株和载体 大肠杆菌(Escherichia coli)菌株为 DH5α; 根癌农杆菌(Agrobacterium tumefaciens)菌株为 LBA4404, 抗性标记为利福平(Rif<sup>r</sup>)和卡那霉素(kan); 植物表达载体为 pBI101, 抗性标记为卡那霉素(kan)。

1.2 试剂 限制性内切酶、T<sub>4</sub> DNA 连接酶、PMD-T Easy Vector 及 DNA 凝胶回收试剂盒等购自 TaKaRa 公司。抗生素为 Sigma 产品, 其他生化试剂为国产分析纯。

1.3 油菜总 DNA 的提取 以甘蓝型油菜幼苗为材料, 用 CTAB 法提取油菜总 DNA。

1.4 Oleosin 启动子的扩增与相关载体的构建

1.4.1 Oleosin 启动子的扩增。引物设计根据 O20(GenBank: M63985.2) Oleosin 启动子核苷酸序列, 其中上游引物: 5'-GATAAAGCAATCACCTGG-3', 下游引物: 5'-TTTGCCTTCTGTGAATTGAG-3'。以油菜总 DNA 为模板, 通过 PCR 扩增得到 Oleosin 启动子, 送上海英骏生物技术有限公司测序。

1.4.2 重组表达载体的构建。将测序正确的菌体扩大培养, 按《分子克隆实验指南》用碱裂解法提取质粒。用 Hind III 与 BamH I 酶切 Oleosin 启动子和 PBI101 质粒, 于 1.0% 琼脂糖凝胶电泳, 凝胶回收试剂盒分别回收 Oleosin 启动子片段和 PBI101 载体片段。用 T<sub>4</sub> 连接酶连接两片段, 构建重组表达载体。

1.5 重组质粒的筛选和转化 将构建好的载体用热激法转化农杆菌, 并将转化产物涂布于含 50 mg/L 卡那霉素(kan)和 25 mg/L 利福平(Rif<sup>r</sup>)的 LB 培养基平板, 28℃ 培养 48 h。挑取阳性克隆并扩大培养 36 h 备用。

1.6 农杆菌介导油菜愈伤组织的转化 用菌悬液培养基(MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L+100 μmol/L 乙酰丁香酮)28℃ 振荡培养农杆菌, 至最终浓度为 OD<sub>600</sub> = 0.6, 备用。将已培养好的带有愈伤的 80 棵油菜幼苗随机分为 2 组, 一组幼苗设为对照, 另一组幼苗浸泡在农杆菌菌液中 10 min。将幼苗转移至共培养基(MS+6-BA 0.5 mg/L+NAA 0.1 mg/L+100 μmol/L 乙酰丁香酮)中, 暗培养 3 d。

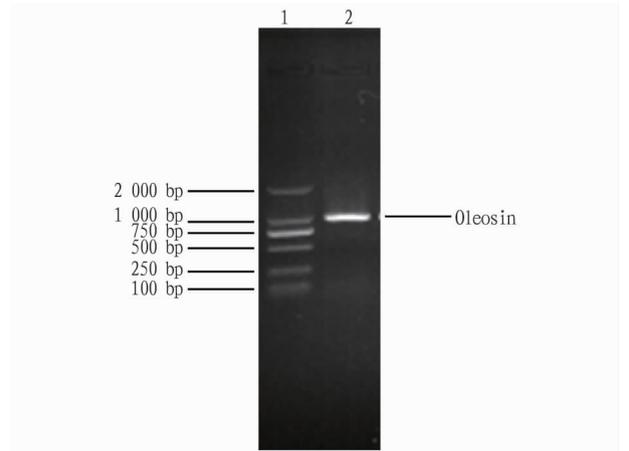
1.7 GUS 染色与瞬时表达 将油菜幼苗转移至固定液(50 mmol/L PBS+1% 甲醛+0.5% Triton-100)中固定 45 min, 用蒸馏水洗涤 3 次。然后油菜幼苗被转移至染色液[100 mmol/L PBS+0.5% Triton-100+X-Gluc+1 mmol/L K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>+1 mmol/L K<sub>4</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>]中, 37℃ 过夜。用 70% 乙醇进行脱色, 观察油菜幼苗染色情况, 同时拍照记录。

2 结果与分析

2.1 Oleosin 基因启动子的扩增 从图 1 可以看到, 以油菜总 DNA 为模板, GenBank O20 Oleosin [简写 Oleosin(O20)] 启动子两端序列为特异性引物, 扩增得到一条特异条带, 条带长度约 950 bp。

2.2 Oleosin 基因启动子序列比对 测序结果表明, 该研究扩增到的 935 bp 启动子, 经与已测序的油菜基因组 1 号染色体比较, 935 bp 长度的启动子和 1 号染色体上面的序列完全

一致(图 2)。



注: 1. DL2000 分子量标记; 2. Oleosin 启动子  
Note: 1. DL2000 DNA Marker; 2. Oleosin promoter

