

阳春砂萜类合酶 AvTPS1 启动子的克隆及其活性分析

王 虹, 李 萌, 马东明, 叶 鹏, 詹若挺, 杨锦芬*

广州中医药大学中药资源科学与工程研究中心, 岭南中药资源教育部重点实验室(广州中医药大学), 国家中成药工程技术研究中心南药研发实验室, 广东 广州 510006

摘 要: 目的 获得药用植物阳春砂 *Amomum villousm* 的萜类合酶基因 AvTPS1 的启动子并进行活性分析。方法 从阳春砂叶片基因组 DNA (gDNA) 中克隆获得 AvTPS1 基因, 再通过 FPNI-PCR 的方法从阳春砂叶片 gDNA 中克隆 AvTPS1 的启动子并进行序列分析, 构建由该启动子驱动 β -葡萄糖苷酸酶基因 (GUS) 的重组表达载体 pCAM-AvTPS1p, 利用农杆菌介导法注射侵染烟草 *Nicotiana benthamiana* 叶片进行瞬时表达来验证 AvTPS1 启动子的活性。结果 获得 AvTPS1 的 gDNA 序列长度为 2 444 bp, 经过序列比对发现 AvTPS1 含有 7 个外显子和 6 个内含子; 通过 FPNI-PCR 成功获得 568 bp 的 AvTPS1 启动子序列, 其含有 10 种顺式作用元件, 包括保守元件 TATA-box 和 CAAT-box, 以及可被转录因子 MYC 结合的 G-box 等; 通过 GUS 染色发现 AvTPS1 启动子启动了 GUS 基因的表达, 使转基因烟草叶片呈现蓝色。结论 AvTPS1 启动子被成功克隆, 且通过实验验证其具有启动基因表达的功能, 为进一步研究 AvTPS1 在萜类合成途径的功能及其受转录因子调节的机制奠定了基础。

关键词: AvTPS1; 启动子; 阳春砂; 瞬时表达; FPNI-PCR

中图分类号: R282.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2019)09-2181-07

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2019.09.025

Cloning and activity analysis of AvTPS1 promoter of terpene synthase from *Amomum villousm*

WANG Hong, LI Meng, MA Dong-ming, YE Peng, ZHAN Ruo-ting, YANG Jin-fen

Research Center of Chinese Herbal Resource Science and Engineering, Guangzhou University of Chinese Medicine; Key Laboratory of Chinese Medicinal Resource from Lingnan (Guangzhou University of Chinese Medicine), Ministry of Education Joint Laboratory of National Engineering Research Center for Pharmaceuticals of Traditional Chinese Medicines, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective To clone the unknown sequence of terpene synthase (TPS) AvTPS1 promoter from *Amomum villousm* and analyze its activity. **Methods** In this research, AvTPS1 DNA sequence was amplified and cloned from genomic DNA (gDNA) of *A. villousm* leaves. Furthermore, the promoter of AvTPS1 was cloned by FPNI-PCR and the sequence was analyzed. The recombinant vector pCAM-AvTPS1p with AvTPS1 promoter for the expression of GUS gene was constructed. The activity of AvTPS1 promoter was verified by transient expression of *Agrobacterium*-mediated infiltration using the leaves of *Nicotiana benthamiana*. **Results** The gene sequence of AvTPS1 was 2 444 bp including seven exons and six introns. The 568 bp AvTPS1 promoter was successfully cloned using FPNI-PCR. Furthermore the sequence had ten kinds of cis-elements including conserved elements TATA-box, CAAT-box, MYC2 related element G-box and other elements. Finally, the GUS staining showed the tobacco leaves infiltrated by the pCAM-AvTPS1p were blue. **Conclusion** The AvTPS1 promoter can drive the transcription of GUS gene and then it was verified to have the promoter activity. These results give foundation for future research on the function of AvTPS1 involved in the terpenoid biosynthesis and its relationship with the transcription factors.

