

矮牵牛 *CHS* 基因启动子克隆、序列分析及植物表达载体构建

高 水 平¹, 范 丙 友², 史 国 安², 贾 小 平², 孔 祥 生²

(1. 河南科技大学 林学院, 河南 洛阳 471003; 2. 河南科技大学 农学院, 洛阳市牡丹生物学重点实验室, 河南 洛阳 471003)

摘 要:应用 Primer Premier 5.0 软件, 根据 GenBank 数据库报道的查尔酮合成酶基因启动子序列(EF199747)设计 1 对特异性 PCR 扩增引物, 以矮牵牛品种‘午夜蓝色’叶片总 DNA 为模板, 用 *Taq* DNA 聚合酶成功扩增出 1 条约 0.5 kb 的 DNA 片段, 回收该片段并连接到 pMD18-T 载体上。结果表明: 经测序该启动子片段长 550 bp; *bl2seq* 分析结果表明该启动子与目标序列相似性高达 100%; PLACE 在线分析显示在克隆片段中含有 TATA box、CAAT box、cap site、anther box、box1、box2、G box 及 TACPyAT-box 等顺式元件; 并构建了矮牵牛 *CHS* 基因启动子融合标记基因 GUS 的植物表达载体 pPhCHS::GUS。

关键词:矮牵牛; *CHS* 基因启动子; 克隆; 序列分析; 植物表达载体

中图分类号:S 681.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)17-0155-04

在应用基因工程技术改良植物性状时, 如果导入的外源基因在组成型启动子调控下组成型表达, 就有可能对转基因植物的生长和发育带来许多不利影响^[1]。因此, 在利用植物基因工程技术改良园林植物的性状尤其是与花器官相关的商业性状时, 花特异表达启动子的使用将是很有必要的。在花特异表达启动子的调控下, 使目的基因的表达产物在花器官中积累, 增加区域表达量, 从而在不影响转基因植株正常发育的基础上, 定向改良园林植物的花器官性状。许多花器官特异性表达启动子已相继被分离和鉴定, 目前研究的最为深入的是与类黄酮合成相关的查尔酮合成酶(Chalcone synthase, *CHS*)基因的启动子^[2], 在矮牵牛基因组中共含有 8 个完整的 *CHS* 基因, 其中有 4 个在花器官中特异性表达且受到光的调控, *CHS* 基因的组织特异性表达受启动子多种顺式元件的调控^[3]。该研究克隆了‘午夜蓝色’矮牵牛 *CHS* 基因的启动子, 并构建了 *pPhCHS::GUS* 植物表达载体, 为开展基于花特异表达启动子的园林植物观赏性状定向改良研究奠定了一定基础。

第一作者简介:高水平(1976-), 女, 硕士, 讲师, 现从事园林植物与观赏园艺研究工作。

通讯作者:范丙友(1974-), 男, 博士, 副教授, 现从事园林植物的分子生物学研究工作。E-mail: fanbingyou2005@163.com。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(30740013); 林木、花卉遗传育种教育部重点实验室开放基金资助项目(05-03)。

收稿日期:2010-05-06

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 植物材料为美国泛美种子(Pan-American Seed)梦幻系列‘午夜蓝色’(Dreams Midnight)矮牵牛(*Petunia hybrid*), 已开花的矮牵牛植株购置于洛阳市新村花卉市场, 取幼嫩叶片置于-80℃冰箱用于矮牵牛总 DNA 的提取。

1.1.2 菌种、质粒与试剂 大肠杆菌菌株 DH5α 及 pBI122 质粒为本实验室保存; 克隆载体 pMD18-T、DNA 凝胶回收试剂盒、质粒小提试剂盒、限制性内切酶 *Hind* III 和 *Xba* I 均购自宝生物工程(大连)有限公司; *Taq* DNA 聚合酶和 DNA 分子量 Marker Ⅲ购自天根生化科技(北京)公司。

