

植物双元表达载体 pCRI1210 的构建及其功能验证

尹 国¹, 李世云¹, 路正营¹, 韩永亮¹, 王 晔², 张彦波¹, 洪伟东², 商海红²,
张朝军², 张雪妍², 李俊玲¹, 李付广²

(¹邯郸市农业科学院, 河北邯郸 056001; ²中国农业科学院棉花研究所, 河南安阳 455000)

摘要: pBI121 是转基因研究中的常用载体, 但其多克隆位点相对较少, 所携带的 *GUS* 基因检测较为复杂。为了增加其多克隆位点, 增强其表达效率, 简化其检测方法, 本研究在 pBI121 载体的基础上, 在其骨架中插入含有 CaMV35S 启动子、棉花 β -tubulin 基因内含子和 CaMV 35S polyA 终止子的干涉表达框, 该表达框含有 *GFP* 报告基因。通过验证, 所插入的干涉表达框能够正常表达插入的外源基因, 且 *GFP* 基因可以正常表达。该载体被命名为 pCRI1210, 它是一种双元植物表达载体, 既可以用来当作表达载体, 又可以用作干涉载体。本研究为转基因研究提供了一种非常实用的工具。

关键词: 双元表达载体; pCRI1210; 功能验证

Construction and Function Analysis of a Plant Binary Expression Vector pCRI1210

YIN Guo¹, LI Shi-yun¹, LU Zheng-ying¹, HAN Yong-liang¹, WANG Ye², ZHANG Yan-bo¹, HONG Wei-dong²,
SHANG Hai-hong², ZHANG Chao-jun², ZHANG Xue-yan², LI Jun-ling¹, LI Fu-guang²

(¹ Handan Academy of Agricultural Sciences, Handan 056001; ²

Institute of Cotton Research, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Anyang 455000)

Abstract: Vector is an indispensable tool in the process of transgenic research. Researchers usually connect foreign target genes with vectors and import vectors into target plants (animals) by technical means to observe the role played by target genes. Therefore, many factors, such as the success of vector selection, the efficiency of vector transformation and expression, the difficulty of vector detection and the level of metabolic burden, determine the success or failure of the test to a certain extent. Therefore, the use of a simple, easy to transform, high expression, easy to detect and small metabolic burden is very important. Based on this, the vector pCRI1210 was successfully constructed by inserting an interference frame and replacing reporter gene on the basis of the commonly used vector pBI121. pBI121 was commonly used in the study of genetically modified (gm), but its multiple cloning site was relatively small, and *GUS* gene detection was more complicated. In order to increase its multiple cloning loci, enhance its expression efficiency, and simplify the detection method, a plant binary expression vector, named pCRI1210, was constructed on the basis of pBI121 vector, which contained CaMV 35S promoter, cotton β -tubulin gene introns, CaMV 35S polyA terminator and interference expression box with *GFP* as reporter gene. Functional analysis in tobacco showed that the interference express cassette could normally expressed exogenous gene and *GFP* gene. The vector had multiple cleavage sites in a TUB intron 5' and 3', so that target gene could be positive and reverse inserted and hairpin structure of dsRNA was built. In addition, the vector carries multiple cloning sites at both 5' and 3' of the CaMV 35S promoter, which could easily exchange 35S promoter to study other promoter functions. pCRI1210

收稿日期: 2017-01-20 修回日期: 2017-04-21 网络出版日期: 2017-08-14

URL: <http://kns.cnki.net/kcms/detail/11.4996.S.20170814.0939.010.html>

基金项目: 国家棉花产业技术体系项目 (CARS-18-28); 河北省科技计划项目 (16226307D)

第一作者主要从事棉花分子育种研究。E-mail: yinguo7514053@163.com

通信作者: 李世云, 主要从事转基因早熟棉新品种选育研究。E-mail: hdlshiyun@163.com

李付广, 主要从事植物分子生物学与基因工程研究。E-mail: aylifug@163.com

could be used as expression vector or interference vector. Through validation in tobacco, skin cells of the onion and the healing of the cotton embryo, it would be a very practical tool for transgenic research.

Key words: binary expression vector; pCRII210; functional verification

植物表达载体是进行植物转基因研究的必备工具之一,它可以携带目标基因片段导入植物细胞并和植物染色体上的 DNA 进行整合^[1-3]。在植物转基因研究领域,双元表达载体是应用范围最广的载体之一。目前,一系列表达载体在植物转基因研究中得到应用^[4],如 pCambia 载体家族。它们通常同时具备标记基因、报告基因以及多克隆位点,便于检测和操作。所使用的报告基因大多是 *GUS* 基因(即转 β -葡萄糖醛酸酶基因),虽然 *GUS* 基因的表达产物 *GUS* 蛋白相对较为容易检测^[5-6],但是,与 *GUS* 基因相比,绿色荧光蛋白(GFP, green fluorescent protein)的检测更加简便,在鉴定转基因材料时,不需要反应底物和其他辅助因子,也不需要前处理,只需要具备荧光显微镜或者激发光源,还可以活体检测,对转基因材料的损伤也较小^[7-9]。植物表达载体上携带的标记基因通常有 4 种^[10],最常用的是 *NPTII* 基因,操作简单,准确性和安全性高。

RNAi(RNA interference),即 RNA 干扰技术,是近年来得到成熟应用的一种特异基因表达阻断技术^[11]。它可以使双链 RNA(dsRNA, double stranded RNA)专一性阻断靶基因信使 RNA(mRNA)的表达并使其降解^[12-14]。有研究证实,转化含有内含子发夹 RNA(ihpRNA, intron-containing hairpin RNA)结构表达的 dsRNA,其沉默效率更高^[15-18]。

