

花特异表达启动子的克隆 及花色调节基因 Lc 表达载体的构建

刘佳, 王忠, 李建粤

(上海师范大学生命与环境科学学院, 上海 200234)

摘要: 克隆了矮牵牛花特异表达基因 CHSA 启动子, 并定向插入到已含有花色调节基因 Lc 的质粒 pBI121 中, 取代原有的 CaMV 35S 启动子. 所构建的新表达载体可用于花色改良研究.

关键词: 查尔酮合成酶基因启动子(PCHS); 克隆; 表达载体; 花色调节基因 Lc

中图分类号: Q943 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-5137(2004)04-0070-04

尽管多年来花卉育种学家利用传统杂交育种及定向选择育种, 已培育出了大量花卉新品种, 但这种育种方法有其局限性, 主要表现在远源杂交不亲合, 难以打破物种生殖隔离; 多种优良性状有时难以组合在一个后代中; 育种周期长等^[1-3]. 近年来, 生物技术的发展对花卉园艺业也产生了较大的影响, 特别是基因工程技术在花卉育种中的应用, 极大地推动了花卉在花色、抗虫、抗病等方面的改良研究.

由于花卉花色的表现, 主要局限在花器官上. 因此, 花色改良的基因工程与其他抗虫、抗病基因工程相比, 对于控制外源目的基因表达的启动子具有特殊的要求: 即花特异表达启动子.

据报道^[4], 矮牵牛查尔酮合成酶基因的 CHS A 启动子是光依赖性的, 并在花器官中特异表达. 在这个启动子作用下, 植物花色的变化易观察, 能够更有利于对其控制的下游基因的功能进行研究. 本试验的主要工作就是以矮牵牛为材料分离克隆查尔酮合成酶 CHS A 启动子, 并成功地将 CHS A 启动子与可控制花色调节的 Lc 基因融合, 构建成能够在不同植物中进行遗传转化研究的表达载体. 本研究可为今后利用基因工程技术改良花卉花色研究奠定基础.

1 材料与方法

1.1 植物材料及主要试剂

矮牵牛 (*Petunia hybrida*) 种子购于花市. DNA Ladder1000(SM0383), pUCm-T 载体, PCR 扩增专用试剂, PCR 产物回收试剂盒, Taq DNA 聚合酶, T4 DNA 连接酶及各种限制性内切酶(除 Xba I) 等试剂均购自上海生工生物工程公司, Xba I 限制性内切酶和 DNA Marker DL15,000 购于 Takara 公司.

pBI121(含有 35S 启动子启动的 Lc 基因)由中科院上海植物生理研究所曹湘玲老师提供.

1.2 方法

(1) 参照文献[4]报道的花特异表达启动子序列设计引物, 由上海生工生物工程公司合成. 引物序列为:

收稿日期: 2004-05-27

基金项目: 上海市科技发展基金(023112027).

作者简介: 刘佳(1979-), 女, 上海师范大学生命与环境科学学院硕士研究生; 李建粤(1958-), 女, 上海师范大学生命与环境科学学院副教授.

Hind III

PCHS 1: 5'-GG AAGCTTTTCCTGTTCAAAGCTGATG-3'

Xba I

PCHS 2: 5'-GC TCTAGACGATTTTTGCTTGAAAAAG-3'

以矮牵牛总 DNA 为模板, 按标准体系 (即 50 μ L 体系) 进行特异引物 PCR 扩增反应, 反应参数为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4min; 94 $^{\circ}$ C 1min, 55 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 1min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min. PCR 产物经 1.5% 琼脂糖凝胶电泳后, 切下目的条带, 用 PCR 产物回收试剂盒回收后置于 -20 $^{\circ}$ C 保存.

(2) PCR 扩增的 PCHS 与 pUCm-T 载体的连接、转化和筛选

回收的 PCR 产物与 pUCm-T 载体连接后转化大肠杆菌, 16h 后挑白色单菌落摇菌过夜, 提质粒进行 PCR 检测鉴定后送上海生工生物工程公司进行序列分析.

(3) 由 T 载体双酶切回收 PCHS

在上下游引物设计时两端引入 Hind III 和 Xba I 位点, 因此在 T 载体中可采用这两个内切酶将 PCHS 启动子切出, 电泳后回收, 置于 -20 $^{\circ}$ C 保存.

