

猕猴桃果实特异表达异戊烯基转移酶基因植物表达载体的构建

王静毅^{1,2}, 朱道坤^{*}

(1. 河南农业大学林学院园艺学院, 河南郑州 450002; 2. 中国热带农业科学院生物技术研究所热带作物生物技术国家重点实验室, 海南海口 571101)

摘要 以pBI121质粒为载体, 将猕猴桃素基因启动子与ipt编码基因连接, 构建猕猴桃果实特异表达ipt嵌合基因。

关键词 猕猴桃; 植物表达载体; 猕猴桃素基因启动子; 异戊烯基转移酶基因

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)16-04773-02

Construction of Plant Expression Vector for Isopentenyltransferase (ipt) Gene Expressed mainly in Fruit of *Actinidia deliciosa*

WANG Jin-yi et al (College of Forestry and Horticulture, Henan Agricultural University, Zhengzhou, Henan 450002)

Abstract In the paper, a plasmid pBI121 was used to insert the chimeric gene to construct plant expression vector for ipt gene expressed mainly in the fruit of *Actinidia deliciosa*.

Key words *Actinidia deliciosa*; Plant expression vector; Actinidin gene promoter; ipt gene

外源基因表达量不足是得不到理想的转基因植物的重要原因。由于启动子在决定基因表达方面起关键作用, 因此选择合适的植物启动子和改进其活性是增强外源基因表达首先要考虑的问题^[1]。植物基因的启动子按其基因的表达方式分为组成型启动子、诱导型启动子和组织特异性启动子。其中组织特异性启动子调控基因在不同发育阶段及组织中表达, 是植物自身生长发育的需要, 因此对该类启动子的研究和应用越来越受重视^[2]。

异戊烯基转移酶(isopentenyl transferase, ipt)是细胞分裂素合成中的第一步关键酶, 它能催化异戊烯基焦磷酸和单磷酸腺苷的分解, 产生细胞分裂素的前体异戊烯基单磷酸腺苷(isopentenyl AMP, iAMP)。细胞分裂素对植物有多方面的生理功能, 如生产实践中施用外源细胞分裂素可有效增加籽粒的重量^[3], 诱导果树单性结实, 提高座果率, 增加糖酸比, 以及增大果实等^[4-5]。

在遗传转化方面, ipt基因已用于水稻、烟草、棉花、番茄等植物的转基因研究^[6-12]。关于基因在猕猴桃果实中特异表达问题, 已分离出猕猴桃果实特异表达猕猴桃素(actinidin)基因启动子^[13-14]。猕猴桃素是一种半胱氨酸蛋白酶, 只在猕猴桃幼果中开始呈现, 因而猕猴桃素基因启动子可以保证外源基因在猕猴桃果实中特异表达。笔者用猕猴桃素基因启动子与ipt编码基因连接构建成猕猴桃果实特异表达ipt嵌合基因, 以期ipt基因仅在猕猴桃果实中表达, 为提高猕猴桃单果重及果实品质的转基因工作奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料 质粒pRA-9由新西兰奥克兰大学提供, 内含1.3 kb的猕猴桃素基因启动子, 酶切位点为Xba / BamH。质粒pGEM-T Easy为中国热带农业科学院作物生物技术国家重点实验室惠赠, 内含0.72 kb的ipt编码基因, 酶切位点为BamH / Sac。各种限制性内切酶、T₄DNA连接酶、琼脂糖、Taq酶等分子生物学试剂均购自大连宝生物工程有限公司, 其余化学试剂为Sigma或国产分析纯产品。试验在河南

省农科院农作物新品种重点开放实验室进行。

1.2 植物表达载体构建方案 用pRA-9、pGEM-T Easy和pBI121质粒为出发质粒, 在植物表达载体pBI121质粒中构建猕猴桃果实特异表达AGP-ipt嵌合基因, 构建完成后的质粒称为pBI121AGP-ipt, 如图1所示。

1.3 方 法

1.3.1 质粒DNA提取与酶切。将带有出发质粒的大肠杆菌接种于相应抗生素浓度的LB液体培养基中, 过夜培养后按少量碱法提取并进行酶切^[15]。

1.3.2 酶切产物的纯化与回收。将酶切液用酚氯仿抽提液抽提纯化后用1%的低熔点Agrose胶电泳分离, 在紫外灯下用刀片切下目的片段, 放入1.5 ml Eppendorf管中, 使用PCR Fragment Recovery Kit从胶中回收DNA片段。

1.3.3 载体与片段的连接。将处理好的载体和要连接的片段以适当比例混合, 加1 μl 10×buffer, 加入双蒸水至总体积9.5 ml, 加入0.5 μl T₄DNA Ligase, 混匀, 16℃连接16 h以上。

