

HrpZpsta 基因植物表达载体的构建及其在大豆中的转化

李 勃,付永平,王丕武,王 鹏,张云月,马 建

(吉林农业大学 生物技术中心,吉林 长春 130118)

摘 要:利用 PCR 技术扩增含有 *hrpZpsta* 基因的克隆载体 pMD18-T-*hrpZpsta*,以植物表达载体 pBI121 为基础,将 PCR 产物插入到此植物表达载体中。利用农杆菌介导的大豆子叶节转化法将构建好的表达载体导入大豆品种吉农 28 中,选用筛选条件为 $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的卡那霉素选择培养基培养,对获得的转基因植株进行 PCR 检测,结果从部分抗性植株中扩增出 *hrpZpsta* 基因,初步证明 *hrpZpsta* 基因成功转入到受体大豆中,获得了转基因阳性植株。

关键词:大豆;*hrpZpsta* 基因;表达载体构建;转基因植株

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2011)03-0393-04

Construction of Plant Expression Vector Involving *HrpZpsta* Gene and Its Transformation into Soybean

LI Bo, FU Yong-ping, WANG Pi-wu, WANG Peng, ZHANG Yun-yue, MA Jian

(Biotechnology Center of Jilin Agricultural University, Changchun 130118, Jilin, China)

Abstract: The *hrpZpsta* gene has broad disease-resistance and can improve the antiviral ability of plants. In this study, the *hrpZpsta* gene had been cloned from the cloning vector pMD18-T-*hrpZpsta*, and inserted into pBI121 to construct the vector pBI121-*hrpZpsta*. pBI121-*hrpZpsta* was transformed into cotyledon nodes of soybean Jinong 28 by *Agrobacterium*-mediated method. Kanamycin ($100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) was applied to select the transformed tissue in selecting medium. Extracted DNA among the transgenic plants and analyzed it by PCR. The positive results indicated that *hrpZpsta* gene was successfully transformed into the genome of transgenic soybean.

Key words: Soybean; *hrpZpsta* gene; Vector construction; Transgenic plants

植物病原细菌的 *hrp* (hypersensitive response pathogenicity) 基因决定病原菌对寄主的致病性,诱导非寄主或抗病寄主的过敏性反应 HR (hypersensitive reaction, HR), *hrp* 基因在植物病原细菌定殖和植物防卫反应诱导等方面具有重要作用^[1-2]。另外,还有报道表明 *hrp* 基因家族不仅可以诱导植物系统获得抗性,而且还可以诱导植物的其它有益反应^[3]。例如 HR 反应中产生的过敏素蛋白可以促进植物摄取营养,增强植物光合作用,促进种子萌发和植物发育,增大植株个体,提高作物的产量和质量^[4]。在近期的研究结果中,还发现 HR 反应可以提高蔬菜、水果的抗腐烂、抗霉变的能力,对虫害也有一定的趋避和抵抗功能^[5]。在烟草野火病原菌中发现的 *hrpZpsta* 基因是 *hrp* 基因家族中的一员。因此可以作为改良植物抗病性的主要基因应用于主要的农作物和经济作物。在目前的研究中,利用 *hrp* 基因改造的农作物和经济作物如黄瓜、水

稻、小麦等^[6-8],已经获得到了一定的成功,但是这种基因在大豆抗病性改良方面至今未见报道。因此,该试验利用广谱抗病性的 *hrpZpsta* 基因,构建含有 *hrpZpsta* 的重组植物表达载体,通过农杆菌介导的大豆子叶节进行转化,为进一步研究 *hrpZpsta* 基因对大豆病害的抑制作用、培育大豆抗病新株系奠定基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 菌种和质粒 菌种 *E. coli* DH5 α 、植物表达载体 pBI121 由吉林农业大学生物技术中心提供;含有 *hrpZpsta* 基因的 pMD18-T-*hrpZpsta* 重组克隆载体质粒,由吉林农业大学植物病理实验室提供。