本研究在 pBI121 载体的基础上,在其骨架中插入含有 CaMV35S 启动子、棉花 β -tubulin 基因内含子和 CaMV 35S polyA 终止子的干涉表达框,并含有 *GFP* 作为报告基因。该载体在 TUB intron 的 5'端具有 5 个酶切位点:*Xba* I、*Age* I、*Kpn* I、*Avr* II、*Bam* H I,在 3'端具有 4 个酶切位点:*Eco* R I、*Sac* I、*Sal* I、*Sna* B I,可便于进行目的基因片段的正反向插入,构建可转录出发卡结构的 dsRNA。同时在 CaMV 35S 启动子的两端均有多克隆酶切位点,可根据需要对启动子进行替换。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 烟草种子 NC89,由中国农业科学院棉花研究所惠赠;陆地棉种子由邯郸市农业科学院早熟棉课题组提供。

1.1.2 质粒和菌株 植物表达载体 pBI121 由北京大学教授惠赠;克隆载体为 pMD 19-T Simple,购自 TaKaRa 公司;根癌农杆菌菌株 LBA4404 由中国农业科学院棉花研究所提供;大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株为 DH5 α 感受态细胞购自天根生物制品公司。

1.1.3 酶和试剂 Taq 酶、连接酶和限制性内切酶购自 TaKaRa 公司;配置培养基所用试剂购自 Sigma 公司和 Oxoid 公司;氨苄青霉素(Ampicillin, Amp)、卡那霉素(Kanamycin, Kan)和利福霉素(Rifamycin, Rif)购自上海生工;DNA Marker 购自天根生物制品公司;其他化学药品为国产分析纯。普通质粒小提取试剂盒 TIANprep Mini Plasmid 购自天根生物制品公司;DNA 回收试剂盒 Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System 购自 Promega 公司。

1.1.4 引物和测序 所用引物和测序服务由南京金思瑞生物技术公司完成。

1.2 载体构建方法

1.2.1 构建干涉表达框 以含有 CaMV 35S 启动子的 pBI121 载体(GenBank: AF485783.1)为模板,分别用引物 35S1;35S2 和 35S1;35S3(表1)通过 2 次 PCR 反应扩增得到两端添加了酶切位点的 CaMV35S 启动子片段(5'端添加的酶切位点为 *Sma* I、*Hind* III 和 *Xma* I,3'端添加的酶切位点为 *Bgl* II、*Kpn* I、*Xba* I 和 *Xho* I),并连接至 pMD19-T simple 载体上,得到中间载体 pMD19T-35S。

以含有 CaMV 35SpolyA 终止子的 pCADS1341 载体为模板,用引物 35SpolyA1;35SpolyA2 和 35SpolyA1;35SpolyA3(表1)通过 2 次 PCR 扩增获得了两端添加了酶切位点的 CaMV 35SpolyA 终止子(5'端添加的酶切位点为 *Sac* I、*Sal* I 和 *Sna* B I,3'端添加的酶切位点为 *Bgl* II),并连接至 pMD19-Tsimple 载体上,得到中间载体 pMD19T-polyA。PCR 反应体系包括有基因组 DNA 模板 1.0 μ L, dNTP mixture 2.0 μ L, ExTag DNA 聚合酶 0.125 μ L, 上、下游引物各 1 μ L, 10 $\times$ ExTag buffer 2.5 μ L, dd H₂O 补至 25 μ L;扩增程序为 95 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 次循环, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。反应结束后,取 6 μ L 反应产物在浓度为 1% 的琼脂糖凝胶上进行电泳检测。

表 1 引物名称及序列

Table 1 Primer name and sequence

引物名称 Primer name	引物序列 Primer sequence
35S1	5'-AAGCTTCCCGGTTATTGGCTAGAGCAGCTT-3'
35S2	5'-TACCGGTGATCTAGAAGCTCGAGAGAGATAGAT-3'
35S3	5'-CCGAGATCTATAGGTACCTGACCGGTGATCTAGAAGC-3'
35SpolyA1	5'-TTGCTAGATCTCCGTACTGAATTAACGCCGAAT-3'
35SpolyA2	5'-GTCGACTCTACGTATCTGTGCGATCGACAAGCT-3'
35SpolyA3	5'-ATGAGCTCTCTTGTGCGACTCTACGTATCTGT-3'
AF1	5'-CCTAGGTATGGATCCACTCCAAGTTGTAAGTAT-3'
AF2	5'-TAGGTACCAATTACCTAGGTTATGGATCCACT-3'
AF3	5'-GAGCTCACTGAATTCTGAACATCAACATTACA-3'
AF4	5'-AGATCTTGAGAGCTCACTGAATTCTGAACAT-3'
GUSF1	5'-CTACACCACGCCGAACACCT-3'
GUSR1	5'-CACGCTTGGGTGCTTTTTTGTCTC-3'
GUSF2	5'-GAAAGCCGGGCAATTGCT-3'
GUSR2	5'-CACATCACCCAGCTTGGGT-3'

提取陆地棉叶片基因组 DNA,利用引物 AF1: AF3(表 1),通过 PCR 扩增得到 TUB intron 内含子片段;用引物 AF2: AF4(表 1)通过 PCR 扩增,在 TUB intron 内含子片段两端增加酶切位点(5'端添加的酶切位点为 *Kpn* I、*Avr* II 和 *Bam*H I,3'端添加的酶切位点为 *Bgl* II、*Sac* I 和 *Eco*R I),T/A 克隆至 pMD19-T simple 中,得到中间载体 pMD19T-AF。

