

· 技术方法 ·

一种受抗生素诱导的启动子的构建及活性分析

刘伟伟, 张海磊, 刘财丰, 葛晓春*

复旦大学生命科学学院植物研究所生物化学与分子生物学系, 上海 200433

摘要 多聚ADP核糖聚合酶(PARP)受基因毒剂的特异性诱导。将拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)*AtPARP1*基因上游长2 179 bp的启动子片段插入到质粒pAKK687的 β -葡萄糖醛酸糖苷酶(GUS)报告基因上游, 转化拟南芥。GUS组织化学染色结果表明, GUS报告基因仅在苗龄3–5天的拟南芥根部及花发育早期的雄蕊中表达; 1.5 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 博莱霉素与22 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 丝裂霉素联用强烈诱导了GUS报告基因的表达(尤其在拟南芥的幼苗和果荚中)。进一步降低抗生素浓度, 发现单独使用1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 博莱霉素对GUS报告基因也具较强的诱导活性, 且对拟南芥幼苗的生长无影响。上述结果表明, *AtPARP1*启动子是一个新型的具较大应用潜力的抗生素诱导型启动子。

关键词 抗生素, 拟南芥, 博莱霉素, 诱导型启动子, 多聚ADP核糖聚合酶

刘伟伟, 张海磊, 刘财丰, 葛晓春 (2011). 一种受抗生素诱导的启动子的构建及活性分析. 植物学报 46, 560–568.

多聚ADP核糖聚合酶(poly ADP-ribose polymerase, PARP)负责蛋白质的翻译后修饰(Amé et al., 2004; Barth et al., 2006; Schreiber et al., 2006), 它先将 NAD^+ 裂解为ADP核糖(ADP-ribose)和尼克酰胺两部分, 然后将其中的ADP核糖基团转移至受体蛋白谷氨酸或赖氨酸残基上, 之后进一步催化新的ADP核糖连接到蛋白质已有的ADP核糖基团上, 进而形成线性或带分支的含有几十个至几百个ADP核糖单位的多聚ADP核糖链(Althaus and Richter, 1987; Amé et al., 2004)。多聚ADP核糖携带有大量的负电荷, 因此会极大地改变受体蛋白的物理及生化特性(Althaus, 1992; Schreiber et al., 2006)。研究表明, PARP的激活与DNA修复有关, 活化的PARP结合到DNA双链断裂处并募集修复相关蛋白, 同时修饰组蛋白, 使其携带大量的负电荷, 从DNA上脱落, 从而更加有利于修复酶的结合(Petrucco, 2003; Huber et al., 2004; Ahel et al., 2009)。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的基因芯片数据分析(www.arabidopsis.org)表明, 在正常生长的拟南芥内*AtPARP1*的表达水平很低, 但在基因毒剂存在时, *AtPARP1*被迅速诱导, 表达水平大大提高, 说明*AtPARP1*的启动子可成为一个新型的诱导型启动子。

诱导型启动子是指在某些特定条件下, 如物理、化学和生物信号(统称为“诱导因子”)存在时, 启动子可以驱动下游基因增强表达, 转录水平大大提高(Rossi and Blau, 1998; Giandomenico and Mariani, 2009)。目前, 根据植物所感受到的信号刺激种类, 诱导型启动子主要可分为3种, 即物理因素(如温度、光照和射线等)、化学因素(离子、有机物和激素等)和生物因素(病菌、组织器官和发育阶段等)诱导表达的启动子。该类启动子常以诱导信号命名, 例如光诱导表达基因启动子、热诱导表达基因启动子、创伤诱导表达基因启动子、激素诱导表达基因启动子和真菌诱导表达基因启动子(Mcelroy and Brettell, 1994; 吴雪峰等, 2004)。化学因素诱导型启动子, 由于其诱导物是外源的, 生物体内或环境中一般不存在诱导因素, 因此与生物因素或温度等环境因素诱导的启动子相比, 特异性更强, 基因的开关更加可控(Wang et al., 2003; Tang et al., 2004)。目前, 在植物学基础研究中, 已成功应用的化合物诱导启动子有地塞米松诱导启动子、糖皮质激素和雌激素响应启动子等(Zuo and Chua, 2000)。通过外源化合物的施用, 启动子驱动下游基因表达, 从而实现基因表达的人工调控。这类启动子在植物学基础研究以及应用转基因技术

收稿日期: 2011-01-31; 接受日期: 2011-05-19

基金项目: 国家自然科学基金(No.30770425和No.31070232)

* 通讯作者。E-mail: xcge@fudan.edu.cn

改造植物性状方面都有广泛的应用。例如, 研究基因表达与表型变化之间的相互关系, 使经济作物在特定生长期表达外源基因产物等(Zuo and Chua, 2000; Wang et al., 2003; Li et al., 2005)。

本实验室克隆了拟南芥*AtPARP1*基因的启动子, 并利用该启动子构建了*GUS*基因报告系统, 研究了正常情况下*AtPARP1*启动子在各组织中的活性; 检测了在博莱霉素和丝裂霉素处理下该启动子的响应情况; 同时分析了该基因在其它生物和非生物因素胁迫条件下的表达情况。结果表明, *AtPARP1*启动子可成为一个新型的化学诱导型启动子, 具有潜在的应用价值。

