

大豆抗病相关基因 SR1 正反义植物表达载体的构建及遗传转化研究^{*}

林世锋 张淑珍 杨秀红 陈庆山 杨庆凯 李文滨^{**}

(东北农业大学大豆科学研究所, 哈尔滨 150030)

摘要 实验构建了 CaMV35S 启动子控制下的大豆抗病相关基因 SR1 的正反义植物二元表达载体 pBISR1(+) 和 pBISR1(-)。通过根癌农杆菌叶盘转化法, 将正义和反义 SR1 基因导入烟草 Havana 425, 经卡那霉素筛选, 获得了抗性植株。经 PCR 和 PCR-Southern 印迹分析, 证明抗性植株中整合了 SR1 基因, RT-PCR 分析进一步表明正义和反义基因皆能转录为完整的 mRNA, 经疫霉根腐接种及抗病性鉴定表明, 转反义基因株系和未转基因株系均轻微感病, 而转正义基因株系始终没有出现感病症状。

关键词 大豆 SR1 基因; 表达载体; 转化; 烟草

中图分类号 S 565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2005)02-0090-04

植物抗病基因的克隆研究对于抗病育种和抗病机制的理解具有重要意义。但从现有的文献报道来看, 大豆抗病基因的研究还很薄弱, 迄今尚未有功能性大豆抗病基因被克隆的报道。

2003 年, 杨秀红从大豆抗疫霉根腐病品种绥农 10 号中分离出大豆 NBS 类抗病基因的同源序列, 在此基础上, 通过 RACE 技术获得了 3574bp 的全长大豆抗病相关基因 SR1^[1]。尽管序列和结构上的分析均已表明, SR1 基因为大豆抗病相关基因, 但还需要在转基因体系中进一步验证该基因的功能。本实验拟利用 SR1 基因替换植物表达载体 pBI121 质粒中 CaM35S 启动子与 T-nos 终止子之间的 gus 基因, 构建正反义植物二元表达载体; 利用农杆菌浸染法转化烟草植物, 研究该基因的表达, 通过生物实验检测该基因对疫霉根腐病的抑制效果。

1 材料和方法

1.1 材料

本实验中使用的大肠杆菌(E. coli)为 DH5 α , 根癌农杆菌(Agrobacterium tumefaciens)为 LBA4404, 表达载体为 pBI121, 抗性标记为 Kmr。

质粒 pE42(含大豆抗病相关基因 SR1)由本实验室克隆和构建, 抗性标记为 Amp^r。

限制性内切酶, Klenow 大片段, T4 DNA 连接酶, M-MLV 反转录酶购自 Promega 公司, 地高辛标记和检测试剂盒(DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II)购自 Roche 公司, 其它生化试剂购自 TaKaRa 公司。所用 PCR 引物由上海博亚生物技术有限公司合成。

烟草(Nicotiana tabacum L.)种子 Havana 425 由加拿大圭尔夫大学提供。大豆疫霉根腐病 1 号生理小种由本实验室保存。

1.2 SR1 基因正反义植物二元表达载体的构建

用 Not I 从重组克隆 pE42 中切下 SR1 基因, Klenow 大片段补平, 与经 Sma I /EcoI 酶切 pBI121 获得的载体 DNA 大片段进行平端连接, 连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 。以碱法提取质粒 DNA^[2], 经琼脂糖凝胶电泳检测挑选转化子, PCR、酶切鉴定正反义表达载体, 分别命名为 pBISR1(+) 和 pBISR1(-), 见图 1。

