

对一种多基因组装方法的改进

赵先海¹ 黄浩^{1,2} 邓小梅^{1*} 袁金英¹ 湛欣¹

(1. 华南农业大学 林学院/广东省森林植物种质创新与利用重点实验室,广州 510642;
2. 广西药用植物园,南宁 530022)

摘要 改建了基于 *Cre/LoxP* 重组的 2 个供体载体和 1 个兼容 Gateway 系统的供体载体: pYLd1GW/pYLd2GW、pYLd1GW35s/pYLd2GW35s 和 pYLd1GWMPK/pYLd2GWMPK。在改建载体的基础上构建了 2 个供体载体 pYLd1GWMdSPDS1 和 pYLd2GWCBF1,并将 2 个基因构建于受体载体 pYL1305,得到双价表达载体 pYL1305MC。采用农杆菌介导的叶盘法转化烟草,经 PCR 检测和 GUS 组织化学染色检测发现,双价基因已成功转入烟草。对 6 株转基因烟草进行荧光定量 PCR 检测,发现在不同植株中同一基因表达量差异很大,但 2 个基因表达量差异趋势一致。

关键词 烟草; 载体; 多基因; Gateway; 组装

中图分类号 Q 782

文章编号 1007-4333(2014)03-0095-06

文献标志码 A

Improvements on a multi-gene assembly system

ZHAO Xian-hai¹, HUANG Hao^{1,2}, DENG Xiao-mei^{1*}, YUAN Jin-ying¹, ZHAN Xin¹

(1. College of Forestry/Guangdong Key Laboratory for Innovative Development and Utilization of Forest Plant Germplasm, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China;
2. Guangxi Botanical Garden of Medicine Plant, Nanning 530023, China)

Abstract By altering two donor vectors of multi-gene assembly vector system based on *Cre/LoxP* recombination, the donor vectors compatible Gateway system were generated including pYLd1GW/pYLd2GW, pYLd1GW35s/pYLd2GW35s, pYLd1GWMPK/pYLd2GWMPK. Two donor vectors pYLd1GWMdSPDS1 and pYLd2GWCBF1 were obtained from the modified Gateway compatible vectors. The two genes were cloned in the acceptor vector pYL1305 named pYL1305MC. The double-gene vector was transformed into tobacco through agrobacterium-mediated leaf disc transformation. The analysis of transgenic tobacco with PCR and GUS staining were shown that the double-gene was integrated into tobacco genome. The results of real-time PCR were indicated that the expression level of two transgenes in six transgenic tobacco plants was varied significantly, however, the varying trend of the two genes in expression level was not much different.

Key words tobacco; vector; multi-gene; Gateway; assembly

基因工程技术的迅速发展为研究植物性状提供了非常便利的手段,以往用转化单基因来改变植物特征的研究已经不能满足现代需求。关于探索多基因控制的植物代谢途径及提高植物多种抗性等问题,已报道了不少多基因组装技术手段,为培育优质、高产、多抗的植物新品种创造了机遇。多基因组

装是指把多个基因构建于同一个载体上,同时转入植物,最终得到多基因转化植物个体。多基因载体的构建方法有很多种,比如稀有限制性内切酶载体系统^[1]、多顺反子法^[2]、生物活性珠法^[3-4]、质体转化法^[5]和植物人工染色体法^[6]等。但这些方法都有很大局限性,有的容量太小,有的不容易操作。

收稿日期: 2013-10-04

基金项目: 国家林业局林业公益性行业科研专项(201004020)

第一作者: 赵先海,硕士研究生,E-mail:zhao_xianhai@126.com

通讯作者: 邓小梅,教授,主要从事林木遗传育种专业研究,E-mail:dxmei2006@scau.edu.cn

Gateway 重组技术的商品化应用加速了载体构建^[7],在此技术上已开创出多基因组系统,主要有多位点组装系统^[8-9]和多循环组装系统^[10-11],但限于 Gateway 重组位点的数量限制,衍生的多基因组系统大部分只能有限度地组装基因。基于 *Cre/LoxP*^[12] 重组的载体系统^[13] 利用 2 个供体载体和 1 个受体载体的轮流重组,可以在受体载体的承受范围内不限次数地引入外源基因,由此提供了一种强有力的多基因组手段。Lin 等^[13] 利用此系统构建了包含 8 个基因和 2 个 MARs 的载体并成功转化梗稻。贾香楠等^[14] 利用此系统构建了五价载体并成功转化烟草。但此系统在构建供体载体时还需借助于传统的酶切连接,这是一项耗时耗力的工作。

