

## 多年生野生大豆 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂基因的克隆及分析

赵洪锟, 李启云, 王玉民, 李玉秋, 庄炳昌, 董英山

(吉林省农业科学院 生物技术研究中心, 吉林 长春 130033)

**摘要:**利用 RT-PCR 方法, 从对蚜虫高抗的多年生野生大豆短绒野大豆 (*G. tomentella*) ( $2n = 78$ ) 未成熟子叶中扩增到了大豆 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂同源基因单一目的片段, 该基因和蛋白分别被命名为 *KTiPW54* 和 *KTiPW54*。序列分析表明: 该片段为 654 bp 的完整编码序列, 编码 218 个氨基酸残基, 编码的蛋白与栽培大豆 (*G. max*)、野生大豆 (*G. soja*)、短绒野大豆 (*G. tomentella*) 的 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂基因编码蛋白高度保守的区域一致。将 *KTiPW54* 编码区克隆到表达载体 pTWIN1, 在宿主菌 BL21 (DE3) 中经 IPTG 诱导获得高效表达。

**关键词:**多年生野生大豆; Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂; 原核表达

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841 (2010) 02-0191-04

## Isolation and Analysis of Soybean Kunitz Trypsin Inhibitor Gene from *Glycine tomentella*

ZHAO Hong-kun, LI Qi-yun, WANG Yu-min, LI Yu-qiu, ZHUANG Bing-chang, DONG Ying-shan

(Biotechnology Research Center, Jinlin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, Jilin, China)

**Abstract:** A single soybean Kunitz trypsin inhibitor gene, *KTiPW54*, was isolated from immature cotyledons of perennial wild soybean (*G. tomentella*) with high aphids resistance by RT-PCR. Sequencing analyses revealed a cDNA sequence of 654 bp long and encoded 218 amino acids. The deduced amino acid sequence of *KTiPW54* exhibited high similarities to those of soybean Kunitz trypsin inhibitor. The coding region was fused to the intein of pWIN1 and over-expressed in *E. coli* BL21 (DE3) induced by IPTG.

**Key words:** *Glycine tomentella*; Soybean Kunitz trypsin inhibitor; Prokaryotic expression

大豆 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂属典型丝氨酸蛋白酶抑制剂, 是最普遍的大豆蛋白酶抑制剂, 其分子量约为 21kD, 主要存在于种子中, 1945 年由 Kunitz 发现并纯化结晶<sup>[1-2]</sup>。大豆的基因组中至少存在 10 个不同的 *KTi* 基因, 是一个多基因家族, 这些基因家族“成员”多数以串联对的方式紧密连接在一起, 并且不同基因型的分布频率在栽培大豆和野生大豆中不同<sup>[3-4]</sup>。Jofuku 等<sup>[4]</sup>研究表明 *KTi1*、*KTi2*、*KTi3* 和 *KTi4* 在大豆和转化的烟草植株中能在 mRNA 水平表达, 其中, *KTi3* 是编码大豆种子胰蛋白酶抑制剂的关键基因, 并与早期发现的 *Tia* 基因相对应。大豆 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂可抑制昆虫蛋白酶的活性, 是一类天然的具有广谱抗虫特点的物质, 因此在抗虫植物基因工程中有广泛的应用价值<sup>[1, 5-10]</sup>。该研究选用对大豆蚜虫和花叶病毒病稳定表现为高抗的多年生短绒野生大豆 (*G. tomentella*) ( $2n = 78$ ), 拟克隆其 Kunitz 型胰蛋白酶抑

