

大豆 11S 球蛋白 Gy5 (A3B4)cDNA 的克隆及植物表达载体的构建*

王丕武 刘灵芝 柴晓杰 张 君 曲同宝

(吉林农业大学生物中心, 长春 130118)

摘要 从大豆(花生豆 1 号)未成熟种子中提取总 RNA, 逆转录形成 cDNA 第一条链。根据 genebank 中大豆 11S 球蛋白 Gy5 的 cDNA 序列设计引物, 用 PCR 方法扩增 Gy5 的 cDNA 序列, 克隆到 pUC19 质粒载体上, 并测定其全序列。用限制性内切酶 PstI 和 EcoRI 酶切重组质粒, 将目的片段与质粒 pCAMBIA1301 连接, 构建成植物表达载体并转化到农杆菌中, 以便于以后的研究利用。

关键词 大豆; Gy5; cDNA; 克隆; 植物表达载体

中图分类号 S 565.1 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2004)03-0159-05

近年来, 随着人民生活水平的提高以及对外贸易的开拓, 作物营养品质研究日益引起人们的关注。利用基因工程技术改良作物营养品质的研究始于 20 世纪 90 年代, 虽起步较晚, 但通过 10 年的发展, 已取得了一些可喜的成就^[1]。目前利用植物工程技术进行的品质改良主要集中在改良种子蛋白质、淀粉、油脂等的含量和质量。

大豆种子贮存蛋白是人类植物蛋白的主要来源之一。大豆种子富含蛋白质, 其中大豆球蛋白约占大豆种子蛋白的 70%, 是重要的蛋白质源^[2]。利用基因工程技术扩增和改造大豆蛋白质基因, 并转化到其它作物中, 在改良作物品质方面具有重要的应用价值。美国国际植物研究所的科学家们从大豆获取蛋白质合成基因, 成功地导入到马铃薯中, 培育出高蛋白马铃薯品种, 其蛋白质含量接近大豆, 大大提高了营养价值。日本学者 Hirano 等从大豆种子中克隆了碱性 7S 球蛋白基因, 构建了含该目的基因的植物表达载体和工程农杆菌, 并对烟草进行遗传转化, 得到了转基因烟草^[3]。楼程富等在构建含大豆蛋白 A1aB1b 亚基基因的植物表达载体和工程农杆菌的基础上, 以桑叶为材料, 利用农杆菌介导法进行遗传转化并获得了转基因植株。

和很多植物蛋白一样, 大豆种子球蛋白也是由

多基因家族编码的。至今为止, 大豆球蛋白基因家族已发现七个成员, 即 Gy1—Gy7^[4,5]。Chikafusa Fukazawa 等建立了大豆 cDNA 文库, 并从中筛选分离出大豆球蛋白 Gy5(A3B4)的 cDNA 序列^[6]。本研究用 RT-PCR 方法快速扩增和克隆了 Gy5 的 cDNA 序列, 并构建了植物表达载体, 以便于以后的转化利用研究。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料

大豆材料为“花生豆 1 号”, 为本中心将花生总 DNA 导入大豆后选育的高蛋白变异体。

1.1.2 菌株与质粒

大肠杆菌菌株 DH5a、根癌农杆菌菌株 LBA4404 均为本实验室保存; pUC19 质粒载体购自 TaKaRa, pCAMBIA1301 质粒载体由东北师范大学王兴智老师馈赠。

1.1.3 试剂与酶

逆转录酶、RNA 酶、T4DNA 连接酶、限制性内切酶 (PstI、EcoRI)、溶菌酶均购自 TaKaRa 和 Promega 公司, DNA 片断回收试剂盒购自上海生物

* 收稿日期: 2003-11-03

基金项目: “国家转基因植物中试与产业化基地(吉林)”专项课题(J99-B-001)

