

研究报告

Research Report

荧光素酶表达载体 yy621 的构建及鉴定

李玉洁^{1*} 南奇延^{2*} 金美玉¹ 曹后男¹ 山本義治³ 赵成日^{1**}

1 延边大学农学院, 延吉, 133002; 2 延边大学附属医院, 延吉, 133000; 3 岐阜大学, 岐阜, 5011193

* 李玉洁、南奇延共同第一作者

** 通信作者, zhaochengri@ybu.edu.cn

摘要 在载体 yy449 的 CaMV 35S minimal 启动子序列与 *LUC* 基因序列之间增加 *Bgl* II 限制性内切酶位点, 构建 yy621 载体。用 PCR 的方法分别扩增 CaMV 35S minimal 启动子序列与 *LUC* 基因。引物设计要满足如下条件: CaMV 35S minimal 启动子序列扩增片段的上游应包括 *Bam*H I、下游应包括 *Bgl* II 限制性内切酶位点; *LUC* 基因序列扩增片段的上游应包括 *Bgl* II、下游应包括 *Xba* I 限制性内切酶位点。以上两个片段先用 *Bgl* II 限制性内切酶消化后进行连接, 得到 CaMV 35S minimal 启动子序列与 *LUC* 基因序列之间含 *Bgl* II 限制性内切酶的识别位点的片段, 然后再用 *Bam*H I 和 *Xba* I 限制性内切酶进行消化, 插入到载体 yy449 的 *Bam*H I 和 *Xba* I 酶切位点之间, 替换原有的 CaMV 35S minimal 启动子序列与 *LUC* 基因序列。经菌落筛选、PCR 鉴定和测序验证, 阳性菌落中的 CaMV 35S minimal 启动子序列与 *LUC* 基因序列之间包含 *Bgl* II 限制性内切酶的识别位点, 载体 yy621 构建成功。本实验中构建的荧光素酶表达载体 yy621, 适于今后用抗性相关基因替换 *LUC* 基因, 测定合成启动子对抗性相关基因的具体调控与赋予植物对不良环境的具体抗性表现, 或者用全长启动子序列替换 CaMV 35S minimal 启动子序列(-46~+1)来观察 *LUC* 基因的表达调控具有重要的意义。

关键词 荧光素酶, yy621 载体, 构建

Construction and Identification of luciferase Expression Vector yy621

Li Yujie^{1*} Nan Qiyang^{2*} Jin Meiyu¹ Cao Hounan¹ Yamamoto Y Yoshiharu³ Zhao Chengri^{1**}

1 Agricultural college, Yanbian University, Yanji, 133002; 2 Yanbian University Hospital, Yanji, 33000; 3 Faculty of Applied Biological Sciences, Gifu University, Yanagido 1-1, Gifu City, 5011193

* Li Yujie and Nan Qiyang contributed equally to this work

** Corresponding author, zhaochengri@ybu.edu.cn

DOI: 10.5376/mpb.cn.2020.18.0027

Abstract The yy621 vector was constructed by adding a *Bgl* II restriction endonuclease site between the CaMV 35S minimal promoter sequence and the *LUC* gene sequence of vector yy449. The CaMV 35S minimal promoter sequence and the *LUC* gene were amplified by PCR, respectively. The primers should be designed to meet the following conditions: the upstream of the amplified fragment of the CaMV 35S minimal promoter sequence should include *Bam*H I, and the downstream should include the *Bgl* II restriction endonuclease site; the upstream of the *LUC* gene sequence amplification fragment shall include *Bgl* II and downstream shall include the *Xba* I restriction endonuclease site. The two fragments were digested by *Bgl* II restriction endonuclease and then ligated

本文首次发表在《分子与植物育种》上, 现依据版权所有人授权的许可协议, 采用 Creative Commons Attribution License, 协议对其进行授权, 再次发表与传播

收稿日期: 2020 年 8 月 3 日; 接受日期: 2020 年 8 月 6 日; 发表日期: 2020 年 8 月 13 日

引用格式: 李玉洁, 南奇延, 金美玉, 曹后男, 山本義治, 赵成日, 2020, 荧光素酶表达载体 yy621 的构建及鉴定, 分子植物育种 (网络版), 18(27): 1-9 (doi: 10.5376/mpb.cn.2020.18.0027) (Li Y.J., Nan Q.Y., Jin M.Y., Cao H.N., Yamamoto Y Yoshiharu and Zhao C.R., 2020, Construction and identification of luciferase expression vector yy621, Fengzi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding (online)), 18(27): 1-9 (doi: 10.5376/mpb.cn.2020.18.0027))

to obtain the fragment containing the recognition site of *Bgl* II restriction enzyme between the CaMV 35s minimal promoter sequence and the *LUC* gene sequence, and digested with *Bam*H I and *Xba* I restriction endonucleases, they were inserted between *Bam*H I and *Xba* I sites of vector yy449 to replace the original CaMV 35s minimal promoter sequence and *LUC* gene sequence. Colony screening, PCR identification and sequencing confirmed that the recognition site of *Bgl* II restriction endonuclease was included between the CaMV 35S minimal promoter sequence and the *LUC* gene sequence in the positive colony, and the vector yy621 was successfully constructed. The luciferase expression vector yy621 constructed in this experiment is suitable for replacing the *LUC* gene with a resistance-related gene in the future, and determining the specific regulation of the synthetic promoter-related gene and the specific resistance of the plant to the adverse environment, or replace the CaMV 35S minimal promoter sequence (-46~ +1) with full-length promoter to observe the expression and regulation of *LUC* gene.

