



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110724686 B

(45) 授权公告日 2021. 07. 27

(21) 申请号 201910774653.8

C12N 15/82 (2006.01)

(22) 申请日 2019.08.21

A01H 5/00 (2018.01)

A01H 6/20 (2018.01)

(65) 同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 110724686 A

(56) 对比文件

CN 104988153 A, 2015.10.21

William等.LR031572.1.《NCBI, GenBank》

(43) 申请公布日 2020.01.24

.2018, 全文.

(73) 专利权人 深圳大学

刘昱辉等.拟南芥profilin2启动子5'端缺失对维管束特异表达的影响.《科学通报》.2001, 全文.

地址 518060 广东省深圳市南山区南海大道3688号

刘昱辉等.维管束特异表达启动子及其顺式调控元件.《生物工程学报》.2003, 全文.

(72) 发明人 唐玉林 邓艳午 刘帅

审查员 张锦广

(74) 专利代理机构 深圳市恒申知识产权事务所
(普通合伙) 44312

代理人 李倩竹

(51) Int. Cl.

C12N 15/113 (2010.01)

C12N 15/10 (2006.01)

权利要求书1页 说明书5页

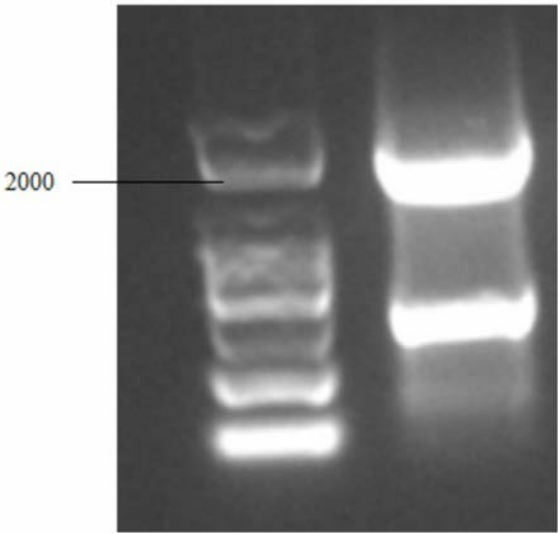
序列表2页 附图4页

(54) 发明名称

维管束组织特异性表达启动子、包含其的载体、转化体及其应用

(57) 摘要

本发明公开了一种维管束组织特异性表达启动子包含其的载体、转化体及应用,所述启动子由甜菜心基因组获取,其核苷酸序列如SEQ ID:No 1所示,所述启动子能够明显促进报告基因GUS在拟南芥维管组织中表达,其在植物的维管束组织中具有特异性表达的作用,从而使由所述启动子驱动的抗病基因能够在植物维管束中表达,从而对抗枯萎病等病菌,为植物的抗病育种提供了一种新的途径。



1. 一种维管束组织特异性表达启动子,其特征在于,所述启动子由甜菜心基因组获取,其核苷酸序列如SEQ ID:No 1所示。
2. 一种包含如权利要求1所述的启动子的载体。
3. 一种包含如权利要求1所述的启动子的转化体,其特征在于,所述转化体的宿主为植物。
4. 根据权利要求3所述的转化体,其特征在于,所述植物为拟南芥。
5. 一种如权利要求1所述的启动子在拟南芥幼苗根、茎、叶的维管束组织特异性表达基因中的应用。

维管束组织特异性表达启动子、包含其的载体、转化体及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于植物基因工程技术领域,具体地说涉及一种维管束组织特异性表达的pBrpHMA2启动子及其应用。

背景技术

[0002] 基因的表达受不同因素的调控,其中转录调控是基因表达的重要调控步骤。顺式作用元件和反式作用因子共同作用调控基因的转录表达,而启动子是一种重要的顺式作用元件,在基因的特异表达过程中发挥重要作用。启动子根据作用方式的不同被分为三大类:组成型启动子、诱导性启动子和组织特异性启动子。

[0003] 到目前为止,已有大量的组织或器官特异性启动子被分离出来,且相关研究表明,拟南芥HMA2基因,主要是在植物的根、茎和叶的维管束组织中观察到其所驱动的报告基因GUS的表达,在木质部和韧皮部都有表达,但是相关研究都没有进一步的对控制AtHMA2基因表达的启动子序列特性进行分析。pBrpHMA2启动子的序列和拟南芥HMA2基因的2000bp的启动子序列存在很大差异,序列比对发现只有40%相似,但都在植株的维管组织表现出很强的特异性。

