

匡琛,朱晓义,张亮,等. 含多酶切位点融合黄色荧光蛋白的植物通用载体的构建与应用[J]. 江苏农业科学,2019,47(16):56-62. doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2019.16.012

含多酶切位点融合黄色荧光蛋白的植物通用载体的构建与应用

匡琛^{1,2},朱晓义¹,张亮¹,范世航¹,华玮¹

(1. 中国农业科学院油料作物研究所/农业农村部油料作物生物学与遗传育种重点实验室,湖北武汉 430062;

2. 中国农业科学院研究生院,北京 100081)

摘要:以植物表达载体 pCAMBIA3301 为基本骨架,以黄色荧光蛋白(yellow fluorescent protein,简称 YFP)为标签蛋白构建可融合目标蛋白的表达载体,并包含可用于外源基因插入的单一识别位点的核酸酶酶切位点(*Spe* I、*Xba* I、*Sma* I、*Bam*H I)。为了验证载体的实用性,将构建完成的载体转化到感受态 GV3101 农杆菌上,进行菌落 PCR 鉴定,再分别瞬时转化烟草下表皮和稳定转化拟南芥。激光共聚焦显微镜观察结果显示,在阳性转基因植株上均观察到荧光,在阴性对照上没有观察到荧光,表明 YFP 标签蛋白在转基因受体细胞中能够正常表达。pCAMBIA3301::YFP 载体的成功构建为植物蛋白亚细胞定位及过表达转基因植株等相关领域的研究提供了稳定可靠的通用型载体资源。

关键词:多酶切位点;黄色荧光蛋白;通用载体;激光共聚焦;植物基因表征工具

中图分类号: S188 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2019)16-0056-07

植物表达载体是高等植物基因功能研究中不可或缺的工具,

在后基因组时代具有广泛的应用^[1]。植物表达载体可以用来研究启动子元件、蛋白质互作、亚细胞定位以及组成型表达。植物二元表达载体的发展和不同农杆菌菌株的选育,使得农杆菌介导的植物转化系统得到广泛应用^[2]。早期的植物二元表达载体主要是由复制起始位点、2 个 T-DNA 边界重复序列之间的部分、大肠杆菌筛选标记、目的基因与启动子元件及植物筛选标记组成的。植物表达载体的构建方法有传统的酶切连接法^[3]和 T-DNA 插入法^[4]。随着现代生物技术的发展,出现了多种新的技术,如 Gateway 法^[5]、不依赖于

收稿日期:2018-04-04

基金项目:湖北省自然科学基金(编号:2015CFB348);国家“863”计划(编号:2013AA102602)。

作者简介:匡琛(1994—),男,湖南益阳人,硕士研究生,研究方向为功能基因组学与蛋白质组学。E-mail: junyuankuang@icloud.com。

通信作者:华玮,博士,研究员,主要从事油菜功能基因组学研究。E-mail: huawei@oilcrops.cn。

参考文献:

[1] Altshuler D, Pollara V J, Cowles C R, et al. An SNP map of the human genome generated by reduced representation shotgun sequencing[J]. *Nature*, 2000, 407(6803): 513-516.

[2] 水科. 鲤鱼全基因组序列图谱绘制完成[N]. *中国渔业报*, 2014-10-13(A03).

[3] 陈小明, 李佳凯, 王志勇, 等. 基于简化基因组测序的大黄鱼耐高温性状全基因组关联分析[J]. *水生生物学报*, 2017, 41(4): 735-740.

[4] 刘峰. 半滑舌鳎经济性状的遗传评估及基因组选择初步研究[D]. 上海: 上海海洋大学, 2015: 37-40.

[5] Davidson W S, Koop B F. ICSASG international collaboration. Sequencing the Atlantic salmon (*Salmo salar*) genome the old fashioned way[R]. *Plant & Animal Genomes XIX Conference*, 2011, San Diego, CA, USA: 33-41.

[6] Liu J. Strategies for efficient assembly and annotation of the catfish whole genome sequence [R]. *Plant & Animal Genomes XIX Conference*, 2011, San Diego, CA, USA: 49-53.

[7] 张晓军. 中国甲壳动物学会第十一届年会暨学术研讨会论文集摘要集[C]//中国海洋湖沼学会甲壳动物学分会, 中国动物学会甲壳动物学分会, 2011: 18-19.

[8] Zhang G F, Guo X M, Li L, et al. The oyster genome project: an update[C]// Ninth International Marine Biotechnology Conference. Qingdao, China, 2010: 371-379.

[9] Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows-Wheeler transform [J]. *Bioinformatics*, 2009, 25(14): 1754-1760.

[10] McKenna A, Hanna M, Banks E, et al. The genome analysis toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data [J]. *Genome Research*, 2010, 20(9): 1297-1303.

[11] Wang K, Li M, Hakonarson H. ANNOVAR: functional annotation of genetic variants from high-throughput sequencing data [J]. *Nucleic Acids Research*, 2010, 38(16): e164.

[12] 莫惠栋, 顾世梁. 基因组长度的估计方法 [J]. *科学通报*, 2000, 45(13): 1414-1419.

[13] 尹云厚. 中药复方制剂对缺氧大鼠微管蛋白和驱动蛋白表达影响的研究 [D]. 长春: 中国人民解放军军需大学, 2003: 156-158.

[14] Hirokawa N, Takemura R. Kinesin superfamily proteins and their various functions and dynamics [J]. *Experimental Cell Research*, 2004, 301(1): 50-59.

[15] 薛继鹏. 三聚氰胺、氧化鱼油和脂肪对瓦氏黄颡鱼生长和体色的影响 [D]. 青岛: 中国海洋大学, 2011: 125-128.

