基于 *phy* 基因的双边界植物表达载体构建

赵鄢鹏[1],李 杰[1],刘 琦[2],夏善勇[2],吴立成[2],王秀君[2],李希臣[2]

(1. 东北农业大学 生命科学学院,黑龙江 哈尔滨 150030;2. 黑龙江省农业科学院 生物技术研究所,黑龙江 哈尔滨 150086)

摘 要:采用同源克隆方法从泡盛曲霉中克隆了1 515 bp的植酸酶基因,与黑曲霉(*A. niger*963)phyA2的核苷酸同源性为95%。以植物表达载体pTTBUG8为基础,构建了由35S启动子调控、具有磷高效利用功能基因(*phy*)的双边界植物表达载体pBSP。解决了*bar*基因及其产物PAT蛋白的安全性及产权等问题,并为植物养分高效利用基因工程研究奠定了重要基础。

关键词:*phy*基因;*bar*基因;双边界植物表达载体;安全性

中图分类号:S565.1 **文献标识码**:A **文章编号**:1000-9841(2010)03-0394-04

Construction of a Plant Expression Vector Containing Two T-DNA Based on *phy* Gene

ZHAO Yan-peng[1], LI Jie[1], LIU Qi[2], XIA Shan-yong[2], WU Li-cheng[2], WANG Xiu-jun[2], LI Xi-chen[2]

(1. Life Science College of Northeast Agricultural University, Harbin 150030; 2. Biotechnology Research Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086, Heilongjiang, China)

Abstract: To obtain transgenic soybean plants without selective marker genes, an efficient approach is to transform soybean with plant expression vectors containing two separate T-DNAs in a single expression vector, by which transgenic plants without selective marker genes could be selected in their progenies by crossing deletion. In this study, we used homology clone method to amplify the fragments of phytase gene from *Aspergillus awamori* and constructed a plant expression vector containing two T-DNAs, designated as pBSP. The results laid the basis to achieve marker-free transgenic plants in the progenies.

Key words: *phy* gene; *bar* gene; Plant expression vectors containing two T-DNAs; Security

植酸酶(Phytase,phyA)是催化植酸及其盐类物质水解成肌醇和磷酸的一类酶的总称[1]。通过植酸酶的水解,能减少饲料中50%以上无机磷的添加量,减少环境磷排泄30%以上,极大地提高饲料安全性和利用率[2]。

目前商品化的植酸酶是通过微生物发酵生产的。饲用酶在造粒过程中一般需要经过75 ~ 93℃的短暂高温过程。通常植酸酶在该温度下,酶活性都会大大降低,甚至失活。通过转基因技术使植物体内表达足量的植酸酶,不仅能提高植物性饲料的营养价值,而且省去了植酸酶生产中的高温造粒过程及在饲料中的添加[3]。20世纪90年代以来,国内外科学家开始致力于将来源于黑曲霉或无花果曲霉的植酸酶基因导入到烟草[4]、油菜[5]、大豆[6]、苜蓿[7]、马铃薯[8]及小麦[9]等植物中进行重组植酸酶表达的研究。在转基因作物中抗除草剂作物种植面积最大,因此*bar*基因及其产物PAT蛋白的安全性也成为了科学家一直探索的问题之一[10]。通过双边界植物表达载体的特性,可利用*bar*基因筛选到T_1代抗性植株中转入*bar*基因或转入*bar*和*phy*基因共同转入的株系。通过PCR检测技术以及转基因植株有性杂交及后代分离,筛选到只转入目的基因而不转入*bar*基因的安全的转基因新种质。

该研究克隆了泡盛曲霉植酸酶基因,构建了由启动子35S调控、具有磷高效利用功能的植酸酶基因(*phy*)、带有双边界的高效植物表达载体pBSP。旨在为磷高效利用大豆新品系的筛选和培育及获得无选择标记的大豆转基因后代植株提供理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 质粒、菌株 泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*)AS3.324及质粒pUC118/sp2eGFP2nos DNA由大连理工大学生命科学与技术学院提供。