为了减少多基因构建过程中的繁琐步骤,本研究拟将 Gateway 特异重组位点整合于 2 个受体载体,以期得到兼容 Gateway 系统的供体载体。在此基础上利用此载体构建二元表达载体 pYL1305MC,以缩减多基因载体的构建时间,并优化多基因的组装过程。

1 材料与方法

1.1 基因、质粒及菌株

pYL1305、pYLd1、pYLd2 质粒和 *E. coli* NS3529、*E. coli* DH10B 菌株,由华南农业大学刘耀光教授惠赠;pGWB2^[15] 载体、pDONR207 载体和 *E. coli* DB3.1 菌株由华南农业大学吴嵩民教授惠赠;pBI121-*MdSPDS1* 质粒由 Yoshinori Hasegawa 博士(National Institute of Fruit Tree Science, Japan)惠赠;载体 pHUB10-*CBF1* 和根癌农杆菌 LBA4404 由本实验室保存。

1.2 酶和试剂

实验过程中用到的限制性内切酶、T4DNA 连接酶、cDNA Synthesis Kit (M-MLV Version) 反转录试剂盒、SYBR Premix Ex *Taq* II (Tli RNaseH Plus)、*rTaq* DNA Polymerase 和 PrimeSTAR HS DNA Polymerase 购于 Takara 公司;DNA Marker、植物基因组 DNA 提取试剂盒和植物 RNA 提取试剂盒购于北京天根生化科技有限公司;潮霉素 (Hyg)、庆大霉素 (Gen)、卡那霉素 (Kan)、氯霉素

(Cm)、氨苄青霉素 (Amp) 和 X-Gluc 等均购于德国 Sigma 公司;其他国产分析纯试剂购于北京鼎国昌盛有限公司。

1.3 供体载体改建

利用供体载体 pYLd1 和 pYLd2 上的多克隆位点,借助 PCR 法将 GW 片段 (*Hind* III-*attR1*-*Cm^r*-*ccdB*-*attR2*-*Spe* I) 从载体 pGWB2 上克隆出来,分别对 pYLd1、pYLd2 和 GW 片段进行双酶切,将 GW 片段连入 pYLd1 和 pYLd2 载体,得到改建后的载体 pYLd1GW 和 pYLd2GW。为了提高保真度,减少 PCR 时目的基因的扩增长度,pYLd1GW35s 和 pYLd2GW35s 的改建采用将 35sGW 片段分段克隆的方法,分别将 *Hind* III-*CaMV* 35s-*attR1*-*Kpn* I 和 *Kpn* I-*ccdB*-*attR2*-*nos*-*Xho* I 从载体 pGWB2 上克隆下来,经酶切连接分别构建于 pYLd1 和 pYLd2,形成改建后的载体 pYLd1GW35s 和 pYLd2GW35s。最后,用连入 pMD19-T 载体的从拟南芥中克隆得到的 *AtMPK3* 启动子替换掉 *CaMV* 35s 启动子,得到载体 pYLd1GWMPK 和 pYLd2GWMPK,载体改建时用到的引物见表 1。

