



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 106957843 B

(45)授权公告日 2019.08.02

(21)申请号 201610011284.3

C12N 15/82(2006.01)

(22)申请日 2016.01.08

A01H 5/02(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 106957843 A

(56)对比文件

(43)申请公布日 2017.07.18

KR 20060006150 A,2006.01.19,

WO 2008128293 A1,2008.10.30,

(73)专利权人 中国科学院植物研究所

CN 104946648 A,2015.09.30,

地址 100093 北京市海淀区香山南辛村20

CN 102286486 A,2011.12.21,

号中国科学院植物研究所

审查员 程珂

(72)发明人 林荣呈 李家龙 唐为江

(74)专利代理机构 北京纪凯知识产权代理有限公司

11245

代理人 关畅 白艳

(51)Int.Cl.

C12N 15/113(2010.01)

C12N 15/11(2006.01)

权利要求书1页 说明书4页

序列表3页 附图1页

(54)发明名称

一种植物花粉特异表达的启动子P-PPP1及其应用

(57)摘要

本发明公开了一种植物花粉特异表达的启动子P-PPP1及其应用。本发明从拟南芥中克隆得到花粉特异表达的启动子P-PPP1,构建了P-PPP1驱动GUS基因转基因植物,并且通过RT-qPCR检测其表达模式。通过实验证明:P-PPP1可以驱动GUS在花粉中特异性高表达,且RT-qPCR检测其在花粉中有高的表达量,在其他组织中基本无表达,说明P-PPP1是一个花粉特异性的启动子。因此在研究特定基因在花粉发育过程中的功能时,可以通过P-PPP1驱动其在花粉中特异性表达或沉默,进而研究该基因在花粉发育中的具体作用。

1. DNA片段,为序列表的序列1所示的DNA分子。
2. 与权利要求1所述的DNA片段相关的生物材料,为下述A1)至A7)中的任一种:
 - A1) 含有权利要求1所述的DNA分子的表达盒;
 - A2) 含有权利要求1所述的DNA分子的重组载体;
 - A3) 含有A1)所述表达盒的重组载体;
 - A4) 含有权利要求1所述的DNA分子的重组微生物;
 - A5) 含有A1)所述表达盒的重组微生物;
 - A6) 含有A2)所述重组载体的重组微生物;
 - A7) 含有A3)所述重组载体的重组微生物。
3. 扩增权利要求1所述的DNA片段的引物对。
4. 根据权利要求3所述的引物对,其特征在于:所述引物对中的一条引物的序列为序列2,另一条引物的序列为序列3。
5. 权利要求1所述的DNA片段在使目的基因在植物组织中的表达中的应用;所述植物组织为植物生殖器官;所述植物生殖器官为花粉;所述植物为双子叶植物。
6. 权利要求1所述的DNA片段在植物的遗传育种中的应用;所述植物为双子叶植物。

一种植物花粉特异表达的启动子P-PPP1及其应用

技术领域

[0001] 本发明属于生物技术领域,具体涉及一种植物花粉特异表达的启动子P-PPP1及其应用。

背景技术

[0002] 启动子是位于结构基因5'上游区直接与转录因子及RNA聚合酶结合的DNA序列,决定基因表达的起始时间、表达部位以及表达程度。根据启动子驱动基因表达的模式可将启动子分为三类:组成型启动子,组织特异性启动子和诱导型启动子。组成型启动子能够使基因在几乎所有的组织中都启动表达;在组织特异性启动子调控下的基因一般只在某些特定组织中表达;诱导型启动子只有在诱导因子的作用下才具有起始转录的活性。在转基因操作过程中,可以根据不同的需要选择不同类型的启动子驱动基因的表达。

[0003] 因为组织特异性启动子只在某些特定的组织器官中表达,所以可以通过其实现在植物体内对外源基因表达进行定时定量的精确调控。

[0004] 花粉作为植物的雄配子,在植物完成世代交替中起着十分重要的作用,在农业生产中花粉是否正常发育直接影响到农作物的产量,另外对花粉发育过程的研究有助于了解细胞分化发育的机制。在对花粉进行分子生物学的研究过程中,可以通过花粉特异启动子驱动基因过表达或是基因沉默,有针对性的研究基因在花粉发育过程中的作用。