图 1 PCR 扩增油菜 Oleosin 启动子

Fig.1 The result of Oleosin promoter by PCR amplification

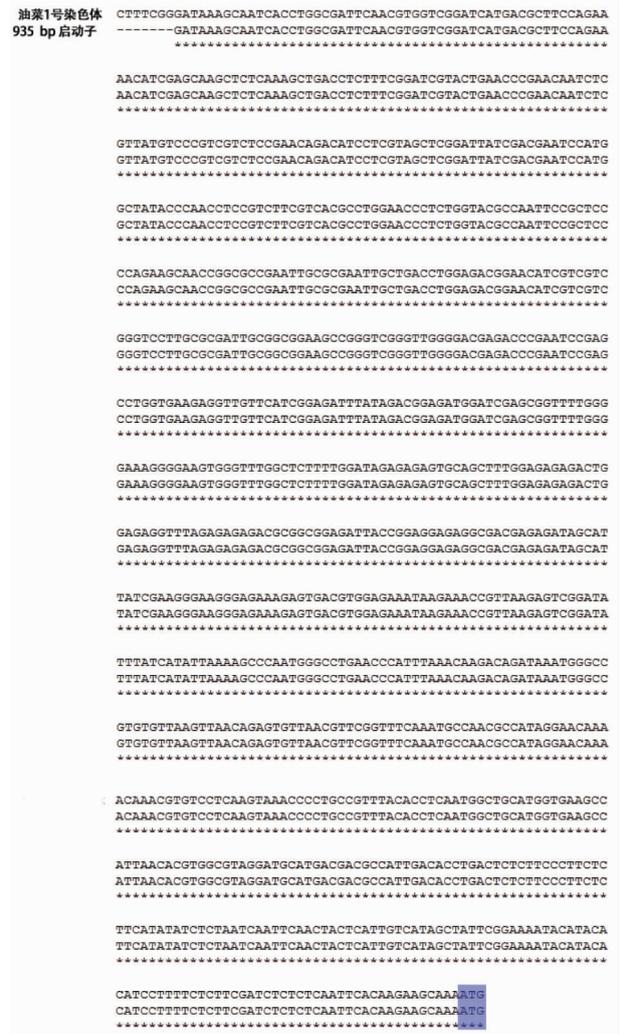


图 2 935 bp Oleosin 启动子和油菜 1 号染色体的序列比对

Fig.2 Sequence alignment of Oleosin promoter and chromosome 1

油菜油脂蛋白是一个蛋白质家族, 为进一步鉴定扩增到的 935 bp 油脂蛋白启动子, 该研究利用油菜基因组信息, 将

染色体上的 *Oleoin* 基因与设计引物的 *Oleoin* (O20) 基因进行了对比(图 3),结果显示,油菜 1 号染色体上预测的 *Oleoin* 基因与 *Oleoin* (O20) 基因的 cds 完全一致,但它们的基因组序列有差异,油菜基因组 1 号染色体的基因组序列要大于 *Oleoin* (O20) 的基因组序列。

```

预测oleoin基因 ATGACGGATACAGCTAGAACCOCATCACGATATCAACAAGTCGAGATCAGTATCCCCGAGAC
油菜(O20)基因  ATGACGGATACAGCTAGAACCOCATCACGATATCAACAAGTCGAGATCAGTATCCCCGAGAC
CGAGACCAGTATTCTATGATCGTTCGAGACCGAGACAAGTATTOCATGATTGGCCGAGAC
CGAGACCAGTATTCTATGATCGTTCGAGACCGAGACAAGTATTOCATGATTGGCCGAGAC
CGAGACCAGTACAACATGTATGGTCGAGACTCTCAAGTCTAGACAGATTGCTAAGGCT
CGAGACCAGTACAACATGTATGGTCGAGACTCTCAAGTCTAGACAGATTGCTAAGGCT
GTTACCGCAGTACCGCCGGTGGGTCCTTCTTCTCTCCAGTCTCACCTTTGCGGA
GTTACCGCAGTACCGCCGGTGGGTCCTTCTTCTCTCCAGTCTCACCTTTGCGGA
ACTGTCATTGCTCTGACTGTTGCGACTCTCTGCTTGTATCTTTAGTCCAATCTTGTG
ACTGTCATTGCTCTGACTGTTGCGACTCTCTGCTTGTATCTTTAGTCCAATCTTGTG
CCTGCTCTCATACCGTTCGATCTCATACCGGCTTCTCTCTCTGGTGGCTTTGGC
CCTGCTCTCATACCGTTCGATCTCATACCGGCTTCTCTCTCTGGTGGCTTTGGC
ATTGCAGCTATAACCGTCTTCTCTGGATCTACAAGTAAAGTGACATTTAAACATATAIT
ATTGCAGCTATAACCGTCTTCTCTGGATCTACAAGTAAAGTGACATTTAAACATATAIT
TCAAGTTGTACAATATGTTTTAAGAAGCGGTAATTTAATAAAAAATAATGTTGAA
TCAAGTTGTACAATATGTTTTAAGAAGCGGTAATTTAATAAAAAATAATGTTGAA
TATAGCGCATGCCTTGTGAGGGGAAAAAAAAATCAAAACATAAAAAATATACATAACCGA
TATAGCGCATGCCTTGTGAGGGGAAAAAAAAATCAAAACATAAAAAATATACATAACCGA
