

基于 In-fusion 技术的 *ERECTA* 基因植物表达载体的构建

陈菲帆, 王琪琦, 钟辉丽, 付冰冰, 任丹莉, 李玉红

(西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100)

摘要:以黄瓜品种‘长春密刺’(CCMC)为试材,利用高保真酶 Iproof 及不依赖于酶切的 In-fusion 技术,构建基于本底启动子驱动的黄瓜 *ERECTA* 基因的植物表达载体,以探讨 *ERECTA* 基因在黄瓜中的功能,以期为黄瓜抗性性状的遗传改良提供技术支持。结果表明:从 CCMC 的基因组 DNA 中克隆的 2 段 *gERECTA* (DNA 序列)长度分别为 8 940 bp 和 9 812 bp,并分别命名为 *CsgERECTA*-Flag 和 *CsgERECTA*-Poly。经过质粒 PCR、梯度片段 PCR 和测序结果的鉴定表明,pCambia3301-*gERECTA* 的 2 个植物表达载体都已成功构建并转入根癌农杆菌 EHA105 中。

关键词:黄瓜;*ERECTA*;长片段扩增;In-fusion;表达载体

中图分类号:Q 943.1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2015)18-0110-06

ERECTA 基因是植物体内编码富含亮氨酸重复序列的类受体蛋白激酶家族成员之一。在拟南芥上的研究表明,*ERECTA* 基因可改变蒸腾效率,与植株的抗旱性密切相关^[1-2],*ERECTA* 基因的过表达可使水稻水分利用率大大增强^[3]。另外,*ERECTA* 基因还参与植株对细菌和真菌的抗性^[4-5],*ERECTA* 基因的这些表现显示了它在植物抗旱或抗病育种方面的应用潜力^[6]。但目前对 *ERECTA* 基因的研究主要集中在模式植物拟南芥上,对于在其它农作物和园艺作物的研究罕见报道。黄瓜作为重要的蔬菜作物和典型的模式植物(如研究维管束、性型分化和单性结实),对黄瓜的 *ERECTA* 基因进行研究,可为 *ERECTA* 基因在黄瓜中的应用(如提高抗旱性)提供一种可能性。

在拟南芥上的研究表明,*ERECTA* 基因的 DNA 长度(含启动子)为 9.4 kb,*ERECTA* 基因的正常表达强烈的依赖内含子的存在,内含子对于 *ERECTA* 基因的正常表达是必需的,无内含子的 *ERECTA* 基因与有内含

子的 *ERECTA* 基因相比,蛋白表达量下调了 500~900 倍,并且 *ERECTA* 基因的 Poly(A)尾巴结构的完整性对其转录后翻译水平的表达也很关键^[7]。课题组推测在黄瓜作物上,*ERECTA* 基因的表达同样需要内含子存在,因此在构建 *ERECTA* 基因的植物表达载体进行基因功能研究时,很有必要保持其内含子的完整性。根据西北农林科技大学园艺学院黄瓜课题组对黄瓜 *ERECTA* 基因的测序结果,黄瓜中 *ERECTA* 基因长度约为 9 000 bp,属于长片段克隆,因此构建 *ERECTA* 基因组的 DNA 植物表达载体,涉及到长片段的克隆和大片段重组载体的构建。

在大片段重组载体构建过程中,大量扩增出阳性目的片段是关键步骤,PCR 扩增过程中的保真性难以保证,目前相关报道较少。在扩增出大片段后,涉及到与载体的融合,传统的 DNA 分子克隆大多依赖于酶切和连接,但是它有较大的局限性,首先酶切与连接的步骤复杂烦琐,费时费力;其次有无合适的酶切位点是该方法能否使用的关键因素,特别在克隆长基因片段时,往往由于没有合适的酶切位点使该方法难以应用;另外克隆的效率也难以控制^[8]。在水稻和拟南芥的 *ERECTA* 基因表达载体的构建上,均使用了传统基因融合技术克隆基因组 DNA 并构建植物表达载体,但试验周期长,操作繁琐,并且很大程度上受限于合适酶切位点的选择^[3,9]。

In-fusion 技术作为一种新兴的 DNA 克隆技术,其原理是在目的基因 PCR 引物 5'端加上与线性化载体同

第一作者简介:陈菲帆(1989-),男,硕士研究生,现主要从事黄瓜种质资源和生物技术等研究工作。E-mail:aaronchan116@126.com.

