

# 种子特异表达启动子的克隆分析及其植物表达载体的构建

朱亚兰<sup>1,2</sup>, 姚伟<sup>1,2</sup>, 窦建华<sup>1,2</sup>, 乐超银<sup>1,2</sup>, 何正权<sup>1,2</sup>,  
陈发菊<sup>1,2</sup>, 梁宏伟<sup>1,2</sup>, 梁薇<sup>1,2</sup>

(1 三峡大学 生物技术研究中心, 湖北 宜昌 443002; 2 湖北省天然产物研究与利用重点实验室, 湖北 宜昌 443002)

**摘要:** 根据 GenBank 已公布的种子特异性的 *Oleosin* 蛋白基因启动子序列设计合成引物, 利用 PCR 技术从油菜总基因组 DNA 中扩增出 *Oleosin* 基因启动子序列(SOP), 将该序列克隆到 pGM-T 载体中, 经鉴定获得 pGM-T-SOP 重组载体。测序和序列分析表明, 该启动子序列由 899 bp 核苷酸组成, 其核苷酸序列与 GenBank 中的 *Oleosin* 基因启动子序列同源性高达 95.6%。分别用限制性内切酶 *Hind* III 和 *Bam*H I 双酶切重组质粒 pGM-T-SOP 和双元植物表达载体 pBI121, 分别回收 pGM-T-SOP 重组质粒中的 SOP 小片段和 pBI121 植物表达载体中去掉 CaMV35S 组成型启动子的大片段, 经连接、转化和鉴定, 获得由 SOP 驱动报告基因 GUS 的新型植物表达载体 pBI121-SOP, 为外源基因在油菜种子中的定位表达研究奠定基础。

**关键词:** 种子特异表达启动子; 克隆; 油菜

中图分类号: Q789 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)02-0006-05

## Cloning and Analysis of Seeds Oil-body-specific Promoter from the *Brassica napus* and Construction of Plant Expression Vector

ZHU Ya-lan<sup>1,2</sup>, YAO Wei<sup>1,2</sup>, DOU Jian-hua<sup>1,2</sup>, YUE Chao-yin<sup>1,2</sup>, HE Zheng-quan<sup>1,2</sup>,  
CHEN Fa-ju<sup>1,2</sup>, LIANG Hong-wei<sup>1,2</sup>, LIANG Wei<sup>1,2</sup>

(1. Biotechnology Research Center, Three Gorges University, Yichang 443002, China;

2. Key Laboratory of Natural Products Research and Development, Yichang 443002, China)

**Abstract:** A pair of primers was designed according to the sequence of *oleosin* protein promoter, which showed seeds oil-body specificity, and a fragment of *oleosin* gene in the promoter region was amplified by polymerase chain reaction (PCR) using the genomic DNA of *Brassica napus* as template. The fragment was cloned into pGM-T vector, and a new recombinant vector named pGM-T-SOP was obtained after analyzed with PCR and restriction digestion. The results of sequence analysis indicated that this fragment had 95.6% homology compared with the reported promoter in Genbank. A new plant expression vector named pBI121-SOP in which the reporter gene GUS is driven by SOP was constructed after cutting two vectors pGM-T-SOP and pBI121 with two restriction enzymes *Hind* III and *Bam*H I, subsequently recovering the small SOP fragment from pGM-T-SOP recombinant vector and the long fragment excised CaMV35S promoter from pBI121 plant expression vector, and then ligation, transformation and identification. And then foundation has been set up for further research work in expression and function of this promoter.

**Key words:** Seeds oil-body-specific promoter; Cloning; *Brassica napus*.

油菜是重要的油料作物之一, 随着分子生物学技术的发展, 有很多利用基因工程手段提高种子的含油量和改变种子油中脂肪酸组分来增加油菜籽油的营养价值和工业利用价值的报道<sup>[1]</sup>。目前, 用于

油菜遗传转化的启动子多属组成型表达启动子如 CaMV 35S 启动子, 由于其为组成型表达, 容易对油菜的生长造成不良影响, 使得遗传改造的油菜农艺性状比较差<sup>[2,3]</sup>。种子特异表达启动子的利用, 可

收稿日期: 2007-01-20

基金项目: 湖北省教育厅项目(Q200513002); 国家“863”计划项目(2002AA241031)

