

DOI: 10.3724/SP.J.1005.2008.01069

含 *gfp* 植物转基因表达载体的构建及在矮牵牛转基因不定根中的高效表达

徐纪明, 向太和

杭州师范大学生命与环境科学学院, 杭州 310036

摘要: 利用 pBIN19、pGFP 和 pCHS 质粒, 成功构建了 CaMV 35S 启动子驱动的 *gfp* 基因的植物转基因表达载体 pBIN-35S-GFP, 并导入野生型发根农杆菌 K599。矮牵牛的转化实验表明, 矮牵牛离体叶片被发根农杆菌 K599(带 pBIN-35S-GFP 质粒)感染生根率达 45%。对诱导的不定根基因组 DNA 的 PCR 检测表明, 不定根基因组中含有发根农杆菌 K599 Ri 质粒中的 *rolB* 基因和外源 *gfp* 基因;转基因不定根在蓝色光激发下能发出强烈的绿色荧光, 表明构建的转基因载体 pBIN-35S-GFP 能实现 *gfp* 基因的高效表达。该载体在 CaMV 35S 启动子的两端各有一个多克隆位点, 可以方便地进行启动子替换, 用于研究不同启动子的功能。此外, 该载体在 *gfp* 基因的 5'端含有多克隆位点, 在 3'端含有 *EcoR* I 和 *Bsm* I 两个单一酶切位点, 可以方便地在 5'端连接上目标基因, 表达含 GFP 的融合蛋白, 进行目标基因编码蛋白的亚细胞定位;也可以方便地切除 *gfp* 基因, 连上需要的目的基因进行转化。

关键词: 绿色荧光蛋白基因; 表达载体; 构建; 转基因; 不定根

Construction of a novel vector harboring green fluorescence protein gene (*gfp*) and high expression of *gfp* in transformed roots of *Petunia hybrida*

XU Ji-Ming, XIANG Tai-He

College of Life and Environment Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China

Abstract: A novel vector pBIN-35S-GFP was constructed from the plasmids of pBIN19, pGFP, and pCHS, which included *gfp* gene driven by the CaMV 35S promoter. The hairy roots of *Petunia hybrida* were induced by wild-type *Agrobacterium rhizogenes* K599 harboring pBIN-35S-GFP with the frequency of 45%. The PCR results showed that *rolB* from K599 Ri plasmid and *gfp* from pBIN-35S-GFP were co-transformed into the genome of *P. hybrida*. The high activity of green fluorescence protein was detected by fluorescence microscopy. In particular, the vector carries multiple cloning sites at both 5' and 3' of the CaMV 35S promoter, which allows easy exchange 35S promoter to study other promoter functions. In addition, there are multiple cloning sites at 5' end and one-sites of *EcoR* and *Bsm* sites at 3' end of *gfp*. Therefore, it supports to fusion target genes to expression fusion protein and can be replaced with any other genes of interest for genetic transformation.

收稿日期: 2007-12-07; 修回日期: 2008-01-11

基金项目: 浙江省自然科学基金项目(编号: Y304083), 杭州市科技创新项目(编号: 20070232H07)和杭州市“131”人才基金项目资助[Supported by the Natural Science Foundation of Zhejiang Province (No. Y304083), the Science and Technology Foundation of Hangzhou Government Administration (No. 20070232H07), and the Science Foundation for Hangzhou “131” Talents]

作者简介: 徐纪明(1983-), 男, 山东诸城人, 硕士研究生, 专业方向: 植物基因工程。Tel: 0571-28865327; E-mail: xujiming2005@163.com

通讯作者: 向太和(1965-), 男, 安徽青阳人, 博士, 教授, 研究方向: 植物基因工程和细胞工程及生物信息学。Tel: 0571-28865327;

E-mail: xthcn@163.com

Keywords: green fluorescence protein gene; expression vector; construction; genetic transformation; hairy root

绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)是海洋动物水母(*Aequorea victoria*)体内的一种发光蛋白。其编码基因 *gfp* 作为一种新颖的非酶性标记基因具有许多优点:检测方便,只需要荧光显微镜或激发光源;材料无需前处理,可以活体检测;无需任何底物或辅助因子;对细胞本身几乎无毒;植物本身不含有 GFP,不会出现假阳性;对于一些使用抗生素或除草剂会降低转基因效率的物种, GFP 可以作为替代的选择标记;由于 GFP 分子量较小,不影响与其融合的蛋白的生物学活性,所以 GFP 在研究蛋白的亚细胞定位方面也是一个很好的工具^[1,2]。构建含有*gfp*基因的表达载体在植物转基因研究中具有重要的应用价值。

Haseloff等^[3]、Richards等^[4]、Tzfira等^[5]、范文韬等^[6]和熊玲媛等^[7]分别报道构建了含有*gfp*基因的表达载体。本研究利用pBIN19、pGFP和pCHS质粒,成功构建了CaMV 35S启动子驱动*gfp*基因的表达载体pBIN-35S-GFP,并导入野生型发根农杆菌K599,转化矮牵牛,实现了*gfp*基因在矮牵牛转基因不定根中的高效表达。

1 材料和方法

1.1 材料

菌种 XL1-Blue MRF'、野生型发根农杆菌 K599、质粒 pBIN19 和 pGFP 均由本实验室保存;质粒 pCHS 由中国台湾中央研究院生物农业科学研究所陶建英博士惠赠。质粒小量提取试剂盒、DNA 胶回收试剂盒购自上海 Sangon 公司。*Taq* DNA 聚合酶、dNTP、限制性核酸内切酶和 T4 DNA 连接酶购自美国 Promega 公司。抗生素和乙酰丁香酮购自北京博大泰克生物基因技术有限责任公司。矮牵牛无菌苗由矮牵牛种子灭菌后,于 1/2 MS 上培养所得。

1.2 方法

1.2.1 含 *gfp* 基因植物转基因表达载体的构建

质粒DNA小量提取、酶切、片段回收均参照产品说明书进行;连接、转化克隆的筛选鉴定按照《分子克隆实验指南》进行^[8]。转基因表达载体的构建分2步进行:第一步,质粒pGFP经*EcoR* + *Bam*H

酶切后回收含*gfp*基因的小片段,与质粒pBIN19经*EcoR* + *Bam*H 酶切后的大片段连接得到新质粒pBIN19-GFP;第二步,质粒pCHS经*Hind* + *Xba* 酶切后回收含CaMV 35S启动子的小片段,与质粒pBIN19-GFP经*Hind* + *Xba* 酶切后的大段连接得到新质粒pBIN-35S-GFP(图1)。

1.2.2 pBIN-35S-GFP 导入发根农杆菌 K599

发根农杆菌K599感受态的制备和质粒的提取均参照文献^[9]的方法进行。用冻融法将pBIN-35S-GFP导入发根农杆菌K599,即在100 μL K599感受态细胞中加入约0.1 μg纯化质粒DNA,混匀,0℃冰上放置10 min,置于液氮速冻5 min,立即用28℃水浴热激5 min,加入500 μL LB液体培养基,在28℃缓慢振荡培养2 h。取100 μL菌液分别涂布于LB+Km(卡那霉素)50 mg/L+Str(链霉素)50 mg/L固体培养基上,28℃培养约48 h筛选抗性菌落。

1.2.3 发根农杆菌 K599 介导的遗传转化和不定根的繁殖

发根农杆菌 K599/pBIN-35S-GFP 单克隆在LB+Km 50 mg/L+Str 50 mg/L液体培养基中28℃、200 r/min过夜培养,再取5 mL菌液移入50 mL MS+Km 50 mg/L+Str 50 mg/L液体培养基中28℃、200 r/min培养至 OD_{600} 为0.5左右,5 000 r/min、4℃离心10 min,收集菌体,用MS培养基清洗3次后,用MS+乙酰丁香酮20 mg/L培养基将菌液稀释10倍后作为侵染液。

