

含绿色荧光蛋白(gfp)基因的植物重组表达载体 *pBII21-GFP-62390* 和 *pBII21-GFP-51780* 的构建

邓丽, 刘红, 杨万年^{*} (华中师范大学生命科学学院, 湖北武汉 430079)

摘要 [目的] 构建含绿色荧光蛋白(gfp)基因的植物重组表达载体 *pBII21-GFP-62390* 和 *pBII21-GFP-51780*。[方法] 用 PCR 方法扩增 *psmGFP* 的 *GFP* 片段, *Bam*H I 和 *Sac*I 双酶切 PCR 产物, 同时用 *Bam*H I 和 *Sac*I 双酶切 *pBII21*。从琼脂糖凝胶中回收纯化 *pBII21* 的大片段, 经连接、转化、鉴定出改造后的质粒。[结果] 用 PCR 方法扩增得到长度为 740 bp 的增强型的绿色荧光蛋白基因片段, 克隆入 *pBII21* 表达载体后, 获得了新的重组质粒 *pBII21-GFP*。分别将编码拟南芥 BAG7、BAG4 蛋白的基因 *At5g62390* 和 *At3g51780* 通过 PCR 方法扩增后, 克隆入 *pBII21-GFP*, 构建了用于超量表达 BAG 蛋白基因的 GFP 融合蛋白二元表达载体 *pBII21-GFP-62390* 和 *pBII21-GFP-51780*。利用细胞感受态法将该植物表达载体分别导入根瘤农杆菌 GV3101 中。[结论] 为进一步研究 BAG 蛋白在拟南芥抗性胁迫中的功能及其在细胞内的动态分布奠定了基础。

关键词 绿色荧光蛋白(gfp)基因; BAG 蛋白; 植物表达载体; 根瘤农杆菌

中图分类号 S188 **文献标识码** A **文章编号** 0517-6611(2008)26-11251-02

Construction of the Recombinant Expression Plasmid *pBII21-GFP-62390* and *pBII21-GFP-51780* Contained Green Fluorescent Protein Gene

DENG Li et al (College of Life Sciences, Central China Normal University, Wuhan, Hubei 430079)

Abstract [Objective] The research aimed to construct the recombinant expression plasmid *pBII21-GFP-62390* and *pBII21-GFP-51780* contained green fluorescent protein gene. [Method] The GFP fragment was amplified by PCR. PCR production and *pBII21* were double digested using *Bam*H I + *Sac*I. Big *pBII21* fragment was purified from agarose gels. The plasmid was appraised through joint and transformation. [Result] A 740 bp fragment of green fluorescent protein gene was amplified by PCR. The fragment was cloned into *pBII21* vector, and a new recombined vector was obtained. *Arabidopsis* calmodulin genes *At5g62390* and *At3g51780* were cloned into the recombined vector *pBII21-GFP*. The new plant expression vector named *pBII21-GFP-62390* and *pBII21-GFP-51780* were constructed. The recombined plant expression vector were transferred into *Agrobacterium tumefaciens* strains of GV3101. [Conclusion] The study is a good start for the further research on the functions and location of genes *At5g62390* and *At3g51780*.

Key words Green fluorescent protein (gfp) gene; AtBAG; Plant recombinant expression plasmid; *Agrobacterium tumefaciens*

BAG 家族蛋白(Bcl-2-associated anthanogene family proteins)最初从哺乳动物中被鉴定到, 因其能够与抗凋亡蛋白 Bcl2 结合并促进细胞生存而得名。所有 BAG 蛋白的 C 端都含有至少 1 个 BAG 结构域, 该结构域由 110~124 个氨基酸组成, 二级结构形成 3 个反向平行的 α -螺旋^[1]。拟南芥基因组含有 8 个 BAG 蛋白, 它们编码的蛋白分子都含有 BAG 结构域(BAG domain)。根据这些蛋白所含其他保守序列的情况可以将拟南芥 BAG 蛋白家族分为 3 类: ①人类 BAG1 在植物中的直向同源物: AtBAG1, AtBAG2, AtBAG3 和 AtBAG4, 它们都带有泛素类的结构域; ②除 BAG 结构域外, 无其他保守序列: AtBAG5; ③含有钙调素结合结构域, 可能受 Ca^{2+} 的调控: AtBAG6; AtBAG7 和 AtBAG8^[2]。

绿色荧光蛋白(gfp)是源于海洋生物水母属(*Aequorea victoria*)的一种发光蛋白, *GFP* 基因作为新一代基因转移物和蛋白定位标记物, 在生命科学领域应用越来越广泛, 已经成为活体检测活体基因表达的理想报告基因^[3-5]。绿色荧光蛋白作为报告分子具有许多优点, *GFP* 的荧光反应不需要任何底物及辅助因子, 使表达检测非常简单。同时 *GFP* 在细胞中呈自主表达, 没有种属特异性, *GFP* 对受体细胞无毒性, 对目的基因没有影响, 因而用 *GFP* 作报告基因可以在不干扰活细胞功能的情况下检测基因表达、信号转导、蛋白运输与定位等^[6-8]。为此, 笔者进行了该研究。

