

烟草 MARs 的分离及功能鉴定

王健美,常正尧,高丽君,王凤泽,齐冰

(泰山医学院 生物科学系,山东 泰安 271000)

[摘要] **【目的】**研究烟草 MARs 序列对外源基因表达的影响,从中筛选出能明显提高目的基因表达水平的强 MARs 序列。**【方法】**用 PCR 方法从烟草基因组中克隆得到 3 个 MARs 序列(TM1、TM2 和 TM3),将这 3 个 MARs 序列分别顺向构建到植物表达载体 pBI121 GUS 基因表达盒两端,经农杆菌介导转化烟草,对获得的转基因植株体内的 GUS 酶活性进行了定量检测,分析 MARs 对 GUS 酶活性的影响。**【结果】**(1)序列分析表明, TM2 和 TM3 是两个新的 MARs 序列;(2)GUS 酶活性的定量检测表明, TM1、TM2、TM3 可以使 GUS 基因的平均表达活性分别提高 1.4、5.1 和 1.3 倍,但不同转化个体之间的表达水平有明显差异。**【结论】**虽然克隆到的 3 个 MARs 序列均可提高外源基因 GUS 的表达,但其并未降低转基因植株个体间外源基因表达水平的差异。

[关键词] 烟草; MARs 序列; GUS 基因; 表达活性

[中图分类号] Q78; S572.01

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2008)06-0073-05

Isolation and functional identification of tobacco MARs

WANG Jian-mei, CHANG Zheng-yao, GAO Li-jun, WANG Feng-ze, QI Bing

(Department of Biological Sciences, Taishan Medical University, Taian, Shandong 271000, China)

Abstract: **【Objective】** The paper studied the effects of tobacco MARs on transgene expression and select strong MARs which can obviously increase transgene expression level. **【Method】** Three MARs (TM1, TM2 and TM3) were cloned from tobacco genome by PCR. Vectors pBI121 were modified with direct repeat MARs inserted on both sides of the reporter gene cassette and were transferred into tobaccos via *Agrobacterium*-mediated transformation method. GUS activity of the transgenic tobaccos was detected according to Jefferson and the effect of MARs on GUS activity was analyzed. **【Result】** (1) Sequence analysis showed that TM2 and TM3 were two new MARs. (2) Quantitative detection of GUS activity for the transgenic tobaccos showed that TM1, TM2 and TM3 increased the average GUS activity by 1.4-folds, 5.1-folds and 1.3-folds. But the expression differences among individual transformants were still obvious. **【Conclusion】** Three MARs could increase GUS gene expression level, but the expression differences among individual transformants were still obvious.

Key words: tobacco; MARs; GUS gene; expression activity

在转基因植物研究中,常常出现转基因沉默现象,又叫转基因失活,这种现象对于植物基因工程的应用与作物改良是一大障碍^[1]。过去,人们常常通过去甲基化或改变启动子等方式试图缓解这一现象的发生,但效果甚微^[2]。近年来, MARs 序列的发现及功能研究,为克服转基因沉默、培育外源基因高效

表达的转基因工程农作物提供了一条有效途径^[3]。核基质结合区(Matrix attachment regions, MARs)是真核生物基因组中能特异结合核基质的一段 DNA 序列,将 MARs 序列插入到外源基因两翼,构建表达载体并转化动植物,能够提高目的基因的表达水平,降低转基因沉默现象^[3],同时还可以缩小由

* [收稿日期] 2007-10-30

[基金项目] 泰安市科技局计划项目(2006D1076);泰山医学院青年科学基金项目(2007QN57)

[作者简介] 王健美(1976—),女,山东高密人,讲师,硕士,主要从事生物技术研究。E-mail: jmwang@tsmc.edu.cn

“位置效应”引起的不同转化体中外源基因表达的差异^[4]。

本试验通过 PCR 方法,从烟草基因组中分离出 3 个 MARs 序列,对其序列特征进行了分析。同时将 3 个 MARs 分别构建到植物表达载体 pBI121 *GUS* 基因表达盒两端,通过农杆菌介导转化烟草,研究其对外源基因表达的影响,以期从中筛选出能明显提高目的基因表达水平的强 MARs 序列,从而获得具有自主知识产权的高效表达载体,为克服转基因沉默提供一条新途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 无菌苗烟草 NC89,由泰山医学院生物科学实验室提供。

