

用于通路 (Gateway) 克隆技术的植物表达载体研究进展

肖素勤, 孙振, 轩秀霞, 陈丽梅*

(昆明理工大学生命科学与技术学院生物工程技术研究中心, 昆明 650500)

摘要: 通路 (Gateway) 克隆技术是根据 λ 噬菌体基因组和大肠杆菌基因组之间的位点专一性重组分子机制开发的一套分子克隆新技术。利用该技术 LR 反应构建目的基因的表达载体时不需要经过酶切和连接等繁琐而又费时的过程, 因此, 可以节省很多时间。为了扩大 Gateway 技术在植物基因工程领域的应用, 最近有很多研究机构和研究小组开发了能用于组成型或诱导型表达目的基因、基因沉默、启动子分析、蛋白质亚细胞定位、蛋白质/蛋白质相互作用、多个 DNA 片段的模块化组装和 DNA 组片段功能验证等研究用的植物表达载体。该文对这些技术的研究进展进行了综述。

关键词: 通路克隆技术; 植物表达载体; 载体结构; LR 反应; 重组位点

中图分类号: Q943.2

文献标识码: A

文章编号: 2095-0837(2012)05-0528-17

Research Progress on Plant Expression Vectors for Gateway Cloning Technology

XIAO Su-Qin, SUN Zhen, XUAN Xiu-Xia, CHEN Li-Mei*

(Biotechnology Research Centre, Kunming University of Science and Technology, Kunming 650500, China)

Abstract: Gateway molecular cloning technology was developed by Invitrogen based on the mechanism of site-specific recombination between λ phage DNA and the *Escherichia coli* genome. Construction of an expression vector for a target gene via Gateway LR reaction does not need to use restriction enzymes and a ligase, and thus is time efficient. Recently, to expand the application of Gateway technology in plant genetic engineering, several research groups have constructed Gateway destination vectors for studies on constitutive, inducible or silence expression of target genes, promoter analyses, protein localization, protein/protein interaction, DNA fragment modular assembly and functional verification of genomic fragments. Here we review research progress on the development of these destination vectors.

Key words: Gateway cloning technology; Plant expression vector; Vector structure; LR reaction; Recombination sites

利用限制性内切酶和连接酶构建质粒载体时需要对 DNA 进行切割并回收目的片段, 然后用连接酶将其连接, 这是一种费时又费钱的工作。除此之外, 为了获得高质量连接成功的质粒, 必须把连接产物转化到具有高转化效率的感受态细胞中。目前常用的植物转基因方法有基因枪轰击法和农杆菌介导

的转化法^[1], 基因枪轰击法由于成本高, 操作过程麻烦而不常使用; 农杆菌介导的转化法操作简单, 成本也不高, 因此成为常用的植物转基因方法, 但是该方法使用的表达载体由 Ti 质粒衍生而来, 质粒载体的分子量都很大, 用酶切/连接的方法构建这类质粒载体不易成功。

收稿日期: 2012-03-02, 修回日期: 2012-07-11。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30670163); 云南省中青年学术与技术带头人培养费资助项目 (2004PY01-5)。

作者简介: 肖素勤 (1982 -), 女, 博士研究生, 主要从事植物代谢基因工程研究 (E-mail: xiaosuqin227@126.com)。

* 通讯作者 (Author for correspondence. E-mail: chenlimeikm@126.com)。

为了克服用酶切/连接技术构建表达载体所遇到的问题,Invitrogen 公司根据 λ 噬菌体基因组和大肠杆菌基因组之间的位点专一性重组分子机制开发了一套分子克隆新技术,即通路(Gateway)克隆技术。Gateway 技术主要运用 BP 和 LR 重组反应来构建载体^[2],BP 反应的原理是根据 λ 噬菌体基因组和大肠杆菌基因组之间的整合机制设计的。该反应由含有 λ 噬菌体整合酶和宿主整合因子的 BP 克隆酶混合物催化。在 BP 反应中,含有 *attB* 位点的 PCR 产物和含有 *attP* 位点的供体载体(pDONR vector)DNA 分子发生重组反应,使末端含有 *attB* 重组位点的 PCR 产物插入含有 *attP* 位点的供体载体中,产生含有 *attL* 位点的入门克隆载体(pENTR vector)。该反应是利用 PCR 产物产生 Gateway 入门克隆的方法之一。此外,入门克隆载体也可以通过酶切和连接的方法或采用 TOPO[®]克隆方法获得^[3]。入门克隆载体的产生是进入 Gateway 技术的关键环节,因为入门载体能与各种目的载体(pDEST)相兼容^[4]。入门载体和目的载体都是 LR 反应的底物,通过 LR 反应可以构建目的基因的各种表达载体。LR 反应的原理是根据 λ 噬菌体基因组从大肠杆菌的基因组中切离的机理设计的。用 Gateway 的 LR 反应构建表达载体时不需要对 DNA 分子进行酶切和连接,也不需要 DNA 片段进行回收,只需要把两种 DNA 分子混合并加入 DNA 整合或切离所需要的蛋白质就能完成表达载体的构建,所以利用 Gateway 的 LR 反应可以快速构建目的基因的各种表达载体,省去酶切与连接等费时又繁琐的过程。LR 反应是由含有整合酶、宿主整合因子和噬菌体切割酶的 LR 克隆酶混合物催化的。在 LR 反应中,含有 *attL* 位点的入门克隆和 *attR* 位点的目的载体 DNA 分子发生重组反应,使

两端含有 *attL* 重组位点的目的基因 DNA 片段亚克隆到含有 *attR* 位点的目的载体中,产生含有 *attB* 位点的表达载体(pEXPR)。供体载体、入门载体、目的载体和表达载体是 Gateway 技术发明者在通路克隆反应中为了区分输入和产出的质粒而采用的术语。为了使克隆具方向性,Gateway 系统的发明者对大肠杆菌和 λ 噬菌体基因组中 *attB*、*attP*、*attL* 和 *attR* 重组位点的序列进行了改造,在 BP 反应中,使 *attB1* 位点只与 *attP1* 重组,而不与 *attP2* 或 *attP3* 等发生重组,而在 LR 反应中,使 *attL1* 位点只与 *attR1* 重组,而不与 *attR2* 或 *attR3* 等发生重组^[5,6]。

目前 Invitrogen 公司开发的 Gateway 技术体系中没有植物表达载体,为了能在植物基因工程领域广泛应用 Gateway 技术构建表达载体,最近有研究机构和研究小组依据 Gateway 技术的 BP 反应和 LR 反应原理开发了一系列能用于组成型或诱导型表达目的基因、基因沉默、启动子分析、蛋白质亚细胞定位、蛋白质/蛋白质相互作用、多个 DNA 片段的模块化组装和基因组 DNA 组片段功能验证等研究用的植物目的表达载体。笔者对这些技术的研究进展进行了综述。

1 用于组成型表达目的基因的 Gateway 植物表达载体

用组成型启动子控制基因或开放读码框的异位表达可以在多种类型的植物细胞中验证基因的功能。这类载体的基本结构特点如图 1 所示。

其主要组成元件包括启动子、Gateway 盒(*attR1-ccdB-attR2*)、终止子和用于选择转基因植物的筛选标记基因。所用的启动子是组成型启动子,比如烟草花叶病毒(CaMV)双增强启动子($2 \times \text{CaMV } 35\text{S}$)^[7],该启动子能使目的基因在多种类型



组成型启动子: $2 \times \text{CaMV } 35\text{S}$, *OsAct1*, *ZmUbi1* 等启动子; *attR1* 和 *attR2*: *att* 重组位点; *ccdB*: 负选择细菌毒性基因; 终止子: *CaMV } 35\text{S}, *nos*, 章鱼碱合成酶等终止子; 筛选标记基因: *Kan^r*, *Hyg^r*, *Basta^r* 等; RB 和 LB: 右边界序列和左边界序列。*

Constitutive promoter: $2 \times \text{CaMV } 35\text{S}$, *OsAct1*, *ZmUbi1*, etc.; *attR1* and *attR2*: *att* recombination sites; *ccdB*: Bacterial toxin gene for negative selection; Terminator: *CaMV } 35\text{S}, *nos*, octopine synthase, etc.; Marker genes for plant selection: *Kan^r*, *Hyg^r*, *Basta^r* etc.; RB and LB: Right border sequence and left border sequence, respectively.*

图 1 用于组成型表达目的基因的 Gateway 植物表达载体结构示意图

Fig. 1 Schematic diagrams of the T-DNA construct in the Gateway plant expression vectors for constitutive expression of target genes

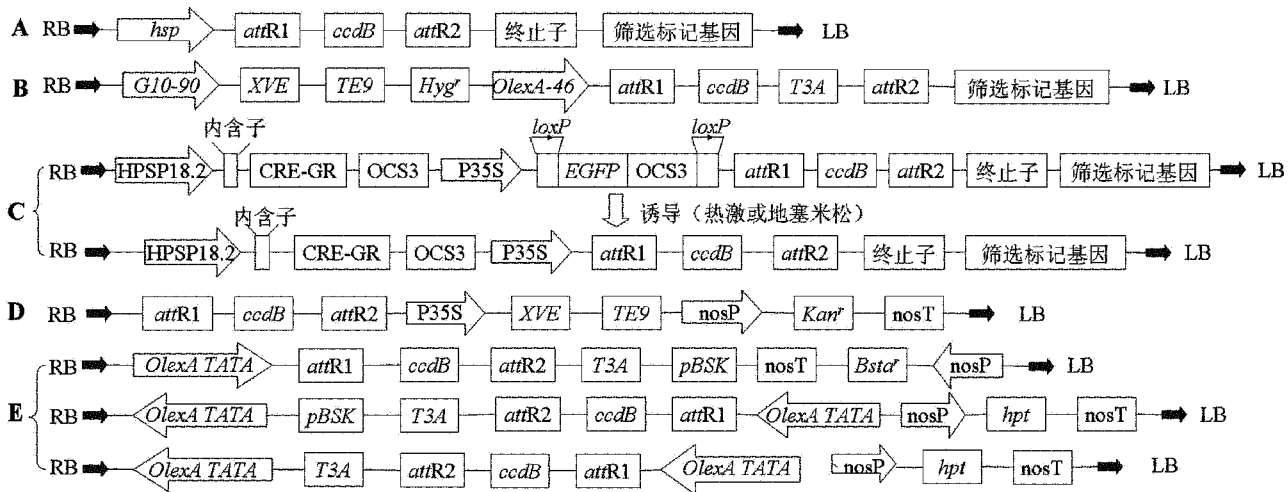
的植物细胞中表达。有研究通过 LR 反应把 *GmH-KT1* 基因(大豆中一个新的盐胁迫基因)克隆在含有双增强 35S 启动子的 pMDC83 目的载体中,用所获得的植物表达载体转化烟草,结果发现转基因烟草比对照植物有更强的盐胁迫耐受性^[8]。这证实利用这类载体获得的转基因植物可以成功表达目的基因,且 *attB* 重组位点也不抑制目的基因的表达。然而,CaMV 35S 启动子不太适合在水稻这类单子叶植物中启动基因的组成型表达^[9],因此,一些研究小组开发的目的载体含有可用于单子叶植物中组成型表达目的基因的启动子,比如水稻肌动蛋白启动子(*OsAct1*)和玉米泛素启动子(*ZmUbi1*),利用这些表达载体可以在大麦中广泛表达 *gus* 基因。植物筛选标记基因是所有 Gateway 目的载体都含有的基因表达盒,该筛选标记一般都放在左边界,这是因为 T-DNA 从农杆菌转移至植物细胞时是始于右边界止于左边界。紧邻左边界的植物筛选标