CAAGTGGATTTTTAGATATTACATTAATAAGCGGTTTTACATCATCATTTTGGCTAGCTA
CAAGTGGATTTTTAGATATTACATTAATAAGCGGTTTTACATCATCATTTTGGCTAGCTA
TACACAAGACTTGACTTAGCTAGCTTGTATACGTAACGTTAGTATATGATGCAACGCACTG
TACACAAGACTTGACTTAGCTAGCTTGTATACGTAACGTTAGTATATGATGCAACGCACTG
TGTGTGAATTTGTGATGAATAGGTATGCAACGCGGAGACCCACCAAGGTCAGATAAACT
TGTGTGAATTTGTGATGAATAGGTATGCAACGCGGAGACCCACCAAGGTCAGATAAACT
GGACAGTCAAGGATGAAGCTGGGAGCAAAAGTTCAGGATATGAAGGACAGAGCTCAGTA
GGACAGTCAAGGATGAAGCTGGGAGCAAAAGTTCAGGATATGAAGGACAGAGCTCAGTA
CTATGGACAACAGCAAAAGCTGGGAGCAACGACCGTGAACCGTACCGGTCGAAACCCAGCA
CTATGGACAACAGCAAAAGCTGGGAGCAACGACCGTGAACCGTACCGGTCGAAACCCAGCA
CACTACCTAAAATACGCCATGACTATTTTTCATAGTCCAAATAAGGCTGATGTCGGGAGTCC
CACTACCTAAAATACGCCATGACTATTTTTCATAGTCCAAATAAGGCTGATGTCGGGAGTCC
AGTTTATGAGCAATAAGGTTTTAGAAATTTGATCAATGTTTATAATAAAAGGGGAAAGAT
AGTTTATGAGCAATAAGGTTTTAGAAATTTGATCAATGTTTATAATAAAAGGGGAAAGAT
GATATCACAGCTGTTTTTCTTTTGGCTTTTGTAAATTTGTTGTTTCTAATTTGTAATA
GATATCACAGCTGTTTTTCTTTTGGCTTTTGTAAATTTGTTGTTTCTAATTTGTAATA
CCTCTGTAATATGTTACTTCTTCCCTTTTTAAGTGGTATCGTCTATATGGTAAAAACG
CCTCTGTAATATGTTACTTCTTCCCTTTTTAAGTGGTATCGTCTATATGGTAAAAACG
TTATGTTGGCTTTTCCCTTTTCTCTGTTTAGGATAAAAAAGCTGATGTTTTATCTTTAG
TTATGTTGGCTTTTCCCTTTTCTCTGTTTAGGATAAAAAAGCTGATGTTTTATCTTTAG
TTAATATGTTGAGTAAATGAACTTTCATAGATCTGGTTCGGTAGAGTAGACTAGCAGC
TTAATATGTTGAGTAAATGAACTTTCATAGATCTGGTTCGGTAGAGTAGACTAGCAGC
CGAGCTGAGCTGAACTGAAACAGCTGGCAATGTGAACACTGGATGCAAGATCAGATGTGAA
CGAGCTGAGCTGAACTGAAACAGCTGGCAATGTGAACACTGGATGCAAGATCAGATGTGAA
GATCTCTAATATGGTG 1276
GATCTCTAATATGGTG 2105

