

蓝猪耳启动子捕获系统的建立

龙海涛, 李洪清, 李 玲

(华南师范大学 生命科学院 广东 广州 510631)

摘 要: 为了分离基因启动子, 构建了陷阱植物表达载体 pHAHCA, 用农杆菌介导的无启动子 GUS 方法转化蓝猪耳, 经抗性筛选和 PCR 检测, 获得 82 株转基因植株, 转化率达 12.5%。12 株 GUS 染色呈阳性, 其中 10 株 GUS 在叶脉表达, 2 株在茎和叶脉表达。对转基因植株进行盐胁迫处理, 有 1 株根部出现 GUS 染色蓝色斑点。通过 TAIL-PCR 扩增和测序, 获得 5 个 T-DNA 侧翼序列。

关键词: 启动子捕获; T-DNA 侧翼; GUS 报告基因; 蓝猪耳

中图分类号: S 681.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001—0009(2008)05—0181—04

蓝猪耳(*Torenia fournieri* Linden) 属玄参科蓝猪耳属, 是热带亚热带地区 1 a 生观赏花卉植物, 其生长周期短、容易再生且具备特殊的裸露胚囊^[1], 是植物细胞分化、花器官发育和授粉受精研究的理想模式植物^[2]。近年来通过传统育种和分子育种等方法已获得了蓝猪耳的变种, 其改变了花色、花型、花期以及提高其对环境的适应性^[3-5]。研究室前期工作建立了蓝猪耳高频再生体系^[6] 和农杆菌介导的遗传转化体系^[2, 7]。

基因启动子是指 RNA 聚合酶识别、结合和开始转录的一段 DNA 序列, 是基因表达调控重要的顺式作用元件, 在很大程度上决定着目的基因表达的时间、空间和强度。分离和鉴别启动子, 研究启动子的结构和功能, 了解启动子时空专一性表达特征及其作用机制, 不仅具有基因表达调控的重要意义和潜在的巨大的实用价值^[8]。目前分离捕获启动子主要利用陷阱技术, 通过建立高效稳定的启动子捕获系统, 构建包含报告基因随机插入整个基因组的个体突变体库^[9-12]。

研究将构建蓝猪耳启动子捕获系统, 旨在分离启动子, 为研究其结构和功能以及为植物表达外源目的基因提供新的启动子资源打下基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料、菌株、载体、工具酶

植物材料为蓝色花类型的蓝猪耳品种。大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 、根癌农杆菌 EHA 101、克隆载体 pCAM-

BIA1200 和质粒 pAHC27 实验室自存。pMT18 载体和各种工具酶为 TaKaRa 公司产品; 质粒快速提取试剂盒、DNA 快速纯化和回收试剂盒购自上海博能申彩公司。

1.2 植物表达载体的构建和工程菌种的获得

pCAMBIA1200 和 pAHC27(图 1) 分别用 EcoRI 和 XbaI 双酶切, 获得线性 pCAMBIA1200 和 2.3 kb 无启动子的 GUS 基因, 纯化后连接转化 *E. coli* DH5 α , 经酶切鉴定(图 2) 获得启动子陷阱植物表达载体 pAHCA, 质粒冻融法转化根癌农杆菌 EHA101, 根据 GUS 基因设计引物(GUS1: 5' ACGGATCCATATTACGTCCTGTAGA AACC3', GUS2: 5' ACCTGCAGTCATTGTTTGCCTC-CCTGCT3'), 经 PCR 鉴定(图 3) 获得工程菌种 pAHCL。

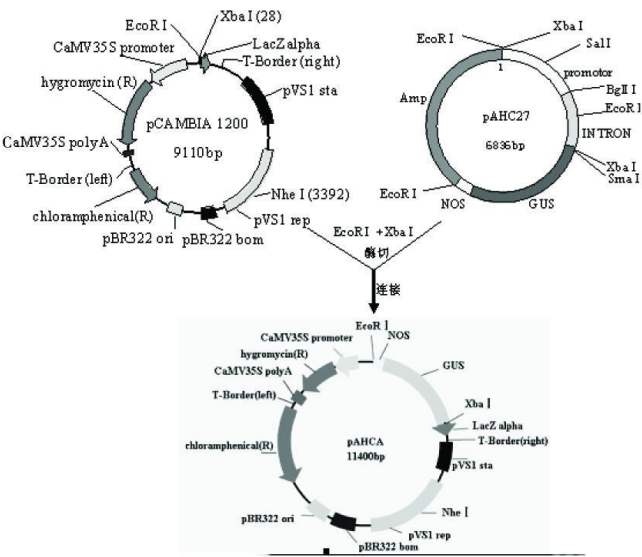


图 1 表达载体 pAHCA 的构建

第一作者简介: 龙海涛 (1979-), 男, 湖南邵阳人, 硕士, 助教, 现从事生化与分子生物学教学及科研工作。E-mail: longht@scnu.edu.cn.

