

## 水曲柳节律基因 *LHY* 启动子的克隆和功能分析

王璇<sup>2</sup>, 曾凡锁<sup>1,2</sup>, 詹亚光<sup>1,2,\*</sup>, 何之龙<sup>2</sup>

东北林业大学<sup>1</sup>林木遗传育种国家重点实验室, <sup>2</sup>生命科学学院, 哈尔滨150040

**摘要:** 以水曲柳基因组DNA为模板, 用SiteFinding-PCR法扩增得到节律基因 *LHY* (late elongated hypocotyl) 启动子序列, 长度为1 360 bp。PLACE启动子预测工具分析表明, 序列中含有转录必备的TATA box、CAAT box以及一些非生物胁迫和激素响应元件等。构建植物GFP瞬时表达载体pPXGFP-P-LHY, 农杆菌介导转化烟草叶片和白桦悬浮细胞, GFP检测结果表明, *LHY*启动子能够启动GFP基因在烟草和白桦细胞中表达, 且对非生物胁迫(低温、高温、盐)产生响应; 构建植物GUS报告基因整合表达载体pPCXGUS-P-LHY, 农杆菌介导法瞬时转化烟草, GUS染色结果表明, *LHY*启动子的活性具有不同程度的时空特性。

**关键词:** *LHY*; 启动子; 克隆; 瞬时表达

## Cloning and Functional Analysis of the Circadian Gene *LHY* Promoter in *Fraxinus mandshurica*

WANG Xuan<sup>2</sup>, ZENG Fan-Suo<sup>1,2</sup>, ZHAN Ya-Guang<sup>1,2,\*</sup>, HE Zhi-Long<sup>2</sup>

<sup>1</sup>State Key Laboratory of Tree Genetics and Breeding, <sup>2</sup>College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin 150040, China

**Abstract:** The *LHY* promoter fragment (1 360 bp) was isolated and identified from the genomic DNA of *Fraxinus mandshurica* using the method of SiteFinding-PCR. Promoter sequence was analysed by PLACE, and the result showed that this fragment contained TATA box and CAAT box, as well as some elements which can respond to abiotic stress and hormones. Plant transient expression vector with report gene *GFP* (named as pPXGFP-P-LHY) was constructed, and then was transformed into *Nicotiana tabacum* leaves and *Betula platyphylla* cells through the *Agrobacterium* infection process. The result showed that the promoter of *LHY* could activate the expression of *GFP* gene in *N. tabacum* leaves and *B. platyphylla* cells, and this activation could respond to abiotic stress, such as cold, heat and salinity. Furthermore, another plant expression vector with report gene *GUS* (named as pPCXGUS-P-LHY) was constructed too, and after transformation to *N. tabacum* leaves by *Agrobacterium* infection, the activity of *LHY* promoter showed different in stem and leaf vein tissue.

**Key words:** *LHY*; promoter; cloning; transient expression

生物钟节律基因(简称节律基因)是一类新型的功能基因(转录因子), 其作用是产生和调控生物昼夜节律的运转(Yakir等2006)。对模式生物拟南芥的研究表明: *LHY* (late elongated hypocotyl)、*TOC1* (timing of CAB expression 1)、*CCA1* (circadian clock associated 1)相互作用, 在其昼夜节律的维持中起着至关重要的作用, 其中*TOC1*启动子中的相关蛋白结合域是其时钟调控的关键(Pokhilko等2012; Yerushalmi等2011)。由于节律基因还能够识别胁迫信号通路基因上游的调控元件并且能够调控植物对非生物胁迫作出响应, 这类基因对于植物逆境胁迫的研究具有巨大潜力。在拟南芥中, 三分之二的上调表达基因都和节律基因相关(Mas 2008; Mizuno和Yamashino 2008)。蓝藻是目前发

现的最简单的具有内源性生物钟节律的生物, 在蓝藻的许多生理过程中都表现出了一定的生物节律性(Hotta等2007)。节律基因可能在植物的各种生理活动中起着不可替代的作用, 如: 氨基酸吸收过程、固氮过程、植物代谢、淀粉合成等一些生理活动中(Strayer等2000; Harmer等2000; McClung 2006)。节律基因可能是控制它们的“大开关”。如果能清楚的了解节律基因在植物各种生理活动中所起的作用, 那么对于控制植物的生理活动将会有一个大的突破。启动子是植物基因表达与调控

