

# 豌豆凝集素基因的克隆与植物表达载体的构建<sup>①</sup>

周小全, 张兴国, 田婷婷, 童超, 苏承刚

西南大学 园艺园林学院, 重庆 400716

**摘要:** 为研究凝集素基因转化非豆科植物后对根瘤菌的识别作用, 设计特异引物扩增出豌豆凝集素基因, 并对基因序列进行比对分析. 将豌豆凝集素基因克隆到载体 pVCT2020 中, 获得植物表达载体 pVCT-PsL. 该载体可用于转化烟草等非豆科植物.

**关键词:** 豌豆; 凝集素基因; 克隆; 植物表达载体

**中图分类号:** S643.3

**文献标识码:** A

豆科植物与根瘤菌之间的识别具有物种专一性, 植物凝集素在其中起着不可缺少的重要作用<sup>[1]</sup>. 转豌豆凝集素基因(*psl*)的三叶草能够识别原不能识别的豌豆根瘤菌, 并获得结瘤固氮功能<sup>[2]</sup>; 转大豆凝集素基因的百脉根被大豆根瘤菌侵染后也有结瘤反应<sup>[3]</sup>. 为验证在非豆科植物中是否也能获得类似结果, Edwards 等<sup>[4]</sup>和 Höfte 等<sup>[5]</sup>分别将由 CaMV 35S 启动子控制的 *psl* 基因转入马铃薯和烟草, 并研究了其定位和表达. 但是, 非豆科植物对根瘤菌的识别问题却一直未能得到解决. 本研究克隆了包含启动子和终止序列在内的 *psl* 基因, 并构建成植物表达载体, 为深入研究转 *psl* 基因的非豆科植物与豌豆根瘤菌的相互作用机制奠定基础.

## 1 材料与方 法

### 1.1 植物材料

豌豆品种为食荚大菜豌豆(*Pisum sativum* L.), 由本实验室繁殖和保存.

### 1.2 菌株与质粒

大肠杆菌(XL<sub>1</sub>-blue)和植物表达载体 pVCT2020(9532 bp)均由本实验室保存和提供; pMD18-T 载体(2694 bp)购自 TaKaRa 公司(Japan).

### 1.3 *psl* 基因的克隆

参照 GenBank 中公布的豌豆凝集素基因(*psl*)序列, 分别在其启动子和终止子处设计 PCR 引物, P1 序列为 GTTAAGTTCTGATGATGTGGTGTG 和 P2 序列为 CTAATAGAACCCATTCTTGCAA. 根据 CATB 改良法从豌豆幼叶中分离基因组 DNA, 作为扩增模板. 采用 PrimStar HS DNA 聚合酶(TaKaRa Co., Japan)进行 PCR 扩增, 反应条件: 98 °C 2 min, 1 个循环; 94 °C 10 s, 55 °C 30 s, 72 °C 2 min 30 s, 循环 28 次; 72 °C 最后延伸 10 min. PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后回收, 再用 Taq DNA 聚合酶加“A”尾, TA 克隆入 pMD18-T 载体. 菌落 PCR 筛选阳性克隆(pMD-PsL)后委托上海生工生物有限公司测序.

### 1.4 植物表达载体的构建

用 Xba I /Hind III 酶切质粒 pMD-PsL 和 pVCT2020, 分别回收前者的小片段和后者的片段, 经 T4

① 收稿日期: 2007-12-24

作者简介: 周小全(1981-), 男, 湖南茶陵人, 硕士研究生, 主要从事细胞工程研究工作.