取矮牵牛无菌苗叶片,剪成5 mm²的小块,放入侵染液中10 min,用无菌滤纸吸干菌液,置于MS培养基上共培养3 d后,转入MS+Cef(头孢霉素)500 mg/L+Km 50 mg/L培养基上培养;同时将未经侵染的矮牵牛叶片外植体培养在相同的培养基上作为阴性对照。待长出不定根后,将不定根转入MS+Cef 500 mg/L+Km 50 mg/L培养基中繁殖。

1.2.4 不定根的 PCR 鉴定和 GFP 蛋白荧光检测

不定根基因组DNA的提取参照向太和等^[10]的方法。参照施和平等^[11]的报道设计扩增*rolB*基因的引物*rolB*-P1和*rolB*-P2。引物序列:

rolB-P1: 5'-GCTCTTGACAGTGCTAGATTT-3';

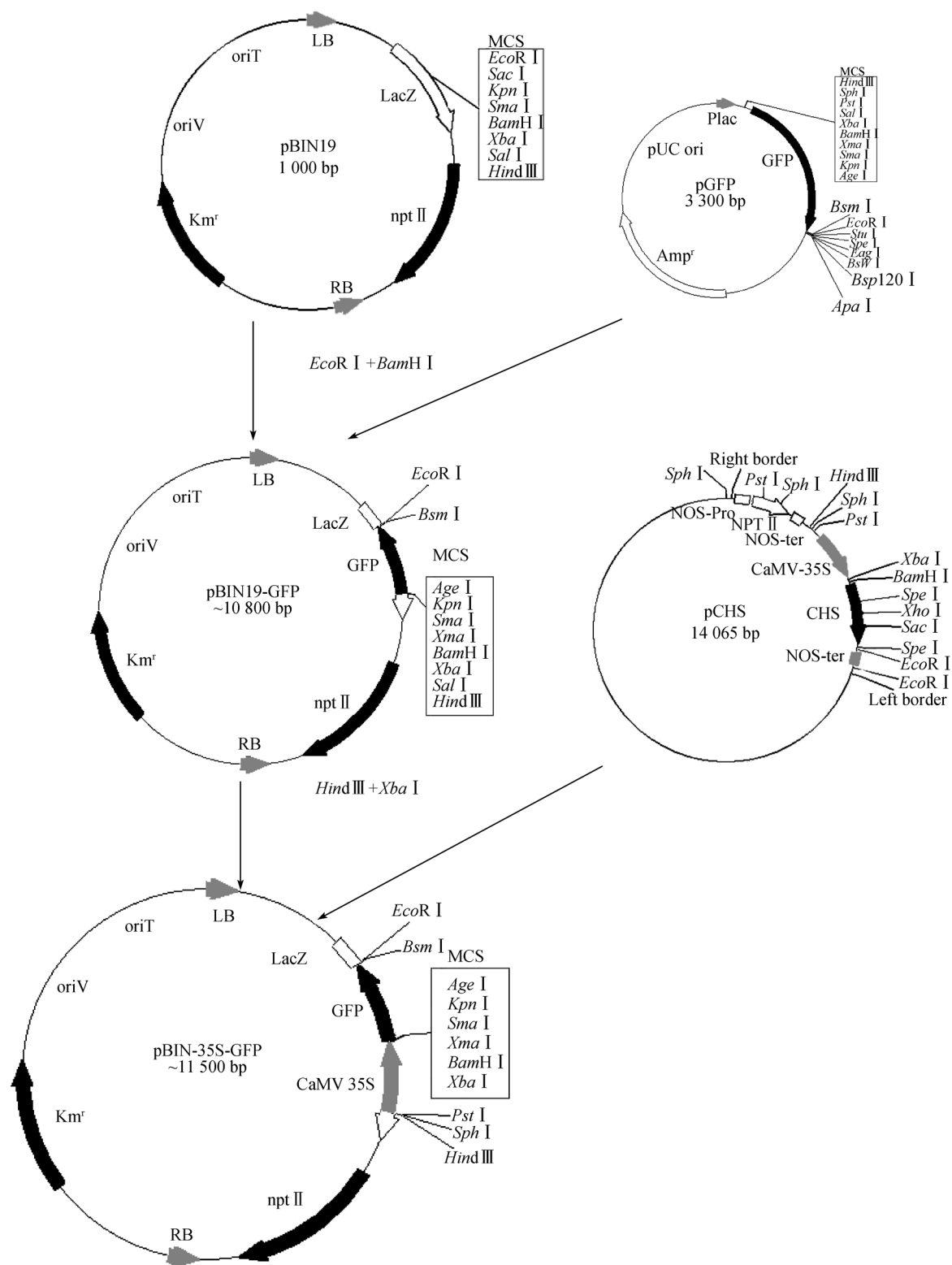


图 1 载体 pBIN-35S-GFP 构建示意图

Fig. 1 Construction diagram of the vector pBIN-35S-GFP

rolB-P2 : 5'-GAAGGTGCAAGCTACCTCTC-3'.

参照Lee等^[12]的报道设计扩增*virG*基因的引物 virG-P1 和 virG-P2, 引物序列:

virG-P1 : 5'-TTATCTGAGTGAAGTCGTCTCAG G-3';

virG-P2 : 5'-CGTCGCCTGAGCTTAAGTGTC-3'.

根据 *gfp* 基因(GenBank 登记号 :U17997)序列设计引物 GFP-P1 和 GFP-P2, 引物序列:

GFP-P1 : 5'-GTCAGTGGAGAGGGTGAAGG-3';

GFP-P2 : 5'-AAAGGGCAGATTGTGTGGAC-3'.

PCR 扩增反应体积为 35 μ L, 其中包括 0.2 μ L 10 mmol/L dNTP 混合物, 2 μ L 10 pmol/L PCR 引物, 2 U *Taq* Plus DNA 聚合酶和约 0.2 μ g DNA。用美国 ABI 公司 PE9700 型 DNA 扩增仪进行扩增反应。