研究简讯

NAC1 启动子驱动 *GFP* 表达的组织特征及对生长素和赤霉素的反应*

王友华[1] 段留生[1**] 卢孟柱[2] 李召虎[1] 王敏杰[2] 翟志席[1]

1. 中国农业大学植物生理与生物化学国家重点实验室，农业与生物技术学院，北京 100094；
2. 中国林业科学院国家林业局林木培育重点实验室，北京 100091

摘要 将拟南芥中转录因子基因 *NAC1* 上游调控区 1 kb 克隆到 pRD420 质粒，构建由 *NAC1* 启动子驱动绿色荧光蛋白基因(*GFP*)表达的植物表达载体，并以此载体转化烟草，对阳性转基因植株研究表明，GFP 在根部有较高水平的表达. 进一步用生长素、生长素拮抗剂 NPA 和赤霉素处理，荧光强度的变化表明：该调控区受生长素作用的同时也受赤霉素诱导. 初步说明 *NAC1* 基因不仅是一个生长素反应基因，同时可能也是一个赤霉素反应基因.

关键词 生长素 赤霉素 *NAC1* *GFP*

侧根原基发生和侧根形成已成为植物发育生物学研究中热点之一，但目前其机理尚不完全清楚[1,2]. *NAC1* 被证明是拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中介导生长素信号促进侧根发生的重要转录因子基因，其表达强度与生长素浓度、侧根原基发生强度呈高度正相关[3,4]. 序列分析[5]其上游生长素响应元件时发现，该基因编码区上游 1 kb 范围内同时还含有 3 个赤霉素响应元件，推测该基因具有显著的赤霉素诱导特征，但这方面尚未见相关报道. 研究 *NAC1* 对赤霉素的反应对深入揭示植物侧根原基发育机制以及赤霉素的作用有重要意义.

生长素、细胞分裂素等激素作用机理的研究表明，激素在植物地上和地下组织或器官发育过程中的作用多呈对应关系，赤霉素在叶原基、花原基等次生组织形成过程中发挥着重要作用[6,7]，推测赤霉素在参与次生根(侧根)原基的发生过程中. 形态和生理学研究仅能显示赤霉素在促进根发育过程中的作用主要集中在促进根的伸长生长，而很难找出相关证据说明其影响侧根原基的发生[6,8]. 那么在分子水平上能否找到赤霉素参与侧根发生的证据？本实验拟通过对烟草中 *NAC1* 上游调控区驱动下的 GFP 基因表达特征的研究，验证该区域作用的组织特异性和受生长素、赤霉素诱导的特征，探讨赤霉素在侧根原基发育过程中的作用.

1 材料和方法

1.1 材料

供试烟草(*Nicotiana Tabaccum*)SR1 由中国科学院遗传与发育生物学研究所提供，拟南芥 c-type 由植物生理与生物化学国家重点实验室提供. 克隆载体 pGEM-T 及双元载体质粒 PBI121 由国家林业局林木培育重点实验室提供.

2005-07-26 收稿，2005-09-21 收修改稿

* 国家自然科学基金(批准号：30200169)和高校博士点基金(批准号：20010019008)资助项目

** 通讯作者，E-mail：duanlsh@cau.edu.cn

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

1.2 *NAC1* 上游调控区克隆及 *Bam*HI/*Hind*III 酶切位点引入

提取拟南芥基因组 DNA，根据已发表的 *NAC1* 基因序列找到 *NAC1* 上游调控区，设计一对引物(5'-acgacactggctttgttt-3'，5'-ccaggatttgatcctttt-3')．PCR 反应条件：94℃变性 1 min，52℃退火30 s，72℃延伸 40 s，30 个循环，由此扩增出 *NAC1* 转录起始位点上游 1050 bp 片段，该片段经 T-A 克隆到 pGEM-T 载体上测序确认后，设计分别含 *Hind*III，*Xba*I 酶切位点的上下游引物：m*NAC1*-F：5'-aggaagcttacgacactggctttgttt-3'，m*NAC1*-R：5'-tgctctagaccaggatttgatcctttt-3'，以所得质粒为模板进行 PCR 扩增．反应条件为：94℃变性 1 min 后，94℃变性 30 s，52℃退火 30 s，72℃延伸 40 s，共 8 个循环，然后 94℃变性 30 s，68℃退火 30 s，68℃延伸 40 s，共 25 个循环后，再 72℃退火 7 min．所得 PCR 片段经 T/A 克隆后测序鉴定，所得质粒命名为：pGEM-mNAC1pro.

