

# At2 基因双 T-DNA 植物表达载体的构建

王文玲, 王贤磊, 熊丽曼, 高兴旺, 李冠

(新疆大学 生命科学与技术学院, 新疆 乌鲁木齐 830046)

**摘要:**以甜瓜品种‘MR-1’为试材,采用 PCR 技术,扩增出了 *At2* 基因并在两端添加 *Bam*H I 和 *Sac* I 酶切位点。结果表明:在 NCBI 上进行 BLAST 显示其氨基酸序列与 GeneBank 中已公布的 *At2* 基因的同源性为 99%;经 DNAMAN 软件分析,核苷酸序列同源性为 99.43%。将其连接在中间表达载体 G-pPTN133 上,得到替换了 GUS 基因的中间载体 A-pPTN133。A-pPTN133 再经 *Sca* I 酶切后,插入到经 *Sca* I 酶切的 pPTN133<sup>-</sup> 中,构建成双 T-DNA 植物表达载体 *At2*-pPTN133。经酶切和 PCR 鉴定证明了所构建载体的正确性。

**关键词:***At2* 基因;双 T-DNA;植物表达载体;无选择标记

**中图分类号:**Q 946 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)12-0107-06

运用转基因技术对作物进行品种改良已经成为一种有效的育种途径,随着植物遗传工程的发展,已经产生了大量具有人们所期望性状的农作物,仅中国就有 50 余种植物及 120 多个功能基因被科学家用于基因工程的研究中<sup>[1]</sup>,但是,转基因植物中标记基因的存在引发了人们对环境与健康人类的担忧<sup>[2-5]</sup>。因此,培育无选择标记的安全的转基因植物的呼声越来越高。

目前培育无选择标记转基因植物的方法有共转化法<sup>[6]</sup>、位点特异性重组<sup>[7]</sup>、转座子重组<sup>[8]</sup>、MAT 系统<sup>[9]</sup>、定点转换等<sup>[10]</sup>,其中共转化中双 T-DNA 载体系统是用获得无选择标记的转基因植物途径中相对简单、有效的方法,同时也是使用最为广泛的系统<sup>[11]</sup>。它是将 2 个分离的 T-DNA 构建于同 1 个表达载体上,其中 1 个 T-DNA 区含有目的基因,另 1 个 T-DNA 区含有选择标记基因,共转化到植物细胞中,这 2 个 T-DNA 可以分别整合到植物基因组的不同位点,在一定条件下,2 个 T-DNA 将发生分离,从而从后代分离群体中获得只含有目的基因而无选择标记基因的转化植株。

Taler D 等<sup>[12]</sup>从对所有甜瓜霜霉病病原都有很高的抗性的野生型品种 PI 124111F (PI) 中克隆了 1 个与抗霜霉病相关的抗性酶基因-*At2* 基因。PI 对霜霉病的抗性受控于此抗性酶基因,这 1 组成型表达的基因可以

编码乙醛酸转氨酶,易感品种中,*At2* 基因只在转录水平有较低水平的表达,过表达此抗性酶基因的转基因甜瓜中检测出了乙醛酸转氨酶的高水平表达同时也显示出对霜霉病的显著抗性。因此,此抗性酶基因为研究甜瓜抗霜霉病开辟了新的道路。

该研究从甜瓜品种 MR-1 中克隆得到 *At2* 基因,MR-1 是由甜瓜品种‘90319’自交 6 代后培育到的品种,而‘90319’又是‘PI 124111’自交 10 代后培育出的品种,因此‘MR-1’与‘PI 124111’具有同源的抗性基因,‘MR-1’同样对霜霉病也有很强的抗性<sup>[13]</sup>。将克隆的 *At2* 基因连接到构建成功的含有双 T-DNA 的植物表达载体 *At2*-pPTN133 上,其中 1 个 T-DNA 区插入抗性酶基因 *At2*,另外 1 个 T-DNA 区含有 *bar* 标记基因,在此基础上可以进一步进行农杆菌介导的遗传转化,以期得到无选择标记的只含有 *At2* 基因的转基因植株,从而为培育无选择标记基因的抗霜霉病的甜瓜奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

1.1.1 植物材料 甜瓜栽培品种‘MR-1’种子。

1.1.2 菌株、质粒、酶和试剂 大肠杆菌菌株 *E. coli* DH5 $\alpha$ ,根癌农杆菌菌株 EHA105 由新疆大学生物工程研究中心提供,植物表达载体 pPTN133<sup>[14]</sup>获赠于美国内布拉斯加州大学林肯分校 Clemente T E 教授,反转录试剂盒、T<sub>4</sub>-DNA 连接酶、限制性内切酶 *Sca* I 均购自 Fermentas 公司,*Taq* DNA 聚合酶、限制性内切酶 *Eco*R I、*Bam*H I、*Sac* I、去磷酸化酶 CIAP 均购自宝生物(大连)有限公司(TaKaRa),胶回收试剂盒购自新长江生物科技有限公司。