Keywords Luciferase, yy621 vector, Construction

随着基因工程手段的不断发展,近年来世界的研究者们发现了很多与植物抗性相关的基因。如:酸性土壤中与 Al^{3+} 毒和低 pH 抗(耐)性相关的 *ALMT1* 基因和 STOP1、STOP2 转录因子,与干燥胁迫的抗性相关的 DREB 家族基因等(Liu et al., 1998; Hoekenga et al., 2006; Iuchi et al., 2007; Kobayashi et al., 2014)。为了让植物获得特定的抗性,研究者们经常是将这些基因用基因工程手段导入到植物体中或者使其在植物体中过量表达,从而达到抗性育种的目的(Ortega-Amaro et al., 2014; Ding et al., 2015; Augustine et al., 2015)。但是,涉及到这些实验的很多研究者发现,抗(耐)性基因在植物体上过量表达后有时并不能得到预期的结果,反而会产生一些负面的效果(Liu et al., 1998; 余君涵等, 2016; 肖庆红等, 2018, 农业与技术, 38(09): 20-23)。应用基因工程的手段将特定的、与某种抗(耐)性相关的基因导入到一个正常的植物体后,此基因在转基因植物中会产生新的或者过量的蛋白质,影响植物体原有的代谢产物的平衡关系。如果导入的基因所产生的蛋白质对植物体的正常生长或者代谢不产生大的影响,植物体得到抗性性状之后也能保持正常或者接近于正常状态生长。相反,如果导入或过量表达的基因所产生的蛋白质对植物的正常代谢途径产生负面的影响时,转基因植物的生长是畸形的或者是不正常的(Liu et al., 1998; Mnaimneh et al., 2004; 崔百明, 2006)。那么,如何有效解决这些问题,是当前或者今后在抗(耐)性育种中亟待解决的一个崭新的课题。

为了让转基因植物只在遇到胁迫时适当表达那些已导入的特定的与抗(耐)性相关的基因,充分了解基因表达调控机理是至关重要的(Hirayama and Shinozaki, 2010)。最近的研究表明,在特定的时间、空间上有着相似表达变化规律的一些共表达基因群的启

动子区域中有着相同或者类似的基因表达调控元件(Obayashi et al., 2007; 赵成日, 2017)。这种调控基因转录活性的要素在真核生物中叫做顺式调控元件。顺式调控元件是一类受到广泛关注的功能元素,它与转录因子结合并触发相应基因的表达是高等生物对生理环境改变的一种有效应答。因此,分析和识别转录因子、顺式调控元件,了解它们间的结合规律是理解和解释整个基因组行为的重要步骤(周强, 2008)。综合分析并挖掘不同胁迫应答中起重要作用的、组织特异表达的顺式调控元件后,利用分子生物学手段将这些调控元件整合到与某种抗(耐)性相关基因的启动子序列中,使其只在特定的条件下有效调控下游的抗(耐)性相关基因的空间表达。这样一来,可有效降低过量表达所导致的转基因植物的能量消耗,同时也有效降低已导入的与抗(耐)性相关基因所产生的多余的蛋白质对植物本身原有的代谢平衡的干扰,从而尽可能减少导入基因对植物正常生长发育的负面影响(崔百明, 2006)。

启动子是基因表达调控的“开关”。不同的启动子可以满足不同植物不同性能的需求,如 *rd29A* 启动子便是一种低温诱导型启动子,该启动子可以在低温条件下满足目的基因在转基因植物中进行表达(马琳, 2005);在干旱条件下,蔗糖-1-果糖基转移酶基因,即, *1-SST* 基因和根部特异性表达启动子 *pPST2a* 组合成的转 *pPST2a:1-SST* 基因甘蔗(*Saccharum officinarum* L.) 植物与转 *rbcs:1-SST* 基因植株相比,前者植株抗旱性更好(武媛丽等, 2014)。已有成功的实验前例通过设计和合成包含 5' 非转录区的约 2 000 bp 的脱氧核糖核酸链,经过限制性内切酶 *Kpn* I 和 *Mlu* I 酶切后插入到 pGL3-Basic 载体中,形成的重组载体 DNA 测序结果证实有效的 pGL3-Claudin-1 启动子载体构建成功(王洪波等, 2012)。

让植物体随着人们的意愿只在给予一定的信号时适当表达那些已导入的特定基因，来满足植物正常生长的需求或人们的需求是合成生物学发展的目标。在植物启动子调控元件对下游基因表达机理研究中，表达载体的构建是非常重要的。荧光素酶表达载体的出现促进了基因功能分析的进程。然而，多数荧光素酶载体对于转基因植物的实体观察上表现并不如意。荧光素酶作为报告基因，其在植物中的表达远不如在动物体内的表达效果——易观察性。荧光素酶活性受到温度、酸碱度等多种因素的影响，环境中的某些有毒物质，还可和荧光素酶的活性部位或与其周围残基进行结合，使其催化的发光反应受到抑制进而增加观察难度(康洋, 2014)。

最近, Hayami 等人用荧光素酶 yy449 载体成功分析了人工合成启动子序列对下游基因的表达调控。并用 EM-CCD 相机实时拍摄转基因拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*) 植物的荧光素强度的变化 (Hayami et al., 2015)。说明 yy449 载体非常适合启动子调控元件序列对下游 *LUC* 基因的表达调控研究。然而，从 yy449 载体的结构上来看，因其在 CaMV 35S minimal 启动子序列(-46 ~ +1)和 *LUC* 报告基因之间没有酶切位点，导致无法单独替换启动子序列或者 *LUC* 基因。

本研究中，在载体 yy449 的 CaMV 35S minimal 启动子序列与 *LUC* 基因序列之间增加 *Bgl* II 限制性内切酶位点，构建 yy621 载体。载体 yy621 的构建对于用抗性相关基因替换 *LUC* 基因，测定人工合成启动子对抗性相关基因的具体调控与赋予植物对不良环境的具体抗性表现，或者用全长启动子序列替换 CaMV35 minimal 启动子序列(-46 ~ +1)来观察 *LUC* 基因的表达调控具有重要的意义。

1 结果与分析

1.1 载体 yy449 的 DNA 提取

经电泳检测所得载体 yy449 的 DNA 大小在 10 kb 以上无降解(图 1)。

1.2 载体 yy449 DNA 的酶切

为了确定 yy449 载体序列中实际存在的限制性内切酶的识别位点，我们用 *Bam*H I、*Hind* III、*Bgl* II、*Xho* I、*Spe* I、*Sal* I、*Pst* I、*Nco* I、*Eco*R V 等 9 个限制性内切酶对 yy449 载体 DNA 进行了消化反应(图2)。