1.2 试验方法

1.2.1 叶片总 DNA 提取及引物设计 矮牵牛叶片总 DNA 的提取采用 CTAB 法进行^[4], 总 DNA 浓度被稀释为 50 ng/μL。应用 Primer Premier 5.0 软件, 根据 GenBank 数据库报道的 *CHS* 基因启动子序列(EF199747)及 pBI121 质粒中标记基因 *GUS* 上下游的多克隆位点, 设计特异性 PCR 扩增引物。上游引物中插入了 *Hind* III 酶切位点, 其序列为 5'-CCCAAGCTTTTCCTGT-TCAAAGCTGATGCTA、下游引物中插入了 *Xba* I 酶切位点, 其序列为 5'-GGCTCTAGACGATTTTGTCTT-GAAAAAAGTA, 引物由北京奥科生物技术有限公司合成。

1.2.2 矮牵牛 *CHS* 基因启动子的 PCR 扩增 PCR 扩增体系为 50 μL, PCR 扩增体系中各组分分别为 10×

PCR Buffer 5 μ L, 2.5 mM each dNTP 4 μ L, 上游和下游引物各 1.5 μ L, *Taq* DNA 聚合酶 1 μ L, 叶片总 DNA 1 μ L, ddH₂O 36 μ L。PCR 扩增程序为 95℃ 预变性 5 min, 然后 95℃ 变性 30 s, 52℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 共 35 个循环, 最后 72℃ 延伸 7 min。用 1% 琼脂糖凝胶对 PCR 产物进行电泳检测。

1.2.3 矮牵牛 *CHS* 基因启动子扩增片段的回收、连接与测序 用宝生物公司的 DNA 纯化回收试剂盒纯化 PCR 目标产物。将回收的 PCR 产物与 pMD18-T 载体连接后用热激法转化大肠杆菌 DH5 α , 经菌落 PCR 初筛后, 用质粒 DNA 小量试剂盒提取重组质粒, 经质粒 PCR 检测、*Hind* III 和 *Xba* I 双酶切鉴定, 将阳性重组子的质粒样品送至上海生工生物工程技术有限公司进行序列测定。

1.2.4 矮牵牛 *CHS* 基因启动子的序列分析 应用在线分析工具 BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) 中的 *bl2seq* 程序对测序结果及 EF199747 序列进行双序列比对。应用 PLACE (<http://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/signalscan.html>)^[5] 在线分析矮牵牛 *CHS* 基因启动子的顺式元件。

1.2.5 植物表达载体构建 用 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切阳性重组子后回收小片段, 然后与 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切质粒 pBI121 后回收的大片段连接, 转化感受态细胞 DH5 α , 卡那霉素抗性筛选转化子, 经菌落 PCR 初筛后进行质粒 PCR 进一步验证。

2 结果与分析

2.1 矮牵牛 *CHS* 基因启动子的 PCR 扩增

图 1 为矮牵牛 *CHS* 基因启动子 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳结果, 表明成功扩增出 1 条约 0.5 kb 的 DNA 片段。

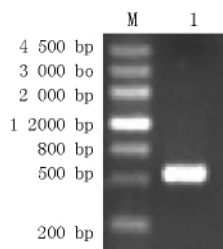


图 1 矮牵牛 *CHS* 基因启动子 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳
注: M; DNA Marker III; 1: 矮牵牛 *CHS* 基因启动子 PCR 扩增产物。

anther-box

1 TTCCTGTTCAAAGCTGATGCTAGAAGTGACAGAAATTATATGTAAGAATGATCAAGGCCATTCATTTGGTTCAACAGATT
81 GAAAAATCTAAAGGGTCGTTCCGTACGAGGGATTGGATTACTTATCCCGAGATTATATTTATCCCATGTTTGGTATTAGG
CAAT-box

161 TATTAGCTAATACTAGGACAATTTTATGCCTAAATTGTAGGATTAGTCCCAGGATTATAATCCCGAATTGTTAATCCCG
241 TGATAACTTAGGGATGAACCGAACGACCCTAAGAGCCTTGTATCTTGAGAAGTAGGTAGGGCTAATTCGAAAATAACCA
box 2 box 1 G-box G-box

321 ACCATTAATTTGTGTTGAAGGTTTGCTACGAAAATAAAAAGGATGTCACGTGCCATCAAGTTATAGCTACACGTGATTAC
TACPyAT-box TATA-box CAAT-box cap site CAAT-box

