

满江红鱼腥藻 *glnA* 启动区的克隆及在烟草中的活性表达

刘祥林¹ 印莉萍¹ 吴燕川² 高志环¹ 吴晓强¹

(¹首都师范大学生物系, 北京 100037; ²宣武医院多肽室, 北京 100053)

摘要: 利用 PCR 技术获得满江红鱼腥藻 *glnA* 启动区, 经克隆测序后构成谷氨酰胺合成酶基因启动子驱动的 GUS 基因表达载体。用基因枪转化, 将表达载体导入烟草中, 在其叶片和茎中检测到 GUS 活性, 而在烟草根中未见表达。实验结果对真核生物与原核生物间基因表达调控、转录因子识别的研究以及构建实用载体具有一定价值。

关键词: *glnA* 启动区; 活性表达; 满江红鱼腥藻; 烟草

中图分类号: 949.22 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3207(2000)04-0369-05

蓝藻是极为多样的具有植物型放氧光合作用的原核生物, 兼具植物及细菌的一些特性, 故也称为蓝细菌 (Cyanobacteria)。蓝藻的结构虽然简单, 但却包括了高等植物的许多复杂生化过程, 其放氧光合、固氮及分化发育等特征的分子生物学研究, 无疑是一个很有吸引力的生物模型。满江红鱼腥藻是与蕨类植物 *Azolla* 具有共生关系的固氮丝状体蓝藻, 是研究固氮、固定化泌氨等的很好材料。通过对蓝藻核苷酸、氨基酸序列比较和酶联免疫技术证明, 高等植物叶绿体的某些光合蛋白, 如 Ferredoxin、Cyt_f 等, 同蓝细菌具有很大相似性, 这些都支持了叶绿体起源的内共生学说。

以 PCR 技术获得满江红鱼腥藻 (*Anabaena azollae* Strasb.) *glnA* (谷氨酰胺合成酶基因) 的前半部分, 经酶切后得到包括 5' 端启动区在内约 0.4kb 的片段, 克隆到 PBluescriptIIKS⁺ 载体后测序, 再将其组装到 PBII01 载体 GUS 报告基因前, 构建成谷氨酰胺合成酶基因启动子 (*glnA*-P) 驱动的 GUS 基因表达载体 PIL。使用基因枪将 PIL 导入烟草, 经 GUS 组织化学检测在烟草的叶、茎中均得到阳性结果, 初步证明满江红鱼腥藻 *glnA* 启动子在烟草中能启动 GUS 表达, 为基因表达调控和转录因子识别的研究以及构建实用的穿梭载体打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料 烟草 (*Nicotiana tabacum* W38) 无菌苗继代培养于 MS0 培养基中, 其叶片根尖

收稿日期: 1999-11-20; 修订日期: 2000-02-25

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39270414)

作者简介: 刘祥林 (1952—), 男, 山东莱州人, 首都师范大学生物系副教授, 从事植物分子生物学, 基因工程方面研究。

作转化受体。满江红鱼腥藻由中国科学院植物所施定基教授惠赠,培养参考文献 [1]。

1.2 PCR 扩增基因片段 PCR 仪为美国 PE 公司 PT4800 型,试剂购自华美公司, Promega 公司,方法参考文献 [2]。

1.3 表达载体的构建 PBII01 和 PBII21 载体由北京大学林忠平教授惠赠。其它质粒及试剂均购自华美公司和 Promega 公司。所涉及方法参考文献 [2]。

1.4 烟草的转化 转化用基因枪为清华大学微细工程研究所研制的 ZHFQ-II 型撞击式基因枪。转化方法参考文献 [3]。

1.5 GUS 组织化学检测 方法参考文献 [4]

2 结果与讨论

依据 *Anabaena* 7120 的 *glnA* DNA 序列设计 PCR 引物,其序列为:

primer 1: 5' tactgcctgcagcattccttc3', primer
2: 3' ttggaagtaatacgaagc5'。在 Primer 1 的 5' 端加入了 *pst*I 的酶切位点,以利于对其产物的克隆。PCR 结果见图 1。

