

一种花生转基因表达载体的构建

王 静^{1,2}, 严海燕^{1*}, 康强胜¹

(1. 中国科学院武汉植物园, 武汉 430074; 2. 中国科学院研究生院, 北京 100039)

摘 要: 通过用一对特异性引物, PCR 扩增得到花生 (*Arachis hypogaea*) 主要致敏蛋白 Ara h 1 的基因的启动子片段 1 957 bp, 其序列组成与已发表序列基本一致。用其替换 pBIN 35S-mGFP4 载体中的 35S 启动子部分, 组成一种花生转基因表达载体 pGA1。该载体含有种子特异表达调控元件、增强表达元件和一些与转录因子结合的调控元件, 是一个强启动子, 便于将外源基因转入花生, 实现外源基因在花生中的表达, 为建立花生生物反应器奠定了基础。

关键词: PCR; 启动子; 表达载体; 酶切

中图分类号: Q943. 2

文献标识码: A

文章编号: 1000-470X(2005)06-0514-05

Construction of a Plant Transgenic Expression Vector of Peanut

WANG Jing^{1,2}, YAN Hai-Yan^{1*}, KANG Qiang-Sheng¹

(1. Wuhan Botanical Garden, The Chinese Academy of Sciences, Wuhan 430074, China;

2. Graduate School of the Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China)

Abstract: The promoter of the gene encoding the major peanut allergy protein Ara h 1 has been cloned by the polymerase chain reaction technique (PCR) with a pair of special primers. The promoter we have got is 1957 bp. Basically, it is consistent with the sequence published. By replacing the 35S promoter in pBIN 35S-mGFP4 vector with this promoter, we have constructed a plant transgenic expression vector of peanut named pGA1. It contains seed specifically expressed elements, enhancers and some elements regulated by transcription factors. Thus the heterologous gene can be transferred to peanut and expresses in it easily. The research lays a foundation for establishing the peanut bioreactor.

Key words: Polymerase chain reaction; Promoter; Expression vector; Restriction enzyme digestion

克隆、分离目的基因是植物基因工程的一个重要环节。但是获得的基因在转基因植物中的表达有许多因素控制, 选择合适的启动子尤为重要, 它决定了基因表达的强弱及空间分布^[1], 启动子可分为组成型启动子 (constitutive promoter), 组织特异性启动子 (tissue-specific promoter) 和诱导型启动子 (inducible promoter)^[2], 根据不同目的将选择不同的启动子。而花生作为主要的食用油源和植物蛋白源, 其种子是主要的蛋白贮藏场所, 因此, 本研究选择了在花生种子中专一表达的贮藏蛋白 Ara h 1 的基因的启动子来构建载体, 为实现外源蛋白在花生中的表达, 改善花生品质, 建立花生生物反应器来生产口

服疫苗奠定基础。

另一方面, 花生过敏症因其终生性和敏感性, 已广泛受到人们的关注。在花生的贮藏蛋白中, Ara h 1 和 Ara h 2 是两种主要的过敏原, 它们被超过 90% 的花生过敏症患者血清中的 IgE 所识别^[3]。Ara h 1 是豌豆球蛋白家族中的一员, 属于 7S 盐溶性蛋白, 分子量为 63.5 kD, 它耐热^[4], 不易被消化, 由多个亚基组成。目前已获得了编码 Ara h 1 的基因序列, 并对其启动子的功能结构域进行了分析^[5], 但还未对其基因表达的转录调控分子机理进行深入研究。为此, 获得含有 Ara h 1 基因启动子的表达载体, 进而通过启动子功能元件的缺失和与相应的转录因

收稿日期: 2005-04-12, 修回日期: 2005-06-09。

基金项目: 中国科学院武汉植物园创新基金资助项目 (08035105); 中国科学院创新基金启动经费资助项目 (08025125)。

作者简介: 王静 (1981—), 女, 硕士在读, 主要从事植物分子生物学和细胞生物学方面的研究。

* 通讯作者 (E-mail: haiyan@rose. whiob. ac. cn)。

子的结合作用,我们将可以对各调控元件进行研究,了解它们对目的基因表达强度和时间的控制,从而调整其结构,利用它在花生子叶中大量生产目的蛋白,同时就如何使过敏原基因沉默,来生产低变应原的转基因花生做进一步的研究。

