

## 甘蓝短散布元件对转基因表达效果的研究\*

杨正安<sup>1</sup>, 曹 晖<sup>1</sup>, 王小佳<sup>2</sup>, 张应华<sup>1\*\*</sup>

(1. 云南农业大学园林园艺学院, 云南 昆明 650201; 2. 西南大学园艺园林学院, 重庆 400715)

**摘要:** 为检验甘蓝短散布元件 (SINE) 对植物转基因表达的影响, 采用 PCR 方法, 从甘蓝基因组中克隆了一段短散布元件序列 (Short Interspersed Nuclear Element, SINE), 该 SINE 具有核基质结合区 (matrix attachment region, MAR) 的结构特征, 将其构建到  $\beta$ -葡糖醛酸酶 ( $\beta$ -glucuronidase, GUS) 基因 (*uidA*) 的两侧翼, 形成 SINE 调控的植物表达载体, 采用农杆菌介导法, 将含 SINE 序列和不含 SINE 序列的植物表达载体导入烟草中。对转基因植株进行 GUS 活性定量测定, 结果表明, SINE 表现出类似 MAR 的功能, 可以提高外源 *uidA* 基因的表达水平, 与不含 SINE 的转化植株相比, 外源基因的平均表达水平提高了 2 倍, 但转基因植株个体间表达水平存在较大的差异。

**关键词:** 甘蓝; 短散布元件 (SINE); 核基质结合区; 转基因表达; 烟草

**中图分类号:** S 635.03    **文献标识码:** A    **文章编号:** 1004-390X (2008) 05-0590-05

## Effect of Short Interspersed Nuclear Element (SINE) of Cabbage on Transgene Expression In Transgenic Tobacco

YANG Zheng-an<sup>1</sup>, CAO Hui<sup>1</sup>, WANG Xiao-jia<sup>2</sup>, ZHANG Ying-hua<sup>1</sup>

(1. Faculty of Landscape and Horticulture, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China;

2. Department of Horticulture and Landscape, Southwest University, Chongqing 400715, China)

**Abstract:** In this study, a SINE fragment was cloned from cabbage (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) by PCR method in order to test its effect on transgene expression in plant. This SINE fragment has the structure and feature of matrix attachment region (MAR). The plant expression vector was constructed by SINE sequence used to flank the  $\beta$ -glucuronidase (GUS) report gene within the T-DNA of the binary vector. Vectors containing or lacking SINEs were then used to transform tobacco plants by *Agrobacterium tumefaciens*. The biologic activity of GUS was quantitatively determined; the result showed that the expression level of *uidA* gene could be improved by regulation of SINE fragment, and the function of SINE was similar to MAR. Furthermore, transgenic plants containing the SINE and flanking the GUS gene exhibited higher levels of transgene expression, compared with the transgenic plants that lacked the SINE. On average, plants transformed with SINE-containing vector expressed GUS at level 2-fold higher than the controls. However, the expression differences among individual transformants were still obvious.

**Key words:** cabbage; short interspersed nuclear element (SINE); matrix attachment region (MAR); transgene expression; tobacco

收稿日期: 2007-12-28    修回日期: 2008-02-18

\* 基金项目: 国家自然科学基金项目资助 (30571275)

\*\* 通讯作者 E-mail: zhangyh9519@163.com

作者简介: 杨正安 (1974-), 男, 云南建水人, 在读博士, 讲师, 主要从事植物基因工程研究。

E-mail: dyangza@yahoo.com.cn

短散布元件 (short interspersed nuclear element, SINE) 广泛存在于真核生物中, 是基因组中可转移的成分<sup>[1]</sup>, 大小一般为 100 ~ 500 bp, 也有超过 1 000 bp 的, 拷贝数可达数百至数十万个, SINE 家族的分布具有一定的科属特异性, 在真核基因组系统进化中扮演着十分重要的角色<sup>[2,3]</sup>, 对基因组的复杂化、基因的钝化、新基因的产生、基因表达的调控都具有重要意义<sup>[4]</sup>。

