

• 药材与资源 •

阳春砂与海南砂 *BPPS* 启动子比较及 GCN4-motif 正调控作用的鉴定

林晓静, 梁慧琳, 赵海莹, 吴清文, 黄琳璇, 伍思容, 杨锦芬*

广州中医药大学中药学院 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 龙脑基二磷酸合酶(bornyl diphosphate synthase, BPPS)是砂仁药效萜类合成途径中的关键酶, 获得海南砂 *AIBPPS* 的启动子并与阳春砂 *AvBPPS* 启动子进行调控元件和瞬时表达的比较, 以期解析 *AvBPPS* 在种子中高表达的分子机制。方法 通过 FPNI-PCR 的方法从海南砂 gDNA 中克隆 *AIBPPS* 的启动子, 并与阳春砂 *AvBPPS* 启动子进行序列比较, 对启动子相似区域进行截短, 获得其相应的截短片段; 对 *AvBPPS* 启动子截短片段中的 GCN4-motif 进行突变; 构建由上述启动子驱动 β -葡萄糖苷酸酶基因(β -glucuronidase gene, *GUS*)的重组表达载体, 利用农杆菌介导法注射感染本氏烟草叶片进行瞬时表达, 验证启动子的活性和 GCN4-motif 的功能。结果 克隆获得 365 bp 的 *AIBPPS* 启动子序列, 3'端约 300 bp 的序列与 *AvBPPS* 启动子的相应序列相似度高达 93%, 但 *AIBPPS* 启动子不含有 *AvBPPS* 启动子的 GCN4-motif。构建成功与 *GUS* 报告基因融合的系列启动子重组载体——*VBPT::GUS*(*AvBPPS* 启动子全长)、*VBPT::GUS*(*AvBPPS* 启动子截短至 320 bp)、*VBPT-GM::GUS*(截短 *AvBPPS* 启动子且突变 GCN4-motif) 和 *LBP::GUS*(*AIBPPS* 启动子全长)、*LBPT::GUS*(*AIBPPS* 启动子截短至 305 bp)。通过 *GUS* 染色发现虽然上述启动子均具有驱动 *GUS* 基因转录的活性, 然而, 含有 GCN4-motif 的启动子, 包括全长或截短的 *AvBPPS* 启动子(*VBPT::GUS* 和 *VBPT::GUS*)的活性均高于 GCN4-motif 突变(*VBPT-GM::GUS*)或无 GCN4-motif 的启动子(*LBP::GUS* 和 *LBPT::GUS*)。结论 GCN4-motif 对基因转录具有正调控作用, 为进一步探究 *AvBPPS* 启动子的调控机制奠定了基础。

关键词: 启动子; 龙脑基二磷酸合酶; 阳春砂; 海南砂; GCN4-motif; 瞬时表达

中图分类号: R286.12 文献标志码: A 文章编号: 0253-2670(2022)19-6159-08

DOI: 10.7501/j.issn.0253-2670.2022.19.021

Comparison of *BPPS* promoters between *Amomum villosum* and *Amomum longiligulare* and identification of GCN4 motif positive regulation

LIN Xiao-jing, LIANG Hui-ling, ZHAO Hai-ying, WU Qing-wen, HUANG Lin-xuan, WU Si-rong, YANG Jin-fen

Research Center of Chinese Herbal Resource Science and Engineering, 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, College of Traditional Chinese Medicine, Guangzhou University of Chinese Medicine, Guangzhou 510006, China

Abstract: Objective Bornyl diphosphate synthase (BPPS) is an important enzyme in the synthetic pathway of *Amomum* medicinal terpenoids. To investigate the molecular mechanism of *AvBPPS* high expression in seed, the promoter of *AIBPPS* was obtained from *Amomum longiligulare* and was compared with the promoter of *AvBPPS* from *A. villosum*. **Methods** The promoter of *AIBPPS* was cloned from *A. longiligulare* gDNA by FPNI-PCR, and its sequence was compared with the promoter of *AvBPPS*; The similar regions of the promoter were truncated, and the corresponding truncated sequences were obtained. Meanwhile, the GCN4 motif was mutated from the truncated sequence of *AvBPPS* promoter. The recombinant expression vectors of β -glucuronidase gene (*GUS*) driven by the above-mentioned promoter were constructed, and the *Agrobacterium*-mediated method was used to infect the leaves of *Nicotiana benthamiana* for transient expression to verify the promoter activities and the functions of GCN4 motif. **Results** The

收稿日期: 2022-02-08

基金项目: 国家自然科学基金面上项目(81872954)

作者简介: 林晓静(1996—), 女, 硕士研究生, 研究方向为药用植物次生代谢。Tel: 13724047090 E-mail: 517507071@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