### 1.2 试验方法

质粒抽提、纯化、目的片段回收、补平、去磷酸化等

**第一作者简介:**王文玲(1986-),女,在读硕士,现主要从事植物分子生物学研究工作。E-mail:wangwenling86@163.com。

**责任作者:**李冠(1949-),男,硕士,教授,现主要从事植物生理生化与分子生物学研究工作。E-mail:guanli6666@126.com。

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31060148,31150004);新疆高新技术研究发展计划资助项目(201111120)。

**收稿日期:**2012-03-27

均按相应的操作说明进行,大肠杆菌感受态细胞的制备及转化参考文献[15]。

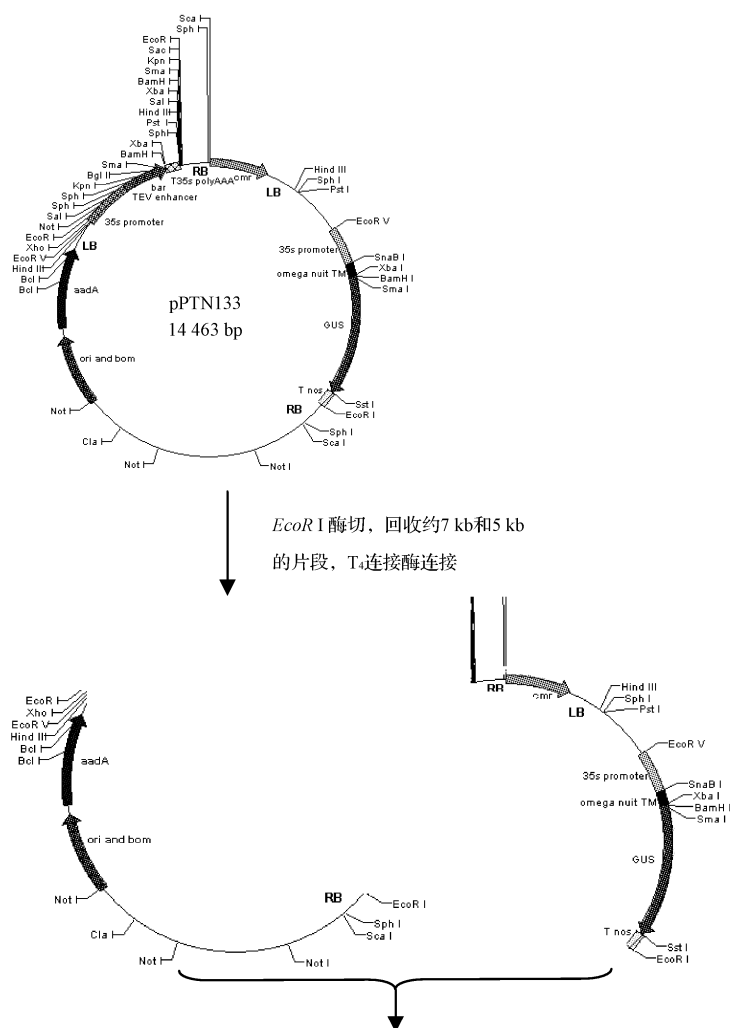
1.2.1 *At2* 基因的获得 根据 GenBank 中 *At2* 基因 (PUBMED 14688292) 序列设计引物对如下,为方便载体构建,在上下游引物的 5' 端分别添加 *Bam*H I 酶切位点和 *Sac* I 酶切位点(下划线部分)并加入保护碱基 CG: P<sub>1</sub>: 5'-CGGGATCCATGGATTACGTTTATGCA-3' (加入酶切位点 *Bam*H I); P<sub>2</sub>: 5'-CGGAGCTCAATTACATGGACATGGGAGA-3' (加入酶切位点 *Sac* I) 提取甜瓜品种 'MR-1' 的总 RNA, 反转录合成 cDNA, 以此为模板, 进行 RT-PCR 扩增, 获得带有 *Bam*H I 和 *Sac* I 的大小约为 1.2 kb 的目的片段。将此产物连接到克隆载体 pMD18-T Simple Vector 上, 连接产物命名为 *At2*::pMD18T S, 测序验证序列是否正确。将测序结果在 NCBI 网站上进行 BLAST。

