

南瓜韧皮部特异性启动子在转基因棉花中的表达

罗晓丽¹, 陈晓英², 肖娟丽¹, 张安红¹, 王志安¹, 田颖川², 吴家和^{1*}

(1. 山西省农业科学院棉花研究所生物技术研究室, 运城 044000;

2. 中国科学院微生物研究所, 植物基因组学国家重点实验室, 北京 100080)

摘要:以自行构建的重组南瓜韧皮部特异启动子 dENP 构建了植物表达载体 pBII2。利用根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 介导转化棉花(*Gossypium hirsutum* L.) 品种珂字 312, 共获得转 pBII2 和对照 pBI121 的抗卡那霉素棉花再生植株 243 株, 筛选出 172 株为转基因阳性植株。Southern blot 分析确证外源 *Gus* 基因插入拷贝数在 1 个或 2 个以上。对这些转基因棉花植株进行 *Gus* 染色结果表明 dENP 和 CaMV35S 启动子一样均能驱动 *Gus* 基因的表达, 前者仅在棉花的韧皮部内特异表达, 而 CaMV35S 启动子驱动的 *Gus* 基因为组成性表达。*Gus* 酶活力测定结果进一步表明 dENP 和 CaMV35S 启动子驱动 *Gus* 基因表达水平相当, 但是转 pBII2 棉花植株的 *Gus* 富集在韧皮部组织。证明了 dENP 启动子驱动的外源基因在棉花中具有韧皮部特异而高效表达的特征, 从而可用于棉花抗病、抗蚜虫转基因研究。

关键词: 特异启动子; 棉花; *Gus* 酶活力

中图分类号: S562.035.3 **文献标识码:** A

文章编号: 1002-7807(2007)06-0431-05

Expression Pattern of a Recombinant Phloem-specific Promoter from Pumpkin in Transgenic Cotton Plants

LUO Xiao-li¹, CHEN Xiao-yin², XIAO Juan-li¹, ZHANG An-hong¹, WANG Zhi-an¹, TIAN Ying-chuan², WU Jia-he^{1*}

(1. Institute of Cotton Research, Academy of Shanxi Agricultural Sciences, Yuncheng 044000, China; 2. National Key Laboratory of Plant Genomics, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: The plant expression vector pBII2 was constructed on the basis of pBI121, which contains the neomycin phosphotransferase gene (*NPT II*) expression cassette and the β -glucuronidase (*Gus*) gene driven by a recombinant pumpkin phloem-specific promoter (dENP). Cotton embryogenesis calli from aseptically cultured cv. Coker 312 plants were transformed with pBII2 and pBI121 mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, respectively. 243 independent transformants of kanamycin resistant cotton plants were regenerated. PCR and Southern blot analyses confirmed that the *Gus* gene had been integrated into the plant genome in 172 out of all independently transformed cotton plants. Integration of the transgene varied from one to over two estimated copies in the analyzed plants. *Gus* expression in the transgenic plants was either constitutive or tissue specific, depending on the nature of the promoter used. Results from histochemical staining confirmed that the *Gus* activity was specifically localized in phloem tissue of the transgenic plants if dENP promoter drives the *Gus* gene. The average *Gus* activity in pBII2 transgenic plants had no significant difference compared with that driven by CaMV35S promoter.

Key words: phloem-specific promoter; cotton; *Gus* activity

收稿日期: 2006-09-05 **作者简介:** 罗晓丽(1963-), 女, 在读硕士, mhssjwl@126.com; * 通讯作者, wujiahe@126.com
基金项目: 国家攻关项目(2005BA530C); 山西攻关项目(042005; 041001-1)