收稿 2014-08-05 修定 2014-09-29

资助 国家科技支撑计划项目(2012BAD01B0503)和国家自然科学基金(31270697)。

\* 通讯作者(E-mail: yaguangzhan@126.com; Tel: 0451-82191752)。

的重要顺式作用元件,在转录水平上参与下游相应基因的表达,对启动子的克隆以及功能研究,对植物基因表达调控机制的研究有重要意义。

植物基因启动子克隆的方法很多,如:反向PCR (inverse PCR)、锚定PCR (anchored PCR)、T接头PCR (T-linker PCR)、交错式热不对称PCR (thermal asymmetric interlaced PCR)等(刘晓庆等2011; 杨予涛等2003)。本研究采用SiteFinding-PCR法,虽然此方法发明时间并不长,但是和以上方法相比较, SiteFinding-PCR法具有简单、快捷、敏感、有效、能够适应多种植物且成功率较高的优点(Tan等2005)。

有关节律基因的研究都是以模式生物拟南芥等为研究对象展开的,在树木中有关节律基因的报道很少。本研究是以水曲柳节律基因LHY启动子为研究对象,克隆了LHY启动子,对其序列特征及潜在的调控元件进行分析,并构建表达载体以研究其相关功能。

## 材料与方法

### 1 植物材料

水曲柳(*Fraxinus mandshurica* Rupr.)栽植于东北林业大学白桦强化种子园;烟草(*Nicotiana tabacum* L.)种子接种于MS培养基培育组培苗备用,白桦(*Betula platyphylla* Suk.)愈伤组织置于B<sub>5</sub>液体培养基(含0.6 mg·L<sup>-1</sup> TDZ和0.2 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA)培育白桦悬浮细胞备用。白桦悬浮细胞和烟草组培苗均培育于组培室(25 °C、光照时间为16 h·d<sup>-1</sup>、光强20~40 μmol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup>、湿度60%)。

### 2 菌株和质粒

根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) LBA-4404菌株、pPXGFP-P植物瞬时表达载体和pPCX-GUS-P植物表达载体为本实验室保存,大肠杆菌

(*Escherichia coli*) JM109、pMD18-T载体购自大连宝生物公司。

### 3 酶和化学试剂

*Pst*I、*Xma*I、*Xcm*I等限制性内切酶均购买自NEB公司, LA Taq聚合酶、rTaq聚合酶、T<sub>4</sub> DNA连接酶、RNase A、DNA Marker等购买自大连宝生物公司, DNA胶回收试剂盒购买自上海生工。

### 4 水曲柳LHY基因启动子的克隆和生物信息学分析

以水曲柳幼嫩叶片为试验材料,用CTAB法提取其基因组DNA(李金璐等2013; 詹亚光和曾凡锁2005),以其为模板,运用SiteFinding-PCR法进行PCR扩增。首先在LHY基因编码区5'端设计3轮巢式引物(表1、图1-B);其次20 μL PCR反应体系(2 μL 10×LA PCR Buffer、2 μL dNTP、2 μL SiteFinder引物、2 μL水曲柳基因组DNA、0.2 μL LA Taq、12.8 μL ddH<sub>2</sub>O)经25 °C低温退火,68 °C延伸(此过程缓慢升温),使SiteFinder引物锚定于目标DNA启动子区未知序列的某一位置,原始DNA其中一条链被由SiteFinder引物新扩增出来的单链所取代;最后以SiteFinder引物扩增出的双链DNA为巢式PCR第一轮模板,接下来每一轮PCR扩增均以上一轮PCR扩增产物(稀释100~500倍)为模板,在20 μL PCR扩增体系(2 μL 10×LA PCR Buffer、2 μL dNTP、2 μL LHY<sub>1-3</sub>、2 μL SFP<sub>1、2</sub>、DNA模板、0.2 μL LA Taq、9.8 μL ddH<sub>2</sub>O)和PCR扩增条件(94 °C预变性3 min; 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 5 min扩增32个循环; 72 °C延伸10 min)下经3轮巢式PCR扩增即可扩增出未知双链DNA序列(图1-B)。多轮巢式PCR扩增条带间的差异与多轮巢式引物间距(图1)一致的条带即可初步确定为目的条带。本研究用3轮巢式引物同时验证扩增结果减少了假阳性的概率,增加了旁侧序列克隆的成

表1 引物序列

Table 1 The PCR prime sequences

引物名称	引物序列(5'→3')
LHY1	GTGCATGGGCCCTACCTTAATTTAT
LHY2	AATCAATCACTTGTTCATCTCGCT
LHY3	ATGGGAGTTTCAGCAGGTGA
SFP1	CACGACACGCTACTCAACAC
SFP2	ACTCAACACACCCTCGCACAGC
SiteFinder	cacgacagctactcaacacaccctcgcacagcgtcctcaagcggccgcnnnnnngcct

