

# 韧皮部特异性启动子的克隆及含绿色荧光蛋白报告基因新植物表达载体的构建

胡桂兵<sup>1,2</sup>, 张上隆<sup>1</sup>, 徐昌杰<sup>1</sup>, 林顺权<sup>2</sup>

(1 浙江大学 果树科学研究所, 浙江 杭州 310029; 2 华南农业大学 园艺生物技术研究, 广东 广州 510642)

**摘要:**用 PCR 方法扩增得到了长度为 966 bp 的笋瓜韧皮部蛋白 2 基因启动子片段, 克隆入 pUCm-T 载体后, 获得了新的重组质粒 pUCm-PSP. 分别用限制性内切酶酶切重组质粒和 pCAMBIA1302 植物表达载体, 经回收、连接、转化和鉴定后, 构建了由 PSP 驱动绿色荧光蛋白(GFP)报告基因的新型植物表达载体 pHZ03. 利用细胞感受态法将新植物表达载体分别导入根癌农杆菌 EHA105、GV3101、LBA4404 和发根农杆菌 Ri15834 中.

**关键词:**笋瓜; 韧皮部特异性启动子(PSP); 植物表达载体; 绿色荧光蛋白(GFP)

中图分类号: Q782; S642.9

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2005)04-0118-03

## Cloning of phloem specific promoter and construction of new plant expression vector containing green fluorescence protein reporter gene

HU Gui-bing<sup>1,2</sup>, ZHANG Shang-long<sup>1</sup>, XU Chang-jie<sup>1</sup>, LIN Shun-quan<sup>2</sup>

(1 Fruit Science Institute of Zhejiang University, Hangzhou 310029, China;

2 Institute of Biotechnology in Horticultural Plants, South China Agric. Univ., Guangzhou 510642, China)

**Abstract:** A 966 bp fragment of phloem protein 2 (PP2) gene in the promoter region of *Cucurbita maxima* was amplified by PCR. The fragment was cloned into pUCm-T vector, and a new recombined vector named pUCm-PSP was obtained. A new plant expression vector named pHZ03 in which the reporter gene GFP is droved by PSP was constructed after cutting two vectors pUCm-PSP and pCAMBIA1302 with restriction enzymes, subsequently recovering, ligation, transformation and identification. The recombined plant expression vector was transferred into *Agrobacterium tumefaciens* strains of LBA4404, GV3101, EHA105 and *A. rhizogenes* strain of Ri15834 by using cell competent method.

**Key words:** *Cucurbita maxima*; phloem specific promoter (PSP); plant expression vector; green fluorescence protein (GFP)

韧皮部蛋白 2 (PP2) 是南瓜属中一种独特的结合几丁质的凝集素, 其 mRNA 高度保守且具有韧皮部组织特异性<sup>[1~3]</sup>. 目前对驱动 PP2 基因启动子 (PP2-P) 的研究<sup>[4,5]</sup> 均以  $\beta$ -半乳糖苷酶 (GUS) 基因作为报告基因, 既不能活体检测, 同时还受内源 GUS 活性的干扰, 从而影响了研究结果的可靠性. 本研究构建了由 PP2-P 驱动、可进行活体检测的绿色荧光

蛋白 (GFP) 报告基因的新型植物表达载体 pCAMBIA1302-PSP (命名为 pHZ03), 以期充分利用 GFP 的优点来研究此启动子在果树中的功能奠定基础.

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

山西本地栽培品种笋瓜 *Cucurbita maxima* 由浙

收稿日期: 2005-01-20

作者简介: 胡桂兵 (1969-), 男, 副教授, 在职博士研究生. 通讯作者: 张上隆 (1935-), 男, 教授; E-mail: shlzhang@zju.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30100125); 浙江省自然科学基金资助项目 (301291); 广东省农业重大专项资助项目 (2002A208020202, 2003A2010202)