棉花生产受到各种因素的影响,诸如,非生物逆境、病毒、病原菌和害虫等,棉花产量和品质很难得到保证。因此通过遗传改良的方法提高棉花的产量、改善品质和增强棉花抗病虫害能力是棉花研究的主要方向。利用基因工程技术把一些外源基因如抗虫基因的表达框架导入到棉花中已获得了很大的成功^[1-3],抗虫转基因棉花的应用提高了棉花的抗虫性,也显著地减少农药的应用,减轻了对环境的污染和破坏^[4]。但转基因植物中驱动外源基因表达的启动子主要还是组成型表达启动子,如 CaMV35S、Ubiquity 等启动子,这些启动子使得外源基因在植物体各个部位表达,不能专一地某些昆虫或病原菌危害的组织器官表达,从而造成外源蛋白利用的不经济,加重了植物的负担,也给转基因安全带来较大的压力^[5-6]。本研究利用已构建的增强型(或重组的)南瓜韧皮部特异启动子 dENP,在 pBI121 的基础上构建了植物表达载体 pBII2;利用农杆菌介导方法把 pBII2 和对照 pBI121 导入棉花基因组中,研究了 dENP-Gus 在棉花中的表达模式,研究结果可为更有效地研究抗病和抗蚜转基因棉花提供韧皮部特异表达的启动子元件。

1 材料和方法

1.1 质粒、菌株和植物

含有增强型的(或重组的)南瓜(*Cucubita moschata*)韧皮部特异启动子表达载体 pBII2 质粒由中国科学院微生物研究所提供;大肠杆菌(*Escherichia coli*)DH5 α ,根瘤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)LBA4404 均由本实验室保存。质粒 pBI121 购自 Clontech 公司。棉花(*Gossypium hirsutum* L.)品种 Coker 312 由本实验室保存。

1.2 酶与试剂

各种内切酶购自 Takara 公司;质粒回收、胶回收试剂盒购自 Omega 公司;PCR 引物由北京三博远志公司合成; α -³²P-dCTP 购自 New England Biolabs (NEB)公司。

1.3 棉花胚性愈伤组织外植体的转化

主要参照胚性愈伤组织转化的方法进行棉花遗传转化^[7]。获得的转基因再生苗进行敞口炼苗 3-5 d,然后洗净根系培养基移植于花盆,在温室中生长,直至收获种子。

1.4 棉花叶片总 DNA 的提取

取转化再生棉花植株的幼嫩叶片约 1 g,在液氮冷冻后研磨至粉状并迅速转移到预热至 65℃ 的 10 mL 提取缓冲液(2 %CTAB + 1.4 mol·L⁻¹ NaCl + 0.2 % 2-巯基乙醇 + 20 mmol·L⁻¹ EDTA + 100 mmol·L⁻¹ Tris·Cl (pH8.0) + 0.5 % PVP) 中,轻轻摇匀,65℃ 保温 30 min。稍冷却后加等体积的氯仿:异戊醇(24:1) 抽提,3000 g 离心 15 min。上清液用平头吸头转移到新的离心管中,加 2/3 体积的异丙醇于 4℃ 沉淀 1 h;2000 g 离心 10 min 后,用 70 %乙醇将沉淀洗涤两次,干燥后溶于适量双蒸水中。DNA 浓度用紫外分光光度计测定。

1.5 PCR 检测

Gus 基因的特异引物为 P_{G(+)}: 5'-TCT GGT ATC AGC GCG AAG TCT-3', P_{G(-)}: 5'-TGT CAC GCG CTA TCA GCT CT-3'。用这一对引物进行 PCR 扩增,应扩增出 1kb 大小的产物。取 50 ng 总 DNA,在 20 μ L 的体系中进行目的片段的扩增。扩增条件为:94℃ 预变性 5 min,然后以 94℃ 变性 1 min,58℃ 退火 1 min,72℃ 延伸 1 min,进行 30 个循环,最后 72℃ 延伸 10 min。取 10 μ L PCR 反应液和适量电泳指示剂在 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳检查反应产物的大小。

1.6 Southern blot 分析

Southern blot 分析按照分子克隆^[8]方法进行,取 20 μ g 棉花基因组 DNA,经 *Hind*III 完全酶切后,在 1.0% 的琼脂糖胶上电泳,将胶上的 DNA 转移到 Yond-N¹ 尼龙膜上后,用 α -³²P-dCTP 标记的 *Gus* 基因探针进行杂交。