作者简介: 朱亚兰(1980-), 女, 湖北宜昌人, 助教, 硕士研究生, 主要从事生物技术研究

通讯作者: 姚伟(1977-), 男, 湖北宜昌人, 副教授, 博士, 硕士生导师, 主要从事生物技术研究。

以使外源目的基因只在种子中表达,不但提高外源基因的表达效率,而且也利于表达蛋白的分离纯化,大大节约了蛋白质分离纯化的成本<sup>[4,5]</sup>。

近年来,人们相继分离和鉴定了许多种子特异表达基因的启动子,如对玉米醇溶蛋白基因 B4 启动子<sup>[6]</sup>、水稻胚乳特异性谷蛋白基因启动子<sup>[7]</sup>、大豆 7S 种子特异性启动子<sup>[8]</sup>、油菜 H165 的 napinB 启动子<sup>[9]</sup>等,但都有专利的保护。Oleosin 是高度疏水的碱性小分子量蛋白,主要在种子中特异表达。Oleosin 基因启动子可以在种子中启动 Oleosin 的表达,是一种组织特异性的启动子<sup>[10]</sup>。为了实现外源基因在油菜中的定位表达,三峡大学生物技术研究中心实验室根据 GenBank 中已登录的序列设计合成引物,从油菜中克隆了种子特异性表达的 Oleosin 基因的启动子序列 SOP,并将其构建到双价植物表达载体 pBI121 上,获得组织特异性重组植物表达载体 pBI121-SOP。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

双低油菜品种中油杂 10 号 (*Brassica napus* cv. ZYZ10) 为中国科学院油料作物研究所培育,是近年来大面积推广的栽培品种;Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 连接酶、DNA Marker、pGM-T Vector 均购自大连宝生物公司;凝胶回收试剂盒及其他生化试剂购自上海生工生物工程公司;DH5 $\alpha$  及双元植物表达载体 pBI121 为三峡大学生物技术实验室保存。

### 1.2 方法

1.2.1 油菜总基因组 DNA 的提取 称取 200 mg 幼嫩油菜叶片,参照 CTAB 提取方法<sup>[10]</sup>,并稍加改进,分离油菜总基因组 DNA。

1.2.2 引物设计与合成 根据 GenBank 数据库已公布的 *Brassica juncea* Oleosin 基因序列(登录号为 AF134411)设计合成 2 条引物,同时,在引物的 5' 端引入 Hind III 和 Bam HI 酶切位点,并增加 3 个保护碱基:

SOP-F: 5'-ATTCAAGCTTTTCAACGTGGTCGGATCA-3' (加横线者为 Hind III 酶切位点)

SOP-R: 5'-TGTCGGATCCAATTGAGAGATCGAA-3' (加横线者为 Bam HI 酶切位点)

1.2.3 PCR 及扩增产物的纯化 反应体系 25  $\mu$ L: 2.5  $\mu$ L MgCl<sub>2</sub> (25 mmol/L), 2.5  $\mu$ L 10 $\times$  buffer, 2  $\mu$ L dNTP (2.5 mmol/L), 1  $\mu$ L Taq 酶 (2.5 U/ $\mu$ L), 0.5  $\mu$ L SOP-F, 0.5  $\mu$ L SOP-R, 1  $\mu$ L 模板,用 ddH<sub>2</sub>O 补足到 25

$\mu$ L。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 3 min; 52 $^{\circ}$ C 退火 45 s; 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s; 共进行 35 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂凝胶电泳,回收目的 DNA 片段。

1.2.4 序列的克隆 按照 pGM-T 载体试剂盒的说明,将纯化回收的 PCR 产物与 pGM-T 载体连接,命名为 T-SOP,转化 DH5 $\alpha$  感受态细胞,涂布在含有 XGal, IPTG 和氨苄青霉素 (100  $\mu$ g/mL) 的 LB 培养基平板上,37 $^{\circ}$ C 培养 16~20 h,经蓝白斑选择、PCR 和酶切鉴定筛选阳性克隆<sup>[11]</sup>。