功率(Tan等2005; 郑岑等2009; 罗丽娟和施季森2003)。PCR产物回收、纯化后连入pMD18-T载体,送至北京华大基因测序。

## 5 LHY启动子表达体系的构建

### 5.1 LHY启动子pPXGFP-P植物瞬时表达载体的构建

根据NCBI上查找到的植物瞬时表达载体pPXGFP-P的序列构建其质粒图谱,并对其分析。经分析选取*Pst*I和*Xma*I进行双酶切实验。根据已经获得的启动子序列,设计加入酶切位点和保护碱基的上游引物5'-tccccccgggCAAAATTATACAATTTCTTTTAA-3',下游引物5'-aaaactgcag-GTTGTGACTTGAAGTGAATGA-3',扩增目的片段。首先在37 °C条件下分别对pPXGFP-P和LHY启动子进行双酶切4 h,回收酶切后的pPXGFP-P和LHY启动子,然后在16 °C 6 h条件下用T<sub>4</sub>DNA连接酶连接,经转化、阳性克隆筛选等获得重组的植物瞬时表达载体。

### 5.2 LHY启动子pPCXGUS-P植物表达载体的构建

根据NCBI上查找到的植物表达载体pPCX-GUS-P序列构建其质粒图谱,并对其分析。经分析选取了*Xcm*I进行单酶切实验。根据已经获得的启动子序列,运用Primer5.0设计特异性上游引物:5'-ATCTCCAACCCATCCTTTACA-3',下游引物:5'-CAGATCCACCGTTTCCCAAT-3'。利用LA Taq扩增启动子后使其带有A尾,*Xcm*I酶切pPCX-GUS-P后使其酶切位点带有T尾这一特性,回收扩增的LHY启动子和酶切后的pPCXGUS-P,16 °C过夜条件下用T<sub>4</sub>DNA连接酶连接,经转化、阳性克隆筛选等获得重组的植物表达载体。

## 6 农杆菌介导下LHY启动子的表达

### 6.1 表达载体导入农杆菌

活化农杆菌LBA4404,用三亲杂交法(徐威等2003)将表达载体导入农杆菌。在含利福平(rifampicin, Rif) 30 mg·L<sup>-1</sup>、氨苄青霉素(ampicillin, Amp)/卡那霉素(kanamycin, Kan) 50 mg·L<sup>-1</sup>的YEB培养基上筛选阳性克隆。

### 6.2 LHY启动子在烟草中的瞬时表达

烟草种子脱毒(75%的乙醇浸泡90 s,用ddH<sub>2</sub>O冲洗3~5次,置于3%次氯酸钠浸泡3~5 min,用ddH<sub>2</sub>O冲洗3~5次,置于灭菌滤纸上吸干)后立即接

种于MS培养基,置于组培室培养,待长出3~4片叶片时可用于侵染。

将50 mL工程菌液6 000 g·min<sup>-1</sup>室温离心5 min,除上清,将沉淀悬浮于200 μmol·L<sup>-1</sup>的AS渗透培养液中(OD<sub>600</sub>=0.8),将制备好的渗透液喷洒于烟草叶片上,置于MS培养基26 °C组培室培养(光照时间16 h·d<sup>-1</sup>) 2 d,取出叶片,撕取叶表皮制成临时装片,置于荧光显微镜下观察实验结果。

### 6.3 在非生物胁迫下LHY启动子在白桦细胞中的瞬时表达

将工程菌(OD<sub>600</sub>=0.8)置于B<sub>5</sub>液体培养基(含0.6 mg·L<sup>-1</sup> TDZ和0.2 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA)中制备终浓度100 mg·L<sup>-1</sup>培养液,将生长良好的白桦悬浮细胞置于其中,放置在26 °C组培室(光照时间16 h·d<sup>-1</sup>) 150 r·min<sup>-1</sup>摇床上侵染24 h,分装4份,1份对照(组培室培养),另外3份分别进行低温(4 °C)、高温(37 °C)和NaCl (400 mmol·L<sup>-1</sup>)胁迫处理2 h;对照及每个处理均重复3次。制成临时装片,置于荧光显微镜下观察实验结果。

### 6.4 LHY启动子在烟草中的表达活性分析

取长出3~4叶的整株烟草浸泡于制备好的工程菌(OD<sub>600</sub>=0.8)中,在26 °C组培室(光照时间16 h·d<sup>-1</sup>)分别培养1、2、3 d(对照组和实验组均重复3次)。取出烟草放入GUS检测液中(Jefferson等1987),置于37 °C培养箱中染色24 h,75%乙醇脱色后观察实验结果。