江大学蔬菜研究所提供;大肠杆菌(*Escherichia coli*) TG1、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404、EHA105、GV3101 和发根农杆菌(*A. rhizogenes*) Ri15834 均由浙江大学果树分子生物学实验室保存;PCR 产物克隆试剂盒、DNA 胶回收试剂盒和限制性内切酶等购于上海生工生物工程技术有限公司;pCambia1302 植物表达载体由美国佛罗里达大学柑橘研究和教育中心(CREC)郑启发博士惠赠。

## 1.2 试验方法

用改良 CTAB 法<sup>[6]</sup>提取基因组 DNA;参考蒋浩等<sup>[4]</sup>和萨姆布鲁克等<sup>[7]</sup>的方法进行 PCR 及其产物克隆,获得重组质粒并测序后,用 Clustal W 软件进行序列同源性分析;分别用相同的限制性内切酶酶切重组质粒和 pCambia1302 植物表达载体,经回收、连接、转化和鉴定后,构建由 PSP 驱动 GFP 报告基因的新型植物表达载体;利用细胞感受态法<sup>[7]</sup>获得含新植物表达载体的各个农杆菌单菌落的悬浮液,然后用预先设计的鉴定引物经 PCR 扩增后,获得可用于遗传转化研究的农杆菌。

## 2 结果与分析

### 2.1 PSP 的克隆

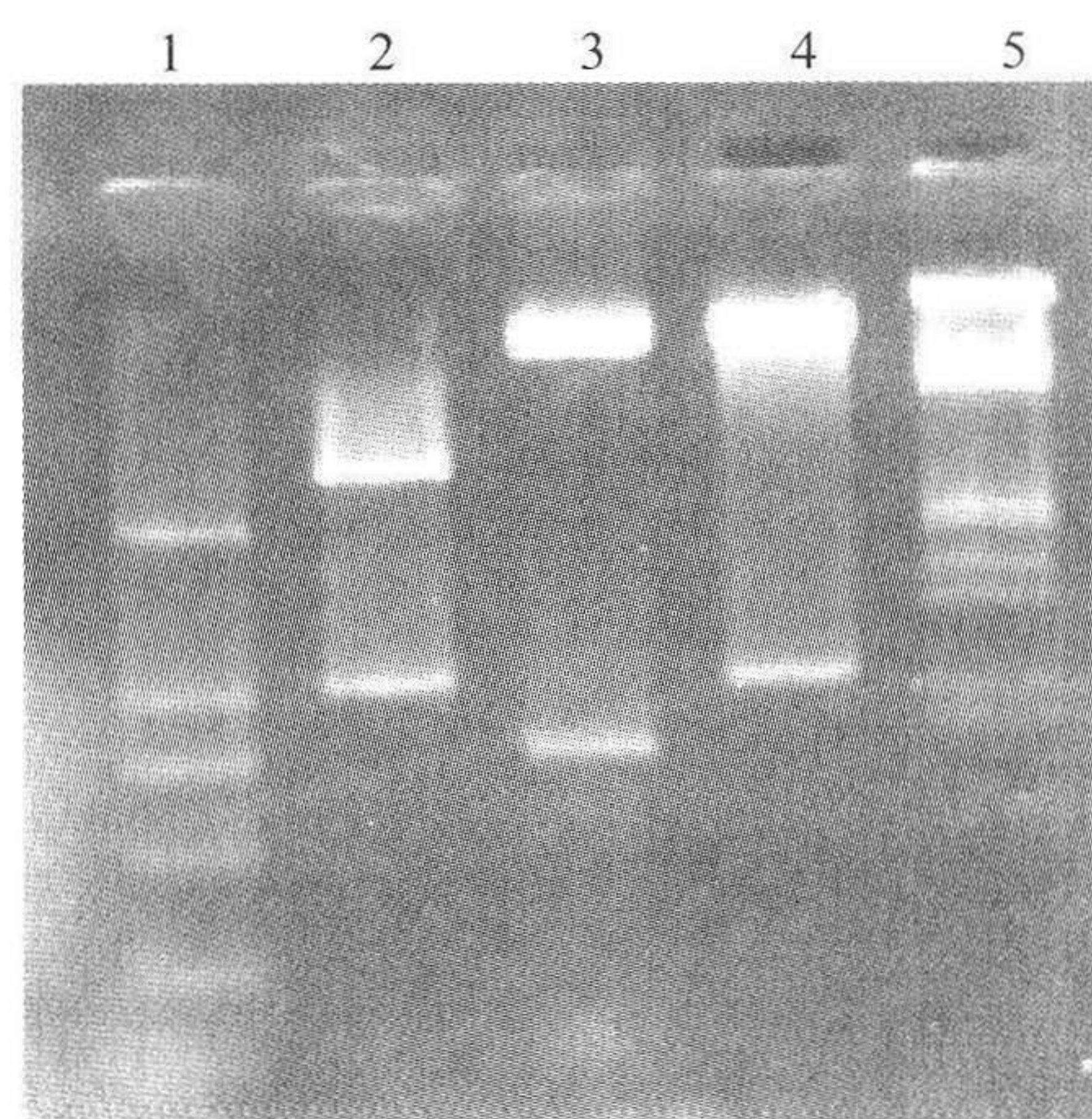
以改良 CTAB 法提取的山西本地种笋瓜幼叶基因组 DNA 为模板,用所设计的 1 对 5' 端引物上含 *Hind* III 限制性内切酶序列、3' 端引物上含 *Bam* H I 限制性内切酶序列的引物进行 PCR 扩增,得到与预计长度一致的约 1 kb 的条带。将经纯化的 PCR 产物与 pUCm-T 载体连接,用连接产物转化大肠杆菌 TG1 菌株感受态细胞,在含氨苄青霉素、X-gal 和 IPTG 的 LB 平板上涂布获得白色菌落。随机挑取一些白色单菌落,用无菌水悬浮后,用 PSP 引物进行 PCR 扩增,取扩增为阳性的菌液划线,再挑取长出的单菌落用液体 LB 培养基培养,提取质粒 DNA 经长度和多种组合的限制性内切酶双酶切鉴定后,获得了新的重组质粒,命名为 pUCm-PSP。