1.7 Gus 组织化学染色

转基因棉花 *Gus* 活性的组织化学染色参照 *Gus* 组织化学染色^[9]的方法进行。

1.8 Gus 酶活性检测

使用 Hoefer Pharmacia 生物技术公司生产的荧光计(DyNA QuanTM 200 Fluorometer)在激发光 365 nm,发射光 455 nm 条件下测定 *Gus* 反应液所产生的荧光强度。参照 *Gus* 组织化学染色^[8]等所述的方法计算 *Gus* 的比活度,用 pmol 4-MU·min⁻¹· μ g⁻¹ 可溶性总蛋白表示。

2 结果与分析

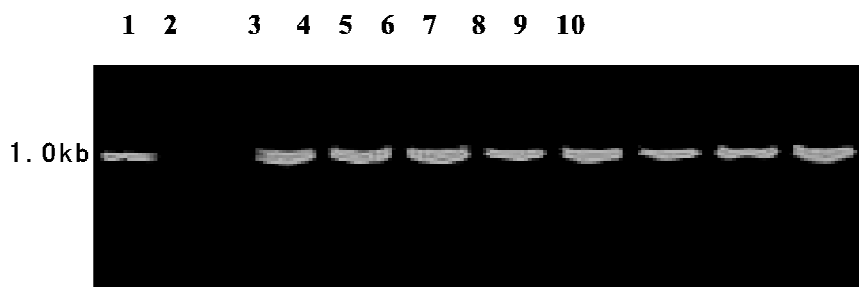
2.1 植物表达载体 pBII2 的构建

质粒 pBNII 含有南瓜韧皮部蛋白 PP2 基因启动子+8~-465 的片断^[6],用 PCR 方法扩增该

片断的-85~-465 片断后,通过 *Hind*III 和 *Eco*R V 位点连接到 +8~-465 上游,即相当于-85~-465 片断正向重复 2 次形成了带有双增强子序列的南瓜 PP2 启动子-*Gus* 嵌合基因植物表达载体 pBII2,其结构图见图 1 所示。该带有双增强子序列的 dENP 启动子序列已经测定证明其结构正确(资料略),即 pBII2 的结构是正确的。

2.2 棉花植株的 PCR 检测

如材料与方法所述,利用 PCR 检测了转化再



泳道 1~2 分别为正对照和负对照;泳道 3~6 依次为 pBII2 转化植株的 1,4,2 和 3 株系;泳道 7~10,依次为 pBI121 转化植株的 1,2,3 和 4 号株系

图 2 部分抗性再生植株的 PCR 检测图

Fig. 2 PCR detection of some transformants

2.3 转基因棉花的 Southern-blot 分析

通过 Southern-blot 杂交对转化体的再生植株进行分析,以检测外源基因的整合情况。因为 *Gus* 基因序列中没有 *Hind*III 位点,而且 pBII2 中仅有一个 *Hind*III 位点,所以出现的杂交条带数就可以认为是 *Gus* 基因在植株中的拷贝数。对所有 PCR 阳性植株进行了分子杂交分析,结果表明外源基因已经整合到棉花的基因组中,并且大多数以单拷贝插入,部分植株的 Southern 杂交结果见图 3 所示。

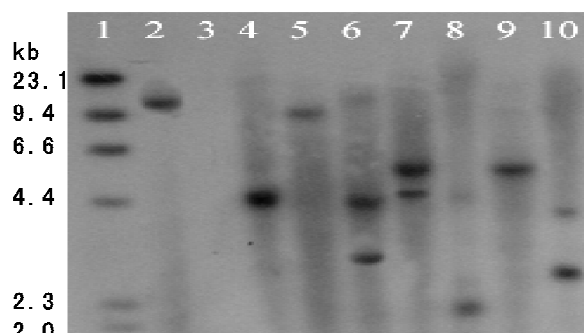
2.4 *Gus* 的组织化学染色

用 X-Gluc 染色转基因或对照棉花茎横切片,经酒精脱色后在显微镜下观察,结果发现转化 pBI121 的棉花各茎染为比较均匀的蓝色,而转化 pBII2 的棉花仅在茎的韧皮部出现蓝色。所有的负对照都没有蓝色出现(图 4)。这些结果表明,dENP-*Gus* 在转基因棉花中为韧皮部特异表达。