1 材料与方法

1.1 材料

拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)种子为Columbia生态型(Col-0)。PCR引物由上海捷瑞基因技术有限公司合成。DNA序列测定由上海桑尼生物科技有限公司完成。所用试剂和酶分别为: 除草剂草丁膦和X-GLUC(上海捷瑞基因技术有限公司); 博莱霉素和丝裂霉素(日本化药株式会社); 限制性内切酶、LA *Taq*酶和T₄ DNA连接酶(Takara); *Taq* DNA聚合酶(天根); PCR Blunt II载体(Invitrogen)。

```

TTTTGAGCG GTGGAGTTTC TATTGATTGG TTATCGATGA CCACTTGCAT CGTCAAATGG TTCTTTGATT CGTGGTTTCGGCCCCAGCTT
CATACTATCA CGAGACTCGA CCATCTTGTT TTTTCTTCT TCTTCTGGT AAATGGTTTC ACAACTTGGT TCCTCTTCT TTCATTTTAT
TTTATATACT ATCATAGCAT TTTGGTTGGA TTTCTCGAGA TAGTATATTT TTTAGTTACT ATCATTACAT AAGTATATTT TAAAAAATA
ATTATATGAA TTATGTAGCT AACTAGATAG ATAATCGTAT AACCAATTCA TGTTAGTATA GTATAGTTTA AGTATGTATT TTGGGATTAC
AAGTGTGGTT GGCATCAAGA CAAGGATGGT GATAGCCTTT CTCTGTAATT TGGTTTAAGA AAAGTTTTTG CATTTTATGT ATAAACGTGT
TTTTTTTTTA TAATTTAAAA TTCAACAAA AAACAATTTT TTTAATAAT GATTGACCAC TATAGACAAT TTAATGATA AAAAAAACCC
CCAATTTTTC ACAATGTTTT GGAGATTAGT CTAGATTTTT TGTCCAAATT TTCCGATTGT AAGAATTAAG AAGCAATGAA CATTGTGTGT
AAGCTTAATG ATTTGTACTC ACAATATCTT TTAATTTAA AATTGTTAAC CAAAAATCC TATATATTGT ACTTGTAAATA GAAATATAAA
CTATTAATAA CAACACTTTA TTCATATAAT ATAAGTTAAA ACATATGTTT TTTTGTAGTAT GTTCTAATCA CACCTATTA AAAAAAGTTGA
AGCTAAATGA GCCAAAAAGA AAAATAAAGA TAGGGGATGG GGACAGGCTG TAATGTTAGG CGGTTGGTAT ATGAACTGAG AACATGTCTG
TTGGTTCGGT CCATCTACAC CACTCAACCA TTTGGCTATG TTTTCTTTT GGCTTTTGCA TGTCTCTCT ACTTTTCTTC TTTGGTCAAA
ATCTCTATCT CGTCTTTTAC ATGGCTTACC CGAATGTTAG TTGTCATGTA AATTGGTTA TGAAGATA TTTTATATAA ACTTTATCGT
ATATTAATAT CGTTATCATC TAACCATTTT TTAACACTAA ACTAGAACCA TCCAGTTTCA CAAGAGTTTT TTTTTTTTT TTTCTAACTA
AATAATATTT GAAGTGACA ATATTAACAA TATATGGGCC AAATAATAGT GGAAACCAA TCGTTAGTCC CACTTTATGA TGGCCTGTT
GATTCTTATG TCTTCTCGT AAGTTGTGAT TATGCAGATT ACGGGCTAAT AAACATGCAT GTTTAGTTTT TACTGTCCA GTAACGAAAT
TTTATCTTTT GGGTTGTGG CCCATTTCAT ATATCCAAA TGCCAAATCC AGCCCGGCTC GACACAGCAC TGCTCGGCTC AACACTCGTA
TGCGTTGGT AGCCACTTAA GACCTTGGT TGATTAACAT GTTACGAATA ATTTGTGTCC CTTTTTCTTC AAGGAGACTA ATCTCTTTTA
ATAAAAAAGA ATGTGTGCAT TAGTCAACAC AAGTCCTATA ATCCGTTTAC GGTAATTGT ATGCACGTCC TTGAAAAGT GAGTAGTGGC
GTAGCATTAC AGCCAAAAAC TATTTGTATA TTTTCTTTT CGTTAAACAA CCAGCAAAAT TTTCAGAAAA ATGTTCTTAA ATTATAAATT
AGTAGTACAT TTTAAACAT AGAGATTTTT TGTTCCTTTT AATAGAAGAG TTAACCTAT GTACAAAATT TCAACTCCTT TTCAAAGTAT
TTGCCGTGTA CTAGATTTTT AACCTTTTTT TTTTATCTT TCATGATTTT CTATTGCTTG CCATCATCAA TGGTAGGAAA TAAATACTAT
TTTTAAAAAG TCAGGGGTGG ATTTAAGAAT CAATCCAAAA GTTTGGGTC TTTTGGAGAT TAAAAAGTTA TATGGGAAAT ATCCAAAAAT
ATGAACGAGA ACTTTGTCA AAAAAATTTA AAATAATTTT TCAAAAAGCC CTAAGCTTT CAAGGGAAGC CATCGATGAA GAAGAAAAACG
AAGAAGAAGA CTCTCAAAAT GCTCGCGCA ACTCACTTCT GACGAAAACC ATACTTCCTC AGTCTCATT CTTTTCCGAC GAACTATTCT
CCTGAAGAAG AAGACGAAA A TG

```

图1 用于驱动*GUS*报告基因表达的拟南芥*AtPARP1*基因ATG起始位点上游2 179 bp的序列

Figure 1 The 2 179 bp sequence upstream from the ATG start codon of *AtPARP1* gene of *Arabidopsis thaliana* was used for driving *GUS* reporter gene expression

