

大肠杆菌甘露糖-6-磷酸异构酶基因 (*manA* /*pmi*)的克隆及功能鉴定

杨 欣^{1,2}, 梁爱华², 罗晓丽³, 吴家和^{1,2}

(1 中国科学院 微生物研究所, 植物基因组学国家重点实验室, 北京 100101;

2 山西大学 生物技术研究所, 山西 太原 030006; 3 山西省农业科学院 棉花研究所, 山西 运城 044000)

摘要: 甘露糖-6-磷酸异构酶基因 (*pmi/manA*)是当前植物转基因工程的重要选择标记基因, 在生物安全上被认为是无害的。根据同源序列从大肠杆菌 DH10B基因组中克隆出 *pmi* 基因。通过诱导原核表达获得 PMI 目的蛋白, 对粗提和经过镍柱纯化的 PMI 蛋白进行 Western 分析和酶活反应鉴定。以上结果表明, PMI 蛋白成功诱导, 其分子量为 46 kDa 纯化过的 PMI 具有高的酶活性, 能催化甘露糖-6-磷酸发生异构反应生成果糖-6-磷酸。同时利用 *pmi* 基因作为选择基因构建植物表达载体 pCPMi 通过农杆菌介导法转化烟草获得转基因植株, PCR 检测结果表明 96 个再生植株有 72 株为阳性。以上结果表明, 克隆的 *pmi* 基因具有高的酶活性, 并能作为转基因植物的一种选择标记, 同时也为转基因植物提供安全的选择标记基因, 便于转基因植物的推广。

关键词: 甘露糖-6-磷酸异构酶; 大肠杆菌; 果糖; 选择标记

中图分类号: Q785 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2011)02-0107-04

Cloning and Characterization of Mannose-6-phosphate Isomerase Gene (*manA* /*pmi*) from *Escherichia coli*

YANG Xin^{1,2}, LIANG Aihua², LUO Xiao-li³, WU Jia-he^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Plant Genomics Institute of Microbiology Chinese Academy of Sciences Beijing 100101, China; 2. Institute of Biotechnology Shanxi University Taiyuan 030006 China; 3. Institute of Cotton Shanxi Academy of Agriculture Sciences Yuncheng 044000 China)

Abstract: Mannose-6-phosphate isomerase (PMI) is encoded by the *manA*/*pmi* gene from some bacteria as a selectable marker which has been used for the transformation of plant. The novel *pmi* gene was cloned from *E. coli* DH10B strain according to homologous sequence by PCR methods. Then, a prokaryotic vector pEPMi and a plant expression vector pCPMi both harboring *pmi* gene were constructed respectively. The prokaryotic vector pEPMi with his-tag was transformed into *Escherichia coli* to express PMI protein. A single band on SDS-PAGE gel was presented by optimizing the concentration of imidazole in the buffers during the PMI protein isolation. Then, western blot assay confirmed that the induced target protein was PMI protein fused His-tag, the size of protein is about 46 kDa. The results of analysis of enzyme reaction indicated that PMI has catalyzed the conversion of mannose-6-phosphate to fructose-6-phosphate with high efficiency. In addition, plant expression vector pCPMi was transformed into tobacco by Agrobacterium mediated system, and 72 of 96 independent tobacco transformants were confirmed to contain the *pmi* gene by PCR detection. So the novel *pmi* gene can be directly used in plant transformation as a kind of safe selectable marker.

