

经修饰的烟草几丁质酶基因的克隆及 多基因香蕉转化载体构建

阮小蕾, 李华平

(华南农业大学 植物病毒研究室, 广东 广州 510642)

摘要:从烟草中克隆得到1个经修饰的几丁质酶基因 *chi*, 将它与1个已经克隆的核糖体失活蛋白基因 *Cassin* 以及1个抗病毒的融合基因 *FBC* (CMV 香蕉株系的 CP 基因和 BBTV 的 Rep 基因) 共同构建在1个表达载体上, 得到多基因植物表达载体 pYLTAC747NH-c-C-FBC.

关键词:几丁质酶基因; 多基因组装; 植物表达载体

中图分类号: Q781, Q782

文献标识码: A

文章编号: 1001-411X(2008)01-0023-05

Cloning of a Modified Chitinase I Gene from Tobacco and Construction of a Plant Multiple Gene Expression Vector

RUAN Xiao-lei, LI Hua-ping

(Lab of Plant Virology, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

Abstract: The modified chitinase (*chi*) I gene was cloned from the *Nicotiana tabacum* cv. K326 after infected by TMV for 7 d. The plant expression vector, pYLTAC747NH-c-C-FBC contained *chi*, *Cassin* (a kind of RIP gene from *Cassia occidentalis*) and *FBC*, a fusion gene containing CP gene of CMV and replicase gene of BBTV was constructed with the vector system for multiple gene assembly and transformation.

Key words: chitinase gene; multiple gene assembly; plant expression vector

香蕉是一种重要的水果和粮食作物。香蕉生产面临着病毒病害和真菌病害的威胁^[1]。病毒病害主要有由香蕉束顶病毒 (*Banana Bunchy Top Virus*, BBTV) 引起的香蕉束顶病、由黄瓜花叶病毒 (*Cucumber Mosaic Virus*, CMV) 引起的香蕉花叶病、由香蕉线条病毒 (*Banana Streak Virus*, BSV) 引起的香蕉线条病等; 真菌病害主要有香蕉枯萎病和香蕉叶斑病^[2]。近几年来, 香蕉枯萎病在局部地区爆发以及快速传播, 使得香蕉生产面临更严峻的挑战^[2]。如何寻找有效方法来控制病害, 特别是防治枯萎病是当今香蕉生产面临的难点和热点。基因工程技术为植物病害防治开辟了一条崭新的途径。通过克隆致病病毒的外壳蛋白 (coat protein, CP) 基因、复制酶 (replicase, Rep) 基因等病毒来源的基因或片段, 并将之转

入受体植物中获得相应的病毒抗性已是一个成熟的策略^[3]。几丁质酶基因是一类重要的防卫基因, 其编码产物几丁质酶可水解真菌细胞壁的主要成分几丁质^[4]。核糖体失活蛋白 (ribosome inactivating protein, RIP) 是一类具有离体抑制真菌生长、增殖能力的蛋白质, 其抑制作用在有真菌细胞壁水解酶的协助作用下, 抑菌效果更为显著^[5]。研究发现, 很多 RIP 还具有广谱的植物病毒抗性和农业害虫抗性^[6]。本研究从烟草中克隆1个经过修饰的几丁质酶基因 *chi*, 将其与核糖体失活蛋白基因 *Cassin* (来源于药用植物望江南, 华南农业大学植物病毒研究室克隆) 以及1个抗病毒的融合基因 *FBC* (CMV 香蕉株系的 CP 基因和 BBTV 的 Rep 基因, 华南农业大学植物病毒研究室构建) 一起组装在植物表达载体上,

收稿日期: 2007-06-01

作者简介: 阮小蕾 (1973—), 女, 讲师, 博士; 通讯作者: 李华平 (1961—), 男, 教授, 博士, E-mail: huaping@scau.edu.cn

基金项目: 国家自然科学基金 (30370929); 广东省科技攻关项目 (C20209)

构建成一个多基因植物转化载体,为下一步开展对香蕉的遗传转化,进而筛选获得既抗真菌病害又抗病毒病害的香蕉新品种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 烟草 *Nicotiana tabacum* K326 采自华南农业大学植物病毒研究室。

1.1.2 菌株 大肠杆菌 *Escherichia coli* DH10B 由华南农业大学植物病毒研究室提供;NS3529 由华南农业大学遗传工程研究室提供。

1.1.3 质粒与载体 pYLTA747NH、pYLSV、pYLVVS 由华南农业大学遗传工程研究室刘耀光研究员提供;pBI525-*Cass*、pBI121-*FBC* 由华南农业大学植物病毒研究室提供;pMD-18 T 购自 TaKaRa 公司(大连)。

