

·实验简报·

## 不同调控序列作用下 *GUS* 基因在烟草中瞬时表达活性

谢伟, 乐超银\*, 郭政宏, 戴志鹏, 刘敏, 姚伟

三峡大学生物技术研究中心, 宜昌 443002

**摘要** 以pBI121为出发质粒, 利用烟草泛素启动子Ubi.U4、CaMV35S启动子以及Kozak序列构建4种*GUS*基因表达载体, 通过叶盘转化法转化烟草叶片, 检测瞬时表达活性, 研究不同调控序列对外源基因表达的调控作用。结果表明: CaMV35S启动子附加Kozak序列后使*GUS*活性比独立使用CaMV35S提高了近2倍; 双CaMV35S启动子附加Kozak序列驱动*GUS*基因的表达活性与单CaMV35S附加Kozak序列相当; 烟草泛素启动子附加Kozak序列的表达活性为CaMV35S启动子附加Kozak序列的1.5倍; Ubi.U4-CaMV35S复合启动子附加Kozak序列驱动*GUS*基因表达水平最高, 其表达效率是双CaMV35S启动子附加Kozak序列调控下*GUS*表达效率的3倍, 为CaMV35S独立作用时的10倍。

**关键词** *GUS*分析, Kozak 序列, 转基因烟草, 瞬时表达, 序列泛素启动子

谢伟, 乐超银, 郭政宏, 戴志鹏, 刘敏, 姚伟 (2007). 不同调控序列作用下 *GUS* 基因在烟草中瞬时表达活性. 植物学通报 24, 452–458.

启动子是决定外源基因转录效率的关键因素, 选择合适的启动子对于增强外源基因的表达量至关重要。目前广泛应用的组成型启动子CaMV35S启动子, 它在单子叶植物和双子叶植物中都有较高效率的表达。但Chen等(1998)将水稻*CHITINASE*基因转入小麦后发现, 使用CaMV35S作为启动子时, 转入的植株到第2代时*CHITINASE*全部表现出基因沉默, 而使用玉米泛素Ubi-1启动子时, 在第4代时, 该基因的表达量仍然较大。泛素(ubiquitin, Ub)是一种由76个氨基酸构成的多肽, 是泛素蛋白酶途径的重要组成部分, 植物生长发育的很多方面受泛素蛋白酶体介导的蛋白降解途径的调控(宋素胜和谢道昕, 2006)。利用泛素启动子在细胞体内持久而高水平的转录调节作用, 将其整合至附加型的载体中, 可获得高水平的表达系统。因而在转基因植物中, 泛素启动子有很大的应用潜力。目前, 已经从很多泛素基因中分离得到启动子序列, 包括玉米基因组中的Ubi-1启动子(Christensen and Quail, 1996)、水稻泛素RUBQ<sub>2</sub>启动子(Wang et al., 2000)、拟南芥泛素启动子(Norris et al., 1993)、向日葵泛素UbB<sub>1</sub>启动子(Binet et al., 1991)、烟草泛素Ubi.U4启动子

(Genschik et al., 1994)、马铃薯泛素Ubi7启动子(Garbarino and Belknap, 1994)、番茄泛素Ubi1-1启动子(Hoffman et al., 1991)和大麦泛素Mub1启动子(Causing and Jensen, 1990)。玉米泛素Ubi-1启动子已经广泛地应用于玉米、小麦和水稻等单子叶植物中(Chen and Rubenstein, 1991; Christensen et al., 1992; Chen et al., 2001; 侯文胜等, 2002; 范媛媛等, 2004)。烟草泛素启动子也有应用于双子叶植物中的报道(Genschik et al., 1994; Kang et al., 2003)。另外, 根据Kozak(1986)提出的真核生物偏好的转移起始密码子周边序列, 许多研究报道起始密码子的周边序列做相应修改, 可提高外源基因的表达量。例如, 张琦等(2006)将Kozak序列导入油菜中进行表达分析, 叶片中的脂肪酸分析结果表明目的脂肪酸 $\gamma$ -亚麻酸和十八碳四烯酸的含量均获得相应提高。

本研究用烟草泛素启动子Ubi.U4、CaMV35S启动子以及Kozak序列构建了4个*GUS*基因表达载体并转化烟草叶片, 比较不同调控序列对*GUS*基因瞬时表达的调控作用, 为建立更高效、稳定的烟草表达系统打下基础。

