

盐角草磷酸乙醇胺 N-甲基转移酶基因 (*SePEAMT*) 启动子的克隆及瞬时表达*

马赛箭 苏乔** 吴淞 安利佳

(大连理工大学环境与生命学院生物科学与工程系 大连 116024)

摘要 磷酸胆碱是合成磷脂酰胆碱和甘氨酸甜菜碱的重要前体,磷酸乙醇胺 N-甲基转移酶(*PEAMT*)是磷酸胆碱合成的关键酶。根据已知的 *SePEAMT* cDNA 5'端序列设计 2 个基因特异的反向引物(PP1, PP2),通过锚定 PCR 获得了 *PEAMT* 起始密码子上游 1249bp 的序列。RLM-RACE 反应确定其转录起始位点 A 位于起始密码子上游 301bp 处,由此获得了 948bp 的 *SePEAMT* 启动子序列。PlantCARE 和 PLACE 在线启动子预测工具分析表明:该序列除了含有启动子的基本元件 TATA-box 和 CAAT-box 外,还含有一些胁迫诱导元件(如 ABRE、HSE、LTR)和花粉特异的激活元件 AGAAA。构建了 *SePEAMT* 启动子与报告基因 GUS 融合的表达载体 pPro,并通过农杆菌介导的叶盘法转化烟草,染色结果表明 *SePEAMT* 启动子可以有效地驱动 GUS 基因的瞬时表达。

关键词 磷酸乙醇胺 N-甲基转移酶 锚定 PCR 启动子 序列分析 瞬时表达

中图分类号 Q785

胆碱是一种重要的代谢物质,它不仅是合成细胞膜主要成分磷脂酰胆碱的底物,而且还可以在许多植物的叶绿体中经过两步氧化生成甘氨酸甜菜碱。许多生物在高盐、干旱、低温等逆境胁迫下可在体内积累甘氨酸甜菜碱,从而起到维持细胞膨压、稳定酶和细胞膜结构、清除自由基和保护光合系统复合物等作用^[1]。在植物中,催化胆碱生成甘氨酸甜菜碱的 2 个氧化酶分别是胆碱单氧化酶(CMO)和甜菜碱醛脱氢酶(BADH)。CMO 和 BADH 已通过基因工程手段转入到许多植物体中,但甘氨酸甜菜碱的积累并不显著,植物抗逆性的提高也不十分明显,这在很大程度上是因为合成前体胆碱的供给不足^[2,3]。胆碱是由磷酸乙醇胺在磷酸乙醇胺 N-甲基转移酶(*PEAMT*)的作用下,经过三步甲基化而生成的。据报道,在转入 CMO 和 BADH 的烟草中过表达 *PEAMT* 可使磷酸胆碱和游离胆碱分别比对照提高 5 倍和 50 倍,胆碱的增加使甘氨酸甜菜碱的合成量提高 30 倍且不影响磷脂酰胆碱的含量和植物的生长^[4]。

200mmol/L NaCl 处理的菠菜中 *PEAMT* mRNA 的丰度比未经盐处理的高近 10 倍^[5]。Charron 等^[6]的 Northern 杂交结果也显示:小麦 *PEAMT* 的转录水平在低温和 NaCl 处理后会大幅提高,在 ABA 和水分胁迫下也会有一定量的提高。上述研究表明 *PEAMT* 基因受逆境胁迫诱导表达。另外,*PEAMT* 沉默的拟南芥植株表现出一系列的形态学特征,包括叶片白化、早衰和对温度敏感的雄性不育,这说明 *PEAMT* 不仅关系到甜菜碱的合成,同时也影响植物的正常生长和发育^[7]。因此,克隆并分析其上游启动子序列以进一步研究 *PEAMT* 的表达调控是十分必要的。目前 *PEAMT* 启动子序列只从玉米中克隆获得^[8],且没有进一步的表达分析报道。

盐角草(*Salicornia europaea*)是双子叶盐生植物,可在含盐 3.5% 以上的湿地生长,其体内主要的渗透调节物质是甜菜碱和 Na⁺。本实验室已通过 RLM-RACE 获得了 *SePEAMT* cDNA 序列(Genbank 登录号: DQ659144),此基础上我们用锚定 PCR 法^[9]获得 *PEAMT* 5'侧翼序列,并利用 PlantCARE 和 PLACE 进行序列分析。然后将此启动子序列与报告基因 GUS 融合获得植物表达载体并转化烟草进行瞬时表达分析。