```

图 3 1 号染色体上预测的 *Oleoin* cds 和 *Oleoin* (O20) cds 序列对比

Fig.3 Sequence alignment of chromosome I *Oleoin* and *Oleoin* (O20) cds

将 935 bp 长度的启动子和 *Oleoin* (O20) 基因启动子的序列进行对比,结果表明两者之间有很多的突变位点(图 4)。

```

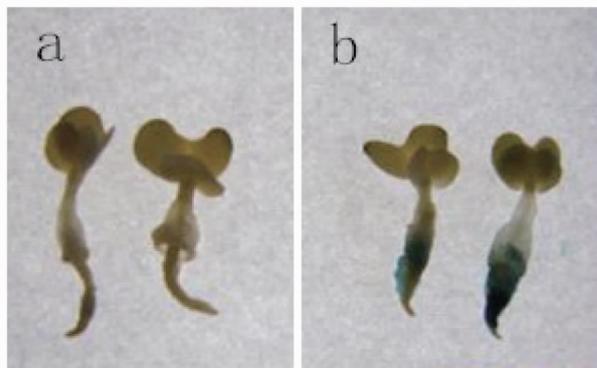
935 bp启动子 ---GATAAAGCAATCACCTGGCGATTCAACGTGGTCGGATCA TGACGCTTCCAGAAAACA
O20基因启动子 CGGGATAAAGCAATCACCTGGCGATTCAACGTGGTCGGATCA TGACGCTTCCAGAAAACA
*****
TCGAGCAAGCTCTC-----AAAGCTGACCTCTTCGGATCGTACTGAAACCGGAACA
TCGAGCAAGCTCTCGAAAGCAACCAAAGCTGACCTCTTCGGATCGTACTGAAACCGGAACA
*****
ATCTCGT TAATG TCCCGT CGTCT CCGAA CAGAC ATCCT CGTAGCTCGGATTAI TGACGAAI
ATCTCGT TAATG TCCCGT CGTCT CCGAA CAGAC ATCCT CGTAGCTCGGATTAI TGACGAAI
*****
CCATGGCTATACCCAACCTCCGTCCTTCTGTCACGCCTGGAACCTCTGTTACGCCAATTC
CCATGGCTATACCCAACCTCCGTCCTTCTGTCACGCCTGGAACCTCTGTTACGCCAATTC
*****
GCTCCCCAAGAGCAACC GCGCG CGAAT TGCGC GAAIT GCTGA CCTGGAGACG GAACATCG
GCTCCCCAAGAGCAACC GCGCG CGAAT TGCGC GAAIT GCTGA CCTGGAGACG GAACATCG
*****
TCGTCGGTCTCT TCGCG GAIT TCGCG GAAAGC CGGGT CGGGT TGGGGACGAG ACCCGAAI
TCGTCGGTCTCT TCGCG GAIT TCGCG GAAAGC CGGGT CGGGT TGGGGACGAG ACCCGAAI
*****
CCGAGCTTGGTGAAGAG GTTGT TCATCGGAGATTTTATAGACGAGAT GSAITC GAGCGGTT
CCGAGCTTGGTGAAGAG GTTGT TCATCGGAGATTTTATAGACGAGAT GSAITC GAGCGGTT
*****
TTGGGAAAGGGGAAGT GGGTT TGGCT CTTTT GGATA GAGAGAGTGCAGCTT TGGAGAGA
TTGGGAAAGGGGAAGT GGGTT TGGCT CTTTT GGATA GAGAGAGTGCAGCTT TGGAGAGA
*****
GACTGGA GAGGT TTAGA GAGAGACGCGCGGGA GATTA CCGGA GAGGA GCGCA CGAGA GAT
GACTGGA GAGGT TTAGA GAGAGACGCGCGGGA GATTA CCGGA GAGGA GCGCA CGAGA GAT
*****
AGCATTATCGAAGGGGAAGGAG AAGAGT GAC GTGGA GAAAT AAGAAACCGT TAAGA GTC
AGCATTATCGAAGGGGAAGGAG AAGAGT GAC GTGGA GAAAT AAGAAACCGT TAAGA GTC
*****
GGATATT TATCATATTA AAAAGCCCAAT GGGCTGAAACCCAAT TAACAAAGCAGATAAAI
GGATATT TATCATATTA AAAAGCCCAAT GGGCTGAAACCCAAT TAACAAAGCAGATAAAI
*****
GGGCCGT GTGTTAAGT TAACAGAGTGT TAACG TCGGTTTCAATGCAACG CCAATGGA
GGGCCGT GTGTTAAGT TAACAGAGTGT TAACG TCGGTTTCAATGCAACG CCAATGGA
*****
ACAAAACAAAGGTGTCTTCAAGTAACCCCTCGCGT TACAC TCAATGCTG CATG TG
ACAAAACAAAGGTGTCTTCAAGTAACCCCTCGCGT TACAC TCAATGCTG CATG TG
*****
AAGCCAT TAACAGTGGGCGTAGGATGATGACGAGCGCAITGACACCTGACTCTCTCCC
AAGCCAT TAACAGTGGGCGTAGGATGATGACGAGCGCAITGACACCTGACTCTCTCCC
*****
TTCTCTT CATATATCTCTAATCAATCAACTCAAT TGTCATAGCTATTTCGAAAAATAC
TTCTCTT CATATATCTCTAATCAATCAACTCAAT TGTCATAGCTATTTCGAAAAATAC
*****
ATACACATCTTTTCTCTTCGATCTCTCTCAATTCACAAAGAACAAA
ATACACATCTTTTCTCTTCGATCTCTCTCAATTCACAAAGAACAAA
*****

```

图 4 935 bp 启动子和 *Oleoin* (O20) 启动子对比

Fig.4 Sequence alignment of 935 bp and *Oleoin* (O20) promoter sequence

2.3 *GUS* 基因瞬时表达检测 为了检测 *Oleoin* 启动子表达的组织特异性,将长度为 928 bp 和长度 935 bp 的片段分别连接到 pBI101 载体,并检测 *Oleoin* 启动子能否驱动 *GUS* 基因瞬时表达(图 5)。由图 5 看出,经含有底物 X-Gluc 的



注:a.对照;b.GUS 染色结果

Note:a.Control;b.GUS staining result

图 5 935 bp *Oleoin* 启动子在油菜幼苗中的 GUS 染色结果

Fig.5 GUS staining result of 935 bp *Oleoin* promoter from *Brassica napus* seedling

缓冲液的浸泡,转 935 bp 启动子的油菜幼苗根部被染成蓝色,说明组织细胞被转入了 *GUS* 基因,并在幼苗根部特异性表达出 *GUS*。然而转 928 bp 启动子的幼苗没有被染成蓝色。

