

文章编号: 1005-0906(2006)02-0084-04

玉米淀粉分支酶 *sbe II b* 基因启动子的克隆和表达载体构建

徐亚维, 柴晓杰, 王丕武, 左艳亭, 吕 品, 张 宇

(吉林农业大学生物技术学院, 长春 130118)

摘要: 以玉米基因组 DNA 为模板, 通过 LA-PCR 技术扩增了玉米淀粉分支酶 *sbe II b* 基因启动子序列, 并将其克隆到 pMD18-T Vector 上, 对重组子进行 PCR 检测和限制性内切酶分析并测序。结果表明, 该启动子和 Genbank 中发表的玉米淀粉分支酶 *sbe II b* 基因启动子同源性达 98.52%, 克隆片段长为 934 bp。再将经 BamH I 和 Hind III 双酶切得到的启动子片段克隆到相同酶酶切的 pBI121 载体上, 构建植物表达载体 pBI121-*sbe II b*, 并进行酶切鉴定和 PCR 检测。结果显示, 启动子基因 *sbe II b* 已成功整合到植物表达载体 pBI121 上。序列中发现高等植物启动子所特有的基本核心序列和种子特异表达所需的特殊调控元件。

关键词: 玉米; 淀粉分支酶; 启动子; 扩增; 表达**中图分类号:** S513.01**文献标识码:** A

Cloning of the Promoter of Maize Starch Branching Enzyme *Sbe II b* and Constructing of Plant Expression Vector

XU Ya-wei, CHAI Xiao-jie, WANG Pei-wu, ZUO Yan-ting, LU Pin, ZHANG Yu

(Faculty of Biotechnology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: Genetic DNA of maize was used as total template to amplify the sequence of the promoter of maize starch branching enzyme *sbe II b* by using LA-PCR. Then we cloned the promoter to pMD18-T Vector, and detected the recombinant by doing PCR and restriction enzyme method. The result indicated that the sequence of promoter cloned in this experiment extremely similar to the one that announced in the Genbank. The ratio was 98.52% and the length was 934bp. After digesting by BamH I and Hind III, we cloned the promoter to pBI121 vector, and constructed a new vector called pBI121-*sbe II b*. After detected by restriction enzyme and PCR, the result indicated that the promoter had been already integrated into plant expressing vector pBI121. The basic cored sequences and seed specific expression elements were found among the sequence.

Key words: Maize; Starch branching enzyme; Promoter; PCR; Expression

植物的生长发育受基因调控, 启动子是调控基因表达的关键元件之一。目前基因工程中存在的首要问题是外源基因的表达水平、表达部位等问题, 而启动子在决定基因表达方面起关键作用。启动子有组成型启动子(constitutive promoter)和组织特异性启动子(tissue-specific promoter)两类, 前者在所有组织

中都启动基因表达, 后者仅在特定的组织中和一定的发育时期启动基因表达。组成型启动子被广泛用于植物表达载体中, 导致外源基因在转基因植物的所有部位和所有发育阶段都表达, 不但造成外源基因的浪费还会引起植物的形态发生改变, 影响植物的生长发育。这就使人们越发注重特异表达启动子的研究和应用, 既保证了外源基因在植物体内的有效发挥, 又减少了对植物的不良影响。已发现的特异性启动子主要包括组织特异性启动子和诱导特异性启动子。启动子是分析和调控基因表达的有力工具, 而特异性启动子的克隆和应用不但为植物中特异性表达外源基因奠定了基础, 也为植物雄性不育基因工程提供新的启动子元件。我们从玉米中克隆得到

收稿日期: 2005-03-19**基金项目:** “国家转基因植物中试与产业化基地建设”专项基金(J99-13-001)和吉林省科研基金(20040203-2-2)资助**作者简介:** 徐亚维(1974-), 女, 研究生, 研究方向: 植物基因工程。

Tel: 0432-2057665 13624323389

E-mail: xuyaweilucky@163.com

柴晓杰为本文通讯作者。Tel: 0431-8715118

E-mail: ldcdf56@yahoo.com.cn

淀粉分支酶 *sbe II b* 基因启动子,试图为玉米淀粉的表达提供新的启动子元件。

1 材料与方法

1.1 实验材料

(1)植物材料。玉米黄化苗由本实验室提供。

(2)受体菌株。E. coli DH5 α 和 EHA105 菌株, LB 培养基及 YEP 培养基均由本实验室提供。

(3)试剂。pMD18-Tvector、DNA Marker DL-2000、限制性内切酶 (BamH I、Hind III)、RNase、LA Taq 聚合酶均购自 TaKaRa 和 Promega 公司, 表达载体 pBI121 购自 Invitrogen 公司, 凝胶回收试剂盒购自北京鼎国生物试剂公司, 其他试剂都是国产分析纯产品。

