

高等植物启动子及其应用研究进展^{*}

路 静^{1,2} 赵华燕¹ 何奕昆² 宋艳茹^{1**}

1. 中国科学院植物研究所, 光合作用和环境分子生理学重点实验室, 北京 100093; 2. 首都师范大学生物系, 北京 100037

摘要 高等植物基因的表达调控已成为分子生物学研究领域的热点和前沿, 启动子是基因表达调控的重要元件. 深入研究启动子的结构和功能, 建立可用于植物转基因表达的时、空、量三维调控系统, 可为功能基因组学研究及通过基因工程技术精确地调节植物代谢提供全新的思路. 文中从高等植物启动子的类型、结构和功能入手, 着重介绍了启动子研究及应用的最新进展.

关键词 启动子 基因表达调控 时空表达特异性

启动子是 RNA 聚合酶能够识别并与其结合, 从而起始基因转录的一段 DNA 序列, 通常位于基因上游. 一个典型的启动子包括 CAAT-box 和 TATA-box, 它们分别是依赖 DNA 的 RNA 聚合酶的识别和结合位点, 一般位于转录起始位点上游几十个碱基处. 在核心启动子上游通常会有一些特殊的 DNA 序列, 即顺式作用元件, 转录因子与之结合从而激活或抑制基因的转录. 一旦 RNA 聚合酶定位并结合在启动子上即可启动基因转录, 因此启动子是基因表达调控的重要元件, 它与 RNA 聚合酶及其他蛋白辅助因子等反式作用因子的相互作用是启动子调控基因转录的实质.

根据启动子的转录模式可将其分为 3 类: 组成型启动子、组织或器官特异性启动子和诱导型启动子.

1 组成型启动子

在组成型启动子调控下, 不同组织器官和发育阶段的基因表达没有明显差异, 因而称之为组成型启动子. 双子叶植物中最常用的组成型启动子是花椰菜花叶病毒 (CaMV) 35S 启动子, 它具有多种顺式作用元件^[1]. 其转录起始位点上游 -343 ~ -46 bp 是转录增强区, -343 ~ -208 和 -208 ~ -

90 bp 是转录激活区, -90 ~ -46 bp 是进一步增强转录活性的区域. 在了解 CaMV 35S 启动子各种顺式作用元件的基础上, 人们利用它的核心序列构建人工启动子, 以得到转录活性更高的启动子. Mitsu-hara 等^[2] 利用 CaMV 35S 核心启动子与 CaMV 35S 启动子的 5' 端不同区段和烟草花叶病毒的 5' 非转录区 (omega 序列) 相连, 发现把两个 CaMV 35S 启动子 -419 ~ -90 (E12) 序列与 omega 序列串联, 在转基因烟草中 GUS 有最大的表达活性. 把 7 个 CaMV 35S 启动子的 -290 ~ -90 (E7) 序列与 omega 序列串联, 非常适合驱动外源基因在水稻中表达. 用这两种结构驱动 GUS 基因表达, 在转基因烟草和水稻中 GUS 活性比单用 CaMV 35S 启动子高 20 ~ 70 倍.

另一种高效的组成型启动子 CsVMV 是从木薯叶脉花叶病毒 (cassava vein mosaic virus) 中分离的^[3]. 该启动子 -222 ~ -173 bp 负责驱动基因在植物绿色组织和根尖中表达, 其中 -219 / -203 是 TGACG 重复基序, 即 as1 (activating sequence 1), -183 / -180 为 GATA (又称为 as2), 这两个元件的互作对控制基因在绿色组织中表达至关重要. 该启动子 -178 ~ -63 bp 包含负责调控基因在维管组织中表达的元件. CsVMV 启动子在转基因葡萄中驱

2003-11-06 收稿, 2003-12-30 收修改稿

* 北京市自然科学基金 (批准号: 5012009)、国家自然科学基金 (批准号: 30170783) 和“八六三”高科技 (批准号: 2004AA212121) 资助项目

** 通讯作者: E-mail: songyr@ms.ibcas.ac.cn

© 1994-2008 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

动外源基因的转录能力与使用两个串联的 CaMV35S 启动子相当, 两个串联的 CsVMV 启动子转录活性更强⁴. Rance 等⁵利用 CoYMV (com-melina yellow mosaic virus), CsVMV 启动子区和 CaMV 35S 启动子的激活序列 (as1, as2) 人工构建高效融合启动子, 瞬时表达实验表明该启动子可驱动报告基因在双子叶植物烟草中高效表达, 在单子叶植物玉米中其驱动能力比通常使用的 γ -玉米蛋白启动子高 6 倍. 因此用这种人工构建的高效启动子驱动抗病基因或目的蛋白基因, 在双子叶和单子叶植物中均可达到较理想的效果.