发明内容

[0005] 本发明的第一个目的是提供一种DNA片段。

[0006] 本发明提供的DNA片段为如下1)-3)中任一所述的DNA分子:

[0007] 1) 序列表的序列1所示的DNA分子;

[0008] 2) 在严格条件下与1)所述DNA序列杂交且具有启动子功能的DNA分子;

[0009] 3) 与1)中所述DNA序列具有90%以上同源性,且具有启动子功能的DNA分子。

[0010] 本发明的第二个目的是提供与上述DNA片段相关的生物材料。

[0011] 本发明提供的与上述DNA片段相关的生物材料为下述A1)至A11)中的任一种:

[0012] A1) 含有上述DNA分子的表达盒;

[0013] A2) 含有上述DNA分子的重组载体;

[0014] A3) 含有A1)所述表达盒的重组载体;

[0015] A4) 含有上述DNA分子的重组微生物;

[0016] A5) 含有A1)所述表达盒的重组微生物;

[0017] A6) 含有A2)所述重组载体的重组微生物;

[0018] A7) 含有A3)所述重组载体的重组微生物;

[0019] A8) 含有上述DNA分子的转基因植物细胞系;

[0020] A9) 含有A1)所述表达盒的转基因植物细胞系;

[0021] A10) 含有A2)所述重组载体的转基因植物细胞系;

- [0022] A11) 含有A3) 所述重组载体的转基因植物细胞系。
- [0023] 本发明的第三个目的是提供扩增上述DNA片段的引物对。
- [0024] 本发明提供的扩增上述DNA片段的引物对中的一条引物的序列为序列2, 另一条引物的序列为序列3。
- [0025] 本发明的第四个目的是提供上述DNA片段的新用途。
- [0026] 本发明提供了上述DNA片段在使目的基因在植物组织中的表达中的应用。
- [0027] 上述应用中, 所述植物组织为植物生殖器官。
- [0028] 上述应用中, 所述植物生殖器官为花粉, 所述花粉为成熟花粉和/或萌发花粉。
- [0029] 上述应用中, 所述基因为GUS基因。
- [0030] 本发明还提供了上述DNA片段在植物的遗传育种中的应用。
- [0031] 上述应用中, 所述植物为单子叶植物或双子叶植物, 所述双子叶植物具体为拟南芥(哥伦比亚生态型)。
- [0032] 本发明从拟南芥中克隆得到花粉特异表达的启动子P-PPP1, 构建了P-PPP1驱动的GUS基因转基因植物, 并且通过RT-qPCR检测其表达模式。通过实验证明: P-PPP1可以驱动GUS在花粉中特异性高表达, 且RT-qPCR检测其在花粉中有高的表达量, 在其他组织中基本无表达, 说明P-PPP1是一个花粉特异性的启动子。因此在研究特定基因在花粉发育过程中的功能时, 可以通过P-PPP1驱动其在花粉中特异性表达或沉默, 进而研究该基因在花粉发育中的具体作用。

附图说明

- [0033] 图1为PPP1表达模式。
- [0034] 图2为GUS染色结果。图2A: 双核期花粉; 图2B: 成熟花粉; 图2C: 萌发花粉; 图2D: 花)。

具体实施方式

- [0035] 下述实施例中所使用的实验方法如无特殊说明, 均为常规方法。
- [0036] 下述实施例中所用的材料、试剂等, 如无特殊说明, 均可从商业途径得到。
- [0037] 下述实施例中的pBI101载体是Clontech公司的产品。
- [0038] 实施例1、PPP1启动子的获得
- [0039] 一、RT-qPCR检测PPP1的表达特异性
- [0040] 通过RT-qPCR检测PPP1在野生型拟南芥(哥伦比亚生态型)的不同组织部位(种子、根、茎、莲座叶、茎生叶、花芽、花、雌蕊、雄蕊、角果)的表达情况。具体步骤如下:
- [0041] 分别提取野生型拟南芥(哥伦比亚生态型)的种子、根、茎、莲座叶、茎生叶、花芽、花、雌蕊、雄蕊、角果的RNA, 反转录成cDNA。以获得的cDNA为模板, 采用AGATGGGAACCGAAATTATCAGG和AACTTTAGCCGAGAAGTCTCC进行RT-qPCR, 检测不同组织部位的PPP1的表达情况。
- [0042] PPP1在拟南芥的不同组织部位(种子、根、茎、莲座叶、茎生叶、花芽、花、雌蕊、雄蕊、角果)的表达情况如图1所示: 从图中可以看出, PPP1在雄蕊中表达量最高, 其他组织部位中表达量非常低。可见, PPP1具有花药中特异表达的性质。

