

# 核糖体失活蛋白(RIP)基因克隆及其表达载体的构建

孙亚卿, 邵金旺, 张少英\*, 张洪霞

(1. 内蒙古农业大学甜菜生理研究所, 内蒙古呼和浩特010018; 2. 中国科学院上海植物生理生态研究所, 上海200032)

**摘要** 以按玉米 RIP 基因(M83927)序列设计合成的特异性引物, 用提取的玉米基因组DNA为模板, 应用PCR技术扩增目的片段, 测定并克隆玉米的 RIP 基因。序列分析表明, 它们的核苷酸和氨基酸序列与 GenBank 中登录的 CRIP(M83927)的同源性分别为99.90%和100%。RIP 与植物表达载体pCAMBIA2301 相连构建成为带有35S 启动子和polyA 终止子的植物表达载体p2301-RIP。

**关键词** RIP 基因; DNA 序列分析; 克隆; 载体构建

中图分类号 Q786 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)16-04770-03

## Cloning and Construction of Expression Vector of RIP Gene

SUN Ya-qing et al (Sugar Beet Physiological Institute, Inner Mongolia Agricultural University, Hihht, Inner Mongolia 010018)

**Abstract** The full length of RIP gene was amplified and cloned from maize by PCR. The DNA contained 953 bp with an open reading frame(ORF) of 921bp and encoded 307 amino acid residues. The deduced nucleotide acid sequence and amino acid sequence showed 99.90% and 100% homology to CRIP(M83927) respectively. The RIP gene was stickly inserted into BamHI and PstI site of the vector pCAMBIA2301 that was suitable for Agrobacterium mediated DNA transformation. The new constructed plasmid p2301-RIP included GUS, nptII and RIP gene constructs.

**Key words** RIP gene; Sequence analysis; Cloning; Vector construction

核糖体失活蛋白(Ribosome Inactivating Proteins, RIPs)是一类在植物中较广泛存在的毒蛋白, 目前已从350多种植物中分离到110多种RIP。RIP的主要酶学性质是具有RNA N糖苷酶活力, 更确切地说是多聚核苷酸:腺苷糖苷酶活力, 可特异地修饰核糖体大亚基rRNA 3'端茎环结构的腺嘌呤残基而导致核糖体失活, 阻止多肽链的延伸, 从而抑制靶细胞中蛋白质合成。RIPs不影响自身28S rRNA, 但对亲缘关系较远生物的核糖体表现不同程度的损伤。一些RIPs具有抗肿瘤和抗病毒等医用价值, 另一些RIPs具有抗植物病毒和病原真菌、昆虫的农用价值。RIPs是一种多活性的物质, 不同RIP具有各自独特的功能, 其潜在活性还在不断发现之中。因此, RIPs研究在理论和应用开发上都具有十分重要的意义, 而分离RIP基因并构建基因表达载体, 利用基因工程技术, 使其在一些作物中高效表达, 筛选具有抗性的转基因植株, 成为植物病害防治的新途径。

已克隆并测序的来自玉米不同组织的RIP基因的核苷酸序列不尽相同, 有的甚至差异很大。笔者根据玉米RIP(M83927)基因序列设计合成引物, 采用PCR的方法从玉米中克隆RIP基因, 并将此基因与质粒pCAMBIA2301相连构建植物表达载体, 为进一步的研究工作打下基础。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料** 玉米(*Zea mays*)品种为自交系海丰4号, 由内蒙古莫力达瓦旗农技推广中心提供。DNA提取所用试剂、各种限制酶、连接酶及中间载体pMD18-T Vector等均购自大连宝(TaKaRa)生物工程公司, Taq DNA聚合酶为北京博大泰克生物基因技术上海分公司产品, DNA片段回收试剂盒购自上海申能博彩生物技术有限公司。载体质粒pCAMBIA1301、转化受体菌DH5等均由中科院上海植物生理生态研究所张洪霞组保存。质粒pCAMBIA2301特性为Kan<sup>R</sup>35SpA; pMD18-T Vector的特性为Amp<sup>R</sup>lacZ。

