

# 一个新的马铃薯 GBSS 基因 5'侧翼序列克隆及调控活性研究

李淑洁<sup>1</sup>, 张金文<sup>1,2\*</sup>, 王煜<sup>2</sup>, 郭志鸿<sup>1</sup>, 陈正华<sup>2</sup>

(1. 甘肃农业大学农学院, 甘肃 兰州 730070; 2. 甘肃亚盛集团博士后科研工作站, 北京 100101)

**摘要:** 采用 PCR 技术, 从马铃薯叶片基因组 DNA 中扩增到了约 0.6 kb 的马铃薯 GBSS 基因的 5'侧翼序列, 经序列同源性分析所克隆的序列与已知序列同源性为 97.41%, 含有启动基因表达所需的主要调控元件 CAAT 盒和 TATA 盒。构建该序列与 GFP 的融合基因植物表达载体 pBIGGFP, 并用基因枪转化法将 pBIGGFP 导入马铃薯无菌苗茎段、叶片和微型薯薯片, 用荧光显微镜观察转化组织中 GFP 的瞬时表达, 结果表明 GFP 在上述器官中都得到了表达, 说明所克隆的约 0.6 kb GBSS 基因的 5'侧翼序列是具有启动基因表达的功能。

**关键词:** 马铃薯; GBSS 基因 5'侧翼区; 克隆; GFP; 调控

马铃薯块茎是淀粉合成和积累的重要贮存器官, 在淀粉合成过程中一系列淀粉合成酶基因的表达会影响到块茎中合成淀粉的效率和性质。控制马铃薯块茎中淀粉合成酶基因的表达调控, 是实现淀粉品质改良的关键。在基因表达调控中, 启动子作用是极为重要的<sup>[1,2]</sup>。目前人们对器官特异表达启动子的研究和应用越来越重视, 在马铃薯上已发现的块茎特异性启动子有 patatin 基因启动子<sup>[3]</sup>、GBSS 基因启动子<sup>[4,5]</sup>, 其中对 patatin 基因启动子研究和利用较多, 但对 GBSS 基因启动子活性的研究报道相对较少。据报道, 0.8 kb 马铃薯 GBSS 基因 5'侧翼序列驱动的 GUS 基因在匍匐茎和块茎中的表达, 比叶片中高 125~3350 倍<sup>[6,7]</sup>; 此外, 0.4 kb 的 5'侧翼序列亦表现块茎专一性<sup>[7]</sup>。因此, 我们在进行的以基因工程技术培育降低马铃薯淀粉糊化温度和提提高冻融稳定性的研究中, 拟采用马铃薯颗粒结合型淀粉合成酶(granule-bound starch synthase, GBSS)基因启动子控制目的基因在块茎中的表达, 以培育出能够产生具有无直链淀粉、低糊化温度和抗冻融淀粉的马铃薯品种或育种材料。目前, 我们以引进的马铃薯品种“大西洋(Atlantic)”基因组 DNA 为

模板, 克隆到了 0.6 kb 的 GBSS 基因 5'侧翼序列, 与已知序列对比发现在其上游缺失 136 个碱基, 而在靠近转录起始位点插入了 14 个碱基。为了利用这一新颖的启动子, 首先必须对其活性进行鉴定。为此, 我们利用绿色荧光蛋白(GFP)基因为报道基因, 构建了 GBSS 基因 5'侧翼序列与 GFP 基因融合的植物表达载体, 采用基因枪转化法对马铃薯进行转化, 通过对 GFP 基因在马铃薯不同器官中的瞬时表达效果测定, 用以确定克隆的片段是否有启动子活性。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 植物材料

马铃薯品种大西洋(Atlantic)组培苗, 由甘肃农业大学农学院实验室提供。

#### 1.1.2 菌株及质粒

宿主菌 *E.coli* DH5 $\alpha$ 、含绿色荧光蛋白(GFP)基因的载体 pBIGFP 由亚盛集团北京博士后科研工作站实验室提供; pUCm-T vector 购自上海生物工程有限公司。

