

抗旱、耐盐基因 P5CS 植物表达双元载体的构建

程继东^{1,2}, 安玉麟¹, 孙瑞芬¹

(1. 内蒙古农牧业科学院 生物技术中心, 内蒙古 呼和浩特 010031; 2. 内蒙古农业大学 农学院, 内蒙古 呼和浩特 010019)

摘要: 以含有 P5CS 的重质质粒 pBI P5CS-F129A 为模板, 通过 PCR 的方法获得了目的基因 P5CS (1 905 bp) 并将其克隆到 pBS-T 载体上。利用限制性核酸内切酶 BamH 和 Sal 将 P5CS 基因从克隆载体上消化下来, 定向插入到无 GUS 基因植物表达载体 pCHF3 的 CaMV35S 启动子和 NOS 终止子之间。通过冻融法将此表达载体导入农杆菌 LBA4404 中, 经 PCR 鉴定表明, P5CS 基因植物表达双元载体构建成功。

关键词: 抗旱、耐盐基因; P5CS 基因; 克隆; 植物表达载体

中图分类号: Q785 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2008)06-0011-04

Construction of Drought and Salt Resistance Gene P5CS in Plant Expression Binary Vector

CHENG Ji-dong^{1,2}, AN Yu-lin¹, SUN Rui-fen¹

(1. Biotechnology Research Center, Inner Mongolia Academy of Agriculture and Animal Husbandry Sciences, Huhhot 010031, China; 2. College of Agronomy, Inner Mongolia Agricultural University, Huhhot 010019, China)

Abstract: The gene P5CS (1 905 bp) was amplified via PCR using pBI P5CS-F129A plasmid as template and cloned into pBS-T vector. The BamH / Sal fragment from the recombinant plasmid pBS-T/ P5CS was ligated directly between CaMV35S promoter and NOS terminator of the expression vector pCHF3 without GUS gene. The plant expression vector pCHF3/ P5CS was transferred into *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 by freeze-thaw method, and the expression binary plasmid was further identified by PCR. The results showed that pCHF3/ P5CS vector was constructed successfully.

Key words: Drought, salt resistance gene; P5CS gene; Plant expression vector

采用常规育种手段进行抗旱、耐盐新品种选育, 往往会由于不良性状的伴随导入以及转育周期的延长而达不到预期目的。通过基因工程手段, 将外源抗旱、耐盐基因导入作物体内并使之表达, 是一条行之有效的育种途径。研究表明, 脯氨酸 (Proline) 是植物中主要的渗透调节物质之一, 它不仅是生物大分子的保护剂或羟基的清除剂, 还是植物从胁迫条件恢复正常过程中迅速、有效的氮源、碳源和还原剂。许多物种, 包括细菌、真菌和植物等, 在渗透胁迫条件下常通过积累脯氨酸来达到渗透调节的作用。目前, 有关脯氨酸合成酶基因的克隆、分离和遗传转化已取得了很大进展, 已从细菌、酵母、水稻、玉

米、黑麦、大豆、拟南芥、苜蓿等克隆出了多个脯氨酸合成酶或与之相关的基因, 即脯氨酸合成酶基因族。在胁迫条件下, 由谷氨酸合成脯氨酸在植物脯氨酸合成的 2 条途径中占主导地位, 脯氨酸合成发生在细胞质中^[1-6]。

P5CS (L-二氢吡咯-5-羧酸合成酶) 是一个双功能酶, 具有 L-谷氨酰激酶和谷氨酰-L-半醛脱氢酶活性, 催化从谷氨酸合成脯氨酸的最初 2 步反应, 其活性受脯氨酸反馈抑制。P5CS 基因在积累脯氨酸以降低渗透胁迫、在正常和胁迫条件下反馈调控植物中脯氨酸合成水平等方面均起着重要作用。在胁迫条件下植物中脯氨酸的积累是两条途径相互调控

收稿日期: 2008-06-20

基金项目: 农业部“948”项目 (2006-G23)