[0004] 现在对在维管束特异表达的启动子的研究较少,但维管束病害却是农业生产上造成经济损失的一重要病害。比如棉花黄枯萎病、茄子黄萎病、马铃薯青枯病以及黄瓜、西瓜和苦瓜各种经济作物枯萎病。相关文献表明,由于病原菌寄生在维管阻碍水分和矿物质的运转使得植株不能进行正常生命活动,导致叶片枯萎甚至植株的死亡。棉花黄萎病是一种真菌侵染棉花根部,逐渐造成棉花叶片变黄然后脱落,严重的还会进一步造成植株的死亡,维管束病害严重影响棉花的品质,造成严重的经济损失。茄子的黄萎病,是半知菌亚门轮枝孢属大丽花轮枝菌从植株根部的伤口或者幼根表皮及根毛侵染植物体,而后在维管束内快速繁殖进而侵染整个植株。病菌会导致导管堵塞,影响植物对日常物质的吸收和正常的运输,有的还会分泌毒素导致植株叶缘、叶脉间变黄,然后是整叶变黄植株萎蔫。马铃薯青枯病又叫做细菌性枯萎症,是一种世界性的重大细菌性病害分布范围广,发病严重时会造成马铃薯产量的大大降低。青枯假单胞菌从植物的根部或者茎基部伤口侵入,也可透过导管侵入相邻的薄壁细胞导致茎部出现不规则的水浸状斑,是一种典型的维管束病害。但是对于维管束病害,目前并没有有效的化学药剂,因此,提供一种能够直接在植物维管束表达的启动子驱动的抗病基因从而在维管束中直接对抗病菌成为当前亟待解决的技术问题。

发明内容

[0005] 为此,本发明正是要解决上述技术问题,从而提出一种维管束特异表达的启动子及其应用。

[0006] 为解决上述技术问题,本发明的技术方案为:

[0007] 本发明提供一种维管束组织特异性表达启动子,所述启动子由甜菜心基因组获

取,其核苷酸序列如SEQ ID:No 1所示。

[0008] 作为优选,所述启动子序列的克隆包括如下步骤:

[0009] S1、获取BraHMA2基因并获取BraHMA2基因转录起始位点上游2000bp的核苷酸序列;

[0010] S2、设计克隆引物;

[0011] S3、以所述核苷酸序列为模板,用克隆引物扩增。

[0012] 作为优选,所述克隆引物包括:

[0013] pBrpHMA2-F:TCTCTCAGGGGTAAAAGGCTTA;

[0014] pBrpHMA2-R:TCTTATCGTTCTTGACGCCAT。

[0015] 本发明还提供一种包含所述的启动子的载体,所述载体通过克隆甜菜心BrpHMA2基因转录起始位点前2000bp的片段构建而得。

[0016] 作为优选,所述载体由引物p1p100-pBrpHMA2-F和p1p100-pBrpHMA2-R与启动子序列经重组制得,所述引物p1p100-pBrpHMA2-F为:GCCCTTTCGTCTTCAAGAATTCTCTCTCAGGGGTAAAAGGCTTA,所述引物p1p100-pBrpHMA2-R为:GGGGATCCTCTAGAGTCGACTCTTATCGTTCTTGACGCCAT。

[0017] 作为优选,重组后,还包括将构建的重组质粒p1p100-pBrpHMA2-GUS转化到大肠杆菌DH5 α 中并通过正向引物、反向引物进行PCR鉴定的步骤,所述正向引物为:CTCTTTTTCGCCAAGTG TAG,反向引物为:CTGCCCAACCTTTCGGTATA。

[0018] 本发明还提供一种包含所述的启动子的转化体,所述转化体的宿主为植物。

[0019] 作为优选,所述植物为拟南芥。

[0020] 本发明还提供一种所述的启动子在拟南芥幼苗根、茎、叶的维管束组织特异性表达中的应用。

[0021] 本发明的上述技术方案相比现有技术具有以下优点:

[0022] 本发明所述的维管束组织特异性表达启动子,所述启动子由甜菜心基因组获取,其核苷酸序列如SEQ ID:No 1所示,所述启动子能够明显促进报告基因GUS在拟南芥维管组织中表达,其在植物的维管束组织中具有特异性表达的作用,从而使由所述启动子驱动的抗病基因能够在植物维管束中表达,从而对抗枯萎病等病菌,为植物的抗病育种提供了一种新的途径。

附图说明

[0023] 为了使本发明的内容更容易被清楚的理解,下面根据本发明的具体实施例并结合附图,对本发明作进一步详细的说明,其中

[0024] 图1是本发明实施例所述的pBrpHMA2启动子的克隆的PCR电泳图;

[0025] 图2是本发明实施例所述的包含所述的启动子的载体的结构示意图;

[0026] 图3是本发明实施例所述的p1p100-pBrpHMA2菌落的PCR电泳图;

[0027] 图4是本发明实施例中pBrpHMA2-GUS转基因T0代植株的鉴定结果图;

[0028] 图5是本发明实施例中pBrpHMA2-GUS转基因T1代植株的鉴定结果图;

[0029] 图6是本发明实施例中pBrpHMA2-GUS幼苗染色的示意图。

具体实施方式

[0030] 若未特别指明,实施例中所用的化学试剂均为常规市售试剂,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段。

[0031] 实施例1

[0032] 本实施例提供一种维管束组织特异性表达启动子,所述启动子由甜菜心基因组中获取,其核苷酸序列如SEQ ID:No 1所示:tctctcaggggtaaaaggcttaaaaagcaaagattaaaagaagattacttttctagtagaaaagtttctattgtttaccgccatcgacaacaacaaaaattatgtggccaagttgggccaggtcttgggttgactctggtttagtggtcccattactttgtgtatgtgaatgtgatggttttaacttttaactagcactcttctatgataaaaaatcctttgatgctccttattgtataatatgtgttcgagtttacagaggtgagtatcgcggttgtaatatagttatgttagtttgggtggccaaatcaaactccttaaggagtagacattacaaaaagcaaggaacggaagcaataaagaaactcaatctctaaatagccatcaaaattgattagatgaagtcaattttgtaaacacgtctaggtgactagaaagctaagaattaaatgaatcggtagcttgaattttgggtgagataacatatgttgctctctcgccatagttcataattaaatggtgatcatatataggtctggtctcaagcctacgccagtaaaggacataaagccaagcatgggaaggtggcacagctagcaccttcagtaatgcacgttaatagacttttggttatattttaggagtattattta caagtattaatgaatgtaagtaaatgatattttatatatttctatacaacttcaaaaataagtttggattttatat ttttgaacaaaaaacaattctgaaactatttcacataatatgatgtttattcccctaatactttcacatttagcct catttagaggaatctatctaacttaccaaactaataaggaaaaaaaactgtaaaaaacattgaaatgaggaatca cacatggatttccattctgtaatcttgtactttggattctccactataattttagtagtacctatcttttgccaaac atacatctatctttttgcaaaggcttgacaaaaatagtttaaaagcatattgtataacgtatgcctgcctaaaaccg tgacctcgaacaagttctcttttttccctatttttttaactcaaacgtttcttcagtctcagtatgttatttat tttaaactcttttgaatatgtaaatagaaaattcttggatagatatactagtttaattttagtctctgaaatgat ttaagtaaatagaaattcttaaatgttttaccaaagttaatgaaactgcaaaactagaatggaacattgagatttg agagaataggaatcagaaagaagcagcctaccacagaactatggaatttacattattgtcatactgtatatgagga ttctttacacaaccataatacactaatgtcaacattataaaggaatttacattattacgataatttatttcaaag attctttacacaacaaatatattaatttcggaaagcatattatcatggcaaggaagttaattaaaccaccaa tgc ttttaaccacacttttctaacacatttgcctatataaagcaaccacatctctcatcttctttcacctcagatcatta tcatctccacatagggaaaaaaaactctcctctctttgactaattaacaaagtatataaatcgaatcgaacaaa ctaaaccggtccggttaattgctctctgtccctcggtacctctgtcttctcctccggtattcttcttctcctgtct tcttcacatacatctcaatgacctctctgttttttttcttctgaaatgtctgtttttttatgagagaactcaaaa ctcatctctctttttcgccaagtgtagagtgaacctaacgaaaacgttttcaaacatcttggttatagacatatctt cgacacgttacgtgcatttccccaagacattattgctatctttacatcaactgccacgaaatagtttcagcacata aacacaaaccacaaagtaacattctcacagtttttggttttcgttcttttgccagattcgtaagcagaaatggcggtcc aagaacgataaga。