责任作者:李玉红(1973-),女,博士,教授,现主要从事黄瓜种质资源与生物技术等研究工作。E-mail:liyuhong73@126.com.

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31171955;31471891);西北农林科技大学优秀人才科研专项资金资助项目(QN2009011)。

收稿日期:2015-05-25

源的 15 bp 碱基序列,以使 PCR 扩增产物两端分别带上与线性化载体两端同源的 15 bp 碱基序列,In-fusion 酶识别目的基因的 PCR 产物和线性化载体两端的同源序列,并发生同源重组^[10],这种技术可简便快速实现片段与片段或片段与载体的无缝连接,不受酶切位点的限制,也不需要单独的连接反应,一步实现载体与片段的重组^[11],可适用于各种载体的构建,也可完成多片段连接和定点突变试验,是一种快捷高效的克隆技术^[12]。该研究利用 Iproof 高保真酶对黄瓜 *ERECTA* 基因长片段进行扩增,并采用 In-fusion 技术完成长片段与载体的融合,进行黄瓜 *ERECTA* 基因的植物表达载体的构建,以期构建长片段基因的植物表达载体提供技术参考,也为黄瓜 *ERECTA* 基因的遗传转化奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

黄瓜品种‘长春密刺’(CCMC)购于黑龙江省鑫星农业发展有限公司。供试材料于光照培养箱中培养,光周期为 16 h/8h,日间温度 26℃,夜间温度 15℃。

植物表达载体 pCAMBIA3301、大肠杆菌感受态受体菌株 Top10 以及根癌农杆菌 EHA105 为西北农林科技大学园艺学院课题组保存;DNA 聚合酶 Iproof 购于杨凌杰一生物技术有限公司,质粒小提试剂盒、DNA 纯化回收试剂盒均购于北京天根公司;限制性内切酶 EcoRI 和 Hind III 购于 Fermentas 公司;一步克隆试剂盒 NovoRec 购于上海近岸科技有限公司,DNA 标准分子量(10 kb)购于广州东盛生物科技有限公司;引物的合成和序列测定工作,均委托北京奥科鼎盛生物科技有限公司完成。

1.2 试验方法

1.2.1 叶片总 DNA 提取 以黄瓜幼苗期鲜嫩叶片为材料,总 DNA 提取方法参照 CTAB 改良法进行^[13]。利用微型紫外分光光度计 NanoDrop2000c 测得提取的黄瓜基因组 DNA 母液浓度,并将母液稀释成为 50 ng/μL 的工作液。

1.2.2 基于 In-fusion 技术的 PCR 引物设计 根据 PCR 引物设计的一般原则和 In-fusion 引物原理^[11],利用 Primer Premier 5 软件,参照已经测序的黄瓜种质‘9930’的 DNA 序列,在西北农林科技大学园艺学院黄瓜课题组对 *ERECTA* 基因本身启动子克隆和验证结果的基础上,共设计 2 对特异性引物分别用于扩增 *ERECTA* 基因含 Poly(A)尾巴结构的 DNA 序列(上游引物 Infusion-L,下游引物 Infusion-R1)和引入 flag 标签不含 Poly(A)尾巴结构的 DNA 序列(上游引物 Infusion-L,下游引物 Infusion-R2)。2 对引物的上游引物相同,下游引物不同,其中下游引物 Infusion-R2 引入 flag 标签以替代 *ERECTA* 基因的终止密码子,与上游引物 Infusion-L 组