作者简介: 程继东 (1979-), 男, 内蒙古乌兰察布人, 硕士, 主要从事植物基因工程研究。

通讯作者: 安玉麟 (1954-), 男, 内蒙古土默特右旗人, 研究员, 主要从事作物栽培、育种方面的研究。

的结果:即增加脯氨酸合成酶基因(*P5CS*)的表达量,同时抑制脯氨酸降解酶的活性^[7]。

本研究中的目的基因 *P5CS* 是从豇豆 (*Vigna arconitifolia* L.) 中分离到的,它是野生型 *P5CS* 基因的突变体,由于基因位点的突变,可有效去除反馈抑制。Hong^[8]将该基因转化到烟草中,可使转基因烟草中该酶的表达量大大提高,脯氨酸的合成量比对照提高 8~10 倍。我们以携带 *P5CS* 基因的质粒 pBI*P5CS*-F129A 为模板,通过 PCR 的方法获得了 *P5CS* 基因,并将其构建到植物表达载体上,为 *P5CS* 基因的遗传转化奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 质粒与菌株 携带 pBI*P5CS*-F129A 质粒(图 1)的农杆菌 LBA4404 由北京农业生物技术中心黄丛林博士惠赠;植物表达载体 pCHF₃ 由内蒙古农业大学生物工程学院李国婧教授惠赠;LBA4404 农杆菌菌株由内蒙古大学生命科学学院张鹤龄教授惠赠;克隆载体 pBS-T 和感受态细胞 Top10 购于清华大学北京天为时代科技有限公司。

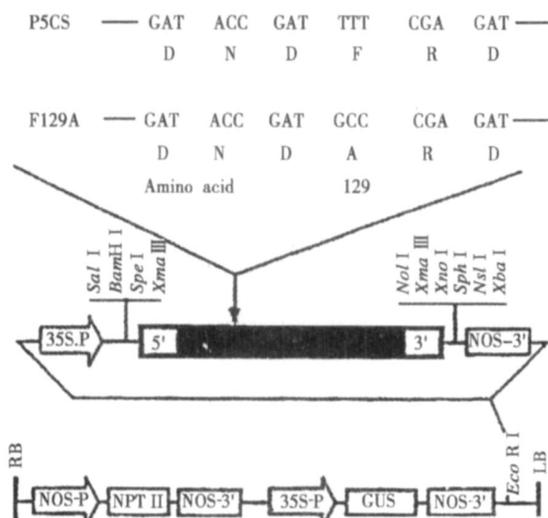


图 1 pBI*P5CS*-F129A 质粒图谱

Fig. 1 pBI*P5CS*-F129A plasmid

1.1.2 酶及主要试剂 *Hind* (Promega 产品), *Bam*H、*Sal* (Fermentas 产品), DNA/*Hind* Marker (TaKaRa 产品), T₄ DNA Ligase、2 × *Taq* PCR MasterMix (含染料)、庆大霉素、壮观霉素(Spe)、卡那霉素(Kan)、氨基青霉素(Amp)、X-gal、IPTG(购自清华大学北京天为时代科技有限公司), E. Z. N. A Gel Extraction Kit(美国 Omega Biotek 产品),其他试剂均为国内或进口分析纯。

1.1.3 引物 引物由上海生物工程技术服务有限

公司合成,序列如下:

引物 1:5'-GGTTAGCGGTTGGAAGATTGG-3' - 21mer

引物 2:5'-TGCCGCTAGTCTCAAATCGTG-3' - 21mer

1.2 方法

1.2.1 *P5CS* 基因的克隆

1.2.1.1 pBI*P5CS*-F129A 质粒的提取及 *P5CS* 基因片段的扩增、纯化 将含 pBI*P5CS*-F129A 质粒的农杆菌 LBA4404 活化后接种在 5 mL 液体 YEB (含庆大霉素 25 mg/L, Kan 50 mg/L) 中,用碱裂解法小量提取质粒^[9]。以提取的 DNA 质粒为模板进行 *P5CS* 基因全长片段扩增。PCR 扩增条件为:95 预变性 7 min; 94 变性 1 min, 58 退火 1 min, 72 延伸 2 min, 35 个循环; 72 保温 10 min。0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测并回收 PCR 产物,回收试剂盒为 E. Z. N. A Gel Extraction Kit,方法按产品使用说明进行。

1.2.1.2 目的片段与克隆载体的连接及 *E. coli* Top10 感受态细胞的转化 将回收的目的基因片段与载体 pBS-T 在 T₄ DNA Ligase 的作用下,16 连接过夜。用连接产物转化 *E. coli* Top10 感受态细胞,以质粒 pUC19 作阳性对照,无菌 ddH₂O 作空白对照,转化方法按产品说明书进行。将菌液涂布在含 Amp. X-gal 和 IPTG 的 LB 固体培养基上,37 培养过夜。次日挑取白色单菌落划线培养。