载体 yy449 的 DNA 序列中不存在 *Bgl* II、*Xho* I、*Spe* I、*Sal* I、*Pst* I、*Nco* I、*Eco*R V 等限制性内切

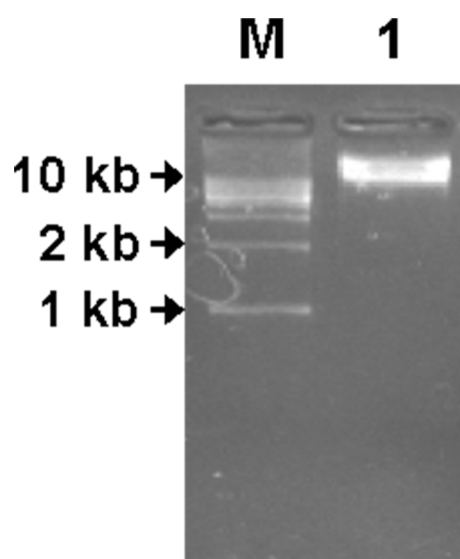


图 1 琼脂糖凝胶电泳检测提取的 yy449 载体 DNA
注: M: TaKaRa 1 kb DNA Ladder Marker; 1: 载体 yy449 DNA
Figure 1 Detection of extracted vector yy449 DNA by agarose gel electrophoresis
Note: M: TaKaRa 1 kb DNA Ladder Marker; 1: Vector yy449 DNA

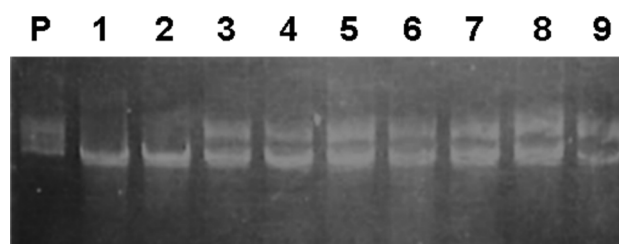


图 2 不同的限制性内切酶对 yy449 载体 DNA 的酶切效果
注: 载体 yy449 的 DNA; 1: 利用限制性内切酶 *Bam*H I 消化载体 yy449 的 DNA; 2: 利用限制性内切酶 *Hind* III 消化载体 yy449 的 DNA; 3: 利用限制性内切酶 *Bgl* II 消化载体 yy449 的 DNA; 4: 利用限制性内切酶 *Xho* I 消化载体 yy449 的 DNA; 5: 利用限制性内切酶 *Spe* I 消化载体 yy449 的 DNA; 6: 利用限制性内切酶 *Sal* I 消化载体 yy449 的 DNA; 7: 利用限制性内切酶 *Pst* I 消化载体 yy449 的 DNA; 8: 利用限制性内切酶 *Nco* I 消化载体 yy449 的 DNA; 9: 利用限制性内切酶 *Eco*R V 消化载体 yy449 的 DNA

Figure 2 The effect of different restriction enzymes on the enzyme digestion of yy449 vector DNA
Note: P: Vector yy449 DNA; 1: Restriction enzyme *Bam*H I digested the vector yy449 DNA; 2: Restriction enzyme *Hind* III digested the vector yy449 DNA; 3: Restriction enzyme *Bgl* II digested the vector yy449 DNA; 4: Restriction enzyme *Xho* I digested the vector yy449 DNA; 5: Restriction enzyme *Spe* I digested the vector yy449 DNA; 6: Restriction enzyme *Sal* I digested the vector yy449 DNA; 7: Restriction enzyme *Pst* I digested the vector yy449 DNA; 8: Restriction enzyme *Nco* I digested the vector yy449 DNA; 9: Restriction enzyme *Eco*R V digested the vector yy449 DNA

酶的酶切位点(图 2)。因此,可以作为 yy449 载体的 CaMV 35S minimal 启动子序列与 *LUC* 基因序列之间新增限制性内切酶位点的后补。然而,限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Bgl* II 酶切后产生的粘性末端还可以在连接酶的作用下进行连接。新产生的连接部位序列不能再被限制性内切酶 *Bam*H I 和 *Bgl* II 切开。这种特性对质粒载体的灵活运用有着重要的意义。

为此,我们决定在载体 yy449 的 CaMV 35S minimal 启动子序列与 *LUC* 基因序列之间增加 *Bgl* II 限制性内切酶的识别位点(AGATCT)。

1.3 CaMV 35S minimal 启动子序列的扩增与提纯

为了获得 CaMV 35S minimal 启动子序列,以 yy449 载体 DNA 为模板用 CIP7_SacI_F 和 35S miniPro.(R) 引物进行了 PCR 扩增。取 3 μ L 的 PCR 产物在 1% 的 TBE 凝胶中电泳检测(图 3 中的 1 泳道)。利用试剂盒回收 CaMV 35S minimal 启动子序列,测定浓度,备用。

1.4 *LUC* 基因序列的扩增与提纯

为了获得 *LUC* 基因序列,以 yy449 载体 DNA 为模板用 Luc(+) Gene(F)和 Luc(+) Gene(R) 引物进

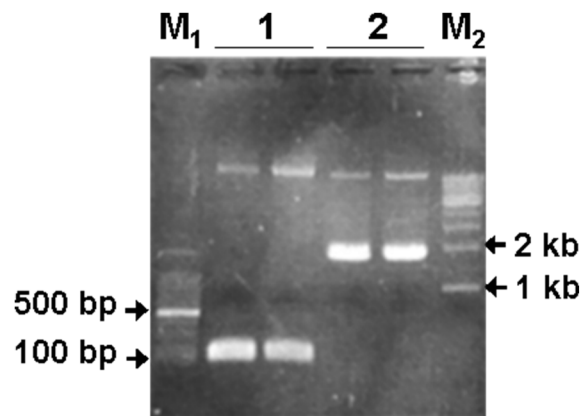


图 3 CaMV 35S minimal 启动子序列和 *LUC* 基因序列的扩增产物电泳图

注: M1: TaKaRa 100 bp DNA Ladder Marker; M2: TaKaRa 1 kb DNA Ladder Marker; 1: 利用 CIP7_SacI_F 和 35S miniPro.(R) 引物扩增获得的 CaMV 35S minimal 启动子序列; 2: 利用 Luc (+)Gene(F)和 Luc(+)Gene(R)引物扩增获得的 *LUC* 基因片段

