

王 雷,崔震海,张立军. 玉米 C_4 型 *PEPC* 全长基因的克隆与表达载体构建[J]. 江苏农业科学,2014,42(11):26-29.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2014.11.007

玉米 C_4 型 *PEPC* 全长基因的克隆与表达载体构建

王 雷,崔震海,张立军

(沈阳农业大学生物科学技术学院/辽宁省植物基因工程技术研究中心,辽宁沈阳 110866)

摘要:以玉米自交系郑 58 基因组 DNA 为模板,设计了 2 对特异性引物,分别 PCR 扩增玉米 C_4 型磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(*PEPC*)启动子及其全长编码序列,利用 In-Fusion 技术将两者定向克隆到载体 pCAMBIA-1391Z 上,并对重组子进行测序验证。结果表明,该 *PEPC* 启动子序列与 GenBank 中的玉米自交系 B73 的同源性为 97.70%,片段长 1 200 bp;全长编码序列同源性为 97.90%,片段长 6 330 bp。通过 *Hind* III 和 *Eco*R I 酶切载体 pCAMBIA-1391Z,利用 In-Fusion 技术将线性载体与之前获得的 2 个 PCR 片段连接,测序结果与预期序列一致,表明成功构建了 pCAMBIA-1391Z-*PEPC* 植物表达载体。对克隆和载体构建中存在的问题进行了讨论,以期为该类型基因的高效克隆及表达载体的构建提供参考、为 C_4 型 *PEPC* 基因功能研究和 C_3 植物遗传转化提供可用的基因序列。

关键词:玉米;*PEPC*;基因克隆;序列分析;表达载体构建

中图分类号: Q786;S513.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2014)11-0026-04

根据 CO_2 固定初始产物的不同,可将高等植物分成 C_3 、 C_4 、CAM 这 3 类。以三碳化合物 3-磷酸甘油酸为最初光合产物的光合途径为 C_3 途径(或卡尔文循环),以四碳化合物草酰乙酸为最初光合产物的光合途径为 C_4 途径。 C_4 途径具有 CO_2 浓缩机制,能高效利用大气中的 CO_2 ,使植物保持较高的光合效率^[1-3],因此人们大量开展了将 C_3 植物转化为 C_4 植物的研究,但是许多这类转化没有达到预期目的^[4]。

磷酸烯醇式丙酮酸羧化酶(*PEPC*)存在于所有能进行光合作用的有机体中,包括植物、绿藻和光合细菌等。根据其序列特征和功能结构,*PEPC* 基因可划分为 C_4 、 C_{3-1} 、 C_{3-2} 3 个亚族,其中 C_4 型主要在叶肉细胞的胞质中表达,并且受光照调控, C_{3-1} 型主要在黄色叶片、茎等部位表达, C_{3-2} 型主要在根部表达; C_4 型的 *PEPC* 基因由 C_3 型 *PEPC* 基因进化而来^[5-7]。研究表明,将杂交玉米品种(Golden Cross Bantam)的 C_4 型 *PEPC* 全长基因(包括自身的启动子)转入 C_3 植物,*PEPC* 酶活性提高了 2~110 倍,苹果酸浓度也提高了,光合速率在强光条件下明显提高。研究还发现,转玉米 *PEPC* 基因 cDNA 和水稻 Cab 启动子的嵌合基因的水稻仅能使光合作用效率提高数倍,而将完整的玉米 *PEPC* 基因(包括外显子、内含子及自身的启动子)转入水稻中则能数十倍或更高地提高其光合效率^[8-17]。这说明以嵌合基因形式转化 C_3 植物,即 cDNA 和组成型启动子 CaMV35S 或光诱导型 Cab 启动子,或采用 C_4 全长基因和自身启动子进行转化,对基因更好地表达