1.1.2 菌株与质粒 大肠杆菌菌株 *E. coli* DH5 α ,农杆菌菌株 LBA4404,克隆载体 pGEM-T easy vector,植物表达载体 pBI121,均为泰山医学院生物科学实验室保存。

1.1.3 酶及生化试剂 PCR 试剂、X-gal、IPTG、DNA 回收试剂盒,均购自上海生物工程公司; *Hind* III Linker、*Eco*R I Linker、Klenow 片段、T₄DNA 连接酶、限制性内切酶、DNA Marker,均购自联星生物公司。

1.2 烟草 MARs 的克隆

1.2.1 引物的设计与合成 根据 MARs 序列的特征设计 2 对富含 A/T 的引物。

引物 1 上游引物 P1: 5'-TCGAT TAAAA ATCCC AATTA-3'; 下游引物 P2: 5'-TATTT TCAGA AGAAG TTCCC-3'。

引物 2 上游引物 P3: 5'-GATAC GTAAA CAACG TGTAT-3'; 下游引物 P4: 5'-TATAC TCTGG ATCGG GCCG-3'。

引物均由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2.2 烟草基因组 DNA 的提取 称取 0.2 g 幼嫩烟草叶片,参常规 CTAB 提取方法^[5],分离烟草叶片基因组 DNA。

1.2.3 PCR 扩增及产物的回收 以提取的烟草叶片基因组 DNA 为模板进行 PCR 扩增。PCR 反应体系为: ddH₂O 35.5 μ L, 10 $\times$ PCR Buffer 5 μ L, dNTP(各 2.5 mmol/L) 1 μ L, MgCl₂(25 nmol/L) 4 μ L, 引物(20 μ mol/L) 各 1 μ L, DNA 模板 2 μ L, *Taq* 聚合酶(5 U/ μ L) 0.5 μ L, 总体积 50 μ L。反应参数

为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 60 s, TM1 和 TM2 于 46 $^{\circ}$ C 退火 60 s, TM3 于 60 $^{\circ}$ C 退火 60 s, 然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 共进行 35 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。反应完毕后, 取 10 μ L 扩增产物在含 10 g/L 溴化乙锭的琼脂糖凝胶上进行电泳, 然后在紫外透射仪下观察, 使用 UNIQ-10 柱式 DNA 回收试剂盒对其进行纯化回收。

1.2.4 序列的克隆 将回收的目的 DNA 片段与克隆载体 pGEM-T 连接, 经 CaCl₂ 法转化大肠杆菌 DH5 α , 菌液涂布在含有 IPTG、X-Gal 和氨苄青霉素的 LB 培养基平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养 20 h, 经蓝白斑筛选、PCR 扩增和酶切鉴定筛选阳性克隆, 具体操作参照王关林等^[5]的方法进行。

1.2.5 DNA 序列测定与分析 将鉴定为阳性的菌液送至大连宝生物公司进行序列测定, 并用 DNA-MAN、BLAST 软件进行序列分析和序列同源性比较。

1.3 植物表达载体的构建与鉴定

用 *Eco*R I 将 TM1 和 TM2 从重组克隆载体上切下来, 分别插入到含 *GUS* 基因的表达载体 pBI121 的 *Eco*R I 酶切位点, 获得质粒 pBIG-USTM1 和 pBIGUSTM2; 用 *Not* I 将 TM3 从重组克隆载体上切下, 将 TM3 (Klenow 片段补平 + *Eco*R I Linker) 经 *Eco*R I 酶切后插入到含 *GUS* 基因的表达载体 pBI121 的 *Eco*R I 酶切位点, 获得质粒 pBIGUSTM3。通过 PCR 方法筛选出 MARs 序列正向插入的表达载体, 然后再将带有 *Eco*R I 粘性末端的 TM1、TM2 和带有 *Not* I 粘性末端的 TM3 分别用 Klenow 片段补平, 连接 *Hind* III Linker, 经 *Hind* III 酶切后分别插入到 pBIGUSTM1、pBIG-USTM2 和 pBIGUSTM3 质粒 DNA 的 *Hind* III 酶切位点, 同样用 PCR 方法筛选出 MARs 序列正向插入的表达载体。最终得到 MARs 序列呈顺式重复的植物表达载体 pBITM1GUSTM1、pBITM2GUSTM2 和 pBITM3GUSTM3。