1.3.4 转化菌落的PCR检测。根据猕猴桃素基因启动子的上游和下游序列设计的引物分别为: 5'-TCT AGA GGT TGA GAA GGT GGG TGT G-3', 5'-CAA TGG TGT TCT CTC TCG TTT TTT G-3'。

用牙签挑取转化菌落于PCR管中, 在94℃预变性10 min做为模板进行PCR扩增。反应条件为94℃预变性1 min; 94℃变性1 min, 58℃退火1 min, 72℃延伸2 min, 共30个循环; 72℃延伸10 min。PCR产物用1%的低熔点Agrose胶电泳检查。

1.3.5 酶切鉴定。用Xba / BamH, BamH / Sac分别双酶切质粒DNA, 并取酶切液进行电泳分析, 鉴定插入片段是否正确连接。

2 结果与分析

2.1 质粒DNA的酶切电泳 用BamH / Sac分别双酶切质粒pBI121和pGEM-T Easy。质粒pBI121酶切后可得到1条大片段和约1.8 kb的小片段(图2, 泳道1), 电泳回收大片段作为载体; 质粒pGEM-T Easy酶切后可得到0.72 kb的ipt编码基因小片段(图2, 泳道2), 回收后作为插入片段构建载体pBI121-ipt。

用Xba / BamH分别双酶切质粒pBI121-ipt和pRA-9。质粒pBI121-ipt酶切后得到1条大片段(图2, 泳道4), 回收作为载体; 质粒pRA-9酶切后可得到1.3 kb的猕

