

# 化学诱导表达系统及其在植物中的应用

庄晓英 卢 钢\* 曹家树 侯大强<sup>1</sup>

(浙江大学蔬菜研究所, 杭州 310029; <sup>1</sup>浙江大学园林所, 杭州 310029)

**摘要** 化学诱导启动子可以在特定时间和部位激活或抑制目的基因的表达。目前, 已经建立了多种化学诱导表达系统, 用于基因功能分析、无标记植物转化、特定位点 DNA 切除、育性恢复和 RNA 沉默等方面的研究。化学诱导表达系统为基础分子生物学研究和生物技术应用提供了强有力的工具, 将大大加快植物转基因技术的应用。

**关键词** 启动子; 表达系统; 化学诱导

拟南芥和水稻的全基因组测序工作已分别于 2000 年和 2002 年完成。在后基因组学时代, 诠释拟南芥和水稻植物中各个基因的功能即功能基因组学研究将成为该领域的主流。通过转入外源基因和对内源基因的激活或抑制等人为的调控基因表达, 可以精确地确定基因功能, 并为动植物的定向改良以及生物体的发育及生理过程的研究提供分子依据。作为调控基因表达的一种手段, 建立在化学诱导启动子基础上的化学诱导表达系统在近 20 年来不断完善, 已经在基因功能分析、无标记植物转化、特定位点 DNA 切除、雄性不育的育性恢复、RNA 沉默等多个研究领域得到广泛应用, 为基础分子生物学研究和遗传工程技术应用提供了强有力的工具, 在植物转基因研究中具有巨大的潜在应用价值。王瑜等<sup>[1]</sup>、罗晓艳等<sup>[2]</sup>、唐孙勇等<sup>[3]</sup>、胡廷章<sup>[4]</sup>已对化学诱导启动子的研究进展做了较为全面的介绍, 本文综述了化学诱导启动子及其在植物中的应用, 着重对其研究进展作进一步的补充。

## 1 化学诱导启动子

启动子是一段特定的直接与 RNA 聚合酶及其转录因子相结合、决定基因转录起始与否的 DNA 序列。目前, 在双子叶植物遗传转化中广泛使用的是来自花椰菜花叶病毒(CaMV)的 35S 启动子, 而单子叶植物更常用的是来源于水稻肌动蛋白基因(actin1)的启动子和玉米泛素基因(ubiquitin)的启动子。但这 3 个启动子都是组成型启动子, 在所有组织中都启动基因表达, 具有持续性, 不表现时空特异性<sup>[5]</sup>。它们指导表达的外源基因在受体植物中往往产生持续高效的非特异性表达, 而在需要该基因大量表达

的时间和特定组织部位则因表达量过低达不到预期效果。另外, 组成型启动子不适用于基因功能研究, 因为其过量表达或表达量不足均有可能对植物产生不良影响。更重要的是, 某些外源基因的表达本身就可能对植物有害, 阻碍植物的再生。组织特异性启动子调控基因表达只发生在特定的器官或组织部位, 可以部分的克服组成型启动子的缺点<sup>[6]</sup>。近年来, 各种器官或组织特异性启动子被相继克隆, 并得到广泛的应用, 但其调控往往受组织细胞生理状态和化学物理信号等的诱导, 其表达表现为多种因子相互作用的结果, 难以在转基因植物的再生过程中适时激活启动子的表达。

而化学诱导启动子为特定基因的转录, 提供了更为灵活和整体性的解决方案。当诱导剂存在或者缺乏时化学诱导启动子是不起作用的, 不会干扰植物细胞的生理活性; 经适当的处理, 启动子响应而诱导基因表达, 就可以使目的基因在特定器官、组织或细胞中表达。化学诱导启动子目前主要应用于以下情况: (1)基因表达产物干扰再生、生长和繁殖; (2)基因在发育的不同阶段表达; (3)基因表达存在主效应和次级效应; (4)自身调节机制起作用前的主效应分析; (5)目的基因诱导表达与表型改变上的相关性分析<sup>[7]</sup>。

## 2 化学诱导表达系统

利用植物内源性化学诱导启动子或其他生物的化学诱导响应元件都可以在植物中构建化学诱导表

收稿日期: 2004-10-28 接受日期: 2005-02-24

国家高技术研究发展计划(863 计划)资助项目(No.2002AA207013)