利用 *Kpn* I 和 *Bgl* II 两种酶同时酶切上述中间载体 pMD19T-35S 和 pMD19T-AF,分别回收 3.5 kb 和 590 bp 的片段,连接后获得中间载体,利用 *Bgl* II 和 *Sac* I 同时酶切中间载体,回收 4.1 kb 片段;利用 *Sac* I 和 *Bgl* II 同时酶切载体 pMD19T-polyA 得到的 240 bp 片段;将 4.1 kb 片段和 240 bp 片段进行连接,得到含有干涉表达框的中间载体 pMD19T-35SAP。

1.2.2 修饰 pBI121 载体 用 *Sac* I/*Bam*H I 双酶切 pBI121 载体,得到的载体片段与报告基因 *EGFP* (GenBank:6 AF323988.1)连接,得到 pBI121-EGFP 表达载体。pBI121-EGFP 载体用 *Eco*R I 单酶切,平末端化进而去除载体上的 *Eco*R I 酶切位点。用同样的方法,分别去除 pBI121-EGFP 载体上的 *Sac* I、*Bam*H I 和 *Xba* I 酶切位点,得到 pBI121-GFPQ 中间载体。*Eco*R I、*Sac* I、*Bam*H I 和 *Xba* I 酶切位点位于 pBI121 载体中 *GUS* 基因的两侧。

1.2.3 构建 pCRI1210 载体 用 *Hind* III 单酶切 pBI121-GFPQ 中间载体,回收后将其末端平掉并和去磷酸化;用 *Hind* III 和 *Bgl* II 同时酶切中间载体 pMD19T-35SAP,回收 1.7 kb 片段,将其末端平掉,与上述单酶切 pBI121-GFPQ 中间载体后回收的载体片段进行连接,得到双元植物表达载体 pCRI1210(图 1)。

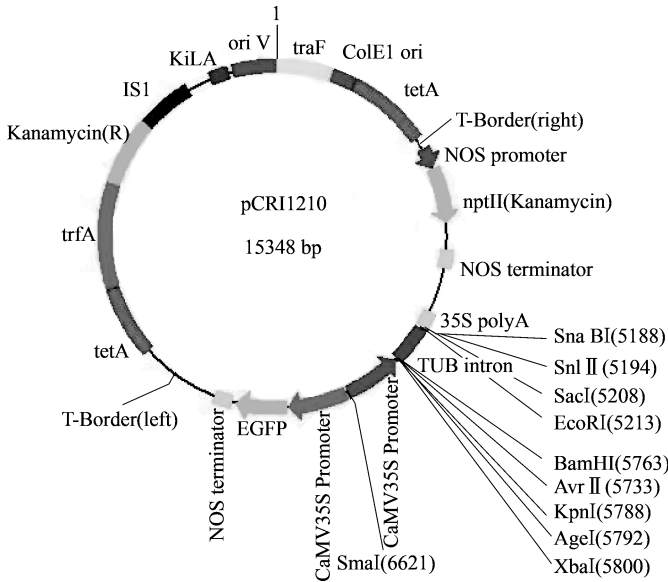


图 1 pCRI1210 质粒图谱

Fig. 1 The plasmid profile of pCRI1210

1.2.4 表达载体 pCRII210-GUS 的构建 用 *Bam*H I 和 *Sac* I 同时酶切质粒载体 pBI121 中的 *GUS* 基因和质粒 pCRII210 中的 TUB intron 部分, 分别回收 1.9 kb 和 15 kb 两部分片段, 将二者进行连接, 得到含有 *GUS* 和 *GFP* 基因的载体 pCRII210-GUS。将连接产物 pCRII210-GUS 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。未转化的大肠杆菌为空白对照, 转化 pBI121 载体的大肠杆菌为阳性对照; 利用 TIANprep Mini Plasmid Kit 试剂盒提取质粒 DNA, 用 *GUS* 基因的序列设计特异检测引物 GUSF1 和 GUSR1(表 1), PCR 检测所提取的质粒 DNA 是否为 pCRII210-GUS。

1.3 表达载体 pCRII210-GUS 的功能验证方法

1.3.1 表达载体的瞬时表达分析 将提取的 pCRII210-GUS 质粒 DNA 利用基因枪轰击转化法, 导入棉花胚性愈伤组织和洋葱表皮细胞中。然后, 将棉花胚性愈伤组织置于 MS 培养基上, 37 $^{\circ}$ C 暗培养 48 h, GUS 染色; 洋葱表皮在 MS 培养基上 28 $^{\circ}$ C 弱光培养 24 h, 在显微镜下观察荧光表达效果。

1.3.2 含 pCRII210-GUS 载体的农杆菌对烟草的转化

1.3.2.1 农杆菌转化 提取阳性单克隆中的质粒 DNA, 转化农杆菌 LB4404 感受态细胞。培养菌液, 利用无菌弯头玻璃棒将菌液均匀涂布在含有卡那霉素、利福平和链霉素的 YEB 固体培养基平板上, 28 $^{\circ}$ C 静止培养生长出单菌落; 待菌斑长至足够大后进行菌落 PCR 检测。将阳性单克隆菌落摇菌过夜培养至 OD600 = 0.3 ~ 0.6, 用于侵染。

