

苦瓜 *afp1* 基因的克隆与序列分析

朱美霞, 韩改英, 王兰明, 马兴树

(河北工程大学 农学院, 河北 邯郸 056038)

摘要:通过异硫氰酸胍法提取苦瓜总 RNA, 采用一步 RT-PCR 方法获得 394 bp 苦瓜 *afp1* 基因序列。应用 DNA star 软件进行序列分析, 表明这个片段包含了基因完整的编码。Blast 分析表明, 它与荠菜的防卫基因有很高的同源性, 序列一致率为 87%。该试验结果将为分子植物抗病育种提供基因材料。

关键词:苦瓜; *afp1*; RT-PCR; 克隆; 序列分析

中图分类号:Q 943.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)24-0120-04

AFP1 (Antifungal proteins 1) 是植物受到病原微生物侵染时, 合成的一类低分子量植物防卫蛋白质 (Defensins)。植物防卫蛋白 AFP1 除具有抗真菌活性外尚具有类似真菌激活子作用, 可诱导产生信号物质, 激活植物防卫反应, 抑制病原真菌侵染。1992 年 Terras 等^[1]从萝卜 (*Raphanus sativus* L.) 中分离到 2 种具有抗真菌活性的植物防卫蛋白质 Rs-AFP1 和 Rs-AFP2。2006 年 De Lucca A J 等研究指出, 凤仙花 AFP1、萝卜 AFP1 具有杀菌性能, 对发芽和不发芽的黄曲霉及串珠镰刀菌分生孢子均具有杀菌活性^[2]。西番莲种子 AFP1 对真菌哈茨木酶、枯萎病菌和烟曲霉具有抑制作用^[3]。周向军等^[4]利用 PCR 扩增得到萝卜 Rs-AFP1 基因, 并证明 Rs-AFP1 对大丽轮枝菌的孢子萌发和菌丝生长具有明显抑制作用。AFP1 作为防卫蛋白家族成员之一, 必将促进抗病真菌生物技术抗菌药物和转基因植物的研究和开发。转基因植物中 AFP1 表达可使这些植物获得抵抗病原真菌侵染能力。已经有人将萝卜防卫蛋白 Rs-AFP1 的 cDNA 序列转化到烟草中作组成型表达, 结果发现转基因植株对长柄链格胞的抗性也得到了加强。

苦瓜 (*Momordica charantia*) 较其它作物适应性强、抗病性强、病害少, 因此该试验欲通过一步法反转录聚合酶链反应 (Reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 获得苦瓜 *afp1* 基因全序列, 为苦瓜 *afp1* 基因表达研究、转基因研究及应用于植物分子抗病育种奠定试验基础。

第一作者简介:朱美霞 (1970-), 女, 河北武安人, 硕士, 副教授, 现主要从事植物分子育种和分子生物学等方面的教学和科研工作。
E-mail: zmx0412@163.com

基金项目:河北省教育厅科学研究计划资助项目 (20091113)。

收稿日期:2012-07-20

1 材料与方法

1.1 试验材料

植物: 苦瓜种子发芽后栽种于花盆内, 于 2 片真叶时用枯萎病菌悬浮液处理。

仪器: Sigma 超速冷冻离心机、Bio-Rad 核酸蛋白测定仪、Flexi-gene PCR 仪、Bio-Rad 水平电泳槽和 Bio-Rad 凝胶成像系统、Eppendorf 移液器、Sanyo 超低温冰箱、超净台。

菌种及载体: 大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 α 、pGEM-T easy vector system, 抗性标记为 Amp。

试剂和酶类: rTaq DNA 聚合酶、限制性内切酶 EcoRI、dNTPs、DNA 分子量标准 (DL-2000)、DNA 片段回收试剂盒均购自北京鼎国生物技术有限公司; 琼脂糖为 Spanish 产品; EDTA、Tris 碱、SDS、平衡酚、氨苄青霉素、蛋白酶 K 均为 Sigma 公司产品; X-gal、IPTG、T₄ DNA 连接酶购自大连宝生物有限公司; 抗生素为 Sigma 产品; 其它化学试剂均为国产分析纯。