1 材料与方法

1.1 材料

以豫花15号花生(*Arachis hypogaea*)嫩叶为材料提取花生基因组DNA;载体和受体菌采用pMD18-T、pBIN 35S-mGFP4及DH5 α 感受态细胞;实验中所用TaqDNA聚合酶购自大连TaKaRa公司,T4 DNA连接酶及各种限制性内切酶购自华美生物工程公司,凝胶回收试剂盒购自上海生工生物公司,测序由北京三博远志生物技术有限责任公司完成。

实验所用引物为北京奥科生物工程公司合成。根据已报道的花生主要致敏蛋白Ara h1的启动子序列,利用引物设计软件Primer premier 5设计引物P515和P155,为了保持序列的完整性,未另外添加设计酶切位点,序列为:P515:5'-TTAGGTTTTC-CATTTTACACAGAG-3';P155:5'-GCAGAAA-CTGAAGCCAGGACAAGGA-3'。转基因表达载体的检测引物为一个正向引物S427和三个嵌套的反向引物a1596,a1223,a1106。具体为,S427:5'-TAC-GCAGATACGCTAAA-3';a1596:5'-GGTGAAA-TGATGGAGG-3';a1223:5'-TCATCACCCATTC-AGC-3';a1106:5'-GTCGGGTAAGGGTCTC-3'。

1.2 方法

1.2.1 花生种子的萌发 将花生脱壳,放入铺垫有吸水纸的干净培养皿中,均匀分布,加入适量自来水,在室温下培养1周,每2 d加1次水。在提取花生基因组DNA之前,将其放在避光处培养1~2 d。

1.2.2 CTAB法提取花生基因组DNA 根据王关林等的方法^[6],称取2 g嫩叶组织剪碎,冰冷的研钵中放入液氮,将组织在其中研磨成粉末状,转移至冰冷的1.5 mL离心管中,加入600 μ L已经预热到65℃的CTAB缓冲液(400 μ L EDTA,1 mL Tris-HCl,2.8 mL NaCl,2 mL CTAB,3.8 mL H₂O,100 μ L β -巯基乙醇),缓慢上下颠倒几次,直到溶液均一,65℃水浴中放置20 min,其间颠倒数次,使溶液充分混匀,加入600 μ L氯仿/异戊醇(24:1),盖紧,在涡旋仪上震荡直到乳状液形成,6 000 r/min离心15 min,将上清转入新的1.5 mL离心管中,加入

0.5 倍体积5 mol/L NaCl混匀,再加入2倍体积经-20℃预冷的无水乙醇,4℃放置2 h,3 000 r/min离心3 min,然后在5 000 r/min下离心3 min,去上清,用0℃ 70%乙醇洗涤沉淀,3 000 r/min离心3 min,去上清,在37℃放置20~30 min,干燥DNA,用200~300 μ L TE溶解DNA,加入1%体积的RNase,即得到无RNA的花生基因组DNA。

1.2.3 花生Ara h1启动子的分离 以两端固定引物P515和P155进行PCR,反应体系为:10 $\times$ PCR buffer(含Mg²⁺) 2.5 μ L,dNTPs 0.5 μ L(终浓度0.2 mmol/L),正、反引物各0.25 μ L(终浓度为1 μ mol/L),TaqDNA聚合酶0.5 μ L(1 U),基因组模板视浓度而定,加dd H₂O至终体积为25 μ L,反应程序为:94℃预变性1 min,94℃变性1 min,55℃复性30 s,72℃延伸1 min,30个循环,最后72℃延伸5 min。以50 μ L的PCR产物量,从琼脂糖凝胶中回收目的片段,1 957 bp,将目的片段克隆于PMD18-T载体中,得到中间载体1P2,然后转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞。

1.2.4 PCR鉴定插入中间载体1P2中的启动子片段 以所得到的转化子菌液^[6]为模板,P515为正向引物,P155为反向引物,PCR扩增,反应程序与之前相同,产物经0.7%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5 启动子片段与切去35S的pBIN 35S-mGFP4载体连接并转化^[4] 将中间载体1P2从阳性转化子中提取出来,用限制性内切酶BamH I和Hind III双酶切,同时也用相同的两种酶酶切pBIN 35S-mGFP4载体,将其35S启动子部分切除。从琼脂糖凝胶中回收Ara h1启动子片段和切除35S的pBIN 35S-mGFP4载体片段(约12 kb),在10 μ L反应体系中,以摩尔比3:1的比例加入启动子片段和载体片段,同时加入1 U的T4 DNA连接酶,在22℃反应3 h,连接产物转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞。

