

胡萝卜抗冻蛋白基因克隆及植物表达载体构建

尹明安¹, 崔鸿文¹, 樊代明², 郭立³

(1 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨陵 712100; 2 第四军医大学 西京医院, 西安 710032;

3 西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨陵 712100)

[摘要] 以胡萝卜品种 Autumn King 的幼苗为材料, 用 CTAB 法提取其基因组 DNA, 以 PCR (Polymerase Chain Reaction) 的方法在体外扩增出胡萝卜抗冻蛋白基因 (afp), 以 pUCm-T Vector 为载体构建成胡萝卜 afp 的克隆载体 pTAF, 用 *EcoR* I 消化重组质粒 pTAF 使其线性化, 再用 DNA 聚合酶 I Klenow 大片段补平末端, 然后用 *Xba* I 消化, 获得一末端粘, 一末端平的目的片段 (afp)。植物表达载体 pBI21 用 *Xba* I 和 *Sma* I 双酶切, 获得一末端粘, 一末端平的线性质粒。将目的片段与线性质粒在 T4 DNA 连接酶的作用下进行定向连接, 构建成胡萝卜 afp 的植物表达载体 pBAF。

[关键词] 胡萝卜; 抗冻蛋白基因; 分子生物学

[中图分类号] Q 789

[文献标识码] A

[文章编号] 1000-2782(2001)01-0006-05

低温冻害是农业生产中一种严重的自然灾害, 也是许多农作物区域性和季节性的限定因素。改造农作物的遗传特性, 使之从冻害中解脱出来, 一直是科学工作者的理想与追求。然而用常规的育种方法很难提高作物的抗冻性。自从北极鱼抗冻蛋白 (Antifreeze proteins, AFPs) 基因 (afp) 被揭示以后, 人们就尝试用转鱼类 afp 的方法来提高作物的抗冻性 (黄永芬等^[1], Georges 等^[2], Hightower 等^[3], Wallis 等^[4])。虽然取得了一些有益的成果, 但在大多数情况下并不理想。因为鱼类和植物在分类学上的关系毕竟太远, 外源基因的正确表达有一定困难。在此情形下, 人们寄希望于植物 afp 基因的早日发现和利用^[5,6]。1998 年 10 月英国 York 大学的 Worrall 等^[7]发表了胡萝卜 afp 及其基因的论文, 标志着第一个植物 afp 基因的发现, 对于植物抗冻基因工程具有非常重要的意义。他们不仅测定了胡萝卜 afp 的体外热滞值及重结晶抑制活性, 而且将其 cDNA 连接在表达载体的双 CaMV 35 S 启动子之后导入烟草, 获得了正确表达。但到目前为止, 还未见国内有关胡萝卜 afp 的研究报道。本研究以胡萝卜基因组 DNA 为模板, 用 PCR (Polymerase Chain Reaction) 的方法克隆了胡萝卜 afp, 构建了其植物表达载体, 为进一步利用其转化番茄、甜椒等作物奠定了实验基础。

1 材料与方法

胡萝卜品种 Autumn King 由美国友人赠送。

胡萝卜基因组 DNA 的提取用 CTAB 法, 参考文献[8]进行, 略加修改。取材部位为胡萝卜苗幼叶。

PCR (Polymerase Chain Reaction) 根据 Autumn King 的 afp cDNA 已知序列, 设计合成 1 对引物, 正向: A T G A A T A T T G A A T C A T C T T T C T G C C C T; 反向: G G T A A C T A G C A T T C T G G C A A T G G A G C A。以胡萝卜基因组 DNA 为模板。反应程序: 94 10 min → (94 1 min → 63 1 min → 72 2 min)₃₀ → 72 8 min。循环 30 次, 热启动法加酶。所用酶为 Taq Plus I DNA Polymerase (Taq+ Pfu)。PCR 仪为 Minicycler™。

