

文章编号: 1674-7054(2018)01-0021-10

橡胶树 *HbMVK* 启动子的克隆与缺失表达分析

胡进 杨翠萍 巩笑笑 闫冰玉 谭玉荣 王丹 高璇 张恒 刘进平

(海南大学 海南省热带生物资源可持续利用重点实验室/热带农林学院,海口 570228)

摘要: 为了研究橡胶 *MVK* 基因启动子精细结构及功能,笔者利用 PCR 技术对橡胶树 *HbMVK* 基因启动子进行了克隆,并对其进行了生物信息学分析。结果表明,该启动子序列全长 1 696 bp,包含 CAAT-box, TATA-box, CAT-box, LTR, GARE-motif, TCA-element 等元件。此外,根据元件分布,构建橡胶树 *HbMVK* 基因启动子系列缺失和全长序列表达载体并转化拟南芥。T2 代转基因拟南芥中,报告基因 GUS 组织化学染色结果表明:*HbMVK* 启动子全长序列和 5'端 -1 386 bp 缺失 *HbMVK* 启动子驱动的 GUS 基因只在转基因拟南芥实生苗胚轴中有极微弱表达。5'端 -1 221 bp 和 -725 bp 缺失 *HbMVK* 启动子驱动 GUS 基因表达的活性较强,而 5'端 -325 bp 缺失 *HbMVK* 启动子则完全失去活性,这表明启动子核心调控元件位于 -725 bp 到 -325 bp 之间。

关键词: 橡胶树;橡胶生物合成;*MVK* 基因启动子;启动子缺失分析;GUS 染色分析

中图分类号: Q 786

文献标志码: A

DOI: 10.15886/j.cnki.rdsxb.2018.01.003

橡胶树 (*Hevea brasiliensis*) 作为四大工业原料(煤炭、钢铁、石油、橡胶)唯一可再生原料,以其栽培为基础的天然橡胶产业对我国经济建设和国防安全具有重要的战略意义^[1-2]。天然橡胶主要成分为聚异戊二烯(cis-1,4-polyisoprene),其生物合成途径已基本清楚,但是对其调控机制还知之甚少^[3-10]。为了利用生物技术提高橡胶树产量,对橡胶树中橡胶生物合成及基因表达调控深入研究是十分必要的。橡胶链合成的前体物或单体模块为异戊二烯焦磷酸(isopentenyl pyrophosphate, IPP 或 IDP),目前被认为是通过细胞质中的甲羟戊酸(mevalonic acid, MVA)途径合成^[11-14]。其中甲羟戊酸激酶(mevalonate kinase, *MVK*)是 MVA 途径中第 1 个 ATP 依赖酶,它催化 MVA 磷酸化形成甲羟戊酸-5-磷酸(5-phosphomevalonate, MVP 或 MVAP)^[15, 16]。编码该酶的橡胶树基因已经克隆,它与拟南芥和水稻对应基因具有 61%~73% 的同源性,研究表明,它在橡胶树的胶乳、叶片、木质部和韧皮部都有表达,其中,以胶乳中表达量最高,其后依次为木质部、叶片和韧皮部^[17]。但是,目前尚未见到对该基因表达调控研究的报道。基因转录调控是真核生物基因表达调控的重要方式,而启动子是基因表达调控的顺式元件,在很大程度上决定基因表达的强度与特异性^[18]。为了了解 *HbMVK* 启动子中的精细结构及功能,笔者利用 PCR 技术克隆了橡胶树 *HbMVK* 基因启动子,通过生物信息学软件分析了 *HbMVK* 启动子的顺式作用元件及其可能的生物学功能,并用 5'端缺失分析法研究了该基因启动子不同区域对其组织特异性表达的影响,旨在为进一步研究橡胶树中橡胶生物合成的调控机理积累资料。

1 材料与amp;方法

1.1 试验材料 巴西橡胶树热研 7-33-97 叶片采自海南大学试验基地,拟南芥 Col-0 种子由本实验室保存。TA 克隆载体 pMD-19T 及大肠杆菌 DH5 α 感受态菌株购自宝日医生物技术(北京)有限公司

收稿日期: 2017-11-09

修回日期: 2017-12-29

基金项目: 国家自然科学基金项目(31560573); 海南省重大科技专项(ZDZX2013023)

作者简介: 胡进(1993-),男,海南大学热带农林学院 2015 级硕士研究生, E-mail: 409797358@qq.com

通信作者: 刘进平(1970-),男,教授,博导,研究方向:作物遗传育种, E-mail: liu3305602@163.com

(TaKaRa) 植物表达载体 pCAMBIA1301 及农杆菌 GV3101 感受态菌株购自武汉转导生物科技发展有限公司。

1.2 橡胶树 *HbMVK* 基因启动子区序列的扩增和生物信息学分析 采摘新鲜的橡胶树苗上的嫩叶,立即置于液氮中保存。带回实验室后将叶片剪去主叶脉,在液氮中研磨成粉末状,用改良 CTAB 法^[19]进行橡胶 gDNA 的提取。提取完成后,电泳检测其完整性,以质量较好的 gDNA 为模板,根据橡胶全基因组测序数据^[20]和来自 NCBI 数据库的 *HbMVK* 基因序列(XM_021818592.1)设计启动子克隆引物,并在下游引物加上 NcoI 酶切位点。引物见表 1 中的 M5。PCR 条件如下:预变性(94 °C)5 min,变性(94 °C)30 s、退火(57 °C)30 s、延伸(72 °C)2 min,变性、退火和延伸 30 个循环,终延伸(72 °C)7 min,然后于 4 °C 保存。将 PCR 得到的启动子序列经胶回收操作,连接到 pMD-19T 载体,然后转化大肠杆菌。挑取阳性菌落经 PCR 鉴定无误后送 Thermo Fisher Scientific 测序。测序结果经 DNAMAN 软件进行序列比对无误后,利用 Plant-CARE(<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/plantcare/html/>)进行生物信息学分析。