根据 TIKHONOV 等<sup>[1]</sup>报道的油菜 (*Brassica napus*) 中的短散布元件序列设计引物, 采用 PCR 法从甘蓝基因组中分离了一段 SINE, 该片段具有核基质结合区 (matrix attachment region, MAR) 序列的结构特征, 在离体条件下表现出具有与核基质结合的能力<sup>[1]</sup>, 为检验其对转基因表达的影响, 将其按顺式重复构建到 GUS 基因表达盒的两侧, 用农杆菌介导法转化烟草, 对转基因植株的 GUS 酶活性检测。结果表明, SINEs 的存在提高了外源基因稳定表达的水平。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

甘蓝 (*Brassica oleracea* var. *capitata* L.) 材料为自交系 93131, 烟草 (*Nicotiana tabacum* L.) 品种为 K326。

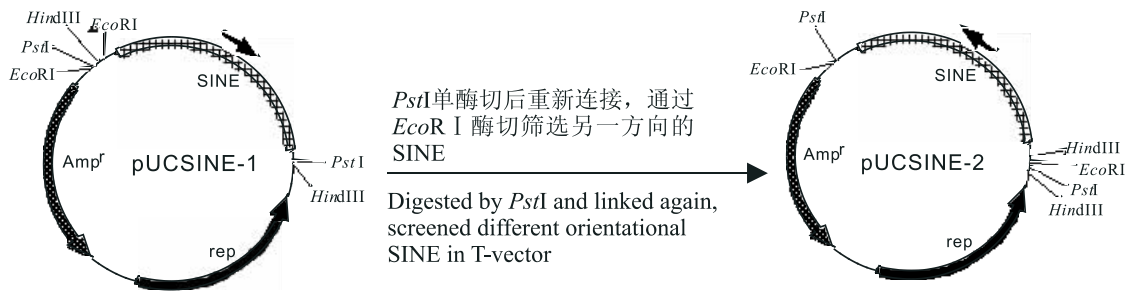


图 1 SINE在T载体上的不同方向

Fig. 1 Different orientational SINEs in T-vector

### 1.2.2 表达载体构建

为便于对重组质粒进行鉴定, 设计 GUS 基因部分片段扩增引物 Pg1, Pg2 及 T-NOS 的上游引物 Pt, P-35S 的下游引物 Pp:

Pg1: 5' - TGC GTT TCG ATG CGG TCA CTC - 3';

Pg2: 5' - CAC TGT TAC TCT TCA CTC CAC - 3';

Pt: 5' - CCT GTT GCC GGT CTT GCG ATG - 3';

Pp: 5' - CTA TTT GAA TCT TTG ACT CC - 3'。

大肠杆菌菌株 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 农杆菌菌株 EHA105, 质粒 pBI121 和 pBINPLUS 为云南农业大学园林园艺学院实验室保存。克隆载体 pUCm-T, 限制性内切酶、连接酶、Taq DNA 聚合酶、抗生素、生化试剂购于上海生工; *E. Z. N. A. Plasmid Miniprep Kit* 购自 Omega 公司。

## 1.2 方法

### 1.2.1 SINE 的克隆

采用 CTAB 法<sup>[5]</sup>, 提取甘蓝基因组 DNA, 根据文献 [1] 报道的 SINE 序列设计引物, 为便于表达载体构建, 在引物 P1 的 5' 端添加了 *EcoR* I - *Hind* III 酶切位点:

P1: 5' - GAATTC AAGCTT CTG ACA AGA  
*EcoR* I *Hind* III

TTG TAT CAT C - 3'

P2: 5' - CTG AGC GAT CTT GTC TCC TCT  
GAG - 3'

扩增产物克隆到 pUCm-T 载体上, 得到的若干重组质粒, 选取 *Hind* III 能切下目标片段的质粒, 其 SINE 在 T 载体上的方向见图 1, 命名为 pUCSINE-1, *Pst*I 单酶切后重新连回去, 通过 *EcoR* I 酶切, 筛选另一方向的 SINE, 得到 pUCSINE-2, 得到的重组子进行测序分析。

*EcoR* I / *Hind* III 双酶切将 pBI121 上的表达盒切下, 插入到 pBINPLUS 中, 得到的阳性克隆命名为 pBGUS。SINE 通过单酶切后分别插入 *Hind* III 和 *EcoR* I 位点, 获得重组表达载体 pBGUS-SINEs, 表达载体结构见图 2。

