

双价抗病虫基因植物表达载体 Lc-ChiA-pBI121 的构建

田强强^{1,2}, 徐利³, 谭黎霞², 王敦², 李厚华¹

(1. 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨凌 712100; 2. 植保资源与病虫害治理教育部重点实验室, 陕西 杨凌 712100;

3. 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要:采用 35S 启动子将抗病基因玉米 Lc 转录因子和抗病虫基因棉铃虫核型多角体病毒 (HearNPV) 的几丁质酶 (ChiA), 连接到高效植物表达载体 pBI121 中, 进行酶切鉴定。结果表明: 含有上述 2 个基因, 且转录方向相同的双价植物表达载体已经构建成功; 含有上述 2 个基因的双价载体国内外尚未见报道, 用于植物转基因研究, 可提高植物抗病虫能力。

关键词:植物表达载体; 构建; Lc 转录因子; 几丁质酶

中图分类号:Q 943.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2011)11-0101-03

几丁质是昆虫体壁和中肠围食膜的主要组分, 杆状病毒几丁质酶能特异性的水解昆虫体内的几丁质, 与宿主虫体液化有关; 因此几丁质酶在害虫生物防治中的作用越发突出^[1]。此外, 外源微生物的几丁质酶基因转入植物体内, 可使植物获得对真菌、植物线虫、昆虫及病原微生物的抗性^[2]; 因此, 几丁质酶兼具抗病害和抗虫害的作用。

Lc 转录因子基因属于 R 基因家族, 是第 1 个在植物中发现的具有 bHLH 结构域的转录因子, 属 MYC 型, 编码大约 610 个氨基酸的蛋白质, 对花青素合成途径中的多个结构基因起一定的调节作用^[3]。烟草、矮牵牛、番茄、苜蓿等物种中的研究已证明 Lc 基因能增加叶片和花瓣中花青素的含量。在苹果 (*Malus domestica* Borkh.) 中的异源表达增加其叶片中花青素的含量, 使其叶片、茎都变成红色的同时, 促进了黄烷醇和原花青素的合成, 提高了苹果的抗病性, 如对苹果火疫病和黑星病表现出较高的抗性^[4-5]。

虽然, 随着转基因技术的不断进步, 科研工作者们构建了许多双价基因表达载体^[6-8]。但构建具有 Lc 转录因子和几丁质酶基因的双价抗病虫植物表达载体是十分必要的, 国内外尚未见报道。用于植物转基因研

究, 既能提高植物抗病虫害的能力, 又能使植物叶片等部位颜色发生改变, 具有一定的观赏价值。

1 材料与方法

1.1 试验材料

1.1.1 菌株和载体 大肠杆菌 TG1、重组载体 ChiA-pBI121、Cry1Ab-pBI121 均为该实验室保存; 农杆菌 LBA4404、质粒 pSRLc349、植物表达载体 pBI121 均为西北农林科技大学林学院 515 实验室保存; pGEM-T Easy vector 购自 Promega 公司, pMD 19-T Simple Vector 购自 TaKaRa 生物工程有限公司。

1.1.2 生化试剂和工具酶 PCR 相关试剂、限制性内切酶及其配套 buffer、DNA 分子量标准 (DL 2 000、DL 15 000)、Rnase、均购自 TaKaRa 生物工程有限公司; T4 DNA ligase 购自 Promega 公司; 普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒购自天根生化科技 (北京) 有限公司; 加 A 试剂盒购自康为世纪; 其它常规试剂均为国产分析纯。

1.2 试验方法

1.2.1 引物设计合成 参照玉米 Lc 转录因子基因序列 (GeneBank accession No. M26227.1) 中的基因编码区, 并在基因两端加相应酶切位点设计引物, 由上海生工合成。Lc-F: 5' CCC GGATCC ATG GCG CTT TCA GCT TCC CG 3' BamHI; Lc-R: 5' GCC GTCGAC TCA CCG CTT CCC TAT AGC TTT 3' SalI。参照植物表达载体 pBI121 (GeneBank accession No. AF485783.1) 全序列中, GUS 基因两端的启动子 CaMV 35S Promoter 和终止子 NOS Terminator 序列, 设计扩增 35S-OS 片段的引物序列, 并在基因两端加 EcoRI 酶切位点设计引物, 由上海生工合成。35S-NOS-F: 5' CGG GAATTC AGA

