

蒲 鹏,谢晓东,白子彧,等. 禾谷类作物高效启动子分析专用载体 p14781pro-GUS 的构建[J]. 江苏农业科学,2016,44(8):60-62.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.08.015

禾谷类作物高效启动子分析专用载体 p14781pro-GUS 的构建

蒲 鹏,谢晓东,白子彧,郭 雨,古同华,李 明,王俊斌,孙守钧,丁 博

(天津农学院农学与资源环境学院/天津-布里斯托环境变化对农作物影响研究中心,天津 300384)

摘要:启动子决定了基因的组织器官表达特异性及其在环境、内源激素作用下的诱导型表达,因此对启动子的分析有利于解析基因的表达模式及功能。对玉米 Ubiquitin 启动子控制的 *nptII* 抗性基因添加适宜的酶切位点,连接到 pGWB433 双元载体中,构建目标表达载体 p14781pro-GUS。该载体具有适于在禾谷类作物中筛选转基因植株的 Ubiquitin-nptII 组件、启动子高效克隆的 Gateway 组件,且整合进载体的启动子可控制报告基因 *GUS* 的表达,以确定启动子的转录调控模式,因而能够更加深入便捷地研究禾谷类作物重要性状相关基因的启动子,推动针对重要性状的分子遗传改良。

关键词:启动子;载体构建;p14781pro-GUS;GUS 蛋白;限制性内切酶

中图分类号: Q782 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)08-0060-03

目前,应用于双子叶转基因体系中启动子分析的载体非常丰富,如 pGWB 系列载体,研究也已非常完备。而单子叶植物转基因体系的研究尽管已取得很好进展,但适于单子叶特别是禾谷类作物启动子研究的载体却非常有限。

在植物表达载体中广泛应用的启动子是组成型启动子,例如,绝大多数双子叶转基因植物均使用 CaMV 35S 启动子,

禾谷类转基因植物主要使用来自玉米的 Ubiquitin 启动子^[1]和来自水稻的 Actin I 启动子^[2]。在这些组成型表达启动子的控制下,外源基因可在转基因植物的所有部位和所有发育阶段表达^[3]。

Ubiquitin 启动子是一个在禾谷类作物中有较强表达的启动子,Ubiquitin 启动子来自玉米多聚泛素蛋白基因 (maize polyubi gene),它实际上包括 Ubiquitin 基因的启动子区、5'非翻译区和第一内含子。研究表明,Ubiquitin 启动子在禾谷类作物中能组成型过量表达,表达效率高于 35 S 启动子^[4]。

GUS 的基因 *gusA* (又称 *uidA*) 来自大肠杆菌菌株 K12。Novel 等研究并克隆了含有 *uidA* 基因的 DNA 片段,对其调控部分进行了分析^[5-7]。Jefferson 等进行了 *uidA* 基因的序列分析,该基因编码区长 1 809 bp,并由此发展了 *uidA* 基因作为一个基因融合标记,使其得到了更广泛的应用^[8]。该酶与 5-溴-4-氯-3-吡啶基- β -D-葡萄糖苷酸环己胺盐 (X-

收稿日期:2015-09-18

基金项目:国家及天津市大学生创新创业训练计划(编号:201410061004、201410061066、201510061047);天津市高校创新团队培养计划(编号:TD12-5017);天津市千人计划项目“高粱抗性生理及遗传机理的研究”。

作者简介:蒲 鹏(1994—),男,甘肃陇南人,主要从事生物化学与分子生物学研究。E-mail:1414338588@qq.com。

通信作者:丁 博,硕士,实验师,主要从事作物遗传育种工作。E-mail:yuancircle@126.com。

[10] Yun L, Bi H X, Gao L B, et al. Soil moisture and soil nutrient content in walnut crop intercropping systems in the Loess Plateau of China[J]. Arid Land Research and management, 2012, 26(4): 260-266.