Key words: Mannose-6-phosphate isomerase (PMI); *Escherichia coli*; Fructose Selection marker

在植物遗传转化中, 抗生素标记是长久以来一直使用的最广泛的筛选标记。这些标记基因本身是否

具有毒性目前尚没有定论, 因此人们开始对转基因植物中抗生素的安全性产生担忧。后来出现的无选择

收稿日期: 2011-02-11

基金项目: 农业公益行业专项 (20080324); 转基因专项 (2008ZX08010-004)

作者简介: 杨 欣 (1984-) 女, 山西太原人, 在读博士, 主要从事生物技术及分子生物学研究。

通讯作者: 吴家和 (1968-) 男, 安徽合肥人, 副研究员, 博士, 主要从事生物技术及分子生物学研究。

标记基因和标记基因敲出体系,但因这些方法效率低、程序复杂,也不能被人们广泛应用^[1-3]。因此研究人员希望找到更好的选择标记来保证植物安全性。

甘露糖-6-磷酸异构酶可催化 D-甘露糖-6-磷酸醛糖异构化为 D-果糖-6-磷酸酮糖。大多数植物细胞不含 *pmi* 基因,而转入 *pmi* 基因的植物细胞可利用培养基中的甘露糖作为碳源,使其在以甘露糖选择的培养基上正常代谢和分化^[3];而在甘露糖选择培养基上的未转化细胞中,甘露糖-6-磷酸不能生成果糖,在没有其他碳源的情况下,代谢过程受到抑制,细胞因饥饿而死亡。这种选择机制被认为在转基因作物中是安全的。另外,含有该基因的转基因植物可以通过氯酚红检测法鉴定,既高效又无毒。有报道认为,甘露糖筛选体系对人体健康和环境十分安全^[4]。因此,甘露糖选择体系作为一种正向选择系统受到更多的关注。

目前 *pmi* 基因已经被报道从许多细菌里获得克隆。本实验室从常见的大肠菌株 DH10B 中获得该基因,构建该基因的原核表达载体和植物表达载体验证 PMI 蛋白的酶活性和作为选择标记在转基因烟草中的应用。为该基因在基因工程上的应用提供技术保障,也为植物转基因安全性提供了可靠的选择标记基因。

1 材料和方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株和质粒 大肠杆菌菌株 (*Escherichia coli* DH10B、DH5 α 、BL21); 原核表达载体 pET-23b 中间载体 pD513 (含 CaMV35S 启动子) 以及植物表达载体 pCambia2301; 农杆菌 Agl-1; 烟草品种 SR1。以上均由中国科学院微生物研究所植物基因组国家重点实验室保存。

1.1.2 主要仪器及试剂 WD-9402A 型 PCR 仪, JY04S-3C 型凝胶成像仪, 高保真酶 (Trans Taq HiFi DNA polymerase), EZ-T kit (GenStar), 镍柱及柱材料 (QIAGEN), 一抗及二抗 (MBL), 甘露糖-6-磷酸标准液 (2 g/L), 果糖标准液 (2 g/L), 间苯二酚标准液 (2 g/L)。

1.2 *pmi* 基因的克隆

通过 CTAB 法提取大肠杆菌 DH10B 基因组 DNA。根据 NCBI 提供的 *pmi* 基因的保守序列^[5] 设计引物扩增大肠杆菌菌株 DH10B 的 *pmi* 基因序列。反应条件为 95 $^{\circ}\text{C}$, 3 min; 94 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 55 $^{\circ}\text{C}$, 30 s; 72 $^{\circ}\text{C}$, 1 min; 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 8 min。扩增得到的片段经纯化, 克隆至 pEZ-T 中, 得到 pEZ-T-*pmi*。经过

测序比对后获得了 1.2 kb 的 *pmi* 基因。氨基酸序列与 NCBI 上其他菌株的序列基本一致 (GenBank AAC74685.1)。

1.3 原核及真核表达载体的构建

原核表达载体的构建: 在 5' 端加 BamH I 位点并去掉起始密码子 ATG, 3' 端加 Sal I 位点并去掉终止密码子 TTA。设计一对引物 P1: 5'-GGATCCCAA AACTCATTAAAC-3', P2: 5'-GTCGACCAGCTTGTTG-TAAAC-3'。

植物表达载体的构建: 也在 5' 端加 BamH I 位点, 3' 端加 Sal I 位点, 但不去掉起始和终止密码子。设计一对引物 P3: 5'-GGATCCATGCAAAAACCTCATTAAAC-3', P4: 5'-GTCGACTTACAGCTTGTTGTAAAC-3'。