收稿日期:2010-03-05

基金项目:国家"十一五"转基因生物重大专项资助项目(2009ZX08004 - 005B)。

第一作者简介:赵鄢鹏(1982-),女,在读硕士,研究方向为植物基因工程与分子生物学。

通讯作者:李希臣,研究员。E-mail:lixichen1968@163.com。

& Ã Ä Å " ?2 7*/('7(! '. %(#Å ß NP9! ', Ä Å Å ß Q+- >>%& ¯ p V E W, (b g 8 H I . / 0 r š & = ³ HYY+SRO¯ ^ d , - &) g ? ( )) b) > &

&4&4! # · + X $ e ¶ # Y@ Ô' & < š 8 n , 0 Ô' Y> N. - ? ¿ Ô µ E • € ß ù & ? ½ g 8 « ¾ Ö š › œ %N. - = Î E • – ß ù d + Y U U . g 8 H I ð õ Ö š › œ %q / & < E • € ^ 1 ù ' " Ú & ¤ 8 Ó ¦ 'T u - • ¯ ½ g 8 "& ? #› œä ¦ & &4&4$# / 0 1 2 # ™§ ° Å ¶ • Ô T u • ' '£ À ^UA? KU94%¦ $ ¥ L &j ÆÇ ¤ 8 HBE "9c- YRRRY: RY/ Y/ YR/ / RYY/ Y- / YY/ / :$c#¡ HBEB " 9c/ Y- - R: / - - - - / - / Y/ / R/ / / - - Y/ - :$c#& 0 Ø Ü ý ½ - ($4 $! > T u : N. - ^ í î x y ^/ 8 « ¬ & ™§ « ¬ ù 8 T u - • Ã ' " | } !WÀ ^/ 8 H I ë ú , þ Â • ' !‡ Ö ' " q , á Ô 0 ƒ A ! ¥ L &j ¤ 8 ! ~ Ä ¦ c ª Ü , F28 1 Ô 0 ƒ A '%¦ c ª Ü . BK0 Ô 0 ƒ A Ã r ' › T & } X Ë Ï ¤ 8 • ' ® %$, 1 HBE "9cRR: R- Y- Y/ - YRRRYRY/ Y/ YR/ / RYY/ Y- / YY/ / YYYRY- / / Y/ / YRY- RY/ - / / Y/ / RR- / YRR/ - R:$c# ¡ . PHBE "9c/ / R/ Y- R/ / Y- - R/ - - - - / - / Y/ / R/ / / - - Y/ - : $c#&

&4! # [\ X Y

&4! 4&# Ç È É Ê Ë Ì Í N. - &) * # " À / Y- + •) I Ø Ü ý ½ - (4! > T u : N. - &

&4! 4! # #7&Ã Ä & 9 : # 0 Ø Ü ý ½ k l " N. - ^ í î ! , 1 HBE . PHBE ^ ¤ 8 9 ¿ ^/ 8 « ¬ #7&T u • ' "o l þ , þ Â #& « ¬ ù 8 - • | } Ì Ë Y ! ? …^ HBED& Z HBED ¡ = ³ HS/ &&OgGH KR`^ ! 72GN. - Ô 0 ? ¿ ! 1 „ ¦ ? t @: Â HS/ &&Og GH HBED 72G&

&4! 4$# Î Ï Ð Z 0 ® ½ ¾ s & ¿ À # ' L Z = ³ HS/ &&OgGH HBE72G¡ ¶ 8 ¢ £ ¼´ H+0&! & N. - À , F280 ¡ mT@D• Ô 0 1 „ à B @: 5 ™ ¶ 8 ¢ £ ¼´ H+0&! &gGH HBED& Z 5 ™ ¶ 8 ¢ £ ¼´ H+0&! &gGH HBED À ^GD ¡ , F280 • Ô 0 ! = Î Ù ! 49 iTt $9(:HBE 72GT u É Ê ! À † ‡ t Ô • Ô 0 = ³ HYY+SRO ! = Î ¼´ É Ê & Ç v Y>N. - ? ¿ Ô ? ¿ ! – • & Ã Ä Å NP9! ! Ç v Y>N. - ? ¿ Ô ? ¿ ! – • & Ã Ä Å NP9! ! ~ þ Ö 9%?I + ?Q] & t Q+ 7 } T é î Ä õ º – • Å i ! G H ö I – • Å i ÿ • ') I = ³ Ô 0 Á Ï S n – • Â &