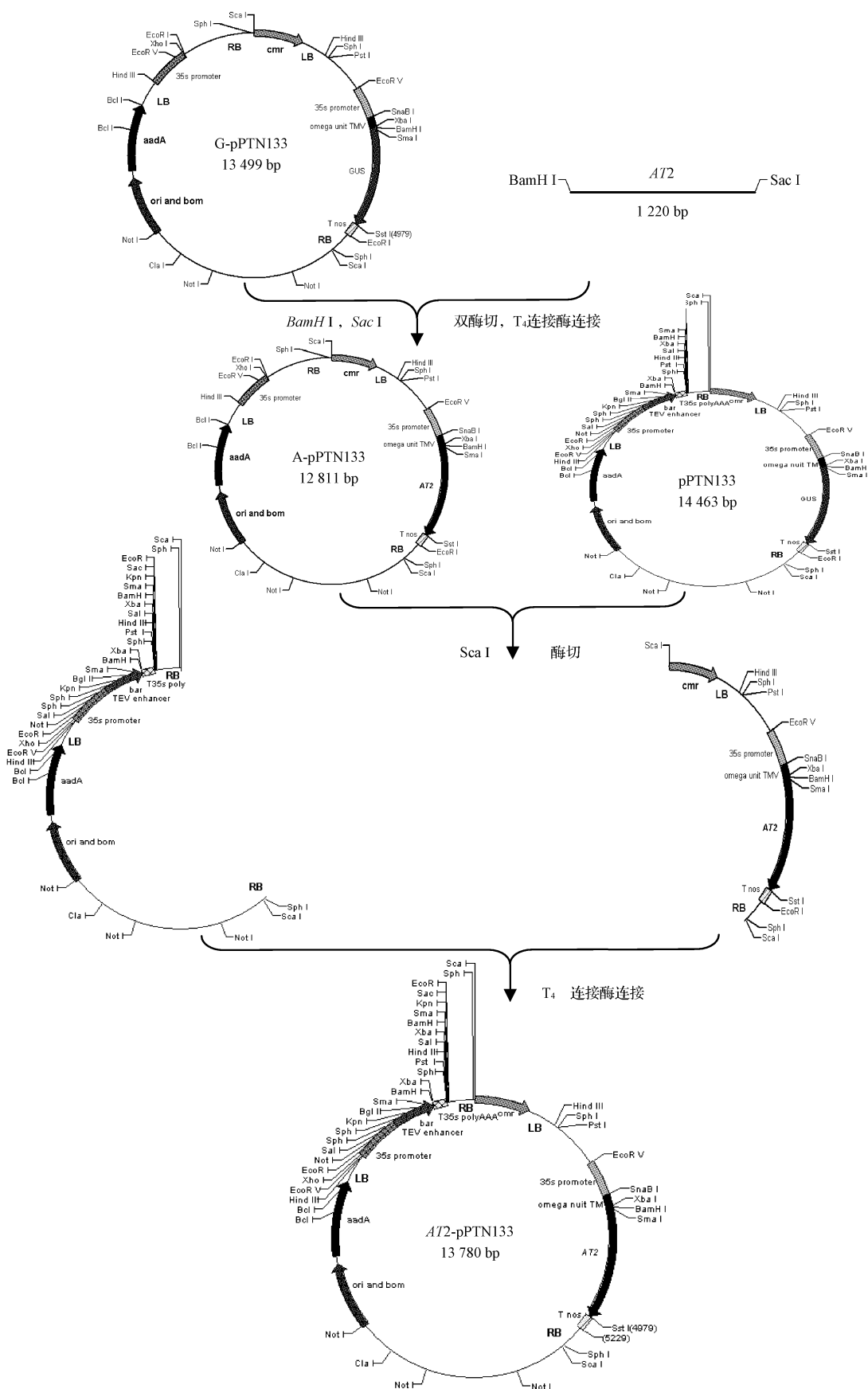
1.2.2 中间表达载体 G-pPTN133 的构建 用 *Eco*R I 酶切植物表达载体 pPTN133, 电泳分离后回收大小约为 7.9 kb 和 5.6 kb 的 2 个片段, 将 7.9 kb 的大片段用

CIAP 去磷酸化。T<sub>4</sub>-DNA 连接酶将这 2 个片段连接, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 抗生素筛选出阳性转化子, *Bam*H I/*Sac* I 双酶切鉴定, 将获得的中间载体命名为 G-pPTN133。

1.2.3 中间表达载体 A-pPTN133 的构建 用 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切 *At2*::pMD18T S, 电泳分离后回收约 1.2 kb 的片段, 连接到经 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切后的中间表达载体 G-pPTN133 上, 转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 抗生素筛选出阳性转化子, *Hind* III 酶切鉴定, 将获得的中间载体命名为 A-pPTN133。

1.2.4 双 T-DNA 共转化载体 CMA-pPTN133 的构建 用 *Sca* I 同时酶切 A-pPTN133 和 pPTN133。分别回收含有 *At2* 基因, 大小约为 5 kb 的片段和含有 *bar* 基因的大小为 8.9 kb 的片段, 将 8.9 kb 的大片段用 CIAP 去磷酸化, T<sub>4</sub> 连接酶将这 2 个片段连接。转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ , 抗生素筛选出阳性转化子, *Hind* III, *Eco*R I 酶切鉴定, 得到含有目的片段 *At2* 基因的双 T-DNA 的植物表达载体 *At2*-pPTN133。载体构建流程见图 1。



图1 双 T-DNA 共转化载体 *At2-pPTN133* 构建流程Fig.1 Construction flowchart of the double T-DNA co-transformation vector *At2-pPTN133*

