

# 用于单子叶植物启动子功能分析的 pUKGF 载体构建

丁 博, 杨文丽, 李 明, 王俊斌, 陈帅君, 谢晓东\*

(天津农学院 农学系, 天津—布里斯托环境变化对农作物影响研究中心, 天津 300384)

**摘要:** 为了对单子叶植物重要性状相关基因启动子进行研究, 以载体 pGWB450 为基本骨架, 利用酶切方法将 ubiquitin 启动子序列和 *NPT II* 抗性基因引入该载体, 构建了新载体 pUKGF。其转基因单子叶植株可通过卡那霉素进行抗性筛选; 另外, 该载体含有 Gateway 元件, 启动子可高效重组到该载体中; 启动子下游是绿色荧光蛋白基因, 根据该报告基因的表达部位, 可确定启动子功能的组织特异性。该载体在单子叶植物启动子鉴定方面将有广阔的应用前景。

**关键词:** 单子叶植物; 启动子; 载体构建; 绿色荧光蛋白; 限制性内切酶

中图分类号: Q782 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2014)02-0015-04

## Construction of Vector pUKGF Used for Analyzing Promoter Function of Monocotyledon

DING Bo, YANG Wen-li, LI Ming, WANG Jun-bin, CHEN Shuai-jun, XIE Xiao-dong\*

(Department of Agronomy of Tianjin Agricultural University, Tianjin-Bristol Research Centre of Effects of Environmental Changes on Crops, Tianjin 300384, China)

**Abstract:** In the study, the vector pGWB450 was used as a backbone, and the ubiquitin promoter and the resistance gene *NPT II* were integrated into the vector to construct the new vector pUKGF by enzyme digestion method, which could be screened by kanamycin in transgenic monocot plants. In addition, the new vector contained the Gateway elements which could integrate the interested promoter sequence into the vector, while the *GFP* gene was located in the downstream of the promoter which would confirm the regulation pattern of promoter in monocot plants. With many advantages, the pUKGF vector would have a broad application prospect in identifying the promoter function of monocot plants.

**Key words:** monocotyledon; promoter; vector construction; green fluorescence protein; restriction enzyme

启动子决定了基因的组织器官表达特异性, 同时还决定了基因在环境及内源激素作用下的可诱导表达或阻遏, 因此对启动子进行功能分析有利于解析基因的表达方式。近些年人们对植物转基因技术进行了多方面的探索和改进<sup>[1-6]</sup>, 植物表达载体的改

进和优化是其中最重要的一项内容, 包括构建对启动子进行分析的载体。目前, 应用于双子叶植物转基因体系中的启动子分析载体较多, 如 pCAMBIA (www.cambia.org) 和 pGWB 系列载体<sup>[7-8]</sup>等, 这些载体的选择标记基因受 *CaMV 35S* 等双子叶植物

收稿日期: 2013-06-20

基金项目: 国家 863 计划项目 (2012AA10A309); 天津市应用基础与前沿技术研究计划项目 (11JCYBJC09100); 天津农学院科学研究发展基金计划 (2011N11)

作者简介: 丁 博 (1982-), 女, 天津人, 实验师, 硕士, 主要从事作物遗传育种工作。E-mail: yuancircle@126.com

\* 通讯作者: 谢晓东 (1975-), 男, 内蒙古兴安盟人, 研究员, 博士, 主要从事植物抗逆机理研究。E-mail: xiexiaod@gmail.com

来源启动子控制,在双子叶植物中应用非常广泛<sup>[9]</sup>,但由于这些选择标记基因表达盒的 *CaMV 35S* 等启动子在单子叶植物中的活性受限,将其用于单子叶植物中进行启动子功能鉴定并非最佳选择。已有的启动子分析载体是针对双子叶植物而建,而适于单子叶植物的载体却鲜有报道。目前验证启动子功能的载体,由于不具有可在单子叶植物中进行高效筛选的选择标记基因表达盒,限制了其在单子叶植物中的应用。本研究应用 pGWB450 载体,构建了用于启动子功能鉴定的载体 pUKGF,旨在为单子叶植物重要性状相关基因的启动子研究奠定基础。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

质粒 pGWB450、pEASY-ubi-npt II 均为天津—布里斯托环境变化对作物影响研究中心保存。大肠杆菌菌株 (*E. coli*) DH5 $\alpha$  和 DB3.1 感受态细胞由实验室人员制备。感受态细胞制备方法参照李振宇等<sup>[10]</sup>的方法。

