

玉米叶绿体表达载体构建及绿色荧光蛋白基因瞬时表达检测

赵彤^{1,2}, 黄丛林¹, 张秀海¹, 于荣², 王永勤¹, 吴忠义¹

(1. 北京市农林科学院 北京农业生物技术研究中心, 北京 100097; 2. 首都师范大学 生命科学学院, 北京 100037)

摘要: Tps1 是生物保护物质海藻糖的关键合酶基因。构建含 Tps1 的玉米叶绿体表达载体, 首先从玉米叶绿体基因组中克隆 16S/ trnI2trnA/ 23S 片段, 作为定点整合同源片段; 然后将编码酵母海藻糖合酶基因 Tps1 表达盒(Prrn2Tps12TpsbA2ter)、草丁膦抗性基因 Bar 表达盒(RpsbApr2Bar2RpsbAter)、卡那霉素抗性基因 Npt II 和绿色荧光蛋白基因 Gfp 构建的融和基因表达盒(Prrn2Npt II/ Gfp2Rrbclter)一起克隆到定点整合同源片段之间, 构建了玉米叶绿体的稳定表达载体 mTKGB。通过基因枪轰击法将 mTKGB 转化到玉米幼嫩叶片中, 培养 2 d 后, 在激光扫描共聚焦显微镜下观测到玉米一些细胞的叶绿体中有很强的 GFP 绿色荧光, 结果表明构建的载体可在玉米叶绿体中表达。

关键词: 玉米; 叶绿体表达载体; 瞬时表达; GFP 荧光

中图分类号: Q786 文献标识码: A 文章编号: 1000- 7091(2008) 04- 0072- 05

Construction of Maize Chloroplast Expression Vector and Transient Expression in Maize Chloroplasts by Detecting GFP

ZHAO Tong^{1,2}, HUANG Conglin¹, ZHANG Xiu2hai¹, YU Rong², WANG Yong2qin¹, WU Zhong2yi¹

(1. Beijing Research Center of Agro2Biotechnology, Beijing Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Beijing 100097, China; 2. College of Life Science, Capital Normal University, Beijing 100037, China)

Abstract: Tps1 encodes a key enzyme in trehalose synthesis1Maize chloroplast expression vector harboring the yeast Tps1 is constructed in this paper1Firstly, the homologous fragment 16S/ trnI2trnA/ 23S was amplified from maize chloro2plast genome by PCR for site2specific integration. Secondly, the yeast Tps1 cassette (Prrn2Tps12TpsbA2ter), phos2phinothricin2resistant gene Bar cassette(RpsbApr2Bar2RpsbAter) and Npt / Gfp cassette consisting of kanamycin2resistant gene Npt and green fluorescent protein gene Gfp (Prrn2Npt/ Gfp2Rrbclter) were constructed respectively1 Finally, the three expression cassettes were cloned into the homologous fragment to obtain chloroplast stable expression vector mTKGB. Then mTKGB was introduced into young leaves of maize through particle bombardment1Two days later, strong green fluorescence was observed in the chloroplasts of some bombarded leaves under confocal laser scanning microscope, indicating that mTKGB could be expressed in maize chloroplasts1The results of this paper provide a strong foundation for genetic engineering drought2resistant maize through chloroplast transformation in the future.

Key words: Maize; Chloroplast expression vector; Transient expression; GFP

玉米是人类重要的粮食作物, 但在我国, 干旱、半干旱耕地面积约占总耕地面积的 51%。玉米是需水量较大、对水分胁迫很敏感的旱地作物, 干旱是影响玉米产量的重要原因之一。在水分匮乏的环境里, 玉米常通过部分或全部保护生命的方式, 即减少

叶面积、抑制代谢作用等继续存活, 而此类存活机制又以牺牲产量为代价。因此, 利用基因工程的方法对培育耐旱玉米具有重要的现实意义。

叶绿体基因工程因其具有传统核转化所不具备的独特魅力已经成为植物基因工程领域研究的热

收稿日期: 2008- 03- 31

基金项目: 北京市自然科学基金项目(5062012); 国家自然科学基金项目(30400228, 30600318)

