

细胞质雄性不育相关基因 orf 224 的克隆 及其植物表达载体的构建*

王永飞^{1,2}, 马三梅², 张鲁刚¹, 王 鸣¹, 郑学勤³

(1 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨陵 712100; 2 烟台师范学院 生物系, 山东 烟台 264025;

3 热带作物生物技术国家重点实验室, 海南 海口 571101)

[摘 要] 利用 PCR 技术从油菜 Polima 不育系中扩增出细胞质雄性不育相关基因 orf 224, 并将其克隆到 pGEM-T Easy 载体上得到重组质粒 pGEMORF。在此基础上, 用限制性内切酶将 orf 224 基因从质粒 pGEMORF 上切下, 连接在 pB II21 质粒的 CaMV 35S 启动子和 NOS 终止子之间。经 PCR 和酶切鉴定, 得到了 orf 224 基因的植物表达载体 pB DRF。

[关键词] 细胞质雄性不育; orf 224; 基因克隆; 植物表达载体

[中图分类号] Q 781; S634.2

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2002)04-0009-04

利用杂种优势可显著提高作物产量, 改善作物品质, 因此杂种优势利用在农业生产中占有重要的地位。作物雄性不育系的选育是杂种优势利用的关键环节, 但利用常规育种方法来选育不育系, 周期长、见效慢, 远远不能满足生产发展的需要。近年来, 通过基因工程创建植物雄性不育系及其恢复系已在一些作物上获得了成功^[1~5], 为作物杂种优势利用开创了新的前景。近年来, 在油菜 Polima 不育系中发现了一个与细胞质雄性不育 (Cytoplasmic male sterility, CMS) 相关的基因 orf 224^[6,7]; 该基因由 675 个碱基组成, 编码 224 个氨基酸。笔者通过研究进一步证实了 orf 224 确实与 CMS 有关^[8]。本试验利用 PCR 技术从油菜 Polima 不育系中扩增出 orf 224, 并将其克隆到 pGEM-T Easy 载体上得到重组质粒 pGEMORF。在此基础上, 用限制性内切酶将 orf 224 从 pGEMORF 质粒上切下, 连接在 pB II21 质粒的 CaMV 35S 启动子和 NOS 终止子之间, 构建了 orf 224 的植物表达载体, 以期创造新的不育系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材 料

1.1.1 植物材料 甘蓝型油菜 Polima 不育系由华中农业大学傅廷栋院士提供。

1.1.2 菌种和质粒 pB II21 质粒和受体菌大肠杆

菌 DH_{5α} 由热带作物生物技术国家重点实验室提供。pGEM-T Easy 载体购自 Promega 公司。

1.1.3 主要化学试剂和酶 限制酶和修饰酶分别购自华美生物工程公司和 Promega 公司; X-Gal, IPTG 购自 Promega 公司; PEG8000, 溴化乙锭购自 Sigma 公司; 限制性核酸内切酶和修饰酶购自华美生物工程公司; 低熔点琼脂糖、硫酸卡那霉素 (Kanamycin, Kan) 为 Sigma 公司产品; 化学常规试剂为国产分析纯。

1.2 方 法

1.2.1 油菜 Polima 不育系 DNA 的提取 挑选成熟度好, 饱满且表面光滑的种子。先用质量分数为 70% 的乙醇处理 30 s, 然后用质量分数为 0.1% 的 HgCl₂ 消毒 15 min, 用无菌水冲洗 5 次后, 播于固体 MS 培养基上。在 25 °C, 16 h 光照, 光强 1 500 lx 条件下培养两周后, 取 2.0 g 幼嫩的叶片, 按江昌俊等^[9]的方法提取 DNA。

1.2.2 寡核苷酸引物的设计合成及目的基因的扩增 根据 Homme L Y 等报道的 orf 224 序列, 设计下列引物, 由中国科学院微生物研究所在 AB I381 型 DNA 合成仪上合成。

Primer 1 5' GC T↓CTAGA ATG CCT CAA CTG

GAT AAA TTC A C 3'

Primer 2 5' GC G↓AGCTC TCA GCG AAA GAG

* [收稿日期] 2001-07-17

[基金项目] 高等学校博士学科点专项科研基金项目 (960701)