&4! 4># Ñ Ò Ó Ô Õ u N. - 5 6 & 7 8 # J Ý E • – 0 7 ¡ ¤ x y &

&4! 49# Ö × , g # Š Ý Œ 1 µ (&&) t \ • x y &

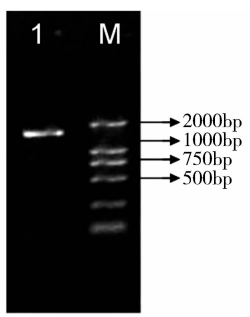
&4! 4' # Ø Ù Ú - $ B Û w Ü D # ™Ð , Ä Å À Á Â 8 å Ã æ Ï • – • ™Ð , Ä Å Š . • 2 (&!) &

&4! 4=# Ý ^ B Û w Ü D ^/ 8 K ; # ö I æ Ï • – • é î Ä t K Å i ! ~ þ 8 AW(?' X?$ < º g » t *, ^ È ´ 7 } T 5 ! Oa 7 } >OB&) I = ³ ! Ô 0 Á Ï (&$) &

! #] ^ + M _

! 4&# #7&. / 0 w x " É (M _

0 Ø Ü ý ½ k l " N. - ^ í î ! " À #7&T u ¸ • ¤ 8 x y ^/ 8 « ¬ ! « ¬ ï Ù &49 i Tt ¸ • # e " Ñ &#& Z B / t N. - É Ê ; = ³ HS/ &&Og GH KR`^ ! 72GN. - ? ¿ ! à B t @: = ³ HS/ &&Og GH HBED 72G& " À , F28 1 Ô 0 ƒ A ¡ . BK0 Ô 0 ƒ A x y Á Ï & Z Á Ï Ì Ë t S n Æ Ç Å i Í 9 - • & - • | } ¢ ¤ ! Ó T u þ Ö ° Å , þ Â t ¸ ¹ r a • ' * N272U • ' " RY- YR/ #! Q@D@C • ' " R/ YR- / #¡ - FFK-K2U • ' " / - R#! ; ¨ ä í t ° Å ¥ c t ¶ • Ô T u Ö o ‡ ¾ w t ‡ c n ! q 5 ; p ý ½ " - 47AKU "' $# HBE- ! t ± Æ • ‡ c n { G ! ^ "9d ! Œ T • ‡ c n ^ ">d & T u „ w ^ & 9&9 TH Ë Ï ^ Q t T u &



