

大豆细胞质转化酶基因 *GmCInv* 的克隆与植物表达载体构建

王 彬,徐志华,侯金锋,郭 娜,赵晋铭,邢 邯

(南京农业大学 国家大豆改良中心,江苏 南京 210095)

摘 要:利用同源克隆方法从南农菜豆6号中克隆得到一个编码大豆细胞质转化酶(cytoplasmic invertase, *CInv*)的基因,命名为 *GmCInv*。序列分析发现该基因含有一个长1 956 bp的开放阅读框,编码652个氨基酸。预测其蛋白质分子量为73.88 kDa,等电点为6.12。与NCBI公布的部分蛋白质序列比对发现,*GmCInv* 蛋白序列与毛果杨(*Populus trichocarpa*)的相似性最高,达88%。组织表达分析表明,*GmCInv* 在大豆苗期的叶、开花期的花中表达量最高,在根、茎中表达量较低。利用Gateway技术得到植物过表达载体 pEarleyGate103-*GmCInv*,再转入根瘤农杆菌 EHA105 中,为 *GmCInv* 基因的转化及功能分析奠定了基础。

关键词:大豆; *GmCInv* 基因; Gateway 技术

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2014)02-0168-05

Cloning of Soybean Cytoplasmic Invertase Gene *GmCInv* and Construction of Its Plant Expression Vector

WANG Bin, XU Zhi-hua, HOU Jin-feng, GUO Na, ZHAO Jin-ming, XING Han

(National Center for Soybean Improvement, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China)

Abstract: Invertase(INV), also known as sucrase is a hydrolytic enzyme that catalyzed irreversibly hydrolysis of sucrose to fructose and glucose, providing the growth and development of the plant with carbon and energy. Cytoplasmic invertase gene was isolated from vegetable soybean Nannong 6 by homology cloning, designed as *GmCInv*. *GmCInv* contained a 1 956 bp open reading frame, encoding a 652 amino acids protein. The protein is estimated to have a molecular weight of 73.88 kDa and isoelectric point of 6.12. Comparing with the amino acid sequence of *CInv* from other species on NCBI, *GmCInv* has a highest similarity of 88% with the *CInv* from *Populus trichocarpa*. The mRNA abundance of *GmCInv* in leaves of seedling stage and in flowers of florescence stage were higher than in stems and roots of the both stages. A plant over-expression vector of pEarleyGate103-*GmCInv* was constructed by Gateway technology, and was transferred into *Agrobacterium* EHA105, which would lay a foundation of its conversion into the plant and provide a foundation for further studying the function of *GmCInv* gene in soybean.

Key words: Soybean (*Glycine max* L. Merr.); *GmCInv* gene; Gateway technology

转化酶(invertase, EC 3.2.1.26)不可逆催化蔗糖水解成D-葡萄糖和D-果糖,存在着多种同工酶形式。这些同工酶根据它们的亚细胞定位结果可分为细胞壁转化酶、液泡转化酶和细胞质转化酶^[1]。细胞质转化酶(cytoplasmic invertase, *CInv*)存在于细胞质中,活性的最适pH为中性或弱碱性(pH 7.0~8.0),故称为中性/碱性转化酶。最近研究表明 *CInv* 定位于植物线粒体、质体等细胞器上^[2]。目前细胞质转化酶蛋白已经从胡萝卜和甘蔗中纯化出来,细胞质转化酶的cDNA克隆也已从裸麦和蓝细菌中分离出来^[3-6]。

研究发现,转化酶活性对糖类信号的作用是调节蔗糖浓度或者是产生葡萄糖信号,转化酶还能调控碳水化合物分配、植物的发育、对环境的应激

响应、伤口和病菌侵染的应答等^[7-9]。植物转化酶对植物的生长发育有影响,相关报道表明细胞质转化酶基因的功能缺失影响拟南芥根生长。拟南芥细胞质转化酶 *AtCINV1* 的突变体 *cinv1* 中细胞壁转化酶的活性降低,并且根缩短,蔗糖含量升高,葡萄糖含量降低,说明 *CINV1* 具有催化蔗糖的功能。拟南芥突变体 *AtCYT-INV1* 主根缩短,叶片和荚果变小,与野生型相比花期提前, *AtCYT-INV1* 通过调节细胞中的己糖浓度参与渗透胁迫对侧根的抑制作用^[10]。细胞质转化酶参与维持细胞生长,对开花的调控和对环境刺激响应等功能^[11-13]。