[11] 周国英,宋光桃,李 河. 油茶病虫害防治现状及应对措施[J]. 中南林业科技大学学报,2007(6):179-182.

[12] 刘石泉,胡治远,赵运林. 用 DGGE 法初步解析茯砖茶渥堆发酵过程中真菌群落的结构[J]. 湖南农业大学学报:自然科学版,2014(5):494-500,505.

[13] 代金霞,赵 辉. 宁夏荒漠草原固沙植物群落土壤微生物数量及土壤酶活性研究[J]. 江苏农业科学,2011,39(4):460-462.

[14] 陈永忠,王玉娟,王湘南,等. 间种对油茶林地土壤理化性质及幼林生长量的影响[J]. 南京林业大学学报:自然科学版,2011(5):117-120.

[15] 王 瑞,陈永忠,王玉娟,等. 油茶林地不同间种处理土壤养分及生长量的主成分分析[J]. 中国农学通报,2011(4):30-35.

[16] 张向前,黄国勤,卞新民,等. 间作对玉米品质、产量及土壤微生物数量和酶活性的影响[J]. 生态学报,2012,32(22):7082-7090.

[17] 王玉娟,陈永忠,王 瑞,等. 覆草间种对油茶林土壤养分及生长量影响的主成分分析[J]. 中南林业科技大学学报,2010(6):43-49.

[18] 王玉娟,陈永忠,等. 稻草覆盖对油茶幼林林地土壤温度及新梢的影响[J]. 经济林研究,2009(2):49-52.

[19] 徐华勤,肖润林,宋同清,等. 稻草覆盖与间作三叶草对丘陵茶园土壤微生物群落功能的影响[J]. 生物多样性,2008(2):166-174.

[20] 贾倩民,陈彦云,杨 阳,等. 不同人工草地对干旱区弃耕地土壤理化性质及微生物数量的影响[J]. 水土保持学报,2014(1):178-182,220.

[21] 邵英男,刘延坤,孙清芳,等. 小兴安岭不同林型土壤微生物多样性及其与土壤理化特征关系研究[J]. 中国林副特产,2013(4):17-19.

Gluc) 底物发生蓝色沉淀反应,检测容易、高效、方法多样,且灵敏度高于 GFP 检测^[9]。GUS 基因作为基因融合的标志,最初应用于大肠杆菌。后来发现几乎所有的高等植物,特别是已研究的烟草、矮牵牛及拟南芥等,都很少或几乎没有 GUS 活性^[10],因此 GUS 基因被广泛用作转基因植物中的报告基因。

相对于传统的使用限制性内切酶构建表达载体,由 Invitrogen 公司开发的 Gateway 克隆技术得到广大研究者的认同和青睐。该技术基于 K 噬菌体位点特异性重组原理^[11],其优点在于可以在不同的克隆载体之间实现 DNA 片段的转移,并保持基因定位和阅读框架不发生改变。对于研究者来说,这项技术是进行载体构建的入门技术,简便易行。

本研究拟通过构建表达载体 p14781pro-GUS,建立适用于禾谷类作物高效启动子功能分析的载体系统和评价体系。应用本载体,可通过 Gateway 克隆技术高效克隆目标启动子序列,由于 Ubiquitin 启动子和 *nptII* 抗性基因的结合,易于对禾谷类作物转基因株系进行筛选鉴定。此外,利用 GUS 报告基因的表达水平来衡量启动子的功能,也方便了启动子功能的鉴定。对禾谷类作物重要性状相关基因进行启动子研究,对推动针对重要性状的分子遗传改良有重要的理论和应用意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

质粒 pGWB433、pEASY-ubi-*npt II* 均为笔者实验室保存,ubi 代表 Ubiquitin 启动子序列,*npt II* 代表新霉素磷酸转移酶基因(Neomycin Phosphotransferase II, NPT II)。