测定重组质粒中插入片段的序列,表明所克隆的片段长 966 bp,将此序列及已报道的 2 个序列<sup>[1,4]</sup>用 Clustal W 软件进行了序列同源性分析,结果表明新克隆的片段与 2 个已报道的片段分别有 95% 和 99% 的同源性,推测新克隆的片段具有相似的启动子功能。

### 2.2 由 PSP 驱动 GFP 报告基因的新型植物表达载体构建及转化农杆菌

分别提取 pUCm-PSP 和由 CaMV35S 组成型启动子驱动 GFP 报告基因的 pCambia1302 植物表达载体的 DNA,用同样的限制性内切酶 *Pst* I 和 *Bgl* II 双

酶切,琼脂糖凝胶电泳分离所需片段,用 DNA 胶回收试剂盒分别回收所需目的片段。利用 PCR 产物克隆试剂盒中的 T4 DNA 连接酶将回收的目的片段连接,使 PSP 定向插入到 pCambia1302 植物表达载体中 GFP 报告基因的上游,然后将连接产物转化大肠杆菌 TG1 感受态细胞,经 PCR、酶切和测序鉴定后,获得了由 PSP 驱动报告基因 GFP 的新型植物表达载体 pCambia1302-PSP (图 1),笔者把它命名为 pHZ03。



1: DL2000 marker; 2: pUCm-PSP 重组质粒 DNA 用 *Pst* I 和 *Bgl* II 双酶切产物; 3: pCambia1302 载体 DNA 用 *Pst* I 和 *Bgl* II 双酶切产物; 4: pHZ03 重组载体 DNA 用 *Pst* I 和 *Bgl* II 双酶切产物; 5: DNA/*Hind* III marker

1: DL2000 marker; 2: pUCm-PSP recombinant vector digested by *Pst* I and *Bgl* II; 3: pCambia1302 plant expression vector digested by *Pst* I and *Bgl* II; 4: pHZ03 new plant expression vector digested by *Pst* I and *Bgl* II; 5: DNA/*Eco*R I + *Hind* III marker