365bp *AlBPPS* promoter sequence was cloned. The 3' end of 300 bp sequences was 93% similarity to the corresponding sequence of the *AvBPPS* promoter. In this sequence, only the *AvBPPS* promoter contained GCN4 motif. We successfully constructed a series of vectors fused with the reporter gene of GUS: *VBPT::GUS* (*AvBPPS* promoter full length), *VBPT::GUS* (*AvBPPS* promoter truncated to 320bp), *VBPT-GM::GUS* (the mutant *AvBPPS* promoter on GCN4 motif), *LBP::GUS* (*AlBPPS* promoter full length) and *LBPT::GUS* (*AlBPPS* promoter truncated to 305 bp). Through GUS staining, it was found that all of the above-mentioned promoters have the activity of driving the transcription of GUS. However, promoters containing GCN4 motif, including full-length or truncated *AvBPPS* promoters (*VBPT::GUS* and *VBPT::GUS*) are more active than GCN4 motif mutation (*VBPT-GM::GUS*) or the promoters lack of GCN4 motif (*LBP::GUS* and *LBPT::GUS*). **Conclusion** This study improves GCN4-motif has a positive regulatory effect on *AvBPPS* and provides a basis for further exploration of the regulation mechanisms of *AvBPPS* promoter.

Key words: promoter; BPPS; *Amomum villosum* Lour.; *Amomum longiligulare* T. L. Wu; GCN4-motif; transient expression

砂仁是我国“四大南药”之一，具有化湿开胃、温脾止泻等功效，可用于湿浊中阻、脾胃虚寒等症，《中国药典》2020 年版收录砂仁来源于姜科豆蔻属植物阳春砂 *Amomum villosum* Lour.、海南砂 *A. longiligulare* T. L. Wu 或绿壳砂 *A. villosum* Lour. var. *xanthioides* T. L. Wu et Senjen 的干燥成熟果实，并规定挥发油和乙酸龙脑酯为其主要药效成分^[1]。阳春砂因高含量挥发油和乙酸龙脑酯，其品质通常优于海南砂和绿壳砂，国内市场对阳春砂的需求远大于后两者，使其长期处于供需紧张的状况^[2-4]。因此，分析阳春砂关键酶的分子调控机制，从分子角度解析阳春砂品质优良的原因，为优化海南砂和绿壳砂品质奠定基础，进而缓解品质优良砂仁的供需缺口。

龙脑基二磷酸合酶 (bornyl diphosphate synthase, BPPS) 是砂仁药效萜类合成途径的关键酶，催化 *L*-半乳糖-1-磷酸酯 (geranyl diphosphate, GPP) 生成龙脑基二磷酸合酶 (bornyl diphosphate, BPP)，而 BPP 则为砂仁药效物质龙脑的直接前体和乙酸龙脑酯的间接前体^[5]。Wang 等^[6]、李萌^[7]分别克隆并鉴定阳春砂和海南砂的 *AvBPPS* 和 *AlBPPS*，除了自身基因功能差异，同时期种子团中 *AvBPPS* 表达量远高于 *AlBPPS*^[6-7]。启动子在基因的表达调控中起着重要的作用，推测 *AvBPPS* 和 *AlBPPS* 的启动子所调控的 BPPS 转录差异是导致海南砂和阳春砂品质差异较大的重要原因之一。因此，将比较分析海南砂和阳春砂 BPPS 启动子序列，以期阐明不同来源 BPPS 转录差异的原因。

课题组前期已克隆获得 470 bp 的 *AvBPPS* 启动子序列，发现 *AvBPPS* 启动子序列中具有参与胚乳特异性表达的 GCN4-motif [TGA(G/C)TCA]^[8]。GCN4-motif 是一种在谷作物种子贮藏蛋白启动子中高度保守的顺式元件，对控制醇溶蛋白和谷蛋白的胚乳特异性表达起着核心作用^[9-11]。然而

GCN4-motif 在非贮藏蛋白种子特异性启动子的研究较少，*AvBPPS* 作为非贮藏蛋白，表现出在种子中高表达特点和其产物表现出种子富集的特性^[6,12]，初步推断单个 GCN4-motif 在非贮藏蛋白种子特异性启动子中可以介导基因在种子中特异性表达且具有正调控的作用。因此，本研究重点关注 *AvBPPS* 启动子中的 GCN4-motif，鉴定 GCN4-motif 对非贮藏蛋白 *AvBPPS* 的正调控作用，为提高关键基因的表达提供分子调控元件，为砂仁品质优化及药效成分的代谢工程奠定基础。

1 材料与试剂

1.1 材料

海南砂种植于广州中医药大学大学城校区，经广州中医药大学何国振教授鉴定为海南砂 *A. longiligulare* T. L. Wu，本研究取其嫩叶并保存至 -80 °C 超低温冰箱备用；野生型本氏烟草 *Nicotiana benthamiana* L.、pLB-*AvBPPS* 载体质粒和 pCambia1301 植物表达载体质粒均为本实验保存。

