

大豆铁蛋白 cDNA 的克隆及植物表达载体的构建^{*}

王永斌¹ 郭长虹¹ 郭东林¹ 蔡秋艺¹ 张爽¹ 李集临¹ 林红²

(1. 哈尔滨师范大学生物系, 哈尔滨 150080; 2. 牡丹江制药厂, 牡丹江 157013)

摘要 以大豆为材料, 利用 RT-PCR 法扩增得到大小约 750bp 的片段, 将这个片段连接到克隆载体 pBluescript SK+ 上进行测序, 结果证明, 此片段就是大豆的铁蛋白基因。将此片段再正向插入到植物表达载体 pBI121 的 CaMV35s 启动子和 NOS 终止子之间, 构建了植物表达载体 pBIFe, 并成功地将该载体导入根癌农杆菌 EHA 105。此项工作为获得表达铁蛋白的转基因植物奠定了基础。

关键词 大豆铁蛋白; cDNA; 克隆; 植物表达载体

中图分类号 S565.1 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2006)04-0454-04

铁蛋白是广泛存在于动物、植物、真菌和细菌中的一类铁贮藏蛋白。它是中间含有一个无机铁核空腔的中空球体, 每分子的铁蛋白能以可溶、无毒和生物体可以利用的形式贮藏 4500 个铁原子^[1]。

近年来, 铁蛋白基因作为提高植物铁含量的候选基因而倍受关注。原因是: (1) 铁蛋白贮存铁的能力高于其它蛋白^[2]; (2) 铁蛋白由特殊酶亚基形成, 无需导入任何其它基因去诱导产生翻译产物^[3]; (3) 铁蛋白在单子叶和双子叶植物中都存在^[4]; (4) 铁蛋白中的铁以生物可以利用形式存在, 易于吸收和利用^[5]。克隆植物的铁蛋白基因并将其导入到经济作物, 对于提高经济作物的铁营养成分具有重要的意义。

本研究通过 RT-PCR 法获得了大豆铁蛋白 cDNA, 并将其克隆到载体 pBI121 中, 构建了植物表达载体 pBIFe, 为今后获得高表达铁蛋白的转基因植物奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料

栽培大豆黑农 38, 购于黑龙江省农科院。

1.1.2 菌株和质粒

大肠杆菌菌株 DH5 α , 根癌农杆菌菌株 EHA 105; 质粒 pBluescript SK+, pBI121 均由本研究室保存。

1.1.3 主要试剂

植物 RNA 提取试剂盒购自北京天为时代公司; 高保真 KOD Polymearase 购自日本 ToYoBo 生物公司; cDNA 合成试剂盒、DNA 片段回收试剂盒、限制性内切酶、Ex Taq 酶、连接酶等均购自大连宝 (TaKaRa) 生物公司; 卡那霉素、氨苄青霉素为美国 Amresco 公司产品。引物由上海生工生物工程技术有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 植物材料的处理

将大豆黑农 38 的幼苗用 100 μ M 的 Fe-EDTA 溶液处理 24h, 取植株叶片放于液氮中备用。

1.2.2 植物总 RNA 的提取、cDNA 第一链的合成、琼脂糖凝胶中 DNA 片段的回收

参照试剂盒说明

1.2.3 引物设计

参照 GenBank 中登录的大豆铁蛋白基因序列, 在其正向引物上加 BamHI 位点, 在其反向引物上

* 收稿日期: 2006-09-20

基金项目: 黑龙江自然科学基金 C2005-07; 哈尔滨市学科后备带头人项目 2005A FXXJ016; 黑龙江省青年基金 QC05C60; 黑龙江省教育厅海外学人科研项目 1055HQ024

作者简介: 王永斌(1976-), 女, 硕士研究生, 主要从事植物基因工程研究。电话: 0451-88060576, E-mail: wyby119@yahoo.com.cn

通讯作者: 郭长虹, 电话: 13936622308, E-mail: kak u3008@yahoo.com.cn

加 SacI 位点, 以方便植物表达载体的构建。引物序列如下:

正向引物: 5'-actg gatccatggcttcttgetccatce 3'

反向引物: 5'-ctg gagctcctaatacaagaagtctttg 3'

1.2.4 质粒提取、电泳、酶切、连接及大肠杆菌转化

参考文献^[4]

