

用绿色荧光蛋白和洋葱表皮细胞检测拟南芥 *rd29A* 基因启动子活性的方法

张俊莲¹ 王蒂^{2,*} 张金文² 陈正华³

甘肃农业大学¹ 园艺系, ² 农学院, 兰州 730070; ³ 甘肃亚盛集团博士后科研工作站北京分站, 北京 100101

Determination of Promoter Activity of *rd29A* Gene of *Arabidopsis thaliana* Using Green Fluorescent Protein and Onion Epidermal Cell

ZHANG Jun-Lian¹, WANG Di^{2,*}, ZHANG Jin-Wen², CHEN Zheng-Hua³

¹Department of Horticulture, ²College of Agronomy, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China; ³Postdoctoral Workstation of Yasheng Industrial Ltd., Beijing 100101, China

摘要 将 *rd29A* 基因的启动子与绿色荧光蛋白基因(*GFP*)融合在一起, 构建成植物表达载体, 并以 CaMV35S 启动子驱动的 *GFP* 基因的植物表达载体为对照, 用基因枪介导法转化置于4种类型培养基上的洋葱表皮细胞。对其进行不同温度下的培养, 16 h 后观察 *GFP* 基因瞬时表达水平的结果表明, *rd29A* 启动子对高盐和脱水逆境的响应较温度显著, 特别是在含 PEG6000 的培养基上, 细胞无破损, 绿色荧光强烈, 适合于 *GFP* 的瞬时表达。而高盐由于易导致细胞出现离子毒害, 不宜作为 *GFP* 瞬时表达的培养基。

关键词 *rd29A* 启动子; CaMV35S 启动子; 绿色荧光蛋白(*GFP*); 洋葱表皮细胞; 拟南芥

启动子是调控基因表达的关键元件之一。它有3种类型, 即组成型启动子、组织特异性启动子和诱导型启动子^[1]。组成型启动子 CaMV35S 是目前植物基因工程中使用最多的启动子^[2,3], 它可使所驱动的目的基因高效且非特异性表达。但这种非特异性表达模式不仅造成植物能量上的过度消耗, 而且还可能诱发转基因的沉默现象^[4], 因此, 许多研究者改用组织特异性启动子或诱导型启动子来解决这一问题。拟南芥(*Arabidopsis thaliana*) *rd29A* 基因的启动子是逆境诱导型启动子, 含有干旱、高盐、低温和 ABA 诱导表达相关的顺式作用元件^[5], 逆境胁迫可在早期瞬时诱导这些顺式作用元件, 从而激活靶基因的表达, 增强转基因植物的抗逆性。

绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)是水母(*Aequorea victoria*)体内的天然蛋白, 自1994年Chalfie等^[6]揭示了该蛋白作为报告蛋白的潜在应用价值以来, 它已作为报告蛋白成功地在多种植物、动物和微生物中获得表达。由于 GFP 作为报告蛋白不需抗体、辅助因子、酶底物等其他成分, 也不影响宿主细胞, 因而可以鉴定、跟踪、分选表达 GFP 的细胞; 又由于它可以在活细胞中进行图象分析, 在固定细胞中进行检测, 因此, GFP 已成为近年来广泛使用的一种

报告基因。利用 *GFP* 基因检测启动子功能的方法多采用将其通过农杆菌或基因枪介导法转入植物愈伤组织和叶片等受体细胞或组织中, 荧光显微镜下观察 GFP 蛋白的表达。但该方法需对转化细胞进行抗性的初步筛选及 PCR 和 Southern 杂交的再筛选, 才能进一步对 GFP 蛋白的表达进行检测^[7], 故工作量大, 费时耗财, 且不利于快速进行下步实验。洋葱(*Allium cepa*)表皮细胞结构清晰, 取材方便, 是观察细胞部分功能、外源基因瞬时表达的好材料。对其进行 *GFP* 基因的转化后, 可在 1~2 d 内检测出启动子的活性^[8]。利用该试材进行不同逆境培养基和培养条件下逆境诱导型启动子(如 *rd29A* 启动子)的活性检测, 尚未见报道。

