

Code No. 3264/3265/3266/3267

研究用

TaKaRa

pRI 201 DNA Series

(High-expression vectors for plant cell transformation)

说明书

目 录

内 容	页 码
● 制品说明	1
● 制品内容	1
● 保 存	1
● 载体图谱和多克隆位点	1
● 使用方法	4
● 实验例	5
● 参考文献	8
● 关联产品	8

● 制品说明

pRI 201 DNA 系列载体是用于植物转化、能够高效表达目的基因的载体。这一系列的载体是以 pRI 101 系列载体 (Code No. 3262/3263) 为骨架构建¹⁾, 在花椰菜花叶病毒(CaMV)的 35S 启动子下游有 ADH (乙醇脱氢酶) 基因的 5' 非编码区 (5' -UTR), 该区域具有翻译增强子的作用。此外, 使用热激蛋白 (HSP) 的终止子取代了胭脂碱合成酶的终止子 (NOS), 与 pRI 101 系列载体相比, 目的基因可以获得更高效的表达²⁾。另外, 在 HSP 终止子下游有 MCS2, 在这里插入表达框 (启动子+增强子+目的基因+终止子), 可以在一个载体上同时表达多个基因。

pRI 201 DNA 系列载体分为两种类型: pRI 201-AN DNA 和 pRI 201-ON DNA, pRI 201-AN DNA 具有拟南芥 ADH 基因由来的 5' UTR (AtADH 5' -UTR), 适用于双子叶植物; pRI 201-ON DNA 具有水稻 ADH 基因由来的 5' -UTR (OsADH 5' -UTR), 适用于单子叶植物。阳性对照载体(pRI 201-AN-GUS DNA 和 pRI 201-ON-GUS DNA)包含有 β -葡萄糖苷酸酶(GUS)基因。

pRI 201 DNA 是用于植物转化的双元载体, 具有发根农杆菌的 Ri 质粒的突变型复制起点 (Ri ori), 这些载体同时还具有和 pUC 系列载体相同的复制起点(ColE1 ori), 因此, 在 *E.coli* 中是一种高拷贝质粒。利用本系列载体, 可以通过选择标记 (NPT II) 整合目的基因到植物染色体上, 并保持稳定, 因为克隆位点相对于植物筛选标记基因, 位置更靠近 T-DNA Right Border (RB)的位置。

