

李 珺,马力通. 马铃薯淀粉体表达载体的构建及其转基因植物的培养[J]. 江苏农业科学,2013,41(8):22-24.

马铃薯淀粉体表达载体的构建及其转基因植物的培养

李 珺,马力通

(内蒙古科技大学生物工程与技术研究所,内蒙古包头 014010)

摘要:以 pCAMBIA1305-1 载体为基础,构建融合了淀粉体转运肽 GB77 及淀粉粒结合肽 GB20 编码序列的马铃薯淀粉体定向表达载体 pCAMBIA1305-GB77-GB20,并通过马铃薯块茎专一性 *GBSS I* 基因启动子启动其表达。将构建的载体经农杆菌介导转化蜡质马铃薯突变植株,PCR 证实了融合基因已经整合到马铃薯基因组中。研究为探讨马铃薯淀粉体定向表达外源蛋白、进一步开发马铃薯淀粉体细胞器生物反应器奠定了基础。

关键词: *GBSS I* 基因启动子;马铃薯;淀粉体;生物反应器

中图分类号: Q943.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)08-0022-03

随着基因工程的不断发展,植物生物反应器已经成为具有重要经济价值的外源蛋白的生产体系。如何提高外源蛋白的表达量并降低蛋白提取、加工等过程中的成本是外源蛋白能否进行产业化的关键。使用启动子、增强子等特异表达的调控序列,使外源蛋白靶向定位于叶绿体、油体、淀粉体等细胞器中是解决上述问题的有效途径^[1]。

淀粉体是贮藏组织中淀粉合成的场所,是积累淀粉的一种质体,其形态表现为形成团粒结构——淀粉粒^[2]。淀粉粒形态大小因植物种类不同而具有很大差异性,同时具有种专一性,是决定不同内源淀粉性质的重要因素之一。淀粉粒表面或内部紧密结合的蛋白是淀粉粒结合蛋白(starch granule-associated proteins,SGAPs)。颗粒结合型淀粉合成

酶 I (granule-bound starch synthase, *GBSS I*) 也称 Waxy 蛋白,是目前研究较为深入的一种淀粉粒结合蛋白,*GBSS I* 类基因的显著特征之一是其编码的 *GBSS* 蛋白质能够与淀粉粒结合而表现出活性,具有延长直链的特殊功能。在研究谷类作物 *waxy* 突变体、马铃薯 *amf* 突变体、豌豆 *lam* 突变体以及马铃薯 *GBSS I* 反义突变体的过程中发现,随着 *GBSS I* 活性的下降或丧失,植物贮藏器官中的直链淀粉合成量会下降或根本不合成,由此说明 *GBSS I* 是唯一决定合成代谢贮藏器官中直链淀粉的基因^[3]。

马铃薯 *GBSS I* 基因为单拷贝基因,它的结构基因长约 3 kb,有 13 个内含子,14 个外显子,其中第一内含子在不翻译的前导区^[4]。马铃薯 *GBSS I* cDNA 长 1 821 bp,编码 607 个氨基酸组成的未成熟的 *GBSS I* 多肽,其中位于 N 末端的转运肽由 77 个氨基酸组成,C 末端序列有 20 个氨基酸的延伸,使得它能够结合在淀粉粒上并延伸淀粉粒上的直链淀粉^[5]。研究表明,马铃薯 *GBSS I* 的启动子是块茎专一性启动子^[6]。

收稿日期:2013-01-17

基金项目:内蒙古科技大学创新基金(编号:2011NCL005)。

作者简介:李 珺(1979—),女,宁夏石嘴山人,硕士,研究方向为植物基因工程。E-mail:star1979@126.com。

[6] Jakoby M, Weisshaar B, Droge-Laser W, et al. bZIP transcription factors in *Arabidopsis* [J]. Trends in Plant Science, 2002, 7(3): 106-111.

[7] Qin F, Kakimoto M, Sakuma Y, et al. Regulation and functional analysis of ZmDREB2A in response to drought and heat stresses in *Zea mays* L. [J]. The Plant Journal, 2007, 50(1): 54-69.

[8] Dai X, Xu Y, Ma Q, et al. Overexpression of an R1R2R3 MYB gene, *OsMYB3R-2*, increases tolerance to freezing, drought, and salt stress in transgenic *Arabidopsis* [J]. Plant physiology, 2007, 143(4): 1739-1751.

[9] Liao Y, Zhang J, Chen S, et al. Role of soybean GmbZIP132 under abscisic acid and salt stresses [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2008, 50(2): 221-230.

[10] Liu J, Srivastavar, Howell S, et al. Stress-induced expression of an activated form of AtbZIP17 provides protection from salt stress in *Arabidopsis* [J]. Plant, Cell & Environment, 2008, 31(12): 1735-1743.