由于细胞质转化酶极不稳定,酶活性在植物组织匀浆后迅速丧失,因此纯化十分困难,目前仅在几种植物中纯化得到电泳纯多肽,故与细胞质转化

收稿日期:2013-08-28

基金项目:国家转基因重大专项(2012ZX08004);国家自然科学基金(0106J1050);现代农业产业技术体系建设专项(CARS-04-PS10)。

第一作者简介:王彬(1987-),男,在读硕士,主要从事大豆分子遗传育种研究。E-mail:basibin2010@163.com。

通讯作者:邢邯(1963-),男,教授,博士生导师,主要从事大豆育种研究。E-mail:hanx@njau.edu.cn。

酶相关的研究也相对较少。本研究在大豆中克隆得到 *GmClnv* 基因,利用 Gateway 技术构建其过表达载体,为 *GmClnv* 基因的转化及功能分析奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

1.1.1 植物材料 大豆品种南农菜豆 6 号由南京农业大学种质资源库保存,将大豆种子种植于装有营养土和蛭石(1:2)的花盆中,置入人工气候箱培养,待幼苗长至 2 周龄,取其叶片,液氮速冻后放入 -80°C 冰箱保存。

1.1.2 菌株、载体及试剂 用于遗传转化的大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株 DH5 α 购自北京天根公司。克隆载体 pMD19-T Simple Vector 购自 TaKaRa 宝生物工程(大连)有限公司。植物遗传转化所用的根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株 EHA105 和植物表达载体 pEarleyGate103 由本实验保存。RNA 提取试剂盒购自天根公司,ExTag DNA 聚合酶、M-MLV 反转录酶购自 TaKaRa 公司。DNA 回收试剂盒购自上海赛百盛公司,引物合成由 Invitrogen 公司完成。Gateway BP reaction 试剂盒、Gateway LR reaction 试剂盒及入门载体 pDONR221 购于 Invitrogen 公司。

1.2 目的基因 *GmClnv* 的克隆

用 RNA 提取试剂盒提取大豆叶片的总 RNA,利用 cDNA 第一链合成试剂盒进行反转录,合成 cDNA。根据拟南芥细胞质转化酶基因 *AtClnv1* (登录号:AM230708)序列为探针,在大豆基因组数据库中(<http://www.phytozome.net/>)进行 Blast 搜索,得到一个同源性较高的基因,命名为 *GmClnv*。利用 Primer Premier 5.0 软件设计引物:上游引物:5'-AC-CACACTCTCAGTCCTTCTC-3',下游引物:5'-TTTCATCACAATCAACCCA-3'。扩增程序为:95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min,94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s,54 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s,72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 2 min,共 35 个循环,最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min,4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。PCR 产物用 1% 的琼脂糖凝胶进行电泳检测,选择目的条带采用胶回收试剂盒进行回收后,与 pMD19-T vector 连接,转化大肠杆菌感受态细胞,将长出的阳性单克隆送 Invitrogen 公司进行测序。

1.3 目的基因的生物学分析与组织表达

用软件 BioXM2.6 分析 *GmClnv* 编码的氨基酸序列、蛋白质分子量以及等电点。在 NCBI 上搜索其他物种的 *Clnv* 基因的氨基酸序列,利用 Clustalx 和 MEGA5.0 软件分别进行氨基酸序列同源性比对和进化树分析。

于大豆第一对真叶完全展开后分别取根、茎、叶;盛花期再取根、茎、叶及花,提取 RNA,以大豆的 *Tublin* 基因为内参,*Tublin* 基因的上游引物为:5'-GTTGAAAAGCCAGGGGACA-3',下游引物为:5'-TCTTACCCCTTGAGCGTGG-3'。目的基因的上游引物为:5'-TTAGCATTACATTCCCAGTTTCG-3',下游引物为:5'-TCCACTCGCACTTTCAGCC-3'。进行实时荧光定量 PCR 分析不同时期不同组织中 *GmClnv* 基因的表达情况。