1.2.1.3 重组质粒的检测及目的片段插入方向的鉴定 随机挑取 3 个白色单菌落,分别接种在加有 Amp 100 mg/L 的 LB 液体培养基中,37 振荡培养过夜,用碱裂解法小量提取质粒并进行 PCR 扩增,扩增条件同上。对重组质粒及 PCR 产物进行 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测,同时对目的基因进行测序及内切酶位点分析。

选用目的基因内部合适的单一酶切位点的内切酶消化重组质粒,以重组质粒为对照,对酶切产物进行 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.2 *P5CS* 基因植物表达双元载体的构建

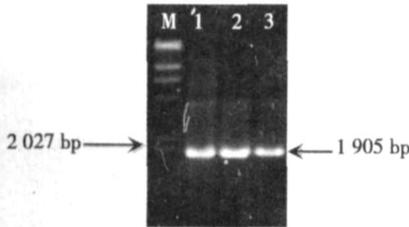
1.2.2.1 目的片段与载体大片段连接 用 *Bam*H 和 *Sal* 分别双酶切重组质粒 pBS-T/*P5CS* 和植物表达载体 pCHF₃。0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测并回收 *P5CS* 目的片段和植物表达载体大片段,然后用 T₄ DNA Ligase 将 2 种片段作定向连接。

1.2.2.2 表达载体的导入及重组子的检测 农杆菌 LBA4404 感受态细胞的制备及转化按文献^[10]进行。在 YEB 固体培养基 (含 Spe 100 mg/L, Str 100 mg/L 和 Rif 20 mg/L) 上筛选转化子,用无菌 ddH₂O 作空白对照。小量提取 LBA4404 中转化质粒并对其进行 PCR 鉴定。PCR 反应条件同上。

2 结果与分析

2.1 *P5CS* 基因全长片段的扩增

以 pBI*P5CS*-F129A 质粒为模板,用特异引物对 *P5CS* 基因进行全长片段的扩增,经琼脂糖凝胶电泳证实扩增出来的目的基因片段大小为 1 905 bp (图 2),与预期大小一致。



M. DNA/ *Hind* 标准分子量;1~3. 目的基因扩增产物。

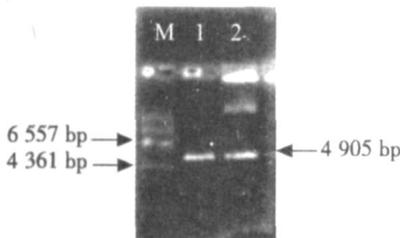
M. DNA/ *Hind* Marker;1 - 3. Amplification product of destination gene.

图 2 目的基因的扩增

Fig. 2 Destination gene amplification

2.2 *P5CS* 基因的克隆及其检测

2.2.1 *P5CS* 基因克隆 将目的基因 PCR 产物进行回收,与克隆载体 pBS-T 连接后转化 Top10 感受态细胞,经蓝/白菌落筛选,对白菌落进行质粒提取及目的片段 PCR 检测,结果表明质粒大小为 4 905 bp (图 3),PCR 扩增片段大小为 1 905 bp (图 4),恰好符合预期结果,证明 *P5CS* 基因已克隆到 pBS-T 中,随机选取 1 个重组质粒将其命名为 pBS/ *P5CS*。

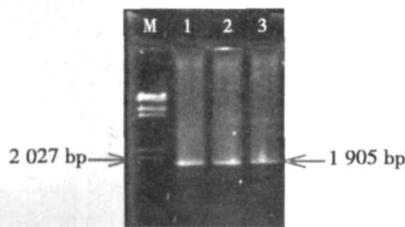


M. DNA/ *Hind* 标准分子量;1,2. 重组质粒 pBS/ *P5CS*。

M. DNA/ *Hind* Marker;1,2. Recombinant plasmid pBS/ *P5CS*。

图 3 重组质粒检测

Fig. 3 Test for recombinant plasmid



M. DNA/ *Hind* 标准分子量;1~3. 目的基因扩增产物。

M. DNA/ *Hind* Marker;1 - 3. Amplification product of destination gene.

图 4 目的基因的扩增

Fig. 4 Destination gene amplification

2.2.2 目的基因序列的测定及内切酶位点的分析 将含有重组质粒 pBS/ *P5CS* 的 Top10 大肠杆菌送上海生物工程技术有限公司进行序列测定,测

序结果与 Genebank 中的已知序列同源性达 99.34%,用 DNAMAN 软件分析该序列的内切酶位点,下面只列出部分单一内切酶位点的分析结果。

Restriction analysis of *P5CS* (1 905 bp)

