

番茄叶片液泡转化酶基因植物反义表达 载体的构建与瞬时表达

程智慧¹, 吴正景^{1,2}, 孟焕文¹, 许小勇¹

(1 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨凌 712100; 2 河南科技大学 林学院, 河南 洛阳 471003)

[摘要] 在分析植物液泡转化酶基因保守区序列的基础上, 设计 1 对 PCR 引物, 以番茄(中蔬四号)叶片总 RNA 的反转录产物为模板, 扩增出长为 668 bp 的 cDNA 片段, 并克隆入 pMD-18 T simple 载体。测序结果表明, 所获得的片段为番茄液泡转化酶基因 *TIV1* 的片段; PCR 和酶切分析表明, 该片段已成功定向连入到双元载体 pBinAR 的 CaMV 35S 启动子和 OCS 终止子间, 构建成反义植物表达载体 pBinAR-a*TIV1*; 菌落 PCR 表明质粒成功转化入农杆菌 EHA105; 瞬时表达证明该反义片段对番茄叶片液泡转化酶活性具有明显的抑制效果。

[关键词] 番茄; 液泡转化酶; 反转录 PCR; 反义表达载体构建; 瞬时表达

[中图分类号] S641.203.6; Q782 **[文献标识码]** A **[文章编号]** 1671-9387(2007)04-0155-04

Construction and transient expression of vacuolar invertase gene antisense expression vector in tomato leaves

CHENG Zhi-hui¹, WU Zheng-jing^{1,2}, MENG Huan-wen¹, XU Xiao-yong¹

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

2 College of Forestry, He'nan Sci-Tech University, Luoyang, He'nan 471003, China)

Abstract: Total RNA was isolated from tomato (cv. Zhongshu No. 4) leaves by using the specific primers designed according to the sequence of vacuolar invertase gene in GenBank. A fragment with the length of 668 bp was amplified by reverse transcription and polymerase chain reaction and cloned into pMD18-Tsimple vector. Sequence analysis showed the amplified fragment was the *TIV1* fragment of the vacuolar invertase gene. The fragment was cut by two restriction enzymes *Sal* I and *Bam*H I, and inserted into plant expression vector pBinAR between CaMV 35S promoter and OCS terminator to form antisense plant expression vector pBinAR-a*TIV1*. The pBinAR-a*TIV1* was identified by PCR amplification with *TIV1* gene primers, and the direction of connection was identified by double restricted enzymes digestion. The result showed that the expression vector was successfully transferred into agrobacteriumtum EHA105 with method of colony PCR. The activity of vacuolar invertase was decreased by transient expression of antisense fragment in tomato leaves.

Key words: tomato; vacuolar invertase; RT-PCR; antisense expression vector construction; transient expression

当植物遭受逆境胁迫时, 有许多基因参与的一 系列防御反应就会受到诱导。通常植物对胁迫的代

[收稿日期] 2006-10-08

[基金项目] 国家自然科学基金项目(30370977); 国家“十五”科技攻关项目(2004 BA 516A09)

[作者简介] 程智慧(1958-), 男, 陕西兴平人, 教授, 博士, 博士生导师, 主要从事蔬菜生理与生物技术研究。
E-mail: chengzh@nwsuaf.edu.cn

谢响应是呼吸升高、细胞壁强化以及生成防御复合物等。这些代谢活动的提高需要更多的蔗糖在受胁迫的部位降解来实现,植物体内的转化酶能将蔗糖分解为果糖和葡萄糖,用于代谢所需。有关研究表明,转化酶参与植物对干旱^[1-3]、病菌侵染^[4]和机械伤害^[5]等逆境胁迫的反应。目前针对植物转化酶的基因功能研究多集中在光合产物的积累和分配及个体发育方面^[6-10],但转化酶基因对不同逆境反应的分子生物学机制并不清楚。

本试验构建番茄叶片液泡转化酶反义表达载体,旨在为进一步的基因转化和研究转化酶在植物抗逆反应中的功能及相关基因表达调节奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

