

RACE 方法获得番茄蓝光受体基因 *Phototropin-2* 全长及其过量表达载体的构建

喻堃, 牛向丽, 汪松虎 (四川大学生命科学学院生物资源与生态环境教育部重点实验室, 四川成都610064)

摘要 采用 RACE 及降落 PCR 技术从番茄幼苗总 RNA 中克隆出 PHOT-2 基因的 3' 及 5' 末端片段, 并根据测序结果, 设计拉基因全长引物获得了 PHOT-2 基因全长。结果表明, 该基因全长 3 381 bp, 含开放阅读框 2 856 bp, 编码 952 个氨基酸; 与拟南芥 PHOT-2 氨基酸序列相比, 同源性高达 68%, 主要功能区域同源性高达 99%。将番茄 PHOT-2 基因定向插入 pHB 质粒中构建成过量表达载体, 重组质粒转化农杆菌 EHA105 感受态细胞。

关键词 番茄; 蓝光受体; RACE PCR 技术; 降落 PCR 技术; 过量表达载体

中图分类号 Q943.2 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2006)22-5808-02

Acquiring Full Length cDNA of Tomato Phototropin-2 with RACE PCR Technology and Construction of its Overexpression Vector

YU Kun et al (College of Life Science, Key Laboratory of Biological Resource and Ecological Environment, Ministry of Education, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610064)

Abstract Utilizing RACE and touchdown PCR technology, both 3' and 5' cDNA ends of the blue light photoreceptor Phototropin-2 from tomato seedlings were acquired. According to their sequence the full length cDNA of PHOT-2 was cloned and sequenced. PHOT-2 cDNA fragment was 3 381 bp in length, including 2 856 bp of its ORF, encoding 952 amino acid. It shared 68% identity to *Arabidopsis thaliana* PHOT-2 in whole amino acid sequence and at the important action domain it almost shared 99% identity to *Arabidopsis thaliana*. Its overexpression vector was constructed by directionally inserting it into pHB plasmid and the recombinant plasmid was transformed into *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 cells.

Key words Tomato; Blue light photoreceptor; RACE PCR technology; Touchdown PCR technology; Overexpression vector

光受体基因是植物中一大类重要基因。植物通过光受体感受光线的波长、大小、强弱, 从而调节其生长发育^[1-2]。其中, 蓝光受体 *Phototropin-1*、*Phototropin-2* (PHOT-1、PHOT-2) 主要介导向光生长、叶绿体移动、叶片伸展、气孔开闭等生理应答。这些应答都是为了调节植物自身更有效的捕获光能、降低光伤害、获得 CO₂, 以促进光合作用^[3]。目前这 2 个基因几乎都是在拟南芥中取得。番茄作为重要农作物和模式生物, 其研究极少, 这可能与番茄中这 2 个基因全长未获得有关。该文通过快速获得基因末端法 (5' and 3' rapid amplification of cDNA ends, RACE) 获得 PHOT-2 3' 及 5' 末端片段, 通过测序, 设计拉基因全长引物, 得到基因全长, 通过软件分析其开放阅读框, 并构建过量表达载体 (Overexpression vector), 为深入研究基因功能奠定了基础。

1 材料与方

1.1 材料 BDs nartTM RACE cDNA amplification Kit 购于 Clontech 公司; 番茄种子 AC⁺、E. coli DH5 为该实验室保存。总 RNA 提取试剂购于天为时代公司; 凝胶回收试剂盒及质粒微量抽提试剂盒购于安徽 Ugene 公司; 多种抗生素、pMD18-T 载体连接试剂盒、PCR 用试剂、Taq 酶等均购于 Takara 公司。

1.2 方法

1.2.1 引物设计。根据 Genbank 数据库中登陆的番茄 *phototropin-2* 基因片段序列及 BDs nartTM RACE Kit 中 RACE 的引物设计原则设计引物。3' RACE 基因特异引物为 5' CCACG GCCTCATAAGAGACACAGTGC 3'; 3' RACE 基因特异巢式引物为: 5' CCTACTTCAGGCTGATGGGCATGTCG 3'; 5' RACE 基因特异引物为: 5' CGACATGCCATCAGCCTGAAGTAGG 3'; 5' RACE 基因特异巢式引物为 5' CTGAGAGGCGGTTTCTTAGTGGTTCC