1.1.4 试剂 限制性内切酶、*Ex-Taq* DNA 聚合酶购自 TaKaRa 公司(大连)。自引导内切酶 I-Sce I、PI-Sce I 购自 New England Biolabs(NEB)公司。RT-PCR system access quick kit 购自 Promaga 公司。RNAPure 植物 RNA 抽提试剂盒购自天为时代公司。氨苄青霉素(Ampicilin, Amp)、卡那霉素(Kanamycin, Kan)、氯霉素(Chloramphenicol, CM)购自广州威佳公司。

PCR 引物由北京赛百胜生物工程有限公司合成;序列测定由上海联合基因生物工程有限公司完成。

1.2 方法

1.2.1 烟草中经修饰的 I 型几丁质酶基因的克隆

引物的设计:根据李继红等^[7]发表的序列,扩增烟草中将 C 端胞内表达信号肽序列去除的 I 类几丁质酶基因,使其可以分泌到胞外,对分布在细胞间隙的病原真菌能够起作用。其引物序列如下:

P_{JDI}:5'-gaa tga ggc ttt gta aat tca c -3',

P_{JJ2}:5'-cgt taa ttt cca aaa gac etc t -3'.

RT-PCR 扩增与 pMD-18 T 克隆:取由机械摩擦接种 *Tobacco Mosaic Virus*(TMV)2 周后的烟草 K326 叶片,以试剂盒提取其总 RNA,以 P_{JDI} 和 P_{JJ2} 为引物,用 RT-PCR 一步法进行扩增。按 RT-PCR system access quick kit 说明书进行。具体为:10 μ L 体系中,2 $\times$ master mix 5 μ L, P_{JDI} 与 P_{JJ2} 各 1 μ L, RNA 模板 1 μ L, AMV(40 U/ μ L)0.2 μ L,以水补足。45 $^{\circ}$ C 反转录 45 min,94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,50 $^{\circ}$ C 退火 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min,进行 35 个循环,然后 72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。将特异性扩增带回收,克隆于 pMD-18 T 上。

重组子鉴定与序列分析:经 PCR 与 *EcoR* I 和

Hind III 双酶切鉴定筛选出阳性重组子,将其送往上海联合基因生物工程有限公司测序。测序结果利用 NCBI 的 BLAST 程序进行分析。

1.2.2 多基因的组装 本试验采用的多基因组装系统由刘耀光^[8]创建。整个系统分为 3 个部分:受体载体 pYLTA747NH,供体载体 pYLVVS 和 pYLSV,含有 Cre 重组酶基因的大肠杆菌 NS3529。受体载体 pYLTA747NH 上不带有启动子和终止子元件,为使表达正确,要往上组装的所有基因均要带上启动子和终止子,构成完整的基因表达盒;并且为避免基因沉默,启动子要求尽量不同。故首先要将进行组装的基因进行系列亚克隆,使之符合要求;再将各目的基因分别组装到供体载体上;然后通过供体载体将目的基因轮流引入受体载体 pYLTA747NH,最终得到整合了多个基因的植物表达载体。

目的基因亚克隆:克隆得到的几丁质酶基因片段 *chi* 只是一个 cDNA 序列,不含有表达元件。要将其先亚克隆到含有 620 bp 的 35S 启动子序列、44 bp 的 AMV 增强子序列和 NOS 终止子序列的中间载体 pBI525 上,得到重组质粒 pBI525-*chi*。最终得到其完整表达盒片段。设计特异性引物,以克隆有核糖体失活蛋白基因——*Cass* 的质粒 pBI525-*Cass* 为模板,将 *Cass* 基因和 NOS 终止子序列部分扩增出来。再将 *Cass*-NOS 片段插入到质粒 pUC18-ubi 中 ubi 启动子的下游,得到了带有 ubi-*Cass*-NOS T 完整表达盒的质粒 pUC-ubi-*Cass*。ubi 启动子是从玉米中分离的,其启动转录的能力要比 35S 启动子强很多。质粒 pBI121-*FBC* 的结构中已经包括 *FBC* 的一个完整的表达盒。*FBC* 为 CMV 的 CP 基因与 BBTV 的 Rep 基因的融合基因。