1.2.5 重组子的鉴定和测序

采用菌落 PCR 法和限制性内切酶酶切的方法鉴定重组子, 确认正确后送交上海生工生物工程技术服务有限公司测序。

1.2.6 电击法转化根癌农杆菌

参照电击转化仪使用说明。

2 结果与分析

2.1 大豆铁蛋白 cDNA 的克隆和测序

提取经 Fe EDTA 溶液处理的大豆黑农 38 植株叶片总 RNA, 经反转录获得 mRNA 第一链, 以其为模板, 用设计的铁蛋白基因特异引物进行 PCR 扩增, 得到了大约 750bp 的特异带(图 1)。回收此片段, 将其克隆到 pBlueskript SK+ 载体的 BamHI/SacI 位点。经蓝白筛选, 挑取白色菌落进行 PCR 鉴定, 得到了 9 个阳性克隆, 取其中的 2 个进行限制性内切酶处理, 证明均有 DNA 片段的插入(图 2)。

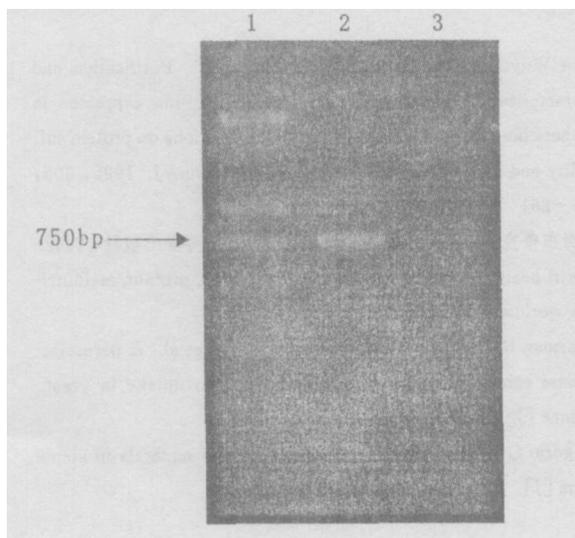


图 1 大豆铁蛋白 cDNA 片段的 PCR 扩增

Fig. 1 PCR amplification of soybean ferritin cDNA

1. Marker DL2000 2. 大豆铁蛋白 cDNA
扩增产物 3. 阴性对照

将经过鉴定的菌种甘油保存, 送至上海生工进行测序, 结果表明, 黑农 38 大豆的 cDNA 全长

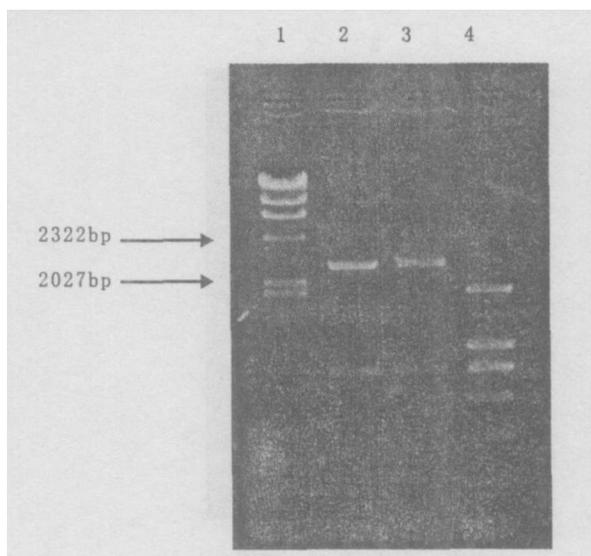


图 2 pFer 质粒的酶切鉴定

Fig. 2 Identification of pFer by enzymatic digestion

1. Marker λ /HindIII 2.3. pFer/BamHI + SacI
4. Marker DL2000

753bp, 编码 251 个氨基酸, 与 GenBank 登录的大豆铁蛋白序列进行核苷酸比对, 仅有一个碱基的差异, 而且没有造成氨基酸的改变。由于本实验采用了高保真的 KOD Polymearease 进行扩增, 所以, 推测这个差异产生于大豆不同品种之间的遗传差异。将此质粒命名为 pFer。

2.2 大豆铁蛋白基因植物表达载体的构建

用 BamHI/SacI 双酶切质粒 pFe, 回收 750bp 的基因片段, 用同样的酶酶切质粒 pBI121, 回收大片段, 将这两个片段连接, 转化大肠杆菌, 挑取转化菌落, 进行 PCR 检测, 获得了 5 个阳性克隆。取其中的两个克隆提取质粒, 用 BamHI/SacI 双酶切, 可切出约 10 kb 和 750bp 的条带(图 3), 证明该质粒确为重组质粒, 将其命名为 pBIFer。

2.3 植物表达载体导入根癌农杆菌

采用电击法将上述的植物表达载体质粒 pBIFer 转化根癌农杆菌 EHA105, 挑取单菌落作为模板进行 PCR 扩增, 得到了约 750bp 的目的带, 而没有转化的空白 EHA105 无此产物(图 5), 证明该质粒已经导入根癌农杆菌。