## 2 结果与分析

### 2.1 *At2* 基因的克隆与鉴定

为将双 T-DNA 表达载体 pPTN133 上其中 1 个 T-DNA 区的 GUS 基因替换成 *At2* 目的基因,设计 *At2* 基因 PCR 扩增引物时同时在引物端添加 *Bam*H I/*Sac* I 酶切位点,0.8%的琼脂糖凝胶电泳检测 RT-PCR 扩增产物(图 2),结果显示扩增片段大小约 1.2 kb,与预期一致。克隆序列测序结果在 NCBI 上进行 BLAST 显示,氨基酸序列同源为 99%(图 3),用 DNAMAN 软件对测序结果与 GenBank 上公布的基因的 DNA 序列比对显示核苷酸序列的同源性为 99.43%(图 4)。

M 1 2

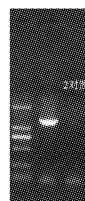


图 2 *At2* 基因 PCR 扩增产物电泳图

注:M;DNA 分子质量标记 DL 2000;1:*At2* 基因的 PCR 产物;2:未添加模板的阴性对照。

Fig. 2 PCR product of *At2* gene

Note:M;DNA molecular marker DL 2000;1:PCR amplified product;

2:Negative without template.

Query	1	MDYVYGPGRNHLFVPGPVNIPEQVLRAMNRNEDYRSPAVPALTKTLLDVKKIFKTTSG	180
Sbjct	1	MDYVYGPGRNHLFVPGPVNIPEQVLRAMNRNEDYRSPAVPALTKTLLDVKKIFKTTSG	60
Query	181	TPFFPTTGTGAWESALTNLSPGDRIVSFLIGQFSLLWIDQQQLNFKVDVIESEWGEG	360
Sbjct	61	TPFFPTTGTGAWESALTNLSPGDRIVSFLIGQFSLLWIDQQQLNFKVDVIESEWGEG	120
Query	361	AKLDVLAALKAADTDHTIKAVCIVHNETATGVTNDLSLVRILDEYRHPALFLVDGVSSI	540
Sbjct	121	AKLDVLAALKAADTDHTIKAVCIVHNETATGVTNDLSLVRILDEYRHPALFLVDGVSSI	180
Query	541	CALDFRMDDWGDVALTGSQKALSLPTGIGIVCASPRALEASKTAKSLRVFFDWKDYLFK	720
Sbjct	181	CALDFRMDDWGDVALTGSQKALSLPTGIGIVCASPRALEASKTAKSLRVFFDWKDYLFK	240
Query	721	YNLGTYWPTYPSIQLLYGLRAALDLVFEENGLVIARHKRLGQATRLAVEAWGLKNCTQK	900
Sbjct	241	YNLGTYWPTYPSIQLLYGLRAALDLVFEENGLVIARHKRLGQATRLAVEAWGLKNCTQK	300
Query	901	EEWHSDDTVA VVVPYIDSAEIVRRWAKRYNLSLGLNKGK VFRIGHLGNLNLQLL	1 080
Sbjct	301	EEWHSDDTVA VVVPYIDSAEIVRRWAKRYNLSLGLNKGK VFRIGHLGNLNLQLL	360
Query	1 081	GCLAGVEMILKDVGPVKLGSGVAAASSYLQNNIPLIPSRI	1203
Sbjct	361	GCLAGVEMILKDVGPVKLGSGVAAASSYLQNNIPLIPSRI	401

图 3 推测的氨基酸序列与公布的序列的比较结果

Fig. 3 The result of comparison between the predict amino acid sequence and the reported sequence