合后扩增产物命名为 *CsgERECTA-Flag*;下游引物 Infusion-R1 保留终止密码子并且引入 Poly(A)尾巴结构,与上游引物 Infusion-L 组合后扩增产物命名为 *CsgERECTA-Poly*。上游引物 Infusion-L 序列为:5' CCATGATTAC GAATTC AAGGAAGTCACATCA CA TAGGCTAAC -3'(下划线为 EcoRI 酶切位点);下游引物 Infusion-R1 序列为:5' GGCCAGTGCCAAGCTT CAAC CACATACG ACCATTATTG -3'(下划线为 HindIII 酶切位点),下游引物 Infusion-R2 序列为:5' GGCCA GTGC CAAGCTTTTACTTATCGTCGTCA TCCTTGTAATC CTC ACTGTTTTGTGATATTACCTCTC -3'(下划线为 HindIII 酶切位点);其中下划线为酶切位点,虚线为依据 *ERECTA* 基因的 DNA 序列设计的引物。以上引物酶切位点前 10 bp 序列以及部分酶切位点的序列为线性化 pCAMBIA3301 载体粘性末端的同源序列,同时也可作为酶切位点的保护碱基。同时在 *ERECTA* DNA 序列中每间隔 3 kb 设计 1 条检测引物,形成梯度片段,3 条引物分别命名为 Pd1(5'-GACGGGATCGGCC CAATCAGTC -3'),Pd2(5'-CTTGTGGGAATGTCA CCAGCTAGATTG -3')和 Pd3(5'-TGCGG AGTCTTTAGATTTCATATCTC -3');分别与 Infusion-L 组合,用于重组质粒的鉴定。

1.2.3 目的片段的 PCR 扩增 以提取的黄瓜基因组 DNA 为模板,分别以 Infusion-L 为上游引物,Infusion-R1 和 Infusion-R2 为下游引物,利用高保真的 Iproof 酶扩增 *ERECTA* 的 DNA 序列。反应体系为:5×Buffer Q(含 Mg²⁺) 10 μL, dNTP(10 mmol/L) 1 μL,上下游引物(10 μmol/L)各 1 μL,DNA 模板(50 ng/μL) 1 μL,Iproof 酶(2 U/μL) 1 μL,无菌水补齐终体积至 50 μL。反应条件为 96℃ 预变性 2 min;96℃ 变性 20 s,58℃ 退火 30 s,68℃ 延伸 210 s,32 个循环;68℃ 延伸 10 min。PCR 扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳分离检测,切胶回收目的片段。

1.2.4 植物表达载体 pCAMBIA3301 的线性化处理 将 pCAMBIA3301 载体用 EcoR I 和 Hind III 进行双酶切,酶切体系为:pCAMBIA3301(1 700 ng/μL) 3 μL,10×tango buffer 4 μL,EcoR I(10 U/μL) 0.5 μL,Hind III(10 U/μL) 1 μL,无菌水补齐终体积至 20 μL,37℃ 酶切过夜。1% 的琼脂糖凝胶电泳后,回收约 11 kb 的单一线性化载体片段。

1.2.5 重组质粒的构建及验证 回收后的线性化载体和目的基因用超微量分光光度计测定浓度后,利用 Promega 生物技术公司的网站(<http://www.promega.com/apps/biomath/index.html?calc=ratio>)将线性化载体与目的片段按 1:3 的比例计算后,加入到 In-fusion 连接体系中。反应体系为:10×重组缓冲液 2 μL,NovoRec 重组酶 1 μL,线性化载体(100 ng/μL):目的片段=1:3,无菌水补齐至 20 μL。37℃ 温浴 20 min,转化感受态大

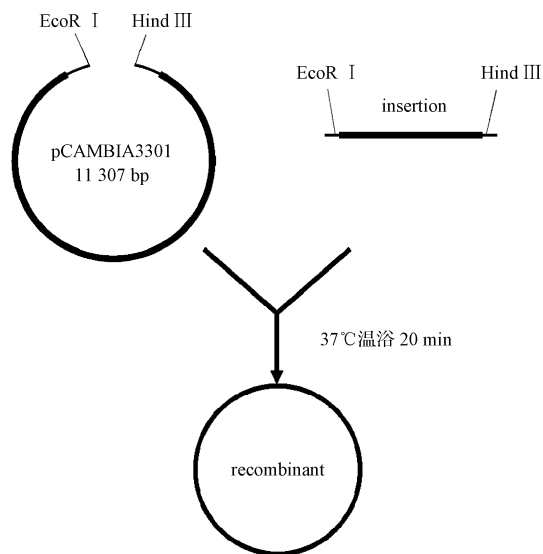
肠杆菌 Top10, 经卡那霉素筛选后, 挑取阳性单克隆, 分别利用上游引物 Infusion-L、Pd1、Pd2、Pd3 和下游引物 Infusion-R1、Infusion-R2, 对重组质粒进行 PCR 梯度片段的检测以及对扩增的片段进行测序, 来验证片段是否成功连到植物表达载体上。