制剂基因, 并进行初步功能分析。

### 1 材料与方法

#### 1.1 供试材料

多年生野生大豆短绒野大豆 (*G. tomentella*) ( $2n = 78$ ) 为该实验室保存资源。pMD 18-T Vector 为 TAKARA 公司产品, pTWIN1 Vector、EcoR I、HindIII、BamHI、SalI、PstI、NcoI、XhoI、XbaI、T4 连接酶等为 Biolabs 公司产品, RNA 提取试剂盒为 Promega 公司产品, cDNA 合成系统为 Pharmacia-LKB 公司产品, 蛋白 Marker 为 Sigma 公司产品, 其它试剂 CTAB、PVP、巯基乙醇、Tryptone、Yeast Extract、Taq DNA Polymerase、胶回收试剂盒, 质粒提取试剂盒等购于国内多家生物技术公司。

大肠杆菌 DH5 $\alpha$  和 BL21 为该实验室保存。

#### 1.2 试验方法

##### 1.2.1 RNA 的提取及其 RT-PCR 取未成熟的大豆

收稿日期: 2009-11-26

基金项目: 国家转基因专项资助项目 (2008ZX08004-004); 农业部生物资源保护与利用资助项目。

第一作者简介: 赵洪锟 (1974-), 女, 副研究员, 研究方向为植物资源与分子生物学。E-mail: zhaohk99@126.com。

通讯作者: 董英山, 研究员。E-mail: ysdong@cjaas.com。

种子子叶,参照 Promega 公司的 RNA 提取系统及推荐程序分离总 RNA。RNA 的提取质量采用 1.0% 甲醛变性凝胶电泳检测 RNA 浓度,利用 CARY 紫外分光光度计 (Bio-rad 公司)测定其 260 nm、280 nm 的 OD 值。参照 Pharmacia-LKB 公司的 cDNA 合成系统,以 Oligo d(T)12-18 为引物,利用高效的 Murine 反转录酶合成 cDNA 第一链。取 1  $\mu$ L 反转录产物为模板,进行 PCR 反应,反应程序为:94 $^{\circ}$ C, 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 30 s,58 $^{\circ}$ C 复性 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 5 min。PCR 的引物设计根据已发表的大豆胰蛋白酶抑制剂基因 *KTI3* 的特异性序列 (Genebank 登录号 S45092.1) 设计:

上游引物 P1: 5' - NNNAGATCTAAGAAAGTCT-TCCATAGCCCC-3'

下游引物 P2: 5' - NNNAGATCTCACTCACT-GCGAGAAAGGCCATG-3'

1.2.2 RT-PCR 产物的克隆与测序 经回收纯化后的 PCR 产物,利用 pMD 18-T Vector 将其克隆并转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中,菌落 PCR 及酶切检测。经鉴定的重组质粒,送北京华大基因研究中心进行序列测定,将其命名为 *KTiPW54*。测序结果采用 Vector NTI 8.0、GENEDOC 软件进行比对,利用 MEGA 3.1 软件计算遗传距离及其构建分子系统树。

1.2.3 原核表达载体的构建 根据上述获得的 *KTiPW54* 序列设计了 5'端和 3'端的引物,在上游引物引入 Nco I 酶切位点,下游引物引入 Xho I 酶切位点:

上游引物 P3: 5' - GAAGAGCCATGGGCAT-GAAGAGCACCATCTTC -3'

下游引物 P4: 5' - AGAGCCCTCGAGCTCACT-GCGAGAAAGGCC -3'

以质粒 *kTiPW54* 为模板,PCR 扩增目的基因片段。条件为:94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min,94 $^{\circ}$ C 变性 45 s,57 $^{\circ}$ C 退火 50 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s,共 35 个循环,最后 1 个循环结束后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。反应结束后,琼脂糖凝胶电泳鉴定、回收。回收产物重新克隆到 pMD 18-T Vector, Nco I、Xho I 双酶切并回收、纯化目的片段。纯化后的目的基因片段用 T4 DNA 连接酶定向插入同样双酶切的 pTWIN1 Vector,获得重组质粒,命名为 *KTiPT54*。同时以质粒 pTWIN1 为对照,将 PCR、酶切鉴定后的重组质粒送北京华大基因公司测序确定插入序列准确性。