通讯作者: 李玲。E-mail: lilab@scnu.edu.cn.

基金项目: 广东省自然科学基金资助项目 (003062)。

收稿日期: 2008-01-30

1.3 蓝猪耳转化和抗性筛选

将含有 pAHCL 农杆菌接种于含 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 乙酰丁香酮(AS)的诱导培养基(1/2 MS),活化后稀释至 OD600 为 0.5。浸染嫩叶片 5~10 min,在含 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ AS 的愈伤组织共培养基(MS+ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA+ $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D)、 25°C 暗培养 4 d,转入含 $500 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 头孢霉素(Cef)、 $12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 潮霉素(Hyg)愈伤组织选择培养基(MS+ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA+ $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 2,4-D)14 d。在含 $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cef 芽选择培养基(1/2 MS+ $1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ BA+ $0.1 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ NAA)培养 7 d,用 $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cef、 $12 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Hyg 的芽选择培养基培养 28 d。在含 $400 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cef、 $15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Hyg 的生根培养基(1/2 MS)生根筛选 21 d 获得抗性植株。

1.4 PCR 检测和 GUS 活性分析

采用 CTAB 法^[14]提取植株基因组 DNA,根据 T-DNA 区域潮霉素抗性基因设计引物,引物间序列长度为 375 bp。引物序列为 Hph1: 5'-GCTGGGGCGCTCG-GTTTCCACTATCGG 3', Hph2: 5'-CGCATAACAGCG CTCATTGACTGGAGC3'。20 μL PCR 反应体系: 15 ng 模板 DNA, $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Hph1, $1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ Hph2, 0.4 U Taq 酶 $200 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP, $10\times$ buffer

2 μL 。反应程序: 94°C 变性 3 min 后,依次在 94°C 变性 30 s、 55°C 退火 30 s、 72°C 延 1 min 的条件下循环 30 次,最后 72°C 反应 10 min。PCR 反应结束后,取 10 μL 在 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳检测。

GUS 活性分析参照 Jefferson^[13] 的方法进行。

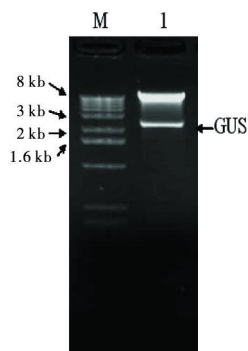


图2 pAHCA 的 *EcoRI*+
XbaI 双酶切检测
注: M: 1 kb DNA ladder
Marker; 1: pAHCA。

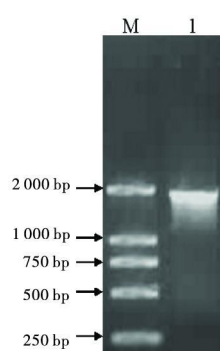


图3 pAHCA 的
PCR 检测
注: M: DL2000DNA
Marker; 1: pAHCL。

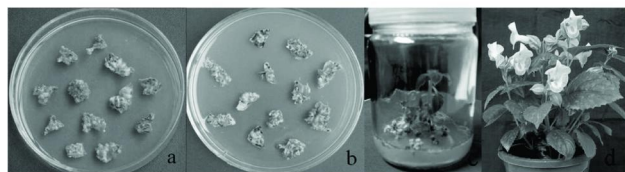


图4 农杆菌介导蓝猪耳的转化
注: a: 抗性愈伤诱导; b: 抗性芽体诱导;
c: 抗性植株生根筛选; d: 抗性植株。

1.5 TAIL-PCR 法逐步扩增 T-DNA 侧翼序列, 寻求分离启动子

TAIL-PCR 参照 Liu 等^[15-16] 的方法。特异引物按照双元载体 pCAMBIA 1200 的 T-DNA 右边界进行设计,由里往外依次为引物 1 (5'-CAACTTAATCGCCTTG-CAGCACATC 3')、引物 2 (5'-GGCGTAATAGCGAAG-AGGCCCCGA 3')和引物 3 (5'-CAGATTGTCGTTTC-CCGCCTTC AG 3')。随机引物采用 Liu 等^[15-16] 的随机引物 AD (5'-NTCGA (G/C) T (A/T) T (G/C) G (A/T) GTT 3')。第一轮 PCR 反应的退火温度分别为 61°C 、 67°C 和 44°C 。取第一轮产物稀释 50 倍作为第二轮 PCR 扩增模板,退火温度分别为 60°C 和 44°C 。取第二