## 1.2 方 法

**1.2.1 玉米总DNA的提取。**玉米种子室内播种, 出苗后2星期, 去胚芽鞘, 用剪刀机械损伤, 黑暗饥饿5h, 取嫩叶用于DNA提取。采用改良CTAB法提取玉米叶总DNA: 在2ml离心管中加入500μl的2×CTAB和20μl-巯基乙醇, 65℃预热; 取约1g重的玉米嫩叶, 先后用蒸馏水和灭菌的重蒸水清洗干净后, 在液氮中研磨成粉末, 用干净的灭菌不锈钢勺转移粉末到预热的离心管中, 总体积达到1ml, 混匀后置65℃水浴中保温45min; 加等体积的氯仿:异戊醇(24:1), 轻缓颠倒混匀, 10000r/min离心10min, 移上清至另一新管中, 向管中加入1/100体积的RNase A溶液, 置37℃30min; 加入0.7倍体积的异丙醇, 出现絮状沉淀, -80℃放置10min, 12000r/min离心10min收集DNA沉淀; 用70%乙醇清洗沉淀2次, 吹干后溶于适量的TE(pH8.0)中, -20℃保存。提取后的总DNA在分光光度计上测浓度及纯度, 用1%琼脂糖凝胶检测抽提质量。

**1.2.2 PCR扩增。**根据Bass等报道的玉米RIP基因(GenBank accession number: M83927)序列<sup>[1]</sup>设计引物, 扩增RIP基因编码区序列, 总长约950bp。引物合成由北京奥科生物技术有限公司上海分公司完成, 序列如下:

Forward Primer: GATACAAAAGAGCTAGAAGGG;

Reverse Primer: ATGATGTGTCGATGATCAGG。

由于RIP基因的阅读框架内不含有内含子, 故可用该引物, 以玉米叶片组织总DNA为模板进行PCR扩增, 反应条件如下: 94℃预变性5min; 94℃变性50s; 55℃复性50s; 72℃延伸1min; 30个循环; 72℃延伸10min; 4℃结束反应。扩增产物在1.0%琼脂糖凝胶中电泳检测。

**1.2.3 目的片段的电泳回收。**按申能博彩3S Spin DNA Agarose Gel Purification Kit操作步骤进行。

**1.2.4 基因序列分析。**因为在以后的连接中需要BamHI和PstI酶切位点, 故利用pMD18-T Vector的多克隆位点引入这2个酶切位点。PCR扩增所得到的目的DNA片段经回收后, 与中间载体pMD18-T Vector连接, 16℃反应30min, 连接产物转化到大肠杆菌DH5, 在含有X-Gal IPTG、Amp的L-琼脂平