## 实验结果

### 1 节律基因LHY启动子克隆

以水曲柳基因组DNA为模板,运用SiteFinding-PCR法,进行SiteFinder引物锚定;以SiteFinder锚定PCR产物为模板,以*SFP1*和*LHY1*为引物进行第1轮扩增,扩增结果如图1-A中泳道1所示;接下来每一轮PCR扩增均将上一轮PCR扩增产物稀释100倍做为模板,以*SFP2*和*LHY2*为引物进行第2轮扩增,扩增结果如图1-A中泳道2所示;以*SFP2*和*LHY3*为引物进行第3轮扩增,扩增结果如图1-A中泳道3所示。泳道1、2中箭头所示条带大小差异和引物*LHY1*、*LHY2*间距(图1-B)一致,泳道2、3中箭头所示条带大小差异和引物*LHY2*、*LHY3*间距(图1-B)一致,因此图1-A中箭头所指的PCR扩增产物可以

初步确定为*LHY*启动子片段,回收三轮PCR扩增产物,连入pMD18-T载体,经转化、阳性克隆筛选、测序获取其序列。测序得到的序列经NCBI同源比对和PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>)在线分析、预测确定其为*LHY*启动子片段。以测序得到的*LHY*启动子片段为模板设计多轮巢式引物,继续巢式PCR扩增,共克隆*LHY*启动子1 360 bp。

## 2 节律基因*LHY*启动子顺式作用元件的鉴定及分析

经PLACE在线分析、预测水曲柳*LHY*基因启

动子元件。分析结果表明,*LHY*基因启动子中含有重要的转录必备RNA聚合酶结合位点TATA box、CAAT box以及一些压力响应元件(如抗旱响应元件)和激素响应元件(如赤霉素、茉莉酸等的调控元件),此外,还有和节律相关的Circadian元件、光响应元件(AE-box、BOX1、GAG-motif、LAMP-element等)(表2),对这些元件的研究可以更准确的揭示*LHY*启动子在水曲柳生物节律中所扮演的角色。

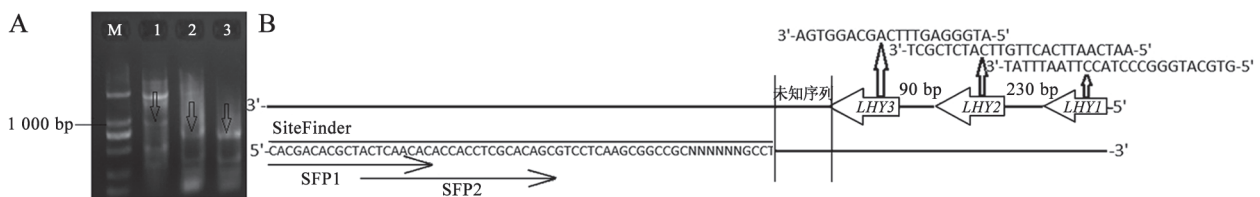


图1 水曲柳*LHY*基因启动子PCR扩增电泳和引物结合位点简图

Fig.1 PCR products of the promoter of the ashtree *LHY* gene and sketch map of primers

A: PCR扩增电泳。M: DL2000 Marker; 泳道1、2、3中箭头所指分别为1、2、3轮巢式PCR扩增产物。B: 引物结合位点简图。*LHY1*、*LHY2*、*LHY3*箭头所指为3轮巢式PCR引物序列,引物*LHY1*与*LHY2*、*LHY2*与*LHY3*的间距分别为230和90 bp,上划线的序列为SiteFinder引物(箭头上方对应的序列为*SFP1*和*SFP2*引物序列)。

表2 *LHY*基因启动子顺式作用元件分析

Table 2 Analysis of *LHY* promoter *cis*-acting elements

顺式调控元件	基序序列	生物学功能
5'UTR Py-rich Stretch	TTTCTCTCTCTCTC	赋予高转录水平的顺式作用元件
AE-box	AGAAACAT	光响应元件
ARE	AAACCA	厌氧感应不可少的顺式作用元件
BOX4	ATTAAT	参与光反应的保守DNA模块
BOX1	GTCCATCTAACCTACCAC	光响应元件
BOXIII	atCATTTCACt	蛋白结合位点
CAAT-box	CCAAT	启动子增强区常见顺式作用元件
CAT-box	GCCACT	与分生组织表达相关的顺式元件
CCAAT-box	CAACgg	具有MYBHv1约束力元件
CGTCA-motif	CGTCA	参与茉莉酸反应顺式作用元件
G-Box	CACGTG	光反应的顺式作用元件
G-box	CACGTA	光反应顺式作用元件
GAG-motif	AGAGAGT	光响应元件
GARE-motif	AAACAGA	赤霉素响应元件
GCN4-motif	TGAGTCA	参与胚乳表达的顺式作用元件
GT1-motif	GGTTAAT	光响应元件
LAMP-element	ACAGAATCTTATCC	光响应元件
MBS	CAACTG	参与抗旱诱发的MYB结合位点
P-box	CCTTatg	赤霉素响应元件
SKn-1-motif	GTCAt	胚乳表达所需的顺式作用元件
TATA-box	TATAAATT	核心启动子转录起始元素
TCCC-motif	TCTCCt	光响应元件
Unnamed-1	catgtCACGTGccaactg	CG-1因子结合位的
Unnamed-4	agaaatgCCACGTGGacgaatac	GBF3因子结合位点
TGACG-motif	TCTCct	参与茉莉酸反应的顺式作用元件
Circadian	CAAAGATATC	参与生物钟调控的顺式作用元件