2.4 油菜启动子中的顺式作用元件 为了更好地研究

935 bp 启动子的序列,该研究通过 PLACE<sup>[12]</sup> 和 Plant-CARE<sup>[13]</sup> 网站对该启动子进行扫描预测,在启动子序列内找到了很多顺式作用元件,尤其是几个与植物激素相关的顺式作用元件值得关注(图 6)。

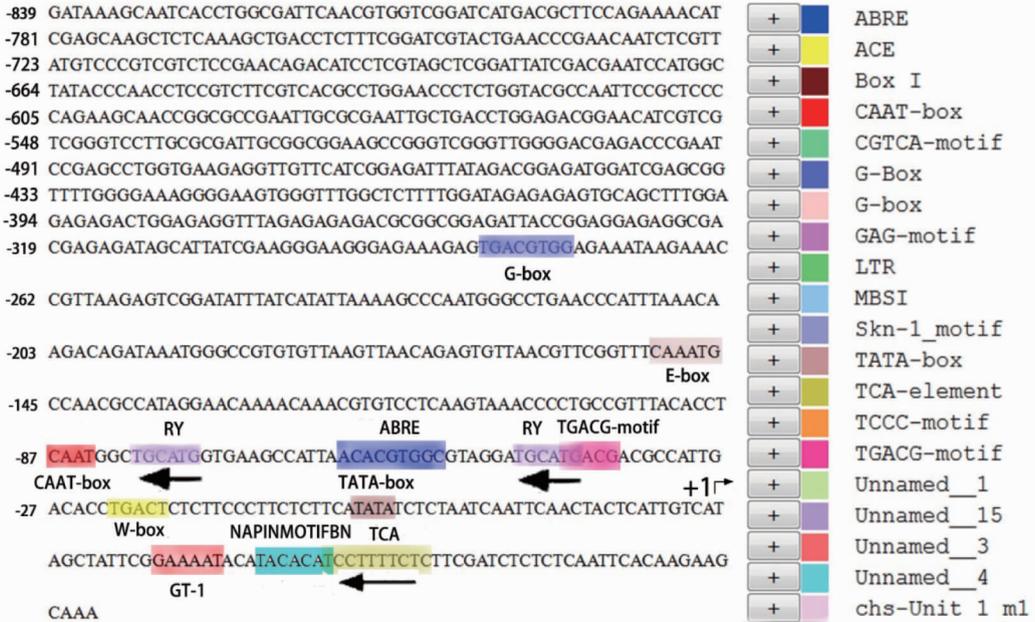


图 6 935 bp 油菜启动子中的顺式作用元件

Fig.6 The cis-acting elements within the 935 bp promoter

由图 6 可知,935 bp 启动子中的-62 到-54 区域含有 ABRE(ACACGTGGC)序列,-43 到-39 的区域含有 TGACG 基序(TGACG)序列,以及+31 到+39 的区域含有 TCA(TCCTTTCTC)序列,这些区域的基序分别是 ABA、茉莉酸甲酯(MeJA)和水杨酸(salicylic acid)的顺式作用元件。

启动子可以在油菜幼苗的根部特异性地驱动 *GUS* 基因的转录并染上蓝色,而 928 bp 长度的启动子却不能驱动 *GUS* 基因的转录,油菜幼苗没有染出颜色。将两者的序列比对后发现,2 个启动子间有比较多的突变位点(图 7)。这说明大自然对基因的选择压力要远远高于基因的启动子,不让基因随便变异。

该研究同时做了 2 个启动子的瞬时表达,935 bp 长度的



图 7 935 bp 启动子和 928 bp 启动子序列的对比

Fig.7 Sequence alignment of 935 bp and 928 bp promoter sequence

由图 7 可知,928 bp 长度的启动子明显缺少了 TAAGT-TAACA 一段序列,更加重要的是在 TCA 基序,也就是受水杨酸调控的顺式作用元件位置缺少了一个碱基,对比其他的脱落酸、茉莉酸甲酯、RY 重复、G-box、TGACG 等基序,该启动子的序列没有改变。由此可以推测 AGTTAACA 序列的缺失以及 TCA 基序碱基的缺失可能是 928 bp 长度的启动子不能驱动 *GUS* 基因转录的原因。

### 3 结论与讨论

*Oleosin* (O20) 基因的 *cds* 和 GenBank 中的序列比对结果表明有很多同源性很高的 *Oleosin* 基因,说明 *Oleosin* 是一个油脂蛋白质家族,也只有 1 号染色体上面相应的 *Oleosin* 基因的 *cds* 和 *Oleosin* (O20) 基因的 *cds* 序列完全一致。此外,该研究克隆到的 935 bp 启动子和 1 号染色体上面相应的序列也完全一致,从这个角度来看,935 bp 启动子后面启动的是和 *Oleosin* (O20) 基因一样序列的蛋白质,但油菜 1 号染色体上面的基因组要大于 GenBank 上预测的 *Oleosin* (O20) 基因组序列。