\*通讯作者。Tel: 0571-86971722, E-mail: glu@zju.edu.cn

达系统。为了构建理想的化学诱导表达系统,可以采取两种策略<sup>[4,8]</sup>:一是分离内源性化学诱导启动子,但内源启动子大都存在较高的非诱导表达水平,对环境及生理信号存在复杂的反应,不具备高效特异性诱导表达的特点,因此其应用受到局限;另一种策略是利用植物自身没有的、来自于其他有机体的、受化学诱导剂诱导的调控元件构建化学诱导表达系统。如果调节机制仅仅涉及一个调节蛋白与特异顺式序列的结合,那么就可以构建受特异化学制剂诱导的表达系统。一个理想的化学诱导表达系统应当满足以下要求:(1)特异性。基因只在特定化学物质施用或停止施用时专一性表达,而不受内源激活因子的影响;(2)安全性。诱导剂为非植物毒素,对环境安全,对植物体不产生多效性;(3)高效性。非诱导状态下,本底表达水平很低或不表达,一经诱导,表达水平急剧升高;(4)剂量依赖性。诱导表达系统在不同的诱导剂浓度下表现出不同程度的诱导表达;(5)适用性。诱导剂的半衰期较长,无需多次施用就可以产生系统性影响,方便在实验室和大田中应用<sup>[9]</sup>。

现有的化学诱导表达系统(图1)是基于去抑制、失活、激活这3种不同机制建立起来的,但构建模式相似,均是在两个转录单位的协调作用下起作用的。第一个转录单位由一个组成型启动子(如CaMV35S)转录一个对化学诱导剂敏感的转录因子;第二个转录单位包含由多个能结合转录因子的位点与一个基本植物启动子(如截短的CaMV35S启动子)组成的嵌合型启动子,调控目的基因的表达<sup>[10]</sup>。在调控目的基因表达的过程中,不同化学诱导剂激活或抑制对化学诱导剂敏感的转录因子的表达,从而诱导第二个转录过程中目的基因的表达。下面介绍几种化学诱导表达系统。

## 2.1 四环素诱导表达系统

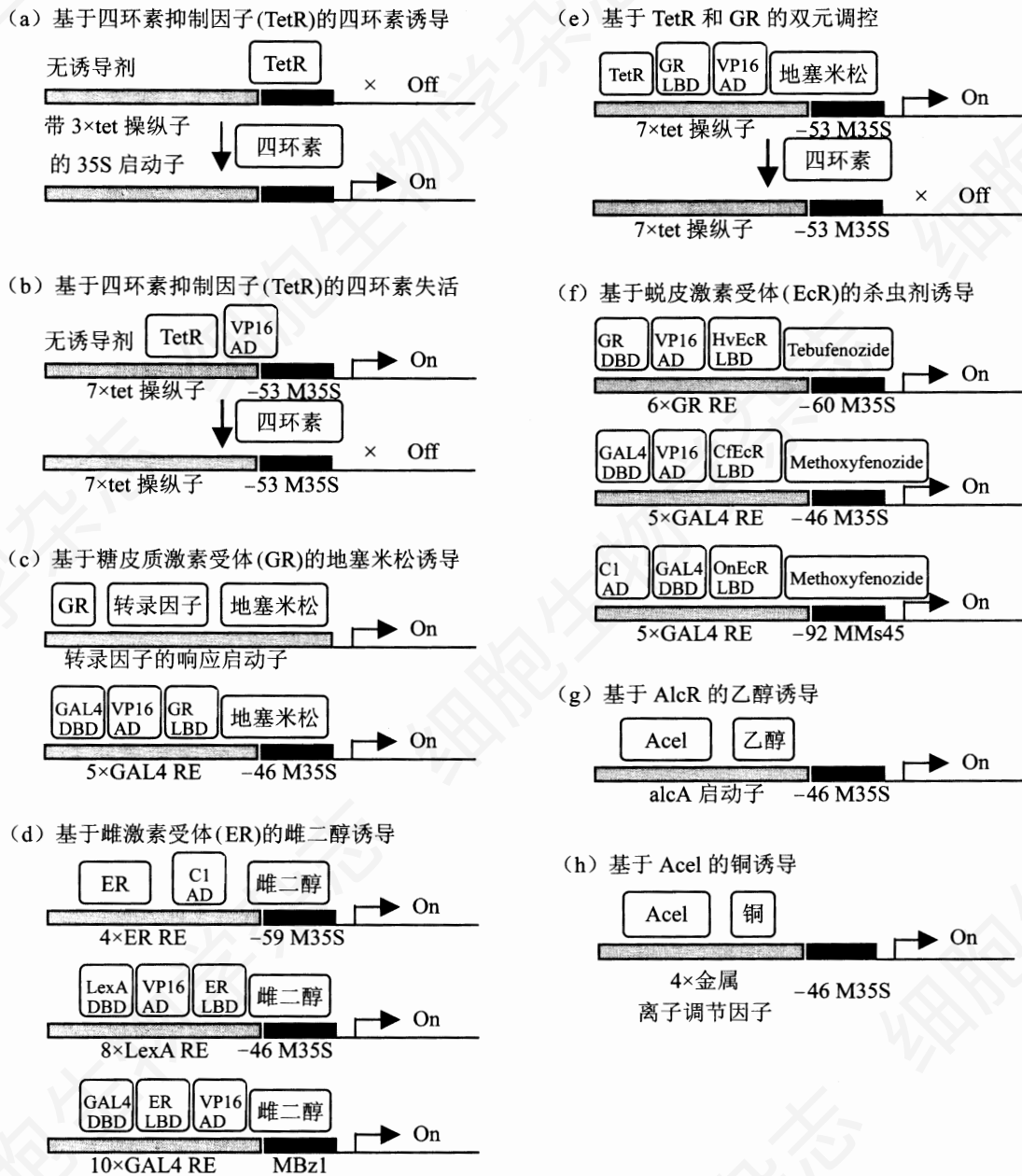
四环素诱导表达系统是基于对大肠杆菌(*E. coli*)的四环素操纵子的调节建立起来的。最初建立了四环素去抑制系统(TetR),接下来,Weinmann等<sup>[11]</sup>利用四环素阻遏因子与四环素互作的热力学特性,建立了四环素失活系统(tTA)。当前,四环素诱导表达系统已经被调整应用于多种研究领域,是研究和应用最为广泛的一种化学诱导表达系统。