### 3 pPXGFP-P和pPCXGUS-P植物表达载体的构建与鉴定

图2-A、B中显示出pPXGFP-P、pPCXGUS-P酶切前后的差异,初步断定它们线性化成功。T<sub>4</sub>DNA连接酶连接后的启动子和表达载体,构建成功的植物表达载体分别命名为pPXGFP-P-LHY(抗Amp)和pPCXGUS-P-LHY(抗Kan)。连接产

物转化至JM109大肠杆菌感受态细胞中,37℃暗培养24h,挑取单菌落分别接种在含有Amp/Kan(50 mg·L<sup>-1</sup>)的LB液体培养基中,37℃培养6~8h,碱裂解法提取质粒,以质粒为模板进行PCR扩增,检测结果如图2-C所示,连入pPXGFP-P和连入pPCXGUS-P的启动子序列长度和预期结果一致。

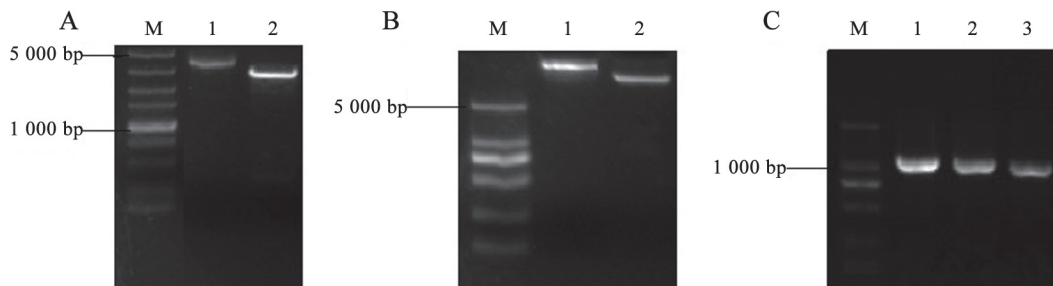


图2 pPXGFP-P与pPCXGUS-P重组质粒验证

Fig.2 Verification of recombinant pPXGFP-P and pPCXGUS-P

A: pPXGFP-P酶切验证。M: DL5000 Marker, 3: 质粒pPXGFP-P酶切前; 4: 质粒pPXGFP-P酶切后。B: pPCXGUS-P酶切验证。M: DL5000 Marker; 1、2分别为质粒pPCXGUS-P酶切前、后。C: PCR扩增验证。M: DL2000 Marker; 1: pPCXGUS-P-LHY农杆菌菌液PCR产物; 2: pPXGFP-P-LHY农杆菌菌液PCR产物; 3: *LHY*启动子大肠杆菌菌液PCR扩增产物。

### 4 瞬时GFP活性检测

瞬时表达载体pPXGFP-P中含有*GFP*报告基因,在荧光显微镜下用蓝光激发可观察到绿色荧光。图3显示,在低倍镜下,被pPXGFP-P-LHY工程菌侵染的烟草叶片,用蓝光激发可以明显观察到绿色荧光,而对照烟草叶片用蓝光激发则完全观察不到绿色荧光。由此说明重组入瞬时表达载体pPXGFP-P-LHY中的启动子*LHY*启动了表达,具有