1.2 试剂

快速定点突变试剂盒、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和 DNA 切胶回收试剂盒购于天根生化科技 (北京) 有限公司；根瘤农杆菌 EHA105、DH5 α 感受态细胞购于上海唯地生物技术有限公司；Infusion 连接酶、限制性内切酶、PCR 酶 PrimerSTAR、LA Taq 和 DL2000 Marker 购于 Takara 公司；内切酶 *Nco*I 和 *Bam*HI 均购于 New England Biolabs (NEB) 公司；GUS 染色试剂盒购于索莱宝生物科技有限公司；引物合成和基因测序由北京擎科生物科技有限公司完成。

2 方法

2.1 海南砂基因组 DNA 的提取

参照植物基因组 DNA 提取试剂盒的操作说

明,提取海南砂叶片的基因组 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 AIBPPS 启动子序列的克隆

根据 FPNI-PCR 引物设计原则以及参考 AvBPPS 和 AIBPPS gDNA 序列^[8],在 5' 端参考使用 3 条方向一致的特异性引物 (gene specific primers, GSP),即 GSP TPS3-1、GSP TPS3-2 和 GSP TPS3-3,见表 1。

FPNI-PCR 分为 3 轮扩增,第 1 轮 PCR 取适量海南砂 gDNA,用 9 条通用简并引物 FP1~9 分别与 AvBPPS 特异引物 GSP TPS3-1 进行热不对称 PCR;第 2 轮 PCR 取第 1 轮 PCR 产物为模板,巢式特异引物 FSP1 分别与 3 个基因的特异引物 GSP TPS3-2 进行普通 PCR 第 3 轮方法与第 2 轮类似,以逐步分离目的 DNA 片段。将 3 轮 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测,用第 3 轮 PCR 产物直接测序或连入 pLB 载体测序。利用 Snapgene 软件对测序结果与已获得的目的基因 gDNA 序列分别比对,确认 3' 端与其 gDNA 序列的 5' 端部分序列是否重叠。

2.3 AIBPPS 启动子序列分析、比较

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 AIBPPS 启动子潜在的顺式元件。利用 Jalview 软件将 AIBPPS 和 AvBPPS 启动子序列进行比对,并使用 TBtool 软件对该启动子的顺式元件位置分

布进一步可视化。

2.4 AIBPPS 和 AvBPPS 启动子截短、AvBPPS 启动子 GCM4-motif 突变及其表达载体的构建

通过对比海南砂和阳春砂 BPPS 启动子的序列,其中高度相似区域包含转录起始位点至起始密码子之前约 50 bp,利用 In-fusion 原理设计同源臂引物并扩增启动子全长和相似区域序列。PCR 扩增条件:98 ℃,预变性 5 min;98 ℃,变性 10 s,58 ℃,退火 30 s,72 ℃,延伸 2.5 min,30 个循环;最后 72 ℃延伸 5 min。分别回收 PCR 产物,参照快速定点突变试剂盒的说明,设计引物并进行突变,将 AvBPPS 启动子截短片段中的 TGAGTCA 突变为 TGTCA,使用 VBTp-F 和 Bp-R 的引物扩增并回收该 PCR 产物 (引物见表 1)。

将获得的目的片段,即 AvBPPS 和 AIBPPS 全长启动子、各自截短至保守区域的启动子,以及 AvBPPS 启动子截短加 GCN4-motif 突变的启动子,通过 In-fusion 酶连接上已经过内切酶 NcoI 和 BamHI 酶切的 pCambia1301 线性化载体,构建与 GUS 基因融合的植物表达载体,将连接产物转化至 *E. coli* DH5 α 中,利用菌液 PCR 和测序验证含有目的片段的阳性重组密码子,并将重组质粒分别命名为 VBP::GUS、LBP::GUS、VBPT::GUS、LBPT::GUS 和 VBPT-GM::GUS。

2.5 农杆菌介导法转化烟草验证启动子活性

将“2.4”项的重组质粒用液氮速冻法转化农杆菌 EHA105 菌株,选取阳性的单菌落在 25 μ g/mL 利福平 (Rif) 和 50 μ g/mL 卡那霉素 (Kan) 的 LB

表 1 引物序列

Table 1 Primers sequences

引物用途	引物名称	引物序列 (5'→3')
启动子序列扩增	GSP TPS1-1	GAAGCCCTCTGATCTGGTCCTCACA
	GSP TPS1-2	CAGCTGCGAGCTCACGCCGTCTAAA
	GSP TPS1-3	CGACGACGACCACTACACTCGATCG
GCN4-motif 突变	GM-F	GGAAAAAATGATTGTCAAATTTTCTAGGGAAGG
	GM-R	CCTTCCTAGAAAATTTGACAATCATTTTTTTTTTCC
pCambia1301-BPPS 启动子表达载体构建	VBp-F	GCAGGCATGCAAGCTTTGTGTAGTACCAAACATATTTTCTATTTTCTAAAAATATATTAGA
	L/VBTP-F*	GTACCCGGGGATCCGGTTTGATTAAATATACTGCCCTATAATTATTATTAAATTTGTAAATAG
	LBp-F	GCAGGCATGCAAGCTTAGACGACTGAAAAGAAGCGCTG
	Bp-R*	CAGATCTACCATGGGTTTGCAATCAAAAAATCGTAAAAATATATCTCAACTCCA

