

# 中国栽培大豆“中油83-14”11S种子贮存蛋白基因的分子克隆

杜杰 刘阳 范云六

(中国农业科学院生物技术研究中心分子生物学研究室, 北京)

利用植物cosmid载体PEND4K, 以国内高蛋白栽培大豆“中油83-14”为材料, 构建了含30Kb以上DNA片段的基因文库。用野豌豆(*Vicia faba*)豆球蛋白基因的克隆为探针, 对构建的cosmid文库进行杂交发现野豌豆豆球蛋白基因与“中油83-14”大豆的基因组克隆(genomic clones)有杂交, 说明两者之间有同源性, 杂交强度不同, 并且这些克隆的酶谱不同; 说明这些克隆为豆球蛋白基因组分。大豆球蛋白基因的分子克隆为高表达的大豆球蛋白基因的利用提供了基础, 是作物遗传工程改良的主要一步。

**关键词** 植物cosmid载体; cosmid基因文库; 高含量种子贮存蛋白; 大豆球蛋白; 同源性

以Ti质粒为基础的植物载体中, 引入 $\lambda$ 噬菌体的cos位点, 提供了把分离和克隆的植物基因直接转移到异源植物中的可能性<sup>[1,2]</sup>。

大豆豆球蛋白(Glycinin又称Legumin)具有11S的沉降系数, 是大豆种子中含量最多的蛋白, 是决定大豆营养的主要成份, 大豆种子贮存蛋白11S中, 甲硫氨酸的含量比7S蛋白要丰富得多, 因此研究11S的种子贮存蛋白基因, 对于植物营养改良的基因工程具有更重要的意义。

豆球蛋白不仅在大豆种子中存在, 在其它豆科种子中如豌豆、花生, 甚至在某些非豆科植物种子中, 如燕麦、烟草、向日葵等也存在。对于这些豆球蛋白DNA之间有无同源性, 还不很清楚, 了解不同植物种子中豆球蛋白基因的同源性, 对于作物品质改良也是很重要的。

本文利用近年发展起来的植物cosmid载体, 构建了国内优质栽培大豆“中油83-14”的基因文库, 得到具有不同杂交强度的克隆, 为进一步分离利用和改良大豆球蛋白基因奠定了基础。

## 材料与amp;方法

### (一) 材料

#### 1. *Escherichia coli*菌株:

HB101( $F^-$ , hsd20( $r_{\text{H}}^{\text{m}}\text{m}^{\text{B}}$ ), recA13, ara-14, proA2, lacY, galK2, rpsL20( $\text{Sm}^r$ ), xyl-5, mtl-1, supE44,  $\lambda^-$ )

LE392( $F^-$ , hsdR514( $r_{\text{K}}^{\text{m}}\text{m}^{\text{K}}$ ), supE44, upF58, lacY,  $\text{or}_{\Delta}$ (lacIZY)6, galK2, galT22, metB1, trpR55,  $\lambda^-$ )

BHB2688(N205, recA $^-$ ( $\lambda$ imm<sup>434</sup>, cIts, b2, red $^-$ , Eam, Sam)/ $\lambda$ )

BHB2690(N205, recA $^-$ ( $\lambda$ imm<sup>434</sup>, cIts, b2, red $^-$ , Dam, Sam)/ $\lambda$ )

2. HB101(pEND4K)由E. W. Nester教授惠赠。pEND4K<sup>[2]</sup>质粒具有广谱复制子, 能在*E. coli*和*Agrobacterium tumefaciens*中稳定存在; 带有T-DNA的两个边界序列, 能使克隆到其中间的外源DNA整合到植物基因组中, nos-npt基因, 提供了转化植物的筛选标记; 引入

本文于1987年6月15日收到。



体所建构。本文首次报道用植物cosmid载体建成植物基因文库。它具有许多优点:

(1) 克隆片段大,一般在30kb以上,而 $\lambda$ 载体一般为15kb左右。由于植物基因组分子量大,且许多性状为多基因决定,因此要求克隆的片段大一些为好。同时cosmid文库还适宜“chromosome walking”的基因分离。(2) 由于植物cosmid载体有T-DNA的边界序列,提供了外源基因整合到植物基因组的条件。所以插入的外源植物基因可以很容易地转移到其它植物中去,这也为利用“遗传拯救”(genetic rescue)分离植物基因提供了可能<sup>[8]</sup>。 $\lambda$ 载体则不同,需经过亚克隆到Ti载体上等操作,才能转移到植物中。

我们已经成功地把pEND 4K的nos-npt基因转移到烟草中,分子杂交证明了此基因在植物体中存在,并可通过有性生殖传递到子一代中,建立了植物遗传转化系统<sup>[6]</sup>。说明pEND 4K具有植物运载体的功能。目前,我们正利用植物cosmid可直接转移的优点,把“中油83-14”文库中与豆球蛋白杂交阳性克隆的DNA向百脉根等植物导入。