目的片段的纯化回收和酶切鉴定 对 PCR 产物做琼脂糖凝胶电泳, 用 DNA 快速纯化回收试剂盒 (北京博大科技公司产品) 回收目的片段, 具体操作按产品说明书进行。根据已知序列的酶切位点, 选择 *Bam* H I 和 *Pst* I 对目的片段进行酶切分析, 酶切反应体系为 DNA 15 μL + 10 × Buffer 2 μL + BSA 2 μL + *Bam* H I (*Pst* I) 1 μL。在 37 °C 条件下酶切 4 h。

〔收稿日期〕 2000-10-31

〔基金项目〕 陕西省科技攻关项目 (91K12-G19(11))

〔作者简介〕 尹明安 (1956-), 男, 陕西汉中, 副教授, 主要从事蔬菜采后生理及贮藏技术的教学和科研工作。

克隆载体的构建 所用载体为上海生工(Sangon)生物工程技术服务有限公司的pUCm-T Vector。该载体专为PCR产物的克隆而设计,具有氨苄青霉素抗性标记,可以进行蓝白筛选,便于进行酶切鉴定和测序。连接反应体系: 2 μL 去离子无菌水+ 5 μL 纯化后的PCR产物+ 1 μL 10 $\times$ Ligation Buffer+ 1 μL (50 mg/L) pUCm-T Vector+ 1 μL T4 DNA Ligase。在16 $^{\circ}\text{C}$ 条件下连接过夜。

感受态细菌的制备及转化 宿主菌为大肠杆菌DH5 α , 感受态的制备及转化过程参照文献[9]进行。筛选培养基中添加氨苄青霉素、X-gal和IPTG。

重组质粒的鉴定 随机挑取2个白色菌落,分别接种于2 mL LB液体培养基中,在37 $^{\circ}\text{C}$ 180 r/min条件下振荡培养过夜,转接于8 mL LB中振荡培养。按碱裂解法小量提取质粒^[7]。以质粒DNA为底物用BamH I进行单酶切鉴定, Xba I + EcoR I进行双酶切鉴定。双酶切反应体系为质粒DNA 14 μL + 10 $\times$ BufferD 2 μL + BSA 2 μL + Xba I 1 μL + EcoR I 1 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$, 4 h。

目的基因的序列测定 由上海博亚生物技术有限公司用Sanger双脱氧链终止法进行,所用仪器为美国PE公司377型全自动DNA序列分析仪。

植物表达载体的构建 重组质粒pTAF用EcoR I酶切,酶切反应体系为DNA 15 μL + 10 $\times$ BufferH 2 μL + BSA 2 μL + EcoR I 1 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$, 3 h。形成的粘末端线性质粒经纯化回收后用DNA聚合酶I Klenow fragment补平。补平反应体系: DNA 17 μL + 10 $\times$ Buffer 2 μL + 10 mmol/L dNTP 0.5 μL + Klenow (10 $\mu\text{mol}/(\text{min} \cdot \mu\text{L})$) 0.5 μL , 16 $^{\circ}\text{C}$ 反应9 h, 纯化回收补平的线性质粒,用Xba I酶切。酶切反应体系为DNA 15 μL + 10 $\times$ BufferD 2 μL + BSA 2 μL + Xba I 1 μL , 37 $^{\circ}\text{C}$ 反应4 h。酶切后产生带有一粘末端和一平末端的afp基因片段,对其进行纯化回收。

pBI121用Sma I酶切,酶切反应体系为质粒DNA 15 μL + 10 $\times$ BufferJ 2 μL + BSA 2 μL + Sma I 1 μL , 25 $^{\circ}\text{C}$ 反应4 h。酶切后形成平端线性质粒,对其进行纯化回收,再用Xba I酶切,酶切反应体系同上Xba I酶切。酶切后形成带有一粘末端和一平末端的线性质粒,纯化回收。

回收的线性pBI121和afp基因片段经电泳定

量后,在T4 DNA Ligase作用下进行定向连接,连接反应体系为afp DNA 5 μL + pBI121 12 μL + 10 $\times$ Buffer 2 μL + T4 Ligase 1 μL , 19 $^{\circ}\text{C}$ 连接22 h。