基因序列和连接反应的不依赖序列和连接的克隆方法(sequence and ligation independent cloning, 简称 SLIC)^[6]、重组融合 PCR 技术^[7]、一步克隆法^[8]、基于竞争性连接原理构建小片段基因表达载体技术^[9]、无缝连接克隆 In - Fusion 技术^[10]和快速克隆 Golden Gate 拼接法等^[11]。综合比较上述几种载体构建的生物技术,基于 SLIC 原理的一步克隆方法具有操作简单、效率高、经济实惠及适用范围广等优点,被广泛应用于植物表达载体的构建中。

pCambia 系列双元表达载体是进行植物遗传转化最常用的表达载体之一,大多数植物功能基因组学研究所用的表达载体都以其为骨架^[12-13]。植物表达骨架载体 pCambia3301 所使用的报告基因是细菌的 β - 葡萄糖苷酶基因(β - glucuronidase, 简称 GUS)。虽然 GUS 蛋白相对较易检测,但是检测底物成本高,染色过程会损伤细胞的超微结构,从而对细胞造成一定毒害,并且反应中间物的扩散会影响葡萄糖苷酶本身在细胞内的准确定位^[14]。基于 GUS 蛋白检测的局限性,目前发展了荧光蛋白标记技术^[14]。与 GUS 蛋白相比,荧光蛋白的检测具有以下优点:(1)操作简单,在鉴定转基因植株时,只需取样制作临时切片,使用荧光显微镜观察有无荧光,省去了前处理等试验;(2)可以使用活体生物发荧光成像系统进行活体检测;(3)对转基因植株的损伤较小,目前最常用的荧光蛋白是绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, 简称 GFP),它是从维多利亚水母中分离纯化出的一种可以发出绿色荧光的蛋白^[15]。GFP 生色基团的形成无种属特异性,GFP 蛋白对细胞没有毒害作用,不会影响细胞的正常生长和功能^[15]。以 GFP 作为选择标记基因,可以很方便地从大量细胞或组织中筛选出转化细胞和植株,并可追踪外源基因的分选或亚细胞定位。Sleight 等利用 Gibson 法成功构建了 Cyan - Megenta - Yellow 表达载体,并插入启动子、终止子和核糖体结合位点等元件,从而编码青色荧光蛋白(CFP)、红色荧光蛋白(RFP)、黄色荧光蛋白(YFP)共 3 种荧光蛋白^[16]。YFP 是 GFP 的突变体,与 GFP 相比,YFP 蛋白的荧光向红色光谱偏移。GFP 的最大激发波长为 395 nm,最大发射波长为 509 nm,而 YFP 的最大激发波长为 514 nm,最大发射波长为 527 nm^[17-18]。GFP 在非模式植物如油菜中的表达不稳定,荧光强度弱,较难观察到荧光^[19-20]。通过基因工程遗

传转化引入 YFP 蛋白,较易观察到稳定的荧光,这可能是由于 YFP 存在更大的发射波长与激发波长。因此,在非模式植物的遗传转化中,YFP 蛋白更具优势^[20-21]。

基于 SLIC 技术的原理,可将插入片段 PCR 产物定向克隆至任意载体的任意位点,称为一步克隆法,此技术的关键在于设计带有一步克隆酶切位点接头的引物序列,即在插入片段 PCR 引物的 5'端引入线性化克隆载体末端序列,从而使插入片段 PCR 产物的 5'端和 3'端分别带有与载体 2 个末端对应的一致序列(15 bp 左右)。本研究利用 pCambia3301::GFP(为笔者所在实验室用 pCambia3301、pAN580 载体改造而来)作为基础载体。本研究用此方法构建了用于非模式植物的多酶切位点遗传转化通用载体 pCambia3301::YFP。该载体在 T - DNA 右边界具有 8 个酶切位点,其中 4 个酶切位点(*Spe* I、*Xba* I、*Sma* I 和 *Bam* H I)可用于插入目的基因,在 T - DNA 左边界具有 10 个可供选择的酶切位点,并且在 CaMV 35S 启动子的两端均有多克隆酶切位点,可以根据需要对启动子进行替换。本研究构建的多酶切位点融合黄色荧光蛋白通用载体,为研究植物基因功能提供了一种有力工具。

1 材料与与方法

1.1 供试材料

本试验均于 2017 年 6 月起由笔者于中国农业科学院油料作物研究所功能基因组实验室与农业农村部油料作物生物学与遗传育种重点实验室独立操作完成。双元表达载体骨架为 pEarlyGate104 和 pCambia3301::GFP。笔者所在实验室中种植野生型烟草(tobacco)温室的培养条件如下:温度为 22 ℃,光 - 暗周期为 16 h - 8 h,光照度为 110 $\mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$,湿度约为 30%。质粒提取试剂盒购自 Axygen 公司;凝胶回收试剂盒与大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α 购自北京全式金生物技术有限公司;One Step Cloning Kit 购自 Vazyme 公司;感受态农杆菌 GV3101 由笔者所在实验室保存。各种生化试剂和酶分别购自 Sigma 公司、Thermo Science 公司和生工生物工程(上海)股份有限公司等。此外,根据美国国立生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information, 简称 NCBI)网站(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>)提供的 YFP 标签蛋白序列(登录号:KJ411637.1)设计本研究所用引物(表 1)。

表 1 本研究所用 PCR 引物序列及用途

引物名称	引物序列 (5'→3')	引物用途
YFP - F	AGGACCGGTCCCGGGGATCCATGCTGAGCAAGGGCCAGGA	YFP 序列克隆
YFP - R	TGTAATTCACACGTGTTAAGATCTTGGACGAGCTGTACAAGTAA	YFP 序列克隆
NOSR	AATCATCGCAAGACCGGC	测序引物

1.2 基因克隆

利用携带 *Bam* H I、*Bgl* II 一步克隆酶切位点接头的 YFP - F/YFP - R 引物,以 gateway104::YFP 载体为模板进行 PCR 扩增,获得带有相应一步克隆酶切位点接头的 YFP 序列。

采用 KOD(嗜嗜热原始菌)菌株 DNA 聚合高保真酶 KOD - Plus - Neo 进行 PCR 扩增。PCR 扩增体系如下:10 μL 10 \times PCR Buffer for KOD - Plus - Neo,6 μL 2 mmol/L dNTPs,

