

中国分类号: Q943.2

文献标识码: B

文章编号: 1004-311X(2000)04-0034-03

## 转基因植物启动子的化学诱导

王瑜, 吴丽芳, 吴东君, 余增亮

(中国科学院等离子体物理研究所离子束生物工程实验室, 安徽 合肥 230031)

研究活体内基因功能最有效的方法是当某一特定基因产物的水平发生改变时, 通过分离突变体或构建转基因植株分析其表型。但反义 RNA 或一些显性负性蛋白的表达能够引起有功能的基因表达产物的减少。若在实验过程中获得某种功能, 则基因表达产物量的提高就提供了较有价值的信息, 且通过改变了分子特征的基因表达产物可以研究细胞的调控机制。

若使基因的活动处于可逆及暂时能精确调控的方式就使得上述研究基因功能的方法更为有效。在转基因的表达参与植株再生过程的情况下, 就必须应用可调控系统。可调控的启动子不仅能研究不同发育阶段基因产物的功能, 还能使得诱导动力学与表型相适应, 从而分辨出转基因表达的初级及次级效应。

较为理想的状况是在未诱导情况下, 可被化学物质诱导的启动子仅有较低的本底活动水平, 而在诱导状态时则有较高水平的活力, 且后一条件为必须。在任何情况下, 诱导剂应只影响转基因的表达, 所以内源启动子不能符合这一要求, 而倾向于使用来源于进化关系较远的生物, 如酵母、大肠杆菌、果蝇或哺乳动物等的调节元件。这些因子的特征较为明显, 并对植物通常不能遇到的信号起答反应。基于以上基础存在两种不同的基因调控模式: 阻遏型启动子系统、激活型启动子系统。

## 1 阻遏型启动子系统

阻遏原则建立在阻遏蛋白与转录相关蛋白在空间构型相互作用基础上, 这种机制在细菌中较为普遍。但在高等真核生物中则相对较少, 而存在较多的是通过蛋白质与蛋白质相互作用对转录机制进行激活或抑制的调节。依据原核生物的模式, 两种细菌的阻遏子/操纵子系统 (Lac 及 Tet) 被应用于调控 RNA 聚合酶 II 启动子的活性。1988 年 Gatz 等报道了在瞬间检测中第一次成功地应用细菌阻遏蛋白来调控修饰过的花椰菜花叶病毒 (CaMV) 35S 启动子<sup>[1]</sup>, 其中大肠杆菌 Tn10 编码的 Tet-阻遏蛋白因少量四环素的存在而

失去了结合 DNA 的活性<sup>[2]</sup>。由于四环素很容易进入真核生物细胞而不需要特异的吸收系统, 所以在实验室的研究实验中较为合适。

系统分析阻遏子操纵子复合物在 CaMV35S 启动子不同位置的效应<sup>[3,4]</sup>, Gatz 等设计成可被严格抑制的 CaMV35S 启动子, 其中包含 3 个 Tet 操纵子, 一个在 TATAbox 的上游并与其相邻, 另二个在 TATAbox 的下游<sup>[5]</sup>。由于阻遏子要与可形成转录起始复合物的多种蛋白质进行竞争, 因而阻遏的效应依赖于细胞内较高的阻遏蛋白浓度<sup>[6]</sup>。在转基因烟草中用四环素诱导启动子的表达可提高几百倍<sup>[5]</sup>, 而且将四环素加入营养液中从而在植物生长过程中于整株植物水平上进行诱导是最为有效的<sup>[7]</sup>。但在拟南芥中无法成功地建立该系统, 可能的原因是其所需要较高的阻遏蛋白浓度无法为植物体所承受。这一现象也存在于哺乳运动细胞<sup>[8]</sup>。过量表达细菌 Tet 阻遏蛋白的转基因番茄在较合适的生长状况下比对照组生长得缓慢, 加入四环素可逆转这种效应, 表明阻遏蛋白仅在为 DNA 结合构象时才是有害的。

早期研究曾致力于应用 Lac 阻遏子/操纵子系统以异丙基- $\beta$ -D-硫代半乳糖苷 (IPTG) 诱导基因表达, 并取得了理想的效果<sup>[9]</sup>。Lac 系统中 Lac 阻遏蛋白 (LacR) 与 LacO 结合后, 转录起始复合物不能形成, 无法开启转录。用 IPTG 进行诱导, 使 LacO 转录活性升高。Lac 操纵子被插到叶绿素 a/b 结合蛋白 (CAB) 启动子的 TATA 盒的附近, 并已稳定地整合到烟草植株的基因组中, 但诱导仅是在原生质体中而非整个植株水平。