人们高度重视从植物本身克隆组成型启动子, 并初见成效, 例如肌动蛋白 (actin)⁶ 和泛素 (ubiquitin)⁷ 等基因的启动子已被克隆. 用这些启动子代替 CaMV 35S 启动子, 可以更有效地在单子叶植物中驱动外源基因的转录. Naomi 等⁸分别从拟南芥的色氨酸合酶 β 亚基基因和植物光敏色素基因中克隆了相应启动子, 用其代替 CaMV35S 启动子, 在转基因烟草中也取得了很好的表达效果.

由于组成型启动子驱动基因在植物各组织中均有不同程度表达, 应用中逐渐暴露出一些问题. 例如外源基因在整株植物中表达, 产生大量异源蛋白质或代谢产物在植物体内积累, 打破了植物原有的代谢平衡, 有些产物对植物并非必需甚至有毒, 因而阻碍了植物的正常生长, 甚至导致死亡. 另外, 重复使用同一种启动子驱动两个或两个以上的外源基因可能引起基因沉默或共抑制现象⁹. 因此, 人们寻找更为有效的组织、器官特异性启动子代替组成型启动子, 以更好地调控植物基因表达.

2 组织或器官特异性启动子

这类启动子调控下的基因转录一般只发生在某些特定器官或组织中, 目前已发现这类启动子中一般同时存在几种控制组织特异性表达的元件, 其表达特异性由这些元件的种类、数目及相对位置等共同决定. 深入研究这些启动子不仅有助于阐明植物形态、发育、代谢途径等基础理论, 而且具有广泛的应用价值.

2.1 根特异启动子

根的发生和发育是植物发育过程中的重要问

题, 研究根中特异表达基因及其启动子无疑是重要的.

拟南芥根中特异表达的黑芥子酶 (myrosinase) 是由 *Pyk10* 基因编码的. *Pyk10* 启动子中存在若干器官特异性表达和植物激素应答的特异元件, 如 ACGT-核心序列、CANNTG-motifs、GATA-motifs、诱导物 (elicitor) 应答元件 W-box ((T)TGAC (C))、植物激素应答元件 (如 as-1 元件、生长素和脱落酸应答元件、Myb 元件) 和细胞特异表达元件等¹⁰. 其中 ACGT, CANNTG, GATA 等顺式作用元件是决定组织器官特异表达的转录因子结合位点, Myb 元件在控制植物次生代谢、调节细胞形态建成及信号传导通路中起作用.

根特异表达系统可用于研究转基因植物的高渗透胁迫耐受、植物修复和根际分泌等问题. Borisjuk 等¹¹用根特异启动子 *mas2'*, GFP 和烟草钙网蛋白 (calreticulin) 基因构建融合表达载体, 水培转基因烟草结果表明, 根细胞不仅能够高效生产 GFP, 而且可将目的蛋白质分泌到液体培养基中. 因此利用该启动子与其他有用的能编码蛋白质的基因融合, 不仅可大量生产目的蛋白质, 且更便于回收产物.

2.2 茎特异启动子

Trindade 等利用 cDNA-AFLP 技术从马铃薯中分离了一个与乙醇脱氢酶非常相似的 TDF511 (transcript derived fragment), 其基因 *Stgan* 可能参与植物体内影响赤霉素水平的复合物的合成¹². 在 NCBI 数据库中, 比较 *Stgan* 启动子与马铃薯的 patatin I 和 II、蛋白酶抑制子、nodulin 22K 和 23K 等编码蛋白质基因的启动子, 发现它们包含一些可能与蔗糖应答反应有关的共有序列; 该启动子还包含植物中几个保守的转录因子 (如 Dof1, Dof2, Dof3 和 PBF) 的结合位点. 构建 *Stgan* 启动子-GUS 融合表达载体转化烟草, GUS 组织化学染色显示该启动子驱动基因在茎结节处特异表达, 可能参与块茎形成过程.