1.4 供体载体 pYLd1GWMdSPDS1 和 pYLd2GWCBF1 的构建

设计含 *attB1/attB2* 位点的引物,从实验室已构建好的载体 pHUB10-*CBF1* 中 PCR 扩增出 *Atrd29A*-*CBF1*-*nos* 片断,凝胶电泳后回收产物,经 BP 反应重组进入载体 pDONR207, BP 反应体系为:*Atrd29A*-*CBF1*-*nos* 1.5 μ L, pDONR207 0.5 μ L, BP Clonase 0.5 μ L。得到的载体 pDONR207*CBF1* 再与 pYLd1GW 和 pYLd2GW 分别进行 LR 反应,最终得到载体 pYLd1GWCBF1 和 pYLd2GWCBF1, LR 反应体系为:pDONR207*CBF1* 1.5 μ L, pYLd1GW/pYLd2GW 0.5 μ L, LR Clonase 0.5 μ L。设计含酶切位点 *Bam* HI 和 *Kpn* I 的 *MdSPDS1* 基因的引物,从载体 pBI121-*MdSPDS1* 中 PCR 得到 *Bam* HI-*MdSPDS1*-*Kpn* I 片断,进行双酶切,与同样经双酶切而失去 *CBF1* 基因的线性载体 pYLd1GWCBF1 连接,得到载体 pYLd1GWMdSPDS1。载体构建过程中用到的引物同表 1。

表 1 本研究所使用的引物
Table 1 Primers used in this research

DNA	F 引物(5'→3') Forward primers	R 引物(5'→3') Reverse primers
GW	CCAAGCTTGTATCAACAAGTTTGTAC	GGACTAGTTTATCAACCACTTTGTAC
35sGW-1	CCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCCC	GGGGTACCCATAGTACTGGATATGTTG
35sGW-2	CCGACGGTACCATGCAGTTTAAGTTTACACC	CCGGCTCGAGGATCTAGTAACATAGATG
<i>AtMPK3</i>	AGCTTCAAGTAGAGCACTGAAGACC	AGAGACTGAGATTGAGGATTGAGCA
<i>attB-Atrd29A</i>	GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCTGAT	GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGG
<i>CBF1nos</i>	GGAGGAGCCATAGATGCAATTCAA	GTCCGATCTAGTAACATAGATGACACCGC
<i>MdSPDS1</i>	CGCGGATCCATGGCGGACGAGAGTGTGGC	CGGGGTACCTCACTTTGCTTTTGCCTC
<i>CBF1</i>	ATGAACTCATTTCAGCTTTTCTG	TTAGTAACTCCAAAGCGACACGTCA
<i>Actin</i>	CGGAATCCACGAGACTACATAC	GAGGGAAGCCAAGATAGAGC
<i>RTMdSPDS1</i>	TCCGGGAGGAGTTGTGTGTA	AAGGGCCGTTTCGACTCATC
<i>RTCBF1</i>	TTTGGCTCGGGACTTTCCAA	TCGTGGTCTCGTATCACAC

1.5 多基因组装程序及烟草转化

基于 *Cre/LoxP* 重组的多基因组装包含 1 个受体载体 pYL1305 和 2 个供体载体 pYLd1/pYLd2^[13], 和 1 个可以表达 Cre 重组酶的菌株 *E. coli* NS3529。具体过程为: 目的基因克隆到供体载体上以后, pYLd1-*GeneA* 和 pYL1305 共转化 *E. coli* NS3529, 在 Cm 17 mg/L 和 Kan 50 mg/L 的双抗 LB 平板上涂板, 进行菌内的重组反应; 经过夜培养后, 挑取大约 100 个单菌落进行摇菌提质粒, 提取到的质粒有 4 种: 未经重组的 pYL1305 和 pYLd1-*GeneA*, 经重组反应并切掉供体骨架的 pYL1305A, 经重组反应但未切掉供体骨架的载体 pYL1305-d1*GeneA*; 用归位内切酶 *I-Sce I* 酶切质粒, 以切除目的载体 pYL1305A 以外的 3 种载体, 酶切产物电击转化 *E. coli* DH10B, 过夜培养后 PCR 鉴定目的菌落, 得到含第一个目的基因的载体 pYL1305A, pYL1305A 成为下一轮反应的受体载体; pYL1305A 和第二个供体载体 pYLd2-*GeneB* 共转化 *E. coli* NS3529, 在 Amp 100 mg/L 和 Kan 50 mg/L 的双抗 LB 平板上涂板, 进行菌内重组反应; 经过夜培养后, 提取混合质粒, 用归位内切酶 *PI-Sce I* 切除除目的载体 pYL1305AB 以外的 3 种载体, 酶切产物电击转化 *E. coli* DH10B, 过夜培养后 PCR 鉴定目的菌落, 得到含第二个目的基因的载体 pYL1305AB, 并且此载体恢复了 pYL1305 的重组位点和酶切位点, 继