[作者简介] 王永飞 (1972-), 男, 山西壶关人, 副教授, 博士, 主要从事植物遗传育种和分子生物学的教学与科研工作。

ATC AAG GAT C 3'

目的基因的扩增在 PE 公司生产的 480 型 DNA Thermal Cycler 扩增仪上进行, 具体方法详见文献[10~12]。

1.2.3 *orf* 224 的克隆和 DNA 序列测定 将 PCR 扩增的 *orf* 224 基因经低熔点琼脂糖凝胶电泳回收, 然后克隆到 pGEM-T Easy 载体上, 并转化 E. coli DH₅ α , 具体操作过程参考文献[13~14]及 Promega 技术手册。DNA 序列测定采用 ABI 公司 PRISMTM Ready Reaction Dye DeoxyTM Terminator Cycle Sequencing 试剂盒反应, 通过 ABI 全自动序列分析仪进行测序分析。

1.2.4 表达载体的构建策略 由于 pBI121 的多克隆位点中有 *Xba*I 和 *Sac*I 酶切位点, 而 *orf* 224 序列中没有这两个酶切位点序列, 所以在利用 PCR 扩增 *orf* 224 时, 在其两端分别加上 *Xba*I 和 *Sac*I 酶切位点。这样就使得目的基因两端的酶切位点和 pBI121 中的 *Xba*I 和 *Sac*I 酶切位点相匹配, 故本试验用 *Xba*I 和 *Sac*I 双酶切分别消化 pBI121 和 pGEMORF, 回收目的基因片段和线状载体, 采用粘端连接策略, 将 *orf* 224 连接在 pBI121 的 CaMV 35S 启动子和 NOS 终止子之间, 从而构建 *orf* 224 的植物表达载体。

1.2.5 *orf* 224 表达载体的构建步骤 具体操作步骤如下: ①用 *Xba*I 和 *Sac*I 双酶切分别消化 pGEMORF 和 pBI121, 采用低熔点琼脂糖法回收 *orf* 224 基因片段和线状载体片段; ②按插入片段与

载体的分子数为 3:1 的比例, 连接回收的目的基因片段和线状载体片段, 同时设不加目的基因的连接反应体系为对照; ③用连接产物转化大肠杆菌 DH₅ α ; ④将转化产物均匀涂布在含有 100 mg/L 的 Kan 的 LB 平板上, 于 37 °C 下培养 16 h 后出现单菌落; ⑤挑取单菌落, 分别接种于 3 mL 含 100 mg/L Kan 的 LB 培养基中, 于 37 °C 下, 300 r/min 振荡培养 8~10 h; ⑥用碱裂解法小量抽提质粒^[9], 并进行琼脂糖凝胶电泳检验和 PCR 及酶切鉴定。

1.2.6 *orf* 224 植物表达载体的检测 以质粒 DNA 为模板, 按扩增 *orf* 224 的反应条件进行 PCR, 电泳检测扩增片段长度。根据 pBI121 的酶切位点, 用 *Sac*I 和 *Xba*I 消化质粒 DNA, 电泳检测酶切结果。