作者简介: 赵彤(1982-), 女, 北京人, 在读硕士, 主要从事植物分子生物学的研究。

通讯作者: 吴忠义(1969-), 男, 福建德化人, 副研究员, 主要从事植物分子生物学的研究。

点, 叶绿体基因工程的优点主要是高效表达外源基因^[1]; 环境安全性好, 因为叶绿体大多数为母系遗传, 导入的外源基因不随花粉传播^[2]; 还未见基因沉默现象的报道^[3]等。迄今为止, 在叶绿体中成功实现外源基因稳定表达的植物有烟草^[4,5]、马铃薯^[6]、西红柿^[7]、油菜^[8]、胡萝卜^[9]、棉花^[10]、水稻^[11]等。其中在烟草中, 已经有超过 40 种基因插入并在叶绿体基因组中稳定表达, 它们利用叶绿体基因工程实现了改良农学性状(例如: 转入耐旱相关基因酵母海藻糖合酶 *Tps1* 基因、抗虫相关基因 *cry2Aa2*)、高效表达疫苗抗原(例如: 霍乱毒素 B 亚基抗原、炭疽热保护性抗原)和生物医用蛋白(例如: 胰岛素类似生长因子、人血清蛋白)的作用。在质体中使用 *Gfp* 作为质体表达的报告基因, 实现 *Gfp* 瞬时表达的报道有: 拟南芥和烟草的叶片、马铃薯的块茎、万寿菊的花瓣、胡萝卜的根部、胡椒的果实等^[12]。但禾本科植物中的叶绿体转化还少有报道。

海藻糖是一种天然非特异的生物保护物质, 具有抗脱水、抗冷冻、抗高渗的作用。酵母基因 *Tps1*, 它所编码的 α 磷酸海藻糖合酶以 UDP2 葡萄糖为底物, 而 UDP2 葡萄糖在植物细胞中广泛存在, 这就成为将 *Tps1* 基因转化植物获得抗逆植株的依据。叶绿体转基因同源重组的效率主要依靠定点整合同源片段的长度和同源性^[13], 两段同源片段每段增长到 2 kb 时, 可以提高同源重组的效率, 因此, 本研究克隆玉米叶绿体基因组 16S2trnI2trnA23S 片段作为定点整合的同源片段, 构建含耐旱相关基因 *Tps1* 的玉米叶绿体表达载体, 并利用 GFP 荧光观测其在玉米叶绿体的瞬时表达。

1 材料和方法

111 植物材料

供试玉米种子(京玉 7 号)为大北农金色农华提供。

112 质粒及菌株

质粒 *ptgc* 含本试验所需启动子和终止子、质粒 TPS 含酵母海藻糖合酶基因 *Tps1*、大肠杆菌菌株 DH5A 由北京农林科学院生物技术研究中心保存。

113 主要试剂

所有内切酶、T4 连接酶、Taq 酶、DNA 补平试剂盒(DNA Blunting kit)、CIAP 碱性磷酸酶都购自 Takara 公司。

114 方法

11411 玉米叶绿体基因组 16S/ trnI2trnA/ 23S 片段的克隆 用改进的高盐低 pH 法^[14]从玉米叶片提取

叶绿体 DNA, 以玉米叶绿体 DNA 为模板扩增叶绿体基因组中的 16S/ trnI2trnA/ 23S 片段作为定点整合外源基因的叶绿体同源片段, 其中引物是根据 NCBI 上玉米叶绿体基因组序列(AY928077)设计的(上游引物为 CAC TCT GCT GGG CCG ACA CTG ACA A, 下游引物为 CAC TGG CCG ACC TTG ACC CCT GTT), 先克隆到 pGEM2T 载体上测序确认后, 再克隆到质粒 PUC119 上, 命名为 m216S23S。

11412 玉米叶绿体表达载体的构建 通过 PCR 的方法, 从本实验室保存的 *ptgc* 载体上获得相应的启动子和终止子。启动子分别是来自水稻叶绿体基因 16S rRNA 的强启动子 *Prm* 和 *RpsbA2pro* (*psbA* 基因的 5'端调控序列), 终止子分别来自水稻叶绿体基因的 *Rrbdl2er* (*rbdL* 基因的 3'端调控序列)和 *RpsbA2tr* (*psbA* 的基因 3'端调控序列)以及烟草叶绿体基因的 *TpsbA2tr* (*psbA* 基因的 3'端调控序列)。