大肠杆菌菌株(*E. coli*) DH5 α 、DB3.1 感受态细胞购自天根生化科技(北京)有限公司。

1.2 试剂和生物学软件

Phusion 超保真 DNA 聚合酶和限制性内切酶购自 New England Biolabs 公司,pGEM-T Easy 载体购自普洛麦格(北京)生物技术有限公司。琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司,质粒提取试剂盒和特异性引物购自生工生物工程(上海)股份有限公司,生物信息学研究所用软件为 Geneious 8、Vector NTI Advanced 11。

1.3 方法

1.3.1 pGUN 载体的构建 首先合成 2 条寡核苷酸序列(*Asc* I - U - *npt II* F: 5' - TATGCGCGCCAGTGCAGCGTGACCCGGTC - 3'; *Sac* II - U - *npt II* R: 5' - AAGCCGCGGTGCGATCT AGTAACATAGATGACACCGC - 3'),利用 PCR 从克隆载体 pEASY-ubi-*npt II* 上扩增出目的片段 ubi + *npt II*,且两端具有 *Asc* I、*Sac* II 酶切位点。

PCR 扩增反应体积为 20 μ L,反应体系中含 1 \times buffer, 200 μ mol/L dNTPs, 0.4 μ mol/L primer, 0.4 U phusion DNA polymerase, 100 ng 质粒 DNA, 进行 PCR 扩增,回收 PCR 产物,电泳检测。

进行 TA 克隆反应,将回收产物连接到载体 pGEM-T easy 上,热激转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。挑取阳性克隆,摇菌培养,用质粒提取试剂盒收集质粒 pGUN。

1.3.2 ubi-*npt II* 片段与 pGWB433 载体的组装 将 pG-

WB433 和 pGUN 进行双酶切反应。酶切先用 *Sac* II 在 37 $^{\circ}$ C 反应 30 min,再加入 1 μ L *Asc* I 37 $^{\circ}$ C 反应 40 min,电泳检测。用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收,产物通过 T₄ DNA 连接酶连接,连接体系于 25 $^{\circ}$ C 反应 1 h 后,转化大肠杆菌 DB3.1 感受态细胞。菌落 PCR 验证转化反应产物,挑取验证正确的克隆进行测序(北京六合华大基因科技股份有限公司),具体的载体构建思路见图 1。

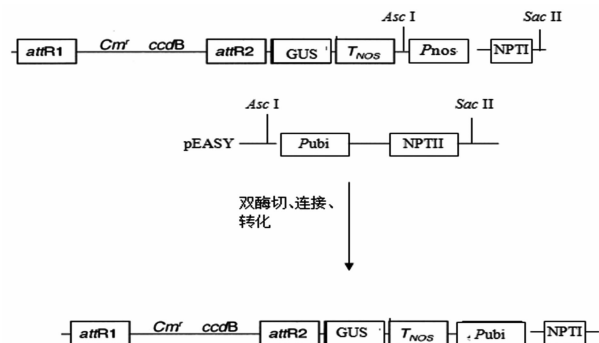


图1 载体构建技术路线

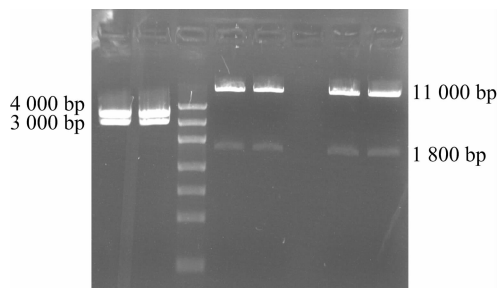
2 结果与分析

2.1 pGUN 载体的构建

为了进行双酶切反应,首先设计合成了包含 *Asc* I、*Sac* II 位点的 1 对引物,得到了 pGUN 载体。

2.2 p14781pro-GUS 载体构建

Asc I 对质粒 pGWB433 和 pGUN 进行单酶切,*Sac* II 对酶切之后的片段再次酶切,结果见图 2。取 *Sac* II/*Asc* I 酶切回收后的片段,按照大约 1:1 的分子比在 T₄ DNA 连接酶催化下进行定向重组,菌落 PCR 结果见图 3。把菌落 PCR 筛选出的质粒进行测序,做进一步验证,测序结果正确(测序图未显示),p14781pro-GUS 载体见图 4。