Key words: AvTPS1; promoter; *Amomum villousm* Lour.; transient expression; FPNI-PCR

姜科植物阳春砂 *Amomum villosum* Lour. 的干燥成熟果实是中药砂仁的主要来源之一, 具有化湿开胃、温脾止泻、理气安胎的功效, 主要药效物质挥发油富含乙酸龙脑酯、樟脑、龙脑等萜类化合物^[1]。

植物萜类化合物合成的 2 条途径已经很明确, 1 条位于细胞质中的甲羟戊酸途径 (mevalonate pathway, MVA), 另外 1 条则是位于质体中的脱氧木酮糖-5-磷酸途径 (1-deoxy-D-xylulose-5-phosphate

收稿日期: 2018-11-08

基金项目: 国家自然科学基金青年基金项目 (81303163); 广东省高等学校优秀青年教师培养计划 (Yq2013042)

作者简介: 王 虹 (1992—), 女, 在读硕士研究生。Tel: 13724082624 E-mail: 519775094@qq.com

*通信作者 杨锦芬 (1978—), 女, 研究员, 研究方向为药用植物萜类化合物生物合成与调控。Tel: (020)39358331 E-mail: yangjf@gzucm.edu.cn

pathway, DXP)。在挥发性萜类生物合成下游途径, 由 FPP 和 GPP 经萜类合酶 (terpenoid synthase, TPS) 通过骨架重排等过程催化形成丰富多样的萜类化合物, 如单萜、倍半萜等^[2]。目前很多文献已经报道了 TPS 参与萜类的合成, 例如, 在青蒿 *Artemisia annua* L. 中 AaTPS2、AaTPS5 可以催化底物 GPP 产生多个萜类产物; 在胡萝卜 *Daucus carota* L. 根中 DcTPS1 是一个参与生成 (*E*)- β -石竹烯的倍半萜合酶, DcTPS2 是一个参与香叶醇合成的单萜合酶^[3-4]。

AvTPS1 是基于阳春砂转录组数据挖掘得到的萜类合酶基因^[5], 本课题组已经克隆该基因并通过实验鉴定其具有蒎烯合成酶的功能。启动子是精确调控基因在植物体内表达的重要元件, 是一段 DNA 非编码序列, 一般位于结构基因的 5' 端上游, 是基因转录调控的中心, 可以被 RNA 聚合酶识别、结合, 然后启动下游基因转录^[6]。有文献报道转录因子可以通过反式结合启动子进而调控萜类的合成, 拟南芥 *Arabidopsis thaliana* L. 中 MYC2 通过直接结合倍半萜合酶 AtTPS21 和 AtTPS11 的启动子激活了它们的表达^[7]; 通过对番茄 *Solanum lycopersicum* L. 腺毛转录组分析发现其 2 个转录因子反式激活若干个萜类合酶的启动子, 参与了萜类的生物合成^[8]。本实验对 AvTPS1 启动子的研究是探究阳春砂中的转录因子对萜类合酶表达调控的基础。本实验首先用普通 PCR 的方法获得 AvTPS1 的基因组 DNA 序列, 在此基础上利用融合引物嵌套 PCR (fusion primer and nested integrated PCR, FPNI-PCR) 对其启动子进行克隆, 并构建重组植物表达载体, 通过瞬时表达验证 AvTPS1 启动子的功能。

1 材料与试剂

阳春砂栽培于广州中医药大学时珍山, 经广州中医药大学中药资源与工程研究中心詹若挺研究员鉴定为阳春砂 *Amomum villosum* Lour., 本研究取其嫩叶并保存至 -80 °C 超低温冰箱备用。

植物基因组 DNA 提取试剂盒 (离心柱型)、pLB 零背景快速克隆试剂盒购于天根公司, DH5 α 感受态细胞、PCR 酶 PrimerSTAR、LA Taq、DL2000 Maker、DNA 切胶回收试剂盒购于 Takara 公司; pGEM-T 载体、T4 连接酶购于 Promega 公司; 内切酶 *Hind* III 和 *Bam*H I 购于 Thermo Fisher 公司; EHA105 菌株购于武汉淼灵生物科技有限公司; GUS 染色试剂盒购于中科瑞泰 (北京) 生物科技有限公

司; 引物合成和基因测序由华大基因有限公司完成。

2 方法

2.1 阳春砂基因组 DNA 的提取

参照植物基因组 DNA 提取试剂盒的操作说明, 提取阳春砂叶片的基因组 DNA (gDNA), 用 1% 琼脂糖凝胶电泳和微量紫外分光光度计检测 DNA 完整性及浓度。

