

# 利用 GFP/RFP 双荧光指示载体鉴定特异性启动子功能

尹涛<sup>1</sup>, 秦巧平<sup>2</sup>, 张上隆<sup>1</sup>, 刘敬梅<sup>3</sup>, 陈大明<sup>4</sup>

1 浙江大学园艺系, 杭州 310029

2 浙江林学院, 杭州 311300

3 北京市蔬菜研究中心, 北京 100089

4 Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center at Johns Hopkins, USA

**摘要:** 在基因表达定位或启动子调控模式的研究中, 多以 *gusA* 作为报告基因。但由于部分组织中高内源 GUS 背景活性或转化手段的限制, 使判断基因表达定位或调控时存在很大误差。为了解决上述问题, 本实验将报告基因绿色荧光蛋白(GFP)和红色荧光蛋白(RFP)融合构建双荧光标记瞬时表达载体 pBI221-RFP/GFP。该载体以 CaMV35S 启动子驱动 GFP 确定转化效率, 通过鉴定阳性个体的红色荧光活性分析目的基因或启动子的表达模式。并通过番茄 *E8* 和西瓜 *AGPLI* 果实特异启动子验证了该载体在启动子调控模式研究中的应用可行性。结果表明 pBI221-RFP/GFP 是一个可以在基因和启动子功能验证中应用的高效瞬时表达载体。

**关键词:** 绿色荧光蛋白, 红色荧光蛋白, 瞬时表达载体, 特异性启动子

## Functional Analysis of Specific Promoter Using Vectors Harboring GFP/RFP Double Fluorescent Marker Genes

Tao Yin<sup>1</sup>, Qiaoping Qin<sup>2</sup>, Shanglong Zhang<sup>1</sup>, Jingmei Liu<sup>3</sup>, and Daming Chen<sup>4</sup>

1 Department of Horticulture, Zhejiang University, Hangzhou 310029, China

2 Zhejiang Forestry University, Hangzhou 311300, China

3 Beijing Vegetable Research Center, Beijing 100089, China

4 Sidney Kimmel Comprehensive Cancer Center at Johns Hopkins, USA

**Abstract:** Most studies related to determining the expression profile of genes and specific promoters used histochemical localization of the reporter gene, *gusA*. While the histochemical method for visualizing *gusA* expression suffers from several limitations in the determination of gene expression and location, especially in the tissues with high background activity. To solve this problem, a transient expression vector pBI221-RFP/GFP, was constructed using GFP and RFP as double fluorescent marker genes. This vector used CaMV 35S promoter to drive GFP and determine the transforming efficiency. It analyzed expression profile of the target gene and promoter through the RFP activities of the transformed tissues. Through the specific promoter *AGPLI* from watermelon and *E8* promoter from tomato, it is resistible to use this vector to study the expression patterns of promoters. Results indicated that the pBI221-RFP/GFP is a very efficient transient expression vector that can be verify the functions of the genes and promoters.

**Keywords:** green fluorescent proteins, red fluorescent proteins, transient expression vectors, specific promoter

**Received:** May 20, 2008; **Accepted:** August 25, 2008

**Supported by:** the National Natural Science Foundation of China (No.30671430).

**Corresponding author:** Shanglong Zhang. Tel: +86-571-86971009; Fax: 0571-86971009; E-mail: shlzhang@zju.edu.cn

国家自然科学基金项目 (No. 30671430) 资助。

对启动子表达调控模式的研究中,多数以 *gusA* 作为报告基因来确定其在植物中的表达或定位<sup>[1-4]</sup>。*gusA* 基因表达的组织化学检测具有方便观察等优点,但同时也存在很多局限性。如:酶本身或反应产物扩散到周围非表达细胞和组织中,引起 GUS 活性定位的误差<sup>[5,6]</sup>。GUS 定位过程中的染色由于染料渗入到细胞中而引起细胞死亡,使得对基因表达或调控的适时检测难以控制,这些弊端降低了以 *gusA* 作为报告基因的研究可靠性。

