

乔新荣,赵丽平,孙 伟,等. 拟南芥 *PHOT2* 基因超表达载体的构建及转化[J]. 江苏农业科学,2014,42(1):30-32.

# 拟南芥 *PHOT2* 基因超表达载体的构建及转化

乔新荣<sup>1</sup>, 赵丽平<sup>1</sup>, 孙 伟<sup>1</sup>, 徐长水<sup>2</sup>

(1. 信阳农林学院,河南信阳 464001; 2. 河南大学生命科学学院/植物逆境生物学重点实验室,河南开封 475004)

**摘要:**采用 PCR 技术扩增拟南芥 *PHOT2* 基因编码序列,并将其转入 pSUPER1300 超表达载体中,构建了 pSUPER1300-*PHOT2* 超表达载体,利用农杆菌介导花序转化法,转入拟南芥野生型 *gll*、*phot1* 突变体中。PCR 扩增及 RT-PCR 分析表明,该基因超表达,筛选到了潜在的转基因株系。

**关键词:**蓝光受体;向光素;超表达

**中图分类号:** Q943.2      **文献标志码:** A      **文章编号:** 1002-1302(2014)01-0030-02

光向素 (phototropin, PHOT) 是植物特有的蓝光受体, PHOT1、PHOT2 属于同一家族,其 N 端含有 2 个高度保守的光感受区 LOV1 (light, oxygen, voltage) 区、LOV2 区,每个 LOV 区都结合一分子的黄素单核苷酸(FMN)作为发色团。C 端是 Ser/Thr 蛋白激酶区,蓝光激活多个丝氨酸残基发生自磷酸化作用<sup>[1]</sup>。研究发现,PHOT1 的第 851 位丝氨酸残基 (Ser851) 的磷酸化作用是 PHOT1 发挥其生理作用所必需的<sup>[2]</sup>。PHOT 都定位于质膜,但蓝光会诱导部分 PHOT1 向胞质迁移,部分 PHOT2 移至高尔基体及叶绿体外膜<sup>[3-5]</sup>。PHOT1、PHOT2 调节植物的许多生理反应,包括植物的向光反应、气孔开放、叶绿体迁移及提高弱光下植物的光合作用、降低强光对植物伤害等<sup>[1,6]</sup>。目前,学者们对 PHOT1、PHOT2 的结构及其生理作用有了较为深入的研究<sup>[7-8]</sup>, PHOT1、PHOT2 以光强依赖方式共同介导植物的许多生理反应,如共同介导弱光下叶绿体的聚集运动及强光下下胚轴的向光弯曲<sup>[7]</sup>。为了进一步研究 *PHOT2* 基因的功能及该基因下游的信号调控网络,本研究通过基因重组技术,构建 pSUPER1300-*PHOT2* 超表达载体,转入野生型 *gll* 及 *phot1* 突变体 2 种遗传背景材料,获得 *PHOT2* 超表达转基因植株,旨在为深入研究 PHOT1、PHOT2 所调控的信号网络提供遗传材料。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 植物材料 拟南芥野生型 *gll* (Col-0 生态型)、*phot1* 突变体。

1.1.2 试剂、菌株、载体 大肠杆菌菌株 DH5 $\alpha$ 、农杆菌菌株 GV3101、超表达载体 pSUPER1300、*Taq* DNA 聚合酶为笔者所在实验室保存;克隆载体 pMD18-T、限制性内切酶、Oligo (dT) 引物、核酸分子量标准 (marker)、DNA 凝胶纯化回收试剂盒及质粒提取试剂盒均购自 TaKaRa 公司;Trizol 试剂购自 Invitrogen 公司;高效连接试剂盒 Soution I、M-MLV 反转录酶、潮霉素 B (hygromycin B) 购自 Promega 公司;KOD-plus DNA 聚合酶购自 ToYoBo 公司;各类抗生素购自 Solarbio 公

司;dNTP、普通 PCR buffer 购自天根生化科技有限公司。引物由上海生工生物工程技术有限公司 (以下简称上海生工) 合成 (表 1)。

表 1 引物序列

引物名称	引物序列 (5'→3')	片段长度 (bp)
PF1	GGGTCTAGAAAGAAACGTTATGGAGAGG	2 748
PR1	GCCGGTACCGATTAGAAGAGGTCAATGTCC	2 748
AF1	TTCTCATGCCATCTCCGCTCTT	420
AR1	CAGCGATACCTGAGAACATAGTGG	420
PF2	TCGTCATCAGTGATCCTCGTC	812
PR2	CTCTCCACCTGGGCAGAACT	812

