

拟南芥 *AGL15* 基因的克隆及其植物超表达载体的构建

吴晓梅¹, 刘忠丽²

(1. 丽水学院 生态学院, 浙江 丽水 323000; 2. 浙江大学 农业与生物技术学院/作物科学研究所, 浙江 杭州 310029)

摘要: 为了研究 *AGL15* 基因在种子发育过程中的作用, 应用聚合酶链式反应技术(PCR)扩增了拟南芥 *AGL15* 基因, 并将其克隆到 pMD20-T vector 载体上, 对重组子进行 PCR 检测和限制性内切酶分析, 并测定了该基因全序列。结果表明, 该基因全长为 807 bp。将拟南芥 *AGL15* 基因定向克隆到植物表达载体 pCambia1301 的 35S 启动子下游, 双酶切鉴定结果表明, *AGL15* 基因在双元表达载体中的插入位置和方向都正确, 即成功构建了该基因的植物超表达载体。

关键词: 拟南芥; PCR; *AGL15* 基因; 超表达载体

中图分类号: Q943.2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1004-3268(2012)05-0033-04

Cloning and Construction of Plant Over-expression Vector Containing *AGL15* Gene in *Arabidopsis thaliana*

WU Xiao-mei¹, LIU Zhong-li²

(1. Ecology Department, Lishui College, Lishui 323000, China;

2. Institute of Crop Science/College of Agriculture and Bio-technology, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China)

Abstract: In order to explore its functions during the seed development, *AGAMOUS-Like15* (*AGL15*) gene in *Arabidopsis thaliana* was obtained by PCR technique and cloned into pMD20-T vector. The recombinant clone was detected by PCR technique and analyzed by the restriction enzyme, and the full length of *AGL15* was sequenced. The results showed that the length of the clone sequence was 807 bp. *AGL15* gene in *Arabidopsis thaliana* was cloned into plant expression vector pCambia1301 in orientation, downstream of the promoter 35S. Double enzyme digestion results indicated that the position and orientation of *AGL15* gene in pCambia1301 were exactly right, and the plant over-expression vector was constructed successfully.

Key words: *Arabidopsis thaliana*; PCR; *AGL15* gene; over-expression vector

拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)作为生物学的模式植物,近些年其发育、生殖等生理生化机制在分子水平上得到了前所未有的认识。尽管拟南芥是研究种子胚胎发育分子遗传机制的良好材料,但是由于拟南芥胚胎很小并且处于种子中,目前对拟南芥种子的胚胎发育,尤其是胚胎早期发育还知之甚少^[1-2]。拟南芥种子胚中主要的储藏物质为油脂、蛋白质和淀粉等。这些储藏物质经过一系列的生理生化反应降解为糖,给种子萌发和形态建成提供能量,同时,种子中的储藏物质不仅是人类重要的食物

来源,而且在化学工业中也起着重要的作用。因此,研究拟南芥种子胚胎的发育具有很好的理论价值和广阔的应用前景。

在拟南芥中,植物内源信号、转录因子以及外界环境因子共同控制着拟南芥种子胚胎正常的生长发育。截至目前,已经发现的影响种子胚胎发育的植物内源信号主要有脱落酸和糖等^[3-6]。影响拟南芥种子胚发育的转录因子主要 *ABI3*、*LEC1*、*LEC2* 和 *FUS3* 等,这些转录因子在种子发育的很多方面起着重要作用,其中包括种子储藏物质的积累^[7-8]。

收稿日期: 2011-10-24

作者简介: 吴晓梅(1963-),女,浙江金华人,高级讲师,本科,主要从事应用生物学研究。E-mail: wuxiaomei2122367@163.com

MADS 家族的转录因子在植物的生长发育过程中起着重要作用^[9], *AGAMOUS-Like15* (*AGL15*) 基因作为 MADS 家族中的转录因子, 通过结合 DNA 和调控基因表达来促进种子胚胎发育。该基因在拟南芥整个生长发育过程中均有表达, 但在种子胚胎发育过程中表达水平较高。在拟南芥中, 组织性表达 *AGL15* 基因造成转基因植物体内活性赤霉素的合成量减少, 导致转基因植物植株矮小、开花晚等, 外源赤霉素能够部分恢复该表现型^[10]。染色质免疫共沉淀试验研究表明, *LEC2*、*FUS3* 和 *ABI3* 为 *AGL15* 的靶基因^[11]。为了进一步研究 *AGL15* 基因的功能以及该基因的下游调控网络, 利用 *AGL15* 基因成功构建了植物超表达载体, 为通过拟南芥转基因技术研究该基因在胚胎发育过程中的作用和对储藏物质积累的影响以及其他突变体的基础上研究基因互作提供良好的遗传分子材料。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌种和质粒 菌种为大肠杆菌菌株 DH5 α ; 二元质粒表达载体为 pCambia1301; 克隆载体 pMD20-T vector 购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 培养基 LB 培养基。