有人分析<sup>[7]</sup>用ccsmid来建构植物基因文库有两个困难:(1)不易得到两端均有粘性末端的大片段DNA,(2)由于某些不清楚的原因,不易得到高频率的体外包装。在我们的实验中,对建构的各个步骤进行了优化研究,结果表明:我们在得到两端均是粘性末端的大片段DNA的基础上得到 $4 \times 10^5$ 克隆/ $\mu\text{g}$  DNA,达到了建立完整植物基因文库的要求,因此,以植物cosmid建构植物基因文库是完全可行的。

同位素杂交结果表明:大豆基因文库中存在野豌豆11S贮存蛋白基因的同源区,杂交强度不同提示这些是11S基因族中不同成分。

一般的栽培大豆蛋白质含量在30—40%之间,而我们所用的“中油83-14”具有高蛋白质特点,高达49%,我们推测该品种的11S种子贮存蛋白具有高表达的特性。进一步研究“中油83-14”大豆11S种子贮存蛋白基因克隆,将为11S种子贮存蛋白基因及其启动子,在大豆和其他作物品质改良上提供可能性。

## 参 考 文 献

- [1] An, G. et al.: *EMBO J.*, 4:277—284, 1985.
- [2] Harry, J., Klee, et al.: *Bio/Technology*, 3:637—643, 1985.
- [3] Maniatis, T. et al.: *Molecular Cloning*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- [4] Lichtenstein and Draper: J. In *DNA Cloning*, Vol. 2, ed. by D. M. Cloves, IRL Press, p. 102, 1985.
- [5] 陈瑞春, 范云六: *微生物学报*, 27(1):30—36, 1987.
- [6] 杜杰, 范云六: *生物工程学报*, 4(2):110—118, 1988.
- [7] Croy, R. R. D. and Gatehouse, J. A.: in *Plant Genetic Engineering*, ed. by John H. Dodds, Cambridge University Press, 1985.
- [8] Polacco, J. C.: In *“Applications of Genetic Engineering to Crop Improvement”*, ed. by Collins, G. B. and Fetolino J. G., Martinus Nijhoff/Dr. W. Junk Publishers, pp. 255—304, 1984.

# MOLECULAR CLONING OF 11S SEED STORAGE PROTEIN GENE OF CHINESE CULTIVAR SOYBEAN “ZHONG YOU 83-14”

Du Jie Liu Yang Fan Yunliu

(Laboratory of Molecular Biology, Biotechnology Research Center, Chinese  
Academy of Agricultural Sciences, Beijing)

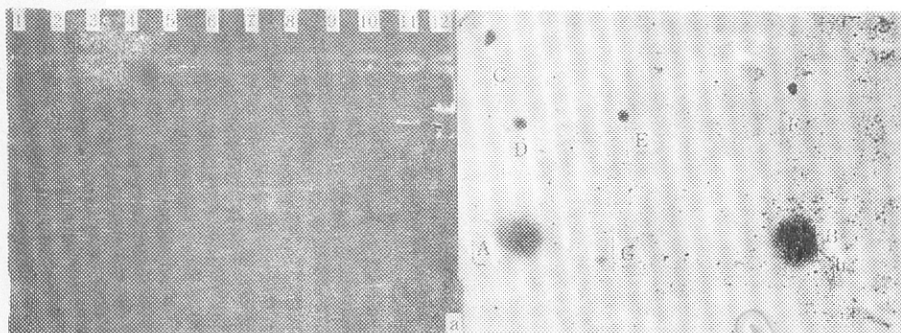
Cosmid genomic library of Chinese cultivar Soybean “Zhong You 83-14”, which contains high seed storage protein up to 49%, was constructed using plant cosmid vector pEND4K. Sizes of plant DNA in genomic clones are 30—35kb.

The library was screened by colony hybridization using the radioactively labelled legumin gene of *Vicia faba*. Screening about  $10 \times 10^4$  recombinants with a legumin gene as a probe yield 11 clones. This result shows that there is homology between legumin gene of *Vicia faba* and of Chinese cultivar Soybean “Zhong You 83-14”.

The differences in hybridization strength and restriction mapping suggest that those clones may contain different genes of legumin gene family. Molecular cloning of Chinese cultivar Soybean legumin gene is a basic step for seed crop improvement by genetic engineering and may provide a model for study of high expression of Soybean legumin gene.

## Key words

Plant cosmid vector; cosmid library; high seed storage protein contents; legumin; homology



a. 蔗糖梯度密度离心回收30kb片段

11 孔道为 $\lambda$  Xba I, 大片段为24kb

12 孔道为 $\lambda$  Sal I, 分别为32.7kb, 15.3kb

7 孔道为约30kb DNA, 1—10孔道为分离的大小不同的DNA

b. 菌落原位杂交的放射自显影图

A, B为阳性对照; C, D, E, F, G为阳性克隆

a. Preparation of 30kb fragment of plant DNA, by centrifugation through a sucrose density gradient

Lane 11:  $\lambda$  XbaI larger fragment is 24kb

Lane 12:  $\lambda$  SalI 32.7kb and 15.3kb

Lane 7: 30kb fragment

Lane 1—Lane 10: Different DNA fraction from sucrose gradient

b. Autobiography of in situ colony hybridization

A, B, are positive control

C, D, E, F, G are positive clone