3'; BDs nartTM RACE cDNA amplification Kit 提供通用引物: long primer 为 5' CTAATACGACTCACTATAGGGCAAGCA - GTGGTATC-AACGCAGAGT 3', short primer 为 5' CTAATACGACTC-AGTATAGGGC 3', nup primer 为 5' AAGCAGTGGTATCAACG-CA-GAGT 3'。

1.2.2 番茄总 RNA 的提取。取在 MS 培养基上生长 8~10 d 的 AC⁺ 无菌幼苗, 在液氮中碾磨成细粉, 参照天为时代公司总 RNA 提取试剂盒使用说明进行。

1.2.3 番茄 PHOT-2 基因 3' 及 5' 末端片段的获得。以番茄幼苗总 RNA 为模板, 采用 BDs nartTM RACE cDNA amplification Kit 中 3' 及 5' RACE 反转录的体系和方法进行 RT-PCR 扩增, 扩增参数: 42 90 min 共 1 个循环, 加 Tricine-EDTA 适量稀释, 72 7 min 后可作为 RACE PCR 反应模板。3' 及 5' RACE PCR 第 1 轮扩增采用降落 PCR 技术以提高扩增特异性, 扩增参数: 94 5 min; 94 30s, 72 3 min, 5 个循环; 94 30s, 70 30s, 72 3 min, 5 个循环; 94 30s, 68 30s, 72 3 min, 25 个循环。产物用 0.7% 琼脂糖电泳, 检查是否有特异带。以第 1 轮 PCR 产物 1 μl 为模板, 进行巢式扩增。巢式扩增参数: 94 5 min; 94 30s, 68 30s, 72 3 min, 20 个循环, 最后 72 延伸 10 min; 0.7% 琼脂糖电泳, 检查是否有特异带。

1.2.4 番茄 PHOT-2 基因 3' 及 5' 末端片段的克隆及测序分析。RACE PCR 巢式扩增反应产物 50 μl 经 1.0% 琼脂糖电泳后用凝胶回收试剂盒回收, 胶回收产物与 pMD18-T 载体连接, 转化 E. coli DH5 感受态细胞。涂相应抗性平板, 挑取单克隆摇菌, 提质粒做 PCR 鉴定, 每个测序片段分别挑选 3 个平行菌, 测序由英骏生物公司进行。

1.2.5 番茄 PHOT-2 基因全长的获得和测序及其开放阅读框分析。根据 5' 端和 3' 端片段的测序结果, 设计拉基因全长的引物 p2qc-fr 及用于验证的巢式引物 p2qcn-fr。上游引物为 p2qc-f: 5' GGTTCCTACTCTCTCCCTGTCAC 3', p2qcn-f: 5' TC-CCTGTCAC TTTTACAATAACAC 3'; 下游引物为 p1qc-r: 5' GAA-

