

玉米醇溶贮藏蛋白基因启动子 PCR 扩增 及其驱动 GUS 基因在转基因烟草种子中的表达

梁 华 马崇烈 赵 倩 敖光明

(北京农业大学农业生物技术国家重点实验室 北京 100094)

摘 要 以玉米 (*Zea mays* L.) 黄化苗为材料, 利用 PCR 技术扩增了玉米 19kDa 醇溶贮藏蛋白基因 (zein) 起始密码子上游启动子片段, 序列分析结果表明, 克隆的 -1~-694 片段具有 19kDa Zein 启动子特点, 与同一家族中其它基因的对应区段同源性达 90% 以上。将此启动子插入 pPKGT 的 GUS 基因及 NOS 终止子上游构成表达载体。经农杆菌转化烟草 (*Nicotiana tabacum* Var. *samsun*), 得到了转化植株。转化的烟草的 PCR 扩增及 Southern 杂交证明目的片段已整合到烟草基因组中。转基因植株的 GUS 活性检测表明, 在叶、根中无 GUS 活性, GUS 活性只存在于种子中。转基因植株烟草种子经冷冻切片, GUS 底物 X-Gluc 活体组织染色证明 GUS 活性只存在于一层介于种子胚乳与种皮之间的细胞中。

关键词 玉米醇溶贮藏蛋白基因, 启动子, 烟草, GUS, PCR

种子贮藏蛋白是人类食用蛋白的主要来源之一。关于它们的分子生物学及基因工程研究非常引人注目。由于种子贮藏蛋白的基因表达受到严格的时间和空间调控, 所以可做为研究植物基因调控机制的良好材料。

本实验克隆了 19kDa Zein 基因的启动子, 并对其调控特性进行了研究, 其目的是为玉米营养品质改良的基因工程和分子生物学做一些基础研究。

1 材料与方 法

1.1 材 料

大肠杆菌 JM101, DH5 α 由本室保存。质粒 pUC19, pGEM-7Zf (+), pPKGT 为本室保存。pCS1, pZ19GT 为本实验室构建。GUS 检测底物 X-Gluc, MUG, MU 由澳大利亚国际水稻中心的 R. A. Jefferson 教授惠赠, 玉米杂交种-农大 60 由农学系苏胜宝老师提供。

1.2 方 法

1.2.1 质粒 DNA 的提取, 纯化, 酶切, 连接等操作: 参照文献 [1]。

1.2.2 植物 DNA 的提取, 以玉米黄化苗为材料, 提取总 DNA: 参照文献 [2]。

1.2.3 PCR 扩增: 在一 Eppendoff 管中, 分别加入 63 μ l 无菌水, 10 μ l 10 \times Taq DNA 聚合酶 buffer, 20 μ l dNTPs (1.0mmol/L), 2 μ l Primer1 (100pmol), 2 μ l Primer2 (100pmol) 及 2 μ l 模板 DNA (0.5 μ g/ μ l, 总体积为 99 μ l。上封适量石蜡油。95 $^{\circ}$ C 7min 后,

再向水相加入 1 μ l Taq DNA 聚合酶 (5u/ μ l), 循环设置为:

	93 $^{\circ}$ C/min	53 $^{\circ}$ C/min	72 $^{\circ}$ C/min
循环 1	2	2	6
循环 2	2	2	6
循环 3	2	2	4
循环 4-30	2	2	3

扩增完毕后, 吸去石蜡油, 向 PCR 反应体系中加入 15 μ l 1mmol/L dNTPs, 10u T4 DNA 聚合酶, 37 $^{\circ}$ C 保温 15min, 15 $^{\circ}$ C, 15min, 将 PCR 产物补平。