1.2.6 根癌农杆菌的转化 通过冻融法将成功构建的重组质粒 *CsgERECTA*-Flag 和 *CsgERECTA*-Poly 分别转化根癌农杆菌 EHA105, 经过利福平和卡那霉素(终浓度都为 50 mg/L)双抗性筛选阳性单克隆后大量扩繁。按照天根质粒小提试剂盒说明书提取农杆菌质粒并进行 PCR 验证, 确保重组质粒转入农杆菌中。

2 结果与分析

2.1 *ERECTA* 基因的植物表达载体构建策略

植物表达载体 pCambia3301 经过 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切后, 切胶回收此线性化的载体, 大小约为 11 250 bp; 设计 *gERECTA* 的 PCR 扩增特异性引物, 然后在引物的 5' 端添加与连接载体末端同源的 15 bp 碱基序列, 利用高保真的 Iproof 酶扩增目的基因片段, 凝胶电泳回收后, 在 In-fusion 连接体系中, 直接作为连接片段与线性化的 pCambia3301 载体相连, 经过 37℃ 恒温水浴 20 min 后, 一步克隆反应完成(图 1)。



注: 黑色突出细线代表载体和扩增片段的同源序列。

Note: Amplicon was represented by black prominent thread.

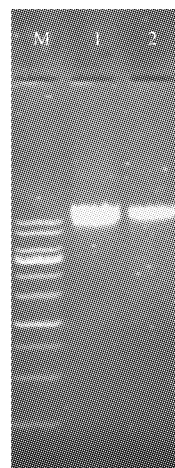
图 1 植物表达载体 pCambia3301-*ERECTA* 一步克隆构建图

Fig. 1 Construction view of recombinant using In-fusion Homologous sequence of plasmid

2.2 本身启动子驱动的 *ERECTA* 基因植物表达载体的构建与鉴定

利用引物 Infusion-L 为上游引物, Infusion-R1 和

Infusion-R2 为下游引物, 从黄瓜基因组中分别克隆到长度约为 8 900 bp 和 9 800 bp 的特异条带(图 2)。通过与线性化的载体 pCambia3301 的连接, 得到 pCambia3301-*CsgERECTA*-Flag 和 pCambia3301-*CsgERECTA*-Poly 的重组质粒, 通过热激法将重组质粒转化大肠杆菌感受态 Top10 中, 经过卡那霉素筛选, 分别挑取这 2 个重组质粒菌落的单克隆进行菌液 PCR 验证。



注: M 为 DNA 10 000 marker ladder; 1 和 2 分别为 *CsgERECTA*-Flag 和 *CsgERECTA*-Poly 的 PCR 扩增产物, Marker 从上至下大小依次为 10 000、8 000、6 000、5 000、4 000、3 000、2 000、1 500、1 000、500 bp。

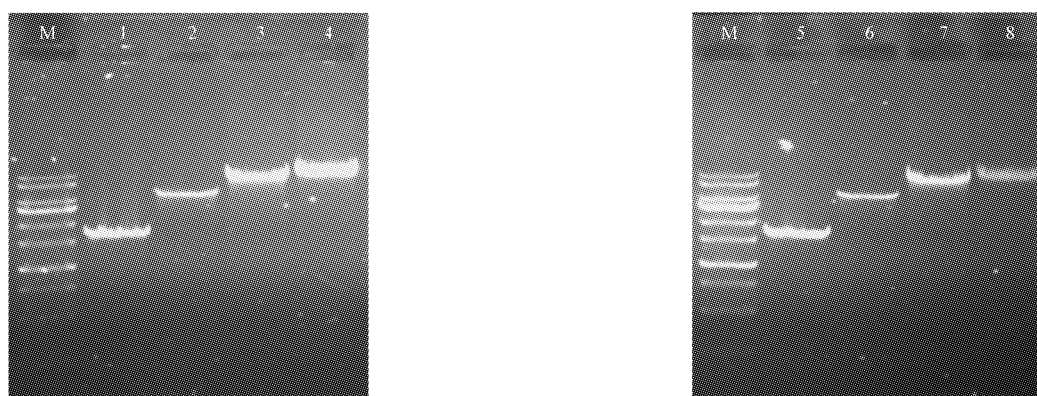
Note: M, DNA 10 000 marker ladder; 1 and 2 represent PCR products of *CsgERECTA*-Flag and *CsgERECTA*-Poly respectively, Marker from top to bottom are 10 000, 8 000, 6 000, 5 000, 4 000, 3 000, 2 000, 1 500, 1 000, 500 bp.