收稿日期: 2006-09-18; 接受日期: 2007-01-05

基金项目: 宜昌市科技发展计划项目(No. A04401-8)

\* 通讯作者。E-mail: yuechaoyin@163.com

## 1 材料和方法

### 1.1 材料、菌种、试剂及设备

烟草(*Nicotiana toabcum* cv. 'NC89')由本实验室保存并繁殖。大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 DH5 $\alpha$ 、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)EHA105及出发质粒 pBI121 等均由本实验室保存。限制性内切酶、T<sub>4</sub> DNA 连接酶等购自 Promega 公司。PCR 反应相关试剂和胶回收试剂盒购自上海生物工程公司, PCR反应中所用引物的合成与克隆的基因序列的测定亦委托该公司进行。电激仪采用 Bio-Rad 公司生产的 GenePulser Xcell 电穿孔仪。

### 1.2 实验方法

#### 1.2.1 Ubi.U4 启动子片段的克隆

根据GenBank (X77456)烟草泛素启动子核苷酸序列设计合成 2 对 PCR 引物。一对引物两端均为 *Hind*III, 另一对引物含 *Hind*III 和 *Bam*HI 酶切位点如下。

Ubi.U4-1: 5'引物5'GCGCAAGCTTACTACGTTA-GAGCGCTAACGAGAAT 3' (*Hind*III)  
Ubi.U4-1: 3' 引物5'CGAAGCTTTGGTCGGG-TGGGATTCCCTCTTTATCCTGGA 3'  
Ubi.U4-2: 5' 引物5'CGCAAGCTTACTACGTTAG-AGCGCTAACGAGAATACT3'。Ubi.U4-2: 3' 引物5'CGCGGATCCTGGTCGGGTGGGATTCCCTCTTTAT3' (*Bam*HI)。

采用以上引物, 以烟草(NC89)基因组DNA为模板, 通过PCR 扩增得到Ubi.U4启动子片段, 与pMD18-T连接, 然后对扩增片段进行测序。

#### 1.2.2 Kozak 序列的构建

根据Kozak原则, 设计一段富含AT的序列, 以 *GUS* 基因为模板设计引物, 在上游引物前附加一段“TAAACCATGGCT”序列, 并设计*Bam*HI酶切位点, 下游引物引入 *Sac* I 酶切位点: (*Bam*HI)

gusk 5' 引物 5'CGGGATCCTTAAACCATGGCT-ATGTTACGTCCTGTAGAAAGGAAG

gusk3' 引物 5'CGCAGTACTTCATTGTTTG-CCTCCCTGCTGC (*Scal*)

PCR 扩增得到附加 Kozak 序列的 *GUS* 基因, 与 pMD18-T 连接, 然后对扩增片段进行测序。将得到的片段通过 *Bam*HI/ *Scal* 位点置换出发质粒 pBI121 中的 *GUS* 基因, 即可得到插入 Kozak 序列的表达载体 pSKG。

#### 1.2.3 表达载体的构建

将以上克隆得到的 Ubi.U4 启动子片段, 分别通过 *Hind*III/ *Bam*HI 位点以及 *Hind*III 位点插入含有 Kozak 序列的 pSKG 中, 构建含 Ubi.U4 启动子附加 Kozak 序列的表达载体 pUKG, 以及含 Ubi.U4-CaMV35S 串联启动子附加 Kozak 序列的表达载体 pUSKG; 通过 *Hind*III 位点, 在 pSKG 上的 CaMV35S 启动子之前再插入一个 340 bp 左右的 CaMV35S 启动子, 即可得到双 CaMV35S 启动子附加 Kozak 序列的表达载体 pSSKG。

#### 1.2.4 烟草的遗传转化

将植物表达载体 pBI121、pUKG、pUSKG、pSKG 及 pSSKG 分别通过电激法(杨明等, 2000)导入根癌农杆菌 EHA105 中。分别挑取含表达载体 pBI121、pUKG、pUSKG、pSKG 和 pSSKG 的根癌农杆菌菌落及 EHA105 菌株(不含任何表达载体的空菌株)菌落, 28°C 培养过夜。离心收集菌体, 用 1/2MS 液体培养基稀释至 OD<sub>600</sub> 值为 0.5 作为浸染液(张娅等, 2005)。将 4-5 叶期的无菌培养烟草叶片剪成 0.5 cm<sup>2</sup> 的小块, 分别在 4 种菌液中浸染 5-10 分钟后, 吸干叶片表面的菌液, 重置于共培养培养基(MS+0.05 mg·L<sup>-1</sup> NAA+0.5 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA)上暗培养 24 小时后, 取出各组叶片进行瞬时表达检测。