目的基因往供体载体上的组装:选择合适的酶切位点将几丁质酶基因片段、*Cass*、*FBC* 3 个基因的完整表达盒片段分别克隆到供体载体 pYLVVS 和 pYLSV 上,通过酶切进行验证。

多基因的组装:将供体载体上带有的目的基因依次组装到受体载体 pYLTA747NH 上。其基本过程如下:第 1 轮循环是 pYLVVS-基因 1 和 pYLTA747NH 共转化大肠杆菌 NS3529。使 2 种质粒在其细胞内发生重组整合。用卡那霉素和氯霉素双抗筛选,再混收质粒转化到 DH10B,得到共整合质粒 pYLTA747NH -VS-基因 1。用 I-Sce I 切除 pYLVVS 骨架,有约 2 kb 的供体载体片段切出,用 T4 DNA 连接酶把整合载体和人工合成的寡核苷酸接头 LS(内设有 1 个 *Not* I 切点)连接成环状质粒,转化 DH10B,先用含卡那霉素的培养基选择抗卡那霉素的克隆,

再用含氯霉素的培养基,鉴定出不抗氯霉素的克隆。这一步骤完成后获得新质粒 pYLTA747NH——基因1,用 *Not* I 进行酶切鉴定。此质粒依靠供体载体又重新引回 *PI-Sce* I 位点,成为第2轮循环的受体载体,依此类推,得到整合了3个基因的植物表达载体。

2 结果与分析

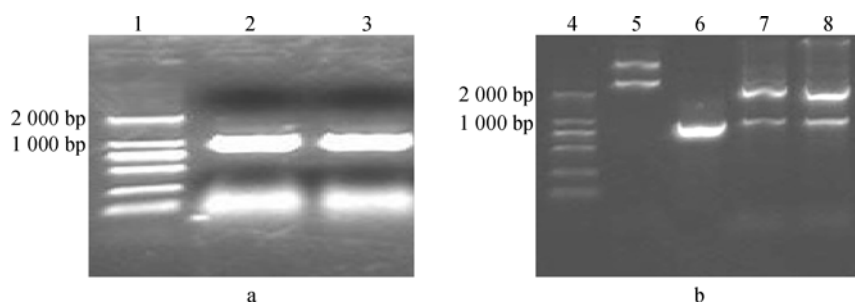
2.1 烟草中经修饰的 I 型几丁质酶基因的获得及序列分析

经 RT-PCR 扩增,得到明亮的约 1 kb 的条带(图 1a)。将其回收,克隆于 pMD-18 T 上。经 PCR 与双酶切鉴定(图 1b),筛选出阳性重组子。经测序得到 974 bp 的特异性扩增片段。

Blast n 程序分析,其编码区从第 3 个碱基开始,

到第 969 个碱基结束。编码区内只有起始密码子,没有终止密码子,不是一个完整的编码序列。其中 3 ~ 71 bp 为信号肽编码区。Blast x 分析表明:该基因片段共编码 322 个氨基酸,与烟草栽培种 Hawana 的几丁质酶前体蛋白(accession number:CAA34813)的氨基酸序列的相似性为 97.5%,与烟草栽培种 Samsen 几丁质酶前体蛋白(accession number:S44869)氨基酸序列的相似性为 88%,这说明不同的烟草品种中 I 类几丁质酶基因的序列存在差别。

完整的烟草 I 类几丁质酶(accession number:x16939)共有 988 个核苷酸,编码 329 个氨基酸。与之相比,我们得到的片段缺失了 22 个核苷酸。这 22 个核苷酸编码液泡导向肽的 7 个氨基酸——GI-IVDTM。我们的结果与预期相符。将此片段命名为 *chi*,在 GenBank 的登陆号为:EF183473。



1,4:DNA marker DL2000;2,3:RT-PCR 的特异性扩增条带;5:阳性重组质粒;6:阳性重组质粒的 PCR 检测;7,8:阳性重组质粒的酶切鉴定
 1,4:DNA marker DL2000;2,3:RT-PCR products of *chi*;5:the positive plasmid;6:PCR of positive plasmids;7,8:positive plasmids cleaved with *Eco*R I and *Hind* III

图1 *chi* 基因 RT-PCR 的扩增结果(a)及阳性转化子的 PCR 及酶切鉴定(b)

Fig.1 Electrophoresis analysis of RT-PCR products of *chi*(a) and PCR and restriction analysis of recombinant plasmids(b)