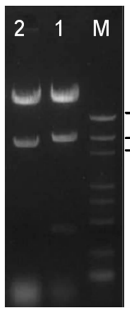
M$M@UKNQ %%%&h^/ 8 « ¬ | } &

M$M@UKNQ %%%&h^/ 8 @ HBAWF@@27 UKG6324

L &# #7&. / 0 ^/ 8 q r

A(5? &# H! 0 %# $:(/(;%("4 "/ #3& 5*4*

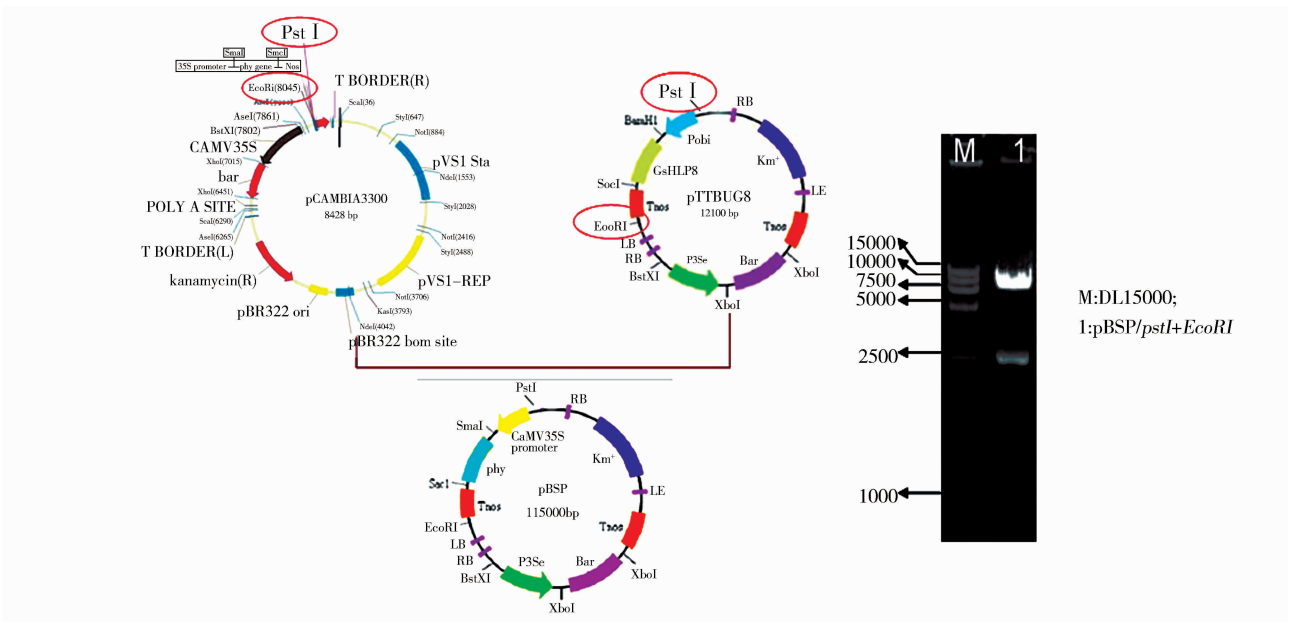
! 4! # K 9 - Î } Q K — H+0&! &gGH HBED 0 ì R = ³ H+0&! & e Ö $9([' Â Ã 72GCX , Â ! Ó [' Â Ä ¦ þ Ö &, HGD %¦ þ Ö &, mT@Ô 0 ƒ A ! 72GCX , Â %¦ þ Ö &, , F28%Ô 0 ƒ A & À mT@ , F28%• Ô 0 = ³ HS/ &&OgGH HBED 72G = Î &4= i T … † t #7&T u É Ê ¡ 72GCX , Â T u É Ê ! ; ³ † ‡ Ô 0 ' = Î t H+0&! &¼´ ? ¿ & – • & Ã Ä Å NP9! ! ~ þ Ö X? t Q+ { ´ 7 } T Ä õ º – • Å i !) I = ³ & À HGD ¡ , F28%• Ô 0 Á Ï ! 0 ï ! 49 i T ¡ O4$ i T ! # e & ý ¤ Ó = ³ Ë ^ @: = ³ ! ? …^ H+0&! &gGH HBED ' Ñ ! #&



M:DNA Marker 5000
1:pTTBUG8pstI+EcoRI,
2:pBl 12sp2phyI/pstI+EcoRI

L !# - Î } Q K — H+3&! &GH HBE0 L B M¦
A(5?!# > *4'(/(;%("4 "/ $:%4' *Q$&*..("4)*;'"&$D>&!&.$! $B9>

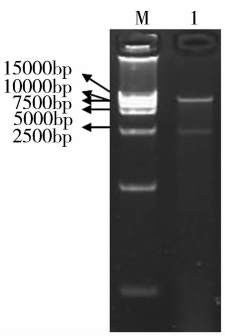
! 4$# S [\ - Î } Q K — H+(^ 0 ì R
À HGC0¡ , F28 %• Ô 0 = ³ H+0&! &gGH HBE0 = Î ! 49 i T … † t $9(: HBE 72GT u É Ê & ; ³ † ‡ Ô 0 ' = Î t HYY+SRO¼ ´ ? ¿ & – • & Ã Ä Å NP9! ! ~ þ Ö X? t Q+ 7 } T é î Ä õ º – • Å i !) I = ³ & À HGC0¡ , F280 • Ô 0 Á Ï ! 0 ï ! 49 i T¡ "49 i T ! # e & ý ¤ Ó = ³ Ë ^ @ : = ³ !? …^ H+(^" Ñ $#! ä ¦ • ÿ ! ¶ 8 ¢ £ ¼ ´ t 1 „ &