图 2 黄瓜 *ERECTA* 基因的 PCR 扩增

Fig. 2 PCR amplified products of *ERECTA*

采用梯度 PCR 片段验证方法, 利用 Infusion-L、Pd1、Pd2、Pd3 作为 2 个重组质粒的上游检测引物, Infusion-R1 作为 pCambia3301-*CsgERECTA*-Poly 的下游检测引物, Infusion-R2 作为 pCambia3301-*CsgERECTA*-Flag 的下游检测引物, PCR 扩增梯度条带如图 3 所示。依据数据库中黄瓜 9930 的 *ERECTA* 基因序列, Infusion-L/Pd1、Infusion-L/Pd2 和 Infusion-L/Pd3 引物组合的扩增片段长度分别为 3 392、6 662 和 8 832 bp。3 个梯度片段都符合预期序列长度, 初步表明载体构建成功。将阳性单克隆的大肠杆菌在 LB 培养基中(Kan 终浓度为 50 mg/L)扩大培养并提取质粒进行测序。

测序结果显示 *CsgERECTA*-Flag 和 *CsgERECTA*-Poly 的长度分别为 8 940 bp 和 9 812 bp, 利用 blast 服务器与 9930 的染色体 DNA 数据进行比对, 结果表明, 所克隆的这 2 个片段特异性强, 与 9930 相应的 DNA 片段的相似度均达到 99.98%, 表明从 CCMC 中已经成功克隆出 *ERECTA* 基因, 而且已经连接到表达载体上;



注:M为DNA 10 000 marker ladder;1,5为Infusion-L/Pd1引物组合扩增片段;2,6为Infusion-L/Pd2引物组合扩增片段;3,7为Infusion-L/Pd3引物组合扩增片段;4为扩增产物 *CsgERECTA*-Flag;8为扩增产物 *CsgERECTA*-Poly。Marker条带从上至下大小依次为10 000、8 000、6 000、5 000、4 000、3 000、2 000、1 500、1 000、500 bp。

Note:M,DNA 10 000 marker ladder;1,5 represent segment of P1-Pd1;2,6 represent segment of P1-Pd2;3,7 represent segment of P1-Pd3;4 represent product of *CsgERECTA*-Flag;8 represent product of *CsgERECTA*-Poly,marker from top to bottom are 10 000,8 000,6 000,5 000,4 000,3 000,2 000,1 500,1 000,500 bp.

图3 重组质粒梯度PCR鉴定

Fig. 3 Gradient PCR identification of recombinant plasmid

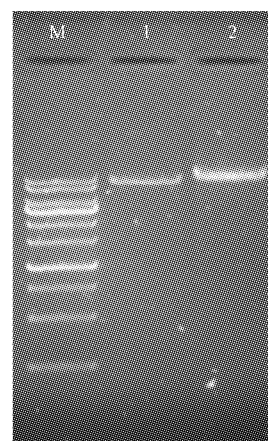
CsgERECTA-Flag 和 *CsgERECTA*-Poly 的 DNA 序列在共同区域内无任何碱基差异,说明 PCR 扩增过程中的保真性良好。

2.3 *ERECTA* 基因植物表达载体转化农杆菌

利用冻融法分别将 pCambia3301-*CsgERECTA*-Flag 和 pCambia3301-*CsgERECTA*-Poly 重组质粒转入根癌农杆菌 EHA105 感受态细胞中,涂布 YEP 平板上培养长菌后,挑取单克隆菌落在含有 Kan(50 mg/L)和 Rif(50 mg/L)的液体 LB 培养基中过夜扩繁,提取质粒进行 PCR 检测,分别得到约 8 900 bp 和 9 800 bp 的特异条带(图 4),证明重组质粒已成功转化农杆菌 EHA105 感受态中,可以作为转基因等后续研究之用。