在种子胚发育期间,内源脱落酸 (ABA) 作为正的调节因子起着重要的作用,它在种子发育过程中发挥的作用广泛,包括调控后期胚性基因表达,诱导脱水耐性和种子休眠<sup>[14-15]</sup>;玉米种子的发芽及根的生长受茉莉酸甲酯含量的影响<sup>[16]</sup>,同时茉莉酸甲酯也会抑制苍耳种子的发芽<sup>[17]</sup>;水杨酸的变化经常是随着植物遇到生物或者非生物的胁迫时才表现出来<sup>[18]</sup>,更有报道说明水杨酸能提高油菜的免疫能力<sup>[19]</sup>。该研究克隆到的 935 bp 启动子中的 ABRE (ACACGTGGC) 序列、TGACG 基序 (TGACG) 序列以及 TCA (TCCTTTCTC) 序列,分别是脱落酸 (ABA)、茉莉酸甲酯 (MeJA) 和水杨酸 (salicylic acid) 的顺式作用元件。油菜种子中的油脂蛋白 *Oleosin* 确切功能还不清楚,有报道称 *Oleosin* 可能与种子休眠有关,Keddie<sup>[20]</sup> 证明油菜的一种胚蛋白可以与该研究克隆的启动子中的 G-box 基序特异性结合;还有报道指出拟南芥中油脂蛋白 *Oleosin* 在种子发育过程中表达量很高,它受到拟南芥 LEC2 转录因子的调控,一旦油脂蛋白 *Oleosin* 的启动子中的 2 个相邻的 RY 基序中其中 1 个基序有了突变,油脂蛋白 *Oleosin* 启动子的活性会明显降低<sup>[21]</sup>。无独有偶,启动子中的 W-box 基序也和 WRKY 类转录因子有关联<sup>[22]</sup>。E-box (CANNTG) 基序和 G-box (CACgTG) 基序比较相似,菜豆  $\beta$ -phaseolin 蛋白是一种子储藏蛋白,有组织特异性,并且和生长发育有关<sup>[23]</sup>。菜豆  $\beta$ -phaseolin 基因的启动子转录表达 *GUS* 的能力与 E-box 和 G-box 基序有关,如果 G-box 基序突变了,那么菜豆  $\beta$ -phaseolin 基因的启动子就不能转录表达出 *GUS* 基因<sup>[24]</sup>。

油菜幼苗的 *GUS* 染色结果表明该研究获得一个新的具有活力的组织特异性启动子,为将来切掉 *GUS* 基因,换上所需基因,并让这些基因在幼苗根部特异性表达打下基础,以达到简单、快速纯化目标蛋白的目的,例如将克隆的鲑鱼降钙素的突变基因 *msCT* 插在芝麻油体蛋白 *Oleosin* 基因的 C 端,构建由油菜 *Oleosin* 基因启动子驱动的 *Oleosin*-Calcitonin

融合蛋白植物表达载体<sup>[25]</sup>;设计合成重组人胰岛素原基因并将其连接于 *Oleosin* 基因下游构建融合基因<sup>[26]</sup>。同时,928 bp 长度的启动子没有染色结果,这将为进一步研究以及开发更好的生物反应器提供理论依据。

