

Code No. 3262/3263

研究用

TAKARA

pRI 101 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	2
● 实验例	2
增强子功能确认（使用 pUC 系列载体瞬时表达确认）	2
转化子中目的蛋白质的表达确认（使用双元载体法）	3
● 参考文献	4
● 关联产品	4

● 制品说明

pRI 101 DNA 系列载体是用于植物转化、能够高效表达外源基因的双元载体。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, 在植物体内可以高效表达目的基因¹⁾。pRI 101-AN DNA 具有拟南芥 ADH 基因由来的 5' UTR (AtADH 5' -UTR), 应用于双子叶植物如烟草和拟南芥; pRI 101-ON DNA 具有水稻 ADH 基因由来的 5' -UTR (OsADH 5' -UTR), 应用于单子叶植物如水稻。

pRI 101 DNA 是穿梭载体, 可以在 *E.coli* 和 *Rhizobium (Agrobacterium)* 中进行自主复制。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; 同时具有发根土壤杆菌的 Ri 质粒的突变型复制起点 (Ri ori)²⁾, 可以稳定存在于 *Rhizobium (Agrobacterium)* 中。利用本系列载体, 可以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 101-AN DNA (Code No. 3262)	10 μg
pRI 101-ON DNA (Code No. 3263)	10 μg

- Concentration 0.5 μg/μl
- Form 10 mM Tris-HCl, pH8.0
1 mM EDTA

● 保存: -20°C。

● 载体图谱和多克隆位点

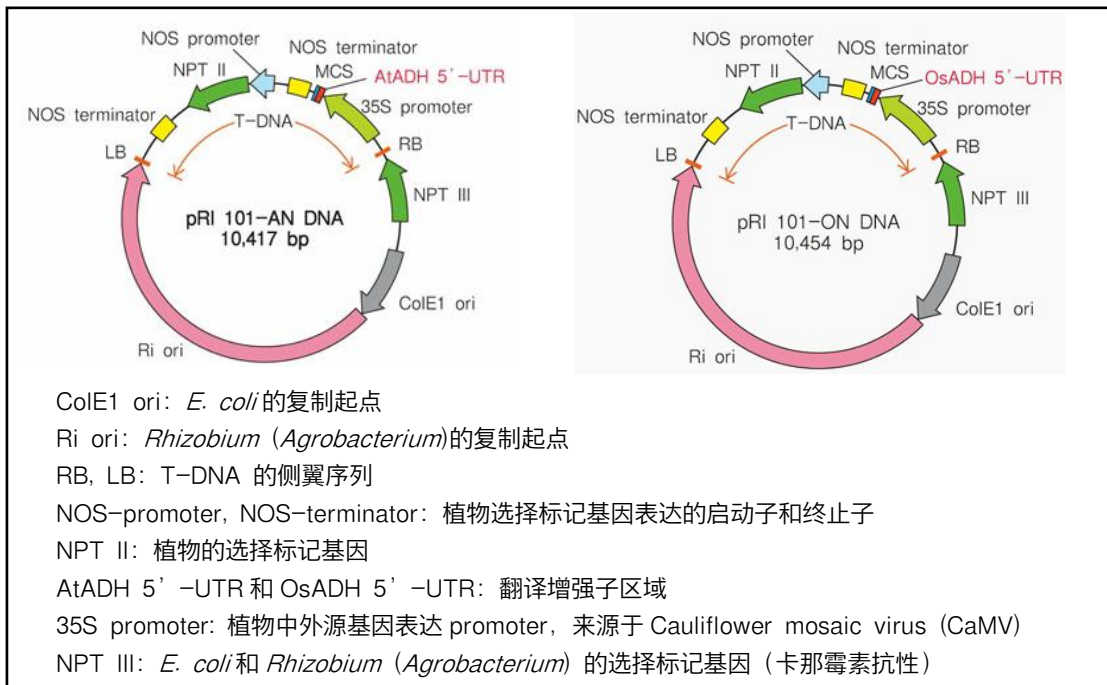
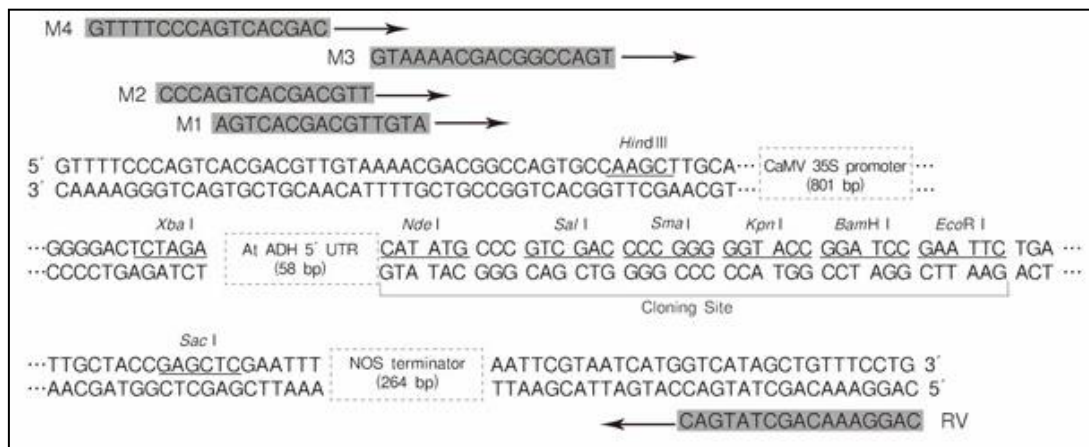
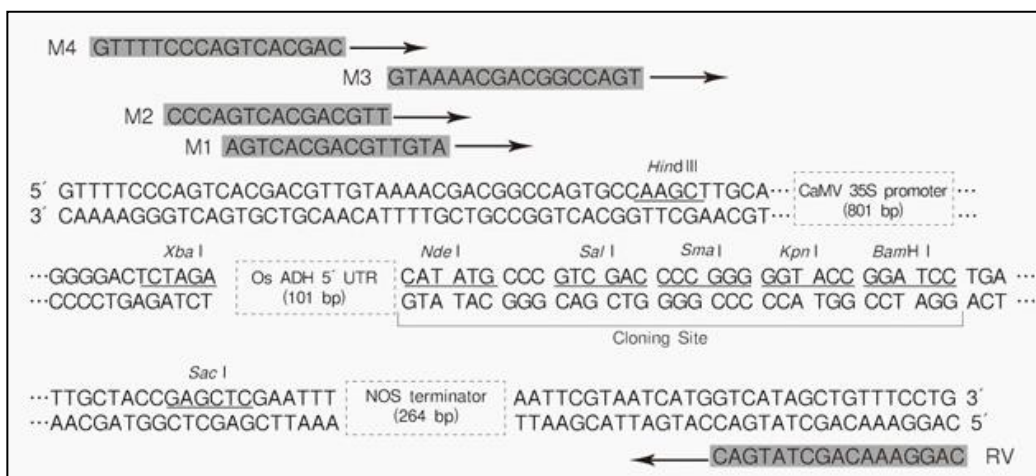


