

玉米淀粉分支酶基因的克隆和反义载体的构建

柴晓杰,王丕武,张 君,关淑艳

(吉林农业大学生物技术学院,吉林 长春 130118)

摘要: 应用聚合酶链式反应技术(PCR)扩增了玉米淀粉分支酶的 cDNA 基因片段,并将其克隆到 pMD18-Tvector 载体上,对重组子进行 PCR 检测和限制性内切酶分析,并测定了 DNA 全序列。结果表明:克隆片段全长为 1 698 bp。将该基因反向插入到 pCambia1301 的 CaMV35S 启动子之后,构建了反义表达载体。

关键词: 淀粉分支酶基因;PCR;克隆;cDNA;反义载体

中图分类号: S513.035.3

文献标识码: A

Cloning and Construction of Antisense Vector on Gene of Corn Starch Branching Enzymes

CHAI Xiao-jie, WANG Pi-wu, ZHANG Jun, GUAN Shu-yan

(College of Biotechnology, Jilin Agricultural University, Changchun 130118, China)

Abstract: cDNA segment of corn starch branching enzymes gene was obtained by PCR technique and cloned into pMD18-Tvector. The recombinant clone was detected by PCR technique and analysed by the restriction enzyme. A full length of cDNA gene was sequenced. The results showed that the length of the clone sequence is 1698bp. The gene was inserted into binary vector in reverse orientation and constructed antisense vector.

Key words: Starch branching enzymes(SBE) gene; PCR; Clone; cDNA; Antisense vector

淀粉是大多数高等植物重要的储存物质,淀粉合成的主要场所是淀粉体和叶绿体,整个过程受到一系列酶的调控^[1]。淀粉分支酶是植物淀粉生物合成过程中的一个起重要调节作用的酶,一方面它能切开以 $\alpha(1,4)$ 糖苷键连接的葡萄糖,另一方面它又能把切下的短链通过 $\alpha(1,6)$ 糖苷键连接于受体链上,形成分枝结构。因此,淀粉是直链淀粉和支链淀粉混合物^[2,3]。而降低或抑制淀粉分支酶基因的表达则可以影响细胞内酶的含量或活性,从而控制淀粉的结构,提高直链淀粉的含量^[4]。直链淀粉是重要的工业原料,用途广泛,涉及到各个领域,如食品、医疗、纺织、造纸、包装、石油、环保、光纤、高度印刷线路板和电子芯片等行业;另一个潜在利用价值是玉米高直链淀粉是生产光解塑料的最佳原料,是解决目前严重“白色污染”的有效途径。普通玉米淀粉质量赶不上高直链淀粉,而我国工业所需要的直链淀

粉主要从美国进口,进口原料价格比普通玉米淀粉高 16 倍^[5,6]。但迄今为止国内尚没有高直链淀粉的玉米品种,利用常规育种技术选育高直链淀粉玉米品种会引起子粒瘪缩和产量降低,而利用基因工程技术进行改良则是一种有效的途径。

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 菌种和质粒 菌种为 E. coli DH5 α 。质粒由北京农林科学院玉米研究中心谭振波博士提供,作为 PCR 反应的模板。pMD18-Tvector 购自 TaKaRa 公司,pCambia1301 由东北师大王兴智教授馈赠。

1.1.2 培养基 LB 液体培养基:胰化蛋白胨(bacto-tryptone)10 g/L,酵母提取物(bacto-yeast)5 g/L,氯化钠 10 g/L,pH7.0,高压蒸汽灭菌 20 min。LB 固体培养基:在液体培养基中加入琼脂(bacto-agar)15 g/L,高压灭菌 20 min。

1.1.3 试剂与酶 PCR 扩增试剂盒、限制性内切酶(EcoR I、BamH I)、RNase、溶菌酶、T₄ DNA 连接酶、DNA Marker DL-2000 和 DL-15000 分子量标准购自 TaKaRa 和 Promega 公司,其它试剂都是国产分

收稿日期: 2003-06-15

基金项目: “国家转基因植物中试与产业化基地建设”专项基金(J99-13-001)

作者简介: 柴晓杰(1963-),女,博士研究生,副教授,从事植物基因工程研究。王丕武为本文通讯作者 Tel:0431-87151118

析纯产品。

1.1.4 人工寡核苷酸引物 由大连宝生物公司合成。

1.2 实验方法

1.2.1 PCR 扩增 人工合成引物为:

5' 端引物: 5'-GGATCCAAATGCAGATCGTA-TG-3';