收稿日期:2008-03-12 修回日期:2008-04-03

* 辽宁省科技计划资助项目(2006208001)

** 通讯作者,电子信箱:dsuqiao@yahoo.com.cn

1 材料和方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 实验材料 盐角草种子采自辽宁省大连市海边,在实验室萌发后栽培于蛭石中;大肠杆菌 Top10、根癌农杆菌 LBA4404、植物表达载体 pBI121 由本实验室保存。

1.1.2 实验试剂 限制性内切酶、连接酶、pMD18T 载体和 DNA 回收试剂盒购自 TaKaRa(大连)公司;引物由 TaKaRa(大连)公司合成。

1.2 方法

1.2.1 盐角草总 DNA 的提取 以盐角草嫩茎为材料,采用 CTAB 法提取总 DNA^[10]。

1.2.2 锚定 PCR 法克隆 *PEAMT* 5'侧翼序列 根据本实验室已克隆获得 *SePEAMT* 全长序列,设计合成两条上游启动子嵌套引物:PP1: 3'-GTTACCGACGAAGTCC TGAACCTC-5', PP2:3'-GGAGGTA AAAACTTAGATGAC A-5'。

(1) DNA 单引物的 PCR 扩增 以盐角草总 DNA 为模板,在 50 μ l PCR 反应体系中加入 5 μ l (2.5mmol/L) dNTP,5 μ l 10 \times LA buffer,10 pmol PP1 引物和 2 μ g DNA 模板。反应程序为:97 $^{\circ}$ C 预变性 7min 后,立即加入 2.5U LA Tag;94 $^{\circ}$ C 变性 30s,60 $^{\circ}$ C 退火 30s,72 $^{\circ}$ C 延伸 2min30s, 25 个循环。PCR 扩增产物用 DNA 回收试剂盒回收。

(2) TdT 加尾及巢式 PCR 扩增 回收产物中加入 10 μ l 加尾缓冲液(5 \times),1 μ l 10mmol/L dCTP,5 μ l (20mg/ml) BSA 和 ddH₂O 至 49 μ l;反应混合物先在 94 $^{\circ}$ C 保温 3min 后,立即置于冰上 5min;加入 15U 末端转移酶 TdT (TaKaRa) 后在 37 $^{\circ}$ C 温育 12h 以上,再在 97 $^{\circ}$ C 保温 20min 使末端转移酶失活。以 PP2 和 Oligo G 为引物,对加尾产物进行 PCR 扩增,反应条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5min;94 $^{\circ}$ C 变性 30s,50 $^{\circ}$ C 退火 30s,72 $^{\circ}$ C 延伸 2min,35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 7min。

(3) PCR 产物回收及连接转化 PCR 扩增产物经凝胶电泳后,切取 1~2kb 区域的凝胶并用试剂盒回收,将回收产物连接在 pMD18-T 载体上,转化大肠杆菌 Top10。提取质粒 DNA,用正向引物 *PEAMTS* (5'-ACAACAAACACTCCCGATTTCATAG-3') 和反向引物 PP2 进行 PCR 检测,PCR 阳性质粒用 *Bam*HI 和 *Hind*III 双酶切后选插入片段最长的克隆进行测序。

1.2.3 *PEAMT* 启动子植物表达载体的构建及转化

(1) 启动子的扩增 根据 *SePEAMT* 5'侧翼序列设计一对引物 PPF:5'-CGCGGATCCTGCCAAGAATAAGCAAA CCT-3',PPR:5'-TCCCCGGGGTTATATA ATA GTACA GT AG-3',在引物 5'端分别引入 *Bam*HI 和 *Sma*I 酶切位点。以含有 *SePEAMT* 启动子的重组质粒为模板进行 PCR 扩增,并将 PCR 产物进行酶切和纯化。

(2) 植物表达载体的构建 植物表达载体 pBI121 用 *Hind*III 和 *Xba*I 酶切去掉 CaMV35S 启动子之后末端补平并连接,再用 *Bam*HI 和 *Sma*I 酶切,在 T₄ DNA 连接酶的作用下与回收的 *PEAMT* 启动子片段连接。连接产物转化大肠杆菌,获得 *PEAMT* 启动子与 GUS 基因融合的表达载体,命名为 pPro。然后以 PPF 和 PPR 为引物对 pPro 质粒进行 PCR 检测,并用 *Bam*HI 和 *Sma*I 对该质粒进行酶切验证。

