

邵铁梅,安胜军,仵陶,等.油菜油体蛋白基因启动子的克隆及在油葵中的功能验证[J].江苏农业科学,2016,44(6):71-73.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.06.017

油菜油体蛋白基因启动子的克隆 及在油葵中的功能验证

邵铁梅,安胜军,仵陶,焦展,李雪,刘培,柴锡庆,高维娟

(河北化工医药职业技术学院/河北省高校生物反应器与蛋白类药物应用技术研发中心,河北石家庄 050026)

摘要:利用 PCR 技术,从油菜(*Brassica campestris*)基因组 DNA 中克隆 20 ku 油体蛋白基因上游 903 bp 的调控序列 NOP,将其与 *GUS* 基因融合构建植物表达载体,利用花粉管通道法转化油葵并进行 PCR 扩增,组织化学染色检测启动子和 *GUS* 基因在油葵基因组中的整合和表达情况。结果表明,NOP 序列 1~903 bp 与报道序列同源性为 95%,包含驱动基因表达的重要元件及驱动基因在种子中特异表达所必需的核苷酸序列;目的片段已整合到油葵基因组中,NOP 具有种子特异性启动子的功能,能够驱动 *GUS* 基因在油葵种子中特异性表达,而在油葵根、茎、叶中均不表达。

关键词:油葵;烟草;种子特异性启动子;*GUS* 染色;油体蛋白基因

中图分类号: Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)06-0071-02

植物油体表达体系是以种子特异性基因为启动子,驱动目的蛋白基因与油体蛋白基因在植物油体中融合表达,获得转基因植物种子,粉碎种子并离心,回收上层油,利用油体亲脂疏水性去除种子中大部分非目标成分,进一步获得纯化的目的蛋白,使蛋白的分离纯化成本得到显著降低^[1]。油用向日葵(*Helianthus annuus* L.)简称油葵,是世界第二大油料作物,也是我国四大油料作物之一^[2],因其产量和含油率高,被认为是构建植物油体表达体系较为理想的植物。另外,油葵是一种耐旱作物,可在盐碱地、干旱地区甚至沙漠等恶劣环境下种植,不仅不会与粮食“争地”,还有利于提高我国山岭薄地、干旱贫瘠地块的利用率,适于大面积推广,有助于缓解我国耕地紧张的压力。目前,成功用于构建植物油体表达体系的种子特异性启动子有油菜(*Brassica campestris*)油体蛋白基因启动子、菜豆蛋白基因启动子、拟南芥油体蛋白基因启动子等。油菜油体蛋白基因启动子驱动一种新型降钙素基因,与芝麻油体蛋白基因在棉花种子和油菜种子中成功融合表达^[3];菜豆蛋白基因启动子驱动拟南芥 18 ku 油体蛋白单链抗体和阿朴脂蛋白 AI 米兰突变体,与融合基因在红花种子中表达^[4];拟南芥油体蛋白基因启动子驱动拟南芥油体蛋白基因和水蛭素基因在油菜种子中融合表达^[5]。驱动外源基因在油葵种子中特异表达的研究比较少。

油菜是我国非常重要的油料作物,油菜籽含油量高达 42%~45%,油菜 20 ku 油体蛋白是 24 ku 油体蛋白含量的

10 倍,贾世荣等成功利用 20 ku 油体蛋白基因在油菜和棉花种子中驱动外源基因的表达^[3]。本试验从油菜基因组 DNA 中克隆油菜 20 ku 油体蛋白基因上游 903 bp 的调控序列 NOP,构建植物表达载体并转化油葵,经检测,该启动子能驱动 *GUS* 基因在油葵种子中的特异表达。这为油葵植物生物反应器的构建提供了优良的备选启动子资源,同时也为油葵的油脂基因工程改良提供了候选启动子。

1 材料与方法

1.1 试验材料、菌株与质粒

植物材料为“精选”油葵品种的恢复系,由河北华丰种业开发有限公司惠赠。二元表达载体 pBI121:*GUS*,由 pCAM-BIA1301 中的 *GUS* 基因替换 pBI121 中的 *GUS* 基因,河北化工医药职业技术学院实验室构建保存;大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 感受态细胞,购自博迈德生物科技有限公司;限制性内切酶、连接酶,购自宝生物工程(大连)有限公司;KOD-plus,购自东洋纺(上海)生物科技有限公司;Taq DNA 聚合酶,购自鼎国生物技术公司。琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒、质粒提取试剂盒,购自天根生物科技(北京)有限公司;卡那霉素(kanamycin),购自 Roche 公司。