本文将已获得的拟南芥 *rd29A* 基因上游的 946 bp 的启动子序列^[8]与 *GFP* 基因^[9]进行融合, 构建成 *rd29A* 启动子驱动的 *GFP* 基因植物表达载体, 采用基因枪介导法, 使转化的洋葱表皮细胞在不同逆境培养基和培养条件下诱导 *GFP* 基因进行瞬时表达, 检测启动子活性, 为进一步构建该启动子驱动的目的靶基因奠定基础。

收稿 2004-12-06 修定 2005-04-20

资助 甘肃省科技攻关项目(2GS054-A41-005-01)和国家高技术研究与发展计划("863"计划)项目(2004AA241132)。

*通讯作者(E-mail: wangd@gsau.edu.cn, Tel: 0931-7631140)。

材料与方法

1 试剂

各种限制性内切酶为 TaKaRa 公司或 NEB 公司产品, DNA 回收试剂盒为上海开瑞公司产品, 抗生素为 Sigma 产品, 其他为国产分析纯试剂。

2 *rd29A* 启动子和 *GFP* 基因

rd29A 启动子和 GFP 基因由亚盛博士后科研工作站北京分站提供。*rd29A* 启动子序列见参考文献 8, *GFP* 基因序列见参考文献 9, 载体为 pBI121。*rd29A* 替换了 pBI121 上的 35S 启动子(记 pBI29A), *GFP* 基因替换了 pBI121 上的 *GUS* 基因(记 pBI35S::GFP)。抗性标记为 Kan^r, 宿主菌为大肠杆菌 DH5 α 。

3 GFP 表达载体的构建

根据 pBI35S::GFP 和 pBI29A 载体的酶切位点, 对 pBI35S::GFP 和 pBI29A 分别进行 *Xma*I

和 *Sac*I 双酶切, 回收 pBI35S::GFP 的小片段和 pBI29A 的大片段, 利用 T₄ 连接酶进行粘端连接, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。转化细胞在 LB 固体平板上进行 50 μ g·mL⁻¹ 的 Kan 筛选后, 再进行 PCR 和酶切鉴定, 获得 pBI29A::GFP 植物表达载体。同时以 CaMV35S 启动子驱动的 *GFP* 为对照(图 1)。*GFP* 基因扩增特异性引物序列为: p1, 5' CGCCCGGGATGAGTAAAGG-AGAAGAAC 3'; p2, 5' CGGAGCTCTTATTATT-TGTATAGTTCATCC 3'。PCR 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 50 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。*rd29A* 启动子扩增特异性引物序列为: p3, 5' CGAAGCTTAA-CGCATGATTTGATGGAGGA 3'; p4, 5' GCGG-ATCCCTTTCCAATAGAAGTAATCAAACC 3'。PCR 扩增条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 4 min; 94 $^{\circ}$ C 40 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 90 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

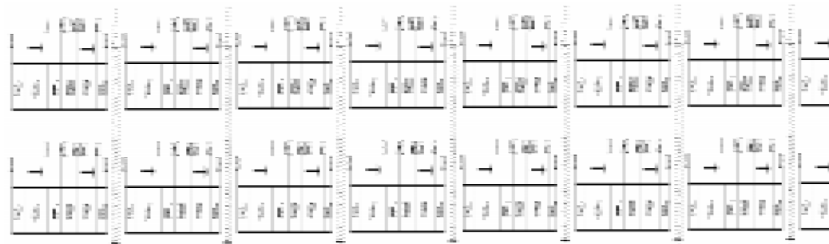


图 1 pBI29A::GFP (A) 和 pBI35S::GFP (B) 的 T-DNA 区域示意

4 洋葱表皮细胞培养

切取约 2 cm \times 2 cm 的洋葱表皮组织置固体平板培养基上, 28 $^{\circ}$ C 弱光下预培养 4~6 h, 然后利用基因枪进行目的基因的转化。固体平板培养基为 4 类: (1) MS 培养基; (2) MS 培养基附加 0.2 mol·L⁻¹ 山梨醇和 0.2 mol·L⁻¹ 甘露醇; (3) MS 培养基附加 250 和 500 mmol·L⁻¹ NaCl; (4) MS 培养基附加 15% 和 30% 的 PEG6000。每种处理 2 皿, 重复 3 次。