1.3 植物表达载体的构建

质粒 pGEM-mNAC1pro，pRD420 分别同时进行 *Hind*Ⅲ/*Xba*Ⅰ双酶切，T4 连接酶连接．连接产物转化感受态大肠杆菌 DH5α．所得克隆经 PCR 检验后，测序鉴定片段插入方向的正确性及序列的正确性．所得表达载体命名为 pRD-mNAC1pro.

1.4 农杆菌介导转化烟草

质粒 pRD-mNAC1pro 转化农杆菌 GV3101 后，采用叶盘法进行农杆菌侵染转化，侵染后的叶盘在不含抗生素的分化培养基(MS 附加 0.5 mg/L 6-BA，0.1 mg/L NAA，0.25% 琼脂)上黑暗条件下共培养 4 d 后，转移到含 50 mg/L 卡那霉素和 50 mg/L 羧苄青霉素的分化培养基上光照培养，筛选具卡那霉素抗性的再生芽，20 d 继代一次．待分化芽长至约 2 cm 时将其转入生根培养基(1/2 MS 附加加0.5 mg/L IBA，0.5 mg/L NAA，100 mg/L 卡那霉素，50 mg/L 羧苄青霉素，0.25%琼脂)上.

1.5 转基因植株的 PCR 检测

NAC 是一个大的基因家族并在不同植物中有较高保守性[3]．为避免假阳性出现，采用针对 *GFP* 基因的引物对转化子进行 PCR 鉴定．以分化的烟草再生苗基因组 DNA 为模板，GFP 引物(GFP-F：5'-cacaagttcagcgtgtccg-3'；GFP-R：5'-gttcaccttgatgccgttc-3')进行 PCR 检测．条件为：94℃变性 5 min，95℃变性 40 s，55℃退火 35 s，72℃延伸 40 s，30 个循环，72℃延伸 7 min.

1.6 器官中 GFP 转录本的逆转录-聚合酶链反应(RT-PCR)半定量检测

取生长良好的烟草植株根、茎、叶新鲜组织，液氮速冻后充分研磨，用 Qiagen Total RNA Extract 试剂盒提取纯化总 RNA，经 DNA 酶处理和 0.8%琼脂糖凝胶电泳验证，检测 RNA 含量．各样品取等量总 RNA 1 μg，与 25 ng 寡聚 dT 引物混合溶解在经焦碳酸二乙酯(DEPC)处理的无菌水中，65 ℃保温 5 min，冷却后加 2 μL 0.1 mol/L 的 DTT，1 μL 20 mmol/L 的 dNTP，2 μL 10X 逆转录缓冲液，1 μL RNase，0.5 μLAMV 逆转录酶，42℃保温 1 h，92℃保温 4 min 使逆转录酶失活．以逆转录得到的 cDNA 为模板，以 1.5 中的引物和方法进行 PCR 扩增．反应完成后，对产物进行 1%琼脂糖凝胶电泳，再经扫描和半定量分析.

1.7 赤霉素、生长素及特异性抑制剂对根部的处理

沙土中培养转基因烟草苗至高 5 cm，水中小心洗净根部土壤颗粒，分根并分别固定于盛有 1/4 MS 液体培养基的处理容器中预培养 24 h．在培养液中分别加赤霉素(GA_3)、吲哚丁酸(IBA)、生长素拮抗剂 N-萘基邻氨羰基苯甲酸(NPA)母液至处理浓度，以加入等量无菌蒸馏水(d H_2O)为对照，处理 8 h，在显微镜下观察根尖荧光强度．参考 Aspuria 的方法[9]，以对照为++，把差异显著的不同处理根尖荧光强度从强到弱分级为+++，++，+．GA_3，IBA，NPA 处理均设 0.1 mg/L 和 1.0 mg/L 两个浓度.

1.8 显微镜观察

取阳性烟草植株的根经盖玻片轻压后于倒置显微镜(Nikon TE 300)下观察．压片时保证根处于同一平面且组织完整不变形.