'MR-1'中克隆的 <i>At2</i> CenBank中 <i>At2</i> 序列	ATGGACTATGTTTATGGACCITGGAAGGAACCAATCTTTTGTGCGCGGGGCCGGTTAATAATC	60
'MR-1'中克隆的 <i>At2</i> CenBank中 <i>At2</i> 序列	ATGGACTATGTTTATGGACCITGGAAGGAACCAATCTTTTGTGCGCGGGGCCGGTTAATAATC	60
'MR-1'中克隆的 <i>At2</i> CenBank中 <i>At2</i> 序列	CCCGAACCAAGTCCITCGAGCAATGAACCGGAACACGAGGATATCGTTCCTCCAGCTGTT	120
'MR-1'中克隆的 <i>At2</i> CenBank中 <i>At2</i> 序列	CCCGAACCAAGTCCITCGAGCAATGAACCGGAACACGAGGATATCGTTCCTCCAGCTGTT	120
'MR-1'中克隆的 <i>At2</i> CenBank中 <i>At2</i> 序列	CCAGCAGTACACCAAGACCTCTGCTTGAAGGATGTCAAAAAGATATTCAAAACACCATCAGGC	180
'MR-1'中克隆的 <i>At2</i> CenBank中 <i>At2</i> 序列	CCAGCAGTACACCAAGACCTCTGCTTGAAGGATGTCAAAAAGATATTCAAAACACCATCAGGC	180
'MR-1'中克隆的 <i>At2</i> CenBank中 <i>At2</i> 序列	ACICCATTTTGTTCCTTACCACAGGTACAGGTGATGGGAGAGTGCTCTCACAACACACA	240
'MR-1'中克隆的 <i>At2</i> CenBank中 <i>At2</i> 序列	ACICCATTTTGTTCCTTACCACAGGTACAGGTGATGGGAGAGTGCTCTCACAACACACA	240
'MR-1'中克隆的 <i>At2</i> CenBank中 <i>At2</i> 序列	TTGCTCCGGGAGATCGGATCGTGTCTATTCCTTATTTGGTCAATTCAGTTTGGTTTGGATT	300
'MR-1'中克隆的 <i>At2</i> CenBank中 <i>At2</i> 序列	TTGCTCCGGGAGATCGGATCGTGTCTATTCCTTATTTGGTCAATTCAGTTTGGTTTGGATT	300
'MR-1'中克隆的 <i>At2</i> CenBank中 <i>At2</i> 序列	GATCAGCAGCAGCGCTCTCAATTTCAAAGTCGACGTGATGAAAGTGAATGGGGTGAAGGT	360
'MR-1'中克隆的 <i>At2</i> CenBank中 <i>At2</i> 序列	GATCAGCAGCAGCGCTCTCAATTTCAAAGTCGACGTGATGAAAGTGAATGGGGTGAAGGT	360
'MR-1'中克隆的 <i>At2</i> CenBank中 <i>At2</i> 序列	GCTAAGCTTGTATGTTTATGCTGCAAGCTTGCAGCTGATACCTGATCATATATAAAGGCA	420
'MR-1'中克隆的 <i>At2</i> CenBank中 <i>At2</i> 序列	GCTAAGCTTGTATGTTTATGCTGCAAGCTTGCAGCTGATACCTGATCATATATAAAGGCA	420
'MR-1'中克隆的 <i>At2</i> CenBank中 <i>At2</i> 序列	GTTTGATTTGTTTATGATGAGACAGCACTGGTGTGACTAATGATTTGCTCTAGTAAGA	480
'MR-1'中克隆的 <i>At2</i> CenBank中 <i>At2</i> 序列	GTTTGATTTGTTTATGATGAGACAGCACTGGTGTGACTAATGATTTGCTCTAGTAAGA	480
'MR-1'中克隆的 <i>At2</i> CenBank中 <i>At2</i> 序列	AGAATCTAGATGAATACAGGCACTCCAGCTCTTTCCTCGTGGATGGAGTGTCTTCGATA	540
'MR-1'中克隆的 <i>At2</i> CenBank中 <i>At2</i> 序列	AGAATCTAGATGAATACAGGCACTCCAGCTCTTTCCTCGTGGATGGAGTGTCTTCGATA	540
'MR-1'中克隆的 <i>At2</i> CenBank中 <i>At2</i> 序列	TGTGCTCTTGAATTTTCGATGAGGATTTGGGGAGTGGATGTGGCTTTAACTGGCTCTCAA	600
'MR-1'中克隆的 <i>At2</i> CenBank中 <i>At2</i> 序列	TGTGCTCTTGAATTTTCGATGAGGATTTGGGGAGTGGATGTGGCTTTAACTGGCTCTCAA	600
'MR-1'中克隆的 <i>At2</i> CenBank中 <i>At2</i> 序列	AAAGCTCTTTCCTTCCCAACCGGAATTTGGTATTTTGTGCGCCAGCCCGGAGCCTGAG	660
'MR-1'中克隆的 <i>At2</i> CenBank中 <i>At2</i> 序列	AAAGCTCTTTCCTTCCCAACCGGAATTTGGTATTTTGTGCGCCAGCCCGGAGCCTGAG	660
'MR-1'中克隆的 <i>At2</i> CenBank中 <i>At2</i> 序列	GCATCTAAAAACAGCAAAATACACACAGATTTTCTTGTGACTTGAAGGACATCTCAAGTTC	720
'MR-1'中克隆的 <i>At2</i> CenBank中 <i>At2</i> 序列	GCATCTAAAAACAGCAAAATACACACAGATTTTCTTGTGACTTGAAGGACATCTCAAGTTC	720
'MR-1'中克隆的 <i>At2</i> CenBank中 <i>At2</i> 序列	TATAACTTAGGAACATACCTGGCTTACACTCTTCCATCCAACCTCTTATATGGGCTTAGA	780
'MR-1'中克隆的 <i>At2</i> CenBank中 <i>At2</i> 序列	TATAACTTAGGAACATACCTGGCTTACACTCTTCCATCCAACCTCTTATATGGGCTTAGA	780
'MR-1'中克隆的 <i>At2</i> CenBank中 <i>At2</i> 序列	CGAGCTTTGGACCTCGTATTTGAGGAAGGCCCTTGAATAATGATTTGGGAGACATAAAGCT	840
'MR-1'中克隆的 <i>At2</i> CenBank中 <i>At2</i> 序列	CGAGCTTTGGACCTCGTATTTGAGGAAGGCCCTTGAATAATGATTTGGGAGACATAAAGCT	840
'MR-1'中克隆的 <i>At2</i> CenBank中 <i>At2</i> 序列	TTAGGCCAAGCAACAAGGCTTGTCTGTGGAGGCAATGGGGTTTGAAGAAGTGCACACAAAAG	900
'MR-1'中克隆的 <i>At2</i> CenBank中 <i>At2</i> 序列	TTAGGCCAAGCAACAAGGCTTGTCTGTGGAGGCAATGGGGTTTGAAGAAGTGCACACAAAAG	900
'MR-1'中克隆的 <i>At2</i> CenBank中 <i>At2</i> 序列	GAGGAATGGCACAGTACACCTGTGACTGCTGTGTTGTTTCTCCATACATTTGACAGTGCA	960
'MR-1'中克隆的 <i>At2</i> CenBank中 <i>At2</i> 序列	GAGGAATGGCACAGTACACCTGTGACTGCTGTGTTGTTTCTCCATACATTTGACAGTGCA	960
'MR-1'中克隆的 <i>At2</i> CenBank中 <i>At2</i> 序列	GAAATTTGTAGAAAGGCTTGGAAAGAGATACAAATTTGAGTTTAGGCTTTGGCCCTCAACAAA	1 020
'MR-1'中克隆的 <i>At2</i> CenBank中 <i>At2</i> 序列	GAAATTTGTAGAAAGGCTTGGAAAGAGATACAAATTTGAGTTTAGGCTTTGGCCCTCAACAAA	1 020
'MR-1'中克隆的 <i>At2</i> CenBank中 <i>At2</i> 序列	GTTGCTGGTAAAGTCTTCAGAAATGGCCACCCTTGGCAACCTAAATGAGTTGCAACTGTTG	1 080
'MR-1'中克隆的 <i>At2</i> CenBank中 <i>At2</i> 序列	GTTGCTGGTAAAGTCTTCAGAAATGGCCACCCTTGGCAACCTAAATGAGTTGCAACTGTTG	1 080
'MR-1'中克隆的 <i>At2</i> CenBank中 <i>At2</i> 序列	GGTTGCTTGTGCTGGTGTGGAGATGATTCGAAAGGATGTTGGTTATCCAGTGAAGCTTGGG	1 140
'MR-1'中克隆的 <i>At2</i> CenBank中 <i>At2</i> 序列	GGTTGCTTGTGCTGGTGTGGAGATGATTCGAAAGGATGTTGGTTATCCAGTGAAGCTTGGG	1 140
'MR-1'中克隆的 <i>At2</i> CenBank中 <i>At2</i> 序列	AGTGTGTGTTGCAGCAGCTTCTTCATATTTGCAGAACACATCCCTCTCATCTCTCTCGG	1 200
'MR-1'中克隆的 <i>At2</i> CenBank中 <i>At2</i> 序列	AGTGTGTGTTGCAGCAGCTTCTTCATATTTGCAGAACACATCCCTCTCATCTCTCTCGG	1 200
'MR-1'中克隆的 <i>At2</i> CenBank中 <i>At2</i> 序列	ATTTGATATTCGATCGGTTTCAAAACCGTG	1 229
'MR-1'中克隆的 <i>At2</i> CenBank中 <i>At2</i> 序列	ATTTGATATTCGATCGGTTTCAAAACCGTG	1 229