1.4 农杆菌介导叶盘法转化烟草及再生植株的筛选

用叶盘法转化烟草 NC89, 在含有羧苄和卡那霉素的 MS 培养基上筛选抗性植株, 然后将其移到生根培养基上生根, 待根系发育好后, 移入盛有无菌土的花盆中, 用塑料薄膜保湿 2 d 后, 置于温室中常规管理^[5]。用 CTAB 法提取烟草叶片基因组 DNA, 以其为模板, 用 *GUS* 基因引物 P1(ATGTT ACGTC CTGTA GAA) 和 P2(TTCCG GCATA

GTATA AGAAA T)进行 PCR 扩增。

1.5 *GUS* 基因在转基因烟草中的瞬时表达

取在选择培养基上培养 2 d 的烟草叶片,用 *GUS* 反应液浸泡后,在 37 ℃ 条件下温浴 12 h,然后用体积分数 70%乙醇脱色后进行观察。

1.6 转基因烟草中 *GUS* 基因表达活性的定量测定

按照 Jefferson^[6]的方法,定量测定 *GUS* 基因的表达活性。取转基因烟草植株同一部位的新鲜成熟叶片(距顶端第 3 片叶)100 mg,分别置液氮中研磨成粉,加入 3 倍体积的 *GUS* 提取缓冲液,研成匀浆,4 000 r/min 离心 10 min,收集上清液。在 1 mL 预热的反应缓冲液中(含 1 mmol/L 4-MUG,4-甲基伞形-β-葡萄糖苷酸)加入 20 μL 上清液,混匀,于 37 ℃ 反应 30 s,取出 100 μL 加入到 900 μL 反应终止液中终止反应,用荧光分光光度计测定各样品的 Ex365/Em455 值。蛋白质含量的测定按 Bradford^[7]的方法进行,取 20 μL 上清液,用重蒸水定容至 4 mL,加入 1 mL 考马斯亮蓝溶液,测定 595 nm 处的吸光值。*GUS* 基因的表达活性用 4-甲基伞形酮(4-MU)的纳摩尔数与总蛋白含量及时间的比值表示,即“nmol/(mg·min)”。

本试验中分别选取表达载体 pBITM1GUSTM1、pBITM2GUSTM2、pBITM3GUSTM3 和 pBI121 转化的植株 24,28,15 和 22 株,未转基因烟草植株 10 株,按照上述方法定量测定烟草植株叶片中的 *GUS* 活性。

2 结果和分析

2.1 烟草 MARs 的克隆及序列分析

以烟草基因组 DNA 为模板,利用合成的 2 对引

物进行 PCR 扩增。琼脂糖凝胶电泳检测表明,PCR 扩增得到了大小为 1 165,1 001 和 475 bp 的 3 个 DNA 片段(图 1),将其分别命名为 TM1、TM2 和 TM3。

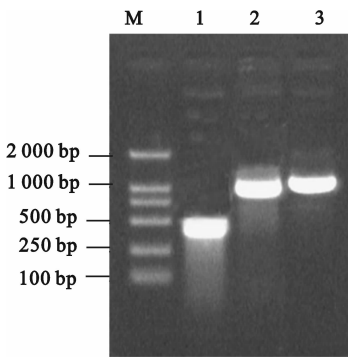


图 1 烟草 MARs 的 PCR 产物电泳结果

M. DNA 分子标样;1~3. PCR 产物

Fig. 1 Electrophoresis of tobacco MARs PCR product

M. DNA Marker; 1—3. PCR product

用 DNAMAN 软件将这 3 段 MARs 与 GenBank 中所有的 DNA 序列进行同源性比较,发现 TM1 与 GenBank 中 Rb7 的 DNA 同源性高达 99%,故认为其是同一个 MARs^[8]。在 GenBank 中未发现 TM2 和 TM3 的同源序列,但它们均富含 AT 碱基,含有 MARs 序列中常见的几个 DNA 结构域^[9],如 A-box、T-box、TATAAA 结构域和拓扑异构酶 II 识别切割序列(GTNAATATTNAT-NNG)及 DNA 链解旋序列(AATATATTT)等,所以初步认为它们是 2 个新的 MARs 序列。3 个 MARs 的序列特征分析结果见表 1,从表 1 可以看出,TM1 中的 AT 含量最高,为 73.3%,TM2 中 AT 的含量最低,为 62.8%。