**2.1.1 四环素去抑制系统** Gatz等<sup>[12]</sup>严格定义了四环素诱导启动子的结构:其靶启动子是经过改造的35S启动子,其中一个单拷贝和一个双拷贝的tet

操纵子分别置于TATA框的上游和下游。缺乏四环素时,在强启动子(CaMV35S)的控制下TetR过量表达,TetR以二聚体形式与tet操纵子结合,干扰转录起始复合体的组装;一旦TetR与四环素结合,TetR构象发生改变,即从tet操纵子上解离下来,解除抑制。四环素去抑制系统是Gatz等<sup>[8]</sup>在四环素阻遏因子(TetR)基础上建立的第一个应用于植物的化学诱导表达系统。植物体的系统分析证实四环素去抑制系统可以完全抑制CaMV35S启动子。该系统最早成功的应用于烟草细胞的瞬时转化<sup>[13]</sup>,接着在马铃薯和番茄中实现了多个基因的诱导表达<sup>[14,15]</sup>,其诱导效率高于同期报道的乳糖开关系统。该系统的主要缺点是<sup>[16]</sup>:(1)细胞核中只有存在较高浓度的TetR时才能与CaMV35S启动子相结合,而如此高浓度的TetR对许多植物有毒副作用;(2)诱导物在植物体中的半衰期短,需要不断补充新鲜的四环素,造成应用上的不便;(3)不适用于植物体单个细胞中基因的过度表达。

早期的研究中,由于充分抑制转录所需的TetR蛋白浓度太高影响拟南芥的发育,未能建立拟南芥的TetR系统<sup>[9]</sup>。最近,Matzke等<sup>[17]</sup>建立了一个二元调控诱导系统——tetO/TetR-EYFP(EYFP,增强黄色荧光蛋白)系统,该系统与一个T-DNA结构(编码一个定位在细胞核中的TetREYFP融合蛋白)组装在一起,在拟南芥中用于鉴定细胞核中的标记T-DNAs获得成功。用标准荧光纤维法对转化的拟南芥株系进行检测,可观察到EYFP被高水平诱导表达,而在未经转化的植物组织中,EYFP只是本底水平上的低表达。这说明TetR系统经过调整和改造,同样适用于模式植物拟南芥的研究。

**2.1.2 四环素失活系统** 在四环素失活系统中,TetR与人体疱疹病毒(herpes simplex)上的VP16蛋白的酸性转录活化域(AD)融合,转变成受四环素调控的转录活化因子(tTA)。在缺乏四环素时,tTA结合目的基因表达序列启动子上的操纵子,激活目的基因表达;在四环素的诱导下,TetR构象发生改变,tTA与色氨酸操纵子(tetO)解离,目的基因停止转录<sup>[11]</sup>。tTA系统最早在哺乳动物中得到应用,在植物中,嵌合转录活性因子tTA在转基因烟草植株整体水平上得到表达<sup>[11]</sup>;研究拟南芥中SAUR-AC1基因的转录,可以阐明不稳定转录中mRNA降解的途径,分析基因产物的稳定性<sup>[18]</sup>;将获得的纯合转tTA拟南芥株系与含有四环素抑制启动子的植株杂

图 1 调节基因表达的化学诱导表达系统<sup>[7]</sup>

交,使 Top10(Top10 包含了四环素操纵子的 7 个拷贝和 -53 最小 35S 启动子)与 GFP 发生偶联,通过调节培养基中的四环素浓度可以调控 GFP 的表达水平<sup>[19]</sup>;藓类植物中嵌合蛋白(由 Tn10 编码的 Tet 阻遏因子和疱疹病毒 VP16 蛋白组成)的化学诱导表达,也进一步证实了此系统表达的可控性<sup>[20]</sup>。与 TetR 系统相比,tTA 系统的优点在于本底表达水平较低,可以消除转基因产物对植株的毒害作用,更加严格地调控目的基因的表达;tTA 系统的缺点是不能对基因表达实现精确的时间控制,启动子的活性在第