记可以避免因某些因素而造成的 T-DNA 不完全转移,确保筛选出来的抗性植株带有完整的 T-DNA^[10]。

2 用于诱导型表达目的基因的 Gateway 植物表达载体

虽然基因的过量表达为基因功能的研究提供了一个强大的工具,但是由此产生的基因普遍表达可能会致死或掩盖基因的组织特异性。为了克服这些问题,一些研究小组开发了几种用于诱导型表达目的基因的 Gateway 植物表达载体。

图 2:A 是含有热激启动子的一种目的载体的结构示意图,在该载体中,Gateway 盒放在热激启动子 *hsp* 的下游,在有热刺激的情况下,*hsp* 启动下游基因的表达。用含有 *hsp* 启动子的植物表达载体转化拟南芥,对所获得的 T₀ 和 T₁ 代转基因植株进行检测证实这种 Gateway 兼容性结构可被热



hsp: 热激启动子; *G10-90*: 一个强的组成型启动子; *XVE*: 编码嵌合转录因子的 DNA 序列; *OlexA*: 8 个拷贝的 *LexA* 操纵子序列; -46: -46 35S 小启动子; *TE9*: *rbcS E9* 多聚 A 尾序列; *T3A*: *rbcS3A* 的多聚 A 序列; *HPSP18.2*: 拟南芥热休克蛋白基因 *HSP18.2* 启动子; CRE-GR: CRE-GR 融合蛋白编码区; OCS3: 终止子; *loxP*: 噬菌体 P1 中的整合酶 (CRE) 催化的重组位点; *EGFP*: 增强型绿色荧光蛋白基因; *nosP*: 胭脂碱合成酶启动子; *nosT*: 胭脂碱合成酶终止子; *hpt*: 潮霉素抗性基因; *pBSK*: 用于细菌筛选的氨苄青霉素抗性基因;其余的标记见图 1 说明。

hsp: Heat shock promoter; *G10-90*: Strong constitutive promoter; *XVE*: DNA sequences encoding a chimeric transcription factor; *OlexA*: Eight copies of the *LexA* operator; -46: The -46 35S minimal promoter; *TE9*: *rbcS E9* poly (A) addition sequence; *T3A*: *rbcS3A* poly(A) addition sequence; *HPSP18.2*: *Arabidopsis HSP18.2* gene promoter; CRE-GR: The CRE-GR fusion protein sequence; OCS3: The terminator; *loxP*: Recombination site catalyzed by the CRE recombinase of the bacteriophage P1; *EGFP*: Enhanced green fluorescent protein gene; *nosP*: Nopaline synthase promoter sequence; *nosT*: Nopaline synthase terminator sequence; *hpt*: Hygromycin-resistance genes; *pBSK*: An ampicillin-resistance gene for bacterial selection; Remaining markers are described in Fig. 1.

图 2 用于诱导型表达目的基因的 Gateway 植物表达载体结构示意图
Fig. 2 Schematic diagrams of the T-DNA construct in the Gateway plant expression vectors for inducible expression of target genes

热诱导。热休克诱导基因的表达是一种在时间上控制基因异位表达的高效方法,然而诱导温度对植物所造成的胁迫可能会诱导转基因植物中其他基因的表达,这限制了热诱导载体的应用范围^[11]。

图2:B是含有启动子可被化学试剂诱导的目的载体的结构示意图。在该载体中,从T-DNA的右边界序列开始是一个人工合成的强组成型启动子G10-90,由该启动子控制一个人工融合的转录因子XVE基因的表达,XVE基因编码区由细菌操纵子阻遏蛋白LexA的DNA结合结构域(X)、VP16的酸性转移激活域(V),人雌激素受体的调控区(E)组成,XVE下游有一个终止子TE9,XVE基因表达盒的下游还有一个潮霉素抗性基因(*Hyg^r*),这是植物筛选标记基因。Gateway盒被置于潮霉素抗性基因之后,Gateway盒中的启动子由9个拷贝的LexA操作子序列和1个-46 35S小启动子融合而成,终止子T3A由*rbcS3A*的多聚A序列构成。在没有雌激素诱导时,G10-90启动子启动XVE融合转录因子的组成型表达,表达的XVE融合蛋白定位在细胞质且不发生构象变化。当加入雌激素时,雌激素与XVE融合蛋白中雌激素受体调控区结合,导致XVE融合蛋白发生构象变化,并由细胞质转移到细胞核。在细胞核内,XVE融合蛋白中LexA的DNA结合域能特异性识别并结合LexA的操作子序列使VP16的转录激活域激活与LexA相融合的小35S启动子,从而启动其下游基因(Gateway盒中的目的基因)的高水平表达,实现利用雌激素间接控制目的基因表达的目的^[12]。该载体的功能通过插入到LexA操纵子下游的*uidA*报告基因的表达而得到证实,且在转基因植物体内,*attB*重组位点不抑制雌激素诱导的报告基因的表达^[11]。

图2:C表示的是一种利用热刺激和地塞米松双重诱导的目的基因表达的目的载体结构示意图,该类载体能更严谨地控制目的基因的表达。克隆在Gateway盒中的目的基因放在35S启动子的下游,但是二者被一个两端含有loxP重组位点且编码增强型GFP的基因(*EGFP*)隔开。此外,在35S启动子的上游是一个融合基因,该基因的表达由拟南芥热休克蛋白基因HSP18.2启动子控制,编码区由编码重组酶(CRE)和哺乳动物糖皮质激素受体(GR)

的DNA片段融合而成。当糖皮质激素缺乏时,受热刺激表达的CRE-ER融合蛋白定位在细胞质中。当补充糖皮质激素如地塞米松时,与地塞米松结合的融合蛋白就可以进入细胞核。进入细胞核的CRE可以使*EGFP*基因两端的loxP重组位点发生重组反应,从而使*EGFP*基因被切除,切除的区域可以通过EGFP荧光的缺失观察。此后目的基因才可以在35S启动子控制下进行转录。这种“双锁”系统可以避免因驱动重组酶表达的热休克蛋白基因启动子HPS18.2的泄漏而过早地激活目的基因的表达^[3,7,12,13]。用含有*gus*基因的该Gateway目的载体转化烟草Bright Yellow-2(BY-2)细胞的研究结果表明:当转基因烟草愈伤组织在含有10 μmol/L地塞米松培养基上生长以及37℃诱导2 h后,93%的愈伤组织都具有GUS活性,而只用地塞米松或只用热诱导时这些愈伤组织不具有GUS活性,这表明CRE-ER重组酶的表达严格受双锁系统的控制^[13]。

图2:D和图2:E中的载体结构示意图表示的是一种通过雌激素的诱导作用,既能在时间上又能在空间上控制目的基因表达的双组份系统。该系统由激活型和应答型两种载体组成。在激活型载体(图2:D)中,Gateway盒放在由小35S启动子控制的融合转录因子基因XVE的上游,且激活型载体的Gateway盒中插入的DNA片段不是目的基因的编码区而是增强子或启动子序列,这样可以有效激活该载体中XVE的表达。在应答载体(图2:E)的Gateway盒中可以插入目的基因编码区的DNA片段,Gateway盒的上游是能对XVE产生响应的启动子(*OlexA-TATA*),因此Gateway盒中插入的目的基因的表达直接受该启动子的控制。此外,应答载体还含有一个编码氨基青霉素的基因(*pBSK*),该基因可以用于细菌的筛选。只含有激活载体或只含有应答载体的转基因植物都不能启动目的基因表达,这是因为该系统中应答载体的启动子活性依赖于从激活载体表达产生的XVE结构变化。通过激活载体表达的XVE融合蛋白定位在细胞质,当加入雌激素诱导后,雌激素与XVE融合蛋白中雌激素受体调控区即E区结合,XVE融合蛋白发生构象变化从细胞质转移到细胞核,在细胞核内XVE融合蛋白

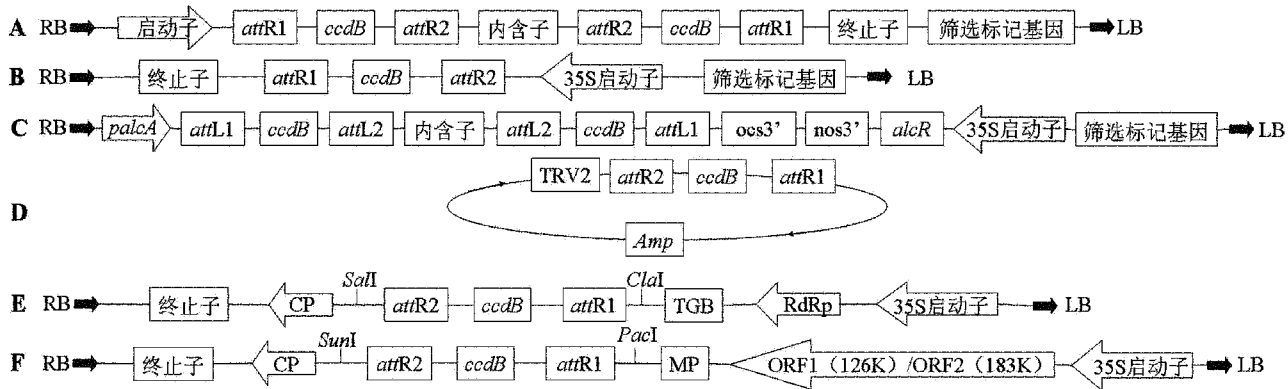
中 *LexA* 的 DNA 结合域与 XVE 响应启动子 *OlexA-TATA*, 从而启动其下游 *Gateway* 盒中目的基因的表达。*Brand* 等的研究用含有白喉毒素 A 片段的应答型载体转化拟南芥获得转基因植株, 然后用激活载体转化获得的转基因植株, 得到的 13 株转基因拟南芥在没有雌激素存在下可以正常生长, 而在添加 2 $\mu\text{mol/L}$ 雌二醇诱导后死亡, 因为雌二醇诱导目的基因白喉毒素 A 片段的表达, 产生核糖基化的延伸因子, 导致蛋白质合成受阻, 进而引起细胞死亡, 这表明该系统对目的基因表达的控制很严谨。由于雌激素的非扩散性使该系统可以在植物的限定区域应用, 这对那些由于基因诱导表达会产生不育或致死的组织再生非常有用。此外, 还可以用不同浓度的雌激素诱导来控制基因的表达程度, 如在含 *KNAT1* (控制叶的圆裂) 和 *FUS3* (控制营养器官肉质愈伤的再生) 基因的子代植株中, 用不同浓度的雌激素诱导可以控制植物表型受损的程度^[14]。