3 讨论

ERECTA 基因作为一个 LRR 型类受体蛋白激酶,可以通过调节表皮细胞和叶肉细胞的发育来影响蒸腾效率,进而影响植物对水分的利用率^[1]; *ERECTA* 基因的正常功能还可以缓冲高温胁迫对叶片正常发育的危害^[14]。此外,转基因的 *erecta* 突变体对细菌性萎蔫病的抗性显著增强^[4], *ERECTA* 基因的缺失,导致在感染位点不能形成胼胝质阻止入侵^[5]。最近,有研究表明 *ERECTA* 激酶还能够激活植物防御 *Pythium irregular* 的信号传递, *ERECTA* 基因可能直接参与了拟南芥的抗病信号转导。 *ERECTA* 基因的这些功能显示了其在植物遗传育种方面的应用潜力。为此,该研究构建 *ERECTA* 基因的植物表达载体,以期为 *ERECTA* 基因在黄瓜中的功能研究奠定基础。出于对 *ERECTA* 基因转化黄瓜后续研究的需要,在 *ERECTA* 基因 C 端融入 flag



注:M为DNA 10 000 marker ladder;1为 *CsgERECTA*-Flag 扩增产物;2为 *CsgERECTA*-Poly 扩增产物,Marker条带从上至下大小依次为10 000、8 000、6 000、5 000、4 000、3 000、2 000、1 500、1 000、500 bp。

Note:M,DNA 10 000 marker ladder;1,product of *CsgERECTA*-Flag;2,product of *CsgERECTA*-Poly,marker from top to bottom are 10 000,8 000,6 000,5 000,4 000,3 000,2 000,1 500,1 000,500 bp.

图4 农杆菌质粒PCR检测

Fig. 4 Plasmid PCR detection from agrobacterium

标签序列,用于融合蛋白质的高效检测和免疫吸附纯化,构建了插入片段长度为 8 940 bp 的 pCambia3301-*CsgERECTA*-Flag 表达载体;由于 *ERECTA* 的 Poly(A) 尾巴结构,能够使基因在受体植物中更稳定地表达,该研究又构建了插入片段长度为 9 812 bp 的 pCambia3301-*CsgERECTA*-Poly 的植物表达载体,从而为 *ERECTA* 基因在黄瓜中的遗传转化奠定了基础。

在植物遗传转化中,启动子的选择对于目的基因在

植物中的表达和功能的发挥有很重要的作用。其中 CaMV35S 启动子是植物基因工程中最为常用的启动子,但 CaMV35S 是强组成型启动子,目的基因连接 CaMV35S 转化植物后会在受体植物中非特异性的持续、高效表达,不仅会阻碍植物的正常生长,导致生长发育不良^[2],而且需要该外源基因在特定时间和空间表达时,却由于表达量较低而达不到预期的效果。选择特异性表达启动子则可解决这一问题。因此,为了研究黄瓜 *ERECTA* 基因的功能,有必要使用特异的启动子构建 *ERECTA* 基因的表达载体。研究表明 *ERECTA* 基因的启动子本身也可作为强启动子来启动其它基因的表达^[15-16],同时西北农林科技大学园艺学院黄瓜课题组已克隆并对 *ERECTA* 启动子活性进行了验证(资料未显示),选择 *ERECTA* 基因本身的启动子来构建植物表达载体,将有利于黄瓜 *ERECTA* 基因的功能诠释。

在长距离的 PCR 反应中,合理选择耐热 DNA 聚合酶是 PCR 成败与否的一个关键因素。目前在长片段的扩增中,最常用的酶是 LA *Taq* DNA 聚合酶(约比 *Taq* 酶错配率低 10 倍)。该研究最初分别采用 LA *Taq* 和 KOD 酶对 *ERECTA* 的这 2 个片段进行扩增,经过反复试验,但并未实现成功扩增(资料未显示)。鉴于 Iproof 酶具有很高的保真性(比 *Taq* 酶错配率低 52 倍)、高速度(15 s 能扩 1 kb)和长距离 PCR 能力强(只需要很少的酶 0.25 U 即可扩 37 kb 的产物)等特点,该研究利用 Iproof 酶,不仅成功实现了长度分别为 8 940 bp (pCAMBIA3301-*CsgERECTA*-*Flag*)和 9 812 bp (pCAMBIA3301-*CsgERECTA*-*Poly*)的 DNA 片段的扩增,而且通过对这 2 个片段的 DNA 序列在长为 8 914 bp 的共同区域内进行比对,无任何碱基差异,也说明了 Iproof 酶的高保真性。因此,在大片段的扩增中,选用 Iproof 酶不失为一种好的选择。

