

毛尖紫萼藓 *GH394* 基因克隆、表达载体的构建

张百成, 沙 伟, 宋 璐

(齐齐哈尔大学 生命科学与农林学院, 黑龙江 齐齐哈尔 161006)

摘 要:利用 PCR 技术,以毛尖紫萼藓总 RNA 为模板,扩增出上、下游分别加入 *Bam*HI、*Sac*I 酶切位点的 *GH394*(657 bp) 基因 CDS 区全长序列,采用 pMD18-T Vector、pRI 101-AN Vector 构建了该基因克隆、表达载体,并将重组载体质粒转化到大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH 5 α 和根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 工程菌株 GV3101 中,并选用 X-gal、IPTG 和利福平 (Rifampicin, Rif)、卡那霉素 (Kanamycin, Km) 筛选阳性菌株。结果表明:已成功构建 pMD-*GH394* 克隆载体和 pRI 101-AN-*GH394* 表达载体并将重组质粒转入目的菌株中;该试验为后续实现毛尖紫萼藓 *GH394* 基因抗旱预期功能的验证,奠定了良好的试验基础。

关键词:毛尖紫萼藓;抗旱;T-PCR;基因克隆;载体构建

中图分类号:Q 348 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)12-0113-04

毛尖紫萼藓是紫萼藓科 (Grimmiaceae) 紫萼藓属 (*Grimmia*) 中典型的旱生藓类,在无水室温条件下,放置数月甚至几年,复水后仍能恢复正常生长状态;主要生长在裸露的岩石之上,拥有丰富的抗旱种质资源,是作为抗旱性研究的常用材料^[1]。

在漫长的进化过程中,许多藓类植物形成了一些特殊的形态结构以适应极度干旱的环境^[2]。早在 20 世纪 70 年代,国外就开始对抗旱藓类的干旱生理响应展开了研究,并已深入到基因水平。国内对其研究大部分集中于分布、形态、细胞等方面,分子生物学方面的研究较少^[3]。吴玉环等^[4]从细胞、分子水平系统地阐述了土生墙藓 (*Tortula ruralis*) 和角齿藓 (*Ceratodon purpureus*) 等多种耐旱藓类的抗旱应答过程;徐杰等^[5]通过对干旱-半干旱地区的藓类体内的氨基酸化学相关性变化进行分析,进而揭示了藓类的营养组成特征及对环境的适应性机理;Song X H 等^[6]采用 SMART 技术构建了毛尖紫萼藓的干旱 cDNA 文库,为毛尖紫萼藓抗旱基因资源的筛选奠定了基础。

谷胱甘肽-S-转移酶 (GSTs) 是植物体内含量丰富的

一类酶。植物 GSTs 能催化 GSH 和亲电子的异源物质接合,其转基因植物具有诸如干旱、冰冻、热等多种抗性,并有研究表明 GSTs 对盐胁迫也有一定的抵御能力^[7]。该研究选取与谷胱甘肽转移酶 (GSTs) 同源性较高的 *GH394* 基因,构建克隆、表达载体,旨在验证该基因的抗性功能,开发、储备植物优势遗传资源,最终将其应用于作物遗传育种,提高农作物产量,切实解决粮食安全問題。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 以采自黑龙江省五大连池市的毛尖紫萼藓为材料,长期干旱胁迫再复水 3~6 d,使其趋于自然生长状态。取其绿色尖部,密封,存放于 -80℃ 冰箱过夜。

1.1.2 菌种、载体与试剂 克隆载体 pMD18-T Vector、植物表达载体 pRI 101-AN Vector、T₄ DNA 连接酶、胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、DNA Marker 均购自 TaKaRa 公司,大肠杆菌 DH5 α 、根癌农杆菌 GV3101 菌株均由该实验室提供,感受态细胞利用 CaCl₂ 法^[8] 自行制备,限制性内切酶 *Bam*HI 和 *Sac*I、M-MLV RTase 购自 Promega 公司,高保真 *Taq* 酶等 PCR 试剂购自上海生物工程公司,其它试剂均为国产分析纯试剂,培养基为常规 LB 培养基。