3 用于沉默基因表达的 Gateway 植物表达载体

RNA 干扰指与靶基因同源的双链 RNA 诱导的

特异转录后基因沉默现象。在植物中表达双链 RNA 可以触发 RNA 干扰 (RNAi) 途径, 其作用机制是双链 RNA 被特异的核酸酶降解, 产生干扰小 RNA (siRNA), 这些 siRNA 与同源的靶 RNA 互补结合, 特异性酶降解靶 RNA, 从而抑制或下调基因表达。

Gateway 技术中用于基因沉默的目的载体结构如图 3: A 所示, 该载体含有两个 *Gateway* 盒, 通过中间的一个内含子隔开, 目的基因的两个拷贝 DNA 片段可以相反的方向分别插入两个 *Gateway* 盒中, 用含有这种结构的植物表达载体转化植物后可以形成靶基因的发夹 RNA (hpRNA), 引发靶基因的转录后沉默。*Helliwell* 等的研究利用含有这种结构的目的载体构建了含有 *FLC* (控制开花的基因座 C) 和 *PDS* (八氢番茄红素去饱和酶) 基因的植物表达载体, 用植物表达载体转化拟南芥可以高效沉默 *FLC* 和 *PDS* 基因, 且重组载体中的 *attB* 位点并不影响该结构沉默基因的效率^[15]。另外一种沉默基因方法是把目的基因亚克隆到 *Gateway* 盒时使其方向与启动子的方向相反 (图 3: B), 转录产生的反义 RNA 引发目的基因的转录后沉默, 并可共抑制有同源序列的内源基因的表达^[16]。



alcR: 编码乙醇传感器转录因子的基因; *palcA*: 来自于乙醇脱氢酶 I 的应答 *alcR* 基因的启动子; TRV2: 烟草脆裂病毒; *Amp*: 氨苄青霉素抗性基因; CP: 外壳蛋白; TGB: 三重叠基因区; MP: 移动蛋白; PdRp: 依赖于 RNA 的 RNA 聚合酶; *SalI*、*Clal*、*SunI* 和 *PacI*: 限制性内切酶酶切位点; 其余的标记见图 1 和图 2 说明。
alcR: Gene encoding a transcription factor which is the ethanol sensor; *palcA*: An *alcR*-responsive promoter from the alcohol dehydrogenase I gene; TRV2: Tobacco rattle virus; *Amp*: Ampicillin-resistance genes; CP: Coat protein; TGB: Triple gene box block; MP: Movement protein; PdRp: RNA dependent RNA polymerase; *SalI*, *Clal*, *SunI* and *PacI*: Restriction enzyme sites; The remaining markers are described in Fig. 1 and Fig. 2.

图 3 用于基因沉默的目的基因的 Gateway 植物表达载体结构示意图
Fig. 3 Schematic diagrams of the T-DNA construct in the Gateway plant expression vectors for inducible silencing of target genes

基因的沉默也可以用化学诱导剂如乙醇来诱导,在 Gateway 系统乙醇诱导基因沉默载体中(图 3: C),有两个和乙醇诱导有关的控制单元,一个由 35S 启动子控制的 *alcR* 基因,位于左边界植物筛选标记基因的下游,*alcR* 基因的组成型表达产生的一个转录因子是乙醇的感受器,另一部分是 *palcA* 启动子(乙醇脱氢酶 I 基因的启动子),可以对 *alcR* 表达后产生的转录因子的激活作用产生应答,*palcA* 启动子位于两个被内含子串联的 Gateway 盒上游,目的基因的两个 DNA 拷贝通过 LR 反应取代 *ccdB* 基因后以相反的方向亚克隆于两个 Gateway 盒中,添加乙醇诱导后,乙醇与 ALCR 转录因子结合后改变其构象,使 ALCR-乙醇复合物能与 *palcA* 启动子结合,从而激活其下游目的基因两个反向 DNA 片段的转录,形成靶基因的发夹 RNA(hpRNA),引发靶基因的转录后沉默。由于乙醇可以挥发,因此可以通过乙醇的添加或移除(蒸发)来控制靶基因的沉默与恢复。用 *gus* 基因取代该载体的 *ccdB* 基因后获得的表达载体转化烟草,用 1%(V/V)的乙醇通过根灌法处理转基因植株可以实现 *gus* 基因的高效沉默。该载体可以用于那些被组成型敲除会致死的基因沉默,也可以用于发育阶段靶基因的敲除^[17]。

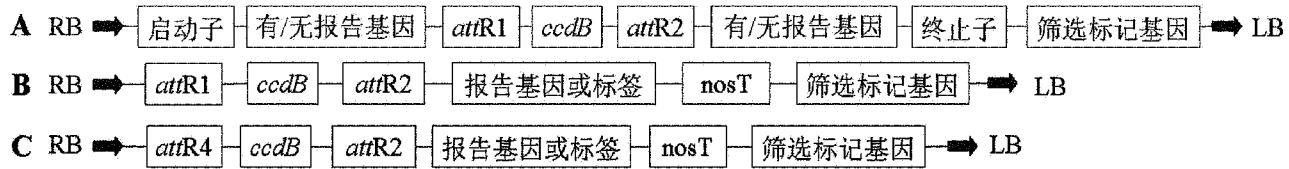
病毒诱导基因沉默(VIGS)也是一种基因沉默的工具。在 VIGS 实验中,用携带有宿主基因的病毒接种植物,可以在植物中引发基因沉默。VIGS 对于难转化的植物以及引起胚胎致死的基因沉默非常有用^[18]。Liu 等利用烟草环状病毒的一段基因组序列与 Gateway 盒构建 VIGS 的载体 pTRV2-*attR1-attR2* 载体(图 3: D)^[19],该载体可以使 *pds* 和 *RbcS* 基因沉默。最近,Lacorte 等以马铃薯病毒 X

(PVX)和烟草花叶病毒(TMV)与 Gateway 技术相结合而开发的 PVX-GW(图 3: E)和 TMV-GW(图 3: F)载体也可以用于 VIGS,比如含有 *pds* 基因部分序列的 PVX-GW 载体和 TMV-GW 载体可以在烟草中引发 RNA 沉默,造成被侵染的烟草叶片萎黄^[20]。用目的基因取代这些载体的 *ccdB* 基因后获得该基因的表达载体(VIGS-vector),构建的重组病毒携带有需要沉默的宿主基因的部分序列,用这种重组病毒感染植物,当病毒系统性地扩散时,内源基因的转录物因为与病毒载体中的插入序列同源而被 PTGS 促发的途径降解,因此,用 VIGS 可以快速敲除一个基因的表达又不需要转化植物,所以是个很吸引人的方法。

4 用于启动子分析及启动子应用的 Gateway 植物表达载体

特定基因的表达通常是由它们的启动子决定的,启动子是 DNA 链上可以与 RNA 聚合酶特异性结合的部位^[21]。启动子活性分析是一种非常重要的研究相关基因功能和时空特异性表达特征的方法。

在可用于启动子分析的 Gateway 目的载体中(图 4: A),Gateway 盒的下游有报告基因 *GUS*、*GFP* 或其他荧光蛋白基因如 *YFP*、*CFP* 或 *RFP*,有待检测目的基因的启动子序列取代该载体的 *ccdB* 基因后获得的表达载体中,待检测目的基因的启动子可以与报告蛋白的编码序列融合成嵌合基因。用这类表达载体产生转基因植物,对转基因植物中表达报告基因编码蛋白的器官,细胞或组织进行鉴定可以阐明待测目的基因启动子的活性。为了高通量的研究拟南芥低活性启动子,Xiao 等把 Gateway 重



报告基因或标签: *GUS*、*GFP* 或其他荧光蛋白基因如 *YFP*、*CFP* 或 *RFP*; *attR2* 和 *attR4*: *att* 重组位点;其余的标记见图 1 说明。
Reporter gene or tags: *GUS*, *GFP* or other fluorescent protein gene, such as *YFP*, *CFP* or *RFP*; *attR2* and *attR4*: *Att* recombination sites; The remaining markers are described in Fig. 1.

图 4 用于启动子分析和启动子应用的目的基因的 Gateway 植物表达载体结构示意图
Fig. 4 Schematic diagrams of the T-DNA construct in the Gateway plant expression vectors for promoter specificity analyses

组序列添加到目的基因上下游引物中,运用 Gateway 克隆策略获得了低表达基因启动子和报告基因融合的转基因拟南芥株系,最终确定了在不同区域中表达的 81 个启动子^[22]。

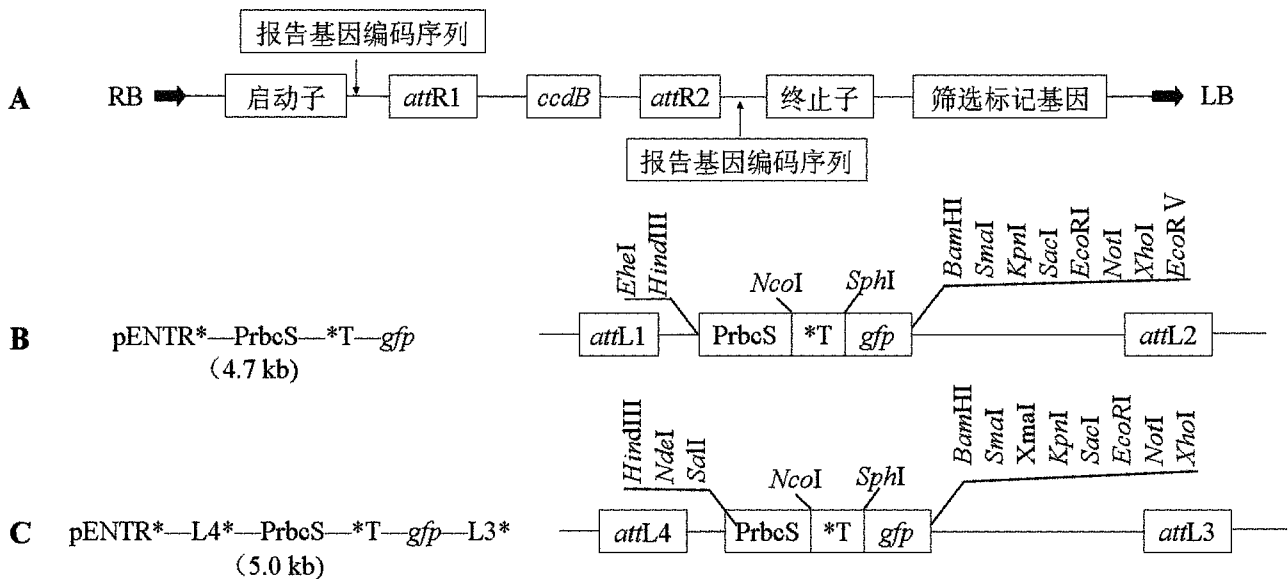
Nakagawa 等以 pGWB 载体^[23]为基础开发了一系列可以用于启动子分析的 Gateway 二元载体 (4:B),这类载体含有 7 个报告基因 (*sGFP*, *GUS*, *LUC*, *EYFP*, *ECFP*, *G3GFP*, *mRFP*),可用于高等植物中启动子分析和 cDNA 的组成型表达研究。随后他们用 *attR4* 取代上述载体系列中的 *attR1* 开发的 R4 Gateway 二元载体 (图 4:C) 可以进行高通量启动子序列的替换操作^[24]。该载体的 Gateway 盒中含有 *attR4* 和 *attR2* 重组位点,任何启动子和 cDNA 都可以重组到该载体中,该载体在研究特异启动子控制 cDNA 表达方面具有极大的优势^[21,25]。