1.4 植物过表达载体的构建

根据 Gateway 技术设计引物,在引物的两端加上特异性重组序列 attB 序列。

上游引物为:

5'-GGGGACAAGTTTGTACAAAAAAGCAGGCT

TCATGTCCCTGGGTACATCC-3'

下游引物为:

5'-GGGGACCACTTTGTACAAGAAAGCTGGGT

CTACAATGTAAGTCTGCCT-3'。

BP 反应体系(10 μL): pDONR221 vector 0.5 μL , attB-PCRproduct 2 μL , BP CloneTM 酶 1 μL , TE-Buffer 6.5 μL 。短暂离心后 25 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 16 h,加入 1 μL 蛋白酶 K,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 10 min,终止反应。

取 1 μL BP 反应液用热激法转化 DH5 α 感受态细胞,将转化的细胞均匀涂在 LB 固体培养基上(加 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 除草剂),37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床上培养 12~16 h。挑取单克隆,菌液 PCR 检测,阳性克隆送往 Invitrogen 公司测序。测序结果正确的菌液摇菌提取质粒,作为入门载体进行下一步实验。

LR 反应体系(10 μL): Entry clone 2 μL , pEarleyGate103 2 μL , TE-Buffer (pH 8.0) 4 μL , LR CloneTM 酶 2 μL 。短暂离心后 25 $^{\circ}\text{C}$ 温浴 16 h,加入 1 μL 蛋白酶 K,37 $^{\circ}\text{C}$ 温育 10 min,终止反应。

取 1 μL LR 反应液热激法转化 DH5 α 感受态细胞,将转化的细胞均匀涂在 LB 固体培养基上(加 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 除草剂),37 $^{\circ}\text{C}$ 摇床上培养 12~16 h。挑取单克隆,菌液 PCR 检测,阳性克隆送往 Invitrogen 公司测序。将测序结果正确的菌液摇菌,提取质粒,即为表达载体。

1.5 农杆菌的转化

用冻融法将构建好的过表达载体转化根癌农杆菌 EHA105,转化的细胞均匀涂在 YEB 固体培养基上(含 20 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 除草剂和 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的利福平),28 $^{\circ}\text{C}$ 摇床上培养 24~36 h。检测单克隆的方法与表达载体检测方法相同,阳性克隆扩大培养后部分保存在 -80°C 冰箱备用。

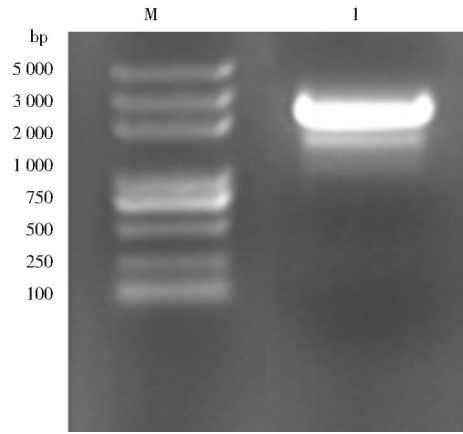
2 结果与分析

2.1 *GmClnv* 基因的克隆

以大豆叶片 cDNA 为模板,用克隆引物进行 PCR 扩增,1% 的琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测,扩增得到与预测大小相符的特异性条带,并与克隆载体 pMD19-T vector 连接,测序结果表明所克隆的目的基因和大豆基因组数据库中相应基因的碱基序列相似性超过 99%,氨基酸序列一致,证实为同一个基因(图 1)。

2.2 *GmClnv* 基因的生物学分析与组织表达分析

克隆的目的基因 *GmClnv* 的开放阅读框是 1 956 bp,编码 652 个氨基酸,基因编码的蛋白质分子量是 73.88 kDa。以 *GmClnv* 编码的蛋白质序列与 NCBI 公布的部分蛋白质序列比对发现,植物细



M:DL 2 000 Marker;1:*GmClnv* 的 PCR 产物。

M:DL 2 000 Marker;1:The PCR products of *GmClnv*.

