

青花菜 β -1,3-葡聚糖酶基因的克隆、表达分析 及其植物表达载体的构建

靳敏峰, 侯喜林*

(南京农业大学作物遗传与种质创新国家重点实验室, 江苏 南京 210095)

摘要: 根据其他植物的 β -1,3-葡聚糖酶基因保守域序列设计简并引物, 扩增出青花菜 β -1,3-葡聚糖酶基因的中心区段, 结合 5'RACE 和 3'RACE 技术获得该基因的 5'端序列和 3'端序列, 经序列拼接获得 1 个 1 277 bp 的 cDNA, 在 GenBank 中登录号为 EF484879, 定名为 *BObg*。序列分析结果表明, 该 cDNA 包含 1 个 1 056 bp 的开放阅读框, 编码 352 个氨基酸, 其理论上的等电点 $PI=7.314$, 相对分子质量为 3.892×10^4 , 聚类分析显示该序列与已报道的其他植物的 β -1,3-葡聚糖酶基因具有较高氨基酸序列同源性。利用未接种和接种霜霉病后不同时期的青花菜植株细胞进行半定量 RT-PCR 分析, 结果表明, 该基因在霜霉病接种后 48 h 优势转录表达, 未接种和接种后其他时期都呈低水平转录表达。利用 pBI121 质粒构建含 35S 启动子的正义表达载体, 酶切图谱和 PCR 分析结果证明该表达载体构建成功。

关键词: 青花菜; 霜霉病; β -1,3-葡聚糖酶基因; 植物表达载体

中图分类号: S635.301 文献标识码: A 文章编号: 1000-2030 (2008) 02-0027-05

Cloning and characterization of β -1,3-glucanase gene cDNA from *Brassica oleracea* L. and construction of its plant expression vector

JIN Min-feng, HOU Xi-lin*

(State Key Laboratory of Crop Genetics and Germplasm Enhancement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: A pair of degenerating primers was designed according to the conserved regions of β -1,3-glucanase gene from other plant species and a cDNA fragment was isolated from *Brassica oleracea* L. using RT-PCR. Full-length cDNA with 1 277 bp was acquired by 5'RACE and 3'RACE methods. Its ORF (open read frame) encoded a polypeptide of 352 amino acids. The sequence was accepted and released by GenBank (accession number EF484879) and named as *BObg*. The putative protein of this gene had an isoelectric point of 7.314 and a calculated molecular weight of 3.892×10^4 . Alignment and phylogenetic tree showed it had high homologies with β -1,3-glucanase gene from other plant species. Semi quantitative RT-PCR analysis indicated this gene was up-regulated expressed at 48 h after downy mildew was inoculated, while it was down-regulated expressed in the plant without inoculation and other phases post inoculation. It was subsequently cloned into plant expression vector pBI121 and located between 35S promoter and NOS (nopaline synthase) terminator.

Key words: *Brassica oleracea* L.; downy mildew; β -1,3-glucanase gene; plant expression vector

β -1,3-葡聚糖酶在植物中广泛存在, 是大多数植物真菌细胞壁的主要成分之一, 是病程相关蛋白中一个大基因家族。许多研究表明 β -1,3-葡聚糖酶在植物抗真菌病害的防卫反应中起着重要的作用^[1-2], 在植物体中的合成受病原物的诱导^[3-4]。 β -1,3-葡聚糖酶能够降解细胞壁, 释放的低聚糖反过来又能诱导植物产生其他多种病程相关蛋白, 如植物抗毒素等。迄今为止, 已从多个植物中分离纯化得到了 β -1,3-葡聚糖酶基因^[5]。

霜霉病 (*Peronospora parasitica*) 是危害青花菜的主要病害之一, 选用抗病品种成为解决这一病害的有效途径。本研究获得了一个 1 277 bp 的青花菜 β -1,3-葡聚糖酶基因序列, 通过对其霜霉病诱导表达分析认为, 它参与了青花菜霜霉病的防卫反应, 并构建了其正义植物表达载体, 为进一步通过转基因技术培育高抗霜霉病的青花菜品种提供了可能。