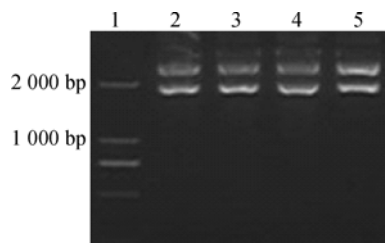
2.2 3 个基因完整表达盒的鉴定

将质粒 pBI525-*chi* 用 *Eco*R I 和 *Hind* III 双酶切,得到 1 888 bp 的 *chi* 的完整表达盒片段。将质粒 pUC-ubi-*Cassin* 用 *Hind* III 和 *Sac* I 双酶切,得到约 3 kb 的 *Cassin* 的完整表达盒片段。

以 *Hind* III 和 *Eco*R I 双酶切质粒 pBI121-FBC,切出约 2 100 bp 的 *FBC* 完整表达盒条带,其构成是:35S-FBC-Nos T。

2.3 目的基因往供体载体上的组装

将 *chi* 的完整表达盒构建到载体 pYLSV 的 *Eco*R I 和 *Hind* III 位点之间,得到重组质粒 pYLVS-*chi*。将 *Cassin* 完整表达盒构建到载体 pYLSV 的 *Hind* III 和 *Sac* I 位点之间,得到重组质粒 pYLSV-ubi-*Cassin*。将 *FBC* 的完整表达盒构建到载体 pYLSV 的 *Eco*R I 和 *Hind* III 位点之间,得到重组质粒 pYLVS-FBC。图 2、3 分别展示了质粒 pYLVS-*chi*、pYLSV-ubi-*Cassin* 的酶切验证结果。



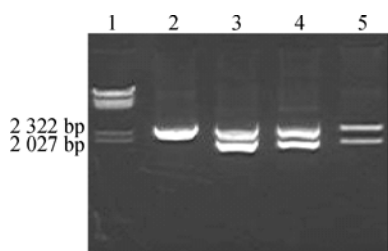
1:DNA marker DL2000;2~5:pYLVS-*chi*/*Eco*R I 和 *Hind* III
 1 DNA marker DL2000;2~5:pYLVS-*chi*/*Eco*R I and *Hind* III

图2 pYLVS-*chi* 的酶切鉴定

Fig.2 Restriction analysis of pYLVS-*chi*

2.4 多基因植物表达载体的获得及鉴定

将 *chi*、*Cassin*、*FBC* 顺序整合于受体载体,得到共整合质粒 pYLTA747NH- c-C-FBC。经过 *Not* I 酶切(图 4),第 5 泳道除 pYLTA747NH 载体上切出的潮霉素抗性基因的 2 条带外,还有约 1.9 ~ 2.0 kb、约 3 kb 的共 4 条带切出。其中 1.9 ~ 2.0 kb 的条带含有 *chi* 和 *FBC* 的 2 个完整表达盒片段(*chi* 和 *FBC* 的 2 个完整表达盒片段分别为 1.9 kb 和 2.1



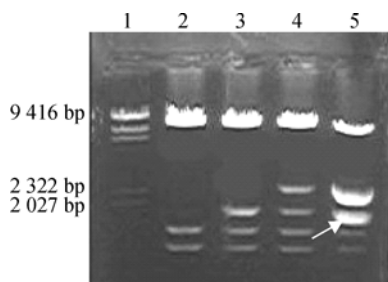
1: DNA marker λ /Hind III; 2: 重组质粒; 3~5: pYLSV-ubi-Cassin/ Hind III 和 Sac I

1: DNA marker λ /Hind III; 2: recombinant plasmid; 3~5: pYLSV-ubi-Cassin/Hind III and Sac I

图3 pYLSV-ubi-Cassin 的酶切验证

Fig. 3 Restriction analysis of pYLSV-ubi-Cassin

kb, 由于2个表达盒片段相近, 故分不出明显酶切条带, 只在约2 kb处有1条共迁移带出现, 约3 kb的条带为Cassin完整表达盒片段, 与预期相符. 质粒pYLTAC747NH-c、pYLTAC747NH-c-C为分别整合了1个及2个基因的中间载体.