1.1.3 生化试剂及酶 高保真的 *Taq* 酶 Trans-Start FastPfu DNA Polymerase 购自北京全式金公司, T4 DNA 连接酶、限制性内切酶、RNA 提取试剂盒及 cDNA 合成试剂盒均购自天根生化科技(北京)有限公司, 其他试剂均为国产分析纯试剂。

1.1.4 引物 克隆 *AGL15* 基因的正向引物 FP: 5'-ATTTCTAGAATGGGTCGTGGAAAAATCGA-3' 和反向引物 RP: 5'-ATTGAGCTCCTAACAGAGAAC-CTTT-3' 前分别加有 *Xba* I 和 *Sac* I 限制性酶切位点序列, 由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 RNA 提取及 cDNA 合成 利用 RNA 提取试剂盒提取拟南芥花蕾的总 RNA, 并利用 cDNA 合成试剂盒合成单链 cDNA。

1.2.2 PCR 扩增 50 μ L 反应体系为: dNTPs 0.8 μ L、上下游引物各 1.5 μ L (各 2.0 μ mol/L)、模板 cDNA 2 μ L、*Taq* 酶 0.5 μ L、10 \times Buffer 5.0 μ L, 以 ddH₂O 补足 50 μ L。 *AGL15* 基因的 PCR 扩增条件: 95 $^{\circ}$ C 预变性 35 s; 95 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 59 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 60 s, 32 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.2.3 PCR 产物的克隆、鉴定与序列分析 首先回收 *AGL15* 基因的 PCR 扩增产物, 纯化后按 3:1 比例与克隆载体 pMD20-T vector 在 16 $^{\circ}$ C 下过夜

连接。按 Mason 等^[12]的方法制备感受态细胞, 然后将连接产物转入到大肠杆菌 DH5 α , 并在含 100 μ g/mL 氨苄青霉素的 LB 培养基上选择培养。挑取白斑用碱裂解法提取质粒 DNA, 用 PCR 方法检测得到重组克隆 pMDAGL15。序列测序由上海生工生物工程技术服务有限公司完成。

1.2.4 植物表达载体的构建 将带有目的基因的重组质粒 pMDAGL15 经 *Xba* I 与 *Sac* I 双酶切, 同时, pCambia1301 经 *Xba* I 和 *Sac* I 双酶切, 然后, 利用 T4 DNA 连接酶将 *AGL15* 基因和 pCambia1301 片段在 16 $^{\circ}$ C 下过夜连接, 得到重组质粒 pCamAGL15。转化大肠杆菌 DH5 α , 在含有 50 μ g/mL 卡那霉素的 LB 培养基上筛选重组子。

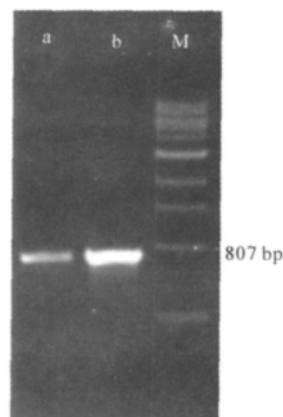
1.2.5 PCR 检测 以阳性克隆重组质粒为模板, 按照 1.2.2 的方法进行 PCR 扩增, 然后用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测目的基因片段是否存在以及大小是否正确。

1.2.6 双酶切鉴定 在 50 μ L 双酶切反应体系中, 阳性克隆重组质粒约 20 μ L (约 6~8 μ g), 2 种限制性内切酶 (*Sac* I + *Hind* III 或 *Xba* I + *Eco*R I) 各 1 μ L, 10 \times Buffer 5.0 μ L, 以 ddH₂O 补足 50 μ L。37 $^{\circ}$ C 恒温条件下反应约 5 h, 然后用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测重组质粒的酶切片段大小和方向是否正确。