Figure 3 Electrophoresis of the amplification product of CaMV 35S minimal promoter sequence and *LUC* gene sequence

Note: M1: TaKaRa 100 bp DNA Ladder Marker; M2: TaKaRa 1 kb DNA Ladder Marker; 1: CaMV 35S minimal promoter sequence amplified with CIP7_SacI_F and 35S miniPro. (R) primers; 2: *LUC* gene sequence amplified with Luc (+)Gene(F) and Luc(+)Gene(R) primers

行了 PCR 扩增。取 3 μ L 的 PCR 产物在 1% 的 TBE 凝胶中电泳检测(图 3 中的 2 泳道)。利用试剂盒回收 *LUC* 基因片段,测定浓度,备用。

1.5 用 *Bgl* II 内切酶消化 PCR 产物及 T4 DNA 连接酶连接

对 CaMV 35S minimal 启动子序列扩增片段和 *LUC* 基因序列扩增片段进行 *Bgl* II 单酶切反应。再经酶失活处理的两个片段用 T4 DNA 连接酶进行连接。获得 CaMV 35S minimal 启动子序列和 *LUC* 基因序列之间包含一个 *Bgl* II 限制性内切酶识别位点的长片段连接产物。

1.6 用 *Bam*H I 和 *Xba* I 酶消化 yy449 载体 DNA 和长片段连接产物并连接

用 *Bam*H I 和 *Xba* I 限制性内切酶分别双酶切 yy449 载体 DNA 及上述长片段连接产物,产生 Vector 和 Insert。再用 TaKaRa 公司的 DNA Ligation <Mighty Mix> 试剂盒进行连接,获得重组载体。

1.7 感受态细胞转化、菌落筛选及 PCR 鉴定

重组载体经感受态细胞转化、菌落筛选,获得了 20 个由单一菌株形成的阳性菌落,用于 PCR 鉴定,挑选 4、5、9、10、13、17 和 20 菌落进行测序鉴定(图 4)。

1.8 用 *Bgl* II 和 *Xba* I 内切酶消化鉴定

挑选 4、5、9、10、13、17 和 20 菌落继续培养后,提取载体 DNA。分别用 *Bgl* II 和 *Xba* I 限制性内切酶进行双酶切,鉴定。酶切产物在 1.5% 的 TBE 琼脂

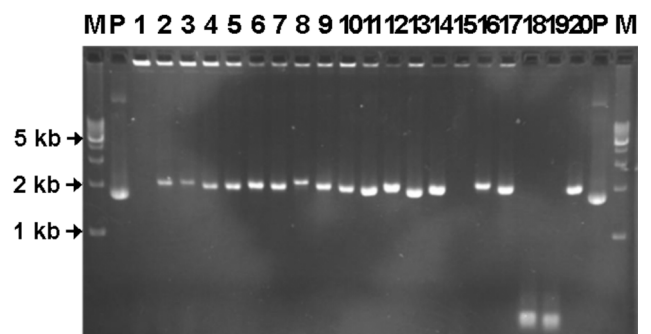


图 4 用 CIP7_SacI_F 和 Luc(+)Gene(R)引物对菌落 1~20 进行 PCR 鉴定

注: M: TaKaRa 1 kb DNA Ladder Marker; P: 载体 yy449 DNA; 1~20: 菌落 1~20

Figure 4 PCR identification of colony 1~20 by CIP7_SacI_F and Luc(+)Gene(R) primers

Note: M: TaKaRa 1 kb DNA Ladder Marker; P: Vector yy449 DNA; 1~20: Colony 1~20

糖凝胶上进行电泳(图 5)。

1.9 测序鉴定

为了确定新构建载体序列的准确性，我们进行了测序。所使用的引物(表 1)。

结果发现，菌落 5 号上的载体 DNA 序列是准确的。为此，我们将此载体命名为 yy621(图 6)。

2 讨论

表达载体的出现为研究顺式调控元件对下游基因表达变化规律提供了便利工具。常用于表达载体的报告基因主要有 *GFP*、*GUS*、*LUC* 等。其中，*LUC* 报告基因的敏感性、定量性远远超出其它报告基因(李强, 1995, 生物学杂志, (01): 12-13,10; 杨宇等, 2011)。这样一来，在实时观察人工合成启动子对 *LUC* 报告基因的调控作用时可以观察到其灵敏的动态调控图

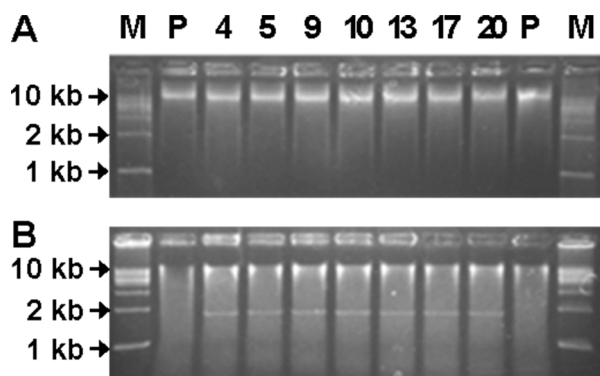


图 5 *Bgl* II 和 *Xba* I 双酶切鉴定新载体 DNA
注: A: 载体 DNA; B: 双酶切的载体 DNA; M: TaKaRa 1 kb DNA Ladder Marker; P: 载体 yy449 DNA; 4~20: 对应于菌落 4~20 的载体 DNA

Figure 5 Identification of new vector DNA by *Bgl* II and *Xba* I double digestion
Note: A: Vector DNA; B: Double enzyme excised vector DNA; M: TaKaRa 1 kb DNA Ladder Marker; P: Vector yy449 DNA; 4~20: Vector DNA corresponding to colony 4~20

