

烟草 β -1, 3-葡聚糖酶 cDNA 克隆、大肠杆菌 表达及植物表达载体的构建

蓝海燕 田颖川* 张丽华 刘桂珍 王兰岚 陈正华

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

(中国科学院遗传研究所 北京 100101)

摘 要 用 0.15% 乙烯利诱导烟草幼苗后,提取叶片总 RNA,并通过反转录及多聚酶链式反应(RT-PCR)扩增出 β -1, 3-葡聚糖酶基因的 cDNA。将其克隆至载体 pBluescript SK 后,完成了此基因的全序列分析。测序结果表明:所克隆的 cDNA 除第 1008 位碱基与所报道的不同外,其它序列完全一致。为制备抗血清,构建了此基因的大肠杆菌表达载体,并在表达宿主菌 BL21(DE3)plysS 中得到表达,进行了 Western blot 分析。同时,还构建了此基因的植物表达载体。

关键词 β -1, 3-葡聚糖酶 cDNA, 序列分析, Western blot 分析, 大肠杆菌表达, 植物表达载体
学科分类号 Q 753

β -1, 3-葡聚糖酶(EC3.2.1.39)在高等植物中广泛存在。70 年代以前,对此酶的研究主要集中于它对植物本身不同发育阶段的作用,如:种子中葡聚糖的降解、细胞延长、花粉管伸长、四分体小孢子发育、育性及韧皮部胼胝质去除等^[1]。以后在病原物侵染的植物中检测到大量 β -1, 3-葡聚糖酶的存在,且发现它在体外可以降解病原真菌细胞壁并释放出寡糖激发子进而诱导植物其它的防御反应^[2]。由此对 β -1, 3-葡聚糖酶的研究开始集中于抗病方面^[3, 4]。目前, β -1, 3-葡聚糖酶基因在植物抗病基因工程研究中已被认为是最具吸引力的基因之一^[5]。已从植物中克隆到一些葡聚糖酶基因并导入烟草,其含量比非转化植株高约 2 倍,而导入其反义 mRNA 的植株中此酶活性明显低于非转化植株^[6]。表达该基因的烟草植株能有效抵抗赤星病和黑胫病^[7],对根黑腐病也有一定抗性^[6]。尤其与几丁质酶结合,其抗病力和抗病菌种类都增加,因此把这两种基因同时导入植物是近期人们研究的焦点^[10]。

本研究对烟草 β -1, 3-葡聚糖酶基因 cDNA 进行了克隆和全序列测定,获得了大肠杆菌表达产物,并制备了抗血清,完成了表达产物的 Western blot 分析。同时构建了此基因的植物表达载体,并且正在进行植物转化。这些工作为利用该基因与其它抗病基因构建双价或三价的表达载体及培育广谱抗真菌品种的研究创造了条件。

本研究由中国科学院植物生物技术实验室和国际科学与文化中心(ICSC)世界实验室资助。

收稿日期:1997-07-29, 修回日期:1998-03-24。

1 材料与方 法

1.1 菌种与质粒

大肠杆菌 DH5 α 为受体菌,大肠杆菌 BL21 (DE3)plysS 为大肠杆菌表达宿主菌,pB48.212 为植物表达载体,以上菌种和质粒由中科院微生物所提供。克隆和测序载体 pBluescript SK 为 Clonetech 公司产品。大肠杆菌表达载体 pET11d 为 Novagen 公司产品。

1.2 植物材料

制备总 RNA 所用烟草品种(NC89)为微生物所温室培育 3 个月的幼苗。

1.3 酶与试剂

各种限制酶购自 Boehringer mannheim、BRL、Bio-Lab 及 Promega 等公司。AMV 反转录酶为 Promega 公司产品;Taq DNA 聚合酶购自上海生物工程有限公司;T4DNA 连接酶购自 Bio-Lab 公司;Wizard PCR preps DNA purification system 购自 Promega 公司;T7 DNA Sequencing Kit 为 Pharmacia 公司产品; α -³²P-dCTP、 α -³³P-dCTP 和 α -³⁵S-dATP 购自 NEN 公司;PCR 引物由上海生物工程有限公司合成。

1.4 烟草的处理及总 RNA 的提取

用 0.15% 的乙烯利处理 3 个月左右的烟草幼苗,用塑料袋密封整个植物株,22h 后取其中部叶片。用热酚法^[11,12]制备总 RNA。

1.5 目的基因第一链 cDNA 的合成、PCR 扩增及克隆

以 1 μ g 烟草总 RNA 为模板,以 Oligo(dT)₁₂₋₁₈ 或基因 3' 端引物为本实验所用引物,按 Promega AMV 反转录酶说明书所述反应条件,合成单链 cDNA。