5 用于研究蛋白质亚细胞定位的 Gateway 载体

用于启动子分析的目的载体一般不含启动子,

而用于蛋白质定位的表达载体一般都含有启动子,此外亚克隆在这类目的载体 (图 5:A) Gateway 盒中的基因必须不含终止密码子,以便该基因与荧光蛋白基因能在同一个编码框。在这类目的载体中,报告基因的编码序列既可以位于 Gateway 盒上游也可以位于 Gateway 盒下游或其两端,因此克隆到 Gateway 盒中的目的基因可以在 N 或 C 端也可以在基因两端与报告蛋白基因进行融合。通过 LR 反应使目的基因重组到带有报告基因的 Gateway 目的载体后,不含终止密码子的靶基因与荧光蛋白基因的编码序列融合成一个开放阅读框,然后在同一个启动子控制下表达产生融合了靶基因编码蛋白的荧光蛋白,通过检测荧光蛋白在细胞中的位置可以对靶蛋白的亚细胞定位进行研究^[7,11,16,26]。研究结果表明表达载体中的 *attB* 重组位点并不干扰靶蛋白定位报告基因表达的能力。

现有的 Gateway 植物表达载体不包含任何将表达蛋白定位到叶绿体中的序列。我们最近的研究以入门载体 pENTR-2B 质粒为骨架,将番茄 1,5 二



attL1, *attL2*, *attL4* 和 *attL3*: *att* 重组位点; *PrbcS*: 番茄 *rbcs*-3C 启动子; *T: 番茄 *rbcs*-3C 转移肽序列; *gfp*: 绿色荧光蛋白报告基因; *EheI*, *HindIII*, *NcoI*, *SphI*, *BamHI*, *SmaI*, *KpnI*, *SacI*, *EcoRI*, *NotI*, *XhoI*, *EcoRV*, *NdeI*, *Sall*: 限制性酶切位点; 其余的标记见图 1 说明。

attL1, *attL2*, *attL3* and *attL4*: *att* recombination sites; *PrbcS*: Tomato *rbcs*-3C promoter; *T: Tomato *rbcs*-3C transit peptide sequence; *gfp*: A reporter gene for green fluorescence protein; *EheI*, *HindIII*, *NcoI*, *SphI*, *BamHI*, *SmaI*, *KpnI*, *SacI*, *EcoRI*, *NotI*, *XhoI*, *EcoRV*, *NdeI*, *Sall*: Restriction enzyme sites; The remaining markers are described in Fig. 1

图 5 用于蛋白质亚细胞定位的目的基因的 Gateway 植物表达载体结构示意图

Fig. 5 Schematic diagrams of the T-DNA construct in the Gateway plant expression vectors for protein localization studies

磷酸核酮糖羧化酶(Rubisco)小亚基3C的启动子(PrbcS)及其转运肽序列(*T)和绿色荧光蛋白(GFP)报告基因亚克隆到该入门载体中产生入门载体pENTR*-PrbcS-*T-*gfp*(图5:B)^[27]。研究结果证明可用任何目的基因替换该入门载体中的*gfp*构建目的基因的入门载体,然后用Gateway技术的LR反应可以快速构建其光诱导型植物表达载体,将表达的目的蛋白定位到转基因植物或组织细胞的叶绿体中。Song等利用pENTR*-PrbcS-*T-*gfp*入门载体构建植物表达载体细菌甲醛同化途径关键酶HPS/PHI融合基因的表达载体pK2-35S-PrbcS-*T-*rmpAB*。用该载体转化天竺葵后融合基因*rmpAB*编码的HPS/PHI融合蛋白可以定位在转基因天竺葵的叶绿体中,从而将细菌的甲醛同化途径整合到天竺葵叶绿体的卡尔文循环途径中^[28]。

为了利用Gateway技术在一个LR重组反应中构建一个含有两个目的基因表达盒的植物表达载体,并把目的基因编码的蛋白质定位到转基因植物的叶绿体中,我们还在一个含有*attL4*和*attL3*重组位点的入门载体pEN-L4-2-L3中插入光诱导型启动子PrbcS及其叶绿体基质定位序列*T和绿色荧光蛋白GFP报告基因的DNA片段,获得pEN-L4*-PrbcS-*T-*gfp*-L3*入门载体(图5:C)。用该载体和另一个含有*attL1*和*attL2*重组位点的入门载体(pENTR*-PrbcS-*T-*gus*)与Gateway的目的载体pK7m34GW2-8m21GW3进行LR重组反应,构建了一个能串联两个报告基因表达盒的植物表达载体pKm-35S-PrbcS-*T-*gfp*-PROLD-PrbcS-*T-*gus*,研究结果表明用所构建的植物表达载体转化烟草后,目的基因能插入到转基因烟草的基因组中并正常表达,所表达的GFP蛋白可正确定位到转基因植物的叶绿体中,而GUS蛋白也可以在叶片中表达^[29]。进一步的研究结果表明,用甲基营养酵母菌同化甲醛的Xu5P途径两个关键酶基因*das*和*dak*分别取代pENTR*-PrbcS-*T-*gus*和pEN-L4*-PrbcS-*T-*gfp*-L3*的*gus*和*gfp*基因构建*das*和*dak*的入门载体,与Gateway的目的载体pK7m34GW2-8m21GW3进行LR重组反应构建串联*das*和*dak*表达盒的植物表达载体pKm-35S-PrbcS-*T-*das*-PROLD-PrbcS-*T-*dak*。用这个表达载体转化烟草

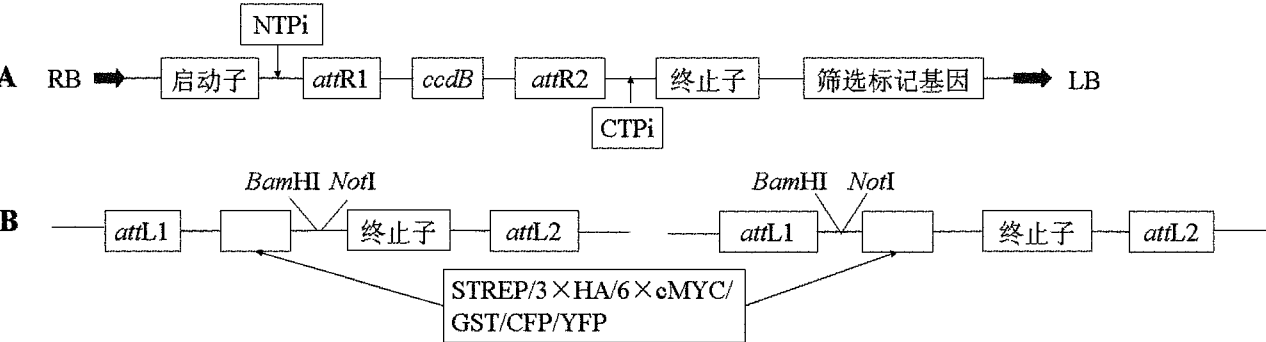
后目的基因都能插入到转基因烟草的基因组中并正常表达,且定位在叶绿体中,通过DAS和DAK在叶绿体中的正确定位能成功地构建一条甲醛光合作用同化途径。因此,这两个入门载体的应用进一步扩大了Gateway技术及植物表达载体的应用范围,为叶绿体基因工程操作提供了一个更方便的技术平台^[30]。

6 带异位标签及用于蛋白质亲和纯化的Gateway载体

蛋白质组学的发展及分析技术的进步客观上要求建立新的生物纯化策略。串联亲和纯化(TAP)策略是一项高效纯化蛋白质复合物的方法,它与质谱技术结合使用,已成为当前蛋白质组学研究的重要工具。

用于蛋白纯化的Gateway植物表达载体(图6:A)结构与上述研究蛋白定位的载体相似,Gateway盒的一端或两端有短的表位标签序列,通过LR反应用目的基因取代Gateway盒的*ccdB*基因后,表达的融合蛋白含有表位标签,表位标签有的位于目的蛋白的N端(NTPi),有的位于其C端(CTPi),有些两端都有,这样能加强目的蛋白的亲性和结合能力。表位标签是能被特异性抗体识别的亲水性肽段序列,在与大的蛋白质融合时很少干扰蛋白质的折叠和功能。一个或更多表位标签加到靶蛋白上,表达的融合蛋白可被单克隆或特异性表位标签抗体识别,因此可用于标签蛋白的高效检测和亲和纯化,表达具有标签的重组蛋白可以消除产生每一个要研究的蛋白质抗体的需要。用单个表位抗原标记或串联亲和肽标签产生融合蛋白逐渐用于大规模、高通量的蛋白质组学研究^[7,31,32]。

Gateway目的载体所含的TAP标签虽然在蛋白质复合物的纯化方面有很多优点,但标签序列和目的基因之间的*attB*重组位点序列可能会干扰融合蛋白质的活性和表达。为了解决这个问题,Dubin等把Gateway克隆技术和酶切/连接克隆技术结合起来开发了一个避免*attB*重组位点序列干扰目的蛋白质表达和功能的杂交克隆系统。该系统由12个Gateway入门克隆载体组成(图6:B),使用的标签序列有6种(STREP,3×HA,6×MYC,GST,



NTPi: 位于目的蛋白 N 端的的表位标签; CTPi: 位于目的蛋白 C 端的表位标签; STREP: 抗生蛋白链菌素标签; 3 × HA: 3 个串联的 HA 标签; 6 × cMYC: 6 个串联的 cMYC; GST: 谷胱甘肽 S 转移酶标签; CFP: 青色荧光蛋白; YFP: 绿色荧光蛋白; *Bam*HI 和 *Not*I: 限制性酶切位点; 其余的标记见图 1 说明。

NTPi: The N-terminus epitope tag of a target protein; CTPi: The C-terminus epitope tag of a target protein; STREP: Streptavidin tag; 3 × HA: Triple HA tags; 6 × cMYC: 6 repeats of Myc tags; GST: Glutathione S-transferase tag; CFP: Cyan fluorescent protein; YFP: Yellow fluorescent protein; *Bam*HI and *Not*I: Restriction enzyme sites; The remaining markers have been described in Fig. 1.