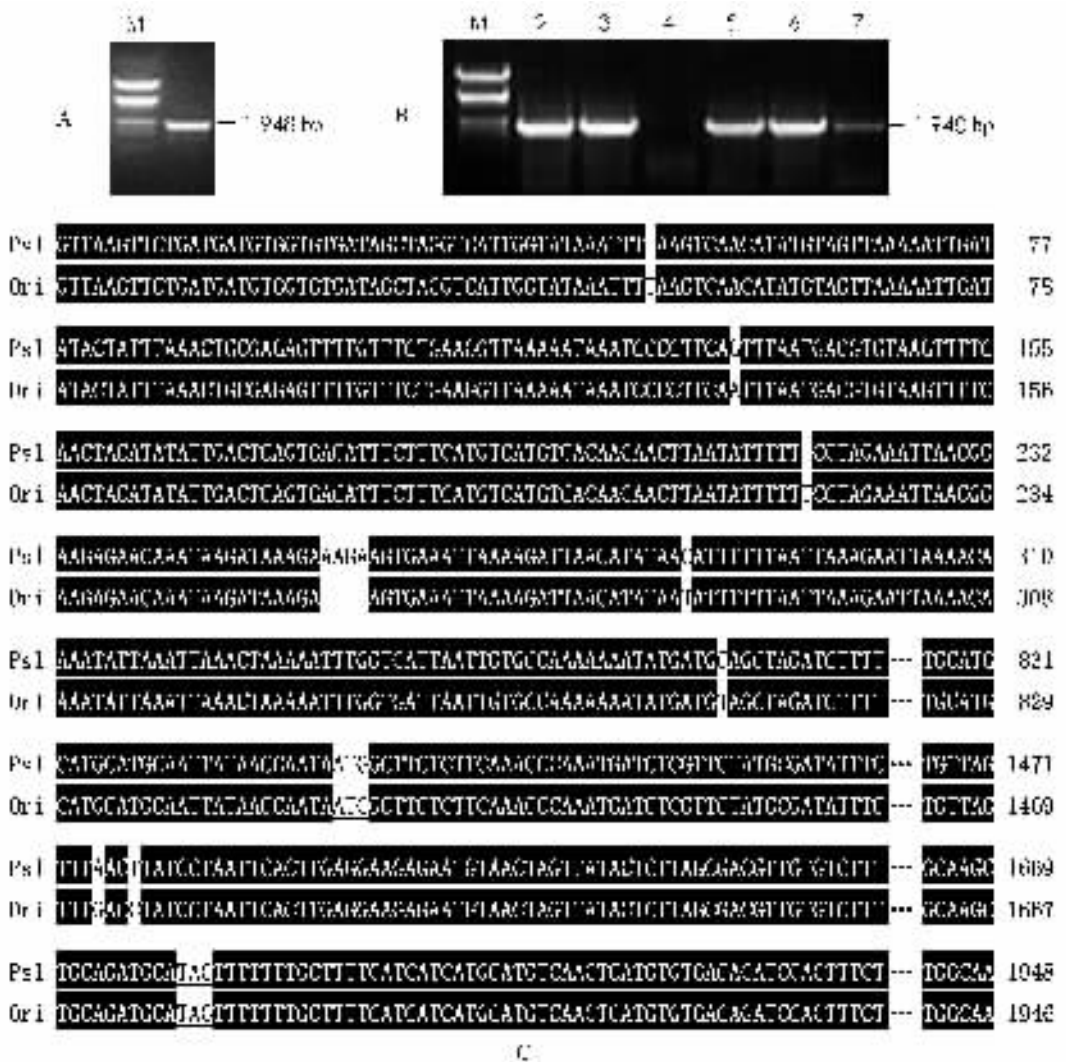
通讯作者: 张兴国, 研究员.

DNA 连接酶连接, 获得植物表达载体 pVCT-PsL. 载体构建流程见图 3A.

## 2 结果与分析

### 2.1 *psl* 基因的克隆与核酸序列分析

以豌豆 gDNA 为模板、P1/P2 为引物, 扩增出约 2.0 kb 的目的条带(图 1A), 克隆入 pMD18-T 载体, PCR 筛选阳性克隆(图 1B)获得重组质粒 pMD-PsL. 目的基因测序结果显示: 核酸序列全长为 1 948 bp, 其中阅读框区为 828 bp, 共编码 275 个氨基酸. 与 GenBank 公布的已知序列(X66368)相比, 其核苷酸序列及推测的氨基酸序列的同源率分别为 99.4%和 100%; 其中启动子区域有 9 处差异, 阅读框区域有 2 处差异(图 1C). 这说明不同豌豆品种 *psl* 基因所编码的氨基酸序列是高度保守的.