(4)引物。根据已知 *sbe II b* 启动子序列(GenBank: AF072725), 通过分子生物学分析软件 Oligo5.0 设计人工寡核苷酸扩增引物, 交由大连 TaKaRa 公司合成。

上游引物: 5' TCTCTCCAACCCCTTCAATC 3'

下游引物: 5' GACCGCAAGAGCGAAATC 3'

1.2 实验方法

1.2.1 基因组 DNA 的提取(CTAB 法)

取 1.0 g 经暗培养 2~3 d 的幼嫩玉米叶片(去叶脉), 液氮研磨后加入预热至 65℃ 的 CTAB 提取缓冲液中提取, 上清液加等体积氯仿:异戊醇(24:1)混匀后离心; 上清液用等体积苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)和氯仿:异戊醇(24:1)反复抽提。加入 1/10 体积 NaAc (3 mol/L, pH5.2) 和 2 倍体积冷乙醇以沉淀 DNA (2 h), 分别用 70%、80% 乙醇洗涤沉淀并加入 100 μ L TE 缓冲液回溶 DNA 沉淀, 同时加入 2 μ L RNase, 置 37℃ 处理 2 h。再用等体积的苯酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)和氯仿:异戊醇(24:1)分别抽提, 吸取上清液, 重新沉淀 DNA, 用 70% 乙醇洗, 风干, 加入适量体积的去离子水回溶。

1.2.2 PCR 扩增

体系为 25 μ L, 引物 (50 pmol/L) 各 0.5 μ L, 2 $\times$ GC buffer I 12.5 μ L (5 mM Mg²⁺ Plus), dNTP Mixture (各 2.5 mM) 4 μ L; 模板 70 ng; LA Taq 酶 (5 u/ μ L) 0.25 μ L; ddH₂O 补足 25 μ L。反应条件为: 94℃ 预变性 3 min; 94℃ 变性 3 s; 48℃ 退火 30 s; 72℃ 延伸 2 min, 30 个循环; 72℃ 延伸 5 min。

1.2.3 PCR 扩增产物电泳及回收 DNA 片段^[13,14]

电泳检测后切下含有目的片段的琼脂糖凝胶, 放入微量离心管中。用鼎国的 DNA 片段凝胶回收试剂盒 A014-1 回收 DNA 片段, 置 -20℃ 冰箱保存。

1.2.4 目的片段与载体的连接

在 Eppendorf 管内配制 10 μ L 反应体系, pMD18-T Vector 与目的片段以 1:3 的比例进行连接反应。

1.2.5 重组子克隆的筛选和鉴定^[15]

按 Maniatis 的方法制备感受态细胞, 将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α , 同时做两个对照管。在含有氨苄青霉素、X-gal 和 IPTG 的 LB 固体培养基平板上 37℃ 选择培养过夜(倒置培养)。次日, 挑取筛选出的白色菌落振荡培养过夜, 并用碱裂解法提取质粒。

1.2.6 限制性内切酶酶切鉴定和 PCR 检测

在 Eppendorf 管内配制 20 μ L 反应体系, 用 BamH I 和 Hind III 双酶切, 然后对酶切片段进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。用小片段回收试剂盒回收酶切产物。

1.2.7 克隆片段的序列分析

测序由大连宝生物公司完成, 核酸序列分析用 DNAMAN 软件分析。

1.2.8 融合表达载体的构建

提取用来测序的重组克隆(*sbe II b*/DH5 α)质粒, 经 BamH I 与 Hind III 酶切后, 以 1:3 的比例和经过同样酶切的植物表达载体 PBI121 相连, 并将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 同时做两个对照管。涂在含有卡那霉素 (50 μ g/mL) LB 固体培养基平板上 37℃ 选择培养过夜(倒置培养)。次日, 挑取单菌落振荡培养过夜并用碱裂解法提取质粒。

1.2.9 限制性内切酶酶切鉴定

对植物表达载体 pBI121-*sbe II b* 进行限制性内切酶酶切鉴定, 然后对酶切片段进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.10 农杆菌转化融合表达载体

利用冻融法将植物表达载体 pBI121-*sbe II b* 质粒转入农杆菌 EHA105 菌株中, 涂在含有卡那霉素 (50 μ g/mL) YEP 固体培养基平板上, 28℃ 选择培养 1~2 d (倒置培养)。取单菌落用碱裂解法提取质粒并进行酶切鉴定和 PCR 检测。

2 结果与分析

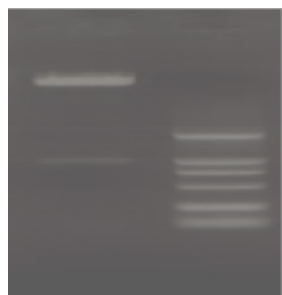
2.1 启动子片段的扩增与克隆

由于 Genbank 中发表的玉米淀粉分支酶 *sbe II b* 基因启动子序列中的 GC 含量偏高 (>60%), 普通 Taq 酶无法扩增目的片段, 因此本实验中采用 LA-PCR 扩增出一条特异的约 934 bp 的特异扩增条带(图 1)。