* 此类制品由 Takara Bio Inc.研制, Nara Institute Science and Technology 提供样品与支持。

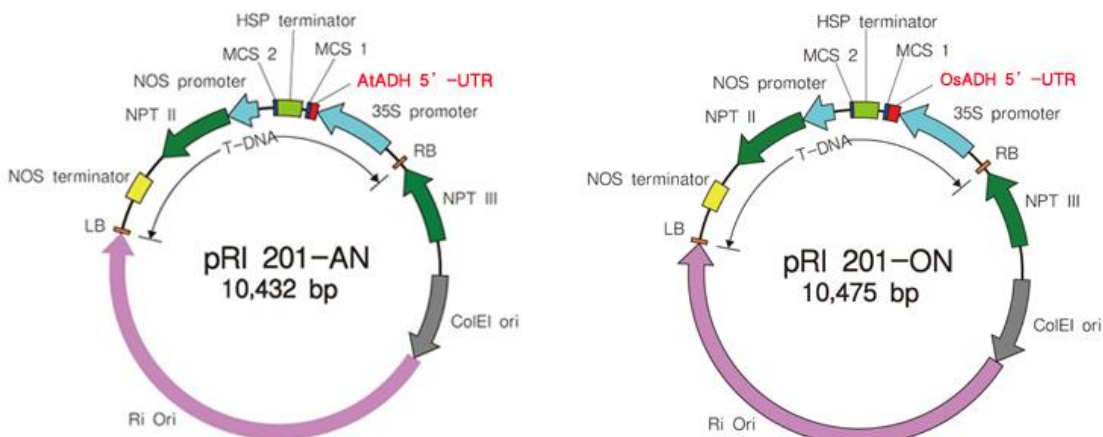
● 制品内容

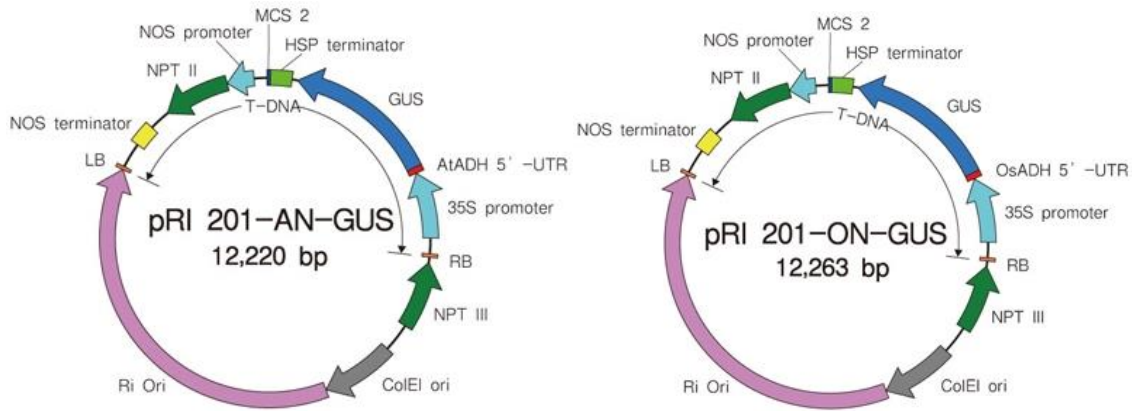
pRI 201-AN DNA (Code No. 3264)	10 μ g (0.5 μ g/ μ l)
pRI 201-ON DNA (Code No. 3265)	10 μ g (0.5 μ g/ μ l)
pRI 201-AN-GUS DNA (Code No. 3266)	10 μ g (0.5 μ g/ μ l)
pRI 201-ON-GUS DNA (Code No. 3267)	10 μ g (0.5 μ g/ μ l)