2 结果与分析

2.1 *NAC1* 上游调控区的序列分析

对 *NAC1* 上游序列[5]分析发现，在其－996/

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

－1001 bp，－827/－832 bp 和－57/－62 bp 处共含有 3 个 GA 响应元件(GARC ‘TATCCAC’，‘C/TCTTTC/T’)，同时在－503/－508 bp 处含有 1 个生长素响应元件(AuxREs ‘TGTCTC’)[10]，如图 1 所示．在距编码起始位点“ATG”上游－88—－84 bp处存在显著的上游元件“ccaat”盒，其上游－20—－10 bp 处碱基大多为 A 且两端各有 1—2 个嘧啶核苷酸，具有显著的转录起始位点特征．基因的启动子大多在其转录起始位点上游 100 bp 以内，一般不会超过 1 kb，因此，其编码区上游 1 kb 范围内应该为 *NAC1* 基因表达的调控区．本实验通过 PCR 获得拟南芥 *NAC1* 上游调控区 1050 bp 的片段，连入 pGME-T 载体后测序结果与 GenBank 中的序列完全一致，片段命名为 *NAC1pro*．

图 1 NAC1 编码区上游赤霉素与生长素元件分布示意图

GARE，赤霉素反应元件；AuxRE，生长素反应元件；NAC1 coding region，NAC1 编码区

2.2 *NAC1* 上游调控区的克隆及表达载体的构建

经方法 1.3 所得植物表达载体质粒 pRD-mNAC1pro 的结构如图 2．由图 2 可知，插入片段整合进烟草基因组后，烟草中 GFP 的表达由 *NAC1pro* 调控，GFP 的表达模式将表征 *NAC1pro* 的作用特征．质粒酶切图谱如图 3，由图 3 可以看出 *NAC1pro* 片段已经以正确的方向插入 pRD420 质粒．

图 2 pRD-mNAC1pro 质粒的 T-DNA 结构示意图

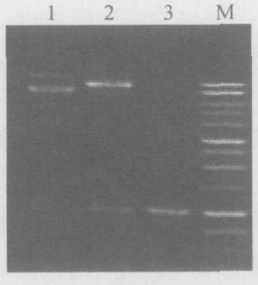

图 3 表达载体 pRD-m*NAC1pro* 的酶切图谱

1，pRD-mNAC1pro 质粒；2，pRD-mNAC1pro 经 *Hin*dIII/*Xba*I 酶切；3，mNAC1pro PCR 产物；M，1 kb 分子量标准

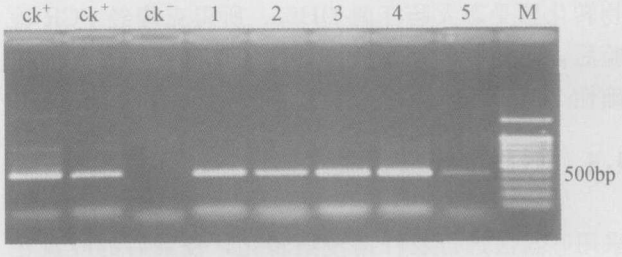

图 4 转化烟草中的 GFP PCR 检测电泳图

CK＋，阳性质粒；CK－，转空质粒株；泳道 1—5，以转化子基因组为模板的 PCR 产物电泳图；M，DNA 分子量标准

2.3 阳性植株的 PCR 检测

烟草叶盘经与农杆菌共培养、分化、生根培养后，共获得 205 株转化植株．PCR 鉴定结果见图 4．在该检测组中有 5 个转化子扩出 420 bp 的 GFP 特征条带，而未转化株和转空质粒株均无条带，初步说明目的基因已整合到植株基因组中．

2.4 转基因植株中 GFP 表达的组织差异性分析

分别提取经 PCR 验证为转基因阳性的 T1 代烟草植株根、茎、叶总 RNA 进行 RT-PCR，RT-PCR 后的电泳如图 5 所示，由 *NAC1-pro* 驱动的 *GFP* 基因在烟草根中表达量最高，在茎中仅有痕量表达，在成熟叶中没有检测到表达．这说明 *NAC1pro* 具有在根中组织表达的特异性．

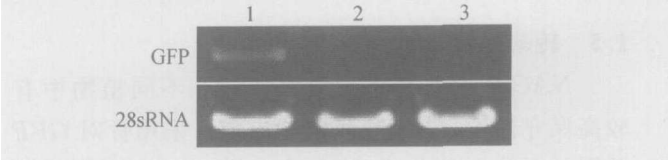

图 5 不同组织中 GFP 表达量的 RT-PCR 半定量结果

1，根；2，茎；3，叶

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

2.5 GFP在转基因烟草根中的表达

对转基因烟草中GFP表达位置进行显微镜观察. 结果显示，由 *NAC1pro* 驱动的GFP在根中的表达集中在根尖分生组织区(如图6)，该位置特征与 *NAC1* 转录本富集的位置吻合[3]，说明 *NAC1* 转录起始位点上游1kb片段基本覆盖了 *NAC1* 基因的启动子区域.