(3) 农杆菌介导的烟草转化 将 pPro,pBI121 和去掉 35S 启动子的 pBI121 质粒通过冻融法^[11] 导入农杆菌 LBA4404 中,获得可用于烟草转化的工程菌菌株。然后用农杆菌介导的叶盘法转化烟草,并以未转化的烟草作为阴性对照。

1.2.4 GUS 基因瞬时表达检测 将转化后共培养 2d,再转入筛选培养基上培养 3~5d 的烟草叶片用 ddH₂O 冲洗 2~3 遍后,加入 X-Gluc 染色液(0.1mol/L 磷酸钠缓冲液 pH7.0,5mmol/L K₃[Fe(CN)₆],5mmol/L K₄[Fe(CN)₆],0.1% Triton X-100,2mmol/L X-Gluc) 37 $^{\circ}$ C 下密封染色过夜^[12]。然后分别用 50%、75% 和 100% 的乙醇脱至无色,观察染色结果。

2 结果与分析

2.1 *SePEAMT* 上游启动子序列的获得

在用锚定 PCR 法进行 *SePEAMT* 上游序列的扩增中,单引物线性 PCR 扩增后没有任何条带,而用巢式引物和锚定引物对加尾产物进行 PCR 扩增后的产物在泳道上呈弥散状,显示有不同大小的片段得到了扩增,其中小片段较大片段要多一些(图 1)。切取 1~2kb 区域的凝胶,回收后与 pMD18-T 连接并转化大肠杆菌 Top10。挑取 12 个单菌落分别在含 100mg/L 氨苄的液体 LB 培养基中 37 $^{\circ}$ C 培养过夜,以菌液为模板,*PEAMTS* 和 PP2 为引物进行 PCR 检测。在这 12 个单菌落中,只有 1、3、4、7 和 11 能扩增出目的片段,其中 3、4 和 11 信号较强(图 2)。酶切后选插入片段最长的质粒进行测序。经测序我们获得了 1 249bp 的 *SePEAMT* 5'侧翼序

列, 该序列已提交 Genbank, 登录号为 DQ659143。

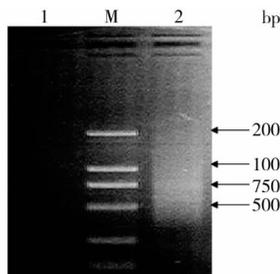


图 1 *PEAMT* 启动子的 PCR 电泳图

Fig. 1 PCR amplification of the *PEAMT* promoter

1: Single primer amplification; M: DL2000

Marker; 2: nested-primer amplification

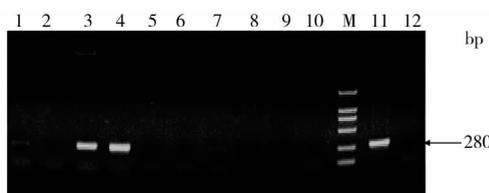


图 2 部分克隆插入启动子片段的 PCR 检测

Fig. 2 PCR amplification of the inserted promoter fragment

1~12: PCR product of different recombinants;

M: DL2000 Marker

2.2 *SePEAMT* 启动子序列分析

在获得 *SePEAMT* 全长 cDNA 的 RLM-RACE 反应中, 我们确定了其转录起始位点为 A, 位于起始密码子上游 301bp 处。用 PlantCARE 和 PLACE 软件 (<http://sphinx.rug.ac.be:8080/PlantCARE/index.htm> and <http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>) 分析发现 *SePEAMT* 5' 侧翼序列具有启动子的基本转录元件 TATA-box 和 CAAT-box, 分别位于转录起始位点上游 35bp 和 170bp。进一步分析发现该序列含有几个非生物胁迫诱导元件, 包括脱落酸诱导元件 ABRE、热激应答元件 HSE 和低温诱导元件 LTR; 此外该序列还存在一个生长素响应的顺式元件 AuxRR-core, 两个赤霉素响应元件 GARE-motif, P-box 和几个光诱导元件 (1 个 Box I, 1 个 GT1-motif 和 2 个 Sp1 元件)。另外, 在该序列中还发现了花粉特异的激活元件 AGAAA (图 3)。