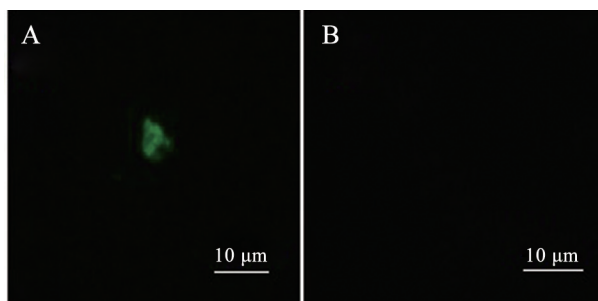


图3 荧光显微镜下烟草叶片的GFP检测

Fig.3 GFP test of *N. tabacum* leaves under fluorescence microscope

A: pPXGFP-P-LHY农杆菌侵染后的烟草叶片; B: pPXGFP-P空载农杆菌侵染后的烟草叶片(对照)。

启动活性。这对研究上游调控元件的表达机制提供了方法和可能。

对照(图4-A)显示,在荧光显微镜下用蓝光激发可观察到白桦细胞发出微弱的自发荧光,而被pPXGFP-P-LHY农杆菌侵染后的白桦细胞在蓝光激发下则发出明显的绿色荧光(图4-B),说明重组入表达载体pPXGFP-P-LHY中的启动子*LHY*启动了表达。在非生物胁迫下,启动子仍可启动表达,但是表达水平总体呈现降低趋势,从荧光的明亮程度看,与对照相比较,在低温(图4-C)和高温(图4-D)胁迫下表达水平显著降低,且高温胁迫降低趋势更加明显;在盐(图4-E)胁迫下表达水平相对升高了。对水曲柳节律基因*LHY*启动子元件分析显示其包含CAAT-box元件(响应高温胁迫),G-box广泛响应各种非生物胁迫(如低温、盐胁迫等),可能上/下调*LHY*启动子活性,这可能和*LHY*启动子中的相关保守元件的互作和对外源信号的响应相关。

### 5 GUS酶活性分析及组织特异性

为了检测整株烟草中*GUS*报告基因的表达。pPCXGUS-P空载体转入整株烟草中经GUS染色显示,烟草未呈现蓝色(图5-A),说明在烟草中pPCX-

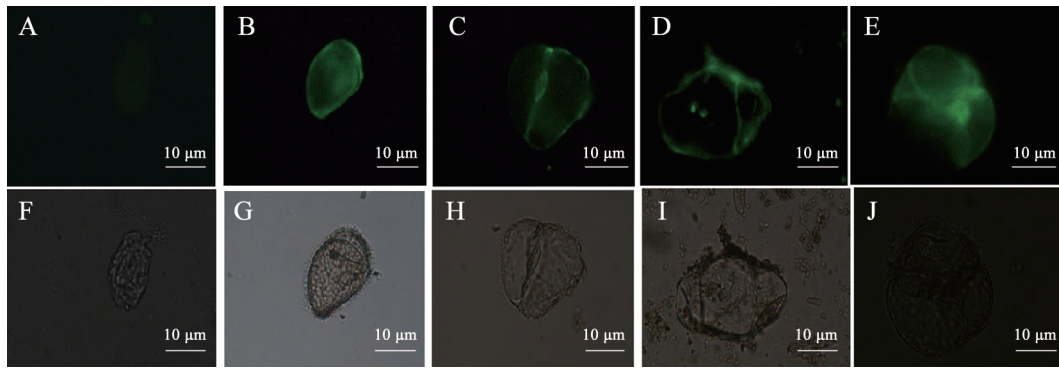


图4 荧光显微镜下白桦细胞的GFP检测

Fig.4 GFP test of *B. platyphylla* cells under fluorescence microscope

A~E: 蓝光激发下的白桦细胞; F~J: 自然光下的白桦细胞; A、F: pPXGFP-P空载农杆菌侵染(对照); B、G: pPXGFP-P-LHY农杆菌侵染; C、H: pPXGFP-P-LHY农杆菌侵染后又经低温处理; D、I: pPXGFP-P-LHY农杆菌侵染后又经高温处理; E、J: pPXGFP-P-LHY农杆菌侵染后又经NaCl处理。

GUS-P空载体中GUS报告基因没有表达。pPCX-GUS-P-LHY工程农杆菌侵染整株烟草1 d后, 经GUS染色显示, 烟草茎、叶脉中可观察到少许蓝色(图5-B); pPCXGUS-P-LHY工程农杆菌侵染整株烟草2 d后, 经GUS染色显示, 烟草茎中可观察到大面

积蓝色、叶脉中可观察到少许蓝色(图5-C); pPCX-GUS-P-LHY工程农杆菌侵染烟草3 d后, 经GUS染色显示, 烟草茎、叶脉中可观察到大面积蓝色, 根中少许蓝色(图5-D); 由此说明, *LHY*基因启动子具有组织特异性, 在茎和叶脉中具有强启动活性。