1.1.3 引物序列 根据 NCBI 中已注册的近缘 GST 基因 CDS 区设计特异性引物,由上海生工生物有限公司合成,引物序列见表 1。

第一作者简介:张百成(1983-),男,在读硕士,现主要从事植物遗传学研究。E-mail:baicheng359@163.com。

责任作者:沙伟(1963-),女,博士,教授,博士生导师,现主要从事植物学与植物遗传学方面的研究工作。E-mail:Shwl129@263.net。

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31070180);齐齐哈尔大学研究生创新科研资助项目(YJSCX2010-010X)。

收稿日期:2012-04-09

表 1 试验所用引物序列

Table 1 Sequences of primer

名称 Name of primer	序列 Sequences	酶切位点 Enzyme restriction
GH394-F1	5'-GGATCCATGGCGTGAAGATTAACTATTATG-3'	BamH I
GH394-R2	5'-GAGCTCTTAATGTAACGAGCACACTGTCATGGCTT-3'	Sac I

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 的获得及纯化 从-80℃冰箱中取出材料,于研钵中加入液氮迅速研磨。每 0.2 g 材料均匀分装于 4 个 1.5 mL EP 管中。采用改良的 SDS/酚法^[9]提取总 RNA。纯化步骤:将总 RNA 42 μL, DNase 3 μL, Buffer 5 μL 混合,加入 1.5 mL EP 管中,总体积为 50 μL;37℃ 30 min;再加入 150 μL DEPC 水和 200 μL CI 液($V_{\text{氯仿}}:V_{\text{异戊醇}}=24:1$)抽提 1 次;取上清,加入 2 倍体积的无水乙醇,-80℃保存 1 h;取出后,4℃ 12 000 r/min 离心 20 min;弃上清,400 μL 75%乙醇洗涤,后 4℃ 12 000 r/min 离心 5 min;冰上静置 10 min,加入 DEPC 水 30 μL,-20℃保存备用。

1.2.2 反转录 选用 M-MLVRTase 逆转录酶,以获得的毛尖紫萼藓总 RNA 为模板,合成单链 cDNA。具体用量参见酶说明书。

1.2.3 基因 GH394 的克隆 以毛尖紫萼藓总 cDNA 为模板,以 GH394-F1、GH394-R2 为引物进行 PCR 基因扩增,其反应体系如下(表 2)。反应条件:预变性 94℃ 2.5 min,变性 94℃ 30 s,退火 57℃ 45 s,延伸 72℃ 1 min,35 个循环,再延伸 72℃ 10 min,结束反应。经琼脂糖凝胶电泳分离扩增产物后,利用 TaKaRa 胶回收试剂盒回收目的片段。

表 2 PCR 反应体系

Table 2 The reaction system of PCR

药品 Chemicals	体积 Volum / μL	总体积 Total volume / μL
Buffer	5	50
Mg ²⁺	1.2	
dNTP	0.6	
引物 1	2	
引物 2	2	
DNA 模板	20	
Taq 酶	0.5	

1.2.4 pMD18T-GH394 克隆载体的构建 取回收产物 0.5 μL, pMD18-T Vector 0.5 μL, 无菌双蒸水 1.5 μL, Solution 2.5 μL(含 T₄连接酶),混匀,16℃过夜连接。取 2.5 μL 的连接产物,加入到 50 μL 的大肠杆菌 DH 5α 感受态细胞中,轻旋,冰浴 30 min,后入 42℃水浴 90 s,勿摇,最后将上述产物加入到 800 μL LB 培养基中,37℃振荡 90 min。取 50 mL 转化液涂布于含有氨苄青霉素(50 mg/L)、X-gal(20 μL)、IPTG(40 μL)的 LB 固体培养基平板上,室温放置 25 min,待菌液被完全吸收后,倒置平板于 37℃过夜培养。挑取白色单菌落于含有氨苄青

霉素的 LB 液体培养基($L_{\text{LB培养基}}:L_{\text{氨苄青霉素(100 mg/mL)}}=2\ 500:3$)中,37℃过夜摇菌。后通过菌液 PCR 进行鉴定(体系同表 2),并取部分菌液送北京六合华大基因科技股份有限公司测序。同时,提取阳性克隆载体菌液质粒,按如下体系进行双酶切($V_{\text{总}}=10\ \mu\text{L}$):pMD18T-GH394 质粒 2 μL、BamHI 0.5 μL、SacI 0.5 μL、BSA 0.1 μL、缓冲液 1 μL、无菌水 5.9 μL,酶切 3 h。利用琼脂糖凝胶电泳分离酶切产物并回收目的片段 GH394。

