

文章编号: 0529-6579 (1999) 05-0067-05

含多种抗真菌病基因植物表达载体的构建^{*}

李 明, 邱国华, 许新萍, 许 耀, 李宝健

(中山大学生物工程研究中心, 广州 510275)

摘 要: 含有大麦核糖体失活蛋白 (B-RIP) 编码序列的质粒 pRC24/B-RIP 改造后, 依次与含有水稻碱性几丁质酶基因 RCH10 和水稻酸性几丁质酶基因 RAC22 编码序列的质粒 pABC2 以及含有苜蓿 β -1, 3-葡聚糖酶编码序列的质粒 pAAG89 连接, 得到了中间载体 pRAS10. pRAS10 再与根癌农杆菌双元载体 pCambia1300 连接, 得到了适合水稻转化的双元载体 pRAS1300. 利用冻融法将此表达载体导入根癌农杆菌 LBA4404 中, 并准备将 pRAS1300 转入水稻, 以期获得对真菌病有广泛且较强抗性的水稻品种.

关键词: 真菌病; 几丁质酶基因; 葡聚糖酶基因; 核糖体失活蛋白基因; 植物表达载体构建

中图分类号: Q 782 **文献标识码:** A

很多高等植物都受多种真菌的侵害, 尤其在水稻生产中, 由真菌病引起的减产是限制其产量的主要因素, 传统的选育抗性品种及化学杀菌等方法都不能彻底地解决该问题. 近年来, 应用植物基因工程方法已将多种抗病基因导入水稻, 并得到了对真菌有一定抗性的新品系, 但由于真菌的种类繁多以及生理小种变异等原因, 一直得不到有较强抗性的品系. 为解决此问题, 本文尝试将抗真菌病的水稻酸性 RAC22 和碱性几丁质酶 RCH10, 苜蓿 β -1, 3-葡聚糖酶以及大麦核糖体失活蛋白基因串联构建在同一载体上, 以发挥它们之间的协同作用, 从而表现更强的抗病性, 并且有助于扩大抗菌谱和克服真菌小种的变异. 该表达载体进一步与根癌农杆菌双元载体连接后, 利用根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 优良天然转化系统将其转化到水稻中, 为其正确和高效的表达打下坚实的基础.

1 材料与方法

(1) 菌株与质粒: 大肠杆菌 *E. coli* XL1-Blue, 根癌农杆菌 LBA4404 (pLBA4404) 为本室保存; 质粒 pRC24/B-RIP, pABC2, pAAG89 为本室保存; 根癌农杆菌双元载体 pCambia1300 由澳大利亚 Cambia 组织的 R A Jefferson 教授提供.

(2) 主要试剂: 限制酶 *Xba* I, *Spe* I, *Not* I (New England Biolabs 公司); *Bsp*120 I (Apa I) (MBI Fermentas 公司); T4DNA 连接酶 (Promega 公司); 琼脂糖 (SIGMA 公司).

(3) 质粒 DNA 酶切, 酶切片段回收, 连接, 转化及重组体筛选参照文[1]的方法进行.

^{*} 基金项目: 国家 863 高技术计划 (101-01-02-02) 资助项目

收稿日期: 1998-12-17 作者简介: 李明, 1976 年生, 研究生.

(4) 外源 DNA 导入根癌农杆菌参照文 [2] 方法.

