

5'UTR 序列对 *DR5::GUS* 基因瞬时表达的影响

王亚红, 赵燕, 彭彦, 刘晓柱, 张学文*

(湖南农业大学 生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128)

摘要: 利用生长素响应原件(DR5)构建了 *DR5::GUS* 报告基因表达载体,并在载体构建时,对 GUS 的 5'UTR 序列进行 2 种设计:一种是利用载体 GUS 基因原有的 5'UTR 构建成 pBI121-*DR5::GUS*;另一种采用植物增强表达的常用原件烟草花叶病毒(TMV)的 5'端序列(Ω')替换 GUS 基因原有的 5'UTR 序列,构建成 pBI121-*DR5(\Omega')::GUS*。将 2 种载体转化根癌农杆菌后,采用烟草叶片注射浸染的瞬时表达检测法对 2 个载体的植物表达效果进行检测,2 种载体分别转化烟草叶片 2 d 后,对浸染的叶盘进行 GUS 染色分析,pBI121-*DR5::GUS* 的转化叶片有明显的 GUS 反应,而 pBI121-*DR5(\Omega')::GUS* 的转化叶片则无 GUS 反应。分离注射浸染部位叶盘 RNA 后,对 GUS 特异引物进行 RT-PCR 分析,2 种转化的基因都已有效转录出 RNA,但前者能翻译出相应的 β -葡萄糖苷酸酶,后者则不能完成翻译过程,说明 Ω' 序列的引入并未有效提高 GUS 基因的表达,反而抑制了 mRNA 的翻译。

关键词: 5'非编码区;生长素基因报告系统;瞬时表达

中图分类号: Q786

文献标志码: A

文章编号: 1007-1032(2012)02-0146-04

Different 5'UTR sequences influence the transient expression of *DR5::GUS*

WANG Ya-hong, ZHAO Yan, PENG Yan, LIU Xiao-zhu, ZHANG Xue-wen*

(College of Bioscience and Biotechnology, Hunan Agricultural University, Changsha 410128, China)

Abstract: Using auxin-response element (DR5), we constructed reporter expression plasmids containing the recombinant reporter gene *DR5::GUS* for study of the auxin distribution *in vivo*. Two constructions were designed using pBI121, one of which is pBI121-*DR5(\Omega')::GUS*, where the 5'UTR of GUS was replaced by the 5'UTR of TMV (Ω') and the other is pBI121-*DR5::GUS* with 5'UTR of GUS unchanged. We transferred the two recombinants into tobacco leaf by infiltration and the transient expression was tested two days later. The GUS reaction was strong with infiltrated pBI121-*DR5::GUS* but there was no GUS activity with the pBI121-*DR5(\Omega')::GUS*. RNA was isolated from the infiltrated leaf discs and subjected to RT-PCR with specific primers of GUS. The GUS mRNAs were detectable in the infiltrated cells transferred with either pBI121-*DR5::GUS* or pBI121-*DR5(\Omega')::GUS*, and the corresponding β -glucosidase expression was achieved in the former plasmid but not the latter plasmid. It recommended the 5'UTR sequence of Ω' do not improve the gene expression of GUS, but do inhibit the translation of the mRNA in our study.

Key words: 5'UTR; *DR5::GUS*; transient expression

从真核生物 mRNA 5'末端的“帽子”到起始密码子 AUG 之间的 5'非翻译区(5'UTR)对基因表达的翻译过程有重要影响^[1]。5'UTR 的高度结构化对 mRNA 翻译起始进行调控,既具有介导内部翻译起始的功

能,也含有内部核糖体进入位点(IRES)^[2];因此,人工转入生物体的外源基因除编码区序列的有效性外,5'UTR 的作用也至关重要。Daniel 等^[3]研究发现,来自于烟草花叶病毒 RNA 5'端的 67 bp 的前导序

收稿日期: 2011-09-22

基金项目: 湖南省教育厅项目(SCX1103)