5 基因枪转化

基因枪转化方法见参考文献 10。取钨粉(Φ 1.2 nm) 悬液(60 mg·mL⁻¹) 50 μ L, 依次加入 5 μ L 质粒 DNA、50 μ L 2.5 mol·L⁻¹ CaCl₂、20 μ L 0.1 mol·L⁻¹ 亚精胺, 充分混匀后静置 10 min, 18 000 \times g 离心 5 s, 弃上清。加入 250 μ L 无水乙醇振荡 3 min, 静置 5 min, 18 000 \times g 离心 5 s, 弃上清。加入

60 μ L 无水乙醇并悬浮沉淀, 每枪取 12 μ L 混合悬液。采用 Biolistic[®] PDS-1000/He 基因枪进行轰击, 可裂膜片压力为 1.1 \times 10³ Pa, 每皿轰击 2 次。转化后材料置 28 $^{\circ}$ C 弱光下培养 8 h, 然后将培养基(2)中的 pBI29A::GFP 和 pBI35S::GFP 材料各 2 皿转至 4 和 37 $^{\circ}$ C 下培养 8 h, 其余继续在 28 $^{\circ}$ C 弱光下培养 8 h, 然后制片, 荧光显微镜下观察。

6 GFP 绿色荧光观察

在 OLYMPUS BX51/BX52 型荧光显微镜下, 用蓝光激发以观察所发出的绿色荧光, 利用计算机拍摄和存贮图象。

实验结果

1 *rd29A* 启动子驱动的 GFP 植物表达载体的构建

根据 pBI35S::GFP 和 pBI29A 载体的酶切位点, 对 pBI35S::GFP 和 pBI29A 分别进行 *Xma*I 和

*Sac*I 双酶切, 分别回收 pBI29A 载体的 DNA 大片段(约13 kb)和pBI35S::GFP目的基因的小片段(约750 bp), 然后进行载体片段和目的基因片段的重组连接, 替换 pBI29A 中的 *GUS* 基因。pBI29A::GFP 重组子分别经 *Xma*I+*Sac*I 和 *Hind*III+*Bam*HI 双酶切后, 可分别切下约750 bp的 *GFP* 片段(图2)和约946 bp的 *rd29A* 启动子片段(图3), 结合PCR鉴定结果(图4、5), 说明 *rd29A* 启动子驱动的 *GFP* 基因植物表达载体构建成功。

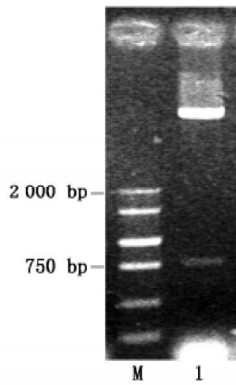


图2 pBI29A::GFP 表达载体的酶切鉴定
M: DNA 分子量标记 V; 1: pBI29A::GFP/*Xma*I+*Sac*I。

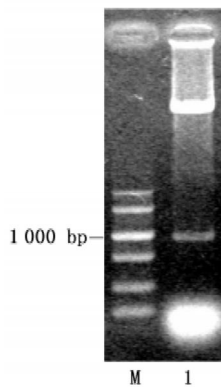


图3 pBI29A::GFP 表达载体的酶切鉴定
M: DNA 分子量标记 V; 1: pBI29A::GFP/*Hind*III+*Bam*HI。

2 不同培养基中 *rd29A* 启动子活性的检测

洋葱表皮细胞经基因枪转化 *rd29A* 启动子和 CaMV35S 启动子驱动的 *GFP* 基因后, 在 28℃ 下经过 16 h 的培养, 4 种类型培养基中的 *GFP* 基因均获得表达, 即在荧光显微镜下观察到细胞中 *GFP* 基因表达后所产生的绿色荧光(图6), 说明我