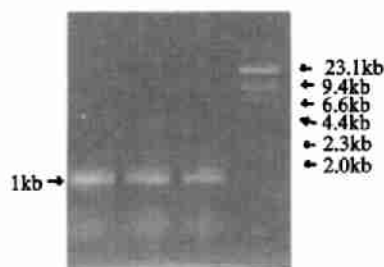


图1 满江红鱼腥藻 *glnA* 片段的 PCR 结果

Fig.1 The PCR result of *Anabaena azollae glnA* gene

从图 1 可以看出,引物的专一性较强,在所设定的条件下,只出现一条产物区带,分子量大约 1kb 左右。检测 *glnA* 启动区活性的表达载体构建过程见图 2,其中所构建的 pBg-p 和 pII 重组体的酶谱分析和 Southern 杂交检验结果见图 3。pBII01 质粒含有农杆菌 Ti 质粒的左右边界区及 NPTII 标记基因,同时带有不具启动子的 GUS 报告基因,是检测启动子

活性的实用载体。利用双酶切割蓝藻 *glnA* 片段,定向插入 pBII01 质粒 GUS 报告基因上游,构建成检测 *glnA*-p 活性的表达载体 pIL。

将 pIL 表达载体利用基因枪导入烟草的结果见图 4。其中 pBII21 质粒是将 0.8kb *Cauli-flower Mosaic Virus* 的 35s 启动子插入 pBII01 质粒的 GUS 基因上游得到的,作为阳性对照。转化实验结果说明,蓝藻的 *glnA*-p 片段具有活性,能够使 GUS 报告基因在烟草中表达。经显色底物 X-Gluc 组化检验,出现蓝色阳性结果,而目前尚未见到有关蓝藻启动子在真核生物烟草中启动表达的报道。将具有满江红鱼腥藻 *glnA* 启动子的 pIL 质粒同具有 CaM35s 启动子的 pBII21 质粒对烟草转化结果比较,*glnA*-p 片段只在叶片中起作用,即表现出组织特异性。这与作者同期做的土壤农杆菌介导的叶盘法转化 pIL 质粒取得一致的结果,在转基因烟草植株中,叶和茎均检测到 GUS 报告基因表达,而在根系中未能检测到(待发表)。进一步证明蓝藻 *glnA*-p 片段只在烟草的绿色组织中具有活性。

谷氨酰胺合成酶(GS)作为植物同化氮途径中的关键酶,其基因的表达调控已有较深入的研究^[5]。通过水稻 2kbGS 启动片段与报告基因融合,导入烟草中,已证明在启动片段中包含组织专一性区。满江红鱼腥藻谷氨酰胺合成酶基因启动区能在烟草的绿色组织中被识别而表现活性,说明二者在顺式作用元件和反式作用因子方面的相关性,提供了转录调控信息,很具有研究价值,同时这一结果也支持了叶绿体的内共生学说。关于启动子的