401 TATCTACCATTCTCCTTTTGGGCTCTCATATAAATACTTTACAATCCCCATGCAAAACCATAACGCAATACAACATTGCT
CAAT-box

481 TTAGCAATATAAAAGACACTTACACTTGTACGTAATATTCTTACTTACTTTTTTCAAGCAAAAATCG

图 3 矮牵牛 *CHS* 基因启动子序列及 PLACE 分析

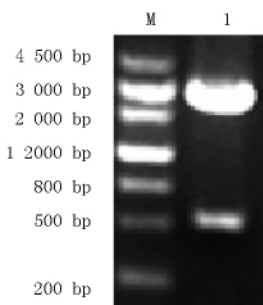


图 2 重组质粒 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切琼脂糖电泳图。

注: M; DNA Marker III; 1: 重组质粒 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切。

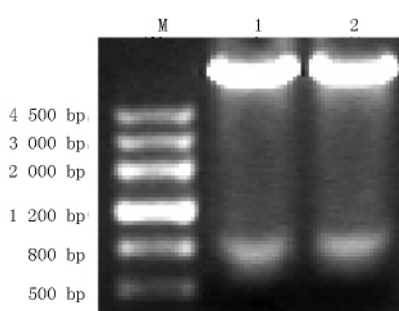


图 4 pBI121 质粒 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切琼脂糖电泳图。

注: M; DNA Marker III; 1~2: pBI121 质粒 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切。

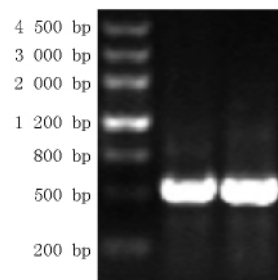


图 5 *pPhChsA::GUS* 表达载体的 PCR 鉴定。

注: M; DNA Marker; Lane 1 to 2: 表达载体 *pPhChsA::GUS* 的 PCR 扩增。

2.2 矮牵牛 *CHS* 基因启动子的克隆

用 DNA 回收试剂盒纯化回收矮牵牛 *CHS* 基因启动子的 PCR 扩增产物,将回收产物与 T 载体进行过夜连接,热激法将连接产物转化到大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中,37℃ 过夜培养,经菌落 PCR、质粒 PCR 筛选后进行 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切,酶切结果见图 2,表明酶切生成 1 条约 2 800 bp 的 pMD18-T 载体 DNA 片段和 0.5 kb 的目的 DNA 片段,与预测结果一致。

2.3 矮牵牛 *CHS* 基因启动子的序列分析

测序结果表明该片段长 550 bp(图 3)。基于 bl2seq 程序对克隆序列与 EF199747 进行双序列比对分析,结果显示本研究克隆的矮牵牛 *CHS* 基因启动子序列与 EF199747 的相似性高达 100%,即完全一致。PLACE 在线分析结果显示在 429~435 之间有 1 个 TATA-box (TATAAAT),其功能是保证转录得以精确起始;在 179~182、442~445、466~469、485~488 的位置上有 4 个 CAAT-box,决定着启动子的起始频率;458~463 间有一个 cap site(CCATAA),这些是基础启动子所必需的表达调控元件;在 31~35 处有 1 个 anther box(AGAAA),它是目的基因在幼嫩的花药中特异表达所必须的调控元件^[6];在 331~348 处有 1 个 box2 元件,在 362~378 处有 1 个 box1 元件,box1 和 box2 元件是类黄酮生物合成相关酶基因启动子的保守序列^[7-8];在 367~372、390~395 处有 2 个 G box(CACGTG),为 ABA、光、厌氧生活的应答元件,受 UV 光诱导调控,并与花特异表达相关^[8];在 398~403 处含有 TACPyAT box,它是决定花特异表达的序列^[9]。该研究克隆的启动子所有调控元件与报道序列基本一致。

2.4 植物表达载体构建

将提取的重组质粒和植物表达载体 pBI121 质粒分别用 *Hind* I 和 *Xba* I 双酶切,回收重组质粒酶切出的约 500 bp 的小片段(图 2)和 pBI121 酶切出的大片段(图 4)。将连接产物转化到大肠杆菌感受态细胞中,对培养出的单菌落进行菌落 PCR 初筛,挑选 PCR 扩增出阳性结果的单菌落进行培养,质粒试剂盒提取质粒进行质粒 PCR 进一步鉴定,扩增出 500 bp 的目标条带(图 5),说明成功构建出矮牵牛 *CHS* 基因启动子融合 *GUS* 标记基因的植物表达载体 *pPhCHS::GUS*。