荧光蛋白基因可以在未受任何损坏的活体细胞中检测其表达。对部分 GUS 背景活性很高的组织如叶片、花粉等进行研究时,可以克服内源 GUS 活性对实验结果造成的误差。在本实验中,我们构建了 RFP/GFP 串联的双荧光指示瞬时表达载体,以 GFP 作为瞬时转化的内参确立阳性转化细胞或组织,通过对具 GFP 荧光活性细胞进行 RFP 的荧光观察,以此对启动子的功能进行评价,减小了实验过程中存在于转化方式、转化效率等方面的误差,同时也克服了染色观察检测步骤繁琐等诸多不利因素。并通过番茄 *E8* 启动子和西瓜 *AGPL1* 启动子的果实特异性调控功能,对此表达载体成功地进行了验证。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

#### 1.1.1 质粒载体与菌株

pBI221-mGFP6 和 pBI221-mRFP2 作为表达载体构建的初始载体。含该质粒的 DH5 $\alpha$  甘油菌由本实验室保存。

#### 1.1.2 试剂与修饰酶

限制性内切酶, T4 DNA 聚合酶和 T4 DNA 连接酶购自 NEB 公司。

### 1.2 方法

#### 1.2.1 pBI221-RFP/GFP 双荧光瞬时表达载体的构建

pBI221-mGFP6 载体内部 *Xba* I 和 *Sac* I 酶切位点除去时,首先对质粒进行酶切,并对线性化质粒用 T4 DNA polymerase 进行补平,然后由 T4 DNA ligase 进行连接,最终得到内部无 *Xba* I 和 *Sac* I 酶切位点的载体。对包含 RFP 和 GFP 基因的载体进行融合构建 pBI221-RFP/GFP, 具体操作步骤如图 1 所示。

#### 1.2.2 瞬时表达载体的功能验证

PEG 分级沉淀法提取质粒 DNA《分子克隆实验指南》(第三版),微粒子弹的制备和基因枪轰击操作按 Bio-Rad 公司说明书进行。基因枪轰击在 Bio-Rad 公司 PDS-1000/He 上进行。轰击距离 7 cm, 轰击压力为 1300 psi。洋葱鳞茎内表皮细胞作为受体材料,瞬时转化后的材料于 24°C 培养。

#### 1.2.3 荧光显微成像

光源为 HBO 100W 汞灯,绿色荧光在激发波长 450 nm~490 nm,检测波长 505 nm, 500 nm 滤光片下观察,红色荧光在激发波长 510 nm~560 nm,检测波长 575 nm, 590 滤光片下观察,紫外荧光在激发波长 380 nm~420 nm,检测波长 430 nm, 450 滤光片下观察。图象采集由 Nikon Eclipse E400 显微成像系统进行。

#### 1.2.4 应用 pBI221-RFP/GFP 载体验证西瓜 *AGPL1* 果实特异启动子

西瓜 *AGPL1* 果实特异启动子(-1140~+433)由 *Hind* III 和 *Xba* I 双酶切获得启动子基因片段,替换 pBI221-RFP/GFP 中 RFP 上游 CaMV 35S 启动子,形成 *AGPL1* 启动子-RFP-Nos ter-CaMV 35S-GFP-Nos ter 的串联结构,命名为 pRG-*AGPL1*。番茄果实特异启动子 *E8*(-1532~+24)替换 pBI221-RFP/GFP 中 RFP 上游 CaMV 35S 启动子,作为启动子功能验证中的阳性对照,命名为 pRG-*E8*。

## 2 结果

### 2.1 pBI221-RFP/GFP 双荧光瞬时表达载体的构建及鉴定

图 1 为 pBI221-RFP/GFP 双荧光瞬时表达载体的构建流程。去除 pBI221-mGFP6 中 *Xba* I 和 *Sac* I 两个酶切位点之后,进行 *Pst* I 单酶切后再补平形成具两平端的线性化 DNA; 然后进行 *Hind* III 单酶切,形成 *Hind* III 位点粘性末端, *Pst* I 位点平滑末端的不对称线性 DNA 分子。对质粒 DNA pBI221-mRFP2 进行 *Eco*R I 单酶切后再补平形成具两平端的线性化 DNA, 然后进行 *Hind* III 单酶切,形成 *Hind* III 位点粘性末端, *Eco*R I 位点平滑末端的不对称线性 DNA 分子片段和载体。对含 RFP 的分子片段与 GFP 载体进行连接,形成“*Hind* III-CaMV 35S-*Xba* I-RFP-*Sac* I-Nos ter-CaMV 35S-GFP-Nos ter-*Eco*R I”串联结构,

