

启动子对外源基因在转基因植物中表达的影响

晏小兰* 邱国华 李宝健

(中山大学生物工程研究中心, 广州 510275)

摘要 将来自 pBI121 质粒的 CaMV35S 启动子片段插入到 pBI121 的 CaMV35S 启动子与 GUS 基因之间, 构建了串联的 CaMV35S 启动子载体 pLB38. 通过三亲交配, 将 pBI121 及 pLB38 分别转移到含 pGV3850 的农杆菌中, 成为适合本研究的双元载体. 以叶圆盘转化法将外源基因转入烟草, 获得了 2 种转基因植株. 经 DNA 分子杂交、NPT I 点分析、GUS 荧光定性及定量分析, 证明外源基因已整合进烟草基因组并获得表达. pLB38 的 GUS 表达量为 pBI121 的 3~4 倍, 这表明启动子数目的不同会直接影响其启动基因的表达水平.

关键词 CaMV35S 启动子串联, 质粒构建, 农杆菌转化, 转基因烟草, 基因表达

分类号 Q81

基因的表达和调控是植物基因工程研究的中心内容之一, 目前, 对特异性启动子的研究已成为一个热点, 利用植物转化的方法, 许多启动子的表达特异性也已研究得较为清楚^(1~7). 已知启动子的串联能增强外源基因在转基因植株中的表达效果⁽⁴⁾. 本文将新霉素磷酸转移酶 (Neomycin Phosphatetransferase, NPT II) 基因和 β -葡萄糖苷酸酶 (β -glucuronidase, GUS) 基因转入烟草, 试图研究在串联的双启动子控制下的 GUS 基因在转基因烟草中的表达效果.

1 材料和方法

1.1 材料

植物材料 烟草无菌试管苗, 品系 SRI, 由美国 Cornell 大学 BTI 研究所提供;

细菌材料 含质粒 pBI121 (卡那霉素抗性, Km^R, 物理图谱见图 1) 的大肠杆菌由新加坡国立大学分子和细胞生物学研究所潘永忠博士提供. 大肠杆菌 HB101 (链霉素抗性, Sm^R)、含协助质粒 (helper plasmid) 的 pGJ23 (Km^R; 四环素抗性, Tc^R) 的大肠杆菌、含 pGV3850 (氨苄西林抗性, Ap^R) 的根癌农杆菌由比利时 Gent 大学提供.

收稿日期: 1993-11-03

* 现在广州市教育学院生物学系工作; 徐增富参加部分工作

1.2 方法

1.2.1 植物基因工程载体的构建 提取和纯化质粒 DNA^[8,9], 酶切和连接 DNA^[10], 采用 CaCl₂ 沉淀法^[8]转化. 获取平头末端^[11,12], 并进行平端连接^[12,13]. 以抗性平板筛选转化子, 然后比较转化子及原质粒 pBI121 的分子量大小, 筛选重组子, 再将重组子用 XbaI 酶切, 选出正接顺序的重组子. 进行三亲交配^[14], 将构建好的大肠杆菌质粒转移至致瘤农杆菌中.

1.2.2 植物转化 用叶圆盘法^[1]转化, 使用的培养基为 MS 盐 B₅ 培养基的维生素, 加入 6-BA 1.0 mg/L 和 NAA 0.1 mg/L. 在含 Km100 mg/L, Cef 500 mg/L 的培养基上长出转化烟草植株.

1.2.3 转化植株的鉴定 DNA 分子杂交. 提取纯化植物总 DNA^[15], 酶切后进行 DNA 转移^[10]、制备探针^[16], 并进行预杂交、杂交及放射自显影. 同时还进行了 DNA/DNA 的点杂交.

NPT I 点滴检测. 提取并检测转化、未转化植物的 NPT I 酶活性^[16].

GUS 活性的荧光法定性、定量测定. 参照 Jefferson 等^[17]的方法改进, 检测了未转化、转化植株的 GUS 基因的定性、定量表达.

2 实验结果

2.1 串联 CaMV35S 启动子的构建

本实验的启动子来源于 pBI121^[17], 其结构及质粒构建图如图 1, 该启动子长为 800bp, 从 pBI121 中分离此片段并补平后, 再插入 pBI121 的 BamHI 补平的末端. 转化子用电泳法筛选, 分子量比 pBI121 大的转化子即为重组子. 为了确定启动子连接的顺序, 用紧