根据 Shinshi 等(1988)报道的烟草 β -1,3-葡聚糖酶基因序列^[13],设计了包含 N 端信号肽及 C 端胞内导向肽序列在内的 PCR 扩增反应的两个引物:

5'端引物:5' >GC GGATCC GACCATGG CTGCTATCACACTCC <3'

3'端引物:5' >CG GTCGAC CTCACATCTCACTTACGAGA <3'

为了便于克隆及进一步构建二元植物表达载体,分别在 5' 端和 3' 端引物中引入了 BamH I 和 Sal I 限制酶位点。为了使目的基因在植物中更好地表达,在 5' 端引物中还引入了 Kozak 序列(Lutcke 等,1987)^[14]。另外,在 Kozak 序列中隐含一个 Nco I 位点,这有利于下一步构建大肠杆菌表达载体。

取 2 μ l 反转录产物,在 20 μ l 体系中进行目的基因的 PCR 扩增。条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 2min,94 $^{\circ}$ C 变性 1min,55 $^{\circ}$ C 复性 1min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1min,共 30 个循环。

用 Wizard PCR Preps DNA Purification system 纯化 PCR 产物;用 BamH I 和 Sal I 酶切后与同样双酶切的 pBluescript SK 连接,在含 IPTG(异丙基硫代- β -D-半乳糖苷)和 X-gal(5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷)的氨苄 LB 平板上筛选白色重组克隆^[15]。

1.6 DNA 序列分析

利用所挑选的重组克隆,根据 β -1,3-葡聚糖酶基因的限制酶图谱,分别用其上 600bp 处的 Hinc II 和 750bp 处的 Xho I 位点与载体上 3' 端多克隆位点上的相同位点,对重组克隆做单酶切,挑选分别含有 600bp 和 750bp 插入片段的重组亚克隆,按常规双脱氧链终止法原理,用 Pharmacia T7 Sequencing Kit 说明书的方法进行序列分析。

1.7 大肠杆菌表达载体的构建及表达分析

将大肠杆菌表达载体 pET11d 用 BamH I 酶切, Klenow DNA 聚合酶补平后, 再用 NcoI 酶切, 同时将含有 β -1, 3-葡聚糖酶基因重组质粒 pSGL-h36 用 Sal I 酶切、klenow DNA 聚合酶补平, 再用 Nco I 酶切后, 回收 1.1kb 片段, 与上述载体连接, 筛选重组质粒并转入大肠杆菌表达宿主菌 BL21(DE3)plysS 中。按 Novagen 公司 pET System 手册提供的方法培养菌体。待菌液 OD₆₀₀ 值达 0.8~1.0 时, 加入 IPTG 至 1mmol/L 诱导表达, 同时设空载体和重组载体的非诱导处理为对照。分别在诱导开始 1h、2h、3h 时各取 1ml 菌液, 离心收集菌体, 加入 200 μ l 上样缓冲液 (50mmol/L Tris-HCl, pH6.8; 2% SDS; 10% 甘油; 5% 巯基乙醇; 0.1% 溴酚蓝) 100 $^{\circ}$ C 煮沸 4min, 取 1/10 体积上清液按文献[15]方法进行 SDS-PAGE 分离, 用考马斯亮蓝染色, 鉴定基因表达产物。用蛋白质扫描仪对 SDS-PAGE 干胶进行扫描, 分析表达量。

1.8 大肠杆菌表达产物的抗血清制备及 Western blot 分析

完成 SDS-PAGE 电泳分离之后, 将胶浸泡在 0.25mol/L KCl 溶液中至白色蛋白条带显现, 将目的条带切出, 用蒸馏水冲洗 3 次后, 将其冷干, 交中科院遗传所动物中心制备兔抗血清。

Western blot 分析中 SDS-PAGE 电泳与 1.7 中所述相同, 利用半干转移仪将电泳蛋白转至硝酸纤维素膜上, 然后按 Sambrook^[15]所述方法处理膜, 其中一抗 (即兔抗血清) 按 1:1000 稀释。二抗为碱性磷酸酶, 按 1:3000 稀释, 加入显色底物 BCIP/NBT, 在室温暗中显色数分钟, 待所需条带出现后, 用水冲洗停止反应。