引物: 对 GenBank 中发表的 *afp1* 基因序列进行 BLAST, 并结合萝卜 *afp1* 基因部分序列找到序列保守区, 应用生物学软件 DNASTAR 3.0 设计扩增植物 *afp1* 基因的特异性引物。引物由上海 Sangon 生物工程有限公司合成, *afp1* 正向引物序列为: 5'-TGCATATGCTG-CATTCCCAG-3'; *afp1* 反向引物序列为: 5'-CGATCT-TCGTAAATTGCTTC-3'。

1.2 试验方法

1.2.1 总 RNA 的提取 苦瓜 RNA 的提取依据分子克隆 (第 3 版) 的异硫氰酸胍酚法进行。样品处理: 取 100 g 组织放入研钵中研磨中, 加入预冷的变性液 12 mL, 在冰浴中充分匀浆; 加 2 mol/L 乙酸钠 (pH 4.0) 0.2 mL, 混合后将溶液转移至 10 mL 离心管中; 加酚: 氯仿: 异戊醇 (25: 24: 1) 2.2 mL, 颠倒混合用力振荡 10 s, 冰上放

置 10 min; 4℃ 离心, 12 000 r/min 离心 20 min; 小心吸取上层含有 RNA 的水相, 并转移至 1 个新的 10 mL 离心管中。避免吸取两相之间的蛋白质; 加等体积的异丙醇, 置 -20℃ 至少 30 min, 沉淀 RNA; 4℃ 离心, 12 000 r/min 离心 15 min; 弃上清, 再加变性液 2 mL 重悬 RNA 沉淀物, 振荡直至 RNA 完全溶解(必要时可 65℃ 水浴促溶); 加入等体积异丙醇, 置 -20℃ 30 min; 4℃ 离心, 12 000 r/min 离心 15 min; 弃上清, 加入 70% 乙醇 4 mL 洗涤 RNA 沉淀。4℃ 离心, 8 000 r/min 离心 5 min; 弃上清, 将沉淀晾干后加入 100~500 μ L 去离子甲酰胺溶解 RNA。

1.2.2 一步 RT-PCR 克隆 *afp1* 基因 PCR 反应体系包括 10× *Taq* buffer 2.5 μ L, 2.5 mmol/L dNTP 2 μ L, *Rnase inhibitors* 0.2 μ L, 10 μ mol/L 的正向引物 1 μ L, 10 μ mol/L 的反向引物 1 μ L, 模板 DNA 1 μ L 5 U/ μ L *Taq* 酶 0.25 μ L 超纯水将反应体系补至 25 μ L。PCR 反应热循环参数设置为: 预变性 94℃ 4 min; 48℃ 反转录 30 min; 94℃ 变性 30 s, 56℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 1 min, 35 个循环; 72℃ 延伸 10 min。

1.2.3 PCR 产物的回收 扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳, 在凝胶成像系统中观察并保存结果, 切割目的条带进行回收。具体步骤为: ①在凝胶成像系统上切割目的 DNA 胶块, 置于称重的 1.5 mL 离心管中, 再称重, 计算胶块质量。②每 100 mg 胶加 400 μ L Binding buffer II(胶浓度为 1.5%~2% 时, 每 100 mg 加 700 μ L Binding buffer)于 50~60℃ 温育 10 min, 期间摇管 2~5 次。③转移上述混合物于 E2-10 column, 2 min 后于 10 000 r/min 离心 2 min, 弃去 1.5 mL 管中的液体。④加 500 μ L Washing Solution, 10 000 r/min 下离心 2 min, 弃去液体。⑤重复④步, 10 000 r/min 离心 1 min, 尽可能除去残留 Washing Buffer。⑥将 E2-10 column 置于干净的 1.5 mL 离心管中, 加 30~50 μ L Elution Buffer 至 E2-10 column 中, 室温保持 2 min, 然后 10 000 r/min 离心 2 min。⑦收集液体至新的离心管中, 于 -20℃ 保存。