[11] Holm M, Hardtke C S, Gaudet R, et al. Identification of a structural motif that confers specific interaction with the WD40 repeat domain of *Arabidopsis* COP1 [J]. EMBO J, 2001, 20(1/2): 118-127.

[12] Armstrong G A, Weisshaar B, Hahlbrock K, et al. Homo-dimeric and heterodimeric leucine zipper proteins and nuclear factors from parsley recognize diverse promoter elements with ACGT cores [J]. Plant Cell, 1992, 4(5): 525-537.

[13] Terzaghi W B, Bertekap R L Jr, Cashmore A R, et al. Intracellular localization of GBF proteins and blue light-induced import of GBF2 fusion proteins into the nucleus of cultured *Arabidopsis* and soybean cells [J]. Plant J, 1997, 11(5): 967-982.

[14] Huang J, Yang m, Liu P, et al. GhDREB1 enhances abiotic stress tolerance, delays GA-mediated development and represses cytokinin signalling in transgenic *Arabidopsis* [J]. Plant, Cell & Environment, 2009, 32(8): 1132-1145.

[15] Martinez-Garcia J F, Moyano E, Alcocer M J, et al. Two bZIP proteins from *Antirrhinum* flowers preferentially bind a hybrid C-box/G-box motif and help to define a new sub-family of bZIP transcription factors [J]. Plant J, 1998, 13(4): 489-505.

[16] Huang X, Chao D, Gao J, et al. A previously unknown zinc finger protein, DST, regulates drought and salt tolerance in rice via stomatal aperture control [J]. Genes & Development, 2009, 23(15): 1805-1817.

本研究以 β -葡糖醛酸酶(GUS)作为报告分子,在其C端融合了GBSS I C末端20个氨基酸的淀粉粒结合肽,并通过GBSS I 块茎专一性启动子启动其表达,得到淀粉体的定向表达载体;通过农杆菌转化蜡质马铃薯突变品系,经PCR检测证明融合基因已经整合到马铃薯基因组中。外源基因与植物特异调控基因的融合表达为马铃薯淀粉体定向表达外源蛋白亚细胞器生物反应器奠定了基础。

1 材料与与方法

1.1 材料与试剂

蜡质马铃薯突变体 Shepody、大肠杆菌受体 *E. coli* B L21、细菌载体 pGEM-T Easy、植物表达载体 pCAMBIA1305-1、农杆菌 LBA4404 (Rif⁺、Str⁺、Kan⁻) 均由笔者所在实验室保存;基因克隆所用试剂、质粒小量提取试剂盒购自大连宝生物工程公司;构建载体所需药品购自 Promega 公司;抗生素及其他常规试剂均购自北京鼎国生物技术有限公司。

1.2 试验方法

1.2.1 马铃薯块茎总 DNA 的提取 采用 CTAB 法,具体过程略。

1.2.2 GBSS I 启动子及 N 端 77 个氨基酸转运肽编码序列的 PCR 扩增 根据马铃薯的 GBSS I 基因序列 (GenBank 登录号: X83220), 用 Primer premier 5.0 软件辅助设计了 1 对引物, 由上海生工生物工程技术有限公司合成。引物序列为 GB-1F: 5'-TCCTTCCTTTAGCAGTGTATCAAT-3'; GB-1R: 5'-GAACCTGATCTTTGTGGGT-3'。以提取的马铃薯总 DNA 为模板, GB-1、GB-2 作为引物进行 PCR 扩增, 反应体系总体积为 25 μ L: 2.0 μ L 模板 DNA, 2.5 μ L 10 \times Taq DNA Polymerase Buffer, 0.5 μ L Ex Taq DNA Polymerase (5 U/ μ L)、2.0 μ L dNTPs (10 mmol/L)、1.0 μ L GB-1F (10 mmol/L)、1.0 μ L GB-1R (10 mmol/L)、16.0 μ L ddH₂O。反应条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 95 $^{\circ}$ C 45 s, 56 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。电泳、拍照并切下目的条带进行回收, 于 -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

1.2.3 克隆与测序 将回收后的 PCR 产物与 pGEM-T Easy 载体进行连接, 连接产物转化至 *E. coli* BL21 感受态细胞中后涂布于含氨苄 (50 μ g/mL) 的 LB 抗性平板上, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养, 利用蓝白斑进行筛选, PCR、双酶切鉴定出阳性克隆。筛选出的阳性克隆送至上海生工生物工程技术有限公司进行测序, 测序结果用 DNAMAN 和 DNASTAR 软件进行序列分析。