作者简介 喻堃 (1982-), 女, 四川成都人, 硕士研究生, 研究方向: 生物化学与分子生物学。

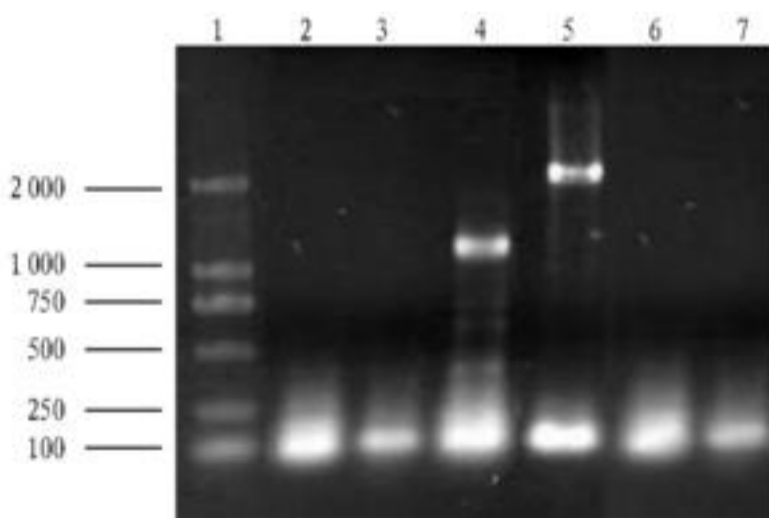
收稿日期 2006-08-12

GATTTTCCTATTACTCACACC 3', plqcr: 5' GGTCCAAACT-TAAACAAGAAGAAG 3'。以番茄总 RNA 反转录产物为模板, 进行 PCR 扩增。扩增参数: 94 5 min; 55 30s, 72 4 min, 35 个循环, 最后 72 10 min; 产物用 0.7% 琼脂糖电泳检测。取 1 μl 以上 PCR 反应产物为模板, 用巢式引物做第 2 轮 PCR 验证, 扩增参数同上, 产物用 0.7% 凝胶电泳检测。第 1 轮 PCR 产物凝胶回收, 回收产物与 pMD18-T 载体连接, 转化 *E. coli* DH5 感受态细胞, 涂相应抗性平板, 挑取单克隆摇菌, 提质粒做 PCR 鉴定, 挑选 3 个平行菌, 送英骏生物公司测序。测序结果用 DNAMAN 软件分析可能的开放阅读框。

1.2.6 番茄 PHOT-2 基因过量表达载体的构建及测序。 根据 PHOT-2 基因全长测序结果所分析出的开放阅读框, 设计两端带 Hnd 和 BamH 酶切位点的 PCR 引物, 上游引物为 leop2-f: 5' AAGCITGTGCTTTGAGGAGCAGAGATG 3'; 下游引物为 leop2-r: 5' GGATCCTTCATCAGAAAATTCGTCCCT 3'。以总 RNA 为模板进行 PCR 扩增, 扩增参数: 94 5 min; 55 30s, 72 3 min, 35 个循环, 最后 72 10 min。取第 1 轮 PCR 产物 1 μl 为模板, 进行巢式验证 PCR, 两轮产物均用 0.7% 琼脂糖电泳检验。胶回收第 1 轮 PCR 产物, 用 Hnd 和 BamH 双酶切, 然后与同样双酶切的 pHB 载体连接, 转化 *E. coli* DH5 感受态细胞, 涂相应抗性平板, 挑取单克隆摇菌, 提质粒做 PCR 鉴定, 挑选 3 个平行菌, 送英骏生物公司测序。最终确定的重组质粒转化农杆菌菌株 EHA105 感受态细胞, 通过 PCR 鉴定含重组质粒的阳性菌用于转染番茄。

2 结果与分析

2.1 番茄 PHOT-2 基因 3' 及 5' 末端片段的克隆 图 1 显示第 1 轮降落 PCR 扩增产物弥散, 没有成型条带, 而第 2 轮巢式扩增产物 3' 端有 1.0 kb 左右片段, 5' 端有 2.0 kb 左右片段; 分别做胶回收, 回收产物与 pMD18-T 载体连接, 得到含重组质粒的阳性菌, 分别命名为 p23n、p25n。