1.3.2.2 烟草转化 将烟草叶片剪成 0.5 cm $\times$ 0.5 cm 大小的方块, 用升汞消毒 3 min, 用上述得到的含有 pCRII210-GUS 载体的农杆菌进行侵染, 移入 MS 共培养基中避光 28 $^{\circ}$ C 共培养 48 h。未转化烟草叶片为空白对照, 转化 pCRII210 的烟草叶片为空载体对照, 转化 pBI121 载体的烟草叶片为阳性对照。将叶片转入幼芽增殖 MS 固体抗性筛选培养基中, 置于 28 $^{\circ}$ C 人工气候箱中诱导幼芽分化。10 d 后, 出现幼芽。

将阳性幼芽用无菌刀片切下, 放入 GUS 染液中进行染色, 37 $^{\circ}$ C 保温过夜培养。用 70% ~ 75% 酒精脱色数次至酒精不变色, 呈深蓝色的为 GUS 检测阳性幼芽。待幼芽长成高度 4 cm 左右的幼苗时, 转移至生根培养基继续培养, 同时取部分叶片进行 GUS 染色。待上述烟草幼苗出现大量不定根后, 打开瓶盖避光常温炼苗 24 h, 将幼苗取出后用清水多次冲

洗根部, 取部分根放入 GUS 染液中染色, 幼苗移栽至花盆中。

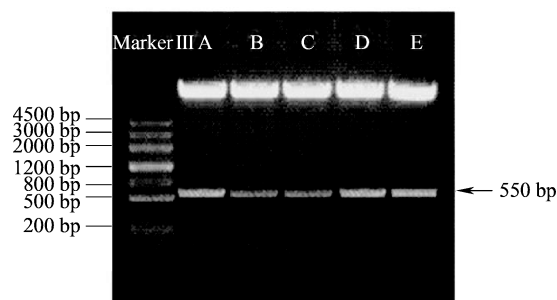
1.3.2.3 pCRII210-GUS 载体转化烟草的分子检测 分别取 pCRII210-GUS 载体转化的烟草植株、阳性对照、空白对照和空载体对照的幼嫩叶片, 提取 DNA, 分别用 *GUS* 基因的特异性检测引物 GUSF2 和 GUSR2 进行 PCR 检测(表 1)。

1.3.3 含有 pCRII210-GUS 载体的农杆菌对棉花下胚轴的转化 利用转化载体 pCRII210-GUS 的农杆菌侵染棉花无菌苗的下胚轴切段, 移入到 MS 共培养基中 28 $^{\circ}$ C 共培养 48 h, 同时设置空白对照。脱分化暗培养 20 d, 取少量的愈伤组织制成水装片, 直接在荧光显微镜下观察 GFP 荧光, 利用 CCD 进行图像的采集。

2 结果与分析

2.1 pCRII210 酶切验证

利用双酶切组合, 验证载体 pCRII210 内含子两端的多克隆位点。酶切组合为 A: *Avr* II/*Eco*R I; B: *Age* I/*Eco*R I; C: *Kpn* I/*Sal* I; D: *Xba* I/*Sac* I; E: *Sna*B I/*Bam*H I, 酶切效果见图 2, 每一对酶切组合均得到了约 550 bp 的酶切片段, 表明该载体只在内含子两端具有上述多克隆酶切位点, 证实该载体得到正确的连接, 多克隆位点是存在和可用的。送测序公司测序, 进一步验证该表达载体构建成功。



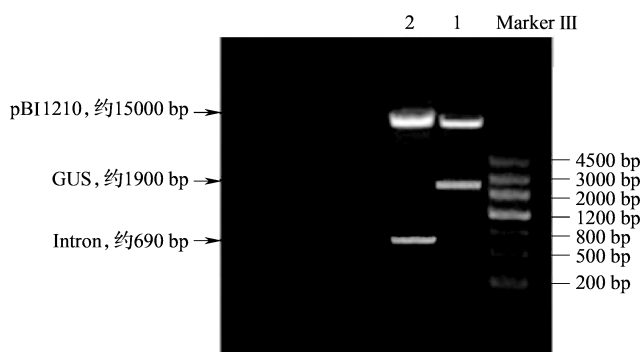
A: *Avr* II/*Eco*R I 酶切检测; B: *Age* I/*Eco*R I 酶切检测;
C: *Kpn* I/*Sal* I 酶切检测; D: *Xba* I/*Sac* I 酶切检测;
E: *Sna*B I/*Bam*H I 酶切检测

A: pCRII210 digested by *Avr* II and *Eco*R I,
B: pCRII210 digested by *Age* I and *Eco*R I,
C: pCRII210 digested by *Kpn* I and *Sal* I,
D: pCRII210 digested by *Xba* I and *Sac* I,
E: pCRII210 digested by *Sna*B I and *Bam*H I

图 2 pCRII210 内含子两端多克隆位点酶切验证
Fig. 2 The enzyme digestion of pCRII210 intron multiple cloning loci

2.2 *GUS* 基因和 *intron* 的酶切

双酶切 pBI121 中的 *GUS* 基因和 pCRI1210 中的 TUB *intron*, 酶切产物进行电泳, 电泳结果如图 3 所示, 分别在约 1900 bp、15000 bp 和 690 bp 处出现了条带。



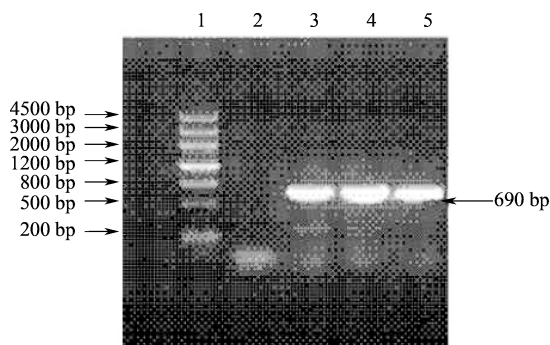
1: pBI121 的 *Bam*H I/*Sac* I 双酶切图谱;
2: pCRI1210 的 *Bam*H I/*Sac* I 双酶切图谱
1: pBI121 digested by *Bam*H I and *Sac* I,
2: pCRI1210 digested by *Bam*H I and *Sac* I