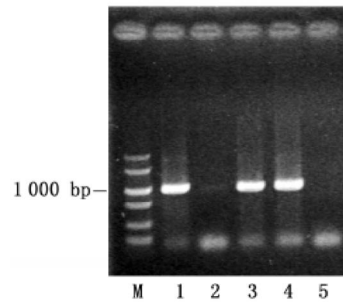


图4 pBI29A::GFP 表达载体启动子的PCR鉴定
M: DNA 分子量标记 V; 1: pBI29A(正对照); 2: pBI121(负对照); 3~4: pBI29A::GFP 的PCR扩增产物; 5: 水(空白对照)。

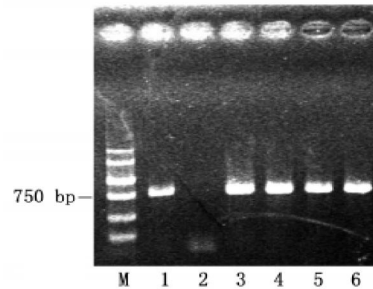


图5 pBI29A::GFP 表达载体GFP的PCR鉴定
M: DNA 分子量标记 V; 1: pBI35S::GFP(正对照); 2: pBI121(负对照); 3~6: pBI29A::GFP 的PCR扩增产物。

们使用的 *rd29A* 启动子与 CaMV35S 启动子一样, 具有启动子的各种作用元件, 能够驱动它所调控的目的基因——*GFP* 基因的表达。而且在山梨醇+甘露醇、高盐及 PEG6000 培养基上, *rd29A* 启动子驱动的 *GFP* 基因的表达量均高于 CaMV35S 启动子驱动的 *GFP* 基因的表达量(图7), 特别是在 PEG6000 培养基上, 细胞无破损, 绿色荧光强烈, 而在高盐尤其是 500 mmol·L⁻¹ 的 NaCl 培养基上, 尽管细胞中有一定量的荧光蛋白表达, 但由于受到高浓度的钠离子毒害, 细胞破损严重(图8)。上述实验结果表明, 该启动子具有高盐和脱水调控元件, 在逆境环境下, 可早期瞬时诱导这些顺式作用元件, 从而激活靶基因快速表达, 积累较多的 GFP 蛋白, 并且脱水培养基特别是 30% 的 PEG6000 培养基对在洋葱表皮细胞中进行逆境诱导型启动子的功能检测是十分有效的, 但高盐特别是含 500 mmol·L⁻¹ NaCl 的培养基则不适宜洋葱表皮细胞的瞬时表达。