A: *psl* 基因 PCR 扩增; B: pMD-PsL 的菌落 PCR 筛选; C: *psl* 基因序列比对; M:  $\lambda$ DNA/*Eco*R I + *Hind* III Marker; 1: 自豌豆 gDNA 中 PCR 扩增的 *psl* 基因产物; 2~7: pMD-PsL 的菌落 PCR 产物; Psi: 本文克隆的 *psl* 基因序列; Ori: GenBank 公布的 *psl* 基因序列(X66368); ...: 比对相同区域的省略部分; 白底黑字部分为比对差异序列; ATG、TAG 分别为阅读框起始、终止密码子; 右侧数字为核酸.

图 1 *psl* 基因的克隆及序列比对

### 2.2 *psl* 基因推测的氨基酸序列分析

利用 <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetOGlyc/> 网站提供的软件, 在线分析由 *psl* 基因推导的氨基酸序列的信号肽和潜在的糖基化位点. 推测 # 1 至 # 30 氨基酸残基为分泌信号肽; Asp-111、Gly-129、Asn-155、Gly-246、Ala-247、Glu-248 是潜在的糖基化位点(图 2).

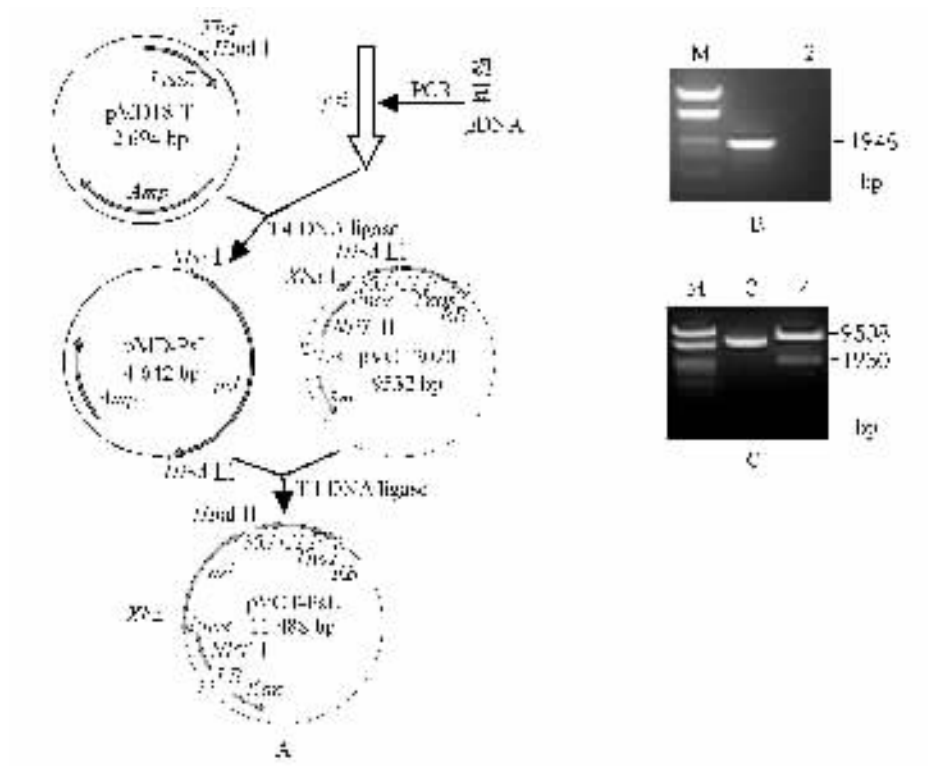


下划线部分为推测的信号肽序列; 白底黑字部分为潜在的 O-糖基化位点; 右侧数字为氨基酸位置.

图 2 *psl* 推导的氨基酸序列及其分析

### 2.3 植物表达载体的构建

植物表达载体 pVCT-PsL 的大小为 11 488 bp. 用引物 P1/P2 对 pVCT-PsL 进行菌落 PCR 扩增, 得到 1 948 bp 预期片段(图 3B); pVCT-PsL 经 *Xba* I/*Hind* III 酶切, 得到 9 508 bp 和 1 980 bp 的两个段预期条带(图 3C). 说明表达载体 pVCT-PsL 构建成功.



A: 载体构建流程图; B: pVCT-PsL 的 PCR 鉴定; C: pVCT-PsL 的酶切鉴定.

M, λDNA/*Eco*R I + *Hind* III Marker; 1, 2, pVCT-PsL 的菌落 PCR 产物;

3, pVCT-PsL 质粒 DNA; 4, pVCT-PsL 的 *Xba* I/*Hind* III 酶切产物.