一代转化株和后代中均表现为随时间推移不断削弱<sup>[21]</sup>。

tTA 系统在以往的一些研究和应用中已经表现出较其他诱导系统明显的优越性<sup>[9,18~21]</sup>,但 TetR 和 tTA 系统都是通过抑制启动子起作用的,而在真核生物中,激活启动子比抑制启动子更可能实现对转录的严格控制<sup>[11]</sup>。Gossen 等<sup>[22]</sup>分离具有反向显性的 TetR 突变体(反向阻遏因子),将其与 VP16 激活结构域融合为转录激活因子[四环素反向转录激活因子(rtTA)],四环素衍生物强力霉素一旦与转录激活因

子结合,即能与靶基因上的特定DNA顺式元件结合,迅速诱导靶基因表达,表达活性成千倍提高。该诱导系统在阻遏因子-操纵子-效应因子(repressor-operator-effector)间的互作本质以及四环素的药理作用,在活体(转基因动物)基因功能的调控以及基因治疗方面具有潜在的利用价值。近来,四环素调控的转录沉默因子(tTS)已经成功的用于培养细胞和转基因老鼠,与四环素反向转录激活因子(rtTA)相结合,四环素转录沉默因子(tTS)可以完全抑制非诱导条件下目的基因的表达,真正起到基因开关的作用<sup>[23]</sup>。然而,以上两个系统还未在植物中得到应用。

## 2.2 类固醇激活系统

在哺乳动物细胞中,糖皮质激素受体、雌激素、其他类固醇可以作为分子开关调控异质蛋白与受体的结合。当类固醇缺乏时,融合蛋白存在于含热休克蛋白90(HSP90)复合体的细胞质中,这种复合体通过空间位阻或阻碍融合蛋白在核中的定位来阻止融合蛋白发生作用。糖皮质激素受体与植物转录因子结合,产生类固醇诱导活化因子,可用这些活化因子来研究毛状体的发育、叶片形态、开花时间、花器官分化和开花诱导的转录因子。

2.2.1 以糖皮质激素为受体的类固醇激活系统 以糖皮质激素为受体的类固醇激活系统最早是由Johnston提出的一种类固醇信号途径。Sчена等<sup>[24]</sup>建立了一个用于诱导植物基因表达的类固醇激活系统。嵌合转录因子GVG[包含酿酒酵母转录因子GAL4的DNA结合域(DBD)、疱疹病毒蛋白VP16的转录激活域(AD)、糖皮质激素受体(GR)的配体结合域(LBD)]和荧光素酶基因一同转入烟草和拟南芥植物中,施加地塞米松(一种人工合成的糖皮质激素)后,包含6个拷贝GAL4上游序列的启动子被激活,从而诱导荧光素酶基因(LUC)的表达,表达活性是非诱导水平下的100多倍<sup>[25]</sup>。Mcneillis等<sup>[26]</sup>将细菌非毒性基因(*avrRpt2*)转入拟南芥中,转基因植株在地塞米松的诱导下表现为非敏感性细胞死亡,这一发现可能为研究抗性植株和易感植株中非毒性基因引起细胞死亡的生理生化等方面提供方法和依据。在烟草上的一项最新研究中,Grémillon等<sup>[27]</sup>利用该系统验证了农杆菌致癌基因*6b*诱导肿瘤发生的功能,发现该基因只在转基因烟草的母体和正在生长的组织中表达,并且其表达会诱发形态学上的非定向变化,具体表现为生长力增强或减弱、根的生长增强

或减弱以及叶片形态和颜色的变化等。Mori等<sup>[28]</sup>整合糖皮质激素诱导的转录系统和滤过性病毒的mRNA放大系统,建立了一个受雀麦草花叶病毒(BMV)复制酶亚基表达水平的严格调控、诱导外源基因mRNA高水平表达的诱导系统,此整合系统的建立为植物体重组mRNA的放大提供了新的途径和方法。

GR系统的主要缺点是地塞米松引起的间歇性毒害作用和抑制相关基因的表达(往往发生在转录活性因子高水平表达的转基因株系),但通过选择转录活性因子低水平或中水平表达的转基因植株,以及使用对植物低毒的地塞米松相似物,可以克服该系统带来的负面影响。Siriani等<sup>[29]</sup>进一步研究还发现糖皮质激素受体的过量表达有负向调节目的基因表达的现象,因为随着受体表达量的不断增加,以非活性状态存在的受体增加,它们与DNA结合,从而抑制目的基因的表达。