图 3 *GUS* 基因和 *intron* 的酶切结果

Fig. 3 The enzyme digestion result of *GUS* and *intron*

2.3 pCRI1210 的 PCR 检测和酶切验证

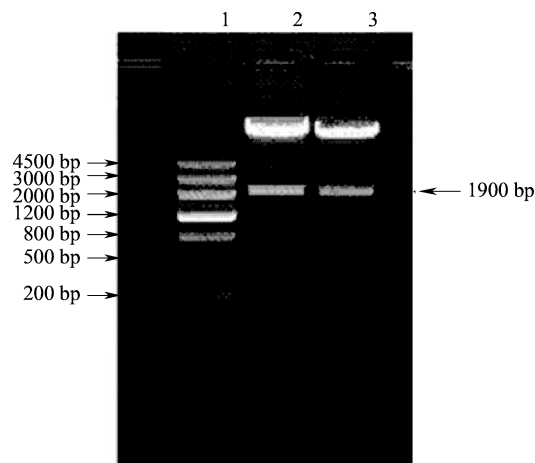
提取含 pCRI1210-*GUS* 载体的大肠杆菌与含 pBI121 载体的大肠杆菌 (阳性对照) 质粒, PCR 检测显示, 在 690 bp 处均出现了目的扩增条带 (图 4), 证实 *GUS* 基因已构建到载体 pCRI1210 中。对提取的质粒用 *Bam*H I/*Sac* I 双酶切, 结果显示 1 号和 2 号单克隆在 1.9 kb 处出现了酶切条带 (图 5), 证实 *GUS* 基因已连接至 pCRI1210-*GUS* 载体上。经测序公司测定, 确定为阳性单克隆菌落。



1: Marker III; 2: 未转化的大肠杆菌; 3: 1 号单克隆;
4: 2 号单克隆; 5: 转化 pBI121 载体的大肠杆菌
1: Marker III, 2: Untransformed *E. coli*,
3: No. 1 monoclonal, 4: No. 2 monoclonal,
5: *E. coli* of transformed pBI121 vector

图 4 *GUS* 基因 PCR 扩增结果

Fig. 4 The PCR amplification result of *GUS* gene



1: Marker III; 2: 1 号单克隆; 3: 2 号单克隆

1: Marker III, 2: No. 1 monoclonal,

3: No. 2 monoclonal

图 5 *GUS* 基因酶切结果

Fig. 5 The enzyme digestion result of *GUS* gene

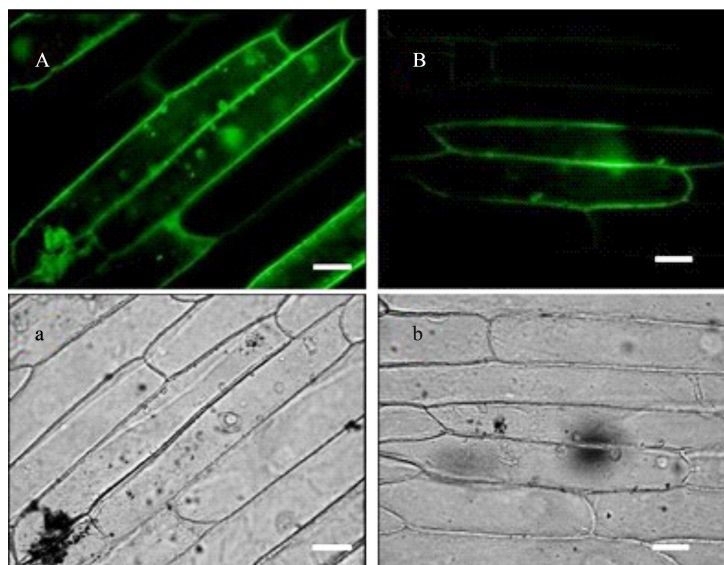
2.4 pCRI1210-*GUS* 的瞬时表达分析

取洋葱表皮, 采用基因枪轰击转化法将 pCRI1210-*GUS* 质粒 DNA 导入其中, 如图 6 所示。证实载体 pCRI1210-*GUS* 中的 *GFP* 基因强势表达。以转化 pCRI1210 的棉花胚性愈伤组织和洋葱表皮作为空载体对照, 以未经转化的棉花胚性愈伤组织和洋葱表皮作为空白对照。结果显示, 空载体对照与空白对照中均未见绿色荧光蛋白。*GFP* 基因能否在转基因烟草中成功表达, 需要做进一步的试验验证。利用基因枪轰击转化法将 pCRI1210-*GUS* 质粒 DNA 导入棉花胚性愈伤组织, 同时以转化 pBI121 的棉花胚性愈伤组织和未经转化的棉花胚性愈伤组织作为空白对照。如图 7 所示, 转化 pCRI1210-*GUS* 质粒 DNA 的胚性愈伤组织与转化 pBI121 质粒 DNA 的胚性愈伤组织中, *GUS* 基因均得到了表达, 且表达效率一致。