作者简介: 王丕武(1958-), 男, 教授, 主要从事大豆遗传育种研究。

有限公司, 异硫氰酸胍、DEPC 等其它试剂均为国产分析纯产品。

1.2 方法

1.2.1 RNA 的提取

取授粉后 30 天的大豆未成熟种子 2g 于研钵中, 加入液氮, 迅速研磨成粉末, 立即转入提取液中 (8ml 4mol/l 的异硫氰酸胍, 0.6ml 2mol/l 的 NaAc (pH4.8)), 6ml 水饱和酚, 1.2ml 氯仿, 1g PVP), 冰浴 30min, 离心; 取上清, 加入 0.7 体积 3mol/l KAc (pH4.8), 冰浴 30min, 离心; 取上清, 加入 2 倍体积无水乙醇, -20°C 放置 1 小时, 离心; 去上清, 加入 2ml 4mol/l LiCl 溶解, 冰浴 2h, 离心; 弃上清, 在沉淀中加入 1ml DEPC 处理水, 充分溶解后, 再加等体积氯仿抽提; 取上清, 加入 0.1 体积 3mol/l NaAc (pH5.0) 和 2 倍体积无水乙醇, -20°C 放置 30min, 离心; 去上清, 沉淀用 70% 乙醇洗涤 2 次, 室温干燥, 加入 100ul DEPC 处理水溶解, -80°C 保存。

1.2.2 cDNA 第一链的合成

以总 RNA 为模板, 以 oligo(dT)18 为引物, 按大连宝生物公司 cDNA 合成试剂盒说明合成 cDNA 第一链, -20°C 保存。

1.2.3 PCR 扩增反应

应用 DNASTAR 生物软件, 根据 genbank 中注册号为 AB000168 的大豆 11S 球蛋白 Gy5(A3B4)cDNA 序列中包括阅读框架 (47-1600bp) 在内的 7 至 1710 碱基两端的序列设计引物;

上游引物: 5' - gccaattc CCAACTC-CTTCAAACCTT-3'

下游引物: 5' - gatctgcag TCGGAGGGTG-GTAAAT-3'

在 25ul 体系中加入逆转录产物、缓冲液、引物、dNTP, 94°C 预变性 5min, 冰浴冷却, 加入 Taq 酶, 在下列条件下进行 PCR 扩增反应:

94°C 、30s, 50°C 、30s, 72°C 、90s, 30 个循环; 72°C 、10min。

1.2.4 PCR 产物的克隆和鉴定

将 PCR 产物和 pUC19 质粒载体同时用内切酶 PstI 和 EcoRI 酶切, 经 1% 的琼脂糖凝胶电泳和 DNA 片段回收试剂盒回收, 以 3:1 的比例混合, 在 T4DNA 连接酶的作用下, 16°C 反应 12h。

按 Maniatis 的方法制备大肠杆菌 DH5a 感受态细胞, 将连接产物用热激法转化到感受态细胞中, 将

菌液涂在含 Ampr, X-gal, IPTG 的 LB 培养基上, 37°C 倒置培养过夜。挑取白斑, 用碱裂解法提取质粒, 用限制性内切酶 PstI/EcoRI, 酶切鉴定和 PCR 检测。

1.2.5 序列分析

序列测定由大连宝生物公司完成, 核酸序列分析用 DNASTAR 软件。

1.2.6 植物表达载体的构建

用碱裂解法提取 pCAMBIA1301 质粒和含有目的基因的 pUC19 质粒, 同时用 PstI 和 EcoRI 酶切, 经 0.6% 琼脂糖凝胶电泳后, 用 DNA 片段回收试剂盒回收目的片段, 用 T4DNA 连接酶连接后冻融法转化到农杆菌 LBA4404 感受态细胞中, 将菌液涂在含有 Rif 和 Kan 的 YEB 培养基上, 28°C 培养 2 天, 挑取单菌落提取质粒进行酶切和 PCR 检测。