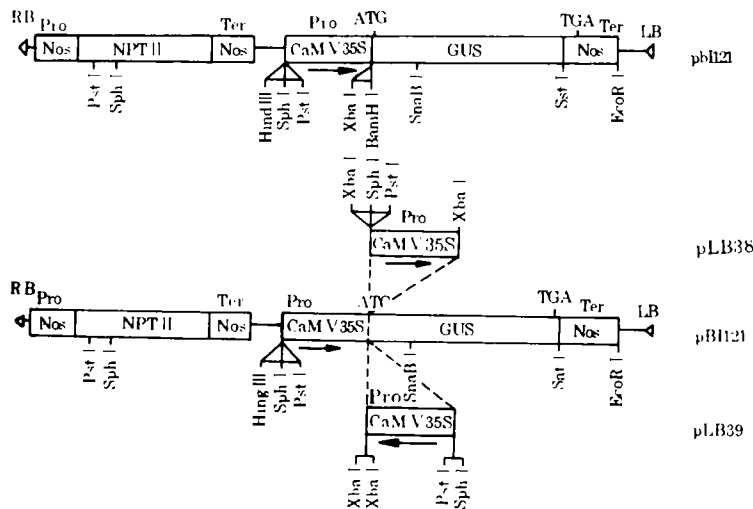
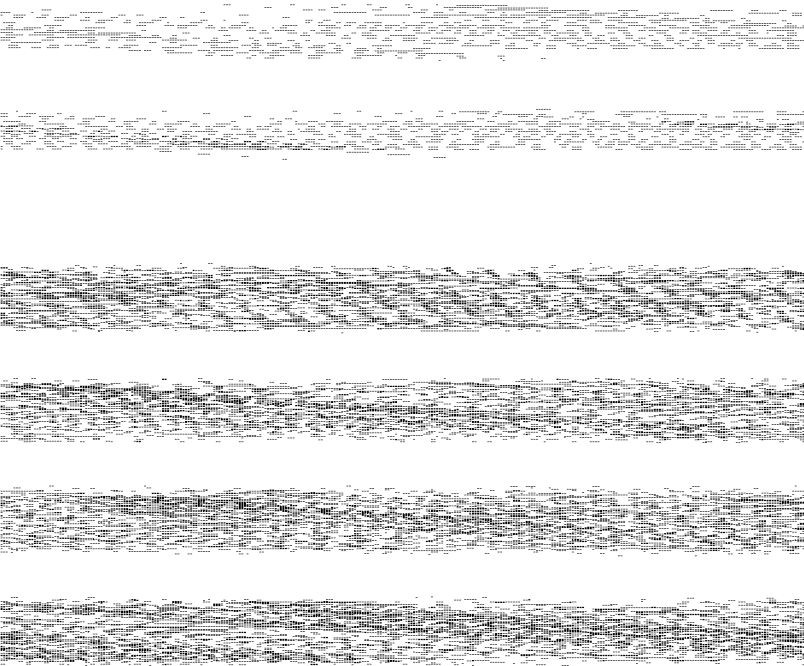