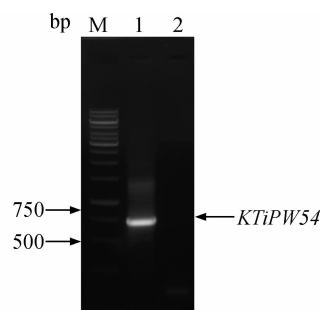
1.2.4 蛋白诱导表达 鉴定为正确的质粒 *kTiPT54* 转化到宿主菌 BL<sub>21</sub> (DE<sub>3</sub>) 中。挑取单菌落,接入 LB 培养液,20 $^{\circ}$ C、200 r $\cdot$ min<sup>-1</sup> 培养过夜;次日把过夜

培养物按 1% 比例接入新鲜 LB 液体培养基中。当 D<sub>600nm</sub> 达到 0.7 左右时,加入诱导物 IPTG,使其终浓度为 1.0 mmol $\cdot$ L<sup>-1</sup>,诱导时间分别为 1、2、3、4 h,诱导温度 20 $^{\circ}$ C。收集菌体,用 2 $\times$  SDS 裂解液裂解,12% 的 SDS-PAGE 电泳鉴定表达产物。

## 2 结果与分析

### 2.1 胰蛋白酶抑制剂基因的克隆及序列分析

以多年生野生大豆短绒野大豆 (*G. tomentella*) (2n = 78) PW54 的 cDNA 为模板,在优化反应条件的基础上,以 P1 和 P2 为引物,RT-PCR 扩增,获得约 700 bp 的特异性谱带 (图 1)。利用 pMD 18-T Vector 将其克隆并转化到大肠杆菌 DH5 $\alpha$  感受态细胞中,菌落 PCR 及酶切检测显示与预期获得的目的片段大小一致 (图 2)。测序结果显示,该片段包含 654 bp 完整的编码区序列,编码 218 个氨基酸的多肽,分子重量为 23.8 kDa,等电点 PI 为 5.61。

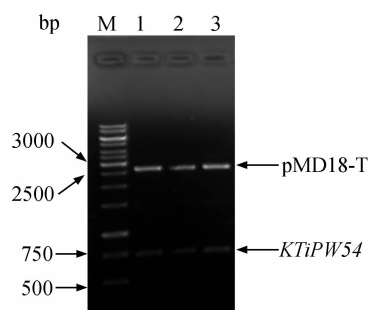


M: 1 kb Marker; 1: RT-PCR 产物; 2: 阴性对照。

M: 1 kb Marker; 1: RT-PCR product; 2: Negative control

图 1 多年生野生大豆 *KTiPW54* 基因的 RT-PCR 扩增

Fig. 1 Results of RT-PCR of *KTI* gene of *G. tomentella*



M: 1 kb Marker; 1: BamHI/PstI 双酶切结果; 2: BamHI/SalI 双酶切结果; 3: XbaI/PstI 双酶切结果

M: 1 kb Marker; 1: *KTiPW54*/BamHI + PstI; 2: *KTiPW54*/BamHI + SalI; 3: *KTiPW54*/XbaI + PstI

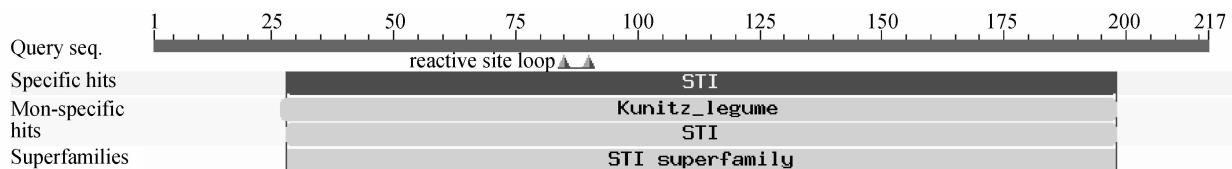
图 2 重组质粒 *KTiPW54* 酶切鉴定

Fig. 2 Restriction enzyme digestion of *kTiPW54* plasmids

依据测序获得的核酸序列及推测的蛋白序列与已发表的 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂基因核酸和蛋白的序列进行比较,显示所获得的基因片段与源于栽培大豆 (*G. max*)、野生大豆 (*G. soja*) 和短绒野