番茄品种(中蔬 4 号)由中国农业科学院蔬菜花卉研究所提供。取 6~10 叶龄番茄苗的幼嫩展开叶,采用 BioFlux 公司的 Biozol 总 RNA 提取试剂提取总 RNA;PCR 引物由上海生物工程技术服务有限公司合成;反转录酶 M-MLV 购自 Promega 公司;pMD18-T simple vector, TaKaRa Ex Taq 酶、限制性内切酶、T4-DNA 连接酶和 DL2000 Marker 购自 TaKaRa 公司;Taq 酶购于华美生物技术公司;凝胶回收和质粒提取采用安徽优品试剂盒;大肠杆菌 DH5 α 为本实验室保存;植物表达载体 pBinAR 由英国 Warwick 大学 Stephen Jackson 博士赠送;PCR 引物由上海生物工程公司合成,测序由上海英骏生物技术有限公司完成。

1.2 方 法

1.2.1 番茄液泡转化酶基因片段克隆 根据已发表的液泡转化酶 cDNA 序列^[10-12],利用 DNAMAN 5.0 软件设计 1 对特异引物,预期目的片段大小约为 700 bp,引物序列如下(5'端分别引入接头酶切位点 *Sal* I 和 *Bam* H I):

Sal I

上游引物: 5'-gcgtcgacttgccctttgcatggtt-3';

Bam H I

下游引物: 5'-cgggatcccttcgtttctctcgggtca-3'。

按照 M-MLV 反转录酶使用说明进行反转录,以 2 μ L 反转录产物为模板,另加 10 \times PCR Buffer 2.5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 2.0 μ L, dNTP (10 mmol/L) 1 μ L, 上、下游引物(10 pmol/L)各 1 μ L, ddH₂O 补足 25 μ L。PCR 循环参数为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;然后 94 $^{\circ}$ C 1 min, 52 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 1.5

min,共 40 个循环;最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

1.2.2 番茄液泡转化酶反义表达载体构建 参考文献[13-14]的方法回收目的片段,连接到 pMD18-T simple vector,PCR 检测,测序。用 *Sal* I 和 *Bam* H I 对重组质粒进行双酶切,回收目的片段与经过同样双酶切的 pBinAR 载体定向连接,构建植物表达载体。连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,在含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 平板上进行筛选。随机挑取菌落,进行 PCR 扩增鉴定。提取阳性克隆质粒双酶切鉴定。提取鉴定过的连接成功的表达载体质粒,采用冻融法转入农杆菌 EHA105。

1.2.3 番茄液泡转化酶反义基因瞬时表达 按照文献[15-16]的方法,以含有空质粒的 pBinAR 农杆菌浸染为对照,对 MicroTom 番茄叶片进行瞬时转化。转化体系菌液 OD₆₀₀ = 0.4, 侵染 20 min,附加乙酰丁香酮 100 nmol/L,共培养 2 d 后转接到培养基 B5+IBA 0.5 mg/L + 6-BA 1.5 mg/L 上,抗生素用量为卡那霉素 75 mg/L,羧苄青霉素 300 mg/L。转接 8 d 后称取 0.2 g 培养物提取转化酶测定活性^[13],重复 8 次。数据采用 Excel 软件进行分析。

2 结果与分析

2.1 番茄液泡转化酶基因片段的克隆

番茄叶片总 RNA 经过反转录 PCR,获得 1 个大小约为 700 bp 的片断,与引物设计时预期的大小相近(图 1)。回收 PCR 产物,经连接、转化后,随机挑取几个白色菌落,菌落 PCR 扩增出 1 条约 680 bp 的片段(图 2)。对阳性克隆进行测序,在 GenBank 上比对结果显示,目的片段大小为 668 bp,属于番茄液泡转化酶基因 cDNA 片段,与番茄液泡转化酶基因 TIV1(GenBank 登录号为 Z12027.1)的 mRNA 序列符合率达 99.71%,与该基因 exon3(5 425~6 284)中的 5 544~6 211 碱基仅有 2 个碱基不同。由 DNAMAN 软件分析克隆的 cDNA 片段编码的氨基酸序列,发现有 2 个氨基酸出现变化(图 3),这可能是品种遗传背景不同造成的。