### 1.2 主要试剂和生物学软件

限制性内切酶 *Asc* I 和 *Sac* II 购自 NEB 公司,琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒 (TaKaRa Agrose Gel DNA Purification Kit) 购自宝生物工程(大连)有限公司,质粒提取试剂盒购自上海生工生物工程技术服务有限公司,Phusion 超保真 DNA 聚合酶购自 NEB 公司,pGEM-T Easy Vector 购自 Promega 公司。生物信息学分析所用软件为 Invitrogen 公司软件 Vector NTI ADVANCED 11。

### 1.3 PCR 扩增及产物回收

PCR 扩增反应体系为 20  $\mu$ L,反应体系中含 1 倍 Buffer,200  $\mu$ mol/L dNTPs,0.4  $\mu$ mol/L 引物,0.4 U Phusion DNA 聚合酶,100 ng DNA 模板。所用引物为 *Asc* I -U-npt II For:5'-TATGGCGCGCCAGT-GCAGCGTGACCCGGTC-3'; *Sac* II -U-npt II Rev:5' - AAGCCGCGGTCTGATCTAGTAACAT-AGATGACAC-3'。

## 2 结果与分析

### 2.1 pGEM-T-ubi-npt II 载体的构建

首先利用 Invitrogen 公司软件 Vector NTI ADVANCED 11 分析载体 pGWB450 的酶切位点,找出合适的限制性内切酶位点进行引物合成。选定的双酶切位点为 *Asc* I 和 *Sac* II 位点。含有 ubi-npt II 插入序列的 pEASY-ubi-npt II 载体由本实验室保存。其中 pEASY 载体是一个不含多克隆位点的 T 载体,便于有效进行酶切位点设计。ubi 代表 ubiquitin 启动子序列,npt II 代表新霉素磷酸转移酶(neomycin phosphotransferase II, NPT II)基因。

利用 PCR 法从克隆载体 pEASY-ubi-npt II 上扩增出目的片段 ubi + npt II,且在片段两端添加 *Asc* I 和 *Sac* II 酶切位点。进行 PCR 扩增,取少许产物电泳,用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收 PCR 产物,电泳鉴定产物。将此回收产物连接到载体 pGEM-T Easy 上,热激转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞。挑取阳性克隆,摇菌培养,用质粒提取试剂盒收集质粒 pGEM-T-ubi-npt II (图 1)。

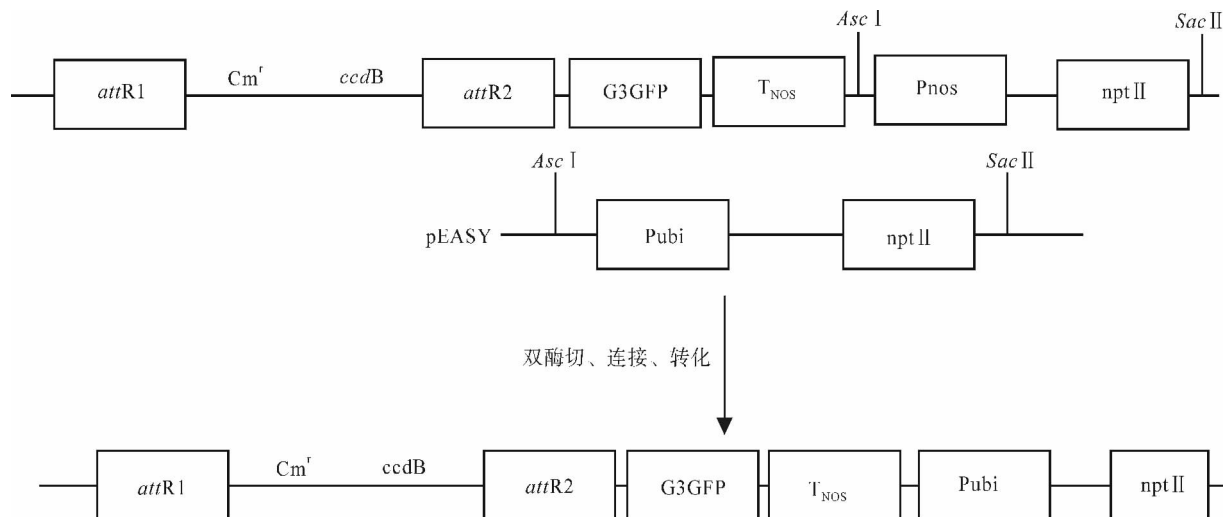
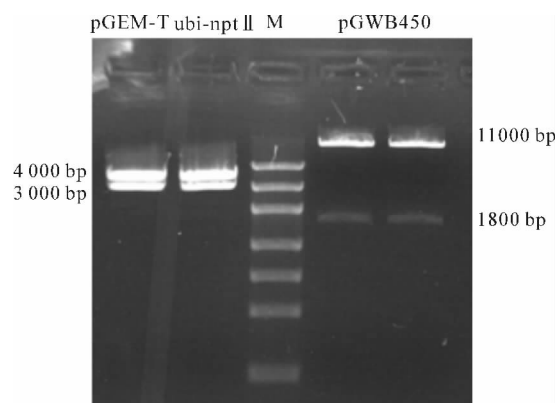