基金项目 国家自然科学基金项目(30440048)和内蒙古自然科学基金项目(200408020303)。

作者简介 孙亚卿(1978-), 女, 内蒙古四子王旗人, 博士研究生, 研究方向: 植物生理生化和分子生物学应用技术。\* 通讯作者。

收稿日期 2007-03-07

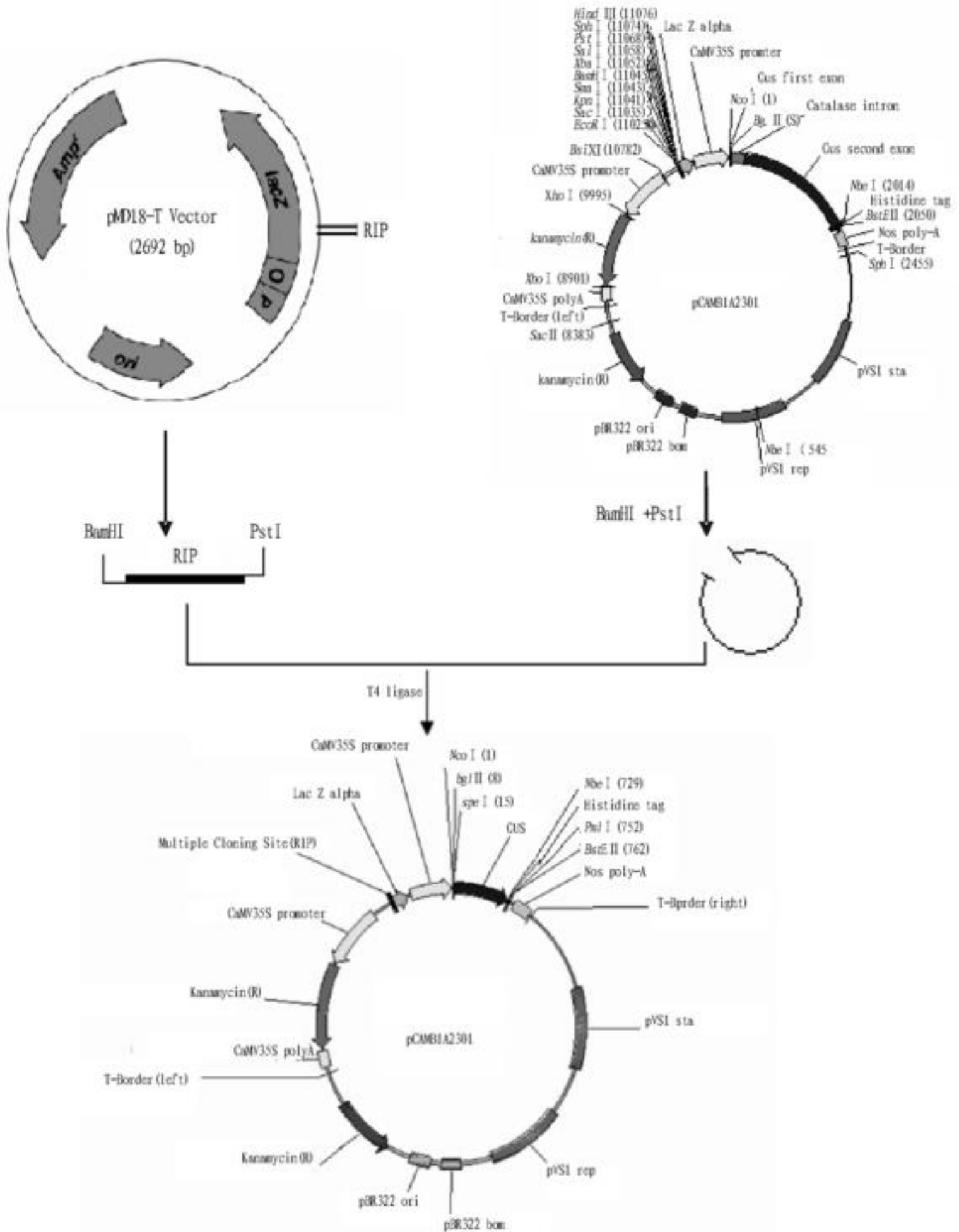
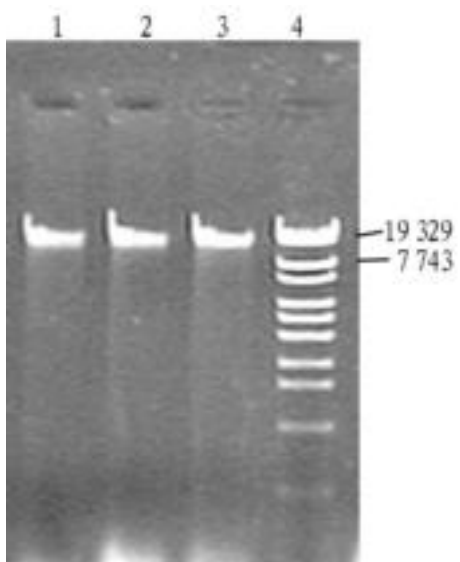