1.2.4 DNA 的重组与转化 目的基因与 T 载体的连接: 连接体系包括: 2× 连接 Buffer 5 μ L, pGEM-T 载体 1 μ L, 目的基因 3 μ L, *T₄* DNA 连接酶 1 μ L, BSA 0.2 μ L, 灭菌的超纯水 0.8 μ L, 总体积 10 μ L 连接反应; 4℃ 条件下连接 16 h。大肠杆菌感受态细胞的制备: ①从 37℃ 培养 18 h 的平板中挑取 1 个单菌落(直径 2~3 mm)转移至 1 个含有 5 mL LB 培养基的 10 mL 离心管中, 37℃ 下振荡培养 16 h。无菌条件下, 转移 100 μ L 菌悬液至灭菌的新离心管中, 继续振荡培养 3~5 h。一般 1 OD₆₀₀ 约含有大肠杆菌 DH5a 10⁹ 个/mL; ②将细菌转移到 1 个无菌一次性使用的用冰预冷的 1.5 mL eppendorf 离心管中, 冰上放置 10 min, 使培养物冷却至 0℃; ③4℃ 12 000 r/min 离心 1 min, 回收细胞; ④倒出培养液, 将管倒置 1 min, 以

使最后痕量培养液流尽; ⑤每 1.5 mL 初始培养液用 600 μ L 预冷的 0.1 mol/L CaCl₂ 溶液重悬每份细胞沉淀; ⑥4℃ 下, 4 100 r/min 离心 10 min, 回收细胞; ⑦倒出培养液, 将管倒置 1 min, 以便使最后的痕量培养液流尽; ⑧每 1.5 mL 初始培养物用 40 μ L 预冷的 0.1 mol/L CaCl₂ 溶液重悬细胞沉淀; ⑨此时可进行重组体转化试验, 亦可将细胞冷冻于 -70℃ 保存。重组体 DNA 的转化: 包括阳性和阴性对照: ①用冷却的无菌吸头从每份用 CaCl₂ 溶液制备的感受态细胞悬液中吸取 40 μ L 转移到无菌的 0.2 mL 离心管中, 每管加入 10 μ L 连接产物(用不超过 10 μ L 的体积, 其中的 DNA 小于 50 ng), 轻轻旋转以混匀内容物, 在冰中放置 30 min; ②将管放入预加温至 42℃ 的循环水浴中 90 s, 不要摇动试管; ③快速将管转移到冰浴中, 使细胞冷却 1.0~2.0 min; ④将上述混合物加至含 800 μ L LB 液体培养基中, 用水浴将培养基加温至 37℃, 然后将管转移到摇床上, 温育 45 min, 使细菌复苏并表达质粒编码的抗生素抗性标记基因; ⑤将适当体积(每个 90 mm, 平板达 200 μ L)已转化的感受态细胞转移到含 20 mmol/L MgSO₄ 和 AMP 琼脂培养基(事先在每个平板上加入 40 μ L IPTG 和 7 μ L x-gal 并涂布均匀)上; ⑥将平板置于室温直至液体被吸收; ⑦倒置平皿, 于 37℃ 培养 12~16 h 后出现菌落。根据 α 互补作用原理选择白色菌落, 进行质粒 DNA 提取和 PCR、EcoRI 酶切检测, 以获得阳性克隆。

1.2.5 质粒 DNA 的提取 ①从上述平板上挑取 1 个白色单菌落, 接种到含 amp 的 LB 液体培养基中, 培养 16~20 h 后转移至 1.5 mL 无菌离心管中, 12 000 r/min 离心 1 min, 收集细胞; ②每个离心管中加入溶液 I 200 μ L, 重悬细胞, 冰上放置 5 min; ③每个离心管中再加入溶液 II 400 μ L, 轻轻混合均匀, 冰上放置 5 min; ④每个离心管中再加入溶液 III, 300 μ L, 轻轻混合均匀, 冰上放置 5 min, 于 4℃ 12 000 r/min 离心 5 min; ⑤取上清 750 μ L, 加入等体积氯仿: 异戊醇(24:1), 混合均匀; ⑥12 000 r/min 离心 5 min; ⑦重复⑤、⑥步骤 2 次, 取上清; ⑧加入等体积预冷的异丙醇, 混合均匀, 室温 5~10 min; ⑨12 000 r/min 离心 5 min, 弃上清, 用 75% 乙醇洗沉淀 2~3 次; ⑩室温下晾干, 最后将沉淀溶解在 30~50 μ L 的无菌超纯水中。