图 3 载体构建流程及鉴定图

## 3 讨论

前人的研究工作表明, 豆科植物之间凝集素基因的转化可以去除根瘤菌的宿主专一性障碍<sup>[2-3]</sup>. 然而, 非豆科植物对根瘤菌的识别问题一直未能得到解决. 张静娴、荆玉祥等曾经利用 CaMV 35S 和 Ubi 启动子将 *psl* 基因的编码区分别转化到烟草与水稻中, 并获得了表达<sup>[7-8]</sup>, 但他们没有采用 *psl* 基因自身的启动子, 并非模拟豌豆识别根瘤菌的原始机制, 所获转基因植株也未能识别根瘤菌. 因此, 采用特异性启动子来调控基因的表达是很重要的.

本实验克隆得到包含启动子和终止子在内的 *psl* 基因, 其序列与 de Pater 等<sup>[6]</sup>所公布的序列相比有 11 处差异, 但二者所编码的氨基酸序列一致, 差异主要在于启动子区域(图 1). 分析差异产生的原因, 可能在于我们所采用的豌豆材料品种不同. 将包含自身启动子和终止序列的 *psl* 基因构建成植物表达载体 pVCT-PsL(图 3), 该载体采用自身启动子来调控 *psl* 基因的表达, 更为接近豆科植物与根瘤菌相互识别的原始机

理,可用于转化烟草等非豆科植物,以便分析 *psl* 基因在非豆科植物中的表达特性及其与豌豆根瘤菌的相互识别.

#### 参考文献:

- [1] Díaz C L, Melchers L S, Hooykaas P J J, et al. Root Lectin as a Determinant of Host Plant Specificity in the Rhizobium Legume Symbiosis [J]. *Nature*, 1989, 338: 579 – 581
- [2] Díaz C L, Logman T J J, Stam H C, et al. Sugar Binding Activity of Pea Lectin Expressed in White Clover Hairy Roots [J]. *Plant Physiology*, 1995, 109: 1167 – 1177.
- [3] Hirsch A M, Brill L M, Lim P O, et al. Steps Toward Defining the Role of Lectins in Nodule Development in Legumes [J]. *Symbiosis*, 1995, 19: 155 – 173.
- [4] Edwards G A, Hopher A, Clerk S P, et al. Pea Lectin is Correctly Processed, Stable and Active in Leaves of Transgenic Potato Plants [J]. *Plant Mol Biol*, 1991, 17: 89 – 100.
- [5] Höfte H, Faye L, Dickinson C, et al. The Protein-Body Proteins Phytohemagglutinin and Tonoplast Intrinsic Protein are Targeted to Vacuoles in Leaves of Transgenic Bobacco [J]. *Planta*, 1991, 184: 431 – 437.
- [6] de Pater S, Pham K, Chua N H, et al. A 22-bp Fragment of the Pea Lectin Promoter Containing Essential TGAC-like Motifs Confers Seed-Specific Gene Expression [J]. *The Plant Cell*, 1993, 5: 877 – 886.
- [7] Zhang J X, Jing Y X, Shen S H, et al. Transformation of Two Nitrogen-Fixation-Related Plant Genes into Tobacco and Their Expressions [J]. *Acta Botanica sinica*, 2000, 42: 834 – 840.
- [8] Zhang J X, Jing Y X, Shen S H, et al. Transformation of Pea Lectin Gene and Parasponia Haemoglobin Gene into Rice and Their Expressions [J]. *Acta Botanica Sinica*, 2001, 43: 267 – 274.

## Cloning of *psl* Gene and Construction of Its Plant Expression vector

ZHOU Xiao-quan, ZHANG Xing-guo,  
TIAN Ting-ting, TONG Chao, SU Chen-gang

*School of Horticulture and Landscape Architecture, Southwest University, Chongqing 400716, China*

**Abstract:** The pea lectin gene was amplified by PCR, using specially designed primers and PrimStar HS DNA polymerase, for researching the function of lectin in recognising rhizobia. It was then cloned into plant expression vector pVCT2020. This plant expression vector could be used in researches on the transformation of non-legumes, tobacco, etc.

**Key words:** pea; *psl*; cloning; plant expression vector

责任编辑 欧 宾