图 1 载体构建流程

## 2.2 pUKGF 载体构建

将 pGWB450 和 pGEM-T-ubi-npt II 分别进行酶切(图 2)。先用 *Sac* II 在 37 °C 反应 30 min, 取 1  $\mu$ L 电泳检测。如果正确, 再加入 1  $\mu$ L *Asc* I 37 °C 反应 40 min, 电泳检测。如果正确, 用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收, 产物通过 T4 DNA 连接酶连接, 连接体系于 25 °C 反应 1 h 后, 转化大肠杆菌 DB3.1 感受态细胞, 转化后挑取部分克隆进行菌落 PCR 验证(图 3), 验证正确的菌液送至北京六合华大基因科技股份有限公司进行测序, 结果表明, 所测克隆与 pUKGF 载体图的序列完全吻合(图 4)。



点样顺序为: pGEM-T-ubi-nptII(2 道), Marker, pGWB450(2 道); Marker 同图 3

图 2 对 2 个质粒分步酶切电泳图谱

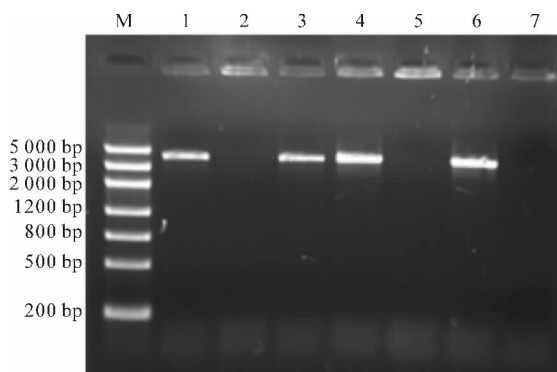


图 3 ubi+npt II 菌落 PCR 结果

## 3 结论与讨论

启动子是决定基因表达模式的重要序列元件, 对其进行鉴定是研究基因功能的重要途径。对植物基因启动子的研究, 目前已有许多套载体系统<sup>[7-8, 11]</sup>, 但进行转基因植株筛选时, 这些载体的选择标记基因受 *CaMV* 35S 等双子叶植物来源启动子的控制, 研究表明, *CaMV* 35S 等启动子在双子叶植物中的表达效率更高<sup>[12-13]</sup>, 适于双子叶转基因植

