

# 烟草花药特异表达基因启动子的克隆及序列分析

彭仁旺 周雪荣 周奕华<sup>1</sup> 方荣祥\* 莽克强

(中国科学院微生物研究所植物生物技术开放实验室 北京 100080) (中国科学院遗传研究所 北京 100101)<sup>1</sup>

**摘要** 通过 PCR 扩增,从烟草 (*Nicotiana tabacum* cv. NC89) 中克隆了花药绒毡层中特异表达基因的启动子,序列分析表明,该启动子含 1303 个核苷酸,与已报道的序列比较,核苷酸的同源性为 99.4%。

**关键词** 花药特异性,启动子,烟草

利用植物雄性不育性进行杂交从而获得杂种优势已广泛应用于植物育种。目前,国内外应用较多的是细胞质雄性不育。已经在高等植物的 21 科近 200 种植物内发现有细胞质雄性不育性,其中玉米、高粱、大麦等植物的细胞质雄性不育已广泛用于配制杂交种子<sup>[1]</sup>。

由显性的核基因控制雄性不育一直是育种学家们努力追求的目标。最近, Mariani 等<sup>[2]</sup>利用在花药中特异表达基因 (TA-29) 的启动子控制核糖核酸酶基因在烟草中的表达,获得的转基因植株表现为雄性不育。这一方法开创了利用植物基因工程技术获得雄性不育的新途径,具有重要的理论意义和巨大的应用前景。为此,我们从烟草中克隆了花药特异表达基因 TA-29 的启动子,并将其与一种来自细菌的核糖核酸酶基因 (barnase) 一起导入“双低”油菜中,以期利用基因工程手段选育雄性不育的油菜。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

烟草 (*Nicotiana tabacum* cv. NC89); Taq DNA 聚合酶,购自 Promega 公司;其余酶试剂购自 Boehringer mannheim, New England Biolabs.

### 1.2 PCR 引物

根据 Seurinck 等报道的序列<sup>[3]</sup>设计引物,两个引物的 5'端分别引入了 Hind III 和 Nco I 位点。

I: 5'-ACAAGCTTCGTGTTTGACGGTGTA-3'

Hind III

II: 5'-CGCCATGGGTAGCTAATTTCTTTAAG-3'

Nco I

引物由中国科学院微生物研究所生物基因工程材料与技术中心合成。

获 ICSC 世界实验室及中国科学院微生物研究所所长专项基金资助。

\* 通讯作者。

本文于 1995 年 7 月 4 日收到。

### 1.3 PCR 扩增

取幼嫩烟草叶片,按文献〔4〕小量提取总 DNA,以总 DNA 为模板,94℃ 30s,54℃ 1min,63℃ 2min 共3个循环;然后94℃ 30s,65℃ 1min,72℃ 2min 共27个循环扩增启动子区域。

### 1.4 PCR 产物的克隆及序列分析

PCR 产物回收后,经 Hind III 或 Nco I 双酶切,克隆到质粒 pBY6.5<sup>〔5〕</sup>中,随后对其插入片段亚克隆。并以 ABI 公司373A 型荧光自动测序仪测定序列。

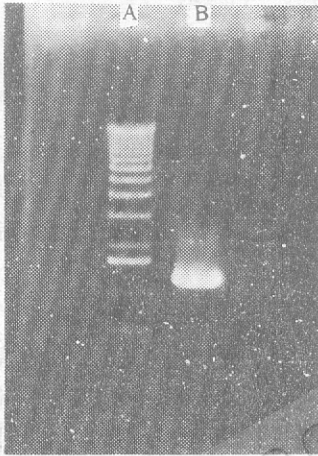


图1 TA-29启动子的PCR扩增

Fig. 1 PCR amplification of TA-29 promoter

A. 1kb DNA ladder, B. PCR product

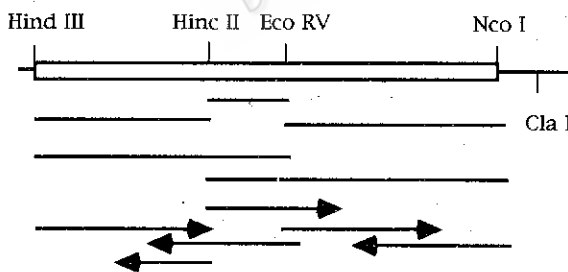


图2 TA-29启动子的测序策略

Fig. 2 Strategy for sequencing TA-29 promoter.