M:DL15000;
1:pBSP/*pstI+EcoRI*

L $#) » %" H(+^ 0 ì R " L B M¦
A(5? $# ! "4.'&,;'("4 %4- ;B%&%'*&(J%("4 8('B *4-"4,;:*%*. "/ &*;"# 7(4%("4 $:%# (- $D+H

! 4>#) » %"] ^ Œ_ ` a z
" À æÏ • Z Ä k t ¶ 8 ¢ £ ¼ ´ = ³ – • ™ Ð , Ä Å Q+- >>%&! ö I K Å i ÿ • ') I = ³ ! À HGC0¡ , F28 %• Ô 0 Á Ï & ¯ Ñ >! &º í â . ! 0 ï ! 49 i T¡ "49 i T ! # e & ý ¤ = ³ Ë ¨ h Ü ™ Ð , Ä Å &



M:Marker DL15000;
1:pBSP/*pstI+EcoRI*;

L ># #7&. / } Q K —] ^ ` a z 0 L B M¦
A(5? ># > *4'(/(;%("4 "/ $B9 5*4* *Q$&*..("4)*;'"&
'&%4./*&&*- (4'" %5&'7%'*&(, # ', # */(;(*4.

$# ƒ „

– T u ¶ 8 t " " ¡ 3 À ^ à n • € ¨ 9 ¥ q C Ù ú t 4 A & à B P º » ñ n ' ã K – T u ¶ 8 ^ à n t Ö • \ • 5 ¨ ¥ 1 „ þ • Y:N. - • t ¶ 8 ¢ £ ¼ ´ ! Z Q ñ T u ; º » ñ n T u ' R ~ o ‡ t Y:N. - • ! Ç v – T u ¶ ß Y A T u t ' —Õ ñ n T u ; Q ñ T u ' —! b ã à B } þ Q ñ T u t ^ à – T u Y A ¶ ß & | } ¢ ¤ ! WÀ þ $9([' Â ¡ Ø Ü ý ½ ¶ • Ô T u "#7&#t 5 ™ ¶ 8 ¢ £ ¼ ´ H+0&! &gGH HBE0 þ 9! / õ º ñ n T u ¡ ! , Y:N. - • t ¶ 8 ¢ £ ¼ ´ HYY+SRO¦ Í [1 „ ‹ ¯ $9([' Â Ü Ò þ G • WÀ Í Î T u "#7&#! ^ 0 9! / T u ^ º » ñ n t • ÿ ! ¶ 8 ¢ £ ¼ ´ H+(^& ^ à B P º » ñ n t – T u ^ à ¶ ß Y A) > ‹ T r & Ó . / ¼ ´ t 1 „ ï 5 À š 8 Ô ¡ = ³ ! 0 7 à á š ¯ Ô t 0 6 ; ? ¿ ! v ¾ • K ! b ã ª k ‹ ¼ ´ 1 „ x ¾ %¢ Ö 7 8 ‹ Ç v ^/ 8 « ¬ „ É Ê e ¥

的困难和失真性。

目前获得无选择标记基因转基因植株的方法有多种,其中包括利用非抗生素基因作为筛选标记基因,如 BADH(甜菜碱醛脱氢酶基因)[14];包括采用双 T-DNA 区,使筛选标记基因与目标基因位于不同的 T-DNA 区,通过转基因植株有性杂交后代基因的分离获得无选择标记的转基因安全植株[15-16]等对筛选标记基因进行定位剔除。

该研究构建了双边界表达载体,构建过程相对省时方便,但需要通过转基因植株后代的基因分离才能获得无选择标记的转基因植株。若能在转基因植株的当代剔除选择标记基因,则可加速获得转基因安全植株的进程。Guo 等[17]报道了一种化学调控诱导的 RNAi 系统可作为拟南芥基因沉默信号传导分子机制的研究工具,可考虑将此种技术引入大豆转基因研究中,通过使外源标记基因的沉默获得安全的转基因大豆植株。