表 1 3 个不同 MARs 序列的特征性元件比较

Table 1 Comparisons of the three different MARs in their characteristic motifs

名称 Name	长度/bp Length	AT 含量/% AT content	A-box 数目 A-box number	T-box 数目 T-box number	TATAAA 结构域 TATAAA domain	拓扑异构酶 II 识别 序列数目 Topoisomerase II binding site number	DNA 链解旋 序列数目 DNA unwinding site number
TM1	1165	73.3	1	0	0	0	6
TM2	1001	62.8	0	1	1	1	2
TM3	475	69.1	1	1	0	1	2

2.2 植物表达载体的构建和烟草的转化

将从烟草中分离得到的 3 个 MARs 序列,分别插入到 pBI121 *GUS* 基因表达盒两端构建植物表达载体。据文献^[10]报道,两段 MARs 序列呈顺式重复的效果较反式重复好。因此,本试验构建的植物表达载体中,*GUS* 基因两侧的 MARs 序列呈顺式重复排列,两段 MARs 序列之间的距离为 2.9 kb。

以不含 MARs 序列的表达载体 pBI121 为对照(图 2),用植物表达载体转化烟草,采用 PCR 方法检测部分抗 Km 的转基因烟草植株,结果从这些转基因植株中均扩增出了约 500 bp 的 *GUS* 基因片段,而未转基因的烟草植株中未扩增出此片段(图 3),说明 *GUS* 基因已经整合到烟草基因组中。

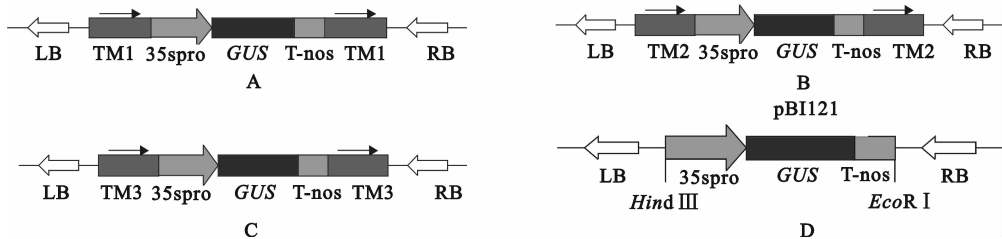


图 2 植物表达载体结构示意图

A. 在 pBI121 *GUS* 基因表达盒两端插入 TM1 的载体 pBITM1GUSTM1; B. 在 pBI121 *GUS* 基因表达盒两端插入 TM2 的载体 pBITM2GUSTM2; C. 在 pBI121 *GUS* 基因表达盒两端插入 TM3 的载体 pBITM3GUSTM3; D. 未加 MARs 的载体 pBI121

Fig. 2 Diagrams of plant expression vectors

A. pBITM1GUSTM1, pBI121 with TM1 inserted on both sides of the *GUS* gene cassette; B. pBITM2GUSTM2, pBI121 with TM2 inserted on both sides of the *GUS* gene cassette; C. pBITM3GUSTM3, pBI121 with TM3 inserted on both sides of the *GUS* gene cassette; D. pBI121, Control without MARs

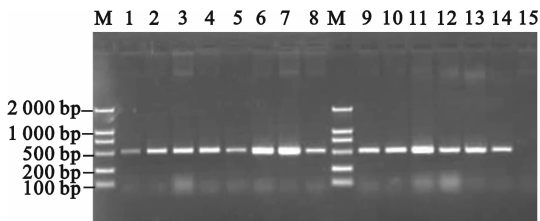


图 3 部分转基因烟草植株 *GUS* 基因的 PCR 产物电泳分析

M. DNA 分子标样; 1~14. PCR 产物; 15. 阴性对照

Fig. 3 Electrophoresis of tobacco plants transformed with *GUS* gene PCR product

M. DNA Marker; 1—14. PCR product; 15. Black control

2.3 MARs 序列对转基因烟草 *GUS* 基因表达的影响

2.3.1 *GUS* 基因在转基因烟草中的瞬时表达 在 pBITM1GUSTM1、pBITM2GUSTM2、pBITM3GUSTM3 和 pBI121 4 个植物表达载体转化的烟草叶片中,经染色后蓝色强度基本相同,即 *GUS* 瞬时表达结果基本相同。说明 MARs 序列对 *GUS* 基因的瞬时表达水平基本没有影响。