大豆 (*G. tomentella*) 获得的 KTi1 (S45035, *G. max*)、KTi2 (S45035, *G. max*)、KTi3 (S45092, *G. max*)、Tia (AB112031, *G. max*)、Tib (AB112032, *G. max*)、Tic (AB112033, *G. max*)、Tid (*G. max*)、Tie (AB070269, *G. max*)、Tif (AB112034, *G. soja*)、Tig (AB308131, *G. soja*)、Tiaa1 (AB308132, *G. soja*)、Tiaa2 (AB308133, *G. soja*)、Tiab1 (AB308134, *G. soja*)、Tibi5 (AB259604, *G. soja*)、Titom (AB435659, *G. tomentella*) 等编码蛋白高度保守的区域是一致的(图 3)。从核酸序列聚类图来看,ktiPW54 和已发表大豆 Kunitz

型胰蛋白酶抑制剂基因核酸序列相互间有很大的相似性,同源于 *G. tomentella* 获得的胰蛋白酶抑制剂基因 Titom 同源性最高(达 96.5%),并与 KTi3 等聚为一类;KTi1 和 KTi2 核酸序列几乎相同,聚为一类;此外,除 KTi1 和 KTi2 外,从栽培大豆 (*G. max*)和野生大豆 (*G. soja*)分离获得的 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂基因种间没有差异,但与不同亚属(大豆亚属)的短绒野大豆 (*G. tomentella*)可明显分开(图 4)。



Titom (AB435659, *G. tomentella*)、KTi1 (S45035, *G. max*)、KTi2 (S45035, *G. max*)、KTi3 (S45092, *G. max*)、Tia (AB112031, *G. max*)、Tib (AB112032, *G. max*)、Tic (AB112033, *G. max*)、Tid (*G. max*)、Tie (AB070269, *G. max*)、Tif (AB112034, *G. soja*)、Tig (AB308131, *G. soja*)、Tiaa1 (AB308132, *G. soja*)、Tiaa2 (AB308133, *G. soja*)、Tiab1 (AB308134, *G. soja*)、Tibi5 (AB259604, *G. soja*)

图 3 PTiPW54 及其同源蛋白氨基酸序列比较

Fig. 3 Comparison of the amino acids residues of PTiPW54 from different organisms including

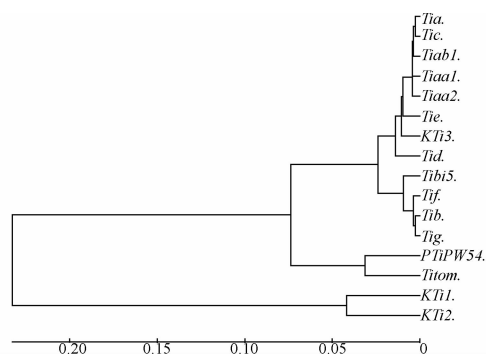


图 4 PTiPW54 及其同源蛋白氨基酸聚类分析

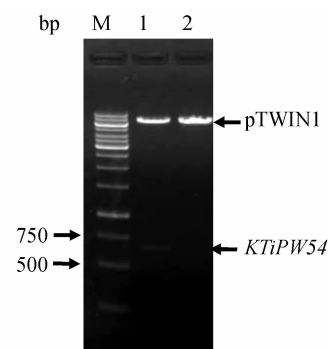
Fig. 4 Dendrogram of the amino acids residues of PTiPW54 from different organisms

