

基于 Cre/loxP 重组系统的多基因载体构建及烟草转化研究

贾香楠¹ 李 伟¹ 沈俊岭¹ 欧阳昆唏¹ 陈晓阳^{1,2}

(1 北京林业大学林木育种国家工程实验室 2 华南农业大学林学院)

摘要:利用一套基于 Cre/loxP 重组系统的植物多基因表达载体系统将苏云杆菌毒蛋白基因 (*BtCryIac*)、甜菜碱醛脱氢酶基因 (*BADH*)、GA20 氧化酶基因 (*pttGA20ox*) 和 *rolB* 基因构建于植物表达载体 pYL1305 上,命名为 pYL1305BBGR。采用农杆菌介导的叶盘法转化烟草,经 PCR 和 Southern blot 检测发现,多基因已成功转入烟草基因组中;经半定量 RT-PCR 检测证实 4 个基因均能正常表达。

关键词: Cre/loxP 重组系统;多基因表达载体;*BtCryIac* 基因;*BADH* 基因;*pttGA20ox* 基因;*rolB* 基因

中图分类号: Q341 文献标志码: A 文章编号: 1000-1522(2010)05-0121-05

JIA Xiang-nan¹; LI Wei¹; SHEN Jun-ling¹; OUYANG Kun-xi¹; CHEN Xiao-yang^{1,2}. **Construction of multi-gene expression vector and tobacco transformation based on Cre-LoxP recombination system.** *Journal of Beijing Forestry University* (2010) 32(5) 121-125 [Ch, 16 ref.]

1 National Engineering Laboratory of Forest Tree Breeding, Beijing Forestry University, 100083, P. R. China;

2 College of Forestry, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, P. R. China.

Using a system of multi-gene plant expression vector based on a set of Cre-LoxP recombination system, the *BtCryIac*, *BADH*, *pttGA20ox* and *rolB* genes were inserted into the plant expression vector pYL1305, which was named pYL1305BBGR. The tobacco was transformed by leaf disc method mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Tested by PCR and Southern blot, the multi genes have been successfully transferred into the genome of tobacco. The semi-quantitative RT-PCR analysis showed that all the 4 genes were expressed normally.

Key words Cre-loxP recombination system; multi-gene expression vector; *BtCryIac* gene; *BADH* gene; *pttGA20ox* gene; *rolB* gene

长期以来,培育优质、高产、多抗的植物新品种,一直是人们努力探索的目标。随着分子生物学和基因工程的发展,通过转入目的基因而获得性状优良的植物新品种已成为植物育种的一个重要手段。但以往的研究,多将 1 个或 2 个基因转入植物中^[1-5],改良其某一性状,并不能满足育种要求。多基因组装是将多个基因及其各自的调控元件构建于同一个植物表达载体中,可通过一次转化将多个基因转入植物基因组,从而得到多价基因同时表达的转基因植物。高效的多基因载体构建是这一理念的核心。

人们对载体的选择^[6-7]、辅助载体和稀有酶切位点的引入^[8]、重组技术的应用^[9]等进行了不断探索, Lin 等^[10]利用位点特异性重组系统 Cre/loxP 和 Homing endonucleases,基于 TAC 载体开发了多基因植物转化载体系统。通过 1 个接受载体与 2 种供给载体交替重组可以不断引入外源 DNA 片段,并利用此系统成功构建了植物转化载体 pYL747H-GMBXRRPGM (约 50 kb),包含 8 个基因和 2 个 MARs 序列。检测发现转化粳稻 (*Oryza sativa*) 各基因均整合于水稻 (*O. latifolia*) 基因组中,并能稳定

收稿日期:2010-03-29

基金项目:教育部科学技术研究重点项目(01028)。

第一作者:贾香楠,博士生。主要研究方向:林木基因工程。电话:010-62390820 Email:jiaxiangnan0616@163.com 地址:100083 北京市清华东路 35 号北京林业大学生物科学与技术学院。

