DOI: 10.3969/j.issn.0488-5368.2025.10.001

·育种生理·

桑树主要乳胶蛋白基因 *MaMLP*423 启动子的克隆与表达

杨金宏[1],陈贵攀[2],凌 君[1],楚 渠[1],陈正余[2],孔卫青[1]

(1.安康学院 陕西省蚕桑重点实验室,陕西 安康 725000;2.安康市蚕桑产业发展中心,陕西 安康 725000)

摘 要:主要乳胶蛋白(major latex protein,MLP)是 Bet v 1 超家族成员,参与植物的各种应激反应。本研究对桑树主要乳胶蛋白基因 *MaMLP*423 的启动子 pMaMLP423 进行了生物信息学分析和克隆表达分析。结果显示 pMaMLP423 具有启动子必需的 TATA-box 和 CAAT-box 等基本顺式作用元件,还有参与光响应(Box 4、TCT-motif、GA-motif 等)、脱落酸反应(ABRE、AAGAA-motif)、乙烯响应(ERE)、干旱诱导(MYB、MBS 等)、创伤响应(WUN-motif)等顺式作用元件。构建植物表达载体 pMaMLP423 及缺失部分序列的 pMaMLP423ΔS1 和 pMaMLP423ΔS2,转化烟草瞬时表达,qPCR 和组织化学染色检测显示,三个启动子均能驱动下游 GUS 基因的表达,但缺失 S1 和 S2 启动子的活性降低。外源激素脱落酸和乙烯利能显著诱导 *MaMLP*4232 基因的表达。本研究为深入了解 MaMLP423 的功能和作用提供了参考。

关键词:桑树;主要乳胶蛋白 *MLP*423 基因;启动子;载体构建;GUS 染色

中图分类号:S544 **文献标识码**:A **文章编号**:0488-5368(2025)10-0001-05

Cloning and Expression Analysis of Promoter of Major Latex Protein *MaMLP*423 Gene from Mulberry

YANG Jinhong[1], CHEN Guipan[2], LING Jun[1], CHU Qu[1], CHEN Zhengyu[2], KONG Weiqing[1]

(1. *Shaanxi Key Laboratory of Sericulture, Ankang University, Ankang, Shaanxi* 725000, *China*;
2. *Ankang Sericultural Industry Development Center, Ankang, Shaanxi* 725000, *China*)

Abstract: Major latex protein (MLP) is a member of the Bet v 1 superfamily and is involved in various plant stress responses. In this study, the promoter of the mulberry *MaMLP*423 gene, designated pMaMLP423, was analyzed using bioinformatics, cloned, and functionally characterized. The results showed that pMaMLP423 contains not only core cis-acting elements such as the TATA-box and CAAT-box, but also multiple elements responsive to light (Box 4, TCT-motif, GA-motif), abscisic acid (ABRE, AAGAA-motif), ethylene (ERE), drought (MYB, MBS), and wounding (WUN-motif). Plant expression vectors containing the full-length promoter (pMaMLP423) and its truncated versions (pMaMLP423ΔS1 and pMaMLP423ΔS2) were constructed and transiently expressed in tobacco. qPCR and histochemical GUS staining demonstrated that all three constructs could drive the expression of the downstream GUS gene. However, the promoter activities of the ΔS1 and ΔS2 deletions were both lower than that of the full-length pMaMLP423. Exogenous application of ABA and ethylene significantly induced the expression of *MaMLP*423. This study provides a foundation for further investigation of the regulatory function of the *MaMLP*423 promoter.