● 保 存: -20°C。

注意: 自收到之日起, 适当条件下保存, 两年内有效。

● 载体图谱和多克隆位点





ColE1 ori: *E. coli* 的复制起点

Ri ori: *Rhizobium (Agrobacterium)* 的复制起点

RB, LB: T-DNA 的侧翼序列

NOS-promoter, NOS-terminator: 植物选择标记基因表达的启动子和终止子

HSP terminator: 在植物中, 外源基因表达的终止子

GUS: 大肠杆菌 β - 葡萄糖苷酸酶基因

NPT II: 植物的选择标记基因

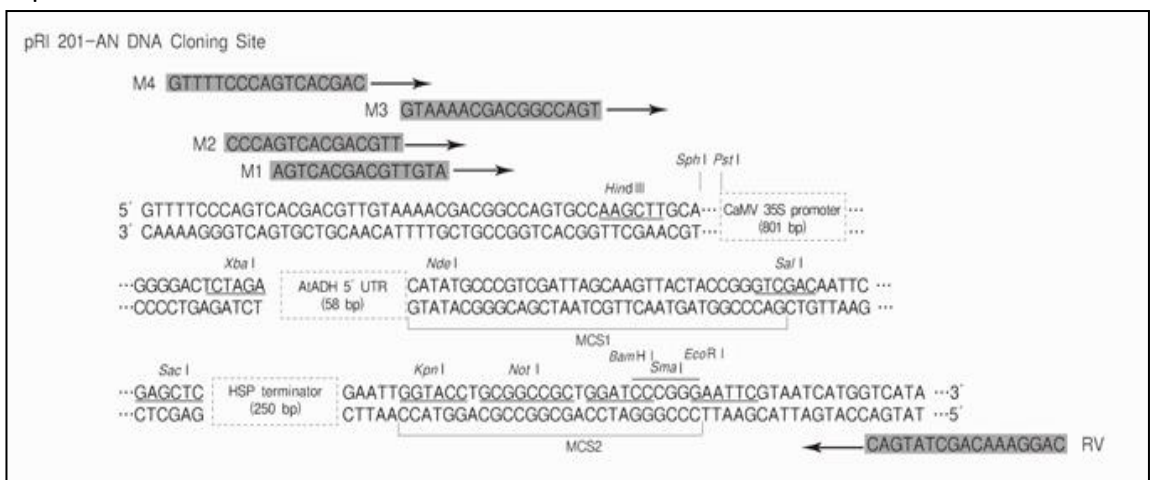
AtADH 5' -UTR 和 OsADH 5' -UTR: 翻译增强子区域

35S promoter: 植物中外源基因表达 promoter, 来源于 Cauliflower mosaic virus (CaMV)

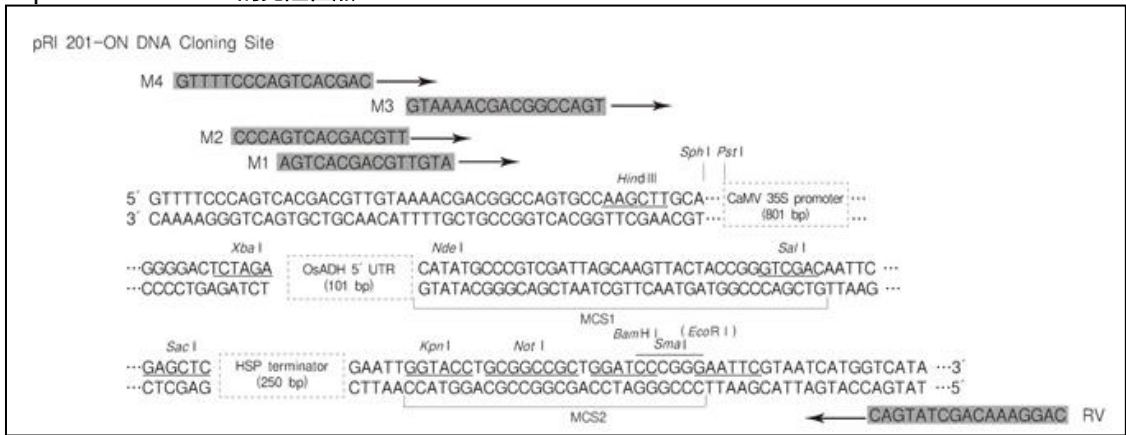
NPT III: *E. coli* 和 *Rhizobium (Agrobacterium)* 的选择标记基因 (卡那霉素抗性)

