

中图分类号: S532 文献标识码: A 文章编号: 1672-3635(2006)03-0140-05

Patatin、Wun1启动子驱动的 PPO反义基因植物表达载体的构建

陈春艳^{1,2}, 王清^{3*}

(1. 甘肃省作物遗传改良与种质创新重点实验室, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃农业大学农学院, 甘肃 兰州 730070;
3. 甘肃农业大学生命科学技术学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 以植物表达载体 PC₃-ASPPot_y 为基础, 分别构建了由 Patatin、Wun1 启动子调控的 PPO 反义基因植物表达载体 pCP-ASPPot_y、pCW-ASPPot_y, 并通过直接导入法将重组质粒分别导入根癌农杆菌 LBA4404 中, 经 PCR 鉴定证明, 此基因已整合到农杆菌 Ti 上。表达载体的建立为获得地上部分 PPO 活性正常、块茎损伤低褐化的马铃薯加工型改良品种奠定了基础。

关键词: Patatin 启动子; Wun1 启动子; PPO 反义基因; 表达载体

马铃薯是一种酚类物质含量较高的粮菜兼用型作物。酚类物质在叶片中的积累有利于其抗病性的提高, 但在块茎中的积累却加重其褐化程度, 影响马铃薯的加工品质; PPQ (多酚氧化酶) 是一种能够催化酚类物质形成醌的氧化酶, 醌的聚合将导致植物受伤部位的褐化, 可见 PPO 是引起植物损伤褐化的主要因素。如何保证地上植株具有较高的 PPO 活性, 同时又能抑制块茎中 PPO 活性, 减少块茎酶促褐变是马铃薯常规育种一直难以解决的问题。采用反义 RNA 技术有目的地调控转基因植株中多酚氧化酶基因的表达, 同时选择合适的启动子使外源基因在特定的部位和特定的时间高效表达, 是培育低褐变马铃薯加工品种的首选途径。虽然我们已构建了 PC₃-ASPPot_y 表达载体^[1], 但由于采用了 CaMV35S 启动子, 从而导致外源基因在植物的所有部位以及发育的所有阶段都表达^[2-3], 不具有特异性。利用马铃薯块茎特异蛋白启动子 Patatin、损伤诱导型启动子 Wun1 来驱动 PPO 反义基因表达, 可能仅限于在马铃薯块茎形成过程中和块茎受到损

伤时进行, 这样既能够有效降低块茎 PPO 活性而达到抑制损伤褐化的目的, 同时又保证了 PPO 基因在地上部分表达正常而避免抗病性的减弱。本研究构建了由 Patatin、Wun1 启动子驱动的 PPO 反义基因植物表达载体 pCP-ASPPot_y、pCW-ASPPot_y, 为培育抗损伤褐化马铃薯加工型品种奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌株与质粒

大肠杆菌 E.coli DH5 α 、农杆菌 LBA4404、pUCm-P、pUCm-W、PC₃-ASPPot_y 质粒由甘肃农业大学农学院作物遗传育种重点实验室提供。PC₃-ASPPot_y 表达载体是由马铃薯多酚氧化酶基因 (POT32) 序列同源片段反向连接在 PC₃ 表达载体^[1]。

1.1.2 试剂

Taq 酶、T₄DNA 连接酶为华美生物工程公司产品, 限制性内切酶 (BamH_I、Sal_I、XhoI、Sac_I)、DNA Marker、pMD18-T 载体为大连宝生物公司产品, DNA 回收试剂盒为上海生工生物工程有限公司产品, 氨苄青霉素、卡那霉素、利福平为 Sigma 公司产品, 其他化学试剂均为国产分析纯试剂。

1.1.3 PCR 引物设计

根据已报道的基因序列^[3-4], 运用 Oligo 生物学

收稿日期: 2005-12-29

基金项目: 甘肃省自然科学基金项目资助 3ZS041-A25-047

作者简介: 陈春艳 (1977-), 女, 硕士研究生, 研究方向: 基因工程在遗传育种中的应用。

* 通讯作者: E-mail: wangqing@gsau.edu.cn

软件设计引物, 同时引入了便于在载体构建过程中进行定向连接的相应酶切位点。引物序列如下:

Patatin 启动子:

P1: 5' CGG↓TCGACGTGCGTATTAGTTTTAGCG 3'
Sal

P2: 5' CGG↓GATCCGGTATATATAGGCACGTA 3'
BamH

Wun1 启动子:

P1: 5' CGG↓TCGACTATACATACATAAAACAC 3'
Sal

P2: 5' CGG↓GATCCAGGAGGACCTAGGAACCAC 3'
BamH

引物由上海生工生物工程有限公司合成。

1.2 方 法

1.2.1 大肠杆菌质粒 DNA 的提取

相关操作参照王关林等^[5]的方法进行。

1.2.2 目的基因的 PCR 扩增

以 pUCm- P、pUCm- W 质粒 DNA 为模板, P1、P2、P1'、P2' 为引物, 分别扩增 Patatin、Wun1 启动子。扩增参数为: 95 预变性 3 min; 95 变性 1 min, 55 退火 1 min, 72 延伸 1.5 min, 35 个循环; 72 延伸 10 min, 最后于 4 保存。

1.2.3 扩增产物的克隆及重组质粒的筛选

取 2 种回收的扩增产物各 5 μL, 分别与 1 μL pMD18- T 和 5 μL ligation solution 混合, 16 连接过夜。将连接反应液转化感受态 E.Coli DH5α, 涂布于含有 100 mg·L⁻¹ Amp 的 X- Gal/IPTG/LB 平板培养基上, 倒置, 37 培养 12~16 h, 选择分隔良好的白色菌落, 提取质粒, 通过 PCR 和酶切鉴定筛选重组质粒。

1.2.4 Patatin、Wun1 启动子驱动的 PPO 反义基因植物表达载体的构建及其鉴定

重组质粒、表达载体的酶切、转化、筛选方法按《分子克隆实验指南》^[6]进行; 连接方法改进如下: 10 μL 反应体系中, 载体 DNA 1 μL, 外源 DNA 6 μL 及 10X ligation buffer、T₄DNA Ligase 各 1 μL, ddH₂O 补至 10 μL, 16 连接 8 h。然后取 5 μL 连接产物, 加 95 μL ddH₂O、250 μL 无水乙醇, 室温 12000 r·min⁻¹, 离心 15 min。弃上清, 吹干。加入 5 μL ddH₂O 溶解沉淀, 进行二次连接。

反应体系如下: 1 μL ligation buffer、1 μL T₄DNA Ligase, ddH₂O 补至 10 μL, 16 连接 8 h。

取 5 μL 连接产物直接用于转化, 于 37 培养 12~16 h, 选择白色菌落, 通过双酶切和 PCR 对反义表达载体进行鉴定。

1.2.5 Patatin、Wun1 启动子驱动的反义 PPO 表达载体转化农杆菌

SDS 碱裂解法小量提取表达载体质粒 DNA, 通过直接导入法转化农杆菌 LBA4404。转化产物涂布于含有 50 mg·L⁻¹ Kan、25 mg·L⁻¹ Str、25mg·L⁻¹ Rif 的 YEP 固体培养基上, 于 28 培养 2 d, 选择白色菌落, 对其进行 PCR 鉴定。

2 结果与分析

2.1 Patatin、Wun1 启动子驱动的 PPO 反义基因植物表达载体的构建策略

以 pUCm- P、pUCm- W 质粒 DNA 为模板, P1、P2、P1'、P2' 为引物, 分别扩增 Patatin、Wun1 启动子, 并引进酶切位点 BamH 和 Sal。回收纯化 PCR 产物后, 直接克隆到 pMD18- T 载体上, 得到具有特定酶切位点的 Patatin、Wun1 启动子重组质粒。对重组质粒进行 BamH 和 Sal 双酶切, 回收小片断。对 PC₃- ASPPO_{ty} 反义表达载体进行 BamH + Xho 双酶切, 回收大片断。经 T₄DNA Ligase 连接, 获得具有 Patatin、Wun1 启动子的 PPO 反义基因表达载体 (图 1)。