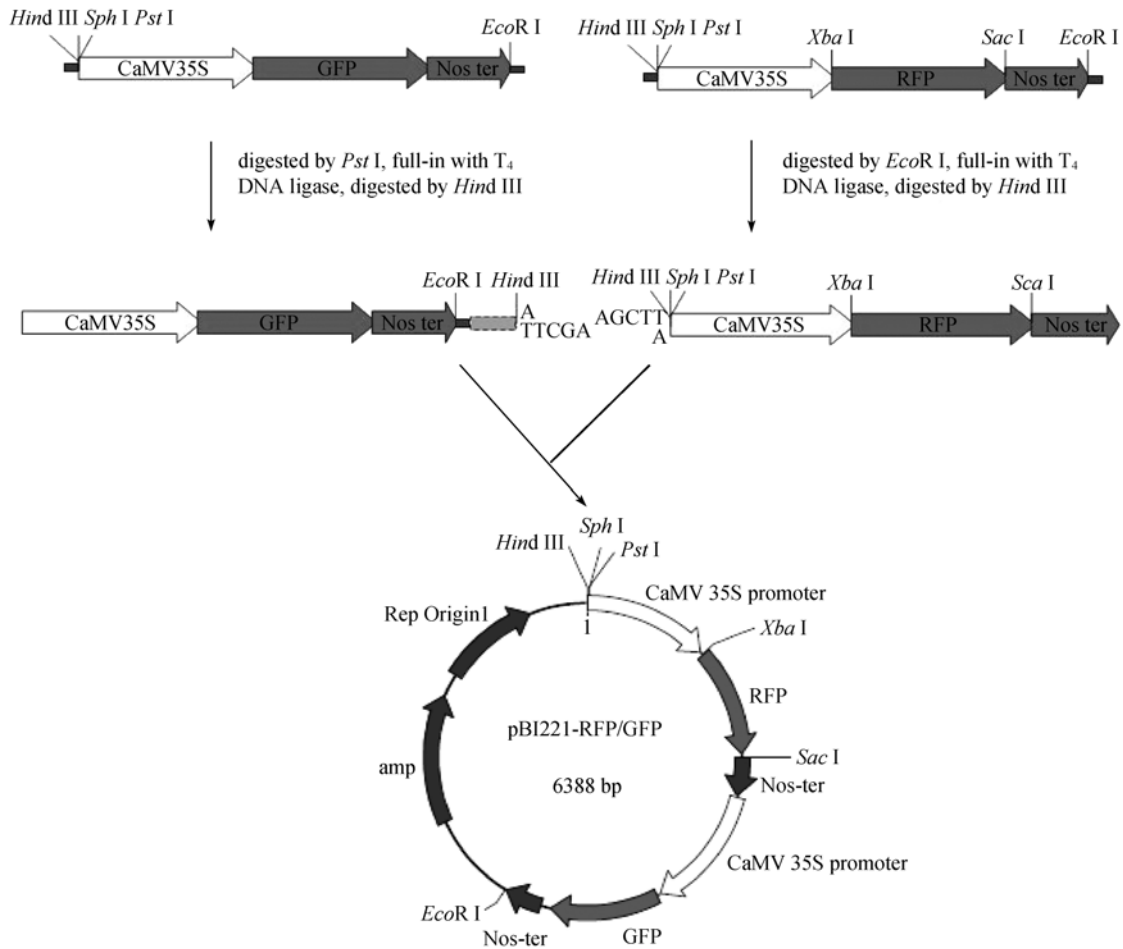


图 1 pBI221-RFP/GFP 双荧光指示瞬时表达载体的构建流程图

Fig. 1 Construction of transient expression vectors pBI221-RFP/GFP harboring double fluorescent genes

其中 GFP 和 RFP 均由 CaMV 35S 启动子驱动。驱动 RFP 的 35S 启动子 5'端含有 *Hind* III、*Sph* I、*Pst* I 位点, 3'端含有 *Xba* I 位点, 便于进行其他启动子功能验证时克隆的操作。