2.2 番茄液泡转化酶基因反义表达载体 pBinAR-aTIV1 的构建

运用 DNAMAN 5.0 软件对克隆片段进行酶切位点分析可知:基因片段内部确实不含 *Sal* I 和 *Bam* H I 酶切位点。用 *Sal* I 和 *Bam* H I 从克隆载体上切下目的片段,将 2 个片段反向插入到经同样双酶切的植物表达载体 pBinAR 中,构建成反义表

达载体,命名为 pBinAR-aTIV1。重组质粒导入 DH5 α 感受态细胞,随机选取 3 个单菌落提取质粒,PCR 扩增均检测有约 680 bp 的条带(图 4); Sal I

和 EcoR I 双酶切结果表明,重组质粒酶切片段较对照(空质粒)长约 680 bp(图 5),证明已将目的片段定向克隆入表达载体 pBinAR。

GGGTGGACTTGGCTTTTGGCATGGTCTGATCAATGGTATGATATTAACGGTGTCTGGACAGGGTCCGCTACCATCCTACCCGATGGTCAGATCATGATGCTTTATACCGGTGACACTGATGATTAT
GTGCAAGTGCAAAATCTTGGTACCCCGCAACTTATCTGATCCTCTCCTCTAGACTGGGTCAAGTTCAAAGGCAACCCGGTCTGGTCTCCACCCGGCATTGGTGTCAAGGACTTTAGAGACCC
GACTACTGCTTGGACCGGACCACAAAATGGCAATGGCTGTTAACAATCGGGTCTAAGATTGGTAAAACGGGTGTGACACTTGTATTGAACTTCCAACCTCACAAAGCTTTAAGCTATTGGATGGAG
TGCTGCATCGGTTCCGGGTACGGGTATGTGGAGTGTGGACTTTTACCCGGTATCTACTAAAAAACAACGGGTGGACACATCATATAACGGCCGGGTGTAAGCATGTGTTAAAAGCAAGT
TTAGATGACAATAAGCAAGATCATTATGCTATTGGTACGTATGACTTGGAAAGAACAATGGACACCCGATAACCCGGAATTGGATTATGGAATTGGGTTGAGACTAGACTATGGAAATATTATGC
ATCAAAGACTTTTATGACCCGAAGGAAGAACGAAGGGATCCCG

图 1 番茄液泡转化酶基因目的片段测序结果
Fig. 1 Sequence of tomato invertase gene fragment

A 591 TTATGGAATTGGGTTGAGACTAGACTATGGGAAATATTATGCATCAAAGACTTTTTATGACCCGAAGGAA 660
B 1090 TTGTGGAATTGGGTTGAGACTAGACTATGGGAAATATTATGCATCAAAGACTTTTTATGACCCGAAGAAA 1159

图 2 获得的番茄液泡转化酶基因序列与 TIV1 基因的 cDNA 序列比较
A. 获得的番茄液泡转化酶基因片段; B. TIV1 基因片段

Fig. 2 cDNA sequence comparing of target gene and TIV1 gene
A. Fragment of tomato invertase gene; B. Fragment of TIV1 gene

A 189 NKWTPDNPELDyGIGLRLDYGKYASKTFYDPKeER 221
B 347 NKWTPDNPELDcGIGLRLDYGKYASKTFYDPKkER 386

图 3 获得的番茄液泡转化酶基因片段与 TIV1 编码的氨基酸序列比较
A. 获得的番茄液泡转化酶基因片段编码氨基酸序列; B. TIV1 基因片段编码氨基酸序列
Fig. 3 Amino acids sequence difference between target gene's and TIV1 gene's
A. Amino acids sequence of tomato invertase; B. Amino acids sequence of TIV1

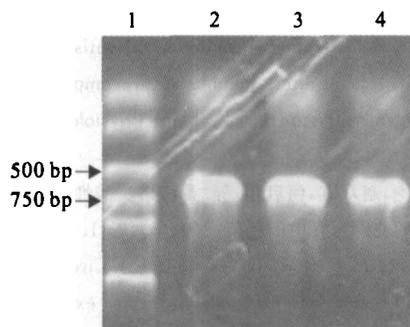


图 4 番茄液泡转化酶基因克隆的 PCR 检测
1. DL2000 Marker; 2~4. 阳性单菌落 PCR
Fig. 4 PCR detection of cloning of tomato invertase gene
1. DL2000 Marker; 2~4. PCR of positive colonies