2.2 AvTPS1 gDNA 序列扩增、序列分析及提交

以阳春砂叶片 gDNA 为模板, 使用 Takara Primer STAR 高保真酶对 AvTPS1 编码区 gDNA 序列进行 PCR 扩增, 使用克隆 AvTPS1 编码区序列的引物 AvF1 和 AvR2^[5], PCR 扩增条件: 98 °C, 预变性 5 min; 98 °C, 变性 10 s, 53.5 °C, 退火 30 s, 72 °C, 延伸 2.5 min, 37 个循环; 最后 72 °C 延伸 5 min。将 PCR 纯化产物连接至 pLB 载体, 进一步转化 *E. coli* DH5 α , 进行菌液 PCR 和测序筛选阳性重组子, 并获得 AvTPS1 的 gDNA 序列。

通过 NCBI ORF Finder (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/orffinder/>) 对 AvTPS1 cDNA 序列进行开放阅读框 (open reading frame, ORF) 查找及其编码氨基酸序列。利用 Clustal Omega (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) 和 DNAMAN 软件, 将测序结果与已获得的 AvTPS1 序列^[5]比对, 确认是 AvTPS1 的 gDNA 序列后, 分析基因序列的外显子、内含子。登陆 GenBank 的序列提交页面 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/submit/>), 用 BankIt 工具提交 AvTPS1 的 gDNA 序列。

2.3 AvTPS1 启动子序列的克隆

根据 FPNI-PCR 引物设计原则和“2.2”项获得的 AvTPS1 核心 gDNA 序列, 在 5' 端分别设计 3 条方向一致的特异性引物 (gene specific primers, GSP), 从第 1 轮到第 3 轮的特异引物分别是 GSPTPS1-1、GSPTPS1-2、GSPTPS1-3 (表 1)。

FPNI-PCR 分为 3 轮扩增, 第 1 轮 PCR 取适量阳春砂叶片 gDNA, 用 9 条通用简并引物 FP1~9^[9]分别与 AvTPS1 的特异引物 GSPTPS1-1 进行热不对称 PCR; 第 2 轮 PCR 取第 1 轮 PCR 产物为模板, 以巢式特异引物 FSP1 分别与 AvTPS1 的特异引物 GSPTPS1-2 进行普通 PCR; 第 3 轮 PCR 将第 2 轮 PCR 产物稀释相应倍数后作为模板, 以巢式特异引物 FSP2 分别与 AvTPS1 的特异引物 GSPTPS1-3 进行普通 PCR, 逐步分离目的 DNA 片段, FPNI-PCR 的反应条件见表 2。

表 1 引物序列

Table 1 Primer sequences used in this study

用途	名称	序列 (5'→3')
启动子序列扩增	GSPTPS1-1	TCGGCCTGGCTCTGGAGCCGGTCTT
	GSPTPS1-2	TCCTCAGCGTGGTCCTCCTCATCCG
	GSPTPS1-3	GCGGTCGTGAGTCCATATGCTCG
pCAM-AvTPS1p 构建	MQ-F	AGCTGGATCCAGCTCTCCCATATGGTCGAC
	MQ-R	AGCTAAGCTTCTTAACTTAATGCCTTTTGTGTG

表 2 FPNI-PCR 反应程序

Table 2 Reaction process of FPNI-PCR

PCR 反应	循环数	反应程序
第 1 轮	1	95 °C、90 s
	2	94 °C、10 s; 62 °C、30 s; 72 °C、2 min
		94 °C、10 s; 25 °C、2 min; 0.2 °C/s; 72 °C、2 min
		94 °C、10 s; 62 °C、30 s; 72 °C、2 min
		94 °C、10 s; 62 °C、30 s; 72 °C、2 min
		94 °C、10 s; 44 °C、30 s; 72 °C、2 min
		72 °C、5 min
第 2 轮	1	95 °C、90 s
	30	94 °C、10 s; 62 °C、30 s; 72 °C、2 min
	1	72 °C、5 min
第 3 轮	1	95 °C、90 s
	30	94 °C、10 s; 62 °C、30 s; 72 °C、2 min
	1	72 °C、5 min