2 μL 25 mmol/L MgSO_4 ,各 2 μL 引物 F/R(均为 10 $\mu\text{mol}/\text{L}$),8 μL 模板,2 μL KOD - Plus - Neo(1 U/ μL),68 μL 高压灭菌蒸馏水。分装成 4 管,25 $\mu\text{L}/\text{管}$ 。PCR 反应程序如下:94 ℃ 2 min;94 ℃ 15 s,60 ℃ 30 s,68 ℃ 1 min,35 个循环。

1.3 载体连接重组、转化与菌落 PCR 初步鉴定

选择 pCambia3301::GFP 合适的克隆位点,并对克隆载体进行双酶切线性化。将扩增产物与线性化载体进行重组反应,融合 YFP 载体的反应体系如下:4 μL 5 \times CE II Buffer(CE

表示快速克隆酶), 5 μL 线性化克隆载体 (42 $\text{ng}/\mu\text{L}$), 3 μL YFP 扩增产物 (60 $\text{ng}/\mu\text{L}$), 2 μL 重组酶 Exnase II, 6 μL ddH₂O。体系配制完成后, 用移液枪上下轻轻吹打混匀, 避免产生气泡。置于 PCR 仪中, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 30 min。待反应完成后, 立即将反应管放置在冰水浴中冷却 5 min。

将 20 μL 冷却的反应液加入 200 μL 感受态细胞中, 轻弹管壁数下混匀, 在冰上放置 30 min。于 42 $^{\circ}\text{C}$ 热激 45 s, 然后于冰水浴孵育 2 min。再加入 450 μL LB 液体培养基, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 摇菌 60 min。吸取菌液均匀涂布在含有卡那霉素 (100 mg/L) 的固体 LB 平板上, 将平板倒置, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养。

从培养箱中取出平板, 在超净工作台中, 使用无菌牙签挑取单克隆, 于含有卡那霉素 (100 mg/L) 的固体 LB 平板上进行划线培养, 编号标记并分别作为鉴定 PCR 反应体系的模板, PCR 扩增, 再进行电泳鉴定, 观察凝胶成像情况。

1.4 测序鉴定

选择经 PCR 鉴定正确的菌株样品, 随机从中挑取 4 个单克隆, 将 LB 液体培养基与卡那霉素按体积比 1 000 : 1 混匀, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养 12 h, 送武汉擎科生物技术有限公司测序, 获得测序结果后使用软件 Vector NTI Advance 11.5.3 进行分析, 判断是否存在突变。

1.5 农杆菌转化

根据测序结果选择序列正确的样品, 使用 Axygen 质粒提取试剂盒提取质粒, 采用液氮冻融法转化感受态农杆菌, 在 50 μL 感受态农杆菌细胞中加入 5 μL 质粒 (100 $\text{ng}/\mu\text{L}$), 用移液枪吹打混匀后, 放置于冰上 5 min, 再用液氮速冻 1 min, 于 37 $^{\circ}\text{C}$ 水浴热激 5 min, 在超净工作台中加 450 μL 液态 LB 培养基, 于 28 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 振荡培养 4 h 后涂布在含有卡那霉素 (100 mg/L)、庆大霉素 (50 mg/L)、利福平 (100 mg/L) 的三抗 (下同) 固体 LB 平板上, 于 28 $^{\circ}\text{C}$ 倒置培养 48 h, 挑取单菌落涂布在新的三抗固体 LB 平板上进行划线培养, 并作为菌落鉴定体系的模板。

1.6 瞬时表达转化

在超净工作台上, 用无菌牙签挑取鉴定正确的农杆菌菌株, 加入含有三抗的液体 LB 培养基中, 于 28 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 培养 6 h 左右, D_{260} 值达到 1.0。此外, 从笔者所在实验室 -80 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱中取出保存的细胞核定位 marker 载体 Mecheery - marker 和有助于共转化的载体 p19, 同时加入含有三抗的液体 LB 培养基中, 于 28 $^{\circ}\text{C}$ 、200 r/min 摇床培养 6 h 左右, D_{260} 值也达到 1.0。吸取样品、marker、p19 三类载体菌液各 2 mL, 于 12 000 g 离心, 弃上清, 用转化工作液将菌体重悬制成悬浮液。10 mL 转化工作液的配方如下: 15 μL 100 mmol/L 乙酰丁香酮 (AS), 50 μL 0.2 mol/L 2-吗啉乙磺酸 (MES), 50 μL 2 mol/L MgCl_2 , 用去离子水补充总体积到 10 mL。最终转化工作液由 3 种载体悬浮液按体积比 5 : 3 : 2 混合, 即 2 mL 转化体系配制方法: 分别吸取 1 mL 悬浮液样品, 600 μL Mecheery - marker, 400 μL p19, 室温静置 2 h。选取野生型烟草 4 叶期的表面平整、肉质丰满的幼嫩叶片, 用 1 mL 注射器将转化工作液通过物理压力沿着叶脉组织打入烟草叶片中, 将烟草放置在温室中正常培养 3 d, 再取叶片进行激光共聚焦观察。

1.7 激光共聚焦观察

使用 Nikon A1 激光共聚焦平台, 以注射器针孔为圆心, 取面积为 1 cm^2 的样品置于载玻片上, 用 2 滴甘油封片并盖上盖玻片。按照标准探测模式 (DU4) 图像拍摄流程采集图像, 并作相关数据分析, 图像处理软件的版本为 NIS - Elements AR 3.1。

