

大豆凝集素基因 *Le2* 克隆及转化

方 标,王丕武,于 雷,卢春蕾

(吉林农业大学 农学院,吉林 长春 130118)

摘 要:大豆凝集素对提高植物的抗虫性有重要作用。应用基因工程手段,克隆大豆凝集素基因 *Le2*,构建植株表达载体 pSy-*Le2*,将大豆凝集素 *Le2* 基因通过农杆菌介导法导入烟草中,经过筛选获得转基因植株,为进一步鉴定 *Le2* 的基因功能提供了试验基础。

关键词:大豆凝集素;基因工程;抗虫性;农杆菌;烟草

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2011)04-0706-04

Cloning and Transformation of Soybean Lectin Gene *Le2* into Tobacco

FANG Biao, WANG Pi-wu, YU Lei, LU Chun-lei

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

Abstract: Soybean lectin(Soybean agglutinin) is a major protein in soybean, which plays an important role in plant insects resistance as a main anti-nutritional factors. In this study, the soybean lectin gene *Le2* had been cloned by genetic engineering technology, then constructed the recombinant plant expression vector pSy-*Le2* and transformed it into tobacco by *Agrobacterium* mediated way. Transgenic plant had been selected, which supplied basic materials for further experiments.

Key words: Soybean lectin; Genetic engineering; Insect resistance; *Agrobacterium*; Tobacco

虫害是造成作物产量损失的重要生物胁迫因子,提高植物抗虫性是降低产量损失的重要途径。大豆凝集素是大豆蛋白质的构成成分之一,同时也是大豆中主要的抗营养因子,大豆凝集素基因对于提高植物的抗虫性有重要作用^[1-3]。

凝集素是自然界广泛存在的一大类能凝集红细胞,多糖或糖复合物的非源于免疫反应的糖蛋白。通常所说的大豆凝集素是指对 N-乙酰基 D-半乳糖胺/D-半乳糖有结合特异性、分子量约 120 KDa-类糖蛋白,在超速离心中随 7S 蛋白一起沉降,每个亚基都有 1 个共价连接的含 9 个甘露糖的 (Man9NAc)的寡糖链。大豆凝集素具有典型的豆类凝集素的四级结构,由等量的 2 种略有不同的 4 个亚基组成,每个亚基分子量约 30 KDa^[4]。Lotan 等^[5]测定了大豆凝集素的氨基酸组成,发现大豆凝集素富含酸性和羟基氨基酸,尤其是 4-羟基脯氨酸的含量较高,而胱氨酸、蛋氨酸含量较低。大豆凝集素亚基完整的基因序列已经被测出(其基因库登录号为 K00821 和 M30884),每个亚基中含有 253 个氨基酸残基,每个亚基都有 1 个共价连接的含 9 个甘露糖 (Man9NAc)的寡糖链。

近年来,抗虫基因在抗虫育种上的应用为预防虫害提供了一条新的途径,主要指将具有抗虫性的基因通过现代科技手段转入到目标生物体中,使受体生物在原有遗传特性基础上增加新的功能特性,获得新的品种,较传统育种具有准确、直接、高效等特点。为此,该项研究应用基因工程手段,克隆大豆凝集素基因,构建植株表达载体,将表达载体利用农杆菌介导法导入到烟草,经过筛选获得转基因植株,从而为鉴定大豆 *Le2* 基因的功能提供试验基础。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 菌种和质粒 大肠杆菌 (*E. coli*) DH5 α 、根癌农杆菌 EHA105、植物表达载体 pBI121,由吉林农业大学生物技术中心提供。克隆载体 pMD18-T Vector 购自 TaKaRa 公司。