作者简介: 王亚红(1987—),女,湖南汉寿人,硕士研究生,主要从事细胞生物学研究; *通信作者, xwzhang@hunau.net

列(命名为 Ω' , 包括TMV RNA的5'端序列和AUG), 无论在体外或体内, 甚至在原核细胞内, 都可以增强报告基因表达。Mitsuhara等^[4]将CaMV 35S核心启动子与CaMV 35S启动子的5'端不同区段和烟草花叶病毒的5'UTR(Ω')相连, 发现在转基因烟草中GUS的表达活性最强。有理由认为, 如果在植物转基因载体构建时, 启动子转录起点下游加上一段 Ω' 可以提高基因翻译的活性。

Guilfoyle等^[5]对生长素反应元件的研究表明, 活体内对生长素进行标记成为可能。生长素早期响应基因的启动子区域, 含有多个生长素反应元件(AuxREs), 顺式作用元件赋予了这些基因的生长素反应能力, 同时也可以与一些反式作用因子结合, 打开或关闭基因的表达^[6-7]。通过对大豆GH3基因的AuxREs序列的位点突变和9个序列的直接重复, 组建了人工生长素反应元件DR5, Tim等^[8]认为, DR5比天然的AuxREs具有更强的生长素反应能力, 表达活性可增加5~10倍。以DR5为启动子与报告基因重组, 构建成生长素响应的报告基因 $DR5::GUS$, 转入植物体获得的转基因植株成为研究生长素在植物体内分布及其作用的良好工具^[9-10]。

鉴于将DR5启动子下游整合 Ω' 序列, 可能增强下游基因的表达活性, 使生长素报告性响应的灵敏度提高, 笔者对 $DR5::GUS$ 进行了改造, 构建了载体pBI121- $DR5::GUS$ 及引入 Ω' 序列的载体pBI121- $DR5(\Omega)::GUS$ 。为了解载体pBI121- $DR5(\Omega)::GUS$ 的有效性, 利用烟草叶片浸注转化的瞬时表达系统对报告基因进行了表达分析, 现将结果报道如下。

1 材料与方法

1.1 材料

已构建的含有 Ω' 的植物表达载体pBI121和不含有 Ω' 的植物表达载体pBI121、大肠杆菌(*E.coli*)菌株InvaF⁺、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株LBA4404、野生型烟草W38植株, 均由湖南农业大学细胞生物学实验室保存。

Infiltration medium 含 250 mg D-glucose、5 mL

500 mmol/L MES(pH6.0)、25 μ L 200 mmol/L AS(乙酰丁香酮)。GUS 染色试剂含 10 mg X-gluc、4 mL 50 mmol/L Na_3PO_4 缓冲液(pH7.0)、50 μ L 50 mmol/L $K_3[FeCN_6]$ 、50 μ L 50 mmol/L $K_4[FeCN_6]$ 、90%丙酮、乙醇。生长素处理液含 10 mL NAA(50 mmol/L)。

1.2 方法

1.2.1 载体构建

人工设计合成 DR5 启动子, 酶切插入替换载体 pBI121 上的 35S 启动子, 利用 PCR 方法, 将烟草花叶病毒的 5' 非转录区(Ω')序列替换 GUS 基因起始密码子 ATG 前的 5'UTR, 重组构建 pBI121- $DR5::GUS$ 和 pBI121- $DR5(\Omega)::GUS$ 2 个植物表达载体。质粒构建、纯化、连接、转化及酶切分析均参照文献^[11]方法进行。再转化重组载体质粒至 LBA4404 菌株中。