#### 1.2.5 *GUS* 基因瞬时表达活性检测

取上述 6 种菌液浸染的烟草叶片各 5 组, 每组随机选取 10 片进行组织染色。选取组织染色阳性率较高组的叶片各 0.1 g, 加入 200  $\mu$ L *GUS* 提取 buffer (50 mmol·L<sup>-1</sup> 磷酸(pH7.0), 10 mmol·L<sup>-1</sup> EDTA, 10 mmol·L<sup>-1</sup>

β-巯基乙醇, 0.1% Triton X-100, 0.1%十二烷基肌氨酸钠)提取叶片总蛋白(王关林和方宏筠, 1998)。采用荧光分析法(Jefferson et al., 1987)测定 *GUS* 活性, 以单位时间内单位蛋白产生4-methylumbelliferone(MU)的量比较各启动子对 *GUS* 基因表达的影响。取5组数据的平均值作为本次实验的结果。实验设3次重复, 取3次实验数据的平均值进行比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 烟草泛素启动子的克隆

以烟草基因组DNA为模板, 在特异引物的作用下扩增得到一条约 1 200 bp 的特异扩增条带(图 1)。将 PCR 产物回收后, 与 pMD18-T 载体连接, 转化 DH5α, 提取质粒并酶切鉴定后进行测序, 结果表明该序列与文献报道序列(Genschik et al. 1994)的同源性达 100%。

### 2.2 Kozak序列的构建

以 pBI121 为模板, 在含有 Kozak 序列的特异引物的作

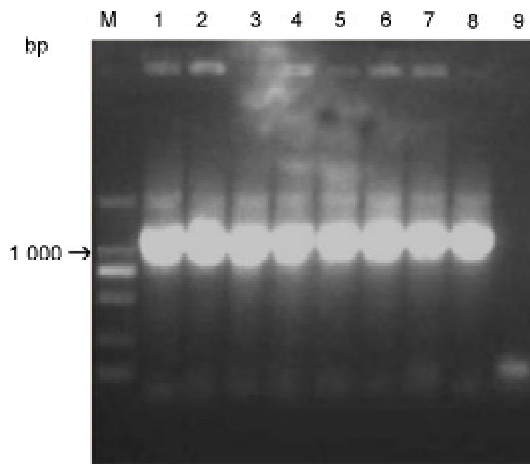


图 1 PCR 扩增烟草泛素启动子

M: D2000 分子量标准; 1-4: Ubi.U4-1 引物的扩增产物; 5-8: Ubi.U4-2 引物扩增产物; 9: 阴性对照

Figure 1 PCR amplified Ubi.U4 promoter

M: D2000 marker; 1-4: PCR products amplified by promoter Ubi.U4-1; 5-8: PCR products amplified by promoter Ubi.U4-2; 9: negative control

用下进行 PCR 扩增, 得到一条 1 800 bp 的条带(图 2)。回收 PCR 产物, 与 pMD18-T 载体连接, 将连接物转化 DH5α, 提取质粒并酶切鉴定后进行测序, 结果表明该片段含有与设计一致的 Kozak 序列以及序列正确的 *GUS* 基因。

### 2.3 表达载体的构建

将 Ubi.U4 启动子片段, 分别通过 *Hind*III/ *Bam*HI 位点以及 *Hind*III 位点插入 pSKG 中, 得到表达载体 pUKG 和表达载体 pUSKG; 通过 *Hind*III 位点, 在 pSKG 上的 CaMV35S 启动子之前再插入一个 CaMV35S 启动子, 即可得到 pSSKG。其结构见图 3。