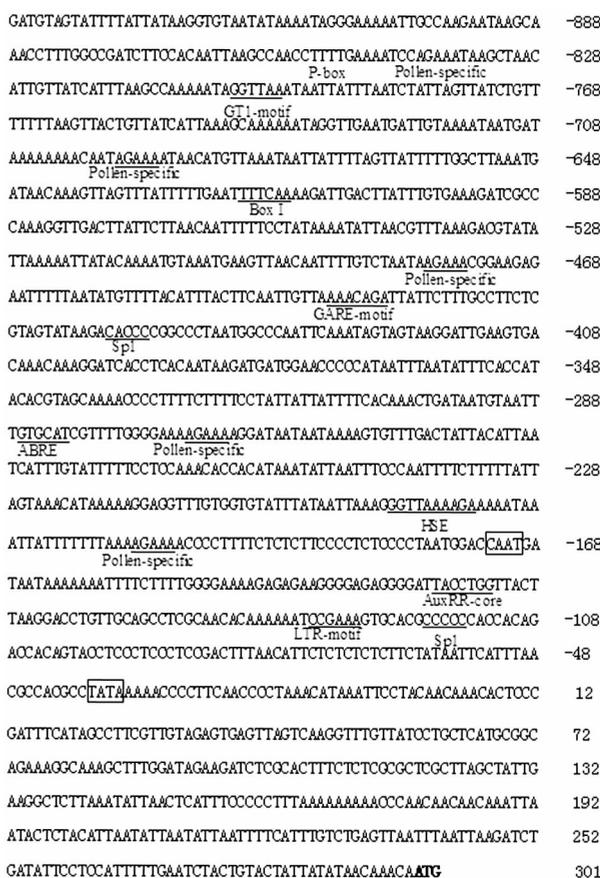


图 3 *SePEAMT* 基因 5' 侧翼序列分析

Fig. 3 Sequence analysis of the 5'-flanking region of *SePEAMT* gene

The transcription initiation site is highlighted in gray and translation start site is shown in bold letters. The TATA and CAAT are shown in box and other potential binding sites for transcription factors predicted by the software are underlined

2.3 植物表达载体的构建和 GUS 瞬时表达分析

将 PCR 扩增获得的 *SePEAMT* 启动子序列与双元载体 pBI121 上的 CaMV35S 启动子替换, 构建植物表达载体 pPro (图 4A)。pPro 质粒经过 PCR 和酶切后得到与预期一致的目的带, 说明此重组质粒即为目的质粒 (图 4B 和图 4C)。用该重组质粒转化根癌农杆菌 LBA4404 并利用农杆菌介导法转化烟草。烟草叶盘的 GUS 瞬时染色结果表明, *PEAMT* 启动子同 *CaMV35S* 启动子一样可以驱动下游 GUS 报告基因在烟草中瞬时表达, 而未转化的和去掉 35S 启动子的阴性对照烟草叶片中没有 GUS 的表达, 说明 *PEAMT* 具有启动子活性 (图 5)。

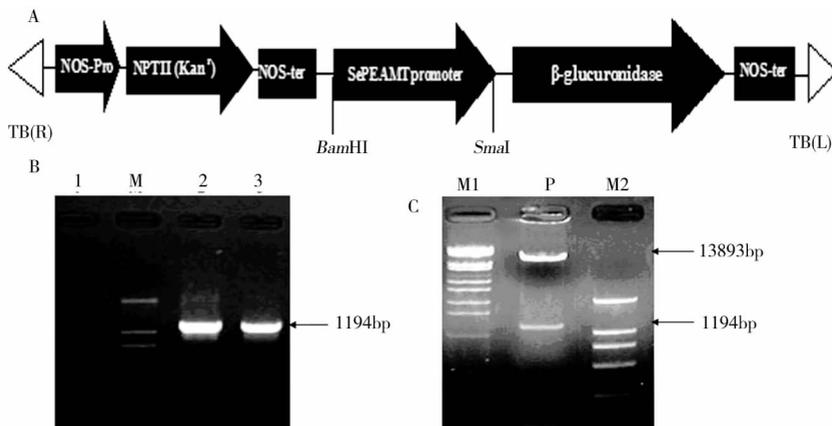


图4 *SePEAMT* 启动子表达载体 pPro 的检测及结构示意图

Fig. 4 Diagram and identification of the pPro expression vector

(A) Diagram of the pPro expression vector TB(R) and TB(L): Right and left T-border (B) PCR amplification of the pPro 1: ddH₂O; 2, 3: PCR amplification products of pPro plasmid DNA; M: DL2000 marker (C) Restrictive enzyme digestion analysis of pPro P: *Bam*HI and *Sma*I double digestion of the plasmid DNA; M1: λ -*Eco*T14 marker; M2: DL2000 marker