PCR 反应程序为: 94 5 min 变性后, 按 94 45 s、55 45 s、72 90 s 的设置进行 30 个循环, 反应结束后在 72 下延伸 10 min, 随后于 4 保存备用。扩增产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶上电泳 1.5 h (5 V/cm), 溴化乙锭(EtBr)染色, 用美国 Bio/Rad 凝胶成像系统观察并拍照记录。

用 ZEISS 显微镜(型号: Axio imager)在蓝色激发光下(滤光片 FITC)对诱导出的不定根进行荧光检测, 用 ZEISS 显微镜配套的数码成像系统拍照记录。

2 结果与分析

2.1 表达载体 pBIN-35S-GFP 的构建

质粒 pGFP 经 *EcoR* + *BamH* 酶切后回收含 *gfp* 基因的小片段, 与质粒 pBIN19 经 *EcoR* + *BamH* 酶切后的大片段连接, 得到新质粒 pBIN19-GFP。pBIN19-GFP 经 *EcoR* + *BamH* 酶切鉴定得到约 10 kb 和 750 bp 的两个片段, 表明构建正确(图 2)。

质粒 pCHS 经 *Hind* + *Xba* 酶切后回收含 CaMV 35S 启动子的小片段, 与质粒 pBIN19-GFP 经 *Hind* + *Xba* 酶切后的大片段连接得到新质粒 pBIN-35S-GFP。质粒 pBIN-35S-GFP 经 *Hind* + *Xba* 酶切鉴定得到约 10.7 kb 和 900 bp 的两个片段, 说明构建正确(图 3)。

2.2 矮牵牛转基因不定根的诱导和繁殖

矮牵牛无菌苗离体叶片在发根农杆菌 K599/pBIN-35S-GFP 侵染后 10 d 左右, 切口边缘长出白色小突起; 15 d 左右, 切口边缘长出明显可见的白色不

定根(图 4A), 不定根的诱导频率达 45%(18/40); 而未经发根农杆菌 K599/pBIN-35S-GFP 侵染的外植体未见根的生成。待不定根长到 5 cm 左右, 切成两段, 培养在无任何植物激素的 MS+Cef 500 mg/L+Km