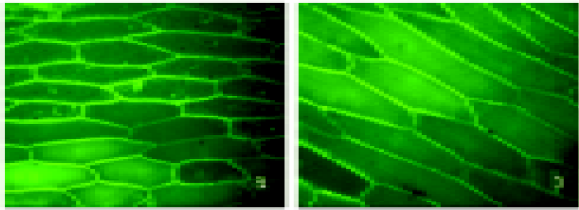


图6 洋葱表皮细胞中的 *GFP* 基因在 MS 培养基上的表达
A: pBI35S::GFP; b: pBI29A::GFP。

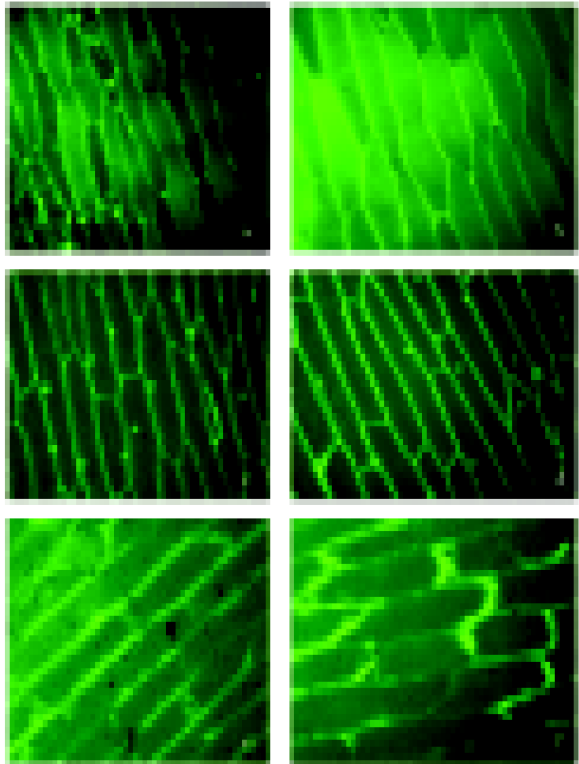


图7 洋葱表皮细胞中的 *GFP* 基因在不同逆境培养基上的表达

a: pBI35S::GFP 在培养基 MS+0.2 mol·L⁻¹ 甘露醇+0.2 mol·L⁻¹ 山梨醇上; b: pBI29A::GFP 在培养基 MS+0.2 mol·L⁻¹ 甘露醇+0.2 mol·L⁻¹ 山梨醇上; c: pBI35S::GFP 在培养基 MS+30% PEG6000 上; d: pBI29A::GFP 在培养基 MS+30% PEG6000 上; e: pBI35S::GFP 在培养基 MS+250 mmol·L⁻¹ NaCl 上; f: pBI29A::GFP 在培养基 MS+250 mmol·L⁻¹ NaCl 上。

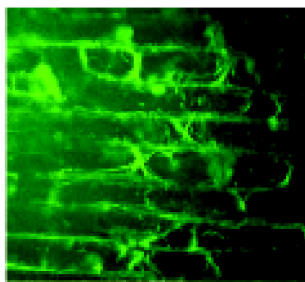


图8 洋葱表皮细胞中的 *GFP* 基因在高盐培养基上的表达

3 不同培养温度下 *rd29A* 启动子活性的检测

将培养基 MS+0.2 mol·L⁻¹ 山梨醇+0.2 mol·L⁻¹ 甘露醇上的转化材料在 28°C 下培养 8 h 后, 再转入低温(4°C)或高温(37°C)环境下继续培养 8 h, 然后观察 *GFP* 基因的表达情况。结果发现, 两种启动子诱导的 *GFP* 基因的表达量差异不明显, *rd29A* 启动子并未明显促进 *GFP* 基因的表达, 甚至在有些细胞中, CaMV35S 启动子驱动的 *GFP* 基因的表达量高于 *rd29A* 启动子驱动的 *GFP* 基因的表达量(图 9)。说明 *rd29A* 启动子驱动的靶基因的瞬时表达受温度影响较小, 但其稳定表达是否也受温度影响较小, 尚需进一步研究。

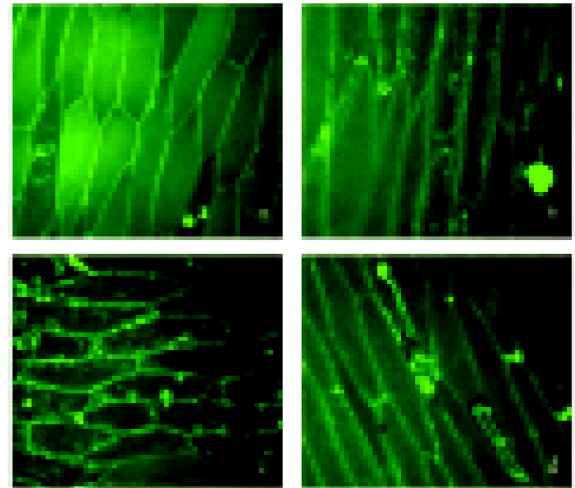


图9 洋葱表皮细胞中的 *GFP* 基因在不同温度下的表达

A: pBI35S::GFP 在 37°C 下; b: pBI29A::GFP 在 37°C 下; c: pBI35S::GFP 在 4°C 下; d: pBI29A::GFP 在 4°C 下。

讨 论

选择合适的启动子来驱动目的靶基因在转基因植物中表达已成为植物基因工程研究的热点问题之一。针对不同的目的基因, 人们选用不同的启动子, 从而使靶基因在特定组织或条件下表达, 以利转基因植物的正常生长发育^[11~13]。拟南芥 *rd29A* 基因的启动子被认为是干旱、低温和高盐诱导型启动子^[5], 具有低温、高盐和脱水响应元件(TACCGACAT)及 ABA 作用元件(保守序列为 ACGT)^[14], 在逆境环境下可促进靶基因大量表达, 从而提高转基因植物的抗逆性, 因此, 它已成为抗逆基因工程中首选的启动子。