2.5 烟草转化

对烟草幼芽进行染色, 如图 8 所示, 转化 pCRI1210-*GUS* 质粒 DNA 的烟草幼芽与转化 pBI121 质粒 DNA 的烟草幼芽 (阳性对照) 脱色后均呈现深蓝色, 未转化的烟草幼芽 (空白对照) 和转化 pCRI1210 的烟草幼芽脱色后变为半透明状, 说明 pCRI1210-*GUS* 载体中的 CaMV 35S 启动子能够强势启动 *GUS* 基因在烟草幼芽中的表达。

对烟草叶片进行染色, 为提高染色效果, 叶片均剪去边缘并用毛细玻璃管打孔, 如图 9 所示, 转化 pCRI1210-*GUS* 质粒 DNA 的烟草叶片与转化

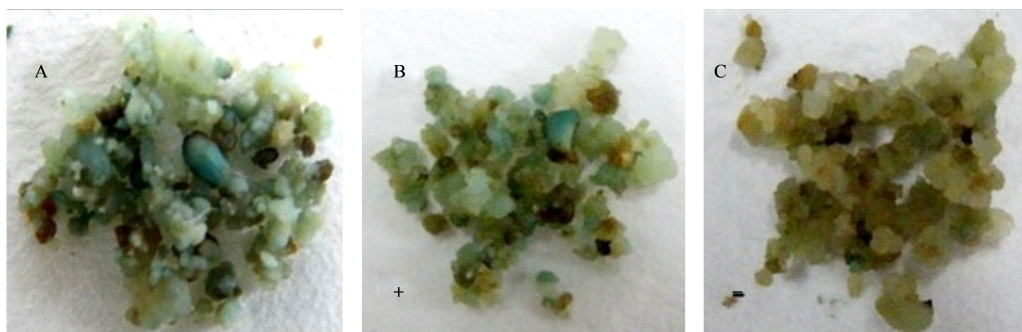


A:转化载体 pCRII210-GUS 质粒 DNA 的洋葱表皮的荧光显微图像;B:转化载体 pBI121 质粒 DNA 的洋葱表皮荧光图像;
a:A 图视野的白光视野;b:B 图视野的白光视野

A:Fluorescence microscopic image of onion for transforming vector pCRII210-GUS,B:Fluorescence microscopic image
of onion for transforming vector pBI121 ,a:White light horizon of A figure,b:White light horizon of B figure

图 6 *GFP* 基因在洋葱表皮的瞬时表达

Fig. 6 The transient expression of *GFP* gene in the onion

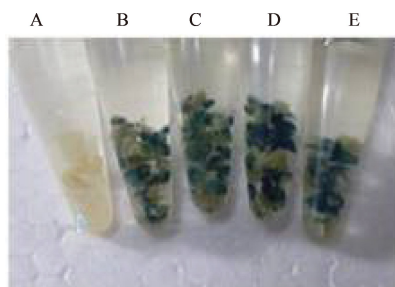


A:转化 pCRII210-GUS 载体的愈伤组织;B:转化 pBI121 载体的愈伤组织;C:未转化的愈伤组织

A:Callus of transformed pCRII210-GUS vector,B:Callus of transformed pBI121 vector,C:Untransformed callus

图 7 *GUS* 基因在愈伤组织中的表达

Fig. 7 The expression of *GUS* gene in callus



A:未转化的烟草幼芽;B~C:转化 pBI121 载体的烟草幼芽;
D~E:转化 pCRII210-GUS 载体的烟草幼芽

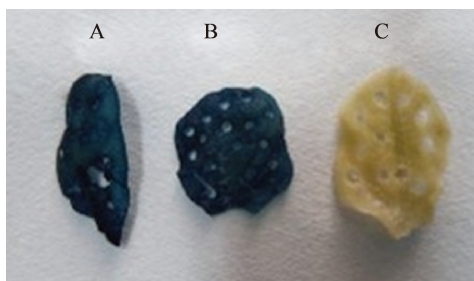
A:Untransformed tobacco germ,B-C:Tobacco germ of transformed pBI121
vector,D-E:Tobacco germ of transformed pCRII210-GUS vector

图 8 *GUS* 基因在烟草幼芽中的表达

Fig. 8 The expression of *GUS* gene in the tobacco germ

pBI121 质粒 DNA 的烟草叶片(阳性对照)脱色后均呈现深蓝色,而未转化的烟草叶片(空白对照)脱色后呈半透明状,说明 pCRII210-GUS 载体的 CaMV 35S 启动子能够强势启动其 *GUS* 基因在烟草叶片中表达。

对烟草根进行染色,如图 10 所示,转化 pCRII210-GUS 质粒 DNA 的烟草根与转化 pBI121 质粒 DNA 的烟草根(阳性对照)均呈现深蓝色,而未转化的烟草根(空白对照)脱色后呈白色,说明 pCRII210-GUS 载体中的 CaMV 35S 启动子能够强势启动其 *GUS* 基因在烟草根部表达。

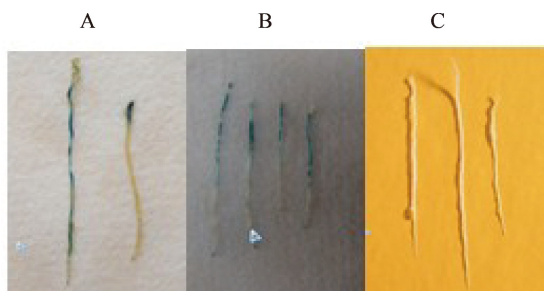


A: 转化 pCRII210-GUS 载体的烟草叶片; B: 转化 pBI121 载体的烟草叶片; C: 未转化的烟草叶片

A: Tobacco leaf of transformed pCRII210-GUS vector, B: Tobacco leaf of transformed pBI121 vector, C: Untransformed tobacco leaf