1.2.5 pRI 101-AN-GH394 植物表达载体的构建及阳性菌株检验 此过程通过提取质粒、酶切转化、目的片段的回收、连接与重组 DNA 的鉴定等常规的 DNA 重组技术进行。具体构建路线:通过 BamHI+SacI 对 pRI 101-AN Vector 进行双酶切,酶切体系($V_{\text{总}}=10\ \mu\text{L}$):pRI 101-AN-GH394 质粒 3 μL、BamHI 0.5 μL、SacI 0.5 μL、BSA 0.1 μL、缓冲液 1 μL、无菌水 4.9 μL,酶切 6 h。利用试剂盒回收带有 BamHI、SacI 粘性末端的大片段。将回收产物与回收的目的片段 GH394 按 1.2.4 方法将回收产物进行连接,产物转化大肠杆菌 DH 5α 感受态细胞中进行修复,检菌,BamHI、SacI 双酶切鉴定。从筛选出的 pRI 101-AN-GH394 阳性大肠杆菌 DH 5α 菌液中提取质粒转化到根癌农杆菌 GV3101 感受态细胞,将菌液涂布于含有利福平、卡那霉素的 LB 固体培养基($L_{\text{LB固体培养基}}:L_{\text{利福平(15mg/mL)}}:L_{\text{卡那霉素(30 mg/mL)}}=2\ 500:9:3$)平板上,28℃过夜培养。挑取单菌落,加入按比例配制好的 LB 液体培养基($L_{\text{LB液体培养基}}:L_{\text{利福平(15mg/mL)}}:L_{\text{卡那霉素(30 mg/mL)}}=2\ 500:9:3$)中,28℃过夜摇菌。从菌液中提取质粒,进行质粒 PCR 鉴定。

2 结果与分析

2.1 材料总 RNA 的检测

由图 1 可知,经 0.1% 琼脂糖凝胶电泳检测,条带 28 s, 18 s 清晰可见,说明 RNA 完整性保持良好,纯度符合试验要求。

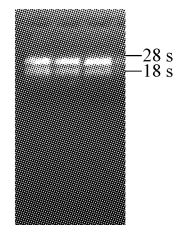
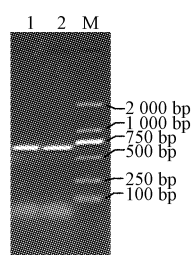
图 1 毛尖紫萼藓(*Grimmia piliifera* P. Beauv)总 RNA 电泳图

Fig. 1 Electrophoresis profile of total RNA

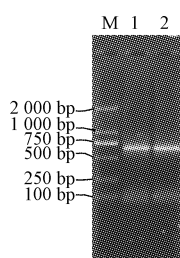
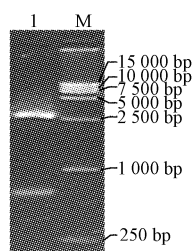
Grimmia piliifera P. Beauv

2.2 GH394 基因引物 PCR 扩增产物测定

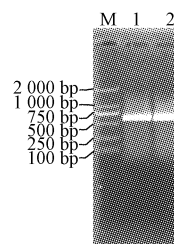
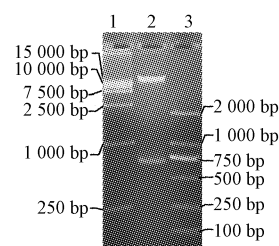
由图 2 可知,将产物经 0.1% 琼脂糖凝胶电泳,获得一特异性条带,条带大小与引物设计选择的 CDS 区长度 657 bp 相符。

图2 *GH394* 基因引物 PCR 产物电泳图注:1~2. *GH394* 基因;M. DNA Marker.Fig. 2 Electrophoresis profile of primer of *GH394* primers PCRNote: 1~2. *GH394* genes; M. DNA Marker.2.3 pMD18T-*GH394* 克隆载体的构建结果测定