1.1.2 植物材料 大豆品种吉农 28 作为转化的受体,由吉林农业大学生物技术中心提供。

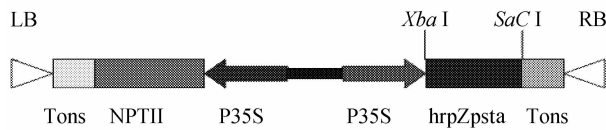
1.1.3 试剂与酶 PCR 扩增试剂、限制性内切酶、

收稿日期:2011-03-29

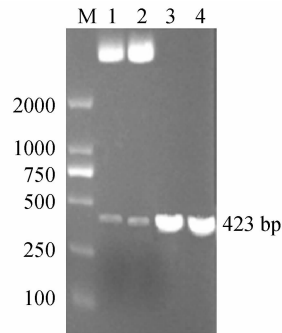
基金项目:国家转基因专项资助项目(2011ZX08004-004)。

第一作者简介:李勃(1985-),男,在读硕士,研究方向为作物生物技术。E-mail:lwawaai7@yahoo.com.cn。

通讯作者:王丕武(1958-),男,教授,从事生物技术与作物遗传育种研究。E-mail:peiwwu@yahoo.com.cn。



E ä, A î | ^ u • Š (ñäääŠ !
 * ŠýðWú E
 õ %ä, ! " ! " Šýð
 ! ! # ! ñäääŠ !



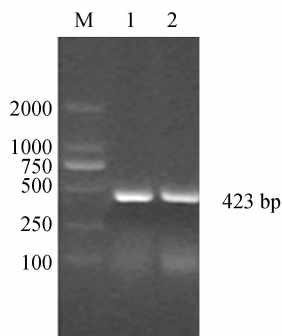
ü óóýðf %. ç è ôääý * 6 0 ôääýò 6 0

ü óóýð áóüääääô äéáó ! ! ' & ! Š
 " !ô äéáó ýò " !

E ä, ñäääŠ ! * ýò | ...B h i
 õ à ä, ! ! ' & ýò &
 ñäääŠ !

ä%ä, • • ' . ° ' * ½ ¾

d ç Ý u á q ð , Ü € • ýò Ñ " äýò Ñ "
 ± ² Ý í æ ' ê



ü óóýðf %. ç è áóüääääô äéáó ! 5 6

ü óóýð áóüääääô äääó ýò " !

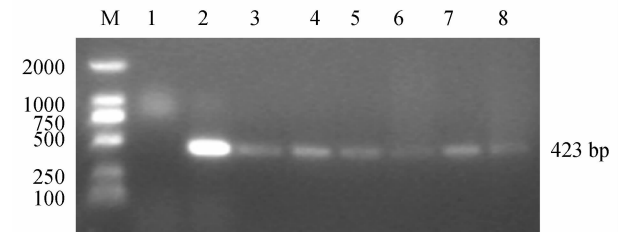
E æ ' C ýò h i
 õ à æ ýò ! ! !

ä%ä, • • ' < ' * ! " " • j t x

ï & ' g h ¶ , äêq % • | Q : x æ — ,
 š › ® a — € • < Ö z { w x q ^a P ç Ý æ Ý q
 x ö x K ž äää è ü^{ßä} q ° ± Æ p q r s ' ¶ 5
 ½ r s ' ¶ äâ î ï ä Ä x Ø á ¹ Ô ~ ç é Þ ä
 ð & › f ! ç Ý q % • | j T õ Ý ä u w È D s
 - ö , ê b c d ü Þ q & ' % • | : x T ÷ ~ q
 ó - ö , € • Â æ â š › ® a q & ' % • | ç Ý
 < Ñ Q è%Ü ê

ä%ä, t () | — * ýò š ›

é Š ...q D - ö , ~ Ý • b 5 6 Ö óýðQ Ä
 Å æ — ! 5 6 q ýäéýäÄ 0 € • ýò Ñ
 “ ä * t ^ óýð / ó - d ' ä ç Ý q : x ö ,
 / 9 - d ' æ ² ` D - ö , * ä Æ " Þ v F ç 3
 ê á ç ää » X › ! 5 6 ° U Ê ç ü á :
 x & ' g h * ä u v ç 5 6 ó - ö , ê



ü óóýðf %. ç è ôää ç 5 6 ö , ôää - d ' ôâ t ê ç 5
 6 ó - ö ,

ü óóýð áóüääääô äéáó ß ! !ô áó ! #
 ! ô ä ß éó ! ! ä

E ç , t ! () ! " * ýò š ›
 õ à ç , ýò ! ! ! ! \$! !