注:下划线为 *Xba* I、*Kpn* I 酶切位点。

### 1.2 方法

1.2.1 总 RNA 提取及 cDNA 合成 将野生型 *gll* 种子点播于 0.6% MS 固体培养基上,取生长 2 周左右的无菌苗 0.1 g,液氮研磨,按照 Trizol 试剂说明书提取总 RNA。将提取的总 RNA 在 1% 琼脂糖凝胶上电泳检测。以合格的总 RNA 为模板,参照 M-MLV 反转录酶说明书进行反转录,合成 cDNA 第一链,立即使用或 -20℃ 保存备用。

1.2.2 *AtPHOT2* 超表达载体构建 根据 TAIR 网站上提供的 *AtPHOT1* 的 CDS 序列及 pSUPER1300 载体上的多克隆位点,选择 *Xba* I、*Kpn* I 限制性内切酶,设计克隆引物 PF1、PR1。以 cDNA 为模板,利用普通 *Taq* DNA 聚合酶预扩增预期片段,再用高保真酶 KOD-PlusDNA 聚合酶扩增回收。扩增条件为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 40 s,56℃ 复性 40 s,68℃ 延伸 3 min,30 个循环;68℃ 延伸 10 min。依据 TA 克隆试剂盒说明书将上述 PCR 产物克隆到 pMD18-T Vector,然后通过热激法将连接产物转入大肠杆菌 DH5 $\alpha$  中,并在含 50  $\mu$ g/mL 卡那霉素 (Kan) 的 LB 培养基上选择培养。菌落 PCR、质粒 PCR 后,得到重组克隆 pMD18-*PHOT2* 质粒,送上海生工测序。以测序正确的 pMD18-*PHOT2* 质粒为模板,按上述引物、PCR 程序再进行 *PHOT2* 片段扩增,回收片段、pSUPER1300 空质粒分别利用 *Xba* I、*Kpn* I 酶切,连接并转化,进行 PCR 检测、酶切鉴定,送上海生工测序,得到 pSUPER1300-*PHOT2* 超表达质粒。

1.2.3 农杆菌介导的拟南芥遗传转化 采用 CaCl<sub>2</sub> 冻融法

收稿日期:2013-06-08

作者简介:乔新荣 (1972—),女,河南新密人,博士,讲师,主要从事植物生理及分子生物学研究。E-mail: xinrong806@163.com。

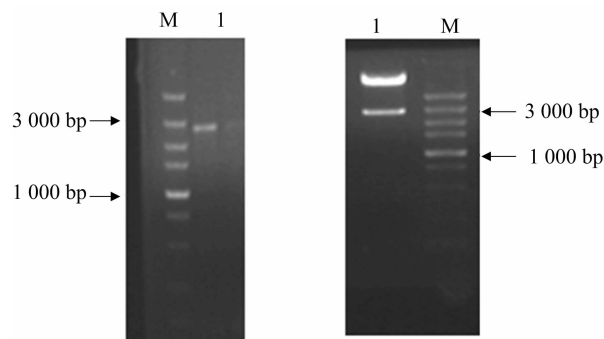
将 0.5  $\mu$ L 重组质粒 pSUPER13000 - *PHOT2* 导入农杆菌 GV3101 感受态细胞,涂板筛选,挑选单菌落摇菌,以所摇农杆菌菌液为模板,PCR 扩增检测阳性目的质粒。拟南芥转化采用的方法是花序浸染法<sup>[9]</sup>,将含有阳性超表达质粒的农杆菌菌液分别浸染野生型 *gll*、*phot1* 突变体的花序,收获转化后的种子,用潮霉素 B(Hyg B)进行抗性筛选,得 T1 代转基因植株,用 SDS 法提取叶片 DNA,利用 PF2、PR2 引物扩增 *PHOT2* 基因,对能扩增出目的条带的株系继续进行 Hyg B 抗性筛选,直至 T3 代产生纯合株系。