续做为下一轮的受体载体重复以上步骤, 进行更多基因的组装。

得到的双价载体用冻融法^[16]转化农杆菌 LBA4404, 农杆菌介导的叶盘法转化烟草 (*N. tabacum*) 参考 Horsch^[17], 抗性植株的筛选使用潮霉素、叶盘分化和生根筛选时都添加 Hyg 20 mg/L。

1.6 抗性植株的检测

PCR 检测: 对未转基因植株 DNA、质粒 pYL1305MC 和抗性植株 DNA 同时用 *MdSPDS1* 基因和 *CBF1* 基因的引物(表 1)进行 PCR 扩增检测, PCR 扩增体系为 20 μ L。扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 50 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 产物取 5 μ L 进行 1% 琼脂糖凝胶电泳。

GUS 染色检测: 在载体 pYL1305 上有 GUS 基因, 因此可通过 GUS 染色来鉴定阳性植株。GUS 染色参照 Jefferson 等^[18]的方法进行, 在此基础上进行一些改进^[19]。把经 PCR 检测阳性的烟草叶片浸入含 10% 甲醇的 GUS 染色液 (NaH_2PO_4 100 mmol/L, Na_2EDTA 10 mmol/L, $\text{K}_3[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 0.5 mmol/L, $\text{K}_4[\text{Fe}(\text{CN})_6]$ 0.5 mmol/L, Triton-X100 1 mL, X-Gluc 0.5 mg/mL), 37 $^{\circ}$ C 温育 4 h, 然后去掉染色液, 用 FAA 溶液脱色过夜, 拍照观察。

荧光定量 PCR 检测: 选择经以上 2 种方法检测都显阳性的植株提取 RNA, 经反转录得到 cDNA, 得到的 cDNA 稀释 10 倍后作为模板, 在 Roche

Light Cycler 480 实时荧光定量 PCR 仪上对 *MdSPDS1* 和 *CBF1* 基因扩增, 2 个基因的引物 RT*MdSPDS1* 和 RT*CBF1* 同表 1。内参选用烟草的 *Actin* 基因, 引物序列同表 1。

2 结果与分析

2.1 供体载体的改建

利用 PCR 法分别从 pGWB2 载体中得到 GW, 35sGW-1, 35sGW-2 片断, 通过双酶切连入 pYLd1, pYLd2 载体, 得到 pYLd1GW/pYLd2GW, pYLd1GW35s/pYLd2GW35s。用克隆于拟南芥基因组的启动子 *AtMPK3* 替换掉 *CaMV* 35s 启动子, 得到载体 pYLd1GWMPK/pYLd2GWMPK, 以上载体通过测序表明构建成功, 得到的载体简图谱见图 1。