以 pEZ-T-*pmi* 为模板, 用 P1 和 P2、P3 和 P4 两对引物分别进行 PCR 扩增, 其反应条件同上, 扩增得到的片段用 BamH I 和 Sal I 酶切, 纯化后与 pET-23b、pD513 分别连接。构建 pERMi 原核表达载体和 pD513-*pmi*。

用 Hind III 和 EcoR I 酶切连接有 *pmi* 片段的中间载体 pD513-*pmi* 得到 5 kb 大小目的基因的表达框, 将此表达框连接到 pCambia2301 的多克隆位点上, 经筛选得到 pCPMi 植物表达载体。

1.4 PMI 在大肠杆菌中的表达、纯化

挑取含 *pmi* 基因的 BL21 的单菌落接入 5 mL LB 液体培养基中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 过夜培养, 次日转接 50 μL 菌液到新的 5 mL LB 液体培养基中摇 2.5 h, 加入 1 mmol/L IPTG 诱导 3 h。收集菌液, 用 1 mL 裂解液重悬, 超声破碎细胞, 4 000 r/min 离心后, 取上清液过 Ni²⁺ 柱纯化 (详细方法见分子克隆)。蛋白表达及纯化结果通过 SDS-PAGE 胶电泳进行分析。

SDS-PAGE 电泳完成后进行转膜, 然后进行 Western blot 检测, 具体步骤包括封闭、结合一抗、二抗、显色和放射自显影, 具体方法见 QIAGEN 公司说明书。

1.5 PMI 体外功能检测

1.5.1 催化异构反应 纯化的蛋白液以 50、100、200、300 μL 分别加入到甘露糖-6-磷酸标准液中, 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应 1 h。反应完毕取出后立即放入 4 $^{\circ}\text{C}$ 中, 供后续反应使用。

1.5.2 间苯二酚反应 果糖与间苯二酚和盐酸共热可产生红色络合物^[6]。假定上述经过催化反应生成果糖-6-磷酸的反应液按 1:1 的比例加入到间苯二酚标准液 (2 g/L) 和盐酸标准液的 1.5 mL EP 管中, 100 $^{\circ}\text{C}$ 水浴加热 8 min。取出 EP 管放置室温冷却。反应物 12 000 r/min 离心 10 min 去掉沉淀, 移

至比色皿比色。

1.6 烟草转化试验和 PCR 分析

将 pCPMi 载体转入农杆菌 LBA4404 收集菌液, 用 MS 液体培养基重悬, 并使 OD₆₀₀ 值达到 0.5。农杆菌侵染外植体 10 min 用无菌水清洗外植体后置于 MS 固体培养基上 (含 6BA 1 mg/L NAA 0.1 mg/L), 26℃ 暗培养 3 d 用无菌水清洗叶片, 并用无菌滤纸吸干残余水分, 转移到附加 Kan 50 mg/L 和 Cef 300 mg/L 的上述同种 MS 培养基上, 16 h 光照培养。等转化的芽长出 3~4 片嫩叶后, 移栽于生根培养基。获得再生小苗移栽于温室, 在植株开花前提取叶片 DNA 对其 DNA 进行 PCR 鉴定。