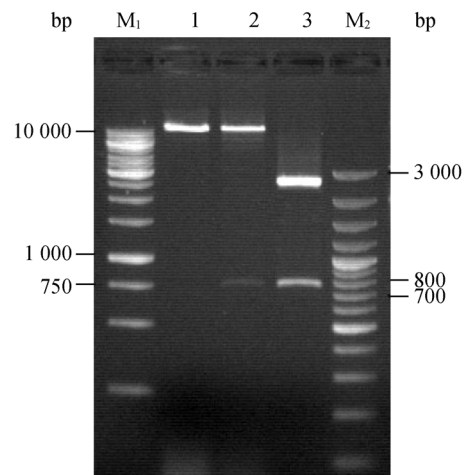


图 2 质粒 pBIN19-GFP DNA 经 *EcoR* I 和 *BamH* I 酶切结果

M₁: 1 kb DNA ladder 标准分子量标记; 1: pBIN19 被 *EcoR* + *BamH* 酶切; 2: pBIN19-GFP 被 *EcoR* + *BamH* 酶切; 3: pGFP 被 *EcoR* + *BamH* 酶切; M₂: 100 bp DNA ladder Plus 标准分子量标记。

Fig. 2 Result of plasmid pBIN19-GFP DNA digested with *EcoR* I and *BamH* I

M₁: 1 kb DNA ladder; 1: pBIN19 digested with *EcoR* + *BamH*; 2: pBIN19-GFP digested with *EcoR* + *BamH*; 3: pGFP digested with *EcoR* + *BamH*; M₂: 100 bp DNA ladder Plus.

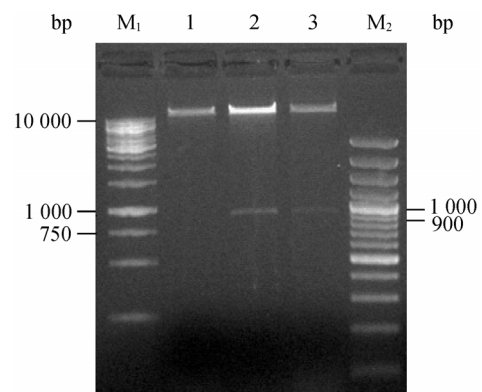


图 3 质粒 pBIN-35S-GFP DNA 经 *Hind* III 和 *Xba* I 酶切结果

M₁: 1 kb DNA ladder 标准分子量标记; 1: pBIN19-GFP 被 *Hind* + *Xba* 酶切; 2: pBIN-35S-GFP 被 *Hind* + *Xba* 酶切; 3: pCHS 被 *Hind* + *Xba* 酶切; M₂: 100 bp DNA ladder Plus 标准分子量标记。

Fig. 3 Result of plasmid pBIN-35S-GFP DNA digested with *Hind* and *Xba* I

M₁: 1 kb DNA ladder; 1: pBIN19-GFP digested with *Hind* + *Xba*; 2: pBIN-35S-GFP digested with *Hind* + *Xba*; 3: pCHS digested with *Hind* + *Xba*; M₂: 100 bp DNA ladder Plus.

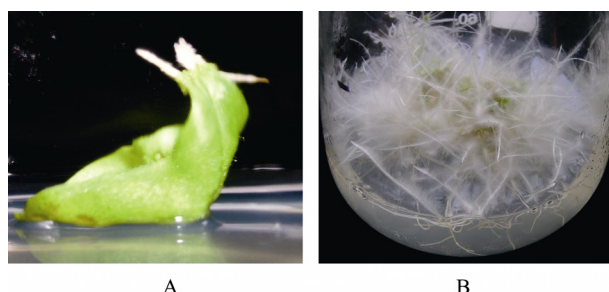


图 4 矮牵牛叶片被发根农杆菌 K599 侵染后形成的不定根

A: 被 K599 侵染 15 d 长出的不定根; B: 不定根的大量繁殖。

Fig. 4 Hairy roots induced by *Agrobacterium rhizogenes* K599 on leaf of *Petunia hybrida*

A: Hairy roots induced by K599 after inoculated 15 days; B: Vigorous growth of hairy roots.