1.3 不同长度 5'端缺失 *HbMVK* 启动子的载体构建与拟南芥转化 参考 Vitale 等的方法^[21]根据在线分析结果,设计不同长度 5'端缺失型启动子对应引物(表 1),交由 Thermo Fisher Scientific 合成。除退火温度见表 1 外,其他 PCR 扩增条件同上(1.2)。扩增出不同长度的 *HbMVK* 基因启动子区序列,进行 TA 克隆,挑选阳性菌进行 PCR 检测,然后测序。选取目的片段无突变位点的菌株,提取其质粒以构建植物表达载体。参考 Chan 等的方法^[22],提取的质粒经双酶切(限制性内切酶为 NcoI + HindIII 或 NcoI + XbaI)后回收目的片段,与经过同样的酶切去掉 35S 启动子的 pCAMBIA1301 载体用 T4 DNA 连接酶进行连接,转化大肠杆菌。转化菌涂含有 Kan 的平板进行培养,挑取菌落进行菌落 PCR 检测,提取检测结果为阳性的菌落质粒,用冻融法转化 GV3101 感受态农杆菌。用含有 Kan 和利福平的平板筛选阳性菌株,最后用阳性农杆菌通过浸花法^[23-25]转化野生型拟南芥(Col-0)。

表 1 构建系列 *HbMVK* 启动子 5'端缺失 GUS 表达载体所用引物

Tab. 1 Primers used for *HbMVK*pro::GUS vector construction of *HbMVK* promoter and its various deletion fragments

缺失片段 Deletion fragment	引物 Primer	引物序列 Primer sequence	退火温度/°C Annealing temperature
M1	<i>HbMVK</i> pro-S1	5'-CCTACCGCAAGAAAGTGTACCC-3'	59
	<i>HbMVK</i> pro-A	5'-CATGCCATGGTAACTTCCATTGTTTTTCAGCAGC-3'	
M2	<i>HbMVK</i> pro-S2	5'-TATCGCCTACCATTAAACGCAC-3'	56
	<i>HbMVK</i> pro-A	5'-CATGCCATGGTAACTTCCATTGTTTTTCAGCAGC-3'	
M3	<i>HbMVK</i> pro-S3	5'-GGATTAGATTAGACCCAC-3'	56
	<i>HbMVK</i> pro-A	5'-CATGCCATGGTAACTTCCATTGTTTTTCAGCAGC-3'	
M4	<i>HbMVK</i> pro-S4	5'-GGCAATGAGGGCTACACTGG-3'	57
	<i>HbMVK</i> pro-A	5'-CATGCCATGGTAACTTCCATTGTTTTTCAGCAGC-3'	
M5	<i>HbMVK</i> pro-S5	5'-TTCAGACGGTTTCTCTGCTCC-3'	57
	<i>HbMVK</i> pro-A	5'-CATGCCATGGTAACTTCCATTGTTTTTCAGCAGC-3'	
GUS	<i>GUS</i> -S	5'-CTCATTACCGCAAAGTGTGGG-3'	60
	<i>GUS</i> -A	5'-AGTTCTTTCCGCTTGTGCC-3'	

注:引物序列包括添加的 NcoI 酶切位点,如下划线所示

Note: The primer sequences containing NcoI restriction sites as underlined

1.4 转基因拟南芥的筛选和 GUS 表达分析 将 T0 代拟南芥在 22 °C 培养室(16 h 光照 & 8 h 黑暗)中培养至种子成熟,收集种子置于 37 °C 烘箱中 2 d 后可长期保存。待所有 T0 代种子成熟后将种子用 75% 乙醇和 10% 次氯酸钠消毒,平铺于含有利福平的 1/2MS 培养基上,于培养室中筛选。将正常生长的 T1 代幼苗移栽到培养土中,待长到 30 d 后剪下 1~2 片叶提取 gDNA 做 PCR 检测。将检测为阳性的植株培养至结荚,单独收集每株 T1 代转基因拟南芥的种子,播种于筛选培养基上,选取 T2 代纯合的株系分别在 5, 10, 15 d 进行 GUS 染色分析^[26-28]。