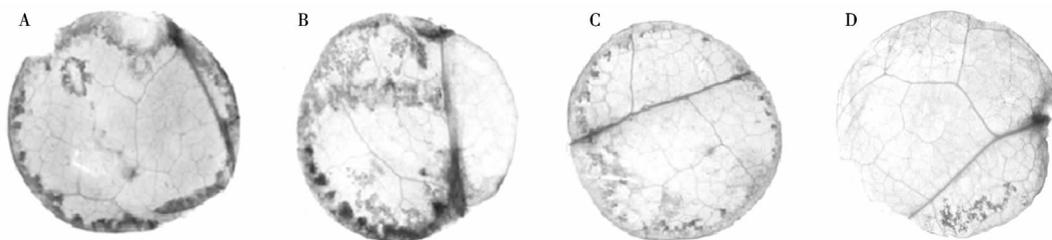


图5 烟草叶盘的 GUS 瞬时表达分析

Fig. 5 Transient expression of GUS gene in tobacco leaf discs

(A) GUS transient expression driven by positive control CaMV35S promoter (B) GUS transient expression driven by *SePEAMT* promoter (C) Untransformed negative control (D) 35S promoterless pBI121 negative control

3 讨论

作为一种重要的甲基化转移酶, PEAMT 的编码区序列已陆续从菠菜、小麦、滨藜和玉米中克隆获得^[5,6,8,13], 其蛋白结构和酶学特征也有了一定的了解, 但表达调控方面的报道还很少^[5,6]。启动子是研究基因表达调控的一个重要工具, 目前只有玉米 *PEAMT* 启动子克隆和序列分析的研究报道^[8]。我们用锚定 PCR 法克隆了 *SePEAMT* 启动子序列, 经在线软件分析后发现在 *ZmPEAMT* 和 *SePEAMT* 启动子中存在相同的赤霉素响应元件、低温和光诱导元件及花粉特异表达元件, 表明 *PEAMT* 基因可能受赤霉素、低温和光诱导表达。花粉特异表达元件的存在暗示 *PEAMT* 启动子可能驱动下游基因在花粉中的表达, CaMV35S 启动子虽然被认为是一个很强的组成型启动子, 但研究表明它在烟

草、拟南芥等植物的花粉中的活性很小甚至没有^[14,15]。*SePEAMT* 启动子中还有 ABRE 和 HSE 元件, 表明它可能还受 ABA 和热激的调控。

为进一步研究 *SePEAMT* 启动子的活性, 我们构建了该启动子与报告基因 GUS 融和的表达载体, 并通过农杆菌介导法转化烟草。在经 X-Gluc 染色的烟草叶盘中, 检测到了较强的 GUS 表达, 初步验证了所克隆的 *SePEAMT* 5'侧翼序列具有启动子活性, 为下一步进行 *SePEAMT* 启动子系列删除、组织特异性表达分析和对非生物胁迫的响应研究奠定了基础。

参考文献

- [1] Shen Y G, Du B X, Zhang W K, et al. AhCMO, regulated by stresses in *Atriplex hortensis*, can improve drought tolerance in transgenic tobacco. Theoretical and Applied Genetics, 2002, 105 (6-7): 815 ~ 821