责任作者:陈晓阳,教授,博士生导师。主要研究方向:林木基因工程。电话:020-2285280001 Email:yxchen@scau.edu 地址:510642 广州市天河区五山华南农业大学林学院。

本刊网址: <http://www.bjfjournal.cn>; <http://journal.bjfu.edu.cn>

遗传。阮小蕾等^[11]利用此系统,成功构建既抗真菌又抗病毒的植物多基因表达载体 pYL747NH-c-C-FBC。王亮等^[12]构建了植物表达载体 pYL747H-MAR-BADH-CMO-MAR,以期提高植物耐盐性。

本研究利用 Cre/loxP 重组系统首次将 *BtCryIac* 基因、*BADH* 基因、*pttGA20ox* 基因和 *rolB* 基因构建于植物表达载体 pYL1305 上,命名为 pYL1305BBGR,用于转化烟草,为提高林木的抗虫性和耐盐碱性、促进顶端优势和生根能力奠定基础。

1 材料与方法

1.1 基因、质粒与菌株

pYL1305、pYL-d1、pYL-d2 质粒和 NS3529 菌株,由华南农业大学刘耀光教授惠赠;*BtCryIac* 基因由中国科学院遗传发育所胡赞民研究员惠赠;载体 pBI121-*BADH*、pBin19*rolBGA* 由本实验室保存。

1.2 酶和试剂

试验所采用的限制性核酸内切酶、T₄ 连接酶和 KOD plus DNA Polymerase 由 NEB 公司生产;Pfu DNA Polymerase、Taq DNA Polymerase、DNA Ladder 和 DNA 片断回收试剂盒由北京天根生化科技有限公司生产;卡那霉素(Kna)、氨苄青霉素(Amp)、潮霉素(Hyg)及其他试剂为 Sigma 公司生产或国产分析纯试剂。

1.3 多基因组装程序

接受载体与供给载体共转化 *E. coli* NS3529(携带和表达 Cre 基因),使两种质粒在其细胞内发生重组整合。取菌液涂于卡那霉素和氯霉素双抗平板上,次日混收菌落提取质粒,用 *I-Sce I* 酶切质粒,以切断未重组的供给载体和未剔除供给载体骨架的重组质粒。热激转化 *E. coli* DH10B 感受态细胞,取适量菌液涂于卡那霉素平板上。将得到的菌落接种到氯霉素平板上,选取在卡那霉素平板上能生长而在氯霉素平板上不能生长的菌落进行质粒提取,做 *NotI* 酶切验证。此质粒依靠供体载体又重新引回 *PI-SceI* 位点,成为第 2 轮循环的受体载体,依此类推。

质粒 DNA 提取、酶切、片段回收、连接、转化及重组体筛选参照文献[13]的方法进行。

1.4 叶盘法转化及抗性植株的筛选

农杆菌介导的叶盘法转化烟草参照文献[14]的方法进行,选择剂为潮霉素,叶片分化添加 Hyg 20 mg/L,植株生根添加 Hyg 25 mg/L。

1.5 PCR 和 Southern blot 检测

利用 CTAB^[13]法提取具有 Hyg 抗性的转化植株和阴性植株的总 DNA。PCR 的扩增引物分别为:*HPT* 基因, hpt1: 5'-CGCTTCTGCGGCGATTGT-3',

hpt2: 5'-GACAGCGTCTCCGACCTGAT-3'; *BtCryIac* 基因, Fbt: 5'-AAAACCATGGACAACAATCCCAACA TCAACGAG-3', Rbt: 5'-AATAAGGTGACCTTACTC GAGCGTTGCAGTAACGGGAATG-3'; *BADH* 基因, 1530U: 5'-TTGGATCCTGCAGACCAGGTCTAGAAT G-3', 1530L: 5'-GCGAGCTCTTTTCAAGGAGACTTG TACCA -3'; *pttGA20ox* 基因, ga20-1: 5'-GCC GTCTAGAATGGCAATAGATTGCATC-3', ga20-2: 5'-CACAGAGCTCGCTAATCCAACCTTTTATTGGTC-3'; *rolB* 基因, rolb1: 5'-CCTCTAGATGGATCCCAAA TTGCTATTCT-3', rolb2: 5'-GAATTCCTGATCTAG TAACATAGATGACAC-3'。DNA 聚合酶为 Long Taq, PCR 扩增程序为:94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 30 s, 58℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1~2 min, 进行 30 个循环后再延伸 10 min。反应结束后,进行 1% 的琼脂糖电泳,检测扩增结果。

