

文章编号: 1005-0906(2007)02-0031-05

美洲商陆抗真菌蛋白转化玉米的研究和抗病性检测

刘爽¹, 杨爱国², 赵琦¹, 赵玉锦², 张世煌²

(1. 首都师范大学生命科学学院, 北京 100037; 2. 中国农业科学院作物所, 北京 100081)

摘要: 研究美洲商陆抗病毒蛋白(PaAFP)基因转入玉米中对玉米纹枯病的抗性。从美洲商陆叶片中获得美洲商陆抗真菌蛋白前体蛋白基因 cDNA 序列, 构建植物表达载体 pCAMBIA1300-PaAFP, 通过三亲杂交法将其导入根瘤农杆菌 LBA4404 受体菌, 转化玉米获得了大量再生转基因植株。PCR、PCR-southern 杂交、RT-PCR 以及 Tris-Tricine-SDS-PAGE 检测结果表明, 目的基因已经整合到玉米基因组中, 并且已经得到转译。

关键词: 玉米; PaAFP 前体蛋白基因; 抗真菌; 立枯丝核菌

中图分类号: S513.035.3; Q78

文献标识码: A

Maize Transformation of PaAFP Gene and Disease Resistance Assay

LIU Shuang¹, YANG Ai-guo², ZHAO Qi¹, ZHAO Yu-jin², ZHANG Shi-huang²

(1. Institute of Life Sciences, Capital Normal University, Beijing 100037;

2. Institute of Corps, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China)

Abstract: In the paper, plant expression vector pCAMBIA1300-PaAFP was constructed by cloning the PaAFP gene from pokeweed to pCAMBIA-1300. Then, the engineered strain LBA4404 was constructed by conducting the pCAMBIA-1300-PaAFP to *A. tumefaciens* LBA4404 and was used to transform maize. The PCR, PCR-Southern blotting, RT-PCR, SDS-PAGE analysis indicated that the PaAFP gene had been integrated into the genome of maize and produced the protein.

Key words: Maize; PaAFP; Antifungal; *Rhizoctonia solani*

玉米纹枯病是一种严重危害玉米生长的真菌病害。对其发病原因的研究结果表明, 玉米纹枯病病原主要是立枯丝核菌(*Rhizoctonia solani* AG-1-IA)。

PaAFP(P. americana Antifungal Protein)是从美洲商陆(*Phytolacca americana* L.)的种子中分离出的一种广谱抗菌蛋白, 该蛋白只在种子中特异存在。PaAFP 从萌发的种子中释放出来, 创造出一个抵抗病原菌的抑制区域, 以抵挡微生物的危害, 保证种子的正常萌发和生长。该蛋白对多种真菌(*R. solani*, *T. viride*, *M. conica*, *F. oryzae*, *A. mellea*, *M. conica*, *F. graminearum*, *A. tenuis*)和革兰氏阳性菌(*B. megaterium*, *Staphylococcus* sp.) 的生长具有明显抑制作用。PaAFP 具有热稳定性和高碱性。且其特有的 knottin

结构支架, 使其在恶劣的环境中仍能保持稳定的结构。该抗菌蛋白首先以一个含有 65 个氨基酸残基的前体蛋白表达, 其后加工成具有 38 个氨基酸残基的成熟蛋白。

从美洲商陆的叶片中, 通过 PCR 扩增得到其前体蛋白的基因序列, 经过拼接, 得到编码其前体蛋白的 cDNA 序列。将其与 Ubi 启动子构建到 pCAMBIA1300 载体上, 利用根瘤农杆菌 LBA4404 转化玉米, 获得了转基因植株。通过对 PaAFP 基因在植物中的整合和抗病状况的探索, 为这种基因在广谱抗真菌病害的植物基因工程中的实际应用打下基础。