1.2 油菜基因组的提取

采用 SDS 法^[6]提取油菜基因组。

1.3 PCR 扩增和植物表达载体 pNOP:*GUS* 的构建

依据 GenBank 发表的油菜 20 ku 油体蛋白基因启动子(序列号:AF134411)设计上下游引物,引物为:NOP F:5'-CCCAAGCTTTTCAACGTGCTCGGATCATGACG-3';NOP R:5'-CGC-CGATCCGAATTGAGAGAGATCGAAGAG-3'(下划线为酶切位点);在上下游引物上分别引入 *Hind*Ⅲ和 *Bam*H I 酶切位点,以油菜品种青油 14 的基因组 DNA 为模板,扩增油菜油体蛋白基因启动子;PCR 扩增产物经限制性内切酶 *Hind*Ⅲ和 *Bam*H I 酶处理,插入 pBI121:*GUS* 的 *Hind*Ⅲ位点和 *Bam*H I 位点之间,获得植物表达载体 pNOP:*GUS*;对 2 个阳

收稿日期:2015-12-23

基金项目:河北省高等学校科学技术研究重点(编号:ZH2011208);

河北省人力资源和社会保障厅 2011 年度河北省人才工程培养(编号:35);河北省高等学校科学技术研究重点(编号:ZD2010216)。

作者简介:邵铁梅(1974—),女,河北徐水人,博士,副教授,主要从事植物生物反应器生产蛋白类药物研究。Tel:(0311)85110321;E-mail:836311038@qq.com。

通信作者:高维娟,博士,教授,主要从事植物生物反应器生产蛋白类药物研究。Tel:(0311)83938058;E-mail:gwj6088@163.com。

性克隆由上海生物工程有限公司进行测序验证。

1.4 油菜的转化

参照刘芳等的方法^[7],采用花粉管通道法转化精选油菜恢复系。

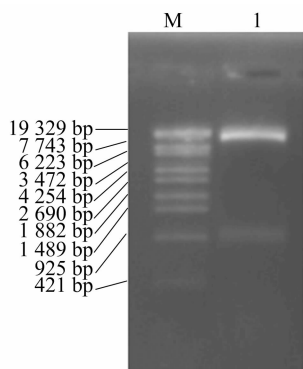
1.5 转基因油菜的 PCR 检测与组织化学分析

以 SDS 法小量提取转基因油菜 T₁ 代幼苗基因组 DNA 为模板,NOP F、NOP R 为引物进行 PCR 检测,鉴定获得转化植株;依据 Rueb 等的方法^[8],对转化植株的根、茎、叶、种子进行 GUS 检测,以验证 NOP 启动子的功能。

2 结果与分析

2.1 启动子片段的克隆、植物表达载体 pNOP:GUS 的构建及启动子序列分析

试验结果表明,以油菜青油 14 品种基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增,经琼脂糖凝胶电泳检测发现,扩增产物有 1 条约 0.9 kb 的扩增条带,将该片段插入 pBI121:GUS 的 HindⅢ 和 BamHⅠ 位点之间,可获得植物表达载体 pNOP:GUS,经 HindⅢ 和 BamHⅠ 双酶切鉴定,获得预期大小 0.9 kb 的目的片段(图 1),这说明该植物表达载体构建正确。将 NOP 核苷酸序列在 NCBI 中运用 Blast 进行比对,结果显示,NOP 与油菜油体蛋白基因的启动子序列同源性的 95%,这说明 NOP 是油菜 20 ku 油体蛋白基因的启动子。NOP 核苷酸序列经 Place 数据库查询分析,结果表明,此序列包含 TATA-box,可能序列为 ATATAT,位于 817~822 位,主要功能是保证转录得以精确起始;包含 ABRES 元件,可能序列为 ACACGTGGC,位于 758~766 位,在生长组织中介导脱落酸(ABA)应答,是种子成熟阶段不可缺少的顺式调控元件之一;含有 1 个 G-box,可能序列为 TGACGTGG,位于 536~543 位,这在种子特异性启动子中普遍存在,高度保守,是光调控的应答元件,对种子特异基因的表达在时间和空间上起到重要的顺式调节作用,发生突变的种子特异性启动子将丧失大部分活性^[9];包含 2 个 CAAT-box,可能序列为 CAAAT,位于 669~673、359~363 位,存在比较广泛,与基因表达的种子特异性和活性相关,主要起数量调节作用^[10-11];包含 1 个 I-box,序列为 TTTC AAA,位于 666~672 位。



