

水稻耐盐相关基因 ZRP4 的克隆 及其植物表达载体的构建*

张文惠^{1,2}, 张红心², 樊 圃³, 陈 亮², 山 仑¹

(1 西北农林科技大学 生命学院, 陕西 杨凌 712100;

2 厦门大学 生命科学院 细胞生物学与肿瘤细胞工程教育部重点实验室, 福建 厦门 361005;

3 四川大学 生命科学院, 四川 成都 610065)

[摘 要] 采用 RT-PCR 技术克隆了水稻 O-甲基转移酶 ZRP4 基因的 cDNA 片段, 并进行了序列测定与分析。结果表明, 该序列全长 1 101 bp, 编码 366 个氨基酸, 与 GenBank 中水稻 ZRP4 基因序列比对, 核苷酸同源性为 99.8%, 氨基酸同源性为 99.7%。将克隆片段插入中间载体 pBPFQ7, 经 *Hind* III 酶切回收带有 P35s 启动子和 nos 终止子片段, 连接 pCAMBIA 1301 载体, 成功构建 ZRP4 基因的植物表达载体。

[关键词] 水稻; ZRP4 基因; 基因克隆; 植物表达载体

[中图分类号] Q 785

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2006)07-0134-05

盐碱地、干旱土地面积的增加给农业生产造成了重大损失。水稻是我国主要的粮食作物之一, 通过基因工程的技术和手段, 研究水稻的耐盐机制, 增强其耐盐性, 使其能在盐碱、干旱胁迫下正常生长, 具有重要的理论和现实意义^[1-3]。研究人员通过“增强子检测系统”筛选水稻耐盐突变体, 发现并推测水稻的 ZRP4 基因与盐胁迫密切相关。ZRP4 基因全长为 1 101 bp, 编码 366 个氨基酸组成的蛋白质, 该蛋白质是由 O-甲基转移酶调控。在逆境胁迫下, 植物调节甲基转移酶的活性, 能够高效地修复胁迫引起的蛋白质损伤, 提高植物的抗逆能力^[4]。本试验克隆了水稻 ZRP4 基因的 cDNA 片段, 并将构建的 ZRP4 基因植物表达载体转入了农杆菌, 以期转化为植物耐盐功能和机理研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 供试材料 水稻粳稻品种 (*Oryza sativa* L.) 中华 11 由上海农业科学院提供。

1.1.2 载体与菌株 pCAMBIA 1301 载体、pBPFQ7 载体、根癌农杆菌 EHA 105 和大肠杆菌 DH5 α , 均由厦门大学细胞生物学实验室保存。

1.1.3 试剂 *Taq* 酶和限制性内切酶均购自大

连宝生物 (TakaRa) 公司, Trizol RNA 提取试剂盒购自 Invitrogen 公司, 反转录酶购自 Promega 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计 根据 GenBank 公布 (NM 194620) 水稻 ZRP4 基因序列, 应用 Primer Premier 5.0 软件分析设计一对上、下游引物 zp4-1 和 zp4-2, 上、下游引物 zp4-1 和 zp4-2 分别设有 *Eco*R I 和 *Xba* I 酶切位点, 上游引物 zp4-1 序列为: 5' GGC GAA TTC CAT GGC ACA ACG TGT CCA AG 3'; 下游引物 zp4-2 序列为: 5' GCG TCT AGA TCA AGG GTA AAC CTC GAT GATTG-3'。引物由上海 Sangon 合成。

1.2.2 ZRP4 基因的扩增 按照 Trizol RNA 提取试剂盒和 Promega 公司逆转录酶使用说明, 提取水稻总 RNA, 经反转录合成 cDNA。以反转录产物 cDNA 作为模板, zp4-1 和 zp4-2 作为引物, 进行 PCR 扩增。PCR 扩增反应体系为: cDNA 30~90 ng, 10 $\times$ Buffer 2.0 μ L, MgCl₂ 2.0 μ L, dNTP 0.2 μ L, 上下游引物各 1.0 μ L, *Taq* 酶 1.0 U, 加 ddH₂O 至 20 μ L。PCR 扩增反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 45 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。回收扩增片段并连接

* [收稿日期] 2006-04-12

[基金项目] 中国科学院知识创新工程重要方向项目 (KZCX3-SW-444); 教育部重点项目“01102-培育转耐盐基因水稻的研究”