*VBPT 和 LBPT 的 5' 端和 3' 端一致,使用同一对引物

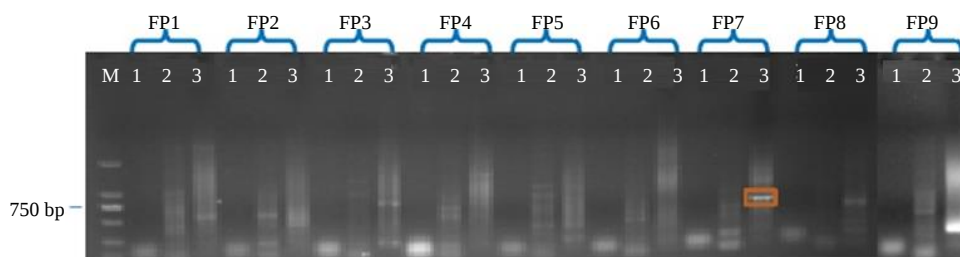
The 5' end and 3' end of VBPT and LBPT are the same, and the same primers are used

液体培养基中 28 ℃ 培养 36 h, 按照 1:50 的比例将菌液转接到含有 25 μg/mL Rif 和 50 μg/mL Kan 的 100 mL 液体 LB 培养基中, 200 r/min, 28 ℃ 培养至 A_{600} 值为 0.6, 4 000×g、28 ℃ 离心 20 min 弃上清收集菌体, 用含有 10 mmol/L MES、10 mmol/L $MgCl_2$ 和 100 μmol/L AS 的 MS 液体培养基重悬菌体, 振荡至 A_{600} 为 0.8~1.0, 在室温静置 3 h。最后用针头在烟草叶子背面轻划破小口子, 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 AIBPPS 启动子序列的获得

利用 AIBPPS gDNA 核心序列设计特异性引物, 以海南砂叶片 gDNA 为模板, 进行 FPNIPCR, 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 FP3 和 FP7 获得了符合长度的条带, 见图 1。以 PCR 产物测序, 只有 FP7 的 3'端有 262 bp 与 AIBPPS gDNA 序列的 5'端重合, 初步认定为 AIBPPS 的 5'端上游序列, 截去转录起始位点 3'端序列之后, 获得含有启动子区域的片段 365 bp, 其 AT 含量为 70%, 为植物启动子主要特征之一, 见图 2。



FP1~FP9-第 1 轮 PCR 为 9 条不同的简并引物的 PCR 产物 1、2、3 分别代表第 1、2、3 轮 PCR 产物 M-Marker 橙框为 AIBPPS 启动子
FP1~FP9-PCR products of first PCR amplified by nine different degenerate primers 1, 2, and 3-PCR products of first, second, and third round of PCR
M-Marker The orange box is the AIBPPS promoter

图 1 AIBPPS 启动子序列 FPNIPCR 扩增产物

Fig. 1 Amplification of AIBPPS promoter using FPNIPCR

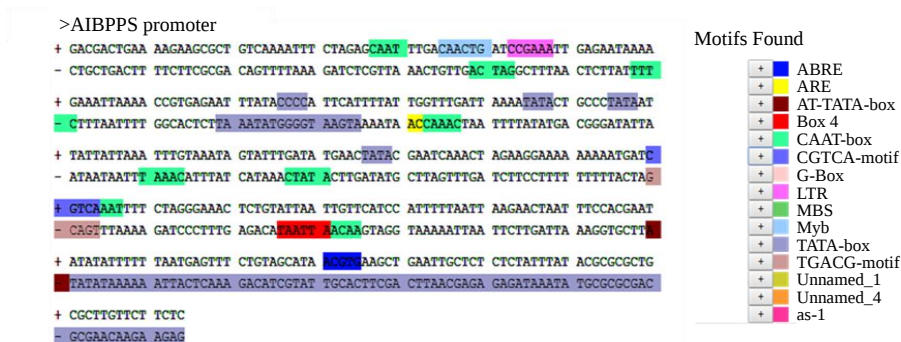


图 2 AIBPPS 启动子序列及其顺式作用调控元件

Fig. 2 Sequences of AIBPPS promoters and their cis-regulatory elements

3.2 AIBPPS 启动子序列的生物信息学分析

将克隆获得的 365 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 0.9 为 cut-off 值, 确定起始转录位点位于起始密码子 ATG 上游 62 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 AIBPPS 启动子元件的类型、数量及位置 (图 2 和表 2)。其中“+”区分碱基的位置和正负链, “366”为转录起