2.5 *Gus* 酶活性检测

对转 pBII2 的棉花植株和转 pBI121 的棉花植株的 *Gus* 酶活性进行检测,数据与非转基因对照进行矫正,结果见图 5(A)(部分植株),转基因单株之间差异较大。

生棉花植株中的 *Gus* 基因,部分转化植株 PCR 扩增结果如图 2 所示。PCR 检测筛选了 243 棵转化再生植株,共有 172 棵呈阳性,其中转 pBII2 的 97 棵,转 pBI121 的 75 棵。这一结果表明棉花的转化率至少应达 70.80%,部分植株中未检测到 *Gus* 基因可能是在卡那霉素筛选过程中有 *Gus* 基因的丢失或提取植物 DNA 制品中有抑制 PCR 的物质,当然也不能排除卡那霉素筛选中假阳性再生芽的可能。



棉花总 DNA 经 *Hind*III 酶切,电泳转膜后与 32 P 标记的 *Gus* 基因片段的杂交结果。泳道 1, DNA 分子量标准;泳道 2, pBII2 质粒(CK⁺);泳道 5,非转基因棉花(CK⁻);泳道 3~6,分别为 pBII2 转化植株 1,4,2 和 3 号;泳道 7~10,分别为 pBI121 转化植株 1,2,3 和 4 号。

图 3 部分转基因株 DNA 的 Southern blot 杂交图

Fig. 3 Southern blotting analysis of some transgenic cotton plants

对以上筛选的阳性植株按材料与方法所述进行 *Gus* 酶活性检测,分别计算两种表达载体转化植株的平均 *Gus* 酶活性,结果如图 5(B)所示。

转 pBII2 的棉花植株的平均 *Gus* 酶活性为 8.85 pmol 4-MU · min μ g,而转 pBI121 的棉花植株的平均 *Gus* 酶活性为 10.12 pmol 4-MU · min⁻¹ · μ g⁻¹,说明两类植株的 *Gus* 活性的平均值接近。然而,由于 pBII2 转化株中的 *Gus* 主要富

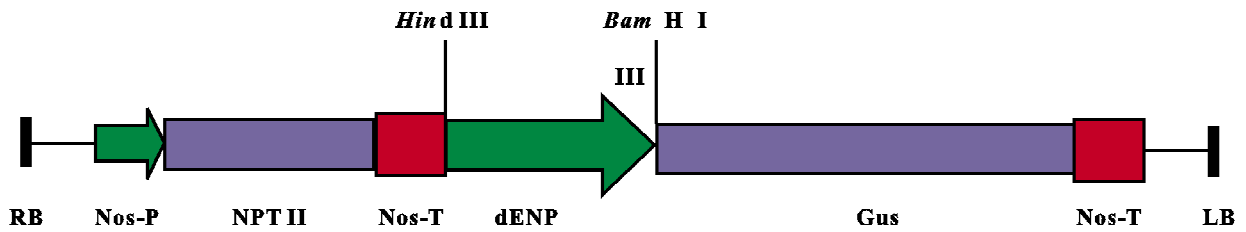
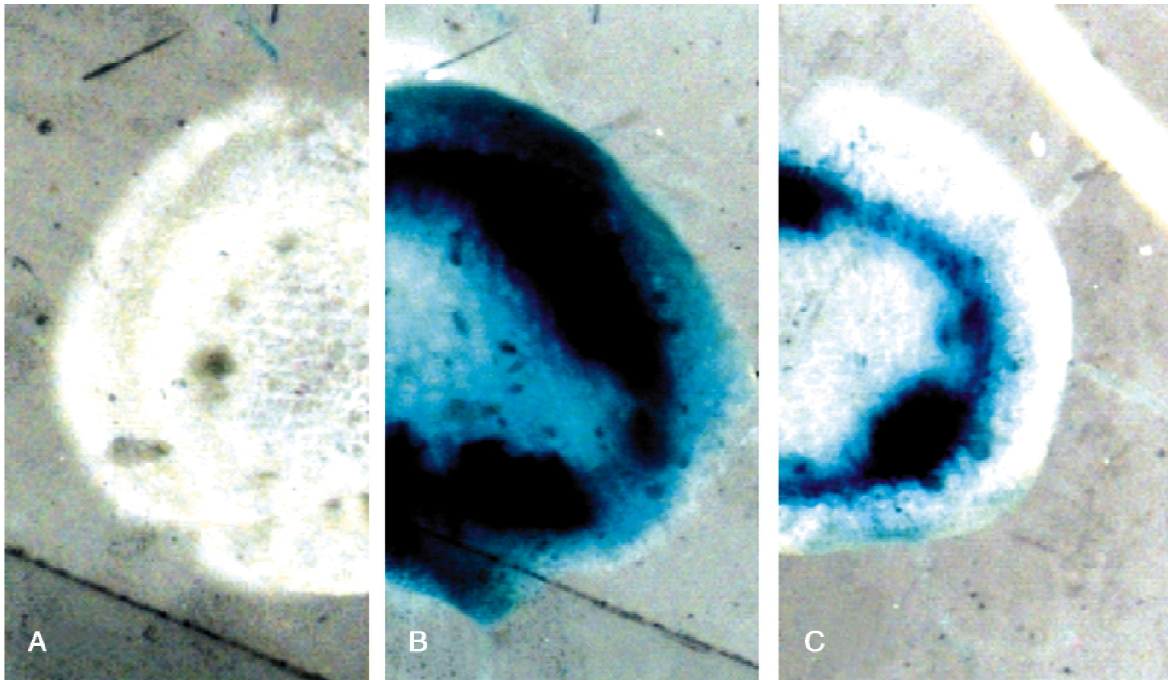


