

高效抗菌植物表达载体的构建

黄文晋 崔晓江 田颖川 林木兰* 彭学贤

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘要 噬菌体 T7 DNA 用 *Ava* I 酶解后, PCR 扩增获得 T7 溶菌酶基因。DNA 序列分析表明, T7 溶菌酶基因的核苷酸序列与国外发表的序列有 99.5% 的同源性, 推测的氨基酸序列完全一致。又用 PCR 法改造了克隆于 pUC19 中的烟草草原相关蛋白 1b (PR-1b) 的信号肽基因和抗菌肽 Shiva-1 基因, 将信号肽基因分别融合于 T7 溶菌酶基因和 Shiva-1 基因的 5' 末端, 并将两个融合基因分别置于一个植物表达载体中的两个表达框架内, 以使转基因植物中 T7 溶菌酶基因和 Shiva-1 基因同时表达且表达产物可分泌到细胞外。本工作为用植物基因工程方法培育抗菌转基因作物打下了基础。

关键词 T7 溶菌酶, 信号肽, 抗菌肽 Shiva-1

植物细菌病害每年给农业生产带来巨大的损失。以马铃薯为例, 每年细菌病害造成的损失占全世界马铃薯总产量的 25%, 约合 40 亿美元。用常规育种方法培育抗菌作物, 周期长, 到目前收效不大。植物基因工程的兴起大大加速了育种进程。如果利用生物技术将外源抗菌蛋白基因导入农作物, 将为抗菌作物的培育带来希望。

Cecropins 是昆虫血淋巴中存在的一类抗菌蛋白, 一般含 35 个左右的氨基酸^[1]。Jaynes 通过对 *Hyalophora cecropia* 的 cecropin B 的氨基酸序列进行定点改变, 获得了杀菌能力比 cecropin B 更强的抗菌肽 Shiva-1^[2]。Cecropins 杀灭细菌的机理是破坏细菌的细胞膜, 导致膜内物质的渗漏和渗透压的改变^[3]。

溶菌酶是另一类抗菌蛋白。*E. coli* 的 T7 噬菌体编码的 T7 溶菌酶可以切断细菌细胞壁的肽聚糖 (peptidoglycan) 中短肽与糖链之间的共价键, 从而破坏细菌细胞壁的致密网状结构^[4]。体外实验表明, Shiva-1 和溶菌酶的协同杀菌作用远远大于单种抗菌蛋白的杀菌作用。

在植物细胞中合成的胞外分泌型蛋白, 在其 N 端有一段短肽, 即信号肽, 信号肽能引导分泌蛋白进入内质网, 经过高尔基体分泌到胞外^[5]。

目前抗菌植物基因工程已有的主要策略是: (1) 破坏细菌产生的毒素, 如乙酰化烟草假单胞杆菌的毒素^[6]; (2) 替换植物体内细菌毒素的靶目标酶^[7]; (3) 增强植物本身防卫蛋白的表达^[8]。这些策略不是以杀死细菌为出发点, 有可能导致细菌最终阻塞导管, 影响植物生长。

* 中国科学院病毒研究所, 武汉 430071。

本文于 1993 年 7 月 1 日收到。

植物病原细菌一般开始寄生于植物细胞间隙,进一步蔓延后,可能进入破损细胞内。基于在细菌侵染植物早期予以杀灭细菌的目的,我们克隆了 T7 溶菌酶基因,克隆改造了烟草病原相关蛋白 1b 的信号肽基因和抗菌肽 Shiva- I 基因,将信号肽基因分别融合于 T7 溶菌酶基因和 Shiva- I 基因的 5' 端,并将两个融合基因置于同一个植物表达载体的二个表达框架内,希望转基因植物通过表达并分泌到植物细胞外的 Shiva- I 和 T7 溶菌酶的协同作用杀死病原细菌。

1 材料和方法

1.1 菌株、质粒和引物

1.1.1 菌株: *E. coli* DH5 α 和 JM107, 农杆菌 LBA4404 来自于中国科学院微生物研究所植物生物技术开放实验室。

1.1.2 质粒: pGEM-7zf⁽⁺⁾ 购自 Promega 公司, pBluescript I SK、pBluescript I KS 购自 Stratagene 公司, pBin438 来自于中国科学院微生物研究所植物生物技术开放实验室, pPRSI 由 Jaynes 博士惠赠。