始位点的位置。依此类推。AIBPPS 启动子包含激活蛋白的核心元件 TATAbox 和提高转录活性的增强元件 CAATbox 等多个真核生物启动子保守元件。此外, 该启动子还有光响应元件 Box 4、G-box, 涉及干旱诱导的结合位点 MBS, 涉及厌氧诱导顺式作用的 ARE 元件, 涉及低温诱导顺式作用的 LTR 元件, 涉及脱落酸反应的 ABRE, 以及参与茉莉酸甲酯响应的 TGACG-motif 和 CGTCA-motif 的元件。

表 2 *AIBPPS* 启动子预测的顺式作用调控元件
Table 2 Predicted *cis*-elements in *AIBPPS* promoter

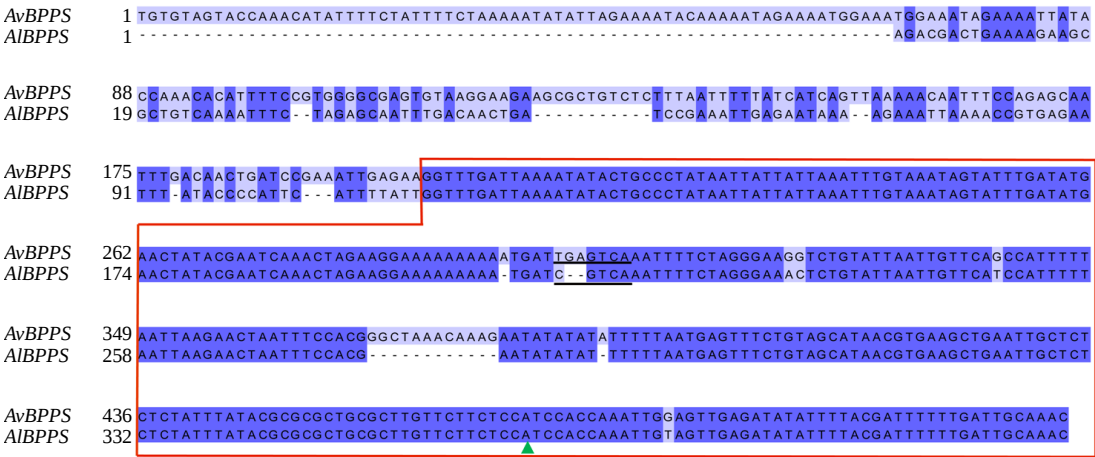
元件	序列	功能	位置
TATA-box	TATATA	核心启动子元件	280-
TATA-box	TATAAATA		334-
TATA-box	TATAAAT		89- 335-
TATA-box	TATAAA		90- 336-
TATA-box	TATAA		91- 337- 92+
TATA-box	TATA		125+ 135+ 176+ 282- 338-
TATA-box	ATATAT		279- 281-
CAAT-box	CAAAT	启动子和增强子区域常见的顺式作用元件	39- 150- 163- 213+
CAAT-box	CAAT		37+ 58- 240- 323-
CAAT-box	CCAAT		109-
AT~TATA-box	TATATA		280-
ARE	AAACCA	参与厌氧诱导的顺式作用调控元件	111-
MBS	CAACTG	参与干旱诱导的 MYB 结合位点	45+
G-Box	CACGTT	参与光响应的顺式作用调控元件	310-
Box 4	ATTAAT	参与光响应的顺式作用调控元件	236-
LTR	CCGAAA	参与低温响应的顺式作用调控元件	53+
ABRE	ACGTG	涉及脱落酸反应的顺式作用调控元件	311+
TGACG-motif	TGACG	涉及茉莉酸甲酯反应的顺式作用调控元件	210-
CGTCA-motif	CGTCA	涉及茉莉酸甲酯反应的顺式作用调控元件	210+

“+”“-”表示正反链，转录起始位点的位置为 366
“+” and “-” indicate the positive and negative strands, and the position of the transcription start site is 366

3.3 *AIBPPS* 与 *AvBPPS* 启动子序列的比较与分析

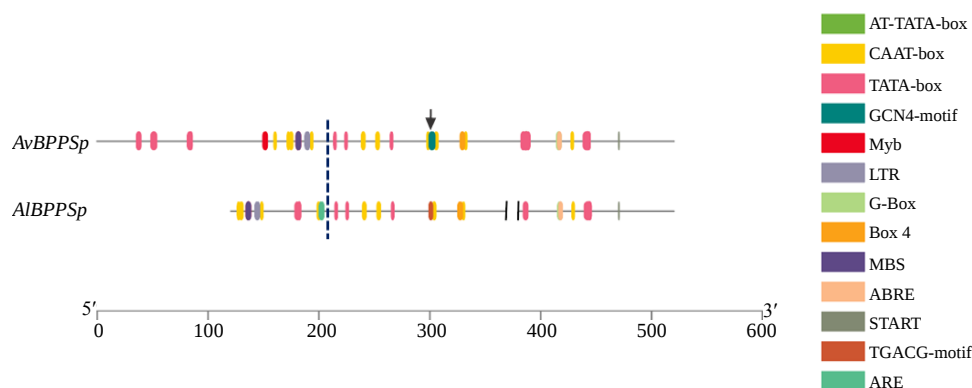
将获得的 *AIBPPS* 启动子与 *AvBPPS* 启动子进行序列对比，发现有一段相似度高达 93%、长度约 300 bp 的区域（包含转录起始位点至起始密码子之前 50 bp）（图 3），推测该相似序列为砂仁 *BPPS* 启动子的保守区域。在这段保守区域中，*AvBPPS*