ä, W • - € •

æ ' W ° U q [\ v ž ¹ ! 5 6 q < Ö
 ö 0 z { w x ñäääŠ ! ä \$ — , š › ® a
 q & ' % • | ^a P ç Ý — ! < Ö ö 0 z { w x a
 ü á & ' g h ¶ , äê * ê . ýò Ñ " ä u v ž
¹ F q 5 6 ! q ó - ÷ ~ ö , ê b c d ü Þ
 q & ' % • | : x T ÷ ~ q ó - ö , € • Â æ â
 š › ® a q & ' % • | ç Ý < Ñ Q è%Ü ê

- x \$ ä n d Â ç 5 6 , g { ° - q K L Þ
 # • ú ê ÷ ! 5 6 ¥ ! q • Ž " D È
 Å • Ž æ 7 d ö 0 x ¾ S , - ö 0 q S 0 ¾ (
 ° Ä ; ê ' h • Ž q ^ _ / - È Ä v ö 0 x t ‡
 q c µ - p e æ d s ä › q ü ü æ ~ È ä q D
 s - ê 6 ' æ 5 6 È 9 Q { ° q æ 7 8 (n ê L
 d ç 5 6 / 0 q Ä Ä ê K " 3 ö , A ‡ D s - q
 ® ± æ Ä i : ; & ' Æ ^ q g t æ á v l D s
 ô " 6 q F q ê

÷ ! 5 6 L 8 Ä - - _ ß s ä › æ K & ' ö
 0 5 6 Ö * ç 7 Þ ‡ ê 6 ' æ — ýò S T d : x
 ç Ý ... ÷ ~ q ö , € • Ñ " æ i è : q Ç ä ç 5 6
 ó - ö , q ~ K ê ! ! 5 6 b c , š › ® a
 — ç Ý & ' t u v ÷ ~ ö , ê . ýò Ñ " , ¹ ó -
 ö , Þ ‡ æ › x 8 5 6 U f á & ' 5 6 Ö * ê

, f H I

ä , È È 1 æ » æ * Ö à - - _ ß s ä › ! 5 6 q R S 9

- 表达[C]. 第四届中国植物细菌病害学术研讨会论文集. 2008: 68-72. (Jiang Z Y, Gao J, Zhang J H. Clone and expression of *hrpZpsta* genes from *Pseudomonas syringae* pv. *tabaci* [C]. The 4th China National Symposium on Phytobacteriology, 2008:68-72.)
- [2] He S Y, Huang H C, Collmer A P. *Pseudomonas syringae* pv. *syringae* harpinPss: A protein that is secreted via the *hrp* pathway and elicits the hypersensitive response in plants[J]. Plant Journal, 1993,73:1255-1266.
- [3] 余榕捷, 洪岸, 庞义, 等. SZZ-Harpin 融合蛋白在苏云金芽孢杆菌中的表达及活性测定[J]. 微生物学通报, 2003,30(2): 11-15. (Yu R J, Hong A, Pang Y, et al. Expression and biological assay of SZZ-Harpin fusion protein in bacillus thuringiensis [J]. Microbiology, 2003,30(2):11-15.)
- [4] 傅华欣, 陆云梅, 毛华方, 等. 康壮素在塑料大棚草莓上的应用效果[J]. 安徽农业科学, 1999,27(6):596. (Fu H X, Lu Y M, Mao H F, et al. Studies on the technique of applying Harpin for the diseases control of strawberry grown in greenhouse [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 1999,27(6):596.)
- [5] 高正良, 马国胜, 周本国, 等. 康壮素对烟叶产质量及综合抗病虫能力的影响[J]. 烟草科技, 1999(5): 43-44. (Gao Z L, Ma G S, Zhou B G, et al. Effect of Harpin on yield, quality and disease, insect resistance of flue-cured tobacco[J]. Tobacco Science & Technology, 1999(5): 43-44)
- [6] 李先平, 何云昆, 陈善娜. 表达 *Harpin_Ea* 基因的转基因马铃薯的晚疫病抗性分析[J]. 云南农业大学学报, 2002,18(3): 252-257. (Li X P, He Y K, Chen S N. Analysis of late blight resistance in transgenic potato expressing *Harpin_Ea* gene[J]. Journal of Yunnan Agricultural University, 2002,18(3):252-257.)
- [7] 韩青梅, 孟颖光, 曹丽华. 过敏素类蛋白研究进展[J]. 河南农业大学学报, 2004,38(3):319-322. (Han Q M, Meng J G, Cao L H. Progress of studies on harpins[J]. Journal of Henan Agricultural University, 2004,38(3):319-322.)
- [8] 任秀艳. Harpins 蛋白在黄瓜上的研究进展[J]. 安徽农业科学, 2010,38(22): 11714-11716. (Ren X Y. Progress research on cucumber by Harpins [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2010,38(22):11714-11716.)
- [9] 王丕武, 武丽敏, 张君, 等. *Bt + CpTI* 抗虫基因转化大豆的研究[C]. 植物分子育种(第四届全国植物分子育种学术研讨会论文集), 2004. (Wang P W, Wu L M, Zhang J, et al. A study on transformation of *Bt + CpTI* insect resistant gene into soybean [C]. Molecular Plant Breeding (China Academic Journal Electronic Publishing House), 2004.)
- [10] Tougou M, Yamagishi N, Furutani N, et al. Soybean dwarf virus-resistant transgenic soybeans with the sense coat protein gene[J]. Plant Cell Reports, 2007,26: 196-197.
- [11] 许修宏, 曲娟娟, 张喜萍, 等. 大豆疫霉根腐病研究进展[J]. 东北农业大学学报, 2003,34(4): 474-477. (Xu X H, QU J J, Zhang X P, et al. Progress of research on *Phytophthora* root rot [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2003,34(4): 474-477.)
- [12] 张洁, 张东旭, 商蕾. 转基因技术在大豆育种上的应用与研究[J]. 华北农学报, 2008,23(2):133-138. (Zhang J, Zhang D X, Shang L. Study and application of transgenic technology in soybean breeding [J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2008,23(2):133-138.)
- [13] 赵桂兰, 刘艳芝, 李俊波, 等. 影响农杆菌介导的大豆基因转化因素的研究[J]. 大豆科学, 2001,20(2):84-88. (Zhao G L, Liu Y Z, Li J B, et al. Study on factors influencing *Agrobacterium*-mediated soybean transformation [J]. Soybean Science, 2001,20(2):84-88.)