将 PCR 产物回收后, 与 pMD18-T 载体连接,

2.3 表达载体的构建及鉴定

鉴于重组体上游有 *Hind* III 酶切位点,下游有 *Bam*HI 酶切位点,且启动子片段正好又是正向插入,因此用 *Hind* III 和 *Bam*HI 双酶切重组体和 *PBI121* 表达载体,即切去 *GaMV35S* 启动子。用 *T4* 连接酶以 1:3 的比例构建特异启动子的植物表达载体 *PBI121-sbe II b*。酶切结果显示(图 4),酶切小片段和目的片段大小一致,由此已成功构建出表达载体。



M 为 DNA 分子量标准(DL2000)

a 为 *Bam*HI/*Hind*III 双酶切

图 4 *pBI121-sbe II b* 质粒酶切鉴定

3 讨 论

sbe II b 基因启动子序列较特殊,它富含 GC (>60%),且 GC 聚集现象严重,加之序列中 TATA-box 和 ATG 起始密码子间距较大,长达 130 bp。这使得扩增起来比较困难,普通 *Taq* 酶无法扩增出特异目的片段。考虑到 GC 含量过高的因素,改用 LA-*Taq* 酶,且用富含 GC 的 Buffer,成功扩增出一条约 934 bp 的目的片段,且目的片段非常特异。经对克隆质粒测序显示,所扩基因和 GenBank 中发表的 *sbe II b* 基因启动子序列只有 14 处不同,同源性达 98.52%。

序列中含高等植物启动子所特有的核心序列 CAAT-box 和 TATA-box,且与高等植物启动子 TATA-box 位于起始位点上游 -32bp 处的理论相吻合。序列中还发现种子特异表达所需的特殊调控元件 GCN4-motif 和 RY-element;另外,AT-rich 和 GC-box 的多处出现应该对特异表达起一定的增强

作用。但本实验克隆的启动子是否是种子特异表达启动子及表达量如何仍需做进一步的研究。

参考文献:

- [1] 王旺田,张金文,刘玲玲,等. *rbcS* 启动子的克隆及活性鉴定[J]. 甘肃农业大学学报,2004,6(3):255-260.
- [2] 洪亚辉,蒋泓,萧浪涛,等. 碧冬茄花特异表达基因启动子 *PchsA* 的克隆与序列分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版),2003,12(6):29.
- [3] 张宪银,薛庆中. 水稻胚乳特异性启动子 *Gt1* 的克隆及其功能验证[J]. 作物学报,2002,28(1):110-114.
- [4] 刘世强,杨丽卿,等. 草菇 7005 启动子区域的克隆及其序列分析[J]. 食用菌学报,2004,11(1):1-6.
- [5] Kim K N, Fisher D K, Gao M. Molecular cloning and characterization of the Amylose-Extender gene encoding starch branching enzyme IIB in maize. *Plant Mol Biol.*, 1998, 38(6): 945-956.
- [6] 石东乔,周奕华,万里红,等. 甘蓝型油菜 *BcNA1* 基因启动子在转基因烟草中对 *GUS* 基因表达的调控[J]. 植物生理学报,2001,27(4):313-320.
- [7] 马志刚,等. 马铃薯 *prp1-1* 启动子的克隆及转基因研究[J]. 西南农业学报,2002,15(1).
- [8] Blauth S L, Yao Y, Klucimec J D. Identification of mutator insertional mutants of starch-branching enzyme 2a in corn[J]. *Plant Physiol*, 2001, 125(3): 1396-1405.
- [9] 罗克明,郭余龙. 棉花 *Lea* 蛋白 D-113 基因启动子的克隆及序列分析[J]. 遗传学报,2002,29(2):161-165.
- [10] 刘大文,谢友菊. 拟南芥菜花药绒毡层启动子的克隆和序列分析[J]. 作物学报,2000,26(4):406.
- [11] 李丽,张景昱. 种子特异性启动子(*napinB* promoter)分离、表达、载体构建及转基因植物获得[J]. 植物学通报,2001,18(2): 216-220.
- [12] 王关林,方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京:科学出版社,2002. 744.
- [13] 魏群. 分子生物学实验指导[M]. 北京:高等教育出版社,1999. 53-62.
- [14] 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]. 北京:科学出版社,1993. 19-23.
- [15] 迪芬巴赫 C W, 德维克斯勒 G S. PCR 技术实验指南[M]. 北京:科学出版社,1999. 23-41.
- [16] 柴晓杰,王丕武,张君,等. 玉米淀粉分支酶基因的克隆和反义载体的构建[J]. 玉米科学,2004,12(2):105-107.
- [17] 蒋浩,秦红敏,田颖川. 杨树皮储藏蛋白基因启动子的克隆和功能研究[J]. 林业科学,1999,35(5):46-50.