#### 1.1.3 酶与试剂

各种限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、Taq DNA Polymerase 均购自大连宝生物公司; RNase 购自 Sigma 公司; DNA 回收试剂盒购自中科开瑞生物公司; 其他化学试剂均为分析纯。

收稿日期: 2005-01-28

基金项目: 国家自然科学基金项目(项目批准号: 30471101)

\* 通讯作者: 甘肃农业大学农学院博士生导师, 从事基因工程在作物遗传育种中的应用研究。

作者简介: 李淑洁(1980-), 女, 甘肃农业大学农学院硕士生, 作物遗传育种专业。

### 1.1.4 引物设计

根据 GenBank (gi:1247300) 中马铃薯 GBSS 基因的 5'侧翼区核心序列, 通过分子生物学分析软件 Oligo 6.0 设计两条引物(由北京赛百盛生物技术有限公司合成):

GPU: 5' - gCg A ↓ AgCTT gTg gAA Cgg AgA CAT gTT ATg ATg -3'

GPL: 5' - gCg g ↓ gATCC gCA TgA AAT CAg AAA TAA TTg gAg g -3'

划线部分分别是为便于构建植物表达载体所加的 *Hind* III 和 *Bam* HI 酶切位点。

## 1.2 方法

### 1.2.1 马铃薯叶片基因组 DNA 的提取

采用 CTAB 法<sup>[8]</sup>。

### 1.2.2 大肠杆菌质粒 DNA 的提取

采用碱裂解法<sup>[9]</sup>。

### 1.2.3 目的基因的克隆及序列分析

以马铃薯叶片基因组 DNA 为模板, 用合成的

特异引物 GPU、GPL 为引物进行 PCR 扩增 GBSS 基因 5'侧翼序列 (以下简称 g5'S 序列), 反应条件为: 94℃ 预变性 4 min; 94℃ 40 s、52℃ 40 s、72℃ 1.5 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 10 min; 4℃ 结束反应。

反应结束后电泳检测扩增产物; 回收目的片段, 并将其克隆到载体 pUCm-T Vector 上。导入 *E.coli* DH5α 感受态细胞; 对重组质粒进行 PCR 扩增和酶切鉴定, 将 PCR 扩增和酶切鉴定为阳性的重组子命名为 pUCmGT, 送交上海博雅生物公司测序, 并用分子生物学分析软件 DNAMAN 对测序结果与已知序列进行同源性分析。

### 1.2.4 植物表达载体的构建

用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Bam* HI 消化质粒 pUCmGI, 回收 0.6 kb 的目的片段, 并将回收片段插入到经同样限制性内切酶消化的 pBIGFP 的 *Hind* III 和 *Bam* HI 位点之间, 得到由 g5'S 序列驱动的 GFP 基因的植物表达载体 pBIGGFP (图 1)。