图 1 植物表达载体 pBII2 的 T-DNA 结构示意图

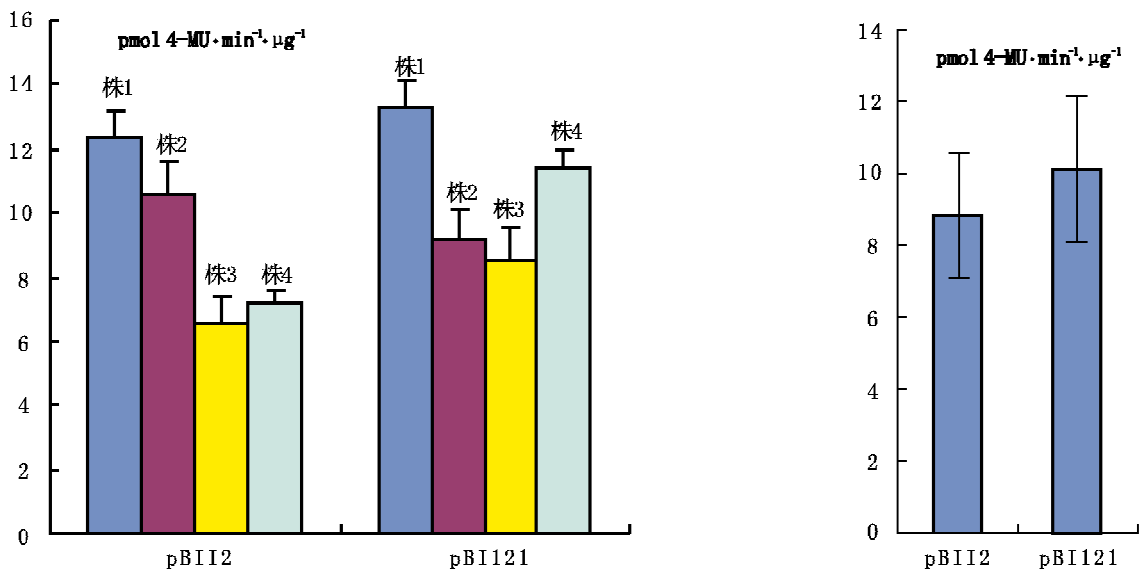
Fig.1 T-DNA structure of the plant expression vector pBII2



A,B,C 分别是非转基因植株及 pBII21 和 pBII2 转基因植株的茎横切片

图 4 转基因棉花植株茎的 Gus 染色图片

Fig.4 Gus staining of the stem cross sections from the transgenic and untransgenic cotton plants