构建含有卡那霉素抗性基因 *Npt* (新霉素磷酸转移酶)和 *Gfp* (绿色荧光蛋白基因)融合基因的表达盒。首先通过合成引物的方法引入噬菌体 T7 *genel0* 5'UTR 序列, 用重叠延伸 PCR 法^[15]将该序列连接到去除终止密码子的 *Npt* 基因前, 将该片段与母体载体 PUC119 连接, 得到的质粒命名为 *g10kan2119*。然后通过 PCR 扩增得到去除起始密码子的 *Gfp* 基因, 再与质粒 *g10kan2119* 连接, 得到的质粒命名为 *gkg*。接着在基因 *Npt* 和 *Gfp* 基因之间通过合成引物的方法插入编码 16 个氨基酸(ELVEG KLELV EGLKVA)的基因序列, 得到的质粒命名为 *gk16g*。将质粒 *gk16g* 酶切后, 回收小片段(包括 *g10/Npt/16mr/Gfp* 的片段)与含有叶绿体启动子 *Prm* 和终止子 *Rrbdl2er* 的 PUC119 载体相连, 得到中间载体 *P2gk16g2RRT*。

构建含基因 *Tps1* 的表达盒。从 TPS 质粒中通过 PCR 的方法得到 *Tps1* 基因片段, 然后与含启动子 *Prm* 和终止子 *TpsbA2tr* 的 PUC119 载体平末端相连, 得到的中间载体命名为 *P2Tps12TPT*。

构建含草丁膦抗性基因 *Bar* (膦丝菌素乙酰转移酶)的表达盒, 设计合成带有合适酶切位点的引物, 通过 PCR 从含有目的基因的载体上得到 *Bar* 基因, 再通过酶切, 最后与含叶绿体启动子 *RpsbA2pro* 和终止子 *RpsbA2tr* 的 PUC119 载体相连, 得到中间载体命名为 *RPP2Bar2RPT*。

最后将含有海藻糖合酶基因 *Tps1* 的表达盒, 含有卡那霉素抗性基因 *Npt* 和 *Gfp* 的融合基因表达盒, 含有草丁膦抗性基因 *Bar* 的表达盒, 连接到玉米叶绿体同源片段 16S/ trnI2trnA/ 23S 之间, 得到的玉

米叶绿体表达载体命名为 mTKGB(图 1), 最后经过测序加以验证。以上试验中质粒 DNA 提取、酶切、连接、转化以及感受态大肠杆菌的制备等参照 5 分子克隆实验指南 6 介绍的方法进行^[16]。