研究在茎中特异表达基因的启动子, 不仅可从分子水平了解茎的发生、分化过程, 更重要的是利用这些启动子调节植物代谢可满足人类需求, 如人们对木质素生物合成及其调控的研究. 木质素是植物体内仅次于纤维素的一种含量丰富而重要的有机

大分子物质, 它的存在对于增加植物机械强度、远距离水分运输和抵抗外界不良环境的侵袭都是非常有益的. 然而, 木质素的存在也有一定的负面作用^[13]. 因此, 人们希望通过调节木质素的合成以降低其含量. 目前多使用 CaMV35S 启动子驱动目的基因, 近年来已分离一些木质素生物合成途径中关键酶基因的启动子, 如 *4CL*, *F5H* 等基因的启动子, 人们正在尝试利用这些特异性启动子来调节木质素的生物合成. Bell-Lelong 等^[14] 已从拟南芥中分离了肉桂酸羟-4-基化酶 (*cinnamate-4-hydroxylase*, *CAH*) 基因的启动子, 本实验室首次从毛白杨中分离了 *CAH* 启动子, 并对该启动子的功能进行了初步鉴定. GUS 组织化学染色和 GUS 荧光测定结果表明, *CAH* 启动子驱动外源基因在烟草茎的维管组织中丰富表达(待发表), 有望将来利用该启动子驱动功能基因调控木质素的生物合成过程.

2.3 叶特异启动子

Marraccini 等^[15] 从咖啡 (*coffea arabica*) 中克隆了 1, 5-二磷酸核酮糖羧化酶/加氧酶 (*rubisco*) 小亚基基因 *RBCS1*, 该基因在一年生植物咖啡的叶中特异表达. 研究发现 *RBCS1* 启动子上游 GTGGT-TAAT 序列与豌豆 *RBCS3A* 启动子的 *BoxII* 核心序列相同; 在其启动子 G-box (GCCACGTGGC) 两侧分别有一个类 I-box (核心序列为 GATAAG), 形成 I-G-I 结构, 推测 G-box 十个碱基的回文结构可能结合某个转录因子; 其 AT-1 box (AGAATTTT-TATT) 与其他 *RBCS* 和 *CAB* 基因的 AT-1 box (AATATTTTTATT) 相比只有两个碱基不同; 类 L-box (AAAATTAACCAA) 与马铃薯 *RBCS1* 和 *RBCS3A* 启动子的相同. 由此可见, 植物叶特异表达顺式元件具高度保守性.

有趣的是 Taniguchi 等^[16] 在玉米中发现了一个双元启动子系统 (dual promoter system). PPKK (*pyruvate, orthophosphate dikinase*) 是 C4 植物光合反应中的一个叶绿体酶, 该酶基因 *Pdk* 具有一个双元启动子系统 (*C4Pdk* 启动子和细胞质 *Pdk* 启动子). 这两个启动子的区别在于起始密码子和拼接方式的差异, *C4Pdk* 启动子驱动 *Pdk* 转录成较长的 mRNA, 基因产物定位在叶绿体中; 细胞质 *Pdk* 启动子在 *Pdk* 基因的第一个内含子中, 驱动 *Pdk* 转录

成较短的 mRNA, 它所编码的蛋白质定位于细胞质中, 又称为细胞质 *Pdk* 启动子. *C4Pdk* 启动子是受光诱导的强启动子, 驱动基因在玉米叶肉细胞中特异表达; 而细胞质 *Pdk* 启动子是个弱启动子, 且不具有组织特异性. 大多数 C4 植物的光合作用相关基因的表达具有细胞特异性, 且主要在转录水平调节基因表达活性, 因此, 可利用该启动子在 C4 植物叶肉细胞中高效表达外源基因.

2.4 花特异启动子

高等植物发育过程中花器官的形成是一个十分复杂的过程, 它包括一系列器官分化及严格控制的细胞及生化变化, 同时伴随大量基因的协同表达. 目前人们最为关注的是花药中特异表达的基因, 抑制或破坏这些基因的表达可导致雄性不育, 即可利用基因工程的方法创造雄性不育系.