和作用的发挥是十分必要的。

另外, C_4 关键酶基因由于序列较长,即使成功克隆,也不容易连入表达载体。在传统载体构建方法中,需要将基因的 2 个末端经过酶切修饰后插入载体,不仅要寻找合适的酶切位点,而且操作复杂,通常还需要构建多个中间载体,并进行多次酶切连接转化,工作量较大而且构建效率较低,尤其不适合构建长片段、多片段拼接的复杂载体。In-Fusion 是近年来发展起来的高效率载体构建技术,已应用于多基因融合和长片段克隆等方面^[18],运用该技术进行基因克隆和载体构建时,不需要借助 T_4 DNA 连接酶和补平 DNA 片段末端等操作步骤,只是在 PCR 引物设计中分别引入载体酶切位点两端的各 15 bp 序列,在 In-Fusion 重组酶作用下将 PCR 产物和已经线性化的载体连接起来,从而完成载体构建。In-Fusion 技术对目的片段和载体没有特殊的要求,可以将任何目的基因连接到线性化载体上。

玉米的 C_4 型 *PEPC* 基因序列较长,同时还需要连入启动子,多片段连接表达载体存在困难。因此,本研究利用 PCR 技术扩增玉米 C_4 型 *PEPC* 全长编码序列及其启动子序列,结合 In-Fusion 技术一步成功构建表达载体,并对克隆和载体构建中存在的问题进行讨论,以期为该类型基因的高效克隆及表达载体的构建提供参考,进而为 C_4 型 *PEPC* 基因功能的研究和 C_3 植物的遗传转化提供可用的基因序列。

1 材料与方法

1.1 植物材料、菌株和载体

玉米(*Zea mays* L.)自交系郑 58、pCAMBIA-1391Z 植物表达载体(图 1)由笔者所在实验室保存,*E. coli* HST08 Premium 菌株购自宝生物工程(大连)有限公司。

1.2 主要试剂

PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase(Code No. R050Q)试剂盒、TaKaRa MiniBEST Agarose Gel DNA Extraction Kit Ver. 3.0 试剂盒(Code No. 9762)、In-Fusion® HD Cloning Kit 试

收稿日期:2014-01-12

基金项目:国家自然科学基金(编号:31000673);教育部博士点基金(编号:20102103110001、20102103120001);辽宁省科技厅科技攻关项目(编号:201201238)。

作者简介:王 雷(1987—),男,山东菏泽人,硕士研究生,研究方向为植物基因工程与分子生物学。E-mail:wanglei6399@126.com。
通信作者:张立军,博士,教授,主要从事植物发育与作物生物技术研究。Tel:(024) 88187613;E-mail:lijunzhang8@yahoo.com.cn。

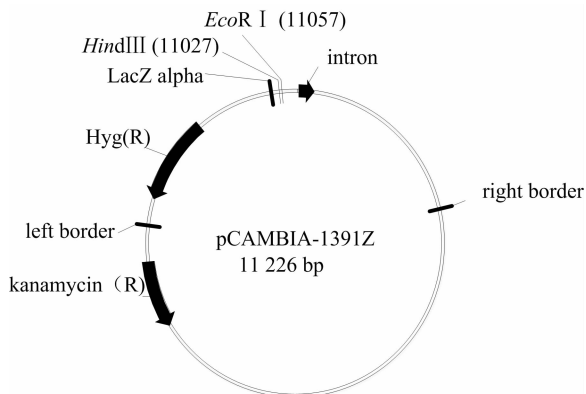


图1 植物表达载体 pCambia-1391Z 结构

剂盒、高效感受态细菌制备试剂盒 *E. coli* Competent Cells HST08 Premium (Code No. 9128)、各种限制性内切酶、DNAMarker 均购自宝生物工程(大连)有限公司;植物基因组 DNA 提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒(DP209)、质粒提取试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司;所用引物由生工生物工程(上海)股份有限公司合成。

1.3 引物设计

根据 In-Fusion 技术原理,利用 NCBI 上已经发表的玉

米 *C₄* 光合关键酶 *PEPC* 基因全长 DNA 序列 (GenBank 号: CM000785.3) 和表达载体 pCambia-1391Z, 设计并合成 *PEPC* 基因启动子及其全长编码序列的引物, 详见表 1。