1.2.4 表达量鉴定 把 *PHOT2* 基因转入 *gll* 背景的株系命名为 PHOT2 - OX,将以 *phot1* 突变体为背景的 *PHOT2* 超表达株系命名为 *phot1*PHOT2 - OX。用 Trizol 法提取拟南芥 *gll*、*phot1* 及上述 2 个转基因株系幼苗的总 RNA,利用 *ACTIN2* 基因做内参,用 PF2、PR2 引物对对转基因植株进行 *PHOT2* 表达量的半定量 PCR 鉴定。

## 2 结果与分析

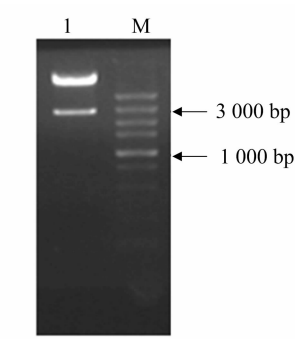
### 2.1 *PHOT1* 基因超表达载体的构建

用 Trizol 方法提取拟南芥幼苗,用反转录的 cDNA 为模板,扩增到 2 748 bp 的 *PHOT2* 的 CDS 序列全长(图 1)。由于该基因 CDS 片段较长,PCR 不易扩增,为了保证载体构建时有足够的模板,先将回收的片段与易连接转化的克隆载体 pMD18 - T 相连,将得到的重组产物转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中,37  $^{\circ}$ C 培养。通过菌落 PCR、质粒 PCR 鉴定基因片段正确后,取 20  $\mu$ L 质粒测序,序列比对完全正确,可用于表达载体构建的模板。用测序正确的质粒为模板,PCR 目的条带回收,与 pSUPER1300 空载体用 *Xba* I、*Kpn* I 酶同时酶切 4 h 回收,用 Soution I 连接酶 16  $^{\circ}$ C 连接过夜,转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中,37  $^{\circ}$ C 培养。菌落 PCR 验证正确后,挑单菌落进行过夜液体培养,提取质粒,质粒 PCR 鉴定条带正确后,再酶切验证(图 2)。将得到的 pSUPER1300 - *PHOT2* 重组质粒送公司测序,经序列比对,序列片段与拟南芥资源信息(TAIR)网站上公布的序列完全相同。



M—marker; 1—PCR产物

图1 PCR产物电泳分析



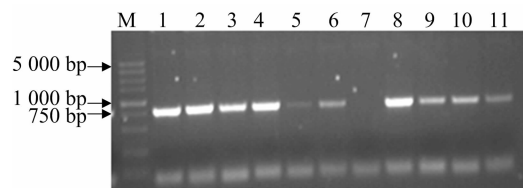
M—marker; 1—酶切电泳条带

图2 超表达载体的酶切电泳图

### 2.2 *PHOT2* 超表达转基因植株的初步鉴定

将测序正确的 pSUPER1300 - *PHOT2* 质粒转入农杆菌 GV3101,菌液 PCR 鉴定出目的条带。将获得的 pSUPER1300 - *PHOT2* 农杆菌菌株分别浸染拟南芥野生型 *gll*、*phot1* 突变体植株,筛选转基因株系。取部分 T3 代纯合株系生长 2~3 周的叶片,提取基因组 DNA 进行初步筛选鉴定,设计 *PHOT2* 引

物 PF2、PR2 进行 PCR 检测(图 3),检测了 5 株 *PHOT2* 转入野生型 *gll* 所获得的转基因株系(命名为 PHOT2 - OX),即图 3 所示的 1~5 号泳道,除 5 号株系有微弱条带外,其余均扩增出了较亮的电泳条带,与预期条带一致。6~11 号是以 *phot1* 突变体为背景的 *PHOT2* 超表达株系(命名为 *phot1*PHOT2 - OX),7 号株系没有目的条带,其他 5 个株系检测到了目的条带。