感受态细菌的制备及转化同上。筛选培养基添加Kanamycin 100 mg/L。

植物表达载体的鉴定 随机挑取两转化菌落,提取重组质粒,用BamH I进行酶切鉴定。以质粒DNA为模板进行PCR鉴定。PCR反应条件同前。

2 结果与分析

2.1 PCR

扩增出的目的片段,约1 000 bp(图1)。退火温度为53~63 $^{\circ}\text{C}$ 均可扩增出目的片段,但以63 $^{\circ}\text{C}$ 特异性最好。

2.2 目的片段的酶切鉴定

对经过纯化回收的目的片段分别用BamH I和Pst I进行酶切分析, BamH I产生约600 bp和400 bp的预期片段, Pst I产生约900 bp和100 bp的预期片段(图2)。据此可初步认为该目的片段即为胡萝卜抗冻蛋白的基因片段。

2.3 克隆载体的构建

由于Taq Plus I DNA Polymerase的PCR产物在3'末端有突出的A, 故以pUCm-T Vector作为克隆载体与目的片段进行连接。转化细菌后,直径9 cm的培养皿上生成菌落约1 000个,其中白色菌落约占50%。

2.4 重组质粒的鉴定

对2个白色菌落(A和B)的质粒DNA用BamH I消化,均产生约600 bp和3 200 bp的预期片段;用Xba I和EcoR I进行双酶切,均产生约1 100 bp和2 700 bp的预期片段(图3),说明克隆载体的构建是成功的。并且所鉴定两克隆的目的基因在载体内的连接方向均为正向。命名A克隆的重组质粒为pTAF(结构示意图见图4), B克隆保存备用。

2.5 目的基因的序列测定

取pTAF进行目的基因的序列测定。所测序列与报道序列一致。证明所克隆的目的片段正是afp基因。测序结果还直接证明了目的片段在克隆载体内的连接方向正是所需要的。

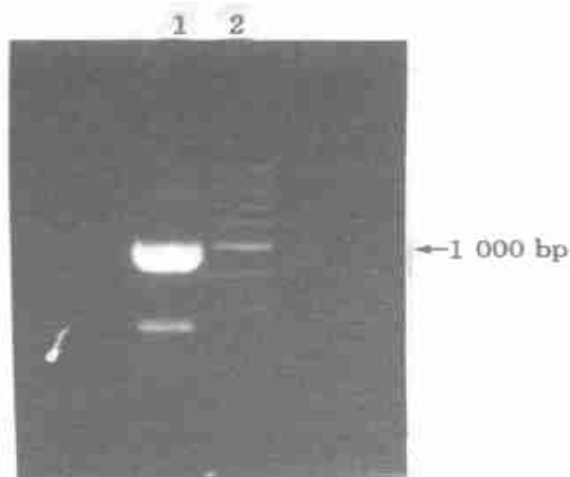


图 1 PCR 产物的电泳结果

1 PCR 产物; 2 DNA 分子量标记

Fig 1 Electrophoresis of PCR products

1 PCR products; 2 200 bp DNA ladder

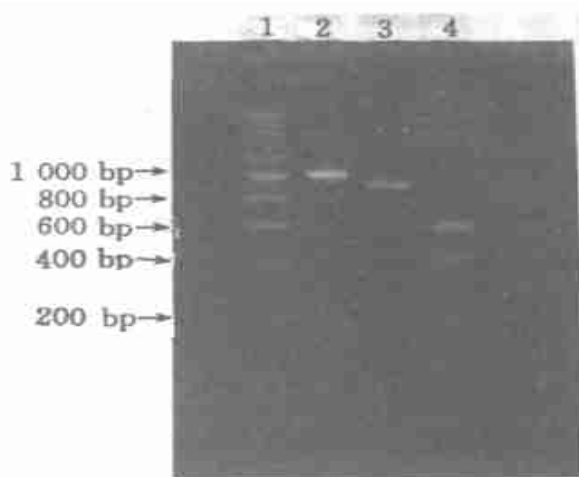


图 2 目的片段的酶切鉴定

1 DNA 分子量标记; 2 目的基因;

3 *Pst* I 酶切; 4 *Bam* H I 酶切

Fig 2 Restriction enzyme digestion of interest fragment

1 200 bp DNA ladder; 2 Interest fragment;