1.4 玉米 *C₄* 型 *PEPC* 启动子及其全长编码序列的 PCR 扩增

采用以上引物和 PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (Code No. R050Q) 试剂盒, 以玉米自交系郑 58 基因组 DNA 为模板, 对 *PEPC* 基因启动子进行 PCR 扩增, 50 μL PCR 总反应体系为: 1 μL DNA 模板, 10 μL 5 × Prime STAR GXL buffer (Mg²⁺ plus), 4 μL dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L), 各 0.5 μL 上下游引物 (20 pmol/μL), 1 μL Prime STAR GXL DNA Polymerase (1.25 U/μL), 33 μL ddH₂O。PCR 扩增程序为: 98 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 15 s, 68 °C 延伸 1 min, 共进行 30 个循环。同样, 对 *PEPC* 基因全长编码序列进行 PCR 扩增, 50 μL PCR 总反应体系为: 1 μL DNA 模板, 10 μL 5 × Prime STAR GXL buffer (含 Mg²⁺), 4 μL dNTP Mixture (各 2.5 mmol/L), 各 0.5 μL 上下游引物 (20 pmol/μL), 1 μL Prime STAR GXL DNA Polymerase (1.25 U/μL), 33 μL ddH₂O。PCR 扩增程序为: 98 °C 变性 10 s, 60 °C 退火 15 s, 68 °C 延伸 6 min, 共进行 30 个循环。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测后切下目的条带, 用胶回收试剂盒回收用于后续试验。同时取 PCR 产物送生工生物工程(上海)股份有限公司进行测序。

表 1 引物序列

引物名称	引物序列
上游启动子序列引物	5' - TGATTACGCCAAGCTTATCTCATTTCTAATTGTGATAAC - 3'
下游启动子序列引物	5' - CCATGAATTTCGGCGCGCGGGAAGCTAAGC - 3'
上游全长编码序列引物	5' - CCGCCGCGCCGAATTCATGCGCTCGACCAAGGCTCC - 3'
下游全长编码序列引物	5' - GACGCCAGTGAATTCACCTTGCTAGATGAGCGCG - 3'

1.5 植物表达载体的构建

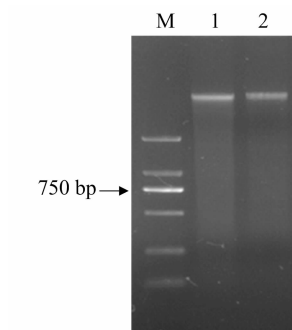
分别用 *Hind*Ⅲ、*Rco*Ⅰ双酶切植物表达载体 pCambia-1391Z。50 μL 酶切反应体系为: 5 μL pCambia-1391Z, 5 μL 10 × M buffer, 1.5 μL *Hind*Ⅲ (10 U/μL), 1.5 μL *Eco*Ⅰ (10 U/μL), 37 μL ddH₂O, 37 °C 完全酶切 16 h。用琼脂糖凝胶电泳检测并切胶回收目的片段, 利用 In-Fusion® HD Cloning Kit (Clontech Code No. 639633) 试剂盒将“1.4”节中经过测序验证正确并回收的 *PEPC* 基因全长编码序列、*PEPC* 基因启动子片段和线性载体 pCambia-1391Z 片段连接, 连接反应体系为: 1 μL *PEPC* 基因扩增回收片段 (约 80 ng/μL), 1 μL *PEPC* 基因启动子扩增回收片段 (约 80 ng/μL), 1 μL pCambia-1391Z 酶切片段, 2 μL 5 × In-Fusion HD Enzyme Premix, 5 μL ddH₂O。取 1 μL 连接产物, 热转化至 *E. coli* Competent Cells HST08 Premium 中, 涂布平板, 37 °C 过夜培养, 挑取阳性克隆、提质粒、测序验证, 所得载体命名为 pCambia-1391Z-*PEPC*。