图 1. 载体图谱

pRI 101-AN DNA



pRI 101-ON DNA



注：OsADH 5' - UTR 内部含有 *EcoR* I 酶切位点

图 2. 多克隆位点

● 使用方法

1. 在翻译增强子区域 (AtADH 5' -UTR 或 OsADH 5' -UTR) 的下游多克隆位点和 NOS terminator 之间插入编码目的蛋白质的 DNA, 构建表达质粒。此时, 需要考虑载体的读码框, 选择限制酶酶切位点。翻译增强子和起始密码子的位置对翻译活性有一定的影响^{1,3)}。
2. 构建的质粒转化到农杆菌感受态细胞中 (*Agrobacterium*), 制备转化农杆菌。
3. 用 2.的转化农杆菌转化目的植物。

● 实验例

1. 增强子功能确认 (使用 pUC 系列载体瞬时表达确认)

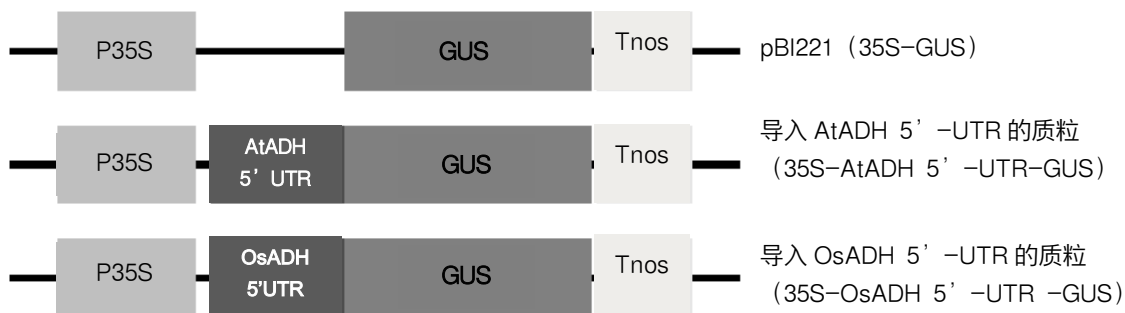
[方法]