### 1.2.3 转基因烟草的获得及 GUS 活性测定

采用叶盘法<sup>[5]</sup>, 分别将 pBGUS 和 pBGUS-SINEs 转入烟草中。提取卡那霉素抗性植株的基

基因组 DNA, Pg1, Pg2 为引物进行 PCR 鉴定。  
GUS 活性定量测定按 JEFFERSON<sup>[6]</sup> 的方法稍

加改进, GUS 活性以 MU 的纳摩尔数与总蛋白含量及时间的比值 nmol MU/mg protein/min 表示。

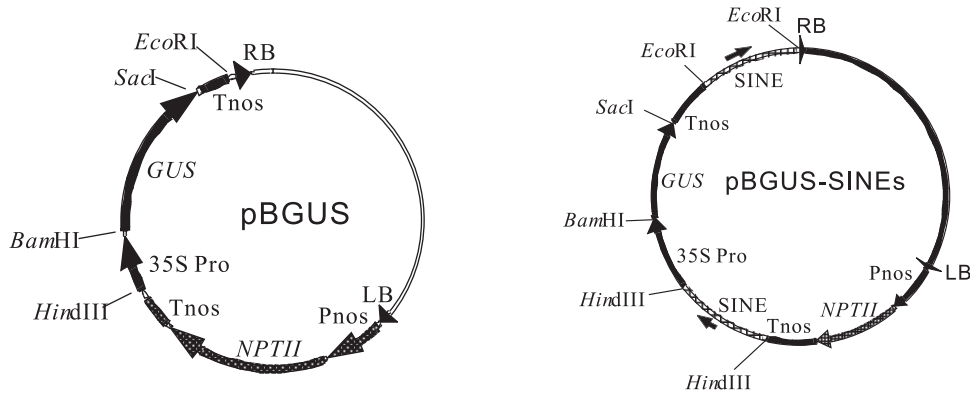


图 2 表达载体 pBGUS/pBGUS-SINEs 结构示意图  
Fig. 2 Constructions of expression vector pBGUS/pBGUS-SINEs

2 结果与分析

2.1 SINE 序列的克隆与分析

经序列测定, 克隆到的片段长度为 527 bp, AT 含量为 74.8%, 该 SINE 片段含有 MAR 中常

见的模体序列, 如 A-box, T-box, ATTAATTT 等, 与油菜中的 SINE 序列相比, 中间缺失了 198 bp 长的片段, 缺失部分上、下游两段序列与已知序列相对应的部分同源性分别为 93.8% 和 84.8%。

```

1 CTGACAAGATTGTATCATCCAAAAACGCAATTAATATAAGAAAATAGTTATTTGATATGA
61 ATTAACATTGTTTTTCGTAACCTTATCTTTAATATATCTAAAAATTTTAGAAAGTAAAGTTAT
121 AATGATTTATTTATTCTATATTTTAAACAAAAATATCATAAACTATAGAACATATATG
181 TAACATATATTTTCATTTTTTCAATTAAACTTGAAAAATCTAAAACTTATGTGACAA
241 AATCTGATGATTAGTATTTTGCATAATTTGCCTTCCATGGTCTGTTATAAGCTAATACCA
301 TATGCATAGTTGATTGTCATAATAATAAGTATAAAATATATAAATATATCATTAACTCTG
361 GCTCATGTTATAACAACCTTTCTGTCAGGCAAGATAATATGTCTAACTTAAGAATACTGA
421 ATATATATCACATGTAAATTATGATAAGAGTATGTTTATTGTTGATTATGAAAGCTAGGG
481 GCCGCTCAAAGAGCCATGATCGCTCAGAGGAGACAAGATCGCTCAG
    
```

图 3 甘蓝 SINE 序列分析图  
Fig. 3 Sequence and analysis of cabbage SINE

注: 框内序列示 A-box, T-box; 下划线示“90% AT box”序列; 双划线为 DNA 链弯曲部分; 阴影示解链序列, 两端黑体为引物序列。  
Note: The sequences in the frames indicate A-box and T-box. The underlined parts indicate “90% AT box”. The dual underlined parts denote curved. Shaded regions are BUR (base-unpairing region) motif. The black segments are primers.