3 讨论

铁是人体所必需的微量元素。据统计, 世界范围内大约有 30% 的人口缺铁, 发展中国家的妇女和儿童缺铁现象更为严重^[7]。铁缺乏不仅可以导致贫血, 而且还会影响到人体其他方面的机能, 如阻碍智

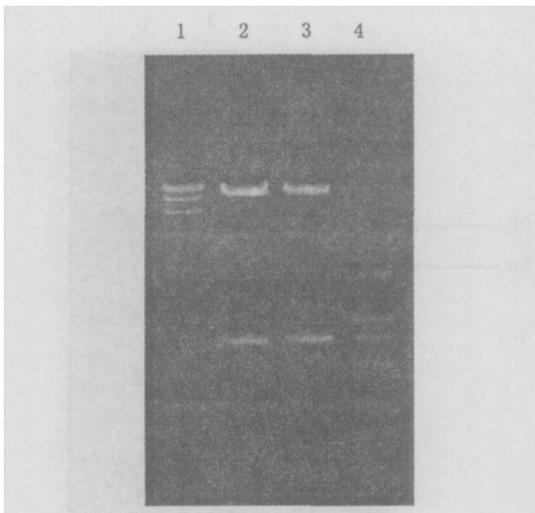


图3 pBIFer 质粒的酶切鉴定

Fig. 3 Identification of pBIFer by enzymatic digestion

1. Marker λ /HindIII 2, 3. pBIFer /BamHI + SacI 4. Marker DL2000

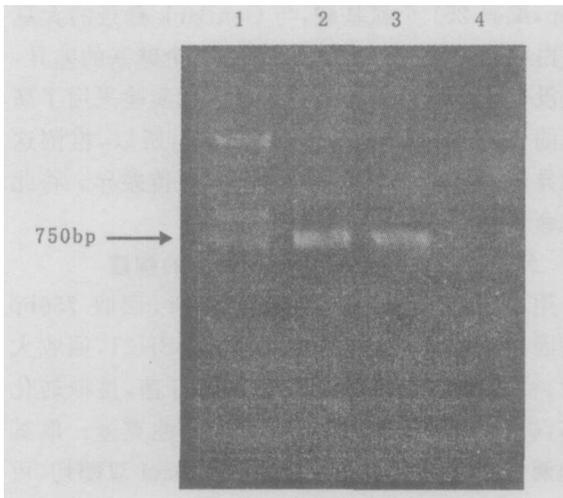


图4 大豆铁蛋白基因植物表达载体导入农杆菌的PCR检测

Fig. 4 Identification of pBIFer expression vector transferred into *Agrobacterium tumefaciens* EH A105

1. Marker DL2000 2. EHA 105 (pBIFer) 3. pBIFer 阳性对照 4. EHA 105 阴性对照

力发育等^[8]。为了克服铁营养缺乏,一般采用补充铁剂或改善饮食等办法,但这些方法费用较高,对于

发展中国家来说很难实行。

植物是食物中铁的主要来源,而且发展中国家的膳食也主要以碳水化合物为主^[9],因此利用基因工程的方法提高植物的铁营养成分,将为解决铁营养缺乏问题提供了一条新的途径。

铁蛋白基因是一种铁贮存基因,可以贮藏可溶、无毒和生物体可以利用的形式的铁^[5],如果将铁蛋白基因导入到植物中,并实现稳定而高效的表达,将会改善植物铁的贮存能力,提高植物的铁营养成分。

本研究以黑龙江省栽培大豆为材料,克隆了铁蛋白 cDNA,并构建了植物表达载体 pBIFe,为今后进一步将铁蛋白 cDNA 导入植物,提高植物的铁营养成分的研究奠定了基础。

参 考 文 献

- 1 Andrews S C, Arosio P, Bottke W, et al. Structure, function and evolution of ferritins [J]. *J Inorg Chem* 1992, 47: 161 - 174.
- 2 Harrison P M, Arosio P. The ferritins: Molecular properties, iron storage function and cellular regulation [J]. *Biochim Biophys Acta*. 1996, 1275: 161 - 203.
- 3 Goto F, Yoshihara T, Masuda T, Takaiwa F. Genetic improvement of iron content and stress adaptation in plants using ferritin gene [J]. *Biotechnol Genet Eng Rev*. 2001, 18: 351 - 71.
- 4 Lobreaux S, Massenet O, Briat J F. Iron induces ferritin synthesis in maize plantlets [J]. *Plant Mol Biol*. 1992, 19(4): 563 - 575
- 5 Van Wuytswinkel O, Savino G, Briat J F. Purification and characterization of recombinant pea seed ferritins expressed in *Escherichia coli*: influence of N terminus deletions on protein solubility and core formation in vitro [J]. *Biochem. J*. 1995, 305: 253 - 261
- 6 萨姆布鲁克. 分子克隆实验指南 第三版[M] 科学出版社, 2002.
- 7 World health Organization <http://www.who.int/nut/malnutrition/worldwide.htm#ida>
- 8 Stearman R, Yuan D S, Yamaguchi Iwai Y et al. A permease oxidase complex involved in high affinity iron uptake in yeast. *Science* [J]. 1996, 271: 1552 - 1557.
- 9 Gregorio G B. Progress in breeding for trace minerals in staple crops [J]. *J Nutr*, 2002, 132: 500 - 502.