1.2.4 植物体内 GUS 活性检测: 方法由 R. A. Jefferson 教授提供。(1) 荧光分析: 取 0.5g 叶片或根, 在 1ml GUS 提取缓冲液 (50mmol/L NaHPO₄, 10mmol/L Na₂EDTA, 10mmol/L 巯基乙醇, 0.1% Nalauryl sarcosine, 0.1% Triton X-100) 中于冰上研磨, 磨后浆液经短暂离心, 弃残渣。测定时, 先准备等于样品数量的 Eppendoff 管, 每管加入 0.2ml 测试缓冲液 [1mmol/L MUG (4-methyl-umbelliferyl-glucuronide 4-甲基-形酮-葡萄糖醛酸苷) 溶于提取缓冲液中], 37 $^{\circ}$ C 预热, 再准备同样数目内装 2.7ml 终止液的管子。向各 0.2ml 测试缓冲液中加入各样品组织提取液 20 μ l, 37 $^{\circ}$ C 温育 1h, 将反应液全数转移到对应的 2.7ml 终止液中, 荧光分光光度计测定。以 1 μ mMU 校正仪器至 100 相对荧光读数; 100nm MU 校正仪器至 10 相对荧光读数; 终止缓冲液调零。各波长为: Excitation, 364nm; Emission, 455nm。(2) 组织染色分析: 取转基因烟草成熟种子, 经冰冻切片后, 置于载玻片上。在载玻片上滴加测试缓冲液 (1mmol/L X-Gluc, 50mmol/L NaH₂PO₄, pH7.0, 0.1% Triton X-100), 37 $^{\circ}$ C 保温 2h。加上盖玻片, 显微镜下观察, 照相。

2 结 果

2.1 目的片段的 PCR 扩增、测序

据已发现的 19kDa Zein 基因启动序列^[3]设计引物, 5' 端引入了 Hind III 酶切位点, 两个引物分别为:

引物 1: (-698~-679) 5'TCCTAAGCTTCTTCCTAGTGTT3'

引物 2: (-21~-1) 5'TGTTGGTACACTATTGTGCTT3'

(-1 为起始密码子上游第一个碱基)

用这两个引物经 30 个循环扩增出一条 700bp 左右的带 (图 1)。把此扩增片段经 T4 DNA 聚合酶补平后插入 pUC19 Sma I 位点, 得到 9 个阳性克隆, 把其中一个命名为 pCS1。提取 pCS1 质粒在 ABI-370 核酸自动测序仪上进行序列分析。通过正反向测序及亚克隆, 得到了全部序列共 694bp。

从测出的序列可以看到, 此片段具有 α -Zein 基因启动子所特有的 -300bp box, 即 15bp 因子 CACATGTG-TAAAGGT^[4]。另外, 它还具有一般启动子所具有 TATA box 和 CAAT box。把此序列与已发表的序列进行比较。结果同源率达 90% 以上 (图 2)。因此, 我们可以肯定所克隆的序

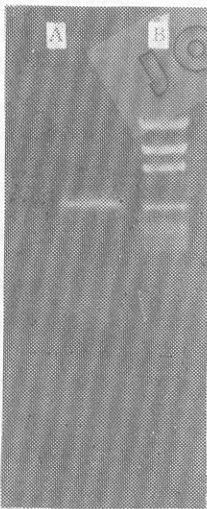


图 1 PCR 产物电泳结果
Fig. 1 Electrophoresis of PCR product
lane A: PCR product
lane B: λ DNA/Hind III/EcoRI marker