Lines show 4 subclones; Arrows indicate sequencing direction

## 2 结果与讨论

### 2.1 烟草花药特异表达基因 TA-29启动子的克隆

琼脂糖电泳分析表明 PCR 产物大小约 1.3kb (图1),与引物所对应的片段大小相符。PCR 产物回收后,经 Hind III 和 Nco I 双酶切,克隆至 pBY6.5<sup>〔5〕</sup>得到重组质粒 pTA-CP,经酶切分析检测,确证克隆正确。

### 2.2 TA-29启动子的序列分析

将 pTA-CP 中的插入片段 TA-29启动子进行一系列酶切并制作酶切图谱,利用其中的 Hinc II 和 EcoR I 位点进行亚克隆并测序,测序方向见图2。图中 Cla I 位点是 pBY6.5 上的。

序列分析结果表明,扩增到的 TA29 启动子长1303个碱基,富含 AT, TATAbox 出现在-80位置 (见图3)。与 Seurinck<sup>〔3〕</sup>等报道的序列比较,除引物区域外只有8个碱基的差异,核苷酸同源性为99.4%。

利用基因工程手段获得稳定的雄性不育系是近年发展的新技术;途径之一是在花药中特异表达 RNA 酶基因而导致花粉败育<sup>〔2〕</sup>。我们利用 PCR 技术从烟草中克隆了 1.3kb 的在花药中特异表达的 TA-29 启动子,并测定了该启动子的全序列。随后用 PCR 扩增并修饰了 RNA 酶基因 (barnase)、

RNA 酶抑制剂基因 (barstar) 及抗除草剂基因 (bar),并将这些基因分别克隆在二元载体 pBI121中,构建了两个植物表达质粒,其中 barnase 基因和 barstar 基因均受花药特异表达 TA-29启动子的控制。将这两个表达质粒分别转化甘蓝型油菜 (Brassica napus L.) “双低”品种“中双821”和“5-4”,已获得了转基因油菜的不育系和恢复系 (待发表),表

(a) AAG CTTCGTGTTT 13  
 (b) G.A T.....