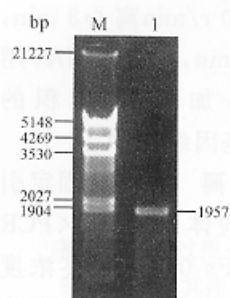
1.2.6 PCR及酶切鉴定插入表达载体中的启动子片段 以转化子菌液为模板^[7],用S427为正向引物,分别和反向嵌套引物a1596,a1223,a1106组合进行PCR,PCR扩增条件除复性温度为60℃外,与前面相同。得到的阳性菌株经扩繁,提取质粒后,用限制性内切酶BamH I和Hind III酶切检验。

2 结果与分析

2.1 PCR获得花生主要致敏蛋白Ara h1基因的启动子片段

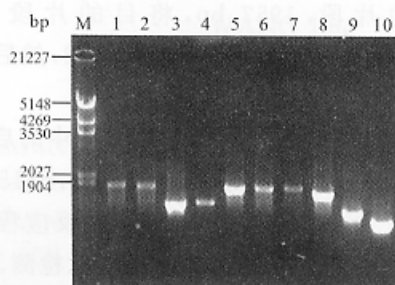
用引物P515和P155对花生基因组DNA进行

PCR扩增,有一条PCR产物,大小与在GenBank登陆的花生 *Ara h 1* 基因的启动子序列一致,为1957 bp (图1)。



M: λ DNA/*Hind* III *Eco* R I ;
Lane 1 is the PCR products
**图 1 *Ara h 1* 基因启动子的
PCR 扩增产物电泳图谱**
Fig. 1 PCR products of the
puomoter of *Ara h 1*

将 PCR 产物回收后直接与 PMD18-T 载体连接,转化 DH5 α 感受态细胞。从所得的转化子中,直接以菌液为模板,以固定引物 P515 和 P155 PCR 检测插入 1P2 中的启动子片段,从其中 10 个转化子中筛选出 5 个为阳性克隆,结果见图 2。



M: λ DNA/*Hind* III *Eco* R I ; Lane 1—10: The PCR products
using ten different transformants as the template. The positive
clones are 1,2,5,6,7.

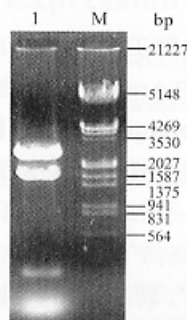
图 2 中间载体 1P2 的 PCR 检测电泳图谱
Fig. 2 PCR detection of the inter-mediate vector 1P2

对其中的 2 号菌株质粒中的插入片段进行测序,结果与已发表的 *Ara h 1* 基因的启动子序列基本一致,其中含有 2 个 TATA-boxes (TATATAAA-TA 和 TTATATATAT),1 个 CAAT-box (CAAT),1 个 GC-box (CGGGACCGGGCCGGGCCTTCGG-GCCGGGCGGGGT),2 个 G-boxes (TAACACGT-ACAC 和 ATCGACGTGAAA),2 个 RY elements (CATGCAC 和 CATGCAT),2 个 GATA 结合基序 (GATGATAT),1 个 A-box 相似序列 (TACGTT),3 个富含 AT 的序列,即 Enhancer (ATAAAATAT-TAA, CAATATTTAAAT 和 TTTATTTATTA),1 个 TGACGT 基序,还有 Dof 蛋白、Gamyb、Athb1、P 和 PBF 调控因子的结合位点。克隆片段与登陆序列最大的区别在于,克隆片段在对应于原序列的-641 位点处多出一段 16 bp 的序列 (TGTG-TATGATGACCGG),另外在 G-box、DOF 结合位

