A C T A AGRICULTURAE BOREALI-SINICA 华北农学报 ·2008 ,23(3) :16-19

植物果实特异性启动子 E8 基因的克隆

王玉霞[1] ,李　唯[2] ,王旺田[2] ,栗孟飞[2] ,陈　鑫[1]

(1. 甘肃农业大学 农学院 ,甘肃 兰州　730070 ;2. 甘肃农业大学 生命科学院 ,甘肃 兰州　730070)

摘要 :采用高盐低 pH 值法、分步离心法、SDS 法、CTAB 法、改良 CTAB 法提取毛粉 802 番茄幼苗基因组 DNA ,其中改良 CTAB 法提取的 DNA 效果最好 ,以此 DNA 为模板 ,用特异性引物进行 PCR 扩增 ,得到了预期大小的片段 ,将目的片段回收 ,克隆进 pMD18-T Simple Vector 载体 ,经 PCR 及酶切检测具有与目标片段长度相符的插入片段 ,构建的重组 pMD18-E8 载体经测序结果分析显示 ,番茄果实特异性 E8 启动子序列具有高度保守性 ,与 GenBank 上发表的 E81.1 启动子同源性为 99.1 % ,说明成功获得了果实特异性 E8 启动子基因 ,为实现外源基因在转基因桃果实中特异性表达做准备。

关键词 :番茄 ;果实特异性 E8 启动子 ;基因克隆

中图分类号 :Q785　　**文献标识码** :A　　**文章编号** :1000 - 7091(2008)03 - 0016 - 04

Clong of Plant Fruit-Specific E8 Promoter

WANG Yu-xia[1] ,LI Wei[2] ,WANG Wang-tian[2] ,LI Meng-fei[2] ,CHEN Xin[1]

(1. College of Agronomy ,Gansu Agricultural University ,Lanzhou　730070 China ;
2. Life-Science Institute of Gansu Agricultural University ,Lanzhou　730070 ,China)

Abstract :The DNA was extracted from cotyledons of tomato Maofen 802 by high salt and low pH ,step by step acentric ,SDS ,CTAB and improved CTAB method. The improved CTAB method was the best method in the DNA extract. We use this DNA as stencil and amplified by PCR ,the product of which was reclaimed and subcloned into pMD18-T Simple Vector. After identification by PCR and restriction enzymes ,the recombinant pMD18-E8 vectors were subjected to sequence analysis. As indicated by homology analysis ,the resultant tomato fruit-specific E81.1 promoter was highly conservation ,with GenBank submission ,proved to share 99.1 % homology. Therefore ,tomato fruit-specific E8 promoter has been successfully cloned ,thus making possible the subsequent research in transgenic peach.

Key words :Tomato ;Fruit-specific E8 promoter ;Gene cloning

启动子是 DNA 分子与 RNA 聚合酶特异结合的部位 ,是最主要的一种转录调节因子 ,对于外源基因的表达非常重要。在基因表达的调控中 ,转录的起始是个关键。某个基因是否表达决定于特定的启动子的起始过程[1]。

果实特异性启动子可以控制外源基因在植物果实中高效表达 ,避免外源基因在植物的其他部位表达 ,减少对植物的不利影响。主要蔬菜如番茄、辣椒 ,瓜果类如甜瓜、桃子等的主要食用部位均为果实。因此 ,利用果实特异性启动子控制外源基因在果实中特异表达具有重要理论和实践意义[2]。本试验的目的是获取番茄果实特异性 E8 启动子基因 ,为实现外源基因在转基因桃子中果实特异性表达做准备。

1　材料和方法

1.1　种子、菌种、质粒与主要试剂

毛粉 802 番茄种子(甘肃省种子公司) , *E. coli* 菌株 DH5α(甘肃农业大学测试中心提供) ,pMD18-T Simple Vector(宝生物工程有限公司) ,IPTG 和 X-Gal (宝生物工程有限公司) ,B 型小量 DNA 片段快速胶回收试剂盒(北京博大泰克生物基因技术有限责任公司) ,DNA 限制性内切酶(北京博大泰恒有限生物公司) ,Taq 酶和氨苄青霉素(宝生物工程有限公