1.2.2 农杆菌浸注瞬时表达

取 5 mL 经 28 $^{\circ}C$ 过夜培养的农杆菌 LBA4404 (包含了重组载体)菌液, 4 000 r/min 离心 5 min, 去上清后加入 1 mL 新鲜的 Infiltration medium 混匀, 离心后去上清, 再加入 1 mL 新鲜的 Infiltration medium 混匀, 最后用约 10 倍体积的 Infiltration medium 将菌液稀释至 $OD < 0.1$ 。吸取 1 mL 处理后的菌液, 从叶片背面注入叶片内, 注射点作标记。21 $^{\circ}C$ 恒温, 14 h 光照/10 h 黑暗培养 40~48 h。期间适当用 50 mmol/L NAA 溶液喷洒烟草植株。

1.2.3 GUS 基因瞬时表达后染色检测

2 d 后, 用打孔器截取注射点周围直径约 0.8 cm 的叶盘, 进行 GUS 染色。

1.2.4 浸注转化基因瞬时表达的转录分析

采用 RT-PCR 方法进行基因转化分析。根据 GUS 基因全长序列, 通过 Primer 5.0 软件, 设计了 GUS 基因的 1 对特异性引物。分 3 个时间点(48 h 前, 24 h 前, 12 h 前)进行烟草叶片的农杆菌注射, 剪下所有被注射的烟草叶片, 采用 Trizol 法提取其 RNA, 使用 RevertAidTM First Strand Synthesis Kit(Fermentas)合成 cDNA 第一链, 再用 GUS 基因的特异性引物摸索确定 RT-PCR 的最佳体系, 检测目的基因是否被转录。

2 结果与分析

2.1 pBI121-DR5::GUS 和 pBI121-DR5(Ω')::GUS 的构建

载体区段如图 1 所示,生长素响应启动子 DR5

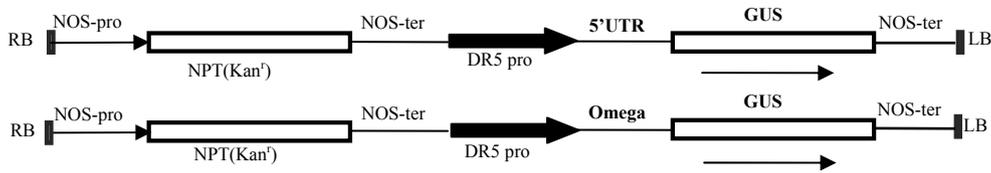
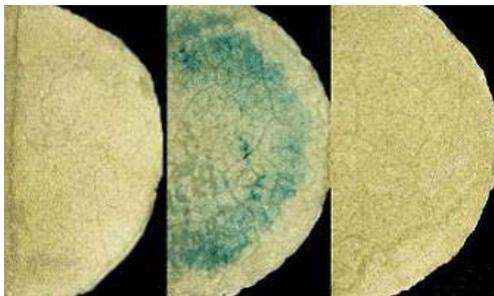


图 1 重组载体 pBI121-DR5::GUS 和 pBI121-DR5(Ω')::GUS 的区段

Fig.1 The T-DNA region of recombinant vector pBI121-DR5::GUS and pBI121-DR5(Ω')::GUS

2.2 GUS 染色检测对比

把分别注射了 2 种不同载体的叶片切取圆盘,设置对照进行 GUS 染色,结果如图 2 所示。pBI121-DR5::GUS 载体农杆菌的注射浸染部位有 GUS 活性表达,而 pBI121-DR5(Ω')::GUS 载体农杆菌的注射浸染部位未检出 GUS 活性。



1 载体 pBI121-DR5(Ω')::GUS 叶片浸注部位瞬时表达的 GUS 检测,未检出 GUS 活性;2 载体 pBI121-DR5::GUS 叶片浸注部位瞬时表达的 GUS 检测,有明显的 GUS 活性;3 未浸注叶盘的 GUS 显色对照。

图 2 叶片的 GUS 染色检测结果

Fig.2 The GUS test with infiltrated leaf discs only the pBI121-DR5::GUS transformation shows GUS activities