### 2.4 瞬时表达检测结果

分别培养 5 个表达载体转化的农杆菌菌株以及 EHA105 菌株作为对照, 浸染烟草叶片, 转入共培养培养基上暗培

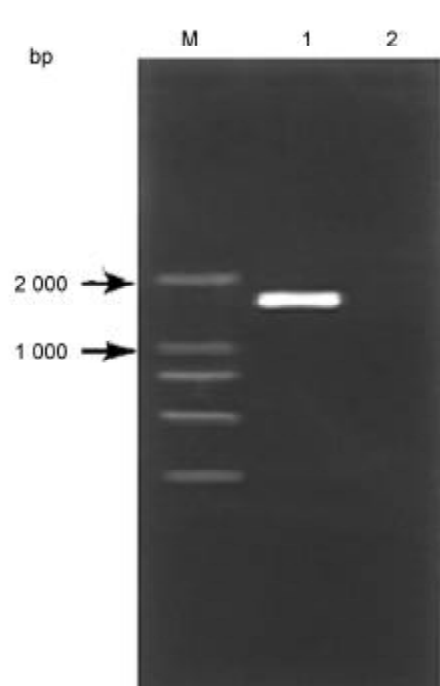


图 2 PCR 扩增含 Kozak 序列的 *GUS* 基因

M: D2000 分子量标准; 1: *gusk* 引物的扩增产物; 2: 阴性对照

Figure 2 PCR amplified *GUS* gene with Kozak sequence

M: D2000 marker; 1: PCR products amplified by *gusk*; 2: negative control

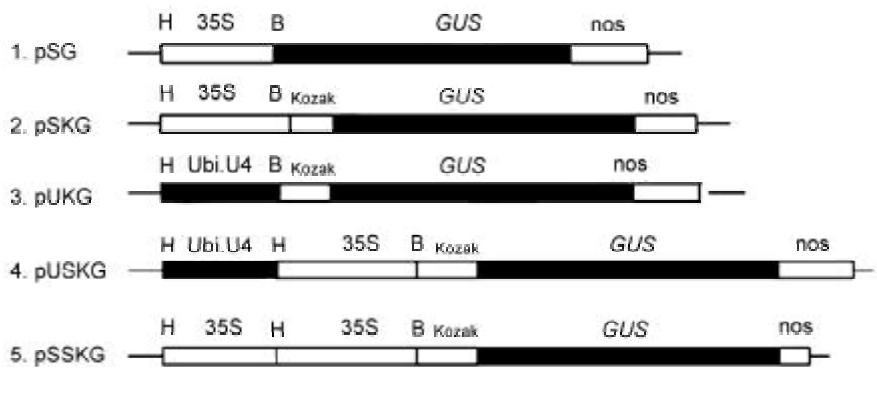


图3 利用不同调控元件构建的5种 *GUS* 基因表达载体

35S: CaMV35S 启动子; nos: 胭脂碱合成酶基因; Ubi.U4: 烟草泛素启动子; H: *Hind*III 酶切位点; B: *Bam*HI 酶切位点

Figure 3 Structure of the vector used for transient expression of *GUS* gene

35S: CaMV35S promoter; nos: polyadenylation site of nopaline synthase gene; Ubi.U4: ubiquitin promoter; H: *Hind*III restriction sites; B: *Bam*HI restriction sites

养24小时。组织染色结果显示, 5个表达载体转化的农杆菌浸染率均达到100%(图4)。提取各组叶片总蛋白, 采用荧光分析法测定 *GUS* 活性。比较5种组合驱动 *GUS* 表达的活性, 结果(表1)显示, 5个表达载体转化的烟草叶片中均检测到 *GUS* 荧光活性, 对照组未检测到荧光活性。 *GUS* 表达量由高到低依次是 pUSKG > pUKG > pSSKG > pSKG > pBI121。

从表1和图5可以看出: (1)CaMV35S启动子附加Kozak序列后使 *GUS* 活性比独立使用CaMV35S提高了近2倍; (2)双CaMV35S启动子附加Kozak序列驱动 *GUS* 基因的表达活性与单CaMV35S附加Kozak序列相当; (3)烟草泛素启动子附加Kozak序列的表达活性为CaMV35S启动子附加Kozak序列的1.5倍; (4)由烟草泛素启动子Ubi.U4与CaMV35S启动子串联使用附加Kozak序列驱动下的 *GUS* 基因的表达效率最高, 其表达效率是双CaMV35S启动子附加Kozak序列调控下 *GUS* 表达效率的3倍, 为CaMV35S独立作用时的10倍。由此可见, 烟草泛素启动子与CaMV35S启动子串联使用时对烟草外源基因的表达有明显的增强作用。