2.2 具有特定酶切位点的 Patatin、Wun1 启动子重组质粒的获得

按 1.2.2 的方法, 分别扩增到了 1.1 kb 和 1.2 kb 的 DNA 片断。回收纯化目的片断按 1.2.3 方法分别连接到 pMD18- T 载体上。其中, Patatin 启动子重组质粒共获得 24 个白斑, 5 个蓝斑, 白斑率为 83%; Wun1 启动子重组质粒共获得 63 个白斑, 22 个蓝斑, 白斑率为 74%。各选择 1 个蓝色菌落, 5 个白色菌落, 提取质粒 DNA, 1% 琼脂糖电泳检测, 与对照相比, Patatin 启动子重组质粒有 5 个滞后质粒, Wun1 启动子重组质粒有 2 个滞后质粒 (图 2, 3)。对滞后质粒进行扩增, 分别得到了 1.1 kb 和 1.2 kb 的 2 个片断 (图 4)。并对滞后质粒进行 BamH 和 Sal 双酶切鉴定, 获得 2 条 DNA 电泳条带, 其中一条与 pMD18- T 载体分子量相仿 (约 2692 bp), 另一条与 Patatin 启动子 (1.1 kb) 或 Wun1 启动子 (1.2 kb) 相仿 (图 5)。将 PCR 和双酶切鉴定合适的含有 Patatin、Wun1 启动子的重组子

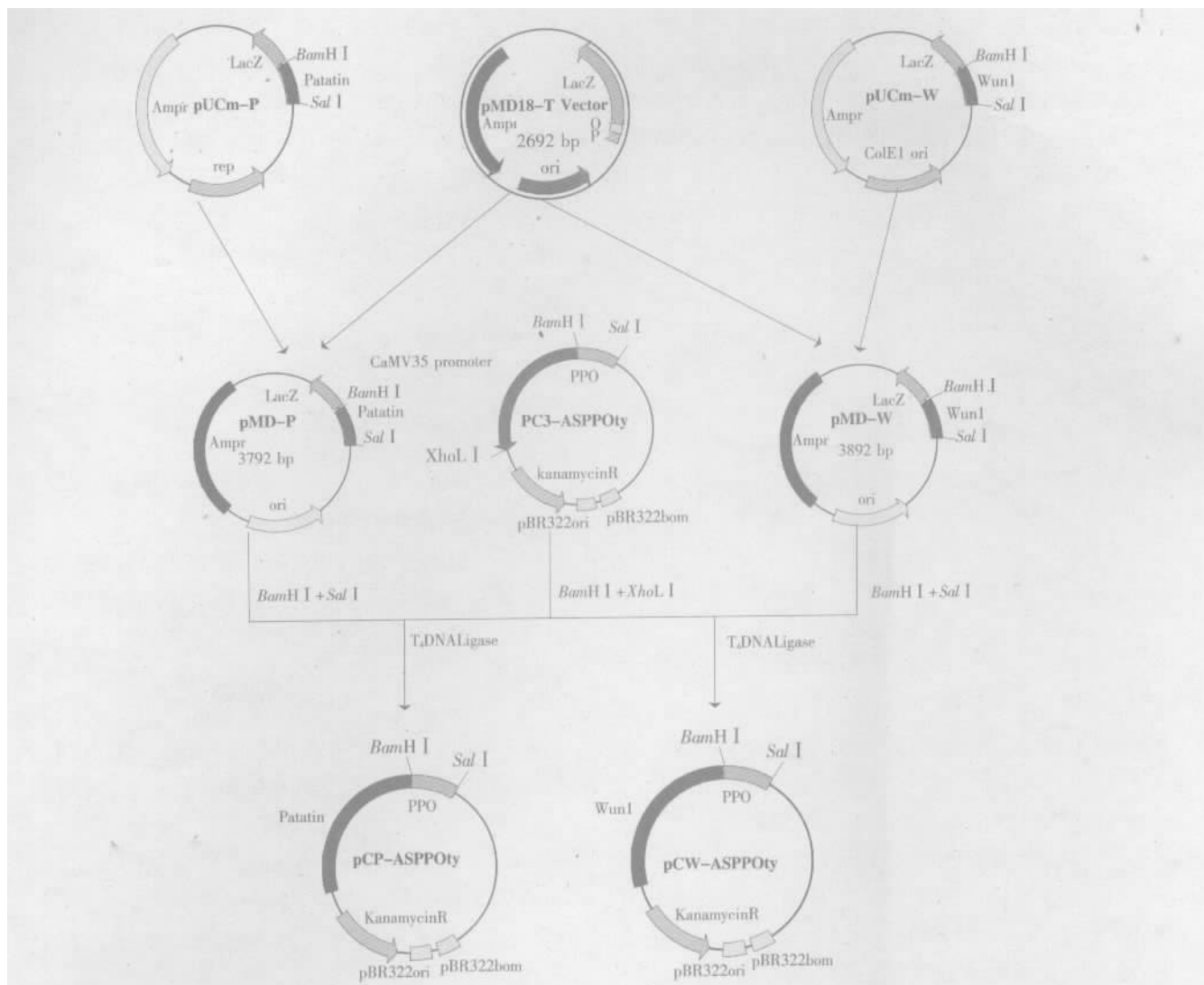
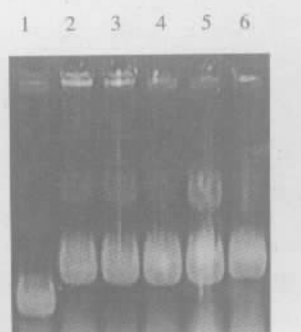
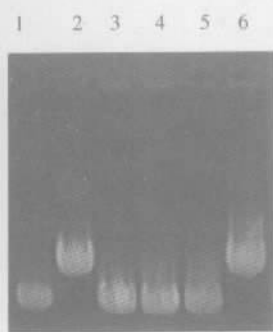