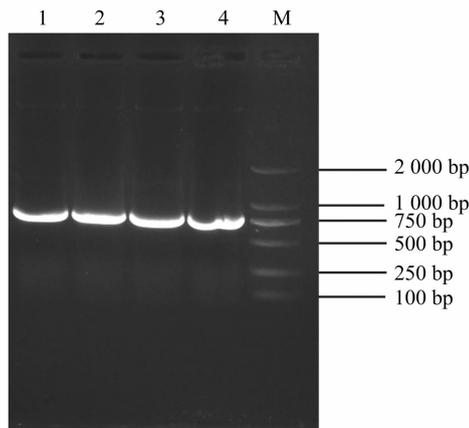
1.8 稳定表达转化

与瞬时表达转化类似, 取经菌落 PCR 鉴定正确的菌株, 加入含有三抗的 LB 培养基中摇床过夜培养。采用 Floral dip 法转化 Columbia 野生型拟南芥^[2], 转化工作液为 200 mL 水溶液体系, 加入 5% 蔗糖及 0.01% 的 Silwet L - 77 (一种有机硅表面活性剂)。待拟南芥生长到初花期 (播种后约 1 个月), 取出过夜培养至 $D_{260\text{nm}}$ 为 2.0 左右的 GV3101 农杆菌菌株, 室温 5 000 r/min 离心 15 min, 再用转化工作液将农杆菌悬浮, 直接将拟南芥花絮在转化工作液中浸泡 1 min, 处理后浇水覆膜暗处理 24 h, 光照培养 7 d 后, 再根据同样的步骤转化处理 1 次。在温室中培养至 T₁ 代, 取转基因拟南芥花瓣置于激光共聚焦显微镜下观察。

2 结果与分析

2.1 黄色荧光蛋白的克隆

利用携带 BamH I、Bgl II 一步克隆酶切位点接头的 YFP - F/YFP - R 引物, 以 pEarlyGate104::YFP 载体为模板进行 PCR 扩增, 获得带有相应一步克隆酶切位点接头的黄色荧光蛋白序列, 电泳结果见图 1。

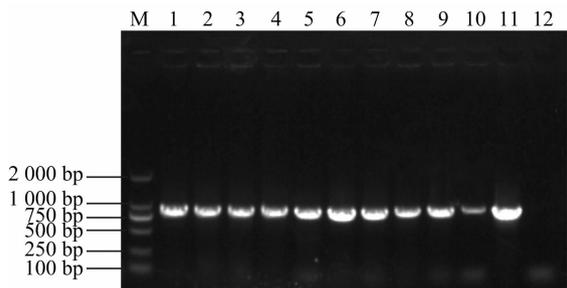


M—DNA 分子量标准 TaKaRa-DL2000; 1~4—YFP 克隆
图1 黄色荧光蛋白克隆电泳鉴定结果

2.2 重组质粒电泳鉴定结果

采用 BamH I、Bgl II 双酶切植物表达载体 p3301::GFP, 切胶回收酶切载体片段, 通过一步克隆将骨架载体与 YFP 连接, 并转化感受态 DH5 α , 于含有卡那霉素的 LB 固体培养基上进行筛选, 随机挑取单克隆进行 PCR 鉴定。由图 2 可以看出, 1~10 号菌株鉴定结果显示均有条带, 表明黄色荧光蛋白已经被成功导入骨架载体中。由图 3、图 4 可知, p3301::YFP 载体在黄色荧光蛋白标签上游有 4 个可用的常见限制性内切酶唯一识别位点: Spe I、Xba I、Sma I、BamH I, 这 4 个常规的限制性内切酶识别位点在 p3301::YFP 中均为单一拷贝, 由此可任选 2 个酶切位点, 设计带酶切

位点接头的序列克隆目的基因,可以实现不同植物基因序列与黄色荧光蛋白基因序列的融合。



M—DNA 分子量标准 TaKaRa-DL2000; 1~10—菌株中的 YFP 克隆; 11—阳性对照; 12—阴性对照

图2 p3301::YFP转化大肠杆菌 DH5 α 中 YFP 的鉴定结果

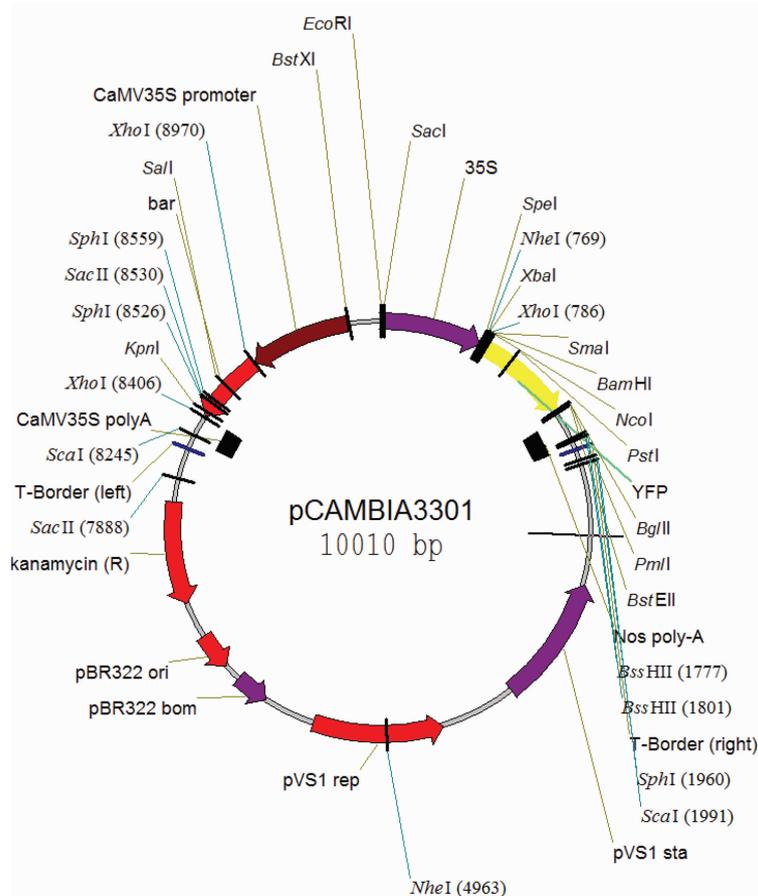


图3 植物多酶切位点融合黄色荧光蛋白高效通用载体的图谱

2.5 瞬时表达转化结果

提取测序正确的 p3301::YFP 载体质粒,转化 GV3101 感受态农杆菌,进行烟草瞬时表达转化,得到瞬时表达的烟草植株,进行烟草叶片激光共聚焦观察。为了便于区分荧光蛋白,在 488 nm 激光器通道下拍摄模式选择绿色,从而使得 YFP 激发光拍摄的图像显示为绿色(图 7、图 8)。激光共聚焦 FITC(异硫氰酸荧光素)通道下观察到 YFP 激发光,表明标签蛋白 YFP 可以在植物体内进行组织泛表达;激光共聚焦 561 nm 激光器通道下观察到核定位 mCherry 红色荧光蛋白激发光,可以直接指明细胞核覆盖区域;激光共聚焦明场通道图像显示出植物细胞区域;通过 FITC 与 TRITC(四甲基异硫