利用菌液进行 PCR, 得到条带与预计相符。对其阳性菌液提取质粒并进行 *Bam*HI + *Sac*I 双酶切(图 3), 酶切得到与 *GH394* 基因大小相符的特异条带(图 4)。将菌液测序结果与 *GH394* 基因 RACE 结果进行比对, 相似度达 100%。证明: pMD18T-*GH394* 克隆载体构建成功。

图3 pMD18T-*GH394* 载体菌液 PCR注: M. DNA Marker; 1~2. *GH394* 基因。Fig. 3 pMD18T-*GH394* vector bacterial liquid PCRNote: M. DNA Marker; 1~2. *GH394* genes.图4 pMD18T-*GH394* 克隆载体酶切注: 1. pMD18T-*GH394* 酶切; M. DNA Marker.Fig. 4 pMD18T-*GH394* vector restriction enzymesNote: 1. pMD18T-*GH394* enzyme cut; M. DNA Marker.2.4 pRI 101-AN-*GH394* 植物表达载体构建结果检测

由图 5 可知, 通过质粒 PCR, 顺利得到了预期大小目的条带, 并成功对重组质粒进行双酶切(图 6)。将菌液测序结果与 *GH394* 基因 CDS 区序列进行比对, 相似度达 100%。证明: pRI 101-AN-*GH394* 表达载体构建成功。

图5 pRI 101-AN-*GH394* 质粒 PCR 产物电泳图注: M. DNA Marker; 1~2. *GH394* 基因。Fig. 5 Electrophoresis profile of pRI 101-AN-*GH394* plasmid PCRNote: M. DNA Marker; 1~2. *GH394* gene.图6 pRI 101-AN-*GH394* 质粒酶切产物电泳图

注: 1. 15 000 Marker; 2. 2 000 Marker; 3. 酶切产物。

Fig. 6 Electrophoresis profile of pRI 101-AN-*GH394* plasmid enzyme cut product

Note: 1. 15 000 Marker; 2. 2 000 Marker; 3. Enzyme cut product.

3 结论与讨论

该研究利用 PCR 技术, 以毛尖紫萼藓总 RNA 为模板, 扩增出上、下游分别加入 *Bam*HI、*Sac*I 酶切位点的 *GH394*(657 bp) 基因 CDS 区全长序列, 采用 pMD18-T Vector、pRI 101-AN Vector 构建了该基因克隆、表达载体, 并将重组载体质粒转化到大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH 5 α 和根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 工程菌株 GV3101 中, 并选用 X-gal、IPTG 和利福平 (rifampicin, Rif)、卡那霉素 (Kanamycin, Km) 筛选阳性菌株。成功构建了 pMD-*GH394* 克隆载体和 pRI 101-AN-*GH394* 表达载体并将重组质粒转入目的菌株中。为后续实现毛尖紫萼藓 *GH394* 基因抗旱预期功能的验证, 奠定了良好的实验基础。

以往, PBI-121 载体常被选用于表达载体的构建^[10-12]。但是, 该载体 T-DNA 区域酶切位点数量很少, 因为酶切位点的不匹配, 许多常用工具酶都无法使用, 只能通过对其进行适当修饰、改造, 才能顺利用于相关试验。这样, 无形中使试验过程复杂化。而 pRI 101-AN 载体的 T-DNA 区含有的常用酶切位点较多, 有一个翻译增强子 *AtADH*, 卡那霉素抗性选择标记基因可以在双子叶植物(如: 烟草、拟南芥、西红柿)中高效表达外源 DNA; 该载体含有通用的 35 s promoter, 无需再对其进行其它的修饰和改造, 基本符合后续利用根癌农杆菌介

导烟草、并顺利表达的理论要求。

在载体构建的整个过程中,从引物设计中酶切位点的加入到载体的选择都是十分重要的:首先,引物所携带的酶切位点必须存在于表达载体质粒的可切割区;避免在进行酶切时,造成载体本身生物学元件(如:CaMV35S promoter, NOS terminator, NPTⅢ等)的损伤或缺失;其次,在通过 DNAMAN 6.0 生物学软件对目的基因进行酶切位点分析时,所选酶切位点不能出现在目的基因序列中,避免酶将目的基因片段切碎,确保其遗传信息的完整性;最后,酶切位点要尽可能选择基因工程中常用的,并在表达载体序列上有一定数量碱基间隔的;这样便可大大提高酶切成功的机率。酶切体系的确定也很关键,一般分为:单酶切、双酶切和多位点切割。