2.2 表达载体构建及工程菌株鉴定

以 CaMV35S 启动子控制的 GUS 基因为报道基因, 构建了植物表达载体 pBGUS 和 pBGUS-SINEs (见图 2), 后者 SINEs 位于 GUS 基因的两侧, 两段 SINEs 成顺式重复。

采用冻融法, 将构建好的表达载体导入根癌农杆菌 EHA105, 通过 PCR 对重组农杆菌进行鉴定。含 pBGUS 菌株, 引物 Pg1/Pg2 扩增出 1.3 kb 片段即为阳性克隆。含 pBGUS-SINEs 的菌株, 引物 Pg1/Pg2 扩增出 1.3 kb 的 GUS 片段, Pp/Pp1

和 Pt/P2 的扩增条带约为 0.85 kb 和 0.75 kb, 对照均未扩增出条带。所有条带大小均与预期相符, 表明表达载体已成功导入根癌农杆菌 EHA105, 而且再次确认 SINEs 在载体上成同向排列。

### 2.3 转化及转基因植株的检测

采用农杆菌介导的叶盘法转化烟草叶外植体。在筛选压 100 mg/L kan. 的分化培养基上进行筛选培养, 为确保得到的植株属于不同的转化体, 每个外植体上只取一个不定芽继代, 转移到相同培养基上进行再次筛选, 获得的抗性苗转到含 100 mg/L kan. 的 MS 培养基上生根, 待长到 3~4 片叶后移栽到营养钵中。

PCR 方法对这些植株进行鉴定, pBGUS 载体转化的植株采用 GUS 基因的引物 Pg1/Pg2 进行扩增, 得到约 1.3 kb 的扩增片段; pBGUS-SINEs 转化植株用引物 P1/P2 进行扩增, 得到的片段约为 0.5 kb; 实验所获抗性烟草植株均能扩增出预期

条带。

### 2.4 GUS 活性定量测定

取生长在室外充分展开的烟草叶片, 参照文献 [6] 稍加改进, 对转基因烟草进行 GUS 活性定量检测, 为减少误差, 每株烟草的取材部位都是一致的, 未转化植株取 10 株, 不同载体转化的各取 25 株。样品磨碎匀浆后离心, 取 20  $\mu$ L 上清液测定与底物 MUG 反应后的荧光值, 剩余提取液保存用于蛋白含量测定, 按 BRADFORD<sup>[7]</sup> 的方法进行。结果表明, pBGUS-SINEs 转化群体的表达水平普遍比不含 SINE 的 pBGUS 转化群体高, 单株平均高 2 倍, 非转基因烟草中则只测到本底活性, 见图 4~5。测定结果还表明, 无论是否携带 SINEs, GUS 表达活性在个体之间相差均很大, SINE 的存在不能降低转基因植株间表达水平的差异。

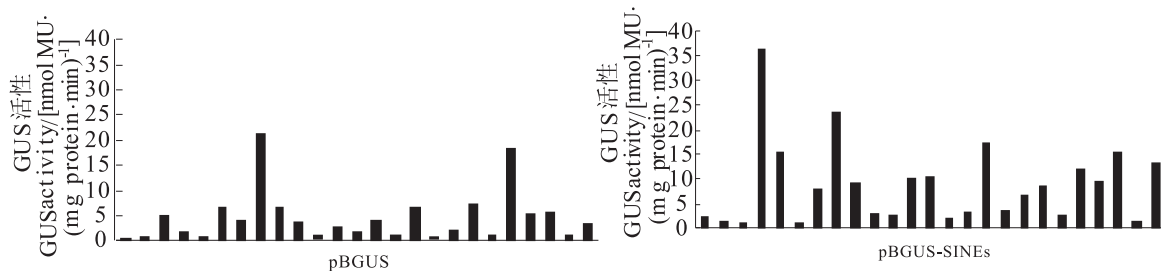


图 4 转基因烟草植株 GUS 活性检测

Fig. 4 GUS activities of transformed tobacco plants

注: *Ex365/Em455* 下测定转基因烟草叶片中 GUS 活性, 每个柱代表一个植株。

Note: GUS activity of transgenic tobacco leaves was measured at *Ex365/Em455*. Each column represents individual GUS activity of transgenic tobaccos.