收稿日期: 2007-03-21

基金项目: 国家 863 计划项目 (2006AA100108)

作者简介: 靳敏峰, 硕士研究生。* 通讯作者: 侯喜林, 教授, 博导, 从事蔬菜遗传育种及分子生物学研究, E-mail: hxl@njau.edu.cn。

1 材料与方法

1.1 植物材料

供试青花菜品种 B-13, 由南京农业大学白菜课题组提供。将种子播种于装有灭菌基质的穴盘中, 在人工气候箱中培养 (光照 12 h, 黑暗 12 h, 温度 20~25 °C)。

1.2 病原菌制备及接种

将采回的病叶用自来水冲净, 再经蒸馏水冲洗后置 20 °C 黑暗条件下保湿 (相对湿度为 95%) 24 h, 用湿棉球轻轻剥落孢子囊制成悬浮液, 孢子稀释至 $1 \times 10^5 \text{ mL}^{-1}$, 最后加入体积分数为 0.1% 的吐温-20 制成接种液。待幼苗长至 2 片真叶时进行人工喷雾接种, 接种量为每株 150~200 μL , 接种后黑暗保湿 24 h, 自然条件下发病, 以喷清水为对照。分别取接种后 12、24、48、72、96、144 h 的叶片, 经液氮冷冻, -80 °C 保存, 供提取 RNA。

1.3 RNA 的分离

采用 TRIZOL (MD Bio) 法提取细胞总 RNA。随后用无 RNase 的 DNase (TaKaRa 公司) 除去 RNA 中残留的 DNA。

1.4 β -1,3-葡聚糖酶基因全长序列的获得

根据其他植物的 β -1,3-葡聚糖酶基因保守域序列设计简并引物 (sense: 5'-RYNGGWGTWT-GYTAYGG-3', anti-sense: 5'-CADCCRCITYTCNGAYAC-3'), 扩增青花菜 β -1,3-葡聚糖酶基因的中心区段, 结合 5'RACE 和 3'RACE 技术获得该基因的 5'端序列和 3'端序列, 经序列拼接获得 β -1,3-葡聚糖酶基因全长序列。

5'RACE: 根据测序已得到的青花菜 β -1,3-葡聚糖酶基因的中心区段序列, 设计巢式特异引物 gsp1 (5'-GCATAGCCTGGATGAGAACC-3')、gsp2 (5'-GACCCTGGGCATCACCTCGTTT-3') 和 gsp3 (5'-GCCTCCGTTTGGCTATCTGC-3'), 进行 5'RACE 扩增。以 gsp1 进行反转录合成 cDNA 第 1 链, 然后用 gsp2 和 AAP (5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT ACG GGI IGG GII GGG IIG-3') 进行 PCR 扩增 cDNA 第 2 链。PCR 反应条件为: 94 °C 3 min; 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 1 min, 35 个循环; 72 °C 10 min。PCR 产物稀释 100 倍, 取 1 μL 为模板, 用 gsp3 和 AUAP (5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC-3') 进行 PCR 扩增, 取 10 μL PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳检测是否扩增出 DNA 片段, 然后将扩增出的 DNA 回收纯化, 连接到 pGEM-T Easy Vector (Promega) 上进行序列测定。序列测定由 Invitrogen 公司完成。

3'RACE: 根据测序已得到的 β -1,3-葡聚糖酶基因的中心区段序列, 设计特异引物 gsp4 (5'-CCAACAACCAGCACCATTACC-3'), 进行 3'RACE 扩增。以 3'RACE AP (5'-GGC CAC GCG TCG ACT AGT AC (T)₁₇-3') 进行反转录合成 cDNA 第 1 链, 然后用 gsp4 和 AP 进行 PCR 扩增 cDNA 第 2 链, PCR 反应条件同上。产物稀释 100 倍, 取 1 μL 为模板, 用 gsp4 和 AUAP 进行 PCR 扩增, 扩增产物电泳后回收测序。