图1 p2301-RIP 植物表达载体构建



注:1~3, total DNA; 4, DNA 分子量标记。

图2 玉米总 DNA 琼脂糖凝胶电泳

板培养基上过夜培养形成单菌落。挑取蓝色菌斑,筛选阳性克隆,对重组质粒进行PCR反应,以确认T载体中插入片段的长度大小。酶切初步鉴定正确后,对克隆后的PCR产物用M3 Primers进行序列分析。基因序列由北京奥科生物技术有限公司上海分公司测定,用DNAMAN软件对测序结果进行分析。

1.2.5 植物表达载体构建。

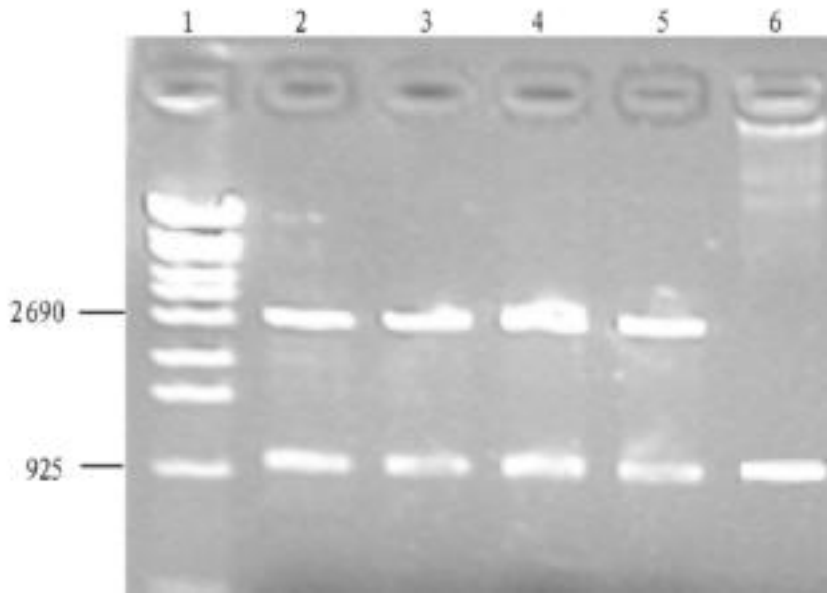
用限制性内切酶 BamHI + PstI 对质粒pCambia2301 和T-RIP质粒进行双酶切,酶切产物分别进行凝胶电泳后回收,将回收产物(即带有 BamHI 和 PstI 酶切位点的 RIP 基因片段和质粒pCambia2301)用T4连接酶连接,16 过夜,得到表达载体p2301-RIP(图1)。

2 结果与分析

2.1 玉米总DNA提取 乙醇沉淀的玉米总DNA经75%乙醇清洗,自然干燥后溶于适量TE中,经紫外分光光度计定量,并进行琼脂糖凝胶电泳,结果见图2。

2.2 基因的克隆 以玉米基因组DNA为模板进行PCR反应,扩增出长度为953 bp的DNA片段,凝胶电泳回收DNA,与中间载体pMD18-T Vector连接,转化大肠杆菌DH5,挑取蓝斑阳性克隆,提取质粒后进行 BamHI + PstI 双酶切鉴定。由图3可以看出,T载体上所插入的片段大小与PCR产物相