[0033] 具体操作如下:

[0034] 1、启动子序列的克隆和载体构建

[0035] 在白菜基因组数据库 (http://brassicadb.org/cgi-bin/gbrowse/Brassica_v1.5/) 中寻找BraHMA2基因,并获得该基因转录起始位点上游2000bp的核苷酸序列以白菜序列为参考设计克隆引物,并将该序列片段命名为pBrpHMA2,所述克隆引物pBrpHMA2-F:的基因序列为:TCTCTCAGGGGTAAAAGGCTTA;pBrpHMA2-R:TCTTATCGTTCTTGGACGCCAT。

[0036] 将甜菜心种子播撒到Hogland营养液的平板上进行萌发,萌发三天后,将甜菜心幼苗移入到加了Hogland营养液水培盘中培养,两周后长出真叶。

[0037] 用CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)法提取甜菜心的基因组DNA:

[0038] 首先取约0.5g的叶片置于2ml的离心管加入小钢珠,盖上管盖丢入液氮后拿出充分震荡研磨成粉末,加入400 μ l的2%的CTAB溶液,在65℃下混合15min,然后加入等体积的氯仿充分震荡混匀,以12000rpm的转速离心15min。取上清液加入等体积的异丙醇,上下缓慢混匀。以12000rpm的转速离心处理10min后去除上清液,加入500 μ l的75%的乙醇洗涤两次,干燥后加入适量水溶。以基因组DNA为模板,用引物pBrpHMA2-F和pBrpHMA2-R扩增启动子,得到pBrpHMA2,结果如图1所示。

[0039] 然后用分别带有与载体(p1p100)部分片段和EcoRI、SalI酶切位点的p1p100-pBrpHMA2-F和p1p100-pBrpHMA2-R引物让启动子序列带上与载体p1p100的相似片段。所述p1p100-pBrpHMA2-F的基因序列为:GCCCTTTCGTCTTCAAGAATTCTCTCTCAGGGTAAAAGGCTTA,所述p1p100-pBrpHMA2-R的基因序列为:GGGATCCTCTAGAGTCGACTCTTATCGTTCTTGGACGCCAT,所述载体结构如图2所示。

[0040] 用快切酶QuickCut™ EcoRI和QuickCut™ SalI对质粒p1p100进行双酶切,利用重组原理将pBrpHMA2启动子序列置换进载体,得到构建好的重组质粒p1p100-pBrpHMA2-GUS,将所述p1p100-pBrpHMA2-GUS转化到大肠杆菌DH5 α 中,使用正向引物F,反向引物R进行菌落PCR鉴定,其中,正向引物F的基因序列为:CTCTTTTTCGCCAAGTG TAG,反向引物R为:CTGCCAACCTTTCGGTATA,鉴定结果如图3所示,图中M为标记物,1-7为单菌落。

[0041] 2、启动子序列的分析

[0042] 选取甜菜心BrpHMA2基因启动子转录起始位点上游的2000bp片段,通过在线植物转录元件分析工具PLACE (<https://www.dna.affrc.go.jp/PLACE/>) 对该片段序列进行分析,预测其中存在的顺式作用元件。发现存在响应组织器官特异性表达有关的元件,如与器官特异性共有序列基序OSE1ROOTNODULE元件(AAAGAT),光调节和组织特异性表达元件GATABOX (GATA), ROOTMOTIFTAPOX1元件(ATATT)与基因在根中的差异表达有关,种子特异性元件CANBNNAPA (CNAACAC)与保卫细胞特异性基因表达元件TAAAGSTKST1元件(TAAAG)。与根毛特异性表达的顺式元件RHERPATEXPA7元件(KCACGW),与花粉特异表达有关POLLEN1LELAT52元件(AGAAA),胚乳特异性表达相关的-300ELEMENT元件(TGHAAARK),但分析结果中并未见有特殊的维管束组织特异性表达元件。