列是 19kDa Zein 基因的启动子。

pcsl		Current length: 699		MERGE: Merge	
abl					
10	20	30	40	50	60
TCCTAAGCTT	CTTCCTAGTG	TTTTTTGTG	TGATTGAGTC	GACACAGCAA	CAACTGTGCA
TCCTCCTCTT	CTTCCTAGTG	TTTTTTGTG	TGATTGAGTC	GACACAACAA	CAACTGTGCA
***				*	
70	80	90	100	110	120
CTATTACAAC	CAGTAGGACT	ATATCAACTA	GCAATGTCTT	CCTTATATGT	TACTATTTAT
CTATTACAAC	CAGTAGGACT	ATATCAACTA	GCAATGTCTT	CCTTATATGT	TACTATTTAT
130	140	150	160	170	180
TTTGCTCATA	TTTATTATGT	TTAAATCACA	TAGGCACCTT	TCTATTGGCT	TCAAAAAATT
TTTGCTAATA	TTTATTATGT	TTAAATCACA	TGTGCACCTT	TCTATTGACA	TCAAAAAATT
*			**	* *	
190	200	210	220	230	240
AGTATCAACT	TTCTAGATTA	AAATGAAACT	AAAAGTACAT	AAATTTCTAT	CGGTGGGGAA
AGTATCAACT	TTCTAGATTA	AAATGCAACT	AAAAGTACAT	AAATTTCTAT	CGGTGGGGAT
		*			*
250	260	270	280	290	300
CGAGTGATTC	TTTAAACCGA	TTATTACACA	AGTTAACCAC	ACTAAAATTA	ACATTGGTGA
CGAGTGATTC	TTTAAACCGA	TTATTACACA	AGTTAACCAC	ACTAAAATTA	ACATTGGTGA
310	320	330	340	350	360
ATCGTGCCAT	GATTTTTTTT	TAGTGGGAAA	TAGCCAAACC	AAGCAACACA	TATGTGGCTA
ATCGTGCCAT	GATTTTTTTT	TAGTGCAAAA	TAGCCAAACC	AAGCAAAACA	TATGTGGCTA
	*	*		*	
370	380	390	400	410	420
TCCTTACACA	TGTGTAAGG	TATTGCATCA	CACCATTGTC	ACCCATGTAT	TTGGACAATA
TCGTTACACA	TGTGTAAGG	TATTGCATCA	CACCATTGTC	ACCCATGTAT	TTGGACAATA
*	-300因子				
430	440	450	460	470	480
CCGAGAGGAA	AAACCACTTA	TTTATTGTAT	TTTATCA GT	TTATCTTGCT	TACGTATAAA
CCGAGAGGAA	AAACCACTTA	TTTATTGTAT	TTTATCAAGT	TTATCTTGCT	TACGTATAAA
			*		
490	500	510	520	530	540
TTATAACCCA	ACAAAGTAAT	CACTAAATGT	CAAACCAAC	TAGATACCAT	GACATCTCTA
TTATAACCCA	ACAAAGTAAT	CACTAAATGT	CAAACCAAC	TAGATA@CAT	GTCATCTCTA
				*	
550	560	570	580	590	600
CCTTATCTTA	CTAATATTCT	TTTTGCAAAA	TCCAAAAGTA	ATCTTGACACA	AGCACAAAGGA
CCTTATCTTA	CTAATATTCT	TTTTGCAAAA	TCGAAAATTA	ATCTTGACACA	AGCACAAAGGA
			CAAT box *	*	
610	620	630	640	650	660
CTGATATGTG	TATAAATATC	TCTTAGATTA	G TAGTTAAT	ACATCACTCA	TATTA AG
CTGATATGTG	TATAAATATC	TCTTAGATTA	GCTAGCTAAT	ATATCGCACA	TATTATTGAG
*	TATA box		*	*TATA box*	* * ***
670	680	690	700	710	720
ACCAACTAGC	AACATAGAAA	GCACAATAGT	GTACCAACA		
ACCAACTAGC	AATATAGAAA	GCACAATATT	GTACCAATA		
	*	*	*		

图 2 pCS1 克隆中 PZ19 序列与发表的 Z19abl 序列的比较

Fig. 2 The nucleotide sequence of PZ19 in pCS1 and comparison of the sequence with Z19abl

值得指出的是, 19kDa 及 21kDa Zein 基因的 5' 调控序列有 2 个启动子: P1 和 P2, 分别位于距起始密码子 -950bp 和 -50bp 处。每个启动子都有 CAAT box 和 TATA box 结构^[5]。而且, 19kDa Zein 基因 P2 在上游相应位置还存在 -300bp 因子^[4]。根据所设计的引物, 我们所克隆的是 P2, 即靠近起始密码子的启动子。

2.2 19kDa Zein 基因启动子在转基因烟草中的活性

2.2.1 表达载体构建及烟草的转化:图 3 列出了表达载体构建策略。用 Hind III 切下启动子并回收该片段。把此片段与经 Hind III 酶消化及 CIP 处理的 pPKGT 连接起来,转化大肠杆菌 DH 5 α 。如果为正向插入,则在目的片段两端均有 Xba I 酶切位点,因此可用 Xba I 酶切鉴定重组子插入方向,筛选出正向插入克隆,pZ19GT。把 pZ19GT 质粒用直接法⁽⁶⁾转入农杆菌 LBA4404。用此农杆菌,通过叶圆盘法转化烟草,转化的外植体培养在 MS 生芽培养基上(含 100mg/L 卡那霉素,500mg/L 羧苄青霉素)。两周继代一次。继代两次后开始长出绿色小芽,将绿色小芽转入生根培养基上,约一个月后把小苗移栽到花盆中。