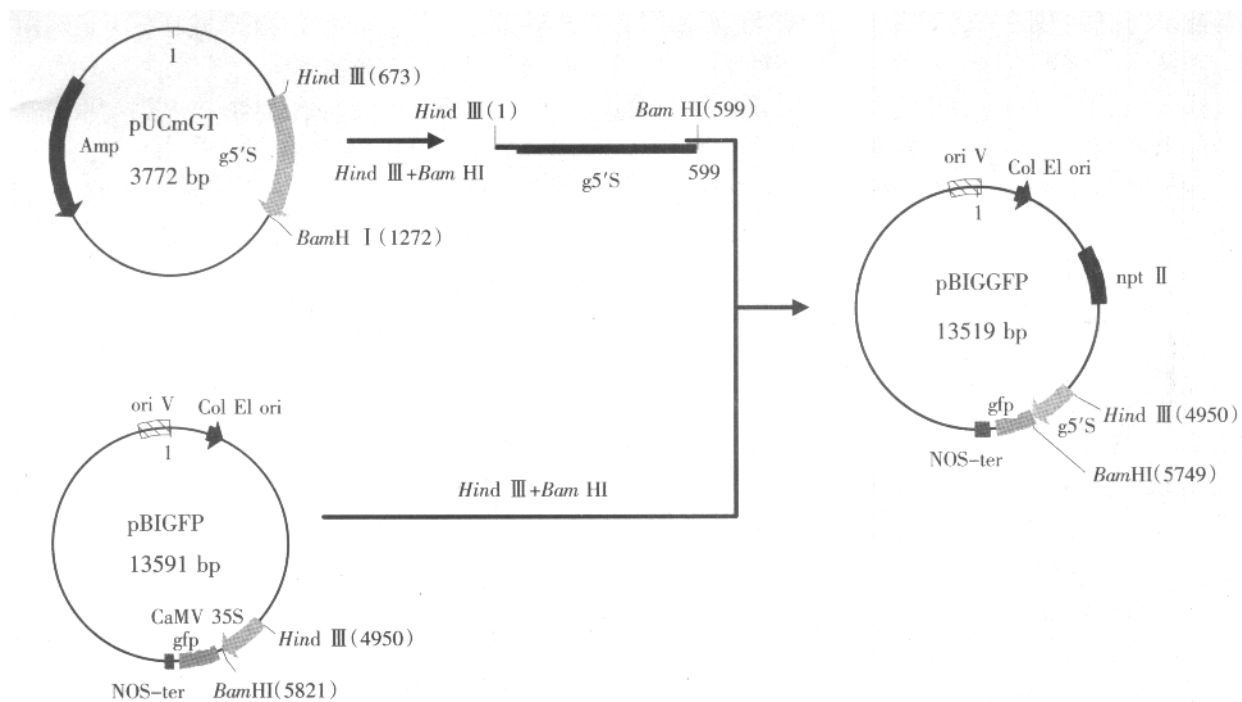


图 1 pBIGGFP载体构建流程图

### 1.2.5 马铃薯离体块茎的诱导

将培养的无菌苗切成含腋芽的茎段, 接种到 MS 培养基 (0.6%琼脂, pH 5.8~6.0, 3%蔗糖), 在 25℃、光照 16 h、光强 3000 lx 的条件下继代培养。然后将培养一个月的小苗切成带有侧芽的长

0.5~1.0 cm 的茎段, 接种到 TBC 培养基 (MS + 6 - BA 1.0 mg·L<sup>-1</sup> + ZT 1.0 mg·L<sup>-1</sup> + CCC 500 mg·L<sup>-1</sup> + 6% 蔗糖, pH 5.8~6.0), 22~24℃ 暗培养诱导块茎<sup>[4]</sup>。

### 1.2.6 基因枪轰击及 GFP 的瞬时表达

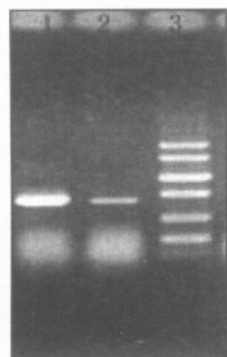
将生长状态良好的马铃薯离体块茎 (切成厚度

约 0.5~1.0 mm)、无菌苗茎段(长 0.5~1.0 cm)、无菌苗叶片作为转化受体材料, 轰击前将其转至含 0.2 mol·L<sup>-1</sup> 甘露醇和 0.2 mol·L<sup>-1</sup> 山梨醇的 MS 高渗固体培养基上预培养 4~6 h<sup>[6]</sup>, 然后按 PDS/ He System 1000 型基因枪(Bio Rad)操作步骤进行轰击转化。暗培养 16 h 后, 分别取块茎、茎段和叶片制片, 在 Olympus BX51 型荧光显微镜下进行观察、照相。