2 结果与分析

2.1 *orf* 224 基因的克隆测序

以 Polima 不育系的 DNA 为模板, 进行 PCR 扩增, 扩增体系为 50 μ L, 其中含有 10 $\times$ Taq 酶反应缓冲液 5 μ L, dNTPs (2.5 mmol/L) 5.0 μ L, Primers (10 μ mol/L) 2.5 μ L, 模板 DNA 200 ng, Taq DNA 聚合酶 20 μ mol/(L $\cdot$ min), 加水补至 50 μ L, 再加 50 μ L 矿物油覆盖反应液。94 °C 预变性 5 min, 然后按 94 °C 1 min, 50 °C 1 min, 72 °C 2 min 的条件进行 35 个循环。循环结束后再于 72 °C 继续延伸 10 min。然后取 5.0 μ L 反应液进行电泳检查。结果发现扩增出了一条 680 bp 左右的 DNA 片段。

```

1 ATGCCTCAAC TGGATAAA TT CACTTATTTT TCACAA TTCT TCTGGTTATG CCTTTTCTTC
61 TTTACTTTCT ATATTTTCAT ATGCAATGAT GGA GATGGA G TACTTGGGAT CAGCA GAA TT
121 CTAAACTAT GGAACCAACT GCTTTCACAC CGGGGGAA GA CCCTCCTGA G CAA GGGAA GG
181 CTTGGAAAAA ATCGTAGTTC AGATTCAA GT CGGTTTCGA GG TATCA GCGTT GGCCGCCCAT
241 TATTTTATCA TTTTCGTGGT CCCAAAA TTG GGACCA GTTT TCTACATTAT ATATAATTTT
301 TTTTGTGTGT TGGGGTTGAA ATGGGGGGTA TTAGGAAATG AAATTTGTCA TTTCGGCGTC
361 GGACCA GATG GCGTCGCGCC CCCA GCGCTG GATCTCAACG AGCGCCCGCC TCTGCA TCTT
421 TTGTACGCGG ATGTTGA GA G TTCCGACTCT CAACAA GCGC GAAATAA TGA CATGTACGCG
481 CATCTTA GGC GCGTACA GGA GATCACCCAA AACTA GA GG GTGA GCGCGA TATCGTGC GG
541 CGTCAA GCCC TCCTGGA TAT AATGAAA TGG GAGGTCA GAA GCCTTCA GGA GCACTTTCGG
601 ATCTTTTCGGC ACCTTGATCG TCTGCGA GAT TCGCA GAGA G CCAAGGTGAA CGAGATCCTT
661 GATCTCTTTC GCTGA
  
```

图1 *orf* 224 基因的核苷酸序列
(起始密码子和终止密码子用黑体表示)

Fig. 1 Nucleotide sequence of *orf* 224 gene

(Translation initial codon, translation termination codon were shown in bold letters)

PCR 产物经质量分数为 1.5% 的低熔点琼脂糖凝胶电泳回收后, 将其克隆到 pGEM-T Easy 载体

上并转化大肠杆菌 DH₅ α , 经蓝白斑选择, 酶切鉴定, 筛选出含有插入片断的重组质粒。重组质粒经

PGE8000 纯化后, 采用 ABI 公司 PRISM™ Ready Reaction Dye Deoxy™ Terminator Cycle Sequencing 试剂盒反应, 以 T7 和 SP6 为通用引物, 在 ABI 全自动序列分析仪上进行了正反方向测序, 测序结果(图 1)表明: *orf 224* 由 675 个核苷酸组成, 起始密码子为 ATG, 终止密码子为 TGA, 所得序列与 Homme Y L 等^[7]报道的序列结果完全一致。并将含有 *orf 224* 基因的重组质粒定名为 pGEMORF。

2.2 *orf 224* 植物表达载体的构建

pB II21 是从结瘤农杆菌双元质粒 pB N 19 改造衍生而来的, 带有 *GUS* 基因, 在 *GUS* 基因上游为 CaMV 35S 启动子。本试验用 *Sac* I 和 *Xba* I 酶切消化 pB II21, 切除 *GUS* 基因, 保留了 CaMV 35S 启动子, 产生约 11.0 kb 的线状质粒载体, 此线状载体具有 2 个粘性末端。用 *Sac* I 和 *Xba* I 酶切消化 pGEMORF 质粒, 获得带有 2 个粘性末端的 *orf 224* 基因片段(图 2)。

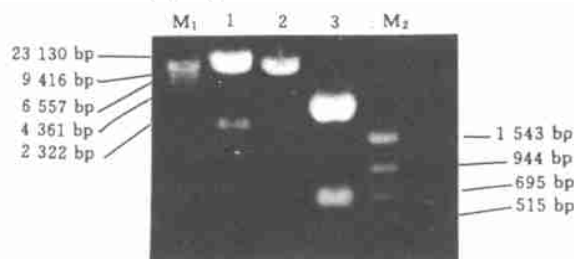


图 2 *Sac* I 和 *Xba* I 消化 pB II21 和 pGEMORF

M₁: DNA/HindIII markers; M₂: PCR Markers;

1. pB II21 被 *Sac* I 和 *Xba* I 酶切; 2. 回收的线状载体片段;

3. pGEMORF 被 *Sac* I 和 *Xba* I 酶切

Fig 2 pB II21 and pGEMORF digested by *Sac* I and *Xba* I

M₁: DNA/HindIII markers; M₂: PCR Markers;