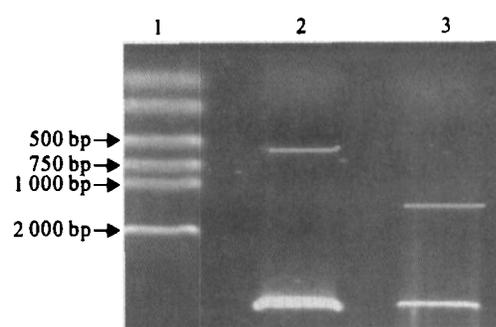


图 5 重组质粒 pBinAR-aTIV1 的双酶切结果
1. DL2000 Marker; 2. pBinAR 质粒(CK); 3. 重组质粒
Fig. 5 Double digestion of expression plasmid pBinAR-aTIV1 with Sal I and EcoR I
1. DL2000 Marker; 2. pBinAR vector (CK); 3. Recombined plasmid

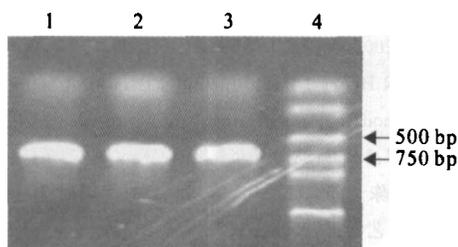


图 6 农杆菌 EHA105 菌落 PCR
1~3. 农杆菌 EHA105 单菌落 PCR; 4. DL2000 Marker
Fig. 6 Colony PCR detection of EHA105
1~3. PCR of single colony of EHA105; 4. DL2000 Marker

2.3 番茄液泡转化酶基因反义表达载体 pBinAR-aTIV1 转入农杆菌 EHA105

重组质粒采用冻融法导入农杆菌 EHA105 感受态细胞,随机挑取 3 个单菌落为模板,采用特异引物进行 PCR。结果(图 6)表明扩增出了约 680 bp 的条带,说明重组质粒已成功导入农杆菌 EHA105 细胞。

2.4 瞬时转化番茄叶片液泡转化酶活性检测

由表 1 可知,番茄叶片瞬时表达反义液泡转化

酶基因使叶片转化酶活性平均下降了 14.09%; 数据分析表明, $F = 13.790 > F_{0.01} = 4.600$, 表明转化叶片中液泡转化酶活性变化极显著。考虑到转化

受体个体受抑制的差异, 说明该片段具有明显的反义抑制效果, 可以进一步进行遗传转化研究。

表 1 番茄叶片液泡转化酶活性

Table 1 Activity of vacuolar invertase in tomato leaves

nmol/(min · g)

处理 Treatment	重复 Repeat								平均 Average
	1	2	3	4	5	6	7	8	
对照 Untranslated	35.65	28.71	33.54	37.08	30.40	36.19	33.90	35.45	33.92
转化 Translated	28.40	25.54	31.63	26.94	29.81	30.10	31.64	28.68	29.26

3 结论与讨论

本研究参照番茄果实中的液泡转化酶 mRNA 设计两端具有接头的特异引物, 以番茄叶片总 RNA 的逆转录产物为模板, 获得 1 个 668 bp 的片段。该片段与番茄液泡转化酶 *TIV1* 基因存在 2 个碱基的差异, 其编码的 2 个氨基酸出现变化, 这可能是品种遗传背景不同造成的。

与 GenBank 中发表的番茄果实液泡转化酶基因序列(Z12025.1、Z12026.1、Z12027.1、Z12028.1、M81081.1、AF490530.1、D1350.1) 进行比对表明, 本研究获得的番茄叶片液泡转化酶基因片段与其序列同源性均达 99% 以上; 姜晶等^[17]也从番茄叶片总 RNA 反转录出果实液泡转化酶, 这说明来自不同部位的番茄液泡转化酶可能由同一个阅读框编码。