[0043] 二、启动子的获得

[0044] 以野生型拟南芥(哥伦比亚生态型)的基因组DNA为模板,采用引物:5'-AAGCTTGGTCCTTTGCAATTCACAAGG-3'(序列2)和5'-GGATCCAGGCCTGATAATTCGGTTCC-3'(序列3)进行PCR扩增,得到PCR扩增产物,即为PPP1启动子。

[0045] 对PCR扩增产物进行1%琼脂糖凝胶电泳检测,回收并纯化PCR扩增产物。并对其进行测序。

[0046] 测序结果表明:PCR扩增得到大小为2194bp的PPP1的启动子区域,其核苷酸序列如序列表中序列1所示,将序列1所示的基因命名为P-PPP1。

[0047] 实施例2、转P-PPP1拟南芥的获得及其GUS染色分析

[0048] 一、转P-PPP1启动子拟南芥的获得

[0049] 1、重组载体pBI101-PPP1:GUS的构建

[0050] (1) P-PPP1的获得

[0051] 以野生型拟南芥(哥伦比亚生态型)的基因组DNA为模板,采用引物:5'-AAGCTTGGTCCTTTGCAATTCACAAGG-3'(序列2)和5'-GGATCCAGGCCTGATAATTCGGTTCC-3'(序列3)进行PCR扩增,得到PCR扩增产物,即为P-PPP1。

[0052] (2) 回收步骤(1)获得的PCR扩增产物,连接至pEASY-blunt(Transgene),得到含有P-PPP1的pEASY-blunt载体。

[0053] (3) 用HindⅢ和BamHI双酶切含有P-PPP1的pEASY-blunt载体,回收P-PPP1,用HindⅢ和BamHI双酶切pBI101-GUS载体,回收载体大片段,连接,得到重组载体pBI101-PPP1:GUS。

[0054] 对重组载体pBI101-PPP1:GUS进行测序验证,结果表明:重组载体pBI101-PPP1:GUS为将序列表中序列1所示的P-PPP1替换pBI101-GUS载体的HindⅢ和BamHI的酶切位点间的DNA片段,且保持pBI101-GUS载体的其他序列不变得到的载体。

[0055] 2、重组菌的获得

[0056] 将重组载体pBI101-PPP1:GUS通过电击转化法,转入农杆菌GV3101,得到重组菌pBI101-PPP1:GUS/GV3101。

[0057] 将pBI101-GUS载体转入农杆菌GV3101,得到重组菌pBI101-GUS/GV3101。

[0058] 3、转基因植株的获得

[0059] 采用浸花法分别将步骤2获得的重组菌pBI101-PPP1:GUS/GV3101和重组菌pBI101-GUS/GV3101转化拟南芥(哥伦比亚生态型),并在含有25mg/L卡那霉素的MS培养基上筛选,分别得到转P-PPP1拟南芥和转空载体拟南芥。

[0060] 二、转P-PPP1拟南芥的GUS染色分析

[0061] 1、GUS染色

[0062] 对步骤一获得的转P-PPP1拟南芥植株和转空载体拟南芥植株的双核期花粉、成熟花粉、萌发花粉和花进行GUS染色。具体步骤如下:分别将新鲜的转P-PPP1拟南芥植株和转空载体拟南芥植株的双核期花粉、成熟花粉、萌发花粉和花置于离心管中,然后加入X-Gluc染色液,抽真空15min,置于37℃过夜染色,分别得到染色后的材料,并将染色后将材料分别依次置于70%,80%,90%的乙醇溶液中进行梯度脱色。