图 2 为对 RFP/GFP 瞬时表达载体的酶切检测。*Hind* III+*Sac* I 双酶切检测 35S 启动子和 RFP 约 1.6 kb; *Hind* III+*Xba* I 双酶切检测驱动 GFP 上游的 35S 启动子 780 bp; *Sac* I+*Eco*R I 双酶切检测 Nos 终止子+CaMV 35S 启动子+GFP+Nos 终止子共约 2.1 kb; 由图所示两个不同克隆的酶切检测均符合预计大小, 判断为正确克隆。

## 2.2 pBI221-RFP/GFP 双荧光指示载体的功能检测

图 3 为瞬时转化 pBI221-GFP/RFP 载体后荧光显微成像。转化后的表皮细胞在绿色荧光检测波长下有较强绿色荧光出现, 表明 CaMV 35S 启动子驱动 GFP 标记基因表达。该细胞或细胞群为瞬时转化的

阳性细胞, 同一明场下的细胞在红色荧光检测波长下也具有较强的红色荧光出现, 说明由 CaMV 35S 作为假定启动子进行调控模式研究时也得到了表达, 两标记基因在相同细胞内得到表达, 且基因表达的定位与强度相同(图 A1、A2; 放大 40 $\times$ , 标尺所示为 200  $\mu$ m)。由此说明, 在双指示标记的瞬时表达载体可以更有针对性地对目的细胞进行分析, 缩小了研究范围。B 为放大 100 $\times$ 后细胞的显微照片。

## 2.3 利用 pBI221-RFP/GFP 瞬时表达载体鉴定启动子特异性的研究

将西瓜果实特异启动子 *AGPL1* 取代 pBI221-RFP/GFP 瞬时表达载体中驱动 RFP 基因的 CaMV 35S 启动子, 形成 pRG-AGPL1 载体, 并转化茎表皮细胞。pRG-E8 载体中番茄果实特异启动子 *E8* 驱动 RFP 基因, 作为阴性对照。由于启动子果实特异性的存在, 报告基因 RFP 将在除果实外的其他组织中检测不到荧光活性<sup>[7]</sup>。如图 4A 所示, 在检测到绿色

荧光活性的细胞中, 由于 GFP 基因由 CaMV 35S 启动子驱动有较强的表达; 而在阳性细胞中 RFP 基因受果实特异启动子 *E8* 的驱动, 在表皮细胞中检测不到红色荧光出现。这与 pBI221-RFP/GFP 中绿色和红色荧光蛋白基因同等强度的表达模式完全不同。

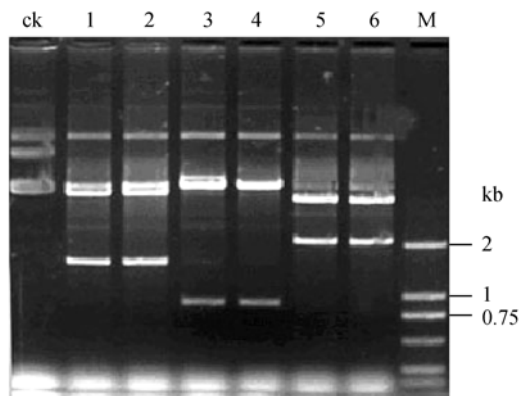


图 2 pBI221-RFP/GFP 双荧光瞬时表达载体的酶切检测

Fig. 2 Restriction enzyme digestion analysis of transient expression vectors harboring RFP and GFP

1, 2: *Hind* III+*Sac* I; 3, 4: *Hind* III+*Xba* I; 5, 6: *Eco*R I+*Sac* I; M: DL2000 marker; CK: pBI221-RFP/GFP as control