按文献^[3]方法转化农杆菌(Agrobacterium tumefaciens) LBA4404, 用 PCR 及酶切鉴定重组克

^{*} 收稿日期: 2004-12-10

基金项目: 863 计划(2003AA207060-4)资助项目

作者简介: 林世锋(1978-), 男, 硕士研究生, 研究方向大豆遗传育种, E-mail: lshifeng1978@163.com

^{**} 通讯作者: E-mail: wenbinli@yahoo.com

隆。

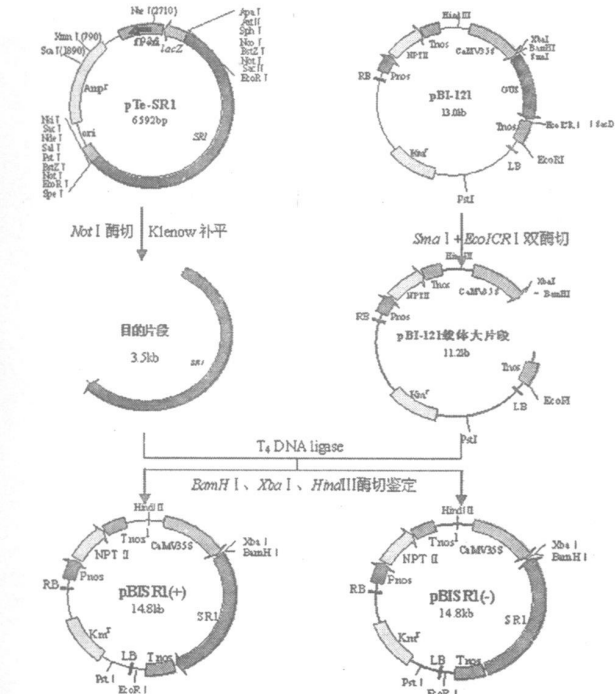


图 1 植物二元表达载体 pBISRI(±) 的构建流程

Fig. 1 Construction of plant binary expression vector pBISRI(±)

1.3 根癌农杆菌叶盘转化法将 SR1 基因导入烟草

参照 Horsch 等^[4]的方法, 略加改进。取烟草无菌苗上部的幼叶, 用解剖刀把叶片切成 0.5~1cm×0.5~1cm 的烟草叶盘, 加入适量的 LBA4404(含 pBISRI(+))或 pBISRI(-))培养液, 浸 1~2 min。滤纸吸干, 近轴面朝下置于 MS 基本培养基上, 共培养 4h, 然后用无菌水冲洗烟草叶盘三次, 再用含 500mg/L Cef 液体培养基冲洗一次, 转至选择培养基上(MS 培养基加 1.0 mg/L 6-BA、0.2mg/L NAA、300mg/L Km、500mg/L Cef)。每两周转一次, 待卡那霉素抗性芽长至 2cm 时, 转至生根培养基(1/2 MS 基本培养基, 补加 50mg/L Km+400mg/L Cef), 待根系发育完全后转入土壤中。

1.4 转基因烟草植株分子检测

烟草基因组 DNA 提取按修改的 CTAB^[5] 程序进行。以提取的基因组 DNA 为模板进行 SR1 全长序列的 PCR 扩增, 所用引物: S1 为 5'-TAATA-ATGGCTGCGACAA-3'; A1 为 5'-ATGAAGG-TAGGCGCA ACA-3'。PCR 反应条件为 94℃ 2min, 一个循环; 94℃ 0.5min, 55℃ 0.5min, 72℃ 3.5min, 35 个循环; 72℃ 7min 反应结束。

从 PCR 为阳性的植株中选取转化植株进行 PCR-Southern 杂交鉴定。PCR 产物电泳后, 转移

至尼龙膜上, 放入紫外交联仪中, 254nm 紫外光照射 2 min 以固定 DNA 于膜上。然后按照 Roche 公司 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II 的详细说明, 以 DIG 标记的质粒正对照扩增产物为探针进行杂交。PCR-Southern 印迹杂交参照文献^[2] 进行。

将 PCR 及 PCR-Southern 鉴定呈阳性植株的叶子在液氮中研磨成粉末, 应用 Trizol Reagent (GibcoBRL 公司) 制备转基因烟草总 RNA, 加入无 RNase 的 Dnase I 消化可能存在的 DNA, 用上述 SR1 基因引物进行 RT-PCR 检测, 以验证其外源基因在转录水平上的表达。