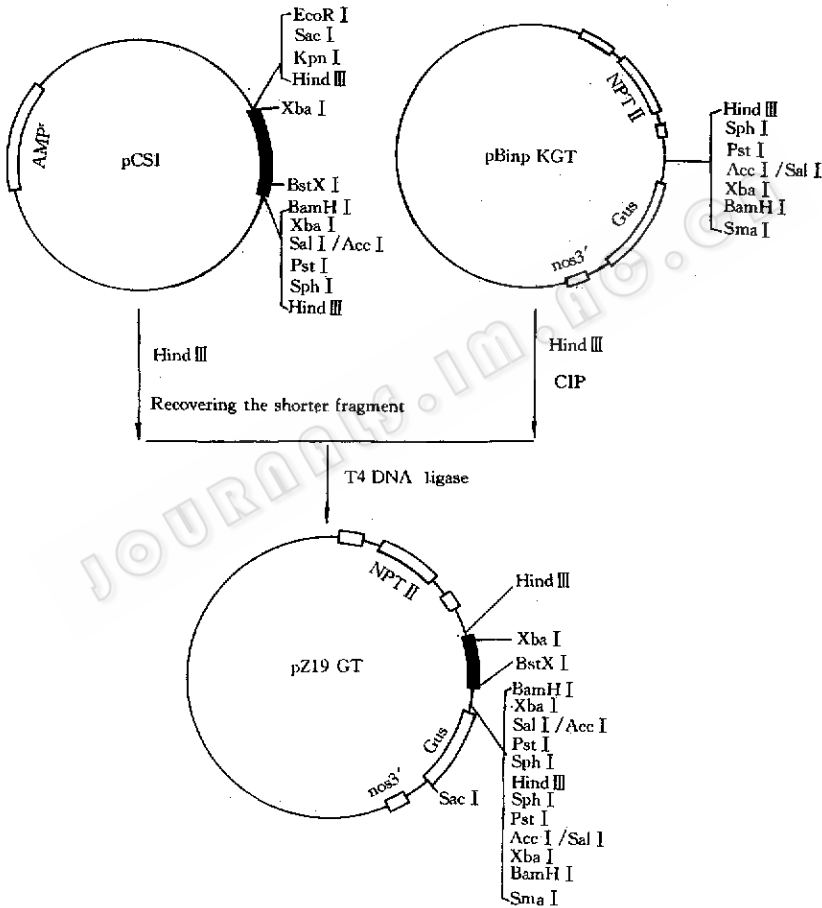


图 3 植物表达载体构建策略

Fig. 3 Scheme of constructing plant expression vector

2.2.2 转基因烟草的 PCR 检测及 Southern 杂交:取 8 株烟草的叶片各 0.5g, CTAB 法提取总 DNA⁽²⁾。以烟草 DNA 为模板,用启动子两端引物进行 PCR 扩增。8 个样品中有 7 个得到了与正对照相同大小的片段。

再从这 7 株 PCR 检测呈阳性的烟草样品中选出 4 个进行 Southern 分子杂交,结果 3 株都呈阳性(图 4),证明目的基因已整合到烟草基因组中。

2.2.3 转基因烟草的 GUS 活性检测:按上述方法检测了 PCR 检测呈阳性的 7 株烟草的根, 叶中的 GUS 活性。荧光比色结果表明, 4 株转基因烟草的根、叶中没有 GUS 活性(表 1)。用 GUS 底物 X-Gluc 对转基因烟草成熟种子进行 GUS 活性分析, 结果烟草种子变成深蓝色(图版 I), 证明种子表达了 GUS 基因。对种子作进一步的切片观察, 发现 GUS 活性只局限于一层介于种皮与胚乳的细胞中(图版 I)。

表 1 转基因烟草中 GUS 活性检测 GUS 活性

Table 1 GUS activity in different organs of transgenic tobacco (pmol 4-MU/mg Protein · h)

Tissue	CK ⁻	1	2	3	4
Callus	1.73	3.33	6.32	2.08	2.68
Blade	-0.05	-0.05	0.02	-0.04	-0.01
Root	0.02	0.40	-0.11	-0.06	0.56