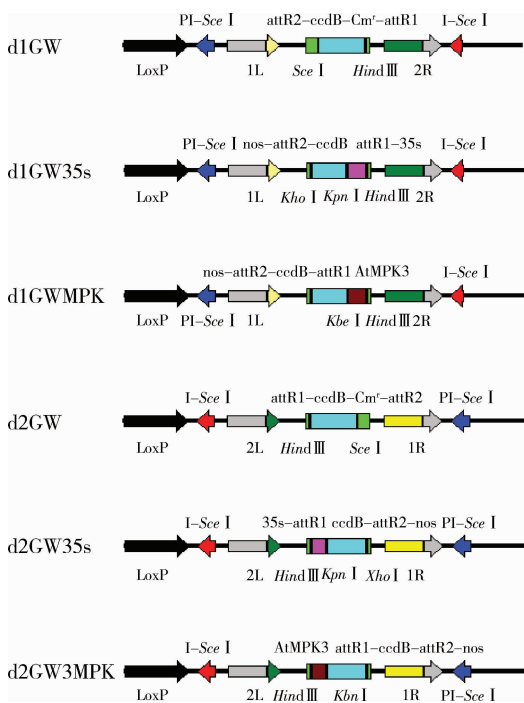


图 1 改建后的 6 个供体载体

Fig. 1 Six donor vectors after alteration

2.2 供体载体 pYLd1GW *MdSPDS1* 和 pYLd2GW *CBF1* 的构建

目的基因 *Atrd29ACBF1nos* 采用 Gateway 重组技术重组进入 pYLd1GW/pYLd2GW, 得到载体 pYLd1GW*CBF1*/pYLd2GW*CBF1*, 利用 PCR 法从 pBI121-*MdSPDS1* 载体得到 *Bam* HI-*MdSPDS1*-*Kpn* I 片断并用此片断替换掉 pYLd1GW*CBF1* 中

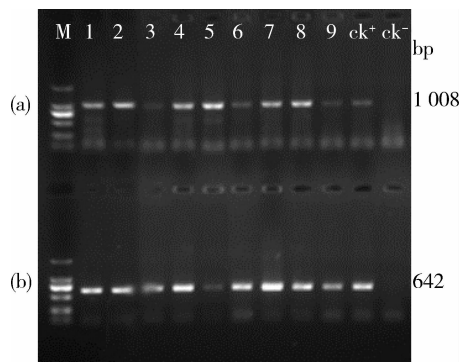
的 *CBF1* 基因, 得到 pYLd1GW*MdSPDS1*, 以上载体通过测序表明构建成功。

2.3 双价表达载体构建

供体载体 pYLd1GW*MdSPDS1* 与受体载体 pYL1305 进行重组, 得到表达载体 pYL1305M, 经测序表明载体构建成功。供体载体 pYLd2GW*CBF1* 与受体载体 pYL1305M 进行重组, 得到表达载体 pYL1305MC, 经测序表明双价载体构建成功。

2.4 双价表达载体转化烟草和转基因烟草的检测

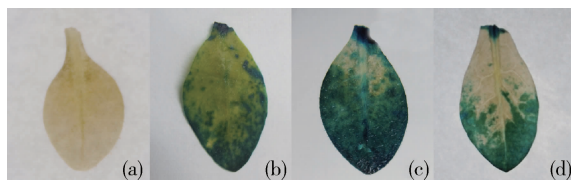
采用农杆菌介导的叶盘转化法转化烟草, 经 Hyg 筛选阳性的 30 株烟草进一步进行 PCR 检测和 GUS 染色检测。PCR 检测结果(图 2)表明: 未转化过的植株显示阴性, 有 20 株烟草 PCR 检测结果和阳性对照一致, 初步说明外源基因已进入烟草。进一步对这 20 株 PCR 检测阳性的烟草进行 GUS 染色(图 3), 全部显示阳性, 而未转化过的植株显示阴性。说明经过 PCR 检测出的转基因植株都是阳性植株。对经 GUS 染色阳性的 6 个植株进行荧光定量 PCR 检测(图 4), 结果表明在不同的植株中, 2 个



(a), (b): *MdSPDS1*/*CBF1* 基因的 PCR 检测; M: DNA Marker DL2000; 1~9: Hyg 筛选阳性烟草; ck+: 阳性对照; ck-: 阴性对照
(a), (b): Detection of *MdSPDS1*/*CBF1* by PCR; M: DNA Marker DL2000; 1~9: Positive tobacco screened by Hyg; ck+: Positive control; ck-: Negative control

图 2 转基因烟草 PCR 鉴定

Fig. 2 Detection of transgenic tobacco by PCR



(a): 阴性对照; (b)~(d): PCR 检测阳性烟草
(a): Negative control; (b)~(d): Positive tobacco detected by PCR