物的筛选, 而在单子叶植物中虽有活性, 但其活性强度较低, 导致其调控基因的表达水平有限<sup>[14-15]</sup>。

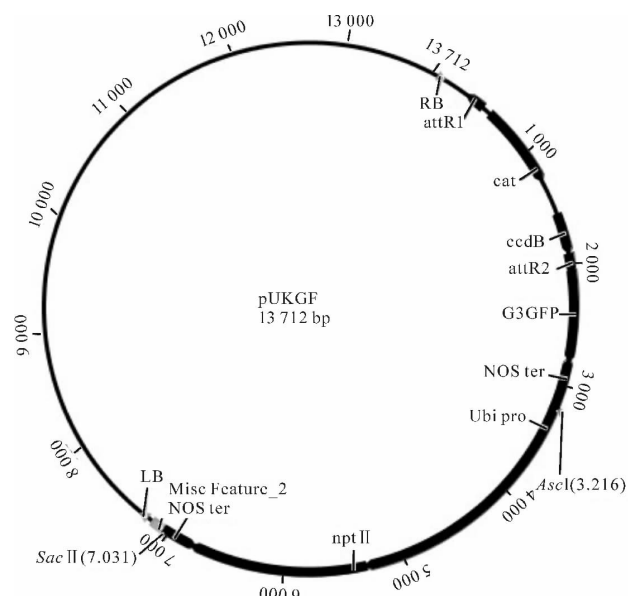


图 4 pUKGF 载体

目前已开发出用于单子叶植物转基因研究的载体系统, 例如 pGreen, 以 *Ubi* 启动子驱动选择标记基因, 但没有专门针对基因启动子研究的载体。本研究对 pGWB450 载体进行了改造。pGWB450 是由 Nakagawa 等<sup>[7]</sup>构建的高效克隆载体, 适于在双子叶植物中对启动子进行研究, 卡那霉素耐受基因 *NPT* II 受 *CaMV* 35S 的控制。本研究通过将 *Ubi* 启动子序列替换 *CaMV* 35S 启动子, 构建了 pUKGF 载体, 适于在单子叶植物中进行转基因植株的筛选, 此载体含有 Gateway 系统, 可以将待研究启动子序列高效整合进来, 根据下游报告基因的表达模式, 确定启动子的调控模式。

总之, 单子叶植物启动子控制基因的时空表达模式, 是基因行使功能不可或缺的序列组件, 对单子叶植物重要性状相关基因进行启动子研究, 有利于推动针对其重要性状的分子遗传改良, 有重要的理论和应用意义。本研究构建的 pUKGF, 集诸多优点于一身, 在单子叶植物启动子研究中将发挥重要作用。

致谢: 许佳盼和王思梦同学在试验中提供了帮助, 谨此致谢。

### 参考文献:

- [1] Christensen A H, Quail P H. Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants

- [J]. Transgenic Research, 1996, 5: 213-218.
- [2] Wu H, Sparks C A, Jones H D. Characterisation of T-DNA loci and vector backbone sequences in transgenic wheat produced by *Agrobacterium*-mediated transformation[J]. Molecular Breeding, 2006, 18: 195-208.
- [3] Khanna H K, Daggard G E. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of wheat using a super-binary vector and a polyamine-supplemented regeneration medium[J]. Plant Cell Reports, 2003, 21: 429-436.
- [4] 李桂英, 王琳情, 施巾帼. 辐射花粉促进普通小麦与窄颖赖草属间杂交的研究[J]. 核农学报, 1999, 13(6): 325-32.
- [5] 吴伟刚, 刘桂茹, 杨学举. 诱变和组织培养相结合在植物育种中的应用[J]. 中国农学通报, 2007, 21(11): 198-201.
- [6] 乔利仙, 于新玲, 隋炯明, 等. 农杆菌介导的花生遗传转化体系的优化[J]. 核农学报, 2012, 26(9): 1244-1248.
- [7] Nakagawa T, Suzuki T, Murata S, *et al.* Improved Gateway binary vectors: High-performance vectors for creation of fusion constructs in transgenic analysis of plants[J]. Bioscience, Biotechnology and Biochemistry, 2007, 71(8): 2095-2100.
- [8] Nakagawa T, Ishiguro S, Kimura T. Gateway vectors for plant transformation [J]. Plant Biotechnology, 2009, 26: 275-284.
- [9] Zheng X, Deng W, Luo K, *et al.* The cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter sequence alters the level and patterns of activity of adjacent tissue- and organ-specific gene promoters[J]. Plant Cell Report, 2007, 26: 1195-1203.
- [10] 李振宇, 徐开林, 潘秀英, 等. 氯化铷法制备感受态细胞[J]. 徐州医学院学报, 2004, 24(4): 315-316.
- [11] Karimi M, Inze D, Depicker A. GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation[J]. Trends in Plant Science, 2002, 7: 193-195.
- [12] Christensen A H, Sharrock R A, Quail P H. Maize polyubiquitin gene: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation[J]. Plant Molecular Biology, 1992, 18: 675-689.
- [13] McElroy D, Brettell R S. Foreign gene expression in transgenic cereals[J]. Trends in Biotechnology, 1994, 12: 62-68.
- [14] Rooke L, Steele S H, Barcelo P, *et al.* Transgene inheritance, segregation and expression in bread wheat [J]. Euphytica, 2003, 129: 301-309.
- [15] 叶兴国, Shirley Sato, 徐惠君, 等. 小麦农杆菌介导转基因植株的稳定获得和检测[J]. 中国农业科学, 2001, 34(5): 469-474.