Key words: Mulberry; Major latex protein MLP423 gene; Promoter; Vector construction; GUS staining

收稿日期:2024-11-25 **修回日期**:2025-01-15

基金项目:陕西教育厅科学研究计划项目(20JS003);安康市科学技术研究发展计划项目(AK2020-NY-05)。

第一作者简介:杨金宏(1979-),副研究员,主要从事桑树分子生物学研究。

通信作者:孔卫青。

先天性免疫系统是植物应对外源胁迫的主要防御机制,Jones 和 Dang 的研究显示,植物受到病原体的入侵时,可诱导其特异性蛋白主要乳胶蛋白(major latex protein,MLP)家族的表达,通过先天免疫和获得的抗性信号保护植物,在植物抗病、抗逆和生长发育中发挥重要作用[1~4]。MLP423 是 MLP 家族成员之一,三维结构与病程相关蛋白 10(pathogenesis-related protein 10,PR10)家族非常相像[5],参与植物的各种应激反应。棉花植株在受粉虱危害后,GhMLP423 的表达量增加,使用 RNA 干扰降低基因的表达,其过氧化物酶的活性被降低,超氧化物歧化酶的活性得到增强[6]。受轮纹病菌(*Botryosphaeria berengeriana*)和苹果致病型链格孢菌(*Alternaria alternate*)感染的苹果中,*MdMLP423* 的表达下调,防御和应激相关基因及转录因子的表达被抑制[7~9]。感染链格孢菌的烟草中,*NbMLP423* 基因的表达显著提高[10]。此外,过表达 *NbMLP423* 基因的烟草,ABA 合成基因的转录和胁迫相关基因的表达同时提高,降低了干旱胁迫下的膜损伤和活性氧积累[11],同时促进了 PR10 蛋白家族表达的上调,增强了烟草的抗性。

启动子是调控植物基因表达的重要元件,利用不同启动子调控基因表达是植物抗逆性研究的重要内容。组成型和诱导型表达启动子是植物基因工程育种中使用较多的两种启动子。其中组成型表达启动子可以持续地表达相关抗病基因[12],而诱导型表达启动子只在特定胁迫下表达,不会影响植物的正常生长发育[13]。

桑树是我国蚕桑产业的物质基础,同时因其具有生长速度快、适应性强,耐干旱、盐碱、寒冷等恶劣环境,近年来还被用于土壤植被修复、防风固沙、荒坡和水库消落带的生态屏障区等[14,15]。但目前对于桑树的抗逆性及生态适应性机理知之甚少。本研究对桑树主要乳胶蛋白基因 *MaMLP423* 的启动子 pMaMLP423 进行了生物信息学分析和克隆测序,构建了 pMaMLP423 及其多态性序列的植物表达载体,研究其启动活性,以及外源激素对基因的诱导表达,对解析该启动子的结构和基因功能及进一步研究桑树抗病、抗逆性具有一定意义。

1 材料和方法

1.1 材料和主要试剂

桑品种为湖桑 32,取自安康学院陕西省蚕桑重点实验室科研基地,本氏烟(*Nicotiana benthamiana*)材料由陕西艾优稷生物技术有限公司提供。高保真 Taq 酶、Hifair® Ⅱ 1st Strand cDNA Synthesis Kit(gDNA digester plus)、Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix(High Rox Plus)等购自上海翊圣生物有限公司。重组连接试剂 NovoRec® plus One step PCR Cloning Kit 购自安诺伦(北京)生物科技有限公司。植物 RNA 提取试剂盒购自 Promega,限制性内切酶 *Hind Ⅲ*、*Sal Ⅰ*、胶回收试剂盒等购自 TaKaRa。农杆菌 GV3101 及植物表达载体 pCAMBIA1391 由本实验室保存。其他试剂为分析纯。

1.2 *MaMLP423* 启动子序列特征分析

提取桑树基因组中 *MaMLP423* 基因(ID:XM_010102202.2)起始密码子上游 2000 bp 的序列,记为 pMaMLP423。使用植物基因组 DNA 提取试剂盒提取湖桑 32 叶片基因组,设计合成引物 pMLP423-F 和 pMLP423-R(表 1),高保真 Taq 酶扩增 pMaMLP423。PCR 扩增产物进行 1.0%琼脂糖凝胶电泳和测序。在线 PlantCare(http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/)预测其中的顺式作用元件。