表 1 测序反应中使用的引物

Table 1 The primers used in sequencing

| 引物名 | 序列 (5'-3') | 退火 (°C) | 长度 (bp) |
|------------------------|---------------------------|---------|-------------|
| Primer name | Sequence (5'-3') | Tm (°C) | Length (bp) |
| CIP7_SacI_F | CGAGCTGGAGTTTTTTTCTG | 54.3 | 20 |
| lucF2 (yyy) | TATGCCGGTGTGGGCGCGTTATT | 54.2 | 24 |
| lucF4 (yyy) | AAGGATATGGGCTCACTGAGACTA | 45.8 | 24 |
| LUC_51_R | TTCCATCTTCCATCGGATAG | 54.3 | 20 |
| LUCR1 (yyy) | CATCGACTGAAATCCCTGGTAATC | 45.8 | 24 |
| Luc(+) <i>Gene</i> (R) | AACGATCGGGGAAATTCGATCGAAT | 58.8 | 25 |

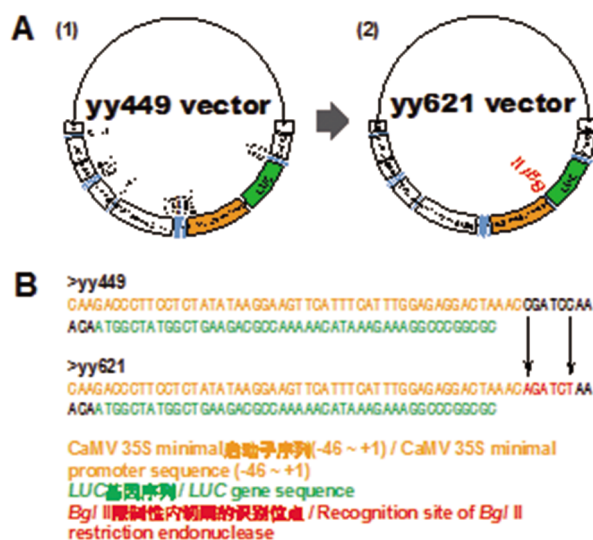


图 6 载体 yy449 和 yy621 的比较
注: A: 载体 yy449(1)和 yy621(2)的结构图; B: 载体 yy449 和 yy621 的序列比较

Figure 6 The comparison of yy449 and yy621 vectors
Note: A: Structure chart of yy449 (1) and yy621 (2) vectors; B: The sequence comparison of yy449 and yy621 vectors

谱。而 *GFP* 和 *GUS* 报告基因由于半衰期较长会降低启动子对报告基因调控的灵敏性和检测率。

建立不同的表达载体研究不同生物应对不同环境变化的基因调控机理是人们有效利用庞大的基因资源的保障。最近, Hayami 等人利用 yy449 载体在拟南芥植物体中成功分析了在 UV-B、强光、冷胁迫处理下人工合成启动子序列对下游荧光素酶报告基因的动态表达变化(Hayami et al., 2015)。这无疑为拟南芥植物体上研究基因表达调控机理提供了很好的工具。然而, 在不同胁迫处理(如偏酸溶液处理)时, 此报告基因的信号表现出不稳定的现象 (实验数据未公开)。为此, 利用不同公司研发的 *LUC* 报告基因替换现有载体 yy449 中的 *LUC* 报告基因, 建立崭新的表达载体, 是解决上述问题的关键所在。为了方便替换载体 yy449 中的 *LUC* 表达基因建立崭新的、多种多

样的表达载体,本研究中在 CaMV 35S minimal 启动子序列(-46 ~ +1)和 *LUC* 报告基因之间增加了一个 *Bgl* II 限制性内切酶识别位点。

在构建 yy621 载体的过程中发现每次酶切反应之前针对 DNA 进行一次乙醇沉淀可有效去除 DNA 溶液中多余的盐分,可保障限制性内切酶实验的顺利进行(罗立廷等, 2006)。在进行多条 DNA 片段进行连接时同时进行连接效果不佳,最好是逐一进行。并且,对插入片段(Insert)和载体(Vector)进行连接时 Insert/Vector 的摩尔之比最好是保持在 1 以上,不过大于 6 时反而表现不佳。因此,建议使用 3 左右(李瑞国等, 2003)。

3 材料与方法

3.1 实验材料

载体 yy449 (10578 bp, Genbank accession AB63-8628.1)由日本国立岐阜大学应用生物科学部植物分子生理学研究室的山本義治教授提供(<https://www1.gifu-u.ac.jp/~yyy/map/yy449.pdf>)。

3.2 实验试剂

购自 Promega 公司的试剂主要有:载体 DNA 提取试剂 Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System 试剂盒(Cat.# A1330);凝胶及 PCR 产物纯化系统 Wizard® SV Gel and PCR Clean-Up System; PrimeSTAR® GXL DNA Polymerase (Cat.# R050A); GoTaq® Colorless Master Mix (Cat.# M7133)。购自 TaKaRa 公司的试剂主要有:DNA 连接试剂 DNA Ligation Kit <Mighty Mix> (Cat.# 6023);限制性内切酶 *Bam*H I、*Hind* III、*Bgl* II、*Xho* I、*Spe* I、*Sal* I、*Pst* I、*Nco* I、*Eco*R V、*Xba* I 及反应缓冲液;*E. coli* DH5α Competent Cells (Cat.# 9057)。购自 Thermo Fisher Scientific 公司的有:BigDye® Terminator v3.1 循环测序试剂盒。

3.3 实验仪器

BIO-RAD T100™ Thermal Cycler PCR 扩增仪;夏日科技公司 FR200-A 型全自动紫外与可见分析装置;Biochrom NanoVue™ Plus 超微量分光光度计;艾本德公司的小型台式高速冷冻离心机(5417R);湘仪公司微量台式高速离心机 H1650-W 型;北京君意东方电泳设备有限公司的 JY600 稳压稳流型电泳仪和 JY-SPCT 型电泳槽;Sangon Biotech 公司的 G50031-2EQU312 型蓝光切胶仪。