2 结 果

2.1 pRC24/B-RIP 的改造

因为在以后的连接中需要 *Xba* I 单切位点, 所以要预先消除 pRC24/B-RIP 上多余的

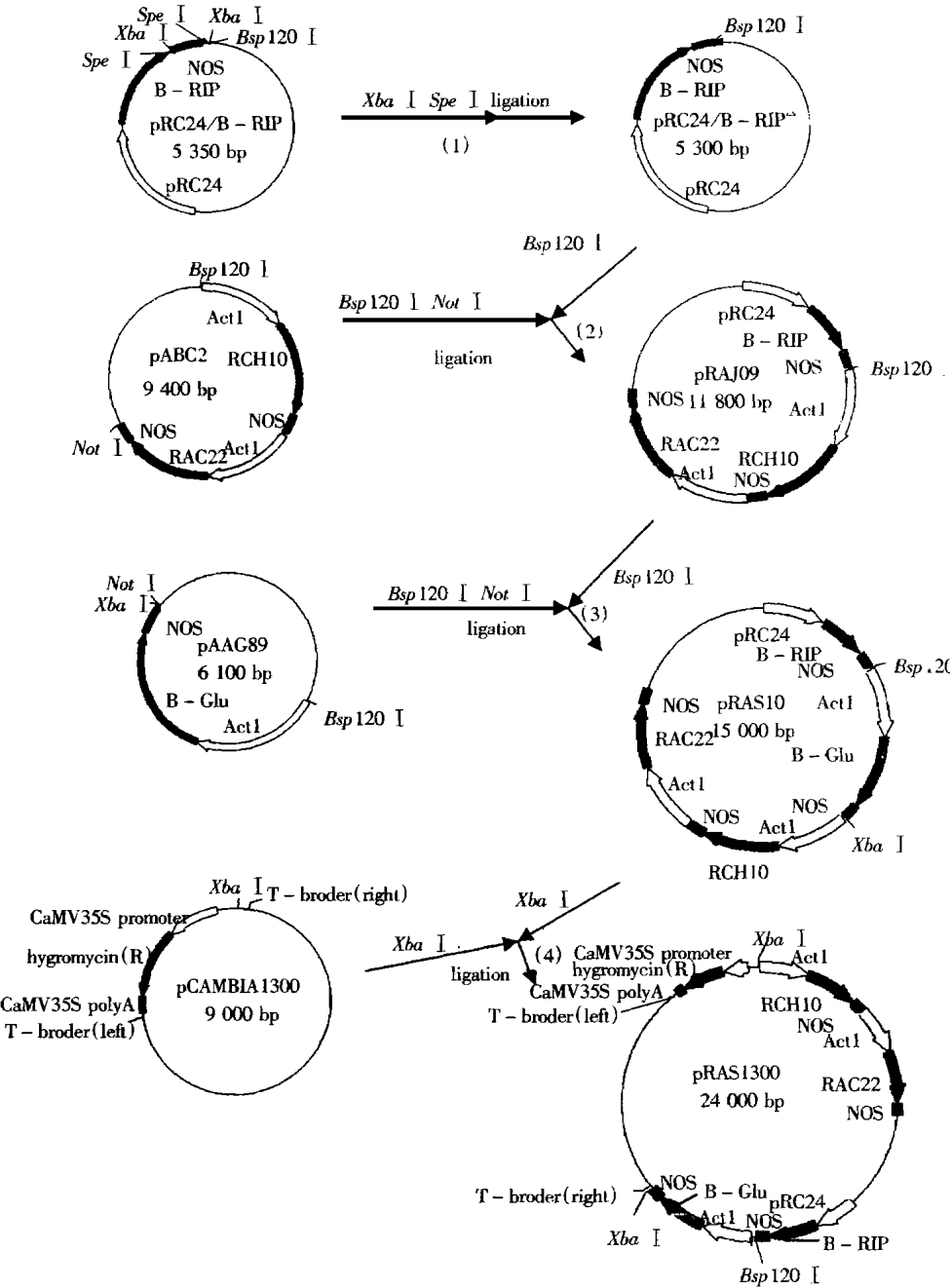


图 1 pRAS1300 的构建示意图

Fig 1 Schematic outline of the construction of pRAS1300

Xba I 位点. pRC24/B-RIP NOS 终止子的两端顺序为 *Xba* I, *Spe* I 和 *Xba* I, *Spe* I (图 1). pRC24/B-RIP 先用 *Xba* I 酶切 3 h, 再用 *Spe* I 酶切 16 h, 然后使两片段自连, 转化前用 *Xba* I 酶切 (以消除 NOS 终止子反向连接的背景), 经过筛选, 得到了消除了 *Xba* I, *Spe* I 位点的重组质粒, 命名为 pRC24/B-RIP^Δ (图 2c).