### 参考文献

- [1] 庞俊峰,黄东光,吴燕民.植物生物反应器研究进展[J].生物技术通报,2011(1):21-25.
- [2] CAO H P.Genome-wide analysis of oleosin gene family in 22 tree species: An accelerator for metabolic engineering of BioFuel crops and agrigenomics industrial applications? [J].OMICS: A journal of integrative biology,2015,19(9):521-541.
- [3] 刘昱辉,贾士荣.植物油体表达体系的研究进展[J].农业生物技术学报,2003,11(5):531-537.
- [4] VAN ROOIJEN G J H,MOLONEY M M.Plant seed oil-bodies as carriers for foreign proteins[J].Bio/Technology,1995,13(1):72-77.
- [5] LIU J H,SELINGER L B,CHENG K J,et al.Plant seed oil-bodies as an immobilization matrix for a recombinant xylanase from the rumen fungus *Neocallimastix patriciarum* [J].Mol Breed,1997,3:463-470.
- [6] PARMENTER D L,BOOTHE J G,VAN ROOIJEN G J H,et al.Production of biologically active hirudin in plant seeds using oleosin partitioning[J].Plant molecular biology,1995,29:1167-1180.
- [7] GIDDINGS G,ALLISON G,BROOKS D,et al.Transgenic plants as factories for biopharmaceuticals[J].Nature biotechnology,2000,18:1151-1155.
- [8] LEE K H,ISENHART T M,SCHULTZ R C,et al.Nutrient and sediment removal by switchgrass and cool-season grass filter strips in Central Iowa, USA [J].Agroforest Syst,1999,44:121-132.
- [9] 孙静,姜宇,陶俊.植物油质蛋白的结构、功能及应用[J].植物生理学学报,2018,54(3):363-369.
- [10] 蒋茂双,元香梅,刘晓东,等.谷子 *Oleosin* 基因家族及其对干旱响应的分析[J].山西农业大学学报(自然科学版),2018,38(1):16-20.
- [11] SAINSBURY F,LOMONOSSOFF G P.Transient expressions of synthetic biology in plants[J].Current opinion in plant biology,2014,19:1-7.
- [12] HIGO K,UGAWA Y,IWAMOTO M,et al.PLACE: A database of plant cis-acting regulatory DNA elements[J].Nucleic Acids Res,1998,26(1):358-359.
- [13] LESCOT M,DÉHAIS P,THIJS G,et al.PlantCARE, a database of plant cis-acting regulatory elements and a portal to tools for in silico analysis of promoter sequences[J].Nucleic Acids Res,2002,30(1):325-327.
- [14] GUTIERREZ L,VAN WUYTSWINKEL O,CASTELAIN M,et al.Combined networks regulating seed maturation[J].Trends Plant Sci,2007,12(7):294-300.
- [15] SKRIVER K,MUNDY J.Gene expression in response to abscisic acid and osmotic stress[J].Plant cell,1990,2:503-512.
- [16] NORASTEHNIA A,SAJEDI R,NOJAVAN-ASGHARI M.Inhibitory effects of methyl jasmonate on seed germination in maize (*Zea mays*): Effect on  $\alpha$ -amylase activity and ethylene production[J].Gen Appl Plant Physiology,2007,33(1/2):13-23.
- [17] NOJAVAN-ASGHARI M,ISHIZAWA K.Inhibitory effects of methyl jasmonate on the germination and ethylene production in cocklebur seeds [J].J Plant Growth Regul,1998,17(1):13-18.
- [18] MAITI S,PATRO S,PAL A,et al.Identification of a novel salicylic acid inducible endogenous plant promoter regulating expression of *CYR1*, a CC-NB-LRR type candidate disease resistance gene in *Vigna mungo* [J].Plant cell, tissue and organ culture,2015,120(2):489-505.
- [19] ALI E,MAODZEKA A,HUSSAIN N,et al.The alleviation of cadmium toxicity in oilseed rape (*Brassica napus*) by the application of salicylic acid[J].Plant Growth Regul,2015,75(3):641-655.
- [20] KEDDIE J S,TSIANTIS M,PIFFANELLI P,et al.A seed-specific *Brassica napus* oleosin promoter interacts with a G-box-specific protein and may be bi-directional[J].Plant Mol Biol,1994,24(2):327-340.
- [21] CHE N Y,YANG Y,LI Y D,et al.Efficient LEC2 activation of *Oleosin* expression requires two neighboring RY elements on its promoter[J].Sci China Ser C,2009,52(9):854-863.
- [22] SUN C X,PALMQVIST S,OLSSON H,et al.A novel WRKY transcription factor,SUSIBA2, participates in sugar signaling in barley by binding to the sugar-responsive elements of the *iso1* promoter[J].Plant cell,2003,15(9):2076-2092.

表 3 处理种子发芽率

Table 3 Germination rate of treated seed %

种子来源 Seed source	培养时间 Culture time//d				
	10	20	28	45	60
旬邑县栽培 Cultivation in Xunyi County	13.05	34.22	38.46	47.59	48.00
黄龙县野生 Wild in Huanglong County	4.56	5.68	6.31	17.19	17.44

**2.4 生态学特性** 短柄五加是我国特有的濒危植物,分布范围极其狭窄,仅分布于陕西、甘肃、宁夏交界处,其中以子午岭为分布中心,分布于桥山、劳山、黄龙山、关山、六盘山等山脉。北缘在陕西志丹、甘肃环县,东缘为陕西的韩城、合阳县,南缘至澄城北部、铜川、旬邑、麟游、凤翔北部、陇县北部、甘肃天水,西缘至甘肃天水、宁夏泾源县。现在资源分布相对较广、生物产量较大的有陕西省的黄龙县和宜君县,甘肃省的灵台县和正宁县等。影响短柄五加分布的环境因子有海拔、水分、热量、光照、坡度、坡向、土壤、群落类型等因素。

短柄五加分布区属于中纬度暖温带季风气候,气候比较温暖和干燥。平均气温 9~10℃,1月平均气温-7.5℃,7月平均气温 21.9℃;无霜期 160~180 d;年平均降水量 500~620 mm;生于阴湿,土层深厚,枯枝落叶盖度较大的环境中,土壤为黄壤土和棕色森木土,pH 7.5~8.5,呈碱性。一般分布于海拔 1 000~2 004 m 的山坡、山梁、沟谷、梯田埂坎、疏林下、林缘、路边灌丛中,以海拔 1 200~1 650 m 生长较多,生长良好,为最适生长区。在梯田埂坎、林缘、路边或乔木层盖度较小的地带生长良好,种群的生物量较大。阴坡、阳坡均有分布,但阴坡比阳坡分布多,生长也较阳坡旺盛。北向阴湿狭窄沟谷底部及两侧山坡的下部沿河或溪边,坡度多在 10°~35°的山坡上。

短柄五加群落具有典型的温带植物区系特点,其科属组成较分散,植物种类少,物种组成不丰富,为自然演替和人工改造双重作用下的不稳定群落。乔木层以刺槐、油松、辽东栎和侧柏为主,灌木层中短柄五加占绝对优势,草本层呈不连续分布,以披针叶苔草为主。