2 结果与分析

2.1 玉米基因组 DNA 的提取

使用植物基因组 DNA 提取试剂盒提取的玉米基因组 DNA, 由图 2 的 0.8% 琼脂糖凝胶电泳与紫外检测结果看出, $D_{260\text{ nm}}/D_{280\text{ nm}}$ 在 1.8~2.0 之间, 表明模板质量较高, 符合后续试验要求。

2.2 玉米 *C₄* 型 *PEPC* 启动子及其全长编码序列的克隆



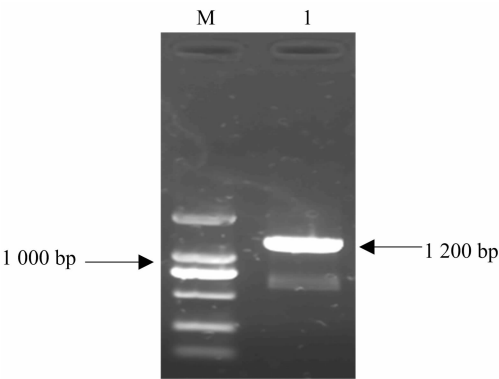
M—DL2000 DNA marker; 1~2—玉米总DNA

图2 总DNA的琼脂糖电泳

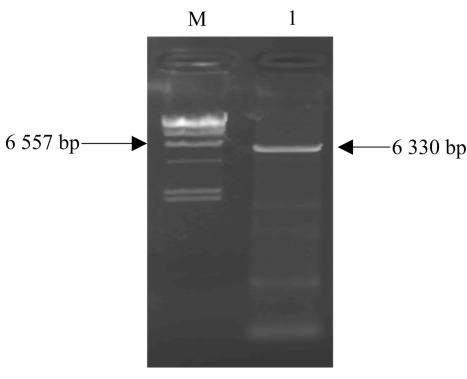
2.2.1 目的片段的获得 以玉米自交系郑 58 叶片 DNA 为模板, 通过 PCR 分别扩增出 2 条大小约为 1 200 bp (图 3)、6 330 bp 的特异性条带 (图 4), 利用琼脂糖回收试剂盒 (DP209) 进行胶回收并测序。

2.2.2 PCR 产物测序结果的比对 通过 BLAST 将测序结果与玉米 B73 相关序列进行比对, *PEPC* 启动子 PCR 扩增产物与玉米 B73 *PEPC* 启动子的比对结果见图 5, 经分析相似度达到 97.70%; *PEPC* 基因全长编码序列 PCR 扩增产物与玉米 B73 *PEPC* 基因的比对结果见图 6, 经分析相似度达到 97.90%。

由以上结果可以看出, 试验用的玉米自交系郑 58 *C₄* 型 *PEPC* 基因及其启动子序列与已注册的玉米 B73 的序列相似度都在 90% 以上, 可以用作后续载体构建。



M—DL2000 DNA marker; 1—玉米叶片DNA扩增结果
图3 *PEPC* 基因启动子的PCR扩增产物



M—λ-*Hind* III digest marker; 1—玉米叶片 DNA 扩增结果
图4 *PEPC* 基因全长编码序列的 PCR 扩增产物

	1	50
B73启动子	TGATTACGCCAAGCTTATCTCATTCTAATTGTGATAACAAATGCATTAG	
郑58启动子	TGATTACGCCAAGCTTATCTCATTCTAATTGTGATAACAAATGCATTAG	
一致序列	TGATTACGCCAAGCTTATCTCATTCTAATTGTGATAACAAATGCATTAG	
	51	100
B73启动子	ACCATAATTCTGTAAATACGTACATTTAAGCACACAGTCTATATTTTAAA	
郑58启动子	ACCATAATTCTTTAAATACGTACATTTAAGCACACAGTCTATATTTTAAA	
一致序列	ACCATAATTCT TAAATACGTACATTTAAGCACACAGTCTATATTTTAAA	
	101	150
B73启动子	ATTCTTCTTTTTGTGTGGATATCCCAACCCAAATCCACCTCTCTCCTCAA	
郑58启动子	ATTCTTCTTTTTGTGTGGATATCCCAACCCAAATCCACCTCTCTCCTCAA	
一致序列	ATTCTTCTTTTTGTGTGGATATCCCAACCCAAATCCACCTCTCTCCTCAA	
	151	200
B73启动子	TCCGTGTATCTTCACCGCTGCCAAGTGCCAACAACACATCGCATCGTGCA	
郑58启动子	TCCGTGTATCTTCACCGCTGCCAAGTGCCAACAACACATCGCATCGTGCA	
一致序列	TCCGTGTATCTTCACCGCTGCCAAGTGCCAACAACACATCGCATCGTGCA	