Name	Cutting sequence	Number of enzymes	Position(s)
<i>Aha</i> III	TTT/ AAA	(1)	988
<i>Alw</i> 44I	G/ TGCAC	(1)	1 771
<i>Bbe</i> I	GGCC/ C	(1)	91
<i>Hind</i> III	A/ AGCTT	(1)	540
<i>Nco</i> I	C/ CATGG	(1)	1 540
<i>Nhe</i> I	G/ CTAGC	(1)	980
<i>Xba</i> I	T/ CTAGA	(1)	600
<i>Sac</i> I	GAGCT/ C	(1)	26
<i>Ssp</i> I	AAT/ ATT	(1)	1 664
<i>Ssr</i> I	GAGCT/ C	(1)	26

2.2.3 *P5CS* 基因插入方向的鉴定 *P5CS* 基因序列的酶切位点分析发现,在基因内部 540 bp 处有一 *Hind* 单一酶切位点,而且在克隆载体上也有一 *Hind* 单一酶切位点(图 5),因此可用 *Hind* 酶切鉴定目的片段的插入方向。将重组质粒 pBS/ *P5CS* (4 905 bp)用 *Hind* 酶切,电泳出现 2 条带,大小为 1 365 和 3 540 bp (图 6),说明目的片段的插入为正向插入。

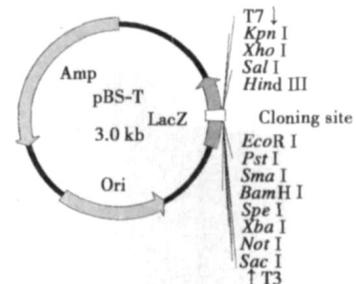
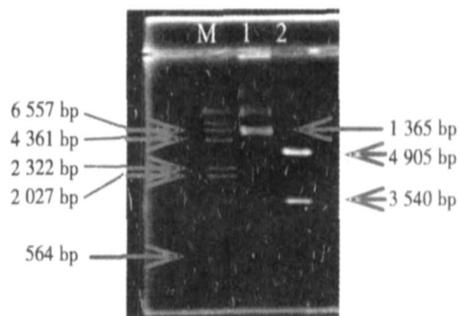


图 5 克隆载体酶切位点示意图

Fig. 5 Restriction enzyme cutting sites sketch

map of cloning vector



M. DNA/ *Hind* 标准分子量;1. 质粒 pBS/ *P5CS*; 2. *Hind* 酶切 pBS/ *P5CS* 产物。

M. DNA/ *Hind* Marker;1. Plasmid pBS/ *P5CS*; 2. Product of *Hind* digested plasmid pBS/ *P5CS*。

图 6 目的基因插入方向的鉴定

Fig. 6 Identification of orientation of destination gene

2.3 P5CS 基因植物表达载体的构建

2.3.1 植物表达载体的构建及其检测 本试验选用 pCHF3(图 7)作为植物表达载体,其上具有与克隆载体相同的 2 个单一酶切位点 *Bam*H 和 *Sal* I, 可以使目的基因与表达载体作定向连接。

将从重组质粒 pBS/ *P5CS* 上消化、回收的 *P5CS* 小片段与植物表达载体 pCHF3 酶切大片段连接后转化农杆菌 LBA4404,对照平板上无农杆菌生长,而有连接物的平板上有白色单菌落生长,初步证明表达载体构建成功。

随机挑取白色单菌落划线培养并提取质粒 DNA,以质粒 pCHF3 为对照,0.8%琼脂糖凝胶电泳检测,发现该质粒带滞后于 pCHF3(10 048 bp),大小

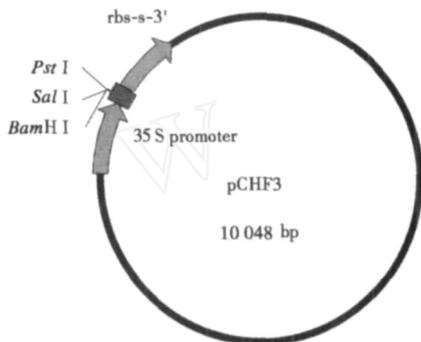
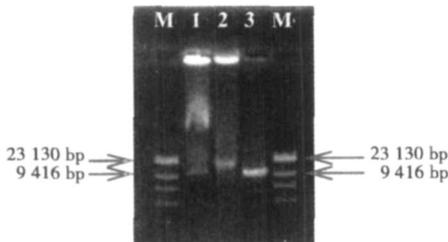