M—DNA 分子; 1—HindⅢ和BamHⅠ双酶切植物表达载体 pNOP:GUS

图1 植物表达载体pNOP:GUS 酶切鉴定结果

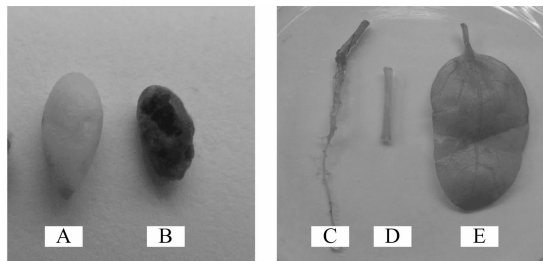
2.2 转基因油菜的获得

经花粉管通道法转化精选油菜恢复系,将收获的种子进行种植,每株取幼嫩真叶提取基因组,PCR 检测,结果表明,

扩增产物得到约 0.9 kb 的特异条带,与以 pNOP:GUS 为模板的阳性对照扩增结果一致,这初步说明目的片段已整合到油菜基因组 DNA 中。

2.3 转基因油菜的 GUS 检测

为验证所克隆启动子的功能,取转基因油菜植株不同部位的组织进行 GUS 检测,结果表明,启动子驱动下的基因不能在油菜根、茎和叶中表达,只能在油菜种子中表达(图 2)。这说明油菜油体蛋白基因启动子可以驱动外源基因在油菜种子中特异表达。



A—阴性对照,非转基因油菜种子;B—转基因油菜种子;C—转基因油菜根;D—转基因油菜茎;E—转基因油菜叶
图2 转pNOP:GUS基因油菜不同组织的GUS染色结果

3 结论与讨论

油菜籽粒含油量高,20 ku 油体蛋白是 24 ku 油体蛋白含量的 10 倍,因此,20 ku 油体蛋白基因的启动子被推测是一个较强的种子特异性启动子,朱亚兰等克隆了该基因并构建了植物表达载体^[12]。本试验从青油 14 中克隆了油菜油体蛋白启动子,包含基因表达的重要特征元件及 TATA-box、ABRES、G-box、I-box、CAAT-box 等种子特异表达所必需的核苷酸序列,与 GenBank 中序列号为 AF134411 的油菜 20 ku 油体蛋白基因启动子同源性的 95%,与刘昱辉等克隆到的油菜油体蛋白基因启动子^[13]同源性的 100%。在此基础上,构建油菜油体蛋白启动子与 GUS 基因融合表达载体,转化油菜,经组织化学染色,结果表明,该启动子可以驱动 GUS 基因在油菜种子中的特异表达,这为油菜利用转基因技术构建生物反应器和油脂基因工程改良奠定了基础。

本研究选用花粉管通道法转化油菜,该方法有效地利用了自然生殖过程,可直接得到转化种子,无需进行繁琐的组织培养。但是,花粉管通道法也有缺点,由于将基因导入受体基因组会引起性状的大量分离,需要经过多代的自交纯化,才能得到目标性状稳定的纯合后代^[14]。本试验主要目的是为研究油菜油体蛋白基因启动子能否驱动外源基因在油菜种子中的特异性表达,采用花粉管通道转化是一种较快较好的选择,且也获得了比较理想的试验结果。

参考文献:

- [1] Ling H. Oleosin fusion expression systems for the production of recombinant proteins[J]. *Biologia*, 2007, 62(2): 119-123.
- [2] 万博,彭兵,宋殿秀,等. 油用向日葵 F64 的选育及配套应用技术[J]. *辽宁农业科学*, 2014(3): 98-99.
- [3] 贾士荣,刘煜辉. 一种新型鲑鱼降钙素类似物及其在植物油体中表达的方法:中国, CN1424399A[P]. 2006-09-13.
- [4] Nykiforuk L C, Yin S. Expression and recovery of biologically active

王 蕾, 罗才林, 徐德林, 等. 千里光脂肪酸脱氢酶(*D6D*)的保守基序(CSM)与功能结构域分析[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(6): 73–77.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.06.018

千里光脂肪酸脱氢酶(*D6D*)的保守基序(CSM)与功能结构域分析

王 蕾, 罗才林, 徐德林, 钱 刚

(遵义医学院医学细胞生物学与遗传学教研室, 贵州遵义 563000)

摘要: $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶($\Delta 6$ desaturase, *D6D*)是不饱和脂肪酸合成途径中的限速酶。以高等植物千里光为材料, 通过构建全长 cDNA 文库克隆得到脂肪酸脱氢酶基因(*D6D*), 明确了 *D6D* 基因的氨基酸保守基元序列(conserved sequence motif, CSM)对蛋白质功能结构域的决定作用。结果显示, 千里光 *D6D* 基因由 466 个氨基酸残基组成; 预测蛋白分子量为 53.40 ku, 理论等电点为 8.48; 进化树和序列比对结果提示 3 个富含 His 的保守基元序列(His I-片段、His II-片段、His III-片段)在不同物种中表现出高度保守性; 三维结构预测结果表明, *D6D* 基因的保守结构域以及一个类似于细胞色素(cytochrome, cyt) b_5 的血红素结合区是形成底物结合部位和酶催化活性中心的结构基础。

关键词: 千里光; 脂肪酸脱氢酶(*D6D* 基因); 保守基元序列(CSM); 三维结构

中图分类号: S567.23+9.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)06-0073-05