传统的载体构建方法,面临着严格的限制性内切酶及中间载体的选择问题,往往需要设计满足特殊条件的引物并通过多次中间载体的构建来实现长片段表达载体的构建,不仅工作量大、操作程序繁琐,构建效率也比较低。为克服上述困难,试验采用 In-fusion 技术成功构建了基因本身启动子驱动的 *ERECTA* 基因植物表达载体。和传统的构建方法相比,In-fusion 方法更简便快捷,在不依靠限制性内切酶、连接酶以及磷酸化酶的情况下,能够将带有 15 bp 同源序列的 DNA 片段克隆到任何载体上。只需要设计带有同源臂的扩增引物,通过普通 PCR 和 20 min 的同源重组反应就能将 PCR 产物克隆到目的载体上,最关键的是 In-fusion 技术对载体和目的片段没有限制,能够在任何载体和任何基因(特别是长片段)中使用。In-fusion 技术可广泛地应用在各种表达载体的构建中,对于较难克隆(如长片段)到载体上的片

段来说,In-fusion 法的效率比 Gateway 法要高^[17],利用 In-fusion 技术进行载体构建的报道较少,有限的报道也仅限于多片段重组和短片段重组^[18-19]。类似该试验成功扩增 9 000 bp 的长片段并一步克隆到线性化植物表达载体上的方法尚鲜见报道,因此,该研究可为克隆长片段以及构建长片段植物表达载体的方法提供依据。

参考文献

- [1] MASLE J, GILMORE S R, FARQUHAR G D. The *ERECTA* gene regulates plant transpiration efficiency in *Arabidopsis*[J]. *Nature*, 2005, 436 (7052): 866-870.
- [2] KASUGA M, LIU Q, MIURA S, et al. Improving plant drought, salt, and freezing tolerance by gene transfer of a single stress-inducible transcription factor[J]. *Nature Biotechnology*, 1999, 17(3): 287-291.
- [3] 韩同凯, 王盈盈, 林红珍, 等. 水稻 *ERECTA* 基因组 DNA 的克隆及植物表达载体构建[J]. *山东农业科学*, 2013(6): 4-10.
- [4] GODIARD L, SAUVIAC L, TORII K U, et al. *ERECTA*, an LRR receptor-like kinase protein controlling development pleiotropically affects resistance to bacterial wilt[J]. *The Plant Journal*, 2003, 36(3): 353-365.
- [5] LLORENTE F, ALONSO-BLANCO C, SÁNCHEZ-RODRIGUEZ C, et al. *ERECTA* receptor-like kinase and heterotrimeric G protein from *Arabidopsis* are required for resistance to the necrotrophic fungus *Plectosphaerella cucumerina*[J]. *The Plant Journal*, 2005, 43(2): 165-180.
- [6] 胡鑫, 徐全乐. *ERECTA* 基因研究进展[J]. *西北植物学报*, 2010(12): 2564-2569.
- [7] KARVE R, LIU W, WILLET S G, et al. The presence of multiple introns is essential for *ERECTA* expression in *Arabidopsis*[J]. *RNA*, 2011, 17 (10): 1907-1921.
- [8] 李慧仙, 朱平. 同源区段长度对 In-Fusion 技术连接效率的影响[J]. *中国医药生物技术*, 2013(4): 241-246.
- [9] 朱锦程, 沈海涛, 祝建波. 拟南芥 *ERECTA* 基因的克隆及其对番茄转化[J]. *生物技术通报*, 2010(8): 102-105.
- [10] 尤佳, 张宁, 文义凯, 等. *CryIII A* 基因植物表达载体构建及马铃薯遗传转化[J]. *草业学报*, 2014(1): 248-56.
- [11] 李玲玲, 张伟, 宋玲珍, 等. In-fusion 连接技术优化及其在大片段重组载体构建中的应用[J]. *动物医学进展*, 2014(5): 1-7.
- [12] 魏明敏, 邱德文, 曾洪梅, 等. 嗜盐虫致病杆菌 *Xna* 基因同源重组载体的构建及遗传转化体系的建立[J]. *生物技术通报*, 2009(4): 91-94, 102.
- [13] MURRAY M, THOMPSON W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8(19): 4321-4326.
- [14] QI Y, SUN Y, XU L, et al. *ERECTA* is required for protection against heat-stress in the ASI/AS2 pathway to regulate adaxial-abaxial leaf polarity in *Arabidopsis*[J]. *Planta*, 2004, 219(2): 270-276.
- [15] DIÉVART A, DALAL M, TAX F E, et al. *CLAVATA 1* dominant-negative alleles reveal functional overlap between multiple receptor kinases that regulate meristem and organ development[J]. *The Plant Cell Online*, 2003, 15(5): 1198-1211.
- [16] SONG S K, LEE M M, CLARK S E. POL and PLL1 phosphatases are *CLAVATA 1* signaling intermediates required for *Arabidopsis* shoot and floral stem cells[J]. *Development*, 2006, 133(23): 4691-4698.
- [17] MARSISCHKY G, LABAER J. Many paths to many clones; a comparative look at high-throughput cloning methods[J]. *Genome Research*, 2004, 14 (10b): 2020-2028.
- [18] 韩凯, 翁建峰, 郝转芳, 等. 一种快速高效构建植物表达载体的方法[J]. *玉米科学*, 2012(1): 61-66.