2.3 GUS 基因 RT-PCR 检测结果

采用不同时间点分别注射了 2 种不同载体的烟草叶片,收集注射点的叶盘,分离总 RNA 并反转录成 cDNA。以其为模板,GUS 基因特异引物进行 PCR 扩增,对基因转录产物进行分子检测,结果如图 3。检测表明构建的 2 种重组体浸注转化后都能瞬时表达,能有效转录出相应的 mRNA。

插入替换载体 pBI121 上的 35S 启动子,得到重组载体 pBI121-DR5::GUS,再将 Ω' 序列插入替换 GUS 基因起始密码子 ATG 前的 5'UTR,获得重组载体 pBI121-DR5(Ω')::GUS。



M Maker; 1 载体 pBI121-DR5::GUS 浸注部位叶盘的 Actin 扩增;2 载体 pBI121-DR5(Ω')::GUS 浸注部位叶盘的 Actin 扩增;3 载体 pBI121-DR5::GUS 浸注叶盘的 GUSmRNA 扩增;4 载体 pBI121-DR5(Ω')::GUS 浸注叶盘 GUSmRNA 扩增;5 以 pBI121 质粒为模板的 GUS 阳性对照扩增出大小一致的分子;6 以未浸注叶片的 cDNA 为模板的对照扩增未出现相应分子。

图 3 GUS 基因表达 RT-PCR 产物的 1% 琼脂糖凝胶电泳结果

Fig.3 The RT-PCR amplification of GUS mRNA with actin as reference in 1% agarose gel

3 讨论

Chen 等^[12]成功构建了基于猪水泡病病毒(SVDV)的 5'UTR 的双顺反子逆转录病毒载体,并证实 SVDV 的 5'UTR 能够高效介导蛋白表达,并比较了同一载体在不同细胞内的表达水平。近年来的研究发现,在不同的生物和不同的基因中,5'UTR 的长度和碱基顺序变化很大,甚至同一基因通过不同的转录起始也有不同长度的 5'UTR,不同的 5'UTR 及其所含元件在不同来源的组织、细胞中表现出很大的差异,即特定的 5'UTR 只有在特定的组织或细胞中才能发挥最优的调控效率^[13-14]。当 5'UTR 的序列中存在着碱基配对时,就可形成发夹式或茎环状二级结构,对翻译起始具有顺式阻抑作用。其抑制作用的强弱取决于发卡结构的稳定性及其在 5'UTR 中的位置。Daniel 等^[15]发现,蛋白质合成常受与核糖体相互作用并有一定结构的 mRNA 的调节。笔者重组构建的 2 个载体的区别在于,GUS

基因 ATG 起始密码子之前的 5'UTR 不同。

利用 DNAMAN 软件分析, Ω' 序列自身折叠的茎环结构为 2 个, 对比 GUS 5'UTR 序列的自身折叠少 1 个茎环, 并且 Ω' 与在替换时还残留的 30 个碱基(ATG 起始密码前)总长度达到 97 bp, GUS 5'UTR 长度相差 43 bp; 与 Mitsuhara 等的载体构建比较, 其载体 PE6113-GUS 的 Ω' 序列的插入位点与本研究类似, 而他们去掉了 ATG 密码子前的 14 个碱基。有研究显示, 与信号传导路径相关的基因往往有较长的 5'UTR。长的 5'UTR 折叠后与翻译调节相联系, 折叠的 5'UTR 可以帮助调节接近核糖体^[16-17]。由于 Ω' 替换后, 使得 GUS 基因的 5'UTR 区过长, 且折叠(茎环结构)较少, 致使 5'UTR 不能有效地接近核糖体, 从而可能导致 GUS 基因不能被有效翻译。2 个载体进行转基因瞬时表达时, 出现截然不同的结果。载体 pBI121-DR5::GUS 的转化叶片经 GUS 染色检测, 证明 DR5 能够启动 GUS 基因的转录, 转录后也能够翻译表达蛋白, 而载体 pBI121-DR5(Ω')::GUS 用 Ω' 替换了 GUS 基因 ATG 前原有的非翻译区序列后, 其 RT-PCR 检测显示, DR5 启动子能够启动 GUS 基因转录, 而 GUS 染色检测结果证明 GUS 基因转录后未能表达蛋白。对比 2 个载体的检测结果, 表明 Ω' 序列替换了原有的 5'UTR 后, 在翻译水平上影响了 GUS 基因在烟草中的表达。