[0063] 2、染色结果

[0064] 染色结果如图2所示:通过GUS染色发现,GUS在花药中有很强的表达,柱头上也有微弱的表达;就单个花粉而言,早期仅在花粉壁中有较弱的表达(图2A),而整个成熟花粉中表达加强(图2B),并且一直持续到花粉萌发(图2C),而在花粉发育早期没有启动表达,转空载体拟南芥植株的GUS基因在任何时期均无表达。

[0065] 以上结果均表明,P-PPP1 (PPP1启动子)可以驱动目的基因如GUS报告基因在植物花粉中特异表达。

[0001]

序列表

<110> 中国科学院植物研究所

<120> 一种植物花粉特异表达启动子 PPP1 及其应用

<160> 3

<210> 1

<211> 2194bp

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 1

| | |
|--|-----|
| ggtcctttgc aattcacaag gaaaggtttg tctgttggaa gcacagccgc atgettaacc | 60 |
| tttattgtaa gtcggttttt cgacttccgc ggtttaccta tttcctttct tgattagatc | 120 |
| acttaatgga acatttgggtt tttggtcaca gatcttccaa agtgctagta tttgccttgc | 180 |
| aacaacaaca ccagagcaac ttgcactage tctacgttgg ttcttgttcc cattgacata | 240 |
| tattggtggt ccagtcagtg aaattatcct cacgctactg ctttactga gattcattaa | 300 |
| tttggttttc gatgaggtaa cgactgttca cttatctgct ttaatattat caatcagcct | 360 |
| agttattcca agtcctaaac cacataatgg tacgttgtgc atatgttaca ttgtaggtcc | 420 |
| gaagtgtttc actgggaatt gtatcgcgaa gagtaaactg gcagcagctt actgttctgg | 480 |
| agacacttga tagtaagaat ctaaaagttt cttctctctt tctatataca tctcatetta | 540 |
| caagtgatcg ctttttgtag ttttcgcgtc attcatacgc cgcattctca agaatatatt | 600 |
| tcgtcatgcc gaacaaatat cacaggtcaa atagatttca cttattatca tctcattgat | 660 |

[0002]

| | |
|--|------|
| ttgagaatca aataagaatt ctctgttgaa gaagtttgta atttatgtgc atgcaggcca | 720 |
| tgattgtag aggcttcaga ggagagagca gtagccacaa gatctacttc ttctctggct | 780 |
| cttcgaataa gtttgcagat tttgcatcag ttttgtgttt aatcggtgta atctcaaccg | 840 |
| cactcttgte tgaatacttt cttgtctaata attgattcat actaatcttt attcgageta | 900 |
| aacttgaac ataattcaga agaaaagatg atcttgaggt agaactctta tcatgatcat | 960 |
| ccaaatgttg tatgtgataa atttcttccc caatgtgtaa gatttcgttg ggggtccggt | 1020 |
| tagggtaaca caatacaact ttgttatgct cgccgaccaa gaaactcadc ccatcagcaa | 1080 |
| acatattcca actcggatta atggtttgca ctgttgagaa cttgctccat gagatgactg | 1140 |
| aatccatact agttgtcacc catacattta agtcttgtga atgtgtttca tcattataat | 1200 |
| aacctaacac taacagacaa agttttctat ttttgcacga agaaattata cctaatgaaa | 1260 |
| caaataccct ttagaaaaag tgtaagaaat tgccacattt cttctttcaa attacgtcaa | 1320 |
| aaatacaate tatacttaaa gagttaagaa agatgatccc aagccaacca agggcgtgat | 1380 |
| ctcttcaate tcaactgata aagtctggta cacccttgtg tgatttgata tggttttcgt | 1440 |
| gtccagaaga gacaaaggca gacgaaaaca gtgtctcaca tctttttcta gaaaataacg | 1500 |
| ggccaatgct ttccaagcc actcgtgctt gcttctataa acaacatcaa tcttgaattc | 1560 |
| taccaaaaac actcaaaacta tatttcggca atatagtttc ttgcattgga agcaatcact | 1620 |
| tgtttccate atcacagctt gaaaaagatt tgcattgga attagttcat atttacagtt | 1680 |
| ctcatttaaa acatgtcaat atatgtagtc caatgcttgt ttgattaate ccatagagca | 1740 |
| acattacatt aattcagcaa aaattagatt tgtggaaaat caaatttaaa aatggaaaaa | 1800 |
| cggacagga aacaaactaa attaaacaaa aagaaaaata gaattatgtg tttaggttac | 1860 |
| agatgcatcg ttacaggagaa acgaagctct gacagagaag ccattttctc catttttgc | 1920 |
| atctcttcta atttcttcta tttattccag tattccatta accagcaaaa aaactcataa | 1980 |
| attagattat ttgtagattt taaccaattt acaaaaattt cgagcaggaa tcgaagaaaa | 2040 |