1.5 序列分析及聚类树状图的构建

序列的拼接及分析采用 DNASTAR (<http://www.dnastar.com/>) 软件。用 Blast 程序软件从 GenBank 中挑选 11 个来源于不同植物的 β -1,3-葡聚糖酶基因编码的氨基酸序列, 利用 Clustalx (<http://soft.studa.com/downinfo/9536.html>) 软件将这些序列与本研究克隆到的 β -1,3-葡聚糖酶基因的氨基酸序列进行多序列比对和聚类分析。

1.6 β -1,3-葡聚糖酶基因的霜霉病诱导表达分析

取未接种与接种霜霉病后不同时期的叶片进行 β -1,3-葡聚糖酶基因的霜霉病诱导表达分析。利用 M-MLV (Promega) 反转录合成第 1 链 cDNA。取 1 μg 总 RNA 按照说明书操作, 反转录产物稀释 20 倍后取 1 μL 进行 RT-PCR。PCR 反应条件为: 94 °C 3 min; 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 1 min, 26 个循环; 72 °C 10 min。为校正用于 RT-PCR 反应的模板量, 以 1 对专一性扩增真核生物组成型表达基因 Histone3 的引物 (h1: 5'-GAAGCCTCATCGATACCGTC-3'; h2: 5'-CTACCACTACCATCATGGC-3') 进行平行 PCR 反应作为内对照。扩增产物经 1.2% 琼脂糖凝胶电泳分离。

1.7 青花菜 β -1,3-葡聚糖酶基因植物表达载体的构建

根据克隆的 β -1,3-葡聚糖酶基因全长序列设计合成引物 (sense: 5'-CGGGATCCCGATGAAAAT-

GTCTGGGGTTA-3'; anti-sense: 5'-CGAGCTCGTCCAAGGAGATTAGTTGAA-3'), 引物中加入 *Bam*H I、*Sac* I 位点和保护碱基, 以反转录的 cDNA 为模板进行 PCR 反应。PCR 反应条件为: 94 °C 3 min; 94 °C 45 s, 55 °C 45 s, 72 °C 90 s, 35 个循环; 72 °C 10 min。将扩增片段用 DNA 回收试剂盒回收, 连接到 pGEM-T Easy Vector 上, 获得质粒 pG-BObg 并进行测序。

将质粒 pG-BObg 和 pBI121 载体分别用 *Bam*H I 和 *Sac* I 进行双酶切, 将 pG-BObg 质粒酶切得到的 β -1,3-葡聚糖酶基因全长片段与酶切 pBI121 载体得到的大片段回收, 二者通过 T₄ DNA 连接酶连接到 pBI121-BObg 表达载体。采用 PCR 与酶切的方法验证表达载体是否构建成功。

2 结果与分析

2.1 β -1,3-葡聚糖酶基因的克隆和序列分析

根据其他植物的 β -1,3-葡聚糖酶基因保守域序列设计简并引物, 扩增出青花菜 β -1,3-葡聚糖酶基因的中心区段, 结合 5'RACE 和 3'RACE 技术获得该基因的 5'端序列 361 bp (图 1) 和 3'端序列 574 bp (图 2), 经序列拼接获得 β -1,3-葡聚糖酶基因全长 cDNA, 定名为 *BObg*。序列分析结果表明, 克隆到的 *BObg* cDNA 为 1 277 bp, 包含 1 个 1 056 bp 的开放阅读框, 编码 352 个氨基酸, 其理论上的等电点 $PI=7.314$, 相对分子质量 3.892×10^4 。根据 NCBI CDS (conserved domain search) 分析发现, 其编码链包含 1 个保守域, 具有典型的植物糖基水解家族 17 功能域, BLAST 分析结果表明, 该序列与白菜型油菜的序列相似性最高, 为 89%, 与芥菜 (*Brassica juncea*)、拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、柑橘 (*Citrus sinensis*)、葡萄 (*Vitis vinifera*)、大豆 (*Glycine max*)、烟草 (*Nicotiana tabacum*)、棉花 (*Gossypium hirsutum*)、橡胶 (*Hevea brasiliensis*)、苜蓿 (*Medicago truncatula*)、水稻 (*Oryza sativa*) 的序列相似性分别为 80%、61%、53%、51%、50%、51%、48%、47%、47%、46%。将该 cDNA 序列提交 GenBank, 登记号为 EF484879。