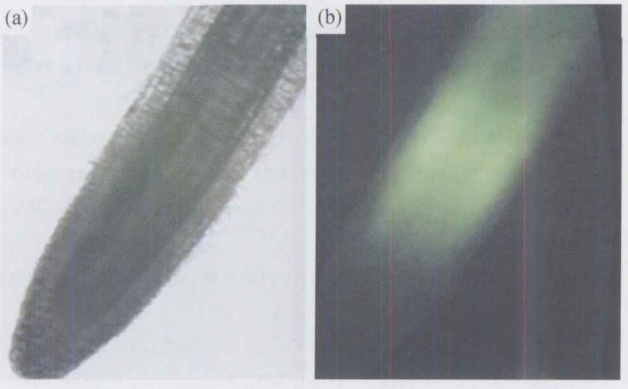

图6 pRD-mNAClpro转基因烟草根尖中的GFP表达
(a) 明视场中的烟草根尖；(b) 紫外激发时根中的GFP荧光

2.6 转基因植株中GFP表达的生长素和赤霉素诱导效应鉴定

活体分根处理8h后，0.1mg/L IBA，1.0mg/L IBA，0.1mg/L GA_3，1.0mg/L GA_3 对GFP表达均有明显诱导，生长素拮抗剂NPA对GFP表达有抑制作用. 1mg/LGA_3 诱导后GFP含量显著增加但表达位置无变化，诱导后中柱细胞中GFP增加最为明显(图7). 生长素诱导后GFP表达的变化与之相似(表1).

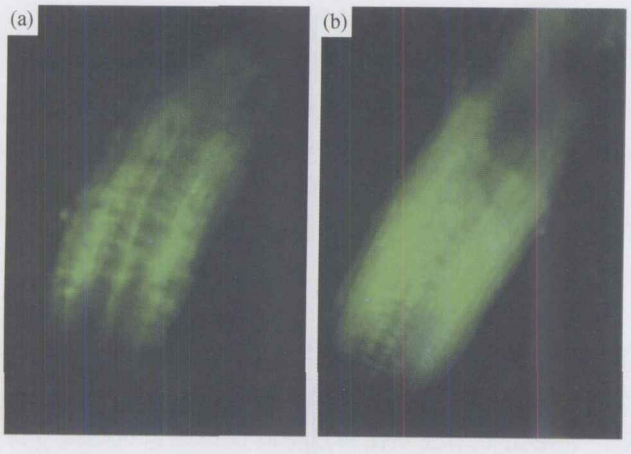

图7 1mg/L的 GA_3 处理6h前后的荧光强度变化
(a) 处理前的荧光强度；(b) 处理后的荧光强度

表1 赤霉素、生长素及其拮抗剂处理对转基因烟草根尖荧光强度的影响

处 理	GFP荧光强度[a)]
0.1mg/L IBA	+++
1.0mg/L IBA	+++
0.1mg/L GA_3	+++
1.0mg/L GA_3	+++
dH_2O	++
1mg/L NPA	+

a) +++，++，+，荧光强度从强到弱

3 讨论

具有高度根组织特异性的启动子是目的基因在转基因作物根中特异表达的关键，有重要的利用价值. 本研究克隆了 *NAC1* 编码区上游1kb片段，通过实验证明由该片段所驱动的标记基因 *GFP* 的表达特征与 *NAC1* 的表达特征基本相同，初步说明所克隆片段覆盖该基因的启动子区域. 同时发现，该启动子集中作用于根尖分生组织区，不易于驱动外源基因在根中的普遍表达和高量表达. 本实验中也观察到，*NAC1-GFP* 在烟草侧根发生位点高量表达，这与Xie等[3]在拟南芥中以GUS为报告基因观察到的结果类似，但本实验中侧根发生位点信号荧光相对根尖中较弱.

植物激素间存在着复杂的相互作用. 已有研究显示在侧根伸长过程中，生长素是通过调节赤霉素信号来控制根的生长速度的[8,10]. 该 *NAC1* 上游序列片段中含有1个生长素响应元件(AuxRE)和3个赤霉素响应元件(GARE)，推测其不仅受生长素作用，而且受赤霉素诱导. 本研究在赤霉素响应元件序列分析的基础上为 *NAC1* 表达受赤霉素诱导提供了一个实验证据. 结合 *NAC1* 在侧根原基发生过程中的重要地位，赤霉素很可能在侧根原基发育过程中也发挥着重要作用.