收稿日期 :2008 - 02 - 09
基金项目 :甘肃省科技厅计划项目(0708NKCA070)
作者简介 :王玉霞(1978 -) ,女 ,甘肃会宁人 ,在读硕士 ,主要从事转基因研究。
通讯作者 :李　唯(1955 -) ,男 ,甘肃成县人 ,博士 ,教授 ,主要从事作物组织培养与种质改良等相关研究。

司)。

1.2　毛粉 802 番茄幼苗的培养及番茄基因组 DNA 的提取

取毛粉 802 番茄种子,清洗后清水浸泡过夜,次日搓洗种子,以便洗掉种皮外抑制萌发的酸性物质,部分种于营养盘中,室温培育;部分铺于湿润的纱布上,保鲜膜覆盖,室温培育,待种子长出 3 片小叶即可采集叶片提取基因组 DNA。

番茄基因组 DNA 的提取采取了 5 种不同的方法,分别是高盐低 pH 值法[3]、分步离心法[4]、SDS 法[5,6]、CTAB 法[7,8]、改良 CTAB 法[9,10]。用 1%的琼脂糖电泳进行鉴定。

1.3　E81.1 启动子基因的克隆

1.3.1　引物设计　根据 Deikman 等[11,12]报道的番茄 Cherry 种的果实特异性 E8 启动子序列,用分子生物学软件 Oligo6.0 设计 2 条 PCR 引物,引物合成由博大泰恒有限公司完成,分别为 PE-1:5′-gCAAGCTTA GGAATTTCACGAAATCG-3′引入 *Hin*d Ⅲ酶切位点;PE-2:5′-CgGGATCCTCTTTTGCACTGTGAATGAT-3′引入 *Bam*H Ⅰ酶切位点。

1.3.2　目的基因的 PCR 扩增及其产物纯化　在 25 μL 反应体系中加 10 ×PCR Buffer 2.5 μL;25 mmol/L $MgCl_2$ 1.5 μL;2.5 mmol/L dNTP 4 μL;10 μmol/L PE-1 0.5 μL;10 μmol/L PE-2 0.5 μL;模板 DNA 0.5 μL;Taq 酶 0.5 μL;ddH_2O 补至 25 μL。PCR 循环条件:95 ℃预变性 3 min;94 ℃变性 1 min,56 ℃退火 50 s,72 ℃延伸 75 s,30 个循环;再 72 ℃10 min;4 ℃保存。反应结束后在 1%琼脂糖凝胶上电泳检测,将符合要求的扩增产物 30～50 μL 上样到同一个点样孔中,采用"DNA 片段快速胶回收试剂盒"从琼脂糖凝胶中切胶回收目的 DNA 片段,方法参见说明书。

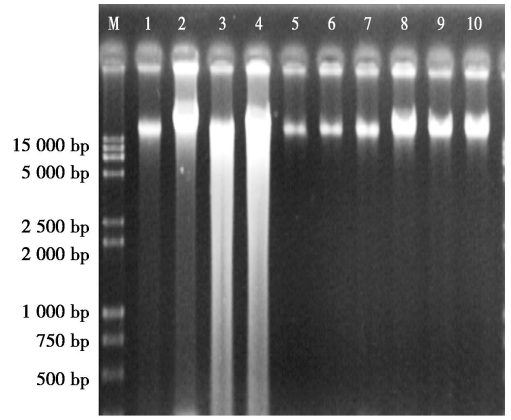
1.4　重组载体的构建、筛选及鉴定

按 TaKaRa 公司 pMD18-T Simple Vector 载体操作手册,将上述回收产物克隆进 pMD18-T Simple Vector,将连接产物转化大肠杆菌 DH5α 感受态细胞,接种到含有 Ampicillin/ IPTG/ X-gal 的固体 LB 平板上,培养 14～16 h,用蓝白斑进行初步筛选,挑蓝斑和白斑单菌落于氨苄青霉素抗性的 LB 液体培养基中,37 ℃300 r/ min 震荡培养过夜,点斑保存菌,取菌液用碱法小批量提取质粒,用蓝斑做对照进行电泳,筛选滞后质粒,初步判断提取的质粒是否含有外源基因。用 PCR 和酶切检测法鉴定重组质粒;将含有目的片段的重组质粒记作 pE8-T,重组子阳性克隆菌单菌落再摇菌,培养物制备甘油(25%)管,-70 ℃保存备测序,序列同源性由 DNAMAN 软件完成。