### 3 讨论

虽然起始密码子在生物界是通用的, 但是从不同生物来源的基因各有其特殊的起始密码周边序列。Kozak (1986)曾详细研究起始密码子ATG周边碱基定点突变后对转录和翻译所造成的影响, 并总结出在真核生物中, 起始密码子周边序列为ACCATGG时转录和翻译效率最

表1 不同启动子调控下 *GUS* 基因在烟草叶片中瞬时表达活性  
Table 1 *GUS* activity under the control of different regulatory sequences in tobacco leaves

| <i>GUS</i> plasmid | <i>GUS</i> activity (nmol·4-MU·mg <sup>-1</sup> protein·min <sup>-1</sup> ) |
|--------------------|---|
| Leaf(none)         | 0 e   |
| Leaf(pBI121)       | 10.12±0.92 a  |
| Leaf(pSKG)         | 32.34±1.27 b  |
| Leaf(pUKG)         | 52.82±1.30 c  |
| Leaf(pUSKG)        | 99.93±3.06 d  |
| Leaf(pSSKG)        | 35.46±1.12 b  |

数据为3组平行实验得出的平均值。根据新复极差法, 在  $P=0.05$  水平, 具有相同字母的平均值没有显著差别

All data were means of 3 replications each. Means with the same letters are not significantly different at  $P=0.05$  level according to Duncan's new multiple range test

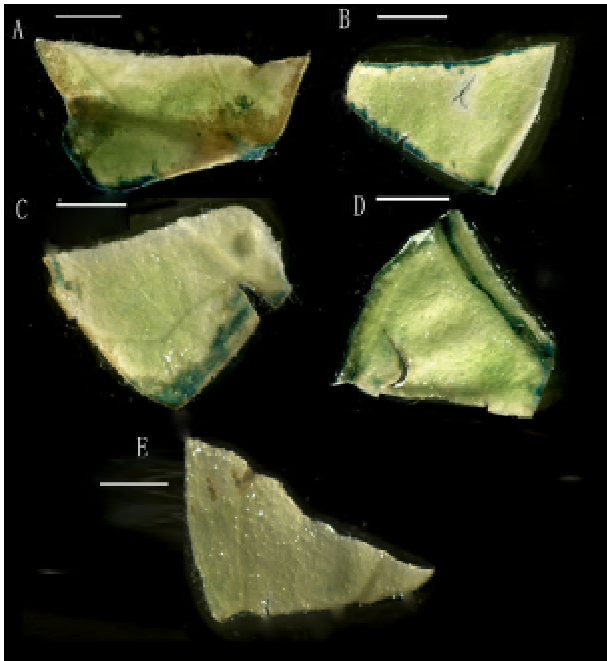


图4 瞬时表达的组织染色结果

- (A) 转化 pBI121 的烟草叶片;
  - (B) 转化 pSKG 的烟草叶片;
  - (C) 转化 pUKG 的烟草叶片;
  - (D) 转化 pUSKG 的烟草叶片;
  - (E) 空菌浸染的烟草叶片.
- 蓝色斑点表示 *GUS* 表达的位点(bar=2 mm)

Figure 4 Histochemical assay with staining buffer containing  $0.5 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$  X-Gluc

- (A) the tobacco leaf containing pBI121;
  - (B) the tobacco leaf containing pSKG;
  - (C) the tobacco leaf containing pUKG;
  - (D) the tobacco leaf containing pUSKG;
  - (E) the tobacco leaf without expression vector.
- The blue colored leaf tissues indicate the *GUS* expression sites (bar=2mm)

高,特别是 -3 位的 A 对翻译效率非常重要。本研究在 *GUS* 基因之前插入了一段 K o z a k 序列 (TAAACCATGGCT), 结果表明, *GUS* 在烟草中的表达水平提高约 2 倍。可见利用非植物来源的基因构建表达载体时, 根据植物起始密码子周边序列的特征加以修饰改造, 可增强外源基因的表达。