2.3 测序结果

对构建的重组质粒进行测序鉴定,测序峰图结果见图 5,以 NCBI 网站提供的 YFP 标签蛋白序列(登录号:KJ411637.1)作为参考序列,使用软件 Vector NTI Advance 11.5.3 进行序列测定与拼接分析。由结果可知,YFP 已被完整准确地连入 p3301 骨架载体中,从而成功构建出了 p3301::YFP 载体。

2.4 酶切验证结果

为了验证 p3301::YFP 载体酶切位点的可靠性,分别采用 *Spe* I/*Bgl* II、*Xba* I/*Bgl* II、*Sma* I/*Bgl* II、*Bam*H I/*Bgl* II 双酶切 p3301::YFP 载体,经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测发现,可以获得大小为 700 bp 左右的 YFP 标签蛋白片段(图 6),证明 4 个常见的限制性内切酶唯一识别位点(*Spe* I、*Xba* I、*Sma* I、*Bam*H I)准确可靠。

氰罗丹明)双通道复合图像,能够观察到 YFP 与 mCherry 红色荧光蛋白可以共定位表达并在细胞核区域叠加显示黄色,表明 YFP 在烟草植株体内成功表达(图 7)。

2.6 载体在转基因拟南芥组织细胞中的稳定表达

为了进一步研究载体 p3301::YFP 在转基因植物组织中的稳定表达情况,本研究观察了转基因拟南芥花瓣周围细胞中黄色荧光蛋白的表达。在转 p3301::YFP 拟南芥株系的花瓣等色素积累较少的器官中观察到强烈的荧光,而在野生型对照植株中均未观察到荧光,说明植物表达载体 p3301::YFP 携带的 YFP 在模式植物拟南芥中能够整合并稳定表达(图 8)。

		Smal ~~~~~		BamHI ~~~~~		NcoI ~~~~~			
801	GGGGGATCCA		TGGTGAGCAA	GGGCGAGGAG	CTGTTCCACC	GGGTGGTGCC			
	CCCCCTAGGT		ACCACTCGTT	CCCGCTCCTC	GACAAGTGGC	CCCACCACGG			
851	CATCCTGGTC		GAGCTGGACG	GCGACGTAAA	CGGCCACAAG	TTCAGCGTGT			
	GTAGGACCAG		CTCGACCTGC	CGCTGCATT	GCCGGTGTTC	AAGTCGCACA			
901	CCGGCAGAGG		CGAGGGCGAT	GCCACCTACG	GCAAGCTGAC	CCTGAAGTTC			
	GGCCGCTCC		GCTCCCGCTA	CGGTGGATGC	CGTTCGACTG	GGACTTCAAG			
951	ATCTGCACCA		CCGGCAAGCT	GCCCGTGCC	TGGCCACCC	TCGTGACCAC			
	TAGACGTGGT		GGCCGTTTCA	CGGGCACGGG	ACCGGGTGGG	AGCACTGGTG			
				PstI ~~~~~					
1001	CTTCGGGTAC		GGCCTGCAGT	GCTTCGCCCG	CTACCCCGAC	CACATGAAGC			
	GAAGCCGATG		CCGGACGTCA	CGAAGCGGGC	GATGGGCTG	GTGTACTTCG			
1051	AGCACGACTT		TTTCAAGTCC	GCCATGCCCC	AAGGCTACGT	CCAGGACGCG			
	TCGTGCTGAA		GAAGTTCAGG	CGGTACGGGC	TTCCGATGCA	GGTCCCTCGG			
1101	ACCATCTTCT		TCAAGGACGA	CGGCAACTAC	AAGACCCGCG	CCGAGGTGAA			
	TGGTAGAAGA		AGTTCCTGCT	GCCGTTGATG	TTCTGGGCGC	GGCTCCACTT			
1151	GTTCGAGGGC		GACACCTTGG	TGAACCGCAT	CGAGCTGAAG	GGCATCGACT			
	CAAGCTCCCG		CTGTGGGACC	ACTTGGCGTA	GCTCGACTTC	CCGTAGTGTG			
1201	TCAAGGAGGA		CGGCAACATC	CTGGGGCACA	AGCTGGAGTA	CAACTACAAC			
	AGTTCCTCCT		GCCGTTGTAG	GACCCCGTGT	TCGACCICAT	GTGTGATGTTG			
1251	AGCCACAACG		TCTATATCAT	GGCCGACAAG	CAGAAGAACG	GCATCAAGGT			
	TCGGTGTTC		AGATATAGTA	CCGGCTGTTC	GTCTTCTTGC	CGTAGTTCGA			
1301	GAAGTTCAAG		ATCCGCCACA	ACATCGAGGA	CGGCAGCGTG	CAGCTCGCCG			
	CTTGAAGTTC		TAGGCGGTGT	TGTAGCTCCT	GCCGTGCGAC	GTCGAGCCGG			
1351	ACCACTACCA		GCAGAACACC	CCCATCGGGC	ACGGCCCGGT	GCTGCTGCCC			
	TGGTGATGGI		CGTCTTGTGG	GGGTAGCCCG	TGCCGGGGCA	CGACGACGGG			
1401	GACAACCACT		ACCTGAGCTA	CCAGTCCGCC	CTGAGCAAAG	ACCCCAACGA			
	CTGTTGGTGA		TGGACTCGAT	GGTCAGGCGG	GACTCGTITC	TGGGGTGTCT			
1451	GAAGCGCGAT		CACATGGTCC	TGCTGGAGTT	CGTGACCCGC	GCCGGGATCA			
	CTTCGCGCTA		GTGTACCAGG	ACGACCTCAA	GCACCTGGCG	CGCCCTATGT			
					BglII ~~~~~				FmlI ~~~~~
1501	CTCTCGGCAT		GGACGAGCTG	TACAAGTAA	A	GATCTTAACA	CGTGTGAATT		
	GAGAGCCGTA		CCTGCTCGAC	ATGTTTCAAT	T	CTAGAATTGT	GCACACTTAA		