[19] 王雷,崔震海,张立军. 玉米 C4 型 PEPC 全长基因的克隆与表达载体构建[J]. 江苏农业科学, 2014(11):26-29.

Construction of *ERECTA* Gene Plant Expression Vector that Based on In-fusion Technology

CHEN Feifan, WANG Qiqi, ZHONG Huili, FU Bingbing, REN Danli, LI Yuhong

(Horticulture College, Northwest Agriculture and Forestry University, Yangling, Shaanxi 712100)

Abstract: Taking cucumber breed of 'Changchun Mici' (CCMC) as material, using high fidelity polymerase, Iproof and In-fusion technology that not based on digestion to construct plant expression vector of *ERECTA* gene that was driven by its own promoter for discussing the function of *ERECTA* gene and providing technology to improve resistance inheritance in cucumber. The results showed that two segments amplified from 'CCMC' genome DNA were named *CsgERECTA-Flag* which was 8 940 bp and *CsgERECTA-Poly* which was 9 812 bp. Plasmid PCR, gradient segments PCR and sequencing were conducted, which showed that two pCambia3301-*gERECTA* plant expression vector were both constructed and transformed into *Agrobacterium tumefaciens* EHA105.

Keywords: cucumber; *ERECTA*; long-segment amplification; In-fusion; expression vector

欢迎订阅 2016 年《北方园艺》

中 文 核 心 期 刊
中 国 农 业 核 心 期 刊
全 国 优 秀 农 业 期 刊
中 国 北 方 优 秀 期 刊
黑 龙 江 省 优 秀 科 技 期 刊
美 国 化 学 文 摘 社 (CAS) 收 录 期 刊

主管:黑龙江省农业科学院
主办:黑龙江省农业科学院、黑龙江省园艺学会
中国标准连续出版物号:
ISSN 1001-0009 CN 23-1247/S
广告经营许可证号:2301070000009
邮发代号:14-150 半月刊 每月 15、30 日出版
单价:15.00 元 全年:360.00 元

全国各地邮局均可订阅 或直接向编辑部汇款订阅

本刊栏目涵盖园艺学的蔬菜、果树、瓜类、花卉、植保等研究领域的新成果、新技术、新品种、新经验。竭诚欢迎全国各地科研院所人员、大专院校师生,各省、市、县、乡、镇农业技术推广人员、农民科技示范户等踊跃订阅。

现辟有试验研究、研究简报、设施园艺、栽培技术、园林花卉、生物技术、植物保护、贮藏保鲜加工、食用菌、中草药、土壤与肥料、新品种选育、产业论坛、专题综述、农业经纬、经验交流等栏目。

地址:黑龙江省哈尔滨市南岗区学府路 368 号《北方园艺》编辑部

邮编:150086 电话:0451-86674276 信箱:bfiybjb@163.com 网址:www.haasep.cn