2 结果

2.1 RNA 的提取

由于开花后 30 天的大豆未成熟种子中含有大量的蛋白质、糖类和其它次生代谢产物, 因此最初用常规的异硫氰酸胍法提取的 RNA 为胶状粘稠物质, 不易溶解, 本研究经过改进: 通过加入 PVP 处理酚类等杂质, 并防止 RNA 降解; 通过加入 KAc 沉淀多糖; 通过用酚、氯仿重复抽提除尽蛋白质, 得到了高纯度的 RNA 样品。经紫外分光光度仪测定, $\text{OD}_{260/280} = 1.98$, $\text{OD}_{260/230} = 2.30$, RNA 含量为 0.04mg/g。经甲醛-琼脂糖凝胶电泳检测, 可以看到 28S 和 18S 两条清晰的带 (如图 1), 说明 RNA 纯度高, 没有降解。LiCl 只能沉淀大分子 RNA, 不能沉淀 5S 小分子 RNA, 所以电泳时只能看到 28S 和 18S 两条带, Gy5 的 mRNA 为大分子 RNA, 因此用这种方法提取的 RNA 符合实验要求。

2.2 PCR 扩增反应

以逆转录产物 cDNA 第一条链为模板, 用人工合成的引物扩增出一条约 1700bp 的带, 扩增带专一, 大小与预期的一致, 结果如图 2 所示。

2.3 目的基因的克隆与鉴定

目的基因与载体连接后得到重组质粒 pUC19/Gy5, 将其转化到大肠杆菌 DH5a 中, 用 Ampr, X-gal, IPTG 筛选出 24 个白斑和 10 个蓝斑。经酶切和 PCR 检测, 得到阳性克隆菌株, 结果如图 3 所示。