各限制性内切酶识别位点以波浪线线标出; YFP—黄色荧光标签蛋白(BamH I 酶切位点后紧连 ATG 起始密码子; YFP 末端终止子 TAA 紧连 Bgl II 酶切位点)

图4 植物多酶切位点融合黄色荧光蛋白高效通用载体酶切位点分析

3 讨论

植物功能蛋白与荧光蛋白的融合表达是研究功能蛋白在植物细胞体内定位及其运动特征的有力手段。绿色荧光蛋白由于能够自发产生荧光团,因此被广泛用作分子和细胞生物学的荧光标记。早期应用的野生型 GFP 基因具有一定不足,如 GFP 不仅具有 2 个激发峰,从而降低了检测特异性,而且其长波激发峰的强度较低,不易观察。在 GFP 所有的突变体中,黄色荧光蛋白具有最长的波长,在分子生物学和细胞生物学中可以用于构成有用的探针,因此 YFP 的应用范围更广。本研究将 pAN580::GFP 载体中的 GFP 与 p3301::YFP 载体中的 YFP 比对后发现,克隆的 YFP 相对于 GFP 有 9 个碱基发生突变,分别是第 69 位的 G 突变成 A,第 197、198 位的 AC 突变成 GG,第 205 位的 G 突变成 C,第 217、218 位的 AG 突变成 GC,第 610、611 位的 AC 突变成 TA,第 695 位的 A 突变成 T,从而导致 5 个氨基酸发生变化,分别是第 66 位的苏氨酸(ACC)突变成丙氨酸(GCC),第 69 位的缬氨酸(GTG)突变成亮氨酸(CTG),第 73 位的丝氨酸(AGC)突变成(GCC)丙氨酸,第 204 位的苏氨酸(ACC)突变成酪氨酸(TAC)以及第 232 位的组氨酸(CAC)突变成(CTC)亮氨酸。本研究用 5 个位点突变的 YFP 替换 GFP 基因片段,成功地构建了新型植物二元表达载体 p3301::YFP,其表达产物不需要其他底物或

者辅助因子即可被检测。YFP 替换 GFP 后荧光活性大大增强。本研究将 p3301::YFP 载体进行瞬时转化和稳定转化的试验均观察到强烈的荧光,表明载体的高效可靠性。

用于遗传转化的植物表达载体需要质粒携带的目的基因与融合标记基因能够与宿主的染色体整合并表达^[22-25]。高效的双元表达载体有利于高等植物基因的功能分析,如启动子分析^[26]、基因沉默和蛋白质定位的荧光蛋白融合分析。如果多克隆位点中具有唯一的限制性酶切位点,将便于启动子的置换。遗传编码的荧光标签是蛋白质序列,可以融合到目的蛋白中使其激发荧光。在分子生物学研究中,植物表达载体资源远远少于动物、微生物载体资源,本研究构建的植物融合表达载体 p3301::YFP 含有目的基因必需的启动子及终止子,同时含有 4 个可用常见限制性内切酶单一识别的位点,为外源目的基因引入提供了 12 种选择,具有更好的应用价值。此外,本研究通过接头引物 PCR 法^[27]、基于 SILC 原理一步克隆等方法构建 p3301::YFP,与使用商业化 T 载体 TOPO 和 gateway 法构建植物表达载体相比,具有以下显著的优点:(1)操作简单,使用进口商业化载体前后需要经过 2 次细菌转化培养与菌落 PCR 鉴定,而通过本研究方法仅需 1 次;(2)成本较低,商业化 TOPO 载体费用较高,进口品牌昂贵,若使用 In-Fusion 技术构建表达载体,进口试剂盒极为昂贵,而本研究使用的国产品牌价格实惠,仅为进口试剂盒的 1/10 左