图1 Patatin、Wun1启动子驱动的PPO反义基因植物表达载体构建策略



1: 对照(蓝斑)
2, 3, 4, 5, 6: 滞后质粒(白斑)

图2 Patatin重组子滞后质粒筛选



1: 对照(蓝斑)
2, 6: 滞后质粒(白斑)
3, 4, 5: 假阳性质粒

图3 Wun1重组子滞后质粒筛选



M: 200 bp DNA Marker
1: Patatin 滞后质粒 PCR 扩增结果(≈1.1 kb)
2: Wun1 滞后质粒 PCR 扩增结果(≈1.2 kb)

图4 Patatin、Wun1 滞后质粒 PCR 鉴定



M: λ EcoRT-14 Marker
1: Patatin 滞后质粒双酶切结果(≈1.1 kb)
2: Wun1 滞后质粒双酶切结果(≈1.2 kb)

图5 Patatin、Wun1 滞后质粒 BamH I + Sal I 双酶切鉴定

分别命名为 pMD- P、pMD- W。

2.3 Patatin、Wun1 启动子驱动的 PPO 反义基因植物表达载体的构建

对 pMD- P、pMD- W 进行 BamH + Sal 双酶切, 分别回收 1.1 kb 和 1.2 kb 的碱基片断; 同时对 PC₃- ASPPOty 反义表达载体质粒用 BamH 和 XhoI 来消化, 回收 PC₃- ASPPOty 的大片断。通过 T₄DNA 连接酶分别对 PC₃- ASPPOty 大片断与 pMD- P、pMD- W 小片断进行连接, 然后将连接反应液转化感受态 E.ColiDH5 α 通过 50 mg·L⁻¹ Kan 筛选获得转化子。

2.4 Patatin、Wun1 启动子驱动的 PPO 反义基因表达载体的鉴定

对获得的 2 种阳性菌斑, 摇菌, 提取质粒, 进行 BamH + Sac 双酶切, 结果均获得 470 bp 左右的条带, 此条带与 PPO- ty 基因大小相近。利用 P1、P2、P1'、P2' 为引物进行 PCR, 也分别扩增出 1.1 kb 和 1.2 kb 的 DNA 条带, 其碱基大小与 Patatin 和 Wun1 启动子分子量相符合 (图 6)。说明 Patatin、Wun1 启动子已按预定的顺序与同时回收的 PC₃- ASPPOty 大片断连接起来, 所构建的表达载体正确, 故定义这两个表达载体分别为 pCP- ASPPOty、pCW- ASPPOty。