图 1 *GmClnv* PCR 扩增产物

Fig. 1 The PCR products of *GmClnv*

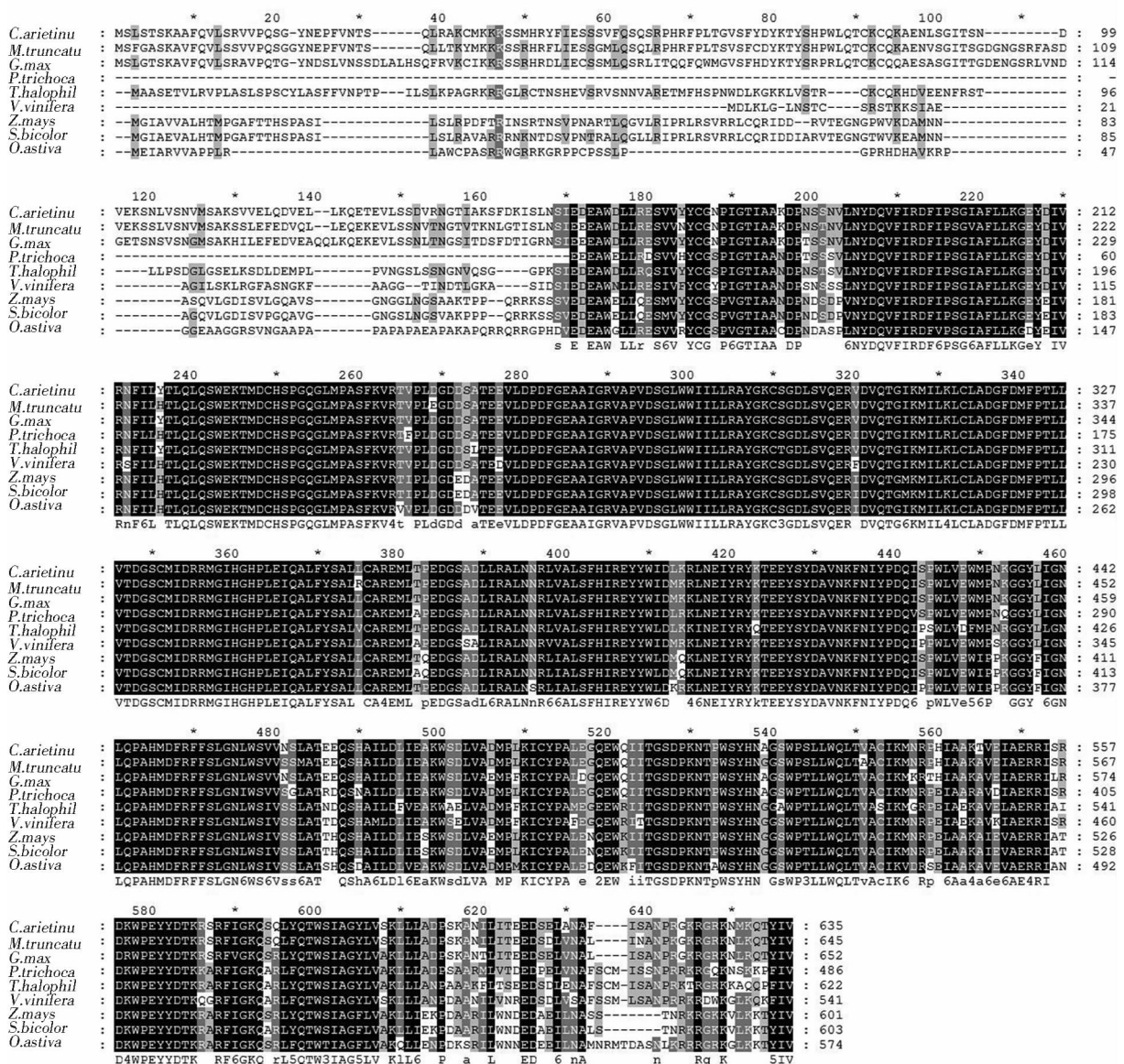


图 2 *GmClnv* 与其他作物的 Clnv 氨基酸序列比对

Fig. 2 Sequence multiple alignment of the *GmClnv* with various Clnv proteins from other species