[0003]

ggactatttg acccttttct tcttcctcct ccttcatttc taccaccacg atttcttctt 2100

tatttattag ccgccgaagg gaattcctcc ggcgccattt ttataattt ttttgttttt 2160

atcttttagag atgggaaccg aaattatcag gcct 2194

<210> 2

<211> 27bp

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 2

aagcttggtc ctttgcaatt cacaagg 27

<210> 3

<211> 27bp

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223>

<400> 3

ggatccaggc ctgataattt cggttcc 27

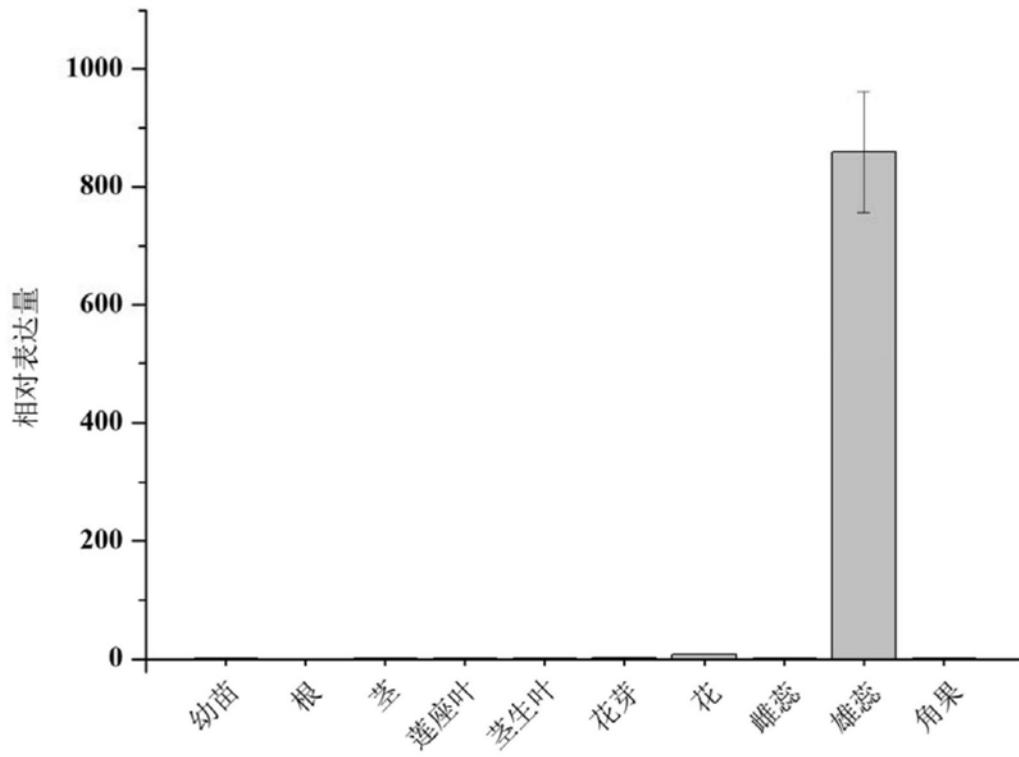


图1



图2