[0043] 3、拟南芥转化及转基因植株筛选

[0044] 利用花序侵染法将p1p100-pBrpHMA2-GUS重组质粒转化到农杆菌GV3101中并侵染拟南芥,收获侵染转化后的pBrpHMA2-GUS转基因T0代种子进行转基因植株的筛选。将种子消毒灭菌后均匀播在含有50mg/L Hyg的筛选培养基上生长约10天。选出叶片大且绿,有根长出的幼苗作为阳性转基因候选植株。在T1代对候选植株再次进行抗生素Hyg的筛选和正向引物、反向引物进行DNA鉴定,获得转基因阳性植株,对T0代植株和T1代植株的鉴定结果如图4-5所示,图中,M为标记物,-为负对照,+为正对照,1-10为转基因植株。

[0045] 4、pBrpHMA2驱动的报告基因GUS的表达分析

[0046] 将pBrpHMA2-GUS转基因种子在1/2MS培养基上培养10天后,得到pBrpHMA2-GUS转基因幼苗,对所述幼苗进行GUS染色,结果如图6所示,课件GUS明显在拟南芥幼苗根、茎、叶

的维管束组织中表达。

[0047] 显然,上述实施例仅仅是为清楚地说明所作的举例,而并非对实施方式的限定。对于所属领域的普通技术人员来说,在上述说明的基础上还可以做出其它不同形式的变化或变动。这里无需也无法对所有的实施方式予以穷举。而由此所引伸出的显而易见的变化或变动仍处于本发明创造的保护范围之内。

[0001]	SEQUENCE LISTING
[0002]	<110> 深圳大学
[0003]	<120> 维管束组织特异性表达启动子、包含其的载体、转化体及其应用
[0004]	<130> 2019.8.6
[0005]	<160> 7
[0006]	<170> PatentIn version 3.3
[0007]	<210> 1
[0008]	<211> 2030
[0009]	<212> DNA
[0010]	<213> Artificial
[0011]	<400> 1
[0012]	tctctcaggg gtaaaaggct taaaaagcaa agattaaaag aaagattact ttctagtaga 60
[0013]	aagtttctat tgttaccgcc atcgacaaca acaaaaatta tgtggccaag ttgggccaag 120
[0014]	tcttgggttt gactctggtt agtgggccca ttactttgtg tatgtgaatg tgatggtttt 180
[0015]	aacttttaac tagcactctt ctatgataaa aatcctttga tgctccttat tgtataatat 240
[0016]	gtgttcgagt ttacagaggt gagtatcgcg gcttgtaata gttatgtagg tttggtggcc 300
[0017]	aaatcaaaact ccttaaggag ttagacatta caaaaagcaa ggaacggaag caataaagaa 360
[0018]	actcaatctc taaatagcca tcaaaattga ttagatgaag tcaattttgt aaacaacgtc 420
[0019]	taggtgacta gaaagctaag aattaaatga atcggtagct tgaattttgg tgagataaca 480
[0020]	tatgttgctc tctcgccata gttcataatt aaatgggtgat catatatagg tctggtctca 540
[0021]	agcctacgcc agtaaaggac ataaagccaa gcatgggaag gtggcacagc tagcaccttc 600
[0022]	agtaatgcac gttaatagac ttttggttat attttaggag tattatttac aagtattaat 660
[0023]	gaatgtaagt aaatgatatt ttatattttc tatacaactt caaaataagt ttggatttta 720
[0024]	tatttctttg aacaaaaaac aattctgaaa ctatttcaca taatatgatg tttattcccc 780
[0025]	taatactttc acatttagcc tcatttagag gaatctatct aaccttacca aactaataag 840
[0026]	gaaaaaaaac tgtaaaaaac attgaaatga ggaatcacac atggatttcc attctgtaat 900
[0027]	cttgtaactt ggattctcca ctataatttg tagtacacta tcttttgcca aacatacatc 960
[0028]	tatctttttg caaaggcttg acaaaaatag tttaaagcat attgtataac gtatgcctgc 1020
[0029]	ctaaaaccgt gaccatcgca acaagtctc ttttttcct attttttta actcaaacgt 1080
[0030]	ttcttcagtc tcagtatgtt attattttaa actcttttga atatgtaaat agaaaattct 1140
[0031]	tggaatagata tactagttta atttgtagtc tctgaaatga tttaagtaaa tagaaattct 1200
[0032]	taaatgtttt accaaagtta atgaaactgc aaaactagaa tggaacattg agatttgaga 1260
[0033]	gaataggaat cagaaagaag cagcctacca cagaactatg gaatttacat tattgtcata 1320
[0034]	ctgtatatga ggattcttta cacaaccata atacactaat gtcaacatta ataaaggaat 1380
[0035]	ttacatttat tacgataatt tattcaaaga ttctttacac aacaaatatt aatttcggaa 1440
[0036]	agcatattat catggcaagg aagttaatta aaccaccaa tgatctttaa ccacacttc 1500
[0037]	taacacattt gcctatataa agcaaccaca tctctcatct tctttcacc tcagatcatt 1560
[0038]	atcatctcca cataggaaaa aaaaaactct cctctctttg actaattaac aaagtatata 1620
[0039]	aatcgaatcg aaccaaacta aaccggtccg gtaattgtct tctgtccctc ggctacctct 1680
[0040]	gtcttctcct ccggtattct tcttctcctg tcttcttcac atacatctca atgacctctc 1740
[0041]	tgtttttttt tcttctgaaa tgtctgtttt tttatgagag aactcaaaac tcatttctct 1800