CLONING OF SOYBEAN FERRITIN GENE AND CONSTRUCTION OF ITS PLANT EXPRESSION VECTOR

Wang Yongbin¹ Guo Changhong¹ Guo Donglin¹ Cai Qiuyi¹ Zhang Shuang¹ Li Jilin¹ Lin Hong²

(1. Department of Biology, Harbin Normal University, Harbin, 150080

2. Mudanjiang Pharmaceutical Factory, Mudanjiang 157013)

Abstract A 750bp fragment was amplified by RT-PCR from soybean. The PCR products were cloned into pBluescript SK+ vector and named pFer after its sequences was confirmed. The soybean ferritin gene was subcloned into plant expression vector pBI121 and named PBI121Fer. Then the recombination plasmid were introduced into *Agrobacterium* EHA105. This work provides a foundation for transferring ferritin gene into plant by *Agrobacterium* mediated transformation.

Key words soybean ferritin; cDNA; cloning; plant expression vector

《大豆科学》征稿简则

《大豆科学》是黑龙江省农业科学院主办的大豆专业学术性期刊,作为我国大豆学术界唯一的学报,现已被收入国内外重要数据库和文摘收录文献源的重点核心期刊。国内外公开发行,双月刊,大16开96页。它是以大豆作物为主体,论述大豆作物本身问题的农业科学刊物,反映我国大豆科学的最新研究成果。主要刊登有关大豆遗传育种、品种资源、生理生态、耕作栽培、植物保护、营养施肥、大豆生物技术、大豆食品加工、大豆药用功能及工业用途等方面的学术论文、科研报告、研究简报、国内外研究述评、学术活动简讯和新品种介绍等。读者对象是从事大豆科学研究、生产的科技工作者和大专院校师生。

本刊来稿要求:

1 内容充实、数据可靠、论文有据、文字精练。每篇论文一般在6000字以内(包括图表及图版)。在文前写300~500字中文摘要,文后附300~500词的英文摘要。中英文摘要后请附3~5个关键词。研究简报不要超过3000字。研究简报、综述不要英文摘要,但需附英文题目、单位及作者姓名。英文摘要中的作者姓名和我国地名请用汉语拼音字母书写。

2 文稿要求计算机激光打印(A4),量和单位按国家法定计量单位以及国际标准中关于量和单位的规定书写。基金项目及课题来源请注明。首页下方请附第一作者简介,姓名(出生年-)性别、职称、学位及研究方向。

3 文稿中图表尽量精简,只附最必要的。图和表中所有中文均需附英文对照,图上数字与文字一律用6号字,线条图须用计算机作图,附清晰激光样和电子版。应能在Word文件中打开并能修改,表需制成三线表,照片要清晰,层次分明。

4 参考文献选主要的列入,未公开发表的不要引入,如期刊写明作者,文献题名,文献代码,刊名,出版年,卷(期);起止页。著作:著者,书名代码,版本(第一版不著录)、出版地,出版者,出版年,起止页。著作者不超过3位时,全部著录,责任者超过3位时,只著录前3位责任者,其后加“等”。参考文献题名后标明参考文献类型,各类文献代码分别为:专著[M],论文集[C],报纸文章[N],期刊文章[J],学位论文[D],报告[R],标准[S],专刊[P]。

5 本刊只接受未曾公开发表过及未曾投寄其它出版社的论文,请勿一稿两投。

6 对选用的稿件本刊有权做适当文字删改,或退请作者修改,来稿刊登与否由编委会审定。文章通过终审后,请提供电子版,可用Word,北大方正等格式。稿件一经刊出,赠送2本样刊。

7 凡被本刊录用的稿件同时通过因特网进行网络出版或提供信息服务,如不同意,请申明。如无特殊说明,视为同意。

来稿请寄:哈尔滨市南岗区学府路368号《大豆科学》编辑部。

邮政编码:150086 电话:0451-86668735 E-mail: dadoukx@sina.com