## 2.2 融合蛋白的诱导表达

经过 PCR、双酶切鉴定 (NcoI/XhoI) (图 5) 和测序验证的重组质粒转化到大肠杆菌 BL21 (DE3) 中进行表达。SDS-PAGE 电泳检测结果 (图 6) 表明,加入诱导物 IPTG 后,在分子量约 50kDa 附近均有一特异条带,与预测的融合蛋白分子量 49kDa 基本相符。诱导时间为 1 h、2 h 时,有蛋白表达,但表达量变化不明显;诱导 3 h 时,蛋白表达量明显增加,4 h 时达到最高。

## 3 讨论

关于利用胰蛋白酶抑制剂基因进行抗虫转基



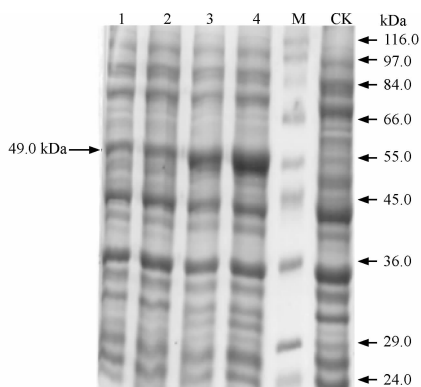
M: 1 kb Marker; 1, 2: NcoI/XhoI 双酶切 (1 为 KTiPT54, 2 为 pTWIN1)

M: 1 kb Marker; 1: KTiPT54/NcoI + XhoI, 2: pTWIN1/NcoI + XhoI

图 5 重组质粒 KTiPT54 酶切鉴定

Fig. 5 Restriction enzyme digestion of recombination plasmid KTiPT54

因植物方面的研究已有相关报道,王伟等<sup>[11]</sup>将含有豌豆外源凝集素基因和大豆 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂基因的双价抗虫基因用于陆地棉栽培品种的转化,结果显示转基因棉株对棉铃虫幼虫 (*Heliothisarmigera* Hubner) 具有较强的抗性。林春晶等<sup>[12]</sup>将大豆 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂 (SKTI) 基因转入北方推广的水稻品种丰优 301 和通 887,利用转基因水稻植株叶片进行了室内饲喂水稻二化螟 (*Chilo suppressalis*),与对照比较,部分转基因水稻植株明显地增强了对水稻二化螟的抗性。杨少



1~4: 诱导 1~4 h; M: 蛋白标样; CK: 未加 IPTG

1~4: over expression of fusion protein in BL21 (DE3) for different time (1, 2, 3, 4 hours) M: protein ladder, CK: expression of KTiPT54 in BL21 (DE3) before IPTG induction (0 hour)

图 6 融合蛋白表达 SDS-PAGE 检测

Fig.6 SDS-PAGE analysis of fusion protein in BL21 (DE3)

旭等<sup>[10]</sup>检测大豆根系中大豆胰蛋白酶抑制剂的表达量对大豆抗胞囊线虫的抗性表明,接种大豆胞囊线虫的抗感品种的大豆胰蛋白酶抑制剂(STI)表达量明显高于未接种的品种,推测大豆胰蛋白酶抑制剂参与抗病过程。结果表明,大豆 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂基因不仅具有广谱抗虫的功能,还可能参与抗病等生物逆境的功能。该研究所选用的多年生野生大豆材料同时具备高抗大豆蚜虫和花叶病毒病的生物学特性<sup>[13]</sup>,但其抗性是否与克隆的 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂同源基因是否有关尚需要进一步验证。蛋白原核表达结果显示,获得的目的基因受 IPTG 诱导表达,该基因可以正常翻译。目前,该基因的植物表达载体的构建工作已完成,下一步将通过遗传转化方法导入栽培大豆,期望获得高抗虫特性的栽培大豆,为进一步研究大豆 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂与多年生野生大豆抗蚜特性的相互关系打下基础。