Southern blot 按照 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 和文献[13]操作步骤进行。

1.6 转基因植株的 RT-PCR 检测

采用 RNA plant Reagent 法提取总 RNA, Promega 公司试剂盒(Reverse Transcription System)进行 RNA 的反转录,以 *ACTIN* 基因为内参,扩增检测各基因的表达情况。

2 结果与分析

2.1 植物表达载体 pYL1305-*BtCryIac*-*BADA* 的构建

在利用重组技术构建多基因载体之前,充分利用表达载体本身的酶切位点,将目的基因构建到表达载体上。采用 PCR 的方法从 pBI121-*BtCryIac* 上扩增 *BtCryIac* 片段,并在扩增所用引物中加上 *gus* 基因两侧的单一酶切位点 *NcoI* 和 *BstEII*,酶切、连接,得到 pYL1305-*BtCryIac*。

采用既具有高保真性、又具有较强的长片段扩增效力的 KOD plus 酶扩增 CaMV35S-*BADH*-nos 表达盒,同时在两端添加酶切位点 *SalI* 和 *KpnI*,并插入到 pYL1305-*BtCryIac* 上的多克隆位点,得到表达载体 pYL1305-*BtCryIac*-*BADH*。

以 pYL1305-*BtCryIac* 为模板,用 *NcoI* 和 *BstEII* 双酶切质粒,得到了约 1.85 kb 的 *BtCryIac* 片断(图 1),说明植物表达载体 pYL1305-*BtCryIac* 构建成功。用 *SalI* 和 *KpnI* 酶切 pYL1305-*BtCryIac*-*BADH*, 结果如图 2 所示。酶切得到约 2.2 kb 的片段,与 CaMV35S-*BADH*-nos 表达盒大小一致,说明植物表

达载体 pYL1305-*BtCryIAc*-*BADH* 构建成功。

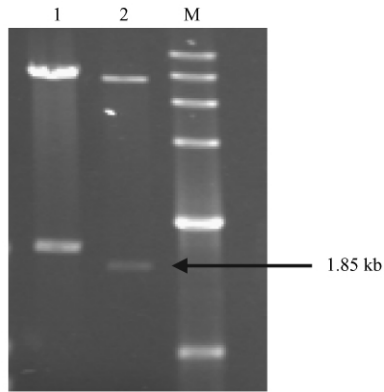


图 1 pYL1305-*BtCryIAc* 的酶切鉴定

Fig. 1 Detection of vector pYL1305-*BtCryIAc* digested by endonucleases

注: M 为 DL15000 DNA Marker, 1 为 pYL1305 的 *Nco*I 和 *Bst*E II 酶切 2 为 pYL1305-*BtCryIAc* 的 *Nco*I 和 *Bst*E II 酶切。

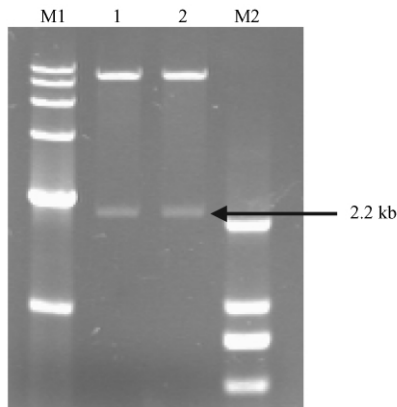


图 2 pYL1305-*BtCryIAc*-*BADH* 的酶切鉴定

Fig. 2 Detection of vector pYL1305-*BtCryIAc*-*BADH* digested by endonucleases

注: M1 为 DL15000 DNA Marker, M2 为 DL2000 DNA Marker, 1~2 为 pYL1305-*BtCryIAc*-*BADH* 的 *Sal*I 和 *Kpn*I 酶切。