启动子含有胚乳特异性元件 GCN4-motif，而 *AIBPPS* 启动子在对应的位置则为茉莉酸甲酯响应元件 CGTCA-motif（图 3、图 4）。鉴于 *AvBPPS* 和 *AIBPPS* 所表现的转录差异和 GCN4-motif 的功能报道，初步推测 GCN4-motif 在 *AvBPPS* 的表达中具有胚乳特异性表达以及正调控的作用。



绿色三角形代表转录起始位点，转录起始位点右边为非编码区，红框为高度相似区域，黑色下划线分别代表 GCN4-motif 和 CGTCA-motif
the green triangle represents the transcription start site, the right side of the ranscription start site are untranslated areas, the red box is a highly similar area, and the black underlined lines represent GCN4 motif and CGTCA motif respectively

图 3 *AIBPPS* 和 *AvBPPS* 启动子序列比较
Fig. 3 Comparison of promoter sequences of *AIBPPS* and *AvBPPS*



蓝色虚线右边为相似区域，黑色箭头表示 GCN4-motif

The right side of blue dotted line is the similar sequences, and the black arrow indicates GCN4 motif

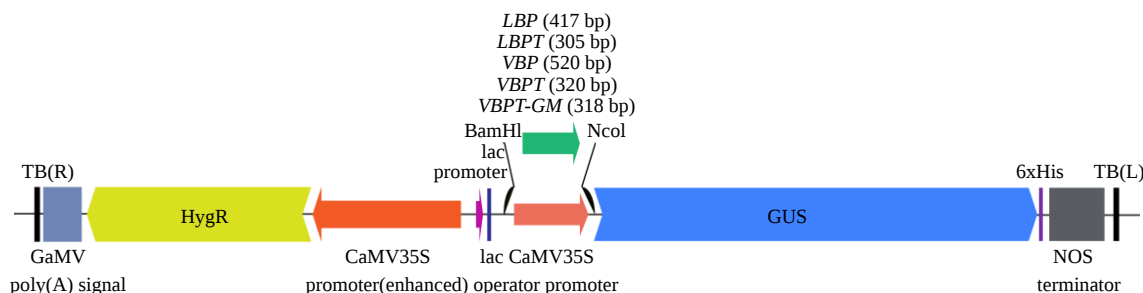
图 4 *AIBPPS* 和 *AvBPPS* 启动子顺式作用元件位置分布比较

Fig. 4 Comparison of positional distribution of *cis*-acting elements in promoters of *AIBPPS* and *AvBPPS*

3.4 BPPS 启动子驱动 GUS 表达载体的构建

构建了 *VBPT::GUS*、*LBPT::GUS*、*VBPT-GM::GUS* 和 *LBPT-GM::GUS* 表达载体(图 5)，对重组质粒进行 PCR 鉴定，PCR

扩增启动子片段与目标片段大小一致(图 6)，获得阳性重组子，测序结果验证了载体构建成功；其中 *VBPT-GM::GUS* 的 GCN4-motif——TGAGTCA 突变成了 TGTCA。

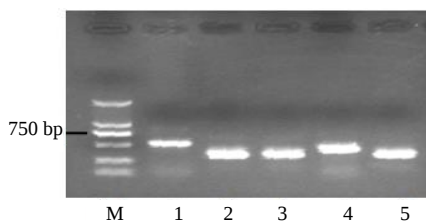


TB(R)、TB(L)是 T-DNA 的左右边界 HygR 潮霉素抗性基因 GUS-β-葡萄糖苷酸酶

TB(R) and TB(L) are the left and right boundaries of T-DNA; HygR hygromycin resistance gene GUS-β-glucuronidase

图 5 BPPSp::GUS 构建

Fig. 5 BPPSp::GUS construction



1~5-*VBPT::GUS*、*VBPT::GUS*、*VBPT-GM::GUS*、*LBP::GUS* 和 *LBPT::GUS* PCR 检测产物 M-Marker

1~5-PCR products of *VBPT::GUS*, *VBPT::GUS*, *VBPT-GM::GUS*, *LBP::GUS* and *LBPT::GUS* M-Marker