1.3 pMaMLP423 启动子序列多态性与引物设计

Clustal 软件[16]比对 pMaMLP423,发现其在不同品种桑树基因组有两处差异,一处位于 118~467 bp,不同品种间差异较大,提取该序列比对桑树基因组,发现有 3 000 多个位点,是一突变 TIME 转座子;另一处位于 891~1 029 bp,部分品种中缺失,分别记为 S1 和 S2(图 1)。设计引物 S1-F 和 S1-R、S2-F 和 S2-R(表 1),分别扩增缺失 S1 和 S2 序列的启动子 pMaMLP423△S1 和 pMaMLP423△S2,分析缺失对其活性的影响。

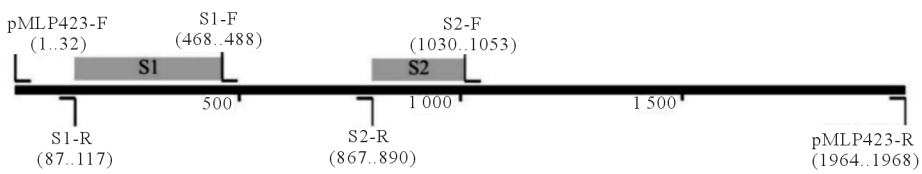

图 1 S1、S2 及引物位置,上方和下方分别为正向和反向引物

表 1 pMaMLP423 扩增和重组质粒构建引物

引物名称	序列(5′-3′)	用途
pMLP423-F	TTGGGCCCGGCGCGCC AAGCTT AATTCGGAGTGGGTAACTTCAATAA TTTTTTC	pMLP423 的扩增和重组质粒构建,下划线为载体序列,阴影为 *Hind* $ III 和 *Sal* I 酶切位点
pMLP423-R	GAATTCCCGGGGATCCGTCGAC CCAAACCTTGTCAGCATTAGACTTC	
S1-F	TCATAGAAAGCACTTGTTTTT **ATGTTCCCGCAGCCCATGACA**	pMaMLP423 △S1 和 pMaMLP423 △S2 的扩增和重组质粒构建,方框内碱基与对应引物的加粗碱基互补
S1-R	TG TGTCATGGGCTGCGGGAACAT **AAAAACAAGTGCTTTCTATGAGA** ACGATTG	
S2-F	GAGCTATGACTGTGGTCTGTTT **ATTTTGGGACAGAGACCGTTGT**TG	
S2-R	ACAACGGTCTCTGTCCCAAAAT **AAACAGACCACAGTCATAGCTC**CG	

1.4 重组质粒构建与农杆菌的转化

Hind III 与 Sal I 双酶切 pCAMBIA1391 载体,并进行电泳检测和线性化载体的回收,同时回收 1.2 中 pMaMLP423 的 PCR 扩增产物。NovoRec ® plus 重组酶孵育两个回收产物,同源重组方法构建其重组质粒 pMaMLP423-P。

分别使用 pMLP423-F 和 S1-R、pMLP423-R 和 S1-F 进行 PCR 扩增,混合两个 PCR 扩增产物进行变性、退火,以此为模板,pMLP423-F 和 pMLP423-R 引物进行 PCR 扩增,获得 S1 缺失的启动子 pMaMLP423△S1,同源重组方法获得其重组质粒,记为 pMaMLP423 △S1-P。同样方法获得 pMaMLP423△S2 及其重组质粒 pMaMLP423△S2-P。液氮冻融法分别转化 3 个重组质粒至根癌农杆菌 GV3101,同时转化 pCAMBIA1391 及缺失 35S 启动子的载体 pCAMBIA1391△35S 作阳性和阴性对照。