参考文献:

- [1] Bate N, Spurr C, Foster G D, et al. Maturation-specific translational enhancement mediated by 5'-UTR of a late pollen transcript[J]. *Plant J*, 1996, 10: 613-623.
- [2] Bryan R Cullen. Nuclear RNA export pathways[J]. *Molecular and Cellular Biology*, 2000, 20(12): 4181-4187.
- [3] Daniel R Galliel, David E Sleat, John W Watts, et al. The 5'-leader sequence of tobacco mosaic virus RNA enhances the expression of foreign gene transcripts in vitro and in vivo[J]. *Nucleic Acids Research*, 1987, 15(8): 1-17.
- [4] Mitsuhara I, Ugaki M, Hirochika H, et al. Efficient promoter cassettes for enhanced expression of foreign genes in dicotyledonous and monocotyledonous plants[J]. *Plant Cell Physiol*, 1996, 37: 49.
- [5] Sun Tao, Chai Tuanyao, Liu Geyu. Progress in the plant GH3 gene family[J]. *Biotech*, 2008 (11): 1860-1866.
- [6] Guilfoyle T J. Auxin response factors[J]. *Plant Molecular Biology*, 2003, 10: 453-460.
- [7] Abel S, Oeller P W, Theologis A. Early auxin-induced genes encode short-lived nuclear proteins[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 91: 326-330.
- [8] Tim Ulmasov, Jane Murfett, Gretchen Hagen, et al. Aux/IAA proteins repress expression of reporter genes containing natural and highly active synthetic auxin response elements[J]. *The Plant Cell*, 1997, 9(11): 1963-1971.
- [9] Guilfoyle T J, Hagen G, Li Y, et al. Expression of auxin-responsive genes in soybean and transgenic tobacco[J]. *Biochem Soc Trans*, 1991, 20: 97-101.
- [10] Bierfreund N M, Reski R, Decker E L. Use of an inducible reporter gene system for the analysis of auxin distribution in the moss *Physcomitrella patens*[J]. *Plant Cell Rep*, 2003, 21(12): 1143-1152.
- [11] Chen B F, Hwang L H, Chen D S. Characterization of a bicistronic retroviral vector composed of the swine vesicular disease virus internal ribosome entry site[J]. *Virology*, 1993, 67(4): 2142-2148.
- [12] 莎姆布鲁克 J, 拉塞尔 D W. 分子克隆实验指导[M]. 3 版. 黄培堂, 等译. 北京: 科学出版社, 2005.
- [13] Creancier L, Morello D, Mercier P, et al. Fibroblast growth factor 2 internal signal sequence reveals a stringent tissue-specific regulation[J]. *Cell Biol*, 2000, 150(1): 275-281.
- [14] Chu Q D, Sun L, Li J, et al. Rat adenocarcinoma cell line infected with an adenovirus carrying a novel herpes-simplex virus-thymidine kinase suicide gene construct dies by apoptosis upon treatment with ganciclovir[J]. *Surg Res*, 2007, 143(1): 189-194.
- [15] Daniel B, Nenad B. Trapping the ribosome to control gene expression[J]. *Cell*, 2007, 130: 983-958.
- [16] Ringnér M, Krogh M. Folding free energies of 5'-UTRs impact post-transcriptional regulation on a genomic scale in yeast [J]. *PLoS Comput Biol*, 2005, 1(7): e72.
- [17] Li S W, Feng L, Niu D K. Selection for the miniaturization of highly expressed genes[J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2007, 360(3): 586-592.

责任编辑: 罗慧敏