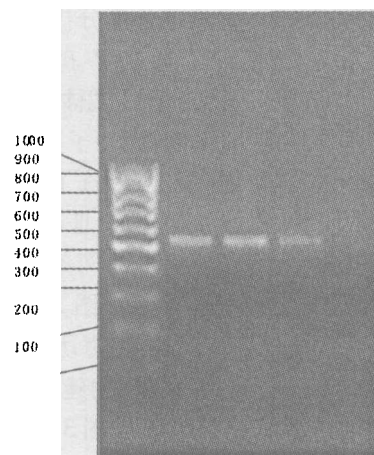
(4) 由 PCHS 控制的花色调节基因 Lc 表达载体的构建与鉴定

Hind III 和 Xba I 双酶切 T 载体, 回收目的大片段, 在 T4 连接酶作用下, 与相应双酶切的 pBI121 质粒在 16 $^{\circ}$ C 连接 5h. 取 10 μ l 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α , 涂布在含卡那霉素 (50mg/L) 的 LB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜. 挑选单菌落摇菌后提取质粒, 进行 PCR 鉴定和双酶切鉴定.

2 结果与分析

2.1 花特异表达启动子 PCHS 的克隆

采用引物 1: 5' GGAAGCTTTTCCTGTTCAAAGCTGATG3' 和引物 2: 5' GCTCTAGACG ATTTTTGCTTGAAAAAG3', 从矮牵牛基因组 DNA 中扩增获得的产物, 经琼脂糖凝胶电泳分析为一条唯一片段, 与标准分子量 DNA 比较, 扩增产物的 DNA 长度介于 500bp ~ 600bp 之间 (图 1).



左 1 泳道为 DNA Ladder1000,
2-4 泳道均为 PCR 产物
图 1 花特异表达启动子 PCHS 的 PCR 扩增

2.2 花特异表达启动子 PCHS 序列分析

Hind III	antherbox	
5' GG AAGCTTTT CCTGTTCAA GCTGATGC TA CAAGTCACAG AAAT CATATG TAAGAACGAT -379		
CCAAT box		
CAAGACCATT CA TTTGGTTC AACCAGCGGC GGATCGATGG AATTCAGTAG GTTTGGTGCA -319		
GACACTGTAT TTATATTA AAAATTAGTA AATATGTACA AAAATTAAGT TGAGAATCCA -259		
GTTACTTGCA CGTGAGATCG TTATCCAAAA ATTTAAAACT CATAAAATTC AAATTCTAGA -199		
TCCGGCTCCC GTTCAACAGA TTGAAAAATC TAAGAGCCTT TGATCTTGCG AAGTAGGTAC -139		
box2	box1	
CATTAATT TG TGTTCAGGT TTGCTAG GAA AATAAAAAAG G ATGTCACGT GCCATC AAGT -79		
G - box	TACPyAT box	TATA box
TATTGCTA CA CGTG AT TACT AT C TACCAT T CTCCTTTAGG GTTCTCA TAT AAAT ACTTTA -19		
capsite		
CAATCCCCAT GCAAA CCATA A CACAATATA AAAGATACTT ACACTTGTC A CGTACTACAT +42		
+1	Xba I	

AAAAAAAAA AATACCAAAC TTTTTTCAAG CAAAATCG T CTAGAGC 3'