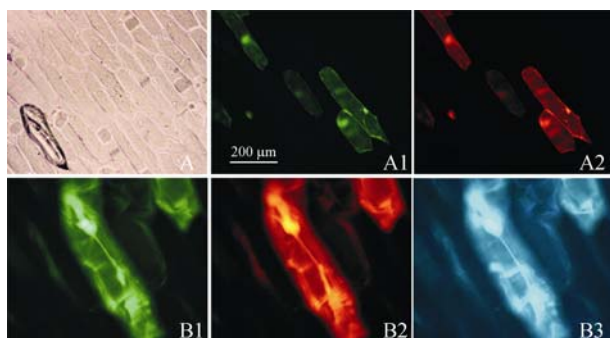


图 3 pBI221-RFP/GFP 双荧光指示瞬时表达载体功能检测

Fig. 3 CaMV 35S promoter-driven GFP and RFP transient expression in epidermal cells

A: light images under 40 $\times$  microscopes; A1: green fluorescent images of A;

A2: red fluorescent images of A1; B1: green fluorescent images; B2: red fluorescent images of B1; B3: fluorescent images of B1

当以西瓜 *APGL1* 启动子驱动 RFP 对表皮细胞进行转化时发现, 在绿色细胞中同样检测不到红色荧光活性(图 4B)。由此说明西瓜 *AGPL1* 启动子与番茄 *E8* 果实特异启动子一样, 由其驱动红色荧光蛋白基因在表皮细胞中并不表达; 而该启动子与报告基因融合转化西瓜果实时则表现出很强的驱动活性, 说明该启动子在果实中具备活性而茎表皮细胞中不存在驱动活性, 与 *AGPL1* 启动子驱动基因在茎表皮细胞中的表达模式综合分析, 认为该启动子具备了

果实特异性的调控特征, 从而说明该载体可以应用于鉴定启动子驱动模式的研究。

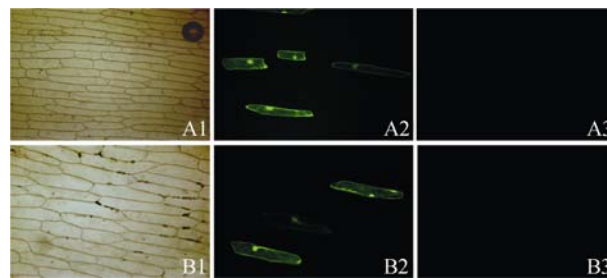


图 4 pBI221-RFP/GFP 介导启动子特异性表达模式研究

Fig. 4 Specific expression assays of promoters mediated by pBI221-RFP/GFP vector

A: transformed epidermal cells of pRG-E8; B: transformed epidermal cells of pRG-AGPL1; A1, B1: light images;

A2, B2: green fluorescent images; A3, B3: red fluorescent images

### 3 讨论

GFP(Green fluorescent protein)从水母(*Aequorea victoria*)中得到, 并首先在动物基因表达的研究中应用<sup>[8,9]</sup>。RFP(Red fluorescent protein)来源于海葵(*Discosoma* sp.), 其一级结构与 GFP 仅有 23% 的同源性<sup>[10]</sup>; 灵敏度与信噪比比 GFP 高, 荧光强度不受 pH 影响而发生荧光淬灭, 为基于 GFP 的体内研究提供了一个很好的互补工具<sup>[11-13]</sup>。

*gusA* 作为报告基因在启动子表达模式研究或组织化学定位中已经得到广泛应用, 但在高 GUS 背景活性的组织中进行研究时却存在很大误差<sup>[1,14]</sup>。目前瞬时表达研究体系多以基因枪为主, 转化过程受许多因素的影响(如受体材料等), 容易把低转化率的表达量误判为启动子功能丧失。虽然操作者试图通过各种途径减少其影响, 如设置阳性对照质粒与目的质粒 DNA 协同转化等, 但这些策略都不能完全避免操作上的误差。因此我们构建以 GFP 为内参, 以 RFP 为报告基因的瞬时表达载体对启动子的特异性模式进行研究, 可以定向地只在转化细胞中进行目的启动子的研究, 增加了研究的针对性并减少工作量。

在利用 pBI221-GFP/RFP 瞬时表达载体进行启动子功能调控模式的研究时, 将待测启动子替代驱动 RFP 基因的 CaMV 35S 启动子, 与 CaMV 35S 驱动 GFP 串联转化入受体细胞或组织。首先在绿色荧光下对转化细胞或组织进行精确定位, 再对同一