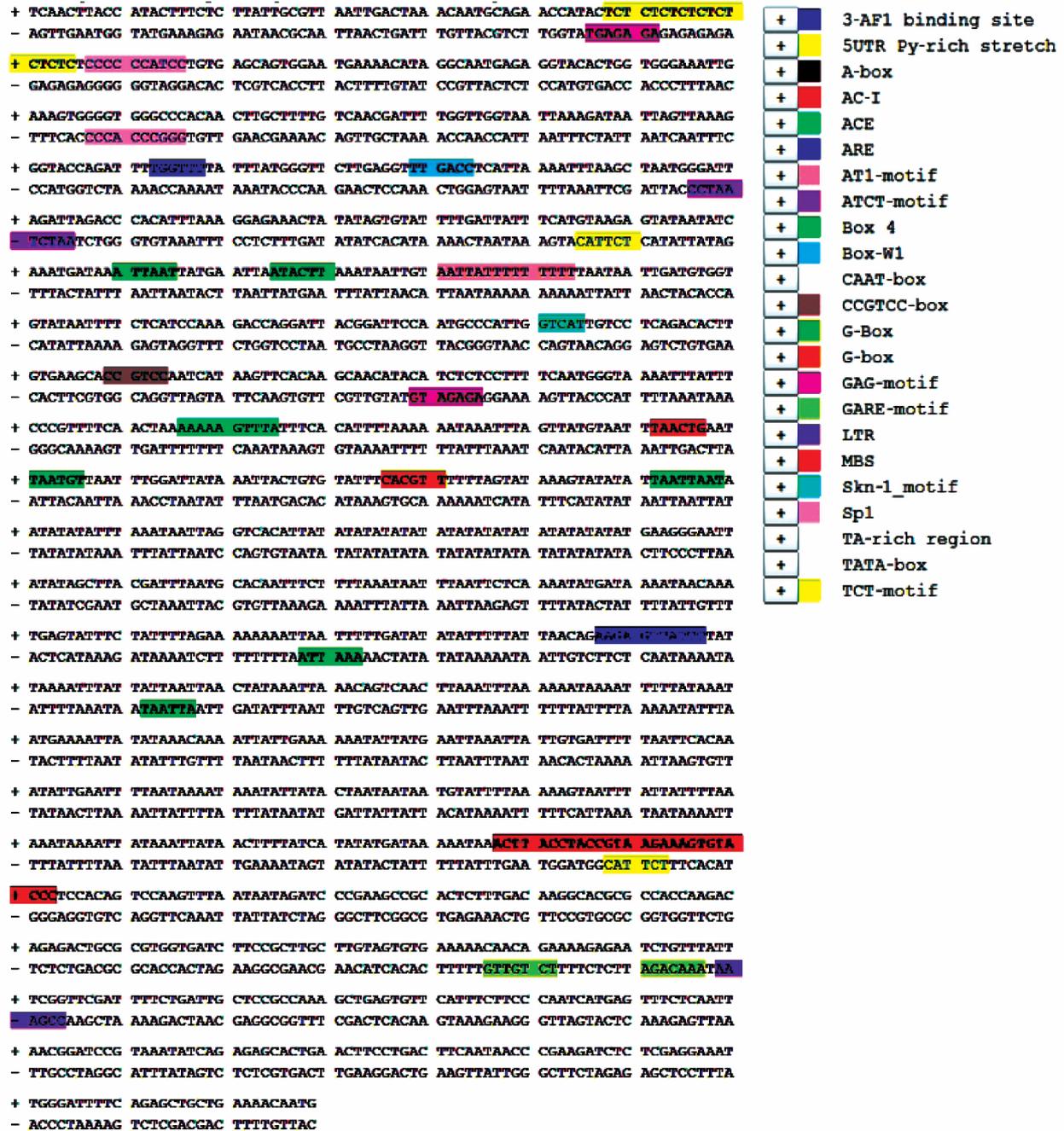


图 1 橡胶树 *HbMVK* 基因启动子序列及其调控元件
 Fig. 1 *HbMVK* promoter sequence and its regulatory elements

2 结果与分析

2.1 橡胶树 *HbMVK* 基因启动子克隆与生物信息学分析 将克隆的橡胶树 *HbMVK* 基因启动子全长序列

经胶回收与 pMD-19T 载体连接后,转化大肠杆菌涂板,37 °C 培养 12 h 后出现明显的白斑,挑取 5 个菌落进行菌落 PCR,结果均有约 1.7 Kb 的条带,说明 *HbMVK* 基因最长启动子区序列 TA 克隆成功,送公司测序后将测序结果与已知序列比对也基本吻合,随后进行序列的相互比对,排除点突变位点。最后将得到的精确序列用 Plant-CARE 分析。从图 1 可知, *HbMVK* 基因启动子区不仅包含典型的植物启动子元件,如 CAAT-box, TATA-box。还包含许多其他调控元件,如有关茉莉酸甲酯 (MeJA) 反应性的顺式作用元件 TGACG-motif、有关水杨酸 (SA) 反应性的顺式作用元件 TCA-element、分生组织表达前端的顺式元件 CAT-box、光反应元件 Sp1、胚乳表达所需的元件 Skn-1_motif、分生组织特异性激活相关的元件 CCGTCC-box、参与干旱诱导的 MYB 结合位点 MBS、增强子 TA-rich region、赤霉素响应元件 GARE-motif、低温响应元件 LTR、光相关调控元件 3-AF1 binding site、ACE、AT1-motif、ATCT-motif、G-Box 等。

2.2 橡胶树 *HbMVK* 基因缺失型启动子的载体构建与拟南芥转化 根据生物信息学分析结果,设计不同的上游引物以构建含不同启动子元件的缺失型 *HbMVK* 基因启动子片段(图 2)。将构建好的 M1-M5 启动子与 pCambia1301 载体连接后,转化大肠杆菌后,阳性菌落经菌落 PCR 鉴定均为阳性。然后提取质粒用冻融法转化农杆菌,筛选阳性菌株经菌落 PCR 鉴定后,确认系列 *HbMVK* 基因缺失型启动子的表达载体构建成功。用花浸法将融合表达载体 M1、M2、M3、M4、M5 (*HbMVK* 基因启动子全长序列)和阳性对照(未切除 35S 启动子的载体)分别转化拟南芥(图 2)。T1 代转基因阳性拟南芥植株经 PCR 检验,均扩增出了相应的目的条带,说明橡胶树 *HbMVK* 基因系列缺失型启动子转化成功。

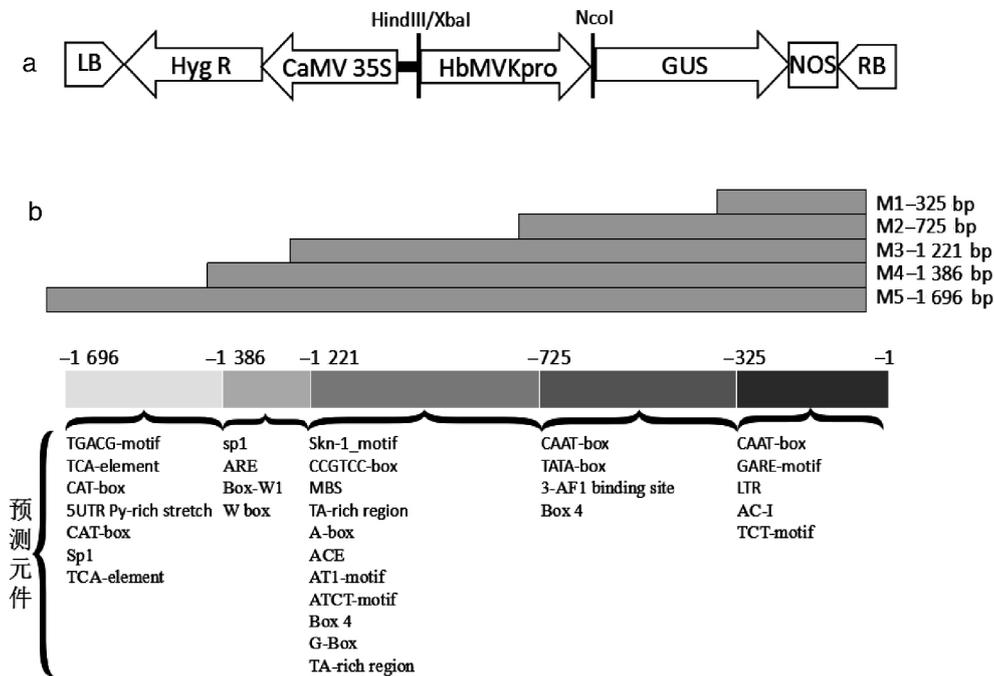


图 2 橡胶树 *HbMVK* 启动子系列缺失片段表达载体的构建

a: 植物表达载体构建示意图; b: 橡胶树 *HbMVK* 启动子不同长度缺失片段及其所包含的顺式元件

Fig. 2 Schematic representation of construction of plant expression vectors containing *HbMVK* promoter 5' deletion fragment
a: Schematic diagram of plant expression vector; b: *HbMVK* promoter and its deletion fragments used for plasmid construction and their elements or motifs identified