**2.5 资源量** 短柄五加结实株少,种子产量低;雄蕊先雌蕊成熟,花粉量少,胚囊败育等使种子质量差;果实成熟时种胚发育不全,后熟时间长;种子萌发需湿润环境等,造成出苗率极低的特点,大大限制了其有性生殖的成功率和种群的扩散,使短柄五加团块分布的格局十分明显。

近几十年的建设与开发,特别是公路建设和封山育林、次生林改造、新树种的引入等,使生态环境有很大变化,短柄五加产地面积和数量进一步减少。不合理的采伐对其资源造成破坏,陇县关山林场以前收购过短柄五加茎,原产地割

茎后由于留茬较高,冬季降雪后湿度较大,根全部死亡,至今未发苗,还可见到残茎。此外还发现有的药厂在采集短柄五加时,根、茎一起采挖,对资源也造成较大的破坏。甘肃省平凉市、天水市和宁夏泾源县的短柄五加产区,当地人有将五加嫩茎叶作为保健野菜食用的习惯,每年 5 月间大量采集五加嫩茎叶,在采集的同时也摘除潜在的花序,对植株的生长具有很大的破坏作用,影响其有性繁殖和营养生长。因此早春嫩茎叶的采集对短柄五加的有性繁殖能力和种群数量增加有显著的影响。

1984 年邢泽田<sup>[2]</sup>调查时常见到成片的倒卵叶五加分布,经样方测定仅陕西就有约 168 万 t(鲜重),但此次笔者调查已很难看到成片分布,仅见到团块状分布的短柄五加,且生物量较少。

### 3 结论

短柄五加分布面积与资源量减少严重,已成为一种濒危植物,应坚持合理开发利用,同时加强现有资源的保护与抚育。为确保资源的供应和可持续利用,应积极开展短柄五加的根段繁育、嫩枝扦插育苗和种子育苗技术研究,开展野生抚育与规范化栽培。

短柄五加结实株少,种子产量低;雄蕊先雌蕊成熟,花粉量少,胚囊败育等使种子质量差;果实成熟时种胚发育不全,后熟时间长;种子萌发需湿润环境等,从生殖生物学角度看,关键是如何提高种子质量和缩短种子后熟时间,进而提高其出苗率;积极进行短柄五加栽培,培育优良种子,种子经变温砂藏处理等措施提高发芽率。

### 参考文献

- [1] 国家中医药管理局中华本草编委会.中华本草:第 5 册 第 15 卷[M].上海:上海科学技术出版社,1999:754.
- [2] 邢泽田.陕西省倒卵叶五加[J].自然资源研究,1984(4):29-34.
- [3] 岳春雷,江洪,魏伟,等.短柄五加濒危趋势和致濒因素的初步分析[J].应用与环境生物学报,2003,9(1):24-27.
- [4] 田国伟,王仲礼,刘林德,等.短柄五加种子结构、后熟作用及其细胞化学研究[J].植物分类学报,1998,36(2):128-133.
- [5] 张晋宁,章英才.短柄五加生态环境及濒危原因的研究[C]//周光召.西部大开发 科教先行与可持续发展——中国科协 2000 年学术年会文集.北京:中国科学技术出版社,2000.
- [6] 叶强,张阳,张玉姣,等.国内五加属植物资源人工栽培的研究现状及展望[J].黑龙江农业科学,2018(11):163-166.
- [7] 卫平,宋庆生.陕西西产四种五加化学成分的含量测定[J].西北药学杂志,1987,2(3):13-15.
- [8] 张艺芳,朱爱华.倒卵叶五加茎的一般药理研究[J].陕西中医,2013,34(7):922-923.
- [9] 简毓峰,胡浩斌.短柄五加的化学成分与药理活性研究进展[J].中药材,2011,34(8):1302-1306.
- [10] 陈新露,王开运.陕西省五加科药用植物的种类和分布[J].中药材,1988,11(5):21-23.
- [11] 崔治家,任路明,晋玲,等.甘肃产五加科植物种类、检索表及地理分布[J].中兽医医药杂志,2018,37(5):5-9.
- [12] 张晋宁,章英才,任昱坤.宁夏六盘山自然保护区短柄五加分布及生态环境初探[J].宁夏农学院学报,2000,21(1):81-83.

(上接第 119 页)

- [23] BUROW M D, SEN P, CHLAN C A, et al. Developmental control of the  $\beta$ -phaseolin gene requires positive, negative and temporal seed-specific transcriptional regulatory elements and a negative element for stem and root expression[J]. Plant J, 1992, 2(4): 537-548.
- [24] KAWAGOE Y, MURAI N. A novel basic region/helix-loop-helix protein

binds to a G-box motif CACGTG of the bean seed storage protein  $\beta$ -phaseolin gene[J]. Plant Sci, 1996, 116(1): 47-57.

- [25] 刘显辉.植物油体表达体系的建立及 Profilin2 维管束特异表达启动子的区段缺失分析[D].北京:中国农业科学院,2001.
- [26] 张冉.利用油菜油体系统表达重组人胰岛素的表达研究[D].上海:上海师范大学,2010.