[0042] ttttcgccaa gtgtagagtg aacctaacga aaacgttttc aaacatcttg ttatagacat 1860
[0043] atcttcgaca cgttacgtgc atttcccaa gacattattg ctatcttaca tcaactgcca 1920
[0044] cgaaatagtg ttcagacat aaacacaaac ccacaagtaa cattctcaca gtttttggtt 1980
[0045] tcgttctttg gcagattcgt aagcagaaat ggcgtccaag aacgataaga 2030
[0046] <210> 2
[0047] <211> 22
[0048] <212> DNA
[0049] <213> Artificial
[0050] <400> 2
[0051] tctctcaggg gtaaaaggct ta 22
[0052] <210> 3
[0053] <211> 22
[0054] <212> DNA
[0055] <213> Artificial
[0056] <400> 3
[0057] tcttatcggt cttggacgcc at 22
[0058] <210> 4
[0059] <211> 44
[0060] <212> DNA
[0061] <213> Artificial
[0062] <400> 4
[0063] gccctttcgt cttcaagaat tctctctcag gggtaaaagg ctta 44
[0064] <210> 5
[0065] <211> 42
[0066] <212> DNA
[0067] <213> Artificial
[0068] <400> 5
[0069] ggggatcctc tagagtcgac tcttatcggt cttggacgcc at 42
[0070] <210> 6
[0071] <211> 20
[0072] <212> DNA
[0073] <213> Artificial
[0074] <400> 6
[0075] ctctttttcg ccaagtgtag 20
[0076] <210> 7
[0077] <211> 20
[0078] <212> DNA
[0079] <213> Artificial
[0080] <400> 7
[0081] ctgccaacc tttcggtata 20