干旱环境胁迫严重威胁到农业生产的可持续发展^[13],该研究表达载体的构建为开端,旨在对具有丰富遗传多样性的毛尖紫萼藓的抗性基因资源进行更加深入细致的研究,为下一步在植物体(烟草、拟南芥)中表达奠定了基础,还为其它载体构建试验提供了一些参考。

参考文献

- [1] 中国科学院昆明植物研究所. 云南植物志[M]. 昆明:云南科学出版社,2002.
- [2] Giordano S, Colacino C, Esposito A, et al. Morphological adaptation to water uptake and transport in the poikilohydric moss *Tortula ruralis* [J]. *Giornale Botanico Italiano*, 1993, 127: 1123-1132.
- [3] 张晗, 高永超, 沙伟, 等. 紫萼藓科植物 DNA 提取及遗传多样性的分析[J]. *山东农业科学*, 2006(1): 7-9.
- [4] 吴玉环, 程佳强, 冯虎元, 等. 耐旱藓类的抗旱生理及其机理研究[J]. *中国沙漠*, 2004, 24(1): 23-29.
- [5] 徐杰, 白学良, 田桂泉, 等. 干旱半干旱地区生物结皮层藓类植物氨基酸和营养物质组成特征及适应性分析[J]. *生态学报*, 2005, 25(6): 1248-1255.
- [6] Song X H, Sha W, Lin Li, et al. Construction of cDNA library in *Grimmia pilifera* under drought stress [J]. *Bulletin of Botanical Research*, 2010, 30(6): 713-717.
- [7] 戚元成, 张慧, 赵彦修. 植物谷胱甘肽转移酶和盐胁迫[J]. *山东师范大学学报(自然科学版)*, 2002, 17(2): 71-75.
- [8] 罗婵, 汤刚彬, 谢体三, 等. 感受态细胞制备与保存方法的比较研究[J]. *生物技术*, 2005, 15(1): 52-54.
- [9] 吕凤香, 沙伟, 闫苗苗, 等. 东亚砂藓(*Racomitrium canescens*) RNA 提取方法的比较和改进[J]. *生物技术*, 2007, 17(1): 37-39.
- [10] 范丙友, 高水平, 刘改秀, 等. 牡丹 ACS 基因片段的克隆及反义植物表达载体构建[J]. *华北农学报*, 2010, 25(6): 34-37.
- [11] 王娟, 韩科厅, 戴思兰. 玉米 *Lc* 基因植物表达载体构建及菊花转化[J]. *基因组学与应用生物学*, 2009, 28(2): 229-236.
- [12] 刘晓静, 郝凤, 张德罡, 等. 抗冻基因 *CBF2* 表达载体构建及转化紫花苜蓿的研究[J]. *草业学报*, 2011, 20(2): 193-200.
- [13] 刘晓敏, 张莉弘, 刘金亮, 等. 玉米逆境诱导型启动子克隆及其植物表达载体构建[J]. *生物技术通报*, 2011(3): 86-90.

Grimmia pilifera P. Beauv GH394 Gene Cloning and Expression Carrier Construction

ZHANG Bai-cheng, SHA Wei, SONG Lu

(College of Life Sciences and Agroforestry, Qiqihar University, Qiqihar, Heilongjiang 161006)

Abstract: Using the *Grimmia pilifera* P. Beauv of total RNA to template, amplified GH394 (657 bp) gene in the full sequence of CDS area which is upstream and downstream adding the restriction site was *Bam*HI and *Sac*I, using pMD18-T Vector and pRI 101-AN Vector constructed with Cloning vector and Expression vector for this gene, then, recombinant plasmid transformation to *Escherichia coli* and *Agrobacterium tumefaciens*, using X-gal, IPTG and Rif, Kanamycin to screening of positive strains. The results showed that constructed with pMD-GH394 Cloning vector and pRI 101-AN-GH394 Expression vector were succeed, and recombinant plasmid transformation to objective strains. The experimental provided an good essential for realization of *Grimmia pilifera* P. Beauv GH394 gene expected drought functional verification.

Key words: *Grimmia pilifera* P. Beauv; drought; RT-PCR; gene cloning; constructed with vector