50 mg/L 上。在该培养基上不定根生长旺盛, 15~20 d 即可形成大量毛状分枝的不定根(图 4B)。

2.3 转基因不定根的 PCR 检测

根据 *rolB* 基因序列设计的引物 *rolB*-P1 和 *rolB*-P2 对获得的 6 个转基因不定根和野生型发根农杆菌 K599 自身携带的 Ri 质粒均扩增出约 450 bp 大小的条带。同时, 根据 *gfp* 基因序列设计的引物 GFP-P1 和 GFP-P2 对获得的 6 个转基因不定根和质粒 pBIN-35S-GFP 均扩增出 538 bp 的条带; 而非转基因的矮牵牛根基因组 DNA 均未扩增出任何条带(图 5)。

此外, 根据发根农杆菌 *virG* 基因设计的引物 *virG*-P1 和 *virG*-P2 对 K599 自身携带的 Ri 质粒、质粒 pBIN-35S-GFP 和矮牵牛转基因不定根基因组 DNA 进行扩增, 结果只有 K599 自身携带的 Ri 质粒扩增出了长度约 1 kb 条带(图 6), 因此, 排除了不定根中存在残留农杆菌污染的可能。

上述结果表明, *rolB* 基因和 *gfp* 基因已经共同整合到不定根的基因组中, 即获得的不定根为转基因不定根。

2.4 转基因不定根 GFP 荧光检测

利用荧光显微镜观察, 转基因不定根在蓝色光激发下, 发出强烈的绿色荧光(图 7)。表明 *gfp* 基因在转基因根中实现了高效表达。

3 讨论

近年来, 绿色荧光蛋白基因(*gfp*)作为一种非酶报告基因引起人们的广泛兴趣。其编码蛋白 GFP 含有特殊的六肽生色团结构, 当用蓝紫光激发时能发

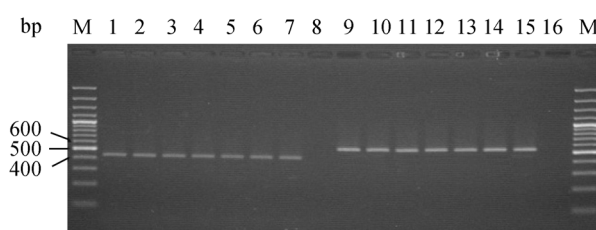


图 5 利用 *rolB* 和 *gfp* 基因引物对转基因获得的不定根进行 PCR 扩增的结果

1~8 是 *rolB* 基因引物扩增的结果, 9~16 是 *gfp* 基因引物扩增的结果。M: 100 bp DNA ladder Plus 标准分子量标记; 1: 野生型发根农杆菌 K599 Ri 质粒; 2~7: 矮牵牛转基因根; 8: 矮牵牛非转基因根; 9: 质粒 pBIN-35S-GFP; 10~15: 矮牵牛转基因根; 16: 矮牵牛非转基因根。

Fig. 5 PCR results of hairy root DNA with primers from *rolB* and *gfp* genes

No. 1 to 8 are PCR products with the pair of primers from *rolB*, while No. 9 to 16 are amplified by the primers from *gfp*. M: 100 bp DNA ladder Plus; 1: Ri plasmid of wild *Agrobacterium rhizogenes* K599; 2~7: Transformed root of *Petunia hybrida*; 8: Non-transformed root of *Petunia hybrida*; 9: Plasmid pBIN-35S-GFP; 10~15: Transformed root of *Petunia hybrida*; 16: Non-transformed root of *Petunia hybrida*.