1.2 方法

1.2.1 DNA的提取

拟南芥叶片DNA的提取参照Xin等(2003)所述方法。用0.6%琼脂糖凝胶检测DNA的质量, DNA片段大小应为50 kb以上。

1.2.2 *AtPARP1*基因启动子片段的扩增

根据*AtPARP1*基因5'上游和翻译起始位点附近序列设计引物, 用于巢式PCR扩增。第1对引物为F-primer: 5'-ATTTTGAGGCGGTGGAGTTTC-3'和R-primer: 5'-CGTCGACTTTGAGCTTGTTTCG-3'; 第2对引物的上游引物为第1对引物的F-primer5'端添加酶切位点, 即为5'-GAATTC⁺TTTTGAGGCGGTGGAGTTTC-3', 下游引物则恰好在ATG位点上游, 亦添加酶切位点, 为5'-CCC⁺GGGTTTCGTCTTCTTCTT-CAGGAGAATAG-3'。首先利用第1对引物进行扩增, 采用LA *Taq*酶。PCR反应程序为: 94°C 2分钟; 94°C 30秒, 53°C/51°C/49°C/47°C/45°C 30秒, 5个循环; 94°C 30秒, 45°C 30秒, 72°C 2分钟30秒, 27个循环。回收符合预期大小的条带作为模板, 再用含有酶切位点的另一对引物对其进行第2次PCR扩增。扩增程序为: 94°C 2分钟; 94°C 30秒, 50°C/49°C/48°C 30秒, 5个循环; 94°C 30秒, 48°C 30秒, 72°C 2分钟30秒, 27个循环。结果扩增出单一的2.2 kb片段。

1.2.3 *AtPARP1*启动子报告基因载体的构建

将目的条带电泳回收后, 连接到T载体pMD18-T (Takara)中, 转化大肠杆菌DH5 α , 摇菌并抽提质粒, 进行*EcoR* I和*Sma* I双酶切鉴定。酶切正确的克隆送上海桑尼生物科技有限公司测序。选择序列正确的克隆, 再以*EcoR* I和*Sma* I双酶切, 释放出的外源片段与*EcoR* I和*Sma* I双酶切的载体pAKK687(带有草丁膦抗性基因)相连, 转化大肠杆菌, 摇菌并抽提质粒。酶切鉴定正确的克隆用于转化农杆菌。

1.2.4 拟南芥的生长及转化

将种子播于浸透营养液的培养土(蛭石:黑土:珍珠岩=9:3:0.5)中, 用保鲜膜覆盖, 4°C下春化3天后转入光照培养室(9小时光照/15小时黑暗, 光强130 $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, 温度(22 \pm 2)°C), 20天后再移入长日照温室

(16小时光照/8小时黑暗), 开花前浇1次营养液, 转化方法参照花序浸泡法(Clough and Bent, 1998)。

1.2.5 阳性转基因植株的鉴定及GUS染色分析

种植转基因T₀代种子, 待其刚刚长出真叶时喷施除草剂, 筛选阳性植株, 开花后取各组织进行GUS染色, 选择有GUS信号的阳性株收种。种植T₂代植株, 取不同时期及不同组织进行GUS染色(Sieburth and Meyerowitz, 1997)。

1.2.6 *AtPARP1*基因启动子活性的定量分析

采用定量PCR技术检测*GUS*基因的表达。引物序列如下: F-primer: 5'-AGTGGCAGTGAAGGGCGAACA-GT-3'; R-primer: 5'-TCAGCGTAAGGGTAATGCG-AGGT-3'。PCR反应程序为: 95°C 3分钟; 95°C 5秒, 60°C 30秒, 40个循环。

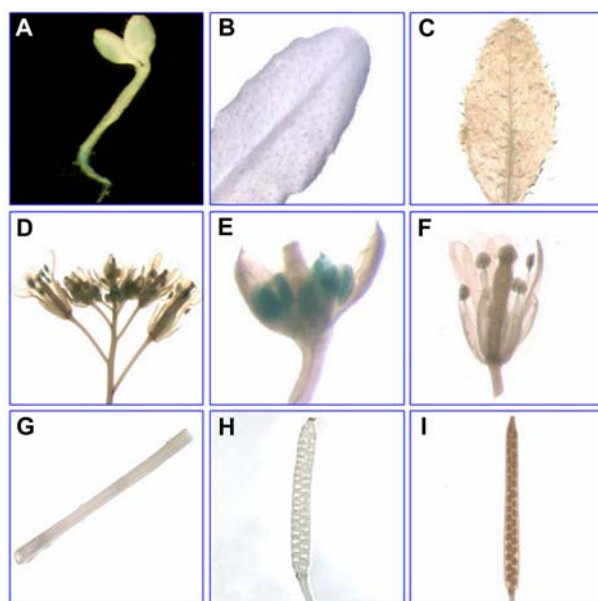


图2 拟南芥*AtPARP1*基因启动子的组织特异性活性分析

(A) 苗龄5天的幼苗; (B) 莲座叶; (C) 茎生叶; (D) 花序; (E) 第9期花; (F) 第13期开放的花; (G) 茎; (H) 幼嫩角果; (I) 成熟角果

Figure 2 The tissue-specific activity of *AtPARP1* promoter of *Arabidopsis thaliana*