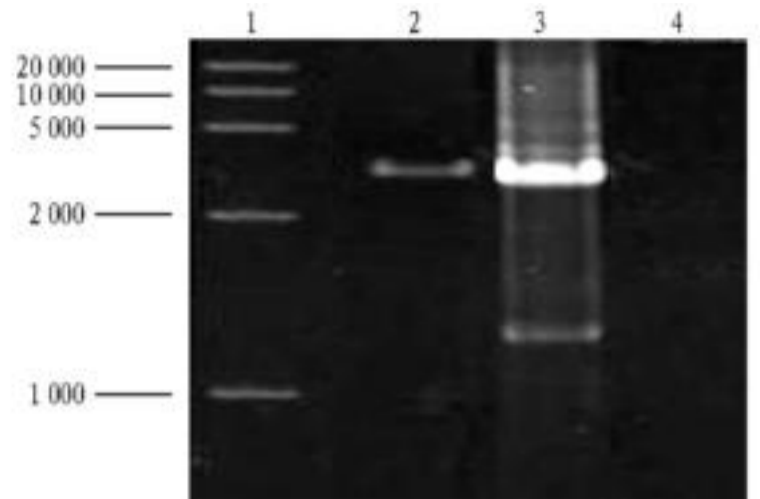
注: 1 为 DNA marker D2000; 2, 3 为 PHOT2 3', 5' RACE 第 1 轮 PCR 产物; 4, 5 为 PHOT2 3', 5' RACE 第 2 轮 PCR 产物; 6, 7 为阴性对照。

图 1 3', 5' RACE PCR 产物电泳图谱

2.2 番茄 PHOT-2 基因 3' 及 5' 末端片段的序列分析 根据 p23n、p25n M13-F/R 测序结果, 通过 sequencher 软件的分析, 选用 p23n 的 M13-F 测序所得序列和 p25n 的 M13-R 测序所得序列为模板, 设计了拉 PHOT-2 基因全长的引物。

2.3 番茄 PHOT-2 基因全长的克隆 RT-PCR 扩增产物电泳图谱显示了预期的约 3.4 kb 左右片段(图 2), 将该片段胶回收与 pMD18-T 载体连接, 得到含重组质粒的菌, 命名为 p2qc。

对测序结果做开放阅读框分析和氨基酸序列推导, 与 Genebank 上登录的拟南芥 PHOT-2 做氨基酸序列同源比对, 发现氨基酸序列的同源性高达 68%, 其中重要的功能区域 PAS、S TKC 等氨基酸序列同源性高达 99%(图 3)。结果表明, 该基因确实是番茄中的蓝光受体 PHOT-2(该基因已登陆 Genebank, 登陆号 DQ886531)。



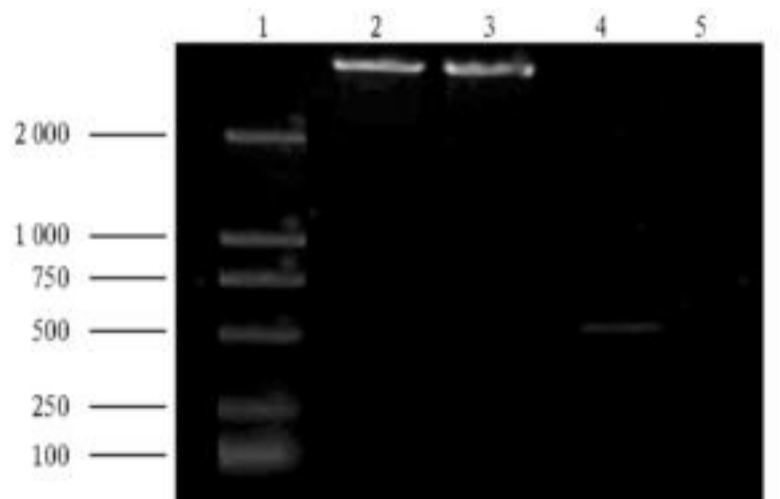
注: 1 为 DNA marker M; 2 为 RT-PCR 扩增产物; 3 为巢式验证扩增产物; 4 为阴性对照。

图 2 PHOT-2 全长 RT-PCR 扩增产物

AT	EREIISLLDHPPELPTLYASFQTSTHVCLITDFCPGGELFA	710
tomato	EREVEALLDHPLPTLYSSFQTETHVCLITDFCPGGELFA	710
AT	LLDRQPMRILTEDSARFYAAEVVIGLEYLHCLGIVYRDLK	750
tomato	LLDRQPMKIFKEESARFYAAEVIIGLEYLHCLGIVYRDLK	750
AT	SKSQPLPTFVAEPSTQSNFVGTTEEYIAPEIITGAGHTSA	830
tomato	SRSTPPPTFVAEPVQSNSFVGTTEEYIAPEIITGAGHSSA	830
AT	IDWWALGILLYEMLYGRTPFRGKNRQKTFANILHKDLTFP	870
tomato	IDWWALGILLYEMLYGRTPFRGKNRQKTFANILHKDLTFP	870