将 *GFP* 基因置于含有顺式作用元件的多种序列或启动子序列的控制下转化细胞, 通过分析其荧光表达的强度, 即可判断该顺式作用元件的不同功能区作用或启动子的强弱和启动方式(组成型、组织特异型或诱导型等)^[15]。我们将 *GFP* 基因置于 *rd29A* 基因启动子和 CaMV35S 启动子的调控下, 转化洋葱表皮细胞后发现, 尽管 *rd29A* 基因的启动子具有低温、高盐和脱水响应元件, 但对高盐、脱水和低温逆境的响应程度却有差异。脱水和高盐环境下, 特别是在 30% 的 PEG6000 条件下, 该启动子能强烈诱导目的靶基因——*GFP* 基因的瞬时高效表达, 形成大量的绿色荧光蛋白, 但它却对温度环境的响应比较弱。因此, 采用脱水和高盐培养基, 特别是 30% 的 PEG6000 培养基, 可以进行逆境诱导型启动子活性的检测。但使用高盐培养基时, 盐浓度不宜过高, 因为在 500 mmol·L⁻¹ NaCl 环境下, 由于钠离子的毒害, 细胞损伤严重, 影响实验结果的观察。

参考文献

- 1 李一琨, 王金发. 高等植物启动子研究进展. 植物学通报, 1998, 15(增刊): 1~6
- 2 郝林, 曹军. CaMV35S双启动子显著提高转基因在拟南芥中表达水平的研究. 植物生理学通讯, 2000, 36(6): 517~519
- 3 潘良文, 陈家华, 胡永强等. 转基因抗草甘膦油菜籽中 FMV35S 启动子的检测研究. 生命科学研究, 2001, 5(3): 225~229
- 4 Matzke MA, Matzke AJM. How and why do plants inactivate homologous transgenes? Plant Physiol, 1995, 107: 679~685
- 5 Yamaguchi-Shinozaki K, Shinozaki K. A novel *cis*-acting element in an *Arabidopsis* gene is involved in responsiveness to drought, low-temperature, or high-salt stress. Plant Cell, 1994, 6: 251~264
- 6 Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression. Science, 1994, 263: 802~805
- 7 石玮, 李东栋, 邓秀新等. 根癌农杆菌介导绿色荧光蛋白基因转化印度酸桔的研究. 园艺学报, 2002, 29(2): 109~112
- 8 白斌, 张金文, 郭志鸿等. *rd29A*启动子克隆及对低温响应的研究. 甘肃农业大学学报, 2004, 39(3): 249~254
- 9 白斌. *rd29A*启动子与 *AcInV*基因的克隆、*rd29A*低温诱导型启动子驱动的 *AcInV*基因反义植物表达载体的构建及其对马铃薯的遗传转化[硕士学位论文]. 兰州: 甘肃农业大学农学院, 2004
- 10 王关林, 方宏筠主编. 植物基因工程. 第2版. 北京: 科学出版社, 2002. 805~807
- 11 毛自朝, 于秋菊, 甄伟等. 果实专一性启动子驱动 *ipt* 基因在番茄中的表达及其对番茄果实发育的影响. 科学通报, 2002, 47(6): 444~448
- 12 赵恢武, 陈杨坚, 胡鸢雷等. 干旱诱导性启动子驱动的海藻糖-6-磷酸合酶基因载体的构建及转基因烟草的耐旱性. 植物学报, 2000, 42(6): 616~619
- 13 陆桂华, 张景六, 洪孟民. RTS启动子与GUS的嵌合基因在转基因水稻花药中的专一性表达. 植物生理学报, 2000, 26(2): 164~170
- 14 Shinozaki K, Yamaguchi-Shinozaki K. Gene expression and signal transduction in water-stress response. Plant Physiol, 1997, 115: 327~334
- 15 贺竹梅, 李华平, 李宝键等. 绿色荧光蛋白在生命科学研究中的应用. 遗传, 1998, 20(5): 43~46