人们克隆了许多花药特异表达的基因, 如在花药绒毡层特异表达的 *TA29*^[17], *A9*^[18]、在花粉壁特异表达的 *Bp4A*^[19] 等, 但这些基因都是在花药营养细胞中表达, 与生殖细胞的分化无关. Singh 等^[20] 从百合 (*Lilium longiflorum*) 中克隆了一个 *LGCI* 基因的启动子, 该启动子驱动基因只在雄配子细胞中表达. *LGCI* 启动子-242~-183 bp 之间可能包含某种顺式作用元件, 它的缺失会导致细胞特异性表达特性丧失, 由此可知 *LGCI* 在生殖细胞中的表达特异性可能是由于其他细胞中存在某些转录因子抑制该基因表达的结果. 这是迄今为止发现的第一个有关雄配子细胞特异性的启动子, 在研究花药发生和受精作用中将会是一个有用的工具.

2.5 果实、种子特异性启动子

利用果实或种子等器官特异性启动子调控基因表达, 不仅可提高基因在这些部位的表达量, 将生物能耗降到最低, 利于表达产物的分离, 而且可有目的地提高转基因植物果实或种子的营养或改善其品质.

番茄 *E8* 启动子^[21] 是成熟果实中乙烯应答性基因的启动子, 其-409~-263 bp 可控制 *E8* 基因在果实成熟过程中特异表达, -2181~-1088 bp 为乙烯应答激活域. Sandhu 等^[22] 利用 *E8* 启动子驱动呼吸道合胞病毒 F 抗原基因成功转化番茄植株, 用果实特异表达抗原喂饲小鼠, 可诱导小鼠产生特异的

粘膜免疫反应、血清学抗体反应及 TH1 型细胞免疫反应。基因表达调控与免疫学的有效结合,使得转基因植物口服疫苗可在不久的将来问世。2A12 是番茄中另一种果实特异性启动子,毛自朝等^[23]利用该启动子驱动 ipt 调节果实内源激素的含量,不仅可获得无籽果实,还能改善果实的品质。

种子特异性启动子中研究较多的是胚乳特异性谷蛋白基因启动子。谷蛋白占水稻种子储藏蛋白总量的 70%~80%,早在 1986 年 Takaiwa^[24] 等就克隆了第一个水稻谷蛋白基因的 cDNA。该基因转录起始位点-261~-1bp 之间有若干控制种子特异性表达的顺式作用元件,如 AAC A-box、种子凝集素-box、未成熟种子核因子结合位点等。此外,启动子更上游处还有若干增强子和调节元件,如-300 bp 处的 RY 重复序列,它是核蛋白的结合位点^[25]。Yoshihara 等^[26] 研究发现水稻谷蛋白启动子上游-104~-60bp 之间有两个顺式作用元件 AAC A 和 GCN4,GCN4 能增强启动子的活性,而启动子的组织特异性则须两者协同作用。

虽然植物食物中包含人类营养所需的绝大多数矿物质和有机养分,但日常摄入的食物往往不足以提供人体所需的营养。因此人们希望通过植物基因工程提高植物中所含的营养物质。水稻谷粒中含有铁蛋白,但多积累在糊粉层,在谷粒加工过程中会失去很多铁。Vasconcelos 等^[27] 用水稻胚乳特异性谷蛋白基因启动子驱动大豆铁蛋白基因,使转基因水稻谷粒中铁和锌的含量都有所增加,而且铁蛋白主要积累在胚乳中,不会在食品加工过程中丢失。无独有偶,Datta 等^[28] 利用水稻谷蛋白特异启动子驱动八氢番茄红素合酶基因 *PSY*,在水稻胚乳中成功合成维他命原 A。

以植物为生物反应器生产生物可降解塑料是本实验室研究目标之一。叶梁等使用大豆 7S 种子特异性启动子,构建二价和三价种子特异性表达载体转化油菜^[29]。这样将产物聚-3-羟基丁酸酯(PHB)定位与种子质体中,不仅增加了底物供应,也减少 PHB 对植物生长发育的影响。为优化已有表达框架,减小基因沉默发生几率,Zhang 等^[30] 从油菜 H165 基因组 DNA 中分离到 *napinB* 启动子的部分序列-*nap300*。序列分析表明,*napinB* 启动子包含一些在进化上保守性很高的序列,如 AT-rich se-

quence, TACACAT 保守序列,RY 重复序列,G-box 等,这些顺式作用元件可能对种子特异性表达起重要的调控作用。将 *nap300* 与 GUS 基因融合转化烟草,GUS 在胚和胚乳中均有表达;GUS 荧光检测显示 *nap300* 启动子具有驱动基因在种子发育晚期表达的能力。