图 6 带异位标签及用于蛋白质亲和纯化的目的基因的 Gateway 植物表达载体结构示意图

Fig. 6 Schematic diagrams of the T-DNA construct in the Gateway plant expression vectors with epitope tags for protein purification

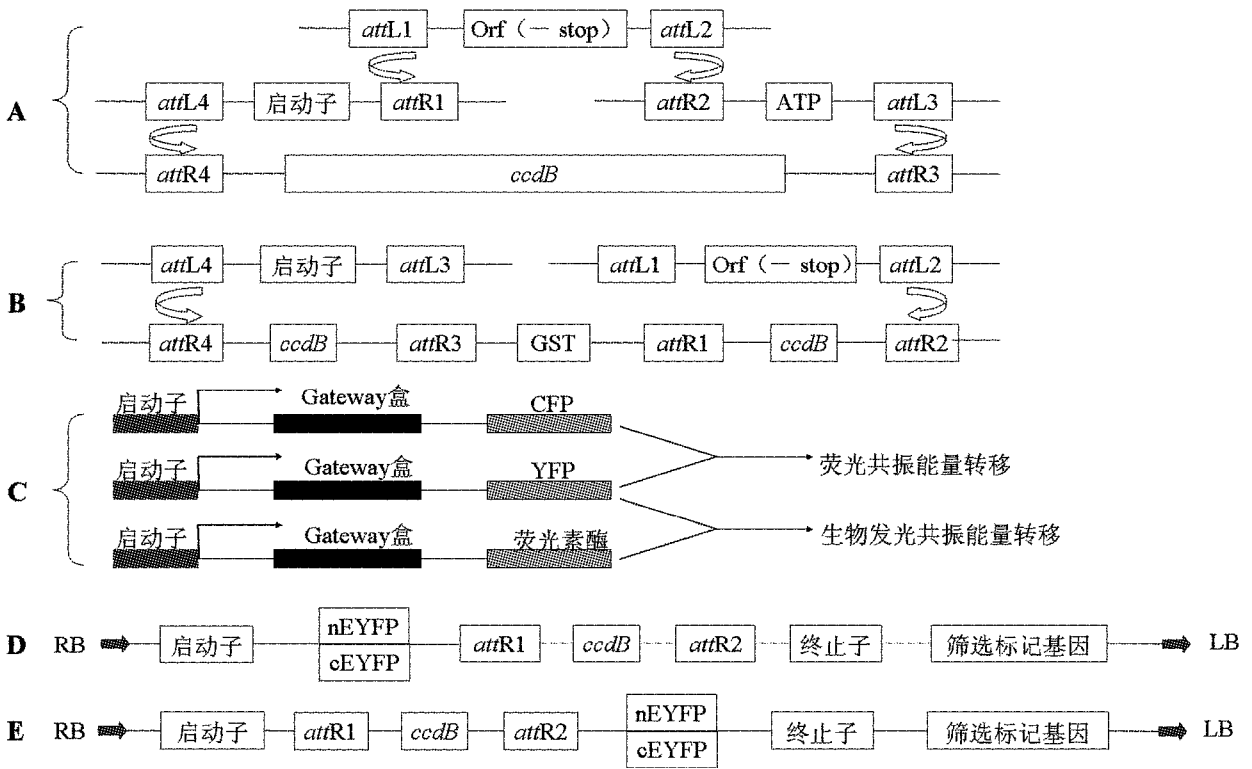
CFP, YFP), 这 6 个标签序列被置于 Gateway 入门载体重组位点 *att*L1 下游或 *att*L2 的上游(图 6:B)。在这个技术体系中,可用酶切/连接方法把目的基因亚克隆到这些入门载体的 *Bam*HI 和 *Not*I 之间,在 N 端或 C 端(图 6:B)产生异位标签和目的基因的融合。通过 Gateway LR 重组反应可以把标签序列和目的基因的融合 DNA 片段重组到目的载体中产生植物表达载体,在所产生植物表达载体中,标签序列和目的蛋白质之间没有额外的接头序列,可避免 *att*B 重组位点序列对目的蛋白质表达和功能的干扰^[33]。

7 用于检测蛋白质/蛋白质相互作用的 Gateway 载体

蛋白质复合物的检测对细胞生物学的所有研究都很重要,因为很多细胞过程受蛋白质复合物的调控,因此了解蛋白质的相互作用对于准确理解蛋白质功能、揭开各种细胞活动的机制十分重要。

上述的 TAP 技术同样也适合蛋白质与蛋白质相互作用的研究。以 Gateway 技术为基础的多位点重组载体系统(图 7:A、B),可以在一个 LR 重组反应中把任何启动子、目的基因的编码区(ORF)和标签序列(TAP)克隆到一个植物表达载体中。在图

7:A 的载体系统中,有 3 个入门载体和 1 个目的载体,目的载体 pKCTAP 的 Gateway 盒由 *att*R4、*att*R3 重组位点和 *ccdB* 毒性基因组成。把启动子序列亚克隆于含有 *att*L4 和 *att*R1 的入门载体中,无终止子序列的 ORF 亚克隆于含有 *att*L1 和 *att*L2 的入门载体中,TAP 标签亚克隆于含有 *att*R2 和 *att*L3 的入门载体中,用这 3 个入门载体和目的载体 pKCTAP 做一个 LR 反应,就可以组装一个在 C 末端带 TAP 标签的嵌合基因。在图 7:B 的载体系统中,有 2 个入门载体和 1 个目的载体,目的载体 pKNGSTAP 有 2 个 Gateway 盒,中间被 GST 标签序列隔开, GST 标签序列上游的 Gateway 盒由 *att*R4、*att*R3 重组位点和 *ccdB* 毒性基因组成, GST 标签序列下游的 Gateway 盒由 *att*R1、*att*R2 重组位点和 *ccdB* 毒性基因组成。把启动子序列亚克隆于含有 *att*L4 和 *att*R1 的入门载体中,含有终止子序列的 ORF 亚克隆于含有 *att*L1 和 *att*L2 的入门载体中,用这 2 个入门载体和目的载体 pKNGSTAP 做一个 LR 反应,可以组装一个在 N 末端带 GST 标签的嵌合基因。Leene 等的研究利用这一系列的载体系统在拟南芥中发现了 28 个相互作用的新蛋白质,并验证了 14 个以前发现具有相互作用的蛋白质,为理解细胞周期的调控机制提供了新的见解^[34]。



Orf(-stop): 不含终止密码子的开放读码框; nEYFP: 位于目的蛋白 N 端的增强型黄色荧光蛋白; cEYFP: 位于目的蛋白 C 端的黄色荧光蛋白; GST: 谷胱甘肽 S 转移酶标签; 其余的标记见图 1 说明。
Orf(-stop): Open reading frame without the stop codon; nEYFP: The N-terminus enhanced yellow fluorescent protein; cEYFP: The C-terminus enhanced yellow fluorescent protein; GST: Glutathione S-transferase tag; The remaining markers have been described in Fig. 1.

图 7 用于蛋白质/蛋白质相互作用的目的基因的 Gateway 植物表达载体结构示意图

Fig. 7 Schematic diagrams of the T-DNA construct in the Gateway plant expression vectors for protein/protein interaction studies

除了用 TAP 来研究蛋白质的相互作用外,具有 YFP(黄色荧光蛋白)、CFP(青色荧光蛋白)或荧光素酶报告基因的 Gateway 载体在用荧光共振能量转移(FRET)、生物发光共振能量转移(BRET)或双分子荧光互补(BiFC)研究植物体内蛋白质/蛋白质相互作用时也是很有用的工具。用于 FRET 的 Gateway 表达载体由两个目的载体组成(图 7:C),其中一个目的载体中的 Gateway 盒带有 CFP 报告基因,另一个目的载体中的 Gateway 盒带有 YFP 报告基因,通过 LR 反应把两个具有相互作用待检测目的基因的 ORF 分别亚克隆于这 2 个目的基因的 Gateway 盒中,构建这 2 个基因的植物表达载体,转化植物再生转基因植株。在检测转基因植物中表达的 2 个目的蛋白是否有相互作用时,用 CFP 发射的光子激发 YFP,若产生黄色的 YFP 荧光表明

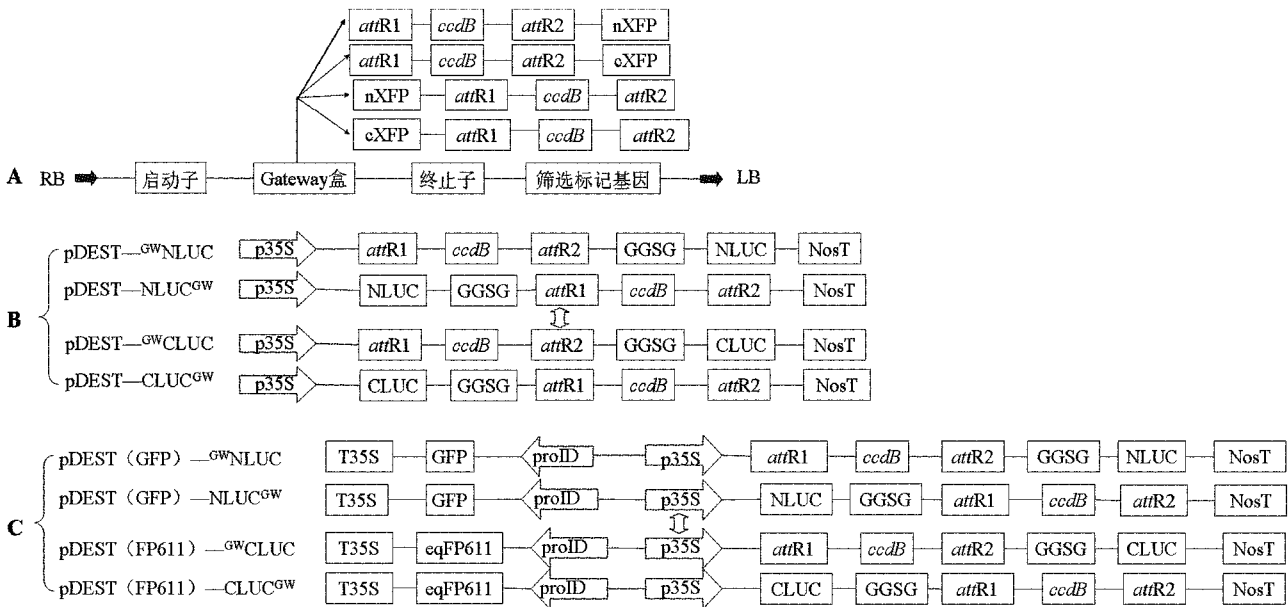
与 CFP 和 YFP 融合的蛋白质有物理上的相互作用^[35]。用于 BRET 研究的 2 个目的载体与 FRET 的相似,不同的只是其中一个目的载体上用的报告基因是荧光素酶基因(*Luc*)而不是 *CFP*,这个系统利用荧光素酶所发出的光激发 YFP 来检测 2 个待测基因编码蛋白的相互作用。