1.1.3 引物: 根据文献报道^[2,9]采用 Applied Biosystem 381A 型 DNA 合成仪合成引物。

T7 5' primer 5'-ATG GCT CGT GTA CAG TT-3'

T7 3' Primer 5'-GAGTTGAATTCATTATCCACGGTC-3'

Shiva- I 5' primer 5'-ATG CCG CGC TGG CGTC-3'

Shiva- I 3' Primer 5'-GCTAGCGAATTCTCAACC-3'

PR-1b signal peptide 5' primer

5'-CCGGGGATCCTCTAGA-3'

PR-1b signal peptide 3' primer

5'-GGCATGGACGCGTGAGAGGAGTG-3'

1.2 试剂

PCR 反应试剂盒、T4 DNA 连接酶和各种限制性内切酶为 Promega 产品, T7 序列分析试剂盒购自 Pharmacia 公司, 同位素 α -³⁵S-dATP 是美国 NEN 公司产品, Klenow 酶购自 Boehringer Mannheim 公司, GeneClean DNA 回收试剂盒购自 Bio101 公司。

1.3 PCR 法合成 T7 溶菌酶基因

从噬菌体 T7 中抽提 T7 DNA, 用 *Ava* I 部分酶解^[10], 吸取少量酶解混合物在 50 μ l 体系中采用 Promega PCR 试剂盒进行 PCR 反应。两种引物各 50 pmol, 94 $^{\circ}$ C 变性, 50 $^{\circ}$ C 复性, 72 $^{\circ}$ C 反应各 1 分钟, 共 30 个循环。

1.4 PCR 法改造 Shiva- I 基因和 PR-1b 信号肽基因

取少量含 Shiva- I 基因和 PR-1b 信号肽基因的质粒 pPRSI, 采用 Promega PCR 试剂盒分别在 50 μ l 体系中进行 PCR 反应, 各 30 循环。Shiva- I 基因两种引物各 50 pmol, 每循环 94 $^{\circ}$ C 变性、54 $^{\circ}$ C 复性各 1 分钟, 72 $^{\circ}$ C 反应 20 秒。信号肽基因的两个引物各 50 pmol, 94 $^{\circ}$ C 变性, 52 $^{\circ}$ C 复性各 1 分钟, 72 $^{\circ}$ C 反应 20 秒。

1.5 T7 溶菌酶基因、Shiva- I 基因和 PR-1b 信号肽基因的克隆、拼接和序列分析

三种 PCR 产物用低熔点胶法回收。PR-1b 信号肽基因克隆于 pBluescript I SK 的

SmaI 位点,获得重组子 pSKPR,基因 5'端靠近载体的 BamHI 位点。pSKPR 用 Mlu I 酶切,Klenow 酶补平,再用 EcoR I 酶切,与 EcoR I 酶切的 T7 溶菌酶基因和 Shiva- I 基因分别连接,获得两种融合基因的重组子 pSKPRS I、pSKPRT7。用 Pharmacia 公司的 T7 序列试剂盒按双脱氧核苷酸链终止法进行序列分析。

1.6 抗细菌植物表达载体的构建

分别封闭 pSKPRS1、pSKPRT7 上的 Hind III、EcoR I 两位点,用 BamH I、Sal I 切下融合基因片段,与用同样酶切的 pBin438 连接,获得两个植物表达载体 p438PRS I、p438PRT7。用 Hind III、EcoR I 切下 p438PRS I 的表达框架片段,连入同样酶切的 pBluescript I KS,从此重组子上用 Xho I、EcoR I 的表达框架片段与同样酶切的 pGEM-7zf⁽⁺⁾连接,再用 Hind III 从这重组子上切下表达框架片段,与用 Hind III 酶切的 p438PRT7 连接,挑选同时含两种融合基因表达框架且两基因转录方向一致的植物表达载体。