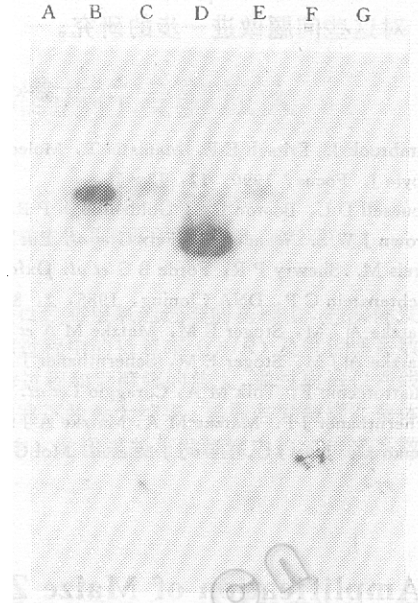


图 4 转基因植株的 Southern 检测

Fig. 4 Southern blot of transgenic plants

A. Untransferred tobacco B. pZ19GT/Hind III
C. E. F. G. Transferred tobacco
D. Deleted fragment of pZ19GT

3 讨 论

玉米 Zein 基因启动子的表达具有严格的发育和组织特异性, 它们在玉米开花 14d 后开始在玉米种子胚乳中表达。前几年, 对玉米 Zein 基因启动子在转基因烟草, 向日葵, 矮牵牛等外源双子叶植物中的表达调控进行了研究^(7~10)。最初的几则报道都认为 Zein 基因启动子在异源双子叶植物中的表达与在玉米中表达差不多, 激活时间为开花后 8d 左右, 并且都是胚乳特异性表达^(8~10)。但是, Matzke 最近的报道更正了以前所得的结果, 他们重新检查了 Z4 即 23kDa Zein 基因启动子驱动的 GUS 基因在转基因烟草种子中的活性部位, 发现 GUS 活性不像他们以前所认为的那样即 GUS 活性是在胚乳中, 而是在一层介于种皮与胚乳之间的细胞中⁽⁷⁾。我们的实验也证实了这一结果(图版 I)。虽然我们所用的是 19kDa Zein 基因启动子。

但是, Zein 基因启动子驱动 GUS 基因不在烟草种子胚乳中表达的原因还不知道。Matzke 等进行了转基因烟草的杂交试验, 发现 Zein 基因启动子驱动的 GUS 基因表达具有母系特征, 即只有在母体是转基因植株时 GUS 活性才存在于上述那些细胞中⁽⁷⁾。最近 Czako 等报道, 烟草种子母体本身组织能被正在发育的胚乳所吸收⁽¹¹⁾。根据这两点可以推测, 也许是由于母体胚乳组织的消失导致了 GUS 活性在胚乳中的消失。

Zein 基因启动子在外源植物中的表达、调控问题还存在很多疑难点。首先, 这一层表达 GUS 基因的细胞是何组织还有待于确定。另外, Zein 基因启动子的调控元件是否真的能被双子叶植物所正确识读还有待于进一步验证。我们正在利用所克隆的 Zein 基因启

动子, 对这些问题做进一步的研究。

参 考 文 献

- [1] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning*, 2nd. Cold Spring Harbor Laboratory Press 1989.
- [2] Doyle J. *Focus*, 1990, 12: 13~15.
- [3] Roussel D L, Boston R S, Goldsbrough P B. *Mol Gen Genet*, 1988, 211: 202~209.
- [4] Brown J W S, Wandelt C, Feix G *et al.* *Eur J Cell Biol*, 1986, 42: 161~170.
- [5] Kreis M, Shewry P R, Forde B G *et al.* *Oxford Surv Plant Mol Cell Biol*, 1985, 2: 253~317.
- [6] Lichtenstein C P, *DNA Cloning*, 1985, 2: 83~85.
- [7] Matzke A J M, Stoger E M, Matzke M A *et al.* *Plant Mol Biol*. 1993, 22: 553~554.
- [8] Matzke A J M, Stoger E M, Scherthner J P *et al.* *Plant Mol Biol*, 1990, 14: 323~332.
- [9] Quattrocchio F, Tolm M A, Coraggio I *et al.* *Plant Mol Biol*, 1990, 15: 81~93.
- [10] Scherthner J P, Matzke M A, Matzke A J M, *EMBO J*, 1988, 7: 1249~1255.
- [11] Czako M, Jang J C, Herr J J M *et al.* *Mol Gen Genet*, 1992, 2235: 33~40.

Amplification of Maize Zein Gene Promoter by PCR and It Drive GUS Gene Expression in Transgenic Tobacco Seeds

Liang Hua Ma Chonglie Zhao Qian Ao Guangming

(National Labs for Agrobiotech., Beijing Agriculture University, Beijing 100094)

Abstract PCR method was used to amplify the promoter region of a maize 19kDa Zein gene. The obtained fragment was inserted into pUC19 Sma I site and sequenced. The sequences showed that we cloned a 694bp promoter which located in -1~-694 region with the start site of translation as +1. This promoter shared several characters with other members of same gene family, and was homologous with them by more than 90%. A chimeric gene, 19kDa promoter-GUS-Nos terminator, was constructed and transferred into tobacco (*Nicotiana tabacum* Var. *samsun*) plants. GUS activity assays indicated that expression of GUS was active only in transgenic tobacco seeds. However, the GUS activity didn't exist in the endosperm of tobacco seeds as we expected, but in a cell layer that is interposed between the seed coat and endosperm.