1.2.6 PCR 及酶切检测 以提取的质粒 DNA 为模板, 进行 PCR(一步 RT-PCR 体系中去除 *Rnase inhibitors*, 总体积 25 μ L; 程序去除 48℃ 反转录步骤)扩增检测特异性条带。EcoRI 酶切反应体系包括: 质粒 DNA 3 μ L, 酶 0.5 μ L, buffer 5 μ L, ddH₂O 1.5 μ L, 反应总体积为 10 μ L。反应温度 37℃, 反应时间 2 h。质粒 DNA、质粒 DNA 酶切产物和 PCR 扩增产物经 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测挑选阳性克隆, 步骤为: ①准确称量 0.2 g 琼脂糖于 25 mL TAE 缓冲液中。②微波炉加热融化, 至沸腾, 1~2 min 后, 加

1. 25 μ L EB(溴化乙啶)摇匀,倒入电泳板中(提前插上齿梳)。③待胶凝固后(20 min 左右),去掉齿梳,随电泳板一起放入电泳槽中(点样孔朝向负极一侧)。④以 Loading buffer:DNA 1:5 的比例混匀后,向点样孔中加样(注意移液枪垂直加入,不要刺破胶孔),打开电源。⑤待 30 min 左右,在凝胶成像系统中检测 DNA 条带。

1.2.7 序列测定 PCR 检测和酶切鉴定的阳性克隆送往上海生物工程有限公司进行序列测定,利用 DNASTar 软件和 NCBI 网站 Blast 对获得的 DNA 序列进行分析。

2 结果与分析

2.1 苦瓜总 RNA 检测

总 RNA 经紫外分光光度计检测, $OD_{260}/OD_{280} = 1.958$, $OD_{260}/OD_{280} > 1.8$,表明提取的 RNA 纯度较高,符合试验要求,通过琼脂糖凝胶电泳检测亦说明提取的总 RNA 可以满足 RT-PCR 试验要求。

2.2 RT-PCR 扩增

通过一步 RT-PCR 法,获得苦瓜 1 个约 394 bp 的特异性片段(图 2)。将该片段回收,并与 pGEM-T 载体连接后转化至工程菌 DH5a,再涂布于含有 x-gal、IPTG 和 amp 的 LB 固体培养基平板上,过夜培养(16~18 h)后根据蓝白斑筛选阳性克隆。

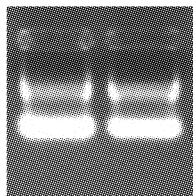


图 1 RNA 琼脂糖凝胶电泳

Fig. 1 RNA agarose gel electrophoresis

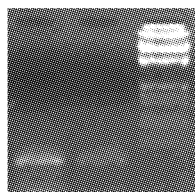


图 2 苦瓜 *afp1* 片段

Fig. 2 *afp1* fragment of *Momordica charantiap*

2.3 酶切和 PCR 检测

由图 3 可知,E 是指质粒 DNA EcoR I 酶切产物,A 是指以质粒为模板进行 PCR 扩增产物,P 是指提取的质粒 DNA。通过凝胶电泳发现多数克隆均含有目的基因,选择具有目的基因、PCR 检测特异性强且无杂带的阳性克隆(左侧第 3 个、右侧第 1 个克隆)送至上海生工测序部进行序列测定。

2.4 序列分析

2.4.1 序列校对 用 DNA STAR 进行序列校对,去除污染的序列,得到序列长度为 394 bp。分析表明,394 bp 的片段中有 104 个 A,78 个 C,81 个 G,131 个 T。其中包含 1 个完整的阅读框,大小为 357 bp,共编码 119 个氨基酸(包括起始密码和终止密码在内),是 1 个完整的功能单位。该序列已经登录到 GENBANK(登录号:1556306)。

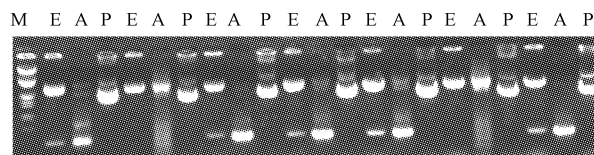


图 3 应用 PCR 扩增及 EcoR I 酶切检测 *afp1* 基因片段

注:M. Marker;P. 质粒 DNA;A. PCR 扩增;E. 酶切。

Fig. 3 *afp1* fragment of PCR amplification and digestion of EcoR I

Note:M. Marker;P. Plasmid DNA;A. PCR amplification;E. Digestion of EcoR I.