## 2 结果与分析

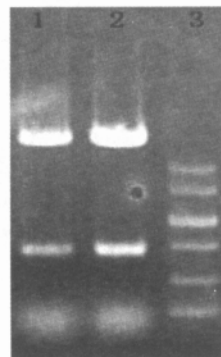
### 2.1 目的基因的克隆及序列分析

以马铃薯叶片基因组 DNA 为模板, 以 GPU、GPL 为引物进行 PCR 扩增得到一条约 600 bp 特异片段(图 2), 其大小与预期片段大小相符。将扩增片段回收后, 克隆到 pUCm-T 载体, 对重组质粒用 *Hind* III 和 *Bam* HI 双酶切(图 3), 并用 PCR 进行检测(图略), 结果都出现一条约 600 bp 特异片段, 说明约 600 bp 特异片段已插入到 pUCm-T 载体上, 进行测序。并将测序结果与已知 GBSS 基因启动子序列(gi:1247300)进行对比分析, 分析结果表明: 已克隆序列长度为 599 bp, 该序列与 GenBank 中已公布的序列的同源性为 97.41%, 转录起始点位于 545 bp 处, 其上游-61 bp(484 bp)与-141 bp(404 bp)处分别有 TATA box(TACAAAT)和 CAAT box(CTAT), 且 TATA box 和 CAAT box 之间有 12 bp 的回文结构(TGACACGTGTCA), 说明克隆的序列具有完整的基因表达调控元件。



泳道 1,2-PCR 扩增产物  
泳道 3-DNA Marker V

图 2 PCR 扩增产物  
电泳图



泳道 1,2-pUCmGT/*Hind* III +  
*Bam* HI  
泳道 3-DNA Marker V

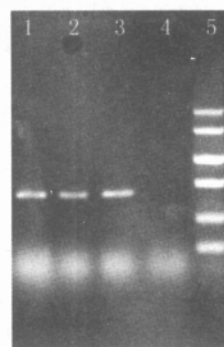
图 3 重组质粒酶切产物  
电泳图

克隆的启动子片段与已知序列相比, 在-

375~-510 处缺失了 136 个碱基(5'-GCAACTTAATA TAGGCTAAACCAAGATAAAGTAATGTATTCAACCT TTAGAATTGTGCATTCATAATTAGATCTTGTGTTGTC GTAAAAAATTAGAAAATATATTTACAGTAATTTGG AATACAAAGCTAAGGGGG- 3'), 而在靠近转录起始位点处(-21~-34)又插入了 14 个碱基(5'-CTCACACTCACTCA- 3'), 说明该启动子不同于已知的 GBSS 基因启动子, 为一新的启动子。因此, 对这一启动子必须进行活性鉴定, 才能为利用这一启动子提供依据。

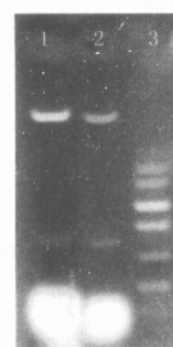
### 2.2 pBIGGFP 植物表达载体的构建

用 *Hind* III 和 *Bam* HI 限制性内切酶, 分别对 pUCmGT 和 pBIGFP 进行双酶切, 从 pUCmGT / *Hind* III + *Bam* HI 中回收 g5'S 片段, 从 pBIGFP / *Hind* III + *Bam* HI 回收大片段。用 T4 DNA 连接酶连接, 转入宿主菌 *E. coli* DH5 $\alpha$ , 提取质粒。对重组质粒进行 PCR 扩增和酶切检测, 结果都得到一条约 600 bp 的目的带(图 4~5), 说明 g5'S 已取代原 pBIGFP 中的 CaMV 35S 启动子, 为一 g5'S 驱动 GFP 基因的植物表达载体, 将此重组质粒命名为 pBIGGFP。



泳道 1,2-pBIGGFP 重组子  
泳道 3-positive control  
泳道 4-negative control  
泳道 5-DNA Marker V

图 4 pBIGGFP 质粒  
PCR 扩增产物电泳图



泳道 1,2-pBIGGFP/*Hind*  
III + *Bam* HI  
泳道 3-DNA Marker V

图 5 pBIGGFP  
酶切产物电泳图

### 2.3 克隆的 GBSS 基因 5'侧翼序列活性

为了进一步验证所克隆到的 g5'S 序列调控基因表达的功能, 采用基因枪法将 pBIGGFP 质粒 DNA 导入预培养的马铃薯无菌苗茎段、叶片和微型薯薯片。在暗培养 16 h 后, 分别取三种受体材