[作者简介] 张文惠 (1972-), 女, 吉林长春人, 在读博士, 主要从事植物抗逆生理生化研究。

[通讯作者] 陈 亮 (1963-), 男, 河南新乡人, 教授, 博士生导师, 主要从事植物细胞工程和基因工程研究。E-mail: chenl304@263.net

pMD18-T 载体, 选取含有目的片段的阳性克隆, 送上海 Sangon 公司进行测序。

1.2.3 *ZRP4* 基因植物表达载体的构建 用 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切带有 *ZRP4* 基因片段的 pMD18-T 质粒, 回收小片段, 连接经 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切的中间载体 pBPF Ω 7, 构建重组质粒 pBPF-

ZRP4。用 *Hind* III 酶切 pBPF-*ZRP4* 质粒, 回收带有 P35s 启动子和 nos 终止子的大片段, 连接 *Hind* III 酶切的 pCambia 1301 载体, 构建植物表达载体 pBPF-*ZRP4*-1301 (图 1), 将其转化至大肠杆菌 DH5 α , 按常规方法提取质粒, 进行 PCR 反应及酶切鉴定。

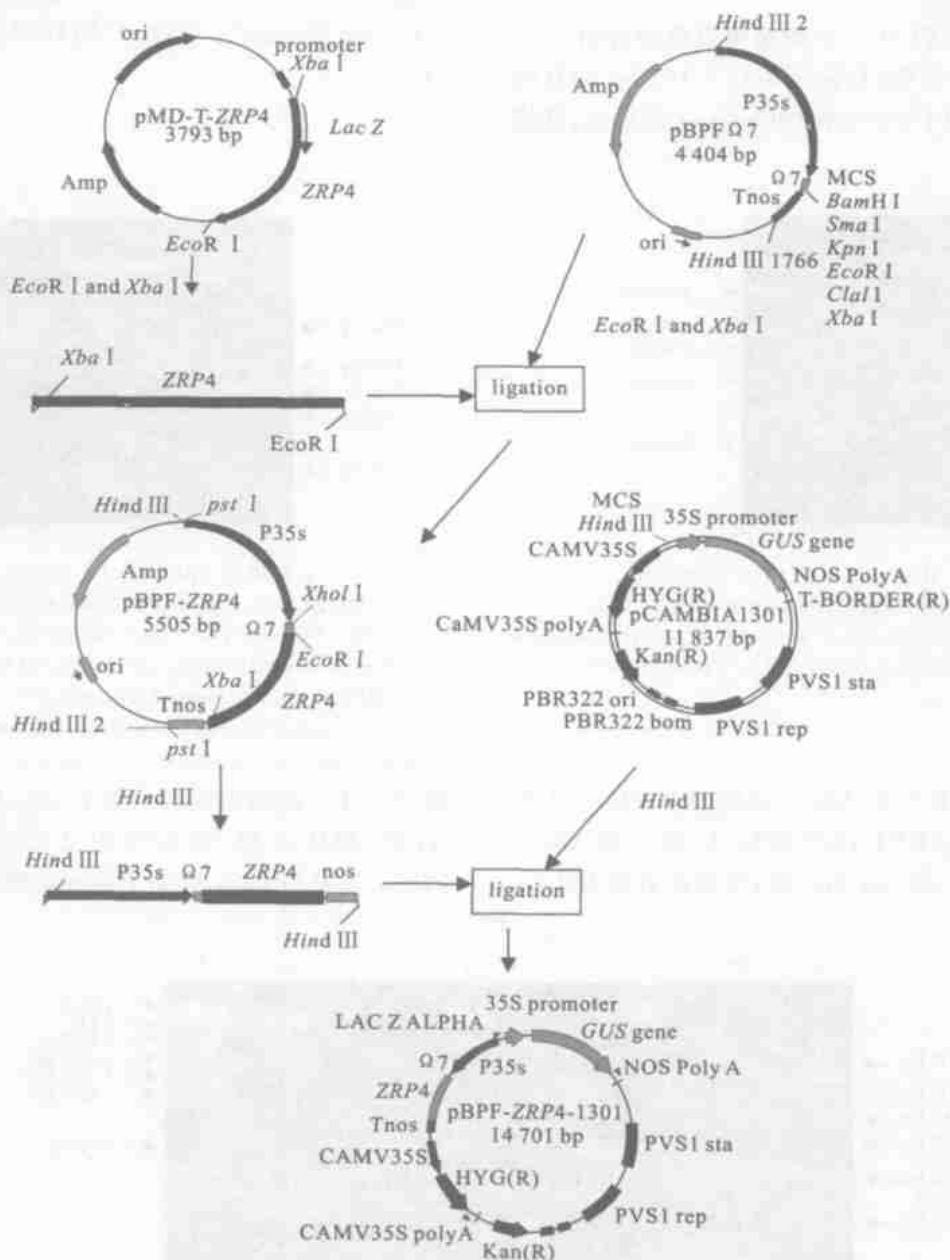


图1 植物表达载体 pBPF-*ZRP4*-1301 构建过程

Fig 1 Construction process of plant expression vector pBPF-*ZRP4*-1301

1.2.4 植物表达载体 pBPF-*ZRP4*-1301 转化 采用冻融法^[4]将植物表达载体 pBPF-*ZRP4*-1301 转化至根癌农杆菌 EHA 105 感受态细胞中, 将菌液涂布于含有卡那霉素的 LB 固体培养基上, 于 28 ℃ 条

件下培养 2~3 d, 挑取单菌落进行 PCR 检测。

1.2.5 重组农杆菌转化水稻愈伤组织及其 *GUS* 基因检测 挑取 1.2.4 中的重组农杆菌接种到 LB 液体培养基中, 于 28 ℃、250 r/min 条件下培养 2~3 d,