## 2 激活型启动子系统

用来源于其它高等真核生物的转录激活因子也可以构建化学物质可诱导系统。比如哺乳动物的糖皮质激素受体, 仅在类固醇存在下激活真核生物细胞转录。在瞬间转化的烟草细胞中, 存在于 TATAbox 上游, 含有 GR 结合位点的靶启动子的转录严格地依赖于地塞米松的存在<sup>[10]</sup>。在已稳定转化的拟南芥菜中加入这种调节元件却不起作用<sup>[11]</sup>。但是若受体的配体结合区与水稻的转录因子 R 相融合则得到可受类固醇诱导的受体 (R-CR), 其调节的原理在于类固醇的结合区与

热休克蛋白 Hsp70 相互作用而使 R-GR 融合蛋白得以在胞质中存在。Lloyd 等<sup>[11]</sup>将 R-GR 融合蛋白转化至拟南芥突变体 (tg) 中,并与水稻转录因子 R 起互补作用。这样,将类固醇结合区与在植物启动子中不存在结合位点的转录激活因子相融合,则构成受类固醇诱导的表达系统。

另外,来源于酵母的 ACE1 也是依赖于配体的转录激活因子, Mett<sup>[12]</sup>等证明在转基因植物中 ACE1 依靠铜来调控适当的靶启动子的转录活性,但铜会参与植物其它的生理过程,所以其特异性不强。

第三种策略是将具有转录活性的转录激活区与细菌的抑制蛋白如 LacR 及 TetR 相融合。大肠杆菌转座子 Tn10 中 Tet 阻遏因子 (TetR) 能与 Tet 操纵子序列 (teto) 结合而阻断操纵子转录,四环素抗性基因不能表达。四环素存在时,则与 TetR 结合,使后者不能与 Teto 结合,转录启动。基于上述原理, Gossen 等将单纯疱疹病毒蛋白 VP16 的反式激活区与 TetR 相融合,得到四环素调控的转录激活因子 (tetracycline transcriptional activator, tTA)。若将含有 7 个 teto 序列的靶启动子置于最小启动子 (人巨细胞病毒启动子的一53 到 +75 区间) 的下游,其下游接被研究基因就能够由 tTA 调控基因表达。在四环素存在时,四环素与 TetR 作用,使 tTA 蛋白构型发生变化,不与 Teto 结合,从而关闭下游基因的转录。这一启动子系统在已稳定转化的 HeLa 细胞和转基因植物中均已发挥作用<sup>[13]</sup>。由于使用依赖 tTA 的启动子后,仍能够分析个别基因 mRNA 及其所编码蛋白的衰减速率,从而具备了放线菌素-D,放线菌酮等转录抑制物所不具备的优点,tTA 系统已被成功地转入拟南芥及苔类 *physcomyrella patens*,且未表现出基因沉默<sup>[14]</sup>。但基于 tTA 的系统仅能达到诱导系统所达到水平的 30%,并随转基因植物逐渐长成,诱导水平渐趋下降。

Gossen & Bujard<sup>[14]</sup>和 Weinman 等<sup>[13]</sup>认为,高等真核生物转录的严格调控应通过激活启动子获得,而不是抑制启动子。其原因多半是转录激活子容易进入靶位点,而阻遏蛋白要与内源的转录因子竞争结合位点。尽管如此,基于抑制原则应用 Tet 阻遏蛋白在锥虫中进行基因表达的调控与对照可相差 3 个数量级<sup>[15]</sup>。tTA 系统在四环素存在下仅有低水平的表达为 tTA 系统较为诱人的优点。但运用此系统进行实验研究,需将转基因植株长时间在四环素条件下培养以使转基因沉默,而在有光条件下,四环素不稳定,因而这一过程较为耗时。并且为诱导转基因的表达需将植株转入无四环素的培养基,但使四

素失去效力,较四环素的吸收要慢,因而又限制了诱导动力学的应用。

### 3 内源的化学物质可诱导启动子

一些植物本身存在可被化学物质诱导的启动子。激素、硝酸盐、碳水化合物和植物防御反应的激发子 (elicitor) 均可用来诱导基因表达,但由于它们在植物体内引起的多重效应使其相对应的启动子不适合用于研究活体内基因的功能。而且能够改变植物生长和发育的物质也不能作为以应用为目的诱导剂。