2 结果和讨论

2.1 T7 溶菌酶基因、Shiva- I 基因和 PR-1b 信号肽基因的 PCR 合成

将 T7 噬菌体 DNA 用 Ava I 酶解后,使 PCR 模板易于变性。PCR 合成的 T7 溶菌酶基因为 456bp,Shiva- I 基因为 117bp,信号肽基因为 90bp(图 1)。pPRS1 虽然含信号肽基因和 Shiva- I 基因,但二者非融合形式,且无法通过酶切法使信号肽基因与 T7 溶菌酶基因、Shiva- I 基因融合。因此通过 PCR 法对之进行了改造。设计信号肽基因的 3'引物时,对该基因的最后二个氨基酸密码作了突变,由 CATGCT 改为 CACGCG,所编码氨基酸未变,增加碱基后产生 Mlu I 位点, CACGCGT……,克隆信号肽基因后,用 Mlu I 酶切 pSKPR, Klenow 酶补平,切点处变为 CAC GCG,这样就能和 ATG 开头的基因直接拼接。T7 溶菌酶基因和 Shiva- I 基因的 5'引物以 ATG 起始,3'引物都加 EcoR I 位点,是为了定向克隆这两个基因,使之与信号肽基因能正确拼接。

2.2 T7 溶菌酶基因的序列分析

T7 溶菌酶基因克隆后,我们用 Pharmacia T7 序列试剂盒,以双脱氧核苷酸链终止法进行序列分析。结果表明,我们获得的 T7 溶菌

酶基因与国外报道结果相比,核苷酸序列同源性达 99.5%,只有 2 个核苷酸不同,但氨基酸序列没有差别^[9](图 2),这也可能是 PCR 本身的误差造成的。

2.3 抗细菌植物表达载体的构建

pBin438 含增强的 35S 启动子和翻译增强子 Ω 片段,信号肽基因的 5'端含 Kozak 序

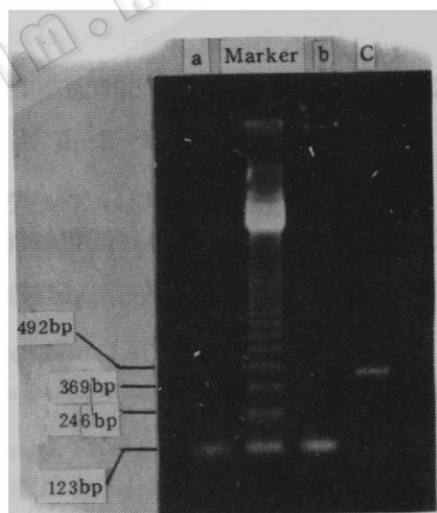


图 1 PCR 产物的电泳图

(a)信号肽基因;(b)Shiva- I 基因;(c)T7 溶菌酶基因

Fig.1 Electrophoresis of PCR products

(a) signal peptide gene;(b)Shiva- I gene;

(c)T7 lysozyme gene.

ATGGCTCGTGACAGTTTAAACAACGTGAATCTACTGACGCAATCTTTGTTCACTGCTCGGCTACCAAGCCA
 M A R V Q F K Q R E S T D A I F V H C S A T K P

 AGTCAGAATGTTGGTGTCCGTGAGATTCGCCAGTGGCACAAGAGCAGGGTTGGCTCGATGTGGGATACCAC
 S Q N V G V R E I R Q W H K E Q G W L D V G Y H

 TTCATCATCAAGCGAGACGGTACTGTGCAGGCAGGACGAGATGAGATGGCTGTAGGCTCTCACGCTAAGGGT
 F I I K R D G T Y E A G R D E M A V G S H A K G

 TACAACCACAACTCTATCGGCGTCTGCCCTTGTTGGTGGTATCGACGATAAAGTTAAGTTCGACGCTAACTTT
 Y N H N S I G V C L V G G I D D K G K F D A N F

 ACGCCAGCCCAAATGCAATCCCTTCGCTCACTGCTGGTCACACTGCTGGCTAAGTACGAAGGCGCTGGTCTT
 T P A Q M Q S L R S L L V T L L A K Y E G A G L