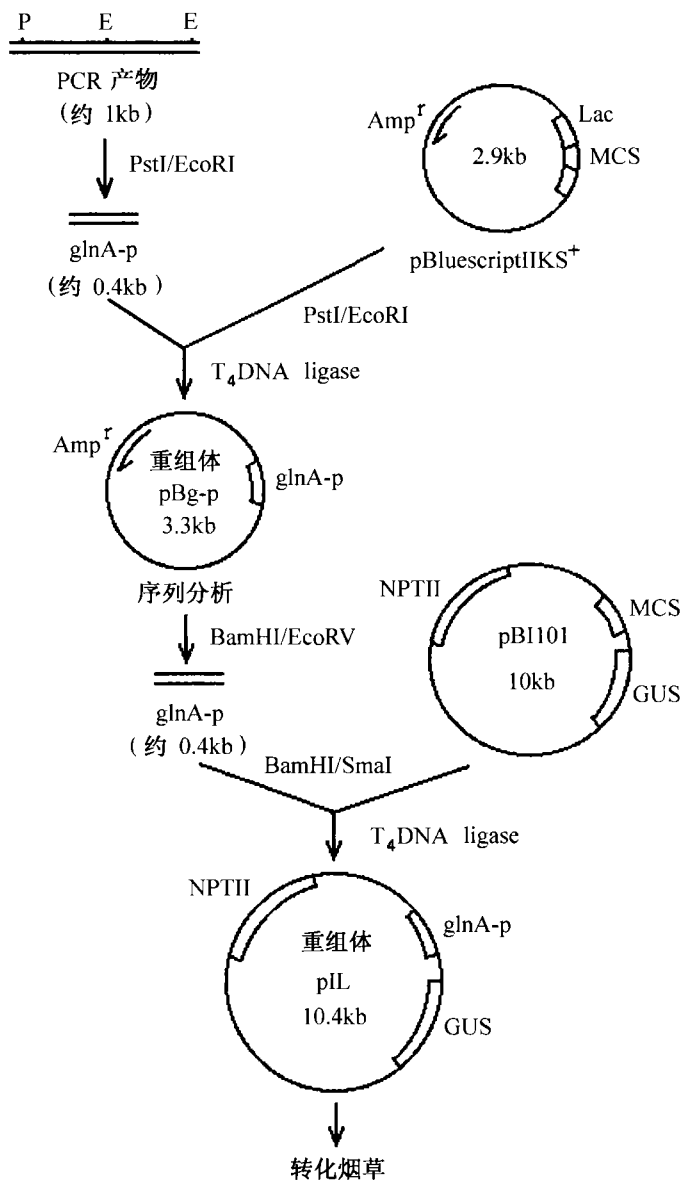


图2 表达载体的构建过程

Fig.2 The construction procedure of the expression vector

研究与开发,在基因工程中具有重要意义。秦松等用基因枪将 pBI121 质粒导入海带和裙带菜获得瞬时表达^[6];王素娟等证实了 CaM35s 启动子在红藻中的通用性^[7]。丝状固氮蓝藻的 glnA 启动区能够在高等植物中具有活性,这不但为基因表达调控和转录因子识别的研究提供很好的材料,同时也为构建实用型穿梭载体开拓一条新路。

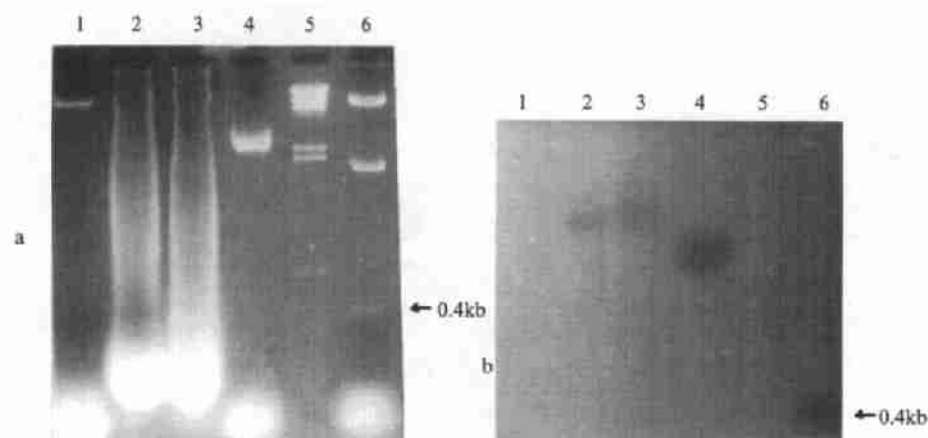


图3 pBg-p和pIL重组体的酶谱分析及Southern结果

Fig.3 Results of pBg-p and pIL restriction endonuclease analysis (a) and Southern blot (b)