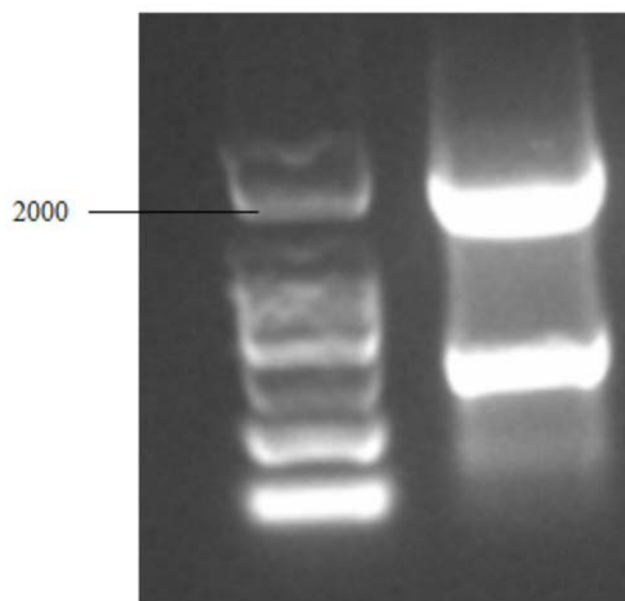


图1

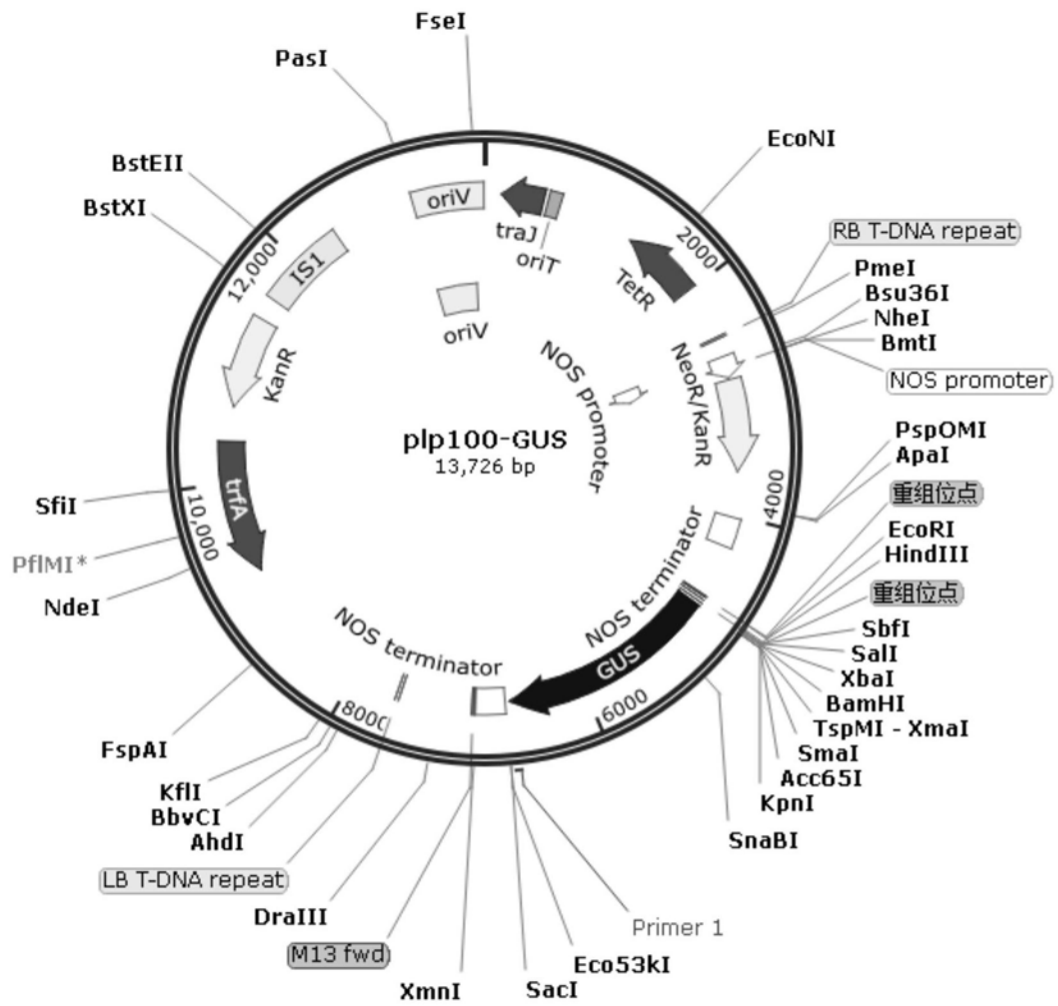


图2

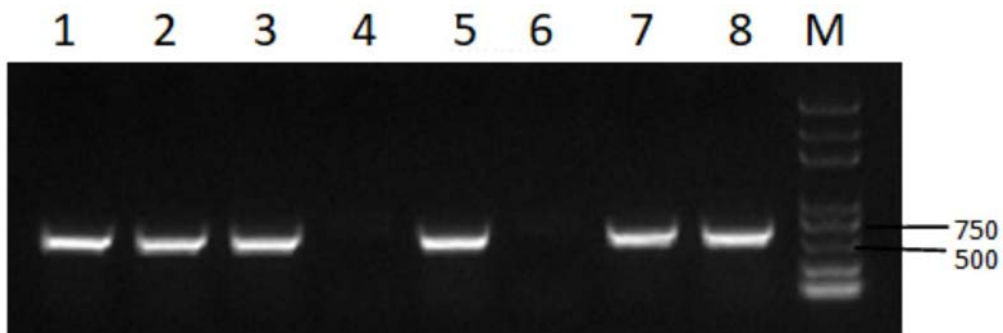


图3