1.9 植物表达载体的构建

重组质粒 pSGL-h36 的酶解、DNA 片段回收及植物表达载体 pB48.212^[16]的连接等参照文献[15]进行。

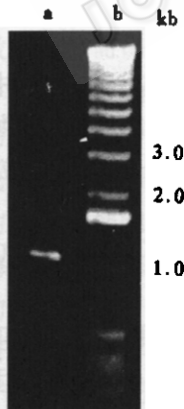


图 1 烟草 β -1, 3-葡聚糖酶 cDNA PCR 产物电泳图

Fig. 1 Electrophoresis of RT-PCR product from tobacco β -1, 3-glucanase cDNA
a. RT-PCR product; b. 1kb DNA Ladder

2 结果与讨论

2.1 烟草 β -1, 3-葡聚糖酶基因单链 cDNA 的合成和 PCR 扩增

在植物中, 健康植株的 β -1, 3-葡聚糖酶的含量很少, 但在病原物或激素等诱导下, 植物会合成大量的 β -1, 3-葡聚糖酶和几丁酶等^[17]。因此, 我们以诱导烟草总 RNA 为模板, 通过反转录合成单链 cDNA, 再以反转录产物为模板, 按所设计的反应条件进行 PCR 扩增, 以期高效地扩增出目的基因片段。1% 琼脂糖凝胶电泳分析表明: PCR 产物为大小约 1.1kb 的片段, 与预期的分子量值一致 (图 1)。

2.2 烟草 β -1, 3-葡聚糖酶 cDNA 的克隆和全序列分析

将扩增的 1.1kb 片段用 BamH I 和 Sal I 双酶切后插入同样双酶切的 pBluescript SK 中, 获得重

组质粒 pSGL-h36(图 2)。将此质粒用 Bam H I 和 Sal I 双酶切后得到一个 1.1kb 的片段,表明 β -1,3-葡聚糖酶 cDNA 已正确插入到克隆载体中(资料略)。

利用基因内部的 2 个单一酶切位点 Hinc II 和 Xho I 与载体上多克隆位点的 Hinc II 和 Xho I 做单酶切,构建 2 个分别为含 600bp 的 BamH I-Hinc II 片段和 750bp 的 BamH I-Xho I 片段的亚克隆。利用 T3 和 T7 引物对全长克隆及亚克隆进行双向测序。序列分析结果表明:该 cDNA 的开放阅读区全长 1077bp,编码 359 个氨基酸,与国外报道的 β -1,3-glucanase cDNA (Shinshi 等,1988)比较,序列基本一致。只有第 1008 位碱基发生变化,其对应密码子由 TTT 变成 TTC,但编码的氨基酸未变,证明了此基因的正确性。

我们对烟草 I 类碱性 β -1,3-葡聚糖酶基因进行了全序列克隆(包括 5'端信号肽序列、成熟蛋白基因序列和 3'端胞内导向肽序列)。在目前的一些报道中^[18]认为 I 类碱性葡聚糖酶导向液泡,而真菌菌丝体

最初是在胞间隙延伸,因此不能有效抑制真菌生长。Melchers 等^[9,19]对 I 类 β -1,3-葡聚糖酶基因及几丁酶基因进行了 3'端修饰,去掉了 C 端胞内导向肽序列后导入烟草,结果转基因植株中两种酶均表达于细胞间隙。李继红等^[20]亦做了有关方面的尝试,但均未有抑菌试验结果的报道。在植物体内,I、II 和 III 类 β -1,3-葡聚糖酶具有严格的分室定位^[21],而只有位于液泡的 I 类碱性葡聚糖酶才具有抑菌活性,这样,此类液泡中的酶一旦位于胞外,是否对细胞本身的结构有不利作用。因为 β -1,3-葡聚糖酶的底物在植物中大量存在,如在叶、根茎毛、花粉母细胞、花粉粒、胚珠等中^[22]。在发育的花药中,此酶对小