3.4 载体 DNA 提取及乙醇沉淀处理

保存在甘油中的含载体的大肠杆菌在含奇霉素(Spectinomycin, SP)和链霉素硫酸盐(Streptomycin sulfate salt, ST)的 LB 液体培养基中 37℃ 条件下培养 12 h。然后按照 Promega 公司的 Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System 试剂盒说明书操作。所得载体 DNA 进行乙醇沉淀,去除多余的盐分,从而提高 DNA 纯度。具体如下:1 加入 DNA 溶液的 1/10 体积的 NaOAc 溶液 (3 mol/L, pH 5.2) 于载体 DNA 溶液中充分混匀;2 加入以上载体 DNA 溶液 2.5 倍体积的预冷 100%乙醇(-30℃ 冷冻保存);3 用手混合至均匀;4~80℃ 处理 15~20 min;5 用手的热量溶解后,在 4℃ 条件下 14 000 rpm 离心 15 min;6 倒掉上清;7 加入 1 mL 的 70%乙醇 (70%乙醇保存在 4℃ 冷藏库);8 混匀离心管中的液体;9 14 000 rpm、4℃ 条件下离心 10 min;10 用移液器吸除上清。倒置 10 min;11 加入适量的 1×TE 使载体 DNA 溶解(本实验中加入 50 μL)。

载体 DNA 和 PCR 产物的 DNA 浓度测定使用了 Biochrom NanoVue™ Plus 超微量分光光度计。最终调制成 100 ng/μL 浓度(载体 DNA)。

3.5 限制性内切酶处理及酶失活处理

本试验中所使用的限制性内切酶及对应的酶切缓冲液均购自 TaKaRa 公司。酶切方法按照 TaKaRa 公司的限制性内切酶产品说明书进行。

为了防止酶切反应对后续实验的影响,每次使用限制性内切酶进行酶切反应之后对反应产物进行酶失活处理,具体如下:1 加入与酶切反应体系等体积的 PCI 溶液(苯酚:氯仿:异戊醇 =25:24:1,遮光冷藏保存,易氧化),使酶失活;2 用混匀器处理 10 s 后常温条件下 14 000 rpm 离心 5 min;3 用移液器将最上层液体转移到新 1.5 mL 离心管中(注:共三层,中间是蛋白质层);4 乙醇沉淀处理,浓缩 DNA。

3.6 CaMV 35S minimal 启动子序列的扩增

考虑到 CaMV 35S minimal 启动子序列扩增产物的下游序列中要包括 *Bgl* II 酶切位点,我们在设计下游引物时引物的 3' 端上增加了 *Bgl* II 限制性内切酶的识别位点序列(AGATCT)。具体如下:CIP7_SacI_F:5'-CGAGCTGGAGTTTTTTTCTG-3' (Tm=54.3℃);35S miniPro. (R):5'-GTTTAGATCTGTTTAGTCCCTCCCAAATGAAATGA -3' (Tm=55.6℃),PCR 产物大小应为 170 bp。反应体系,如下:Vector DNA (100

ng/ μ L) 1 μ L、CIP7_SacI_F primer (10 pmol/L) 1 μ L、35S miniPro.(R) primer (10 pmol/L) 1 μ L、5 \times PrimeSTAR[®] GXL Buffer 10 μ L、dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 4 μ L、PrimeSTAR[®] GXL DNA Polymerase (1.25 U/ μ L) 1 μ L、H₂O 32 μ L, 共 50 μ L。PCR 条件, 如下: 94 $^{\circ}$ C 15 s、80 $^{\circ}$ C 1 min、30 循环 (98 $^{\circ}$ C 10 s、53 $^{\circ}$ C 15 s、68 $^{\circ}$ C 30 s)、68 $^{\circ}$ C 5 min、16 $^{\circ}$ C ever。

3.7 LUC 基因序列的扩增

考虑到 LUC 基因序列扩增产物的上游序列中要包括 Bgl II 酶切位点, 我们在设计下游引物时引物的 5' 端上增加了 Bgl II 限制性内切酶的识别位点(A-GATCT)。具体如下: Luc (+)Gene (F) : 5'-AAACA-GATCTAAACAATGGCTATGGCTGAAGACGC-3' (Tm=60.5 $^{\circ}$ C); Luc (+)Gene (R) : 5'-AACGATCGGG GAAATTCGATCGAAT-3' (Tm=58.8 $^{\circ}$ C), PCR 产物大小应为 1 711 bp。反应体系, 如下: Vector DNA (100 ng/ μ L) 1 μ L、Luc(+)-Gene(F) primer (10 pmol/L) 1 μ L、Luc (+)Gene (R) primer (10 pmol/L) 1 μ L、5 \times PrimeSTAR[®] GXL Buffer 10 μ L、dNTP Mixture (2.5 mmol/L) 4 μ L、PrimeSTAR[®] GXL DNA Polymerase (1.25 U/ μ L) 1 μ L、H₂O 32 μ L, 共 50 μ L。PCR 条件, 如下: 94 $^{\circ}$ C 15 s、80 $^{\circ}$ C 1 min、30 循环 (98 $^{\circ}$ C 10 s、60 $^{\circ}$ C 15 s、68 $^{\circ}$ C 2 min)、68 $^{\circ}$ C 5 min、16 $^{\circ}$ C ever。

3.8 PCR 产物的凝胶回收

本研究中 PCR 扩增产物的凝胶回收利用 Promega 公司的 Wizard[®] SV Gel and PCR Clean-Up System 试剂盒。

3.9 酶切反应及酶失活处理

Bgl II 单酶切反应: Bgl II restriction enzyme (1 U/ μ L) 1.0 μ L、10 \times H Buffer 2.0 μ L、PCR product \leq 1.0 μ g、H₂O Up to 20.0 μ L, 共 20.0 μ L。在 0.2 mL 离心管中充分混匀后在 37 $^{\circ}$ C 处理 3 h 后, 在 70 $^{\circ}$ C 处理 20 min。进一步进行酶失活处理。

BamH I 和 Xba I 双酶切反应: 10 \times K Buffer 2.5 μ L、PCR product (or Vector yy449 DNA) \leq 1.0 μ g、BamH I restriction enzyme (1 U/ μ L) 2.5 μ L、Xba I restriction enzyme (1 U/ μ L) 2.5 μ L、H₂O Up to 50 μ L, 共 50.0 μ L。在 0.2 mL 离心管中充分混匀后在 37 $^{\circ}$ C 处理 3 h 后, 在 70 $^{\circ}$ C 处理 20 min。进一步进行酶失活处理。