3' 端引物: 5'-GAATTCTGCTAAATCCACCAA-ATAGTCCAGC-3';

在 50 μ L 的反应体系中, dNTP 4 μ L, 引物各 50 pmol, 模板 0.1 μ g, EXTaq 0.5 μ L, 10 X Buffer 5 μ L, $MgCl_2$ 4 μ L 以 ddH₂O 补足 50 μ L。PCR 反应条件为: 94℃ 预变性 5 min, 94℃ 变性 60 s, 55℃ 退火 30 s, 72℃ 延伸 2 min, 共 30 循环。

1.2.2 PCR 扩增产物电泳及回收 DNA 片段 配制 1.0% 琼脂糖凝胶, 溴化乙锭(EB)在配胶时加入, 在 DNA 样品中加入 1/6 的上样缓冲液加入样品孔中, 5 V/cm (1 h 40 min)。在紫外灯下观察, 小心切下含有目的片段的琼脂糖凝胶, 放入微量离心管中。DNA 片段的回收: 按 DNA 片段凝胶回收试剂盒(经改良)的方法进行。回收的 DNA 片段, 置-20℃冰箱保存。

1.2.3 PCR 产物的克隆和筛选 pMD18-Tvector 与外源 DNA 片段以 1:3 的比例, 加 4 μ L Solution I 混匀, 16℃ 反应过夜。按 Maniatis 的方法制备感受态细胞, 将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α , 冰浴 30 min, 同时做两个对照管。以 42℃ 热激 90 s, 冰上放置 2 min。每管加入 800 μ L LB 液体培养基, 37℃ 温育 45 min, 140 r/min。涂在含氨苄青霉素(100 μ g/mL)、x-gal、IPTG 的 LB 培养基平板上选择培养过夜(37℃)。挑取白斑用碱裂解法提取质粒, 用限制性内切酶酶切鉴定, 得到重组克隆, 其中插入约 1.7 kb 的目的基因。

1.2.4 序列分析 由大连宝生物公司完成, 核酸序列分析用 DNASIS 软件。

1.2.5 目的基因反向插入表达载体 将含有目的基因的重组质粒和 pCambia1301 用 EcoR I、BamH I 酶切、连接, 转化 E. coli DH5 α 感受态细胞。在含卡那霉素(Kan, 100 μ g/mL)的 LB 固体培养基上培养进行初步筛选, 提取阳性克隆的质粒进行酶切, 以确定反向克隆。

2 结果与讨论

2.1 PCR 扩增反应

经 PCR 扩增后, 取 5 μ L PCR 产物与标准分子量 DNA 一起在 1.0% 琼脂糖凝胶上电泳, 得到约 1.7 kb 大小、特异性强、单一的扩增带(图 1), 结果与预

期一致。



a, h 为 DNA 分子量标准
b, c, d, e 为 PCR 产物
f, g 为无菌水对照

图 1 PCR 产物的电泳分析

2.2 PCR 产物克隆及筛选

扩增产物回收后与载体连接转化到大肠杆菌 DH5 α 中, 筛选出 14 个阳性克隆, 经酶切分析, 由于引物上设计了 EcoR I、BamH I 酶切位点, 当用 EcoR I、BamH I 酶切时, 得到一条约 1.7 kb 大小的插入片段, 说明该目的基因插入在载体上, 其片段大小与预期一致(图 2)。



a, d 为 DNA 分子量标准
b, c 为 EcoR I + BamH I

图 2 重组克隆的酶切鉴定

2.3 反义表达载体的构建

由于表达载体和目的片段均比较大, 所以重组率不是很高, 只筛选出 8 个重组克隆, 进一步用 EcoR I、BamH I 酶切鉴定, 电泳图谱(图 3), 表明酶切片段大小与理论值一致。说明目的基因的插入位置和方向都正确。