(A) 5-day-old seedling; (B) Rosette leaf; (C) Cauline leaf; (D) Inflorescence; (E) Flower at stage 9; (F) Open flower at stage 13; (G) Stem; (H) Young silique; (I) Mature silique

2 结果与讨论

2.1 *AtPARP1*基因启动子片段的扩增和报告载体的构建

从拟南芥Col-0生态型的总DNA中扩增获得*AtPARP1*基因启动子序列, 经测序长度为2 179 bp(图1)。将该片段通过*EcoR* I和*Sma* I位点插入到pAKK687载体的GUS报告基因上游, 转入拟南芥中得到转基因pAt-PARP1::GUS植株。

2.2 *AtPARP1*启动子在不同组织中的活性分析

基因芯片数据(www.arabidopsis.org)分析表明, *At-PARP1*基因在拟南芥花中表达水平最高, 故筛选出转pAtPARP1::GUS阳性植株后, 收集花中出现GUS信号的T₁代植株种子, 得到10株以上的阳性植株。将T₁代种子再进行除草剂筛选, 选取分离比接近3:1的小苗进行GUS组织化学染色。结果发现仅在苗龄3–5天的幼苗根的基部、早期花药以及花丝中检测到GUS

信号(图2), 其它组织中则未见明显表达。

2.3 *AtPARP1*启动子在抗生素诱导下的活性分析

取转基因阳性植株的不同组织, 参考拟南芥网站(www.arabidopsis.org)基因毒剂处理植物的通用条件, 以22 μg·mL⁻¹丝裂霉素+1.5 μg·mL⁻¹博莱霉素处理转基因植株30小时后, 进行GUS染色。结果发现抗生素强烈诱导了GUS报告基因的表达(图3)。未处理前的成熟植株仅在早期花药和花丝中检测到弱的GUS信号, 诱导30小时后, 在整个花序中都出现了强的GUS基因表达; 在苗龄5天的幼苗中, 诱导前GUS基因仅在其根基部有非常微弱的表达, 诱导30小时后, 整个根、叶和下胚轴等位置均有强烈的蓝色信号出现; 在幼嫩角果中, 未诱导之前未检测到蓝色信号, 诱导30小时后也出现了较强的蓝色信号; 但在成熟角果(开始变黄)中, 并未见抗生素的明显诱导效应(结果未显示); 在莲座叶(图片未显示)及茎生叶中, 仅见较弱的诱导信号。

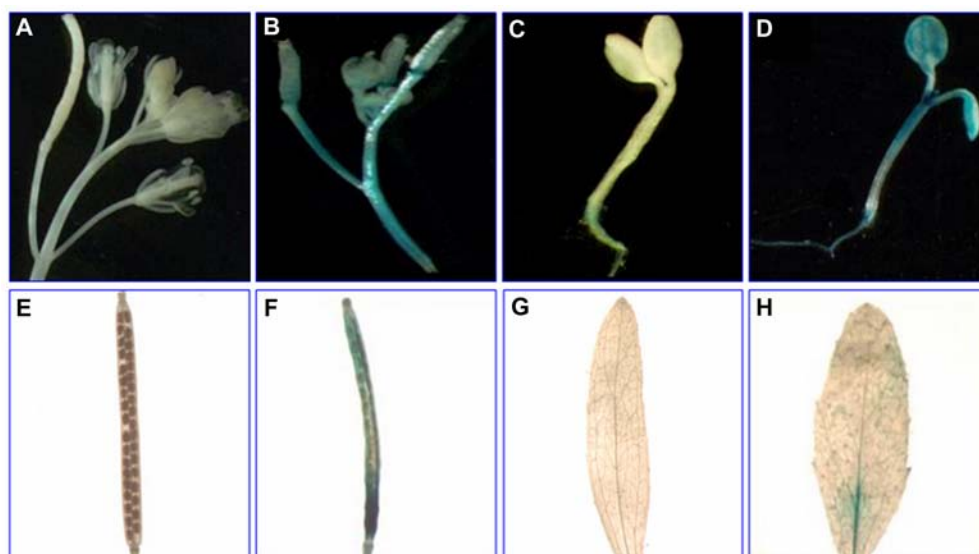


图3 拟南芥不同组织中*AtPARP1*启动子在抗生素诱导前后的活性变化

(A) 花序; (B) 诱导后的花序; (C) 苗龄5天的幼苗; (D) 诱导后苗龄5天的幼苗; (E) 幼嫩角果; (F) 诱导后的幼嫩角果; (G) 茎生叶; (H) 诱导后的茎生叶

Figure 3 The activity of *AtPARP1* promoter in different tissues of *Arabidopsis thaliana* before and after antibiotics treatment

(A) Inflorescence; (B) Inflorescence after treatment; (C) 5-day-old seedling; (D) 5-day-old seedling after treatment; (E) Young silique; (F) Young silique after treatment; (G) Cauline leaf; (H) Cauline leaf after treatment