2.2.2 以雌激素为受体的类固醇诱导系统 雌激素受体的LBD与异源蛋白的AD和DBD结合,在植物体中表现出严格的调控作用和较高的诱导率<sup>[16,30,31]</sup>。Bruce等<sup>[30]</sup>利用人类雌激素受体(ER)的LBD和玉米转录激活因子C1的DBD组成的融合蛋白(ER-C1),验证了玉米类黄酮合成途径中相关基因的功能。Zuo等<sup>[31]</sup>融合大肠杆菌的抑制因子LexA的DBD、VP16的酸性转录活性域和人类ER的调节区域,构建了以雌激素为受体的XVE嵌合转录激活因子,其表达受强组成型启动子G10-90的控制以及雌激素的严格调控。在转基因拟南芥和烟草植株中,XVE有很宽的雌激素浓度响应范围,报告基因(*GFP*,绿色荧光蛋白)的诱导表达水平比CaMV35S启动子调控下要高出几倍,且Northern杂交检测不到*GFP*的非诱导表达。XVE系统对植物体不产生毒副作用,可能用于调节转基因植物中目的基因的有效表达。通过诱导特异位点重组,该系统可用于转基因拟南芥中的选择标记基因的切除<sup>[32]</sup>。Zhang等<sup>[33]</sup>构建VP16 AD、GAL4 DBD和ER LBD组成的嵌合转录激活因子,诱导水稻转基因植株中荧光素酶基因(LUC)的表达。加入雌激素后,LUC的表达活性增强10 000倍;除去雌激素后,一天内就可恢复到正常水平,而且可以多次重复诱导。但直接在叶片表面喷洒雌激素只能局部诱导LUC基因的表达,而根施可以通过系统性传输整株表达。该系统有望用于多种植物功能基因组的研究。

2.2.3 基于糖皮质激素受体、四环素抑制因子构建的双重控制系统(dx-on/ tc-off 系统) Bohner 等<sup>[34]</sup>建立了一个包含转录激活因子 TGV(TGV 包含编码 Tet 抑制因子的 Tn10、老鼠糖皮质激素受体荷尔蒙结合域和疱疹病毒蛋白 VP16)的化学诱导系统,该系统受地塞米松启动,由四环素关闭,可以精确地对基因表达进行正负调控。在转基因烟草中稳定表达时,地塞米松诱导包含 7 个 TATA 框的 *tet* 操纵子上游的组合启动子( $P_{Top10}$ )的转录;四环素干扰 TGV 中 TetR 与 DNA 的结合,在不使用地塞米松的条件下,*GUS* 基因不表达。实验证实,该系统在拟南芥和烟草金黄烟 2(BY2)细胞中具有诱导表达活性,表达 TGV 蛋白和 *GUS* 基因的拟南芥转基因植株无表型异常。但连续的高组织特异性诱导表达只发生于茎尖分生组织、导管和维管组织,且非诱导表达水平在不同植物之间相差较大,地塞米松只能在处于营养阶段的和再生阶段的组织中诱导 *GUS* 基因的高水平表达。在另一项研究中发现,大多数分生组织中都可非诱导条件下观察到 *GUS* 基因的表达,但在拟南芥的根和分生组织中例外<sup>[7]</sup>;表达 TGV 蛋白的转基因 BY2 细胞具有较低的 *GUS* 和 *GFP*(目的基因)非诱导表达活性,加入地塞米松或无水四环素后,*GUS* 和 *GFP* 表达分别表现为诱导和抑制。

Bohner 等<sup>[35]</sup>比较了 dx-on/tc-off 系统中不同启动子对于目的基因表达的影响。包含 CaMV35S 启动子的 -48 到 +1 区段的 PTF 和 Ptax 启动子非诱导和诱导条件下,表达水平均优于  $P_{Top10}$  和 PTFM 启动子;且 Ptax 的非诱导表达水平高于 PTF,表明合成的调节区域序列影响非诱导表达水平的高低。通过调控细胞分裂素限速步骤中异戊烯基转移酶基因表达,可以进行基因功能分析。

### 2.3 以蜕皮激素为受体的杀虫剂诱导系统

四环素和类固醇诱导系统在实验室的操作中已经比较完善,但所使用的诱导剂不适合大田应用。为了建立一个既适合实验室操作又适用于大田的系统,开发了一个包含昆虫蜕皮激素受体(EcR)的基因开关。蜕皮激素受体(EcR)是类固醇受体家族的成员之一,具有特征性 DBD、LBD 和 AD。以蜕皮激素为受体的杀虫剂诱导体系包含两个分子组分,起调节作用的部分是由 *Heliothis virescens* 蜕皮激素受体的 LBD 和 VP16 的转录活性域与 DBD 和哺乳动物糖皮质激素受体的转录激活域组成的嵌合受体;报告部分是 6 个拷贝的糖皮质激素响应元件