GACGGTGTA ATCATATGTA TTGATACTTG TTGCTTCTTT TATTAATTTT AGTGATTAG 73  
 .....  
 ATCCCTAGA AACTACCATA TGCTGTTTTT AGGCTCGTAT AATATGAGAA AAGTTTATTT 133  
 ..... T.....  
 TTAGTCGCTT CCAAATATAT ATTTATATAC TTTCTCCGGT CCACAATAAG TGATTTTTTG 193  
 .....  
 GTTGTTTTCA CACAGATTAG GAAATCACA TTTCAACATT AAATAGCAAT GAAATTGATC 253  
 ..... A..... T.....  
 ATATTAACCT TTACTATTTT TTCACATAAA CATTCTAAC ACATACTCCA ACACCATTTA 313  
 .....  
 CTCCAAGGGC ACTGTAGTAA AAAAATAATT AAATCATTTT TGAAATCTAA AAAACTCACT 373  
 .....  
 TATTTTGAC CATAAAAAA GGGCCAAAA ATAACTTATT GTGGACCGGA GAGAGTAATA 433  
 .....  
 CACTTTTGG TTAGCGAATG CAATTAATTT AGACATTGTG TTATGTTCCA GTTAACCGCT 493  
 .....  
 TCCCTGCACT TCTTCAATC TATCTCTCGA TAGAAAATGG TGATACTTTG CGACTTCTAT 553  
 .....  
 CAGAGGACTT TTTGTTTCC ATGTAACCAT CTGTCATTTT CGATGGGGAG ATTTGCACAA 613  
 ..... T.....  
 ATAGGCTATT TATGTGTCCC AATTTAAATT TTAACCCCAT GTCGATCAGA ACTTAGCCAC 673  
 .....  
 GAGCACCAGA AGCCCGATGG ATATGTGACT TTGTCACTAT CCGGTTTACT AATCAAGAGC 733  
 ..... TTT.....  
 TATTTTATT CAAAAATTGGA TATCTAGCTA AGTATAACTG GATAATTTGC ATTAACAGAT 793  
 .....  
 TGAATATAGT GCCAAACAAG AAGGGACAAT TGACTTGTCA CTTTATGAAA GATGATTCAC 853  
 ..... A.....  
 ACATGATTTT TTATGFACTA ATATATACAT CCTACTCGAA TTAAAGCGAC ATAGGCTCGA 913  
 .....  
 AGTATGCACA TTTAGCAATG TAAATTAAAT CAGTTTTTGA ATCAAGCTAA AAGCAGACTT 973  
 .....  
 GCATAAGGTG GGTGGCTGGA CTAGAATAAA CATCTTCTCT AGCACAGCTT CATAATGTAA 1033  
 .....  
 TTTCCATAAC TGAAATCAGG GTGAGACAAA ATTTTGGTAC TTTTCTCTCA CACTAAGTCC 1093  
 .....  
 ATGTTTGCAA CAAATTAATA CATGAAACCT TAATGTTACC CTCAGATTAG CCTGCTACTC 1153  
 .....  
 CCCATTTTCC TCGAAATGCT CCAACAAAAG TTAGTTTTCG AAGTTGTGTG GTATGTCTTG 1213  
 .....  
 TGCTCTATAT ATGCCCTTGT GGTGCAAGTG TAACAGTACA ACATCATCAC TCAAATCAAA 1273  
 .....  
 GTTTTTACTT AAAGAAATTA GCTACCATGG 1303  
 ..... AA.....

图3 烟草 (*Nicotiana tabacum* cv. NC89) 中 TA-29 启动子的序列 (a) 及与已报道<sup>(3)</sup>的序列 (b) 的比较

Fig. 3 Sequence of TA-29 promoter from tobacco(a)and its comparison with the reported data<sup>(3)</sup>(b) underlined regions show primers for PCR

明烟草花药特异表达的启动子在油菜中具有同样的功能, 目前我们正在进行恢复系纯合子的选育, 以期应用于培育优质杂种油菜。

### 参 考 文 献

- [1] Peacock J. *Nature*. 1992, **357**: 358.
- [2] Mariani C, Beuckeleer M D, Truettner J *et al.* *Nature*, 1990, **347**: 737~741.
- [3] Seurinck J, Truettner J, Goldberg R B. *Nucleic Acids Res.* 1990, **18**: 3403.
- [4] Edwards K, ohnstone C, Thompson C. *Nucleic Acids Res.* 1991, **19**: 1349.
- [5] 周雪荣, 方荣祥, 王成球等. *中国科学 (B辑)*, 1991, **34**: 1174~1179.

## Cloning and Sequencing Analysis of the Promoter for an Anther-specific Gene from Tobacco

Peng Renwang Zhou Xuerong Zhou Yihua<sup>1</sup> Fang Rongxiang Mang Keqiang

(*Laboratory of Plant Biotechnology, Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080*)

(*Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing 100101*)<sup>1</sup>

**Abstract** The upstream regulatory region of an anther-specific gene was amplified from *Nicotiana tabacum* cv. NC89 genomic DNA by polymerase chain reaction. After cloning into Hind III and Nco I sites of pBY6.5, this fragment was subcloned and then sequenced on ABI 373A auto-sequencer. The results indicated that the cloned fragment contained 1303 nucleotides, and shared a sequence homology of 99.4% with that from *Nicotiana tabacum* cv. Samsun. The putative TATA box showed at the position -80 ("A" of the start codon ATG was designated as "+1"). The cloned fragment should facilitate the anther-specific expression of foreign genes in transgenic plants.

**Key words** Anther-specific expression, promoter, tobacco