

选择标记可去除的植物高效表达载体的构建

Construction of Selectable Marker-removable Plant Expression Vectors

高 尚^{1,2} 苏 鹏^{1,2} 贾洪革¹ 郭洪年¹ 田颖川¹ 方荣祥¹ 陈晓英^{1*}

GAO Shang^{1,2}, SU Lei^{1,2}, JIA Hong-Ge¹, GUO Hong-Nian¹, TIAN Ying-Chuan¹, FANG Rong-Xiang¹
and CHEN Xiao-Ying^{1*}

1 中国科学院微生物研究所植物基因组国家重点实验室,北京 100080

2 中国科学院研究生院,北京 100039

1 State Key Laboratory of Plant Genomics, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China

2 Graduate School of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

摘 要 在常用的植物组成型表达载体 pBI121 的选择标记基因 *NPTII* 两侧插入同向的 *lox* 位点并用多克隆位点(MCS)取代了 GUS 基因序列,构建了 *NPTII* 基因可被去除的和可插入目的基因的通用植物表达载体 pBI121-*lox*-MCS。替换 pBI121-*lox*-MCS 中驱动目的基因表达的 35S 启动子,可构建一系列具有其他表达特性的植物表达载体,如本文描述的韧皮部特异表达载体 pBdENP-*lox*-MCS。为方便地筛选去除选择标记基因的转基因植物,还构建了绿色荧光蛋白(GFP)表达框与 *NPTII* 表达框连锁的 pBI121-*gfp*-*lox*-MCS 载体。上述植物表达载体可广泛应用于培育选择标记可去除的转基因植物。

关键词 植物表达载体,去除选择标记,组织特异性表达启动子,Cre/*loxP* DNA 重组系统

中图分类号 Q782 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2007)01-0157-04

Abstract The commonly used plant constitutive expression vector pBI121 was modified by insertion of two directly orientated *lox* sites each at one end of the selectable marker gene *NPTII* and by replacing the GUS gene with a sequence composed of multiple cloning sites(MCS). The resulting plant expression vector pBI121-*lox*-MCS is widely usable to accommodate various target genes through the MCS, and more importantly to allow the *NPTII* gene removed from transformed plants upon the action of the Cre recombinase. In addition, the CaMV 35S promoter located upstream of the MCS can be substituted with any other promoters to form plant vectors with expression features specified by the introduced promoters. Provided in this paper is an example that an enhanced phloem-specific promoter of the pumpkin *PP2* gene (named dENP) was used to construct an *NPTII*-removable phloem-specific expression vector pBdENP-*lox*-MCS. Moreover, to facilitate screening of selectable marker-removed transgenic plants, we constructed another vector pBI121-*gfp*-*lox*-MCS in which a *gfp*-expression cassette is linked to the *NPTII* gene and the composite sequence is flanked by *lox* sites. Thus the selectable marker-free plants can be visually identified by loss of GFP fluorescence. The above newly created plant expression vectors can be used to develop selectable marker-removable transgenic plants for a variety of purposes.

Key words plant expression vectors, selectable marker-removal, tissue-specific expression promoter, Cre/*loxP* DNA recombination system

Received: July 20, 2006; Accepted: September 7, 2006.

This work was supported by the grant from the National "863" High Technology Foundation (No. 2002AA227031).

* Corresponding author. Tel: +86-10-62522109; Fax: +86-10-62548243; E-mail: chenxy@sun.im.ac.cn

国家高技术研究发展计划 863 计划 项目(No. 2002AA227031)资助。

利用转基因技术可使植物获得有益的性状或建立植物生物反应器生产高附加值产品。由于在植物转化过程中,要将被转化的细胞筛选出来必须使被转化的细胞具有某种抗性,比如卡那霉素抗性或删除草剂抗性,因此在将目的基因转入植物的同时也必须将抗性基因作为选择标记一同转入植物。但是在得到了转基因植物后,抗性基因已不再需要而且它在转基因植物中长期存在可能引起生物安全性问题,很大程度上影响了普通民众对转基因植物的接受。目前最好的解决方法是在得到转基因植物后将抗性基因从转基因植物中剔除。我们在构建表达载体时考虑了选择标记的可去除性问题:将载体中的选择标记基因表达框两端插入同向的 *lox* 位点,当 Cre 酶存在时,两个同向的 *lox* 位点会发生重组,将 *lox* 位点之间的选择标记基因缺失掉。