料的组织制片, 并在荧光显微镜下观察其荧光。结果显示, GFP 基因在三种受体材料中都得到了瞬时

表达(图 6), 并且发现 g5' s 序列驱动的 GFP 在马铃薯茎、叶片维管组织中表达量更高。

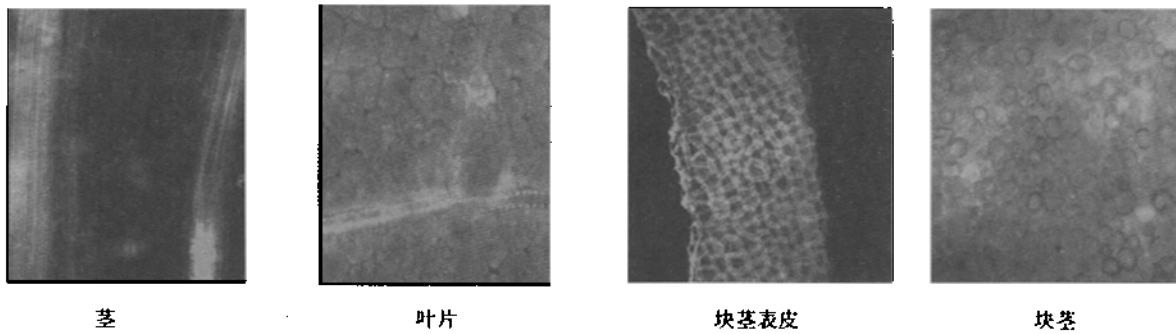


图 6 g5'S 序列驱动 GFP 在马铃薯组织中的瞬时表达

### 3 讨 论

将特定的外源基因构建在植物表达载体中并转入受体植物, 并不是植物遗传转化的最终目的。在马铃薯基因工程育种研究中发现, 将组成型表达的花椰菜花叶病毒启动子(CaMV 35S 启动子)驱动的大肠杆菌 ADPG 焦磷酸化酶(AGPP)基因导入马铃薯植株, 结果发现在转基因马铃薯的块茎中淀粉颗粒形态发生了变化, 显微镜下可以看到淀粉颗粒出现裂痕, 说明用 CaMV 35S 启动子驱动的 AGPP 基因会对淀粉的品质产生不利的影响。因此, 为了使外源基因在植物体内有效发挥作用, 同时又可减少对植物的不利影响, 目前人们对特异表达启动子的研究和应用越来越重视。

基于马铃薯 GBSS 基因在马铃薯直链淀粉合成中的关键作用, 近年来对马铃薯 GBSS 基因 5'侧翼序列的块茎特异性调控作用的研究也引起了国内外研究者的重视。宋东光等<sup>[4]</sup>的研究指出, 不同长度的 GBSS 启动子控制的基因在块茎中的表达活性均高于茎段; 0.8 kb 马铃薯 GBSS 基因 5'侧翼序列驱动的 GUS 基因在匍匐茎和块茎中高表达, 比叶片中高 125~3 350 倍; 戴卫列等<sup>[10]</sup>的研究指出, 0.4 kb-GBSS 启动子就具有块茎表达专一性。但也有人认为<sup>[7]</sup>, 随着 GBSS 基因启动子的增长, 其块茎专一性也增强, 较短的启动子在叶片中的表达活性较长, 启动子的表达活性高。

在本研究中, 虽然根据序列分析发现我们所克隆的新颖的 GBSS 基因 5'侧翼序列具有启动子的特征, 瞬时表达结果也证明这一序列具有启动子活,

但其结果尚不能确定是否具有块茎特异性表达活性。目前, 我们正在利用农杆菌介导法 BIGGFP 导入马铃薯, 以便对所克隆的新颖启动子在块茎中的基因表达调控作用进行鉴定, 以确定其块茎特异性表达活性。

### [ 参 考 文 献 ]

[ 1 ] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术(第 2 版) [M]. 北京: 科学出版社, 2002: 744.

[ 2 ] 李育阳. 基因表达技术 [M]. 北京: 科学出版社, 2001.

[ 3 ] Liu X Y, M Rocha-Sosa, S Hummel, *et al.* A detailed study of the regulation and evolution of the two classes of patatin genes in *Solanum tuberosum* L [J]. *Plant Mol Biol*, 1991, 17 (6): 1139-1154.

[ 4 ] 宋东光, 黄大庆, 王光清, 等. 不同长度马铃薯 GBSS 基因启动子的块茎专一性表达初报 [J]. *复旦大学学报*, 1998, 37 (4): 559-563.