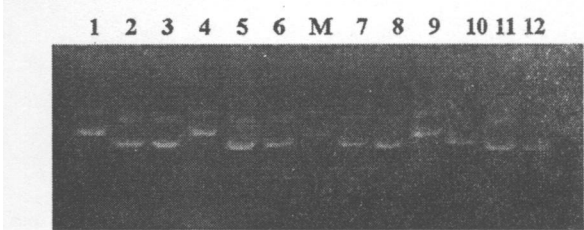
1.5 转基因烟草植株的抗病性鉴定

目前大豆疫霉根腐病原菌接种大豆植株的方法广泛采用的是下胚轴伤口接种法^[6]。本试验借鉴此方法对烟草植株进行接种: 在烟草长出 8-9 片子后, 用消毒后的刀片在烟草近根部的茎上划一伤口, 伤口深度不超过烟草茎粗的三分之一, 取扩繁好的带有培养基的病原菌菌丝体(边长 3mm 的方块) 嵌入伤口中, 接种后在苗的上部罩上塑料薄膜, 向膜内浇水, 保持膜内相对湿度在 90% 以上, 在 22-30℃ 下培养 60 小时, 接种 96 小时后调查病情。

2 结果

2.1 SR1 基因正反义植物二元表达载体的构建

pBI121 经 SmaI/EcoICR1 双酶切, 得到 11.2 kb 的载体 DNA 大片段, 质粒 pE42 经 NotI 酶切得到 3.5kb 的 SR1 基因片段, 补平 SR1 基因片段, 连接过夜后, 转化大肠杆菌。挑单斑提取质粒, 并以载体质粒 pBI121 为对照进行凝胶电泳检测(图 2),

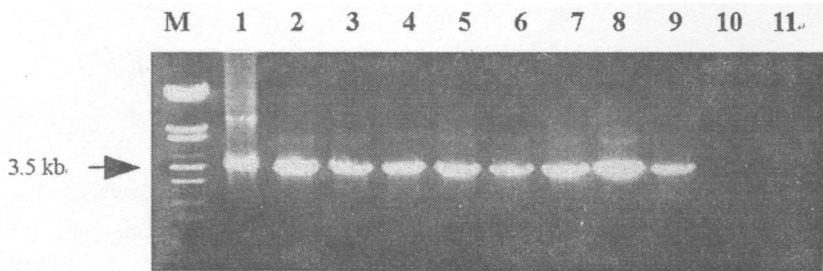


M: pBI-121 1、4、9: 重组质粒
2、3、5、6、7、8、10、11、12: 自环化质粒

图 2 大肠杆菌中重组质粒的凝胶电泳检测
Fig. 2 Detection of recombinant plasmids in Ecoli DH5
by agarose gel electrophoresis
根据自环化质粒、重组质粒与 pBI121 载体质粒在凝

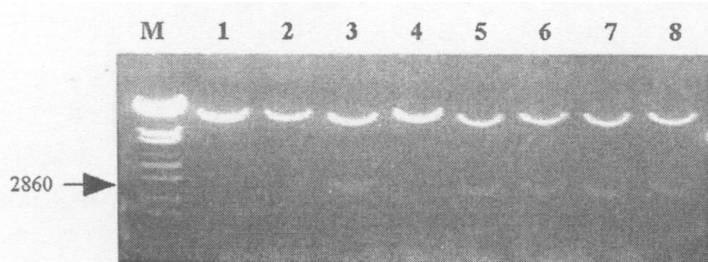
胶中的相对位置初步筛选出 8 个阳性克隆。进一步做 PCR 检测, 均扩增出 3.5kb 的片段(图 3), 证明 SR1 基因片段的插入。为确定 SR1 基因片段的连

接方向, 用 Bam I 酶切 8 个阳性克隆(图 4), 从而确定 1、2、4 为正方向连接的正义表达载体, 其它为反向连接的反义表达载体。



M:λ - EcoT14I marker 1: pE42 PCR 2~9: pBISRI(±) PCR 10: pBI121 PCR 11: 负对照(水)
图 3 植物表达载体 pBISRI(±) 的 PCR 鉴定

Fig. 3 PCR identification of plant expression vector pBISRI(±)