a, d 为 DNA 分子量标准
b, c 为 EcoR I + BamH I

图 3 酶切鉴定反向克隆

2.4 DNA 序列分析

1 698 bp 的目的片段与已发表的基因一致(图 4)。

经过 DNA 全自动测序仪, 测定得到的序列为

```
GGATCCAAATGCAGATCGTATGAGCAAAAATGAGTTTGGTGTTTGGGAAATTTTCTGCCTAACAAATGCAGATGGTACATCACCTATTCTCAT
GGATCTCGTGTAAGGTGAGAATGGATACTCCATCAGGGATAAAGGATTCAATTCCAGCCTGGATCAAGTACTCACTGCAGGCCCCAGGAGA
AATACCATATGATGGGATTTATTATGATCCTCCTGAAGAGGTAAGTATGTGTTTCAGGCATGCCGAACCTAAACGACCAAAATCATTGCCGAT
ATATGAAACACATGTCGGAATGACTAGCCCCGAACCGAAGATAAACACATATGTAACCTTTAGGGATGAAGTCTCCCAAGAATAAAAAAAC
TTGGATACAATGCAGTGCAAATAATGGCAATCCAAGCAGCACTCATATTATGGAAGCTTTGGATACCATTGTAACATAATTTTTTTCGCGCAAGTA
TTCGTTTTGGTACCCAGAAAGATTTGAAGTCTTTGATTGATAGACACATGAGCTTTGGTTTGCTAGTTCTCATGGATGCGGTTTCATAGTCATGC
GTCAAGTAATACTCTGGATGGGTGAATGGTTTGTATGGTACAGATACACATTACTTTTACAGTGGTCCACGTGGCCATCACTGGATGTGGGA
TTCTCGCCTATTTAACTATGGAACTGGGAAGTTTTAAAGTTTCTTCTCTCCAATGCTAGATGGTGGCTCGAGGAATATAAGTTTGATGGTTTTT
CGTTTTGATGGTGTGACCTCCATGATGTACACTCACCACGGATTACAAGTAACATTTACGGGGAACCTTCAATGAGTATTTTGGCTTTGCCACCG
ATGTAGATGCAGTGGTTTACTTTGATGCTGCTAAATGATCTAATTCATGGACTTTATCCTGAGGCTGTAACCATTTGGTGAAGATGTTAGTGAAT
GTCTACATTTGCCCTTCTCTGTTACCATGGTGGGTAGGTTTTGACTATCGGATGCATATGGCTGTGGCTGACAAATGGATTGACCTTCTCAAG
CAAAGTGATGAACTTGAAGATGGGTGATATTGTCACACACTGACAAATAGGAGGTGGTTAGAGAAGTGTGTAACCTTATGCTGAAAGTCA
TGATCAAGCATTAGTCGCGGACAAGACTATTGCCGTTTTGGTTGATGGACAAGGATATGTATGATTTCATGGCCCTCGATAGACCTTCAACTCTT
ACCATTGATCGTGGGATAGCATTACATAAGATGATTAGACTTATCACAATGGGTTTAGGAGGAGAGGGGTATCTTAATTTTCATGGGAAATGAG
TTTGACATCCTGAATGGATAGATTTTCCAAGAGGTCCGCAAAGACTTCCAAGTGGAAGTTTATTCAGGGAATAACAAACAGTTATGACAAA
TGTGCTCGAAGATTTGACCTGGGTGATGCAGACTATCTTAGGTATCATGGTATGCAAGAGTTTGATCAGGCAATGCAACATCTTGAGCAAAAA
TATGAATTCATGACATCTGATCACCAGTATATTTCCCGGAAACATGAGGAGGATAAGGTGATTGCTGTTGCAAAAGGGAGATTTGGTATTTGTG
TTCAACTTCCACTGCAACAACAGCTATTTTGACTACCGTATTGGTTGTGCAAAAGCCTGGGCTGTATAAGTGCTCTTGGACTCCGACGCTGGAC
TATTTGGTGGATTTAGCAG
```

图 4 目的片段的核苷酸序列

参考文献:

- [1] Smith A M, et al. The synthesis of the starch granule. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol. Biol.*, 1997, 48: 67-87.
- [2] 徐军望, 等. 基因工程改良淀粉品质[J]. *生物技术通报*, 2000, (1): 11-19.
- [3] 庄铁成, 等. 高淀粉玉米的遗传与育种[J]. *玉米科学*, 1996, 4(4): 12-14.
- [4] Cartew R W. Gene silencing by double-stranded RNA. *Curr Opin Coll Boil.*, 2001, 13(2): 244-248.
- [5] Virgil Ferguson. High amylose and waxy corns[A]. in Hallauer, A. R. (ed.). *Specialty Corn*. 1994. Boca Raton: CRC Press.
- [6] 王振华, 等. 高淀粉玉米及其开发利用[J]. *玉米科学*, 2002, 10 (3): 90-92.
- [7] Maniatis T, Fritsch E F and Sambrook J. *Molecular Cloning, a Laboratory Manual* Cold Spring Harbor, New York. 1982.