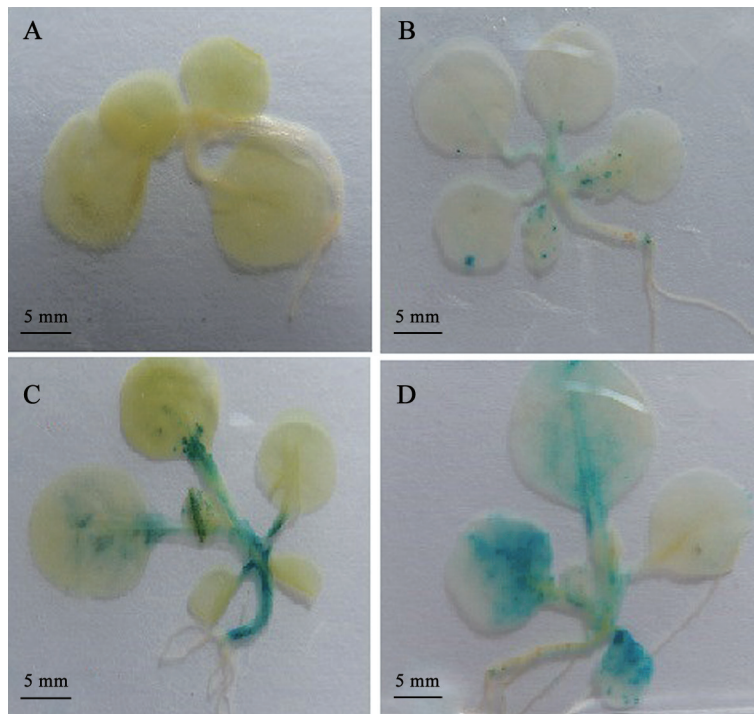


图5 pPCXGUS-P-LHY在烟草中瞬时表达的GUS染色

Fig.5 pPCXGUS-P-LHY transient expression in *N. tabacum* by GUS histochemical staining

A为pPCXGUS-P空载侵染烟草(对照); B、C、D分别为pPCXGUS-P-LHY工程农杆菌侵染1、2、3 d GUS染色后的烟草。

## 讨 论

本研究用SiteFinding-PCR法分离水曲柳LHY启动子, 该方法是根据已知序列设计多个嵌套的特异性引物进行巢式PCR, 特异地扩增基因组旁侧未知序列的PCR法。SiteFinding-PCR方法的关键就是SiteFinder引物的3'端GCCT寡核苷酸能否在较低的退火温度下和基因组DNA完成退火。可以根据不同的植物适当的调整SiteFinder引物的3'端寡核苷酸的组成和数量(Terauchi和Kahl 2000; 方进等2001), 因而此方法可用于扩增多种植物的旁侧未知序列。本研究运用SiteFinding-PCR法分离得到了水曲柳节律基因LHY基因上游1 360 bp启动子调控序列。

研究表明, 在光调控启动子中包含一些如G-box、GT1-motif等光诱导必需元件, 被称为光响应元件。GT1-motif元件在光响应启动子中的位置、数量等影响着植物的生物钟节律(Maruyama等2012)。对LHY启动子序列进行生物信息学分析, 预测其重要顺式作用元件, 发现LHY启动子序列含有多个光响应元件, 如G-box、GT1-motif、LAMP-element等, 2个茉莉酸响应元件TGACG-motif, 1个赤霉素响应元件P-box, 1个胚乳表达调控元件SKn-1-motif, 1个厌氧诱导元件ARE。说明水曲柳节律基因LHY可能是与逆境胁迫有关的启动子。这对水曲柳抗逆性的研究有重要意义。通过DNA重组技术融合了GFP和GUS报告基因, 实现了LHY启动子在烟草和白桦悬浮细胞中的瞬时表达。对烟草、白桦悬浮细胞的GFP和GUS检测揭示LHY启动子可激活GFP和GUS报告基因的表达, 说明其具有启动活性。对拟南芥启动子的研究表明, CCAAT-box元件响应高温胁迫, 报告基因GUS活性检测显示下调表达, 本研究图4-D结果与其一致; G-box元件响应多种非生物胁迫(低温、盐胁迫等), 该元件需要其他元件如ABRE、CE3等互作才能实现报告基因上/下调表达(Chow等2012; Sibénil等2001; Yamaguchi-Shinozaki和Shinozaki 2005)。水曲柳LHY启动子中各个元件的互作以及这些元件能否促进/抑制基因的转录效率, 元件调控启动子活性的机制都有待进一步研究。