将水稻愈伤组织置于 OD_{600} 为 0.5 的重组农杆菌菌液中浸染 30 min, 用灭菌滤纸吸干水稻愈伤组织表面菌液, 置于共培养基 (MS 培养基 + 4 mg/L 2, 4-D + 100 μ mol/L AS) 中, 于 25 $^{\circ}$ C 条件下暗培养 3 d 后, 进行水稻愈伤组织的 *GUS* 基因检测^[5]。

2 结果与分析

2.1 *ZRP4* 基因的 PCR 扩增结果及序列分析

用所设计的引物, 克隆出长约 1 101 bp 的目的片段(图 2), 经 DANman 和 B D edit 软件对比, 其核

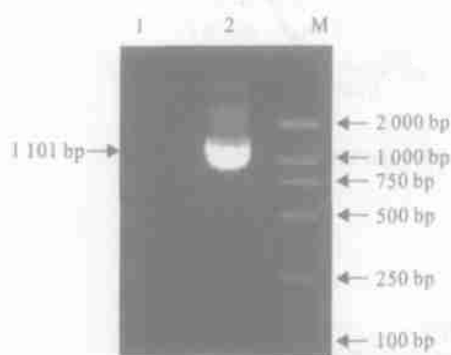


图 2 *ZRP4* 基因的 PCR 扩增结果

1 阴性对照; 2 基因 *ZRP4* 的 cDNA; M. DL 2000

Fig 2 PCR amplification of gene *ZRP4* cDNA sequence

1 Negative control; 2 cDNA of *ZRP4* gene; M. DL 2000

分别用 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切和 *Hind* III 单酶切鉴定 pBPF-*ZRP4*-1301 质粒, *EcoR* I 和 *Xba* I 酶切得到长约 1 101 bp 的片段, 与阳性对照大小一

致。氨基酸序列与 GenBank 中水稻 *ZRP4* 基因序列的同源性为 99.8%, 仅在 135 处有 2 个碱基不同, 推导的氨基酸序列与水稻 *ZRP4* 基因氨基酸序列的同源性为 99.7%。

2.2 *ZRP4* 基因植物表达载体的鉴定结果

用 *EcoR* I 和 *Xba* I 双酶切 pBPF-*ZRP4* 质粒, 得到长约为 4 404 bp 的 pBPF 载体片段, 和长约为 1 101 bp 的 *ZRP4* 片段, 与阳性对照大小一致(图 3)。



图 3 重组质粒 pBPF-*ZRP4* 的酶切鉴定结果

M₁: DL 2000; 1. *EcoR* I 和 *Xba* I 酶切; 2. pBPF-*ZRP4* 质粒; M₂: DL 15000; 3. 阳性对照; 4. 阴性对照

Fig 3 Identification of the recombinant pBPF-*ZRP4* plasmid digested with *EcoR* I and *Xba* I