1.1.2 大豆品种 大豆品种吉农 18 由吉林农业大学生物技术中心提供。

1.1.3 试剂与酶 PCR 扩增相关试剂、限制性内切酶 (*Xba*I、*Sac*I) DNA Marker DL2000、T₄ DNA 连接

收稿日期:2011-05-03

基金项目:国家转基因专项资助项目(2011ZX08004-004);大学生科技创新基金资助项目。

第一作者简介:方标(1988-),男,学士,研究方向为作物遗传育种。E-mail:yongpingf@yahoo.com.cn。

通讯作者:王丕武(1958-),男,教授,博士生导师,从事作物遗传育种研究。E-mail:peiwwu@yahoo.com.cn。

酶购自 TaKaRa 和 MBI 公司,其它试剂均为国产分析纯产品。

1.1.4 主要仪器设备 移液枪、恒温振荡培养箱、光照培养箱、低温离心机、PCR 仪、电泳仪、凝胶成像仪、超净工作台、pH 酸度计、超低温冰箱等。

1.2 试验方法

1.2.1 *Le2* 的克隆和序列分析 采用 CTAB 法^[6]提取大豆幼嫩叶片的基因组 DNA。

根据已注册的序列(K00821),利用软件设计引物(画线部分为加入的酶切位点)。

Le2S: 5'-GGG TCTAGA ATGGCTACCTCCAAGT-TCCAT-3'

Le2AS: 5'-TTT GAGCTC CTAGATAAAGATTG-CAAAATGCG-3'

PCR 扩增条件为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 50 s;50℃ 退火 50 s;72℃ 延伸 50 s;共 30 个循环;最后 72℃ 延伸 8 min。

将 PCR 扩增片段进行琼脂糖凝胶电泳,然后利用 V-gene 凝胶回收试剂盒回收目的片段,将回收产物与克隆载体 pMD18-T Vector 连接,连接液转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,通过含有 Amp⁺ 是否为上角的 LB 筛选培养基进行蓝白斑筛选,提取白斑的单克隆质粒 DNA,利用 PCR 和双酶切进行鉴定,将 PCR 和双酶切鉴定都正确的重组克隆载体命名为:pMD18-T-*Le2*。测序由北京三博远志有限公司完成,并通过 DNAMAN 软件对其进行序列分析。

1.2.2 *pSy-Le2* 表达载体构建 以植物表达载体 pBI121 为基础,利用 *Xba*I 和 *Sac*I 分别双酶切 pMD18-T-*Le2* 和 pBI121,将 pMD18-T-*Le2* 小片段和 pBI121 大片段用 T₄ DNA 连接酶连接,然后转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,通过含有 Kan 的 LB 筛选培养基进行筛选,提取单克隆的质粒 DNA,利用 PCR 和双酶切进行鉴定,将 PCR、双酶切鉴定以及测序都正确的重组植物表达载体命名为:pSy-*Le2*。

1.2.3 烟草的遗传转化 制备根癌农杆菌 EHA105 的感受态细胞,通过液氮冻融法^[7]将重组植物表达载体 pSy-*Le2* 转化到农杆菌 EHA105 中。采用农杆菌介导的烟草叶盘转化方法,对烟草品种 NC89 进行遗传转化。转化烟草的筛选培养基为 MS + 2.0 mg · L⁻¹ 6-BA + 0.5 mg · L⁻¹ IAA + 100 mg · L⁻¹ 氨基青霉素 + 100 mg · L⁻¹ 羧苄青霉素 + 100 mg · L⁻¹ kan。诱导生根培养基为 1/2MS + 80 mg · L⁻¹ 氨基青霉素 + 80 mg · L⁻¹ 羧苄青霉素 + 100 mg · L⁻¹ kan。

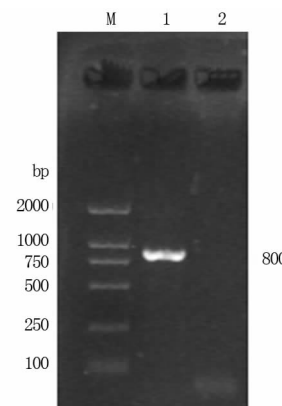
1.2.4 转基因植株的 PCR 检测 利用 CTAB 法,

提取再生植株叶片中的基因组 DNA。以其为模板,并利用未转化植株的基因组 DNA 做为阴性对照,以 pSy-*Le2* 作为阳性对照,以 *Le2* 基因的特异性引物进行 PCR 检测,扩增条件同 1.2.1。

2 结果与分析

2.1 大豆凝集素 *Le2* 基因的克隆

以提取的大豆基因组 DNA 为模板,进行 *Le2* 基因的 PCR 扩增。为了提高产物的特异性,该试验优化了 PCR 反应条件,其最佳反应条件为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 50 s;50℃ 退火 50 s;72℃ 延伸 50 s;28 个循环;然后 72℃ 后延伸 8 min。PCR 扩增反应结束后,将产物进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测,得到 1 条大小约 800 bp 的特异条带,结果与预期大小一致(图 1)。