点样顺序为: pGUN(2道)、marker、pGWB433(2道)

图2 酶切电泳结果

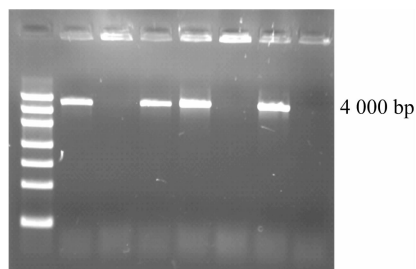


图3 菌落 PCR 结果

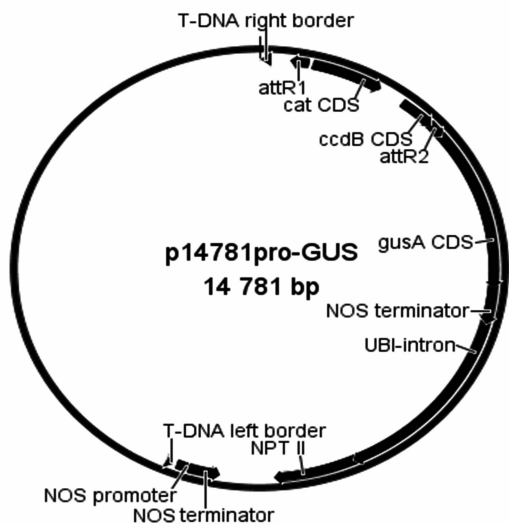


图4 p14781pro-GUS载体

3 讨论

启动子决定了基因的表达模式,包括在组织器官的表达特异性和在诱导物作用下的诱导型表达,因此对启动子功能分析有利于解析基因的生物学功能。外源基因在受体植物内持续、高效地表达不但造成能量浪费,往往还会引起植物的形态和生长发育的改变。为了使外源基因在植物体内有效发挥作用,同时又可减少对植物的不利影响,目前人们对诱导型及特异表达型启动子的研究和应用越来越重视,而作物与粮食安全和人类生活质量密切相关,对禾谷类作物启动子的研究与特异性启动子的筛选越来越重要。

本研究选用 Ubiquitin 启动子调控抗性基因的表达,与已有的表达载体多采用 CaMV 35S 启动子相比,抗性基因的表达水平可明显提高^[4],对于遗传转化效率普遍较低的禾谷类作物,能更有效地筛选出阳性植株,辅助 PCR 进行筛选阳性植株会提高筛选效率^[12]。

该载体对启动子分析的元件为 *gusA* 基因,与此前笔者实验室构建的 pUKGF 载体同为研究禾谷类作物启动子功能的表达载体^[13]。在应用中将 2 个载体进行比较可知:pUKGF 可对活体植物进行连续活体观察,观测手段简单,但对具有自发荧光的组织就无法准确进行此类分析。Jordan 观测到在 1 株转基因小麦的不同胚中 GFP 强度有明显差异^[14]; p14781pro-GUS 则需要经过 X-Gluc 组织化学染色,步骤较荧光观测繁琐,且为破坏性试验,植物不可继续生长发育,但对 GUS 酶的放大作用与植物自身无 GUS 活性,检测效果灵敏,肉眼即可观测结果,因此应用范围更广泛^[9]。在观测根系等组织特异表达的启动子效率时可采用 p14781pro-GUS 载体。笔者所在研究组已经成功采取 GUS 染色评价表达载体 pKIGW 在拟南芥中的应用效果^[15]。