将第 3 轮产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,并以第 3 轮 PCR 产物进行测序。利用 Clustal Omega 对测序结果与已获得的 AvTPS1 序列^[5]比对,确认其 3' 端与 AvTPS1 的 gDNA 序列的 5'端部分序列重叠后,再将其克隆至 pGEM-T 载体,将阳性重组子命名为 pGEM-AvTPS1p,最后测序获得完整序列。

2.4 AvTPS1 启动子的序列分析

利用 Neural Network Promoter Prediction (http://www.fruitfly.org/seq_tools/promoter.html) 预测转录起始位点,利用 PlantCARE (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>) 预测 AvTPS1 启动子潜在的顺式元件。

2.5 AvTPS1 启动子表达载体的构建

以 pGEM-AvTPS1p 为模板,以上游引物 MQ-F 和下游引物 MQ-R (表 1) 扩增启动子片段并引入 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切位点,反应条件为 98 °C, 5 min; 98 °C, 10 s, 60 °C, 15 s, 72 °C, 20 s, 35

循环; 72 °C, 5 min。PCR 产物经回收、酶切,通过 T4-DNA 连接酶插入已经过内切酶 *Bam*H I 和 *Hind* III 酶切的 pCambia1381 线性化载体中,将连接产物转化至 *E. coli* DH5 α 中,利用菌液 PCR 和测序验证含有 AvTPS1 启动子的阳性重组密码子,并将其命名为 pCAM-AvTPS1p。

2.6 农杆菌介导法转化烟草验证 AvTPS1 启动子活性

将质粒 pCAM-AvTPS1p 用液氮速冻法转化农杆菌 EHA105 菌株,选取阳性的单菌落在 50 μ g/mL 利福平 (Rif) 和 34 μ g/mL 卡那霉素 (Kan) 的 YEP 液体培养基中 28 °C 培养 24 h,按照 1:100 的比例将菌液转接到含有 50 μ g/mL Rif 和 34 μ g/mL Kan 的 50 mL 液体 YEP 培养基中,100 r/min, 28 °C 培养至 A_{600} 值为 0.6, 4 000 $\times$ g、20 °C 离心 20 min 弃上清收集菌体,用含有 10 mmol/L MES, 10 mmol/L MgCl₂ 和 100 μ mol/L AS 的 MS 液体培养基重悬菌体,振荡至 A_{600} 为 0.5 左

右, 在室温以 50 r/min 振摇 150 min。最后将重悬液用 1 mL 注射器 (去掉针头), 从烟草叶片背部缓慢注入, 做好标记, 保湿培养 2 d, 用 GUS 组织化学染色法检测 GUS 活性, GUS 染色参照 GUS 染色试剂盒说明书进行。

3 结果与分析

3.1 AvTPS1 gDNA 序列的扩增

利用课题组前期克隆 AvTPS1 编码区序列的引物 AvF1 和 AvR2^[5], 以阳春砂叶片 gDNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 电泳检测获得 AvTPS1 约 2 000 bp 的片段 (图 1)。通过将目的片段连接至 pLB 载体, 获得含有目的片段的菌液并进行测序, 测序结果表明克隆到的 AvTPS1 gDNA 序列长度为 2 444 bp。