2.2 植物表达载体 pYL1305-*BtCryIAc*-*BADH*-*GA20ox*-*rolB* 的构建

CaMV35S-*GA20ox*-nos 表达盒和 GH3-*rolB*-nos 表达盒克隆在 pBin19*rolBGA* 载体上, 大小分别为 2.6 和 1.88 kb。用 *Kpn*I 和 *Sal*I 将 aMV35S-*GA20ox*-nos 表达盒切下, 与经同样酶切的 pYL-d1 载体片段连接, 得到供给载体 pYL-d1-*GA20ox*。PCR 扩增得到 GH3-*rolB*-nos 表达盒, 同时两端加上 *Xba*I 和 *Kpn*I 酶切位点, 与同样酶切的 pYL-d2 载体连接, 得到供给载体 pYL-d2-*rolB*。

接受载体 pYL1305-*BtCryIAc*-*BADH* 与供给载体 pYL-d1-*GA20ox* 进行重组, 得到表达载体 pYL1305-*BtCryIAc*-*BADH*-*GA20ox*, 进行 *Not*I 酶切验证(图 3)。在凝胶上出现 5 条带, 比 pYL1305-*BtCryIAc*-*BADH* 多出 2 条带, 因为 pYL1305-

BtCryIAc-*BADH* 本身有 3 个 *Not*I 酶切位点, 与 pYL-d1-*GA20ox* 重组后又引入 2 个 *Not*I 酶切位点, 因此 pYL1305-*BtCryIAc*-*BADH*-*GA20ox* 共有 5 个 *Not*I 酶切位点, 且均相隔一定距离。酶切结果均与理论大小一致, 其中位于 2.6 kb 的条带为 CaMV35S-*GA20ox*-nos 表达盒。

同上, pYL1305-*BtCryIAc*-*BADH*-*GA20ox*-*rolB* 共有 7 个 *Not*I 酶切位点, 因为 *GA20ox* 基因表达盒与 *rolB* 基因表达盒相邻的 2 个 *Not*I 酶切位点之间只有几十 kb, 在凝胶上不能显示, 因此用 *Not*I 酶切 pYL1305-*BtCryIAc*-*BADH*-*GA20ox*-*rolB* 在凝胶上显示 6 条带, 均与理论大小一致, 其中位于 1.8 kb 的条带为 GH3-*rolB*-nos 基因完整表达盒(图 4)。

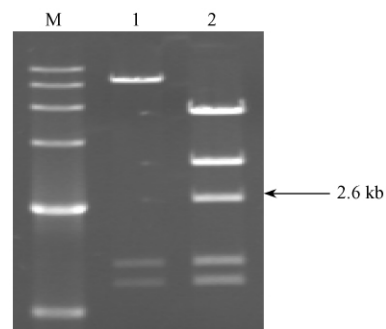


图 3 pYL1305-*BtCryIAc*-*BADH*-*GA20ox* 的酶切鉴定

Fig. 3 Detection of vector pYL1305-*BtCryIAc*-*BADH*-*GA20ox* digested by endonucleases

注: M 为 DL15000 DNA Marker, 1 为 pYL1305-*BtCryIAc*-*BADH* *Not*I 酶切 2 为 pYL1305-*BtCryIAc*-*BADH*-*GA20ox* 的 *Not*I 酶切。

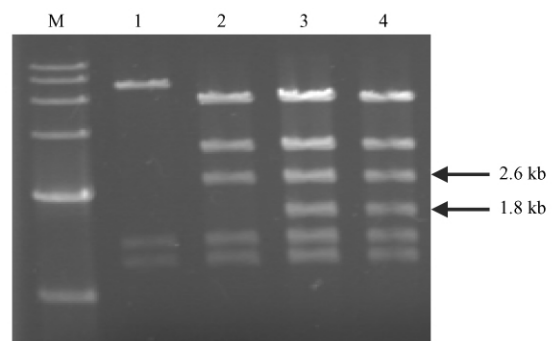


图 4 pYL1305-*BtCryIAc*-*BADH*-*GA20ox*-*rolB* 的酶切鉴定

Fig. 4 Detection of vector pYL1305-*BtCryIAc*-*BADH*-*GA20ox*-*rolB* digested by endonucleases