图 1. 载体图谱

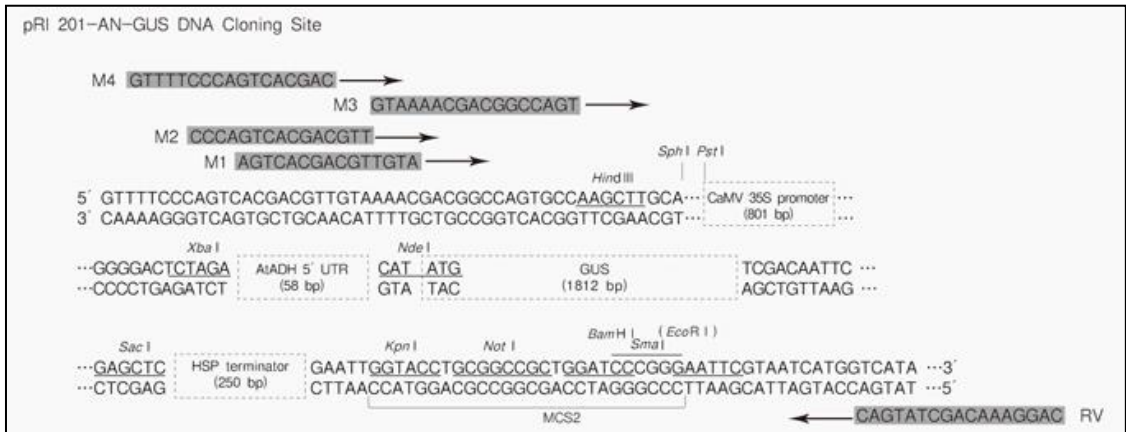
pRI 201-AN DNA 的克隆位点



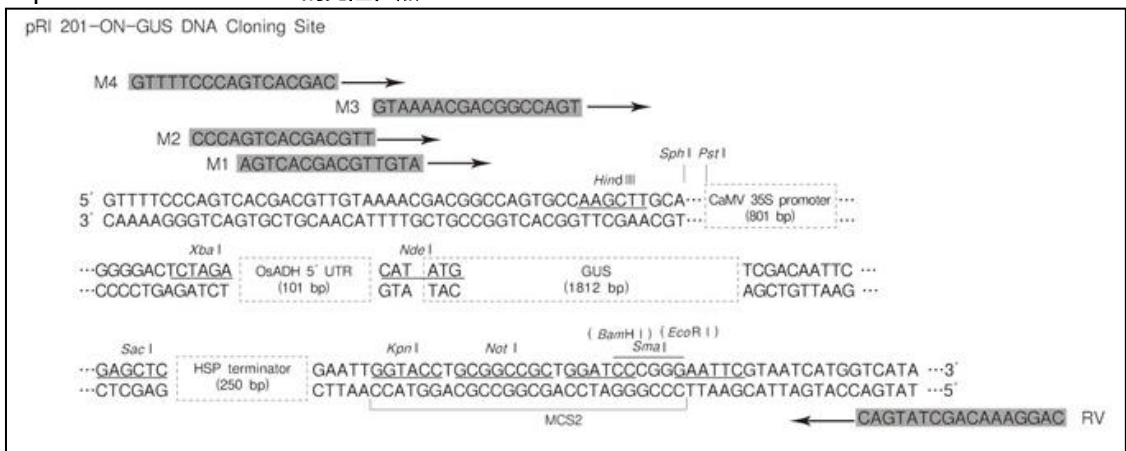
pRI 201-ON DNA 的克隆位点



pRI 201-AN-GUS DNA 的克隆位点



pRI 201-ON-GUS DNA 的克隆位点



注: OsADH 5' - UTR 内部含有 *EcoR* I 酶切位点, GUS 基因有一个 *BamH* I 位点

图 2. 多克隆位点

● 使用方法

1. 克隆目的基因到 pRI 201-AN 或 pRI 201-ON DNA 中

A. 克隆一个基因到 pRI 201-AN 或 pRI 201-ON DNA 中

- 1) 克隆编码目的蛋白质的 DNA 到 pRI 201-AN 或 pRI 201-ON DNA 的 MCS1 位点 (*Nde* I/*Sal* I), MCS1 位于翻译增强子 (AtADH 5' -UTR 或 OsADH 5' -UTR) 和 HSP 终止子之间。
- 2) 推荐使用 MCS1 的 *Nde* I 位点克隆目的基因, 因为增强子和起始密码子有时会影响翻译活性^{1,4,5}, 位于 *Nde* I 位点的 ATG 可以作为翻译起始位点。
- 3) 转化构建的载体到 *E. coli* 的感受态细胞中, 在含 50 μg/ml 卡那霉素的 LB 平板上筛选转化子。

<使用 In-Fusion HD Cloning Kit 的实验例>

In-Fusion HD Cloning Kit w/ Cloning Enhancer (Code No. 639633) 可以连接两个或两个以上的片段, 例如: 载体和插入片段, 只要它们的末端有相同的 15 个碱基。

- 1) 使用 *Nde* I 和 *Sal* I 酶切 pRI 201-AN DNA 或者 pRI 201-ON DNA, 然后纯化线性载体。
- 2) 通过 PCR 方法扩增目的基因的开放阅读框 (ORF)。