1.5 农杆菌介导的瞬时转化和表达检测

注射渗透法将携带重组质粒的农杆菌渗透悬浮液注射入长势一致烟草的倒三和倒四叶片,之后套上保鲜袋置于培养室黑暗培养过夜。第二天打开保鲜袋,继续培养至侵染后 2 d,取侵染区域进行组织化学染色和染色结果拍照。同时提取 RNA,Hifair® Ⅱ 1st Strand cDNA Synthesis Kit (gDNA digester plus)进行第一链反转录反应,Hieff® qPCR SYBR Green Master Mix(High Rox Plus)进行实时荧光定量 PCR(qPCR),以烟草 *EF-1Af* 为内参,检测 GUS 基因的表达,使用引物见表 2,相对定量方法($2^{-\Delta\Delta CT}$)评估相对表达差异。

1.6 *MaMLP*423 基因的诱导表达

选取健康湖桑 32 的 1 a 生枝条,分别喷施脱落酸(ABA,2.64 mg/L)、乙烯利(ETH,500 mg/L)、茉莉酸甲酯(MeJA,224 mg/L),用无菌镊子对叶片进行机械损伤,24 h 后分别取处理叶片提取 RNA,以桑树肌动蛋白 *actin* 基因为内参进行 qPCR,检测 *MaMLP*423 基因的表达。使用引物见表 2。

表 2 qPCR 检测使用引物

引物名称	序列(5′-3′)
MLP423F	AGATCGAAGTTGTGGACCCA
MLP423R	TCACAGCTCCACTTCACCAA
ActinF	TGCTATTCTCCGTCTCGACC
ActinR	AGCCAGCTTCTCCTTCATGT
GUSF	GAATACGGCGTGGATACGTTAG
GUSR	GATCAAAGACGCGGTGATACA
EF-1aF	TGAGATGCACCACGAAGCTC
EF-1aR	CCAACATTGTCACCAGGAAGTG

2 结果与分析

2.1 pMaMLP423 作用元件分析

PCR 扩增和测序获得 pMaMLP423 序列 1 968 bp。在线 PlantCare 预测 pMaMLP423 含 CAAT-box 及 TATA-box 等核心启动子,还有非常多的顺式作用元件,如与光响应相关的作用元件 GATA-motif、G-box、Box 4、LAMP-element 等,胁迫类响应元件 MYB、MBS、ARE、Box 4 等,激素诱导类作用元件 ABRE、as-1、AAGAA-motif、CGTCA-motif、TGACG-motif 等,植物生长发育相关元件 CCAAT-box、O2-site 等(表 3),这说明桑树 *MaMLP*423 基因可能与桑树应激反应、激素诱导和生长发育等相关。

表 3 *MaMLP*423 基因启动子顺式作用元件

功能	元件	核心序列	分布
脱落酸反应的顺式作用元件	ABRE	ACGTG	−963, −1889
	AAGAA−motif	GAAAGAA	−29
茉莉酸甲酯反应的顺式作用调节元件	CGTCA−motif	CGTCA	−1690, +1891,
	as−1	TGACG	+1690, −1891
生长素反应元件	TGA−element	AACGAC	1709(−)
乙烯响应元件	ERE	ATTTT/CAAA	+561, −618, −759, +993, −1432
光响应元件	GATA−motif	GATAGGG	+807
	GA−motif	ATAGATAA	+235
	I−box	cCATATCCAAT	+1747,
	TCT−motif	TCTTAC	−125, −902
	LAMP−element	CTTTATCA	−1218
	G−box	TACGTG	−963, +1889
	AE−box	AGAAACTT	+1272
	Box 4	ATTAAT	+187, +394, +624
光响应的 MYB 结合位点	MRE	AACCTAA	+746
干旱诱导的 MYB 结合位点	MBS	CAACTG	−491, +1327
	MYB	CAACCA	−1306, −1540
	MYB recognition site	CCGTTG	+1044, +1075
	MYB−like sequence	TAACCA	+263, +1526
厌氧诱导必须的顺式作用调节元件	ARE	AAACCA	+663, +1411
真菌诱导顺式作用元件	W box	TTGACC	−788
压力反应元件	STRE	AGGGG	+810
富含 AT 的 DNA 结合蛋白(ATBP−1)的结合位点	AT−rich element	ATAGAAATCAA	+181
创伤响应元	WUN−motif	AAATTACTA	−351
脱水响应相关元件	MYC	CATTTG	+58
MYBHv1 结合位点	CCAAT−box	CAACGG	−1044, −1075
玉米醇溶蛋白代谢调节的顺式作用调节元件	O2−site	GTTGACGTGA	+1935
蛋白结合位点	Box III	atCATTTTCACt	−970