2 结果与分析

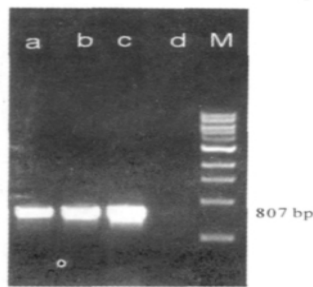
2.1 PCR 扩增产物的克隆及筛选

AGL15 基因的 PCR 扩增产物在 1.0% 的琼脂糖凝胶上电泳, 得到约 807 bp、特异性强的、单一的扩增条带, 与预期一致(图 1)。扩增产物回收后与载体连接转化到大肠杆菌 DH5 α 中, 筛选出 3 个阳性克隆, 经 PCR 检测和电泳分析, 得到一条约 807 bp 的插入片段, 说明该目的基因插入在载体上, 其片段大小与预期一致(图 2)。



a, b. PCR 产物; M. DNA Marker

图 1 PCR 产物的电泳分析



a, b, c. PCR 产物; d. 阴性对照; M. DNA Marker
图 2 重组阳性克隆的 PCR 检测与电泳分析

2.2 DNA 序列分析

经过 DNA 全自动测序仪,测定得到的 *AGL15* 基因序列为 807 bp,该片段与已发表的拟南芥基因序列(NCBI 序列登录号:NM_121382)有 2 个核苷酸的差异,同源性约为 99.8%(图 3)。分析表明,*AGL15* 基因序列中 2 个差异的核苷酸分别为第 357 和 660 个碱基(方框表示差异碱基),但是这 2 个碱基的差异没有导致氨基酸残基的改变,即没有改变 *AGL15* 基因编码的蛋白序列,因此可以用于植物超表达载体的构建以及后续试验。

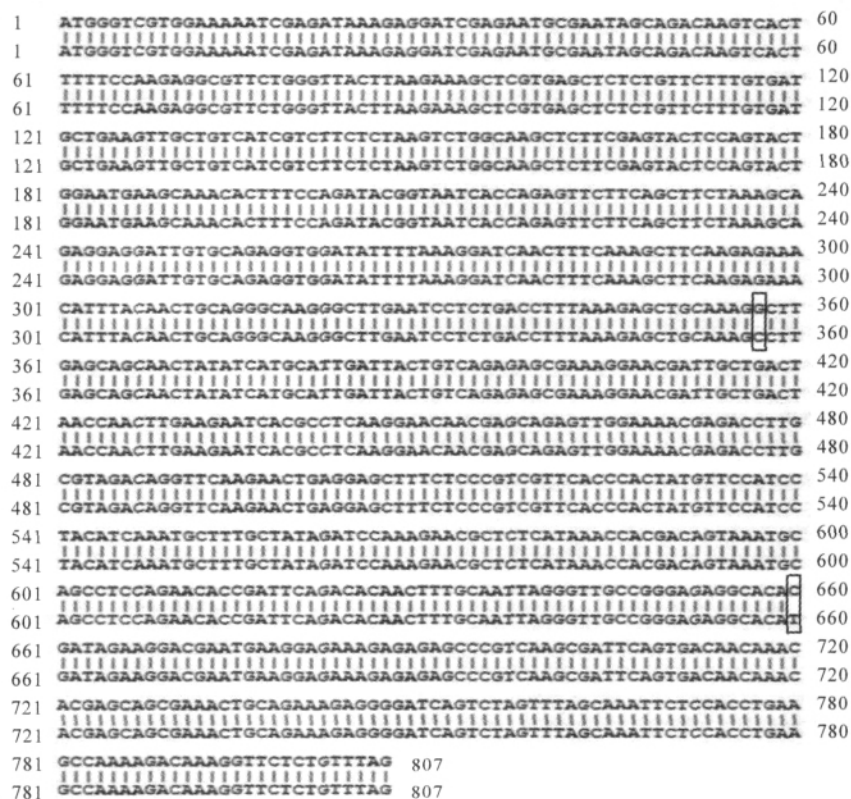
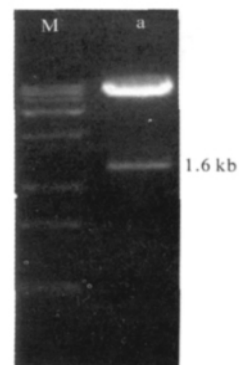


图 3 克隆得到的 *AGL15* 基因片段(上排)与已发表的该基因序列(下排)比对结果

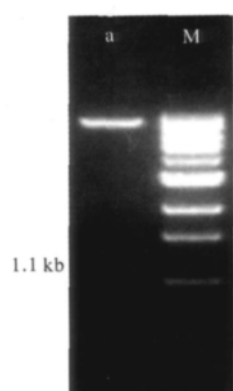
2.3 拟南芥 *AGL15* 基因植物超表达载体的构建

将筛选得到的一个阳性克隆进一步进行双酶切鉴定。理论上,*Xba* I、*Sac* I、*Eco*R I 和 *Hind* III 等 4 种限制性内切酶在阳性克隆中均只有 1 个限制性酶切位点,*Sac* I 和 *Hind* III 位点之间的较小片段大小约为 1.6 kb,*Xba* I 和 *Eco*R I 之间的较小片段大小为 1.1 kb 左右,图 4 和图 5 分别为 *Sac* I + *Hind* III 和 *Xba* I + *Eco*R I 的双酶切电泳图谱,双酶切和电泳结果表明,得到的酶切片断大小与理论值一致,说明目的片段在双元表达载体中的插入位置和方向都正确,即说明成功构建了 *AGL15* 基因的植物超表达双元载体。