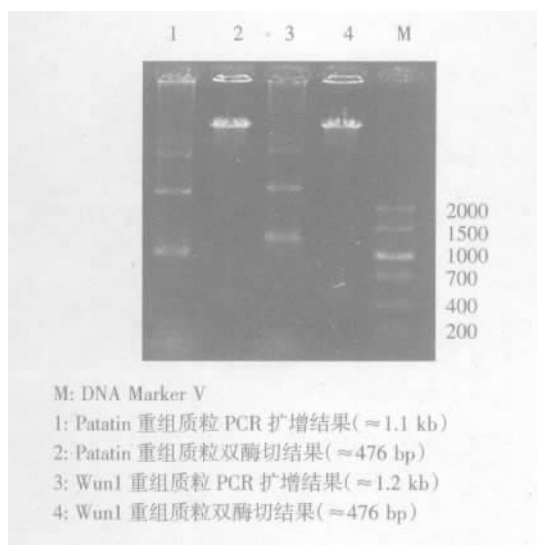


图 6 Patatin、Wun1 重组质粒 PCR 及 BamH + Sac 双酶切鉴定

2.5 Patatin、Wun1 启动子驱动的反义 PPO 表达载体转化农杆菌

通过直接导入法将 pCP- ASPPOty、pCW- ASP-

POty 表达载体导入农杆菌 LBA4404 中, 共获得 10 个白色菌斑。其中, pCP- ASPPOty 有 2 个菌斑, pCW- ASPPOty 有 8 个菌斑。分别取菌斑提取质粒, 以两个启动子的 PCR 引物进行扩增鉴定, 前者 2 个均为阳性菌落, 后者 5 个为阳性菌落, 3 个为假阳性菌落 (图 7)。

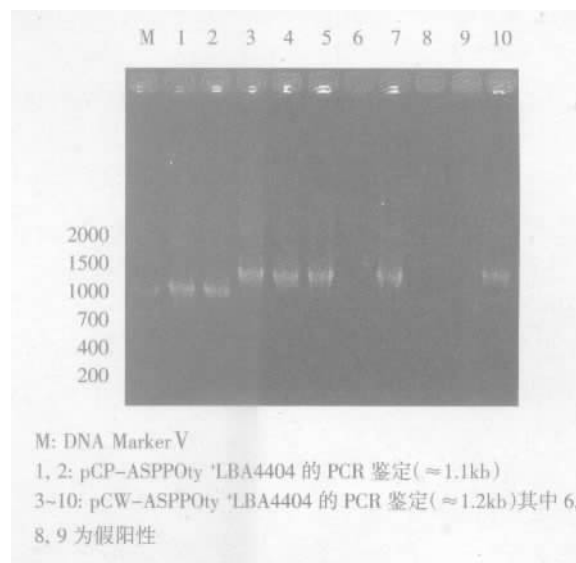


图 7 表达载体导入农杆菌的 PCR 鉴定

3 讨 论

Patatin 启动子是马铃薯块茎特异蛋白启动子, 能够专一性的在块茎发生和形成过程中高水平表达^[3, 7-9], Wun1 启动子是植物受到机械损伤或病原侵染时特异表达活性的一种损伤诱导型启动子^[4, 10], 将这二者分别连接在 PC₃- ASPPOty 载体上, 作为调控反义 PPO 基因的启动子, 以取代该载体上原有的 CaMV35S 启动子。对现有的优良加工型马铃薯品种进行遗传转化, 则可以促使多酚氧化酶基因在马铃薯中的反义表达仅限于块茎发生和形成过程中, 或者当马铃薯受到机械损伤或病原侵染时, 诱导 PPO 基因在马铃薯中进行反义表达, 从而降低转化植株块茎的 PPO 活性, 有效控制 (或抑制) 马铃薯块茎的损伤褐化, 而保证地上植株正常的 PPO 活性。这对积极防御病害, 解决马铃薯在收获、贮藏及产品加工过程中机械损伤而产生的酶促褐化问题具有重要的意义。

在构建表达载体过程中, 由于 Sal 与 XhoI 的识别位点经酶切后, 可形成相互匹配的粘性末端, 故选用 BamH + XhoI 对 PC₃- ASPPOty 载