胞质转化酶氨基酸序列保守区域较多,大豆与其他植物细胞质转化酶氨基酸序列相似性较高(图2)。本研究所克隆的 *GmCInv* 与毛果杨(*Populus trichocarpa*, XP_002311958.1)、蒺藜苜蓿(*Medicago truncatula*, XP_003630134.1)、鹰嘴豆(*Cicer arietinum*, XP_004504002.1)、玉米(*Zea mays*, ACF84899.1)、小盐芥(*Thellungiella halophila*, BAJ33980.1)、高粱(*Sorghum bicolor*, XP_002452195.1)、葡萄(*Vitis vinifera*, CBI17063.3)、水稻(*Oryza sativa*, CAE04902.1)的蛋白序列相似性分别为88%、86%、86%、85%、84%、84%、84%和82%。依据数据绘制氨基酸序列进化树(图3)。

GmCInv 基因的组织表达分析表明,该基因在大豆的各个组织中均有表达,但是表达水平有所差异。

GmCInv 在大豆苗期的叶、开花期的花中表达量较高,在两时期的根、茎中表达量都较低(图4)。

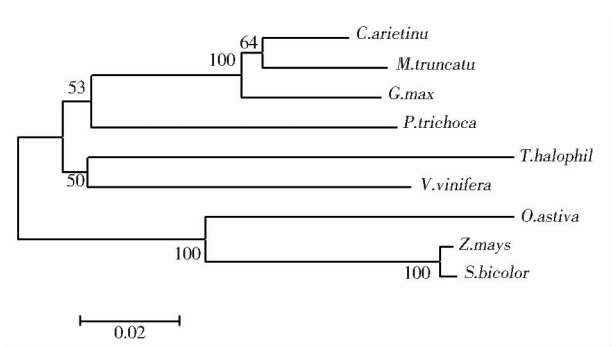


图3 *GmCInv* 与其他物种的进化树分析
Fig.3 The phylogenetic tree of *GmCInv* with other species

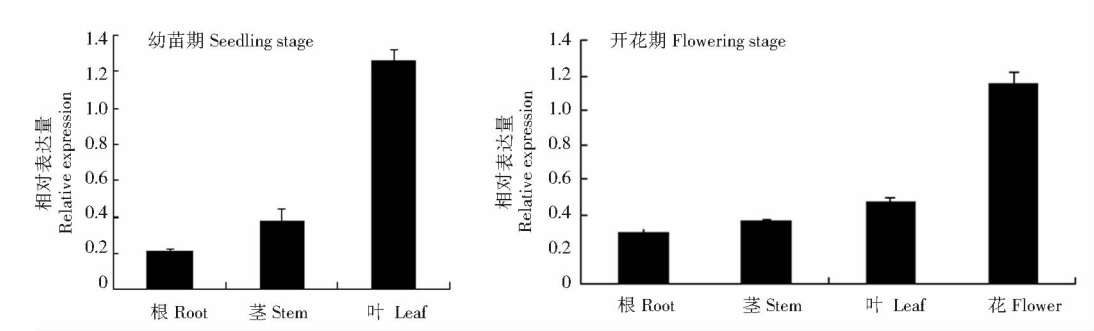
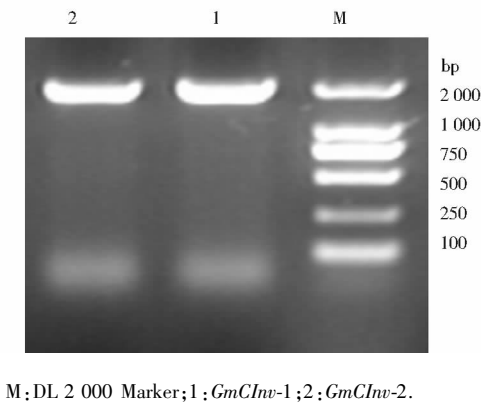