1 材料与方法

1.1 材料

美洲商陆(*Phytolacca americana* L.)为中国科学院植物研究所种植。玉米齐 319 自交系由本实验室提供。

1.2 PaAFP 前体蛋白 cDNA 序列的获得

收稿日期: 2006-04-21; 修回日期: 2007-01-27

作者简介: 刘爽(1980-), 女, 北京人, 在读硕士, 研究方向为植物分子生物学及基因工程。Tel: 13520545720

E-mail: lslsdodo@163.com

1.2.1 编码 PaAFP 前体蛋白 DNA 序列的获得

由于季节等多种原因,本试验未获得足够量的美洲商陆种子作为试验材料。首先从美洲商陆的叶片中利用 CTAB 法提取总 DNA。按照 Genbank (AF105062) 中公布的 PaAFP 前体蛋白 DNA 序列设计基因全长引物。引物序列为:

BamH I

引物 1: 5' GCGGATCCATGGCTAAGGTTTCA 3'

引物 2: 3' ACGTTTTTGGCGATTCTCGAGGC 5'

Sac I

PCR 扩增(94℃ 30 s,57℃ 30 s,72℃ 1 min,30 个循环)获得编码 PaAFP 前体蛋白 DNA 序列。

1.2.2 编码 PaAFP 前体蛋白 cDNA 序列的获得

在 PaAFP 前体蛋白基因序列中,存在一个内含子序列。为获得 cDNA 序列,以 PaAFP 前体蛋白编码 DNA 序列为模板,利用 PCR 扩增分别得到第一外显子序列和第二外显子序列。引物序列为:

第一外显子引物:

*Bam*HI

引物 3: 5' AAGGATCCATGGCTAAGG 3'

引物 4: 3' CGCATTATAGTCGACGC 5'

*Alu*I

第二外显子引物:

Pvu II

引物 5: 5' ACGCCAGCTGTTATGTCA 3'

引物 6: 3' TTTGGCGATTCTCGAGCA 5'

*Sac*I

PCR 扩增得到第一外显子(94℃ 30 s,49℃ 30 s,72℃ 15 s,30 个循环)和第二外显子(94℃ 30 s,50℃ 30 s,72℃ 20 s,30 个循环)。

利用内切酶 *Alu* II 和 *Pvu* II 分别单酶切两个外显子片段,形成两个平末端,之后利用 T4 DNA 连接

酶将两段外显子序列连接在一起。再利用基因全长引物(引物 1 和引物 2)扩增得到 PaAFP 前体蛋白的 cDNA 序列。

1.2.3 测序检测

将扩增得到的 PaAFP 前体蛋白 cDNA 片段连接在 T-easy 载体上,进行测序检测,证明所得片段与 Genbank(AB018476)中所公布的 cDNA 片段完全相同。

1.3 植物表达载体 pCAMBIA1300-PaAFP 的构建

用内切酶 *Bam*HI 和 *Sac*I 双酶切植物表达载体 pCAMBIA1300,用 T4DNA 连接酶将 PaAFP 前体蛋白 cDNA 和植物表达载体 pCAMBIA1300 大片段连接,目的片段上游连有 Ubi 启动子,下游为 Nos 终止子。将载体电击法转化入大肠杆菌 DH5α,利用卡那霉素筛选阳性克隆,用 PCR、酶切及测序方法鉴定阳性克隆,称重组质粒为 pCAMBIA1300-PaAFP。

1.4 重组质粒转化根瘤农杆菌(*A.tumefaciens*)LB A4404

利用三亲杂交法将重组质粒 pCAMBIA1300-PaAFP 转化入根瘤农杆菌 LBA4404 中。

1.5 转化玉米及转基因植株的筛选培养

玉米幼胚的转化步骤参考 Ishida 和 Zhao 的方法,略有改进。培养基见表 1。取幼胚用浸染液充分浸没幼胚,然后静置 5 min。浸染过程中培养皿不晃动。浸染结束后用滤纸吸干幼胚表面的菌液,把幼胚放入共培养培养基,盾片朝上,25℃黑暗中培养 3 d。之后静置培养,28℃黑暗 4~7 d。转移到选择培养基上,每两个星期继代 1 次。在 28℃黑暗中培养两个月左右,开始生长出抗性愈伤。选择生长状态较好的抗性愈伤转移到分化培养基上分化出无根幼苗。移到生根培养基上。幼苗长到 10~15 cm 左右移栽到营养土中。