1: DNA marker λ /Hind III; 2: pYLTAC747NH; 3: pYLTAC747NH-c; 4: pYLTAC747NH-c-C; 5: pYLTAC747NH-c-C-FBC (箭头所指为相近片段的共迁移带 arrow indicate bands with two comigrating fragments)

图4 质粒 pYLTAC747NH-c、pYLTAC747NH-c-C、pYLTAC747NH-c-C-FBC Not I 的酶切分析

Fig. 4 Restriction analysis of pYLTAC747NH-c、pYLTAC747NH-c-C、pYLTAC747NH-c-C-FBC/Not I

3 讨论

随着转基因技术的不断发展, 对多个基因同时表达及调控的研究越来越显得重要而有意义. 基因工程操作也从单基因转向多基因的操作. 因此, 多基因转化技术应运而生.

长期以来, 香蕉的真菌病害和病毒病害一直是香蕉生产的主要制约因子. 抗病育种是控制病害的一种经济有效的手段. 但遗憾的是当今大部分香蕉栽培种基本上是三倍体, 高度不育, 不能通过常规方法来进行杂交育种^[9]. 对于病毒病害, 已有较成熟的抗病策略. 对于香蕉的病毒病害, 华南农业大学植物病毒研究室已克隆了CMV、BBTV等多个基因组分^[10-16]. 在现有的转基因植物中, 鲜见培育既抗真菌又抗病毒的转基因植物报道; 在香蕉上也鲜见

抗真菌病害转基因研究的报道^[17].

几丁质酶与 β -1,3-葡聚糖酶基因经常被用在植物抗真菌基因工程中^[18]. 将二者共同转入植物中, 会得到更好的抑菌效果^[18]. Zhu等^[19]报道将水稻碱性几丁质酶基因和苜蓿酸性 β -1,3-葡聚糖酶基因转入烟草植株, 发现2种基因联合转入对真菌*Cercospora nicotianae*的抗性比只转入1种基因的烟草更强. 使用RIP已成为植物真菌病害防治的新途径^[20]. Jach等^[21]报道了大麦I型RIP单基因转化烟草, 其转基因植株对立枯丝核菌等有一定的抗性. 随后他们又发现该抑制作用在有真菌细胞壁水解酶的协助下, 抑菌效果更为显著. I型RIP胞外毒性较弱, 要使其表现较强的杀菌作用, RIP能否进入真菌细胞内部是抑菌效果的关键^[22]. 将几丁质酶基因、葡聚糖酶基因和I型RIP基因构建在一个植物表达载体上, 使其大量表达, 则通过几丁质酶、葡聚糖酶对真菌细胞壁的水解使I型RIP进入真菌细胞内部, 将致死性抑制真菌蛋白的合成, 强烈抑制真菌的感染^[5]. 这个思路已经在很多试验中取得了成功^[23-24].

本研究通过克隆1个抗真菌病害的烟草几丁质酶基因, 并将它与1个既抗真菌又抗病毒的核糖体失活蛋白基因以及1个抗病毒的融合基因分别构建完整的表达盒, 每个基因的2端都具有各自的启动子、终止子等元件; 然后将它们依次组装在1个植物表达载体上, 通过1次转化香蕉外殖体或悬浮系细胞, 从转化植株中有可能筛选到既抗真菌病害又抗病毒病害的香蕉新品种.

在不同烟草品种中, 已有多类几丁质酶基因被克隆^[4,25]. 本研究中, 新克隆的*chi*与其他发表的烟草栽培种的I类几丁质酶基因的氨基酸序列比较发现他们的相似性为88%~97.5%, 这表明来源于烟草的几丁质酶基因是非常保守的.

运用基因枪法、常规的含单基因载体的农杆菌共转化或重复转化法、转基因植株杂交法等都能将多基因导入受体. 但这些方法存在较大的弊端. 主要表现在: 易导致基因沉默(如基因枪法), 费时且工作量大(如农杆菌转化法和杂交法), 而且对于那些依赖于营养繁殖的植物(如香蕉)则没有办法通过转基因植株杂交法来获得多基因转化植株.

本研究所采用的多基因植物转化载体系统开发于2003年^[8]. 通过利用位点特异性重组系统Cre/lox p和Homing endonucleases, 基于TAC载体的接受载体与2种供给载体交替重组可以不断引入外源DNA片段. Lin等^[8]利用这一系统构建了2个多基因转化载体, 其中载体pYLTAC747H-GMBXRRPGM,

约 50 kb, 经过了多轮重组循环, 聚合了多个外源 DNA 片段。本研究的下一步工作是: 进一步克隆多个抗病基因(包括 $\beta-1,3$ -葡聚糖酶基因等), 将其依次组装于这个植物表达载体, 转入到相关植物中, 验证多基因的转化是否赋予了转基因植株对真菌、病毒和细菌等病原物的多重抗性。