3 讨论

花特异性表达启动子的分离克隆可使某些特定的基因只在花器官中表达,从而在不影响转基因植株正常发育的基础上,定向改良园林植物花器官的商业性状。对矮牵牛 *CHS* 基因启动子的顺式元件分析结果表明该启动子序列具有花特异性启动子的活性,这为以后的园林植物花器官相关的商业性状的定向改良奠定了基础。在接下来的研究工作中,我们将构建矮牵牛 *CHS* 基因启动子融合牡丹 *ACS* 反义基因的植物表达载体 *pPhCHS::anti-PsACS-4*,以便能够将牡丹 *ACS* 反义基因通过花粉管通道法导入牡丹基因组,并期望从中筛选到乙烯生物合成受到抑制的牡丹转基因植株,从而为定向培育切花专用型牡丹品种提供新的种质材料。

参考文献

- [1] 宋杨,周军会,张永强.植物组织特异性启动子研究[J].生物技术通报,2007(6):21-24.
- [2] Van der Meer I M, Spelt C E, Mol J N M, et al. Promoter analysis of the chalcone synthase(cDNA)gene of *Petunia hybrida*: a 67 bp promoter region directs flower-specific expression [J]. Plant Mol Biol, 1990, 15: 95-109.
- [3] Koes R E, Blokland R V, Quattrocchio F, et al. Chalcone Synthase Promoters in *Petunia* Are Active in Pigmented and Unpigmented Cell Types [J]. The Plant Cell, 1990(2): 379-392.
- [4] Harbord R M, Napoli C A, Robbins T P. Segregation Distortion of T-DNA Markers Linked to the Self-Incompatibility(S) Locus in *Petunia hybrid* [J]. Genetics, 2000, 154: 1323-1333.
- [5] Higo K, Ugawa Y, Iwamoto M, et al. Plant cis-acting regulatory DNA elements(PLACE)database [J]. Nucleic Acids Research, 1999; 27(1): 297-300.
- [6] Van Tunen A J, Hartman S A, Mur L A, et al. Regulation of chalcone flavonone isomerase(CHI)gene expression in *Petunia hybrida*: the use of alternative promoters in corolla, anthers and pollen [J]. Plant Mol Biol, 1989, 12: 539-551.
- [7] Schulze-Lefert P, Dangel 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]. EMBO J, 1989, 8: 651-656.
- [8] 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]. PNAS, 1989, 86: 6930-6934.
- [9] Van der Meer I M, Brouwer M, Spelt C E, et al. The TACPyAT repeats in the chalcone synthase promoter of *Petunia hybrida* act as a dominant negative cis-acting module in the control of organ-specific expression [J]. The Plant J, 1992, 2(4): 525-535.

Cloning and Sequence Analysis of Promoter of Chalcone Synthase Gene from *Petunia Hybrida* and Construction of Plant Expression Vector

GAO Shui-ping¹, FAN Bing-you², SHI Guo-an², JIA Xiao-ping², KONG Xiang-sheng²

(1. College of Forestry, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003; 2. College of Agriculture, Luoyang Key Laboratory of Peony Biology, Henan University of Science and Technology, Luoyang, Henan 471003)

刺梨四倍体诱导及其 ISSR 分析

王小平¹, 雍洪俊¹, 杜晋城¹, 梁国鲁², 李丛英¹, 王明霞¹

(1. 南充市高坪区农业局 果树站, 四川 南充 637100; 2. 西南大学 园艺园林学院, 重庆 北碚 400716)

摘 要:以刺梨为试材, 利用组织培养结合秋水仙素溶液浸泡法诱导刺梨多倍体, 并对四倍体与二倍体进行 ISSR 分析。结果表明: 刺梨诱导芽分化增殖的最适培养基为 MS+6-BA 0.5 mg/L+IAA 0.1 mg/L, 诱导率达到 100%, 增殖系数 4.4 以上。用 0.2% 的秋水仙素溶液处理 48 h 诱导率最高, 纯合体诱导率为 24.5%。四倍体与二倍体 ISSR 结果显示扩增条带差异明显, 表明诱导加倍过程中四倍体发生了基因组变异。