 CGCGCCCATCATGAGGTGGCGCCGAAGGCTTGCCCTTCGTTGACCTTAAGCGTTGGTGGGAGAAGAACGAA
 R A H H E V A P K A C P S F D L K R W W E K N E

 CTGGTCACTTCTGACCGTGGATAA
 L V T S D R G

图2 T7 溶菌酶基因及其氨基酸序列

Fig. 2 Nucleic acid and deduced amino acid sequences of T7 lysozyme

列 ACCATGG, 这些都是为了增强基因在植物细胞内的表达效率。Shiva- I 和信号肽融合基因的表达框架片段通过 pBluescript I KS 和 pGEM-7zf⁽⁺⁾ 过渡, 新引入一个 Hind III 位点, 这样通过一个 Hind III 位点, 就能构建含二个表达框架的植物表达载体。我们选择了两个基因转录方向一致的表达载体(图 3)。

这样的载体内含顺向重复的 35S 启动子和 NOS 终止子序列, 结构比反向重复的稳定。

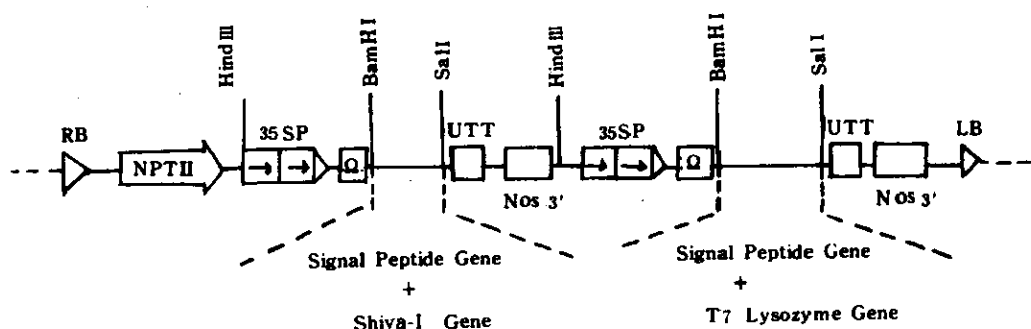


图 3 抗细菌植物表达载体结构图

Fig. 3 The map of plant expression vector

参 考 文 献

- [1] Boman H G, Hultmark D. *Ann Rev Microbiol*, 1987, **41**: 103—126.
- [2] Jaynes J M. *DN&P*, 1990, **3**: 69—78.
- [3] Christensen B, Fink J, Merrifield R B *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA*, 1988, **85**: 5072—5076.
- [4] Inouye M, Arnheim N, Sternglanz R *et al.* *J Biol Chem*, 1973, **248**: 7247—7252.
- [5] Chrispeels M J. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1991, **42**: 21—53.
- [6] Anzai H, Yoneyama K, Yamaguchi I. *Mol Gen Genet*, 1989, **219**: 492—494.
- [7] Martinez J M, Cano G M, Morales A A. *Biotechnology*, 1992, **10**: 905—909.
- [8] Carmona M J, Molina A, Fernandez J A. *The Plant Journal*, 1993, **3**: 457—462.
- [9] Dunn J J, Studier F W. *J Mol Biol*, 1983, **166**: 477—535.
- [10] Studier F W. *Virology*, 1969, **38**: 562—574.

CLONING OF T7 LYSOZYME GENE AND CONSTRUCTION OF THE VECTOR FOR TRANSGENIC PLANTS RESISTANT TO BACTERIAL INFECTION

Huang Wenjin Cui Xiaojiang Tian Yingchuan Lin Mulan Peng Xuexian

(Institute of Microbiology, Academia Sinica, Beijing 100080)

Abstract DNA were extracted from bacteriophage T7 and digested partially with *Ava* I. T7 lysozyme gene was obtained by PCR. DNA sequence analysis showed that the nucleotide sequence of T7 lysozyme gene was 99.5% homologous with the reported sequence and its deduced amino acid sequence was the same as reported. DNA fragment encoding the signal peptide of the pathogenesis-related protein 1b (PR-1b) from tobacco and cecropin (Shiva-I) gene cloned in pUC19 were modified by PCR. The PR-1b signal peptide gene was fused respectively to the 5' terminals of T7 lysozyme gene and Shiva-I gene. Both fusion genes were put in two expression frames of a plant expression vector, so that T7 lysozyme gene and Shiva-I gene could express simultaneously in transgenic plants and the two gene products could be secreted to extracellular space.

Key words T7 lysozyme, Signal peptide, Cecropin Shiva-I