近年来,农杆菌介导转化禾谷类作物的成功,为进行基因功能分析奠定了基础^[16-17]。本研究中构建的 pUKGS 载体可以利用 Gateway 技术克隆目的片段,分析启动子功能的载体的核心元件为 *attR1*-*Cm^r*-*ccdB*-*attR2*-*tag*-*terminator*,该表达载体即可用于下游植物遗传工程中的“后基因组研究”^[18],大大提高了克隆效率,可作为禾谷类作物遗传转化中

的首选。

该载体系统所选择的质粒重组技术、报告基因、抗性标记基因,均是国际、国内植物转基因领域应用最多的元件,尤其是由 Ubiquitin 启动子调控抗性标记基因,能在禾谷类作物的阳性植株筛选上发挥独特作用。

参考文献:

- [1] 王昌涛,梁 粤,王 欢,等. 玉米 Ubiquitin 启动子的克隆及功能鉴定[J]. 沈阳农业大学学报,2006,37(1):9-12.
- [2] McElroy D, Zhang W, Cao J, et al. Isolation of an efficient actin promoter for use in rice transformation[J]. The Plant Cell, 1990, 2(2): 163-171.
- [3] 侯丙凯,夏光敏,陈正华. 植物基因工程表达载体的改进和优化策略[J]. 遗传,2001,23(5):492-497.
- [4] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular cloning[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [5] Novel G, Didier F, Fichet M L, Stoeber F. Inducibility of β -glucuronidase in wild-type and hexuronate-negative mutants of *Escherichia coli* K-12[J]. Journal of Bacteriology, 1974, 120(1):89-95.
- [6] Novel M, Novel G. Regulation of β -glucuronidase synthesis in *Escherichia coli* K-12: constitutive mutants specifically derepressed for *uidA* expression[J]. Journal of Bacteriology, 1976, 127(1):406-417.
- [7] Blanco C, Ritzenthaler P, Mata-Gilsinger M. Nucleotide sequence of a regulatory region of the *uidA* gene in *Escherichia coli* K12[J]. Molecular and General Genetics, 1985, 199(1):101-105.
- [8] Jefferson R A, Burgess S M, Hirsh D. β -glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene-fusion marker[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1986, 83(22):8447-8451.
- [9] 袁思玮,黄锐之,罗红兵. GUS 报告基因在植物功能基因研究中的应用[J]. 作物研究,2008,22(5):310-314.
- [10] Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants[J]. The EMBO Journal, 1987, 6(13):3901.
- [11] Landy A. Dynamic, structural, and regulatory aspects of lambda phage site-specific recombination[J]. Annual Review of Biochemistry, 1989, 58(1):913-941.
- [12] Yau Y Y, Stewart C N. Less is more: strategies to remove marker genes from transgenic plants[J]. BMC Biotechnology, 2013, 13(1):1.
- [13] 丁 博,杨文丽,李 明,等. 用于单子叶植物启动子功能分析的 pUKGF 载体构建[J]. 河南农业科学,2014,43(2):15-18.
- [14] Jordan M C. Green fluorescent protein as a visual marker for wheat transformation[J]. Plant Cell Reports, 2000, 19(11):1069-1075.
- [15] 丁 博,钟思林,王俊斌,等. 化学诱导表达载体 pKIGW 在拟南芥中的应用[J]. 贵州农业科学,2013,41(10):11-13.
- [16] 张莹莹,吴连成,张赛赛,等. 农杆菌介导的玉米愈伤组织遗传转化影响因子和植株再生条件[J]. 江苏农业科学,2014,42(11):51-54.
- [17] 刘 青,李朝炜,朱 昀,等. 抗逆转基因旱稻转化体系的优化[J]. 江苏农业科学,2015,43(11):42-45.
- [18] Nakagawa T, Ishiguro S, Kimura T. Gateway vectors for plant transformation[J]. Plant Biotechnology, 2009, 26(3):275-284.