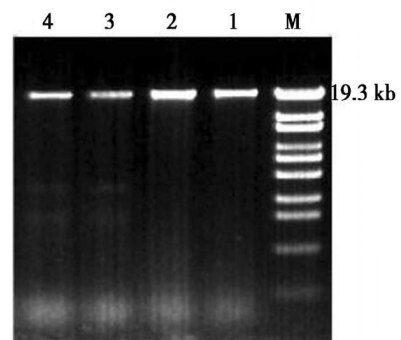
1.2.5 序列测定与分析 将鉴定为阳性菌液送至上海生工生物工程有限公司进行测序,利用 OMIGA 2.0, DNAMAN, BLAST 软件进行序列分析和序列同源性比较。

1.2.6 pBI121-SOP 植物表达载体的构建 用限制性内切酶 Hind III 和 Bam HI 双酶切重组质粒 pGM-T-SOP 和双元植物表达载体 pBI121,分别回收 pGM-T-SOP 重组质粒中的 SOP 小片段和 pBI121 的大片段,经 T4 DNA 连接酶连接后转化 DH5 $\alpha$ 。用 PCR 检测阳性菌液,引物及体系同 1.2.3。

## 2 结果与分析

### 2.1 油菜基因组 DNA 的提取

剪取油菜幼苗叶片,用改进的 CTAB 微量提取法,提取的油菜总基因组 DNA,电泳结果表明,提取的 DNA 呈单一条带,纯度高,可以用于 PCR 扩增 (图 1)。



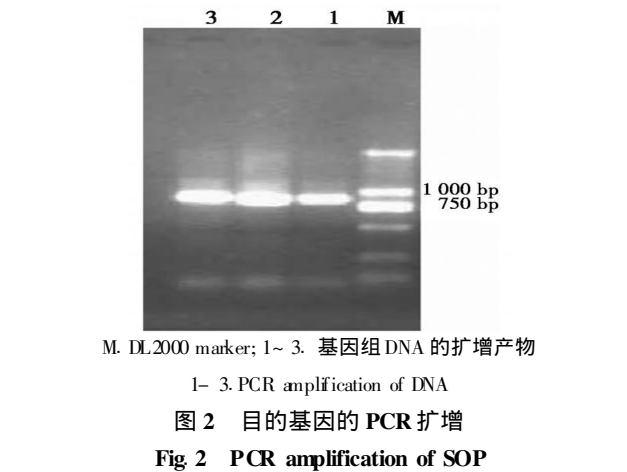
M. Marker; 1~4. 油菜基因组 DNA  
M. Marker; 1~4 Genome DNA of *Brassica napus*

图 1 油菜总基因组 DNA

Fig 1 Genome DNA of *Brassica napus*

### 2.2 PCR 扩增和目的基因回收

以油菜基因组 DNA 为模板, SOP-F 和 SOP-R 为引物进行 PCR 扩增。结果如图 2 所示,扩增获得 1 条大小约 900 bp 的片段,和预期大小一致。回收纯化 PCR 产物,核酸蛋白测定仪测定其浓度为 50 ng/ $\mu$ L,可用于下一步的连接和转化。



2.3 克隆、重组子鉴定

将回收的目的片段连接到 pGM-T 载体后, 转化至 DH5 $\alpha$ , 随机选取 6 个转化后的白色菌落, 用 PCR 方法鉴定阳性克隆。结果如图 3 所示, 6 个都能扩增出 1 条大小约 900 bp 的条带, 而空白对照组没有条带出现。

选取其中一份呈阳性菌液, 提取质粒 DNA, 命名为 T-SOP。用 *Hind* II 和 *Bam*HI 进行双酶切。结果如图 4, 可以切下 1 条大小约 900 bp 的片段, 证明 PCR 产物已成功连接至 T 载体中。