[ 5 ] 蓝晓东, 汪训明. 马铃薯 PGBSS-GUS 融合基因在块茎中专一性表达的初步研究 [J]. *复旦大学学报*, 1997, 36(5): 531-536.

[ 6 ] Visser R G F, A Stolte, E Jacobsen. Expression of a chimaeric granule-bound starch synthase-GUS gene in transgenic potato plants [J]. *Plant Mol Bio*, 1991, 17(4): 691-699.

[ 7 ] Van der Steege G, M Nieboer, J Swaving, *et al.* Potato granule-bound starch synthase promoter-controlled GUS expression: regulation of expression after transient and stable transformation [J]. *Plant Mol Biol*, 1992, 20(1):19-30.

[ 8 ] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程(第 2 版) [M]. 北京: 科学出版社, 2002, 744.

[ 9 ] Sambrook J. 分子克隆实验指南(第 3 版) [M]. 北京: 科学出版社, 2002. 41-46.

[ 10 ] 戴卫列, 邓炜, 崔伟英, 等. 马铃薯 GBSS 基因的克隆与 DNA 顺序分析 [J]. *植物学报*, 1996, 38 (10): 777-784.

## Cloning and Regulation of a New 5' Flanking Sequence of Granule-bound Starch Synthase Gene of Potato (*Solanum tuberosum* L.)

LI Shu-jie<sup>1</sup>, ZHANG Jin-wen<sup>1,2</sup>, WANG Yu<sup>2</sup>, GUO Zhi-hong<sup>1</sup>, CHEN Zheng-hua<sup>2</sup>

( 1. Agronomy College, Gansu Agricultural University, Gansu 730070, Lanzhou, China;

2. Research Station for Postdoctors of Yasheng Group, Beijing 100101, China )

**Abstract:** In this study, a 0.6 kb 5'flanking regions of GBSS gene was cloned from potato (*Solanum Tuberosum* L.) leaf genomic DNA via polymerase chain reaction (PCR). Sequence analysis indicates that the cloned sequence shares a 97.41% homology with the reported sequence (gi:1247300), and that it contains two main regulation domains, TATA box and CAAT box. However, there are a 14 bp insertion and a 136 bp deletion when compared with the reported sequence. In order to assay its regulation function, a plant expression vector pBIGGFP constructed by fusing the cloned sequence with GFP is transferred into stem segments, leaf discs and *in vitro* microtuber slices via the particle bombardment. The transient expression of GFP proves that the cloned sequence is functional.

**Key Words:** potato (*Solanum Tuberosum* L.); 5' flanking sequence of granule-bound starch synthase gene; cloning; green fluorescence protein; regulation

### 江西贝嘉温棚有限公司

主营：温室、温棚、大棚及其配套设施耗材

贝嘉公司是一家致力于研究、设计、生产各类现代化温室、温棚、大棚及其配套设施的专业化企业。二十多年来，贝嘉以其精湛的研发能力、丰富的生产经验和及时周到的售后服务发展成为温室行业的知名企业。

贝嘉温室主要分为：花卉生产型、林业种苗型、组培炼苗型、农业生产型、水产养殖型、畜牧型、食用菌型、科研型、观赏型、教学实验型、生态餐厅以及智能化型。公司提供钢制圆翼型散热器、开窗机组、拉幕机组、湿帘降温系统、喷雾喷灌系统、施肥系统、温度湿度及光照控制系统，并配套各类热风炉及轴流风机。

公司所有产品，免费保修一年，有偿终身保修。

贝嘉公司秉承“以人为本，质量第一”的企业理念，建立完善的企业管理制度和人才激励机制，以信誉求发展，向管理要效益，在推动企业不断前进的同时，积极服务于社会。

欢迎来函来电咨询 欢迎实地考察

公司地址：江西省进贤县进贤大道 2299 号

邮 编：331700

法人代表：徐祖龙

传 真：0791-5663071

联系电话：0791-5670099

国内免费热线：8008691392

网 址：<http://www.jxbjwp.com>

E-mail：[jxbjwp@china.com](mailto:jxbjwp@china.com)