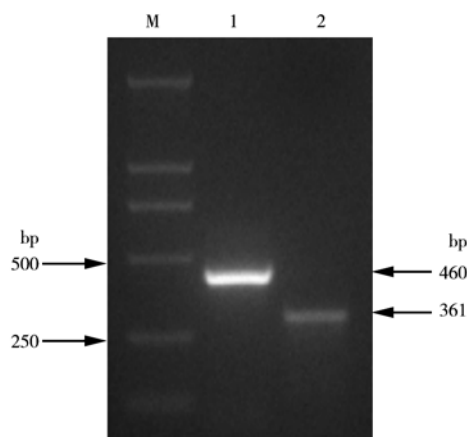


图 1 5'RACE 结果

Fig. 1 Amplification result of 5'-end unknown region by RACE

M: DL2000; 1. 第 1 轮 PCR 产物 The first PCR product; 2. 第

2 轮 PCR 产物 The second PCR product

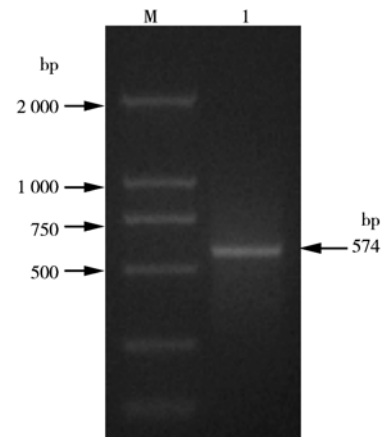


图 2 3'RACE 结果

Fig. 2 Amplification result of 3'-end unknown region by RACE

M: DL2000; 1. PCR 产物 PCR product

与其他植物 β -1,3-葡聚糖酶基因构建的聚类树状图表明 (图 3), 除水稻外, 所有双子叶植物的 β -1,3-葡聚糖酶基因聚在一支, 所有十字花科植物为一个分支, 青花菜 *BObg* 基因与白菜型油菜的距离最近。

2.2 β -1,3-葡聚糖酶基因的霜霉病诱导表达分析

正常情况下, β -1,3-葡聚糖酶在植物体内只有低水平的组成型表达, 植物在病原真菌入侵后 β -1,3-葡聚糖酶在细胞内积累增加^[6]。图 4 显示, β -1,3-葡聚糖酶基因在青花菜接种霜霉病菌 48 h 时表达最强, 未接种和接种后其他时期都呈低水平转录表达。这一结果表明, β -1,3-葡聚糖酶基因为霜霉病诱导表达基因。

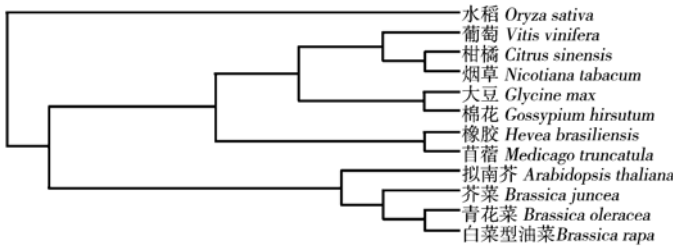


图 3 不同植物中 β -1,3-葡聚糖酶基因的聚类分析
 Fig. 3 Phylogenetic analysis of β -1,3-glucosidase gene in different plant

2.3 β -1,3-葡聚糖酶基因植物表达载体的构建

将质粒 pG-BObg 和 pBI121 载体用 *Bam*H I 和 *Sac* I 进行双酶切, 将 pG-BObg 质粒酶切得到的 β -1,3-葡聚糖酶基因全长片段与酶切 pBI121 载体得到的载体片段回收, 连接得到表达载体 pBI121-BObg。经 PCR 检测与 *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切验证 (图 5), β -1,3-葡聚糖酶基因目的片段确实插入到植物表达载体 pBI121 的 CaMV35S 启动子和 NOS 终止子之间。