1. Identified by digested with *EcoR* I and *Xba* I;

2. pBPF-*ZRP4* plasmid; 3. Positive control; 4. Negative control
致; *Hind* III 酶切得到长约为 11 837 bp 的 pCAMB1-A 1301 载体片段, 和长约为 2 865 bp 的片段(含 *ZRP4* 基因和 P35s 启动子及 nos 终止子, 图 4)。



图 4 重组质粒 pBPF-*ZRP4*-1301 的酶切鉴定结果

1 阴性对照; M₁: DL 2000; 2 pBPF-*ZRP4*-1301 质粒; 3 阳性对照; 4 pBPF-*ZRP4*-1301 质粒;
5 *Hind* III 酶切 pBPF-*ZRP4* 质粒; 6 *EcoR* I 和 *Xba* I 酶切 pBPF-*ZRP4*-1301 质粒; M₂: DL 15000

Fig 4 Identification of the recombinant pBPF-*ZRP4*-1301 plasmid

1 Negative control; M₁: DL 2000; 2 pBPF-*ZRP4*-1301 plasmid; 3 Positive control; 4 pBPF-*ZRP4*-1301 plasmid digested with *Hind* III;

5 pBPF-*ZRP4* plasmid digested with *Hind* III; 6 pBPF-*ZRP4*-1301 plasmid digested with *EcoR* I and *Xba* I; M₂: DL 15000

2.3 植物表达载体 pBPF-ZRP4-1301 的 PCR 检测结果

重组质粒 pBPF-ZRP4-1301 导入农杆菌的 PCR 检测结果见图 5。由图 5 可知, 重组农杆菌菌落可以扩增出长约的 1 101 bp 片段, 与阳性对照一致, 而阴性对照 (EHA 105) 却未见该目的条带, 说明



图 5 pBPF-ZRP4-1301 载体导入农杆菌的 PCR 检测结果

1. 阳性对照; 2, 3, 4 重组农杆菌的 PCR;

5 阴性对照; M. DL 2000

Fig 5 PCR analysis of pBPF-ZRP4-1301 vector

transferred into *Agrobacterium tumefaciens*

1. Positive control; 2, 3, 4 PCR of the recombinated

Agrobacterium tumefaciens; 5 Negative control; M. DL 2000

3 讨论

增强子是基因表达的重要调节元件, 其能显著增强启动子的表达效率。本研究在植物表达载体的构建中, 成功地从中间载体 pBPF Ω 7 中引入植物表达启动子 P35s 和 nos 终止子, 以及一个 Ω 7 增强子。Michiels 等^[6]将增强子元件与一个雄性不育相关的启动子结合, 使用该启动子获得了高效表达。Rahoo^[7]报道, Ω 7 增强子在植物、动物和 *E. coli* 的体内及体外翻译中均能提高翻译效率。本研究构建的载体 pBPF-ZRP4-1301 中的 CaMV 35S 启动子与 *GUS* 报告基因的融合体, 经农杆菌浸染转入靶细胞后, 短时间 (共培养 3 d) 即可通过 *GUS* 瞬时表达系统检测出来。