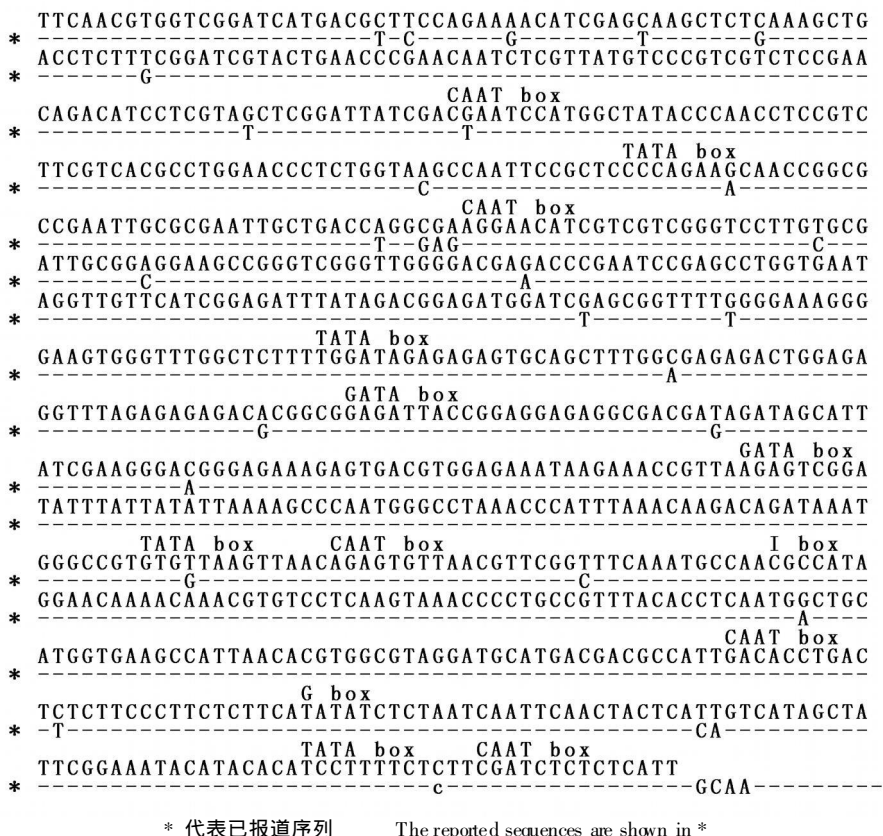
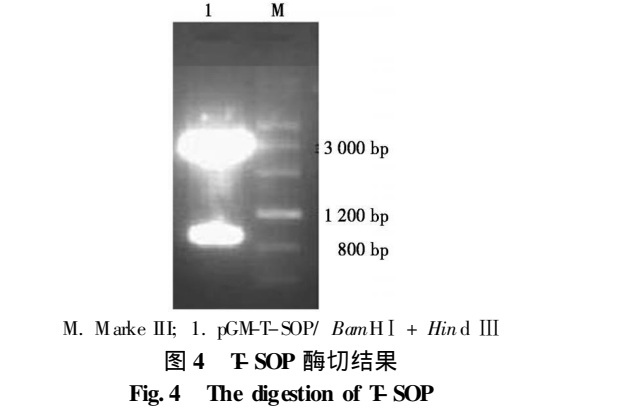
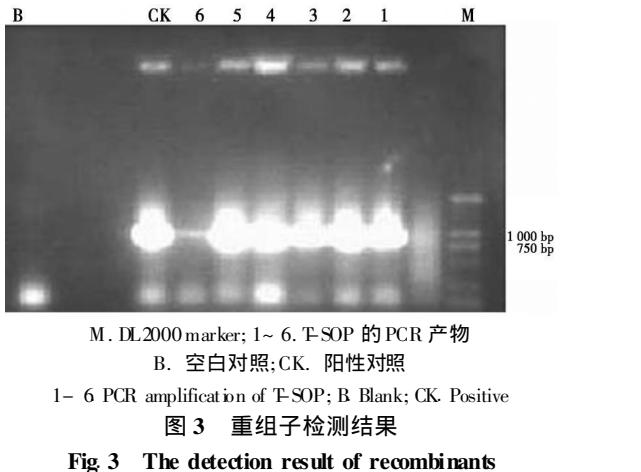


图 5 油菜 (*Brassica napus* cv. ZYZ10) 中油体蛋白启动子序列和已报道序列的比较

Fig. 5 Comparison of the sequences between the oleosin promoter from *Brassia napus* and the sequence reported

2.4 插入序列的测定与分析

以RV-M 和M13-47 引物,在 ABI PRISM™ 377XL 型 DNA 测序仪上对 T-SOP 质粒中的插入片段进行测序,结果表明,该片段由 899 bp 核苷酸组成。在 NCBI 中运用 BLAST 进行比较,表明该序列与 GenBank 数据库已公布的 *Brassica juncea* Oleosin 序列的同源性为 95.6%。运用 DNAMAN 软件进行序列分析,表明该片段含有 4 个 TATA 序列保守区,主要功能能保证转录得以精确起始;含有 5 个 CAAT box 和