3 讨论

在烟草、番茄、水稻、棉花等作物中已有 β -1,3-葡聚糖酶基因参与植物防卫反应的研究^[7-9]。这些与抗病有关的 β -1,3-葡聚糖酶基因都含有糖基水解酶家族 17 保守结构域。本研究克隆的青花菜 *BObg* 基因也含有糖基水解酶家族 17 保守结构域。根据这些结果可以推测, 糖基水解酶家族 17 保守结构域可能是 β -1,3-葡聚糖酶参与植物抗病的功能域。

许多研究表明, β -1,3-葡聚糖酶参与植物的多种正常的生理过程, 包括细胞分裂、小孢子发生、花粉萌发、受精、种子萌芽及植物生长调控等过程^[10-12], 而且是植物抵御真菌病害的主要物质之一^[4-5]。 β -1,3-葡聚糖酶基因能够被真菌、水杨酸、乙烯等诱导表达^[6]。 β -1,3-葡聚糖酶在抗真菌中的作用主要是通过水解真菌细胞壁的 β -1,3-葡聚糖, 使细胞破裂; 另外, 水解后的寡糖可以作为激发子, 激发其他防卫基因的表达。对我们克隆的青花菜 *BObg* 进行霜霉病诱导表达的结果表明, 没有接种霜霉病菌的青花菜为低水平组成型表达, 接种霜霉病菌后 48 h 时表达量最高, 其余时期表达较弱, 表明这个基因是受霜霉病诱导表达的基因, 它参与了青花菜霜霉病的防卫反应。

将外源 β -1,3-葡聚糖酶基因导入植物, 可提高植物对病原真菌的抗性。如: 通过直接转化方法将大豆 β -1,3-葡聚糖酶基因的植物表达载体 pBI121-glu 导入根癌农杆菌 (*A. tumefaciens*) LBA4404 受体菌中, 构建了用于植物遗传转化的工程菌株 LBA4404 (pBI121-glu), 并以烟草为转化对象进行了遗传转化, 获得了大量再生的转基因烟草。转基因植株苗期抗立枯病试验结果表明, 部分转化 β -1,3-葡聚糖酶基因的工程烟草对立枯丝核菌 (*Rhizoctonia solani*) 表现出不同程度的抗性^[13]; 利用农杆菌转化法, 将组成型表达 β -1,3-葡聚糖酶及几丁质酶基因的双价植物表达载体 pBLGC 转化优质甘蓝型油菜品种 H165, 并得到了抗卡那霉素的再生植株, 转基因植株的活体接种油菜菌核病菌 (*Sclerotinia sclerotiorum*) 试验表明, 部分转基因植株比对照显示出较强抗病性^[14]; 将几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶基因导入国产抗虫棉品种 GK19 中, 获得了兼抗病、虫的转基因优系^[15]。本研究以抗性青花菜品种 B-13 为材料, 成功克隆了受霜霉病上调表达的青花菜 β -1,3-葡聚糖酶基因, 并成功构建了青花菜 β -1,3-葡聚糖酶基因的植物表达载体, 为进一步通过转基因技术培育高抗霜霉病品种提供了可能。

参考文献:

[1] Collinge D B, Slusarenko A J. Plant gene expression in response to pathogens [J]. Plant Mol Biol, 1987, 9: 389-410

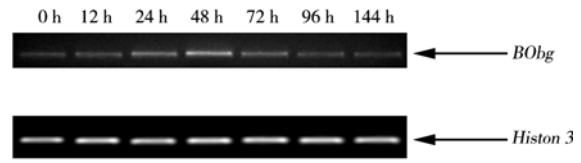


图 4 青花菜 β -1,3-葡聚糖酶基因 RT-PCR 分析
 Fig. 4 RT-PCR analysis of β -1, 3-glucanase gene from *Brassica oleracea* L.

Histon3 为植物组成性表达基因, 0~144 h 表示接种后的时间。*Histon3* is constituted expression gene of plant. 0-144 h indicate time post inoculation.