图 3 转基因烟草 GUS 染色检测

Fig. 3 Detection of transgenic tobacco by GUS staining

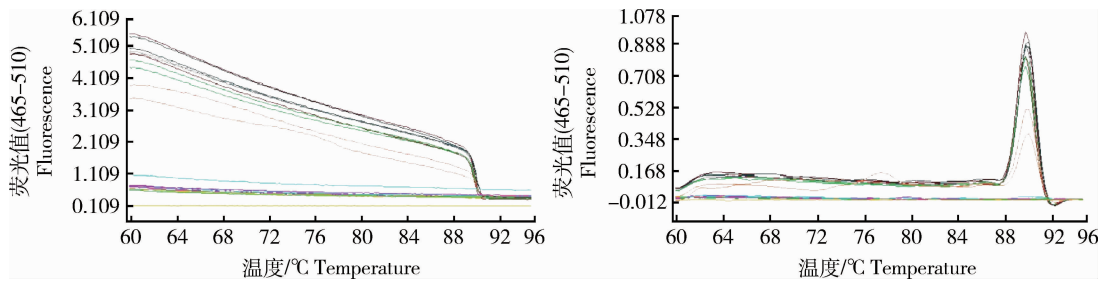


图4 荧光定量PCR的溶解曲线

Fig. 4 Melting curve of Real-time PCR

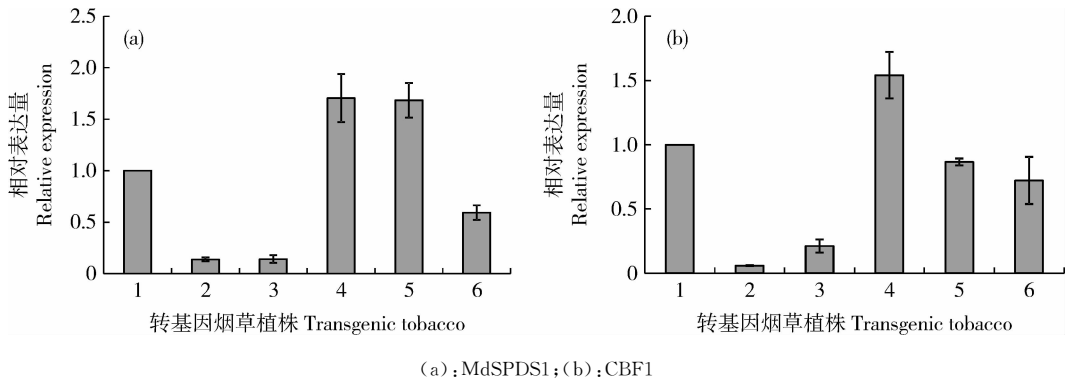


图5 转基因烟草荧光定量PCR检测

Fig. 5 Detection of transgenic tobacco by Real-time PCR

基因的表达式有明显差异,差异范围为分别为MdSPDS1 0.14~1.70,CBF1 0.05~1.54。但是2个基因的表达式差异趋势一致:MdSPDS1 4>5>6>1>3>2,CBF1 4>5>6>1>3>2(图5)。

3 结论与讨论

基于Cre/LoxP重组的多基因组系统,能利用2个供体载体和1个受体载体进行反复组装,最终得到多基因载体。虽然2个受体载体含有多克隆位点,但利用酶切连接来进行启动子、目的基因、终止子的导入还是会遇到很多问题,比如操作过程繁琐费时,有时会没有合适的酶切位点等。本研究将现在比较流行的载体构建系统Gateway系统和2个受体进行整合,得到基于Gateway系统的受体载体pYLd1GW/pYLd2GW, pYLd1GW35s/pYLd2GW35s, pYLd1GWMPK/pYLd2GWMPK, attB位点的引入使2个供体载体成为Gateway系统中的目的载体,可加速载体构建,省去了酶切连接过程。2个受体载体的GW片断可供完整表达或DNA片段如核基质结合序列^[20]的引入,同时,在GW片段两端加上的启动子和终止子可供不同基因选择,本研究只将强启动子CaMV 35s和胁迫诱导

启动子AtMPK3构建到2个受体载体上,在以后的研究中可以继续引入不同的启动子,以防过度重复使用启动子引起基因沉默。为避免过量表达,本研究选择诱导型启动子Atrd29A进行双价表达载体构建。利用改建好的供体载体,得到了载体pYLd1GWMdSPDS1和pYLd2GWCBF1,通过与受体载体pYL1305轮流重组,最终得到双元表达载体pYL1305MC,对转化烟草进行检测得到转基因植株。下一步会对转基因烟草进行抗胁迫测试,以探索2个抗胁迫基因对烟草逆境条件下的影响。