图 7 植物表达载体酶切位点示意图

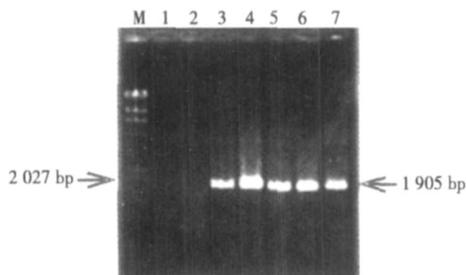
Fig. 7 Restriction enzyme cutting sites sketch map of cloning vector



M. -DNA *Hind* 标准分子量;1. 质粒 pCHF3;2. 质粒 pCHF3/ *P5CS*; 3. *Bam*H 和 *Sal* 酶切质粒 pCHF3 产物。
M. -DNA/ *Hind* Marker;1. Plasmid pCHF3;2. Plasmid pCHF3/ *P5CS*; 3. Product of *Bam*H I and *Sal* digested pCHF3.

图 8 重组表达质粒的检测

Fig. 8 Test of recombinant expression plasmid



M. -DNA *Hind* 标准分子量;1. 2. 阴性对照;3~7. 重组质粒 PCR 产物。
M. -DNA *Hind* Marker;1. 2. Negative control; 3 - 7. PCR product of recombinant plasmid.

图 9 重组质粒的 PCR 检测

Fig. 9 Test for recombinant plasmid by PCR

约为 12 000 bp(图 8),符合预期大小,可以证明该质粒为重组质粒。

进一步对转化质粒进行 PCR 检测,扩增出 1 905 bp 的 *P5CS* 基因片段(图 9),充分证明 *P5CS* 基因植物表达双元载体构建成功,为 *P5CS* 基因的遗传转化奠定了基础。

3 讨论

自 Jefferson^[11]首次提出 -葡糖苷酸酶(*GUS*)基因可作为植物遗传转化时的报告基因以来,据不完全统计,至今已有上千种以 *GUS* 为报告基因的转基因植物。由于其检测方法简单,灵敏度高已成为目前一种最为广泛运用的报告基因,但是其缺点也是不容忽视的,由于植物组织中普遍存在内源性 *GUS* 活性,在检测中容易出现假阳性;同时在作物的遗传转化过程中,人们期望转入的外源基因越少越好,因此,本试验我们将 *P5CS* 基因从含有 *GUS* 报告基因的 pBI *P5CS*-F129A 载体中重新构建到了无 *GUS* 的 pCHF3 载体中。

本试验所用的植物表达载体 pCHF3 是一组成型表达的双元载体,大小为 10 048 bp,多克隆位点上游带有 CaMV 35S 启动子,NOS 终止子下游带有 *NPT* 基因,可进行 Kanamycin 抗性筛选。

参考文献:

- [1] Delauney A J, Verma D P S. Proline biosynthesis and osmorgulation in plants[J]. *Plant J*, 1993, 4(2): 215 - 223.
- [2] Kemple A R, Macpherson H T. Liberation of amino acid in perennial rye grass during witting[J]. *Biochem*, 1954(58): 45 - 49.
- [3] 程继东,安玉麟,孙瑞芬,等.抗旱、耐盐基因类型及其机理的研究进展[J]. *华北农学报*, 2006, 21(专辑): 116 - 120.
- [4] 杨强胜,唐晓蓉,邬晓红.林木耐旱技术研究进展[J]. *内蒙古农业科技*, 2006(5): 26 - 28.
- [5] 李勇,田自华.旱稻根系与抗旱性研究进展[J]. *内蒙古农业科技*, 2006(3): 9 - 10.
- [6] 高银.植物抗逆机制与基因工程研究进展[J]. *内蒙古农业科技*, 2007(5): 75 - 78.
- [7] 江香梅,黄敏仁,王明麻.植物抗盐碱、耐干旱基因工程研究进展[J]. *南京林业大学学报:自然科学版*, 2001, 25(5): 57 - 62.
- [8] Hong Z. Removal of feedback inhibition of 1-pyrroline-5-carboxylate synthase results in increased proline accumulation and protection of plants from osmotic stress[J]. *Plant Physiology*, 2000, 122: 1129 - 1136.
- [9] [美]萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 北京: 科学出版社, 1998: 19 - 22.
- [10] 孙瑞芬,安玉麟,张鹤龄,等.葡萄糖氧化酶基因植物表达载体的构建[J]. *华北农学报*, 2006, 21(6): 11 - 15.
- [11] Jefferson R A. The *Gus* report gene system[J]. *Nature*, 1989, 342: 837 - 838.