3 个 GATA box,它也是启动子必须的顺式作用元件,调控着转录的起始频率<sup>[12]</sup>。另外序列中存在着 1 个 G box(CACGTG),主要是作为生长素、水份和温度的应答元件<sup>[13,14]</sup>,1 个 I box(GATAA),主要是作为光调控的应答元件<sup>[15]</sup>。

由图 5 可以看出,该序列片段不仅含有启动子所必须的几个保守性片段外,还含有诱导型和组织特异型启动子的一些特有序列,与已报道的序列基本相同。

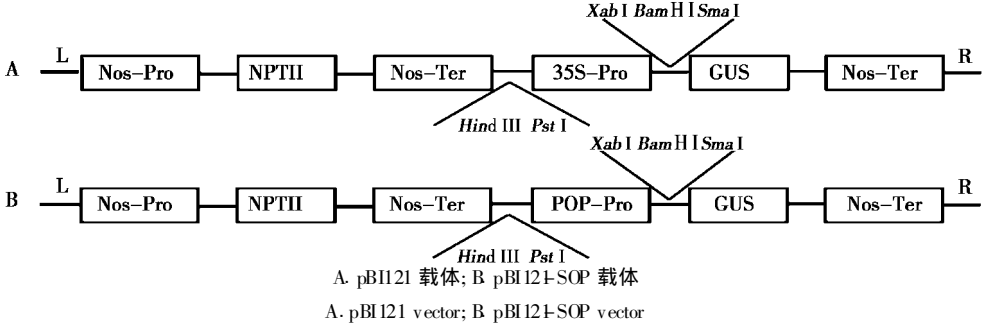
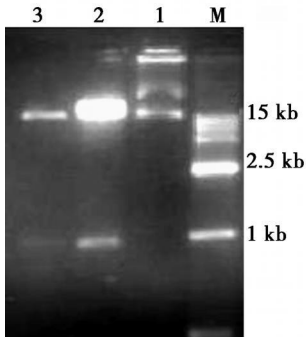
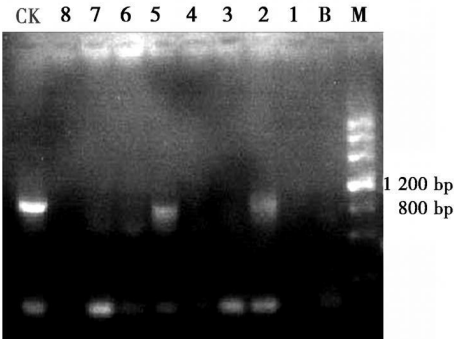


图 6 载体示意图  
Fig. 6 Map of the vectors



M. D15000; 1. pBI121; 2, 3. pBI121/ *Hind* III and *Bam*HI  
图 7 pBI121 酶切结果

Fig. 7 The digestion of pBI121



M. D2000 marker; 1~ 6 pBI121-SOP 的 PCR 产物;  
B. 空白对照; CK. T-SOP 的 PCR 产物  
1~ 6. PCR amplification of PBI121-SOP; B. Blank;  
CK. PCR amplification of T-SOP

图 8 pBI121-SOP 的 PCR 检测结果

Fig. 8 PCR amplification of pBI121-SOP

2.5 pBI121-SOP 植物表达载体的构建

植物表达载体 pBI121 中, 35S 启动子驱动 GUS 基因(图 6A)。用 *Hind* III/*Bam*H I 酶切切去 35S

启动子后(图 7),在 T4 DNA 连接酶作用下与 T-SOP 中切下的 SOP 序列连接然后转化 DH5 $\alpha$ , 对转化子进行 PCR 检测,电泳结果见图 8,其中 3, 6 号菌液扩增出与目的片段大小相一致的特异条带,证明 SOP 启动子已经成功取代 35S 启动子,构建成新植物表达载体 pBI121-SOP(图 6B)。