第一作者简介:田强强 (1984-), 男, 山东东营人, 在读硕士, 现主要从事植物转基因研究工作。E-mail: tqql020@163.com。

责任作者:李厚华 (1973-), 男, 山东济宁人, 博士, 副教授, 硕士生导师, 现主要从事植物基因工程的研究工作。E-mail: lihoushua@hotmail.com。

基金项目:西北农林科技大学国外引进人才科研启动基金资助项目 (Z111020901); 陕西省自然科学基金资助项目 (2010JQ3009)。

收稿日期:2011-03-28

TTA GCC TTT TCA 3'; EcoRI; 35S-NOS-R: 5' GCG GAATTC GAT CTA GTA ACA TAG AT 3' EcoRI。

1.2.2 高保真酶 PrimeSTAR HS DNA Polymerase 的 PCR 扩增反应 以载体 pSRLc349 为模板,用引物 Lc-F 和 Lc-R 扩增 Lc 转录因子基因;以 ChiA-pBI121 为模板,用引物 35S-NOS-F 和 35S-NOS-R 扩增 35S-ChiA-NOS 片段。PCR 反应体系为:5×PrimeSTAR Buffer (Mg²⁺ Plus) 5 μL,dNTP Mixture(各 2.5 mM)2 μL,模板 DNA 1 μL,上下游引物(20 μM)各 0.5 μL,PrimeSTAR HS DNA Polymerase(2.5 U/μL) 0.3 μL,灭菌双蒸水补足到 25 μL。PCR 扩增程序为:98℃预变性 5 min;98℃变性 10 s,55℃退火 10 s,72℃延伸 2 min(Lc 转录因子基因)/3 min(35S-ChiA-NOS),30 个循环;72℃延伸 10 min,4℃forever。PCR 产物回收及回收后的平末端加 A 反应均按照 DNA 回收试剂盒和加 A 试剂盒说明书进行。

1.2.3 载体构建 将加 A 产物与克隆载体连接,构建重组质粒 Lc-pGEM-T Easy 和 35S-ChiA-NOS-pMD19T,连接产物转化大肠杆菌 TG1。测序正确后,首先将 Lc-pGEM-T Easy-TG1 扩大培养提取质粒,质粒 Lc-pGEM-T Easy 和 Cry1Ab-pBI121 同时以 BamHI 和 SalI 双酶切,分别回收 Lc 基因片段和 pBI121 载体片段,连接后转化大肠杆菌 TG1,酶切鉴定正确表明 Lc-pBI121 单价植物表达载体构建成功。其次,将 Lc-pBI121-TG1 和 35S-ChiA-NOS-pMD19T-TG1 扩大培养提取质粒,质粒 Lc-pBI121 和 35S-ChiA-NOS-pMD19T 分别以 EcoRI 单酶切,分别回收载体和 35S-ChiA-NOS 片段,连接后转化大肠杆菌 TG1,酶切鉴定正确即表明 Lc-ChiA-pBI121 双价表达载体构建成功。提取质粒 Lc-ChiA-pBI121,转化农杆菌 LBA4404,即可用于植物转基因工程。

2 结果与分析

2.1 PCR 反应

分别以质粒 pSRLc349、ChiA-pBI121 为模板,利用 PrimeSTAR HS DNA Polymerase 和 1.2.1 设计的引物,扩增出长度约为 1 800 bp 和 2 800 bp 的片段,分别与 Lc 转录因子基因(1 832 bp)和 35S-ChiA-NOS(2 838 bp)片段的大小一致。

2.2 重组载体构建

2.2.1 克隆载体的构建(图 1) 质粒 Lc-pGEM-T Easy 经 BamHI 和 SalI 双酶切,分别得到 3 015 bp 的载体片段和 1 800 bp 左右的 Lc 基因片段(图 1-A);质粒 35S-ChiA-NOS-pMD19T 经 EcoRI 单酶切,分别得到 2 800 bp 左右的 35S-ChiA-NOS 片段和 2 700 bp 左右的载体片段,由于大小相差很小,在琼脂糖凝胶电泳图上只显示出 1 条相对较粗的条带(图 1-B);说明 Lc 基因和 35S-ChiA-NOS 片段已经分别连接到克隆载体上。测序结果