注: M 为 DL15000 DNA Marker, 1 为 pYL1305-*BtCryIAc*-*BADH* 的 *Not*I 酶切, 2 为 pYL1305-*BtCryIAc*-*BADH*-*GA20ox* 的 *Not*I 酶切, 3~4 为 pYL1305-*BtCryIAc*-*BADH*-*GA20ox*-*rolB* 的 *Not*I 酶切。

2.3 转基因植株的 PCR 检测

采用农杆菌介导的叶盘法将多基因转化烟草, 提取抗性烟草组培苗的基因组 DNA, 以质粒 pYL1305BBGR 作阳性对照, 以未转基因植株作为阴

性对照,进行 PCR 检测。检测结果表明:获得了 15 株 PCR 阳性的植株(共检测 20 株潮霉素抗性植株),以部分植株样品的 *HPT* 基因、*BtCryIAc* 基因、*BADH* 基因、*GA20ox* 基因和 *rolB* 基因的 PCR 产物为代表的电泳结果如图 5 所示。从图 5 可以看出:7 个阳性植株均能够扩增出与质粒大小一致的条带,而未转化植株没有得到相应条带,初步说明 5 个基因均已整合到烟草基因组中。

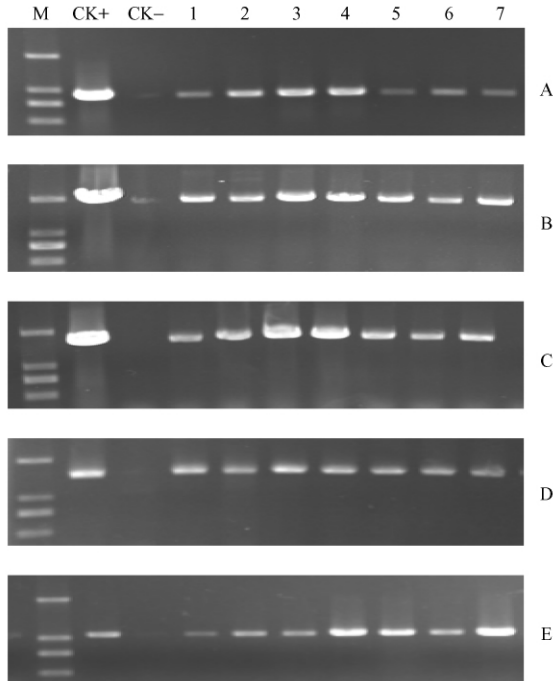


图 5 多基因转化烟草植株的 PCR 检测

Fig. 5 PCR detection of multi-gene transgenic tobaccos

注:M 为标准分子量 DL2000,CK+ 为阳性对照,CK- 为阴性对照,1~7 为 PCR 阳性植株;A 为 *HPT* 基因,B 为 *BtCryIAc* 基因,C 为 *BADH* 基因,D 为 *GA20ox* 基因,E 为 *rolB* 基因。

2.4 转 *BtCryIAc*-*BADH*-*pttGA20ox*-*rolB* 多价基因植株的 Southern blot 检测

选取生长健壮的 PCR 阳性植株,提取植株总 DNA,经 *HPT* 基因两端的 *Xho*I 酶切消化,用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离后,经过变性、中和、转膜,以 *HPT* 基因为探针进行 Southern 杂交分析。杂交结果如图 6 所示,其中 4 个转化植株出现了明显的杂交信号条带(编号为 T1~T4),且多基因与 *HPT* 基因位于同一个 T-DNA 区,说明目的基因已经整合到 T1~T4 烟草基因组中。