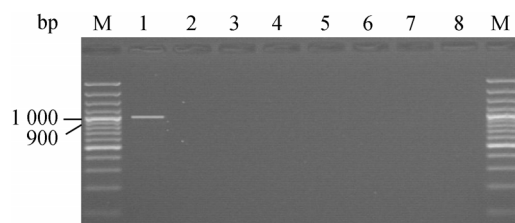


图 6 利用 *virG* 基因引物对转基因不定根进行 PCR 扩增的结果

M: 100 bp DNA ladder Plus 标准分子量标记; 1: 野生型发根农杆菌 K599 Ri 质粒; 2: 质粒 pBIN-35S-GFP; 3~8: 矮牵牛转基因根。

Fig. 6 A PCR profile of hairy root DNA with a pair of primers from *virG* gene

M: 100 bp DNA ladder Plus; 1: Ri plasmid of wild *Agrobacterium rhizogenes* K599; 2: Plasmid pBIN-35S-GFP; 3~8: Transformed roots of *Petunia hybrida*.

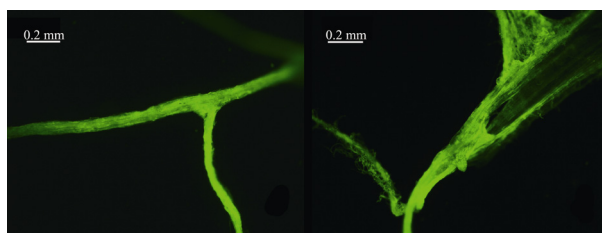


图 7 不定根的荧光检测

Fig. 7 Hairy roots observed by fluorescence microscope

出肉眼清晰可见的绿色荧光, 无需任何底物或辅助因子, 因此作为有效的报告基因用于植物的遗传转化研究比蛋白酶报告基因更为快捷方便。本研究成功构建了组成型启动子 CaMV 35S 驱动的 *gfp* 植物

转基因表达载体,并实现了在矮牵牛转基因根中 *gfp* 基因的高效表达。该载体具有以下优点:在 CaMV 35S 启动子的两端各有一个多克隆位点(图 1),因此可以方便地进行启动子替换,用于研究不同启动子的功能。本实验室已利用该载体,通过启动子替换进行两个花特异性启动子的功能比较(将另文发表);在 *gfp* 基因的 5'端含有多克隆位点,在 3'端含有 *EcoR* 和 *Bsm* 两个单一酶切位点(图 1),因此,可以方便地在 5'端连接上目标基因,表达含 GFP 的融合蛋白,通过荧光观察来进行目标基因编码蛋白的亚细胞定位,也可以方便地切除 *gfp* 基因,连上需要的目的基因进行转化。

此外,值得一提的是,本研究构建的载体 pBIN-35S-GFP 中的 T-DNA 区段来自于根癌农杆菌,对矮牵牛转基因不定根基因组 DNA 的 PCR 结果显示, *gfp* 基因和来源于发根农杆菌 K599 的 *rolB* 基因均整合进不定根的基因组中,表明发根农杆菌 K599 Ri 质粒可以有效地介导根癌农杆菌 Ti 质粒 T-DNA 的共整合,这与 Cho 等^[13]的报道相一致。而 *rolB* 基因和 *virG* 基因引物对野生型发根农杆菌 K599 Ri 质粒 DNA 扩增的条带大小分别约为 450 bp 和 1 kb,这与前人报道^[11, 12]的 540 bp 和 0.9 kb 大小不同,这可能是由于发根农杆菌种类不同所致(如:本研究使用的发根农杆菌 K599 为黄瓜碱型);同时提示,不同种类的发根农杆菌,其 *rolB* 基因和 *virG* 基因的序列可能存在一定的差异。

参考文献(References):