## 参考文献

- [1] Ryan C A. Protease inhibitors[M]// Marcus A. In Biochemistry of Plants. New York: Academic Press, 1981: 351-370.
- [2] Kim S H, Hase S, Ikennake T, et al. Comparative study on amino acid sequences of Kunitz-type soybean trypsin inhibitor, Tia, Tib and Tic[J]. Journal of Biochemistry, 1985, 49: 593-629.
- [3] Waling L, Drews G. N, Goldberg R B. Transcriptional and post-transcriptional regulation by using dextran sulfate[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 1986, 76: 3693-3697.
- [4] K Diane Jofuku, Robert B Goldberg. Kunitz trypsin inhibitor genes are differentially expressed during the soybean life cycle and transformed tobacco plant[J]. The Plant Cell, 1989, 1: 1079-1093.
- [5] Ryan C A. Protease inhibitors in plant: genes for improving defense against insect and pathogens[J]. Annual Review of Phytopathology, 1990, 28: 425-449.
- [6] 王琛柱, 项秀芬, 张书芳, 等. 大豆胰蛋白酶抑制剂对锦铃幼虫消化生理和生长发育的影响[J]. 昆虫学报, 1995, 38(3): 272-276. (Wang C Z, Xiang X F, Zhang S F, et al. Effect of soybean trypsin inhibitor on the growth and digestive physiology of *Helicoverpa Armigera* Larvae[J]. Acta Entomologica Sinica, 1995, 38(3): 272-276.)
- [7] 王琛柱, 钦俊德. 大豆胰蛋白酶抑制剂与棉酚或单宁混用对棉铃虫中肠蛋白酶和生长率的影响[J]. 昆虫学报, 1996, 39(4): 337-340. (Wang C Z, Qin J D. Effect of soybean trypsin inhibitor, gossypol and tannic acid on the midgut protease activities and growth of *Helicoverpa Armigera* Larvae[J]. Acta Entomologica Sinica, 1996, 39(4): 337-340.)
- [8] 高越峰, 朱桢, 朱玉, 等. 大豆 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂基因的克隆及其转基因烟草抗虫性初探[J]. 高技术通讯, 1997(9): 5-9. (Gao Y F, Zhu Z, Zhu Y, et al. Cloning of soybean kunitz trypsin inhibitor gene and preliminary results of bioassay on transgenic tobacco plant[J]. High Technology Letters, 1997(9): 5-9.)
- [9] 谢可方, 董爱武, 忻骅, 等. 大豆 Kunitz 型胰蛋白酶抑制剂的稳定性及抗虫性研究[J]. 复旦学报(自然科学版), 2002, 41(6): 631-634. (Xie K F, Dong A W, Yi H, et al. A Study of the stability and insect resistance of soybean Kunitz type trypsin inhibitor[J]. Journal of Fudan University (Natural Science), 2002, 41(6): 631-634.)
- [10] 杨少旭, 段玉玺, 陈立杰, 等. 大豆胰蛋白酶抑制剂与大豆抗大豆胞囊线虫的关系[J]. 大豆科学, 2008, 27(3): 487-495. (Yang S X, Duan Y X, Chen L J, et al. Relationship of soybean trypsin inhibitor and soybean resistance to soybean cyst nematode[J]. Soybean Science, 2008, 27(3): 487-495.)
- [11] 王伟, 朱桢, 高越峰, 等. 双价抗虫基因陆地棉转化植株的获得[J]. 植物学报, 1999, 41(4): 384-388. (Wang W, Zhu Z, Gao Y F, et al. Obtaining a transgenic upland cotton harboring two insecticidal genes[J]. Acta Botanica Sinica, 1999, 41(4): 384-388.)
- [12] 林春晶, 林秀峰, 董英山, 等. TID 基因对水稻的转化及转基因植株的抗虫性[J]. 高技术通讯, 2003, 13(5): 33-37. (Lin C J, Lin X F, Dong Y S, et al. Tid gene transformation rice plants and the plants insect-resistant[J]. High Technology Letters, 2003, 13(5): 33-37.)
- [13] 庄炳昌. 中国野生大豆生物学研究[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 215. (Zhuang B C. Wild soybean (*G. soja*) biological research in China[M]. Beijing: Science Press, 1999: 215.)