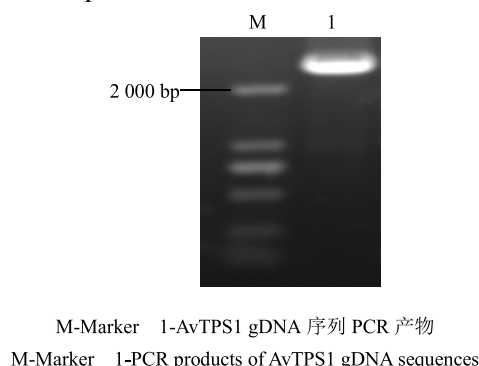


图 1 AvTPS1 gDNA 的 PCR 产物
Fig. 1 Cloning of AvTPS1 gDNA

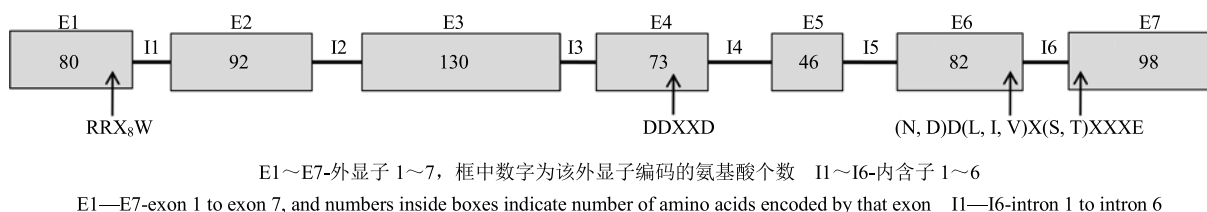


图 2 AvTPS1 基因组 DNA 结构示意图

Fig. 2 Schematic representation of AvTPS1 genomic DNA

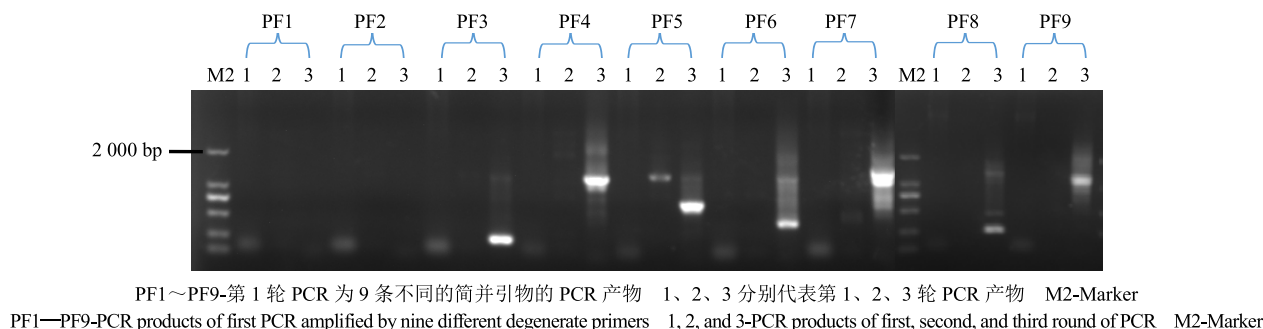


图 3 AvTPS1 启动子序列 FPNI-PCR 扩增产物

Fig. 3 Amplification of AvTPS1 promoter using FPNI-PCR

3.2 AvTPS1 gDNA 的序列分析

转录组 AvTPS1 (Unigene 0137026) 的 cDNA 序列包含了 1 个完整的 ORF (1 803 bp), 克隆获得的阳春砂 AvTPS1 gDNA 序列包含了完整的编码区序列, 从起始密码子到终止密码子为 2 369 bp, 包含了 7 个外显子和 6 个内含子 (图 2)。与植物萜类合酶催化功能密切相关的 3 个保守结构域 RRX₈W、DDXXD 和 (N,D) D (L,I,V) X (S,T) XXXE 分别位于 AvTPS1 的外显子 1、外显子 4 以及外显子 6 和 7。向 GenBank 提交了 AvTPS1 gDNA 序列 (2 444 bp), 获得序列号 MG 431984, 序列说明中详细标注了 7 个外显子的起始位点。

3.3 AvTPS1 启动子序列的获得

利用 AvTPS1 gDNA 核心序列设计特异性引物, 以阳春砂叶片 gDNA 为模板, 进行 FPNI-PCR, 将反应产物进行凝胶电泳检测。结果表明在第 3 轮 PCR 扩增中 PF4、PF5、PF7、PF9 获得了单一的条带。以 PCR 产物测序, 只有 PF5 的 3'端有 266 bp 与“3.1”获得的 AvTPS1gDNA 序列的 5'端重合, 初步认定为 AvTPS1 的 5'端上游序列, 截去编码区序列之后, 获得含有启动子区域的片段 618 bp, 其 AT 含量为 65.9%, 符合植物启动子的其中一个主要特征。见图 3。