1.2.4 马铃薯淀粉体定向表达载体的构建 采用限制性内切酶 *Hind* III、*Nco* I 分别对带有 GBSS I 启动子及 N 端 77 个氨基酸转运肽编码序列的 pGEM-T-GB77 质粒、带有 GBSS I C 端的 20 个氨基酸淀粉粒结合肽编码序列的表达载体 pCAMBIA1305-GB20 进行双酶切; 分别回收 1.0、1.3 kb 左右的片段, 然后在 16 $^{\circ}$ C、24 h 条件下用 T₄ DNA 连接酶将上述 2 个片段进行连接, 将连接产物转化至 *E. coli* BL21 感受态细胞中后涂布于含卡那霉素 (30 μ g/mL) 的 LB 抗性平板上, 于 37 $^{\circ}$ C 过夜培养, 利用双酶切鉴定阳性克隆。

1.2.5 根癌农杆菌 LBA4404 的转化及马铃薯再生植株的获得 将构建的马铃薯淀粉体表达载体通过冻融法转入农杆菌菌株 LBA4404 后浸染蜡质马铃薯突变体的无菌苗茎段外植

体。经过预培养可形成明显的愈伤组织, 约 20% ~ 50% 愈伤组织上逐渐有芽点出现并形成小芽, 将分化出的小芽在抑菌培养基 (含一定浓度潮霉素) 中进行壮苗培养, 然后转入生根培养基 (含一定浓度潮霉素) 中进行生根培养, 最终获得潮霉素抗性的再生植株。

1.2.6 马铃薯再生植株的 PCR 检测 用 CTAB 法提取转基因植株 DNA, 以未经转化的植株作阴性对照进行 PCR 检测。PCR 扩增融合基因的引物为: GB-2F: 5'-CAGCTATGAC-CATGTTAC-3'; GB-2R: 5'-CGGGTCTCGGTGTGA-3', 由上海生工生物工程技术有限公司合成。

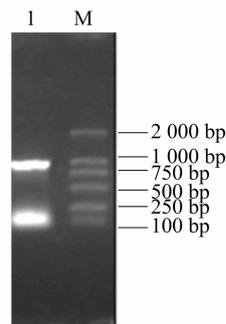
2 结果与分析

2.1 GBSS I 启动子及 N 端 77 个氨基酸转运肽编码序列的 PCR 扩增

PCR 产物经凝胶电泳后发现, 所扩增片段约为 1.0 kb, 与预期结果相符 (图 1)。参照“1.2.3”中相应步骤将回收后的 PCR 产物与 pGEM-T Easy 载体进行连接, 进一步的 PCR 及 *Hind* III + *Pst* I 双酶切鉴定呈阳性, 说明该目的片段已成功插入 pGEM-T Easy 载体中。

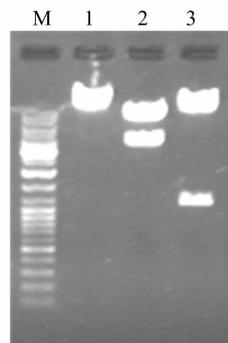
2.2 马铃薯淀粉体定向表达载体的构建及检测

参照“1.2.4”中相应方法, 得到转化细胞后, 挑取单菌落并接种于含卡那霉素的液体抗性培养基中, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养, 碱裂解法提取质粒。经 *Sac* II 单酶切及 *Eco* R I + *Bgl* II 双酶切鉴定, 电泳结果与预期相符 (图 2), 说明本试验成功构建了马铃薯淀粉体定向表达载体 pCAMBIA-GB77-GB20 (图 3)。



M—DL 2 000 DNA marker; 1—PCR产物

图1 GBSS I 基因启动子及 GBSS I 基因N端77个氨基酸编码序列的PCR扩增结果



M—DL 10 000 DNA marker; 1—重组质粒pCAMBIA-GB77-GB20; 2—重组质粒pCAMBIA-GB77-GB20的*Sac* II酶切产物; 3—重组质粒pCAMBIA-GB77-GB20的*Eco* R I + *Bgl* II酶切产物