M:DNA 分子量标准 DL2000;1:PCR 产物;2:水
M:DL2000 DNA Marker;1:PCR product;2:ddH₂O

图 1 PCR 扩增产物

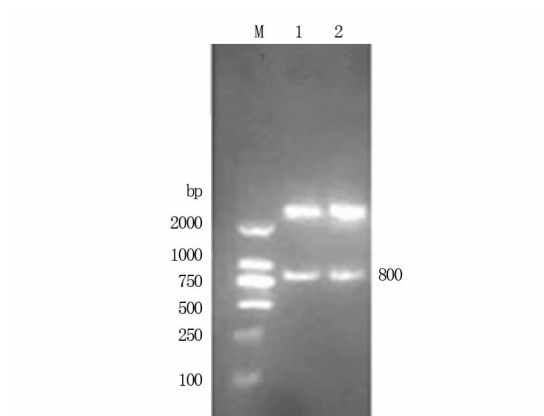
Fig.1 PCR product

2.2 克隆载体的构建和鉴定

将 *Le2* 基因连入克隆载体 pMD18-T, 获得 pMD18-T-*Le2*, 并测序。通过 pMD18-T-*Le2* 的 PCR 结果(图 2)以及 *Xba*I 和 *Sac*I 双酶切结果(图 3)表明,*Le2* 基因已经成功插入到克隆载体 pMD18-T 中。测序结果表明,*Le2* 基因全长 800 bp, 与已注册的基因同源性为 100%。因此,可推测克隆的片段为大豆凝集素 *Le2* 基因。

2.3 植物表达载体 pSy-*Le2* 的构建

利用 *Xba*I 和 *Sac*I 分别双酶切重组克隆载体 pMD18-T-*Le2* 和植物表达载体 pBI121,将 *Le2* 小段基因插入到 pBI121 载体 35S 启动子的下游,替换了 pBI121 中的 *gus* 基因,构建得到重组植物表达载体 pSy-*Le2*。对重组表达载体 pSy-*Le2* 进行 *Xba*I 和 *Sac*I 双酶切和测序鉴定表明(图 4),获得 800 bp 的预期目的片段,证明重组植物表达载体 pSy-*Le2* 构建成功。



M: DNA 分子量标准 DL2000

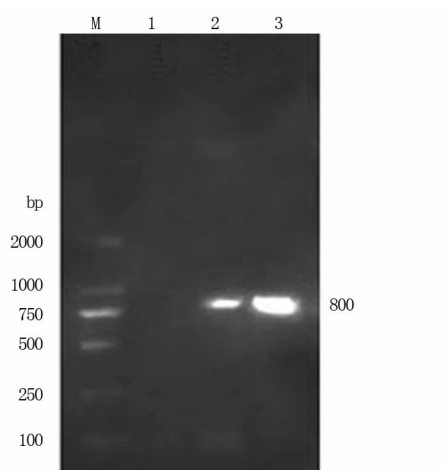
2,3: PCR 产物

M: DL2000 DNA Marker

2,3: PCR product

图 2 PCR 产物的电泳分析

Fig. 2 Electrophoresis of PCR product



M: DNA 分子量标准 DL2000

1,2: *XbaI* 和 *SacI* 双酶切

M: DL2000 DNA Marker

1,2: pMD18-T-*Le2* digested by *XbaI* and *SacI*

图 3 重组克隆载体的双酶切鉴定

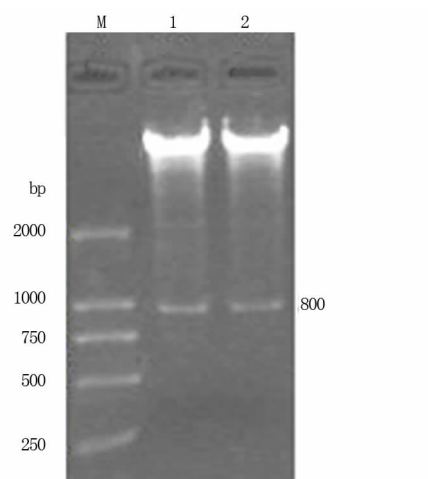
Fig. 3 Restriction identification of the recombinant vector