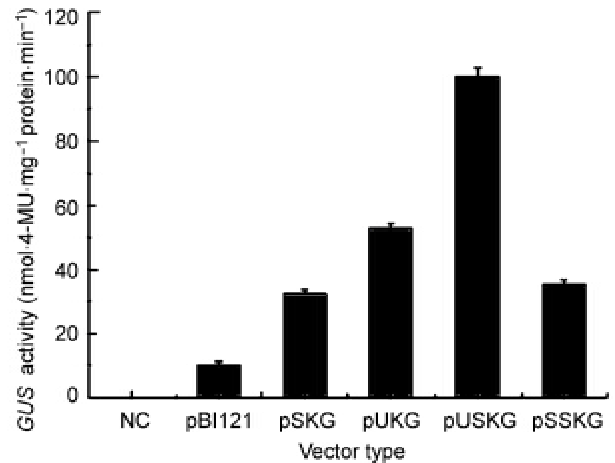


图5 不同启动子调控下 *GUS* 基因在烟草叶片中瞬时表达活性 (NC 为阴性对照)

Figure 5 *GUS* activities under the control of different regulatory sequences in tobacco leaves (NC is negative control)

关于转基因烟草启动子的研究已有很多报道,但是关于烟草泛素启动子在双子叶植物中的应用报道不多。Genschik等 (1994)分析了烟草泛素启动子 Ubi.U4 的结构, 得出启动子上游的 TATA 框、转录起始区的一段内含子序列和泛素第一个单体序列是该启动子的关键元件, 含这些元件的启动子驱动 *GUS* 基因在烟草中的瞬时表达的效率是 CaMV35S 的 7 倍。而 Kang 等 (2003) 在研究利用烟草稳定表达 *CAT* 基因时发现烟草泛素启动子启动 *CAT* 的表达量是 CaMV35S 的 2 倍。本研究将烟草泛素启动子 Ubi.U4 与 CaMV35S 串联使用, 并附加 Kozak 序列, 得到较好的表达效果, 其瞬时表达效率是双 CaMV35S 启动子附加 Kozak 序列调控下 *GUS* 表达效率的 3 倍, 是单独使用 CaMV35S 启动子的 10 倍。其原因可能是来源于双子叶植物烟草的泛素启动子 Ubi.U4 对 CaMV35S 启动子的表达活性有增强作用。同时, 我们研究了烟草泛素启动子加 Kozak 序列调控下 *GUS* 的表达, 其效率比 CaMV35S 启动子附加 Kozak 序列高约 1.5 倍。可见来源于烟草的泛素启动子与 Kozak 序列在烟草中具有一定的协同增效表达的作用。