基金项目 河南省自然科学基金(0111011700)。

作者简介 王静毅(1978-), 女, 河南鹿邑人, 硕士, 助理研究员, 从事植物分子遗传育种研究。* 通讯作者。

收稿日期 2007-03-07

猕猴桃素基因启动子小片段(图2,泳道6),回收后作为插入片段构建猕猴桃果实特异表达异戊烯基转移酶基因植物表达

载体 pBI121 AGP - ipt。

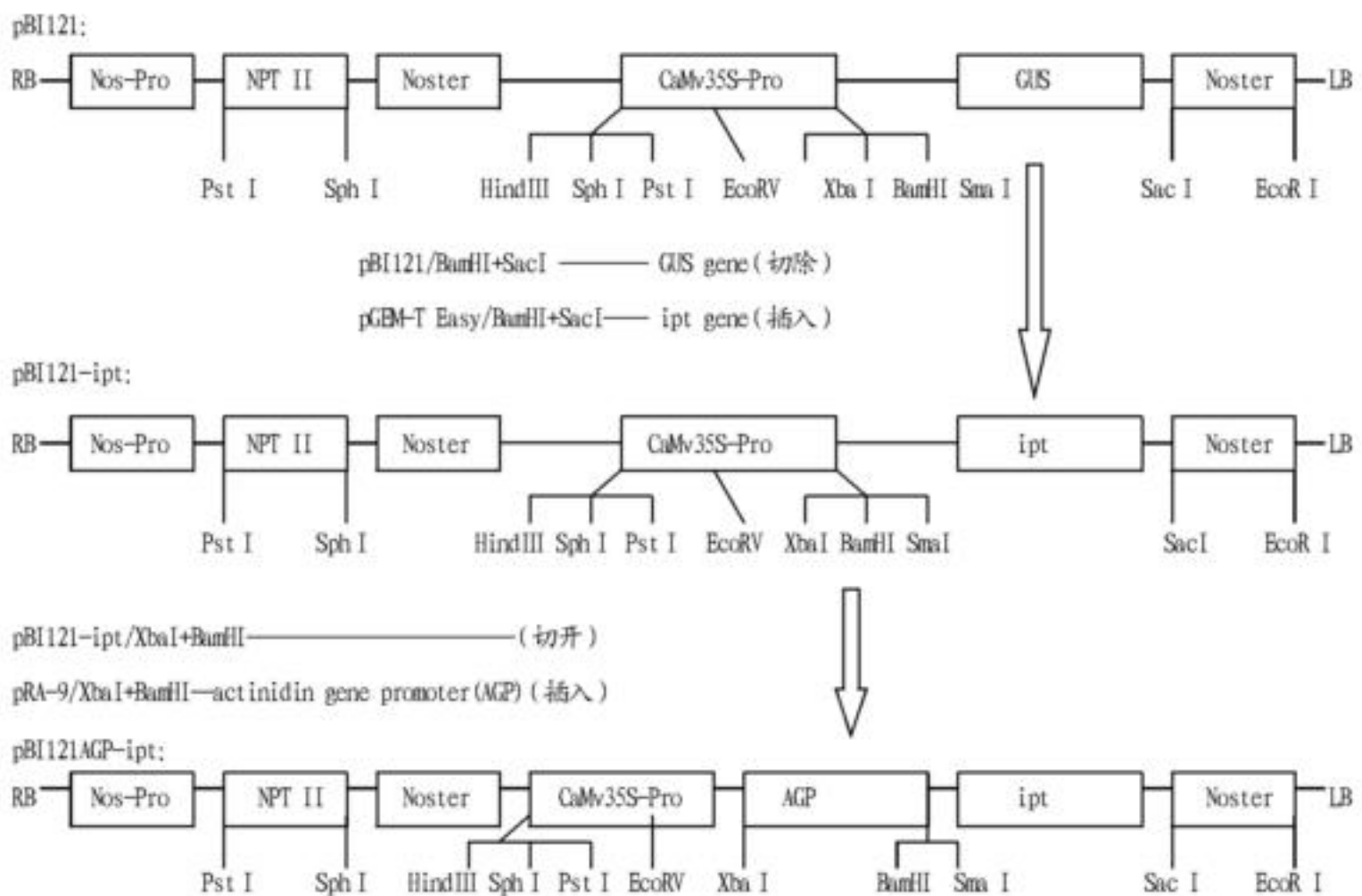


图1 猕猴桃果实特异表达ipt 基因植物表达载体的构建方案

2.2 转化菌质粒的PCR检测 挑取转化单菌落置1.5 ml 含相应抗生素的LB培养基中,37℃摇床震荡培养8~12 h。按照小量碱法提取质粒DNA,并进行PCR检测。电泳分析时用含有猕猴桃素基因启动子的pRA-9质粒和不含该启动子的pBI121-ipt质粒PCR作为对照。试验结果显示,pRA-9质粒扩增出1.3 kb 明亮片段(图3,泳道3),转化质粒pBI121AGP-ipt扩增出1.3 kb 明亮片段(图3,泳道4),而pBI121-ipt质粒未扩

表达载体。先将ipt 插入pBI121中,在得到的菌落中随机挑取7个单菌落进行酶切鉴定。结果发现,有6个单菌落可切出0.72 kb 的ipt 基因,转化效率达86%。随后将猕猴桃素基因启动子插入pBI121-ipt中,再次随机挑选12个所得的菌落进行PCR鉴定。结果有7个单菌落可扩增出1.3 kb 明亮片段,随后酶切鉴定也证实了猕猴桃素基因启动子的正确插入,其转化效率达58%。

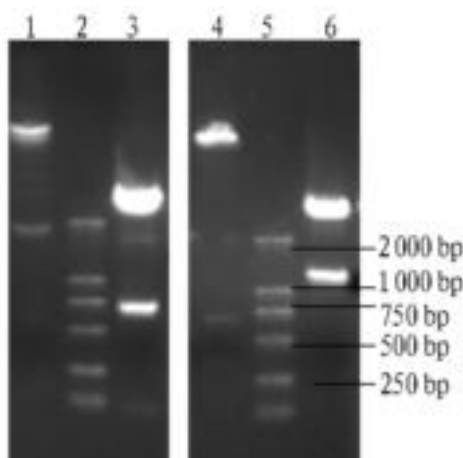
3 小结与讨论

在早期的研究中,用CaMv35S启动子调控ipt 基因在转化组织中表达,转基因植株都表现为细胞分裂

素的含量增加,叶片衰老延迟,同时植株的生长发育形态也发生了许多不正常的变化,如,叶片变小、顶端优势丧失、不能形成根或形成的根不能伸长等。为获得生长发育正常的转基因植株,可利用组织特异性启动子调控ipt 基因表达,使ipt 基因的表达具有一定的时空特异性。笔者用猕猴桃素基因启动子与ipt 编码基因连接构建成猕猴桃果实特异表达ipt 嵌合基因,以期ipt 基因仅在猕猴桃果实中得到表达,改变转基因植株生长发育不正常的状况。

在对猕猴桃果实特异表达异戊烯基转移酶基因植物表

(下转第4788页)



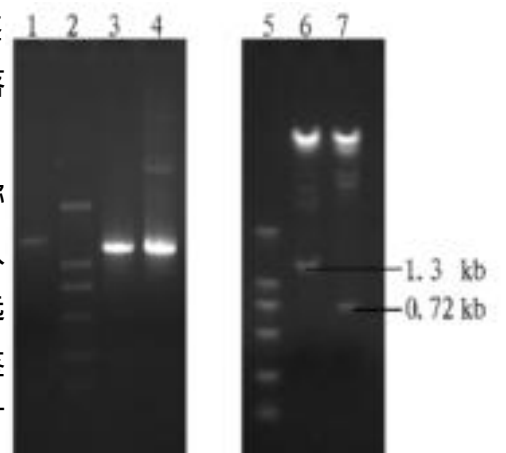
注:泳道1为质粒pBI121酶切电泳图谱;3为质粒pGEM-T Easy酶切电泳图谱;4为质粒pBI121-ipt酶切电泳图谱;6为质粒pRA-9的酶切电泳图谱;2和5为DNA分子量标准。