2　结果与分析

2.1　基因组 DNA 的提取

本试验采取的 5 种不同的提取番茄基因组 DNA 方法中,改良 CTAB 法的提取效果较为理想,DNA 带型整齐、清晰,且无降解,基本没有 RNA 和其他杂质,适于后续的分子生物学操作(图 1)。从图 1 还可以看出,幼叶提取 DNA 的效果普遍好于老叶。

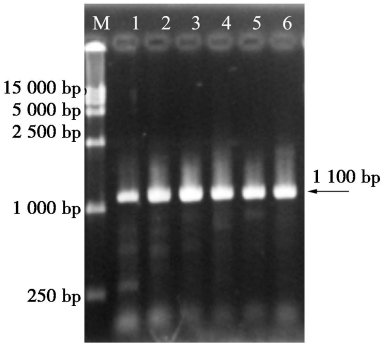


M. DNA marker;1,2. 高盐低 pH 值法;3,4. 分步离心法;5,6. SDS 法;7,8. CTAB 法;9,10. 改良 CTAB 法;1,3,5,7,9. 培养 30 d 的叶片;2,4,6,8,10. 培养 10～15 d 的叶片

M. DNA marker;Lane 1,2. High salt and low pH method;Lane 3,4. Step by step acentric method;Lane 5,6. SDS method;Lane 7,8. CTAB method;Lane 9,10. Improved CTAB method;Lane 1,3,5,7,9. 30 d cotyledons of tomato;Lane 2,4,6,8,10. 10 - 15 d cotyledons of tomato

图 1　番茄基因组 DNA 提取

Fig. 1　Tomato genomic DNA extraction



1,2. DNA 4 μL,引物 1.0 μL,Taq 酶 0.5 μL,0.75 μL;3,4. DNA 1 μL,引物 0.5 μL,Taq 酶 0.5 μL,0.75 μL;5,6. DNA 0.5 μL,引物 0.5 μL,Taq 酶 0.5 μL,0.75 μL;M. DNA marker

Lane 1,2. DNA 4 μL,primer 1.0 μL,Taq 0.5 μL,0.75 μL;Lane 3,4. DNA 1 μL,primer 0.5 μL,Taq 0.5 μL,0.75 μL;Lane 5,6. DNA 0.5 μL,primer 0.5 μL,Taq 0.5 μL,0.75 μL;M. DNA marker

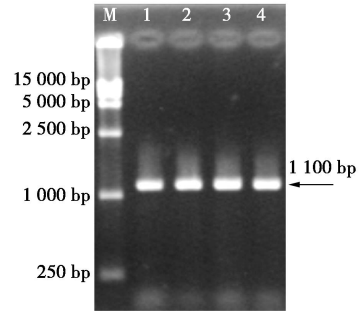
图 2　PCR 反应体系优化筛选

Fig. 2　PCR selection of reactive system

2.2　PCR 反应体系的优化及目的片段的 PCR 扩增

以改良 CTAB 法提取的番茄基因组 DNA 为模板,采用不同浓度的模板和引物对目的片段进行扩增,从节约成本和扩增效果(图 2)可看出最优的反应体系为:10 ×PCR Buffer 2.5 μL;$MgCl_2$ 1.5 μL;

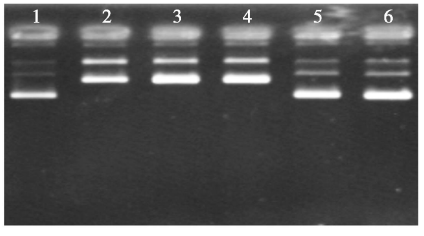
dNTP 4 μL;PE-1 0.5 μL;PE-2 0.5 μL;模板 DNA 0.5 μL;Taq 酶 0.5 μL;ddH_2O 补至 25 μL。扩增得到了预期大小的约 1 100 bp 片段(图 3)。



1,2,3,4. PCR 扩增结果(≈1.1 kb);M. DNA marker
Lane1,2,3,4. PCR product of tomato fruit-specific E81.1 promoter fragment;M. DNA marker