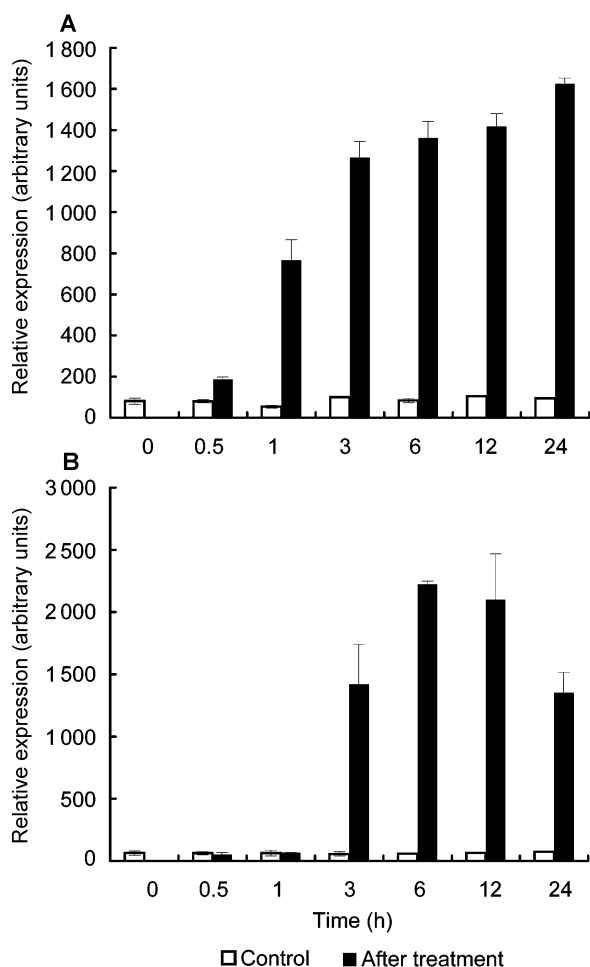


图4 拟南芥幼苗在 $22 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 丝裂霉素+ $1.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 博莱霉素处理不同时间前后*AtPARP1*基因的表达(平均值±标准误)(数据来源http://www.arabidopsis.org/servlets/Search?action=new_search&type=expression)

(A) 根; (B) 茎和叶

Figure 4 Transcriptional response of *AtPARP1* gene to $22 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ mitomycin+ $1.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ bleomycin treatment for different time in *Arabidopsis thaliana* seedlings (means±SD) (Data were obtained from http://www.arabidopsis.org/servlets/Search?action=new_search&type=expression)

(A) Root; (B) Stem and leaf

通过分析该基因在各种胁迫条件下的基因芯片数据(www.arabidopsis.org)发现, 在生长16天的拟南芥幼苗中, 丝裂霉素和博莱霉素联用可以强烈诱导*AtPARP1*基因在其根(图4A)及茎叶(图4B)中表达, 诱导24小时后, 根中的表达量提高了17倍, 茎叶中则提高了18倍(图4)。抗生素对*AtPARP1*基因的诱导趋势

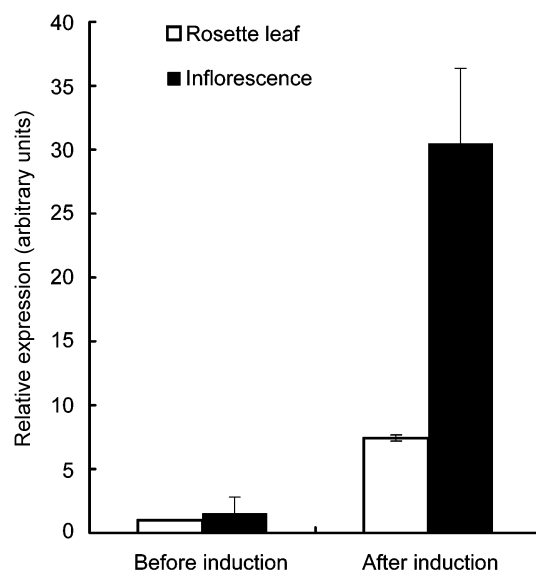


图5 抗生素处理前后*AtPARP1*启动子驱动*GUS*基因表达水平的定量分析(平均值±标准误)

Figure 5 The expression level of *GUS* gene driven by *AtPARP1* promoter before and after antibiotics treatment (means±SD)

与我们的*GUS*染色结果基本相同, 但由于植物生长时期与种植条件均不一致, 诱导时间也不相同, 故在绝对值上难以相互比较。

2.4 *AtPARP1*启动子在抗生素诱导下的活性定量分析

*GUS*组织化学染色结果表明, 在 $22 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 丝裂霉素+ $1.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 博莱霉素诱导下, 花中*AtPARP1*启动子活性受到较强诱导, 而莲座叶中则诱导程度较弱。以此2种组织为代表, 利用定量PCR技术检测转基因植株的花和莲座叶中*GUS*基因在抗生素诱导30小时前后表达量的变化, 以定量分析*AtPARP1*启动子对博莱霉素和丝裂霉素诱导的响应情况。结果表明, 在较强诱导的花中*GUS*基因表达量提高了31倍, 在较弱诱导的莲座叶中其表达量提高了7倍(图5)。