## 参考文献

方进, 翟文学, 王文明, 李素文, 朱立煌(2001). 转基因水稻T-DNA侧翼序列的扩增与分析. 遗传学报, 28 (4): 345~351

- 李金璐, 王硕, 于婧, 王玲, 周世良(2013). 一种改良的植物DNA提取方法. 植物学报, 48 (1): 72~78
- 刘晓庆, 丁志鑫, 刘晶, 崔喜艳(2011). 2种PCR方法扩大大豆*rbcS*启动子5'侧翼序列比较. 吉林农业大学学报, 35 (5): 511~517
- 罗丽娟, 施季森(2003). 一种DNA侧翼序列分离技术——TAIL-PCR. 南京林业大学学报(自然科学版), 27 (4): 87~90
- 徐威, 朱春宝, 朱宝泉, 姚新生(2003). 利用电转化和三亲杂交方法高效转化根瘤农杆菌. 沈阳药科大学学报, 20 (6): 451~454
- 杨子涛, 杨国栋, 刘石娟, 郭兴启, 郑成超(2003). 一个光合组织特异表达强启动子的分离及功能分析. 中国科学: C 辑, 33 (4): 298~306
- 詹亚光, 曾凡锁(2005). 富含多糖的白桦成熟叶片 DNA 的提取方法. 东北林业大学学报, 33 (3): 24~25
- 郑岑, 张立平, 唐忠辉, 赵昌平, 苑少华(2009). TAIL-PCR技术及其在植物基因中的克隆. 基因组学与应用生物学, 28 (3): 544~548
- Chow BY, Helfer A, Nusinow DA, Kay SA (2012). ELF3 recruitment to the *PRR9* promoter requires other Evening Complex members in the *Arabidopsis* circadian clock. *Plant Signal Behav*, 7 (2): 170~173
- Harmer SL, Hogenesch JB, Straume M, Chang HS, Han B, Zhu T, Wang X, Kreps JA, Kay SA (2000). Orchestrated transcription of key pathways in *Arabidopsis* by the circadian clock. *Science*, 290 (5499): 2110~2113
- Hotta CT, Gardner MJ, Hubbard KE, Baek SJ, Dalchau N, Suhita D, Webb AA (2007). Modulation of environmental responses of plants by circadian clocks. *Plant Cell Environ*, 30 (3): 333~349
- Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW (1987). GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J*, 6 (13): 3901~3907
- Maruyama K, Todaka D, Mizoi J, Yoshida T, Kidokoro S, Matsukura S, Yamaguchi-Shinozaki K (2012). Identification of *cis*-acting promoter elements in cold- and dehydration-induced transcriptional pathways in *Arabidopsis*, rice, and soybean. *DNA Res*, 19 (1): 37~49
- Mas P (2008). Circadian clock function in *Arabidopsis thaliana*: time beyond transcription. *Trends Cell Biol*, 18 (6): 273~281
- McClung CR (2006). Plant circadian rhythms. *Plant Cell*, 18 (4): 792~803
- Mizoguchi T, Wheatley K, Hanzawa Y, Wright L, Mizoguchi M, Song HR, Carré IA, Coupland G (2002). *LHY* and *CCA1* are partially redundant genes required to maintain circadian rhythms in *Arabidopsis*. *Dev Cell*, 2 (5): 629~641
- Mizuno T, Yamashino T (2008). Comparative transcriptome of diurnally oscillating genes and hormone-responsive genes in *Arabidopsis thaliana*: insight into circadian clock-controlled daily responses to common ambient stresses in plants. *Plant Cell Physiol*, 49 (3): 481~487
- Pokhilko A, Fernández AP, Edwards KD, Southern MM, Halliday KJ, Millar AJ (2012). The clock gene circuit in *Arabidopsis* includes a repressilator with additional feedback loops. *Mol Syst Biol*, 8 (1): 574~586
- Sibénil Y, Benhamron S, Memelink J, Giglioli-Guivarc'h N, Thiersault M, Boisson B, Doireaup P, Gantet P (2001). *Catharanthus roseus*

- G-box binding factors 1 and 2 act as repressors of strictosidine synthase gene expression in cell cultures. *Plant Mol Biol*, 45 (4): 477~488
- Strayer C, Oyama T, Schultz TF, Raman R, Somers DE, Más P, Panda S, Kreps JA, Kay SA (2000). Cloning of the *Arabidopsis* clock gene *TOC1*, an autoregulatory response regulator homolog. *Science*, 289 (5480): 768~771
- Tan G, Gao Y, Shi M, Zhang X, He S, Chen Z, An C (2005). SiteFinding-PCR: a simple and efficient PCR method for chromosome walking. *Nucleic Acids Res*, 33 (13): e122
- Terauchi R, Kahl G (2000). Rapid isolation of promoter sequences by TAIL-PCR: the 5'-flanking regions of *Pal* and *Pgi* genes from yams (*Dioscorea*). *Mol Gen Genet*, 263 (3): 554~560
- Yakir E, Hilman D, Harir Y, Green RM (2006). Regulation of output from the plant circadian clock. *FEBS J*, 274 (2): 335~345
- Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K (2005). Organization of *cis*-acting regulatory elements in osmotic- and cold-stress-responsive promoters. *Trends Plant Sci*, 10 (2): 88~94
- Yerushalmi S, Yakir E, Green RM (2011). Circadian clocks and adaptation in *Arabidopsis*. *Mol Ecol*, 20 (6): 1155~1165