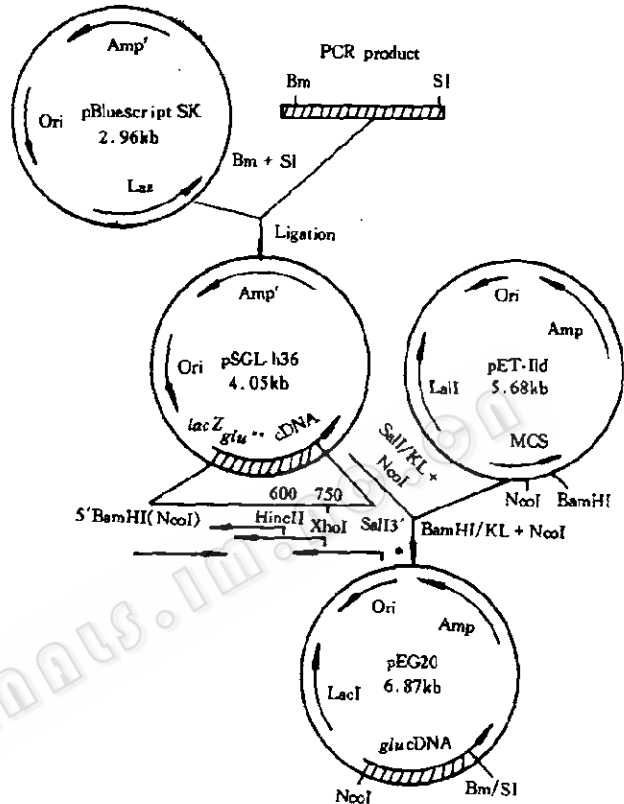


图 2 β -1,3-葡聚糖酶 cDNA 克隆 pSGL-h36 及大肠杆菌表达载体 pEG20 构建图

Fig. 2 Construction map of β -1,3-glucanase cDNA clone pSGL-h36 and *E. coli* expression vector pEG20

* Arrows below the restriction map of pSGL-h36 represent subcloning and sequencing direction in sequence analysis

** *glu* - β -1,3-glucanase

孢子的发育起到重要调节作用^[23,24]。因此,关于此酶分泌到胞外对植物本身结构和发育是否有影响还有待研究。本文拟在克隆到的 β -1,3-葡聚糖酶全序列基因基础上,再对其去除 3'端胞内导向肽序列的基因进行研究,以对两者之间在抗病性方面的差异及对转基因植物生长发育的影响做一全面了解,为进一步的研究工作打下基础。

2.3 大肠杆菌表达载体的构建、表达及 Western blot 分析

为了制备 β -1,3-葡聚糖酶的抗血清,将序列分析为正确的重组克隆 pSGL-h36 中的 β -1,3-葡聚糖酶基因按材料与方法部分所述与大肠杆菌表达载体 pET-11-d 连接(图 2),通过质粒电泳和酶切检查得到目的基因的表达载体 pEG20。通过 5'端测序证实了在 Nco I 插入的 β -1,3-葡聚糖酶基因仍保持其正确的阅读框架,因此可用于在大肠杆菌中的表达。从 cDNA 序列推导出烟草 β -1,3-葡聚糖酶前体蛋白(包括 N-端 21 个氨基酸残基的信号肽,成熟蛋白 316 个氨基酸残基,C-端 22 个氨基酸残基的引导肽)共 359 个氨基酸,其理论分子量约为 39.17kDa。SDS-PAGE 凝胶电泳分析表明:在受体菌 BL21(DE3)plysS 中,经 1mmol/L IPTG 诱导之后,pEG20 产生的蛋白质分子量约为 39kDa(图 3),与理论值吻合。经扫描测定烟草的 β -1,3-葡聚糖酶 cDNA 表达产物在大肠杆菌总蛋白中的表达量为 6%~8%。未达到高效表达的原因之一可能是植物基因的密码子使用频率与原核生物不同。

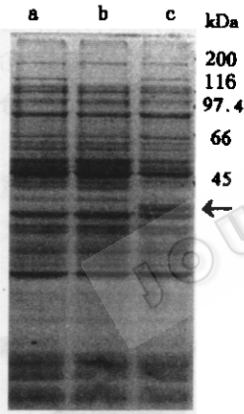


图 3 重组质粒 pEG20 大肠杆菌表达产物的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of pEG20 expression products in *E. coli*