随着植物生长发育基因控制机制的不断阐明，构建各种植物激素特异相关启动子驱动标记基因 *GFP*、红色荧光蛋白基因(*RFP*)等表达的转基因植物株系或细胞悬浮系，通过分析处理前后荧光强度变化，可对新物质的生物活性进行定性、定量，比传统生物测定法更快速、准确、直观. 本实验获得的转 *NAC1-GFP* 烟草株系对于生根剂的基因靶标筛选具有应用潜力. 基于本实验，还可用生物信息

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

学方法寻找相关激素反应元件和构建特异启动子，用于侧根等器官发育分子机制研究，生长素响应特异启动子 DR_5 的研究[9,11]就是成功的先例.

参 考 文 献

1 Malamy J E, Benfey P N. Down and out in *Arabidopsis*: The formation of lateral roots. Trends Plant Sci, 1997, 2: 390—396

2 Casimiro I, Beekman T, Graham N, et al. Dissecting *Arabidopsis* lateral root development. Trends in Plant Sci, 2003, 8: 165—171

3 Xie Q, Frugis G, Colgan D, et al. *Arabidopsis* NAC1 transduces auxin signal downstream of TIR1 to promote lateral root development. Genes Dev, 2000, 14: 3024—3063

4 Xie Q, Guo H S, Geza D, et al. SINAT5 promotes ubiquitin-related degradation of *NAC1* to attenuate auxin signals. Nature, 2002(419): 167—170

5 Rogers J C, Rogers S W. Definition and functional implications of gibberellin and abscisic acid *cis*-acting hormone response complexes. Plant Cell, 1992, 4(11): 1443—1451

6 Christine M F, Sun T P. A Dellacate balance: The role of gibberellin in plant morphogenesis. Current Opinion in Plant Biology, 2005, 8: 77—85

7 Stephen M S, Davinder P S. Tall tales from *sly* dwarves: Novel functions of gibberellins in plant development. Trends in Plant Science (on line publishing, doi: 10. 1016/j. tplants. 2005. 01. 007)

8 Fu X, Harberd N P. Auxin promotes *Arabidopsis* root growth by modulating gibberellin response. Nature, 2003, 421: 740—743

9 Aspuria E T, Ooura C, Chen G Q, et al. GFP accumulation controlled by an auxin-responsive promoter as a non-destructive assay to monitor early auxin response. Plant Cell Rep, 2002, 21: 52—57

10 Sun T P, Gubler F. Molebular mechanism of gibberellin signaling in plants. Ann Biol, 2004, 55: 197—223

11 Ulmasov T, Liu Z B, Hagen G, et al. Composite structure of auxin response elements. Plant Cell, 1995, 7(10): 1611—1623

2006年国家自然科学基金项目指南：重大研究计划

真核生物重要生命活动的信息基础

1 总体科学目标

本计划以真核生物为主要对象，研究遗传信息及其衍生的细胞分化和神经活动三方面的信息基础. 包括信息的本质、载体、传递、修饰和调控等科学问题. 选择合适模式生物系统，创建多学科交叉的技术平台，资助、协调、集成各相关领域的研究项目. 通过本重大研究计划实施，提高我国在遗传、发育、细胞、生化和神经等学科的基础研究能力和水平，做出有原始性创新的研究成果. 本计划的总体科学目标如下：

(1) 高等真核生物基因组中遗传信息编制和储存方式及基因表达系统的组成和表达规律：基因组中编码序列(蛋白质和核酸的编码序列)和非编码序列的识别、结构特征鉴定和分类；基因数目及可变剪接本数目的软件预测和实验验证；各类DNA序列的生物学功能诠释(基因组信息与蛋白质组信息的整合和分析，物种间和种内个体间基因组比较分析、等位基因、共线体、SNPs等的比较分析)；基因表达系统(基因与基因间、基因与蛋白质、RNA间、基因与各种调控元件间等相互作用的系统)的组成分析、活动规律及基因表达结果的生物学意义的阐释.

(2) 阐明细胞分化的信息基础和实现过程 包括：(1) 细胞分化的遗传信息基础及其表达的调控：检测与细胞分化过程有关的基因表达谱，找出在细胞分化和保持分化状态中起关键作用的相关基因及其表达调控机制，干细胞保持全能或多能的未分化状态以及使之分化为特定的功能细胞所需的因子，以期实现可控制的分化；(2) 研究与细胞分化相关的各种信号传导通路：确定正常细胞分化的各个阶段特异表达的信号传导分子，以期发现新的因子，并研究细胞分化中不同信号通路间的相互作用机制；建立虚拟细胞模型及网站，提供信号传导通路研究中的信息服务和进行模拟实验. (下转第251页)

?1994-2018 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net