参考文献:

- [1] 王子齐. 台湾香蕉研究的成绩与展望[J]. 台湾农业状况, 1991(1): 21-23.
- [2] 杨连珍. 香蕉品种遭遇病害威胁[J]. 世界热带农业信息, 2003(12): 26-27.
- [3] 王金生. 分子植物病理学[M]. 北京: 中国农业出版社, 1999.
- [4] 欧阳石文, 赵开军, 冯兰香. 植物几丁质酶的研究进展[J]. 生物工程进展, 2001, 21(4): 30-34.
- [5] 单丽波, 贾旭. 核糖体失活蛋白及其在植物抗真菌基因工程中的应用[J]. 生物工程进展, 2000, 20(6): 74-78.
- [6] 侯法建, 刘望夷. 植物核糖体失活蛋白的研究进展[J]. 世界科技研究与发展, 1999, 22(5): 68-72.
- [7] 李继红, 邵寒霜, 郑学勤. 烟草类几丁质酶 $\beta-1,3$ -葡聚糖酶 cDNA 的克隆和序列分析[J]. 农业生物技术学报, 1997, 5(2): 125-130.
- [8] LIN L, LIU Y G, LI B J, et al. Efficient linking and transfer of multiple genes by a multigene assembly and transformation vector system [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 2003, 100(10): 5962-5967.
- [9] 郑耘, 李华平, 范怀忠. 香蕉抗病基因工程[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(8): 39-42.
- [10] 李华平. 侵染香蕉的黄瓜花叶病毒株系特征及衣壳蛋白基因的遗传转化研究[D]. 广州: 华南农业大学资源环境学院, 1995.
- [11] 肖火根, HU J, 李华平, 等. 香蕉束顶病毒基因克隆和序列分析[J]. 病毒学报, 1999, 15(1): 55-63.
- [12] 何自福, 李华平, 肖火根, 等. BBTV 两个株系组分 I 的克隆和序列分析[J]. 植物病理学报, 2000, 30(4): 364-369.
- [13] 何自福, 李华平, 肖火根, 等. 香蕉束顶病毒中国分离株 DNA-6 的基因克隆和序列分析[J]. 病毒学报, 2000, 16(2): 185-188.
- [14] 何自福, 肖火根, 李华平, 等. BBTV 两个株系组分 III 的克隆和序列分析[J]. 农业生物技术学报, 2000, 9(2): 145-148.
- [15] 徐春香, 李华平, 肖火根, 等. 香蕉束顶病毒 DNA 组分 4 的克隆与序列分析[J]. 病毒学报, 2001, 17(3): 288-291.
- [16] 徐春香, 肖火根, 李华平, 等. 香蕉束顶病毒组分 2 的克隆与序列分析[J]. 植物病理学报, 2001, 32(2): 189-191.
- [17] 阮小蕾. 香蕉抗病基因克隆及多基因植物表达载体构建[D]. 广州: 华南农业大学资源环境学院, 2005.
- [18] 于金凤, 张修国, 张天宇. 植物抗真菌基因工程研究进展[J]. 山东农业大学学报, 2003, 34(1): 148-151.
- [19] ZHU Q, ERLEEN A M, SAMEER M, et al. Enhanced protection against fungal attack by constitutive co-expression of chitinase and glucanase genes in transgenic tobacco [J]. Bio/Technol, 1994, 12: 807-812.
- [20] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理和技术[M]. 北京: 科学技术出版社, 2001.
- [21] JACH G, MUNDY J, GORMHARDT B, et al. 1995. Enhanced quantitative resistance fungal disease by combinatorial expression of different barley antifungal proteins in transgenic tobacco[J]. Plant J, 1995, 8: 97-109.
- [22] 李建国. 核糖体失活蛋白的研究进展[J]. 分子植物育种, 2005, 3(4): 566-570.
- [23] 冯道荣, 卫剑文, 李宝健. 转多个抗真菌蛋白基因水稻植株的获得及其抗稻瘟病菌的初步研究[J]. 中山大学学报: 自然科学版, 1999, 38(4): 62-66.
- [24] 冯道荣, 许新萍, 李宝健. 多个抗病抗虫基因在水稻中的遗传和表达[J]. 科学通报, 2000, 45(15): 1593-1599.
- [25] 崔欣, 杨庆凯. 植物几丁质酶在抗真菌病害基因工程中的应用[J]. 植物保护, 2002, 28(1): 39-42.

【责任编辑 周志红】