2.5 抗生素浓度的选择及其对植物生长的影响

由于丝裂霉素和博莱霉素具有损伤DNA的作用, 在高浓度下会对植物的正常生长产生影响, 因此, 本

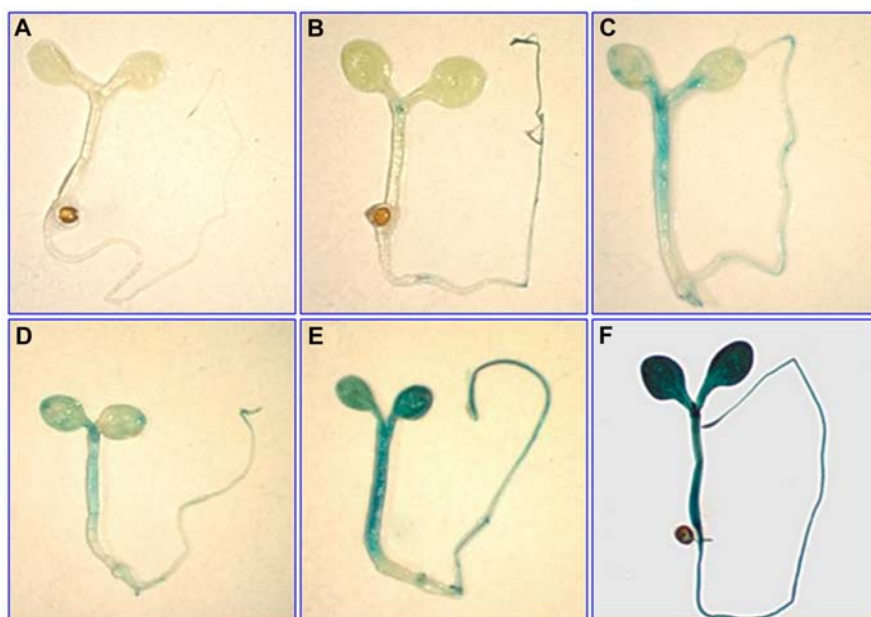


图6 *AtPARP1*基因启动子对 $22 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 丝裂霉素和 $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 博莱霉素处理的响应

(A) 生长7天的pAtPARP1::GUS转基因拟南芥幼苗的GUS活性; (B), (C) 用 $22 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 丝裂霉素分别处理30小时和50小时后转基因幼苗的GUS活性; (D), (E) 用 $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 博莱霉素分别处理30小时和50小时后转基因幼苗的GUS活性; (F) 转p35S::GUS(pAKK687空载体)幼苗的GUS活性(阳性对照)

Figure 6 Response of *AtPARP1* gene promoter to $22 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ mitomycin and $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ bleomycin treatment

(A) GUS activity of 7-day-old pAtPARP1::GUS transgenic seedling; (B), (C) GUS activity of the transgenic seedlings after treated by $22 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ mitomycin for 30 h and 50 h, respectively; (D), (E) GUS activity of the seedlings after treated by $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ bleomycin for 30 h and 50 h, respectively; (F) GUS activity of the p35S::GUS(pAKK687 vector) transgenic seedlings (as positive control)

研究尝试降低抗生素浓度, 以及仅用博莱霉素或丝裂霉素一种进行诱导, 以选择既能诱导下游基因表达, 又对植物生长没有明显影响的抗生素浓度。结果发现, 低浓度的博莱霉素就可强烈诱导该启动子的活性, 用 $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 博莱霉素诱导50小时的效果与用 $22 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 丝裂霉素+ $1.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 博莱霉素诱导30小时的效果相当(图6E, 图3D), 而 $22 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 丝裂霉素的诱导效果则较弱(图6B, C)。为了检测博莱霉素对拟南芥生长的影响, 将拟南芥种植在含有 $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 博莱霉素的1/2MS培养基上, 1周后发现拟南芥的萌发及生长均未受到明显影响(图7), 其根和叶均生长正常, 说明拟南芥可以耐受低浓度的博莱霉素, $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 博莱霉素在苗期不会对小苗产生明显危害。另外, 喷施 $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 博莱霉素的植株下一代也没有发

现异常。以上结果表明, *AtPARP1*启动子受低浓度博莱霉素的诱导, 有望成为在苗期使用的化学诱导型启动子。

2.6 *AtPARP1*基因对其它外界环境条件以及内源生物因素的响应

利用www.arabidopsis.org网站提供的基因芯片数据可以分析*AtPARP1*启动子对其它外界环境条件以及内源生物因素的响应情况。从图8可以看出, 不同环境因素胁迫11天幼苗的气生部分(图8A)和根(图8B)中, *AtPARP1*的表达均受到丝裂霉素和博莱霉素的高度诱导, 而受其它环境因素的影响较小。除了非生物胁迫因素, *AtPARP1*亦不受病原菌接种和内源激素的诱导(数据未显示)。

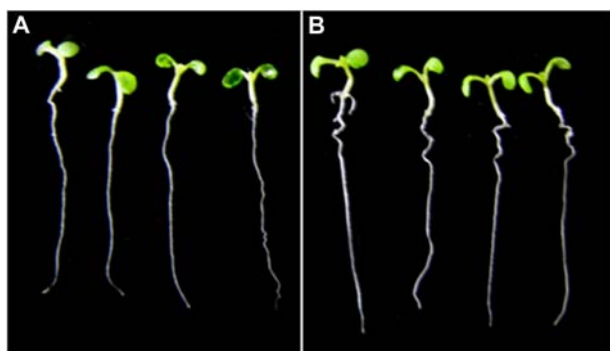


图7 在含有1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 博莱霉素的1/2MS培养基上生长1周的拟南芥幼苗

(A) 正常生长的幼苗(对照); (B) 在含1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ 博莱霉素培养基上生长的幼苗

Figure 7 One-week-old *Arabidopsis thaliana* seedlings grown on 1/2MS medium containing 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ bleomycin

(A) Seedlings under normal growth condition (Control); (B) Seedlings grown on 1/2MS medium containing 1 $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ bleomycin