部位细胞进行红色荧光观察, 这样使待研究的靶向细胞具有专一的针对性, 避免了系统和操作带来的误差。在特异性启动子表达模式的研究中, 假定的果实特异性启动子将只在果实中表达, 而在其他组织中则检测不到标记基因的活性。以西瓜 *AGPL1* 启动子为例进行验证, 并以番茄果实特异启动子 *E8* 为对照, 确定该类型启动子在表皮细胞中无驱动活性, 而在果实中高驱动活性的果实特异性驱动模式。因此判断, pBI221-RFP/GFP 瞬时表达载体在启动子驱动模式的检验中可以广泛应用。

另外, 将 pBI221-RFP/GFP 载体中的 RFP 报告基因与目的基因串联形成融合蛋白, 还可以对基因表达的亚细胞定位进行研究。而且在启动子活性的检测中, 还可以由 RFP/GFP 的荧光强度比值来精确定量启动子的驱动活性。因此, pBI221-RFP/GFP 瞬时表达载体可应用于启动子分析、转基因、蛋白质和细胞定位、药物筛选、细胞、整个器官的双标记, 以及利用荧光共振能量转移(FRET)研究蛋白与蛋白的相互作用。因此, RFP 与 GFP 相结合, 为分子生物学和细胞生物学等相关领域的研究提供了一个新的、快捷的检测手段。

**致谢** 清华大学生物系黄健博士对本实验提供了技术支持, 特此表示感谢。

## REFERENCES

- [1] Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW. GUS fusions:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J*, 1987, **6**: 3901–3907.
- [2] Benfey PN, Chua NH. The cauliflower mosaic virus 35S promoter: combinatorial regulation of transcription in plants. *Science*, 1990, **250**: 959–966.
- [3] Battraw MJ, Hall TC. Histochemical analysis of CaMV 35S promoter- $\beta$ -glucuronidase gene expression in transgenic rice plants. *Plant Mol Biol*, 1990, **15**: 527–538.
- [4] Terada R, Shimamoto K. Expression of CaMV 35S-GUS gene in transgenic rice plants. *Mol Genet Genomics*, 1990, **220**: 389–392.
- [5] Yang NS, Christou P. Cell type specific expression of a CaMV 35S-GUS gene in transgenic soybean plants. *Dev Genet*, 1990, **11**: 289–293.
- [6] Mascarenhas JP, Hamilton DA. Artifacts in the localization of GUS activity in anthers of petunia transformed with a CaMV 35S-GUS construct. *Plant J*, 1992, **2**: 405–408.
- [7] Wu HY, Liu JM, Yang XT, *et al.* Primary targeting of functional regions involved in transcriptional regulation on watermelon fruit-specific promoter WSP. *Chin J Biotech*, 2003, **19**(2): 227–230.  
吴韩英, 刘敬梅, 杨信廷, 等. 西瓜果实特异启动子 WSP 功能调控区域的初步定位. *生物工程学报*, 2003, **19**(2): 227–230.
- [8] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, *et al.* Green fluorescent protein as a marker for gene expression. *Science*, 1994, **263**: 802–805.
- [9] Wang S, Hazelrigg T. Implications for *bcd* mRNA localization from spatial distribution of exu protein in *Drosophila oogenesis*. *Nature*, 1994, **369**: 400–403.
- [10] Matz MV, Fradkov AF, Labas YA, *et al.* Fluorescent proteins from nonbioluminescent Anthozoa species. *Nat Biotechnol* 1999, **17**(10): 969–973.
- [11] Yarbrough D, Wachter RM, Kallio K, *et al.* Refined crystal structure of DsRed, a red fluorescent protein from coral at 2.0 Å resolution. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2001, **98**(2): 462–467.
- [12] Chiu WL, Niwa Y, Zeng W, *et al.* Engineered GFP as a vital reporter in plants. *Curr Biol*, 1996, **6**: 325–330.
- [13] Haseloff J, Siemering KR, Prasher DC, *et al.* Removal of cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic Arabidopsis plants brightly. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, **94**: 2122–2127.
- [14] Sunilkumar G, Mohr L, Lopata-Finch E, *et al.* Developmental and tissue-specific expression of CaMV 35S promoter in cotton as revealed by GFP. *Plant Mol Biol*, 2002, **50**: 463–474.