a. *Sac* I + *Hind* III 酶切产物; M. DNA Marker

图 4 阳性克隆 *Sac* I + *Hind* III 双酶切鉴定结果



a. *Xba* I + *Eco*R I 酶切产物; M. DNA Marker

图 5 阳性克隆 *Xba* I + *Eco*R I 双酶切鉴定结果

3 结论与讨论

根据已发表的序列设计引物,利用优化的 PCR 反应体系扩增出拟南芥 *AGL15* 基因,序列测定的结果表明,该基因片段全长为 807 bp,与已发表的 *AGL15* 基因序列(NCBI 序列登录号:NM_121382) 同源性为 99.8%。尽管与已发表的基因序列有 2 个碱基的差异,但是这没有引起氨基酸残基的改变,因此,克隆得到的 *AGL15* 基因片段可以用于超表达载体的构建以及后续试验。

将目的基因插入到二元表达载体 pCambia1301 中的 35S 启动子下游,构建成超表达质粒 pCamA-*AGL15*。限制性内切酶酶切鉴定表明插入方向和片段大小都正确,证明已成功构建了拟南芥 *AGL15* 的植物超表达载体。

在克隆了拟南芥 *AGL15* 基因的基础上,构建了植物超表达载体,一方面可以为今后利用拟南芥转基因技术研究 *AGL15* 基因与植物内源激素或影响种子胚胎发育和储藏物质积累等基因的互作奠定了基础,另一方面提供了一条实用的途径,即通过转基因技术研究该基因在油料作物种子胚胎发育和储藏物质积累等方面的作用机制,为油料作物如油菜、大豆等的高产和优质育种提供宝贵的基因资源。

参考文献:

- [1] Vogel G. How does a single somatic cell become a whole plant[J]. *Science*, 2005, 309: 86-86.
- [2] Rose R J, Nolan K E. Invited review: Genetic regulation of somatic embryogenesis with particular reference to *Arabidopsis thaliana* and *Medicago truncatula* [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2006, 42: 473-481.
- [3] Brocard-Gifford I M, Lynch T J, Finkelstein R R. Regulatory networks in seeds integrating developmental, abscisic acid, sugar, and light signaling[J]. *Plant Physiology*, 2003, 131: 78-92.
- [4] Finkelstein R R, Gibson S I. ABA and sugar interactions regulating development: cross-talk or voices in a crowd? [J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2002, 5: 26-32.
- [5] Finkelstein R R, Gampala S S L, Rock C D. Abscisic acid signaling in seeds and seedlings[J]. *Plant Cell*, 2002, 14: S15-S45.
- [6] 宋玉伟,赵丽英,杨建伟. 葡萄糖对拟南芥种子萌发和幼苗生长的影响[J]. *河南农业科学*, 2011, 40(6): 57-59.
- [7] Lotan T, Ohto M, Yee K M, et al. *Arabidopsis* *LEAFY COTYLEDON1* is sufficient to induce embryo development in vegetative cells[J]. *Cell*, 1998, 93: 1195-1205.
- [8] Stone S L, Kwong L W, Yee K M, et al. *LEAFY COTYLEDON2* encodes a B3 domain transcription factor that induces embryo development[J]. *Proc of Nat Acad Sci USA*, 2001, 98: 11806-11811.
- [9] Riechmann J L, Meyerowitz E M. MADS domain proteins in plant development[J]. *Biological chemistry*, 1997, 378: 1079-1101.
- [10] Wang H, Caruso L V, Downie A B, et al. The embryo MADS domain protein AGAMOUS-Like 15 directly regulates expression of a gene encoding an enzyme involved in gibberellin metabolism[J]. *Plant Cell*, 2004, 16: 1206-1219.
- [11] Zheng Y M, Ren N, Wang H, et al. Global identification of targets of the *Arabidopsis* MADS domain protein AGAMOUS-Like15 [J]. *Plant Cell*, 2009, 21: 2563-2577.
- [12] Mason H S, Lam D M, Arntzen C J. Expression of hepatitis-B surface-antigen in transgenic plants[J]. *Proc of Nat Acad Sci USA*, 1992, 89: 11745-11749.