2.3 转基因拟南芥的组织化学染色分析 转基因拟南芥 T2 代植株 5、10 和 15 d 的 GUS 染色结果分别如图 3 ~ 5 所示。结果表明, CaMV 35S 启动子可以在拟南芥全株中驱动 GUS 基因的表达,但在茎尖、维管和根部表达最强。 *HbMVK* 启动子全长序列 (M5) 除在 5 d 苗龄的转基因拟南芥实生苗胚轴中有极微弱表达外,在其他部位和其他苗龄植株上基本上没有表现驱动 GUS 表达的活性;5'端 -1 386 bp 缺失 *HbMVK* 启动子 (M4) 则可在 5、10 和 15 d 苗龄植株胚轴中观察到较弱的表达活性。而 5'端 -1 221 bp (M3) 和 -

725 bp (M2) 缺失 *HbMVK* 启动子则表现出较强的驱动 GUS 表达的活性,以茎尖和维管表达量最大,但 5 d 和 10 d 苗龄的转基因拟南芥实生苗两者均未观察到根中的表达活性。15 d 苗龄的转基因拟南芥实生苗可观察到 5'端 -725 bp 缺失启动子可在所有叶片中表达,而 5'端 -1 221 bp 缺失启动子只在 1 对子叶中表达;此外,5'端 -725 bp 缺失启动子可驱动 GUS 在根部表达,而 5'端 -1 221 bp 缺失启动子则否。5'端 -325 bp 缺失 *HbMVK* 启动子 (M1) 则完全失去活性。

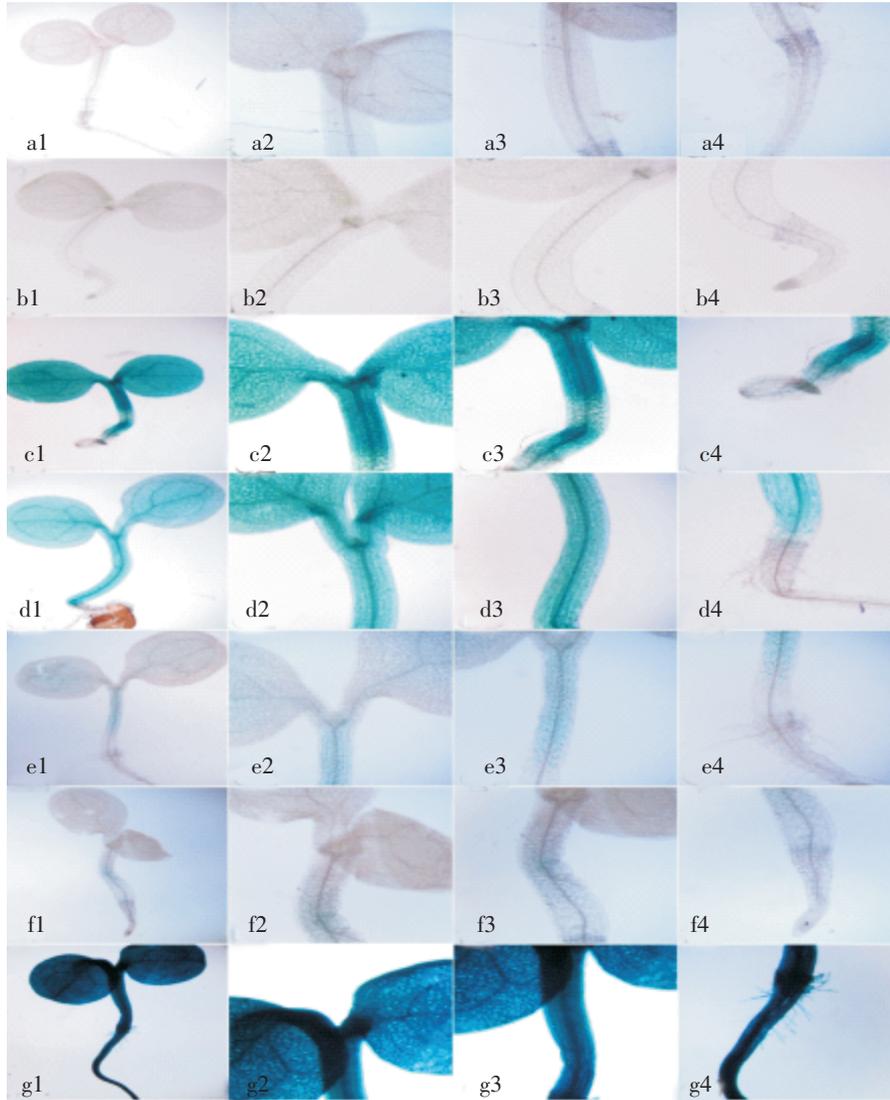


图 3 5 d 苗龄转基因拟南芥的 GUS 组织化学染色分析

a1 ~ a4: 未转化的野生型拟南芥 (阴性对照); b1 ~ b4: *HbMVK* 启动子缺失片段 M1 与 GUS 融合载体转化拟南芥; c1 ~ c4: *HbMVK* 启动子缺失片段 M2 与 GUS 融合载体转化拟南芥; d1 ~ d4: *HbMVK* 启动子缺失片段 M3 与 GUS 融合载体转化拟南芥; e1 ~ e4: *HbMVK* 启动子缺失片段 M4 与 GUS 融合载体转化拟南芥; f1 ~ f4: *HbMVK* 启动子缺失片段 M5 与 GUS 融合载体转化拟南芥; g1 ~ g4: CaMV 35S 启动子与 GUS 融合载体转化拟南芥 (阳性对照)

Fig. 3 Histochemical GUS assay of 5-day old transgenic *Arabidopsis* seedlings

a1 - a4: Non-transgenic wild type *Arabidopsis* (negative control); b1 - b4: *Arabidopsis* transformed with GUS fused to M1 deletion fragment of *HbMVK* promoter; c1 - c4: *Arabidopsis* transformed with GUS fused to M2 deletion fragment of *HbMVK* promoter; d1 - d4: *Arabidopsis* transformed with GUS fused to M3 deletion fragment of *HbMVK* promoter; e1 - e4: *Arabidopsis* transformed with GUS fused to M4 deletion fragment of *HbMVK* promoter; f1 - f4: *Arabidopsis* transformed with GUS fused to M5 deletion fragment of *HbMVK* promoter; g1 - g4: *Arabidopsis* transformed with GUS fused to CaMV 35S promoter (positive control)