3 *Pst* I digestion; 4 *Bam* H I digestion

图 3 重组质粒的酶切鉴定

1 A 克隆 *Bam* H I 酶切; 2 A 克隆 *Xba* I 与 *Eco* R I 酶切;3 B 克隆 *Bam* H I 酶切; 4 B 克隆 *Xba* I 与 *Eco* R I 酶切;

5 DNA 分子量标记

Fig 3 Restriction enzyme digestion

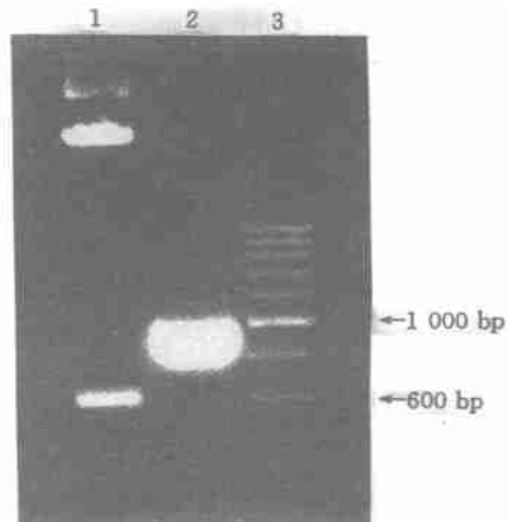
of recombinant plasmid

1 Digestion of clone A with *Bam* H I; 2 Digestion ofclone A with *Xba* I and *Eco* R I; 3 Digestion ofclone B with *Bam* H I; 4 Digestion of clone B with*Xba* I and *Eco* R I; 5 200 bp DNA ladder

图 4 重组质粒(pTAF)的示意图

afp 抗冻蛋白基因; Amp^r 氨苄青霉素抗性基因;LacZ β 半乳糖苷酶阅读框架; rep 起始蛋白质基因

Fig 4 Demonstration of recombinant plasmid pTAF



2.6 植物表达载体的构建

植物表达载体 pB II21 是从结瘤农杆菌双元质粒衍生而来, 系一组成性表达载体, 大小 13 kb, 多克隆位点上游带有 CaMV 35S 启动子, 下游带有

GUS 报告基因; 在 NOS 启动子下游带有 NPT II 基因, 可进行 Kanamycin 抗性筛选。胡萝卜 afp 植物表达载体的构建过程: 先用 *Eco* R I 消化重组质粒

pTAF, 使其线性化, 再用 DNA 聚合酶 I Klenow 大片段补平末端, 然后用 *Xba* I 消化, 获得一末端粘, 一末端平的目的片段 (afp)。pB1121 用 *Xba* I 和 *Sma* I 双酶切, 获得一末端粘, 一末端平的线性质

粒。将目的片段与线性质粒在 T4DNA 连接酶的作用下进行定向连接, 即构建成胡萝卜 afp 的植物表达载体 pBAF (图 5)。

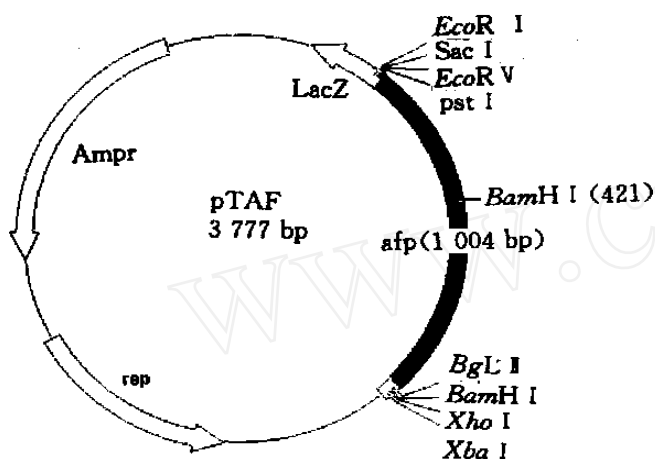


图 5 胡萝卜 afp 的植物表达载体 (pBAF) 示意图

afp. 抗冻蛋白基因; GUS β 葡萄糖苷酶基因;