图 4 克隆的 *At2* 序列与公布的序列的比较结果

Fig. 4 The result of comparison between the *At2* from MR-1 sequence and the reported sequence

## 2.2 中间表达载体 G-pPTN133 的构建

鉴于质粒 pPTN133 上有较多的 *Bam*H I/*Sac* I 酶切位点,会严重干扰目的基因的替换,因此必须去除,所以先用 *Eco*R I 对质粒进行单酶切,得到大小分别约为 0.9、5.6、7.8 kb 的 3 个片段(图 5),把 5.6 kb 和 7.8 kb 的 2 个片段连接。连接成功的重组质粒用 *Bam*H I/*Sac* I 双酶切鉴定。由于 5.6 kb 的片段上不含有可以在大肠杆菌中生长的复制起始位点,所以其自连的片段不会在筛选培养基上生长,而 7.8 kb 的大片段上不含有 *Bam*H I/*Sac* I 的酶切位点,所以用这 2 个酶双酶切后如果有大小约为 1.9 kb 的片段出现,则确定为连接成功的重组质粒。由图 6 可知,对挑取的 10 个重组子进行双酶切鉴定,只有泳道 7 的重组子经 *Bam*H I/*Sac* I 双酶切后得到约为 1.9 kb 和 11 kb 的 2 条带,与预期大小一致。因此确定其为连接成功的重组质粒。

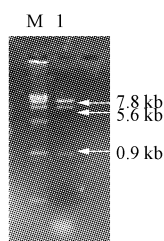


图 5 *Eco*R I 单酶切 pPTN133 电泳图

注:M;DNA 分子质量标记 DL 15 000;1:酶切后的大小片段。

Fig. 5 Single restriction patterns of pPTN133 vector by *Eco*R I

Note:M;DNA molecular marker DL 15 000;1:Single restriction patterns.