尽管植物生物技术的改进研究是多方面的,但在大多数情况下,最重要的问题是怎样在转基因植物中获得表达水平高的有活性的目的蛋白,因此利用较强的启动子和翻译增强子构建具有高表达能力的载体始终是我们的主要目标。35S 启动子可高效组成型表达目的基因,但在某些情况下需要组织特异性表达或可诱导型表达目的蛋白,在需要的时间和组织中表达目的蛋白可以节约植物体内的资源。我们构建的载体采用了本实验室自主开发的从南瓜中克隆得到的组织特异表达启动子——南瓜韧皮部蛋白基因 *pp2* 启动子,通过对该启动子的研究分析,我们定位了该启动子的增强序列,将该序列加倍得到双增强子序列的启动子(dENP),使之具有较高的活性并保留了其组织特异性^[1]。由于许多植物病原菌(包括病毒)和植物害虫侵染植物维管束组织,因此 dENP 启动子在植物抗病、抗虫基因工程中应有广泛的用途。

1 材料与方法

大肠杆菌菌株 JM110 为本实验室保存,植物表达载体 pBI121^[2], pBI221 购自 Clontech 公司。植物表达载体 pBdENP121 和 pGNG 为本实验室构建,质粒 pBIN-*mgfp*5-ER 由英国剑桥大学 J. Haseloff 教授惠赠。分子生物学实验用各种 DNA 内切酶、连接酶、修饰酶类、DNA 提取试剂盒等购自 Promega 公司,生化试剂购自 Sigma 公司,普通化学试剂购自北京化学试剂公司。实验中所用 DNA 引物由赛百盛生物工程公司合成。所有分子生物学方法均参照《分子克隆实验指南》^[3]。

2 结果

2.1 pBI121-*lox*-MCS 表达载体的构建

本表达载体在双元植物表达载体 pBI121 的基础上改造而成。首先用化学合成方法合成 4 条含 *lox* 序列引物,2 条在 5' 端引入 *Bam*H I 位点,1 条在 5' 端引入 *Taq* I 位点,1 条在 5' 端引入 *Cla* I 位点。引物序列分别为:

lox1 5'-aaaaggatccataactctgatagcatacattatagc-3'

lox2 5'-aaaaggatccataactctgataatgtatgctatagc-3'

lox3 5'-aaaatcgaaataactctgatagcatacattatagc-3'

lox4 5'-aaaaatcgatataactctgataatgtatgctatagc-3'

将引物 1 和引物 2、引物 3 和引物 4 分别混合退火,用 Klenow 酶将其补平,引物 1 和引物 2 合成的产物为 *lox*(R),引物 3 和引物 4 合成的产物为 *lox*(L),将 *lox*(R) 用 *Bam*H I 酶切接入 pBI121 的紧邻 RB 下游的 *Bcl* I 的位点,该 *lox* 序列插入后质粒上的 *Bcl* I 位点和引物上的 *Bam*H I 位点都被消除。将 *lox*(L) 用 *Taq* I 切,接入已插入一个 *lox* 序列的 pBI121 质粒的 *Cla* I 位点中得到 pBI121-*lox* 质粒,测序结果证明两个 *lox* 插入方向相同。再合成两条含多克隆位点的引物,其中上游引物在 5' 端引入 *Bam*H I 酶切位点,下游引物在 5' 端引入 *Sac* I 酶切位点,引物序列为:

MCS1: 5'-aaggatcc a gtcgac aggccct gctagc atcgat actagt-3'

MCS2: 5'-aaagagctc gcggccgc ggtacc actagt atcgat gctagc aggcc-3'

将 MCS1 和 MCS2 引物退火,用 Klenow 酶补平,再用 *Bam*H I 和 *Sac* I 酶切,然后连接到用 *Bam*H I 和 *Sac* I 酶切的 pBI121-*lox* 质粒中,最终得到 pBI121-*lox*-MCS 质粒(图 1)。