2.3.2 转基因烟草中 *GUS* 活性的定量测定 利用转基因植株检测不同表达载体中 *GUS* 基因表达活性的高低,是鉴定不同 MARs 功能强弱的直接有效方法之一。本试验根据 Jefferson^[6] 方法,定量测定了转基因烟草植株叶片中的 *GUS* 基因活性。结果发现,不同 MARs 序列对 *GUS* 基因表达水平的影响不同,各表达载体的 *GUS* 基因在转基因烟草中的平均表达活性见表 2,以未转基因的烟草植株为阴性对照,测得的背景值为 0.54 nmol/(mg · min)。

表 2 转基因烟草中 *GUS* 基因的平均表达活性

Table 2 *GUS* average expression activity of transgenic tobacco

表达载体 Expression vector	<i>GUS</i> 基因活性/ (nmol · mg ⁻¹ · min ⁻¹) <i>GUS</i> gene activity
pBI121	4.61
pBITM3GUSTM3	6.18
pBITM1GUSTM1	6.45
pBITM2GUSTM2	23.73

从表 2 可以看出,不同 MARs 序列对 *GUS* 基因表达活性的影响不同,其中 TM2 所构建的表达载体 pBITM2GUSTM2 能够明显地提高 *GUS* 基因的平均表达活性,较对照 pBI121 提高了 5.1 倍;在 TM1 和 TM3 所构建的表达载体 pBITM1GUSTM1 和 pBITM3GUSTM3 中,*GUS* 基因的平均表达活性较对照 pBI121 分别提高了 1.4 和 1.3 倍。

2.3.3 转基因烟草植株之间 *GUS* 基因表达活性的差异分析 各表达载体中 *GUS* 基因在转基因烟草植株之间的表达差异如图 4 所示。由图 4 可知, TM1、TM2 和 TM3 都未能降低由“位置效应”引起的转化体之间 *GUS* 基因表达活性的差异。从图 4 还可以看出,在 pBITM2GUSTM2 转化群体中, *GUS* 基因表达活性最高的单株 (117.18 nmol/(mg · min)) 的 *GUS* 表达活性,较 pBI121 转化群体中的最高单株 (15.77 nmol/(mg · min)) 高 7.4 倍; pBITM1GUSTM1 和 pBITM3GUSTM3 转化群体中最高单株的 *GUS* 基因表达活性 (26.46 nmol/(mg · min), 34.59 nmol/(mg · min)) 分别较 pBI121 转化群体中的最高单株高 1.7 和 2.2 倍。