注:正号表达顺式作用元件位于正链,负号表示该顺式作用元件位于互补链,阴影和下划线标示位置分别位于 S1 和 S2 区。

2.2 pMaMLP423 植物表达载体的构建

利用同源重组,成功构建重组质粒 pMaMLP423−P。pMaMLP423△S1 和 pMaMLP423△S2 的 PCR 扩增,分别在 1 600 bp 和 1 800 bp 左右获得扩增条带(图 2),符合预期大小。回收条带构建重组质粒 pMaMLP423 △S1 − P 和 pMaMLP423 △S2−P。

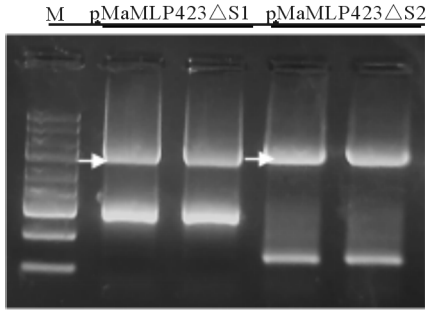

图 2 pMaMLP423△S1 和 pMaMLP423△S2 的 PCR 扩增,箭头所指为扩增条带,M 为 DL5000 marker

2.3 转基因烟草中 GUS 基因的表达

提取转基因烟草叶片的 RNA,qPCR 检测其中 GUS 基因的表达。结果见图 3A,35S 启动子驱动的 GUS 基因的表达量最高,pMaMLP423 次之,pMaMLP423△S1 和 pMaMLP423△S2 的表达均低于 pMaMLP423,说明 S1 和 S2 片段缺失对启动子的活性有一定影响。

2.4 GUS 蛋白组织化学染色分析

组织化学染色法检测转基因烟草中 GUS 的瞬

时表达,从染色结果可以看出(图 3B),阳性对照 CK+和实验组的烟草叶片呈现出不同程度的蓝色斑块,表明所有启动子均具有启动活性,驱动了下游 GUS 报告基因的表达。进一步观察蓝色斑点聚集程度,CK+35S 烟草叶片几乎整个呈现深蓝色,说明其 GUS 基因的表达最强。pMaMLP423 烟草叶片呈大面积深蓝色,pMaMLP423△S1 和 pMaMLP423△S2 烟草叶片呈现小面积深蓝色,说明启动子活性发生降低,与定量 PCR 结果一致。阴性对照 CK-叶片未见蓝色斑点,说明其 GUS 没有表达。