2.2 植物韧皮部特异表达载体的构建

本表达载体在 pBI121-*lox*-MCS 表达载体的基础上,将韧皮部特异表达启动子取代 pBI121-*lox*-MCS 表达载体中的 35S 启动子得到。用 *Hind* III 和 *Bam*H I 切含 dENP 序列的 pBdENP121 质粒,纯化 853bp 片段,同样酶切 pBI121-*lox*-MCS 质粒,将二者连接得到 pBdENP-*lox*-MCS 表达载体(图 2)。

2.3 含植物表达框的高拷贝、小质粒的构建

植物表达载体 pBI121 和我们在该质粒基础上构建的可以在大肠杆菌和土壤农杆菌中生存和复制的双元植物表达载体 pBI121-*lox*-MCS 和 pBdENP-*lox*-MCS 载体,既可以在大肠杆菌中比较方便地进

行基因操作,也可以在农杆菌中增殖并通过农杆菌介导转化植物细胞和组织,但是这些质粒为低拷贝大质粒,所以当进行分子操作时不如高拷贝小质粒容易,为了解决这个问题我们针对 pBI121-*lox*-MCS 和 pBdENP-*lox*-MCS 载体构建了 2 个含植物表达框的小质粒。将 2 个大质粒载体用 *Hind* III 和 *Eco* R I 酶切,将表达框架接入用同样的酶切的 pUC19 质粒中分别得到 pUC-35S-MCS 和 pUC-dENP-MCS 质粒(图 3,图 4)。多拷贝的小质粒在基因操作上极为容易,例如当我们需要将目的基因克隆到植物表达载体 pBdENP-*lox*-MCS 上时,我们首先可以将其克隆到 pUC-dENP-MCS,在这个小质粒上对目的基因进行酶切检测和序列测定,最后再将整个表达框架切出连入 pBdENP-*lox*-MCS 中。

2.4 利用 GFP 监测转基因植物中选择标记基因消除的植物表达载体的构建

将以 pBIN-*mgfp5*-ER 质粒为模板,利用 PCR 扩增的方法克隆 *gfp* 片段并将其克隆到植物表达载体上得到的 pNG 质粒^[4]用 *Hind* III 酶切,将切出的 GFP 基因表达框架接入 pBI121-*lox*-MCS 载体的 *Hind* III 位点,将 *lox* 位点序列接入该表达框 *nos* 终止子的下游。利用这个质粒转化目的基因到植物中的同时,选择标记基因(以 *NPTII* 为例)和 GFP 基因同时转入,转基因植物在紫外线下发出荧光,当在 Cre 酶的作用下 *lox* 位点之间的 DNA 序列被重组失去时,选择标记基因和 GFP 基因同时失去,因此在紫外光下不发荧光的转基因植物同时也是无选择标记的转基因植物。该载体提供了一个方便筛选无选择标记转基因植物的方法,但是该载体较大,酶切位点相对复杂,操作比较困难(图 5)。

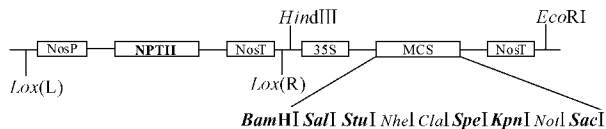


图 1 pBI121-*lox*-MCS 载体的选择标记表达框架两端(引入了 *lox* 位点 MCS 中黑体标出的酶切位点为单酶切位点)

Fig. 1 Two *lox* sites are located at both ends of the selectable marker gene expression cassette in pBI121-*lox*-MCS vector. The restriction enzyme sites of the MCS marked in bold are unique sites.

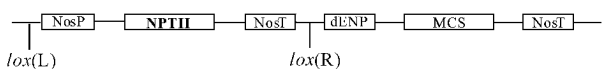


图 2 pBdENP-*lox*-MCS 载体

Fig. 2 pBdENP-*lox*-MCS vector

The 35S promoter of pBI121-*lox*-MCS was substituted by dENP.

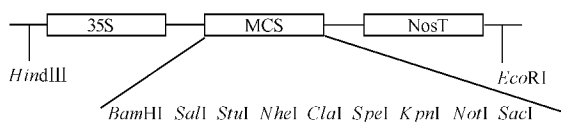


图 3 pUC-35S-MCS 载体

Fig. 3 pUC-35S-MCS vector

The *Hind* III-*Eco* R I fragment of pBI121-*lox*-MCS (containing the 35S promoter, MCS and Nopaline synthase terminator) cloned into pUC19.