用改良的 CTAB 法^[10-11] 提取烟草的基因组总 DNA 进行 PCR 检测。扩增引物和上面的 P3 和 P4

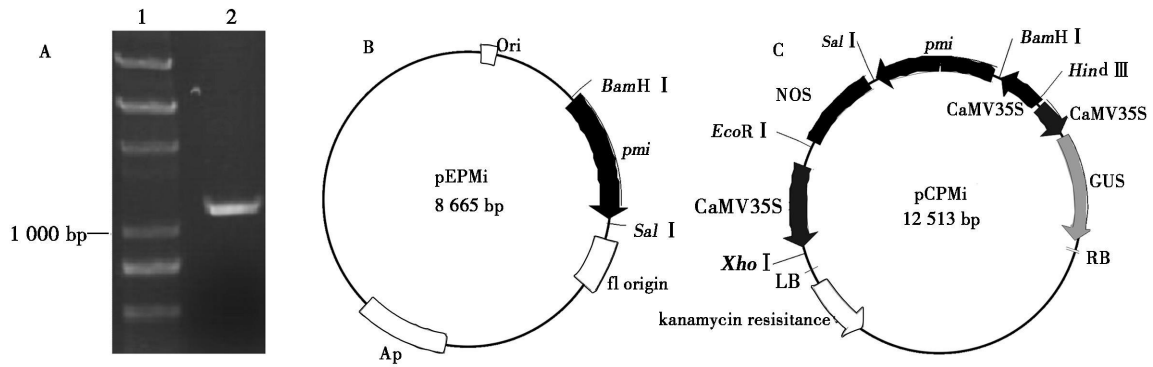
一致。扩增核苷酸片段大小为 1.2 kb

2 结果与分析

2.1 pmi 基因的克隆和载体构建

利用 PCR 技术从大肠菌株 DH10B 基因组里扩增出 1.2 kb 大小的 pmi 基因 (图 1-A) 把该片段连接到克隆载体 pEZ-T 上, 并进行测序鉴定, 最终获得含有 pmi 基因的克隆载体 pEZ-T-pmi

用材料和方法中提及的两对引物 P1 和 P2、P3 和 P4 分别从 pEZ-T-pmi 扩增出大小为 1.2 kb 的条带, 用 BamH I 和 Sal I 酶切分别构建到原核表达载体 pET-23b 和真核表达载体 pCambia2301 上, 两个表达载体分别为 pEPMi 和 pCPMi (图 1-B C)。



A pmi 基因的 PCR 产物; 1 DNA 模板; 2 pmi 基因产物; B. pEPMi 载体构建; C. pCPMi 载体构建。
A. PCR amplification of pmi from DNA extracted from genome of Escherichia coli DH10B. 1. DNA Marker;
2. Product of PCR from Escherichia coli DH10B genome. B. Construction of pEPMi. C. Construction of pCPMi

图 1 pmi 基因的克隆和载体的构建

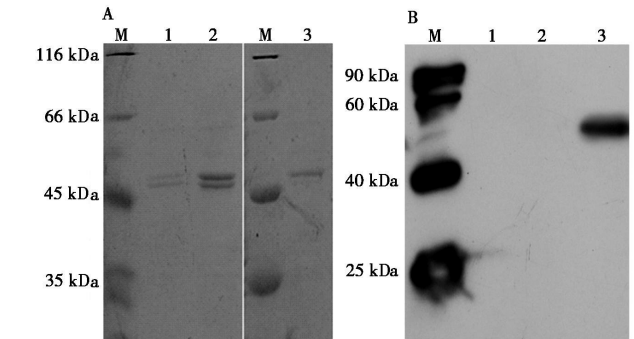
Fig 1 The clone of pmi gene and construction of prokaryotic and plant expression vectors

2.2 PMI 蛋白的表达、纯化和鉴定

转化入大肠杆菌 BL21 中的原核表达载体 pEPMi 生长到对数生长期后期时, 用 IPTG 诱导 3 h 收集菌液并进行超声处理。为去除大肠杆菌表达的本底 PMI 蛋白, 利用原核表达载体上的 His-tag 进行 Ni²⁺ 柱纯化。纯化的目的蛋白用 SDS-PAGE 胶检测, 第一次洗脱液几乎没有洗下来目的蛋白, 第二次洗脱在 46 kDa 附近有 2 条清晰条带 (图 2-A)。如果用咪唑浓度较高的裂解液 (20 mmol/L)、洗液 (40 mmol/L) 则所获得的纯化蛋白为一条带, 大小约 46 kDa 与预计条带大小相符 (图 2-A)。为进一步证明该蛋白是诱导的目的蛋白, 我们用 his-tag 抗体进行 Western blot 分析, 结果表明所诱导的蛋白为 PMI 目的蛋白 (图 2-B)。