图2 质粒的酶切电泳图谱

扩增出1.3 kb 条带(图3,泳道1),说明猕猴桃素基因启动子已成功转入质粒pBI121AGP-ipt之中。

2.3 转化菌质粒的酶切鉴定 挑取转化单菌落置1.5 ml 含相应抗生素的LB培养基中,于37℃摇床震荡培养8~12 h,按照小量碱法提取质粒DNA,然后用XbaI/BamHI与BamHI/SacI分别进行双酶切,若载体与片段连接成功,则可分别切出1条1.3 kb和1条0.72 kb的片段(分别为猕猴桃素基因启动子和ipt 基因)。图3表明,转化质粒pBI121AGP-ipt经酶切后切出了相应的片段,说明猕猴桃素基因启动子与ipt 基因已经插入载体,并被成功切出(图3,泳道6和7)。

2.4 载体与片段的连接效率 根据构建方案,试验用分步连接法构建猕猴桃果实特异表达异戊烯基转移酶基因植物



注:泳道1为质粒pBI121-ipt的PCR鉴定结果;3为质粒pRA-9的PCR鉴定结果;4为质粒pBI121AGP-ipt的PCR鉴定结果;6和7为质粒pBI121AGP-ipt的酶切电泳图谱;2和5为DNA分子量标准。

图3 转化质粒pBI121Actinidin-ipt PCR及酶切鉴定

(上接第4774页)

达载体 pBI121AGP-ipt 的构建过程中,还根据酶切位点情况试验了一步连接法,即将猕猴桃素基因启动子与 ipt 基因同时插入 pBI121 中。但是,3 个片段同时连接得到 48 个单菌落的 PCR 检测结果表明,仅有 4 个单菌落扩增出 1.3 kb 的猕猴桃素基因启动子的明亮片段,转化率仅为 8%。对比分步连接法中第 1 步的转化效率 86% 和第 2 步的转化效率 58%,可得分步连接法明显优于一步连接法。

参考文献

- [1] 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.
- [2] 张春晓,王文棋,蒋湘宁,等.植物基因启动子研究进展[J].遗传,2004,31(12):1455-1464.
- [3] PANDE P C, SHUKLA S D, KUMAR R. Some consequences of the manipulation of growth in wheat and triticale[J]. Annals of Agricultural Research, 1987,8(1):41-46.
- [4] 罗正荣.新植物生长调节剂 CPPU 及其在果实和蔬菜上的应用[J].植物生理学通讯,1993,29(1):297-299.
- [5] 方金豹,黄海,周润生,等.CPPU 对促进猕猴桃增大的研究[J].果树科

学,1996,13(S):37-41.

- [6] 付永彩,孙传清,李自超,等.农杆菌介导的抑制衰老的嵌合基因转化籼稻的研究[J].农业生物技术学报,2000,8(1):28,32.
- [7] 付永彩,刘新仿,曹守云,等.水稻中抑制衰老的嵌合基因基因枪转化和表达分析[J].农业生物技术学报,1999(1):17-22.
- [8] 耿飒,麻密,李国凤,等. ipt 基因定位表达对转基因烟草育性的影响[J].植物学报,2000,42(2):217-220.
- [9] 于晓红,朱勇清,陈晓亚,等.种子特异表达 ipt 转基因棉花根和纤维的改变[J].植物学报,2000,42(1):59-63.
- [10] 张赛群,叶志彪,吴昌银,等.异戊烯基转移酶基因导入番茄及转基因植株再生[J].园艺学报,1999,26(6):376-379.
- [11] 毛自朝,于秋菊,甄伟,等.果实专一性启动子驱动 ipt 基因在番茄中的表达及其对番茄果实发育的影响[J].科学通报,2002,47(6):444-448.
- [12] MARIINEAUB. High yields to tomato shows promise in the field [J]. Agbiotech News and Information, 1995,7(5):104-105.
- [13] SNOWDEN K C, GARDNER R C. Nucleotide sequence of an actinidin genomic clone [J]. Nucleic Acids Research, 1990,18(22):66-84.
- [14] HINE, BURNS D J W, GARDNER R C. Fruit developmental regulation of the kiwifruit actinidin promoter is conserved in transgenic petunia plants [J]. Plant Molecular Biology, 1993,23(3):489-499.
- [15] SAMBROCK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. 分子克隆实验指南[M]. 2版.金冬雁,黎孟枫,译.北京:科学出版社,1996.