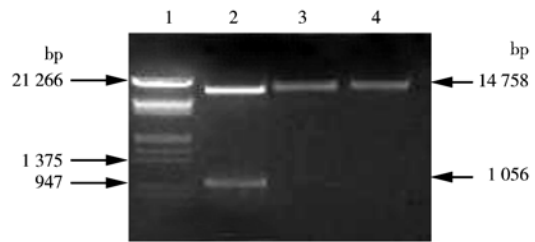


图 5 表达载体构建的酶切验证
 Fig. 5 The enzymes digesting identification of insert-integrated vector

1. DNA marker; 2. *Bam*H I 和 *Sac* I 双酶切验证 The dual digestion with both *Bam*H I and *Sac* I; 3. *Bam*H I 单酶切验证 The single digestion with *Bam*H I; 4. *Sac* I 单酶切验证 The single digestion with *Sac* I

- [2] Mauch F, Mauch-Mani B, Boller T. Antifungal hydrolases in pea tissue [J]. *Plant Physiol*, 1988, 88: 936-942
- [3] Münch-Garhoff S, Neuhaus J-M, Boller T, et al. Expression of β -1,3-glucanase and chitinase in healthy, stem-rust-affected and elicitor-treated near-isogenic wheat lines showing *Sr5*-or *Sr24*-specified race-specific rust resistance [J]. *Planta*, 1997, 201: 235-244
- [4] Zemanek A B, Ko T-S, Thimmapuram J, et al. Changes in β -1,3-glucanase mRNA in peach in response to treatment with pathogen culture filtrates, wounding, and other elicitors [J]. *J Plant Physiol*, 2002, 159: 877-889
- [5] 邢全华, 王斌. 植物葡聚糖酶抗病作用的研究进展 [J]. *遗传*, 2002, 24(6): 715-720
- [6] 王彦华, 侯喜林, 史公军. 白菜 β -1,3-葡聚糖酶基因 cDNA 的克隆及序列分析 [J]. *园艺学报*, 2004, 31(5): 670-672
- [7] Bucciaglia P A, Smith A G. Cloning and characterization of *Tag1*, a tobacco anther β -1,3-glucanase expressed during tetrad dissolution [J]. *Plant Mol Biol*, 1994, 24: 903-914
- [8] McFadden H G, Chapple R, de Feyter R, et al. Expression of pathogenesis-related genes in cotton stems in response to infection by *Verticillium dahliae* [J]. *Physiol Mol Plant Pathol*, 2001, 58: 119-131
- [9] 杜良成, 王钧. 稻瘟菌诱导的水稻几丁质酶、 β -1,3-葡聚糖酶活性及分布 [J]. *植物生理学报*, 1992, 18(1): 29-36
- [10] Morohashi Y, Matsushima H. Development of β -1,3-glucanase activity in germinated tomato seeds [J]. *J Exper Botany*, 2000, 51(349): 1381-1387
- [11] Buchner P, Rochat C, Wuillème S, et al. Characterization of a tissue-specific and developmentally regulated β -1,3-glucanase gene in pea (*Pisum sativum*) [J]. *Plant Mol Biol*, 2002, 49: 171-186
- [12] Akiyama T, Pillai M A, Sentoku N. Cloning, characterization and expression of *OsGLN2*, a rice endo-1,3- β -glucanase gene regulated developmentally in flowers and hormonally in germinating seeds [J]. *Planta*, 2004, 220: 129-139
- [13] 蓝海燕, 王长海, 张丽华, 等. 导入 β -1,3-葡聚糖酶及几丁质酶基因的转基因可育油菜及其抗菌核病的研究 [J]. *生物工程学报*, 2000, 16(2): 142-146
- [14] 迟彦. 大豆 β -1,3-葡聚糖酶基因转化烟草及抗病性的研究 [J]. *大连大学学报*, 2001, 22(6): 37-41
- [15] 程红梅, 简桂良, 倪万潮, 等. 转几丁质酶和 β -1,3-葡聚糖酶基因提高棉花对枯萎病和黄萎病的抗性 [J]. *中国农业科学*, 2005, 38(6): 1160-1166

责任编辑: 范雪梅