(GRE)与 M35SCaMV 启动子和  $\beta$  糖皮质激素构成的融合体。该系统采用非类固醇类蜕皮激素(tebufenozide)作诱导剂,可高效诱导转基因植物中目的基因的表达<sup>[36-39]</sup>。Martinez 等<sup>[36]</sup>利用一种包含糖皮质激素受体 DBD、糖皮质激素受体(GR)、VP16 激活域(Ads)和烟草夜蛾蜕皮激素受体(EcR)的 LBD 的嵌合转录活化因子, Tebufenozide(一种无水四环素类杀虫剂)诱导烟草中 *GUS* 基因表达,表达活性提高到原来的 420 倍,是 CaMV35S 启动子调控下的 1.5 倍。但在转化杂合活化因子的烟草中,*GUS* 基因的非诱导表达水平较高,是 CaMV35S 启动子调控下表达活性的 1%~5%。

Padidam 等<sup>[37]</sup>通过优化 GAL4 或 LexA DBD、VP16AD 和 EcR LBD 之间的相对位置,克隆不同取向的激活因子和目的表达组件,建立了可以得到低非诱导表达和高诱导表达的一个新系统。现已获得了许多具有目的基因 *LUC* 低非诱导表达水平的转基因拟南芥和烟草植株。在诱导条件下,*LUC* 表达水平比 CaMV35S 启动子调控下高出几倍。Unger 等<sup>[38]</sup>建立了一个包含 *Ostrinia nubilalis* 的 EcR LBD、玉米 C1 AD、GAL4 DBD 的嵌合激活因子,可诱导玉米雄性不育突变体(ms45)中育性恢复基因 *MS45* 的表达。Koo 等<sup>[39]</sup>将烟草花叶病毒(TMV)外壳蛋白(CP)转入拟南芥,蜕皮激素诱导表达的转基因植株对 TMV 产生抗性,比 CaMV 双 35S 启动子诱导表达水平高出 4 倍。该实验进一步证明了利用化学药剂诱导植物抗病性的可行性,蜕皮激素诱导系统在温室和农业生产中具有广阔的应用前景。

### 2.4 基于 ACE1 的铜制剂诱导系统

铜制剂诱导系统由 Mett 等<sup>[40]</sup>在 Wright 等的研究基础上调整用于植物,该系统包含两部分:(1)酵母 *ace1* 基因在 CaMV 35S RNA 启动子的控制下编码转录因子 ACE1(激活铜硫蛋白基因表达);(2) ACE1 结合定位于酵母铜硫蛋白启动子上游的特定基因序列,在铜离子的诱导下激活目的基因。该系统已经成功应用于烟草中 *GUS* 基因的表达<sup>[40]</sup>、内源细胞分裂素浓度的时空调节、异戊烯转化酶基因的表达调控<sup>[41]</sup>和莲属(*Corniculatus*)中反义天门冬氨酸转氨酶 P2 基因的组织特性表达<sup>[42]</sup>。Peng 等<sup>[43]</sup>在最近的一项研究中,该系统成功应用于转基因烟草中 DNA 的切除,在所有的转基因株系中均检测到铜诱导的高效 DNA 重组。但是铜制剂诱导系统并非在所有细胞都起作用,例如:它不能用于杨树中目的基因的诱



导表达；也不能诱导 BY2 细胞中 *GFP* 基因的表达；在烟草叶片原生质体中 *GUS* 基因的诱导表达水平也仅是原来的 1~4 倍<sup>[44]</sup>。由于铜诱导启动子的诱导能力在植物种间差异较大，Granger 等<sup>[45]</sup>又进一步研究了拟南芥中的铜离子的诱导水平，结果发现：*GFP* 基因的表达水平在不同株系间、不同地域的植株间和同一地域不同组织间均差异较大。因此，使用该系统进行研究时，必须根据不同株系的具体情况确定表达参数。

### 2.5 基于 *AlcR* 构建的乙醇诱导系统

由于以上所述化学诱导体系中化学诱导剂的使用会对环境造成污染，不可能得到大规模广泛应用。乙醇诱导的 *alc*(乙醇脱氢酶)基因表达系统提供了一个更加安全有效的方案。在曲霉菌中，乙醇结合转录因子 *AlcR*，使 *AlcR* 构象发生改变并与 *AlcA* 启动子结合，激活目的基因。在 Caddick 等<sup>[46]</sup>的研究中，乙醇诱导系统诱导转基因植物(转酵母胞液转化酶)的碳代谢，并表现为叶片表型的变化。Salter 等<sup>[47]</sup>在液体培养基中添加 0.1% 乙醇，4 h 内即可启动报告基因氯霉素乙酰转移酶(*CAT*)的表达，4 天后达到最高值。同时还发现 *CAT* 在非诱导条件不表达，并且表达也不受创伤、寒冷、干旱等胁迫条件和水杨酸以及甲基茉莉酮酸脂的影响。该 *Alc* 基因开关在拟南芥、芸苔(*Brassica napus*)、烟草和离体的土豆块茎中受到严格调控；另外，*AlcR* 受多种无毒化学试剂所调控，包括苏氨酸、乙胺、丙烷-1-ol、丁烷-2-ol，并且都可以大田应用<sup>[46-48]</sup>。Roslan 等<sup>[48]</sup>将 *AlcA* 启动子与报告基因  $\beta$ -*GUS*、*LUC* 和 *GFP* 偶合，用于拟南芥 *Alc* 调节因子的功能分析。实验证实 *AlcR* 介导的表达在拟南芥整株水平上被高效诱导，添加乙醇 1 天后，就可诱导表达，表达水平与乙醇的使用剂量有关；大田种植的植株，使用乙醇 5 天后，报告基因达到表达高峰；在大多数植株中表达可以被严格调控并且是可逆的，同时调控作用受季节的影响。