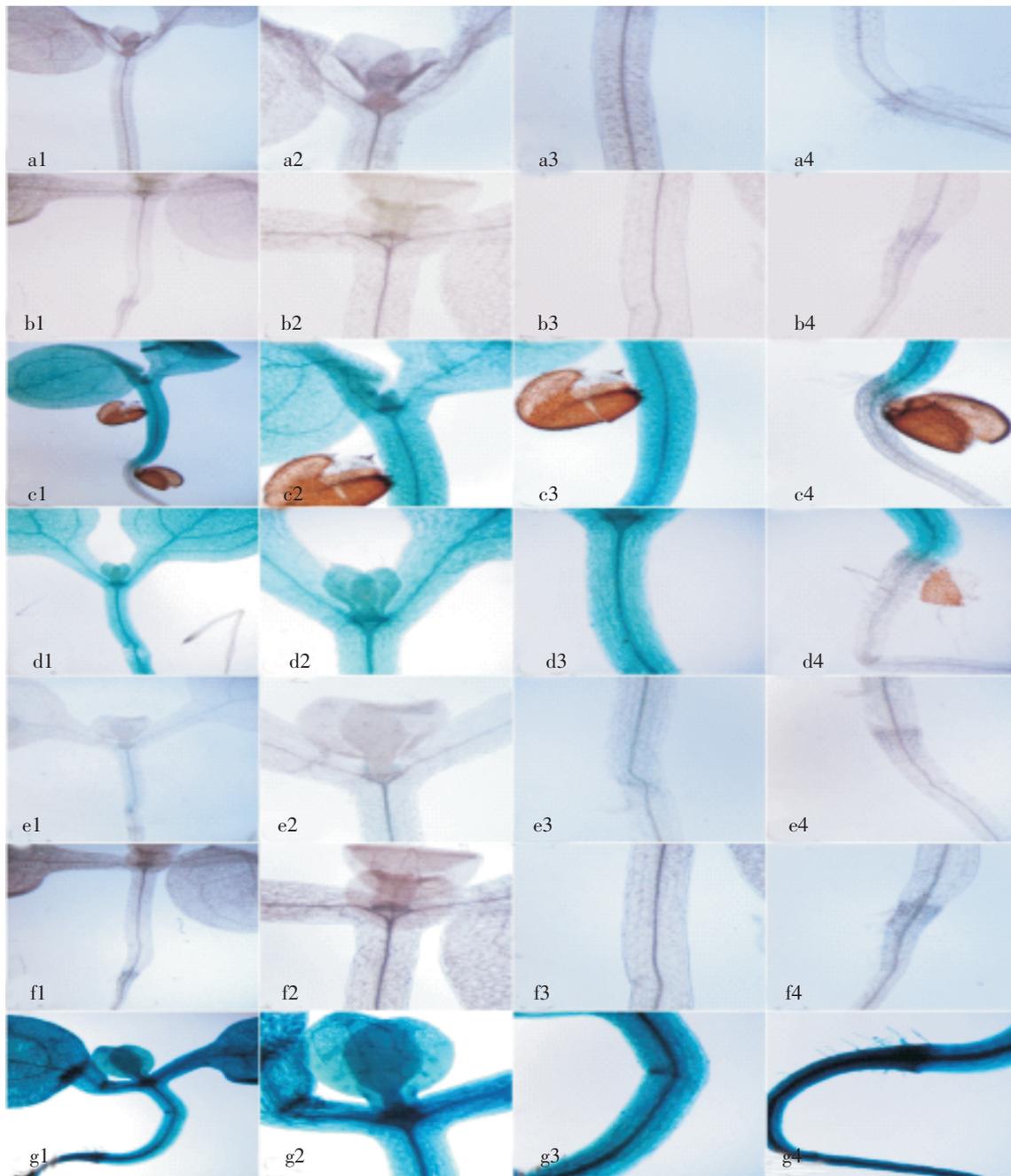


图4 10 d 苗龄转基因拟南芥的 GUS 组织化学染色分析

a1 ~ a4: 未转化的野生型拟南芥 (阴性对照); b1 ~ b4: *HbMVK* 启动子缺失片段 M1 与 GUS 融合载体转化拟南芥; c1 ~ c4: *HbMVK* 启动子缺失片段 M2 与 GUS 融合载体转化拟南芥; d1 ~ d4: *HbMVK* 启动子缺失片段 M3 与 GUS 融合载体转化拟南芥; e1 ~ e4: *HbMVK* 启动子缺失片段 M4 与 GUS 融合载体转化拟南芥; f1 ~ f4: *HbMVK* 启动子缺失片段 M5 与 GUS 融合载体转化拟南芥; g1 ~ g4: CaMV 35S 与 GUS 融合载体转化拟南芥 (阳性对照)

Fig. 4 Histochemical GUS assay of 10-day old transgenic *Arabidopsis* seedlings

a1 - a4: Non-transgenic wild type *Arabidopsis* (negative control); b1 - b4: *Arabidopsis* transformed with GUS fused to M1 deletion fragment of *HbMVK* promoter; c1 - c4: *Arabidopsis* transformed with GUS fused to M2 deletion fragment of *HbMVK* promoter; d1 - d4: *Arabidopsis* transformed with GUS fused to M3 deletion fragment of *HbMVK* promoter; e1 - e4: *Arabidopsis* transformed with GUS fused to M4 deletion fragment of *HbMVK* promoter; f1 - f4: *Arabidopsis* transformed with GUS fused to M5 deletion fragment of *HbMVK* promoter; g1 - g4: *Arabidopsis* transformed with GUS fused to CaMV 35S promoter (positive control).