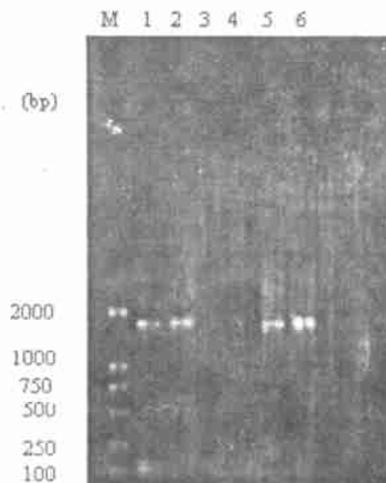
1. 3ul; 2. 2ul; 3. 1ul

图 1 大豆总 RNA 琼脂糖凝胶电泳

1;3ul 加样量; 2;2ul 加样量; 3;1ul 加样量

Fig. 1 Total RNA electrophoresis of soybean

1;3ul added; 2;2ul added; 3;1ul added



1-6 PCR 产物

图 2 PCR 产物琼脂糖凝胶电泳

M; Mark; 1-6; PCR 结果

Fig. 2 The result of PCR electrophoresis

M; Mark; 1-6; PCR results

2.4 序列分析

测序结果如下:

```

1  GCCGAATTCC CAACTCCTTC AAACCTT ATTA ACACTTTCCT TAGTTC AATA TGGGGAAGCC
      PRIMER
61  CTTCTTCACT CTCTCTCTTT CT'CCCTTTG CTTGCTACTC TTGTCGAGTG CATGCTTTGC
121 AT'TACCTCC AGCAAGTTCA ACGAGTGCCA ACTCAACAAC CTCAACGGGT TGAACCCGA
181 CCACCGCGTT GAGTCCGAAG GTGGTCTTAT TGAAACATGG AACTCTCAAC ACCCTGAGCT
241 GCAATGCGCC GGTGTCACTG TTTCCAAAAG CACCCTCAAC CGCAACGGC C T CCACTTGCC
      T C
301 ATCTTACTCA CCTTATCCCC AAATGATCAT TGTGGTTCAA GGGAAGGGAG CAATTGGATT
361 ATCATT'TCCG GGATGTCCCTG AGAGGTTTGA GAAGCCACAA CA G CAATCAA GCAGAAGAGG
      A
421 CTCAAGGTGG CAGCAGCAAC TACAAGACAG TCACCAGAAG ATTCG'TCACT TCAATGAAGG
481 AGACGTACTA GTGATTCCCTC C TGGTGT'TCC T'ACTGGACC TATAACTG GCGATGAACC
      T
541 AGTTGTTGCC ATCAGTCTTC TTGACACCTC CAACTTCAAC AATCAGCTTG ATCAAAACCC
601 CAGAGTATTT TACCTTGCTG GGAACCCAGA TATAGAGCAC CCAGAGACCA TGCAACAACA
661 GCAGCAGCAG AAGAGTCATG GTGGACGCAA GCAGGGGCAA CACCAGCAGC AGGAGGAAGA
721 AGGTGGCAGT GTGCTCAGTG GCTTCAGCAA ACATTTCTTA GCACAATCCT TCAACACCAA
781 CGAGGACACA GCTGAGAAAC TTCGGTCTCC AGATGACGAA AGGAAGCAGA TCGTGACAGT
841 GGAGGGAGGC CTCAGCGTTA TCAGCCCCAA GTGGCAAGAA CAAGAAGACG AAGA C GAAGA
      T
901 T GAAGACGAA GAATATGAAC AAACCTCCCTC TTATCCTCCA CGACGACCAA GCCATGGAAA
      C
961 GCATGAAGAT GACCAGGACG AGGACGAAGA AGAAGATCAA CCTCGTCCCTG ATCACCCCTCC
1021 ACAGCGACCA AGCAGGCCCG AACACAAGA ACCACGTGGA AGAGGATGTC AGACTAGAAA
1081 TGGGGTTGAG GAAAATATTT GCACCATGAA GCTTCACGAG AACATTGCTC GCCCTTCAGC

```

1141 TGCTGACTTC TACAACCCAA AAGCTGGTGG CATTAGCACC CTCAACAGTC TCACCCTCCC
 1201 AGCCCTCCGC CAATTCGGAC TCAGTGCCCA ATATGTTGTC CTCTACAGGA ATGGAATTTA
 1261 CTCTCCACAT TGGAACTTGA ACGCGAACAG TGTGATCTAT GTGACTCGAG GGAAAGGAAG
 1321 AGTTAGAGTG GTGAACTGCC AAGGGAATGC AGTGTTGAC GGTGAGCTAA GGAGGGGACA
 1381 ATTGCTAGTG GTGCCGAGA ACTTTGTGGT GGCTGAGCAA GGGGAGAAC AAGGATTGGA
 1441 ATACGTAGTG TTCAAGACAC ACCACAACGC CGTGAGCAGC TACATTAAGG ATGTGTTTAT
 1501 GGCAATCCCT TCGGAGGTTT TTTCCAATTC TTACAACCTT GGCCAGAGTC AAGTGCGTCA
 1561 GCTCAAGTAT CAAGGAAACT CCGGCCCTTT GGTCAACCCA TAAATAACAA CAAGCATATA
 1621 TGAAGGTGTG GTGAGGCCAT CTATATGAA ATAATATTA AATATATTTT GTGTAATAAT
 1681 AAAACTATGG CCTATGT ATT TACCACCCTC CGACTGCAGA TC

PRIMER

与 genebank 中原序列比较, 只有 6 个碱基的差异, 同源性达 99.6%, 经氨基酸编码分析, 有 3 个碱基为兼并子, 其它 3 个碱基导致两个氨基酸有差异, 氨基酸序列的同源性为 99.6%。

目的基因与 pCAMBIA1301 表达载体连接后得到植物表达载体 pCAM BIA1301/Gy5, 将其转化到农杆菌中, 经 Kan 和 Rif 筛选出 14 个阳性株, 经酶切和 PCR 检测, 结果如图 4 所示。