设计 PCR 用引物: 5' 端引物需要添加载体 *Nde* I 位点前的 15 个碱基, 3' 端引物需要添加载体 *Sal* I 位点后的 15 个碱基, 这样满足最终的 PCR 产物末端包含一段与载体同源的序列。

5' 端引物: **CACTGTTGATACATAT**GNNNNNNNNNNNNNNNNNN (pRI 201-AN 用)

5' 端引物: **GAGGGGGATTACATAT**GNNNNNNNNNNNNNNNNNN (pRI 201-ON 用)

3' 端引物: **ATTCAGAATTGTCG**NNNNNNNNNNNNNNNNNN

(加粗字体为载体序列, 加下划线的 ATG 序列为基因开放阅读框的起始点, N 表示插入片段的相应序列。)

- 3) 将 PCR 产物和线性载体进行 In-Fusion 反应后, 克隆到 *E. coli* 的感受态细胞中 (Stellar Competent Cells (Code No. 636763) 适用于 In-Fusion HD Cloning Kit)。在含有 50 μg/ml 卡那霉素的 LB 平板中筛选转化子。

B. 克隆两个基因到 pRI 201-AN 或 pRI 201-ON 中。

- 1) 克隆基因 A 的 ORF 至 pRI 201-AN 或 pRI 201-ON HSP 的 MCS1 位点 (*Nde* I/*Sal* I)。
- 2) 在 HSP 终止子下游的 MCS2 位点插入一个表达框 (promoter + enhancer + 基因 B + terminator)。
- 3) 转化构建的载体至 *E. coli* 的感受态细胞中, 在含 50 μg/ml 卡那霉素的 LB 平板上筛选转化子。

<使用 In-Fusion HD Cloning Kit 的实验例>

使用 In-Fusion HD Cloning Kit 可以连接两个或两个以上的片段, 例如载体和 Insert, 只要它们在各自的末端有相同的 15 个碱基。

- 1) 使用 A 方法将基因 A 克隆至 pRI 201-AN DNA 或 pRI 201-ON DNA HSP 的 MCS1 位点 (*Nde* I/*Sal* I)。
- 2) 使用基因 A 序列中没有的 MCS2 中的两种限制酶酶切上一步获得的载体。(例如: 使用 *Not* I 和 *Sma* I 酶切)。

3) 通过 PCR 方法获得表达框 (CaMV 35S promoter + AtADH (or

OsADH) + gene B + HSP terminator)。PCR 的 5' 端引物需要添加载体 *Not* I 位点前的 15 个碱基, 3' 端引物需要添加载体 *Sma* I 位点后的 15 个碱基。

- 4) 扩增的表达框和线性化的载体 (含有目的基因 A) 进行 In-Fusion 反应, 然后转化到 *E. coli* 感受态细胞中 (Stellar Competent Cells 适用于 In-Fusion HD Cloning Kit)。最后在含 50 μg/ml 的卡那霉素的 LB 平板上筛选转化子。

2. 转化构建好的质粒到农杆菌感受态细胞。

A. 转化构建好的载体 (含有目的基因 A 或基因 A 和 B) 到农杆菌感受态细胞 ((*Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 Electro-Cells, Code No. 9115)), 产生农杆菌的转化子。