盐胁迫下, 植物体内多种基因的表达模式均会变化或有新的基因产物出现, 而新的基因产物在保

质粒已导入根癌农杆菌 EH 105。

2.4 重组农杆菌转化水稻愈伤组织的 *GUS* 基因检测结果

由图 6-A, B 可知, 转化 *ZRP4* 基因的水稻愈伤组织部分呈现蓝色, 说明外源基因 *ZRP4* 已转入水稻愈伤组织。

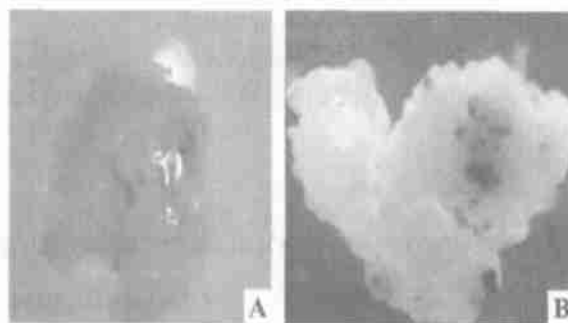


图 6 重组农杆菌转化水稻愈伤组织

的 *GUS* 基因检测结果

A. 未转化水稻愈伤组织; B. 转化 *ZRP4* 基因的水稻愈伤组织

Fig 6 Identification of *GUS* gene in rice calli

1. The untransformed calli of rice;

2. The transformed *ZRP4* gene calli of rice

护细胞正常的代谢活动和生长发育方面起着重要的作用。在逆境胁迫时, 甲基转移酶的活性能够高效地修复胁迫引起的蛋白质损伤, 提高植物的抗逆能力。Mudegett 等^[4]研究表明, 在高浓度盐胁迫下, 小麦幼苗的天冬酰胺异构甲基转移酶被诱导激活, 使幼苗的耐盐能力提高。Sheveleva 等^[8]将肌醇 O-甲基转移酶转入烟草中, 提高了植株的抗旱耐盐能力, 并且转基因植株胁迫后的恢复速度要高于野生型植株。Charron 等^[9]在分析胁迫诱导基因 W 89 内部的甲基转移酶区时发现, 甲基转移酶区的一个 SAM (S-腺苷甲硫氨酸) 结合基因可能与其蛋白或转录因子相互作用, 从而调控植物在逆境中的基因表达, 提高植物的抗逆性。在水稻盐胁迫突变体中, 调控水稻 *ZRP4* 基因的 O-甲基转移酶的活性很高, 但其耐盐的特性和机理尚未见报道。本研究将在水稻遗传转化中对其功能和机制作进一步研究。

[参考文献]

- [1] Serrano R, Gaxiola R. Microbial model and salt-stress tolerance in plant[J]. Critical Reviews in Plant Sciences, 1999, 13(2): 121-138
- [2] McCue K E, Hanson A D. Drought and salt tolerance: towards understanding and application[J]. Trends Biotechnology, 2000, 8: 358-362

- [3] 龚继明, 陈受宜. 离子平衡及其相关信号在细胞耐盐中的作用[J]. 生物工程进展, 1999, 19(6): 2-6
- [4] Mudegett M B, Clarke S. Homonal and environmental responsiveness of a developmentally regulated protein repair L-isoaspartyl methyltransferase in wheat[J]. J Biol Chem, 1994, 269: 25605-25612
- [5] Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W. GUS fusions: β glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants[J]. EMBO J, 1987, 6(13): 3901-3907
- [6] Michiels F, Botteman J, Omelissen M. Production of male sterile plants[J]. Molecular and General Genetics, 1996, 241: 73-80
- [7] Raho G. Tissue-specific expression and environmental regulation of the barley *Hvshp17* gene promoter in transgenic plants[J]. Journal Experiment Botanica, 1996, 47: 1587-1594
- [8] Sheveleva E, Chmura W, Bohnert H J, et al. Increased salt and drought tolerance by D-ononitol production in transgenic *Nicotiana tabacum* L. [J]. Plant Physiol, 1997, 115: 1211-1219
- [9] Charron J B, Breton G, Danyluk J, et al. Molecular and biochemical characterization of a cold-regulated phosphoethanolamine N-methyltransferase from wheat[J]. Plant Physiol, 2002, 129: 363-373

Cloning salt-tolerance related gene *ZRP4* of rice and construction of its plant expression vector

ZHANG Wen-hui^{1,2}, ZHANG Hong-xing², FAN Pu³, CHEN Lian-g², SHAN Lun¹

(1 College of Life Sciences, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Life Sciences Department and Key Lab of the Ministry of Education Cell Biology and Tumor Cell Eng., Xiamen University, Xiamen, Fujian 361005, China;

3 School of Life Sciences, Sichuan University, Chendou, Sichuan 610065, China)

Abstract Utilizing RT-PCR, the cDNA of fragment of O-methyltransferase *ZRP4* gene in rice was successfully amplified, which was about 1 101 bp in length and encoded 366 amino acids, and was cloned and sequenced. DNA sequence analysis indicated that the cloned fragment shared high homogeneity to the cDNA of *ZRP4* gene in rice. The cloned cDNA of *ZRP4* gene was introduced into a middle vector pBPFQ7. The fragment with P35s promoter and nos were digested by *Hind* III, which were ligated into pCAMB1-A1301 vector, giving a plant expression vector containing *ZRP4* gene.

Key words: *Oryza sativa* L.; *ZRP4* gene; gene cloning; plant expression vector