2.4 PCR 检测转基因烟草植株

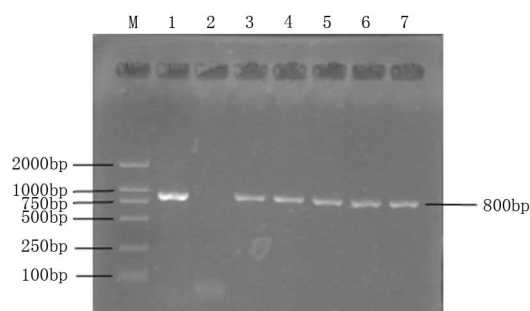
利用液氮冻融法,将 pSy-*Le2* 转化到根癌农杆菌 EHA105 中,然后利用此工程菌转化烟草幼嫩叶片,通过卡那霉素的筛选,获得一批再生植株。以再生植株的基因组 DNA 为模板,经 PCR 扩增得到一条特异的约 800 bp 扩增条带(图 5)。

3 讨论

抗虫转基因植物的研究在我国已取得了较大的进展。目前,抗虫基因主要有 3 种不同的类型:第 1 种为从植物组织中克隆得到的抗虫基因,主要为凝集素基因、淀粉酶基因、蛋白酶抑制剂基因

M: DNA 分子量标准 DL2000; 1,2: *XbaI*/*SacI* 双酶切

M: DL2000 DNA Marker;

1,2: pSy-*Le2* digested by *XbaI* and *SacI*图 4 pSy-*Le2* 的双酶切鉴定Fig. 4 Identification of pSy-*Le2*M: DNA 分子量标准; 1: pSy-*Le2* 质粒阳性对照;

2: 未转基因植株阴性对照; 3~7: 转基因植株

M: DNA Marker; 1: Positive control of

plasmid pSy-*Le2*;

2: Negative control of non-transformed plant;

3-7: Putative transgenic plants

图 5 转基因烟草的 PCR 和分析

Fig. 5 PCR analysis of transgenic tobaccos

等^[9];第 2 种为来自苏云金芽孢的 *Bt* 杀虫蛋白基因,其对鳞翅目、双翅目、鞘翅目等昆虫有毒,现在已经转化的 *Bt* 基因,主要毒杀鳞翅目害虫,对人畜安全,目前已经转入到棉花、玉米、马铃薯、胡桃、杨树、落叶松等植物^[8]。迄今利用最广泛也最有潜力的即为 *Bt* 杀虫蛋白基因;第 3 种为从动物体内分离得到的抗虫基因,主要为蝎毒素基因、蜘蛛毒素、昆虫几丁质酶基因等^[10]。

大豆凝集素基因对于植株的抗虫性有重要的作用,当前对于植株虫害的防治主要是靠农药,造成很严重的环境污染,而转基因育种具有无污染,快速等优点,因此凝集素基因在植株的抗虫性上有很大的应用潜力。该研究克隆了大豆凝集素基因 *Le2*,构建植物表达载体 pSy-*Le2*,将大豆凝集素基因