图 6 BPPS 启动子重组载体的 PCR 鉴定

Fig. 6 PCR identification of BPPS promoter recombinant vector

3.5 启动子活性比较分析

分别将重组质粒和阳性对照 pCambia1301 利用农杆菌介导侵染本氏烟草叶片，保湿培养 2 d，同时以未侵染的叶片作为阴性对照，进行 GUS 染色。结果如图 7 所示，阴性对照(野生型)不能染成蓝色，阳性对照 35S::GUS 叶片呈大面积较深蓝色，*VBPT::GUS*、*LBPT::GUS*、*VBPT-GM::GUS* 均能染上蓝色，说明上述启动子均能驱动 GUS 基因的表达。然而，*AvBPPS* 启动子全长或截短的 *VBPT::GUS* 和 *VBPT-GM::GUS* 均呈现较大面积且较深的颜色，而 GCN4-motif 突变的 *AvBPPS* 启动子 *VBPT-GM::GUS*

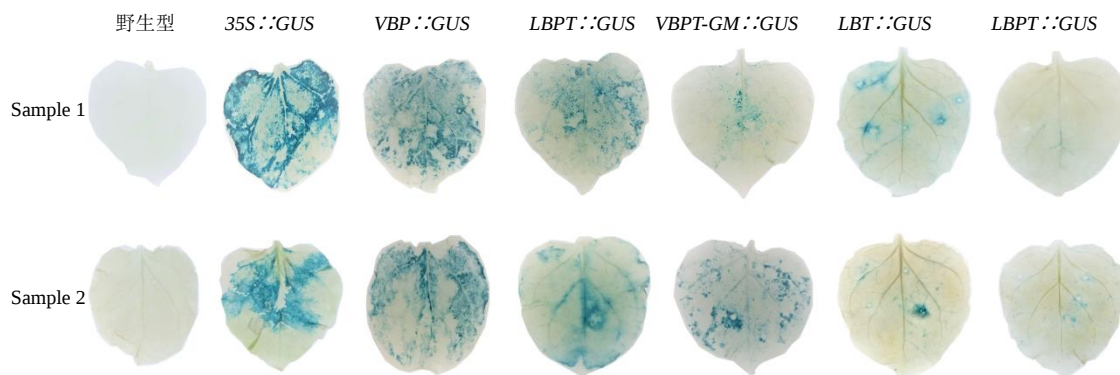


图 7 BPPS 启动子瞬时表达的 GUS 染色

Fig. 7 GUS staining of transient expression of BPPS promoter

GUS 与其野生型对照 VBPT::GUS 相比, 颜色明显较浅; 不含 GCN4-motif 的 AIBPPS 启动子, 包括全长 LBP::GUS 和截短的 LBPT::GUS, 与其相应的对照 AvBPPS 启动子 VBP::GUS 和 VBPT::GUS 相比, 颜色也明显较浅, 仅表现出微弱的活性。结果显示含有 GCN4-motif 的启动子比 GCN4-motif 突变或缺失的启动子显示出更强的活性, 证明 GCN4-motif 对启动子活性起正调控作用。

4 讨论

阳春砂萜类物质主要富集于种子团中, 而 BPPS 作为砂仁药效萜类合成途径的关键酶, AvBPPS 也相应地表现出种子特异性表达^[6,12]。另外, AvBPPS 在阳春砂种子团的表达量不仅显著高于其他的萜类合酶, 例如芳樟醇合酶 (linalool synthase, AvLIS) 和葑草烯合酶 (humulene synthase, AvHUS) 等萜类合酶, 并且在开花后 45 d 种子团中 AvBPPS 的表达量约为 AIBPPS 的 200 倍^[7-8]。基因表达量的差异受上游启动子的影响, 因此, 比较 AvBPPS、AIBPPS、AvLIS 和 AvHUS 启动子之间的序列和顺式元件差异, 有助于解析 AvBPPS 在种子团中高表达的原因。赵海莹等^[8]克隆了 AvBPPS、AvLIS 和 AvHUS 的启动子, 发现 AvBPPS 启动子具有 AvLIS 和 AvHUS 启动子不具备的 GCN4-motif。本研究在此基础上克隆了海南砂 AIBPPS 启动子, 该启动子具有多个顺式作用元件, 包括参与光、低温、干旱、茉莉酸甲酯等逆境响应的顺式作用调控元件; AIBPPS 启动子与 AvBPPS 启动子 3'端序列高度相似, 然而, AIBPPS 启动子却不具有 GCN4-motif, 相应位置的碱基序列变成了 CGTCA-motif——一个参与茉莉酸甲酯

(methyl jasmonate, MeJA) 响应的调控元件。通过进一步的瞬时表达实验进行验证, 发现截短至相似区域与各自相应全长的启动子相比, 其活性表现较为一致, 说明这段截短至相似区域为砂仁 BPPS 启动子序列中的关键保守区域。此外, 在这段核心保守区域中, 包含 GCN4-motif 的阳春砂启动子活性明显高于不具有 GCN4-motif 的海南砂启动子。因此, 推测 GCN4-motif 是调控 AvBPPS 在种子团高表达的重要因素之一。