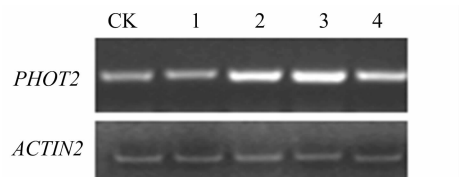


M—marker; 1~11—PCR产物

图3 超表达转基因株系的初步鉴定

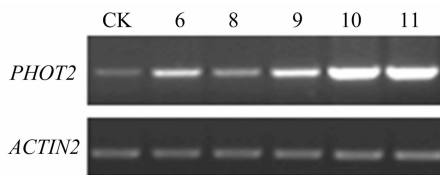
### 2.3 *PHOT2* 超表达转基因植株表达量的鉴定

提取图 3 中有目的条带的转基因单株的总 RNA,同时提取野生型 *gll* 及 *phot1* 突变体幼苗的总 RNA 做对照。反转录为 cDNA,进行半定量 RT - PCR 鉴定,检测各个株系 *PHOT2* 的表达情况。以 *ACTIN2* 为内参,设计表 1 所示的 AF1、AR1 为对照引物,*PHOT2* 半定量表达引物为 PF2、PR2,进行电泳检测(图 4)。PHOT2 - OX 转基因株系 2、3 表达量明显高于对照 *gll*。*phot1*PHOT2 - OX 株系 10、11 号表达量显著高于对照 *phot1* 突变体(图 5)。由此可知,筛选到了潜在的转基因植株。



CK—对照 *gll* 植株; 1~4—PHOT2-OX转基因株系

图4 *PHOT2*-OX株系*PHOT2*表达量鉴定



CK—对照 *phot1* 植株; 6~11—*phot1* PHOT2-OX转基因株系

图5 *phot1* PHOT2-OX株系*PHOT2*表达量鉴定

## 3 结论与讨论

光不仅是植物生长发育的能量来源,而且也是一种重要的信号分子。利用不同类型的遗传突变体材料是目前研究基因功能的重要手段。*PHOT1*、*PHOT2* 既共同介导了植物的许多生理反应,又有其独特的功能。本研究利用优化的 PCR 反应体系扩增拟南芥 *PHOT2* 基因,结果表明,该基因 CDS 序列全长为 2 748 bp,与已发表的 *PHOT2* 序列完全相同。将目的基因插入到表达载体 pSUPER1300 中的 35S 启动子下游,成功构建了超表达质粒 pSUPER1300 - *PHOT2*,获得了野生型 *gll*、*phot1* 突变体 2 种背景的 *PHOT2* 超表达遗传材料。

赵会彦,肖 麓,杜德志. 青海大黄油菜黄籽基因 SSR 标记开发和图谱构建[J]. 江苏农业科学,2014,42(1):32-35.

# 青海大黄油菜黄籽基因 SSR 标记开发和图谱构建

赵会彦,肖 麓,杜德志

(青海大学农林科学院春油菜研究所/青海省春油菜遗传改良重点实验室/青海省高原作物种质资源创新与利用重点实验室,青海西宁 810016)

**摘要:**青海大黄油菜是青藏高原特有的一个白菜型油菜地方品种,具有黄籽的优良性状。前人研究结果表明大黄油菜黄籽性状受一对隐性基因 *Brsc1* 控制。该基因被定位于白菜型油菜的 A9 染色体上。为了筛选更多与 *Brsc1* 紧密连锁的标记,本研究根据 *Brsc1* 所在染色体区间,依据 BRAD 数据库中已公布的白菜型油菜的序列信息(<http://brassicadb.org/brad/>),设计新的 SSR 引物,同时利用同源区间内已有的 SSR 引物对目标基因进一步精细定位。以大黄油菜和褐籽油菜 09A-126 为亲本,构建 BC<sub>1</sub> 分离群体和 F<sub>2</sub> 群体,结合 BSA 法,对 SSR 引物进行检测,共筛选到 5 个与 *Brsc1* 基因紧密连锁的 SSR 标记:A-11-65、A-11-145、B-6-32、BrID10607 和 KS10760,其中 A-11-65 为共显性标记。构建了 *Brsc1* 的 SSR 标记遗传图谱和物理图谱,图谱标记密度较前人进一步增加。这些标记的获得为油菜黄籽品种分子标记辅助选择育种体系的建立和黄籽基因的克隆奠定了基础。