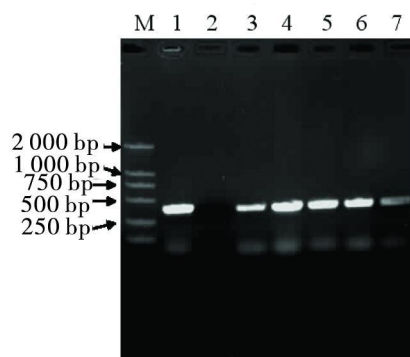


图5 转基因蓝猪耳抗性植株 PCR 检测
注: M: DL 2000 DNA Marker; 1: pAHCL;
2: 非转基因植株; 2~7: 转基因抗性植株。

轮产物稀释 50 倍作为第三轮 PCR 扩增模板,退火温度为 44°C 。当 3 轮 PCR 进行完毕,取 TAIL-PCR 第 2、3 轮的产物电泳检测、测序。通过 GeneBank 对获得的 T-DNA 侧翼序列进行核苷酸和氨基酸序列同源性比对和相关分析。

2 结果与分析

2.1 蓝猪耳的遗传转化、抗性筛选及分子生物学检测

对 GUS 基因设计引物,经 PCR 检测 pAHCL,获得约 1.8 kb 特异片段(图 3),与所设计引物间序列大小相符,证实 pAHCA 成功转入农杆菌。GUS 基因连接 pCAMBIA1200 T-DNA 区域内的 GUS 基因上游仍然没有启动子,T-DNA 随机插入到植物基因组 DNA 后,若

GUS 基因能表达,则表明其上游存在着植物启动子。

将 656 块叶片外植体分别移入含 $500\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cef 和 $12\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Hyg 的愈伤组织选择培养基培养 14 d, 获得愈伤组织(图 4a), 移入含 $400\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Cef 和 $12\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Hyg 的芽选择培养基上分化出芽(图 4b), 将 0.5 cm 的抗性芽转入生根培养基, 能发生生根生长的小苗(图 4c)推测为拟转基因的抗性植株, 共获得 115 株抗性植株(图 4d)。经 PCR 检测(图 5), 有 82 株出现目的片段, 确认为转基因植株, 转化率(转基因植株数/外植体数)达 12.5%。

2.2 GUS 活性分析

对转基因植株的根、茎、叶器官进行 GUS 组织化学染色分析, 发现有 12 株植株 GUS 染色呈阳性, 其中 10 株蓝色斑点发生在叶脉部位(图 6a), 2 株出现在茎和叶脉(图 6b, c)。

为了获得盐胁迫特异型启动子, 对转基因植株进行高盐处理(根浸入 25°C 的 $200\text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ NaCl 溶液, 4 h 后植株完全萎蔫)。检测器官 GUS 活性, 结果表明: 有 1 株植株根部出现蓝色斑点(图 6d)。

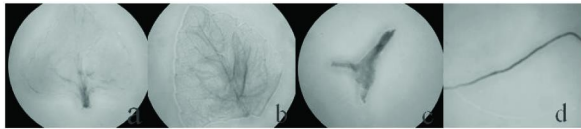


图 6 转基因植株 GUS 染色分析

注: a: 1 号植株叶片; b, c: 11 号植株叶片, 茎; d: 13 号植株高盐胁迫根系。

2.3 TAIL-PCR 法逐步扩增 T-DNA 侧翼序列, 寻求分离启动子序列

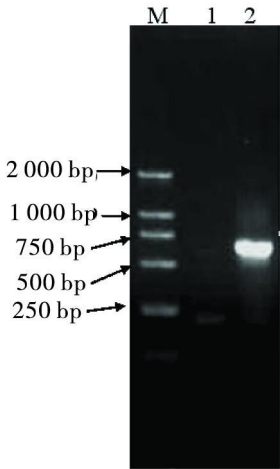


图 7 1 号转基因蓝猪耳 TAIL-PCR 产物琼脂糖凝胶电泳分析

注: M: DL 2000 DNA Marker; 1: Tail-PCR 第二轮产物; 2: Tail-PCR 第三轮产物。

对 GUS 染色呈阳性的 13 株植株进行 Tail-PCR 分析, 有 5 株获得特异扩增片段, 扩增片段最短为 300 bp, 最长为 2 kb。以 1 号植株为例: PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳, 第 2 轮无特异性电泳带出现, 但第 3 轮产物特异性较强, 扩增片段约为 700 bp 左右(图 7), 经测序表明 394 bp 为植物序列(图 8)。经 GenBank 分析, 其与拟南芥羧酸酯酶(β -酯酶)同源核苷酸序列为 91%, 同源氨基酸序列为 57%, 需以所获序列逐步进行 Tail-PCR, 最终获得启动子序列。