体进行消化, 用 BamH⁺ + Sal⁺ 双酶切 pMD- P、pMD- W 重组质粒, 以便定向地将目的片段插入到表达载体中。但是 SalI 与 XhoI 酶切后的粘性末端经 T4DNA 酶连接后, 其连接后的位点将不再被 Sal⁺ 或 XhoI⁺ 所识别, 故只能通过 PCR 和 BamH⁺ + Sac⁺ 双酶切来鉴定表达载体上的 PPO 基因, Patatin 和 Wun1 启动子驱动的反义 PPO 基因表达载体构建是否成功。

在连接反应中, 高浓度 DNA 有利于分子间的聚合, 而低浓度 DNA 有利于分子的自身环化^[11]。在本实验中, 由于所构建的表达载体属低拷贝数的质粒载体, 对宿主菌的毒性太大, 以至于获得转化子的转化率和生长速率极低^[6], 一次连接很难成功。因此改进连接方法, 采用高浓度 DNA 一次连接后, 纯化连接产物, 再进行二次连接, 避免了上述矛盾, 大大提高连接的成功率。

[参 考 文 献]

- [1] 王清, 王蒂, 黄俊生, 等. 马铃薯多酚氧化酶基因克隆及反义表达载体构建 [J]. 西北植物学报, 2003, 23(10): 1745- 1749.
- [2] 侯丙凯, 夏光敏, 陈正华. 水稻中 Dicer 酶基因片段的克隆及反义表达载体的构建 [J]. 遗传, 2001, 23(5): 492- 497.
- [3] 贾笑英. 用于提高马铃薯淀粉含量的 glgC 基因克隆、突变及表达载体构建 [D]. 兰州: 甘肃农业大学, 2003.
- [4] 向云, 王蒂, 张金文. Wun1 启动子 Mel 3 非转录区的克隆及 Hrp 基因植物表达载体的构建 [J]. 甘肃农业大学学报, 2004, 2: 124- 130.
- [5] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2002: 734- 776.
- [6] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 黄培堂, 译. 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 11.
- [7] 刘兴军, 赵微平, 林忠平. 马铃薯 Patatin class-I 启动子及信号肽基因的克隆和序列分析 [J]. 生物工程进展, 1996, 16(2): 29- 30.
- [8] 李灿辉, 王军, 龙维彪. 马铃薯块茎特异蛋白 Patatin 研究进展 [J]. 马铃薯杂志, 1998, 12(3): 179- 186.
- [9] Paiva E, Lister R M, Park W D. Induction and accumulation of major tuber proteins of potato in stems and petioles [J]. Plant Physiol, 1983, 71: 161- 168.
- [10] Logemann J, Lipphardt S, Schell J. 5 Upstream sequences from the Wun1 gene are responsible for gene activation by wounding in transgenic plants [J]. Plant Cell, 1989, (1): 151- 158.
- [11] 范钦, 邱国华, 许新萍, 等. 植物表达载体 pKC- 3 的构建及大分子 DNA 连接策略 [J]. 生物技术, 2000, 10(4): 1- 2.

Construction of Antisense PPO Gene Plant Expression Vector Controlled by Patatin or Wound- inducible Promoter

Chen Chunyan^{1, 2}, Wang Qing³

(1. Gansu Key Laboratory of Crop Genetic Improvement and Germplasm Enhancement, Lanzhou, Gansu 730070, China; 2. College of Agronomy, Gansu Agriculture University, Lanzhou, Gansu 730070, China; 3. College of Life Science and Technology, Gansu Agriculture University, Lanzhou, Gansu 730070, China)

Abstract: Two plant expression vectors were constructed in this experiment. Plasmid pCP- ASPPOty and pCW- ASPPOty were derived from pC3- ASPPOty, with PPO antisense gene being controlled by Patatin promoter and Wound- inducible promoter, respectively. Then, the recombination plasmids were introduced into *Agrobacterium* LBA4404 by direct entering ways. It was proven that the vectors were integrated into LBA4404.

Key Words: patatin promoter; wound- inducible promoter; PPO antisense gene; expression vector