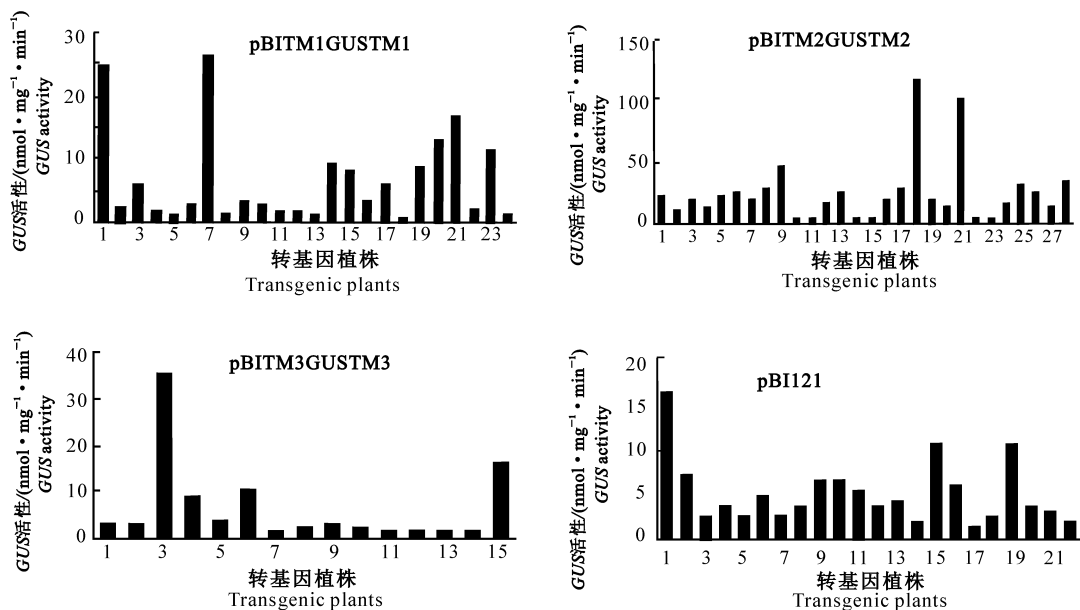


图 4 各表达载体 *GUS* 基因在转基因烟草植株之间的表达差异

Fig. 4 *GUS* activity analysis of expression vectors in transgenic tobacco plants

3 讨 论

在转基因植物研究中,转基因沉默现象已成为基因工程研究与作物改良的一大障碍。利用 MARs 序列来稳定、提高外源基因表达水平,是近年来发展起来的克服转基因沉默的有效策略^[11-14]。本研究从烟草中扩增出 3 个具有 MARs 序列特征的 DNA 片段 TM1、TM2 和 TM3,序列分析发现,其含有数目不等的 MARs 特征基元,将其构建到表达载体中转化烟草,通过对报告基因 *GUS* 活性的测定,发现其均可提高外源基因 *GUS* 的表达,认为分离到的 TM1、TM2 和 TM3 是 MARs 序列。

本研究中,将 3 个 MARs 序列分别顺向重复构建到植物表达载体 pBI121 *GUS* 基因表达盒两端,通过检测转基因烟草植株中的 *GUS* 酶活性来研究 MARs 序列对外源基因表达的影响。试验结果表明,与不包含 MARs 序列的转基因植株相比,TM1、TM2、TM3 可以使 *GUS* 基因的平均表达活性分别提高 1.4、5.1 和 1.3 倍。3 个 MARs 序列虽然来源相同,但因其序列和结构不同,其对外源 *GUS* 基因表达的改善作用也不相同,说明不同的 MARs 序列对外源基因表达的影响存在差别。A、T 碱基对的百分含量高是 MARs 序列的一个特点,但本研究表明,并非 A、T 含量越高的 MARs 序列的作用效果就越好,TM1 中 A、T 含量最高,但作用效果却不如 TM2。试验中还发现,这 3 个 MARs 序列虽然使 *GUS* 基因的平均表达水平有了不同程度的提高,但

各转化体中报告基因表达水平仍存在差异,说明本研究所分离的 MARs 序列,并未降低转基因植株个体间外源基因表达水平的差异。

因此,找到一个既能提高转基因表达水平,又能降低转化体之间外源基因表达差异的理想 MARs 序列,仍是今后研究的主要方向。这不仅将为克服基因工程中的转基因沉默现象提供一个十分有效的手段,也将为提高外源基因的稳定表达开拓新的思路。

[参考文献]

- [1] Finnegan J, Mcelroy D. Transgene inactivation; Plant fight back [J]. Bio-technology, 1994, 12: 883-889.
- [2] 韦珂, 黄艳, 何勇强. 植物转基因沉默及控制 [J]. 广西植物, 2003, 23(1): 31-35.
Wei K, Hang Y, He Y Q. Plant transgene silencing and its controlling [J]. Guangxi Plant, 2003, 23(1): 31-35. (in Chinese)
- [3] Spiker S, Thompson W F. Nuclear matrix attachment regions and transgene expression in plants [J]. Plant Physiol, 1996, 110: 15-21.
- [4] Oh S J, Jeong J S, Kim E H, et al. Matrix attachment region from the chicken lysozyme locus reduces variability in transgene expression and confers copy number-dependence in transgenic rice plants [J]. Plant Cell Rep, 2005, 24: 145-154.
- [5] 王关林, 方宏筠. 基因工程原理与技术 [M]. 北京: 科学出版社, 1998.
Wang G L, Fang H J. Theory and technology in plant gene engineering [M]. Beijing: Science Press, 1998. (in Chinese)