关键词:刺梨; ISSR; 四倍体

中图分类号:S 661.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2010)17-0158-03

刺梨(*Rosa roxburghii* Tratt.) 系蔷薇科蔷薇属落叶小灌木, 又名刺梨子、木梨子、送春归。刺梨营养价值和药用价值极高, 其果肉中 VC 含量居各类水果之冠, 每 100 g 果肉中含 VC 2 500 mg^[1]。刺梨被誉为“长寿防癌”的绿色珍果, 含有抗癌物质及 SOD 抗衰老物质, 同时还具有排铅的作用^[2]。刺梨广泛分布于温带及亚热带地区, 我国野生刺梨主要分布在贵州、云南、四川、湖北、陕西等省, 其中以贵州品种最多。

由于其二倍体植株形态复杂, 果实小, 籽多, 可食部分少。现拟利用秋水仙素溶液诱导多倍体, 以期获得性状优良的材料, 为更好的开发刺梨相关产品打下坚实的基础。同时采用 ISSR 分析刺梨多倍体基因组较二倍体是否发生变异, 为刺梨的多倍体育种提供参考。

第一作者简介:王小平(1983-), 男, 四川江安人, 硕士, 现主要从事果树生物技术研究工作。E-mail: wxphang@yahoo.com.cn。

通讯作者:梁国鲁(1960-), 男, 重庆酉阳人, 博士, 研究员, 现主要从事果树遗传与育种研究工作。E-mail: Lianggl@swu.edu.cn。

收稿日期:2010-05-12

1 材料与方法

1.1 试验材料

供试的刺梨品种来自贵州大学, 为‘贵农 2 号’。

1.2 试验方法

1.2.1 刺梨离体快繁体系的建立 外植体灭菌: 选择田间当年生、健壮枝条上带腋芽的茎段为外植体, 剪成 1~2 cm 长的小段, 保证每 1 小段至少有 1 个可萌发的腋芽, 用中性洗涤剂浸泡 10 min, 洗掉表面污渍, 再用自来水冲洗 0.5 h, 滤纸吸干水分后置于超净工作台进行灭菌。超净工作台内, 以 70% 乙醇处理 15 s 和 0.1% 升汞处理 10 min, 无菌水冲洗 4 次。然后接种于分化培养基中, 30 d 后观察统计。刺梨初代和继代培养: 将消毒后的刺梨芽、茎段以及组培苗接种于 MS 附加 6-BA(0、0.2、0.5、1.0、2.0 mg/L) 和 IAA(0、0.1、0.2、0.5 mg/L) 的培养基中, 进行最适激素配比的筛选, 共计 20 种处理, 每个处理接各种 10 个, 重复 3 次。

1.2.2 刺梨四倍体诱导 利用秋水仙素溶液浸泡法对丛生芽进行处理, 设定 0.1%、0.2%、0.3%、0.4%、0.5%、0.6% 等 6 个处理浓度。从刚长出来的 1 cm 的刺梨的丛生芽上取 0.3~0.5 cm 的茎尖, 每种组合处理 30

Abstract: Based on the Primer Premier 5.0 software, a pair of specific PCR primers was designed according to promoter sequence of CHS gene of *Petunia hybrida* reported in GenBank(EF199747). A DNA fragment about 0.5 kb was successfully amplified with the genome DNA of *Petunia hybrid* cultivar ‘Midnight’ as template and Taq polymerase as DNA polymerase. The purified fragment of PCR products was ligated with pMD18-T vector, and the sequencing result showed that the length of the promoter of CHS gene of *Petunia hybrid* was 550 bp. Bl2seq analysis revealed that the sequence similarity between the cloned promoter sequence and EF199747 was up to 100%. Online PLACE analysis indicated that it contained cis-elements such as TATA-box, CAAT-box, cap site, anther-box, box1, box2, G-box and TACPyAT-box. And plant expression vector of *pPhCHS::GUS* that fused the promoter of CHS gene of *Petunia hybrida* and marker gene *GUS* was successfully constructed.

Key words: *Petunia hybrid*; promoter of CHS gene; cloning; sequence analysis; plant expression vector