本研究首次将番茄叶片液泡转化酶基因片段反向连在植物表达载体 pBinAR 上, 构建成液泡转化酶反义表达载体 pBinAR-a*TIV1*, 并用冻融法将重组质粒高效地转入根癌农杆菌 EHA105。叶盘瞬时表达初步证明, 该片段具有明显的反义抑制效果, 对进一步的基因转化和利用转基因植株进行基因功能研究提供了充足的试验证据。

[参考文献]

- [1] Kim J Y, Mahé A, Brangeon J, et al. A maize vacuolar invertase, *IVR 2*, is induced by water stress, organ/tissue specificity and diurnal modulation of expression[J]. *Plant Physiol*, 2000, 124: 71-84.
- [2] Andersen M N, Asch F, Wu Y, et al. Soluble invertase expression is an early target of drought stress during the critical, abortion-sensitive phase of young ovary development in maize[J]. *Plant Physiology*, 2002(130): 591-604.
- [3] 程智慧, 孟焕文, Scholes J D, 等. 水分胁迫对番茄幼苗转化酶表达及糖代谢的影响[J]. *园艺学报*, 2002, 29(3): 278-279.
- [4] Ehness R, Roitsch T. Co-ordinated induction of mRNAs for extracellular invertase and a glucose transporter in *Chenopodium*

rubrum by cytokinins[J]. *The Plant Journal*, 1997, 11: 539-548.

- [5] Cho J I, Lee S K, Ko S, et al. Molecular cloning and expression analysis of the cell-wall invertase gene family in rice (*Oryza sativa* L.)[J]. *Plant Cell Rep*, 2005, 24(4): 225-236.
- [6] 刘慧英, 朱祝军. 转化酶在高等植物蔗糖代谢中的作用研究进展[J]. *植物学通报*, 2002, 19(6): 666-674.
- [7] Ohyama A, Ito H, Sato T. Suppression of acid invertase activity by antisense RNA modifies the sugar composition of tomato fruit[J]. *Plant Cell Physiol*, 1995, 36: 369-376.
- [8] Yelle S, Chetelat R T, Dorais M. Sink metabolism in tomato fruit IV. Genetic and biochemical analysis of sucrose accumulation[J]. *Plant Physiol*, 1991, 95: 1026-1035.
- [9] Tang G Q, Lüscher M, Sturm A. Antisense repression of vacuolar and cell wall invertase in transgenic carrot alters early plant development and sucrose partitioning[J]. *Plant Cell*, 1999, 11(2): 177-190.
- [10] Klann E M, Hall B, Bennett A B. Antisense acid invertase (*TIV1*) gene alters soluble sugar composition and size in transgenic tomato fruit[J]. *Plant Physiology*, 1996, 112(3): 1321-1330.
- [11] 于喜艳, 赵双宜, 何启伟, 等. 番茄果实酸性转化酶基因 cDNA 片段的克隆[J]. *中国蔬菜*, 2002(6): 9-11.
- [12] Gonzalez M C, Roitsch T, Cejudo F J. Circadian and developmental regulation of vacuolar invertase expression in petioles of sugar beet plants[J]. *Planta*, 2005, 222(2): 386-395.
- [13] 张丽华, 程智慧, 李霞. *GUS* 基因分泌型植物表达载体的构建及对烟草的转化[J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2004, 32(增刊): 94-96.
- [14] 张文惠, 张红心, 樊圆, 等. 水稻耐盐相关基因 *ZRP4* 的克隆及其植物表达载体的构建[J]. *西北农林科技大学学报: 自然科学版*, 2006, 34(7): 134-138.
- [15] Horsch R B, Fry J E, Höffmann N L, et al. A simple and general method for transferring genes into plants[J]. *Science*, 1985, 227: 1229-1231.
- [16] 李静, 陈敏, 刘现伟, 等. 莴苣高效瞬时表达体系的建立[J]. *园艺学报*, 2006, 33(2): 405-407.
- [17] 姜晶, 李天来, 李伟. 番茄酸性转化酶 cDNA 片段的克隆与表达分析[J]. *园艺学报*, 2005, 32(5): 885-888.