Flipphi 等<sup>[49]</sup>在曲霉菌上通过间接试验证实，乙醛是乙醇分解代谢的唯一生理诱导因子，细胞内的乙醛浓度是控制 *alc* 基因开关的关键因素。与此相吻合，接下来的试验表明乙醛可以诱导土豆试管苗 *GUS* 基因的表达，而且，比乙醇诱导反应更迅速，诱导水平更高，降低了对植物的毒副作用。在转基因土豆块茎中，低浓度的乙醛与相同浓度的乙醇相比可以加快 *alc* 基因的表达<sup>[50]</sup>。

### 2.6 内源化学诱导启动子

目前为止，已经分离到大量启动子，包括受生长调节剂、安全剂、诱导剂、伤信号、自身代谢和营养水平等调节的。但内源化学诱导启动子在植物中具有基本表达活性，而且受环境和自身生理信号的调控，影响植物正常的生长和发育，所以使用受到限制。现已构建的化学诱导表达系统的调控序列大多来源于细菌、真菌、昆虫和哺乳动物，但基于苯并噻唑(*BTH*)诱导的 *PR-1a* 启动子和安全剂诱导的 *In2-2* 启动子构建的两个诱导系统，在大田应用上都有广阔前景。

植物体受到病原菌感染以及水杨酸、乙烯、*BTH* 等其他化学试剂都可以诱导 *PR* 蛋白的产生。*PR-1a* 启动子已经用于转基因植物中苏云金杆菌  $\delta$  内毒素的诱导。*BTH* 是 *PR-1a* 启动子的偏爱诱导因子。所以，*PR-1a-BTH* 系统可用于病原菌抗性蛋白的表达<sup>[51]</sup>。例如，瑞士 *CIBA-GEIGY* 公司使用 *PR-1A* 启动子控制转基因烟草中 *Bt* 毒蛋白基因的表达获得成功。安全剂是一种用来提高植物体除草剂抗性的农用化学药剂。已从玉米中克隆得到多种安全剂诱导启动子。在苯氨基磺酰安全剂的条件下，玉米 *In2-2* 启动子可诱导拟南芥和 BY2 细胞中 *GUS* 基因的表达<sup>[52,53]</sup>。

## 3 小结

一个理想的化学诱导表达系统应该具有较低的本底表达水平和较高的诱导水平，诱导剂的适用浓度较宽、灵敏度高、特异性强，除去诱导剂后诱导停止，对植物体无毒副作用。现已建立的化学诱导表达系统没有任何一个是完善和完全通用的，诱导系统的选择要依据诱导和抑制的基因、植物种类和特定应用环境而定。植物中诱导系统的建立已经取得了巨大的进展，通过构建不同的嵌合转录因子和优化小启动子及目的启动子中的相应元件序列，各种化学诱导系统得到不断完善；通过构建新的化学诱导系统或整合两个或多个诱导系统，功能和应用领域将得到不断拓展。Guo 等<sup>[54]</sup>应用化学诱导重组体系 *Cre/loxP* (*CLX*) 引发包含内含子的反向重复 *RNA*(*RNAi*) 在植物中表达，在拟南芥和烟草中的研究表明，该体系可在植物的不同发育阶段高效地诱导转基因和内源基因沉默，而不产生任何副效应。随着对化学诱导启动子的进一步研究，独立调控多个基因表达的多诱导系统在蛋白质学和系统生物学上有着广阔的应用前景，必将在生命科学领域开辟新的天地。