CaMV 35S 花椰菜花叶病毒 35S 启动子;

NPT II(kanr). 新霉素磷酸转移酶基因 (卡那霉素抗性);

NOS pro/ter 胭脂碱合成酶启动子/终止子

Fig 5 Plant expression vector of carrot afp

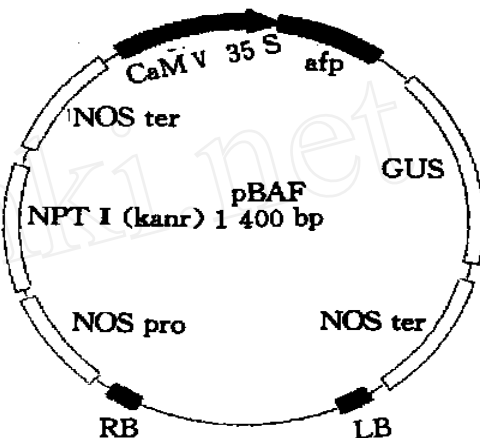


图 6 胡萝卜 afp 植物表达载体 (pBAF) 的酶切及 PCR 鉴定

1. *Bam* H I 酶切; 2. PCR 产物; 3. DNA 分子量标记

Fig 6 Identification of plant expression vector of carrot afp with enzyme digestion and PCR

1. *Bam* H I digestion; 2. PCR product; 3. 200 bp DNA ladder

2.7 植物表达载体的鉴定

挑取转化菌落, 提取重组质粒 pBAF, 用 *Bam* H I 消化, 产生约 600 bp 预期片段。以 pBAF DNA 为模板进行 PCR, 极特异地扩增出 1 000 bp 预期片段, 说明胡萝卜 afp 基因在植物表达载体 pBAF 内连接完整, 并且方向正确 (图 6)。

3 讨论

3.1 胡萝卜 afp 的克隆策略

一般克隆已知基因多采用 RT-PCR (Reverse Transcribed PCR) 的方法, 即以 polyA⁺ RNA 为模板, oligo dT 为引物, 通过反转录酶把 polyA⁺ RNA 反转录成 cDNA, 然后在 Taq DNA 聚合酶的作用下进行 DNA 扩增。此法特别适合于克隆那些具有内含子的基因。对于不含有内含子的基因, 以基因组 DNA 为模板, 直接进行 PCR 的方法则较为简捷经济。本试验采用后一方法的基础即在于胡萝卜 afp 不含内含子。

但以基因组 DNA 为模板进行 PCR, 其背景比 RT-PCR 要复杂得多, 加之胡萝卜 afp 序列的特殊

性, 引物的设计就显得特别重要。作者认为: (1) 除了要注意引物内、引物间的二级结构外, 还要特别注意加上的酶切位点和保护碱基对于二级结构的影响。如果影响较大, 就舍其不用, 改用 T-载体克隆; (2) 为了提高特异性, 可适当延长引物; (3) 开放阅读框 (ORF) 内的序列比其外边的序列更为特异, 引物应尽量向 ORF 内延伸。

一般的克隆载体 (如 pUC18, pUC19 等) 应用于克隆 PCR 产物时, 须提前在 PCR 引物的 5' 端加上酶切位点和保护碱基, 然后对 PCR 产物和克隆载体用相同的限制性内切酶去消化, 造成相应的黏性末端或平末端, 最后再定向连接。这一过程未免繁琐, 尤其是当外加酶切位点对引物的二级结构有影响, 或者引物自身已足够长, 再加酶切位点和保护碱基显得过长时, 就可考虑使用 T-载体。T-载体可和 Taq, Tth, AmpliTaq 或 KlenTaq DNA polymerase 的 PCR 扩增产物直接相连, 因这些酶的 PCR 产物 3' 末端都带有一个突出的-A, 而 T-载体在其 3' 末端带有一个突出的-T, 刚好形成一对黏性接头。本试验使用 pUCm-T Vector 克隆效率很高, 直径 9 cm 的平皿上生成白色菌落和蓝色菌落各约 500 个, 而且