参 考 文 献

- [1] Goderis I J, De Bolle M F, Francois I E, et al. A set of modular plant transformation vectors allowing flexible insertion of up to six expression units[J]. Plant Mol Biol, 2002, 50(1): 17-27
- [2] Odon V, Luke G A, Roulston C, et al. APE-type non-LTR retrotransposons of multicellular organisms encode virus-like 2A oligopeptide sequences, which mediate translational recoding during protein synthesis[J]. Mol Biol Evol, 2013, 30(8): 1955-1965
- [3] Wada N, Kajiyama S, Akiyama Y, et al. Bioactive beads-mediated transformation of rice with large DNA fragments containing *Aegilops tauschii* genes[J]. Plant Cell Rep, 2009, 28

- (5):759-768
- [4] Wada N, Cartagena J A, Khemkladngoen N, et al. Bioactive bead-mediated transformation of plants with large DNA fragments[J]. *Methods Mol Biol*, 2012, 847:91-106
- [5] Ruhlman T, Daniell H. Applications of Plant Metabolic Engineering [M]. Berlin:Springer, 2007:79-108
- [6] Houben A, Mette M F, Teo C H, et al. Engineered plant minichromosomes[J]. *Int J Dev Biol*, 2013, 57(6/7/8):651-657
- [7] Hartley J L, Temple G F, Brasch M A. DNA cloning using *in vitro* site-specific recombination[J]. *Genome Research*, 2000, 10:1788-1795
- [8] David L Cheo, Steven A Titus, Devon R N Byrd, et al. Concerted assembly and cloning of multiple DNA segments using *in vitro* site-specific recombination; Functional analysis of multi-segment expression clones[J]. *Genome Research*, 2004, 14(10B):2111-2120
- [9] Magnani E, Bartling L, Hake S. From Gateway to MultiSite Gateway in one recombination event[J]. *BMC Mol Biol*, 2006, 7:46
- [10] Chen Q, Zhou H, Chen J, et al. A Gateway-based platform for multigene plant transformation [J]. *Plant Mol Biol*, 2006, 62(2):927-936
- [11] Buntru M, Gartner S, Staib L, et al. Delivery of multiple transgenes to plant cells by an improved version of MultiRound Gateway technology[J]. *Transgenic Res*, 2013, 22(1):153-167
- [12] Guo F, Gopaul D N, van Duyne G D. Structure of Cre recombinase complexed with DNA in a site-specific recombination synapse[J]. *Nature*, 1997, 389(6646):40-46
- [13] Lin L, Liu Y, Xu X, et al. Efficient linking and transfer of multiple genes by a multigene assembly and transformation vector system[J]. *PNAS*, 2003, 100(10):5962-5967
- [14] 贾香楠, 李伟, 沈俊岭, 等. 基于 Cre/loxP 重组系统的多基因载体构建及烟草转化研究[J]. *北京林业大学学报*, 2010, 32(5):121-125
- [15] Nakagawa T, Kurose T, Hino T, et al. Development of series of gateway binary vectors, pGWBs, for realizing efficient construction of fusion genes for plant transformation [J]. *J Biosci Bioeng*, 2007, 104(1):34-41
- [16] Walkerpeach C, Velten J. Agrobacterium-mediated gene transfer to plant cells; Cointegrate and binary vector systems [C]//Gelvin S, Schilperoot R. Springer Netherlands, 1994:33-51
- [17] Horsch R B, Fry J E, Hoffmann N L, et al. A simple and general method for transferring genes into plants[J]. *Science*, 1985, 227(4691):1229-1231
- [18] Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W. GUS fusions; beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants[J]. *EMBO J*, 1987, 6(13):3901-3907
- [19] Yan B, Srinivasa Reddy M S, Collins G B, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill.] using immature zygotic cotyledon explants[J]. *Plant Cell Reports*, 2000, 19(11):1090-1097
- [20] Allen G C, Hall G J, Michalowski S, et al. High-level transgene expression in plant cells; Effects of a strong scaffold attachment region from tobacco[J]. *Plant Cell*, 1996, 8(5):899-913

责任编辑:袁文业