## 参考文献 (References)

- [1] 王 瑜等。生物技术, 2000, 10: 34  
[2] 罗晓艳等。发育与生殖生育学报, 2002, 11: 37  
[3] 唐孙勇等。生物工程进展, 2002, 22: 77  
[4] 胡廷章等。分子植物育种, 2003, 1: 731  
[5] 王 颖等。西北植物学报, 2003, 23: 2040  
[6] Cheon CI *et al.* *EMBO J*, 1993, 12: 4125  
[7] Padidam M. *Curr Opin Plant Biol*, 2003, 6: 169-177  
[8] Gatz C. *Annu Rev Plant Phys*, 1997, 48: 89  
[9] Gatz C. *Curr Opin Biotech*, 1996, 7: 168  
[10] Zuo J *et al.* *Plant Cell*, 2000, 12: 1137  
[11] Weinmann P *et al.* *Plant J*, 1994, 5: 559  
[12] Gatz C *et al.* *Plant J*, 1992, 2: 397  
[13] Gatz C *et al.* *Trends Plant Sci*, 1998, 3: 352  
[14] Rieping M *et al.* *Plant Cell*, 1994, 6: 1087  
[15] Thompson AJ *et al.* *Plant Mol Biol*, 1997, 34: 687  
[16] David KM *et al.* *Plant Physiol*, 2001, 125: 1548  
[17] Matzke AJM *et al.* *Plant Mol Biol Rep*, 2003, 21: 9  
[18] Gil P *et al.* *EMBO J*, 1996, 15: 1678  
[19] Love J *et al.* *Plant J*, 2000, 21: 579  
[20] Zeidler M *et al.* *Plant Mol Biol*, 1996, 30: 199  
[21] Wang R *et al.* *Transgenic Res*, 2003, 12: 529  
[22] Gossen M *et al.* *Science*, 1995, 268: 1766  
[23] Zhu Z *et al.* *Semin Cell Dev Biol*, 2002, 13: 121  
[24] Schena M *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 88: 10421  
[25] Aoyama T *et al.* *Plant J*, 1997, 11: 605  
[26] Mcnellis TW *et al.* *Plant J*, 1998, 14: 247  
[27] Grémillon L *et al.* *Plant J*, 2004, 37: 218  
[28] Mori M *et al.* *Plant J*, 2001, 27: 79  
[29] Siriani D *et al.* *J Steroid Biochem Mol Biol*, 2003, 84: 171  
[30] Bruce W *et al.* *Plant Cell*, 2000, 12: 65  
[31] Zou J *et al.* *Plant J*, 2000, 24: 265  
[32] Zou J *et al.* *Nat Biotechnol*, 2001, 19: 107  
[33] Zhang S *et al.* *Novartis Found Symp*, 2001, 236: 85  
[34] Bohner S *et al.* *Plant J*, 1999, 19: 87  
[35] Bohner S *et al.* *Mol Gen Genet*, 2001, 264: 860  
[36] Martinez A *et al.* *Mol Gen Genet*, 1999, 261: 546  
[37] Padidam M *et al.* *Transgenic Res*, 2003, 12: 101  
[38] Unger E *et al.* *Transgenic Res*, 2002, 11: 455  
[39] Koo JC *et al.* *Plant J*, 2004, 37: 439  
[40] Mett VL *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1993, 90: 4567  
[41] McKenzie MJ *et al.* *Plant Physiol*, 1998, 116: 969  
[42] Mett VL *et al.* *Transgenic Res*, 1996, 5: 105  
[43] Peng XL *et al.* *Agr Sci China*, 2003, 2: 597  
[44] Granger CL *et al.* *Planta*, 2000, 210: 502  
[45] Granger CL *et al.* *Plant Cell Rep*, 2001, 20: 227  
[46] Caddick MX *et al.* *Nat Biotechnol*, 1998, 16: 177  
[47] Salter MG *et al.* *Plant J*, 1998, 16: 127  
[48] Roslan HA *et al.* *Plant J*, 2001, 28: 225  
[49] Flippin M *et al.* *J Biol Chem*, 2001, 276: 6950  
[50] Junker BH *et al.* *FEBS Lett*, 2003, 535: 136  
[51] Gorlach J *et al.* *Plant Cell*, 1996, 8: 629  
[52] De Veylder L *et al.* *Plant Cell Physiol*, 1997, 38: 568  
[53] Boetti H *et al.* *Biotechnol Bioeng*, 1999, 64: 1  
[54] Guo HS *et al.* *Plant J*, 2003, 34: 383

## Chemical-inducible Expression Systems and Advances of Their Applications in Plants

Xiao-Ying Zhuang, Gang Lu\*, Jia-Shu Cao, Da-Qiang Hou<sup>1</sup>

(Institute of Vegetable Science, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;

<sup>1</sup>Institute of Landscape, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

**Abstract** Chemical-inducible promoters can activate or inactivate target gene expression at a particular developmental stage and for a specific duration. Several systems have been developed and used to analyze gene function, marker-free plant transformation, site specific DNA excision, restoration of male fertility and RNA silencing. Chemical-inducible expression systems will be powerful tools for basic research in molecular biology and biotechnological applications, which will dramatically increase the application of transgenic technology.

**Key words** promoters; expression systems; chemical-inducible

Received: October 28, 2004 Accepted: February 24, 2005

This work was supported by the National High Technology Research and Development Program of China (863 Program) (No. 2002AA207013)

\*Corresponding author. Tel: 86-571-86971722, E-mail: glu@zju.edu.cn