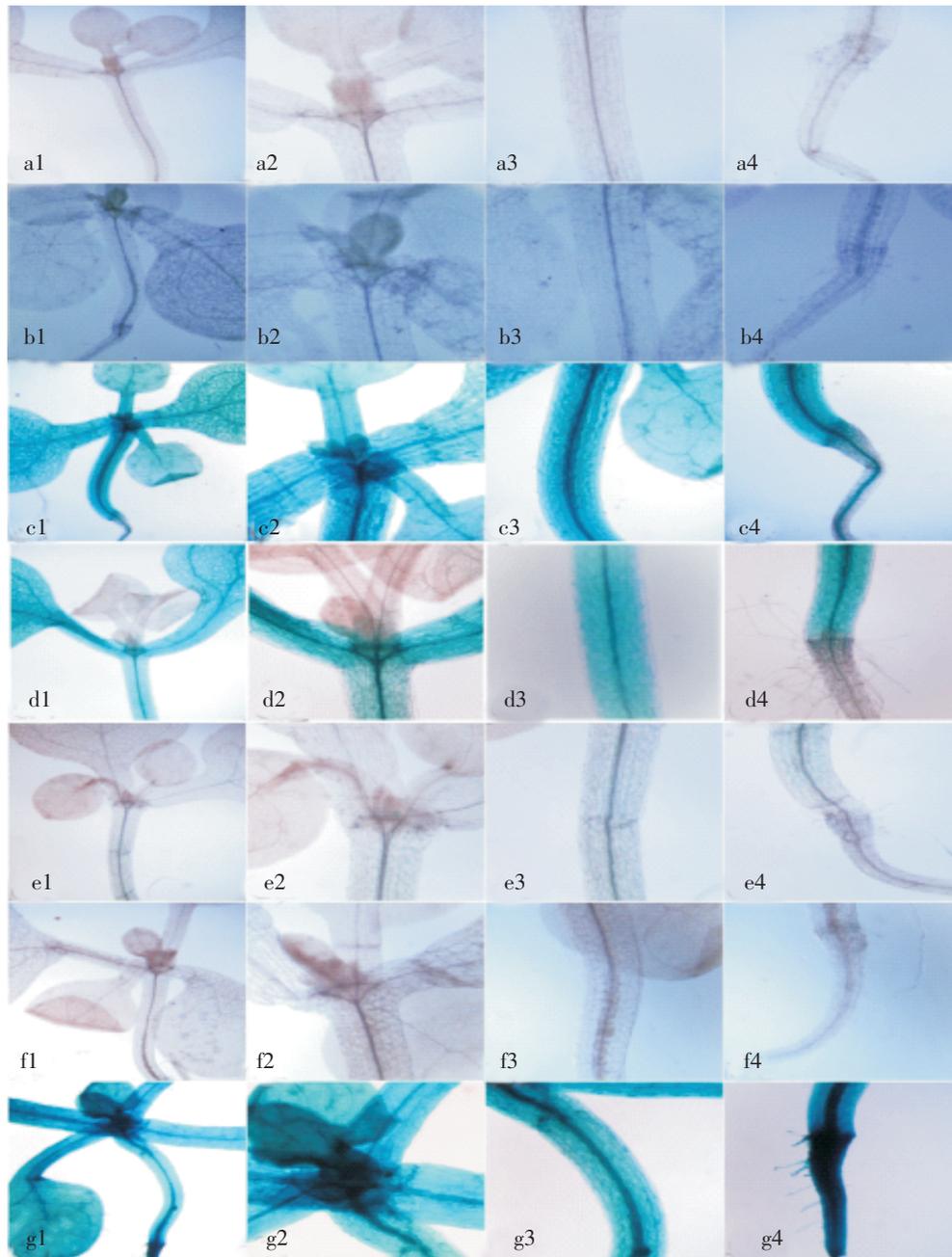


图 5 15 d 苗龄转基因拟南芥的 GUS 组织化学染色分析

a1 ~ a4: 未转化的野生型拟南芥 (阴性对照); b1 ~ b4: *HbMVK* 启动子缺失片段 M1 与 GUS 融合载体转化拟南芥; c1 ~ c4: *HbMVK* 启动子缺失片段 M2 与 GUS 融合载体转化拟南芥; d1 ~ d4: *HbMVK* 启动子缺失片段 M3 与 GUS 融合载体转化拟南芥; e1 ~ e4: *HbMVK* 启动子缺失片段 M4 与 GUS 融合载体转化拟南芥; f1 ~ f4: *HbMVK* 启动子缺失片段 M5 与 GUS 融合载体转化拟南芥; g1 ~ g4: CaMV 35S 与 GUS 融合载体转化拟南芥 (阳性对照)

Fig. 5 Histochemical GUS assay of 15-day old transgenic *Arabidopsis* seedlings

a1 - a4: Non-transgenic wild type *Arabidopsis* (negative control); b1 - b4: *Arabidopsis* transformed with GUS fused to M1 deletion fragment of *HbMVK* promoter; c1 - c4: *Arabidopsis* transformed with GUS fused to M2 deletion fragment of *HbMVK* promoter; d1 - d4: *Arabidopsis* transformed with GUS fused to M3 deletion fragment of *HbMVK* promoter; e1 - e4: *Arabidopsis* transformed with GUS fused to M4 deletion fragment of *HbMVK* promoter; f1 - f4: *Arabidopsis* transformed with GUS fused to M5 deletion fragment of *HbMVK* promoter; g1 - g4: *Arabidopsis* transformed with GUS fused to CaMV 35S promoter (positive control)

3 讨论

天然橡胶树因其特殊的乳管系统,能产生大量胶乳,并且容易通过割胶收获和分离纯化,可作为一种绝佳的天然生物反应器^[3-10]。因此,开展天然橡胶生物合成调控研究具有重要的理论和实践意义,这不仅为利用生物技术进行橡胶树高产品种选育具有重要意义,此外,还可为利用橡胶树胶乳表达具有高效益的外源蛋白质(如药用活性成份)打下基础。但由于橡胶树为多年生木本植物,尚没有成熟的转化体系,相对于模式植物和重要粮食作物而言,橡胶树分子生物学研究显著滞后^[3-10]。对橡胶生物合成重要基因调控序列和启动子的分析是橡胶生物合成调控研究的重要一步,启动子缺失分析可为研究启动子精细结构与功能、寻找基因表达强度与特异性的有关调控元件及合成更有实用价值的启动子打下基础^[29-33]。