2.5 植物表达载体的构建

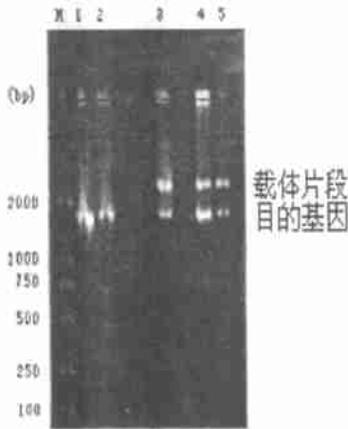


图 3 pUC19/Gy5 的酶切和 PCR 检测
 1—2: 重组质粒 pUC19/Gy5 的 PCR 检测
 3—5: 重组质粒 pUC19/Gy5 经 PstI/EcoRI 酶切
 Fig. 3 Restriction digestion and PCR analysis of recombinant plasmid pUC19/Gy5
 1—2: PCR results of pUC19/Gy5
 3—5: Restriction digestion results of pUC19/Gy5

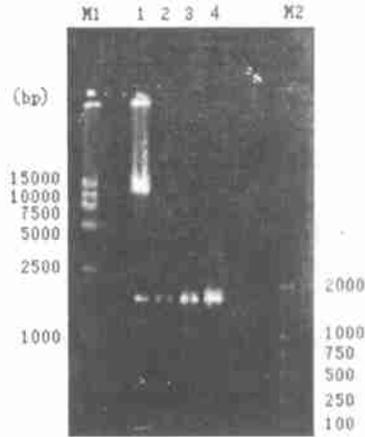


图 4 植物表达载体 pCAMBIA1301/Gy5 的酶切和 PCR 检测
 1: 植物表达载体 pCAMBIA1301/Gy5 经 PstI/EcoRI 酶切
 2—4: 植物表达载体 pCAMBIA1301/Gy5 的 PCR 检测
 Fig. 4 Restriction digestion and PCR analysis of plant expression vector of pCAMBIA1301/Gy5
 1: Restriction digestion result of pCAMBIA1301/Gy5
 2—4: PCR results of pCAMBIA1301/Gy5 的目的。

3 讨论

尽管常规育种方法在改良植物种子蛋白质方面已取得了一些进展, 如高 lys 谷物和大麦突变体的获得^[7]。然而这些突变体由于同时存在产量低、抗虫及抗病性差等不良性状, 使它们在农业生产中难以推广。利用基因工程技术, 如今已实现了在不改变作物其它性状的同时, 达到提高作物蛋白质品质

本实验应用 RT-PCR 的方法, 成功地扩增和克隆了大豆 11S 球蛋白 Gy5 的 cDNA 序列, 并构建了植物表达载体, 以便于今后转化利用, 在提高其它作物蛋白质含量、改良品质方面具有很大的应用价值。此外, 本实验还对富含蛋白质、糖类物质的组织或器官(如种子)的 RNA 提取方法进行了新的研究和改良, 提高了 RNA 的提取效率和质量。

种子贮藏蛋白基因代表着一组发育上的调节基

因, 它们仅在植株发育的特定阶段启动和表达。但楼程富等将载有大豆球蛋白基因的质粒 pBI-Gly 用农杆菌介导法导入桑树, 通过 RNA 点杂交鉴定, 表明大豆球蛋白基因已转入桑树基因组中, 并在转基因的桑叶内检测到了它的表达^[2], 说明大豆球蛋白基因在 35S 启动子的调控下可以表达。蛋白质主要贮藏在种子及其它贮藏器官中, 因此本试验室正克隆贮藏蛋白基因在种子或果实中特异表达的启动子。胡赞民等从甘蓝型油菜品种 H165 中克隆了种子贮藏蛋白基因 BcNA1 的启动子, 将此启动子与 GUS 基因连接构建了植物表达载体, 利用农杆菌介导法将其导入烟草, 对转基因烟草 GUS 基因检测分析表明, BcNA1 基因启动子能特异地启动 GUS 基因在种子中的表达^[8]。贮藏蛋白基因种子特异表达启动子的研究将更有效地提高转基因作物的营养价值和经济价值。