+81

注:前后下划线部分为酶切位点

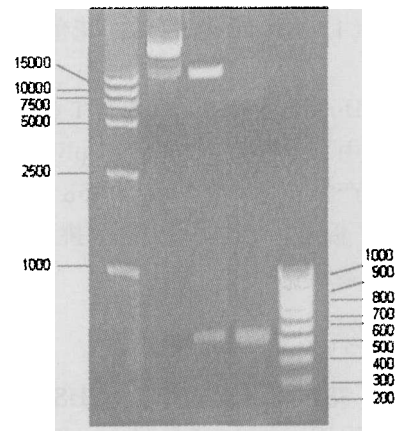
测序结果显示,在本试验中扩增获得的矮牵牛查尔酮合成酶启动子 DNA 核苷酸数为 511bp. 采用 pcgene 软件该序列进行结构分析,发现其在第 -25 ~ -31bp 之间有一个 TATA box (TATAAAT),在 -367 ~ -378bp 之间有一个 CCAAT box (CAAGACCATTCA),在 -3 ~ +3bp 之间有一个戴帽位点 (cap-site, CCATAA),这些位点是作为启动子所必需的表达调控元件;另外在 -395 ~ -410bp 之间有一个 antherbox (TAGAAGTGACAGAAAT),这是目的基因在幼嫩的花药中特异表达所必需的调控元件;在 -112 ~ -130bp 之间有一个 box2 元件,在 -83 ~ -97bp 之间有一个 box1 元件,box 2 和 box1 元件是与类黄酮生物合成相关酶基因启动子的保守序列;box1 元件内包含有一个 C-box (CACCTG),且在 -65 ~ -70bp 之间还有一个 G-box,它是花核蛋白的结合域,是光、厌氧生存和 ABA 应答元件,受光和 UV 诱导调控,并与花特异表达有关;在 -40 ~ -63bp 之间有两个拷贝的 TACPyAT box,它是决定花特异表达的序列,目前已由报道认为可通过抑制花外 CHS 启动子的表达来介导花中 CHS 基因表达调控^[4,6-9].

本试验克隆的启动子所有调控元件及附近的序列与报道^[4]序列基本一致.但从总长度分析,本试验的启动子序列比报道序列多了 167 个 bp,介于第 -189 碱基与 -355 碱基之间.

2.3 LC 调节基因的表达载体构建

为了鉴定由 PCHS 启动子置换 pBI1210 上的 CaMV35S 启动子而得到的克隆的正确性,挑选了 9 个克隆提取质粒,先进行 PCR 分析,将阳性质粒再进行 Hind III 与 Xba I 双酶切检测.根据载体的酶切位点推测,应切出对应的两条带,其中小带为 511bp,酶切后的电泳结果与预测的完全一致(图 2).

用 Hind III 和 Xba I 双酶切定向插入质粒 pBI1210 质粒,取代原有的 CaMV35S 启动子,构建了由 PCHS 驱动花色调节基因 Lc 的植物表达载体 pBI121-1(图 3).



从左到右分别为 DNA Mark15,000, pBI121-1, pBI121-1 双酶切, pBI121-1 的 PCR 产物, DNA Ladder1000
图 2 质粒鉴定

3 讨论

Ingrid 等曾经将 CHSA 基因 5', 非翻译区不同的 5', 缺失片段分别与 CAT 和 GUS 基因构成嵌合基因,再利用农杆菌介导法把它

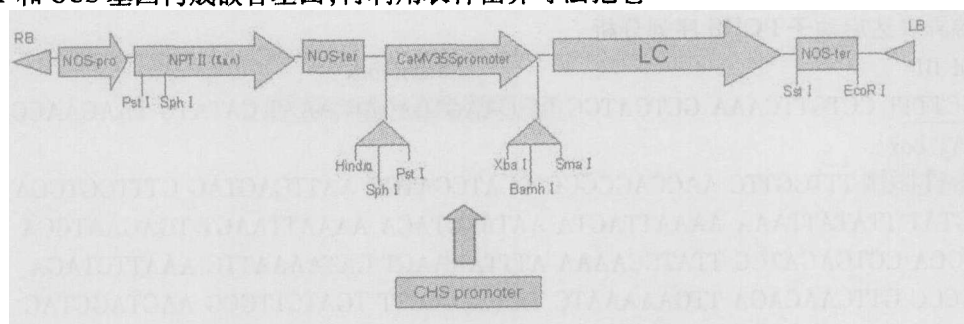


图 3 表达载体质粒 pBI121-1 的物理图谱

们导入矮牵牛中.通过检测不同的转化植株各组织器官中 CAT 和 GUS 报告基因的活性以确定花特异表达所必需的顺式调控元件,证实 CHSA 基因(查尔酮酶基因)的启动子包含了赋予植物花特异表达和受 UV 诱导表达的顺式作用元件.它包括 box2, box1, 2 个 G-box, 2 个 TACPy-AT box, TATA box 和 cap-site.在他们的研究中还发现, -67 至 +1 的片段仍能低水平地驱动花的特异表达,但不能受 UV 诱导表达,该片段仅包含 2 个 TACPyAT box, TATA box 和 Cap site,进一步证明 TACPyAT box 是花特异表达所必