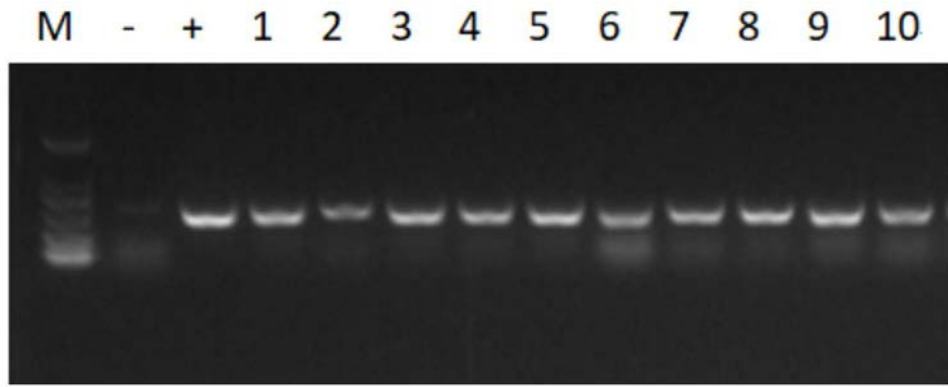


图4

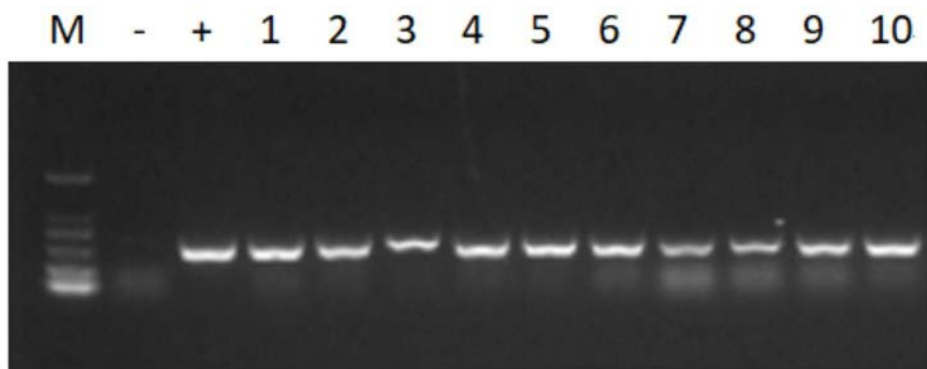


图5

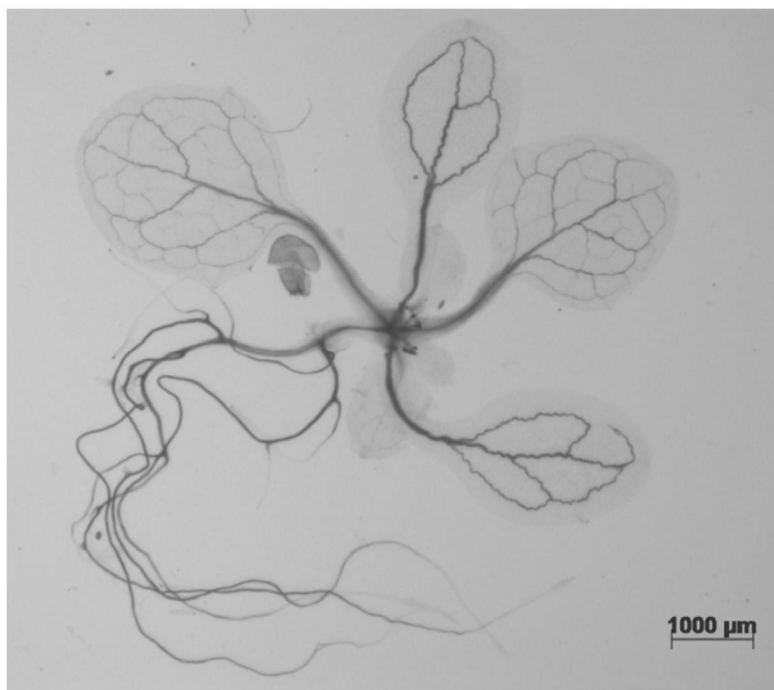


图6