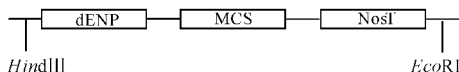


图 4 pUC-dENP-MCS 载体

Fig. 4 pUC-dENP-MCS vector

The *Hind* III-*Eco* R I fragment of pBdENP-*lox*-MCS (containing the dENP, MCS and Nopaline synthase terminator) cloned into pUC19.

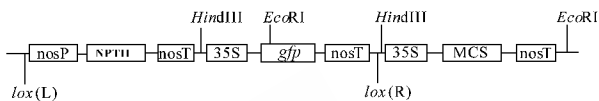


图 5 pBI121-*gfp*-*lox*-MCS 载体

Fig. 5 pBI121-*gfp*-*lox*-MCS vector

A GFP expression cassette (containing the 35S promoter, GFP ORF, Nopaline synthase terminator and a *lox* site) was cloned into the *Hind* III site of the pBI121-*lox*-MCS vector. The selectable marker and the GFP expression cassettes will be deleted together in the presence of Cre recombinase.

3 讨论

在植物转基因技术的研究和应用过程中一个合适的植物表达体系是至关重要的。在前期工作的基础上^[1,4-6],我们使用了自主开发的表达元件——韧皮部组织特异性表达启动子构建植物表达载体,并考虑了选择标记基因消除的问题。韧皮部是植物运输或贮藏有机物质的组织,同时也是许多病原微生物和植物害虫攻击的目标。如能控制外源基因在韧皮部特异地表达便可更有效地发挥某些抗病抗虫基因的作用,也将会避免组成型启动子高水平表达外源基因给植物本身和目标生物可能造成的不良影响。目前已报道的韧皮部特异表达启动子有:玉米蔗糖合成酶-1(Sh-1)基因启动子^[7]、豌豆谷氨酰胺合成酶 3A(GS3A)基因启动子^[8]、油菜伸展蛋白的启动子^[9]和修饰后的菜豆苯丙氨酸解氨酶(PAL-2)基因启动子^[10]。在植物病毒中已发现水稻稻格鲁病毒(RTBV)^[11]、椰子腐叶病毒(CFDV)^[12]及鸭跖草黄斑驳病毒(ComYMV)^[13]的主要转录物的启动子可驱动 GUS 基因在转基因烟草或水稻韧皮部特异表达。在约 15 个已进行了克隆和功能研究的韧皮部特异表

达启动子中 除玉米 Sh-1、水稻 Rss-1 及 ComYMV 启动子这几个来自单子叶植物和单子叶植物病毒的启动子有很高的表达效率外,其它启动子表达效率都较低,因此我们自主研发的可在双子叶植物韧皮部高效表达的启动子 dENP 具有很高的实用性。

我们构建的表达载体的另一个特点是利用 Cre/loxP 定点重组系统去除选择标记基因。早在 1991, Dale 和 Ow 首次利用来自噬菌体 P1 的 Cre/loxP 系统消除选择标记基因。Cre 酶是一个 38kD 的位点特异性重组酶,它可介导在两 lox 位点间的 DNA 发生切除、整合或倒位的重组。Dale 和 Ow 正是利用 Cre 酶可介导两个同向 lox 位点间的 DNA 片段切除的特性,成功地消除了转基因烟草中的标记基因^[14]。近年来,由于转基因生物安全性日益受到重视,利用这一系统来消除标记基因得到进一步发展。例如 1999 年, Gleave 等利用 Cre 酶的瞬间表达来消除标记基因,大大缩短了周期,但效率极低^[15]; 2001 年, Zuo J 等用化学诱导的启动子来驱动 Cre 基因的表达,获得了无选择标记的转基因植物^[16],但其所用的雌激素诱导剂对环境安全并不友好。最近有研究报道, Cre 酶也可与 VirE2 或 VirF 蛋白融合,一起由农杆菌进入植物细胞,并可切除其中的 lox 位点间的 DNA 片段^[17],本实验室贾洪革等设计了用植物病毒载体在转基因植物中瞬间表达 Cre 酶来消除转基因植物中的选择标记的方法,这种方法可以无需经过杂交或再次转化及后代分离就可以得到无选择标记的转基因植物,为简单、高效的获得无选择标记的转基因植物提供了可能^[6]。