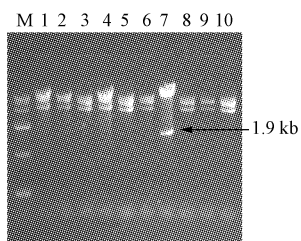


图 6 载体 G-pPTN133 的鉴定

注:M;DNA 分子质量标记 DL 15 000;1~10:重组质粒。

Fig. 6 Identification of recombinant plasmid G-pPTN133

Note:M;DNA molecular marker DL 15 000;1~10:Recombinant plasmid.

## 2.3 中间表达载体 A-pPTN133 的构建

用 *Hind* III 对重组载体 A-pPTN133 酶切鉴定,经 *Hind* III 酶切得到约为 10 kb 和 2.6 kb 的 2 条带(图 7),与预期大小一致,说明中间载体 A-pPTN133 已构建成功。

## 2.4 双 T-DNA 共转化载体 At2-pPTN133 的构建

由于片段 *cmr*-LB- *At2*-RB 和去磷酸化的载体 pPTN133/*Sca* I 为平末端连接,因此片段 *cmr*-LB- *At2*-RB 在中间载体 pPTN133/*Sca* I 上有正反 2 种插入方式,也可能呈多拷贝插入,即多个片段串联后再插入。试验中共挑取 9 个重组转化子进行鉴定,菌落 PCR 表明,挑取

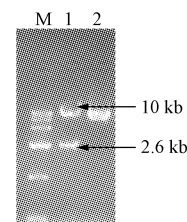


图 7 *Hind* III 单酶切 A-pPTN133 电泳图

注:M;DNA 分子质量标记 DL 15 000;1:酶切后的大小片段;2:未酶切质粒对照。

Fig. 7 Identification of recombinant plasmid A-pPTN133 vector by *Hind* III

Note:M; DNA molecular marker DL 15 000; 1: Single restriction patterns; 2: Plasmid without restriction as control.

的转化子均有插入片段插入。选取其中的 1 个转化子的质粒 DNA 经 *Hind* III 单酶切后出现了大小分别为 10、2、1.4 kb 的 3 条片段;经 *Eco*R I 单酶切后出现了大小分别为 7.8、4.8、0.9 kb 的 3 个片段,与预期大小一致。说明双 T-DNA 表达载体 At2-pPTN133 构建成功(图 8、9)。

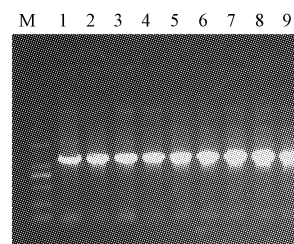


图 8 共转化载体 At2-pPTN133 的菌落 PCR

注:M;DNA 分子质量标记 DL 15 000;1~9:重组质粒。

Fig. 8 PCR product of co-transformation plasmid At2-pPTN133

Note:M;DNA molecular marker DL 15 000;1~9:Recombinant plasmid.

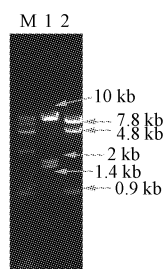


图 9 *Hind* III, *Eco*R I 单酶切 At2-pPTN133 电泳图

注:M;DNA 分子质量标记 DL 15 000;1:*Hind* III 酶切后的大小片段;2:*Eco*R I 酶切后的大小片段。

Fig. 9 Identification of recombinant plasmid A-pPTN133 vector by *Hind* III and *Eco*R I

Note:M; DNA molecular marker DL 15 000; 1: Single restriction patterns by *Hind* III; 2: Single restriction patterns by *Eco*R I.

## 3 讨论与结论

随着分子生物学得迅猛发展,转基因技术在作物的遗传改良中起着关键的作用,但是目前在世界范围内,

转基因植物安全性问题是一个备受关注的问题,该问题不仅仅是环境和食品安全问题,更是技术问题,利用生物技术手段改造传统的植物转化体系,以消除食品安全问题,培育无选择标记的转基因植物是消除生物安全性的一种有效的方法。