图4 *GmCInv* 组织表达分析
Fig.4 Tissue expression analysis of *GmCInv*

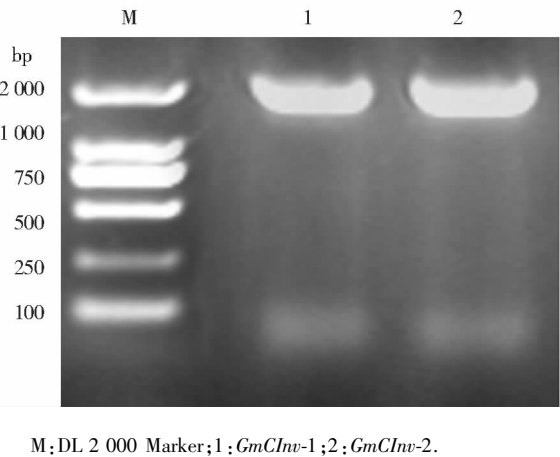
2.3 *GmCInv* 植物过表达载体的构建

2.3.1 入门载体的构建 将PCR产物与入门载体pDONR221进行连接,转化大肠杆菌DH5 α 感受态细胞,以菌液为模板进行PCR检测,1%琼脂糖凝胶电泳检测条带大小(图5),并把阳性克隆测序,测序结果与目的片段序列完全一致,说明目的片段正确插入到入门载体中。对测序正确的菌液提取质粒。

2.3.2 表达载体的获得 利用入门载体把目的片段连接到表达载体pEarleyGate103中,转化大肠杆菌DH5 α 感受态,以菌液为模板,用带接头的引物进行PCR检测,1%琼脂糖凝胶电泳检测条带大小(图6),筛选的阳性克隆送去测序,测序结果与目的片段序列完全一致,说明目的片段正确插入到表达载体中。对测序正确的提取质粒。



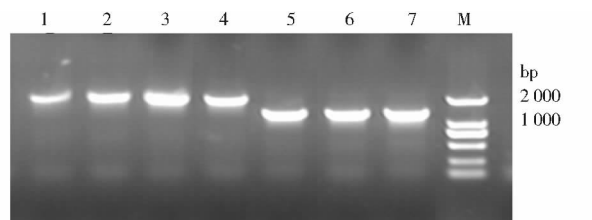
M; DL 2 000 Marker; 1; *GmCInv*-1; 2; *GmCInv*-2.
图5 BP反应菌液PCR的鉴定
Fig.5 PCR Identification of BP reaction in bacteria liquid



M; DL 2 000 Marker; 1; *GmCInv*-1; 2; *GmCInv*-2.
图6 LR反应菌液PCR的鉴定
Fig.6 PCR Identification of LR reaction in bacteria liquid

2.4 植物过表达载体转化农杆菌

将构建好的过表达载体用冻融法转化根癌农杆菌 EHA105,挑取单克隆进行 PCR 检测,结果证明重组表达载体成功导入农杆菌中(图 7)。



M:DL 2 000 Marker;1,2,3,4,5,6,7: *GmCInv*-1, *GmCInv*-2, *GmCInv*-3, *GmCInv*-4, *GmCInv*-5, *GmCInv*-6, *GmCInv*-7.

图 7 农杆菌转化阳性克隆 PCR 检测

Fig.7 The PCR products of positive clones for *Agrobacterium* mediated transformation

3 讨论

蔗糖是植物体内能量物质运输的主要方式,也是生命活动进行时利用碳水化合物的直接形式。转化酶在高等植物糖代谢中起着关键的作用,参与调节韧皮部糖的卸载、贮藏器官中糖的组成等。高媛媛等^[14]在研究番茄中性转化酶基因中指出番茄中性转化酶基因(*LeCInv*)在根、茎、叶、花中均有表达,但叶子中的表达量较高。姜立智^[15]在研究水稻蔗糖转化酶基因(*OsCInv*)中发现不同组织中,水稻的蔗糖转化酶基因表达量不同,叶片中的表达量最高。这与本研究得到的结论一致。本文中 *GmCInv* 在开花期时花中的表达量也较高,可能是由于植物进入生殖生长期,库器官生长发育,不断催化蔗糖水解为葡萄糖和果糖,对能量物质需求过大所导致。