ATGGCTAAGTTTTCGCTCCATCATCGCACTTC
TTTTTGCTGCTCTTGTCTTTTTTGCTGCTTTCGG
TGAGTAGTGACCTGCTTATCACATGCTGCGCATG
AAAAATTTAGATTTGTAGTTTTTTTAGTTTTCA
TATTAATTTGATATCTAACCTGTGAGATCTATG
TATTTACAGAAGCACCAACAGTGGTGGAAAGCAC
AGAAGTTGTGCGAGAGGCCAAGTGGGACACGG
TCAGGAGTCTGTGGAACAATAACGCATGCAAG
AATCAGTGCATTAACCTTGAGAAAGCACGACAT
GGATCTTGCAACTATGTCTTCCCAGCTCACAAGT
GTATCTGCTACTTTTCCTTGTTAATTTATCGCAAA
CTCTCTAGAATTCAATCACTAGTGAATTC

2.4.2 BLAST 检索及进化树分析 在美国国家生物技术中心(NCBI)网站,对上述序列进行 BLAST。结果表明芥菜防卫基因、萝卜真菌防卫基因和拟南芥等的植物防卫基因与苦瓜 *afp1* 基因有很高的同源性,分别为 87%、85%和 84%。苦瓜(*Momordica charantiap*)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)、小萝卜(*Raphanus sativus*)、芥菜(*Brassica juncea*)*afp1* 序列进化树(图 4)分析亦表明苦瓜 *afp1* 基因与芥菜防卫基因聚为一类,它们之间一致率较高,而与拟南芥、小萝卜一致率较低。

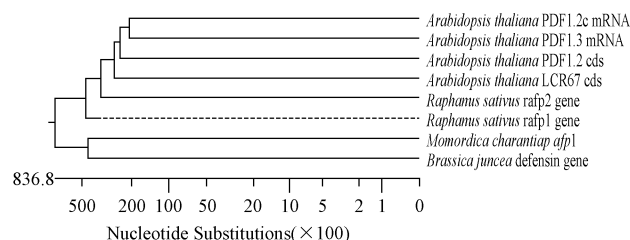


图 4 *afp* 基因遗传进化树

Fig. 4 Phylogenetic tree of *afp* gene

2.4.3 与芥菜防卫基因序列比对与分析 芥菜防卫基因 cDNA 全长为 334 bp,比较发现苦瓜 *afp1* 基因与芥菜的防卫基因有很高的相似性,结果见图 5,二者一致率为 87%,差异仅为 13%。其中 Gaps 占 6%,2 个碱基缺失(分别为第 78 个位点的 T 和 126 位的 C)、22 个碱基插入和 19 个位点的置换。

Query	1	A TGGCTAAGTTTGCCTCCATCATCGCACTTCTTTTGGCTGCTCTTGTCTTTTGGCTGCT	60
Sbjct	1	A TGGCTAAGTTTGCCTCCATCATTGCCCTACTTTTGGCTGCTCTTGTCTGTTTGGCTGCT	60
Query	61	T TCGGTGAGTAGTGAAC-TGCTTATCACATGCTGCGCATGAAAAATTTAGATTGTAG t t	119
Sbjct	61	T TCGGTGAGTAAATGAACCTTGC-T-TACACA---TG-G-ATGCAAATTTAGATTATATTT	113
Query	120	t t t t t AGTTTTCATATTAATTTGATATCTAACCTTGTGAGATCTATGTATTTACAGAAGC	179
Sbjct	114	T TTTCCGTTTTCATATCAGTTTG--A--TAA-----T---A--TATGTATAACAGAAGC	159
Query	180	A CCAACAGTGGTGAAGCACAGAAGTTGTGCGAGAGGCCAAGTGGGACACGGTCAGGAGT	239
Sbjct	160	A CCAACAATGGTGAAGCACAGAAGTTGTGCGAGAGGCCAAGTGGGACATGGTCAGGAGT	219
Query	240	C TGTGGAACAATAACGCATGCAAGAATCAGTGCATTAACCTTGAGAAAGCACGACATGG	299
Sbjct	220	C TGTGGAACAATAACGCATGCAAGAATCAGTGCATTAACCTTGAGAAAGCACGACATGG	279
Query	300	A TCTTGCAACTATGTCTTCCAGCTCACAAAGTGTATCTGCTACTTTCCCTTGTTAA	354
Sbjct	280	A TCTTGCAACTATGTTTCCAGCTCACAAAGTGTATCTGCTACTTTCCCTTGTTAA	334