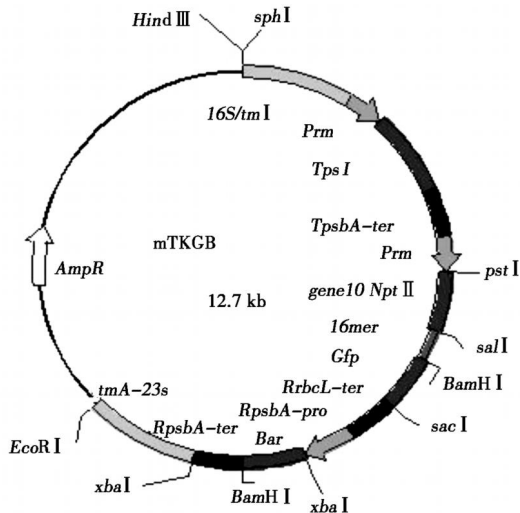


图 1 玉米叶绿体表达载体 mTKGB 的质粒图谱

Fig. 1 Plasmid map of maize chloroplast expression vector mTKGB

11413 基因枪轰击法将质粒 mTKGB 转入玉米叶片 把玉米种子用 20% 的次氯酸钠消毒 30 min, 洗净后, 用水浸泡 12 h, 然后将其种到草碳土 B 蛭石 = 1B1 的营养土中, 在 25 e 温室生长约 8 d, 获得两叶期的幼嫩玉米植株。将玉米植株连根拔出用蒸馏水洗净后, 第一片叶作为基因枪转化的受体材料, 用 BiO Rad 公司的 PSD1000/He 基因枪轰击玉米叶片的正面。轰击参数: 质粒 DNA (1 Ig/LL), 金粉直径为 110 Im, 轰击压力为 1 200 psi, 金粉为 500 Ig/枪, 质粒 DNA 为 0183 Ig/枪, 轰击距离为 9 cm, 每片叶子轰击 1 次。轰击后的玉米植株根部放入水中以保持叶片水势, 在弱光下培养 2 d 用于后续试验。

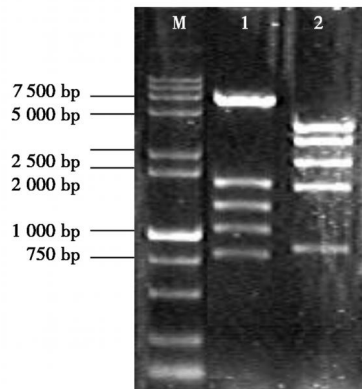
11414 激光共聚焦扫描显微镜观察 以没有转化玉米叶绿体表达载体 mTKGB 的玉米叶片作为空白对照, 研究基因枪轰击 mTKGB 后的玉米叶片的 GFP 表达情况。将空白对照叶片和基因枪轰击 mTKGB 后培养 2 d 的玉米叶片分别剪下, 置于载玻片上, 移至激光共聚焦扫描显微镜下观察 (Leica TCS2Sp2 型), 激发光波长为 488 和 568 nm, 分别通过 FITC 滤镜和 TRITC 滤镜收集绿色荧光和红色荧光。将分别收集到的绿色荧光和红色荧光图片转入 Adobe Photo2 toshop 软件, 同时进行叠加。

2 结果与分析

211 叶绿体表达载体的构建和鉴定

对构建嵌合 TpsI、Npt2Gfp、Bar 基因的叶绿体

表达载体 mTKGB 进行多重酶切鉴定, 均得到预期大小的片段(图 2), 然后经过测序及比对验证 DNA 序列没有发生变化(测序结果略), 表明重组质粒是正确的, 可用于后续基因转化工作。



M: DL2000+ DL15000 marker; 1: 质粒 mTKGB 经 Pst I/Sal I 双酶切; 2: 质粒 mTKGB 经 Xba I/Hin d III 双酶切。

M: DL2000+ DL15000 marker; 1: Plasmid mTKGB digested by Pst I and Sal I; 2: Plasmid mTKGB by Xba I and Hin d III.

图 2 玉米叶绿体表达载体 mTKGB 酶切鉴定电泳图谱

Fig. 2 Digestion of maize chloroplast expression vector mTKGB with restricted enzymes

212 激光共聚焦扫描显微镜下观察 GFP 在玉米叶片中的瞬时表达

基因枪转化玉米叶片后, 用激光共聚焦扫描显微镜对培养 2 d 后的幼嫩叶片进行观察。以没有进行转化质粒 mTKGB 的玉米叶片作为空白对照, 用波长为 488 nm 的激发光激发, 通过 FITC 滤光器收集绿色荧光(图 32D), 只看到一些微弱的绿色荧光; 用波长为 568 nm 的激发光激发, 通过 TRITC 滤光器收集的红色荧光(图 32E), 这是叶绿体中叶绿素的自发红色荧光, 可看到呈现椭圆型的叶绿体; 将绿色荧光和红色荧光转入 Adobe Photoshop 软件进行叠加, 可以观察到虽然有少量的微弱绿色荧光, 但都不与红色荧光重叠, 而是位于相邻两个细胞间或类似在细胞壁的部分(图 32F)。而转化了玉米叶绿体表达载体 mTKGB 的叶片, 用波长为 488 nm 的激发光激发, 通过 FITC 滤光器收集绿色荧光, 进行逐层扫描时, 可观察到在众多不发绿色荧光的细胞团中有 2~3 个玉米叶肉细胞有绿色荧光, 并且这些细胞中的每个细胞在该扫描层面上几乎所有椭圆形细胞器都发出绿色荧光(图 32A, 箭头 a); 在相同层面上用波长为 568 nm 的激发光激发, 通过 TRITC 滤光器收集红色荧光, 可观察到玉米叶肉细胞的椭圆形叶绿体为红色(图 32B); 将分别收集到的绿色荧光和红色荧光图片转入 Adobe Photoshop 软件进行叠加, 可观察到在一些发出红色荧光的细胞团中有 2~3 个相邻的细胞团为黄色(图 32C, 箭头 a), 黄色部分表