表明,Lc-pGEM-T Easy 和 35S-ChiA-NOS-pMD19T 中的插入片段分别与原序列完全相同。

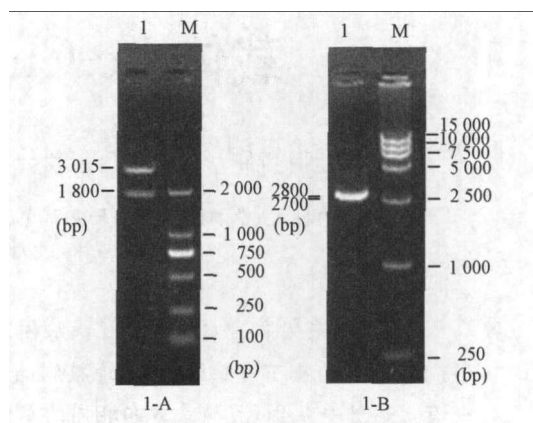


图 1 克隆载体的构建

注:图 1-A 重组质粒 Lc-pGEM-T Easy 的酶切鉴定, M: DL2000; 1: BamHI 和 SalI 双酶切 Lc-pGEM-T Easy。图 1-B 重组质粒 35S-ChiA-NOS-pMD19T 的酶切鉴定, M: DL 15 000; 1: EcoRI 单酶切 35S-ChiA-NOS-pMD19T。

2.2.2 单价重组植物表达载体 Lc-pBI121 的构建 由图 2 可知 Cry1Ab-pBI121 经 BamHI 和 SalI 双酶切(图 2-A)回收的载体片段和 2.2.1 中回收的 Lc 基因片连接,构建单价重组植物表达载体 Lc-pBI121。质粒 Lc-pBI121 经 BamHI 和 SalI 双酶切,分别得到 13 000 bp 左右的载体片段和 1 800 bp 左右的 Lc 基因片段(图 2-B),证明该基因已经插入到植物表达载体 pBI121 中。

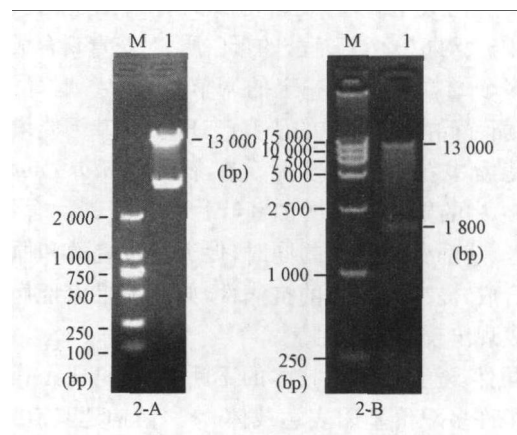


图 2 重组植物表达载体 Lc-pBI121 的构建

注:图 2-A 载体 Cry1Ab-pBI121 酶切, M: DL2000; 1: BamHI 和 SalI 双酶切 Cry1Ab-pBI121;图 2-B 重组质粒 Lc-pBI121 的酶切鉴定, M: DL15000; 1: BamHI 和 SalI 双酶切 Lc-pBI121。

2.2.3 双价重组植物表达载体 Lc-ChiA-pBI121 的构建

由图 3 可知,质粒 Lc-ChiA-pBI121 以 HindIII 和 EcoRI 双酶切,分别得到 2 800 bp 左右和 3 000 bp 左右的 2 条片段(图 3-A),与预测的 35S-ChiA-NOS 片段和 35S-Lc-NOS 片段大小一致,说明这 2 个基因已经连接

到植物表达载体上。又以 BamHI 和 SalI 双酶切,分别得到 13 200 bp 左右的载体片段、1 800 bp 左右的 Lc 基因片段、以及 2 条 1 378 bp 和 1 100 bp 左右的片段(图 3-B),这是由 ChiA 基因(1 644 bp)在 1 378 bp 处有 1 个 SalI 酶切位点所致,由此证明这 2 个基因的转录方向相同。