图 3 果实特异性 E81.1 启动子 PCR 扩增

Fig. 3 PCR amplification of tomato fruit-specific E81.1 promoter



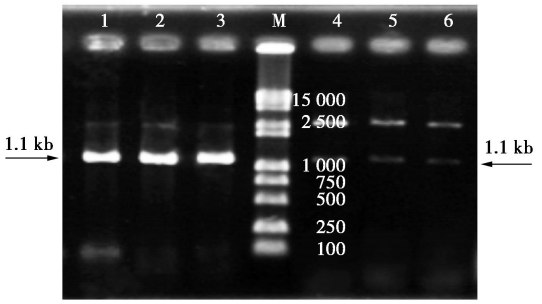
1. 对照(蓝斑);2,3,4. 滞后质粒(白斑);5,6. 假阳性质粒(白斑)
Lane 1. Comparison(blue);Lane 2,3,4. Plasmid of delay(white);
Lane 5,6. False recombinant plasmid(white)

图 4 重组子滞后质粒筛选

Fig. 4 Select recombinant of delay

2.3 重组子的筛选与鉴定

对扩增得到的预期片段采用切胶回收法回收连接到克隆载体 pMD18-T Simple Vector,导入宿主菌 *E. coli* DH5α,经蓝白斑筛选、滞后质粒鉴定(图 4)后,其重组质粒用 PCR 扩增方法(图 5 的 1,2,3 泳道)和酶切方法(*Hind* Ⅲ、*Bam* H Ⅰ双酶切,图 5 的 4,5,6 泳道)进行鉴定均得到分子大小符合的片段,说明扩增片段已成功连接于 pMD18-T Simple Vector 载体中。



1,2,3 为果实特异性 E81.1 启动子基因重组质粒 PCR 结果;
4,5,6 为果实特异性 E81.1 启动子基因重组质粒双酶切结果
Lane 1,2,3. PCR product of E81.1 promoter fragment;Lane 4,5,6. pMD18-T-E81.1/ *Hind* Ⅲ+ *Bam* H Ⅰ;M. DNA marker

图 5 果实特异性 E81.1 启动子基因重组质粒 PCR 及酶切鉴定图

Fig. 5 Identification with PCR and restriction enzymes of the recombinant plasmid containing tomato fruit-specific E81.1 promoter gene