该研究以甜瓜品种‘MR-1’为材料,克隆了抗霜霉病 *At2* 基因,在 NCBI 上进行 BLAST 显示其氨基酸序列与 GeneBank 中已公布的 *At2* 基因的同源性为 99%;经 DNAMAN 软件分析,核苷酸序列同源性为 99.43%。并成功将此 *At2* 基因构建至双 T-DNA 植物表达载体上,得到含有抗霜霉病基因的双 T-DNA 植物表达载体 *At2*-pPTN133,该载体含有 2 个 T-DNA 区:第 1 个 T-DNA 区含有 CaMV 35s 启动子启动的 *At2* 基因;第 2 个 T-DNA 区含有 CaMV 35s 启动子启动,TEV 增强子增强的抗除草剂基因 *bar*。

在此基础上,可进一步将此双 T-DNA 植物表达载体运用于转化体系中,在筛选初期,仍然可以通过标记基因 *bar* 来进行筛选,获得阳性转基因植株,之后再将  $T_0$  进行自交,使得目的基因与标记基因发生分离,从而筛选出只含有目的基因而不含有标记基因的转基因甜瓜。这样不但能消除了转基因作物的食品安全隐患,同时与还可获得常规育种难以获得的抗病种质,为甜瓜育种开辟新的道路,也为运用遗传转化手段培育抗病甜瓜新品种奠定良好的基础。

### 参考文献

- [1] Huang J, Rozelle S, Prat C, et al. Plant Biotechnology in China [J]. Science, 2002, 295: 674-677.
- [2] Qian Y. Analysis of advantages and disadvantages on transgenic crops [J]. Biotechnology Informations, 1999, 5: 7-11.
- [3] 董志峰, 管华诗, 马荣才, 等. 转基因植物中外源非目的基因片段的生物安全研究进展[J]. 植物学报, 2011, 43(7): 661-672.
- [4] 雷茂良, 程金根. 全球转基因植物发展现状[J]. 生物技术通报, 1988 (6): 30-32.
- [5] Ow, DW, 2011, The right chemistry for marker gene removal [J]. Nature Biotechnology, 19(2): 115-116.
- [6] Komari T, Hihe Y, Saito Y, et al. Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers [J]. Plant Journal, 1996, 10(1): 165-174.
- [7] Cleave A P, Mitrad S, Mudge S R, et al. Selectable marker-free transgenic plants without sexual crossing transient expression of crecrecombinase and use of a conditional lethal dominant gene [J]. Plant Molecular Biology, 1999, 40(2): 223-235.
- [8] Dale E C, Ow D W. Gene transfers with subsequent removal of the selection gene from the host genome [J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1991, 88: 10558-10562.
- [9] Goldsbrough A P, Lastrella C N, Yoder J I. Transposition mediated repositioning and subsequent elimination of marker genes from transgenic tomato [J]. Nature Biotechnology, 1993, 11: 1286-1292.
- [10] Russell S H, Hoopes J L, Odell J T. Directed excision of a transgene from the plant genome [J]. Molecular Genetics and Genomics, 1992, 234: 49-59.
- [11] Miki B, Mchugh S. Selectable marker genes in transgenic plants: applications, alternatives and biosafety [J]. Biotechnology, 2004, 107(3): 193-232.
- [12] Taler D, Galperin M, Benjamin I, et al. Plant eR Genes that encode photorespiratory enzymes confer resistance against disease [J]. The Plant Cell, 2004, 16: 172-184.
- [13] Thomas C E, Cohen Y, McCreight Y D, et al. Inheritance of resistance to downy mildew in *Cucumis melo* [J]. Plant Dis, 1988, 72: 33-35.
- [14] Xing A, Zhang Z, Sato S, et al. The use of the two T-DNA binary system to derive marker-free transgenic soybeans [J]. In Vitro Cell. Dev. Biol. -Plant, 2000, 36: 456-463.
- [15] 萨姆布鲁克 J, D. W. 拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 黄培堂, 译. 3 版, 北京: 科学出版社, 2002.

## Construction and Verification of Double T-DNA Plant Expression Vector of the *At2* Gene

WANG Wen-ling, WANG Xian-lei, Xiong Li-man, GAO Xing-wang, LI Guan

(College of Life Science and Technology, Xinjiang University, Urumqi, Xinjiang 830046)

**Abstract:** Taking melon cultivars ‘MR-1’ as material, the enzymatic resistance genes *At2* was amplified by PCR method and the *BamH* I enzyme site and *Sac* I enzyme site was also added. The results showed that its amino acid sequence homology was 99% compared with “*At2*” gene published in GeneBank after BLAST in NCBI; the nucleotide sequence homology was 99.43% after analysis by DNAMAN. The acquired gene was ligated to plasmid G-pPTN133, and therefore the GUS gene was replaced of vector A-pPTN133 was constructed. The plasmid A-pPTN133 was digested by *Sac* I and then ligated to the vector pPTN133<sup>+</sup> which was also digested by *Sac* I, so the plant expression vector *At2*-pPTN133 with double T-DNA was finally obtained. The results showed that enzymes digestion and PCR demonstrated the correctness of the vector. The double T-DNA vector can be transformed into melon mediated by *Agrobacterium tumefaciens*.

**Key words:** *At2* gene; double T-DNA; plant expression vector; marker-free