1. pB II21 digested by *Sac* I and *Xba* I;

2. The recovered linear fragment of pB II21;

3. pGEMORF digested by *Sac* I and *Xba* I

将带有 2 个粘性末端的的目的基因片段和大约 11.0 kb 的线状质粒载体连接, 由于采用 2 个粘端连接, 避免了载体的自身环化, 有利于提高连接效率并达到定向连接的效果。连接产物转化大肠杆菌后, 经过 16 h 的抗性选择培养后在样品平板上长出菌落, 对照平板上无菌落出现, 说明载体 pB II21 的酶切比较彻底。挑取样品平板上的单菌落进行培养, 培养 8~10 h 后, 用碱裂解法小量抽取质粒, 并用质量分数 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳, 结果出现了滞后质粒。

2.3 重组质粒的筛选鉴定

以滞后质粒 DNA 为模板, 按扩增 *orf 224* 的反应条件进行 PCR, 扩增得到了约 680 bp 的片段(图

3), 表明滞后质粒中存在完整的 *orf 224* 基因。

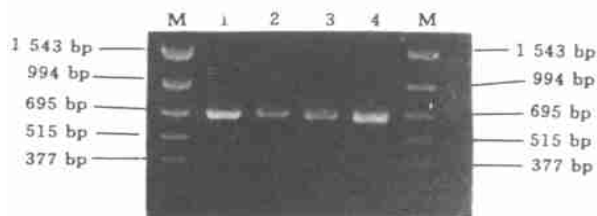


图 3 重组质粒的 PCR 鉴定

M: PCR Markers; 1~4 PCR 产物

Fig 3 Identification of recombinant plasmid by PCR

M: PCR Markers; 1~4 PCR Products

滞后质粒进一步用 *Xba* I 和 *Sac* I 进行酶切鉴定, 结果酶切下一个约 680 bp 的片段(图 4), 说明 *orf 224* 已连接在 pB II21 的 *Xba* I 和 *Sac* I 酶切位点之间, 将此重组子命名为 pB DRF, 从而构建成了 *orf 224* 的植物表达载体。

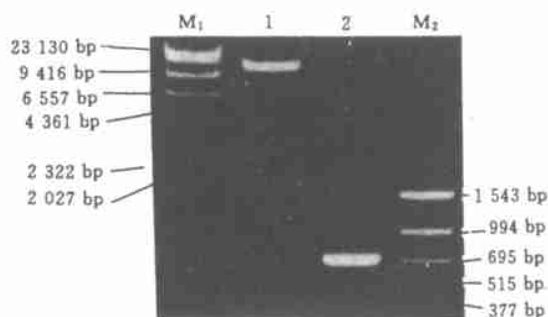


图 4 重组质粒的酶切鉴定

M₁: DNA/HindIII markers; M₂: PCR Markers;

1. 重组质粒 *Xba* I / *Sac* I 双酶切; 2. *orf 224*

Fig 4 Digestion identification of recombinant plasmid

M₁: DNA/HindIII markers; M₂: PCR Marker;

1. Recombinant plasmid digested by

Xba I and *Sac* I; 2. *orf 224*

3 讨论

目前利用基因工程创造雄性不育的策略主要是以绒毡层特异表达基因为启动子, 与外源细胞毒素基因、 β 1, 3-葡聚糖酶基因以及查尔酮合成酶反义 RNA 等嵌合, 阻断花粉发育过程从而达到雄性不育的目的。例如把绒毡层特异表达的启动子 TA 29 与淀粉芽孢杆菌核糖核酸酶(barnase)基因相连, 得到一个嵌合基因 TA 29-barnase, 以 Ti 质粒为载体转化烟草和油菜, 转基因的花药不能产生功能花粉粒, 导致了雄性不育。这是由于 barnase 基因在绒毡层细胞中特异表达, 专一地破坏绒毡层的发育, 致使花粉败育。除了雄性不育外, 这些转基因植物在其他方