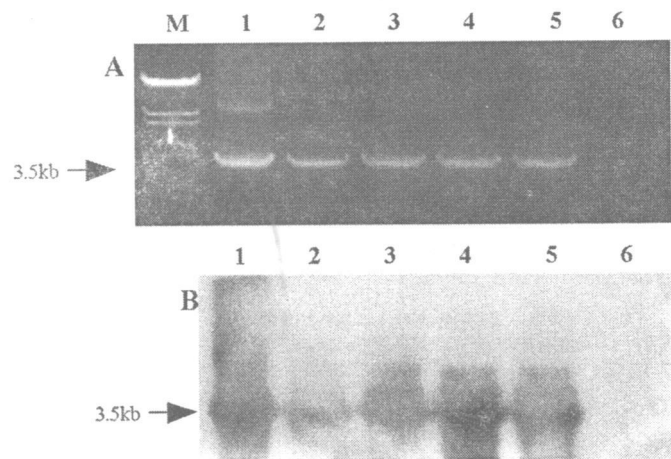


M:λ - EcoT14I marker; 1、2、4, pBISRI(+) ; 3、5、6、7、8, pBISRI(-)
图 4 植物表达载体 pBISRI(±) BamHI 酶切的鉴定

Fig. 4 BamHI restriction analysis of plant expression vector pBISRI(±)

2.2 转基因烟草的获得及其分子鉴定
通过农杆菌介导的叶盘法转化烟草 Havana

425, 共获得 18 株卡那霉素抗性植株。用 CTAB 法提取烟草总DNA, 以其为模板, 用SR1基因5端和3′



M:λ - EcoT14I marker;
1: 阳性对照(pTe - SR1 质粒);
2~3: 转正义 SR1 基因植株;
4~5: 转反义 SR1 基因植株;
6: 阴性对照(Havana 425 DNA)

图 5 转基因植物的 PCR 检测(A) 和 PCR-Southern 杂交分析(B)
Fig. 5 Identification of SR1 gene in transgenic tobacco by PCR(A) and PCR - Southern blotting(B)

端引物进行 PCR 扩增, 扩增产物的电泳分析表明, 其中转化正义基因的卡那霉素抗性植株中, 有 4 株能扩增出一条 3.5kb 的特异带, 转化反义基因的卡那霉素抗性植株中, 有 2 株能扩增出一条 3.5kb 的

特异带, 而非转化对照植株无此特异带(图 5A)。PCR 检测结果同时表明, SR1 正反义植物表达载体对烟草的转化能力并没有明显的差异, 转化率皆为 33.3%。

为了进一步鉴定 PCR 产物是否为 3.5kb 的 SR1 基因片段,排除假阳性的存在,以未转化的同一品种植株 DNA 为阴性对照,以 pE42 质粒为阳性对照,与用地高辛标记的 SR1 基因探针进行 PCR - Southern 杂交检测。结果显示:2 个转正义 SR1 基因的阳性株系和 2 个转反义 SR1 基因的阳性株系均呈现与 pE42 质粒 DNA 相同的杂交带,而阴性对照无杂交带,证明 SR1 基因已整合到受体烟草的基因组中(图 5B)。

为研究转基因植株所含正义或反义 SR1 基因是否在植株中表达(在 RNA 水平),本实验对 PCR 和 PCR - Southern 杂交皆为阳性的植株进行 RT - PCR 检测,发现转基因株系均扩增出与阳性对照一致的专一条带(3.5kb),而未转基因对照植株未扩增出相应条带(图 6)。RT - PCR 结果表明,整合到烟草基因组中的正义或反义 SR1 基因已被 CaMV35S 启动子启动,转录为完整的 mRNA,在 RNA 水平上得到了表达。