3.4 AvTPS1 启动子序列的生物信息学分析

将克隆获得的 618 bp 序列进行生物信息学分

析。利用 Neural Network Promoter Prediction 进行转录起始位点预测,以预测值 0.8 为 cut-off 值,确定起始转录位点位于起始密码子 ATG 上游 50 bp 处。并利用 PlantCARE 对启动子中可能存在的顺式作用元件进行预测,分析 AvTPS1 启动子元件的类型、数量及位置。为了方便区分碱基的位置和正负链,从转录起始位点左边第 1 个碱基的位置设为“-1”,依此类推。AvTPS1 启动子包含多个真核生物启动子保守元件 TATA-box 和 CAAT-box,其中最靠近转录起始点的 TATA-box 位于-25~-30 bp 处(图 4);并有 1 个顺式作用调节元件 G-box 位于-416~-421 bp 处(图 4);此外,还有光响应元件 ATCT-motif,涉及光反应的 GT1-motif、MNF1、Sp1 元件,涉及热应激反应的 HSE 元件,还有参与控制昼夜节律的 circadian 元件,预测得分(matrix score)超过 5 分的元件见表 3。其中,G-box 是本研究最为关注的顺式作用元件,除了作为涉及光反应性的顺式调节元件,文献报道 G-box 是转录因子 MYC 家族结合启动子的元件^[7],笔者

也预测萜类合酶基因 AvTPS1 可能受转录因子 MYC 家族的调控。

3.5 植物表达载体的构建

根据获得的 AvTPS1 启动子序列设计含有 *Hind* III 和 *Bam*H I 酶切位点的特异引物,以 pGEM-AvTPS1p 为模板,进行 PCR 扩增,PCR 产物经纯化回收,酶切后插入线性化的 pCambia1381 中,构建含有 β -葡萄糖苷酸酶基因(GUS)的 pCAM-AvTPS1p 植物表达载体。重组质粒通过 PCR 验证和测序鉴定,获得阳性重组子(图 5)。

3.6 AvTPS1 启动子活性的检验

分别将重组质粒 pCAM-AvTPS1p 和空载体 pCambia1381 利用农杆菌介导法侵染烟草叶片,保湿培养 2 d,进行 GUS 染色,同时以未侵染的叶片作为阴性对照。结果显示未侵染的叶片并未染上蓝色,pCAM-AvTPS1p 和空载体 pCambia1381 侵染的叶片皆染上蓝色,而且 pCAM-AvTPS1p 明显比空载 pCambia1381 颜色深且面积大,证明 AvTPS1 启动子能够较强地启动 GUS 的表达(图 6)。



3'末端大字体“A”为转录起始位点
“A” of large font of 3' terminal was transcription initiation site

图 4 AvTPS1 启动子的部分保守元件及 G-box

Fig. 4 Part of conserved elements and G-box of AvTPS1 promoter

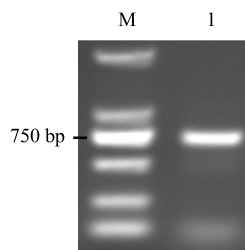
表 3 AvTPS1 启动子预测的顺式元件

Table 3 Predicted *cis*-elements in AvTPS1 promoter

元件名称	位置/bp	+/-链	得分	序列	功能
ATCT-motif	-244	+	9	AATCTAATCC	涉及光响应
ATGCAAAT motif	351	-	8	ATACAAAT	与 TGAGTCA 基序相关的顺式作用调节元件
CAAT-box	-50	+	5	CAAAT	启动子和增强子区域中常见的顺式调节元件
	-374	+	5	CAATT	
	351	-	5	CAAAT	
	395	-	5	CAAT	
	530	-	5	CAAAT	
G-box	351	-	8	CACGAC	涉及光反应性
GT1-motif	-224	+	8	AATCCACA	光反应元件
	297	-	7	GGTTAAT	
HSE	527	-	9	AGAAAATTCG	涉及热应激反应
MNF1	55	-	7	GTGCCC (A/T) (A/T)	光反应元件
Sp1	-363	+	6	CC (G/A) CCC	光反应元件
TATA-box*	-30	+	7	TATAAAT	核心启动子元件
	-57	+	6	TATAAA	
	-243	+	7	ATATAAT	
	-300	+	6	TATAAT	
	-324	+	7	ATATAAT	
circadian	-245	+	6	CAANNNNATC	控制昼夜节律