表 1 玉米培养基配方(1L)
Table 1 Components of maize medium formula

试剂 Reagents	侵染液 Liquid infection	共培养培养基 Co-culture medium	静置培养基 Stewing medium	筛选培养基 Screening medium	分化培养基 Differentiation medium	壮苗培养基 Seedling medium
基本培养基	N ₆	N ₆	N ₆	N ₆	N ₆	1/2MS
2,4-D(mg)	1.5	2.0	1.5	1.5	KT 1 mL	GGR 1 mL
L-Proline(g)	0.69	0.69	0.69	0.69		
Myo-Inositol(mg)					120	50
Casin Acid Hydrolysates(mg)					250	30
Sucrose(g)		30	30	30	30	20
glucose(g)	36					
AgNO ₃ (mg)		0.85	0.85	0.85		
Agar(g)			8.0	8.0	6~7	6~7

续表 1 Continuede 1

试 剂	侵染液	共培养培养基	静置培养基	筛选培养基	分化培养基	壮苗培养基
Reagents	Liquid infection	Co-culture medium	Stewing medium	Screening medium	Differentiation medium	Seedling medium
Gelrite(g)		3.0				
MES(g)		0.5	0.5	0.5		
pH 值	5.2	5.8	5.8	5.8	6.0	6.0
乙酰丁香酮(μM)	100	100				
羧苄青霉素(50 mg/mL)			2 mL	2 mL		
潮霉素(50 mg/mL)				100~300 μL		

1.6 转基因植株的分子检测

提取玉米阳性植株基因组 DNA。利用 PaAFP 前体蛋白基因引物(引物 1 和引物 2)进行扩增。PCR 扩增及电泳结束后, 进行 PCR–Southern 检测。利用 TRIzol 提取总 mRNA, 进行 TR–PCR 检测外源基因的转录情况。提取阳性植株总蛋白, 利用 Tris–Tricine–SDS–PAGE 检测 PaAFP 前体蛋白基因的翻译情况。

2 结果和分析

2.1 PaAFP 前体蛋白 cDNA 序列的获得

电泳检测表明(图 1), 以美洲商陆总 DNA 为模板, PCR 扩增得到编码 PaAFP 前体蛋白的 DNA 序列。经过测序证明获得的编码序列与 Genbank 公布的序列一致。

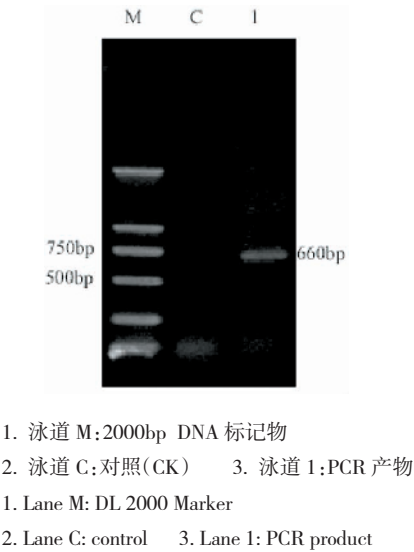


图 1 扩增编码序列的电泳图谱
Fig.1 Electrophoresis identification of PCR analysis of total DNA of pokeweed

电泳检测表明(图 2), 经酶切、连接以及 PCR 扩增, 得到 PaAFP 前体蛋白基因 cDNA 片段, 经过测序证明其与公布的序列一致。

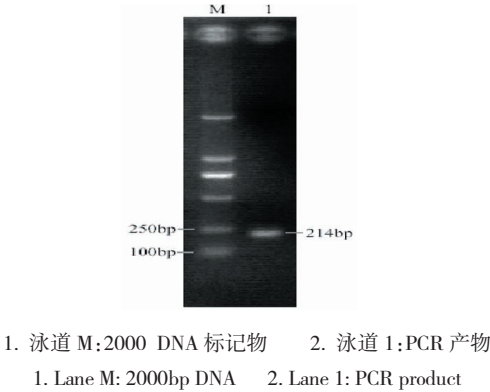


图 2 PaAFP 前体蛋白 cDNA 序列的电泳图谱
Fig.2 Electrophoresis identification of PCR analysis of PaAFP's cDNA sequence