**关键词:**青海大黄油菜;黄籽基因;SSR;遗传图谱;物理图谱

**中图分类号:**S565.401 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2014)01-0032-04

油菜是世界范围内广泛种植的油料作物之一,也是我国食用植物油的重要来源。油菜种皮颜色有黄色、褐色、黑色等,研究表明,在相同遗传背景下,黄籽油菜与黑、褐籽等油菜相比,具有种皮薄,皮壳率低,蛋白质和含油量高,色素含量少等优点<sup>[1-2]</sup>。白菜型黄籽油菜为自然界存在的天然黄籽资源之一,对白菜型油菜黄籽基因进行定位,开发与黄籽基因紧密连锁的分子标记,构建黄籽基因的遗传连锁图谱和物理图谱,对黄籽油菜分子标记辅助选择育种体系的建立、黄籽基因的图位克隆以及转基因油菜品种的培育等都具有重要的意

义<sup>[3-7]</sup>。Chen 等利用印度黄籽沙逊构建白菜-芥蓝(*B. campestris*-*B. alboglabra*)C 染色体组异附加系,并利用该异附加系筛选出一个与黄籽基因紧密连锁的 RAPD 标记 B06-600<sup>[8]</sup>。Rahman 等在白菜型黄籽沙逊油菜中发现 1 个与黄籽性状主效基因(*Br1/br1*)紧密连锁的 SRAP 标记 SA7BG29-245,并将这个标记转化为共显性 SNP(单核苷酸多态性)标记和 SCAR(序列特异性扩增区域)标记<sup>[9]</sup>。Zhang 等利用大白菜双单倍体群体进行黄籽基因的精细定位和图位克隆,用 13 个 SRAP 标记、6 个 SCAR 标记和 4 个 SNP 标记构建了黄籽基因的遗传连锁图谱,克隆了控制种皮颜色的基因,该基因位于白菜型油菜 A6 连锁群<sup>[10]</sup>。Kebede 等对白菜型黄籽沙逊油菜种皮颜色基因进行了 QTL 定位,共检测到 4 个 QTL 位点,其中一个主效 QTL 位点 SCA9-2 和一个微效 QTL 位点 SCA9-1 位于 A9 连锁群,其他两个微效 QTL 位点(SCA3-1 和 SCA5-1)分别位于 A3 和 A5 连锁群,共解释了 67% 的表型变异<sup>[11]</sup>。Xiao 等对青海大黄油菜黄籽性状进行了遗传分析和基因定位研究,结果表明青海大黄油菜黄籽性

收稿日期:2013-05-04

基金项目:国家自然科学基金(编号:31060196);国家“863”计划(编号:2011AA10A104);国家“973”计划(编号:2012CB723007);国家油菜产业技术体系专项(编号:CARS-13)。

作者简介:赵会彦(1989—),男,河南南阳人,硕士研究生,主要从事春油菜分子生物学研究。E-mail:13639767407@163.com。

通信作者:肖 麓,博士。E-mail:981919669@qq.com。

## 参考文献:

- [1] Christie J M. Phototropin blue-light receptors[J]. Annual Review of Plant Biology, 2007, 58: 21-45.
- [2] Inoue S, Kinoshita T, Matsumoto M, et al. Blue light-induced autophosphorylation of phototropin is a primary step for signaling[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2008, 105(14): 5626-5631.
- [3] Kong S G, Kinoshita T, Shimazaki K, et al. The C-terminal kinase fragment of *Arabidopsis* phototropin 2 triggers constitutive phototropin responses[J]. Plant Journal, 2007, 51(5): 862-873.
- [4] Kong S G, Suetsugu N, Kikuchi S, et al. Both phototropin 1 and 2 localize on the chloroplast outer membrane with distinct localization activity[J]. Plant & Cell Physiology, 2013, 54(1): 80-92.
- [5] Kong S G, Suzuki T, Tamura K, et al. Blue light-induced association of phototropin 2 with the Golgi apparatus[J]. Plant Journal, 2006, 45(6): 994-1005.
- [6] Takemiya A, Inoue S, Doi M, et al. Phototropins promote plant growth in response to blue light in low light environments[J]. Plant Cell, 2005, 17(4): 1120-1127.
- [7] Sakai T, Kagawa T, Kasahara M, et al. *Arabidopsis* nph1 and npl1: blue light receptors that mediate both phototropism and chloroplast relocation[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(12): 6969-6974.
- [8] Kagawa T, Sakai T, Suetsugu N, et al. *Arabidopsis* NPL1: a phototropin homolog controlling the chloroplast high-light avoidance response[J]. Science, 2001, 291(5511): 2138-2141.
- [9] Clough S J, Bent A F. Floral Dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Journal, 1998, 16(6): 735-743.