Bgl II 和 Xba I 双酶切反应: 10 \times K Buffer (2 \times T)

4 μ L、Vector DNA (100 ng/ μ L) 10 μ L、Bgl II restriction enzyme (1 U/ μ L) 1 μ L、Xba I restriction enzyme (1 U/ μ L) 1 μ L、H₂O 4 μ L, 共 20 μ L。在 0.2 mL 离心管中充分混匀后在 37 $^{\circ}$ C 处理 3 h 后, 在 70 $^{\circ}$ C 处理 20 min。

3.10 T₄ DNA 连接酶反应

本试验中使用了 TaKaRa 公司的 DNA Ligation <Mighty Mix> (Cat.# 6023) 试剂盒。

3.11 感受态细胞转化

E. coli DH5 α Competent Cells (Cat.# 9057) 购自 TaKaRa 公司。T₄ DNA 连接酶反应产物的转化按照感受态细胞产品说明书操作完成。

3.12 菌落的筛选及 PCR 鉴定

将转化反应溶液中取出 100 μ L 均匀涂布在含 SP 和 ST(终浓度 20 mg/L Amp) 抗生素的 LB 培养基平板上。37 $^{\circ}$ C 条件下静置培养 12 h 后, 观察菌落形成情况。从中选出 20 个由单一菌株形成的菌落进行 PCR 鉴定并转移到新的 LB 培养基平板上 (含 SP 和 ST 抗生素), 继续培养。

PCR 鉴定上我们使用了 CIP7_SacI_F 和 Luc(+)-Gene(R) 引物组合对上述的 20 个菌落 DNA 进行了 PCR 扩增。反应体系, 如下: 菌落(DNA)-(1 μ L)、CIP7_SacI_F primer (10 pmol/L) 1 μ L、Luc(+)-Gene(R) primer (10 pmol/L) 1 μ L、GoTaq[®] Master Mix (Promega, 2 \times) 10 μ L、H₂O 8 μ L, 共 20.0 μ L。PCR 条件, 如下: 94 $^{\circ}$ C 15 s、80 $^{\circ}$ C 1 min、30 循环(94 $^{\circ}$ C 15 s、54 $^{\circ}$ C 30 s、72 $^{\circ}$ C 2 min)、72 $^{\circ}$ C 5 min、16 $^{\circ}$ C ever。

3.13 电泳

本实验中使用 0.5 \times TBE 电泳缓冲液, 在 1.0~1.5% 琼脂糖凝胶, 50 V 恒电压下电泳 2~3 h。最后用 EtBr 或 SYBR Green 工作液染色 30 min, 利用凝胶成像设备照相。

作者贡献

李玉洁和南奇延是本研究的实验设计和实验研究的执行人; 赵成日、李玉洁和南奇延完成数据分析, 论文初稿的写作; 金美玉、曹后男和山本義治参与实验设计, 试验结果分析; 赵成日是项目的构思者及负责人, 指导实验设计, 数据分析, 论文写作与修改。全体作者都阅读并同意最终的文本。