在通过转基因手段研究拟南芥及其它植物的基因功能时,一些基因的组成型表达常常会导致植株生长不正常甚至死亡,故而需要把目的基因置于可诱导的启动子后,在需要时基因才开始表达。化学诱导启动子由于特异性强且使用方便(Zuo and Chua, 2000; Wang et al., 2003),相对于生物因素诱导的启动子而言,可控性更好,故而在研究中更受欢迎,但目前可供选择的化学诱导型启动子并不多。

本研究提供的*AtPARP1*启动子受内源激素和外源的生物及非生物胁迫的影响很小,特异性地受到博莱霉素和丝裂霉素的高度诱导。在未诱导之前,除了在早期花药中外,该启动子活性很低,在低浓度的博莱霉素存在时,该启动子强烈地驱动下游基因的表达,尤其是在苗中。另外,本研究中所用到的低浓度博莱霉素对拟南芥幼苗没有明显的生长抑制,其成熟植株开花和结种正常,后代植株表型也正常。综上所述,本研究通过转基因手段和报告基因证明,*AtPARP1*启动子可以成为一个在拟南芥苗中应用的、特异性地受博莱霉素和丝裂霉素诱导的新型化学诱导启动子。目前,*AtPARP1*启动子中受博莱霉素和丝裂霉素诱导的元件尚属未知,下一步将研究其响应元件

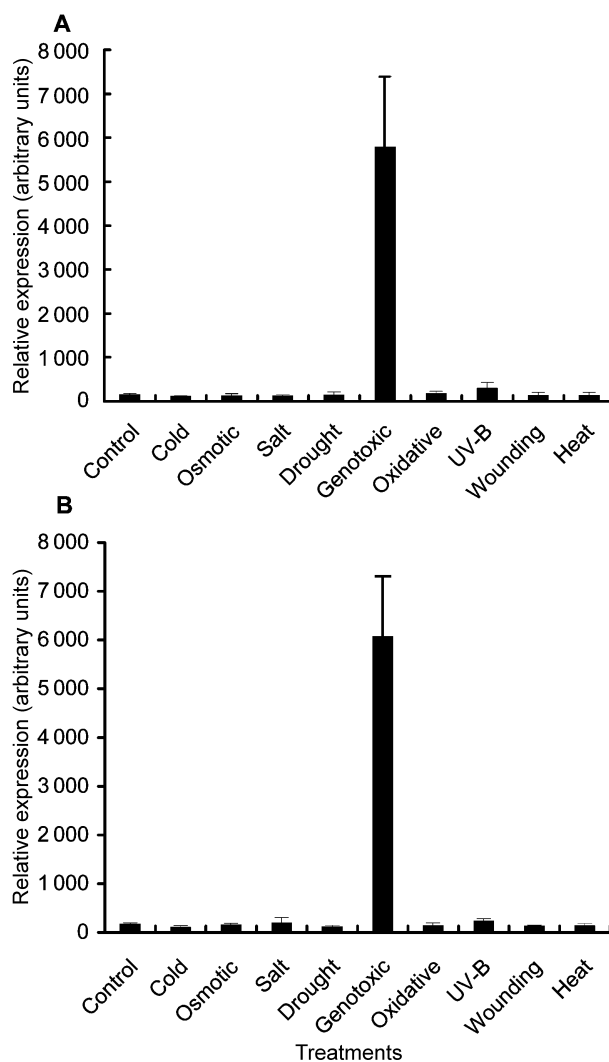


图8 *AtPARP1*基因对环境胁迫的响应(平均值 \pm 标准误)(数据来源<http://jsp.weigelworld.org/expviz/expviz.jsp?experiment=abiostress&normalization=absolute&probesetcsv=At4g02390->&action=Run)

(A) 生长11天幼苗的气生部分*AtPARP1*基因对不同胁迫的响应; (B) 生长11天幼苗的根中*AtPARP1*基因对不同胁迫的响应

Figure 8 Expression level of *AtPARP1* gene in response to various environmental stresses (means \pm SD) (Data were obtained from <http://jsp.weigelworld.org/expviz/expviz.jsp?experiment=abiostress&normalization=absolute&probesetcsv=At4g02390->&action=Run)

(A) Expression level of *AtPARP1* gene in response to various stresses in aerial parts of 11-day-old young seedlings; (B) Expression level of *AtPARP1* gene in response to various stresses in roots of 11-day-old young seedlings