双分子荧光互补(BiFC)技术是近年新出现的一种直观、快速判断目标蛋白在细胞中的定位和相互作用的新技术。其原理是将 GFP 或其突变体如 CFP、YFP、BFP(蓝色荧光蛋白)等分子分割成 2 个不具有荧光活性的分子片段,所分割的 2 个分子片段再分别与目标蛋白连接,如果 2 个目标蛋白有相互作用,荧光蛋白的 2 个分子片段就会在空间上相互靠近,重新形成活性的荧光基团而发出荧光,从而可以在荧光显微镜下直接观察到 2 个目标蛋白是否

具有相互作用,并且在最接近活细胞生理状态的条件观察到其相互作用发生的时间、位置、强弱,所形成的蛋白复合物的稳定性,以及细胞信号分析对其相互作用的影响等。用于 BiFC 研究的 Gateway 系统由 2 个目的载体构成,在目的载体 pSITE-BiFC-N1(图 7:D)中,YFP 片段的 N 端区域位于 Gateway 盒的上游,在目的载体 pSITE-BiFC-C1(图 7:E)中,YFP 片段的 C 端区域位于 Gateway 盒的下游,通过 LR 反应把 2 个具有相互作用待检测目的基因的 ORF 分别亚克隆于这 2 个目的基因的 Gateway 盒中,构建这 2 个基因植物表达载体,转化植物再生转基因植株,在转基因植物中表达分别在 N 端或 C 端携带有不具有荧光活性 YFP 片段的 2 个目的蛋白,若在转基因植物中检测到黄色的 YFP 荧光,表明与无活性 YFP 片段融合的 2 个目的蛋白质有物理上的相互作用。利用该技术,Walter 等发现 14-3-3 蛋白能在烟草叶表皮细胞中形成同

源二聚体^[36]。

GFP 在体外进行一系列突变后,能产生荧光强度更强(EGFP)、波长不同的各种突变体如蓝色(EBFP)、青色(ECFP, Cerulean(蔚蓝色))、黄色(EYFP, Citrine(橘黄色)、Venus(金黄色))荧光蛋白,不同荧光蛋白的片段组成的双分子荧光复合物和由同一种荧光蛋白片段组成的复合物有不同的光谱,通过这些复合物之间的不同光谱可以实现同一细胞中多种蛋白复合物的可视化。多种蛋白之间的选择性相互作用在细胞生理活动中起着重要作用,利用上述几种荧光蛋白开发的多色荧光互补技术(mcBiFC)能实现在同一个细胞中多组蛋白质相互作用的同时检测。Gehl 等利用 Venus、CFP、SCFP3A(超强型青色荧光蛋白)的 N 端或 C 端片段构建了 12 个能用于检测两个或多个蛋白质互助的 Gateway 兼容性 mcBiFC 载体(图 8:A)。在这类目的载体中,Gateway 盒既可以位于这些荧光蛋



A: 用于多色荧光互补分析的 Gateway 目的载体示意图; B: 分割的荧光素酶 Gateway 目的载体结构示意图; C: 增强型分割的荧光素酶 Gateway 目的载体 T-DNA 结构示意图。nXFP: 位于 N 端的荧光蛋白 (CFP, Venus, SCFP3A); cXFP: 位于 C 端的荧光蛋白 (CFP, Venus, SCFP3A); NLUC: 位于 N 端的荧光素酶片段; CLUC: 位于 C 端的荧光素酶片段; proID: 根特异性启动子。其余的标记在图 1 中有说明。
A: Schematic presentation of the Gateway destination for multicolor fluorescence complementation assay; B: Schematic presentation of the split-LUC Gateway destination vectors; C: Schematic presentation of the enhanced split-LUC Gateway destination vectors; nXFP: The N-terminus fluorescent protein (CFP, Venus, SCFP3A); cXFP: The N-terminus fluorescent protein (CFP, Venus, SCFP3A); NLUC: The N-terminus luciferase fragment; CLUC: The C-terminus luciferase fragment; proID: The root-specific promoter; The remaining markers are described in Fig. 1.

图 8 用于研究蛋白质/蛋白质相互作用的目的基因的 Gateway 植物表达载体结构示意图

Fig. 8 Schematic diagrams of the T-DNA construct in the Gateway plant expression vectors for protein/protein interaction studies

白编码序列 N 端的上游或下游,也可以位于这些荧光蛋白编码序列 C 端的上游或下游,因此克隆在 Gateway 盒中的目标蛋白编码序列既可以与这些荧光蛋白的 N 端片段在 N 端或 C 端进行融合,又可以与这些荧光的 C 端片段在 N 端或 C 端进行融合。利用该技术中的 Venus 和 SCFP3A 相关的载体, Gehl 等在同一个细胞中发现和铜代谢相关的 Cnx7 和 Cnx6 以及 Cnx6 和 Cnx6 的相互作用^[37]。

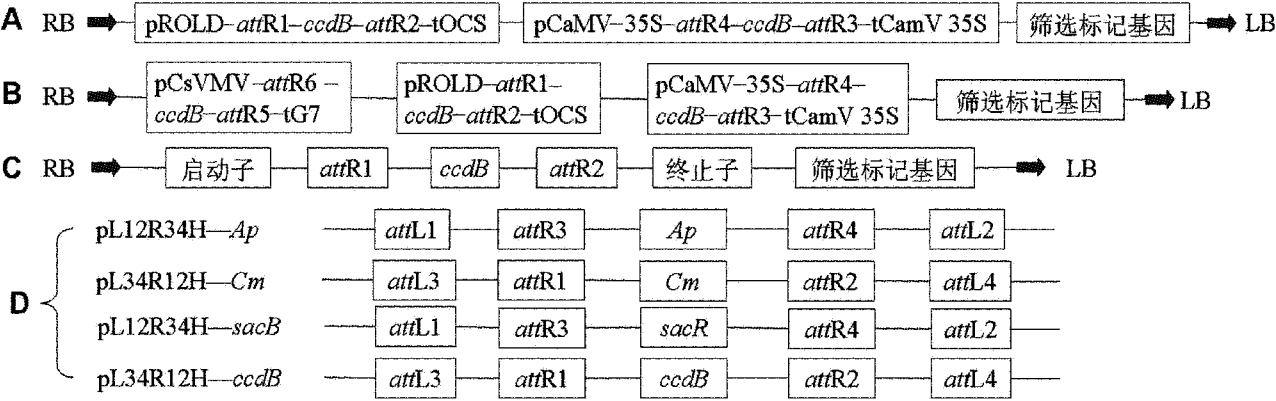
与利用 GFP 变体研究蛋白质相互作用的 BIFC 技术相比,利用荧光素酶(LUC)分割片段互补技术不仅能检测到蛋白质之间的相互作用,而且还能对蛋白质的相互作用进行量化分析和动态监控,这是因为依赖于蛋白质与蛋白质相互作用而恢复的荧光素酶的荧光是可逆的。最近, Gehl 等开发了 8 个含有荧光素酶分割片段的 Gateway 目的载体(图 8: B),在 pDEST-GWNLUC、pDEST-NLUC^{GW}、pDEST-GWCLUC、pDEST-CLUC^{GW} 4 个载体中,分割的 LUC N 端片段(NLUC)或 C 端片段(CLUC)分别位于 Gateway 盒的上游或下游,在分割的荧光素酶片段与 Gateway 盒之间有 4 个氨基酸(GGSG)接头和 8 个氨基酸的 attB 位点组成的灵活间隔区,感兴趣的目标基因都可以以任何方向克隆到这些目的载体中。此外,在上述 4 种载体中导入 proID 启动子控制的 GFP 和远红光荧光蛋白(eqFP611)表达盒,作者又开发了 4 种具有分割 LUC 片段的目的载体 pDEST(GFP)-^{GW}NLUC、pDEST(GFP)-NLUC^{GW}、pDEST(FP611)-^{GW}CLUC、pDEST(FP611)-CLUC^{GW}(图 8:C),以便可以直接在显微镜下观察验证目标基因的表达,简化叶片漂浮荧光素酶图像技术(FluCI)的实验过程。Gehl 利用这些目的载体及 FluCI 技术验证了拟南芥 14-3-3 与烟草 14-3-3 蛋白的相互作用,并对铜代谢相关蛋白 Cnx6 和 Cnx7 相互作用的强度进行量化分析。微丝由不同的肌动蛋白构成,通过体内表达 NLUC 或 CLUC 与肌动蛋白的融合蛋白,观察 LUC 荧光的出现和消失可以分析微丝聚合和解聚的动态过程。这些研究表明利用荧光素酶 Gateway 兼容性载体系统不仅可以对蛋白质与蛋白质的相互作用进行检测,而且还可以对蛋白质相互作用的强度进行量化分析或对蛋白质复合物的

动态组装进行实时检测,由此可见,分割的荧光素酶 Gateway 兼容性载体系统与 FluCI 技术相结合为植物细胞内大量蛋白质相互作用的定量分析提供了一种非常有效的手段^[38]。

8 用于模块化组装多个 DNA 片段或基因表达盒的 Gateway 植物表达载体

植物基因工程技术的发展使对基因的遗传工程操作从单基因发展到多基因。然而,在植物中对多个基因进行操作仍然存在技术上的困难^[39]。多位点 Gateway 克隆技术的发展有助于解决这个瓶颈问题^[3,7]。利用含有多重组位点的 Gateway 目的载体可以通过一步 LR 重组同时把 2 个或 3 个基因组装到同一个目的载体中,从而简化这类表达载体构建的步骤^[40],且所组装的 DNA 片段可以用不同的启动子和终止子控制。