1 材料与方法

1.1 材料 质粒。含 *smGFP* 基因片段的重组质粒 *psmGFP* 和植物表达载体 *pBII21* 购自 *Arabidopsis* biological resource center; *At5g62390* 和 *At3g51780* cDNA 克隆从日本 Riken bioresource center 购得; 限制性内切酶、 T_4 DNA 连接酶购自大连宝生物公司; 质粒提取试剂盒、PCR 产物回收试剂购自上海申能博彩生物公司。

1.2 方法

1.2.1 载体的构建。PCR 方法扩增 *psmGFP* 的 *GFP* 片段, *Bam*H I 和 *Sac*I 双酶切 PCR 产物, 同时用 *Bam*H I 和 *Sac*I 双酶切 *pBII21*。从琼脂糖凝胶中回收纯化 *pBII21* 的大片段, 经连接、转化、鉴定出改造后的质粒 *pBII21-GFP*。

在 *At5g62390* 和 *At3g51780* 的正、反向引物的 5' 端分别加上 *Sac*I 酶切位点。 *Sac*I 分别酶切 *At5g62390* 和 *At3g51780* 的 PCR 片段。同时用 *Sac*I 酶切重组质粒 *pBII21-GFP*。经连接、转化、鉴定出改造后的质粒分别称 *pBII21-GFP-62390* 和 *pBII21-GFP-51780*。

1.2.2 新载体导入农杆菌。制备农杆菌感受态细胞^[9], 在感受态细胞中加入重组质粒, 轻轻混匀, 冰浴 30 min, 液氮速冻 1 min, 迅速移至 37 °C 融化, 加入 1 ml LB 液体培养基, 28 °C 轻摇培养 4 h。6 000 r/min 离心 2 min, 弃去上清液, 重悬菌体后涂布于含 25 mg/L 链霉素和 50 mg/L 卡那霉素的 LB 固体培养基上, 28 °C 倒置培养 2 d。挑取单菌落, 接种到液体 LB 培养基中, 28 °C, 230 r/min 培养 48 h, 菌液用于保存或转化。

2 结果与分析

2.1 重组质粒构建的鉴定结果 将连接产物转化大肠杆菌

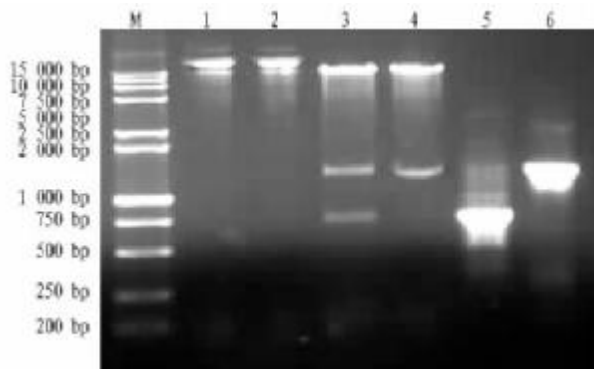
基金项目 国家自然科学基金项目(30570156)。

作者简介 邓丽(1983-), 女, 黑龙江七台河人, 硕士研究生, 研究方向: 发育植物学。* 通讯作者, E-mail: yangwn@mail.cnu.edu.cn。

收稿日期 2008-06-30

DH5 α , Kan 平板筛选阳性克隆,提取质粒 DNA 并进行酶切和 PCR 鉴定,结果如图 1、2 所示。酶切和 PCR 均证明重组质粒

的构建是正确的,经上海基康生物公司测序鉴定外源插入片段的方向和序列正确。



注:1. *pBII21*; 2. *pBII21-GFP-62390*; 3. *pBII21-GFP-62390/BamH I + SacI*; 4. *pBII21-GFP-62390/ SacI*; 5. 以 *pBII21-GFP-62390* 为模板的 PCR 的 GFP 扩增产物; 6. 以 *pBII21-GFP-62390* 为模板的 PCR 的 62390 扩增产物; M 为 DNA Marker。

Note: 1. *pBII21*; 2. *pBII21-GFP-62390*; 3. *pBII21-GFP-62390/BamH I + SacI*; 4. *pBII21-GFP-62390/ SacI*; 5. GFP amplification products by PCR with *pBII21-GFP-62390* as template; 6. 62390 amplification products by PCR with *pBII21-GFP-62390* as template; M. DNA Marker.