图 1 pHZ03 重组植物表达载体酶切检测图

Fig. 1 The new recombined plant expression vector pHZ03 digested by restriction enzymes

用常规  $\text{CaCl}_2$  法分别制备根癌农杆菌菌株 LBA4404、GV3101、EHA103 和发根农杆菌菌株 Ri15834 的感受态细胞,提取 pHZ03 质粒 DNA,利用细胞感受态法直接将 pHZ03 质粒分别导入 4 种农杆菌中,在含不同抗生素组合的 YEP 平板上涂布获得单菌落。随机挑取一些单菌落,无菌水悬浮后,用农杆菌和新植物表达载体上一些基因或启动子的引物进行 PCR 扩增,取扩增为阳性的菌液划线,获得了 4 种含新型植物表达载体的农杆菌。

## 3 讨论

GFP 是一种在无需任何辅助因子或底物参与的情况下即可自动发射出荧光的新报告基因,与传统的 GUS 等报告基因相比有明显的优越性,如可在无需裂解细胞的情况下,就能检测活体组织或细胞的

基因表达,而且安全无害<sup>[8]</sup>. 因此克隆并构建由 PSP 驱动的 GFP 报告基因的植物表达载体可以通过转基因的方法方便地进行 PSP 功能鉴定方面的研究.

据报道,果树上毁灭性及检疫性细菌病害柑橘黄龙病和真菌病害香蕉枯萎病均是通过韧皮部传播的<sup>[9,10]</sup>,本研究建立含 PSP 驱动的 GFP 报告基因的植物表达载体的目的,是想通过转基因的手段,先把此载体的 T-DNA 区导入柑橘和香蕉中并检测 GFP 在韧皮部的表达情况,结果符合预期后再构建由 PSP 驱动抗病基因的植物表达载体进行遗传转化研究,最终获得抗病性显著增强的抗病新株系,这方面的工作正在进行之中.

#### 参考文献:

- [1] BOSTWICK D E, DANNENHOFFER J M, SKAGGS M I, et al. Pumpkin phloem lectin genes are specifically expressed in companion cells[J]. *The Plant Cell*, 1992, 4: 1 539 - 1 548.
- [2] WANG M B, BOULTER D, GATEHOUSE J A. Characterization and sequencing of cDNA clone encoding the phloem protein PP2 of *Cucurbita pepo*[J]. *Plant Molecular Biology*, 1994, 24: 159 - 170.
- [3] BOSTWICK D E, SKAGGS M I, THOMPSON G A. Organization and characterization of *Cucurbita* phloem lectin genes[J]. *Plant Molecular Biology*, 1994, 26: 887 - 897.
- [4] 蒋 浩,秦红敏,虞红梅,等. 笋瓜韧皮部蛋白基因启动子的克隆及其功能初探[J]. *农业生物技术学报*, 1999, 7(1): 63 - 68.
- [5] 袁正强,贾燕涛,吴家和,等. 三个韧皮部特异性启动子在转基因烟草中表达的比较研究[J]. *农业生物技术学报*, 2002, 10(1): 6 - 9.
- [6] DOYLE J J, DOYLE J L. A rapid DNA isolation procedure for small quantities of leaf tissue[J]. *Phytochemistry Bulletin*, 1987, 19(1): 11 - 15.
- [7] 萨姆布鲁克 J,弗里奇 E F,曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 第2版. 金冬雁,黎孟枫,等译. 北京:科学出版社,1996. 42 - 68.
- [8] 黄国存,朱生伟,董越梅,等. 绿色荧光蛋白及其在植物研究中的应用[J]. *植物学通报*, 1998, 15(5): 24 - 30.
- [9] 郭文武,邓秀新. 柑橘黄龙病及其抗性育种研究(综述)[J]. *农业生物技术学报*, 1998, 6(1): 37 - 41.
- [10] 张海水,陈荣章. 香蕉枯萎病发生与防治[J]. *中国南方果树*, 2004, 33(3): 36.

【责任编辑 柴 焰】