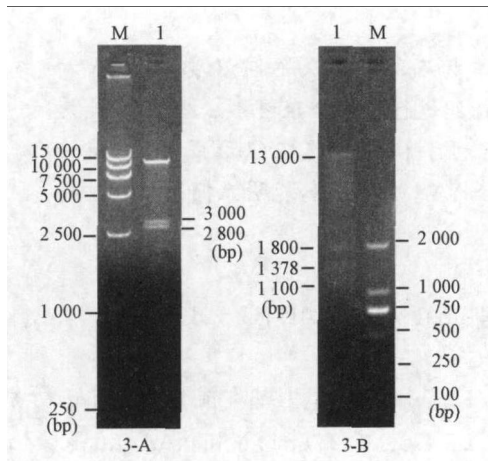


图 3 重组植物表达载体 Lc-ChiA-pBI121 的构建

注:图 3-A 重组质粒 Lc-ChiA-pBI121 酶切鉴定, M. DL 15 000; 1. HindIII 和 EcoRI 双酶切 Lc-ChiA-pBI121。图 3-B 重组质粒 Lc-ChiA-pBI121 酶切鉴定转录方向, M. DL 2 000; 1. BamHI 和 SalI 双酶切 Lc-ChiA-pBI121。

3 讨论

该研究构建了含有 CaMV 35S Promoter-Lc-NOS Terminator 片段和 CaMV 35S Promoter-ChiA-NOS Terminator 片段的双价基因表达载体,其可用于转基因研究,具有抗病害和虫害的双重作用。且 2 个基因都有完

整的转录单元,有利于基因表达。构建的载体中不含 GUS 报告基因,进一步增加了转基因的安全性。此外, pBI121 载体中的筛选基因是新霉素磷酸转移酶 II (NPTII),即卡那抗性基因,较其它具有潮霉素(Hgy)抗性基因载体,可以节省科研成本^[9]。该载体应用于转基因研究,在提高植物抗病虫害能力的同时,由于 Lc 基因能增加叶片和花瓣中花青素的含量,也有可能改变其叶片等部位颜色,从而增加植物的观赏价值。

参考文献

- [1] 刘艳荷,方继朝,郭慧芳. 昆虫杆状病毒几丁质酶及其应用研究进展[J]. 昆虫学报, 2008, 51(4): 430-436.
- [2] 高宇, 亓崇东, 谢响明. 植物几丁质酶的基因工程与分子生物学研究进展[J]. 生物技术通讯, 2004, 15(6): 642-645.
- [3] 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.
- [4] LI H H, Henryk Flachowsky, Fischer T C, et al. Maize Lc transcription factor enhances biosynthesis of anthocyanins, distinct proanthocyanidins and phenylpropanoids in apple (*Malus domestica* Borkh.) [J]. Planta, 2007, 226: 1243-1254.
- [5] Henryk Flachowsky, Iris Szankowski, Fischer T C, et al. Transgenic apple plants overexpressing the Lc gene of maize show an altered growth habit and increased resistance to apple scab and fire blight[J]. Planta, 2010, 231: 623-635.
- [6] 孔维文, 邓仲香, 王倩, 等. 含双边界序列植物双价表达载体的构建[J]. 分子植物育种, 2005, 3(6): 801-806.
- [7] 张志云, 张虎生, 孙毅. 双价抗虫基因植物表达载体的构建[J]. 西北植物学报, 2004, 24(8): 1402-1408.
- [8] 刘明坤, 刘昌财, 许志茹. 一种快速构建 35S 组成型植物双价表达载体的方法[J]. 生物技术通报, 2009(2): 87-92.
- [9] 申艳红, 陈晓静, 何玮毅. 番木瓜 PL 和 Gal 基因双价反义表达载体的构建[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2010, 29(2): 159-163.

Construction of Lc-ChiA-pBI121 Plant Expression Vector Containing Two Pest and Disease Resistant Genes

TIAN Qiang-qiang^{1,2}, XU Li³, TAN Li-xia², WANG Dun², LI Hou-hua¹

(1. College of Forestry, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shanxi 712100; 2. Key Laboratory of Plant Protection Resources and Pest Management, Ministry of Education, Yangling, Shanxi 712100; 3. College of Life Sciences, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shanxi 712100)

Abstract: The maize Lc transcription factor gene having an effect on disease-resistance and the HearNPV chitinase gene having both disease-resistant and insect-resistant abilities were ligated into the plant expression vector, pBI121. It was confirmed by the restriction enzyme digestion that the recombinant vector, Lc-ChiA-pBI121, was constructed successfully with the same transcriptional direction. The plant expression vector containing these two genes could be used for plant transgenic research to enhance plant resistance to diseases and pest.

Key words: plant expression vector; construction; Lc transcription factor; chitinase (ChiA)