通过简便、高效的 Gateway 技术定向地把 PCR 产物连接到指定的过表达载体上,包括 BP 和 LR 两个反应。在构建载体过程中,既省去了复杂的筛选程序,又适合大批量、高通量的研究工作。从南农菜豆 6 号中克隆得到大豆细胞质转化酶基因 *GmCInv*,并对其进行生物信息学分析发现,该基因含有一个长 1 956 bp 的开放阅读框,编码 652 个氨基酸。预测其蛋白质分子量为 73.88 kD,等电点为 6.12,与 NCBI 网站上公布的其他物种进行氨基酸序列比对发现,与毛果杨的相似性最高。同时构建了 *GmCInv* 基因的植物过表达载体并成功转化农杆菌 EHA105,为将 *GmCInv* 转入大豆进行功能研究提供了材料基础。

参考文献

[1] Sturm A, Chrispeels M J. cDNA cloning of carrot extracellular beta-fructosidase and its expression in response to wounding and bacterial infection[J]. Plant Cell, 1990, 2: 1107-1119.

[2] Murayama S, Handa H. Genes for alkaline/neutral invertase in rice; alkaline/neutral invertases are located in plant mitochondria and also in plastids[J]. Planta, 2007, 225: 1193-1203.

[3] Gallagher J A, Pollock C J. Isolation and characterization of a cDNA clone from *Lolium temulentum* L. encoding for a sucrose hydrolytic enzyme which shows alkaline/neutral invertase activity[J]. Journal of Experimental Botany, 1998, 49: 789-795.

[4] Lammens W, Le R K, van L A, et al. Crystal structures of *Arabidopsis thaliana* cell-wall invertase mutants in complex with sucrose[J]. Journal of Molecular Biology, 2008, 377: 378-385.

[5] Vargas W A, Pontis H G, Salerno G L. Differential expression of alkaline and neutral invertases in response to environmental stresses: characterization of an alkaline isoform as a stress-response enzyme in wheat leaves[J]. Planta, 2007, 226: 1535-1545.

[6] Vorster D J, Botha F C. Partial purification and characterisation of sugarcane neutral invertase [J]. Phytochemistry, 1998, 49: 651-655.

[7] Roitsch T, González M C. Function and regulation of plant invertases: sweet sensations [J]. Trends in Plant Science, 2004, 9: 606-613.

[8] Rolland F, Baena G E, Sheen J. Sugar sensing and signaling in plants: conserved and novel mechanisms[J]. Plant Biology, 2006, 57: 675-709.

[9] Sergeeva L I, Keurentjes J J, Bentsink L, et al. Vacuolar invertase regulates elongation of *Arabidopsis thaliana* roots as revealed by QTL and mutant analysis[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103: 2994-2999.

[10] Lou Y, Gou J Y, Xue H W. PIP5K9, an *Arabidopsis* phosphatidylinositol monophosphate kinase, interacts with a cytosolic invertase to negatively regulate sugar-mediated root growth[J]. The Plant Cell, 2007, 19: 163-181.

[11] Barratt D P, Derbyshire P, Findlay K, et al. Normal growth of *Arabidopsis* requires cytosolic invertase but not sucrose synthase[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 2009, 106: 13124-13129.

[12] Tang G Q, Lüscher M, Sturm A. Antisense repression of vacuolar and cell wall invertase in transgenic carrot alters early plant development and sucrose partitioning[J]. The Plant Cell, 1999, 11: 177-189.

[13] Welham T, Pike J, Horst I, et al. A cytosolic invertase is required for normal growth and cell development in the model legume, *Lotus japonicus* [J]. Journal of Experimental Botany, 2009, 60: 3353-3365.

[14] 高媛媛, 杨郁文, 张保龙, 等. 番茄中性/碱性蔗糖转化酶基因的电子克隆、分析及表达载体的构建[J]. 江苏农业科学, 2009 (6): 36-38. (Gao Y Y, Yang Y W, Zhang B L, et al. Cloning of the tomato alkaline/neutral sucrose invertase gene, analyse and construction of its expression vector[J]. Jiangsu Agricultural Sciences, 2009 (6): 36-38.)

[15] 姜立智. 水稻蔗糖转化酶基因的克隆及其表达活性的初步探讨[D]. 杨凌: 西北农林科技大学, 2003. (Jiang L Z. Cloning and characterization of a cDNA encoding putative neutral/alkaline invertase from rice[D]. Yangling: Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, 2003.)