明叶绿体中绿色荧光和红色荧光进行很好的重叠, 而黄色细胞团周围存在若干只发出红色荧光的细胞团(图 3C, 箭头 b), 这说明图 3A 箭头 a 所指的绿色荧光不是叶绿体的自发荧光, 证明了转化 mTKGB 的玉米叶片中 GFP 在叶绿体中进行很好的表达。对该区域继续进行多层扫描时, 观察到即使是同一

个细胞但由于层面不一样, 其他层面的叶绿体绿色荧光会逐渐减弱到没有。图 3C 中还可观察到相邻两个细胞间有部分绿色荧光, 这些绿色荧光并没有与叶片的红色荧光重叠, 推测可能是玉米叶片中的一些自发绿色荧光, 因为我们在未转化的玉米叶片中也观察到类似现象。

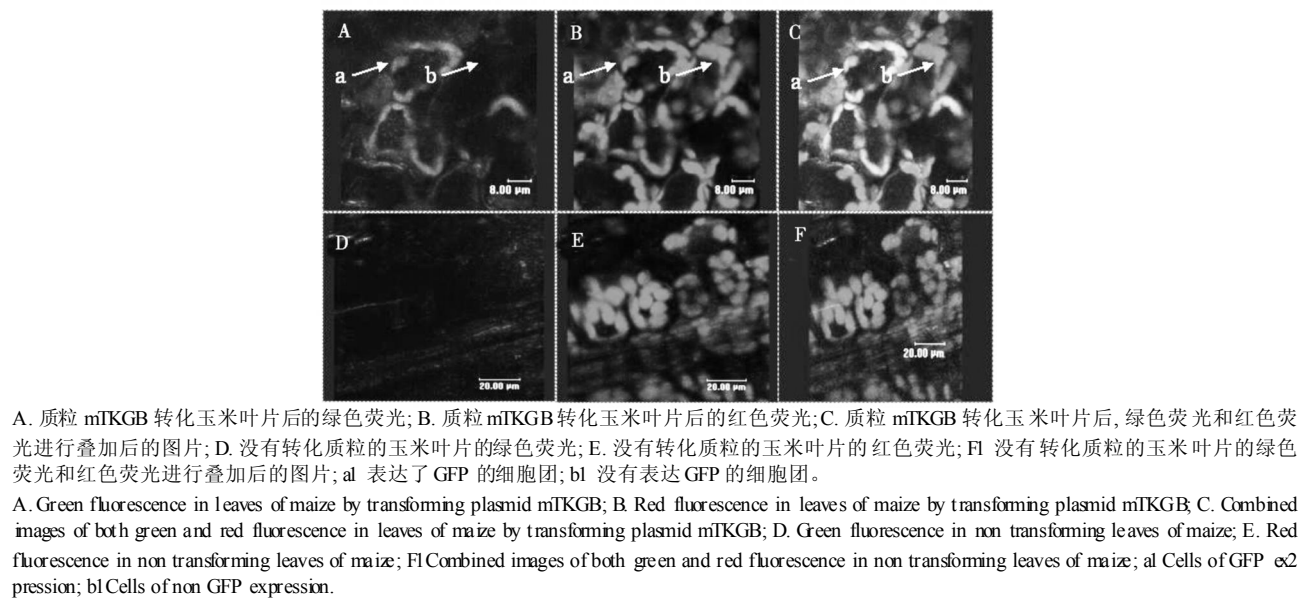


图 3 激光共聚焦扫描显微镜下玉米叶片中的绿色荧光和红色荧光

Fig. 3 Observation green and red fluorescence of maize leaves under confocal laser scanning microscope