大豆球蛋白只在种子形成的胚乳期才大量表达, 这种组织特异性和发育阶段特异性表达是受大豆球蛋白基因启动子的调控。大豆球蛋白基因启动子除具有豆类作物贮藏球蛋白所具有的 Legumin box^[9] 调控序列外, Ltoh 等人研究发现在第 I 类群 Gy2(A2B1a) 基因的启动子中还含有 Glycinin box (TTATAATTT), 参与球蛋白基因的表达调控^[10]。陈三凤等在大豆品种 Williams Gy4 基因启动子中发现类似 Glycinin 盒的核苷酸序列, 是否也在基因表达的调控中发挥同样的作用正在研究中^[11]。本研究利用 RT-PCR 法扩增出 Gy5 的 cDNA 序列, 可以用它作探针, 筛选出 Gy5 染色体基因, 深入研究大豆高蛋白变异体“花生豆 1 号”Gy5 基因启动子的调控序列, 构建高效特异表达载体。

CDNA CLONING AND PLANT EXPRESSION VECTOR CONSTRUCTION OF SOYBEAN 11S GLYCININ Gy5

Wang Peiwu, Liu Lingzhi, Chai Xiaojie, Zhang Jun, Qu Tongbao
(Biotechnology Center of Jilin Agricultural University, Changchun 130118)

Abstract The total RNA was extracted from immature seeds of soybean and directly used in single-stranded (ss)DNA synthetic reaction. According to soybean 11S glycinin Gy5 cDNA sequences in genebank, a pair of primers were designed. Double-stranded (ds)cDNA was amplified by PCR. The amplified Gy5 cDNA was cloned into plasmid pUC 19 and sequenced. Fragment of the Gy5 cDNA in the recombinant plasmid was cut with PstI/EcoRI and ligated with plasmid Pcambia1301, then a plant expression vector was constructed. It was also transferred into Agrobacterium LBA4404 in order to be utilized later.

Key words Soybean; Gy5; cDNA; Clone; Plant expression vector

参考文献

- 1 范士靖, 李建粤, 等. 基因工程改良作物营养品质的研究[J]. 生物工程学报, 2002, 18(3): 381-386
- 2 谈建中, 楼程富, 等. 大豆球蛋白基因转化桑树获得转基因植株[J]. 农业生物技术学报, 2001, 9(4): 400-402
- 3 Kagawa H, Hirano H. Sequence of a cDNA encoding soybean basic 7s globulin[J]. Nucleic Acids Res. 1989, 17: 8868
- 4 Tumer N, Richter JD, Nielsen, et al. Structural characterization of the glycinin precursors. [J]. Biol Chem, 1982, 257: 4016-4018
- 5 V. Beilinson, Z. Chen, R. C. Shoemaker, et al. Genomic organization of glycinin genes in soybean. Theor Appl Genet 2002, 104: 1132-1140
- 6 Chikafusa Fukazawa, Takayuki Monmma, Hisashi Hirano, et al. Cloning and sequencing of double-stranded cDNA complementary to a soybean storage protein[J]. The Journal of Biological Chemistry, 1985, Vol. 260: 6234-6239
- 7 Nelson O E. New approaches to breeding for improved plant protein [R]. Proc of a panel meeting organized by FAO/IAEA, Sweden, 1986
- 8 石东乔, 胡赞民等. 甘蓝型油菜 BcNA1 基因启动子在转基因烟草中对 Gus 基因表达的调控[J]. 植物生理学学报, 2001, 27(4): 313-320
- 9 Baulein H, Nagyl, Villarroel R, et al. Cis-analysis of a seed protein gene promoter; the conservative RY repeat CAT-GCATG Within the legumin box is essential for tissue-specific expression of a legumin gene[J]. Plant J, 1992, 2, 233-239
- 10 Ltoh Y, Kitamura Y, Fukazawa C. The glycinin box; a soybean embryo factor binding motif within the quantitative regulatory region of the 11S seed storage globulin promoter[J]. Mol Gen Genet, 1994, 243: 353-357
- 11 陈三凤, 深泽亲房. 大豆 11S 球蛋白 Gy4(A5A4B3) 的基因克隆和序列分析[J]. 生物工程学报, 2000, 16(2): 215-217