B. 使用含卡那霉素 (50 μg/ml) 和链霉素 (100 μg/ml) 的 LB 平板筛选转化子 (对于植物原生质

体的瞬时表达，通过电穿孔或类似方法导入构建质粒)。

3. 使用 Agrobacterium 转化子进行植物转化。

● 实验例

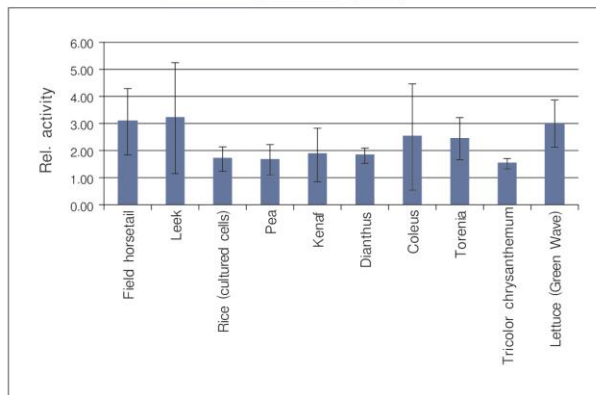
1. 利用基因瞬时表达比较 HSP 终止子和 NOS 终止子

- 制备多种植物的原生质体, 使用 PEG 法转化在 Rluc 基因下游携带 HSP 终止子或 NOS 终止子的 pRI909 DNA。pBI221 35S::Fluc::NOST 可以作为共转染的阳性对照。
- 质粒导入培养 6-7 小时, 然后破碎原生质体, 回收蛋白质, 并测定 Rluc 和 Fluc 的活性。以携带 NOS 终止子的质粒的 Rluc/Fluc 活性比值作为 1。
- 携带 HSP 终止子的质粒 Rluc/Fluc 的活性与携带 NOS 终止子的质粒作对比来获得相对活性比值。

Rluc plasmids



Fluc 用于转染效率均一化:

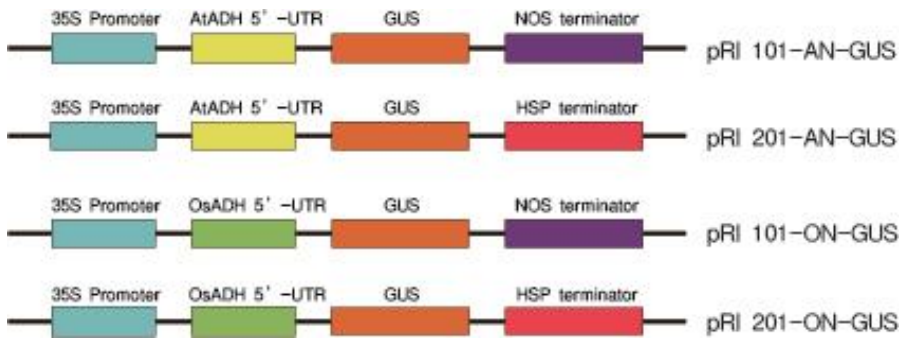


结果: 所有的植物检测中, 与携带 NOS 终止子的质粒相比, 携带 HSP 终止子的质粒表现出更高的表达活性。

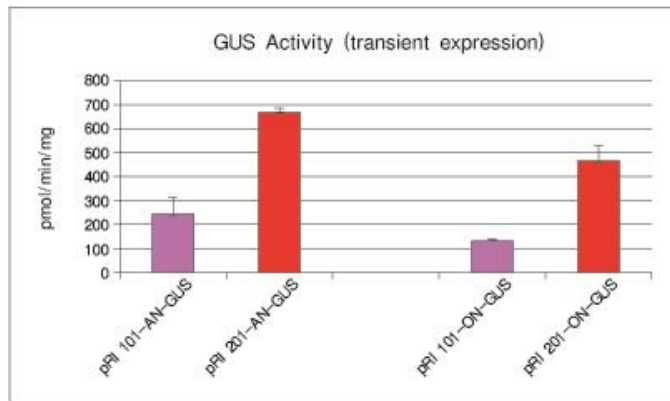
(奈良先端科学技术大学院大学生物科学研究科 植物代谢调节学讲座 加藤晃先生提供的数据)

2. 用植物培养细胞确认表达实验 (瞬时表达)

- 制备烟草培养细胞 (BY-2) 的原生质体, 用电穿孔法导入带有 β -glucuronidase (GUS) 基因的质粒 (pRI 101 载体和 pRI 201 载体)。
- 培养两天后, 破碎原生质体, 测定 GUS 的活性。GUS 是以 4-甲基伞形酮- β -D-葡萄糖醛酸苷 (4-MUG) 为底物, 水解其生成 4-甲基伞形酮 (4MU), 通过测定 4MU 的荧光强度作为 GUS 活性的指标。