3 讨论

基因枪法将叶绿体表达载体 mTKGB 转化玉米 2 d 后, 用扫描共聚焦显微镜进行逐层扫描观察转化后的幼嫩玉米叶片, 观测到叶片中有些细胞叶绿体中有很好的 GFP 表达。在不发绿色荧光的细胞团中有 2~ 3 个玉米叶肉细胞的叶绿体发出了 GFP 绿色荧光, 并且在该层面上表达了 GFP 的细胞中几乎所有叶绿体都有 GFP 荧光。对该区域继续逐层扫描时, 可以观测到即使是同一个细胞, 但在别的层面的叶绿体的绿色荧光逐渐变浅, 直到没有。这说明很可能由于包裹着质粒的金粉在此处正好轰击到多个玉米细胞的多个叶绿体中, 从而使 Gfp 基因转录, 表达了 GFP 荧光蛋白, 而在别的层面上, 即使是相同的细胞, 可能由于基因枪的轰击距离和强度等的细微差别, 而没有使 Gfp 在该层面的叶绿体表达, 因此, 研究基因枪的轰击距离和强度是提高叶绿体转化效率的重要途径。

玉米叶绿体表达载体 mTKGB 是为在玉米叶绿体中稳定表达而构建的, 因此包括卡那霉素抗性的筛选标记基因 Npt 和标记基因 Gfp 的融合基因, 除草剂草丁膦抗性的筛选标记基因 Bar, 还包括耐旱相关基因酵母海藻糖合酶基因 Tps1; 以及用于定点

整合外源基因的玉米叶绿体同源片段 16S/ tml2r2 nA/ 23S。尽管 Daniell 等^[17]在 1998 年就提出来自于叶绿体基因的 trnI 和 trnA 序列在各种植物中具有很高的同源性, 所以可以作为定点整合外源基因的叶绿体同源片段转化多种植物, 但试验证明烟草叶绿体基因片段作为叶绿体定点整合的同源片段所构建的烟草叶绿体表达载体转化马铃薯和西红栻植株虽然得到转基因植株, 但转化的效率远远低于转化烟草植株的效率^[6, 7]。所以, 本试验克隆玉米叶绿体基因 16S2ml2r2nA23S 对于更有效地将外源基因同源重组到玉米叶绿体基因组中创造了条件。融合基因 Npt2Gfp 来自水稻叶绿体基因 16S rRNA 的强启动子 Prm 启动, 该启动子是国内外实验室通用的叶绿体转基因的启动子^[10, 11], 研究证明来自水稻的叶绿体强启动子可以用于玉米叶绿体基因的转录, 由于酵母海藻糖合酶基因 Tps1 同样使用了该启动子, 推测该启动子在稳定转化玉米叶绿体时可启动 Tps1 基因进行很好的转录。构建表达载体时, 还在启动子 Prm 后面加了来自噬菌体 T7 genel0 52 UTR, Kumar 等^[9]在构建叶绿体表达载体时加入该段序列转化胡萝卜, 证明该序列有利于提高基因在叶绿体中的表达水平, 并且有利于基因在植物的绿色和非绿色组织中的表达, 本试验证明了噬菌体 T7