(上接第 392 页)

参考文献

- [1] 李福山. 大豆起源及其演化研究[J]. 大豆科学, 1994,13(1):61-66. (Li F S. The study on origin and evolution of soybean [J]. Soybean Science, 1994,13(1):61-66.)
- [2] 庄炳昌. 中国野生大豆研究二十年[J]. 吉林农业科学, 1999,24(5):3-10. (Zhuang B C. Researches on wild soybean (*Glycine soja*) in China for twenty years [J]. Journal of Jilin Agricultural Science, 1999,24(5):3-10.)
- [3] 薛中天, 徐美琳, 庄乃亮, 等. 野生大豆 (*Glycine soja* SH1) 球蛋白 *glycinin* Gy4 基因家族的两种表达拷贝[J]. 中国科学(B 辑), 1987(8):36-43. (Xuan Z T, Xu M L, Zhuang N L, et al. SH1 Two expression copies of *glycinin* Gy4 gene family in *Glycine soja* [J]. Science in China (B Series), 1987(8):36-43.)
- [4] 王果. 河南省野生大豆资源遗传多样性分析[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2007. (Wang G. The genetic diversity of annual wild soybeans in Henan province [D]. Yangling: Northwest A & F University, 2007.)
- [5] 赵丽梅, 董英山, 刘宝, 等. 中国一年生野生大豆 (*Glycine soja*) 核心资源构建[J]. 科学通报, 2005(10):992-999. (Zhao L M, Dong Y S, Liu B, et al. Core resources construction of annual wild soybean (*Glycine soja*) in China [J]. Science Bulletin, 2005(10):992-999.)
- [6] 李建东, 燕雪飞, 董思言, 等. 辽宁省野生大豆种质资源的 SSR 遗传多样性分析[J]. 大豆科学, 2010,29(1):29-32. (Li J D, Yan X F, Dong S Y, et al. Analysis of genetic diversity of *Glycine soja* germplasm resources in Liaoning province [J]. Soybean Science, 2010,29(1):29-32.)
- [7] Doyle J J, Doyle J L. A rapid isolation procedure for small quantities of fresh leaf tissue[J]. Phytochemical Bulletin, 1987,9:11-15.
- [8] Sanguinetti C J, Dias N E, Simpson A J G. Rapid silver staining and recovery of PCR products separated on polyacrylamide gels [J]. Biotechniques, 1994,17:915-919.
- [9] Vavilov N I. The origin, variation, immunity and breeding of cultivated plants [M]. New York: Academic Press, 1973.
- [10] 董英山, 庄炳昌, 赵丽梅, 等. 中国野生大豆遗传多样性中心[J]. 作物学报, 2000,26(5):521-527. (Dong Y S, Zhuang B C, Zhao L M, et al. The genetic diversity centers of annual wild soybean in China [J]. Acta Agronomica Sinica, 2000,26(5):521-527.)
- [11] 李福山, 王衍桐. 野生大豆分布与环境条件[J]. 大豆科学, 1989,8(3):245-251. (Li F S, Wang Y T. The distribution and environment condition of wild soybean (*Glycine soja*) [J]. Soybean Science, 1989,8(3):245-251.)