须的调控元件。

本研究从矮牵牛中克隆的 511bp 的花特异表达启动子, 经测序分析与查尔酮酶基因启动子报道序列同源率在 96% 以上, 且调控元件及其附近的序列与报道的序列基本一致。为此可以肯定在本试验中克隆的 DNA 片段正是查尔酮酶基因的启动子。本研究中还成功地将 PCHS 插入 pBI1210 中, 与花色调节基因 Lc 融合, 为以后开展香石竹等植物遗传转化研究做好了前期准备。

本试验中我们还发现在克隆获得的启动子中还多出一段 DNA 序列, 这也许与所用的矮牵牛品种不同有关。由于在这段序列中不存在典型的调控元件, 为此我们初步认为它的存在可能不会对启动子的功能造成影响。但究竟如何, 还有待于我们将这一启动子与目的基因融合后导入植物中, 从转基因植物后代表现来进一步确定这段序列对基因表达是否有影响。

花特异表达启动子是组织特异性启动子, 它使目的基因在花中特异性表达, 这样就能控制目的基因表达的时间和组织, 并且在后代的性状上很容易地辨别该基因是否表达以及表达的强弱。而 35S 启动子是组成型启动子, 在控制外源目的基因表达时无组织及时间特异性。本试验中克隆获得的花特异表达启动子来源于植物矮牵牛基因组, 而 35S 启动子来源于花椰菜花叶病毒, 所以在转基因植物安全性方面使用查尔酮酶基因启动子也比 35S 启动子具有优势。在这个意义上, 利用花特异表达启动子驱使花色等各种基因在花特定组织表达所得到的转基因花卉将具有更大的市场价值, 它的应用前景将会更加广泛。

文中所用的 pBI121 质粒(含 LC 基因)由中科际恒生所曹湘玲研究员提供, 特此感谢。

参考文献:

- [1] 王东辉, 吴光耀. 用基因工程方法改变花的颜色[J]. 生物学通报, 2002, 37(11): 30-31.
- [2] 包满珠. 植物花青素基因的克隆进展及其应用-文献综述[J]. 园艺学报, 24(3): 279-284.
- [3] 徐昌杰, 张上隆. 植物类胡萝卜素的生物合成及其调控[J]. 植物生物学通讯, 2000, 36(1): 64-70.
- [4] IHGRID M VAN DER MEER, COMELIS E SPELT, JOSEPH N M MOL, et al. Promoter analysis of the chalcone synthase (chA54) gene of *Petunia hybrida*: a 67 bp promoter region directs flower-specific expression[J]. *Plant Mol Biol*, 1990, 15: 95-109.
- [5] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W, 黄培堂. 分子克隆实验指南(第三版)[M]. 北京: 科学出版社.
- [6] SCHULZE-LEFERT P, DANGL J L, BECKER-ANDRE M, et al. Inducible in vivo DNA footprints define sequences necessary for UV light activation of the parsley chalcone synthase gene[J]. *ELOBOJ*, 1989, (8): 651-656.
- [7] STAIGER D, KAULEN H, SCHELL J. A CACGTG motif of the *Antirrhinum majus* Chalcone synthase promoter is recognized by an evolutionary conserved nuclear protein[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86: 6930-6934.
- [8] GIULIANO G, PICHERSKY E, MALIC V S, et al. An evolutionary conserved protein binding sequence upstream of a plant light-regulated gene[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, 85: 7089-709.
- [9] SOMMER H, BONAS U, SAEDLER H. Transposon-induced alterations in the promoter region affect transcription of the chalcone synthase gene of *Antirrhinum majus*[J]. *Mol Gen Gene*, 1988, 211: 49-55.

Cloning of a flower-specific expression promoter and construction of expression vector

LIU Jia, WANG Zhong, LI Jian-yue

(College of Life and Environment Sciences, Shanghai Normal University, Shanghai 200234, China)

Abstract: A flower-specific expression promoter, PCHSA, was cloned by PCR, and inserted into the vector pBI121 (with LC purpose gene) to take place of the previous promoter, CaMV 35S to get a new expression vector pBI121-1.

Key words: Chalcone Synthase promoter; cloning; expression vector; Lc