在目的载体 pK7m34G2-8m21GW3 的 T-DNA(图 9:A)中有 2 个 Gateway 盒,利用这一目的载体可以通过一个 LR 反应同时组装 2 个目的基因的表达盒,ROLD 启动子和 OCS 终止子之间含有 attR1-*ccdB*-attR2, CaMV35S 启动子和终止子之间含有 attR4-*ccdB*-attR3,在 attL1-*gene1*-attL2 和 attL4-*gene2*-attL3 入门克隆中的 2 个目的基因编码区序列可以同时亚克隆到该目的载体的 2 个 Gateway 盒中。Karimi 等把含有核定位信号序列的红色荧光 *DsRed* 基因的入门克隆 pEN-L1-NR-L2 和含有内质网定位信号序列的 *gfp* 基因的入门克隆 pEN-L4-*ERF*-L3 与该目的载体进行 LR 反应,用获得的植物表达载体转化烟草 BY-2 细胞系的原生质体,结果在转染 48 h 后在细胞核检测到 DsRed 的红色荧光,同时在内质网中也检测到 GFP 的荧光信号,表明在 pK7m34G2-8m21GW3 中的 2 个 Gateway 盒都具有功能。在目的载体 pK7m34GW2-8m21GW3-9m56GW4(图 9:B)中有 3 个 Gateway 盒,除了以上 2 种 attR1-*ccdB*-attR2 和 attR4-*ccdB*-attR3 盒外,还在 CsVMV 启动子和 G7 终止子之间增加了 attR6-*ccdB*-attR5 盒,利用这一目的载体可以通过一个 LR 反应同时组装 3 个目的基因的表达盒。在 attL1-*gene1*-attL2、attL4-*gene2*-attL3



pROLD: 毛茛农杆菌启动子; tOCS: 章鱼肉碱合酶基因终止子; pCaMV35S: 烟草花叶病毒 35S 启动子; tCamV35S: 烟草花叶病毒 35S 终止子; pCsVMV: 木薯叶脉中的花叶病毒启动子; tG7: 来源于 GENE7 的终止子; Ap: 氨苄青霉素抗性基因; Cm: 氯霉素抗性基因; SacB: 毒性基因; 其余的标记见图 1 说明。

pROLD: The ROLD promoter of *Agrobacterium rhizogenes*; tOCS: The octopine synthase terminator; pCaMV35S: The cauliflower mosaic virus 35S promoter; tCamV35S: The cauliflower mosaic virus 35S terminator; pCsVMV: The cassava vein mosaic virus promoter; tG7: The gene7 terminator; Ap: The ampicillin-resistance gene; Cm: The chloramphenicol gene; SacB: The toxic gene; The remaining markers are described in Fig. 1.

图 9 用于模块化组装多个 DNA 片段或基因表达盒的目的基因的 Gateway 植物表达载体结构示意图

Fig. 9 Schematic diagrams of the T-DNA construct in the Gateway plant expression vectors for modular assembling multi-the DNA fragments and genes expression boxes

和 *attL6-gene3-attL5* 三个入门克隆中的 3 个目的基因编码区可以同时亚克隆到该目的载体的 3 个 Gateway 盒中, 从而完成 3 个基因表达盒的组装^[40]。

多位点 Gateway 目的载体在同时克隆多个基因表达盒方面具有很大的优势, 但如果把 4 个基因同时堆积在一个目的载体中, 就需要开发更多的 *att* 重组位点。为克服这个问题, Chen 等的研究以 Gateway 重组克隆系统为基础而开发的“多轮的 Gateway 重组反应”技术可以把多个 DNA 片段连续组装到一个 Gateway 目的载体中。该系统由一个目的载体 (pMDC99, 图 9:C) 和两种类型的入门克隆载体组成 (图 9:D), 第一种类型的入门克隆载体含有 *attL1*、*attR3*、*attR4*、*attL2* 四个重组位点, 其中入门载体 pL1R34H-*Ap* 的 *attR3*、*attR4* 重组位点之间有氨苄青霉素抗性基因 *Ap*, 另一个入门载体 pL12R34H-*sacB* 含有 *sacB* 毒性基因。第二种类型的 2 个入门克隆载体含有 *attL3*、*attR1*、*attR2*、*attL4* 四个重组位点, 入门载体 pL34R12H-*Cm* 的 *attR1*、*attR2* 重组位点之间含有氯霉素抗性基因 *Cm*, pL34R12H-*ccdB* 的 *attR1*、*attR2* 重组位点之间含有 *ccdB* 毒性基因。抗生素抗性基因 *Ap* 和

Cm 可用于亚克隆时标记基因的正筛选, 毒性基因 *sacB* 和 *ccdB* 可用于基因亚克隆时标记基因的负筛选。把 *attR1-ccdB-attR2* 的 Gateway 盒转入人工染色体 TAC 可产生容纳较大 DNA 片段的载体 pMDC99。构建多个目的基因表达盒的表达载体时, 首先是含有基质附着区蛋白基因 (MAR) 的入门克隆载体 pL12R34sB-MAR 与目的载体 pMDC99 之间通过 *attL1* 与 *attR1* 以及 *attL2* 与 *attR2* 的重组进行第一轮 LR 反应。反应混合物转化 DH10B 菌株, 目的载体 pMDC99 和副产物 pP12-*CmR-ccdB* 由于自身含有自杀基因 *ccdB* 而不能在 DH10B 菌株中存活, 副产品 pL12R34sB-MAR 由于不含卡那霉素基因 (*Km*) 也不能在含有卡那霉素 (*Km*) 培养基上存活。因此, 可以在含有卡那霉素 (*Km*) 的培养基上筛选出重组克隆 pMDC99-MAB。然后是含有 *GUS* 基因的入门克隆载体 pL12R34sB-*GUS* 与 pMDC99-MAB 之间通过 *attL3* 与 *attR3* 以及 *attL4* 与 *attR4* 之间重组进行第二轮 LR 反应。反应混合物转化 DB3. 1 菌株, 含有目的载体 pMDC99-MAB 和副产物 pP34-*sacB* 的重组子由于自身含有 *sacB* 基因而不能在含有蔗糖的培养基上存活, 副产物 pL12R34sB-*GUS* 由于不含卡那霉素基因不能在含

有 Km 培养基上存活,所以可以在含有卡那霉素(Km)和蔗糖的培养基上筛选出重组克隆 pMDC99-MAB-GUS。依据该原理,通过多轮的 LR 重组反应可以完成多个基因表达盒序列的组装。在验证该系统原理的试验中,作者利用该载体系统成功构建含有 7 个基因表达盒 DNA 片段(1 个植物筛选标记基因,2 个报告基因和 4 个编码基质附着区蛋白的基因)的植物表达载体,用该植物表达载体转化拟南芥和烟草,结果表明所有基因在转基因植物中都能表达^[41]。

9 用于研究植物基因组片段功能的 Gateway 表达载体

对突变体进行互补分析需要把一些大的基因组片段亚克隆进入植物表达载体。一些 Gateway 目的载体也可以用于这方面的研究。除了启动子有部分不同外,用于该目的载体所具有的结构元件(图 10)与用于组成型表达基因的目的载体所具有的结构元件类似。

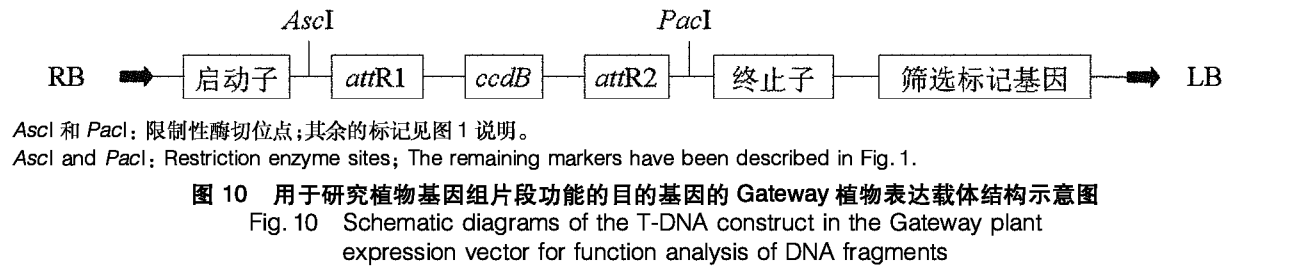
Grossniklaus 和 Curtis 开发的 pMDC99、pMDC100 和 pMDC123 等系列的 Gateway 目的载体可以把高达 12 kb 的拟南芥基因组 DNA 成功地亚克隆到这些目的载体的 Gateway 盒中,在这些载体 Gateway 盒上下游有 *AscI* 和 *PacI* 两个稀有酶切位点,这两个酶的识别位点长达 8 bp,用这两个酶切割基因组 DNA,很容易检测转基因片段在植物基因组中的插入情况。如果用能稳定遗传且含有大基因组片段质粒的细菌菌株如 Stb12 (Invitrogen, Carlsbad, CA),则可以对更大的 DNA 片段进行克隆^[11]。此外,用限制性酶 *SfiI* 酶切 RIKEN 制备的拟南芥全长 cDNA(RAFL)所获得的片段可以高通量亚克隆在用 *SfiI* 酶切后的入门克隆载体 pRAFLINTR 的 *attL1* 和 *attL2* 位点之间,所获得的

RAFL cDNA 入门克隆与 Gateway 目的载体进行 LR 重组反应获得的表达克隆,通过农杆菌介导法转化拟南芥悬浮细胞可以获得大量拟南芥转基因细胞培养系,这对高通量和大规模产生用于功能基因组学分析的功能获得型株系很有用^[42]。

10 展望

人类和模式植物基因组计划的完成标志着生命科学已经迈进了后基因组时代,大规模基因的功能研究已成为生命科学的热点。而对基因功能的每一步分析都需要把感兴趣的基因重新克隆到能表明基因特征的一个或多个特异性目的载体中,因此,对高效克隆基因方法的需求也逐渐增加,在对基因进行克隆时,研究者所面临的主要挑战是怎样对数以千计的 DNA 片段同时进行克隆以及基因的模块化组装和多背景下的表达。Gateway 系统克服了功能基因组学研究遇到的主要瓶颈问题,该系统使基因和其它元件分离,并可以在不同的分析平台中将其进行来回转移。因此可以认为该技术是一个生物操作系统,有助于管理序列信息并把序列信息转移到能理解其生理作用的生物中。Gateway 相关文献的指数增长表明该系统已经对功能基因组学的研究产生很多的影响,它已经开通了一个新的研究途径并且在未来还会继续发展。

应用 Gateway 技术可以把经典的多步克隆法简化为一步克隆法。此外,由于 Gateway 技术的高效性、适应性和兼容性已经使该技术成为最成功和最广泛应用的重组克隆系统,最近在植物转化载体构建和大规模克隆基因资源的研究方面广泛采用了 Gateway 克隆技术。可以预见这个平台在要求系统克隆、模块化组装和在不同背景下表达基因的工程中仍然是一个很重要的工具,将来还可以用组成型或诱导型表达目的基因、启动子分析、蛋白质亚细



胞定位、蛋白质/蛋白质相互作用、多个 DNA 片段的模块化组装和 DNA 组片段功能验证等方面的 Gateway 载体高效构建用于高通量 DNA 分析和基因特征分析的植物表达载体。

参考文献:

- [1] 耿立召,刘传亮,李付广. 农杆菌介导法与基因枪轰击法结合在植物遗传转化上的应用[J]. 西北植物学报, 2005, 25(1): 205–210.
- [2] Hartley J L, Temple G F, Brasch M A. DNA cloning using *in vitro* site-specific recombination[J]. *Genome Res*, 2000, 10: 1788–1795.
- [3] Karimi M, Depicker A, Hilson P. Recombinational cloning with plant gateway vectors[J]. *Plant Physiol*, 2007, 145(4): 1144–1154.
- [4] Katzen F. Gateway® recombinational cloning: a biological operating system[J]. *Expert Opin Drug Discov*, 2007, 2(4): 571–589.
- [5] Cheo D L, Titus S A, Byrd D R N, Hartley J L, Temple G F, Brasch M A. Concerted assembly and cloning of multiple DNA segments using *in vitro* site-specific recombination: functional analysis of multi-segment expression clones [J]. *Genome Res*, 2004, 14: 2111–2120.
- [6] Sasaki Y, Sone T, Yoshida S, Yahata K, Hotta J, Chesnut J D, Honda T, Imamoto F. Evidence for high specificity and efficiency of multiple recombination signals in mixed DNA cloning by the Multi-site Gateway system[J]. *J Biotechnol*, 2004, 107(3): 233–243.
- [7] Earley K W, Haag J R, Pontes O, Opper K, Juehne T, Song K, Pikaard C S. Gateway-compatible vectors for plant functional genomics and proteomics [J]. *Plant J*, 2006, 45(4): 616–629.
- [8] Chen H, He H, Yu D. Overexpression of a novel soybean gene modulating Na⁺ and K⁺ transport enhances salt tolerance in transgenic tobacco plants [J]. *Physiol Plantarum*, 2011, 141(1): 11–18.
- [9] Islam M R, Malo R, Tammi R S, Jahan S, Parvin L, Seraj Z I. Modification of recombination-based Gateway™ binary destination vector with novel promoter for *Agrobacterium*-mediated transformation of rice[J]. *Plant Tissue Cult & Biotech*, 2008, 17(1): 47–58.
- [10] 王峰,黄璐圆. 双元 Ti 载体的发展[J]. 西北植物学报, 2006, 26(11): 2397–2401.
- [11] Curtis M D, Grossniklaus U. A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta[J]. *Plant Physiol*, 2003, 133(2): 462–469.
- [12] Zuo J, Niu Q W, Chua N H. An estrogen receptor-based transactivator XVE mediates highly inducible gene expression in transgenic plants[J]. *Plant J*, 2000, 24(2): 265–273.
- [13] Joubès J, De Schutter K, Verkest A, Inzé D, De Veylder L. Conditional, recombinase-mediated expression of genes in plant cell cultures[J]. *Plant J*, 2004, 37(6): 889–896.
- [14] Brand L, Hörler M, Nüesch E, Vassalli S, Barrell P, Yang W, Jefferson R A, Grossniklaus U, Curtis M D. A versatile and reliable two-component system for tissue-specific gene induction in *Arabidopsis* [J]. *Plant Physiol*, 2006, 141(4): 1194–1204.
- [15] Helliwell C, Waterhouse P. Constructs and methods for high-throughput gene silencing in plants [J]. *Methods*, 2003, 30(4): 289–295.
- [16] Karimi M, Inzé D, Depicker A. Gateway™ vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation [J]. *Trends Plant Sci*, 2002, 7(5): 193–195.
- [17] Lo C, Wang N, Lam E. Inducible double-stranded RNA expression activates reversible transcript turnover and stable translational suppression of a target gene in transgenic tobacco[J]. *FEBS Lett*, 2005, 579(6): 1498–1502.
- [18] Bernacki S, Karimi M, Hilson P, Robertson N. Virus-induced gene silencing as a reverse genetics tool to study gene function[M]. *Plant Developmental Biology*, 2010, 655: 27–45.
- [19] Liu Y, Schiff M, Dinesh-Kumar S P. Virus-induced gene silencing in tomato [J]. *Plant J*, 2002, 31(6): 777–786.
- [20] Lacorte C, Ribeiro S G, Lohuis D, Goldbach R, Prins M. Potato virus X and tobacco mosaic virus-based vectors compatible with the Gateway™ cloning system[J]. *J Virol Methods*, 2010, 164(1–2): 7–13.
- [21] Nakagawa T, Nakamura S, Tanaka K, Kawamukai M, Suzuki T, Nakamura K, Kimura T, Ishiguro S. De-

- velopment of R4 Gateway binary vectors (R4pGWB) enabling high-throughput promoter swapping for plant research [J]. *Biosci Biotech Bioch*, 2008, 72(2): 624–629.
- [22] Xiao Y L, Redman J C, Monaghan E L, Zhuang J, Underwood B A, Moskal W A, Wang W, Wu H C, Town C D. High throughput generation of promoter reporter (GFP) transgenic lines of low expressing genes in *Arabidopsis* and analysis of their expression patterns[J]. *Plant Methods*, 2010, 6: 18.
- [23] Nakagawa T, Kurose T, Hino T, Tanaka K, Kawamukai M, Niwa Y, Toyooka K, Matsuoka K, Jinbo T, Kimura T. Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation[J]. *J Biosci Bioeng*, 2007, 104(1): 34–41.
- [24] Nakagawa T, Suzuki T, Murata S, Nakamura S, Hino T, Maeo K, Tabata R, Kawai T, Tanaka K, Niwa Y, Watanabe Y, Nakamura K, Kimura T, Ishiguro S. Improved Gateway binary vectors: high-performance vectors for creation of fusion constructs in transgenic analysis of plants [J]. *Biosci Biotech Bioch*, 2007, 71(8): 2095–2100.
- [25] Nakamura S, Mano S, Tanaka Y, Ohnishi M, Nakamori C, Araki M, Niwa T, Nishimura M, Kaminaka H, Nakagawa T, Sato Y, Ishiguro S. Gateway binary vectors with the bialaphos resistance gene, bar, as a selection marker for plant transformation[J]. *Biosci Biotech Bioch*, 2010, 74(6): 1315–1319.
- [26] Martin K, Kopperud K, Chakrabarty R, Banerjee R, Brooks R, Goodin M M. Transient expression in *Nicotiana benthamiana* fluorescent marker lines provides enhanced definition of protein localization, movement and interactions in planta[J]. *Plant J*, 2009, 59(1): 150–162.
- [27] Ma L, Song Z B, Hu Q Q, Zhao Y, Nian H J, Yu Y X, Li K Z, Chen L M. Construction and application of a Gateway entry vector with rubisco small sub-unit promoter and its transit peptide sequence[J]. *Prog Biochem Biophys*, 2011, 38(3): 269–279.
- [28] Song Z B, Orita I, Yin F, Yurimoto H, Kato N, Sakai Y, Izui K, Li K Z, Chen L M. Overexpression of an HPS/PHI fusion enzyme from *Mycobacterium gastri* in chloroplasts of geranium enhances its ability to assimilate and phytoremediate formaldehyde [J]. *Biotechnol Lett*, 2010, 32(10): 1541–1548.
- [29] 肖素勤, 孙振, 王莎莎, 梁锋, 李莉, 年洪娟, 李昆志, 陈丽梅. 通路克隆入门载体 pEN-L4* -PrbcS- *T-gfp-L3* 的构建及其应用[J]. *生命科学研究*, 2011, 15(6): 476–484.
- [30] Xiao S Q, Sun Z, Wang S S, Zhang J, Li K Z, Chen L M. Overexpressions of dihydroxyacetone synthase and dihydroxyacetone kinase in chloroplasts install a novel photosynthetic HCHO-assimilation pathway in transgenic tobacco using modified Gateway entry vectors [J]. *Acta Physiol Plant*, 2012, 34(5): 1975–1985.
- [31] Rohila J S, Chen M, Cerny R, Fromm M E. Improved tandem affinity purification tag and methods for isolation of protein heterocomplexes from plants[J]. *Plant J*, 2004, 38(1): 172–181.
- [32] Rubio V, Shen Y, Saijo Y, Liu Y, Gusmaroli G, Dinesh-Kumar S P, Deng X W. An alternative tandem affinity purification strategy applied to *Arabidopsis* protein complex isolation [J]. *Plant J*, 2005, 41(5): 767–778.
- [33] Dubin M J, Bowler C, Benvenuto G. A modified Gateway cloning strategy for overexpressing tagged proteins in plants [J]. *Plant methods*, 2008, 4: 3.
- [34] Van Leene J, Stals H, Eeckhout D, Persiau G, Van De Slijke E, Van Isterdael G, De Clercq A, Bonnet E, Laukens K, Remmerie N, Henderickx K, De Vijlder T, Abdelkrim A, De Jaeger G. A tandem affinity purification-based technology platform to study the cell cycle interactome in *Arabidopsis thaliana* [J]. *Mol Cell Proteomics*, 2007, 6: 1226–1238.
- [35] Zhong S, Lin Z F, Fray R G, Grierson D. Improved plant transformation vectors for fluorescent protein tagging[J]. *Transgenic Res*, 2008, 17(5): 985–989.
- [36] Walter M, Chaban C, Schütze K, Batistic O, Weckermann K, Näke C, Blazevic D, Grefen C, Schumacher K, Oecking C, Harter K, Kudla J. Visualization of protein interactions in living plant cells using bimolecular fluorescence complementation[J]. *Plant J*, 2004, 40(3): 428–438.
- [37] Gehl C, Waadt R, Kudla J, Mendel R R, Hänsch R. New Gateway vectors for high throughput analyses

- of protein-protein interactions by bimolecular fluorescence complementation[J]. *Mol Plant*, 2009, 2 (5): 1051–1058.
- [38] Gehl C, Kaufholdt D, Hamisch D, Bikker R, Kudla J, Mendel R R, Hänsch R. Quantitative analysis of dynamic protein-protein interactions in planta by a floated-leaf luciferase complementation imaging (FLuCI) assay using binary Gateway vectors[J]. *Plant J*, 2011, 67(3): 542–553.
- [39] Karimi M, De Meyer B, Hilson P. Modular cloning in plant cells[J]. *Trends Plant Sci*, 2005, 10(3): 103–105.
- [40] Karimi M, Bleys A, Vanderhaeghen R, Hilson P. Building blocks for plant gene assembly[J]. *Plant Physiol*, 2007, 145(4): 1183–1191.
- [41] Chen Q J, Zhou H M, Chen J, Wang X C. A Gateway-based platform for multigene plant transformation[J]. *Plant Mol Biol*, 2006, 62(6): 927–936.
- [42] Ogawa Y, Dansako T, Yano K, Sakurai N, Suzuki H, Aoki K, Noji M, Saito K, Shibata D. Efficient and high-throughput vector construction and *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* suspension-cultured cells for functional genomics[J]. *Plant Cell Physiol*, 2008, 49(2): 242–250.

(责任编辑: 张 平)