图 9 *GUS* 基因在烟草叶片中的表达

Fig. 9 The expression of *GUS* gene in tobacco leaf



A: 转化 pCRII210-GUS 载体的烟草根; B: 转化 pBI121 载体的烟草根; C: 未转化的烟草根

A: Tobacco root of transformed pCRII210-GUS vector, B: Tobacco root of transformed pBI121 vector, C: Untransformed tobacco root

图 10 *GUS* 基因在烟草根中的表达

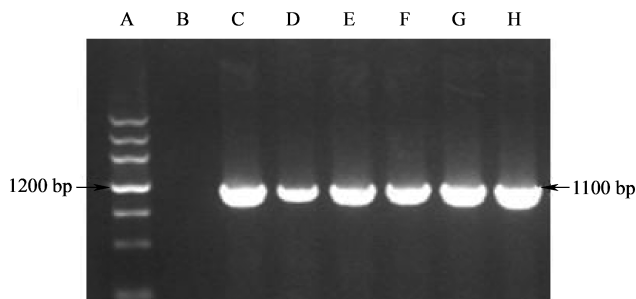
Fig. 10 The expression of *GUS* gene in tobacco root

2.6 转 pCRII210-GUS 载体烟草的 PCR 检测

对转化 pCRII210-GUS 质粒 DNA 的烟草进行 PCR 检测, 如图 11 所示, 转化 pCRII210-GUS 质粒 DNA 的烟草与转化 pBI121 质粒 DNA 的烟草 (阳性对照) 在 1.1 kb 处均出现了目的条带, 未转化的烟草 (空白对照) 未出现目的条带。结果证实, 携带 *GUS* 基因的载体 pCRII210 已成功和烟草基因组 DNA 进行整合。同时, 转化 pCRII210-GUS 质粒 DNA 的烟草植株生长状态良好, 和未转化的烟草以及转化 pBI121 质粒 DNA 的烟草相比, 未出现畸形株 (图 12)。

2.7 *GFP* 基因在愈伤组织中的表达

荧光检测转化 pCRII210-GUS 质粒 DNA 的棉花愈伤组织与未转化的棉花愈伤组织 (空白对照), 如图 13 所示, 转化 pCRII210-GUS 质粒 DNA 的棉花愈伤组织中的 *GFP* 报告基因得到强势表达, 而未转化的愈伤组织未检测到绿色荧光。



A: Maker III; B: 未转化烟草植株;

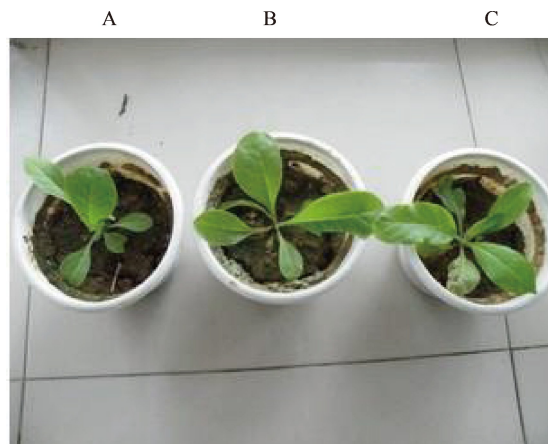
C ~ E: 转化 pCRII210-GUS 载体的烟草的不同单株;

F ~ H: 转化 pBI121 载体的烟草的不同单株

A: Maker III, B: Untransformed tobacco, C-E: Tobaccos of transformed pCRII210-GUS vector, F-H: Tobaccos of transformed pBI121 vector

图 11 转 pCRII210-GUS 载体烟草的 PCR 检测

Fig. 11 The PCR detection of pCRII210-GUS vector tobacco



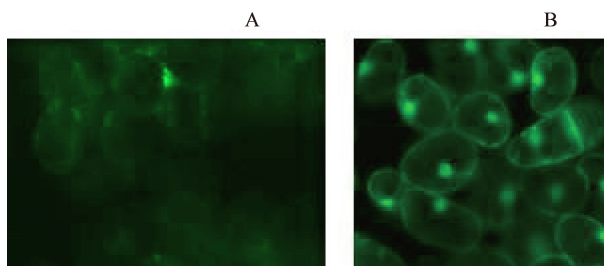
A: 未进行转化的烟草植株, B: 转化 pCRII210-GUS

质粒 DNA 的烟草植株, C: 转化 pBI121 质粒 DNA 的烟草植株

A: Untransformed tobacco, B: Tobacco of transformed pCRII210-GUS vector, C: Tobacco of transformed pBI121 vector

图 12 转基因烟草生长状态

Fig. 12 The growth status of transgenic tobacco



A: 未转化 pCRII210-GUS 载体的棉花愈伤组织;

B: 转化 pCRII210-GUS 载体的棉花愈伤组织

A: Callus of untransformed pCRII210-GUS vector,

B: Callus of transformed pCRII210-GUS vector

图 13 *GFP* 基因在愈伤组织中的表达

Fig. 13 The expression of *GFP* gene in callus

3 讨论

本研究的意义在于成功改造了载体 pBI121。改造后的载体 pCRII210,比 pBI121 具备更多的多克隆酶切位点,报告基因由 *GUS* 更换为 *GFP*,检测方法更加简便。TUB intron 内含子的引入,使该载体既可以作为表达载体,又可以作为干涉载体使用,丰富了载体的功能。通过一系列验证,所改造的载体,多克隆酶切位点均可正常使用,CaMV 35S 启动子可以强势启动下游基因的表达,*GFP* 基因也得到了正常表达。通过提取转基因烟草基因组 DNA 并进行 PCR 检测,该载体可成功整合入植物基因组中实现表达。转基因烟草与野生型相比,生长状态良好,并未增加转基因植株的代谢负担出现畸形株,这为该载体在其他植物上的使用提供了有力的证据。