本课题研制的高效、韧皮部特异表达和选择标记基因可去除的植物表达体系,既可直接用于植物分子生物学研究、抗病虫转基因植物的培育、植物生物反应器的研制等方面,也可以根据具体的实验要求对其进行改造,比如不同类型启动子的替换等。在转基因植物及其产品的生物安全性成为国际上关注的热点的形势下,我们构建的选择标记可去除的植物高效表达载体可供科研院所、大专院校及生物技术相关产业使用。

REFERENCES (参考文献)

[1] Guo HN, Chen XY, Zhang HL, et al. Characterization and activity enhancement of the phloem-specific pumpkin pp2 gene promoter. *Transgenic Research*, 2004, **13**(6), 559 - 566.

[2] Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *The EMBO Journal*, 1987, **6**: 3901 - 3907.

[3] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular cloning: A laboratory manual*. 2nd ed, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[4] Jia HG (贾洪革), Li LF (吕玲飞), Pang YQ (庞永奇), et al. Using green fluorescent protein as a reporter to monitor elimination of selectable marker genes from transgenic plants. *Chinese Journal of Biotechnology (生物工程学报)*, 2004, **20**(1): 10 - 15.

[5] Jia HG, Pang YQ, Fang RX. Agroinoculation with a simple way to deliver a tobacco mosaic virus-based expression vector. *Acta Botanica Sinica*, 2003, **45**: 770 - 773.

[6] Jia HG, Pang YQ, Chen XY, Fang RX. Removal of the selectable marker gene from transgenic tobacco plants by expression of Cre recombinase from a Tobacco mosaic virus vector through agroinfection. *Transgenic Research*, 2006, **15**(3): 375 - 384.

[7] Yang NS, Russell D. Maize sucrose synthase-I promoter directs phloem cell-specific expression of Gus gene in transgenic tobacco plants. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 4144 - 4188.

[8] Edwards JW, Walker EL, Coruzzi GM. Cell-specific expression in transgenic plants reveals nonoverlapping roles for chloroplast and cytosolic glutamine synthase. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1990, **87**: 3459 - 3463.

[9] Shirsat AH, Wilford N, Evans IM, et al. Expression of a Brassica-napus extensin gene in the vascular system of transgenic tobacco and rape plants. *Plant Molecular Biology*, 1991, **17**: 701 - 709.

[10] Leyva A, Liang X, Pintor-Toro JA, et al. Cis-element combinations determine phenylalanine ammonia-lyase gene tissue-specific expression patterns. *The Plant Cell*, 1992, **4**: 263 - 271.

[11] Bhattacharya-Pakrasi M, Peng J, Elmer JS, et al. Specificity of a promoter from the rice tungro bacilliform virus for expression in phloem tissues. *Plant Journal*, 1993, **4**: 71 - 79.

[12] Rohde W, Becker D, Randles JW. The promoter of coconut foliar decay-associated circular single-stranded DNA directs phloem-specific reporter gene expression in transgenic tobacco. *Plant Molecular Biology*, 1995, **27**: 623 - 628.

[13] Medberry SL, Lockhart BE, Olszewski NE. The commelina yellow mottle virus promoter is a strong promoter in vascular and reproductive tissues. *The Plant Cell*, 1992, **4**: 185 - 192.

[14] Dale EC, Ow DW. Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, **88**: 10558 - 10562.

[15] Gleave AP, Mitra DS, Mudge SR, et al. Selectable marker-free transgenic plants without sexual crossing: transient expression of cre recombinase and use of a conditional lethal dominant gene. *Plant Mol Biol*, 1999, **40**: 223 - 235.

[16] Zuo J, Nui QW, Geir MS, et al. Chemical-regulated, site-specific DNA excision in transgenic plants. *Nat Biotechnol*, 2001, **19**: 157 - 161.

[17] Vergunst AC, Schrammeijer B, den Dulk-Ras A, et al. VirB/D4-dependent protein translocation from *Agrobacterium* into plant cells. *Science*, 2000, **290**: 979 - 982.