- [1] Stewart CN Jr. The utility of green fluorescent protein in transgenic plants. *Plant Cell Rep*, 2001, 20(5): 376–382. [\[DOI\]](#)
- [2] Zimmer M. Green fluorescent protein (GFP): Applications, structure, and related photophysical behavior. *Chem Rev*, 2002, 102(3): 759–781. [\[DOI\]](#)
- [3] Haseloff J, Siemering KR, Prasher DC, Hodge S. Removal of a cryptic intron and subcellular localization of green fluorescent protein are required to mark transgenic *Arabidopsis* plants brightly. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94(6): 2122–2127. [\[DOI\]](#)
- [4] Richards HA, Rudas VA, Sun H, McDaniel JK, Tomaszewski Z, Conger BV. Construction of a GFP-BAR plasmid and its use for switchgrass transformation. *Plant Cell Rep*, 2001, 20(1): 48–54. [\[DOI\]](#)
- [5] Tzfira T, Tian GW, Lacroix B, Vyas S, Li J, Leitner-Dagan Y, Krichevsky A, Taylor T, Vainstein A, Citovsky V. pSAT vectors: a modular series of plasmids for autofluorescent protein tagging and expression of multiple genes in plants. *Plant Mol Biol*, 2005, 57(4): 503–516. [\[DOI\]](#)
- [6] FAN Wen-Tao, LIU De-Li, SUN Xiao-Jie, YANG Cheng-Li. Construction of the recombinant plasmid pBI-GFP. *Journal of Central China Normal University (Natural Science)*, 2000, 34(2): 213–215.
范文韬, 刘德立, 孙晓洁, 杨成丽. 带有绿色荧光蛋白基因(*gfp*)的植物重组表达质粒 pBI-GFP 的构建. 华中师范大学学报(自然科学版), 2000, 34(2): 213–215.
- [7] XIONG Ling-Yuan, CHEN Liang, SHEN Ming-Shan, HUANG Yin-Yi, CHEN Mu-Chuan. Constructing of the recombinant plasmid 1301pB G and expression of GFP-mut2 in *Rebaudiana* callus. *Journal of Xiamen University (Natural Science)*, 2002, 41(5): 546–550.
熊玲媛, 陈亮, 沈明山, 黄胤怡, 陈睦传. GFP-mut2 植物表达载体的构建及在甜菊愈伤组织中的表达. 厦门大学学报(自然科学版), 2002, 41(5): 546–550.
- [8] Sambrook F, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Clones: A Laboratory Manual* (2nd ed). Cold Spring Harbor Press, 1989, 74–104.
- [9] XIANG Tai-He, YANG Jian-Bo, Somers DA. Disarming of wild type *Agrobacterium rhizogenes* K599. *Hereditas (Beijing)*, 2001, 23(4): 336–340.
向太和, 杨剑波, Somers DA. 野生型发根农杆菌 K599 的解毒. 遗传, 2001, 23(4): 336–340.
- [10] XIANG Tai-He, WANG Li-Lin, PANG Ji-Liang, CHEN Min, XU Chao. Hairy root induced by wild-type *Agrobacterium rhizogenes* K599 in soybean, cucumber and garden balsam *in vivo*. *Hereditas(Beijing)*, 2005, 27(5): 783–786.
向太和, 王利琳, 庞基良, 陈敏, 许超. 发根农杆菌 K599 对大豆、黄瓜和凤仙花活体感染生根的研究. 遗传, 2005, 27(5): 783–786.
- [11] SHI He-Ping, QI Ying, ZHANG Yue, LIANG Shan. Induction of cucumber hairy roots and effect of cytokinin 6-BA on its growth and morphology. *Chinese Journal of Biotechnology*, 2006, 22(3): 514–520.
施和平, 齐莹, 张悦, 梁山. 黄瓜毛状根的诱导及细胞分裂素 6-BA 对其生长和形态的影响. 生物工程学报, 2006, 22(3): 514–520.
- [12] Lee MH, Yoon ES, Jeong JH, Choi YE. *Agrobacterium rhizogenes*-mediated transformation of *Taraxacum platycarpum* and changes of morphological characters. *Plant Cell Rep*, 2004, 22(11): 822–827. [\[DOI\]](#)
- [13] Cho HJ, Farrand SK, Noel GR, Widholm JM. High-efficiency induction of soybean hairy roots and propagation of the soybean cyst nematode. *Planta*, 2000, 210(2): 195–204. [\[DOI\]](#)