2.5 转基因植株的半定量 RT-PCR 检测

分别提取转化株系 T1~T4 组培植植株叶片的总 RNA,并进行反转录反应,得到第一链 cDNA。图 7A 显示的是各 RNA 提取情况。图 7B 是以 RNA 反转录形成的单链 cDNA 为模板扩增的烟草 *actin* 基因条带,可以看出,各株系的 cDNA 扩增的 *actin* 基因

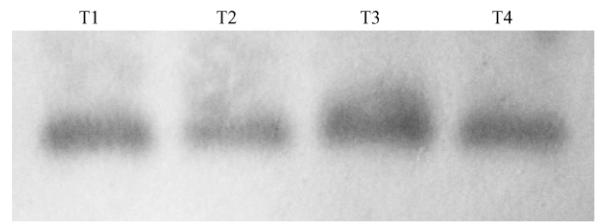


图 6 多基因转化烟草植株的 Southern 检测

Fig. 6 Southern detection of multi-gene transgenic tobaccos

片段丰度基本一致,说明可用于目的基因的组织表达分析。图 7C 显示转基因烟草不同株系 *BtCryIAc* 基因的表达情况,从电泳条带的明暗程度可知,在不同株系中 *BtCryIAc* 基因的表达存在明显差异。株系 T2 表达丰度最高,株系 T3 其次,株系 T1 和 T4 的表达丰度极低。从图 7D 可知,各株系 *BADH* 基因表达丰度均较高,其中株系 T2 表达丰度最高,T3 次之,T1 和 T4 相差不大。*pttGA20ox* 基因的表达情况如图 7E 所示,表达丰度为 T2 > T3 > T4 > T1;而各株系叶片中 *rolB* 基因的表达均较低,这可能与 *rolB* 基因主要在根部表达有关(图 7F)。同一基因在不同植株间表达量的差异可能是由于插入位点的不同造成的。

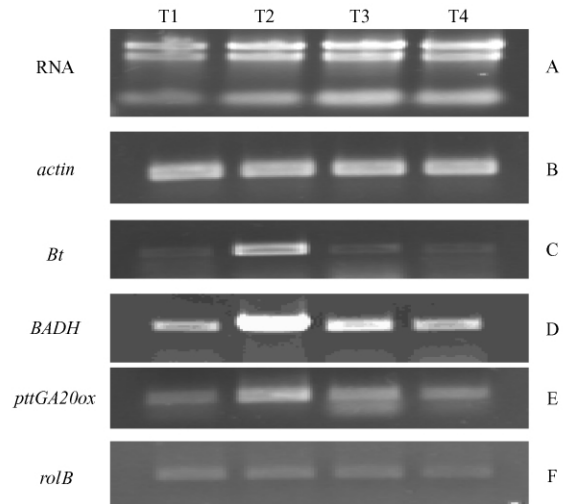


图 7 转基因植株的 RT-PCR 检测

Fig. 7 RT-PCR analysis on transgenic plants

3 结论与讨论

植物新型多基因组载体系统,包含 1 个受体载体、2 个供体载体和 1 个能表达 Cre 酶基因的大肠杆菌(NS3529),利用 Cre/loxP 重组系统来实现目的基因在受体载体上的插入。当携带有目的基因的供体载体和受体载体共转化入 NS3529 中时,供体载体就会通过 loxP 位点将所带的目的基因整合到受体载体中,只需交替使用 2 个供体载体,就可以将多个目的基因连入同一个载体中,避免了传统酶切

连接法构建多基因载体时受到的有限酶切位点的限制。多基因单载体转化也较以往的杂交法、重复转化法、共转化法^[15]等简单易行,省时省力,避免共转化频率低,后代中目的基因分离、重组等问题。

基因的表达需要相应的启动子和终止子进行调控,在此多基因组载体系统中并不含有特定的启动子和终止子,因此,插入外源基因时还要使基因带上各自的启动子和终止子,这使得人们可以按照不同的基因选择相应的启动子和终止子。构建载体时,过多地选择同源序列的启动子和终止子易造成转基因沉默^[13]。本研究中构建的多基因载体包含筛选基因在内共5个基因,除 *rolB* 基因由特异启动子 GH3 驱动,其余基因均由组成型启动子 CaMV35S 驱动,转基因植株检测表明,各基因均能正常表达,未出现基因沉默现象。这说明,在构建多基因载体时,一定数目的同源启动子不会致使基因沉默,但随着基因的增多应该考虑更换不同启动子或在基因两端添加核基质结合区(MAR)序列^[16],以避免转基因沉默。