笔者在巴西橡胶树热研7-33-97全基因组测序完成的基础上,通过NCBI数据库中的*HbMVK*基因序列,用本地Blast的方法获得其启动子区序列信息,然后克隆出*HbMVK*基因全长启动子区序列。*HbMVK*基因全长启动子长约1.7 kb,AT含量高达71.28%,而且含有多种核心启动子元件,符合真核生物启动子序列特征。将其系列缺失序列片段与报告基因GUS连接,然后转入拟南芥中,得到一系列能稳定表达报告基因的转基因拟南芥植株。*HbMVK*启动子全长序列(M5)除在5 d苗龄的转基因拟南芥实生苗胚轴中有极微弱表达外,在其他部位和其他苗龄植株上基本上没有表现驱动GUS表达的活性;5'端-1 386 bp缺失*HbMVK*启动子则可在5、10和15 d苗龄植株胚轴中观察到较弱的表达活性。相反,5'端-1 221 bp和-725 bp缺失启动子则具有驱动GUS基因表达的活性。而5'端-325 bp缺失*HbMVK*启动子完全失去活性。这种情况很可能与*HbMVK*基因启动子在拟南芥异源表达背景下-1 386 bp和-1 221 bp之间存在负调控因子有关。这种启动子活性并不随其长度增加而增加的现象在其他的植物上也见^[34-35]。此外,据此推测启动子核心调控元件在-725 bp到-325 bp之间,因为-325 bp缺失片段启动子几乎完全失去活性,其原因可能与TATA-box和CAAT-box元件缺失有关。5'端-1 221 bp和-725 bp缺失*HbMVK*启动子在不同苗龄和不同部分表达活性的差异表明两者之间存在不同的时间和组织特异性调控元件。一般而言,启动子区域包含不同的调控序列,如增强子、沉默子、绝缘子及基因表达在转录水平上精细调控的顺式元件。在转录过程中,共激活因子和转录因子结合到特定的DNA基序,并同时与核心启动子结合的转录机器相互作用。因此,启动子的活性依赖于启动子上游区域调控序列的位置和组合效应^[18]。本研究中橡胶树*HbMVK*基因启动子在拟南芥异源表达情况可能与该启动子上游区域的调控序列存在复杂的相互作用有关。与此不同的是,拟南芥MVK启动子同源表达研究结果表明,该基因启动子驱动GUS在整个植物发育过程中普遍表达,实生苗早期发育阶段中以根(主要在根分生组织区)表达水平最高^[36]。这可能因为IPP合成途径是其他许多重要成分合成的共有途径,可进一步形成异戊二烯单元组成的其他化合物及其衍生物,包括单萜类(如薄荷醇)、双萜类(如赤霉素、脱落酸、蓖麻烯)、倍半萜类(如衣壳醇)、异戊二烯基类(如细胞分裂素)、多聚异戊二烯醇(如多萜醇、酶Q、质体醌、类胡萝卜素、叶绿素)、固醇类(如菜油甾醇)等次生代谢产物。这些成分具有很多不可或缺的功能,比如膜的流动性(甾醇)、呼吸作用(泛醌)、光合作用(类胡萝卜素、叶绿素、质体醌)、生长和发育的调控(植物激素)^[15-16]。

致谢:中国热带农业科学院橡胶研究所唐朝荣研究员和方永军老师在启动子序列克隆方面提供了帮助,特此致谢!

参考文献:

- [1] 杜亚光. 我国天然橡胶产业发展现状及发展趋势[J]. 橡胶科技市场, 2006, 4(10): 16-18.
- [2] 金华斌, 田维敏, 史敏晶. 我国天然橡胶产业发展概况及现状分析[J]. 热带农业科学, 2017, 37(5): 98-104.
- [3] 彭世清, 陈守才. 巴西橡胶树的分子生物学研究进展[J]. 生物技术通讯, 2001, 12(4): 314-317.
- [4] 刘卫平, 王敏杰, 韩玉珍, 等. 天然橡胶的生物合成机制[J]. 植物生理学通讯, 2002, 38(4): 382-388.
- [5] 段翠芳, 曾日中, 黎瑜. 激素对巴西橡胶树橡胶生物合成的调控[J]. 热带农业科学, 2004, 24(5): 61-68.
- [6] 张福城, 陈守才. 巴西橡胶树天然橡胶生物合成中关键酶及相关基因研究进展[J]. 热带农业科学, 2006, 26(1): 42-46, 74.