Arrow indicates the expression product

a. pET 11d IPTG inducing

b. pEG20 without IPTG inducing

c. pEG20 with IPTG inducing

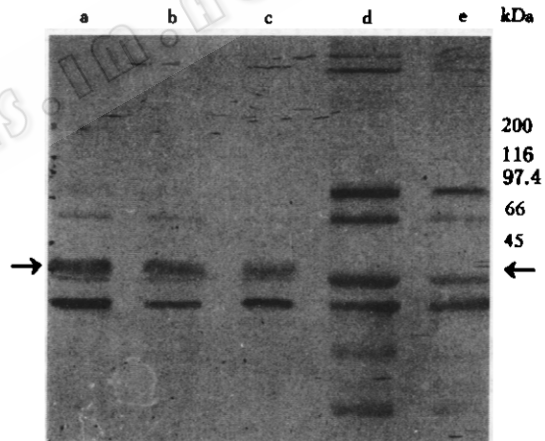


图 4 大肠杆菌表达产物的 Western blot 分析

Fig. 4 Western blot analysis of expression product in *E. coli*

a, b, c. PEG20 expression product 3 μ l, 2 μ l, 1 μ l, respectively

d. PEG20 without induced; e. pET11d expression product induced

cDNA 表达产物的 Western blot 结果表明:大肠杆菌表达产物与 β -1,3-葡聚糖酶基因表达产物的抗血清发生特异的免疫反应,其显色带位置与所计算大小一致(图 4),从而说明所制备的兔抗血清可用于检测目的基因表达产物。除目的蛋白条带外,图 4 中还出现了一些非特异性条带,这是由于从 SDS-PAGE 胶上回收表达产物时,在目的蛋白条带附近的其它非特异蛋白条带密集,切胶时,难免带有其他杂蛋白的污染所致。

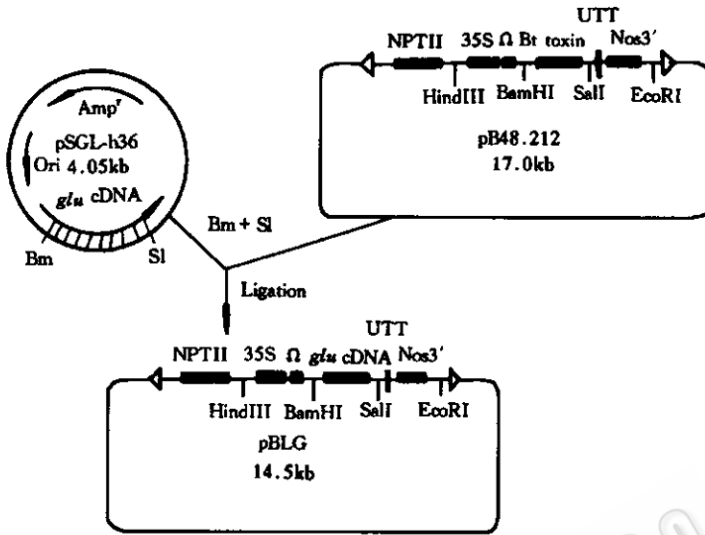


图 5 烟草 β -1,3-葡聚糖酶基因的植物表达载体构建

Fig. 5 Construction map of plant expression vector of tobacco β -1,3-glucanase gene

2.4 烟草 β -1,3-葡聚糖酶基因植物表达载体的构建

为了将 β -1,3-葡聚糖酶基因导入植物,研究其可能的抗真菌病作用,我们利用植物高效表达载体 pB48.212 做载体,它含有带双增强子的 CaMV35S 启动子及 TMV 的“ Ω ”片段翻译增强子序列,可介导外源基因在双子叶植物中高效组成型表达^[16]。

将重组克隆 pSGL-h36 用 BamH I /Sal I 双酶切,回收 1.1kb 片段,与同样双酶切的 pB48.212 连接,得到重组子克隆 pBLG(图 5)。经双酶切后表明:非重组子克隆经 BamH I /Sal I 酶切后,能切出一个约 3.6kb 的片段,而重组克隆则切出一个约 1.1kb 的片段;用 Hind III /EcoR I 双酶切时,非重组子切出多个条带(因其所含 3.6kb Bt 基因中含有 Hind III 和 EcoR I 位点);而 B 重组子克隆只切出一个约 2.1kb 的条带(图 6)。由此证明 β -1,3-葡聚糖酶基因植物表达载体已建成,现已用于植物转化工作。

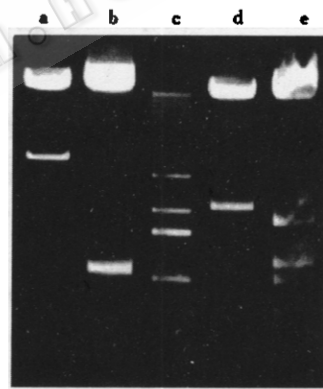


图 6 烟草 β -1,3-葡聚糖酶基因的植物表达载体 pBLG 的双酶切电泳图谱

Fig. 6 Electrophoresis of pBLG plasmid after restriction enzyme digestion

- a. BamH I /Sal I digestion of pB48.212 plasmid
- b. BamH I /Sal I digestion of pBLG plasmid
- c. 1kb DNA ladder
- d. Hind III /EcoR I digestion of pBLG plasmid
- e. Hind III /EcoR I digestion of pB48.212 plasmid