2.2 pRAJ09 的构建

pABC2 用 *Bsp*120 I 和 *Not* I 双酶切回收大小为 6.5 kb 的片段, (图 2e 中的大片段: 含有水稻 Act1 启动子, 碱性几丁质酶 RCH10 编码序列, NOS 终止子; Act1 启动子, 酸性几丁质酶 RAC22 编码序列, NOS 终止子), 与用 *Bsp*120 I 切割的 pRC24/B-RIP^Δ 相连, 得到 pRAJ09.

2.3 pRAS10 的构建

pAAG89 用 *Bsp*120 I 和 *Not* I 双酶切, 回收大小为 3.2 kb 的片段 (图 2g 中的大片段: 含有 Act1 启动子, β-1, 3-葡聚糖酶编码序列和 NOS 终止子), 与 *Bsp*120 I 酶切的 pRAJ09 相连得到 pRAS10.

2.4 pRAS1300 的构建

pRAS10 用 *Xba* I (在 pAAG89 片段插入时引入) 酶切, 与 *Xba* I 酶切的 pCAMBIA1300 连接, 得到农杆菌双元载体 pRAS1300 (在左右 T-Border 内, 除了含有 4 个抗病基因外, 还有潮霉素筛选基因) (图 1, 图 2j, k). 被 *Xba* I 酶切的线形 pRAS10 (以 RCH10 基因为标志起点) 以顺时针方向插入被 *Xba* I 酶切的 pCAMBIA 1300 线形 DNA 中 (图 1), 但由于篇幅所限, 鉴定方向的电泳图略.

2.5 pRAS1300 的构建

通过冻融法将 pRAS1300 导入根癌农杆菌 LBA 4404 中 (图 2l).

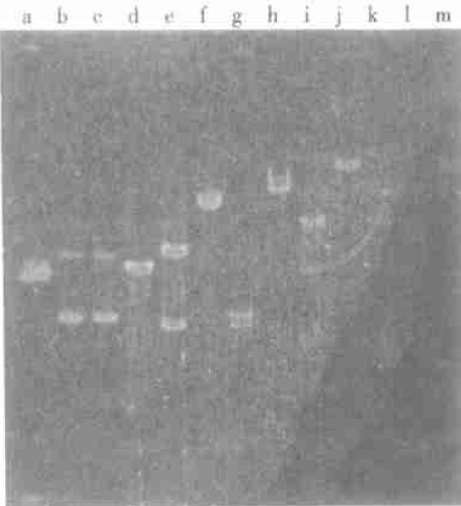


图 2 pRAS1300 构建的酶切图谱鉴定

Fig. 2 Identification of the construction process of pRAS1300 by agarose gel electrophoresis

- a pRC24/B-RIP/ *Xba* I + *Spe* I ; b pRC24/B-RIP^Δ;
- c pRC24/B-RIP^Δ/ *Xba* I + *Spe* I ; d pRC24/B-RIP^Δ/*Bsp*120 I ;
- e pABC2/ *Bsp*120 I + *Not* I ; f pRAJ09/ *Bsp*120 I ;
- g pAAG89/ *Bsp*120 I + *Not* I ; h pRAS10/ *Xba* I ;
- i pCAMBIA1300/ *Xba* I ; j pRAS1300/ *Bsp*120 I ;
- k pRAS1300/ *Xba* I (in *E. coli*); l pRAS1300/ *Xba* I (in *A. t.*);
- m λDNA/ *Eco*RI + *Hind*III

3 讨 论

本研究中构建的载体分别含有水稻碱性几丁质酶 RCH10^[3], 水稻酸性几丁质酶 RAC22, 苜蓿 β-1, 3-葡聚糖酶^[4] 以及大麦核糖体失活蛋白^[5] 基因. 多数真菌对植物的侵染始于细胞间隙, 以体外寄生的方式摄取营养, 然后进入细胞, 但抑菌效果强烈的 I 型几丁

质酶和 I 型葡聚糖酶定位于液泡中, 难以对真菌产生作用. 进一步的研究表明, 细胞间隙中几丁质酶是早期诱发反应的结果, 它能直接抑制侵入细胞间的真菌生长或间接释放真菌诱导因子而诱导几丁质酶活性的增加和宿主其它防卫反应的产生. 而液泡中的几丁质酶可释放到胞外而溶解细胞壁^[6]. 本研究中 RAC22 基因表达产物定位在细胞间隙, 当真菌感染时, 首先与 RAC22 基因产物作用, 随后激发 RCH10 和苜蓿 β -1, 3-葡聚糖酶以及大麦 RIP 的表达, 多种基因产物共同作用, 不仅克服了基因产物难以对真菌产生作用的问题, 而且可以充分发挥它们之间的协同作用从而达到抗性更强, 抗菌谱更广的目的.