点、P 结合位点、Enhancer 和 bZIP 结合位点这 5 处存在细微差别,或是一个碱基的替换,或是一个碱基的丢失(见图 5)。

2.2 花生转基因载体的构建

用 *Hind* III 和 *Bam*H I 对 pBIN 35S-mGFP4 载体酶切,将其 35S 启动子部分切除。原来载体片段约 13 kb,而 35S 启动子部分长 834 bp,酶切前仅一条约 13 kb 的条带,酶切后出现一条约 12 kb 的条带和一条 800 bp 左右的条带,回收约 12 kb 的大片段。用相同的酶 *Hind* III 和 *Bam*H I 对已插入了启动子片段的中间载体进行酶切。由于克隆启动子内部也有 *Hind* III 和 *Bam*H I 酶切位点,结果得到一条 2.6 kb 左右的条带,一条 1.9 kb 左右的条带和一条 200 bp 左右的条带,与理论结果相符(酶切结果见图 3,中间载体 1P2 见图 4),回收约 1.9 kb 的条带。



M: λ DNA/*Hind* III *Eco* R I ;
Lane 1: Digestion of 1P2 by
Hind III and *Bam*H I

**图 3 中间载体 1P2 酶切
产物电泳图**
Fig. 3 Identification of the
inter-mediate vector by
restriction enzyme digestion

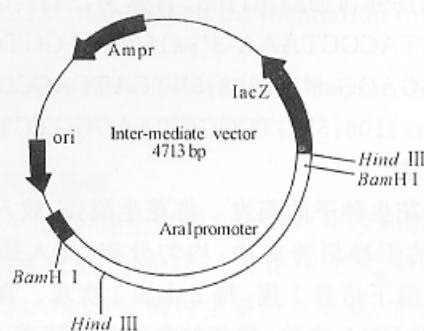
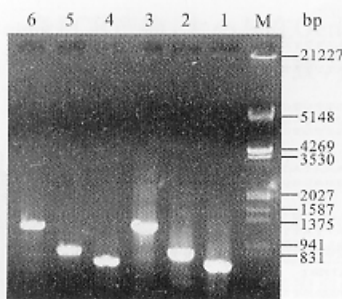


图 4 中间载体 1P2 图谱
Fig. 4 The inter-mediate vector 1P2

将启动子片段与经改造的载体连接后,转化 DH5 α 感受态细胞,在含卡那霉素的选择性培养基上长出菌落,随机挑选出二十几个单克隆。以菌液为模板,1 个正向引物和 3 个反向嵌套引物 PCR 检测,分别得到 1 200 bp、800 bp 和 700 bp 左右的片段,与以含中间载体的转化子为模板的 PCR 结果相同(见图 6,以其中的一个阳性克隆为例)。从筛选出的 11 个阳性克隆中,随机挑出一个克隆,从中提出质粒,用 *Hind* III 和 *Bam*H I 酶切该质粒,得到一个 12 kb 左右



M: λ DNA/*Hind* III *Eco*R I; 1—3: PCR products using the transformants containing the inter-mediate vector as template and three pairs of nested primers; 4—6: PCR products using the transformants containing the constructed vector as template and three pairs of nested primers

图 6 植物转基因载体 pGA1 PCR 检测电泳

Fig. 6 PCR identification of pGA1 with nested primers

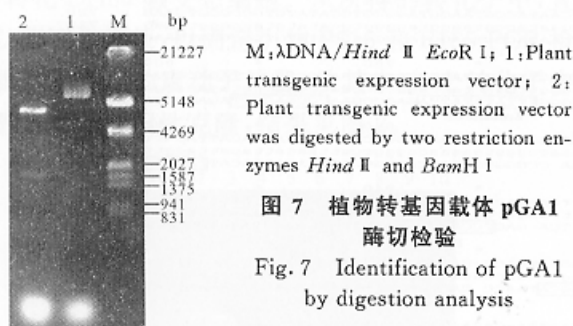


图 7 植物转基因载体 pGA1 酶切检验

Fig. 7 Identification of pGA1 by digestion analysis

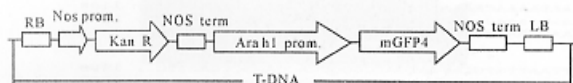


图 8 植物转基因表达载体 pGA1 部分图谱

Fig. 8 Partial structure of plant expression vector pGA1

3 讨论

PCR (polymerase chain reaction, 即聚合酶链式反应) 自问世以来, 以其简便快捷的特点深受人们的喜爱。但由于其所使用的 TaqDNA 聚合酶缺乏 3'-5' 外切酶活性, 在 PCR 反应中当发生某些单核苷酸错配时, Taq 酶无校正功能, 从而造成核苷酸错误掺入 PCR 产物中^[8]。本实验为了避免这一问题对启动子功能“盒子”的破坏, 采用 PFU 高保真酶进行保护。同时在回收目的片段时我们采用手提式紫外灯 (紫外强度小), 并缩短凝胶在紫外光下的曝露时间, 尽量避免紫外线造成的碱基突变, 保持启动子的完整性。