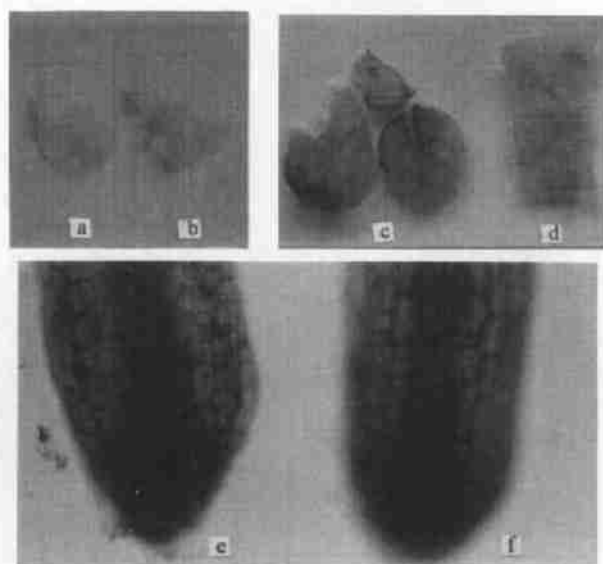


图4 基因枪转化烟草

Fig.4 The transgenic tobacco by using microprojectile bombardment

a: 对照; 未转化烟草叶片 Control the untransformed tobacco leaf; b: pBI121 质粒转化烟草叶片 The transformed tobacco leaf by pBI121; c: pIL 质粒转化烟草叶片 The transformed tobacco leaf by pIL; d: pBI101 质粒转化烟草叶片 The transformed tobacco leaf by pBI101; e: pBI121 质粒转化烟草根尖 The transformed tobacco root top by pBI121; f: pIL 质粒转化烟草根尖 The transformed tobacco root top by pIL

参考文献:

- [1] C Peter Wolk, Avigad Vonshak, Patricia Kehoe et al. construction of shuttle vector capable of conjugative transfer from *E. Coli* to nitrogen-fixing filamentous cyanobacteria [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1984, 81:

1561—1565

- [2] Sambrook J, et al. Molecular Cloning: A laboratory Manual, 2nd, Cold Spring Harbor. [M]. New York, 1989.
- [3] John C Sanford, Theodore M Klein, Edward D Wolf, et al. Delivery of Substances into cells and Tissue Using a Particle Bombardment Process [J]. *Particulate Sci Technol*, 1987, 5: 27—37
- [4] Richard A, Jefferson Kate J. Wilson, plant Molecular Biology Manual [M]. 1991, B14: 1—33.
- [5] 印莉萍, 刘祥林, 林忠平, 植物谷氨酰胺合成酶基因以及基因表达 [J], 生物工程进展, 1995, 15(2): 36—41
- [6] 秦松, 张健, 李文斌等, 用基因枪将 GUS 基因导入褐藻细胞中表达 [J]. 海洋与湖沼, 1994, 25(4): 353—356
- [7] Wang S. J., Li H., Research of direct gene transfer in the cell of *Porphyra haitanensis* Chang et Zheng [A]. (5 th) International Phycological Congress [C], Qing Dao, China 1994, 250

THE CLONE OF *ANABAENA AZOLLAE* GLNA PROMOTER AND ACTIVITY EXPRESSION IN TRANSGENIC TOBACCO

LIU Xiang-lin¹, YIN Li-ping¹, WU Yan-chuan²,
GAO Zhi-huan¹ and WU Xiao-qiang¹

(1 *Biology department of Capital Normal University, Beijing 100037;*

2 *Polypeptide laboratory of Xuanwu Hospital, Beijing 100053*)

Abstract: The promoter of *Anabaena aazollae* glnA gene was obtained by PCR procedure. A binary vector containing the chimeric gene of glnA / GUS was constructed after cloning and sequencing. The expression vector was transformed into tobacco by microprojectile bombardment. The GUS activities were examined histochemically in leaves and stems of the transgenic tobacco, but not in its roots. The result was valuable both in the regulation of gene expression, the recognition of transcriptional factors between eukaryota and prokaryota and the construction of practical vectors.

Key words: glnA promoter; Activity expression; *Anabaena azollae*; Tobacco