+链以转录起始位点左边第 1 个碱基的位置为-1; *当预测的 TATA-box 数目超过 5 个时, 仅展示得分最高的 5 个

Position of first base at left of transcription initiation site was -1 in + chain; When number of predicted TATA-boxes exceeded five, only top five with highest matrix score were shown



1-pCAM-AvTPS1p 菌液 PCR 检测产物 M-Marker
1-PCR products of pCAM-AvTPS1p bacterial solution M-Marker

图 5 载体 pCAM-AvTPS1p 的构建

Fig. 5 Construction of cloning vector pCAM-AvTPS1p



A 未侵染叶片 B-pCMBIA1381 侵染叶片 C-pCAM-AvTPS1p 侵染叶片
A-uninfected leaves B-leaves infected by pCMBIA1381 C-leaves infected by pCAM-AvTPS1p

图 6 AvTPS1 启动子活性的检验

Fig. 6 Activity verification of AvTPS1 promoter

4 讨论

近期已有不少从药用植物中克隆启动子的报道, 比如从黄花蒿 *Artemisia annua* L. 中克隆了 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (HMGR) 基因的启动子^[9], 从刺五加 *Eleutherococcus senticosus* (Rupr. Maxim.) Harms 中克隆了甲羟戊酸焦磷酸脱羧酶 (MDD) 基因的启动子^[10]。但很多药用植物仍不具有基因组数据, 克隆未知的启动子依旧是基因工程研究的难点。阳春砂相关基因启动子的克隆未见报道。目前大部分利用基于 PCR 扩增的染色体步移技术进行启动子的克隆, 虽然具有较好的操作性, 但在实验操作中仍有较大难度^[11], 康丹等^[12]建立了在半随机引物 PCR 基础上的 FPNI-PCR, 通过设计 9 个带有接头的简并引物进行热不对称 PCR, 再通过 2 轮普通 PCR 步移获得目标启动子。课题组前期基于转录组数据和生物信息学分析, 预测 AvTPS1 为阳春砂萜类合成途径的单萜合酶基因, 克隆获得了其含完整编码区的 cDNA 序列^[5]。本研究从阳春砂基因组 DNA 中克隆了 AvTPS1 包含完整编码区的 gDNA 全长序列, 该序列含有 7 个外显子和 6 个内含子, 与已

报道的薰衣草单萜合酶基因相似^[13]。在获得 AvTPS1 gDNA 序列的基础上, 进而通过 FPNI-PCR 获得 AvTPS1 的启动子序列。

通过生物信息学分析, AvTPS1 启动子中含有多个元件, 包括精确启动必须的 TATA 区和控制转录频率的 CAAT 区, 还有涉及光响应、热应激反应、昼夜节律调控的顺式作用元件, 其中也包含了 G-box 顺式作用元件。转录因子 bHLH 家族能与具有 5'-CANNTG-3' 的 E-Box 结合, 多数植物 bHLH 与具有 5'-CACGTG-3' 的 G-box 结合^[14]。研究表明 G-box (5'-CACGTG-3') 是转录因子 MYC2 的强结合位点, 其次是 5'-CACATG-3' 和 5'-CACATG-3', 这在拟南芥中已经得到了验证^[15-16]; 不仅是在拟南芥中, 其他植物如黄花蒿 AaMYC2 通过结合 CYP71AV1 和 DBR2 的 G-box 调节青蒿素生物合成^[17]。AvTPS1 启动子含有 G-box, 预测受 bHLH 类转录因子的调控, 但仍需要实验验证。

本实验在获得阳春砂萜类合酶基因 AvTPS1 gDNA 序列的基础上, 利用 FPNI-PCR 获得了 AvTPS1 启动子并进行了序列分析, 构建植物表达载体 pCAM-AvTPS1p, 通过瞬时表达实验, 证明了 AvTPS1p 具有驱动 GUS 表达的功能。空载体 pCAMBIA1381 不具备启动子序列, 尤其适合于启动子研究的真核表达实验, 但在实验中, 该空载体仍有驱动 GUS 表达的部分活性, 但相比 AvTPS1 启动子活性较低, 因此检验了 AvTPS1 启动子具有启动基因表达的活性, 为进一步研究 AvTPS1 在萜类合成途径的功能及其受转录因子调节的机制奠定了基础。

参考文献

[1] 胡玉兰, 张忠义, 林敬明. 中药砂仁的化学成分和药理活性研究进展 [J]. 中药材, 2005, 28(1): 72-74.