- [7] 于俊红,黄绵佳,田维敏. 巴西橡胶树橡胶生物合成调控的研究进展[J]. 安徽农学通报, 2007, 13(12): 38–40.
- [8] 邹晋,杨礼富,王真辉,等. 橡胶树中橡胶的生物合成与调控[J]. 植物生理学通讯, 2009, 45(12): 1231–1238.
- [9] 袁红梅,洪灏,黄惜. 巴西橡胶树产排胶机理的研究进展[J]. 分子植物育种, 2015, 13(5): 1151–1156.
- [10] 庄玉粉,郭秀丽,刘进平. 橡胶草可作为产胶研究的模式植物[J]. 热带农业科学, 2015, 35(9): 4–8.
- [11] Cornish K. Biochemistry of natural rubber, a vital raw material, emphasizing biosynthetic rate, molecular weight and compartmentalization, in evolutionarily divergent plant species[J]. Nat Prod Rep. 2001, 18(2): 182–189.
- [12] Puskasa J E, Gautriauda E, Deffieux A, et al. Natural rubber biosynthesis – A living carbocationic polymerization[J]. Progress in Polymer Science, 2006, 31(6): 533–548.
- [13] Gronover CS, Wahler D, Prüfer D: Natural rubber biosynthesis and physic-chemical studies on plant derived latex[M]//El-nashar M. Biotechnology of Biopolymers. Rijeka: Intech Open Access Publisher 2011: 75–88.
- [14] Whalen M, McMahan C, Shintani D. Development of crops to produce industrially useful natural rubber[M]//Bach T J, Rohmer M. Isoprenoid Synthesis in Plants and Microorganisms. New York: New Concepts and Experimental Approaches, Springer Science + Business Media, 2013: 329–345.
- [15] Rodríguez-Concepción M. Early Steps in isoprenoid biosynthesis: multilevel regulation of the supply of common precursors in plant cells[J]. Phytochemistry Reviews, 2006, 5(1): 1–15.
- [16] Rodríguez-Concepción M, Campos N, Ferrer A, et al. Biosynthesis of isoprenoid precursors in *Arabidopsis* [M]//Bach T J, Rohmer M. Isoprenoid Synthesis in Plants and Microorganisms. New York: New Concepts and Experimental Approaches, Springer Science + Business Media, 2013: 439–456.
- [17] Sando T, Takaoka C, Mukai Y, et al. Cloning and characterization of mevalonate pathway genes in natural rubber producing plant, *Hevea brasiliensis* [J]. Biosci Biotechnol Biochem, 2008, 72(8): 2049–2060.
- [18] Hernandez-García C M, Finer J J. Identification and validation of promoters and cis-acting regulatory elements[J]. Plant Sci. 2014, 217/218(1): 109–119.
- [19] 尹一伊,王玲,廖文彬,等. 几种橡胶基因组 DNA 提取方法的比较[J]. 安徽农业科学, 2010, 38(17): 8863–8865.
- [20] Tang C, Yang M, Fang Y, et al. The rubber tree genome reveals new insights into rubber production and species adaptation [J]. Nat Plants, 2016, 2(6): 16073.
- [21] Vitale A, Wu RJ, Cheng Z, et al. Multiple conserved 5' elements are required for high-level pollen expression of the *Arabidopsis* reproductive actin ACT1 [J]. Plant molecular biology, 2003, 52(6): 1135–1151.
- [22] Chan CS, Guo L, Shih MC. Promoter analysis of the nuclear gene encoding the chloroplast glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase B subunit of *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant molecular biology, 2001, 46(2): 131–141.
- [23] De Azevedo F A, De Assis Alves Mourão Filho F, Schinor E H, et al. GUS gene expression driven by a citrus promoter in transgenic tobacco and Valencia sweet orange [J]. Pesquisa Agropecuária Brasileira, 2006, 41(11): 1623–1628.
- [24] Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W. GUS fusions beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion [J]. The EMBO journal, 1987, 6(13): 3901–3907.
- [25] 刘敏. 采用花序浸染法将线性基因表达框导入拟南芥[D]. 大连:大连理工大学, 2011.
- [26] Liu Z B, Ulmasov T, Shi X, et al. Soybean GH3 promoter contains multiple auxin inducible elements [J]. The Plant cell, 1994, 6(5): 645–657.
- [27] Thureau T, Kifle S, Jung C, et al. The promoter of the nematode resistance gene Hs1pro-1 activates a nematode-responsive and feeding site-specific gene expression in sugar beet (*Beta vulgaris* L.) and *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Molecular Biology, 2003, 52(3): 643–660.
- [28] Rushton P J, Reinst dler A, Lipka V, et al. Synthetic plant promoters containing defined regulatory elements provide novel insights into pathogen-and wound-induced signaling [J]. Plant Cell 2002, 14(4): 749–762.
- [29] Taniguchi M, Izawa K, Ku M S, et al. The promoter for the maize C4 pyruvate, orthophosphate dikinase gene directs cell- and tissue-specific transcription in transgenic maize plants [J]. Plant Cell Physiol, 2000, 41(1): 42–48.
- [30] Won S K, Lee Y J, Lee H Y, et al. Cis-element-and transcriptome-based screening of root hair-specific genes and their functional characterization in *Arabidopsis* [J]. Plant Physiol, 2009, 150(3): 1459–1473.
- [31] Nitz I, Berkefeld H, Puzio P S, et al. Pyk10, a seedling and root specific gene and promoter from *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Sci. 2001, 161(2): 337–346.

- [32] 杨江涛, 庞伟民, 王旭静, 等. 陆地棉 *GhRACK1* 启动子的克隆与缺失分析[J]. 作物学报, 2016, 42(3): 368–375
- [33] 王旭静, 李为民, 唐巧玲, 等. 中棉 (*Gossypium arboreum*) 光诱导基因 *Gacab* 启动子在转基因烟草中的功能缺失分析[J]. 作物学报, 2009, 35(6): 1006–1012.
- [34] Thirkettle-Watts D, McCabe T C, Clifton R, et al. Analysis of the alternative oxidase promoters from soybean[J]. Plant Physiol, 2003, 133(3): 1158–1169.
- [35] Chang C W, Sun T P. Characterization of cis-regulatory regions responsible for developmental regulation of the gibberellins biosynthetic gene *GA1* in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Molecular Biology, 2002, 49(6): 579–589.
- [36] Lluch M A, Masferrer A, Arró M, et al. Molecular cloning and expression analysis of the mevalonate kinase gene from *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Molecular Biology, 2000, 42(2): 365–376.

Cloning and Deletion Analysis of *HbMVK* Promoter from Rubber Tree (*Hevea brasiliensis*)

HU Jin, YANG Cuiping, GONG Xiaoxiao, YAN Bingyu, TAN Yurong,
WANG Dan, GAO Xuan, ZHANG Heng, LIU Jinping
(Hainan Key Laboratory for Sustainable Utilization of Tropical Bioresources/Tropical Agriculture
and Forestry Institute, Hainan University, Haikou, 570228, China)

Abstract: Mevalonate kinase (MVK) is an important enzyme in natural rubber biosynthesis pathway of rubber tree (*Hevea brasiliensis*). The promoter of *HbMVK* gene from rubber tree was cloned by using PCR and analyzed with bioinformatics tools to observe the fine structure and function of rubber tree MVK promoter. The *HbMVK* promoter sequence is 1 696 bp in length, containing some elements or motifs such as CAAT-box, TATA-box, CAT-box, LTR, GARE-motif, TCA-element, etc. Based on the element distribution, plant expression vectors were constructed with *HbMVK* promoter and its serious deletion fragments were fused to reporter gene GUS (encoding β -glucuronidase), which were transformed into *Arabidopsis thaliana*. GUS histochemical staining of T2 transgenic seedlings showed that the full-length *HbMVK* promoter and its -1386 bp deletion fragment weakly drove GUS expression in transgenic seedling hypocotyls. The 5' -1 221 bp and -725 bp deletion fragments of *HbMVK* promoter were observed to strongly drive GUS expression, and the -325 bp deletion fragment of *HbMVK* promoter completely lost promoter activity, suggesting that the core promoter regulatory elements were located between -325 bp and -725 bp. This study might provide an important basis for further research on the regulation of *HbMVK* expression.

Keywords: rubber tree; rubber biosynthesis; MVK gene promoter; promoter deletion analysis; GUS staining analysis

(责任编辑: 潘学峰)