2.3 PMI 酶活性检测

在甘露糖-6-磷酸标准液中分别加入 50 100 200 300 μL PMI 蛋白纯化提取液, 进行反应 1 h 后



A PMI 的 SDS-PAGE. 1. 第 1 次洗脱产物; 2. 第 2 次洗脱产物; 3. 高浓度咪唑处理产物; M. 蛋白标记; B. PMI 蛋白的 Western 杂交分析; 1. 带有 pET-23b 的 E. coli 未经 IPTG 诱导的产物; 2. 洗涤液样本; 3. 带有 pET-23b 的 E. coli 经 IPTG 诱导的产物。
A. SDS-PAGE detection of PMI. 1. Sample from the first elute. 2. Sample from the second elute. 3. Sample from treatment of high concentration of imidazole. M. Protein marker. B. Western blot analysis the PMI protein. 1. Sample from E. coli containing pET-23b without IPTG inducing. 2. Sample from wash solution. 3. Sample from E. coli containing pET-23b with IPTG inducing

图 2 不同纯化过程获得的 PMI His 融合蛋白和 Western blotting 检测
Fig 2 SDS-PAGE detection of PMI His fusion protein purified by two methods and Western blotting analysis

终止。反应液加入含间苯二酚标准液、盐酸标准液的混合液中进行显色反应。红色深浅随着加入蛋白反应液量增加而加深,逐渐接近果糖标准液的颜色;而直接加入甘露糖-6-磷酸和未诱导菌液上清的两个负对照没有生成红色络合物(图3)。

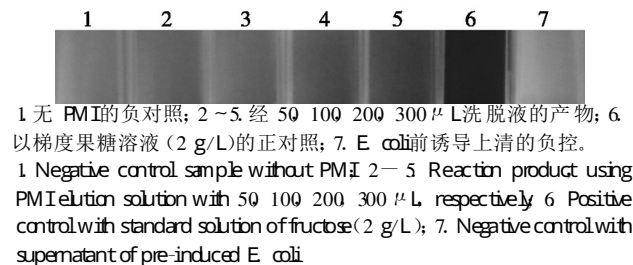
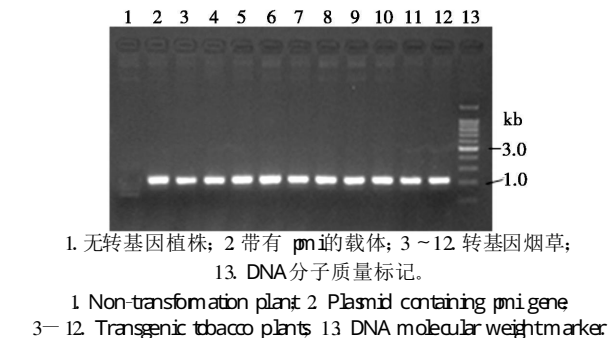


图3 PMI催化活性与间苯二酚显色的颜色变化关系

Fig 3 The relation of chromogenic reaction of the resorcinol and PMI enzyme activity

2.4 甘露糖筛选转基因烟草植株的获得

将含有植物表达载体 pCPM1的农杆菌介导转化烟草 SR1 品种,经过共培养、甘露糖筛选和组织培养共获得 96株转基因再生苗,经 PCR 分析有 72株为阳性转基因植株(图4)。结果表明,pmi基因作为选择标记在烟草的转化中具有很高的效率。



1. 无转基因植株; 2 带有 pmi 的载体; 3~12 转基因烟草; 13. DNA 分子质量标记。

1 Non-transformation plant 2 Plasmid containing pmi gene 3-12 Transgenic tobacco plants 13 DNA molecular weight marker

图4 转基因烟草的 pmi 基因 PCR 检测

Fig 4 PCR detection of transgenic tobacco plants

3 讨论

在大多数植物体内甘露糖虽然能够变为甘露糖-6-磷酸,但因缺乏或表达很少甘露糖-6-磷酸异构酶不能将其转变为果糖进入植物的营养循环,因此不能被植物吸收利用。如果把外源的 pmi 基因转入植物中,能使大多数植物在只存在甘露糖作为唯一碳源的基质中正常生长发育。