genel0 5'UTR 序列作为原核表达系统的核糖体结合序列适用于玉米叶绿体中基因的表达。另外,在融合基因 Npt2Gfp 之间加了 16 个氨基酸的基因间隔序列,保证了 NPT 和 GFP 各自均能进行正确的折叠^[11]。试验结果表明,玉米叶片中 Gfp 融合基因的瞬时表达很好,所以在稳定转化玉米叶绿体时,也可将 GFP 作为筛选转基因植株的辅助标记。在叶绿体基因工程中,由于每个细胞中的叶绿体基因组拷贝数较多,一方面可以使转入的基因高效表达,但另一方面增加了通过抗性筛选得到同质化转基因植株的难度,因为在嵌合了野生型和转基因型的叶绿体基因组植株中,由于转基因叶绿体抗性基因的表达遮蔽了野生型叶绿体,使其没有因为抗性筛选而被淘汰,必须经过多轮的较长时间抗性筛选,并且通过 PCR 或者 Southern 验证,才能最后确定转基因植株是否达到同质化^[11]。所以可以利用 GFP 荧光直接观测叶绿体转基因株系是否达到同质化,以节省 Southern 验证的时间。总之,玉米叶绿体表达载体 mTKGB 可用于玉米叶绿体瞬时表达,这为今后在玉米叶绿体中稳定表达该载体,得到耐旱玉米叶绿体转基因新品种奠定了基础。

参考文献:

[1] De Cosa B, Moar W, Lee S B, et al. Overexpression of the Bt cry2Aa2 operon in chloroplasts leads to formation of insecticidal crystals[J]. Nature Biotechnology, 2001, 19(1): 71- 74.

[2] Scott S E, Wilkinsen M J. Low probability of chloroplast movement from oilseed rape(Brassica napus) into wild Brassica rapa [J]. Nature Biotechnology, 1999, 17(4): 390- 392.

[3] Daniell H, Khan M S, Allison L. Milestones in chloroplast genetic engineering: an environmentally friendly era in biotechnology [J]. Trends in Plant Science, 2002, 7(2): 84- 91.

[4] Daniell H, Chebolu S, Kumar S, et al. Chloroplast derived vaccine antigens and other therapeutic proteins [J]. Vaccine, 2005, 23(15): 1779- 1783.

[5] Daniell H, Kumar S, Dufoumantel N. Breakthrough in chloro2

plast genetic engineering of agronomically important crops [J]. Trends in Biotechnology, 2005, 23(5): 238- 245.

[6] Sidarov V A, Kasten D, Pang S Z, et al. Stable chloroplast transformation in potato: use of green fluorescent protein as a plasmid marker[J]. The Plant Journal, 1999, 19(2): 209- 216.

[7] Ruf S, Hermann M, Berger I J, et al. Stable genetic transformation of tomato plastids and expression of a foreign protein in fruit[J]. Nature Biotechnology, 2001, 19(9): 870- 875.

[8] Hou B K, Zhou Y H, Wan L H, et al. Chloroplast transformation in oilseed rape [J]. Transgenic Research, 2003, 12(1): 111- 114.

[9] Kumar S, Dhingra A, Daniell H. Plastid expressed betaine aldehyde dehydrogenase gene in carrot cultured cells, roots, and leaves confers enhanced salt tolerance [J]. Plant Physiology, 2004, 136(1): 2843- 2854.

[10] Kumar S, Dhingra A, Daniell H. Stable transformation of the cotton plastid genome and maternal inheritance of transgenes [J]. Plant Molecular Biology, 2004, 56(2): 203- 216.

[11] Khan M S, Maliga P. Fluorescent antibiotic resistance marker for tracking plastid transformation in higher plants[J]. Nature Biotechnology, 1999, 17: 910- 915.

[12] Hibberd J M, Linley P J, Khan M S, et al. Transient expression of green fluorescent protein in various plastid types following microprojectile bombardment [J]. The Plant Journal, 1998, 16(5): 627- 632.

[13] Fujitani Y, Yamamoto K, Kobayashi H. Dependence of frequency of homologous recombination on the homology length [J]. Genetics, 1995, 140: 797- 809.

[14] 龚小松, 阎隆飞. 高等植物叶绿体 DNA 提取方法改进[J]. 科学通报, 1991, 36(6): 467- 469.

[15] 刘玲丽, 谭 岩, 刘力华, 等. 获得重构基因的简便方法重叠延伸 PCR[J]. 吉林大学学报医学版, 2004, 30(5): 713- 716.

[16] 萨姆布鲁克 J, 拉萨尔 D W. 分子克隆实验指南[M]. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2002: 2- 137.

[17] Verma D, Daniell H. Chloroplast vector systems for biotechnology applications[J]. Plant Physiology, 2007, 145: 1129- 1143.