以及与之作用的转录因子。

参考文献

- 吴雪峰, 赵开军, 陈毓荃 (2004). 植物启动子的诱导模序. 中国生物工程杂志 **24**(12), 14–21.
- Ahel D, Hořejší Z, Wiechens N, Polo SE, Garcia-Wilson E, Ahel I, Flynn H, Skehel M, West SC, Jackson SP, Owen-Hughes T, Boulton SJ (2009). Poly(ADP-ribose)-dependent regulation of DNA repair by the chromatin remodeling enzyme ALC1. *Science* **325**, 1240–1243.
- Althaus FR (1992). Poly ADP-ribosylation: a histone shuttle mechanism in DNA excision repair. *J Cell Sci* **102**, 663–670.
- Althaus FR, Richter C (1987). ADP-ribosylation of proteins: enzymology and biological significance. *Mol Biol Biochem Biophys* **37**, 1–237.
- Amé JC, Spenlehauer C, de Murcia G (2004). The PARP superfamily. *Bioessays* **26**, 882–893.
- Barth E, Radermacher P, Szabó C (2006). The world according to poly (ADP-ribose) polymerase (PARP)—update 2006. *Intens Care Med* **32**, 1470–1474.
- Clough SJ, Bent AF (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J* **16**, 735–743.
- Giandomenico C, Marianthi K (2009). Inducible gene expression systems and plant biotechnology. *Biotech Adv* **27**, 733–743.
- Huber A, Bai P, de Murcia JM, de Murcia G (2004). PARP-1, PARP-2 and ATM in the DNA damage response: functional synergy in mouse development. *DNA Repair* **3**, 1103–1108.
- Li RZ, Jia XY, Mao X (2005). Ethanol-inducible gene expression system and its applications in plant functional genomics. *Plant Sci* **169**, 463–469.
- Mcelroy D, Brettell RIS (1994). Foreign gene expression in transgenic cereals. *Trends Biotech* **12**, 62–68.
- Petrucco S (2003). Sensing DNA damage by PARP-like fingers. *Nucleic Acids Res* **31**, 6689–6699.
- Rossi FM, Blau HM (1998). Recent advances in inducible gene expression systems. *Curr Opin Biotechnol* **9**, 451–456.
- Schreiber V, Dantzer F, Amé JC, de Murcia G (2006). Poly(ADP-ribose): novel functions for an old molecule. *Nat Rev Mol Cell Biol* **7**, 517–528.
- Sieburth LE, Meyerowitz EM (1997). Molecular dissection of the AGAMOUS control region shows that *cis* elements for spatial regulation are located intragenically. *Plant Cell* **9**, 355–365.
- Tang W, Luo XY, Samuels V (2004). Regulated gene expression with promoters responding to inducers. *Plant Sci* **166**, 827–834.
- Wang RH, Zhou XF, Wang XZ (2003). Chemically regulated expression systems and their applications in transgenic plants. *Transgenic Res* **12**, 529–540.
- Xin ZG, Velten JP, Oliver MJ, Burke JJ (2003). High-throughput DNA extraction method suitable for PCR. *Biotechniques* **34**, 820–824, 826–826.
- Zuo JR, Chua NH (2000). Chemical-inducible systems for regulated expression of plant genes. *Curr Opin Biotech* **11**, 146–151.

Construction and Activity Analysis of an Antibiotic-inducible Promoter

Weiwei Liu, Hailei Zhang, Caifeng Liu, Xiaochun Ge*

Department of Biochemistry and Molecular Biology, Institute of Plant Science, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China

Abstract Poly ADP-ribose polymerase (PARP) is induced specifically by genotoxin. We cloned the 2 179 bp promoter sequence of Arabidopsis *AtPARP1* gene into a pAKK687 vector to drive the expression of a β -glucuronidase (*GUS*) reporter gene for Arabidopsis transformation. *GUS* staining revealed the *GUS* reporter gene expressed only in the basal root of 3 to 5-day-old seedlings and in the anther at early flowering stage. An amount of $1.5 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ bleomycin combined with $22 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ mitomycin could strongly induce the expression of the *GUS* reporter gene, especially in young seedlings and young siliques of Arabidopsis. An amount of $1 \mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ bleomycin was enough to induce the promoter and had no adverse effects on Arabidopsis seedling growth. The *AtPARP1* promoter may be a new antibiotic-inducible promoter with application potential.

Key words antibiotics, Arabidopsis, bleomycin, inducible promoter, poly ADP-ribose polymerase

Liu WW, Zhang HL, Liu CF, Ge XC (2011). Construction and activity analysis of an antibiotic-inducible promoter. *Chin Bull Bot* 46, 560–568.

* Author for correspondence. E-mail: xcge@fudan.edu.cn

(责任编辑: 孙冬花)

《植物分类与资源学报》征订启事

(原刊名《云南植物研究》)

《植物分类与资源学报》(原刊名《云南植物研究》)创刊于1979年,是由中国科学院主管、中国科学院昆明植物研究所及中国植物学会承办的全国性自然科学学术期刊。经过30多年的努力,现已成为我国与植物科学研究相关的主要学术性期刊之一,入选“中国自然科学核心期刊”、“中国生物学类科技核心期刊”。本刊所发表的论文在国内生物、农林、医药、轻工等二次文献刊物中均有收录;国外CA(美国化学文摘)、BA(美国生物学文摘)等从1980年起就连续摘报;生物科学的当代进展(CABS)、科学引文索引(SCI)的CI部分以及俄罗斯文摘杂志(PЖ)和国际农业科技情报系统(Agris)等都有摘报;乌利希国际期刊指南(UIPD)自20世纪80年代就刊载本刊出版事宜。本刊已同30多个国家和地区建立发行和交换关系,目前已加入中国学术期刊光盘版、中国学术期刊网及万方数据库资源系统。本刊主要刊登包含以下内容的原创性论文、简报和综述(以约稿为主): (1) 广义植物系统学相关学科,包括植物分类学、系统学、命名法、系统发生、植物区系和生物地理学; (2) 植物多样性保护及植物资源的可持续利用,包括植物分子生物学、植物生理、植物生态学、植物化学及民族植物学、植物资源管理和监测。研究对象以野生植物为主,兼顾引种驯化后的野生物种;分布地以中国及喜马拉雅地区为主,兼顾其它地区。

《植物分类与资源学报》为双月刊,逢双月25日出版。2012年每期25元,邮发代号:64-11。邮局漏订的读者可直接与编辑部联系订阅。

联系地址: 云南昆明市蓝黑路132号中国科学院昆明植物研究所 邮政编码: 650201

Tel & Fax: 0871-5223032

E-mail: bianji@mail.kib.ac.cn; linnana@mail.kib.ac.cn

http://journal.kib.ac.cn