水杨酸 (Salicylic Acid, SA) 及其衍生物能够应用于田间来诱导转基因,相应同时诱导出的植物防御反应基因的表达也对植物保护有很大益处。水杨酸作为植物抗病反应的重要信号分子,涉及并参与植物系统获得抗性反应<sup>[16]</sup>。可以用含有报告基因与病理发生相关蛋白基因启动子相融合的嵌合基因来分析 SA 对基因表达的诱导,其中病理发生相关蛋白包括 PR-1a、PR-2、PR-3、PR-5 及富含甘氨酸的蛋白。其中研究较为清楚的启动子是来源于烟草的 PR-1a 启动子,对 PR-1a 启动子 5' - 末端缺失分析表明:在转录起始位点上游 643 - 689bp 之间存在一种重要的 SA 应答元件。将 -625bp 到 -902bp 区融合到 35S 核心启动子可以提高 SA 的诱导性<sup>[17]</sup>。研究结果相同点是:启动子中 -300bp 和 -700bp 之间存在一个或更多的元件为 SA 高水平诱导所必须。PR-1a 启动子已被用于诱导转基因植物苏云金芽孢杆菌  $\delta$ -内毒素的表达<sup>[18]</sup>。PR-1a 启动子最为适宜的诱导剂是最新报道的化合物 BTH (Benzothiadiazole)<sup>[19]</sup>。SA 和 INA (2,6- 氟异烟酰胺) 也是潜在的诱导剂,但它们起效应的浓度对农作物有一定的伤害<sup>[20]</sup>。相比较而言,BTH 却并不显示出植物毒性。BTH 施于叶子 12h 后,PR-1a 启动子即开始反应,3d 后达到最高活性,处于诱导水平的 mRNA 可持续至少 20d,较 SA 或 INA 有更持续的反应<sup>[21]</sup>,并且 GUS 活性被诱导至 100 倍,而相同条件下用 SA 诱导仅有 10 倍。因为 SA 仅引起其处理的叶片组织部位的基因表达,所以它用作局部诱导,而 BTH 则可通过植物系统进行循环而于整株水平诱导。

安全剂经常被释放至环境中来减少除草剂对植物的危害,它们主要是通过提高谷胱甘肽-S-转移酶 (glutathione-s-transferases, GSTS) 的活性来加快除草剂的代谢。不同 GST 基因的启动子具有不同的本底表达水平,并对应于不同的刺激物质进行应答<sup>[22,23]</sup>。只有施用了除草剂之后才能检测

到水稻的对应于 GST-27 的转录物<sup>[23]</sup>, 而来源于激素、环境及生理上的刺激物质都不能提高 GST-27 的水平, 说明该类启动子是有相对特异性的。而同样编码 GST 的大豆的 GH2/4 基因却能被相对大范围的化学试剂所激活而转录, 其中包括重金属、植物生长素、水杨酸等及温度上升等外界条件<sup>[22]</sup>, 所以其活性可以在大田状况下因偶然因素而有所提高。

调控基因表达的系统的适应性最终由其应用来衡量。迄今还未发现研究活体内基因功能的最理想系统。当前最为先进的系统是依赖于四环素的表达系统, 并已进行科研及应用。但四环素的诱导系统因其表达泄露的不足在有致死基因参与时就不能用于实验研究, 而且该系统不能运行于拟南芥菜中。基于 t-TA 基础上的四环素抑制系统, 由于其诱导动力学的困难也使其应用受到限制, 但是进一步发展用 Tet 调节的系统仍有一定的前景, 并会越来越成熟。

参考文献:

[1] Gatz C, Quail PH. Tn10 - encoded Tet repressor can regulate an operator - containing plant promoter[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1988, 85: 1394 - 1397.  
[2] Hillen W, Berens C. Mechanisms underlying expression of Tn10 encoded tetracycline resistance [J]. Annu Rev Microbiol, 1994, 48: 345 - 369.  
[3] Frogberg C, Heins L, Gatz C. Characterization of the interaction of plant transcription factor using a bacterial repressor protein [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 10470 - 10474.  
[4] Heins L, Frogberg C, Gatz C. the Tn10 encoded Tet repressor blocks early but not late steps of assembly of the RNA polymeraseII initiation complex in vivo [J]. Mol Gen Genet., 1992, 232: 328 - 331.  
[5] Gatz C, Frogberg C, Wendenburg R. stringent repression and homogeneous derepression by tetracycline of a modified CaMV 35S promoter in intact transgenic tobacco plants [J]. Plant J., 1992, 2: 397 - 404.  
[6] Gatz C, Kaiser A, Wendenburg R. Regulation of a modified CaMV35 promoter by the Tn10 - encoded - Tet repressor in transgenic tobacco [J]. Mol Gen Genet, 1991, 227: 229 - 237.  
[7] Gatz C. Novel inducible/repressible gene expression systems [J]. Methods Cell Biol, 1995, 50: 411 - 424.