图 1 质粒 pBI121 及构建质粒 pLB38, pLB39 结构

Fig. 1 The structure of plasmid pBI121 and constructed plasmid pLB38, pLB39



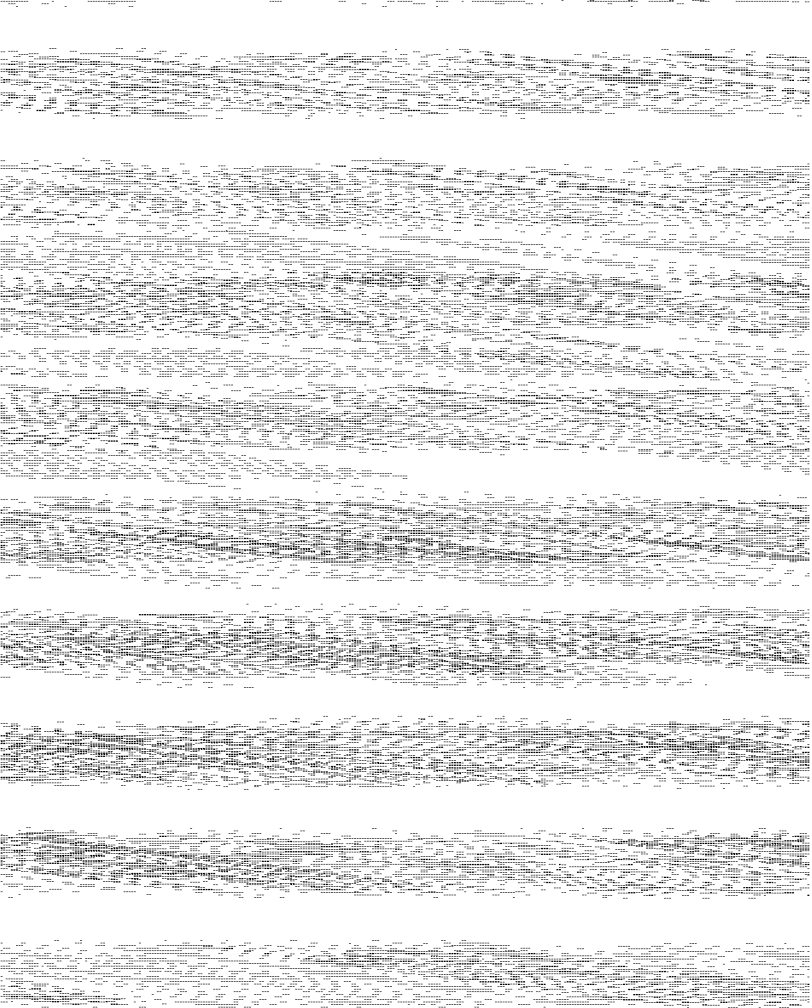


表 2 转化植株在不同阶段的 GUS 相对活力

Tab. 2 The relative activity of GUS in various stages of transformed plants

材 料	时 间(min)					
	0	15	30	45	60	
叶 盘	CK 株	0.002	0.020	0.031	0.047	0.058
	pBI121 株	0.002	0.050	0.073	0.103	0.131
	pLB38 株	0.003	0.150	0.203	0.348	0.408
愈 伤 组 织	CK 株		0.040	0.051	0.064	0.070
	pBI121 株		0.283	0.352	0.487	0.502
	pLB38 株		1.040	1.409	1.882	2.099
芽	CK 株		0.045	0.057	0.069	0.076
	pBI121 株		0.300	0.363	0.499	0.535
	pLB38 株		1.193	1.446	1.807	2.103
苗	CK 株		0.043	0.060	0.072	0.079
	pBI121 株		0.0388	0.370	0.587	0.541
	PLB38 株		1.220	1.460	1.943	2.138

3 讨 论

3.1 植物基因工程载体的构建

经电泳法筛选出含双启动子的重组子后,用 XbaI 酶切确证启动子的插入方向.从图 1 的质粒构建图中可以看到,两启动子同向(转录方向)串联时,2 个 Xba I 位点的间隔正好是一个启动子的距离,而反向相接时,则只相距几个碱基对,即用 Xba I 酶切后分别得到 2 个片段(~12kb, 0.8kb)和一个大片段(~128kb).电泳后如图 2E,出现两种带,是正接;图 2C,只有一条带,是反接.由此构建了合适的中间载体 pLB38.通过三亲交配,构建了用于植物转化的载体.根据如下:1).三亲交配后,经多次抗性筛选,接合子生长良好,证明 pBI121 和 pLB38 分别进入了含 Ti 质粒 pGV3850 的根癌农杆菌中,并可以在其中稳定地复制;吴世寅等^[18]就以此方法筛选了作为转化植物所用的工程菌种;2).在 pBI121 和 pLB38 质粒上,所需转化的外源基因均在 T-DNA 内,而 pGV3850 上则含有转化所必需的 Vir 基因,其 T-DNA 内没有有益基因,这样,不管是以双元质粒还是其整合质粒状态的存在下,都可以将外源基因转移并整合到植物染色体上;3).pBI121, pLB38 上的外源基因均分别由独立的启动子和终止子控制,故可以在植物体内正常转录和表达;4).转基因植株的分子杂交结果及外源基因的产物分析直接证明了此载体适用于植物转化.

3.2 植物转化及其核酸鉴定

转化烟草叶盘可以在含 100mg/L 的 Km 培养基上相继长芽,长根,直至长成健壮的小植株,表明是 Km 抗性表型.而未转化的叶盘则明显不耐 Km 毒性,在选择培养基上逐渐枯萎死亡.如图 3~5 的 DNA/DNA 点杂交及 Southern 杂交的结果表明外源基因的拷贝已整合到植物的基因组中.特别是图 5 的 Southern 杂交中,转基因植株总 DNA 的 Hind III 和

EcoRI 酶切物中含有与探针(pBI121 的 Hind II 和 EcoRI 酶切片段,含 CaMV35S 启动子和 GUS 基因)相同分子量的同源片段,在转基因植物的总 DNA 中,与探针杂交的是分子量约 40kb 的位置,而在对照中则不出现杂交带,这样就无可辩驳地证明了外源基因已经整合进植物的基因组中.

3.3 外源基因在转基因植物中的表达

本实验用 NPT II 的点杂交及液闪记数定性和粗略定量地分析了外源的 NPT II 基因在转基因植株中的表达.从表 1 和图 6 可以看出,由 pBI121 和 pBL38 所转化的植株,它们的 NPT II 酶的活力并没有显著的区别,并且它们的愈伤组织和幼苗的表达产物也差不多,这是因为它们的基因及启动子都是相同的,因而表达的产物也差不多.

同时,对另一外源基因—GUS 基因和酶活性也作了定性和定量的分析,图 7 和表 2 的结果表明,外源的 GUS 基因在转基因的植株中得到了表达,并且,由双启动子控制的 GUS 活性比单启动子控制的 GUS 活性高出 3~4 倍,说明启动子的串联能够提高基因表达的水平.1987 年 Kag R 等^[4]就报导了类似的结果.