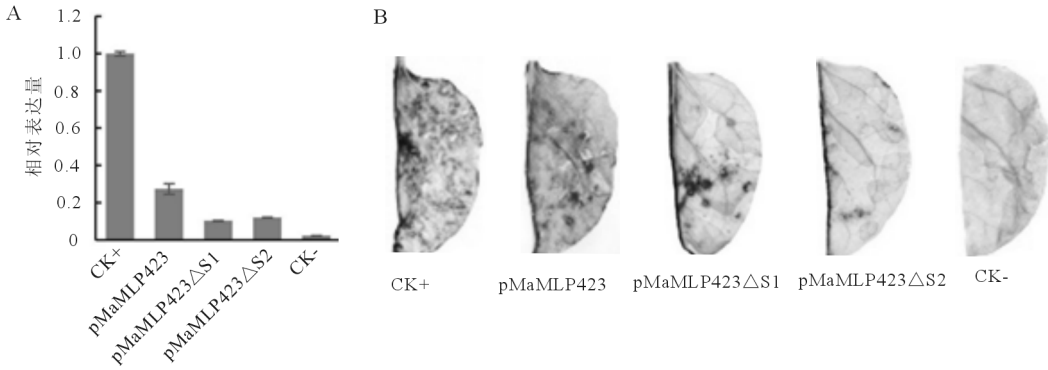

图 3 qPCR(A)和组织化学染色(B)检测转基因烟草 GUS 基因的表达

2.5 *MaMLP*423 基因的诱导表达

qPCR 检测 *MaMLP*423 基因响应损伤和外源激素的表达情况,结果基因在所有处理植株中的表达水平均有所提高,其中 ABA 和 ETH 处理植株中基因的上调达显著水平($P<0.05$)(图 4)。

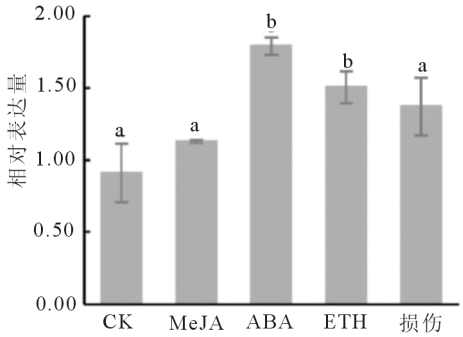

图 4 qPCR 检测 MaMLP423 基因诱导表达

3 讨论

启动子是基因转录的开关,也是调控基因表达及强度的关键。本研究 MaMLP423 的启动子含有与 ABA、MeJA 等生长激素相关的顺式作用元件,这与烟草、拟南芥、苹果等该类基因与 ABA 依赖途径诱导的气孔关闭和抗逆性相关的结果一致[9,17]。同时发现其启动子区域还有干旱诱导、压力、真菌诱导等逆境应答有关的元件,这与该家族蛋白可对生物和非生物胁迫作出反应的功能一致[18,19],说明 *MaMLP*423 基因可能对桑树在不同胁迫下的诱导表达起一定的调控作用。

瞬时表达分析是检验启动子是否具备启动下游基因表达活性功能的常用验证方法[20,21]。本研究构建了 3 种 pMLP423-GUS 植物表达载体,瞬时转染本氏烟草叶片,检测启动活性。结果 3 种启动子均能驱动报告基因 GUS 表达,但 S1 和 S2 的缺失对驱动活性的影响较大。根据此前分析,S1 区含有与光响应和胁迫类相关的作用元件,S2 区主要为激素诱导和光响应相关元件,这为进一步的基因功能及表达调控机制提供参考依据。

参 考 文 献:

[1] Jones J D G, Dang J L. The plant immune system[J]. Nature, 2006, 444(7117): 323-329.

[2] Ruperti B, Bonghi C, Ziliotto F, *et al.* Characterization of a major latex protein (MLP) gene down-regulated by ethylene during peach fruitlet abscission[J]. Plant Sci, 2002, 163: 265-272.

[3] Inui H, Sawada M, Goto J, *et al.* A major latex-like protein is a key factor in crop contamination by persistent organic pollutants[J]. Plant Physiol, 2013, 161: 2 128-2 135.

[4] Zhang N, Li R, Shen W, *et al.* Genome-wide evolutionary characterization and expression analyses of major latex protein (MLP) family genes in Vitis vinifera[J]. Mol Genet Genom, 2018, 293: 1 061-1 075.

[5] Park C J, Kim K J, Shin R, *et al.* Pathogenesis-related protein 10 isolated from hot pepper functions as a ribonuclease in an antiviral pathway[J]. Plant J, 2004, 37: 186-198.

[6] 李素丽. 棉花与烟粉虱互作的蛋白组学分析和 GhMLP423 基因功能分析[D]. 武汉:华中农业大学, 2016.

(下转第 34 页)