3 讨论

启动子陷阱技术可以建立高效稳定的启动子捕获系统, 构建包含报告基因随机插入整个基因组的个体突变体库, 已成为当前未知序列基因启动子的克隆的主要途径之一。目前认为, 只有报告基因插入启动子附近, 即报告基因才表达, 这些转基因植株才为启动子分离所需材料, 同时所创建的突变体库的饱和程度影响利用插入突变研究基因功能的效率^[17]。

研究建立了启动子陷阱植物表达载体 pAHCA, 转化农杆菌 EHA 101 获得工程菌种 pAHCL, 利用根癌农杆菌介导的蓝猪耳遗传转化体系, 转化率达 12.8%, 通过 GUS 组织化学染色, 有 12 株植株呈现蓝色斑点, 经盐胁迫处理, 有一株植株根部染色成阳性, 此 13 株植株即为启动子分离材料。此结果证明所构建的启动子陷阱植物表达载体可用于启动子捕获, 达到了预期目的。

植物基因启动子按其功能和作用方式可分为 3 类: 组成型启动子、组织特异型启动子和诱导型启动子^[18]。组织特异型启动子和诱导型启动子在植物基因理论研究和生产应用中作用更大, 因此寻找组织特异型启动子和诱导型启动子意义更为重要。试验中, 若 GUS 基因表达具有组织特异性, 则 GUS 基因插入在组织特异型启动子下游; 当在特定的物理或化学信号的刺激下, GUS 基因的表达才出现大幅度变化, 则 GUS 基因上游存在着诱导型启动子。为了获得盐胁迫特异启动子, 研究对转基因植株进行高盐处理, 观察到 1 株植株根部出现蓝色斑点, 推测 GUS 基因上游可能存在盐胁迫启动子, 由于蓝色斑点仅出现在根部, 该启动子可能具有根部表达的组织特异性。采用更合适的盐胁迫处理方式, 或进行其它合适的处理如水分胁迫、高温胁迫等, 将会获得更多相关特异型启动子。

对 13 株 GUS 染色呈阳性的植株进行 TAIL-PCR, 有 5 株获得 T-DNA 侧翼序列, 经 GenBank 分析, 其与拟南芥羧酸酯酶(β -酯酶)的核苷酸序列和氨基酸序列的同源性分别为 91%和 57%, 其功能将进一步分析。结果为 TAIL-PCR 方法逐步扩增最终获得启动子提供借鉴。同时需结合其它 PCR 方法如连接介导的 PCR 和反向 PCR 进行分离^[22,23], 最终获得启动子序列, 为花卉和其

它植物表达外源目的基因提供了新的启动子资源, 促进花卉品种改良和新品种选育的应用。同时该启动子捕获系统的建立, 为其它转化效率较高的植物基因组学研究提供借鉴和思路。

参考文献

- [1] Tetsuya H, Kuroiwa H, Kawano S, et al. Guidance in Vitro of the Pollen Tube to the Naked Embryo Sac of *Torenia fournieri* [J]. *Plant Cell*, 1998(10): 2019-2031.
- [2] 李梅兰, 王小菁, 李洪清. Establishment of *Agrobacterium*-mediated Transformation System for *Torenia* [J]. *园艺学报*, 2006, 33(1): 105-110.
- [3] Aida R, Kishimoto S, Tanaka Y, et al. Modification of flower color in *torenia* by genetic transformation [J]. *Plant Science* 2000, 153: 33-42.
- [4] Aida R, Yoshida T, Knodo T, et al. Copigmentation gives bluer flowers on transgenic *torenia* plants with the antisense dihydroflavonol-4-reductase gene [J]. *Plant Science* 2000, 160: 49-56.
- [5] Fukusaki E, Kawasaki K, Kajiya S, et al. Flower color modulations of *Torenia hybrida* by downregulation of chalcone synthase genes with RNA interference [J]. *Journal of Biotechnology*, 2004, 111(3): 229-240.
- [6] 李玲, 黄群声, 张铭光, et al. Tissue culture and regeneration of *Torenia fournieri* [J]. *亚热带植物科学*, 2001, 30(4): 27-31.
- [7] Tao Jun, Li Ling. Genetic transformation of *Torenia fournieri* L. mediated by *Agrobacterium rhizogenes* [J]. *South African Journal of Botany*, 2006, 72: 211-216.
- [8] 朱英, 蔡秀玲, 王宗阳. Promoter Trapping by Using Promoterless GUS Reporter Gene in Rice [J]. *植物生理与分子生物学报*, 2003, 29(4): 289-294.
- [9] Chin H G, Choe M S, Lee S H, et al. Molecular analysis of rice plants harboring an *Ace*/D_s transposable element-mediated gene trapping system [J]. *Plant J*, 1999, 19(5): 615-623.
- [10] Jeon J S, Lee S, Jung K H, et al. T-DNA insertional mutagenesis for functional genomics in rice [J]. *Plant J*, 2000, 22(6): 561-570.
- [11] Greve H D, Nguyen K V, Deboeck F, et al. T-DNA tagging of the translation factor eIF-4A1 of *Arabidopsis thaliana* [J]. *Plant science*, 2001,