(*Le2*) 导入到烟草的基因组中, 获得了转基因烟草, 为进一步鉴定 *Le2* 基因功能提供了试验基础。

参考文献

- [1] 高燕会, 李润植, 毛雪, 等. 植物凝集素的防卫功能及其研究进展[J]. 世界农业, 2000(2): 33-35. (Gao Y H, Li R Z, Mao X, et al. Plant lectin defence function and its research progress [J]. World Agriculture, 2000(2): 33-35.)
 - [2] 潘洪彬, 秦贵信, 孙泽威. 大豆凝集素抗营养的研究进展[J]. 大豆科学, 2005, 24(3): 210-215. (Pan H B, Qin G X, Sun Z W. Soybean lectin antioxidant nutrients research progress[J]. Soybean Science, 2005, 24(3): 210-215.)
 - [3] 李凤玲, 徐培洲, 肖祎, 等. 植物凝集素及其在抗虫基因工程中的应用[J]. 安徽农业科学, 2006, 34(3): 430-432, 439. (Li F L, Xu P Z, Xiao W. Plant lectin and insect-resistant genes engineering application [J]. Journal of Anhui Agricultural Sciences, 2006, 34(3): 430-432, 439.)
 - [4] 张柏林, 秦贵信, 刘宁, 等. 大豆凝集素结构及其活性测定方法的研究进展[J]. 大豆科学, 2009, 28(1): 160-163. (Zhang B L, Qin G X, Liu N. Advances of research on structure and activity detecting method of soybean agglutinin [J]. Soybean Science, 2009, 28(1): 160-163.)
 - [5] Lotan R, Siegelman H W, Lis H, et al. Subunit structure of soybean agglutinin [J]. Journal of Biological Chemistry, 1974, 249: 1219-1224.
 - [6] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]//方宏筠. 抗植物虫害基因及其应用. 北京: 科学出版社, 2005: 532. (Wang G L, Fang H J. Plant gene engineering [M]// Fang H J. Resistance to plant pest gene and its application. Beijing: Science Press, 2005: 532.)
 - [7] Hofen R, Willmitzer L. Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation [J]. Nucleic Acids Research, 1988, 16: 9877.
 - [8] 刘辰, 谢柳, 张文飞. 新型 Bt 杀虫蛋白: VIP 杀虫的机理与植物转基因应用[J]. 分子植物育种, 2008, 6(6): 1031-1037. (Liu C, Xie L, Zhang W F. Insecticidal mechanism of Bt vegetative insecticidal proteins and their application in GM crops [J]. Molecular Plant Breeding, 2008, 6(6): 1031-1037.)
 - [9] 武小霞, 李文滨. 大豆抗虫基因工程研究进展及发展趋势[J]. 东北农业大学学报, 2005, 36(4): 502-506. (Wu X X, Li W B. Research progress and development direction of soybean pest-resistance gene engineering [J]. Journal of Northeast Agricultural University, 2005, 36(4): 502-506.)
 - [10] 郭红. 抗病、抗虫转基因植物的研究与应用[J]. 现代农业科技, 2010(10): 85-87. (Guo H. Disease resistance, resistance to insects the research and application of transgenic plants [J]. Modern Agricultural Sciences and Technology, 2010(10): 85-87.)
-
- (上接第 705 页)
- [2] 田清震, 盖钧镒. 野生大豆种质资源的研究与利用[J]. 植物遗传资源科学, 2000, 1(4): 61-66. (Tian Q Z, Gai J Y. A review on the research and utilization of wild germplasm in soybean [J]. Plant Genetic Resources Science, 2000, 1(4): 61-66.)
 - [3] 江昌俊, 余有本. 苯丙氨酸解氨酶的研究进展[J]. 安徽农业大学学报, 2001, 28(4): 425-430. (Jiang C J, Yu Y B. Advances of studies on phenylalanine ammonia-lyase [J]. Journal of Anhui Agricultural University, 2001, 28(4): 425-430.)
 - [4] 贺立红, 张进标, 宾金华. 苯丙氨酸解氨酶的研究进展[J]. 食品科技, 2006, 731-34. (He L H, Zhang J B, Bin J H. Research progress of phenylalanine ammonia-lyase [J]. Food Science and Technology, 2006, 731-34.)
 - [5] 张淑珍, 靳立梅, 徐鹏飞. 野生大豆接种大豆疫霉根腐病后苯丙氨酸解氨酶 (PAL) 活性的变化[J]. 大豆科学, 2009, 28(6): 1044-1048. (Zhang S Z, Ji L H, Xu P F. Response of PAL activity *Phytophthora sojae* inoculation in *Glycine soja* [J]. Soybean Science, 2009, 28(6): 1044-1048.)
 - [6] Hanson R R, Havir E A. Secondary plant products [C]. New York: Academic Press, 1981, 577-625.
 - [7] Jones D H. Review article number 3: phenylalanine ammonia-lyase. Regulation of its induction and its role in plant development [J]. Phytochemistry, 1984, 23(7): 1349-1359.
 - [8] 张必弦, 李炜, 来永才. 大豆苯丙氨酸解氨酶及其基因的研究进展[J]. 大豆科学, 2008, 27(6): 1058-1061. (Zhang B C, Li W, Lai Y C. Advances of studies on soybean phenylalanine ammonia-lyase and its gene [J]. Soybean Science, 2008, 27(6): 1058-1061.)