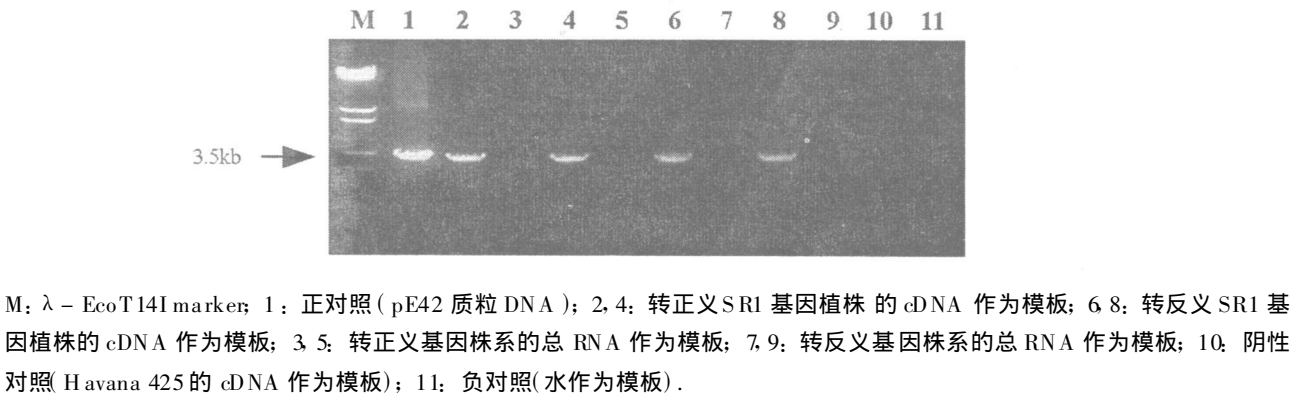


图 6 转正义及反义 SR1 基因的烟草的 RT - PCR 鉴定

Fig. 6 RT - PCR identification of transgenic tobaccos with sense or antisense SR1

2.3 转基因烟草植株的抗病性鉴定

为了初步探索转 SR1 基因的烟草对病原菌的抗性,用大豆疫霉根腐病 1 号生理小种接种转基因烟草植株,同时接种未转基因植株作为对照。结果表明大豆疫霉根腐病 1 号生理小种对转反义基因的株系和未转基因株系均有轻微的致病性,植株下部叶片黄化,而转正义基因的株系始终没有出现感病症状(图 7)。

为了准确地知道新分离的基因或基因片段产物在活体内的功能,应用反义 RNA 技术显然是一条简便的途径。本实验就是根据这一原理,在构建正义植物表达载体的同时,构建了反义植物表达载体,用以进一步确定大豆抗病相关基因 SR1 的具体功能。



+: 转正义 SR1 基因植株;
-: 转反义 SR1 基因植株; c: 未转基因植株。

图 7 转基因烟草的接种鉴定

Fig. 7 Inoculation of transgenic tobaccos

酶切位点分析表明,质粒 pE42 中 SR1 两端可利用的酶切位点在载体质粒 pBI121 中 GUS 两端的多克隆位点处找不到,不能进行粘性末端的定向连接。同时考虑到构建多个中间载体以获得适合的酶切位点,最终把目的片段连接在表达载体上的做法,同样复杂,而且需要多个不同的中间载体。所以本实验采取了平末端片段的克隆连接。再通过酶切鉴定,确定目的片段的连接方向,同时获得正反义植物表达载体。克隆平末端的目的片段时,只要充分注意连接体系中载体和目的基因片段的比例、平端的浓度及连接酶的浓度,在不采用碱性磷酸酶去除载体 DNA 5 端磷酸和加接头等辅助措施的条件下,可以获得 "正确" 的连接产物,连接效率达 8.3%,足够满足亚克隆的要求。