A: 转 pBII2 和 pBII21 棉花部分植株的 Gus 酶活性, 株 1、株 2 等分别表示两种转基因的随机单株编号

B: 转 pBII2 和 pBII21 棉花部分植株的 Gus 酶平均活性

图 5 转 pBII2 和 pBII21 棉花植株的 Gus 酶活性

Fig.5 The Gus activity of the transgenic cotton plants transformed with pBII2 or pBII21

积于棉花的韧皮部组织,因此,其韧皮部组织的相对表达量应高于 pBI121 转化植株韧皮部组织的表达量。

3 讨论

关于韧皮部特异启动子的克隆研究报道已经有一些,主要是来自维管束植物、植物病毒和植物病原菌等。增强型南瓜韧皮部特异启动子是本实验室郭洪年等^[6]克隆的,虽然在烟草中对该启动子的组织特异性和表达强度等进行了初步的研究,然而对于该启动子在其它植物中,尤其是大田作物中是否也存在高效、特异驱动基因表达的效应尚需实验证明。本实验以重要的农作物棉花为研究对象,进行该启动子的组织特异性和表达活性的研究,结果表明增强型的南瓜韧皮部特异启动子可在棉花中高效的驱动 *Gus* 基因的表达,并且为韧皮部组织特异性表达。不同的转基因棉花植株中 *Gus* 表达的活性存在着差异,这与 T-DNA 在植物基因组中插入的位置、拷贝数和重组均有直接的关系,这已经有较多的研究报道。本试验所得到的转化植株中,不同的棉花转化体的 *Gus* 基因表达差异虽然很大,但表达量均明显高于对照,在所检测 172 株转基因植株中没有发现 *Gus* 基因沉默的现象。其中 pBI12 的转化株的 *Gus* 平均表达水平和 pBI121 的转化株的 *Gus* 平均表达水平相当,说明 dENP 启动子和 CaMV35S 启动子在棉花转基因利用中对外源基因的驱动效果是相当的。虽然两种启动子所驱动的 *Gus* 基因活性相近,但由于 dENP 启动子所驱动的基因为韧皮部特异表达,所以维管组织中 *Gus* 蛋白的浓度会更高。即在表达部位的单位面积上,与 35S 启动子相比,dENP 启动子能更高水平地表达目的基因。

参考文献:

- [1] PERLAK F J, Oppenhuizen M, Gustafson K, et al. Development and commercial use of Bollgard cotton in the USA-early promises versus today's reality[J]. *Plant J*, 2001, 27: 489-501.
- [2] SUN Jing, Tang Can-ming, Zhu Xie-fei, et al. Characterization of resistance to *Helicoverpa armigera* in three lines of transgenic Bt Upland cotton[J]. *Euphytica*, 2002, 123: 343-351.
- [3] 李付广,郭三堆,刘传亮,等. 双价基因抗虫棉的转化与筛选研究[J]. *棉花学报*, 1999, 11(2): 106-112.
- [4] BENEDICT J, Altman D. Commercialization of transgenic cotton expressing insecticidal crystal protein. J. Jenkins & S. Saha (Eds.), *Genetic improvement of cotton: Emerging technologies*[M]. Enfield, NH: Science Publishers Inc., 2001, 137-201.
- [5] SHELTON A M, Zhao Jian-zhou, Roush R T. Economic, ecological, food safety, and social consequences of the deployment of Bt transgenic plants[J]. *Annual Review of Entomology*, 2002, 47: 845-881.
- [6] GUO Hong-nian, Chen Xiao-ying, Zhang Hei-li, et al. Characterion and activity enhancement of the phlonem-specific pumpkin PP2 gene promoter[J]. *Transgenic Research*, 2004, 13: 559-566.
- [7] WU Jia-he, Zhang Xia-long, Nie Yi-chui, et al. High-efficiency transformation of *Gossypium hirsutum* embryogenic calli mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of insect-resistant plants[J]. *Plant Breeding*, 2005, 124: 142-147.
- [8] SAMBROOK J D, Russell W. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 3nd ed[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 2001.
- [9] JEFFERSON R A. Assaying Chimeric Genes in plants: The GUS gene fusion system[J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1987, 5: 387-405. ●