据文献报道, GCN4-motif 通常以组合的模式在贮藏蛋白种子特异性启动子进行调控。例如, 在醇溶蛋白启动子中, GCN4-motif 与 prolamins-box-motif 构成双因子胚乳盒, 又或者与 bZIP 类转录因子 BLZ2 结合进而调节醇溶蛋白的表达^[11,13-14]; 而 GCN4-motif 在谷蛋白启动子中主要发挥着胚乳特异性表达的作用, 通常与 ACGT-motif 和 AACA-motif 组成最小元件组合或者与 bZIP 类转录因子 RISBZ1 结合调控谷蛋白在胚乳中特异性表达, 并起正调控作用。而根据海南砂和阳春砂 BPPS 转录模式和启动子序列, 推测单个 GCN4-motif 对非贮藏蛋白 AvBPPS 起着胚乳特异性作用以及正调控作用^[9-10,15]。本研究对 AvBPPS 启动子中的 GCN4-motif 进行突变, 瞬时表达的结果显示, 突变体 VBPT-GM 与野生型 VBPT 比较, 活性明显降低 (图 7)。本研究验证了 GCN4-motif 是非贮藏蛋白 AvBPPS 启动子的正调控元件, 对 AvBPPS 的表达起促进作用。

本研究首次克隆了海南砂 AIBPPS 启动子, 并将它与阳春砂 AvBPPS 启动子进行比较, 发现砂仁 BPPS 启动子的关键保守序列并鉴定了 AvBPPS 启

动子的关键顺式元件 GCN4-motif 的正调控作用。下一步将对启动子缺失体和突变体构建稳定遗传的转基因烟草, 分析 GCN4-motif 与 AvBPPS 种子特异性表达的关系, 加深认识 GCN4-motif 在非贮藏蛋白启动子中的调控机制, 为进一步阐明阳春砂和海南砂中的 BPPS 转录差异模式奠定理论基础。

利益冲突 所有作者均声明不存在利益冲突

参考文献

- [1] 中国药典 [S]. 一部. 2020: 264.
- [2] Ao H, Wang J, Chen L, *et al.* Comparison of volatile oil between the fruits of *Amomum villosum* Lour. and *Amomum villosum* Lour. var. *xanthioides* T. L. Wu et Senjen based on GC-MS and chemometric techniques [J]. *Molecules*, 2019, 24(9): 1663.
- [3] 覃权, 蒋春林, 蒋孟良, 等. 不同产地砂仁中乙酸龙脑酯与总挥发油含量比较研究 [J]. *中医药导报*, 2017, 23(14): 70-72.
- [4] 黄绿. 阳春砂仁资源综合利用研究 [D]. 昆明: 云南中医药大学, 2020.
- [5] 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: 24-33.
- [6] Wang H, Ma D M, Yang J F, *et al.* An integrative volatile terpenoid profiling and transcriptomics analysis for gene mining and functional characterization of AvBPPS and AvPS involved in the monoterpene biosynthesis in *Amomum villosum* [J]. *Front Plant Sci*, 2018, 9: 846.
- [7] 李萌. 阳春砂单萜和倍半萜合酶的功能鉴定及 BPPS 的功能比较 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2019.
- [8] 赵海莹, 李萌, 林晓静, 等. 阳春砂 3 个萜类合酶基因启动子的克隆及其参与萜类调控的分析 [J]. *中草药*, 2021, 52(4): 1117-1127.
- [9] Wu C, Washida H, Onodera Y, *et al.* Quantitative nature of the Prolamin-box, ACGT and AACA motifs in a rice glutelin gene promoter: Minimal cis-element requirements for endosperm-specific gene expression [J]. *Plant J*, 2000, 23(3): 415-421.
- [10] Yoshihara T, Washida H, Takaiwa F. A 45-bp proximal region containing AACA and GCN4 motif is sufficient to confer endosperm-specific expression of the rice storage protein glutelin gene, GluA-3 [J]. *FEBS Lett*, 1996, 383(3): 213-218.
- [11] Marzábal P, Busk P K, Ludevid M D, *et al.* The bifactorial endosperm box of gamma-zein gene: Characterisation and function of the Pb3 and GZM cis-acting elements [J]. *Plant J*, 1998, 16(1): 41-52.
- [12] 赵海莹. 阳春砂萜类合酶及其启动子参与挥发性萜类合成的研究 [D]. 广州: 广州中医药大学, 2020.
- [13] Oñate L, Vicente-Carbajosa J, Lara P, *et al.* Barley BLZ2, a seed-specific bZIP protein that interacts with BLZ1 *in vivo* and activates transcription from the GCN4-like motif of B-hordein promoters in barley endosperm [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(14): 9175-9182.
- [14] Müller M, Knudsen S. The nitrogen response of a barley C-hordein promoter is controlled by positive and negative regulation of the GCN4 and endosperm box [J]. *Plant J*, 1993, 4(2): 343-355.
- [15] Onodera Y, Suzuki A, Wu C Y, *et al.* A rice functional transcriptional activator, RISBZ1, responsible for endosperm-specific expression of storage protein genes through GCN4 motif [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(17): 14139-14152.

[责任编辑 时圣明]