3 讨论

高等植物启动子区域存在各种特征元件,通过同 RNA 聚合酶识别、结合,诱导转录过程。在真核生物中已鉴定了多种特定的启动子序列,常常在基因转录起始位点 5' 近端的核苷酸序列上游区域。本研究所克隆的油菜种子特异表达启动子 SOP 全长 899 bp,其中 A+ T 含量占 55.3%,经 PLACE 数据库的查询和序列分析软件的分析,发现启动子序列含有 4 个 TATA box,5 个 CAAT box,3 个 GATA box,1 个 I box 和 1 个 G box 等多种顺式作用元件。其中 GATA box 在植物受光和硝酸盐诱导的转录调控中发挥重要作用,为高水平的组织特异性表达所必需<sup>[12]</sup>;G box 是植物中通用的受信号(光、激素、厌氧等)诱导的顺式作用元件,也是到目前为止研究得最清楚的植物转录元件<sup>[13,14]</sup>;I box 是单子叶和双子叶植物中很多光调控基因启动子所具有的、带有重要功能的调控元件<sup>[15]</sup>。

利用外源基因与植物的特异调控基因融合表达,使外源基因在植物中的表达具有器官或组织特

异性,可大大提高外源基因的表达量。油体蛋白启动子是油菜种子特异性表达启动子,据报道,油体蛋白启动子具有良好的驱动外源基因组织特异性表达的启动子活性。本试验成功获得了SOP启动子序列,为进一步将外源基因导入油菜植株,实现油菜种子特异性表达、提高表达水平以改良油料作物的品质或增加其经济附加值奠定了基础。

## 参考文献:

- [1] Voelker T A, Worrell A C, Anderson L, *et al.* Fatty acid biosynthesis redirected to medium chain in transgenic oilseed plants [J]. *Science*, 1992, 257(5066): 71– 74.
- [2] 熊兴华,官春云,李 桐,等. 基因枪法向甘蓝型油菜转移反义FAD2基因的研究[J]. *湖南农业大学学报*, 2003, 29(3): 188– 191.
- [3] 林宝刚,张明龙,张 龙,等. 甘蓝型油菜杂种优势和过氧化物酶的关系分析[J]. *华北农学报*, 2005, 20(4): 36– 39.
- [4] Tony W, Jori S, Alexander D, *et al.* Oleosin expression and trafficking during oil body biogenesis in tobacco leaf cells [J]. *Genesis*, 2003, 35(2): 125– 132.
- [5] 岳东霞,金 红,周良炎,等. 外源类甜蛋白基因在马铃薯中的表达[J]. *华北农学报*, 2000, 15(1): 12– 16.
- [6] Vasconcelos M. Enhanced iron and zinc accumulation in transgenic rice with the ferritin gene [J]. *Plant Science*, 2003, 164(48): 371– 375.
- [7] Datta K, Baisakh N, Oliva N, *et al.* Bioengineered golden indica rice cultivars with  $\beta$ -carotene metabolism in the endosperm with hygromycin and mannose selection systems [J]. *Plant Biotech J*, 2003, 1(2): 81– 84.
- [8] Zhang J, Li L, Sun Y, *et al.* Identification of seed-specific promoter nap300 and its comparison with 7S<sub>1</sub> promoter [J]. *Progress in Natural Science*, 2002, 12(10): 737– 740.
- [9] Ye L, Li C, Sun Y R, *et al.* Construction of plant seed-specific expression vectors pSCB and pSCAB and the obtainment of transgenic *Brassica napus* H165 expressing poly-3-hydroxybutyrate synthetic genes [J]. *Chinese Science Bulletin*, 2000, 45(13): 1206– 1209.
- [10] 姚 伟,耿广良,余爱丽,等. 一种改良的转基因甘蔗基因组DNA提取方法[J]. *热带亚热带植物学报*, 2004, 12(3): 257– 260.
- [11] 姚 伟,周 会,徐景升,等. 质粒DNA小量提取法的改进[J]. *应用与环境生物学报*, 2005, 11(6): 776– 778.
- [12] Reyes J C, Pastor M I, Florencio F J. The GATA family of transcription factors in *Arabidopsis* and rice [J]. *Plant Physiol*, 2004, 134(4): 1718– 1732.
- [13] Staiger D, Kaulen H, Schell J. A CACGTG motif of the *antirrhinum* major chalcone synthase promoter is recognized by an evolutionarily conserved nuclear protein [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, 86(18): 6930– 6934.
- [14] Menkens A N E, Schindler U, Cashmore A R. The G box: a ubiquitous regulatory DNA element in plants bound by the GBF family of bZIP proteins [J]. *Trends Biochem Science*, 1995, 20(12): 506– 510.
- [15] William B T, Anthony R C. Light regulated transcription [J]. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1995, 46: 445– 474.