图 1 重组质粒 *pBII21-GFP-62390* 酶切和 PCR 鉴定

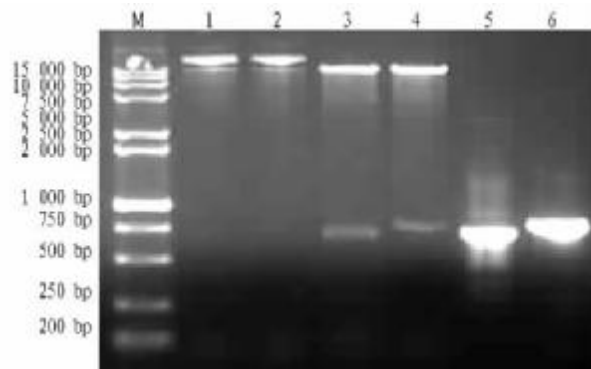
Fig. 1 Restriction enzyme digestion of *pBII21-GFP-62390* and PCR identification

3 结论与讨论

在研究基因表达或蛋白定位时常用荧光物质或报告基因作为标记,传统的荧光标记法已被淘汰。目前植物研究中常用的报告基因有很多,但绿色荧光蛋白基因作为报告基因的诸多优点使它在生命科学领域应用越来越广泛。绿色荧光蛋白(gfp)基因的分子量小,无毒害,自主表达发光,高灵敏,分辨率高,可进行或体检测等优点,克服了植物分子生物学研究中传统报告基因的不足之处^[10-11]。近几年有报道用 *GPF* 作为报告基因来研究烟草钙调素结合蛋白在烟草中的功能和定位,但用 *GPF* 作为报告基因来标记拟南芥 BAG 蛋白进而研究其功能特性还未见报道。该试验成功构建了用于超量表达 BAG 蛋白基因的 *GFP* 融合蛋白二元表达载体 *pBII21-GFP-62390* 和 *pBII21-GFP-51780*,为今后研究 BAG 蛋白在拟南芥抗性胁迫中的功能及其在细胞内的动态分布奠定了基础。

参考文献

[1] TAKAYAMA S, SATO T, KRAJEWSKI S, et al. Cloning and functional analysis of BAG-1: A novel Bcl-2-binding protein with anti-cell activity[J]. Cell, 1995, 80: 279-284.



注:1. *pBII21*; 2. *pBII21-GFP-51780*; 3. *pBII21-GFP-51780/BamH I + SacI*; 4. *pBII21-GFP-51780/ SacI*; 5. 以 *pBII21-GFP-51780* 为模板的 PCR 的 GFP 扩增产物; 6. 以 *pBII21-GFP-51780* 为模板的 PCR 的 51780 扩增产物; M 为 DNA Marker。

Note: 1. *pBII21*; 2. *pBII21-GFP-51780*; 3. *pBII21-GFP-51780/BamH I + SacI*; 4. *pBII21-GFP-51780/ SacI*; 5. GFP amplification products by PCR with *pBII21-GFP-51780* as template; 6. 51780 amplification products by PCR with *pBII21-GFP-51780* as template; M. DNA Marker.

图 2 重组质粒 *pBII21-GFP-51780* 酶切和 PCR 鉴定

Fig. 2 Restriction enzyme digestion of *pBII21-GFP-51780* and PCR identification

- [2] JUQIANG Y, CIXIN H, HONG Z. The BAG-family proteins in *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant Sci, 2003, 165: 1-7.
- [3] CHALFIE M, YU Y, EUSKIRCHEN G, et al. Green fluorescent protein as a marker for gene expression [J]. Science, 1994, 263: 802-805.
- [4] PANG S Z, DEBOER D L, WAN Y, et al. An improved green fluorescent protein gene as a vital marker in plants [J]. Plant Physiol, 1996, 112: 893-900.
- [5] KAIN S R, ADAMS M, KONDEPUDI A, et al. Green fluorescent protein as a reporter of gene expression and protein localization [J]. Biotechniques, 1995, 19(4): 650-655.
- [6] YAMAGUCHI R, NAKAMURA M, MOCHIZUKI N, et al. Light dependent translocation of a phytochrome B-GFP fusion protein to the nucleus in transgenic *Arabidopsis* [J]. J Cell Biol, 1999, 145(3): 437-445.
- [7] LEFFEL S M, MABON S A, STEWART C N JR. Applications of green fluorescent protein in plants [J]. Biotechniques, 1997, 23(5): 912-918.
- [8] ERRAMPALLI D, L EUNG K, CASSIDY M B, et al. Applications of the green fluorescent protein as a molecular marker in environmental microorganisms [J]. J Microbiol Methods, 1999, 35(3): 187-199.
- [9] CLOUGH S J, BENT A F. Floral dip: A simplified method for Agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant J, 1998, 16: 735-743.
- [10] 黄国存, 朱生伟, 董越梅, 等. 绿色荧光蛋白及其在植物研究中的应用 [J]. 植物学通报, 1998, 15(5): 24-30.
- [11] CHALFIE M. Green fluorescent protein [J]. Photochem Photobiol, 1995, 62(4): 651-656.