本研究从大肠杆菌 DH10B 中克隆出 pmi 基因,经原核表达翻译出 PMI 蛋白,在纯化过程中,优化了结合目的蛋白和洗脱杂蛋白的条件,使蛋白条带更特异。此外,通过间苯二酚颜色反应,第一次证明,在体外大肠杆菌甘露糖-6-磷酸异构酶表达的 PMI 具有活性,并且可以进行高效的酶促反应,生成红色络合物,表明果糖-6-磷酸是甘露糖-6-磷酸异构

化产物。

pmi 基因作为转基因植物中的选择基因应用已成功用于玉米^[7]、水稻^[8]、甜橙^[9]、苹果^[10]、甘蔗^[11]、油菜籽^[12]等植物的遗传转化中。在今后转基因植物筛选中,pmi 基因必将起到重要作用。笔者从一个常见的大肠菌株中克隆出该基因,其可直接应用于植物的遗传转化。在烟草遗传转化中 pmi 基因具有选择标记的高效性,也暗示它可以在其他大田作物的遗传转化中作为生物安全争议小的选择标记而进行利用。

参考文献:

- [1] Dominguez A, Fagoaga G, Nacarro L, et al. Regeneration of transgenic citrus plants under non-selective conditions results in high-frequency recovery of plants with silenced transgenes [J]. Mol Genet Genom 2002; 267: 544-556.
- [2] Scott C R, Zubko E, Meyer P, et al. Techniques for the removal of marker genes from transgenic plants [J]. Biochem 2002; 84: 1119-1126.
- [3] Joersbo M, Donaldson I, Kreberg J, et al. Analysis of mannose selection used for transformation of sugar beet [J]. Mol Breed 1998; 4: 111-117.
- [4] Reed J, Privallel M, Powell et al. Phosphomannose isomerase: an efficient selectable marker for plant transformation [J]. In Vitro Cell Dev Boil Plant 2001; 37: 127-132.
- [5] Miles J S, Grest J R. Nucleotide sequence and transcriptional start point of the phosphomannose isomerase gene (manA) of Escherichia coli [J]. Gene 1984; 32: 41-48.
- [6] 哈森其木格, 贺锋嘎. 间苯二酚分光光度法测定芥菜多糖中的果糖含量 [J]. 光谱学与光谱分析, 2002; 22: 446-448.
- [7] Negrotto D, Jolley M, Beer S, et al. The use of phosphomannose isomerase as selectable marker to recover transgenic maize plants (Zea mays L.) via Agrobacterium transformation [J]. Plant Cell Reports 2000; 19: 798-803.
- [8] Paola L, Ye X, Ingo P. Effective selection and regeneration of transgenic rice plants with mannose as selective agent [J]. Molecular Breeding 2001; 7: 43-49.
- [9] Boscardi R L, Alineida W A, Derbyshire M T, et al. The use of PMI/mannose selection system to recover transgenic sweet orange plants (Citrus sinensis L. Osbeck) [J]. Plant Cell Rep 2003; 22: 122-128.
- [10] Juliana D, Annika P, Jurith M, et al. The use of the phosphomannose isomerase/mannose selection system to recover transgenic apple plants [J]. Plant Cell Rep 2006; 25: 1149-1156.
- [11] Mukesh J, Kudithipudi G, Ahmed A, et al. Prospecting the utility of a PMI/mannose selection system for the recovery of transgenic sugarcane (Saccharum spp. hybrid) plants [J]. Plant Cell Rep 2007; 26: 581-590.
- [12] Walbraun M, Sonntag K, Eisenhauer C, et al. Phosphomannose isomerase (pmi) gene as a selectable marker for Agrobacterium-mediated transformation of rapeseed [J]. Plant Cell Tiss Organ Cult 2009; 99: 345-351.