制备烟草培养细胞 BY-2、拟南芥培养细胞 T87 和水稻 (*Oryza sativa*) 的原生质体, 利用电穿孔法, 按

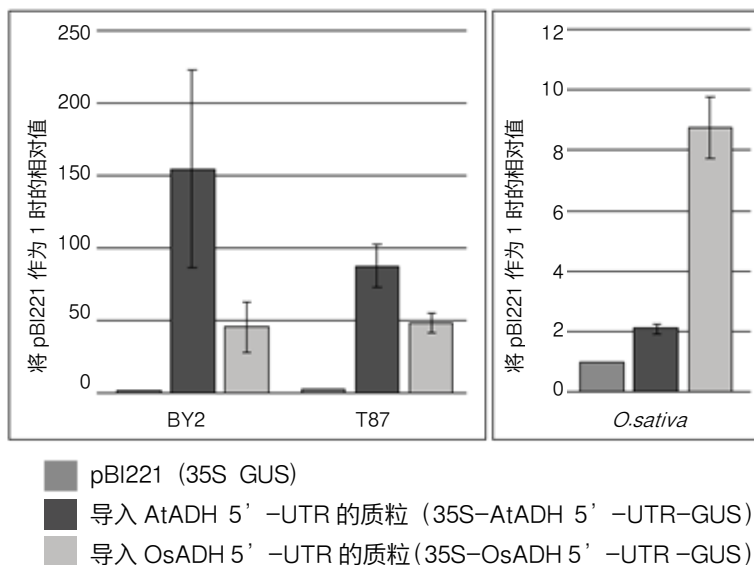
下图所示，导入含有 β -葡萄糖苷酸酶(GUS)基因序列的质粒，质粒导入后，培养 16-18 小时，然后破碎原生质体，测定所得抽提液的 GUS 活性。GUS 是以 4-甲基伞形酮酰- β -D-葡萄糖醛酸苷酯(4-MUG)为底物，水解其生成 4-甲基伞形酮(4MU)，通过测定 4MU 的荧光强度作为 GUS 活性的指标。

[结果]

比较使用 5' -非编码区(5' UTR)和单独使用 CaMV 35S 启动子的载体，与后者相比，前者显示了明显较高的 GUS 活性。拟南芥的 ADH 5' UTR 在 BY-2 细胞和 T87 细胞中显示出很高的活性，在水稻中几乎没有效果。相反，水稻的 ADH 5' UTR 在 BY-2 细胞、T87 细胞和水稻原生质体中都显示出活性。



GUS 活性测定 (瞬时表达实验)



引用于 Kato, K. *et. al* (2008) *J. Bioscience and Bioengineering.* 105 (3) 300-302

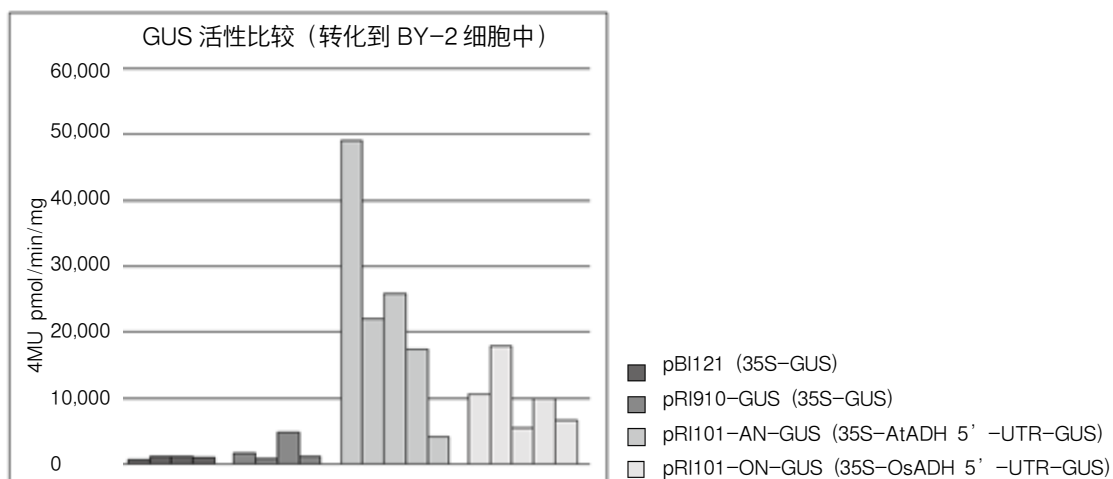
2. 转化子中目的蛋白质的表达确认 (使用双元载体法)

[方法]

与实验例 1.同样的方法将 GUS 基因插入到 pRI 101-AN 及 pRI 101-ON DNA 中，根据农杆菌法转化烟草培养细胞 BY-2。用实验例 1.同样的方法检测转化子中 GUS 活性。

[结果]

用实验例 1.中的 pBI221 相同结构的 35S-GUS 的载体(pBI121 或 pRI910-GUS)转化后与 pRI 101-AN-GUS 和 pRI 101-ON-GUS 进行比较，导入了 ADH 5' -UTR 的转化子有很多克隆获得了高 GUS 活性。



● 参考文献

1. T. Sugio, J. Satoh, H. Matsuura, A. Shinmyo and K. Kato (2008): *J. Bioscience and Bioengineering*, **105** (3), 300–302.
2. R. Nishiguchi, M. Takanami, and A. Oka (1987): *Molecular and General Genetics*, **206**, 1–8.
3. J. Satoh, K. Kato and A. Shinmyo (2004): *J. Bioscience and Bioengineering*, **98** (1), 1–8.

● 关联产品

pRI 909 DNA (Code No.3260)

pRI 910 DNA (Code No.3261)

pRI 201-AN DNA (Code No.3264)

pRI 201-ON DNA (Code No.3265)

pRI 201-AN-GUS DNA (Code No.3266)

pRI 201-ON-GUS DNA (Code No.3267)

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

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: <http://www.takarabiomed.com.cn>