本研究利用一套基于 Cre/loxP 重组系统的植物多表达载体系统,首次将 *BtCryIAc* 基因、*BADH* 基因、*pttGA20ox* 基因和 *rolB* 基因构建于同一载体上。通过对转多基因烟草检测发现,多基因均已整合到烟草基因组中,并能正常表达。下一步将利用此多基因表达载体转化毛白杨(*Populus tomentosa*),为培育抗虫、耐盐碱、高产、高扦插成活率的毛白杨奠定基础。

参 考 文 献

[1] ZHU L H, LI X Y, AHLMAN A, et al. The rooting ability of the dwarfing pear rootstock BP10030 (*Pyrus communis*) was significantly increased by introduction of the *rolB* gene [J]. *Plant Science* 2003, 165:829-835.

[2] 熊瑾, 陈晓阳, 梁机, 等. 毛白杨转 *rolB* 基因植株生根能力的研究 [J]. 北京林业大学学报, 2005, 27(5):54-58.

[3] 李伟, 李慧, 陈晓阳. 转 *rolB/pttGA20ox* 双价基因提高银白杨生根能力及生长速度的研究 [J]. 北京林业大学学报, 2009, 31(2):92-95.

[4] 杨敏生, 李志兰, 王颖, 等. 双抗虫基因对三倍体毛白杨的转化和抗虫性表达 [J]. 林业科学, 2006, 42(9):62-67.

[5] 陈英, 戴咏梅, 黄敏仁, 等. 双价抗病基因植物表达载体构建及在烟草中表达的初步研究 [J]. 林业科学, 2005, 41(5):82-85.

[6] HAMILTON C M, FRARY A, LEWIS G T, et al. Stable transfer of intact high molecular weight DNA into plant chromosomes [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1996, 93(18):9975-9979.

[7] LIU Y G. Complementation of plant mutants with large DNA fragments by a transformation-competent artificial chromosome vector accelerates positional cloning [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96(11):6535-6540.

[8] GODERIS I J. A set of modular plant transformation vectors allowing flexible insertion of up to six expression units [J]. *Plant Mol Biol* 2002, 50:17-27.

[9] MCCORMAC A C, ELLIOTT M C, CHEN D F. pBECKS2000: A novel plasmid series for the facile creation of complex binary vectors, which incorporates "clean-gene" facilities [J]. *Mol Gen Genet*, 1999, 261:226-235.

[10] LIN L, LIU L G, XU X P, et al. Efficient linking and transfer of multiple genes by a multigene assembly and transformation vector system [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2003, 100(10):5962-5967.

[11] 阮晓蕾, 李华平. 经修饰的烟草几丁质酶基因的克隆及多基因香蕉转化载体构建 [J]. 华南农业大学学报, 2008, 29(1):23-27.

[12] 王亮, 苏乔, 安利佳. 利用 Cre/loxP 重组系统构建甜菜碱合成酶多基因表达载体 [J]. 高技术通讯, 2007, 17(7):749-754.

[13] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程 [M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2002.

[14] 李伟, 陈晓阳, 杜金友, 等. *PttGA20ox1* 基因在转化烟草植株中的表达 [J]. 西北植物学报, 2006, 26(1):7-11.

[15] 李宝健, 朱华晨. 论应用多基因转化策略综合改良生物体遗传性研究方向的前景 [J]. 中山大学学报(自然科学版), 2004, 43(6):11-16.

[16] 王天云, 柴玉荣, 袁保梅, 等. 核基质结合区对转基因表达的影响及其作用机制 [J]. 细胞生物学杂志, 2004(26):587-590.

(责任编辑 李文军)