GUS 活性 (瞬时表达)



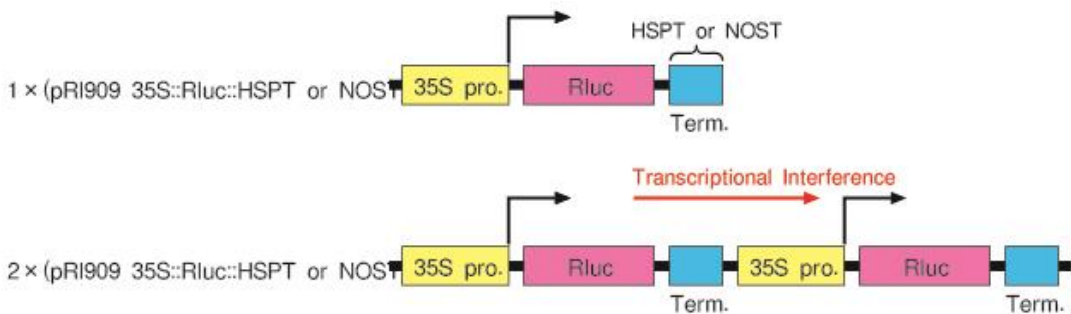
结果：带有 HSP terminator 的 pRI 201 系列比带有 NOS terminator 的 pRI 101 系列的 GUS 活性高 2-3 倍。在 BY-2 细胞（来源于双子叶烟草植物）中，AtADH 增强子的活性与 OsADH 增强子相同。

3. 对多重基因表达 HSP 终止子的评价 (瞬时表达)

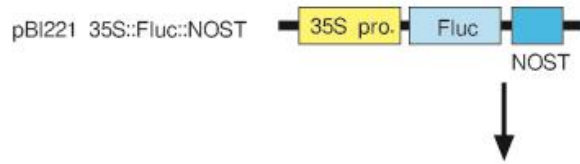
含有 35S promoter-Rluc-NOS terminator 和 35S promoter-Rluc-HSP terminator 构成的一个(1×)或者串联两个(2×)表达框的载体，导入烟草培养细胞 BY-2 和生菜细胞中。比较了 NOS 和 HSP 终止子对 Rluc 拷贝数的影响。

调整质粒量，保证 1× 和 2× 的表达框含有相同数量。基于 Fluc/Rluc 的相对表达水平来确定 1× 和 2× 的表达框的相对表达比率。

Rluc 质粒

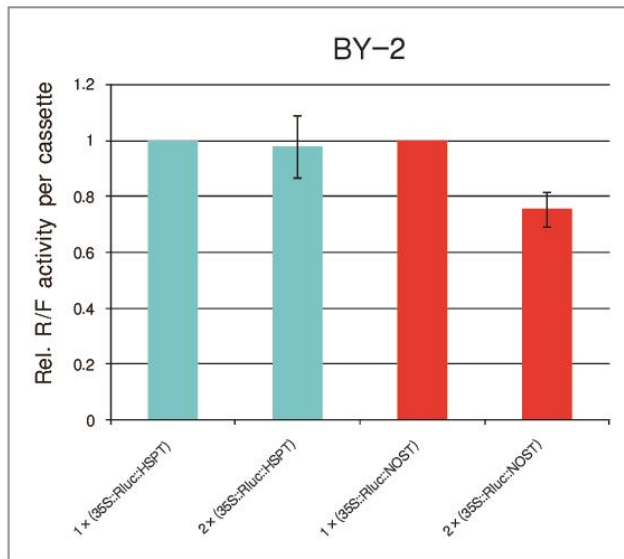


Fluc 用于转染效率均一化:

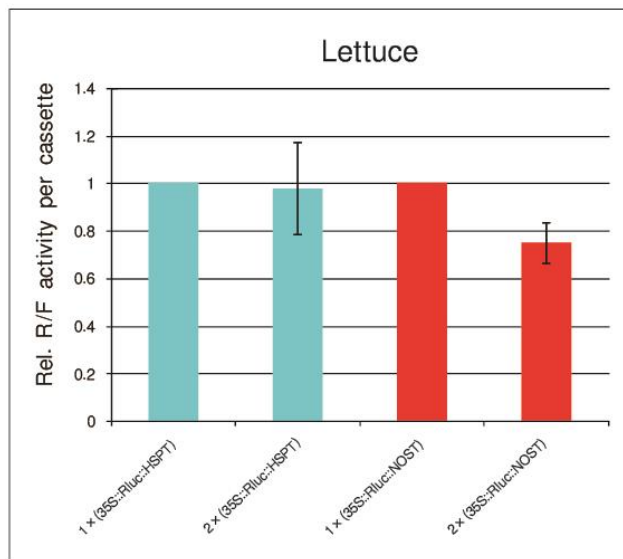


The amount of Rluc plasmid was adjusted so that the molar concentration of Rluc cassette was the same between 1 × and 2 × plasmids

BY-2



Lettuce



结果：携带 HSP 终止子的表达框，其 2×表达框的表达水平与 1×表达框的相差很小，表明其具备对两个基因整合成串联的表达框的协同表达能力。与此相反，携带 NOS 终止子的表达框，其 2×表达框的表达水平比 1×表达框的表达水平低，表明 NOS 终止子对转录有一定程度的干扰。

(奈良先端科学技术大学院大学生物科学研究科 植物代谢调节学讲座 加藤晃先生提供的数据)

● 参考文献

- 1) T Sugio, J Satoh, H Matsuura, A Shinmyo and K Kato. *J Bioscience and Bioengineering*. (2008) **105** (3): 300–302.
- 2) S Nagaya, K Kawamura, A Shinmyo and K Kato. *Plant and Cell Physiology* . (2010) **51** (2): 328–332.
- 3) R Nishiguchi, M Takanami, and A Oka. *Molecular and General Genetics* . (1987) **206**: 1–8.
- 4) J Satoh, K Kato and A Shinmyo. *J Bioscience and Bioengineering* . (2004) **98** (1): 1–8.
- 5) T Sugio, H Matsuura, T Matsui, M Matsunaga, T Nosho, S Kanaya, A Shinmyo and K Kato. *J Bioscience and Bioengineering* . (2010) **109** (2): 170–173.

● 关联产品

Agrobacterium tumefaciens LBA4404 Electro-Cells (Code No. 9115)

pRI 909 DNA (Code No. 3260)

pRI 910 DNA (Code No. 3261)

pRI 101-AN DNA (Code No. 3262)

pRI 101-ON DNA (Code No. 3263)

In-Fusion[®] HD Cloning Kit w/Cloning Enhancer (Code No. 639633 ~ 639635)

E. coli JM109 Competent Cells (Code No. 9052)

Stellar Competent Cells (Code No. 636763)

In-Fusion is a registered trademark of Takara Bio USA, Inc

注意

本产品仅供科学研究使用，不能用于人、动物的医疗或诊断程序，不能使用本产品作为食品、化妆品或家庭用品等。

未经Takara Bio Inc.书面许可授权或批准，不得制造、许诺销售、销售、进口Takara产品，或者使用Takara产品所有的相关专利及相关商标。

如果您需要其他用途的许可授权，请联络我们，或访问我们网站www.takara-bio.com。

您使用本产品必须遵守产品网页上适用的全部许可要求。阅读、了解并遵守此类声明的所有限制性条款是您的责任。

所有商标均属于各自商标所有者的财产。某些商标并未在全部行政区注册。

本文件由宝日医生物技术（北京）有限公司翻译制作，最新版本文件请参考 Takara Bio Inc.网站。为正确使用 Takara 产品，您应当掌握本产品的相关知识和使用说明。

技术咨询热线：

0411-87641685, 87641686

4006518761, 4006518769

TAKARA BIO INC.

URL: <https://www.takarabiomed.com.cn>

v202007Da