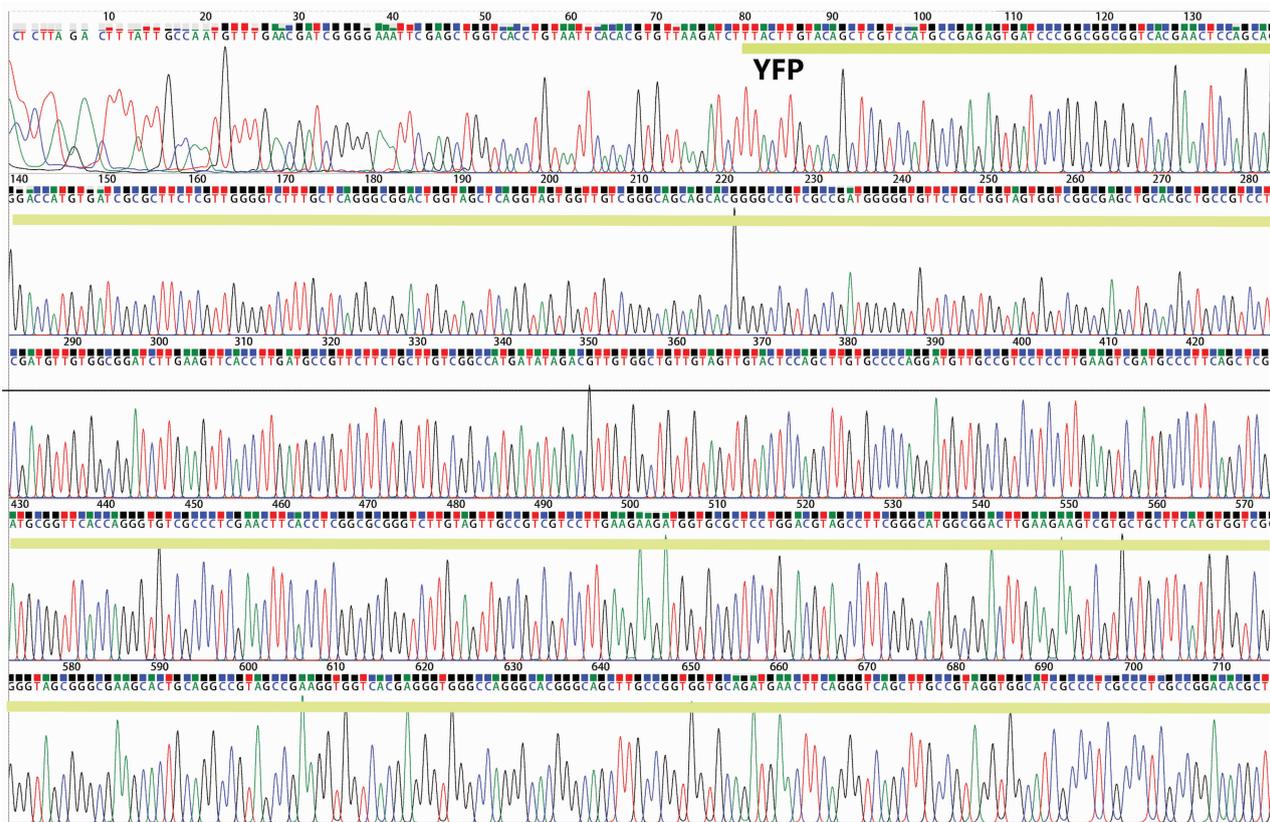


图5 p3301::YFP 载体 YFP 以 NOS-R 为测序引物的反向测序峰

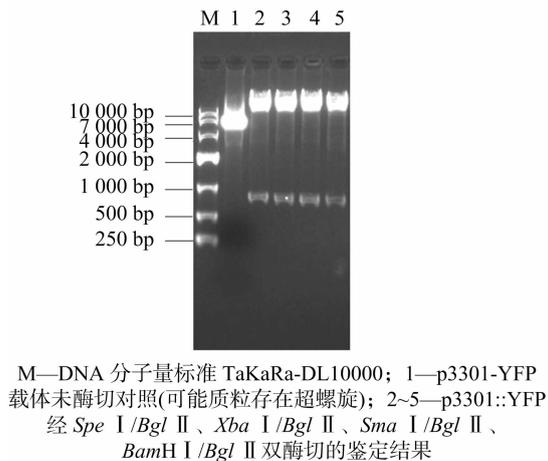


图6 p3301::YFP 载体酶切位点鉴定结果

右;(3)阳性率高,商业化 TOPO 载体假阳性率较高,容易出现目的基因 5'端与 3'端连反的现象,而本研究方法经过双酶切并不会出现连反现象。利用本研究方法构建的植物表达载体,具有广泛的应用价值。但是,本方法在目的基因两端加酶切接头时,可能导致引物退火温度偏高,从而影响特异性目的片段的获得,使得本方法在应用上具有一定的不足。

综上所述,本研究构建的多酶切位点融合黄色荧光蛋白通用载体,为研究人员提供了操作简单、效率高、经济实惠且适用范围广的亚细胞定位研究与功能分析工具。植物表达载体 p3301::YFP 在启动子上游、多克隆位点、终止子下游分别有 3、4、2 个单一拷贝限制性内切酶识别位点。该载体可用于

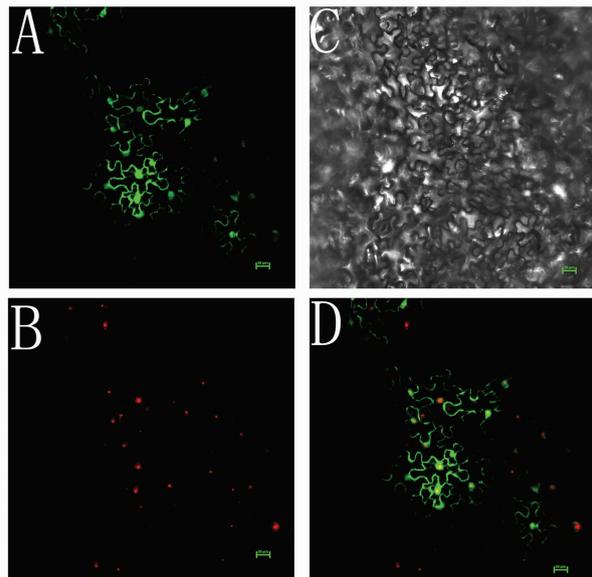
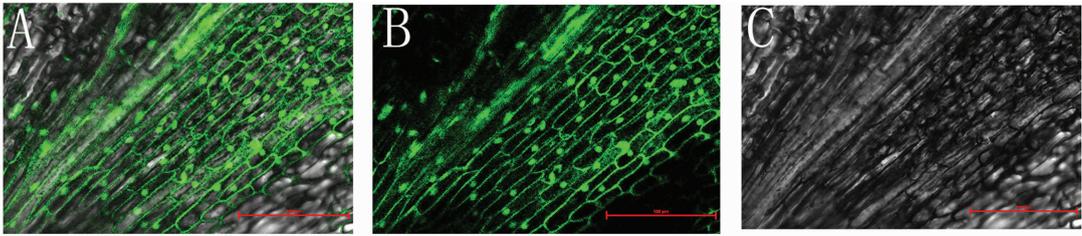