图 5 与芥菜防卫基因序列的比对

Fig. 6 Alignment of *Momordica charantiap afp1* gene and shepherd's-purse's defense gene

3 讨论

植物抗病基因工程技术为植物抗病育种开辟了一条新的途径,尤其是采用广谱抗病策略直接诱导植物本身的防御机制,可行性强,并且没有种属专一性,能取得一劳永逸的效果,而植物基因工程的关键是相关基因的克隆。目前对植物抗真菌蛋白的了解逐渐深入,越来越多的抗真菌蛋白基因将被鉴定和克隆,这为更有效地利用抗真菌蛋白基因提高植物抗真菌病害能力奠定了基础。该试验首次通过一步法 RT-PCR 获得苦瓜 *afp1* 基因片段,该片段具有完整的阅读框,是一个完整的功能单位。且该基因与芥菜的防卫基因、拟南芥的防卫基因有着较高的相似性,可以推断 *afp1* 基因具有一定的抗真菌功能。因此该试验研究成果对即将进行的 *afp1* 基因表达研究、转基因研究和分子植物抗病育种具有重要的意义。

由真菌导致的作物病害每年造成的损失达数十亿美元,虽然目前在植物病害防治方面取得了一定进展,但仍然没有有效的控制措施,而采用分子植物抗病育种是一个首要的、重要的策略。AFP1 作为一种重要的抗

真菌蛋白,它对于多种植物病原真菌具有较好的抑制作用,同时可以刺激病菌寄主植物产生抗病反应。利用转基因技术将基因 *afp1* 转到高产、优质作物中,可以提高植物的抗性。同时亦可将 *afp1* 与几丁质酶基因或豇豆胰蛋白酶基因构建至一个共同的表达载体,利用几丁质酶或豇豆胰蛋白酶与 AFP1 的协同作用,可获得更强、更广泛的抑菌效果。该研究无疑为 *afp1* 基因工程抗病育种提供了更为广阔的开发和利用前景。

参考文献

- [1] Terras F R, Schoofs H M, De Bolle M F, et al. Analysis of two novel classes of plant antifungal proteins from radish (*Raphanus sativus* L.) seeds [J]. Journal of Biological Chemistry, 1992, 267(22): 15301-15309.
- [2] Pelegrini P B, Notonba E F, Muniz M A, et al. An antifungal peptid from passion fruit (*Passiflora edulis*) seeds with similarities to 2S albumin proteins [J]. Biochim Biophys Acta, 2006, 1746(6): 1141-1146.
- [3] De Lucca A J, Jacks T J, Broekaert W J. Fungicidal and binding proteins of three plant peptides [J]. Mycopathologia, 1998, 144(2): 87-91.
- [4] 周向军, 王仑山, 林芝萍, 等. 萝卜抗真菌蛋白 1(Rs-AFP1)在大肠杆菌中的融合表达及其对大丽轮枝菌抑制活性的研究 [J]. 植物学报, 2000, 42(7): 703-707.

Molecular Cloning and Sequence Analysis of *afp1* Gene in *Momordica charantiap*

ZHU Mei-xia, HAN Gai-ying, WANG Lan-ming, MA Xing-shu

(College of Agriculture, Hebei University of Engineering, Handan, Hebei 056038)

Abstract: Total RNA of *Momordica charantiap* was extracted using guanidine isothiocyanate method. *afp1* gene (394 bp) of *Momordica charantiap* was obtained by a step of RT-PCR method. *afp1* sequence was analyzed using DNA star software, the results showed *afp1* sequence contained complete open reading frame. Identity percent of it with defensin gene of *Brassica juncea* was 87%. The results of the project would provide experimental evidence for molecular breeding of plants disease resistance.

Key words: *Momordica charantiap*; *afp1*; RT-PCR; clone; sequence analysis