2.4 测序及序列分析结果

含 E81.1 启动子基因的 pMD18-E8 重组质粒测序结果,经 DNAMAN 分析软件进行同源性比对,显示所获得 E81.1 启动子的 DNA 序列与目的 E81.1 启动子同源性为 99.1%。分析结果如下:

```
E8-1111  AGGAATTTCACGAAATCGGCCCTTATTCGAAAATAACTTTTAAATAATGAATTTTAAATTTTAAGAAATAATATCCAATG   80
E8.txt   ----------------------------a-----------------------------------------------------   80
E8-1111  AATAAATGACATGTAGCATTTTACCTAAATATTTCAACTATTTTAATCCAATATTAATTTGTTTTATTCCCAACAATAGA  160
E8.txt   ----------------------------------------------------------------------------------  160
E8-1111  AAGTCTTGTGCAGACATTTAATCTGACTTTTCCAGTACTAAATATTAATTTTCTGAAGATTTTCGGGTTTAGTCCACAAG  240
E8.txt   ----------------------------------------------------------------------------------  240
E8-1111  TTTTAGTGAGAAGTTTTGCTCAAA.TTTTAGGTGAGAAGGTTTGATATTTATCTTTTGTTAAATTAATTTATCTAGGTGA  319
E8.txt   ----------------------------a-----------------------------------------------------  320
E8-1111  CTATTATTTATTTAAGTAGAAATTCATATCATTACTTTTGCCAACTTGTAGTCATAATAGGAGTAGGTGTATATGATGAA  399
E8.txt   ----------------------------------------------------------------------------------  400
E8-1111  GGAATAAACAAGTTCAGTGAAGTGATTAAAATAAAATATAATTTAGGTGTACATCAAATAAAAACCTTAAAGTTTAGAAA  479
E8.txt   ----------------------------------------------------------------------------------  480
E8-1111  GGCACCGAATAATTTTGCATAGAAGATATTAGTAAATTTATAAAAATAAAAGAAATGTAGTTGTCAAGTTGTCTTCTTTT  559
E8.txt   ----------------------------------------------------------------------------------  560
E8-1111  TTTTGGATAAAAATAGCAGTTGGCTTATGTCATTCTTTTACAACCTCCATGCCACTTGTCCAATTATTGACACTTAACTA  639
E8.txt   ---c------------------------------------------------------------g-----------------  640
E8-1111  ATTAGTTTGATTCATGTATGAATACTAAATAATTTTTTAGGACTGACTCAAATATTTTTATATTATCATAGTAATATTTA  719
E8.txt   ----------------------------------------------------------------------------------  720
E8-1111  TCTAATTTTTAGGACCACTTATTACTTAATAATAAATTAACTACAACTATATTATTGTTGTGAAACAACAACGTTTTGGT  799
E8.txt   ----------------------------a-----------------t-----------------------------------c  800
E8-1111  TGTTATGATGAAACGTACACTATATCAGTATGAAAAATTCAAAACGATTAGTATAAATTATATTGAAAATTTGATATTTT  879
E8.txt   -a----------c-------------------------------------------------c-------------------  880
E8-1111  TCTATTCTTAATCAGACGTATTGGGTTTCATATTTTAAAAAGGGACTAAACTTAGAAGAGAAGTTTGTTTGAAACTACTT  959
E8.txt   ----------------------------------------------------------------------------------  960
E8-1111  TTGTCTCTTTCTTGTTCCCATTTCTCTCTTAGATTTCAAAAAGTGAACTACTTTATCTCTTTCTTTGTTCACATTTTATT 1039
E8.txt   ---------------------------------------------------------------------------------- 1040
E8-1111  TTATTCTATTATAAATATGGCATCCTCATATTGAGATTTTTAGAAATTATTCTAATCATTCACAGTGCAAAAGA        1113
E8.txt   ----------------------------------------------------------------------------------  1114
```

3 讨论

目前报道的转基因试验所用的启动子多为组成型启动子,外源基因在转基因植物中所有的发育阶段和所有的部位都能表达,外源基因在植物内持续高效的表达,往往会造成植物形态的改变,严重的则影响到植物的正常生长发育。因此,本试验中克隆了果实特异启动子 E8,其目的是使目的基因在果实

中表达,而不在其他组织、器官中表达。

E8 启动子是 Lincoln 等于 1987 年发现的番茄果实特异性启动子,它是乙烯应答性基因的启动子,Deikman 等[11-14]对其进行了系统的分析研究证实,-409～-263 bp 可控制 E8 基因在果实成熟过程中特异表达[15],-1 088～-863 bp 为 DNA 蛋白的有效结合区域,去除该区域将显著降低成熟果实中 E8 mRNA 的含量。Good 等[16]用番茄果实特异性 E8 启动子,显著提高了转基因番茄中腺苷甲硫氨酸水解(SAMase)的表达量。Krasnyanski 等[17]将 E8 启动子与报道基因 *uidA* 相连,导入番茄中;在 T_0, T_1 植株果实和叶子中分析β-葡糖醛酸糖苷酶(β-glucuron idase, GUS)活性,发现 E8 控制的 *uidA* 基因只在番茄果实里表达。Sandhu 等[18]的研究也证实了 E8 启动子具有良好的驱动外源基因表达的活性。最近,Yakoby 等[19]用 E8 启动子研究扩增促进序列(Amplification prom oting sequence, APS)对外源基因表达的影响,结果显示,APS 可以促进外源基因在果实中特异高效表达。

正是基于以上理论基础,本试验扩增了番茄果实特异性启动子 E8 基因,为实现外源基因在转基因桃子果实中特异性表达做准备。本研究自我国毛粉 802 番茄基因组 DNA 中成功扩增获得了番茄果实特异性 E81.1 启动子基因,经克隆、测序及序列同源性搜索后证实,其序列与所报道的番茄 Cherry 种的 E8 基因序列相比较,有 8 个核苷酸不同,其核苷酸的同源性为 99.1%,说明 E8 启动子区序列呈现高度保守。导致这些不同的原因大概有 2 个方面:第一,可能是 PCR 扩增时产生的错误,在 PCR 过程中变性温度、退火温度、延伸温度都会影响特异性,本试验用的是普通 Taq 酶,不像高保真酶能保证有较高的可靠性;第二,可能是同一物种不同品种之间的单核苷酸差异,研究结果表明,不同遗传型栽培番茄 E8 启动子间的核苷酸虽然存在一定差异,但相似系数均在 98%以上[20],但个别碱基的不同将不会影响 E8 基因作为果实特异性启动子的功能,以上说明,我们已获得了果实特异性启动子 E8 基因。