植物转基因技术大大促进了农业发展,以转基因棉花为例,转基因棉花的大面积推广,一方面极大地减少了农药的使用,降低了环境压力,降低了生产成本,另一方面显著提高了棉花的产量和品质,为我国的棉花事业作出了巨大的贡献。而转基因技术的一项重要工具——载体,在转基因研究中具有举足轻重地位^[19-21]。一个好的载体,首先,要携带多个高效的多克隆位点,便于目的基因的插入;其次,要具备便于检测的报告基因;最后,和基因组 DNA 整合后,不显著增加转基因植株的代谢负担,能够正常表现目的基因的功能。

pCRII210 的成功构建为转基因研究提供了一件好的工具。为了进一步验证该载体的使用价值,一方面本课题组将利用该载体构建一些特异性基因的表达载体,进一步检测该载体的转化率和功能基因表达效果;另一方面利用该载体构建针对特定基因的干涉载体,检验干涉效率和转基因植株的生长状态,为该载体的成功利用奠定基础。

参考文献

[1] 杨君,张艳,王伟巧,等. 海岛棉 *GbHyPRPI* 克隆及其转基因

- 拟南芥抗黄萎病验证[J]. 植物遗传资源学报,2015,16(3): 594-602
- [2] 文昭竹,尚丹,龚梨霞,等. 高羊茅 *FaSGR* 基因 RNAi 载体构建[J]. 作物研究,2016,30(3):241-246
- [3] 刘正杰,张园,王玉美,等. 陆地棉 *GhDGAT1* 基因干涉载体构建与遗传转化[J]. 中国农业大学学报,2013,18(5):1-8
- [4] 张萍,王斐,孙辉,等. 棉花 *GhACO1* 基因植物表达载体构建及拟南芥遗传转化[J]. 生物学杂志,2011,28(6):19-22
- [5] 向小华,宋琳,裴玉贺,等. 花生 *AhRab7* 基因的克隆及其原核表达研究[J]. 植物遗传资源学报,2013,14(4):686-693
- [6] 秦超,倪志勇,郝晓燕,等. 棉花 *GhCCR4* 基因表达载体构建及 *GUS* 基因的瞬时表达[J]. 新疆农业科学,2009,46(3): 639-642
- [7] 周丽英,李虎,丁玉梅,等. 生菜质体表达载体构建及 *gfp* 基因原核表达分析[J]. 西南农业学报,2015,28(6):2644-2648
- [8] 冯雪,贾永红,郭红珍,等. 含 *GmNHX1* 和 *LcVPI* 双价基因植物表达载体构建与转基因棉花的获得[J]. 华北农学报,2014,29(4):56-62
- [9] 殷桂香,赵佩,郝浩楠,等. 三个方便实用的植物表达载体构建与验证[J]. 植物遗传资源学报,2014,15(6):1327-1333
- [10] 彭珊,李静,杜娟,等. 棉花黄萎病菌遗传转化载体构建和农杆菌转化[J]. 石河子大学学报:自然科学版,2007,25(1): 34-38
- [11] 毕惠惠,王根平,王成社,等. 单子叶植物 RNA 干扰和过表达 Gateway 载体的构建[J]. 植物遗传资源学报,2013,14(1): 115-123
- [12] 田莉莉,牛良. 苹果抗 ASPV 病毒 RNAi 载体构建及转化砧木 M26 的研究[J]. 华北农学报,2016,31(4):100-105
- [13] 田莉莉,牛良. 葡萄广谱抗病毒 RNAi 载体构建及对合子胚起源的体细胞胚的遗传转化[J]. 分子植物育种,2016,14(1): 72-79
- [14] 李波,倪志勇,李晓东,等. 棉花 *GhCOMT1* 基因原核表达载体构建及蛋白纯化和 Western 鉴定[J]. 西北植物学报,2012,32(10):1971-1976
- [15] 刘光快,曹珍珍,韦克苏,等. 水稻蛋白二硫键异构酶基因沉默载体构建及其转基因后代的高温结实特性分析[J]. 作物学报,2013,39(5):816-826
- [16] 崔丽丽,韦祖生,谢宝书,等. 调控木薯淀粉合成的干涉载体构建及转化木薯的研究[J]. 热带作物学报,2012,33(11): 1996-2001
- [17] 张宝娜,朱灿灿,张鹏钰,等. 普通小麦春化基因 *VRN1* RNA 干扰载体构建及转基因小麦获得[J]. 华北农学报,2016,31(1):57-62
- [18] 赵彦朋,李艳军,孙杰,等. 同步抑制棉籽 *FAD2-1* 与 *FatB* 基因表达的 RNAi 载体构建[J]. 西北农业学报,2013,22(10): 54-61
- [19] 李桂琴,齐靖,高志华,等. 鸭梨多酚氧化酶基因反义表达载体的构建及农杆菌介导的遗传转化[J]. 植物遗传资源学报,2010,11(5):635-639
- [20] 郭宇,郝磊,吕晓玲,等. 紫苏 *HPPR* 基因启动子的克隆及植物表达载体构建[J]. 分子植物育种,2016,14(2):382-388
- [21] 高东尧,夏兰琴,马有志. 小麦 *Vp1* 基因 RNA 干扰表达载体的构建及遗传转化[J]. 植物遗传资源学报,2009,10(1):9-15