同,表明PCR 目的片段已克隆到T 载体上,连有RIP 基因的中间载体暂命名为T RIP 质粒。



注:1,DNA 分子量标记;2~5,T RIP, BamHI + PstI ;6,PCR 扩增片段。

图3 T RIP 质粒PCR 和酶切检测

```

1  GATACAAAAGAGCTAGAAGGGAGATGGCCGAGACAAATCCAGAGTTGAGTGATCTTATGG
1  GATACAAAAGAGCTAGAAGGGAGATGGCCGAGACAAATCCAGAGTTGAGTGATCTTATGG
61  CGCAAAACAAAACAAAATAGTACCAAAGTTCACCTGAAATCTTCCCGTGGAGGACGTGA
61  CGCAAAACAAAACAAAATAGTACCAAAGTTCACCTGAAATCTTCCCGTGGAGGACGTGA
121  ACTACCCCTTACAGCGCCTTCATCGCGTCCGGAAGACGTGATCAAAACACTGCACCG
121  ACTACCCCTTACAGCGCCTTCATCGCGTCCGGAAGACGTGATCAAAACACTGCACCG
181  ACCATAAAGGATCTTCCAGCCCGTGTGCCACCGAGAAGAAGTACCGAGCTGTGGT
181  ACCATAAAGGATCTTCCAGCCCGTGTGCCACCGAGAAGAAGTACCGAGCTGTGGT
241  TCTACACGGAGCTCAAACTAGGACCAGCTCCATCACGCTGCCATACCGATGGACAACC
241  TCTACACGGAGCTCAAACTAGGACCAGCTCCATCACGCTGCCATACCGATGGACAACC
301  TGTACCTCGTGGGCTTCAGGACCCCGGGCGGGTGTGGTGGGAGTTCCGCAAGGCCGGCG
301  TGTACCTCGTGGGCTTCAGGACCCCGGGCGGGTGTGGTGGGAGTTCCGCAAGGCCGGCG
361  ACACCCACCTCCTCGGCGACAACCCAGGTGGCTCGGCTTCGGCGGACAGTACCAGGACC
361  ACACCCACCTCCTCGGCGACAACCCAGGTGGCTCGGCTTCGGCGGACAGTACCAGGACC
421  TCATCGGCAACAAGGCTCTGGAGACCGTCACCATGGCCCGCGCCAGATGACCAGGGCCG
421  TCATCGGCAACAAGGCTCTGGAGACCGTCACCATGGCCCGCGCCAGATGACCAGGGCCG
481  TCAACGACCTGGCGAAGAAGAAGAAGTGGCGACACTGGAGGAGGAGGTGCAGATGC
481  TCAACGACCTGGCGAAGAAGAAGAAGTGGCGACACTGGAGGAGGAGGTGCAGATGC
541  AGATGCAGATGCCGAGGCCGCTGAACTGGCGCGCGCGCGCGCGGCTGACCCACAGG
541  AGATGCAGATGCCGAGGCCGCTGAACTGGCGCGCGCGCGCGCGGCTGACCCACAGG
601  CCGACACGAAGAGCAAGCTGGTGAAGCTGGTGCATGGTGTGCGAGGGGCTGCGGCTCA
601  CCGACACGAAGAGCAAGCTGGTGAAGCTGGTGCATGGTGTGCGAGGGGCTGCGGCTCA
661  ACACCGTGTCCCGACCGTGGACGCGGGTTCAACAGCCAGCACGGGTGACCTTGACCG
661  ACACCGTGTCCCGACCGTGGACGCGGGTTCAACAGCCAGCACGGGTGACCTTGACCG
721  TGACCGAGGGAAGCAGGTGCAGAAGTGGACAGGATCTCGAAGGCGGCTTCGAGTGGG
721  TGACCGAGGGAAGCAGGTGCAGAAGTGGACAGGATCTCGAAGGCGGCTTCGAGTGGG
781  CCGACACCCACCGCTGTGATCCCGACATGCAGAAGCTTGGCATCAAGGATAAGAACG
781  CCGACACCCACCGCTGTGATCCCGACATGCAGAAGCTTGGCATCAAGGATAAGAACG
841  AAGCAGCGAGGATCGTTGCGCTCGTTAAGAATCAAACACTGCGCGTGCCTGCGCGTA
841  AAGCAGCGAGGATCGTTGCGCTCGTTAAGAATCAAACACTGCGCGTGCCTGCGCGTA
901  CTGCTGCCAGTGTGACAACGACGATGACGAGGCTGATCATCGACACATCAT
901  CTGCTGCCAGTGTGACAACGACGATGACGAGGCTGATCATCGACACATCAT
    
```