根据目前对于基因表达与调控的了解,串联的启动子能提高基因表达的水平,可能的原因有 1). CaMV35S 启动子含 CAAT 盒及很丰富的 GTGG 和 CCAC 序列^[19],这些序列可增加启动子的转录水平,启动子的串联,相应增加了这些序列的拷贝数,因而起到一定的增强作用;2). 启动子的内部有多个顺式作用因子,这些顺式因子相互协同作用对基因表达起一定的调控作用;3). 启动子经串联后,前一个启动子可能起着增强子的作用.

另外,在 GUS 基因的表达产物分析中也发现,同一种转基因植株的外源基因表达产物在芽和苗中没有显著的区别,这可能是因为在单位质量的外植体中,外源基因的拷贝数或是 mRNA 等基因表达的中间产物并没有增加的缘故.

参 考 文 献

- 1 Horsch R B, Fry J E, Hoffmann N L et al. *Science*. 227(1985):1229~1231
- 2 Michael W L, Joseph M P, Yoder J I. *MGG*, 218(1989):25~32
- 3 Benfey P N, Chua N H. *Science*, 250(1990):959~966
- 4 Kay R, Chan A, Dalg M, J Mcpherson *Science*, 1987,236:1299~1302
- 5 Benfey P N, Ren L, Chua N H. *The EMBO J*. 1989,8:2195~2202
- 6 Benfey P N, Ren L, Chua N H. *The EMBO J*, (1990)9(6):1677~1684
- 7 Benfey PN, Ren L, Chua N H. *The EMBO J*, 1990,9(6):1685~1696
- 8 Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory. Newyork, 1982
- 9 刘伟民,杨志兴. *遗传*, 1987,9(1):43~44
- 10 彭秀玲,袁汉英. *基因工程实验技术*. 长沙:湖南科学技术出版社. 1987
- 11 邹福强,梁意昭,周桢林等. *基因操作技术*. 广州:广东科技出版社. 1986
- 12 陈炬,孙勇如,李向辉等. *中国科学(B辑)*, 1990,3:253~260
- 13 Murry J A H. *Nucleic Acid Res*, 1986,14:10118
- 14 Van Haute E, Joos H, Maes M et al. *The EMBO J*, 1983, 2(3):411~417
- 15 Paszkowski J, Shittito R D, Sanl M et al. *The EMBO J*, 1984, 3(12):2717~2722

- 16 王金发, 李宝健. 植物遗传分子遗传及基因工程专辑. 中山大学学报论丛, 1989, 8(4): 166~169
- 17 Jefferson R A, Kavangh T A, Bevan M W. The EMBO J, 1987, 6(13): 3901~3907
- 18 吴世宣, 赵淑珍等. 中国科学(B 辑), 1989, 90: 948~956
- 19 顾治萍, 周雪荣, 熊澄. 生物工程学报, 1989, 9(3): 42~46

Directed Duplication of CaMV35S Promoter Influences the Expression of the Foreign Genes in Transgenic Plants

Yan Xiaolan Qiu Guohua Li Baojian*

Abstract The mediated vector pLB38 was constructed by insertion the 800 bp fragment of CaMV35S promoter from the plasmid pBI121 into the BamH I site between the CaMV35S promoter and GUS gene of the pBI121 and screening the recombinants containing the directed duplicate of CaMV35S promoter with Xba I digest. The plasmid pBI121 and pLB38 were introduced into the *Agrobacterium tumefaciens* containing Ti plasmid pGV3850 by triparental — mating technique with the aid of helper plasmid pGJ23.

The foreign genes in pLB38 and pBI121 were transferred into the tobacco plants using the leaf — disk co — cultivated method and two kinds transgenic plants were obtained.

DNA/DNA dot blot and Southern blot with α — 32P labelled probe containing 3kb fragment of CaMV35S — GUS confirmed that foreign genes were transferred and integrated into the transgenic tobacco plant genome. The identification of the product of NPT II gene with NPT II dot assay, GUS gene with GUS fluorescent assay proved that the foreign NPT II and GUS gene were expressed in transgenic plants. And the GUS activity in pLB38 — transformed plants in which the GUS gene was controlled by two directed CaMV35S promoters was three — to four — fold higher than that in the pBI121 — transformed plants in which the GUS gene is controlled by single CaMV35S promoter. These results suggested that the promoter number has effect on the expression level of genes controlled by these promoters.

Keywords directed duplication of CaMV35S promoter, plasmid construction, *A. tumefaciens* — mediated transformation, transgenic tobacco, gene expression

* Biotechnology Research Center, Zhongshan University, Guangzhou 510275