3 诱导型启动子

与组织器官特异性启动子相比,诱导型启动子有着独特的优点:它可根据需要在植物特定的发育阶段、组织器官或生长环境下,快速诱导基因转录的“开”与“关”。根据来源,可将诱导型启动子分为天然存在的启动子和人工构建的启动子。

3.1 天然的诱导型启动子

长期进化过程中,植物通过启动不同基因的表达可在一定范围内适应光、温、水等环境的变化。这些基因的启动子通常包含比较保守的顺式作用元件,利用这些保守元件可以推测新基因的可能功能,也可用这些环境应答基因的启动子与抗逆基因融合,从而使转基因植物更好地适应逆境。

天然诱导型启动子包括光、温度、激素应答启动子等。光应答启动子中通常存在 GT-1-motif, I-box, G-box 和 AT-rich sequence 等顺式作用元件;温度应答启动子中多存在 HSE-motif, CCAAT-box, CCGAC-motif 等;激素应答启动子中则包含各种激素应答元件^[31]。G-box 作为蛋白结合的一个高度保守的位点,是植物中通用的受信号诱导的顺式作用元件,在植物和动物中具高度保守的核心序列 CACGT^[32]。G-box 通常与另外一个顺式作用元件如 I-box, H-box 等协同作用,在细胞接受外界信号时调节转录起始的频率。这种机制可能是通过 G-box 及其结合蛋白相互作用产生一个内部环境,其他调节蛋白与启动子区域有效结合,使细胞准确而有选择地起始转录。

有些诱导型启动子同时具有组织特异性,如 *RBCS1* 启动子,既包含叶特异表达元件,又带有几个光应答元件(LREs),受光的诱导调节^[15]。当转基因烟草由光照转入黑暗时,该启动子驱动的 GUS 活性比在光下低许多,Northern 杂交几乎检测不到 GUS 的表达。

由于植物生长环境及基因表达的复杂性, 从外界环境的刺激到启动应答基因的表达之间的信号通路往往是相互交叉的, 这样启动子中包含的顺式作用元件通常也不止一种, 如从葡萄中克隆的白藜芦醇合酶基因 *Vst1* 启动子, 当病虫害侵害、UV 照射、臭氧环境或化学物质诱导时均可启动 *Vst1* 的表达。Riou 等^[33] 发现该启动子上分别带有乙烯和臭氧的应答元件, 可适应不同的外界刺激。拟南芥 rd29A 基因^[34] 在干旱、高盐碱、低温或脱落酸诱导时表达, 其启动子-174~-55 区域包含干旱应答因子 (DRE, TACCGACAT) 和 ABA 应答因子 (ABRE, ACGTGG/TC), 且该基因在 ABA 诱导表达时, DRE 和 ABRE 是相互独立的。

当植物受病虫害侵犯时, 受伤部位会立刻启动细胞程序性死亡, 即发生所谓超敏反应 (hypersensitive response, HR)。HR 通常会启动未受伤部位产生次级防御反应, 从而对一般的病虫害产生普遍抗性, 这种现象称为系统获得性抗性 (systemic acquired resistance, SAR)。烟草中 SAR 基因是一个至少包含十二个成员的家族, SAR 也受一些诸如水杨酸 (SA), INA (dichloroisonicotinic acid) 和 BTH (benzothiadiazole) 等化学物诱导^[35]。烟草 *Sar8.2b* 基因启动子-205/-201 是 as-1 元件 (TGACG), -146/-141 和 -276/-271 为两个 GT-1 结合序列 (GGAAA T), -97/-94、-322/-318 和 -761/-758 分别是 Dof 结合基序 (AAAG), 前两者被认为可以与 SA 应答的转录因子结合而起关键作用。启动子缺失实验表明 *Sar8.2b* 启动子-927~-728 和 -351~-197 bp 分别包含有 SAR 高效诱导基因表达所需的顺式作用元件, 缺少了这两个 DNA 片段, 转基因烟草 GUS 表达活性明显降低。

3.2 人工构建的诱导型启动子

在开发植物天然存在的诱导型启动子的基础上, 人工构建可诱导表达系统以满足不同需求。目前研究最多、最深入的可诱导表达系统是化学诱导表达系统。自第一次用化学诱导表达系统 TetR, 通过 CaMV35S 启动子成功调节 *cat* 基因^[36] 的表达以来已有 20 多年的历史, 现已发展成日臻完善的植物表达外源基因的可诱导表达系统。该系统包括两个转录单元: 一是与化学诱导物结合的转录因子的