注:划线部分为引物,带阴影部分为起始密码子和终止密码子。

图4 玉米叶 RIP 基因核苷酸序列的同源性分析

2.3 序列分析 T RIP 质粒由北京奥科生物技术有限公司上海分公司测序,所测序列在 GenBank 中采用BLAST 程序进行序列同源性分析,结果表明,该序列与 GenBank 的玉米 RIP 基因编码区的核苷酸序列第657 个核苷酸处有1 处差异(图

4),其同源性为99.90%,而其编码的氨基酸序列,其同源性为100%(图5)。

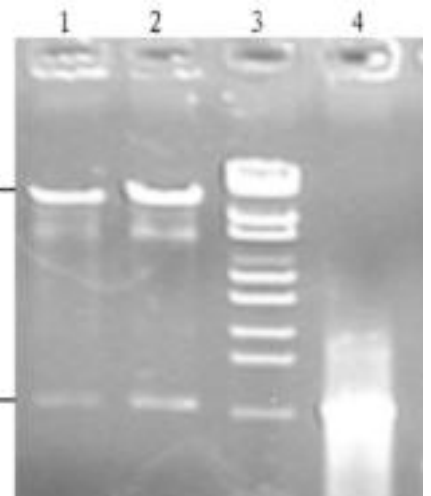
```

1  DTKELEGRWPRQIQSVILWRKQTKKYQSSLKSSPWRTTTLTAPSSRRSGKTSNTAPTIKG
1  DTKELEGRWPRQIQSVILWRKQTKKYQSSLKSSPWRTTTLTAPSSRRSGKTSNTAPTIKG
61  SSSPCCHRRRRYPSCGSTRSSKLGAPSRSPYAWTCTSWASGPRAGCGGSSARPATPTS
61  SSSPCCHRRRRYPSCGSTRSSKLGAPSRSPYAWTCTSWASGPRAGCGGSSARPATPTS
121  SATTPGGSASAAGTRTSSATRVWRPSPAAPRPGPSTTWRRRRRWRHWRRRRCRCRCRCR
121  SATTPGGSASAAGTRTSSATRVWRPSPAAPRPGPSTTWRRRRRWRHWRRRRCRCRCRCR
181  RPLNWRRRRRRLTHRPTRRASWSWSWCARGCGSTPCPARWTRGASTGPPRRGSRCRS
181  RPLNWRRRRRRLTHRPTRRASWSWSWCARGCGSTPCPARWTRGASTGPPRRGSRCRS
241  GTCRRRRPSSGPTTTPPLSPTCRSLASRI RTKQRGSLRSLR IKLLPLPLPLLLPVLTTTMT
241  GTCRRRRPSSGPTTTPPLSPTCRSLASRI RTKQRGSLRSLR IKLLPLPLPLLLPVLTTTMT
301  RPDHRHI
301  RPDHRHI
    
```

图5 玉米叶 RIP 基因氨基酸序列的同源性分析

2.4 RIP 基因植物表达

载体的鉴定 以引物1、2 对质粒 p2301-RIP 进行 PCR 反应,用限制性内切酶 BamHI 和PstI 对该质粒进行双酶切,酶切后得到的片段分子量约为953 bp。该载体的酶切结果和PCR 结果都和理论计算的一致,说明构建的是正确表达载体。