[2] 王凌健, 方 欣, 杨长青, 等. 植物萜类次生代谢及其调控 [J]. 中国科学: 生命科学, 2013, 43(12): 1030-1046.

[3] Ruan J, Li J, Fang X, *et al.* Isolation and characterization of three new monoterpene synthases from *Artemisia annua* [J]. *Front Plant Sci*, 2016, 638(7): 126-139.

[4] Yahyaa M, Tholl D, Cormier G, *et al.* Identification and characterization of terpene synthases potentially involved in the formation of volatile terpenes in carrot (*Daucus carota* L.) roots [J]. *J Agric Food Chem*, 2015,

63(19): 4870-4878.

[5] 邓 可, 杨锦芬, 王 腾, 等. 阳春砂基于转录组的萜类合酶基因挖掘及一个单萜合酶基因的克隆 [J]. 广州中医药大学学报, 2016, 33(3): 395-403.

[6] 汤 方, 涂慧珍. 真核启动子研究进展 [J]. 林业科技开发, 2015, 29(2): 7-12.

[7] Hong G J, Xue X Y, Mao Y B, *et al.* *Arabidopsis* MYC2 interacts with DELLA proteins in regulating sesquiterpene synthase gene expression [J]. *Plant Cell*, 2012, 24(6): 2635-2648.

[8] Spyropoulou E A, Haring M A, Schuurink R C. RNA sequencing on *Solanum lycopersicum* trichomes identifies transcription factors that activate terpene synthase promoters [J]. *BMC Genom*, 2014, 402(15): 226-231.

[9] Wang Z, Ye S, Li J, *et al.* Fusion primer and nested integrated PCR (FPNI-PCR): A new high-efficiency strategy for rapid chromosome walking or flanking sequence cloning [J]. *BMC Biotechnol*, 2011, 11(1): 109-113.

[10] 龙金花, 向 奕, 肖文军, 等. 黄花蒿 HMGR 启动子活性表达及核心序列分析 [J]. 中草药, 2016, 47(19): 3475-3480.

[11] 李志栋, 杨 果, 尤鹏升, 等. 刺五加 MDD 基因启动子的克隆与生物信息学分析 [J]. 中草药, 2016, 47(21): 3871-3875.

[12] 康 丹, 方小艳, 游腾飞, 等. 染色体步移技术克隆已知序列侧翼启动子的研究进展 [J]. 农业生物技术学报, 2013, 21(3): 355-366.

[13] Despinasse Y, Fiorucci S, Antonczak S, *et al.* Bornyl-diphosphate synthase from *Lavandula angustifolia*: A major monoterpene synthase involved in essential oil quality [J]. *Phytochemistry*, 2017, 137(1): 24-33.

[14] 张 鑫, 宋经元, 胡鸢雷, 等. bHLH 转录因子调控植物活性成分生物合成的研究进展 [J]. 药学学报, 2014, 49(4): 435-442.

[15] Dombrecht B, Xue G P, Sprague S J, *et al.* MYC2 differentially modulates diverse jasmonate-dependent functions in *Arabidopsis* [J]. *Plant Cell*, 2007, 19(7): 2225-2245.

[16] Zhou Y, Sun W, Chen J, *et al.* SmMYC2a and SmMYC2b played similar but irreplaceable roles in regulating the biosynthesis of tanshinones and phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* [J]. *Sci Rep*, 2016, doi: 10.1038/srep22852.

[17] Shen Q, Lu X, Yan T, *et al.* The jasmonate-responsive AaMYC2 transcription factor positively regulates artemisinin biosynthesis in *Artemisia annua* [J]. *New Phytol*, 2016, 210(4): 1269-1281.