表达, 另一个转录单元包含一个应答元件, 经诱导物处理后, 通过它激活转录因子, 从而激活或抑制目的基因的表达^[37]。

一个理想的化学诱导表达系统应具备以下特点: 首先, 外源基因在植物体自身不表达或低水平表达, 当添加诱导物后, 高效诱导基因表达; 其次, 诱导物需要有较强的专一性; 第三, 诱导物可快速启动基因表达的“开”与“关”; 而且诱导物对植物无毒或低毒^[37, 38]。根据控制基因表达的方式, 可将化学诱导系统分为两大类: 阻遏型启动子系统和激活型启动子系统。

3.2.1 阻遏型启动子系统 该系统建立在阻遏蛋白与转录因子在空间构型相互作用的基础之上。当诱导物不存在时, 激活蛋白与阻遏蛋白结合, 基因正常转录; 添加诱导物后, 诱导物与激活蛋白结合或阻止其与阻遏蛋白结合, 阻遏蛋白则与启动子上的某些顺式作用元件结合, 抑制基因转录, 如以四环素抑制子为基础的四环素抑制系统 (tTA)。Love 等^[39] 用包含四环素抑制子的启动子 Top10 与报告基因 GFP 相连转化拟南芥, 发现用 100 ng/mL 的四环素即可抑制 GFP 的表达, 而且改变培养基中四环素的浓度, 可调节 GFP 的表达水平。

3.2.2 激活型启动子系统 在抑制型启动子系统中, 抑制基因转录所需诱导物的量往往超出植物适应的范围, 而且在真核生物中激活基因比抑制基因转录更容易, 近年发展了一些激活型启动子系统, 如地塞米松诱导的 GR 系统^[40]、雌二醇诱导的 ER 系统^[41]、杀虫剂诱导的 EcR 系统^[42] 等。激活型启动子系统的优点是只有当诱导物存在时才能启动基因表达, 去除诱导物后, 基因表达很快被关闭, 这样就可以人为地精确、快速控制基因的表达。

Bohner 等^[43] 研究了一种可双向调控外源基因表达的系统, 他们将改造的启动子 Top10 与报告基因 GUS 相连, 使用转录激活子 TGV 作为基因开关。转基因烟草结果表明, 用地塞米松处理 3 h 后基因表达量达到高峰; 用四环素处理 6 h 即可关闭基因表达。该诱导系统最大的优点在于可迅速调节基因的表达与否, 当外源基因可能对植物产生不良影响时这一点显得尤为重要。

为了满足应用需要, 人们开始研究便于在大田

使用的诱导表达系统, 杀虫剂诱导的 EcR 系统就是一个很好的范例. Unger 等^[42] 利用欧洲玉米螟 (*Ostrinia nubilalis*) 的蜕皮激素配基结合结构域 (EcR LBD)、玉米 C1 激活域 (AD) 和 GAL4 DNA 结合结构域 (DBD) 构建化学诱导激活子, 把它与玉米 ms45 最小启动子相连, 构建可受杀虫剂诱导的人工启动子诱导系统. 他们利用该系统在玉米雄性不育突变株 ms45 中成功地诱导了育性恢复基因 MS45 的表达.

4 问题与展望

近 20 年人们在启动子研究方面展开了大量的工作, 不仅克隆了数量丰富的启动子, 而且对其结构和功能有了一定的认识. 但从遗传信息到基因的表达是一个十分复杂的过程, 还有许多问题有待解决. 基因表达与否以及表达时间、表达部位需要启动子上的顺式作用元件与相应的转录因子的协同作用. 从植物中已知的启动子分析, 组织特异性及诱导型启动子的顺式作用元件有一定的保守性, 如 B-box 是种子特异启动子的高度保守区^[44], G-box 通常受光敏色素 A 诱导, 参与多种信号调节^[45, 46]. 而且, 启动子驱动基因表达通常需要两种或两种以上的顺式元件, 这些元件的种类、数量以及彼此之间的顺序与距离都可能影响基因的转录与否或转录程度. 如果能发现其中的规律, 将会对基因表达的调控取得突破性进展. 另外, 基因的特异性表达不仅包括在特定时期激活某些基因的表达, 还涉及到在其他组织器官或发育时期抑制某些基因的表达, 对抑制子的研究将使人们更好地理解基因表达的调控过程.