图 3 番茄与拟南芥 PHOT-2 基因 S TKC 功能区氨基酸序列同源比较

2.4 番茄 PHOT-2 基因过量表达载体的构建 以番茄总 RNA 为模板, 根据所设计的带有 Hnd 和 BamH 酶切位点的引物, 进行 PCR 扩增。扩增产物电泳显示了预期的 2.8 kb 左右片段, 该片段即为带有设计酶切位点的开放阅读框(图 4)。用巢式引物验证, 显示为大小正确片段, 测序结果正确。含该重组质粒的农杆菌可用于转染番茄。



注: 1 为 DNA marker D2000; 2 为 pMD18-T 载体(2.7 kb); 3 为番茄 PHOT-2 基因开放阅读框(ORF); 4 为巢式验证结果; 5 为阴性对照。

图 4 番茄 PHOT-2 开放阅读框电泳结果

3 讨论

目前国内外研究集中于信号传导通路各基因间的调控关系和基因本身的生理功能。在植物领域对光信号传导机制是研究的热点。近期研究发现, 蓝光受体基因 *Gyptochrones* 过量表达会对番茄次生代谢通路产生作用, 导致色

(上接第5809页)

素合成量的升高^[4]。这对于信号传导通路与其他生理通路的相互作用等基础研究有指导意义。植物蓝光受体基因主要分为两大类,一类是 *Gyptochrones*, 另一类是 *Phototropins*。在番茄中,相对于 *Gyptochrones* 的研究,尚未有人做过 *Phototropins* 相关研究。笔者推测其原因为该基因目前没有全长,而且该基因获得其全长相对困难一些。目前获得基因全长的方法主要是构建cDNA文库,但该方法有耗时长、盲目性大、对低拷贝基因获得全长效果差等缺点。该方法主要用于大规模测定模式生物(如水稻)的基因组序列。对于已在 Genbank 里登陆部分片断的基因,可以通过快速获得基因3'及5'末端法获得其全长。该法具有目的性强、耗时短、效率高等优点,已成为获得基因全长的主流方法。该文利用该方法获得了番茄PHOT2的全长。

植物基因功能研究的主要方法是将该基因敲除(Gene knockout)或沉默(Gene silencing)以降低该基因编码的蛋白质的含量;或者过量表达(Overexpression)该基因以在短时间内积累大量该基因表达的蛋白^[5]。转基因主要通过基因枪法、农杆菌介

导转染等方式。其中,最常用且对实验条件要求不高的方式是农杆菌介导转染法。该试验构建过量表达PHOT2基因的重质粒转化农杆菌EHA105,用以转染番茄AC⁺,并通过植物组织培养以期得到转基因植株,观察有无表型上的变化,以此来推测该基因的功能,为进一步研究番茄中该基因的生理功能及各光受体之间的相互作用奠定了基础。

参考文献

- [1] DIEFFENBACH G W, GABRIELAS D. PCR primer: a laboratory manual [M]. New York Cold Spring Harbor Laboratory press, 1995.
- [2] KEARA A F, VICTORIAS L, GARRY C W. The signal transducing photoreceptors of plants [J]. *Int J Dev Biol*, 49:653-664.
- [3] TAKEMIYA A, SHINCHROI, MICHOD. Phototropins promote plant growth in response to blue light in low light environments [J]. *The Plant Cell*, 2005, 17: 1120-1127.
- [4] GILIBERTO L, PERROTTA G, PALLARA P. Manipulation of the blue light photoreceptor cryptochrome 2 in tomato affects vegetative development, flowering time, and fruit antioxidant content [J]. *Plant Physiology*, 2005, 137(1): 199-208.
- [5] 纪宗玲, 刘继红, 陈苏民. 基因功能的研究方法 [J]. *生物工程学报*, 2002, 18(1): 117-120.