参 考 文 献

1 Abeles F B, Bosshart R P, Forrence L E *et al.* Plant Physiol, 1970, 47:129~134

- 2 De Loose M, Alliotte T, Gheysen G *et al.* *Gene*, 1988, **70**: 13~23
- 3 Moore A E, Stone B A. *Proc Fed Eur Biochem Soc*, 1968, p182
- 4 Moore A E, Stone B A. *Virology*, 1972, **50**: 791~798
- 5 Zhu Qun, Eileen A M, Sameer M *et al.* *Bio/Technology*, 1994, **12**: 807
- 6 宋凤鸣, 郑 重. *植物生理学通讯*, 1996, **32**(1): 64~70
- 7 Otsuka-Chem. *Derwent Biotechnology Abstract*, 1993, **12**(4): 9302190
- 8 Leah R, Tommerup H, Svendsen I B *et al.* *Biol Chem*, 1991, **266**: 1464
- 9 Melchers L S, Sela-Buurlage M B, Vloemans S A *et al.* *P1 Mol Biol*, 1993, **21**(4): 583
- 10 姚泉洪, 黄晓敏, 刘宗镇. *植物生理学通讯*, 1995, **31**(4): 303~307
- 11 De Vires S, Hoge H, Bisseling T *et al.* *P1 Mol Biol Manual*, Dordrecht., Kluwer Academic Publishers, 1988, **B₆**: 1~13
- 12 Verwoerd T C *et al.* *Nucleic Acids Res*, 1989, **17**: 23621
- 13 Shinshi H, Wenzler H, Neuhaus J M *et al.* *Proc Natl Acad Sci. USA*, 1988, **85**: 5541~5545
- 14 Lutcke H. A. *et al.* *EMBO*, 1987, **6**: 43~48
- 15 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning*, 1989, Cold Spring Harbor Lab. Press
- 16 李太元, 田颖川, 秦晓峰等. *中国科学(B辑)*, 1994, **24**(3): 276~282
- 17 Amos B O, Ilan Chet. *Trends in Biotechnology*, 1992, **10**: 392~394
- 18 Neuhaus J M, Ahl-Goy, Hinz U *et al.* *Plant Mol Biol*, 1991, **16**: 141
- 19 Marianne B S, Anne S P, Sandra A B *et al.* *Plant Physiol*, 1993, **101**: 857~863
- 20 李继红, 邵寒霜, 郑学勤. *农业生物技术学报*, 1997, **5**(2): 125~130
- 21 Van Den Bulcke M, Bauw G, Castresana C *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1989, **86**: 2674~2677
- 22 Nicole B, Matthieu H A, Joosten J. *Plant Physiol*, 1990, **92**: 1108~1120
- 23 Heather S, Herbert S. *Developmental Biology*, 1973, **34**: 169~173
- 24 Heather S. *Developmental Biology*, 1977, **57**: 87~97

Tobacco β -1, 3-glucanase cDNA Cloning, Expression in *Escherichia coli* and Construction of Its Plant Expression Vector

Lan Haiyan Tian Yingchuan* Chen Zhenghua Zhang Lihua Liu Guizhen Wang Lanlan
(*Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080*)*
(*Institute of Genetics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101*)

Abstract Total RNA of tobacco leaf was isolated after treatment of the plant with ethylene. Using this RNA as template, the cDNA of β -1, 3-glucanase was amplified by reverse transcription and successive polymerase chain reaction (RT-PCR). After the cDNA was cloned into pBluescript SK, the whole sequence was analysed and the result showed that the sequence of the β -1, 3-glucanase cDNA was almost identical with that of the reported gene, except that the 1008th base changed from T to C which did not change the coded amino acid. The expression of this gene in *E. coli* produced a protein of about 39kDa, an expected size for β -1, 3-glucanase, and Western blot of the expression product was analysed. Plant expression vector of this gene was constructed and plant transformation with this vector is in progress.

Key words β -1, 3-glucanase gene, sequencing, expression in *E. coli*, plant expression vector