## 参考文献

- 范媛媛, 庞永珍, 吴为胜 (2004). 双价抗虫植物表达载体的构建及转基因烟草的初步检测. 上海交通大学学报 **22**, 1-6.
- 侯文胜, 郭三堆, 路明 (2002). *cryIA* 基因小麦高效表达载体的构建. 西北农林科技大学学报 **30**, 121-124.
- 宋素胜, 谢道昕 (2006). 泛素蛋白酶体途径及其对植物生长发育的调控. 植物学通报 **23**, 564-577.
- 王关林, 方宏筠 (1998). 植物基因工程原理与技术(第1版). 北京: 科学出版社. pp. 585-588.
- 杨明, 黄兴奇, 张绍松, 万萌, 部波 (2000). 将重组质粒高效导入农杆菌的电脉冲转化研究. 西南农业学报 **13**, 1-4.
- 张琦, 李明春, 蔡易, 苗翠苹, 李绍兰, 陈有为, 邢来君 (2006). 少根根霉  $\Delta 6$ - 脂肪酸脱氢酶基因在转基因油菜中的表达. 中国农业科学 **39**, 463-469.
- 张娅, 曾君祉, 周志勇, 陈毓荃, 黄华樑 (2005). 胡萝卜组织培养和高效遗传转化体系的建立. 植物学通报 **22** (增刊), 37-42.
- Binet MN, Lepetit M, Weil JH, Tessier LH (1991). Analysis of a sunflower polyubiquitin promoter by transient expression. *Plant Sci* **79**, 87-94.
- Causing K, Jensen CB (1990). Two ubiquitin-long-tail fusion genes arranges as closely spaced direct repeats in barely. *Gene* **94**, 165-171.
- Chen K, Rubenstein I (1991). Characterization of structure and transcription of an ubiquitin fusion gene from maize. *Gene* **107**, 205-212.
- Chen WP, Gu X, Liang GH, Muthukrishnan S, Chen PD, Liu DJ, Gill BS (1998). Introduction and constructive expression of a rice chinase gene in bread wheat using biolistic bombardment and the bar gene as a selectable marker. *Theor Appl Genet* **97**, 1296-1306.
- Chen Y, Wang YQ, Sun YR, Zhang LM, Li WB (2001). Highly efficient expression of rabbit nrtrophil peptide-1 gene in *Chlorella ellipsoidea* cells. *Curr Genet* **39**, 365-370.
- Christensen AH, Quail PH (1996). Ubiquitin promoter-based vectors for high-level expression of selectable and/or screenable marker genes in monocotyledonous plants. *Transgenic Res* **5**, 213-218.
- Christensen AH, Sharrock RA, Quail PH (1992). Maize polyubiquitin genes: structure, thermal perturbation of expression and transcript splicing, and promoter activity following transfer to protoplasts by electroporation. *Plant Mol Biol* **18**, 675-689.
- Garbarino JE, Belknap WR (1994). Isolation of a ubiquitin-ribosomal protein gene (*ubi3*) from potato and expression of its promoter in transgenic plants. *Plant Mol Biol* **24**, 119-127.
- Genschik P, Marbach J, Uze M, Feuerman M, Plesse B, Fleek J (1994). Structure and promoter activity of a stress and developmentally regulated polyubiquitin-encoding gene of *Nicotiana tabacum*. *Gene* **148**, 195-202.
- Hoffman NE, Ko K, Milkowski D, Pichersky E (1991). Isolation and characterization of tomato cDNA and genomic clones encoding the ubiquitin gene *ubi3*. *Plant Mol Biol* **17**, 1189-1201.
- Jefferson RA, Tony AK, Michael WB (1987). GUS fusions: 3-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J* **6**, 3901-3907.
- Kang TJ, Kwon TH, Kim TG, Yang MS, Loc NH (2003). Comparing constitutive promoters using *CAT* activity in transgenic tobacco plants. *Mol Cells* **16**, 117-122.
- Kozak M (1986). Point mutations define a sequence flanking the AUG initiator codon that modulates translation by eukaryotic ribosomes. *Cell* **44**, 283-292.
- Norris SR, Meyer SE, Callis J (1993). The intron of *Arabidopsis thaliana* polyubiquitin genes is conserved in location and is a quantitative determinant of chimeric gene expression. *Plant Mol Biol* **21**, 895-906.
- Wang JL, Jiang JD, James HO (2000). Structure, expression and promoter activity of two polyubiquitin genes from rice. *Plant Sci* **156**, 201-211.

## Transient Expression of *GUS* Gene Controlled by Different Regulator Sequences of Tobacco

Wei Xie, Chaoyin Yue\*, Zhenghong Guo, Zhipeng Dai, Min Liu, Wei Yao

*Biotechnology Research Center of China Three Gorges University, Yichang 443002, China*

**Abstract** *GUS* gene controlled by different regulator sequences (CaMV35S promoter, Ubi.U4 promoter and Kozak sequence) were introduced into the leaves of tobacco. Transient expression assay revealed a 2-fold increase in *GUS* activity in leaves with *GUS* expression driven by the CaMV35S promoter fused to the Kozak sequence (pSKG) as compared with the pBI121. The expression of *GUS* driven by a double CaMV35S promoter with the Kozak sequence was not significantly different from that driven by the single CaMV35S promoter with the Kozak sequence. Expression with the Ubi.U4 promoter with the Kozak sequence of pUKG yielded about a 1.5-fold higher level of *GUS* activity than expression with the CaMV35S promoter with the Kozak sequence. The tandem Ubi.U4-CaMV35S promoter with the Kozak sequence was the most effective among the regulator sequences and gave a 3-fold higher expression level than that driven by the double CaMV35S promoter with the Kozak sequence and a 10-fold higher expression level than that driven by the single CaMV35S promoter.

**Key words** *GUS* assay, Kozak sequence, transgenic tobacco, transient expression, ubiquitin promoter

**Xie W, Yue CY, Guo ZH, Dai ZP, Liu M, Yao W** (2007). Transient expression of *GUS* gene controlled by different regulator sequences of tobacco. *Chin Bull Bot* **24**, 452–458.

---

\* Author for correspondence. E-mail: yuechaoyin@163.com