致谢:本研究在黑龙江省作物与家畜分子育种重点实验室完成。

参考文献

[1] 霍丹群,范守城,张云茹,等. 黑曲霉 F246 的 *phyA* 基因克隆及其新型表达载体构建[J]. 重庆大学学报,2004, 27 (8):60-61. (Huo D Q,Fan S C,Zhang Y R,et al. The cloning of a phytase gene and the construction of two new types of the expression vector [J]. Journal of Chongqing University, 2004, 27(8):60-61.)

[2] Mullaney E J, Dalyc B, Ullaha H J. Advances in phytase research [J]. Advances in Applied Microbiology, 2000, 47:157-199.

[3] Lei X G, Porres J M. Phytase enzymology applications and biotechnology[J]. Biotechnology Letters, 2003, 25:1787-1794.

[4] Verwoerd T C, Paridon P A, Ooyen A J,et al. S table accumulation of Aspergillus niger phytase in transgenic tobacco leaves[J]. Plant Physiology,1995,109:1199-1205.

[5] Ponstein A S, Bade J B, Theo C V, et al. Stable expression of Phytase(phyA) in canola (*Brassica napus*) seeds: towards a commercial product[J]. Molecular Breeding ,2002,10:31-44.

[6] Denbow D M, Graubau E A, Lacy G H, et al. Soybean transformed with a fungal phytase gene improve phosphorus availability forbroilers[J]. Poultry Science,1998,77:878-881.

[7] Ullaha H J, Kandan S,Mullaney E J,et al. Cloned and expressed fungal phyA gene in alfalfa produces a s table phytase[J]. Biochemical and Biophysical Research Communication,2002, 290: 1343-1348.

[8] Ullaha H J, Kandan S, Mullaney E J, et al. Fungal phyA gene expressed in potato leaves produces active and stable phytase [J]. Biochemical and Biophysical Research Communication,2003,306: 603-609.

[9] Henrik B P, Annette O, Sren K R, et al . Generation o f transgenic wheat (*Triticum aestivum* L) for constitutive accumulation of an Aspergillus phytase [J]. Molecular Breeding,2000,6:195-206.

[10] 刘洪艳,弭晓菊,崔继哲. *bar* 基因、PAT 蛋白和草丁膦的特性与安全性[J]. 生态学杂志,2007,26 (6):938-939. (Liu H Y, Nie X J,Cui J Z, et al. Characteristics and safety of bar gene ,PAT proteins and glufosinate[J]. Chinese Journal of Ecology,2007, 26 (6):938-939.)

[11] 李杰, 李晶, 朱延明,等. DREB1A 基因植物表达载体的构建[J]. 东北农业大学学报,2003,34(2): 199-204. (Li J,Li J, Zhu Y M, et al. Construction of plant expression vector of DREB1A gene[J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2003,34(2):199-204.)

[12] 王关林. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 2002,(Wang G L. Publishing house of Science and Technology [M]. Biejing:Science Press,2002.)

[13] 萨姆布鲁克. 分子克隆实验指南(第 3 版)[M]. 北京:科学出版社,2002. (Sambrook. Molecular Cloning(Version 3)[M]. Biejing:Science Press, 2002.)

[14] Endo S, Sugita K, Sakai M, et al. Single-step transformation for generating marker-free transgenic rice using the ipt-type MAT vector system[J]. The Plant Journal,2002,30(1): 115-122.

[15] Komari T, Hiei Y, Saito Y, et al. Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by Agrobacterium tumefaciens and segregation of transformants free from selection markers[J]. The Plant Journal, 1996, 10(1): 165-174.

[16] Lu H J, Zhou X R, Gong Z X, et al. Generation of selectable marker-free transgenic rice using a double right-border (DRB) binary vector, Australia [J]. Plant Physiology, 2001,28(3): 241-248.

[17] Guo H S, Fei J F, Xie Q, et al. A chemical-regulated inducible RNAi system in plants [J]. Plant, 2003,34(3): 383-392.