注:1~2,p2301-RIP, BamHI + PstI ; 3,DNA 分子量标记; 4,PCR 扩增片段。

图6 p2301-RIP 质粒PCR 和酶切检测

3 讨论

尽管玉米 RIP 基因

序列已有报道,但由于 RIP 基因的多样性,形成了即使在同种植物同种组织器官中,RIP 经常以不同的亚型存在,故各自的序列不尽相同,虽有一定同源性,但其活性、含量、表达特性及所需辅助因子有所不同,因此想直接快速获得该基因有一定难度。笔者以玉米叶为材料,用传统的方法提取基因组DNA 作为模板,使用Taq DNA 聚合酶进行PCR,获得了特异的扩增片段,对PCR 产物直接进行序列分析,测定了玉米的RIP 基因全序列,对多个阳性克隆的序列分析也获得一致的结果,没有发生碱基突变。

将所测定的玉米 RIP 基因序列与玉米 CRIP 基因(源于叶片组织DNA) 序列<sup>[1]</sup> 进行比较,可以看出稍有不同。虽然2 者有1 个碱基的差异(G-T),但由于GGC 和GGT 同为编码Gy 的同义密码子,所以2 个序列的氨基酸同源性可达到100%。笔者在同样条件下使用具有纠错功能的KOD 高保真DNA 聚合酶克隆该基因,也获得了一致的结果,故推测这种差异主要是由于玉米品种间的差异造成的。因为产生差异的核苷酸并不影响其所编码氨基酸,对基因功能的发挥没有影响,所以该基因的克隆是成功的。

以转基因技术改造植物抗病性的早期研究一般侧重于导入抗病功能基因,这些抗病功能基因的导入在一定程度上可以改善植物对病害的耐受性。已有多种 RIP 被用于植物基因工程的研究,其中玉米RIPb-32、MOD1 分别被成功转化 (下转第4803 页)

(上接第4772页)

到烟草和水稻中,抗性分析表明对土传病原真菌立枯丝核菌有统计学上的显著意义。该研究构建了适于农杆菌介导转化的质粒 p2301-RIP。该质粒含玉米核糖体失活蛋白基因 RIP、GUS 报告基因和 nptII 抗卡那霉素筛选基因。所构建的玉米 RIP 植物表达载体,正在进行相关的转基因植物的研究,进一步的结果将另文发表。

#### 参考文献

- [1] BASS H W, WEBSTER C, O'BRIEN G R, et al. A maize ribosome inactivating protein is controlled by the transcriptional activator Opaque-2 [J]. *Plant Cell*, 1992, 4(2): 225 - 234.
- [2] 王玲, 宋运淳, 宁顺斌, 等. 玉米 (*Zea mays* L.) 两个广谱抗病基因 rip 和 pal1 的原位杂交定位 [J]. *作物学报*, 1999, 25(5): 639 - 644.

- [3] PATRICK F D, WEI N Z, JEFFERY W G, et al. Enhanced resistance to helicoverpa zea in tobacco expressing an activated form of Maize ribosome inactivating protein [J]. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 51: 3568 - 3574.
- [4] KRISTEN N, GANY A P, REBACCA S B. Maize ribosome inactivating protein inhibits normal development of *Aspergillus nidulans* and *Aspergillus flavus* [J]. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 2001, 14(2): 164 - 172.
- [5] SCOTT C S, KSENJA G, BRUNO C, et al. Enhanced resistance to early blight in transgenic tomato lines expressing heterologous plant defense genes [J]. *Plant*, 2005, 10: 5 - 13.
- [6] DESMETER S, VANDENBUSSCHE F, HAO Q, et al. Type-1 ribosome inactivating protein from inis bulbs: a useful agronomic tool to engineer virus resistance [J]. *Plant Mol Biol*, 2003, 51: 567 - 576.
- [7] TIMOTHY D H, MARIIN H, TERENCE A W. Maize ribosome inactivating protein (b-32): homologs in related species effects on maize ribosomes, and modulations of activity by pro-peptide deletions [J]. *Plant Physiology*, 1995, 107: 1323 - 1332.