[8] Gossen M, Bonim AL, Bujard H. Control of gene activity in higher eukaryotic cell by prokaryotic regulatory elements [J]. Trends Biochem Sci, 1993, 18: 471 - 475.  
[9] Wide RJ, shufflebottom E, cooke S, et al. control of gene expression in tobacco cells using a bacterial operator - repressor system [J]. EMBO J, 1992, 11: 1251 - 1259.  
[10] Schena M, Lloyd AM, Davis RW. A steroid - inducible gene expression system for plant cells [J]. Acad Sci USA, 1991, 88: 10421 - 10425.  
[11] Lloyd AM, Schena M, Walbot V. Epidermal cell fate determination in Arabidopsis: patterns defined by a steroid - inducible regulator [J]. Science, 1994, 266: 436 - 439.  
[12] Mett VL, Lochhead LP, Reynolds PHS. Copper controllable gene expression system for whole plants [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1993, 90: 4567 - 4571.  
[13] Weirmann P, Gossen M, Hillen W, et al. A chimeric transactivator allow tetracycline - responsive gene expression in whole plants [J]. Plant J, 1994, 5: 539 - 569.  
[14] Gossen M, Bujard H. Tight control of gene expression in mammalian cells by tetracycline - responsive promoters [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1992, 89: 5547 - 5551.  
[15] Wirtz E, Clayton C. Inducible gene expression in trypanosomes, mediated by a prokaryotic repressor [J]. Science, 1995, 268: 1766 - 1769.  
[16] Klessing DF, Malamy J. The salicylic acid signal in plants [J]. Plant Mol Biol, 1994, 26: 1439 - 1458.  
[17] Ohshima M, Itch H, Matsuka M, et al. Analysis of stress - induced or salicylic acid - induced expression of the pathogenesis - related Ia protein gene in transgenic tobacco [J]. Plant Cell, 1990, 2: 95 - 106.  
[18] Williams S, friedrich L, Diner S, et al. Chemical regulation of Bacillus thuringiensis  $\delta$  - endotoxin expression in transgenic plants [J]. Biotechnology, 1992, 10: 540 - 543.  
[19] Gorlach J, Volrath S, Krauf - beiter G, et al. Benzothiadiazole, a novel class of inducers of systemic acquired resistance, activates gene expression and disease resistance in wheat [J]. Plant Cell, 1996, 8: 629 - 643.  
[20] Kessmann H, Staub T, Hofmann C, et al. Induction of systemic acquired disease resistance in plants by chemicals [J]. Annu Rev. Phyto Pathol, 1995, 32: 439 - 459.  
[21] Friedrich L, Lawton KA, Rues W, Masner W, Specker N, et al. A benzothiadiazole derivative induces systemic acquired resistance in tobacco [J]. Plant J, 1996, 110: 61 - 70.  
[22] Ulmasov T, Ohmiya A, Hagen G, et al. The soybean GH2/4 gene that encodes a glutathione s - transferase has a promoter that is activated by a wide range of chemical agents [J]. Plant J, 1996, 110: 61 - 70.  
[23] Jepson I, Lay VJ, Holt DC, et al. Cloning and characterization of maize herbicide softener - induced cDNAs encoding subunits of glutathione s - transferase isoformal, Iland IV [J]. Plant Mol Biol, 1994, 26: 1855 - 1866.

中图分类号: Q943.2      文献标识码: B      文章编号: 1004 - 311X(2000)04 - 0036 - 04

36-3P

玉米转座子、GBSSI 基因及表达研究进展

S513.01  
Q943.2

姚新灵<sup>1</sup>, 白桦<sup>2</sup>

(1. 宁夏大学生物系, 宁夏 银川 750000; 2. 宁夏农业学校, 宁夏 银川 750000)

与淀粉结合的淀粉合成酶 (GBSSI) 基因又叫做腊质基因 (Wx), 是在小麦、水稻、玉米、马铃薯、木薯等植物中决定直链淀粉合成

的基因。玉米中 GBSSI 基因因其突变形成为位基因是由转座子诱变形成的, 对转座子及 GBSSI 基因特征化的研究, 将对玉米近二十年来停止不前的单产提高问题及淀粉品质改良起着至关重要的作用。

收稿日期: 1999 - 12 - 13

玉米 转座子 GBSSI 基因 表达