面都是正常的^[2]。但这些策略还有一定的局限性和一些潜在危险性。而本试验所采用的细胞质雄性不育基因 *orf 224* 来自植物本身, 潜在的危险性较小,

并且将其与 CaMV 35S 启动子连接, 构建了 *orf 224* 表达载体 pBDRF, 为创造新的不育系奠定了基础, 开创了新途径。

[参考文献]

- [1] Mariani C A, Beuckeleer M D, Truettner J, et al. Induction of male sterility in plants by a chimeric ribonuclease gene[J]. *Nature*, 1990, 347: 737- 741.
- [2] Mariani C A. Chimeric ribonuclease inhibitor gene restores fertility to male sterile plant[J]. *Nature*, 1991, 357: 384- 387.
- [3] 周雪荣, 彭仁旺, 方荣祥, 等. 表达核糖核酸酶基因的雄性不育油菜的获得[J]. *遗传学报*, 1997, 24(6): 531- 536.
- [4] 曹光诚, 孙勇如, 陈占宽, 等. 人工雄性不育基因和恢复基因的克隆及构建研究[J]. *中国农业科学*, 1996, 29(3): 20- 28.
- [5] 凌定厚, 陶利珍, 马镇荣, 等. 以基因枪介导获转 PSL-*barnase* 基因的工程雄性不育水稻植株[J]. *遗传学报*, 1998, 25(5): 433- 442.
- [6] Singh M. Suppression of cytoplasmic male sterility by nuclear genes alters expression of a novel mitochondrial gene region[J]. *The Plant Cell*, 1991, 3: 1349- 1362.
- [7] Homme Y L, Brown G G. Organizational differences between cytoplasmic male sterile Brassica mitochondrial genomes are confined to a single transposed locus[J]. *Nucleic Acids Research*, 1993, 21(8): 1963- 1909.
- [8] 王永飞. 大白菜细胞质雄性不育的分子生物学研究[D]. 陕西杨陵: 西北农林科技大学, 2000. 71- 76.
- [9] 江昌俊, 陈彦. 分离藜苔属植物基因组DNA的一种方法[J]. *中国油料*, 1995, 17(4): 31- 35.
- [10] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E E, 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南[M]. 第2版. 金冬雁, 黎孟枫, 译. 北京: 科学出版社, 1995. 16- 56.
- [11] Handa H, Nakajima H. Different organization and altered transcription of the mitochondrial *atp6* gene in male-sterile cytoplasm of rape-seed (*Brassica napus* L.) [J]. *Curr Genet*, 1992, 21: 153- 159.
- [12] Witt U, Hanson S, Albaum M, et al. Molecular analysis of the CMS-inducing 'Polima' cytoplasm in *Brassica napus* L. [J]. *Curr Genet*, 1991, 19: 323- 327.
- [13] Singh M, Brown G G. Characterization of expression of mitochondrial gene region associated with the Brassica 'Polima' CMS: developmental influences[J]. *Curr Genet*, 1993, 24: 316- 322.
- [14] 傅荣昭, 孙勇如, 贾士荣. 植物遗传转化技术手册[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1994. 152- 157.

Cloning of *orf 224* gene correlated with cytoplasmic male sterility (CMS) and its plant expression vector construction

WANG Yong-fei^{1,2}, MA San-mei², ZHANG Lu-gang¹, WANG Ming¹, ZHENG Xue-qin³

(1 College of Horticulture, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Department of Biology, Yantai Normal University, Yantai, Shandong 264025, China;

3 National Key Biotechnology Laboratory for Tropical Crops, Haikou, Hainan 571101, China)

Abstract: *orf 224* was a CMS-related gene discovered in Polima cytoplasm. In this paper, genomic DNA of Polima CMS line was used as templates, and two primers of specific oligonucleotides at 5' and 3' end were used, PCR was performed. The amplification fragment was cloned into pGEM-T Easy vectors and a recombinant plasmid pGEMORF with *orf 224* was obtained. A plant expression vector was constructed by inserting *orf 224* gene that cut from pGMORF using restriction endonuclease into the site between CaMV 35S promoter and NOS terminator of pBI121. PCR and restriction enzyme digestion analysis showed that the plant expression vector pBDRF containing *orf 224* gene was obtained. This research created a new method and founded the basis for generating CMS line.

Key words: cytoplasmic male sterility; *orf 224*; gene cloning; plant expression vector