脂肪酸脱氢酶是多不饱和脂肪酸合成途径中的关键酶, 分为可溶性脱氢酶和膜结合脱氢酶, 其中膜结合脱氢酶又可分为羧基定向的脂肪酸脱氢酶(“frond-end”脱氢酶)和甲基定向的脂肪酸脱氢酶^[1]。脂肪酸脱氢酶结构上都有 3 个保守的组氨酸富集区, 除此之外羧基定向的脱氢酶 N 端还有 1 个类似于细胞色素 b_5 Cyt b_5 的血红素结合区(HPGG)^[2-3]。

$\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶(*D6D*)属于羧基定向的膜结合脱氢酶, 它以 NADH、细胞色素 b_5 氧化还原酶和细胞色素 b_5 作为

电子供体催化甘油酯中的脂肪酸脱氢^[4]。 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶具有催化亚油酸、 α -亚麻酸分别脱氢形成 γ 亚麻酸和十八碳四烯酸的功能^[5]。

千里光(*Senecio scandens* Buch. - Ham. ex D. DO)为菊科(Compositae), 属多年生草本植物, 它是中国传统中药之一, 具有清热解毒、明目、杀虫、保肝、凉血、驱风除湿、抗菌、抗钩端螺旋体等诸多功效^[6-7]。迄今为止, 已经从蓝细菌^[8]、黑茶藨子^[9]、深黄被孢菌^[10]、高山被孢菌^[11]、月见草^[12]、假狼紫草^[13]、雅致枝霉^[14]、卷枝毛霉^[15]、少根根霉^[16]中克隆到 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶。尽管 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因在微生物和植物等不同物种中已有报道^[1], 目前, 关于 *D6D* 基因高级结构和功能关系的研究尚少, 该基因在菊科植物的相关研究也未见报道。本研究率先开展药用植物千里光 $\Delta 6$ -脂肪酸脱氢酶基因的功能研究, 分析了该蛋白理化性质和保守基序对功能结构域的决定作用, 为深入了解高等植物多不饱和脂肪酸(PUFAs)合成的次生代谢途径和蛋白质组学研究提供依据。

收稿日期: 2015-11-03

基金项目: 国家自然科学基金(31560087); 贵州省优秀科技教育人才省长基金(编号: 黔省专合字 2008-61 号)。

作者简介: 王 蕾(1991—), 女, 黑龙江五大连池人, 硕士研究生, 主要从事药用植物分子遗传学研究。E-mail: 1807840035@qq.com。

通信作者: 钱 刚, 博士, 教授, 主要从事药用植物分子遗传学研究。E-mail: pengjiaqiong@163.com。

recombinant apolipoprotein AIMilano from transgenic safflower (*Carthamus tinctorius*) seeds[J]. Plant Biotechnology Journal, 2011, 9(2): 250–263.

[5] Parmenter D L, Boothe J G, van Rooijen G J, et al. Production of biologically active hirudin in plant seeds using oleosin partitioning[J]. Plant Molecular Biology, 1995, 29(6): 1167–1180.

[6] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京: 科学出版社, 2009: 437–438.

[7] 刘 芳, 袁 鹰, 高树仁, 等. 外源 DNA 花粉管通道途径导入机理研究进展[J]. 玉米科学, 2007, 15(4): 59–62.

[8] Rueb S, Hensgens L A M. Improved histochemical staining for β -D-glucuronidase activity in monotylenous plants[J]. Rice Genet Newsletter, 1989, 6: 168–169.

[9] Chandrasekharan M B, Bishop K J, Hall T C. Module-specific regulation of the β -phaseolin promoter during embryogenesis[J]. Plant

Journal, 2003, 33(5): 853–866.

[10] Wu C, Washida H, Onodera Y, et al. Quantitative nature of the prolamins-box, ACGT and AACA motifs in a rice glutelin gene promoter: minimal cis-element requirements for endosperm-specific gene expression[J]. The Plant Journal, 2000, 23(3): 415–421.

[11] Forde B G, Heyworth A, Pywell J, et al. Nucleotide sequence of a B1 hordein gene and the identification of possible upstream regulatory elements in endosperm storage protein genes from barley, wheat and maize[J]. Nucleic Acids Research, 1985, 13(20): 7327–7339.

[12] 朱亚兰, 姚伟一, 窦建华, 等. 种子特异表达启动子的克隆分析及其植物表达载体的构建[J]. 华北农学报, 2007, 22(2): 6–10.

[13] 刘昱辉. 植物油体表达体系的建立及 Profilin2 维管束特异表达启动子的区段缺失分析[D]. 北京: 中国农业科学院, 2001.

[14] 王永芳, 张 军, 崔润丽, 等. 利用花粉管通道转化谷子 DNA 基因获得转基因小麦[J]. 华北农学报, 2009, 24(2): 17–21.