图7 p3301::YFP 瞬时转化烟草激光共聚焦观察的叶片下表皮
A—绿色荧光通道 p3301::YFP 激发荧光; B—红色荧光通道 M-cherry 激发红色荧光; C—明场; D—绿色荧光通道与红色荧光通道混合场叠加为黄色荧光

不同外源目的基因和不同蛋白功能表达载体的快速一步克隆构建,完成外源基因与宿主植株的瞬时转化,进行亚细胞定位,为植物的基因功能研究与遗传转化提供了新的通用型植物表达载体工具。



A—绿色荧光通道与明场叠加图像; B—绿色荧光通道激发荧光; C—明场

图8 p3301::YFP 稳定转化拟南芥激光共聚焦观察的花瓣

参考文献:

- [1] Lei Z Y, Zhao P, Cao M J, et al. High-throughput binary vectors for plant gene function analysis[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2007, 49(4): 556–567.
- [2] Clough S J, Bent A F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant Journal for Cell & Molecular Biology*, 1998, 16(6): 735–743.
- [3] 钱晓龙, 周建光. 真核表达载体 pcDNA3.1-*myc*-his(-)B 的构建与应用[J]. *生物技术通讯*, 2010, 21(2): 158–162.
- [4] 张阳璞, 杨淑慎. 几种新型植物基因表达载体的构建方法[J]. *生物工程学报*, 2015, 31(3): 311–327.
- [5] Earley K W, Haag J R, Pontes O, et al. Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics[J]. *Plant Journal*, 2006, 45(4): 616–629.
- [6] Li M Z, Elledge S J. Harnessing homologous recombination *in vitro* to generate recombinant DNA via SLIC[J]. *Nature Methods*, 2007, 4(3): 251–256.
- [7] 邝翡婷, 袁定阳, 李莉, 等. 一种载体构建的新方法: 重组融合 PCR 法[J]. *基因组学与应用生物学*, 2012, 31(6): 634–639.
- [8] 金磊, 赵文秀, 马岚. 新型小片段基因表达载体构建方法[J]. *中国生物工程杂志*, 2012, 32(6): 57–63.
- [9] 欧阳平, 李玉, 严红, 等. 一种载体构建的新方法: 一步克隆法[J]. *湖北大学学报(自然科学版)*, 2007, 29(2): 178–181.
- [10] Berrow N S, Alderton D, Sainsbury S, et al. A versatile ligation-independent cloning method suitable for high-throughput expression screening applications[J]. *Nucleic Acids Research*, 2007, 35(6): e45.
- [11] Engler C, Gruetzner R, Kandzia R, et al. Golden gate shuffling: a one-pot DNA shuffling method based on type II S restriction enzymes[J]. *PLoS One*, 2009, 4(5): e5553.
- [12] Leclercq J, Szabolcs T, Martin F, et al. Development of a new pCambia binary vector using Gateway® technology[J]. *Plasmid*, 2015, 81: 50–54.
- [13] Hajdukiewicz P, Svab Z, Maliga P. The small, versatile pZP family of *Agrobacterium* binary vectors for plant transformation[J]. *Plant Molecular Biology*, 1994, 25(6): 989–994.
- [14] 范文韬, 刘德立, 孙晓洁, 等. 带有绿色荧光蛋白基因(*gfp*)的植物重组表达质粒 pBI-GFP 的构建[J]. *华中师范大学学报(自然科学版)*, 2000, 34(2): 213–215.
- [15] Chiu W L, Niwa Y, Zeng W K, et al. Engineered GFP as a vital reporter in plants[J]. *Current Biology*, 1996, 6(3): 325–330.
- [16] Sleight S C, Sauro H M. Randomized BioBrick assembly: a novel DNA assembly method for randomizing and optimizing genetic circuits and metabolic pathways[J]. *ACS Synthetic Biology*, 2013, 2(9): 506–518.
- [17] Wachter R M, Elsiqer M A, Kallio K, et al. Structural basis of spectral shifts in the yellow-emission variants of green fluorescent protein[J]. *Plasmid*, 1998, 6(10): 1267–1277.
- [18] Griesbeck O, Baird G S, Campbell R E, et al. Reducing the environmental sensitivity of yellow fluorescent protein mechanism and applications[J]. *Journal of Biological Chemistry*, 2001, 276(31): 29188–29194.
- [19] Thorn K. Genetically encoded fluorescent tags[J]. *Molecular Biology of the Cell*, 2017, 28(7): 848–857.
- [20] Pang S Z, Deboer D L, Wan Y, et al. An improved green fluorescent protein gene as a vital marker in plants[J]. *Plant Physiology*, 1996, 112(3): 893–900.
- [21] Orm6 M, Cubitt A B, Kallio K, et al. Crystal structure of the *Aequorea victoria* green fluorescent protein[J]. *Science*, 1996, 273(5280): 1392–1395.
- [22] 毕惠惠, 王根平, 王成社, 等. 单子叶植物 RNA 干扰和过表达 Gateway 载体的构建[J]. *植物遗传资源学报*, 2013, 14(1): 115–123.
- [23] 吴立柱, 王省芬, 李喜焕, 等. 通用型植物表达载体 pCamE 的构建及功能验证[J]. *农业生物技术学报*, 2014, 22(6): 661–671.
- [24] 张利娟, 梁卫红, 刘悦霞, 等. 两种水稻 *OsRhoGDI*s 基因启动子的克隆及分析[J]. *中国农业科学*, 2008, 41(10): 2916–2922.
- [25] 李海娇, 卢建平, 刘小红, 等. 适用于稻瘟病菌基因敲除、过表达和荧光融合蛋白表达载体的构建和使用[J]. *农业生物技术学报*, 2012, 20(1): 94–104.
- [26] 巩元勇, 冯永坤, 倪万潮, 等. 植物表达载体 pCambia2300-35S-GUS-CaMVterm 的构建及验证[J]. *中国生物工程杂志*, 2013, 33(3): 86–91.
- [27] 李磊, 薛芎, 左左敏, 等. 一种改造载体多克隆位点的新方法[J]. *生物技术*, 2013(4): 40–43.