161: 685-693.

- [12] 王爱民, 陈石燕, 沈革志. Establishment of Promoter Trapping System Mediated by Activator/Dissociation (β -glucuronidase) Construction in Rice [J]. *植物生理与分子生物学报*, 2005, 31(6): 575-580.
- [13] Jefferson R A. Assaying chimeric genes in plants: The GUS fusion system [J]. *Plant Mol Biol Rep* 1987, 5: 387-405.
- [14] 房迈纯, 李美茹, 李洪清. A Simple and Highly Efficient Method for Cloning Telomere Associated Sequences from *Oryza sativa* [J]. *植物生理学通讯*, 2004, 40(6): 729-730.
- [15] Liu Y G, Whittier R F. Thermal asymmetric interlaced PCR: automatable amplification and sequencing of insert end fragments from P1 and YAC clones for chromosome walking [J]. *Genomics* 1995, 25: 674-681.
- [16] Liu Y G, Mitsukawa N, Oosumi T, et al. Efficient isolation and mapping of *Arabidopsis thaliana* T-DNA insert junction by thermal asymmetric interlaced PCR [J]. *Plant Journal*, 1995, 8(3): 457-463.
- [17] 江树业, 陈启锋, 葛学军. Gene Traps and Their Applications on Plant Gene Isolation and Functional Genomics [J]. *热带亚热带植物学报* 2003, 11(2): 181-189.
- [18] 王颖, 麦维军, 梁承邨, 等. Advances on studies of plant promoters [J]. *西北植物学报* 2003, 23(11): 2040-2048.
- [19] 刘博, 苏乔, 汤敏谦, 等. Progress of the PCR Amplification Techniques for Chromosome Walking [J]. *遗传*, 2006, 28(5): 587-595.
- [20] Michiels A, Tucker M, Ende W V D, et al. Chromosomal walking of flanking regions from short known sequences in GC-Rich plant genomic DNA [J]. *Plant Mol Biol Rep* 2003, 21: 295-302.
- [21] Terauchi R, Kahl G. Rapid isolation of promoter sequences by TAIL-PCR: the 5'-flanking regions of Pal and Pgi genes from yams (*Dioscorea*) [J]. *Mol Gen Genet* 2000, 263(3): 554-560.
- [22] Casson S A, Chilley P M, Topping J F et al. The POLARIS gene of *Arabidopsis* encodes a predicted peptide required for correct root growth and leaf vascular patterning [J]. *Plant Cell* 2002, 14(8): 1705-1721.
- [23] Lee S, Jung K H, An G, et al. Isolation and characterization of a rice cysteine protease gene *OsCPL* Using T-DNA gene trap system [J]. *Plant Mol Biol* 2004, 54(5): 755-765.

Establishment of Promoter Trapping System in *Torenia fournieri* Linden

LONG Hai-tao, LI Hong-qing, LI Ling

(College of Life Science, South China Normal University, Guangzhou, Guangdong 510631, China)

Abstract: Based on the optimization of genetic transformation of *Torenia fournieri* Linden mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, a binary vector, designated as pHAHCA, was constructed for promoter trapping, and was introduced into *Torenia* to establish an efficient promoter trapping system. 82 hygromycin-resistant plants were confirmed to be positive transformants by PCR. The transformation frequency was up to 12.5% overall. GUS histochemical staining of the 82 transgenic plants showed that 12 of them were stained. 10 out of the 12 transformants plants were stained only in veins of plants, and the other 2 transgenic plants were stained both in veins and stems. Under salt stress, only one plant showed GUS activity in roots. The flanking sequences of T-DNA inserting sites in 5 transgenic *Torenia* showed GUS activity was amplified by TAIL-PCR.

Key word: Promoter trapping; Genetic transformation; GUS reporter gene; *Torenia fournieri* Linden