测序结果和原始序列存在个别碱基的差别。其中有 5 处功能元件 (G-Box, DOF 结合位点, P 结合位点, Enhancer 和 bZIP 结合位点) 与原始序列不同, 或是 A 变为 T, 或是 C 变为 G, 也有碱基丢失的情况出现。另外, 所得序列在与原始序列对应的 -641 位置后多出一 16 bp 的片段。这些差异也可能是由于

品种间的差异所造成的, 也可能由于 PCR 错配造成。究竟这些细微的差别是否影响启动子的功能, 还需进一步验证。但其它“盒子”完全相同, 可供后续研究。

在 *Ara h 1* 基因启动子的各功能元件中, TATA boxes 对 RNA 酶 II 的定位并起始转录起重要作用; GATA 结合基序与基因的组织特异性表达有关; 含有 ACGT 的 DNA 基序, 尤其是在 A-, C-, 和 G- 盒子中, 可能是亮氨酸拉链蛋白 (bZIP) 结合位点, 与基因的转录效率有关; 而 3 个富含 AT 的序列, 可增强基因的表达, 认为是 *Ara h 1* 基因启动子的增强子; 另外, RY 因子与种子特异性基因和贮藏蛋白的表达有关^[9,10]。这些顺式作用元件、调控因子结合位点和几个转录起始位点的存在均说明 *Ara h 1* 基因启动子是潜在的强启动子, 而且近来的研究还发现 *Ara h 1* 蛋白还有胰蛋白酶抑制剂活性, 可能与植物防御害虫的机制有关^[5]。因此, 这一表达载体的成功构建, 是进一步研究 *Ara h 1* 基因启动子的功能, 探讨转录因子与启动子的作用机理, 建立花生生物反应器来生产口服疫苗的第一步, 具有重要的意义。

致谢: 衷心感谢中国科学院水生生物研究所徐旭东老师及付娟博士提供的帮助。

参考文献:

- [1] 陈章良. 植物基因工程研究 [M]. 北京: 北京大学出版社, 1992. 5—6.
- [2] 王颖, 麦维军, 梁承郭, 张明永. 高等植物启动子的研究进展 [J]. 西北植物学报, 2003, 23(11): 2 040—2 048.
- [3] Burks W, Sampson H A, Bannon G A. Peanut allergens [J]. *Allergy*, 1998, 53(8): 725—730.
- [4] Koppelman S J, Bruijnzeel-Koomen C A, Hensing M, de Jongh H H. Heat-induced conformational changes of *Ara h 1*, a major peanut allergen, do not affect its allergenic properties [J]. *J Biol Chem*, 1999, 274(8): 4 770—4 777.
- [5] Viquez O M, Konan K N, Dodo H W. Structure and organization of the genomic clone of a major peanut allergen gene, *Ara h 1* [J]. *Molecular Immunology*, 2003, 40(9): 565—571.
- [6] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程 [M]. 第 2 版. 北京: 科学出版社, 2002. 744.
- [7] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指南 [M]. 第 3 版. 北京: 科学出版社, 2003.
- [8] 曹仪植. 植物分子生物学 [M]. 北京: 高等教育出版社, 2002. 132.
- [9] Chandrasekharan M B, Bishop K J, Hall T C. Module-specific regulation of the β -phaseolin promoter during embryogenesis [J]. *The Plant Journal*, 2003, 33: 853—866.
- [10] Ezcurra I, Ellerstrom M, Wycliffe P, Stalberg K. Interaction between composite elements in the *napA* promoter; both the B-box ABA-responsive complex and the RY/G complex are necessary for seed-specific expression [J]. *Plant Molecular Biology*, 1999, 40(4): 699—709.