随意所挑白色菌落均为重组克隆。

3.2 胡萝卜 *afp* 植物表达载体的构建策略

pB II21 是一个常用的植物表达载体,有其优点,但也有其不足,如多克隆位点仅有 3 个酶切位点(*Xba* I, *Bam* H I 和 *Sma* I),选择余地过小,给连接目的基因造成一定的困难。实际工作中有人就用置换 *GU S* 基因的办法来解决这个问题(*GU S* 基因下游有一 *Sac* I 酶切位点可利用)。但这样后期检测表达状况时,就无法进行方便的组织化学检验了。胡萝卜 *afp* 因为含有 *Bam* H I 位点,所以在 pB II21 多克

隆位点只有 *Xba* I 和 *Sma* I 2 个位点可利用。T-载体中的 *EcoR* V 位点也因胡萝卜 *afp* 含有而不能利用,故而采用了文中的技术路线。试验证明,该技术路线简单快捷,行之有效,并且保留了 *GU S* 基因。

目的片段在 T-载体内的连接方向是随机的,可能正向也可能反向。为了构建植物表达载体,在构建克隆载体时就对目的片段的连接方向进行了选择鉴定。这样即可选择利用 T-载体的有关酶切位点,使目的片段能与 pB II21 进行定向连接。

[参考文献]

- [1] 黄永芬,汪清胤,付桂荣,等.美洲拟蝶抗冻蛋白基因(*afp*)导入番茄的研究[J].生物化学杂志,1997,13(4): 418- 422
- [2] Georges F, Saleem M, Cutler A. J. Design and cloning of a synthesis gene for the flounder antifreeze protein and its expression in plant cells[J]. Gene, 1990, 91(2): 159- 165
- [3] Hightower R, Cathy B, Ranela D. Expression of antifreeze proteins in transgenic plants[J]. Plant Molecular Biology, 1991, 17(5): 1013- 1021
- [4] Wallis J G, Wang Hongyu, Guerra D J, et al Expression of a synthetic antifreeze protein in potato reduces electrolyte release at freezing temperatures[J]. Plant Molecular Biology, 1997, 35(3): 323- 330
- [5] 江 勇,贾士荣,费云标,等.抗冻蛋白及其在植物抗冻生理中的作用[J].植物学报,1999,41(7): 677- 685
- [6] 卢存福,王 红,简令成,等.植物抗冻蛋白研究进展[J].生物化学与生物物理进展,1998,25(3): 210- 216
- [7] Worrall D, Elias L, Ashford D, et al A Carrot Leucine-Rich-Repeat Protein That Inhibits Ice Recrystallization[J]. Science, 1998, 282(5386): 115- 117
- [8] 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 133- 134
- [9] [美]萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南[M]. 第 2 版. 金冬雁, 黎孟枫等译. 北京: 科学出版社, 1992 19- 22; 55- 56

Cloning of a carrot gene encoding antifreeze protein and construction of its plant expression vector

YIN Meng-an¹, CUI Hong-wen¹, FAN Da-hong², GUO Li³

(1 College of Horticulture, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China; 2 Xijing Hospital, the Fourth University of Military Medicine, Xi'an 710032, China; 3 College of Life Science, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract Genomic DNA in the seedlings of carrot cultivar Autumn King was extracted with CTAB method. The carrot antifreeze protein gene (*afp*) was amplified by PCR (Polymerase Chain Reaction). Cloning vector pTAF of carrot *afp* was constructed with pUCm-T Vector. pTAF was digested with *EcoR* I and became linear. Its ends were filled with DNA Polymerase I Klenow fragment. Then it was digested with *Xba* I and a designed fragment (*afp*) with a cohesive end and a blunt end was released. Plant expression vector pB II21 was digested with *Xba* I and *Sma* I and a linear plasmid with a cohesive end and a blunt end was obtained. The linear plasmid and the designed fragment (*afp*) were directly ligated with T4 DNA ligase, and the plant expression vector of carrot *afp* was constructed.

Key words carrot; antifreeze protein gene; molecular biology