图5 郑58 *PEPC* 基因启动子与 B73 *PEPC* 基因启动子的序列比对

	1	50
B73 PEPC	ATGGCGTCGACCAAGGCTCCCGGCCCGGCGAGAAGCACCCTCCATCGA	
郑58PEPC	ATGGCGTCGACCAAGGCTCCCGGCCCGGCGAGAAGCACCCTCCATCGA	
一致序列	ATGGCGTCGACCAAGGCTCCCGGCCCGGCGAGAAGCACCCTCCATCGA	
	51	100
B73 PEPC	CGCGCAGCTCCGTCAGCTGGTCCCAGGCAAGGTCTCCGAGGACGACAAGC	
郑58PEPC	CGCGCAGCTCCGTCAGCTGGTCCCAGGCAAGGTCTCCGAGGACGACAAGC	
一致序列	CGCGCAGCTCCGTCAGCTGGTCCCAGGCAAGGTCTCCGAGGACGACAAGC	
	101	150
B73 PEPC	TCATCGAGTACGATGCGCTGCTCGTCGACCGCTTCCTCAACATCCTCCAG	
郑58PEPC	TCATCGAGTACGATGCGCTGCTCGTCGACCGCTTCCTCAACATCCTCCAG	
一致序列	TCATCGAGTACGATGCGCTGCTCGTCGACCGCTTCCTCAACATCCTCCAG	
	151	200
B73 PEPC	GACCTCCACGGGCCCAGCCTTCGCGAATTTGTAACCTAACCACGCGCGG	
郑58PEPC	GACCTCCACGGGCCCAGCCTTCGCGAATTTGTAACCTAACCACGCGCGG	
一致序列	GACCTCCACGGGCCCAGCCTTCGCGAATTTGTAACCTAACCACGCGCGG	

图6 郑58 *PEPC* 全长编码序列与 B73 *PEPC* 基因的序列比对

2.2.3 *PEPC* 基因植物表达载体的构建 采用 In - Fusion 克隆技术,将载体 pCAMBIA - 1391Z 经 *Hind* III/*Rco*R I 双酶切,获得的片段检测结果见图 7,可见片段大小为 11 000 bp。线性化载体 pCAMBIA - 1391Z/*PEPC* 基因全长及其启动子在 In - Fusion HD Enzyme Premix 作用下重组,成功获得重组质粒 pCAMBIA - 1391Z - *PEPC*。将重组质粒热转化至 *E. coli* Competent Cells HST08 Premium 中,挑阳性克隆测序,结果表明,*PEPC* 基因全长及其启动子已经成功插入到载体 pCAMBIA - 1391Z 之中,测序结果与预期结果一致(图 8),表明成功构建了植物表达载体 pCAMBIA - 1391Z - *PEPC*。

3 讨论与结论

植物表达载体的构建在植物基因工程研究中占据重要地位,直接关系到目的基因的表达效果,因此选择方便与快捷的载体构建方法具有重要的意义。目前,人们已经发明了多种表达载体构建的方法,例如传统酶切连接方法、一步克隆法、Gateway 技术等^[19-20]。在构建表达载体过程中,首先需要对表达载体进行选择,常用的植物表达载体有 pBI121、pBI221、pCAMBIA 系列载体(载体的骨架是 pUC18)。根据本试验克隆的*PEPC*基因全长编码序列及其启动子,笔者选择了没有