根据需要选择或人工构建合适的启动子 (组成型、组织器官特异性、诱导型或复合型启动子), 不仅便于研究新基因的功能, 阐明植物的生长、发育、分化及繁殖过程与机理, 还可以在植物特定的部位或发育阶段生产有用蛋白质或其他代谢产物, 以实现对外源基因表达的定时、定点、定量三维精确调控. 人们已经尝试利用植物这个天然的生物反应器进行目标产物的商业化生产并初见成效^[47].

参 考 文 献

1 Odell J T, et al. Identification of DNA sequences required for activi-

ty of the cauliflower mosaic virus 35S promoter. *Nature*, 1985, 313: 810

2 Mitsuhashi I, et al. Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants. *Plant Cell Physiol*, 1996, 37: 49

3 Verdager B, et al. Functional organization of the cassava vein mosaic virus (CsVMV) promoter. *Plant Mol Biol*, 1998, 37: 1055

4 Li Z J, et al. Expression of a bifunctional green fluorescent protein (GFP) fusion marker under the control of three constitutive promoters and enhanced derivatives in transgenic grape (*Vitis vinifera*). *Plant Sci*, 2001, 160: 877

5 Rance I, et al. Combination of viral promoter sequences to generate highly active promoters for heterologous therapeutic protein over-expression in plants. *Plant Sci*, 2002, 162: 833

6 McElroy D, et al. Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation. *Plant Cell*, 1990, 2: 163

7 Christensen A H, et al. Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol Biol*, 1992, 18: 675

8 Naomi Shirasawa-Seo, et al. Constitutive promoters available for transgene expression instead of CaMV35S RNA promoter: *Arabidopsis* promoters of tryptophan synthase protein subunit and phytochrome B. *Plant Biotech*, 2002, 19(1): 19

9 Kum patla S P, et al. Genome intruder scanning and modulation systems and transgene silencing. *TIBS*, 1998, 3: 97

10 Nitz I, et al. *Pyk 10*, a seedling and root specific gene and promoter from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Sci*, 2001, 161: 337

11 Borisjuk N C, et al. Production of recombinant proteins in plant root exudates. *Nature Biotech*, 1999, 17: 466

12 Trindade L M, et al. Isolation and functional characterization of a stolon specific promoter from potato (*Solanum tuberosum L.*). *Gene*, 2003, 303: 77

13 魏建华, 等. 木质素生物合成途径及调控的研究进展. *植物学报*, 2001, 43(8): 771

14 Bell Leong D A, et al. Cinnamate-4-hydroxylase expression in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 1997, 113: 729

15 Marraccini P, et al. Rubisco small subunit of *Coffea arabica*: cDNA sequence, gene cloning and promoter analysis in transgenic tobacco plants. *Plant Physiol Biochem*, 2003, 41: 17

16 Taniguchi M, et al. The promoter for the maize C4 pyruvate orthophosphate dikinase gene directs cell- and tissue-specific transcription in transgenic maize plants. *Plant Cell Physiol*, 2000, 41(1): 42

17 Koltunow A N, et al. Different temporal and spatial gene expression patterns occur during anther development. *Plant Cell*, 1990, 2: 1201

18 Paul W, et al. The isolation and characterisation of the tapetum-specific *Arabidopsis thaliana* A9 gene. *Plant Mol Biol*, 1992, 19(4):