- [2] Nuccio M L, Russell B L, Nolte L D, et al. The endogenous choline supply limits glycine betaine synthesis in transgenic tobacco expressing choline monoxygenase. *Plant Journal*, 1998, 16 (4): 487 ~ 496
- [3] Huang J, Hirji R, Adam L, et al. Genetic engineering of glycinebetaine production toward enhancing stress tolerance in plants: metabolic limitations. *Plant Physiology*, 2000, 122 (3): 747 ~ 756
- [4] McNeil S D, Nuccio M L, Ziemak M J, et al. Enhanced synthesis of choline and glycine betaine in transgenic tobacco plants that over-express phosphoethanolamine N-methyltransferase. *Plant Biology*, 2001, 98 (17): 10001 ~ 10005
- [5] Nuccio M L, Ziemak M J, Henry S A, et al. cDNA cloning of phosphoethanolamine N-methyltransferase from spinach by complementation in *Schizosaccharomyces pombe* and characterization of the recombinant enzyme. *The Journal of Biological Chemistry*, 2000, 275 (19): 14095 ~ 14101
- [6] Charron J F, Breton G, Danyluk J, et al. Molecular and biochemical characterization of a cold-regulated phosphoethanolamine N-methyltransferase from wheat. *Plant Physiology*, 2002, 129(1): 363 ~ 373
- [7] Mou Z L, Wang X Q, Fu Z M, et al. Silencing of phosphoethanolamine N-methyltransferase, results in temperature-sensitive male sterility and salt hypersensitivity in *Arabidopsis*. *The Plant Cell*, 2002, 14: 2031 ~ 2043
- [8] Wu S W, Yu Z W, Wang F G, et al. Cloning, characterization, and transformation of the phosphoethanolamine N-methyltransferase gene (*ZmPEAMT1*) in maize (*Zea mays* L.). *Molecular Biotechnology*, 2007, 36(2): 102 ~ 112
- [9] 陈柏君, 孙超, 王勇, 等. 锚定 PCR (Anchored PCR): 一种新的染色体步行方法. *科学通报*, 2004, 49(15): 1569 ~ 1571
Chen B J, Sun C, Wang Y, et al. *Chinese Science Bulletin*, 2004, 49(15): 1569 ~ 1571
- [10] Doyle J J, Doyle J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 1990, 12: 552 ~ 555
- [11] Höfgen R, Willmitzer L. Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation. *Nucleic Acids Research*, 1988, 16 (20): 9877
- [12] Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants: the gus gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter*, 1987, 5: 387 ~ 405
- [13] Tomoki T, Yusuke K, Tetsushi A, et al. Similar regulation patterns of choline monoxygenase, phosphoethanolamine N-methyltransferase and S-adenosyl-L-methionine synthetase in leaves of the halophyte *Atriplex nummularia* L. *Plant Cell Physiology*, 2005, 46(3): 505 ~ 513
- [14] Wilkinson J E, Twell D, Lindsey K. Activities of CaMV 35S and nos promoters in pollen: implications for field release of transgenic plants. *Journal of Experimental Botany*, 1997, 48 (307): 265 ~ 275
- [15] Mascarenhas J P, Hamilton D A. Artifacts in the localization of GUS activity in anthers of petunia transformed with a CaMV 35s-GUS construct. *The Plant Journal*, 1992, 2(3): 405 ~ 408

Isolation and Transient Expression Assay of *PEAMT* Gene Promoter from *Salicornia europaea*

MA Sai-jian SU Qiao WU Song AN Li-jia

(Department of Bioscience and Biotechnology, School of Environmental & Biological Science & Technology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract Phosphoethanolamine N-methyltransferase (*PEAMT*) is a key enzyme that catalyzes the synthesis of phosphocholine, which is an important precursor of phosphatidylcholine and glycine betaine. A 1249bp 5'-flanking region of phosphoethanolamine N-methyltransferase gene was isolated by anchored PCR, based on the cDNA sequence of *PEAMT* from halophyte *Salicornia europaea*. The transcription start site was identified as A and localized at 301bp upstream of the ATG according to the results of RLM-RACE. In *SePEAMT* promoter region, many potential cis-acting elements were predicted by PlantCARE and PLACE programs. Aside from the basal transcriptional elements TATA-box and CAAT-box, some stress-responsive motifs such as ABRE, HSE and LTR were found. In addition, some pollen-specific activation-related elements were also present in this region. Binary expression vector was constructed by fusing *SePEAMT* promoter with GUS gene and designated as pPro. The pPro was transferred into tobacco by *Agrobacterium*-mediated transformation and transient GUS expression analysis indicated that *SePEAMT* promoter could drive strong GUS expression.

Key words Phosphoethanolamine N-methyltransferase Anchored PCR Promoter sequence analysis Transient expression