致谢

本研究由国家自然科学基金项目(31660319)和吉林省科技发展计划项目(20200402088NC)共同资助。

参考文献

- Augustine S. M., Ashwin Narayan J., Syamaladevi D. P., Appunu C., Chakravarthi M., Ravichandran V., Tuteja N., and Subramonian N., 2015, Overexpression of EaDREB2 and pyramiding of EaDREB2 with the pea DNA helicase gene (PDH45) enhance drought and salinity tolerance in sugarcane (*Saccharum* spp. hybrid), *Plant Cell Reports*, 34 (2): 247-263
- Cui B.M., 2006, Effect of ectopically expressing *cbf* gene on growth and development of transgenic tobacco directed by synthetic promoter, Dissertation for Ph.D., South China University of Tropical Agriculture, Supervisor: Zhou P., and Le J. H., pp.1-63 (崔百明, 2006, 合成启动子及 CBF 异位表达对转基因烟草生长发育的影响, 博士学位论文, 华南热带农业大学, 导师: 周鹏, 乐锦华, pp.1-63)
- Ding J., Holzwarth G., Penner M. H., Patton-Vogt J., and Bakalinsky A. T., 2015, Overexpression of acetyl-CoA synthetase in *Saccharomyces cerevisiae* increases acetic acid tolerance, *FEMS microbiology letters*, 362(3): 1-7
- Hayami N., Sakai Y., Kimura M., Saito T., Tokizawa M., Iuchi S., Kurihara Y., Matsui M., Nomoto M., Tada Y., and Yamamoto Y.Y., 2015, The responses of arabidopsis early light-induced protein2 to ultraviolet b, high light, and cold stress are regulated by a transcriptional regulatory unit composed of two elements, *Plant Physiology*, 169(1): 840-855
- Hirayama T., and Shinozaki K., 2010, Research on plant abiotic stress responses in the post-genome era: past, present and future, *The Plant Journal*, 61(6): 1041-1052
- Hoekenga O.A., Maron L.G., Pineros M.A., Cancado G.M.A., Shaff J., Kobayashi Y., Ryan P.R., Dong B., Delhaize E., Sasaki T., Matsumoto H., Yamamoto Y., Koyama H., and Kochian L.V., 2006, *AtALMT1*, which encodes a malate transporter, is identified as one of several genes critical for aluminum tolerance in *Arabidopsis*, *Proc Natl Acad Sci USA*, 103(25): 9738-9743
- Iuchi S., Koyama H., Iuchi A., Kobayashi Y., Kitabayashi S., Kobayashi Y., Ikka T., Hirayama T., Shinozaki K., and Kobayashi M., 2007, Zinc finger protein STOP1 is critical for proton tolerance in *Arabidopsis* and coregulates a key gene in aluminum tolerance, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 104(23): 9900-9905
- Kang Y., 2014, Prokaryotic expression, purification of recombinant luciferase from the Italian firefly *Luciola italica* and study on its stability factors, Thesis for M.S., Tianjin University, Supervisor: Huang H., pp.2 (康洋, 2014, 意大利萤火虫荧光素酶的原核表达、纯化及酶稳定性研究, 硕士学位论文, 天津大学, 导师: 黄鹤, pp.2)
- Kobayashi Y., Ohyama Y., Ito H., Iuchi S., Fujita M., Zhao C.R., Tanveer T., Ganesan M., Kobayashi M., and Koyama H., 2014, STOP2 activates transcription of several genes for Al- and low pH-tolerance that are regulated by STOP1 in *Arabidopsis*, *Molecular Plant*, 7(2): 311-322
- Li R.G., An X.R., Gou K.M., Bo J.L., Hou J., and Chen Y.F., 2003, Studies on improving T-A cloning efficiency of the pcr products, *Nongye Shengwu Jishu Xuebao (Journal of Agricultural Biotechnology)*, 11 (2): 158-162 (李瑞国, 安晓荣, 苟克勉, 柏家林, 侯健, 陈永福, 2003, 提高 PCR 产物 T-A 克隆效率的研究, *农业生物技术学报*, 11(2): 158-162)
- Liu Q., Kasuga M., Sakuma Y., Abe H., Miura S., Yamaguchi-Shinozaki K., and Shinozaki K., 1998, Two transcription factors, DREB1 and DREB2, with an EREBP/AP2 DNA binding domain separate two cellular signal transduction pathways in drought- and low-temperature-responsive gene expression, respectively, in *Arabidopsis*, *Plant Cell*, 10 (8): 1391-1406
- Luo L.T., Wang J., Yao Q., Chang J.L., Zheng Z., and He G.Y., 2006, A effective method: extracting short fragment products of PCR, *Shengwu Jishu (Biotechnology)*, 16(03): 47-48 (罗立廷, 王珏, 姚琴, 常俊丽, 郑重, 何光源, 2006, 一种有效回收短片段 PCR 产物的方法, *生物技术*, 16(03): 47-48)
- Ma L., 2005, Identification of key cis-elements in promoter of *arabidopsis SLO* gene, Thesis for M.S., Biotechnology Research Institute CAAS, Supervisor: Zhang C.Y., pp.11 (马琳, 2005, 拟南芥 *SLO* 基因启动子区重要顺式调控元件的鉴定, 硕士学位论文, 中国农业科学院生物技术研究院, 导师: 张春义, pp.11)
- Mnaimneh S., Davierwala A.P., Haynes J., Moffat J., Peng W.T., Zhang W., Yang X., Pootoolal J., Chua G., Lopez A., Trochetset M., Morse D., Krogan N.J., Hiley S.L., Li Z., Morris Q., Grigull J., Mitsakakis N., Roberts C. J., Greenblatt J.F., Boone C., Kaiser C.A., Andrews B.J., and Hughes T.R., 2004, Exploration of essential gene functions via titratable promoter alleles, *Cell*, 118(1): 31-44
- Obayashi T., Kinoshita K., Nakai K., Shibaoka M., Hayashi S., Saeki M., Shibata D., Saito K., and Ohta H., 2007, AT-TED-II: a database of co-expressed genes and *cis* elements for identifying co-regulated gene groups in *Arabidopsis*, *Nucleic Acids Research*, 35(suppl 1): D863-D869
- Ortega-Amaro M.A., Rodriguez-Hernandez A.A., Rodriguez-Kessler M., Hernandez-Lucero E., Rosales-Mendoza S., Ibanez-Salazar A., Delgado-Sanchez P., and Jimenez-Bremont J.F., 2014, Overexpression of *AtGRDP2*, a novel

- glycine-rich domain protein, accelerates plant growth and improves stress tolerance, *Frontiers in plant science*, 5: 782
- Wang H.B., Wang P.Y., Liu Y.C., and Wan Y.L., 2012, Construction and characterization of pGL3-Claudin-1 promoter luciferase reporter plasmid, *Zhongguo Zuzhi Gongcheng Yanjiu (Chinese Journal of Tissue Engineering Research)*, 16 (28): 5251-5254 (王洪波, 王鹏远, 刘玉村, 万远廉, 2012, pGL3-Claudin-1 promoter 荧光素酶报告基因质粒的构建及其功能鉴定, *中国组织工程研究*, 16 (28): 5251-5254)
- Wu Y.L., Zhang S.Z., Li X.J., Cai W.W., and Yang B.P., 2014, Drought resistance of the transformed sugarcane with *I-SST* gene driven by two different promoters, *Redai Zuowu Xuebao (Chinese Journal of Tropical Crops)*, 35(1): 1-6 (武媛丽, 张树珍, 李晓君, 蔡文伟, 杨本鹏. 2014, 2 种不同启动子驱动下 *I-SST* 基因转化甘蔗的抗旱性比较, *热带作物学报*, 35(01): 1-6)
- Yang Y., Li J.J., Wang X., and Qiu G.Z., 2011, Progresses on reporter gene and its application, *Shengming Kexue Yanjiu (Life Science Research)*, 15(03): 277-282 (杨宇, 李江江, 王项, 邱冠周, 2011, 报告基因及其应用研究进展, *生命科学研究*, 15(03): 277-282)
- Yu J.H., Ma W.W., Wang Z.W., Chen T., and Zhao X.M., 2016, Progress in synthetic promoter library, *Weishengwuxue Tongbao (Microbiology China)*, 43(01): 198-204 (余君涵, 马雯雯, 王智文, 陈涛, 赵学明, 2016, 人工合成启动子文库研究进展, *微生物学通报*, 43(01): 198-204)
- Zhao C.R., 2017, Progress in the application of omics in the identification of abiotic stress response genes in plant, *Yanbian Daxue Nongxue Xuebao (Agricultural Science Journal of Yanbian University)*, 39(01): 87-93 (赵成日, 2017, 组学在植物非生物胁迫应答基因鉴定上的应用进展, *延边大学农学报*, 39(01): 87-93)
- Zhou Q., 2008, Research and implementation of transcription regulatory sequences data mining, Thesis for M.S., Fudan University, Supervisor: Zhu Y.Y., pp.5 (周强, 2008, 转录调控序列数据挖掘研究与实现, 硕士学位论文, 复旦大学, 导师: 朱扬勇, pp.5)