图2 重组质粒pCAMBIA-GB77-GB20的酶切鉴定

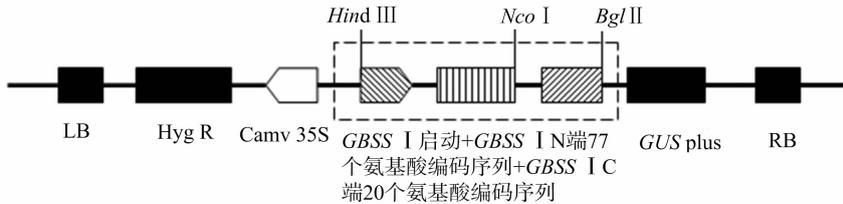
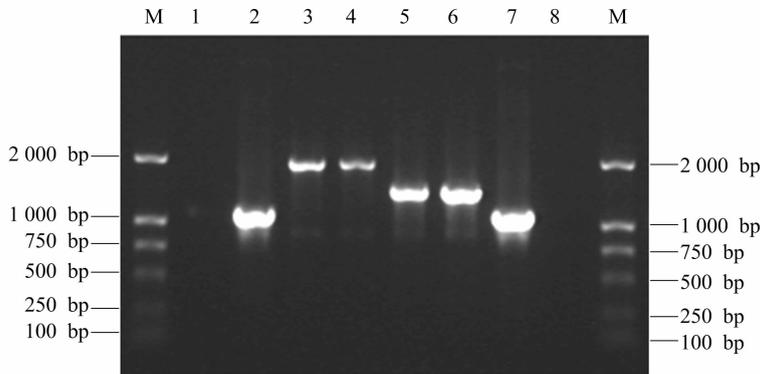


图3 马铃薯淀粉体定向表达载体pCambia-GB77-GB20的构建示意

2.3 马铃薯再生植株的 PCR 检测

参照“1.2.5”中相应方法获得根瘤农杆菌 LBA4404 转化体及马铃薯再生植株后,再参照“1.2.6”中相应方法提取转化的马铃薯再生植株总 DNA,并对抗性再生植株进行融合基因的 PCR 扩增,以未转化植株作阴性对照。由结果可以看

出,抗性植株中存在融合基因的特异性扩增(图4)。试验共对38株抗性植株进行PCR扩增,共有13株能扩增出约1.0 kb目的条带,证明融合基因已经整合到马铃薯基因组中,转化率约为34%。



M—DL 2 000 DNA marker; 1、8—未转化植株对照; 2、7—pCambia1305-1空质粒; 3、4—含GBSS I+N端77氨基酸+C端20氨基酸融合基因的抗性植株; 5、6—含GBSS I+N端77氨基酸融合基因的抗性植株

图4 抗性植株目的片段的PCR扩增结果

3 讨论与结论

马铃薯是世界上仅次于小麦、水稻、玉米的第四大粮食作物,目前利用马铃薯作为植物反应器受体进行外源基因的遗传转化已经得到了飞速发展,一系列抗病、抗虫、抗真菌、品质改良的转基因马铃薯品种相继诞生,而且已有部分品种实现了商品化,但是外源蛋白在转基因马铃薯块茎中复杂的表达和纯化工艺仍是科学家们有待解决的重要难题。能否高水平表达外源蛋白是开发马铃薯作为生物反应器的关键。本研究构建的植物表达载体 pCambia1305 - GB77 - GB20 是以 pCambia1305 - 1 载体为基本骨架,加入了马铃薯块茎专一性启动子(GBSSI启动子)、淀粉体转运肽(GBSSI N 端的 77 个氨基酸)、淀粉粒结合肽(GBSSI C 端的 20 个氨基酸)。结果表明,融合基因可使外源蛋白定向表达于马铃薯淀粉体中。

本试验成功地转化了马铃薯外植体并获得了转基因植株,其转化率约为34%。通过PCR检测证明,融合基因已经整合到马铃薯基因组中,为后续通过GUS检测外源蛋白是否能在马铃薯淀粉体上定向表达奠定了基础。外源基因与植物特异调控基因的融合表达,既提高了外源蛋白的表达量,又简化了蛋白的提取纯化步骤,表明以马铃薯淀粉体定向表达外

源蛋白亚细胞器生物反应器具有较好的前景。

参考文献:

[1]李 珺. 几种新型细胞器植物生物反应器的研究[J]. 生物技术通报,2008(3):30-32.
 [2]Zeeman S C, Tiessen A, Pilling E, et al. Starch synthesis in *Arabidopsis*: Granule synthesis, composition, and structure[J]. Plant Physiology, 2002, 129(2):516-529.
 [3]季 勤, Vincken J P, Reamakers K, 等. 利用 GBSS I 和 SBD 作为“锚”将荧光素酶定位到淀粉粒中效果的比较[J]. 自然科学进展, 2006, 16(6):679-683.
 [4]Hunt H V, Denyer K, Packman L C, et al. Molecular basis of the waxy endosperm starch phenotype in broomcorn millet (*Panicum miliaceum* L.)[J]. Mol Biol Evol, 2010, 27(7):1478-1494.
 [5]Tenorio G, Orea A, Romero J M, et al. Oscillation of mRNA level and activity of granule-bound starch synthase I in *Arabidopsis* leaves during the day/night cycle[J]. Plant Molecular Biology, 2003, 51(6):949-958.
 [6]宋东光, 黄大庆, 王光清, 等. 不同长度马铃薯 GBSS 基因启动子的块茎专一性表达的初报[J]. 复旦学报:自然科学版, 1998, 37(4):559-563.