由于本研究中涉及的质粒片段较大, 其连接及转化的效率都很低, 尤其在后面步骤. 经过多次实验, 我们认为优化连接体系, 尤其是增加外源和载体 DNA 的浓度 (可增加至 0.5~2.0 mg/mL, 而不是文 [1] 推荐的 100 g/mL), 可以显著地增加连接成功的效率, 其次是尽量使外源和载体 DNA 的摩尔比为 1:1. 在转化步骤中, 发现连接反应液在转化之前的加热 (65 °C, 5 min), 受体细胞感受态效率的增加以及使用富营养的培养基可以显著地增加转化效率.

本研究中构建的质粒较大, 利用 *Bsp*120 I 和 *Not* I 以及 *Xba* I 和 *Spe* I 两种末端互补酶才得以顺利完成. *Bsp*120 I 切割产物末端正好与 *Not* I 切割产物末端互补, 且 *Bsp*120 I 切割末端与 *Not* I 切割末端相连后, 两者的识别位点同时消失 (*Xba* I, *Spe* I 同样道理). 尤其是 *Bsp*120 I 和 *Not* I 位于常用的 pBluescript 载体的两端, 两者的识别序列分别为 6 和 8 碱基, 因此将外源 DNA 片段插入该两酶切位点中间, 可以方便地克隆多次, 并容易保持单一切点, 且都是粘端连接.

参考文献:

- [1] SAMBROOK J, FRITSCH E F, MANIATIS T. Molecular cloning: a laboratory manual [M]. Second Ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989. 1~50.
- [2] HOFGEN R, WILLMITZER L. Storage of competent cells for *Agrobacterium* transformation [J]. Nucleic Acids Res, 1988, 16 (20): 9877.
- [3] ZHU Q, LAMB C J. Isolation and characterization of a rice gene encoding a basic chitinase [J]. Mol Gen Genet, 1991, 226: 289~297.
- [4] MAHER E A, LAMB C J, DIXON R A. Stress response in alfalfa (*Medicago sativa* L.) ×vii. Identification of multiple hydrolases and molecular characterization of an acidic glucanase [J]. Physiol Mol Plant Pathol, 1994, 43: 329~342.
- [5] ROBERTS W K, SELITRENNIKOFF C P. Isolation and partial characterization of two antifungal proteins from barley [J]. Biochem Biophys Acta, 1986, 880: 161~170.
- [6] 曾艳, 赵南明, 刘进元. 几丁质酶与植物的防卫反应 [J]. 生物工程学报, 1997, 17 (4): 31~34.

The Construction of Plant Expression Vector Containing Multi-Antifungal Genes

LI Ming^{*}, QIU Guo-hua, XU Xin-ping, XU Yao, LI Bao-jian

Abstract: Mediate vector pRAS10 was obtained by ligating the modified plasmid pRC24/B-RIP containing barley-ribosome inactivating protein (B-RIP) coding sequence with plasmid pABC2 containing rice basic chitinase gene RCH10 and rice acidic chitinase gene RAC22 coding sequence and then with plasmid pAAG89 containing alfalfa β -1, 3-glucanase coding sequence. pRAS10 was ligated to *Agrobacterium tumefaciens* binary vector to produce plant expression vector pRAS1300 which was suitable for rice transformation. The expression vector was transformed into *A. tumefaciens* LBA4404 using the Freeze-shaw method. The rice transformation using the constructed plant expression vector is in progress, in order to obtain rice varieties having broad and strong anti-fungi traits.

Keywords: fungi disease; chitinase gene; glucanase gene; ribosome inactivating protein gene; plant expression vector construction

* Biotechnology Research Center, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China