参考文献:

[1] Tong K Z. Gene and Its Expression(基因及其表达)[M]. Beijing: Science Press, 1998.

[2] 姚　嵘,马三梅. 植物果实的特异型启动子[J]. 生命的化学,2006,26(4):336-339.

[3] 张开春,张军科. 马哈利樱桃 PGIP 基因克隆及全序列测定[J]. 农业生物技术学报,2000,8(3):281-283.

[4] Tai T H, Tanksey D D. Rapid isolation of total DNA from dehydrated plant tissue[J]. Plant Mol Biol Rep, 1990, 8(4):229-303.

[5] Michaels S D, John M C, Amasino R M. Removal of polysaccharides from plant DNA by ethanol precipitation[J]. Biotechniques, 1994, 17(2):274-276.

[6] 巩振辉, Cecchimi E, Milner J J. 以 PCR 鉴定转基因植株的微量 DNA 提取方法[J]. 西北农业大学学报, 1997, 25(1):45-47.

[7] Theresa M F, Seven D T. Microprep protocol for extraction of DNA from tomato and other herbaceous plants[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1995, 13(3):207-209.

[8] 顾红雅. 植物分子生物学实验手册[M]. 北京:高等教育出版社,1998:3-12.

[9] 陈绍宁,崔继哲. 快速提取番茄总 DNA 应用于规模化 PCR 检测[J]. 北方园艺,2004(3):46-47.

[10] 谭晓风,漆龙霖,黄晓光,等. 山茶植物叶片 DNA 提取[J]. 中南林学院学报,1999,19(4):78-81.

[11] Deikman J, Fischer R L. Interaction of a DNA binding factor with the 5′-flanking region of an ethylene-responsive fruit ripening gene from tomato[J]. EMBOJ, 1988, 7(11):3315-3320.

[12] Deikman J, Kline R, Fischer R L. Organization of ripening and ethylene regulatory regions in a fruit-specific promoter from tomato[J]. Plant Physiol, 1992, 100:2013-2017.

[13] Cordces S, Deikman J, Margossian L J, *et al*. Interaction of a developmentally regulated DNA-binding factor with sites flanking two different fruit-ripening genes from tomato[J]. Plant Cell, 1989, 1(10):1025-1034.

[14] Coupe S A, Deikman J. Characterization of a DNA-binding protein that interacts with 5′flanking regions of two fruit-ripening genes[J]. Plant J, 1997, 11(6):1207-1218.

[15] 周晓红,陈晓光,张晓东,等. 番茄果实特异性 E8 启动子的基因克隆与序列分析[J]. 第一军医大学学报, 2003, 23(1):25-28.

[16] Good X, Kellogg J A, Wagoner W, *et al*. Reduced ethylene synthesis by transgenic tomatoes expressing S-adenosylmethionine hydrolase[J]. Plant Mol Biol, 1994, 26(3):781-790.

[17] Krasnyanski S F. In vitro cellular & developmental[J]. Biology Plant, 2001, 37(4):427-433.

[18] Sandhu J S, Krasnyanski S F, Domier L L, *et al*. Oral immunization of mice with transgenic tomato fruit expressing respiratory syncytial virus-F protein induces a systemic immune response[J]. Transgenic Res, 2000, 9(2):127-135.

[19] Yakoby N. Tobacco ribosomal DNA spacer element elevates Bowman-Birk inhibitor expression in tomato plants[J]. PIant Cell Rep, 2006, 25:573-581.

[20] 赵凌侠,金丽鑫,李柱刚,等. 番茄 E8 启动子乙烯应答元件克隆及 DNA 序列分析[J]. 园艺学报, 2004, 31:204-205.