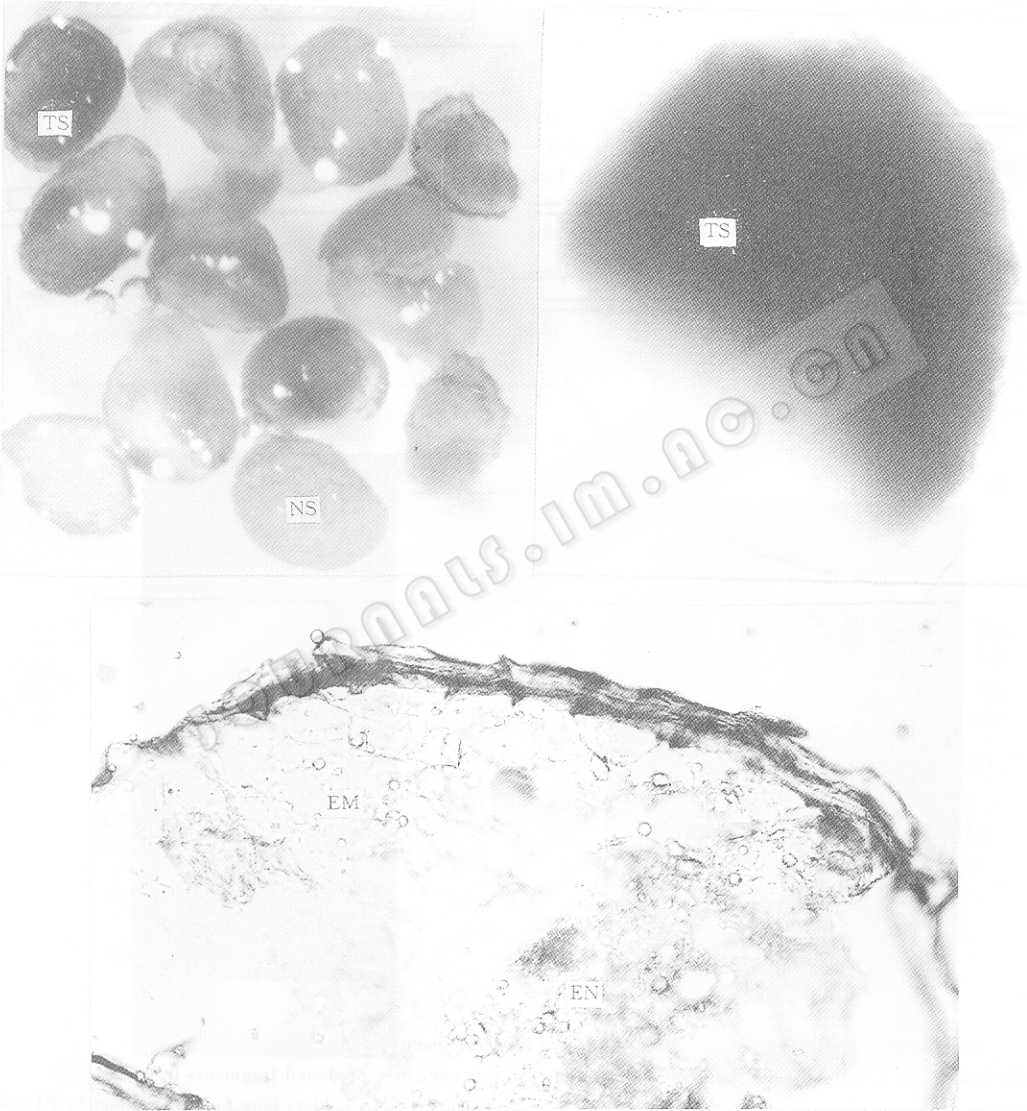
Key words Maize zein gene, promoter, GUS, tobacco, PCR

梁 华等：玉米醇溶贮藏蛋白基因启动子 PCR 扩增及其
驱动 GUS 基因在转基因烟草种子中的表达

图版 I

Liang Hua *et al.* : Amplification of maize zein gene promoter
by PCR and it drives GUS gene expression
in transgenic tobacco seeds

Plate I



GUS activity assay of transgenic tobacco seeds

TS. Transformed plant seeds, NS. Untransformed plant seeds

EN. Endosperm, EM. Embryo