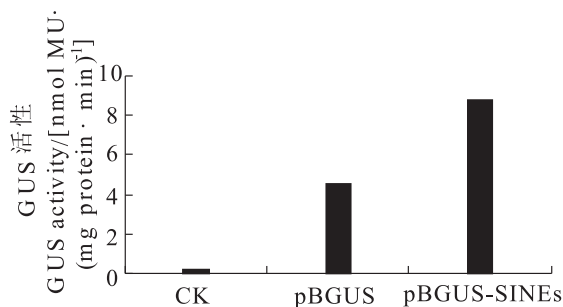


图 5 转基因植株平均 GUS 活性

Fig. 5 Average GUS activities of transformed tobacco plants

注: CK: 未经转化植株; pBGUS: 载体 pBGUS 转化所得的烟草植株; pBGUS-SINEs: 载体 pBGUS-SINEs 转化所得的烟草植株。

Note: CK: untransformed plants; pBGUS: tobacco plants transformed with vector pBGUS; pBGUS-SINEs: tobacco plants transformed with vector pBGUS-SINEs.

## 3 讨论

近 10 余年来, 许多学者进行了核基质结合区在基因工程操作中对外源基因表达效果的研究, 无论在植物系统还是动物系统, 多数情况下 MAR 的存在都提高了外源基因表达的水平, 然而在有些试验中, MAR 的引入却未提高表达的效果<sup>[8]</sup>。MARs 对转基因表达的作用, 与 MAR 本身的片段长度、碱基组成、结合能力、MARs 之间的距离、转化的方法、转化的组织类型等有关<sup>[9]</sup>, 因此, 在一个特定的转基因操作中, 一段 MAR 是否能提高转基因的表达水平, 事先难以作出准确的预测。

短散布元件广泛分布动植物复杂基因组中,

但迄今为止,从植物中分离,尤其是进行过详细研究的 SINEs 还非常少<sup>[10]</sup>。越来越多的证据表明,许多 SINE 在生物类群中的分布具有特异性,因此,近年来已有一些研究者利用 SINE 来探讨有关动植物类群的系统发生,以推动分子系统学的发展<sup>[4]</sup>。

TIKHONOV 等从芸苔(油菜)中克隆了 10 段 SINE 序列,这些 SINE 表现出一个非常有趣的现象:碱基组成上 AT 含量较高,其中 8 段与核基质的亲和力和均较强<sup>[1]</sup>,为检测稳定插入后对转基因表达的影响,本试验克隆了其中一段,并构建到 GUS 报告基因的两侧翼,转化烟草,测定了表达的水平,结果表明,含 SINEs 的转基因植株,外源基因的表达水平普遍比不含 SINEs 的转基因植株高,平均高 2 倍,这与大多数 MARs 研究结果基本一致,即将 SINEs 序列构建到外源基因的两侧后提高了转基因的稳定表达水平。研究结果同时表明,SINEs 的引入并不能消除个体间转基因表达的差异。

#### [参考文献]

- [1] TIKHONOV A P, LAVIE L, TATOUT C, et al. Target sites for SINE integration in Brassica genomes display nuclear matrix binding activity [J]. *Chromosome Research*, 2001, 9 (4): 325 - 337.
- [2] LENOIR A B, COURNOYER S I, WARWICK G. et al. Evolution of SINE Sl Retroposons in Cruciferae Plant Species [J]. *Mol. Biol. Evol.*, 1997, 14 (9): 934 - 941.
- [3] BORODULINA O R, KRAMEROV D A. PCR-based approach to SINE isolation: simple and complex SINEs [J]. *Gene*, 2005, 349: 197 - 205.
- [4] 韩德民,周开亚,王义权. 短散在元件(SINE)的研究进展 [J]. *生物化学与生物物理进展*, 2000, 27 (5): 461 - 464.
- [5] 王关林,方宏筠. 植物基因工程原理与技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [6] JEFFERSON R A. Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system [J]. *Plant Mol Biol Rep.*, 1987, 5: 387 - 405.
- [7] BRADFOLD M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding [J]. *Anal. Biochem*, 1976, 72: 248 - 254.
- [8] BOLLE MIGUEL, BUTAYE KATLEEN, GODERIS INGE, et al. The influence of matrix attachment regions on transgene expression in *Arabidopsis thaliana* wild type and gene silencing mutants [J]. *Plant Molecular Biology*, 2007, 63 (4): 533 - 543.
- [9] 黄慧珍,陈士云,吉万全,等. 核基质附着区与转基因表达 [J]. *中国生物工程杂志*, 2004, 24 (9): 2 - 6.
- [10] 程旭东,凌宏清. 植物基因组中的非 LTR 反转录转座子 SINEs 和 LINEs [J]. *遗传*, 2006, 28 (6): 731 - 736.