由于大豆组织培养再生困难,可重复性差,基因型之间差异大,遗传转化体系还不完善等原因,大豆被公认为难转化的作物之一。为了在有限的时间内

3 讨论

研究 SR1 基因在植物体内整合和转录的情况,以及初步探索 SR1 基因可能的抗病性,我们并没有直接将其转入大豆,而是选择了转化及再生容易,又可大量快速繁殖的植物遗传转化的模式植物烟草。通过根癌农杆菌叶盘转化法将 SR1 基因导入烟草获得卡那霉素抗性再生植株,经 PCR 和 PCR-Southern 检测表明目的基因已整合到烟草基因组中,RT-PCR 进一步表明目的基因在烟草中能够转录出完整的 mRNA。本试验中,PCR 分析鉴定结果显示,并不是所有转化植株表现出阳性反应,仍然有假转化体存在。当然,假转化体的产生是目前遗传转化中非常普遍的现象。可能是外植体细胞暂时表达外源选择抗性基因,从而为其它非转化细胞提供了一道屏障,逃避了选择压力的影响而继续分化;或者外植体的某些表层细胞稳定表达外源选择抗性基因,降低了其周围培养基中的抗生素浓度,为其它非转化细胞提供屏障;也或者是植物对选择抗生素具有很高的内源抗性等。因此转基因植株的鉴定需要一整套完整而可靠的鉴定体系。

大豆疫霉根腐病菌属于鞭毛菌亚门、卵菌纲、霜霉目、腐霉科、疫霉属真菌。该病菌除侵染大豆外,在温室人工接种条件下,还可以造成苜蓿草、甜三叶草的猝倒死亡,对菜豆、老鹤草也有致病力^[7]。但在现有文献中,并未看到关于大豆疫霉根腐病是否侵染烟草方面的研究报道。对此本研究所做了一些尝试性的研究工作,结果显示:大豆疫霉根腐病对烟草

接种,可在烟草上引起一定程度病症。因此,对转基因烟草接种大豆疫霉根腐病 1 号生理小种,结果表明该病原菌对转反义基因的株系和未转基因株系烟草有轻微的致病性,但不能达到致死效果。而转正义基因的株系始终没有出现感病症状。尽管如此,SR1 基因的确切生理功能还有待于进一步转化相应的大豆品种加以充分验证。

参 考 文 献

- 1 杨秀红.大豆抗病相关基因的克隆研究[D].东北农业大学,农学博士学位论文;2002.
- 2 Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T M. Molecular Cloning: A laboratory manual[M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- 3 Hofgen R, Willmitzer L. Storage of competent cell for Agrobacterium transformation[J]. Nucleic Acid Res, 1988, 16(21): 9877.
- 4 Horsch R B, Fry J E, Hoffman N L, et al. A simple and general method for transferring genes into plants[J]. Science, 1985, 227: 1229~1231.
- 5 Porebskis, Bailey G, Baumb B R. Modification of CTAB DNA extraction protocol for plants containing high polysaccharide and polyphenol components[J]. Plant Mol Rep, 1997, 15: 8~15.
- 6 马淑梅,李宝英,丁俊杰.大豆疫霉根腐病抗病资源筛选及抗性遗传研究[J].大豆科学,2001,20(3): 177~179.
- 7 Schmitthenner, A. F. Phytophthora rot in "Compendium of soybean diseases." 3rd ed. J. B. Sinclair and P. A. Backman eds. American Phytophthora society. St. Paul MN. 1989, P35-38

CONSTRUCTION OF TWO PLANT EXPRESSION VECTORS WITH SENSE OR ANTISENSE SOYBEAN RESISTANCE-RELATED GENE SR1

Lin Shifeng Zhang Shuzhen Yang Xiuhong Chen Qingshan Yang Qingkai Li Wenbin

(Institute of Soybean Science, Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

Abstract Two plant expression vectors carrying sense or antisense soybean resistance-related gene SR1 under the regulation of cauliflower mosaic virus 35s promoter was constructed. Leaf segments of tobacco Havana 425 were infected by Agrobacterium tumefaciens LBA4404 with pBISR1(+) or pBISR1(-), from which kanamycin resistant plants were obtained. PCR and PCR-Southern analysis proved that the SR1 gene was integrated into the genomes of the tobacco plants, and RT-PCR analysis proved that sense or antisense gene was transcribed into a complete mRNA. The disease resistance assay showed that plants with antisense gene and control plants were slightly susceptible, and plants with sense gene were not susceptible.

Key words Soybean SR1 gene; Expression vectors; Transgenic; Tobacco