- 611
- 19 Albani D, et al. Characterization of a pollen-specific gene family from *Brassica napus* which is activated during early microspore development. *Plant Mol Biol*, 2000, 15(4): 605
- 20 Singh M, et al. Isolation and characterization of a flowering plant male gametic cell-specific promoter. *FEBS Lett*, 2003, 542: 47
- 21 周晓红, 等. 番茄果实特异性 E8 启动子的基因克隆与序列分析. *第一军医大学学报*, 2003, 23: 25
- 22 Sandhu J S, et al. Oral immunization of mice with transgenic tomato fruit expressing respiratory syncytial virus-F protein induces a systemic immune response(J). *Transgenic Res*, 2000, 9(2): 127
- 23 毛自朝, 等. 果实专一性启动子驱动 ipt 基因在番茄中的表达及其对番茄果实发育的影响. *科学通报*, 2002, 47(6): 444
- 24 Takaiwa F S, et al. The structure of rice storage protein glutelin precursor deduced from cDNA. *FEBS Lett*, 1986, 206: 33
- 25 Wu H K, et al. Analysis of 5' region of glutelin genes from wild rice species. *Bot Bull Acad Sin*, 1996, 37: 41
- 26 Yoshihara T, et al. A 45-bp proximal region containing AACA and GCN4 motif is sufficient to confer endosperm-specific expression of the rice storage protein glutelin gene *GluA-3*. *FEBS Lett*, 1996, 383(3): 213
- 27 Vasconcelos M, et al. Enhanced iron and zinc accumulation in transgenic rice with the ferritin gene. *Plant Sci*, 2003, 164: 371
- 28 Datta K, et al. Bioengineered 'golden' indica rice cultivars with β -carotene metabolism in the endosperm with hygromycin and mannose selection systems. *Plant Biotech J*, 2003, 1(2): 81
- 29 Ye L, et al. Construction of plant seed-specific expression vectors pSCB and pSCAB and the obtainment of transgenic *Brassica napus* H165 expressing poly-3-hydroxybutyrate synthetic genes. *Chinese Science Bulletin*, 2000, 45(13): 1206
- 30 Zhang J Y, et al. Identification of seed-specific promoter nap300 and its comparison with 7S promoter. *Progress in Natural Science* 2002, 12(10): 737
- 31 胡延章. 植物基因环境效应启动子. *重庆三峡学院学报*, 2002, 81: 125
- 32 李一琨, 等. 高等植物启动子研究进展. *植物学通报*, 1998, 15(增刊): 1
- 33 Riou C, et al. Expression of an *Arabidopsis* lectin kinase receptor gene, *lecRK-al*, is induced during senescence, wounding and in response to oligogalacturonic acids. *Plant Physiol Biochem*, 2002, 40: 431
- 34 Narusaka Y, et al. Interaction between two cis-acting elements, ABRE and DRE, in ABA-dependent expression of *Arabidopsis* rd29A gene in response to dehydration and high-salinity stresses. *Plant J*, 2003, 34(2): 137
- 35 Song F M, et al. Cloning and identification of the promoter of the tobacco Sar8. 2b gene, a gene involved in systemic acquired resistance. *Gene*, 2002, 290: 115
- 36 Gatz C, et al. *Tnl0*-encoded Tet repressor can regulate an operator-containing plant promoter. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85: 1394
- 37 Padidam M. Chemically regulated gene expression in plants. *Curr Opin in Plant Biol*, 2003, 6: 169
- 38 Zuo J, et al. Chemical-inducible systems for regulated expression of plant genes. *Curr Opin Biotech*, 2000, 11: 146
- 39 Love J, et al. Stringent control of transgene expression in *Arabidopsis thaliana* using Top10 promoter system. *Plant J*, 2000, 21: 579
- 40 Aoyama T, et al. A glucocorticoid-mediated transcriptional induction system in transgenic plants. *Plant J*, 1999, 11: 605
- 41 Zuo J, et al. An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants. *Plant J*, 2000, 24: 265
- 42 Unger E, et al. A chimeric ecdysone receptor facilitates methoxyfenozide-dependent restoration of male fertility in ms45 maize. *Transgenic Res*, 2002, 11: 455
- 43 Bohner S, et al. Transcriptional activator TGV mediates dexamethasone-inducible and tetracycline-inactivatable gene expression. *Plant J*, 1999, 19: 87
- 44 Ezcurra I, et al. Interaction between composite elements in the napA promoter: Both the B-box ABA-responsive complex and the RY/G complex are necessary for seed-specific expression. *Plant Mol Biol*, 1999, 40(4): 699
- 45 Áda M H, et al. Functional Properties and Regulatory Complexity of a Minimal *RBCS* Light-Responsive Unit Activated by Phytochrome, Cryptochrome and Plastid Signals1. *Plant Physiol*, 2002, 128: 1223
- 46 Hudson M E, et al. Identification of promoter motifs involved in the network of phytochrome A-regulated gene expression by combined analysis of genomic sequence and microarray data. *Plant Physiol*, 2003, 133: 1605
- 47 Yoshida K, et al. Transgene expression systems in plant, a natural bioreactor. *J Biosci Bioeng*, 2000 90(4): 353