2.2 植物表达载体 pCAMBIA1300–PaAFP 的构建

用 BamHI 和 SacI 双酶切植物载体 pCAMBI–A1300 和 T–easy 载体, 将植物表达载体大片段和目的片段连接, 得到重组质粒 pCAMBIA1300–PaAFP, 构建图谱(图 3)反应了整个过程。电泳检测表明(图 4), 目的片段插入到该植物表达载体中。

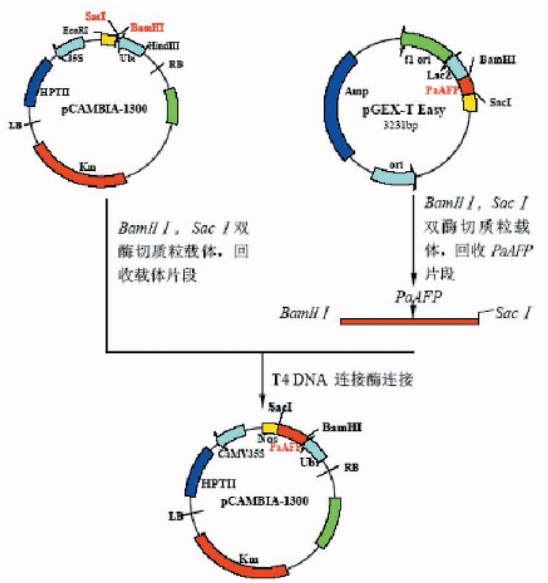
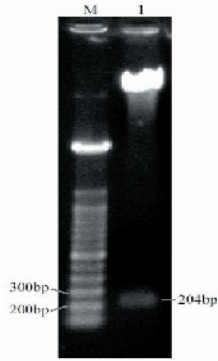


图 3 植物表达载体 pCAMBIA1300–PaAFP 构建流程
Fig.3 Flowchart of constructing plant expressing vector



1. 泳道 M:100bp DNA 标记物 2. 泳道 1:酶切产物
1. Lane M: 100bp ladder Marker 2. Lane 1: digesting product

图 4 对重组质粒 pCambia1300-PaAFP 鉴定
Fig.4 Identification of recombinant plasmid
pCambia1300-PaAFP

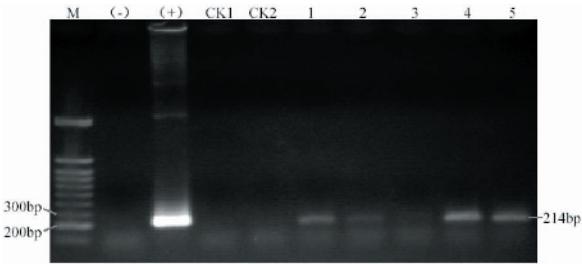
2.3 转基因玉米植株的获得

利用上述方法得到转基因植株，出苗率约为 7%。

2.4 转基因玉米植株的分子鉴定

2.4.1 转基因玉米的 PCR 检测

提取幼叶的基因组 DNA，对其进行了 PCR 检测,结果见图 5。扩增出大约 200bp 的目的条带,与阳性对照扩增得到的条带一致,由此确定,此条带为 PaAFP 前体蛋白基因 cDNA 扩增结果，初步表明目的片段整合入玉米基因组中。没有出现条带的玉米植株为假阳性植株。



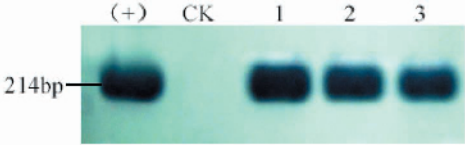
1. 泳道 M:100bp DNA 标记物
2. 泳道(-):非转基因玉米植株
3. 泳道(+):pCambia1300-PaAFP 质粒
4. 泳道 CK1~2: 非转基因玉米植株
5. 泳道:1~5 转基因玉米植株
1. Lane M: 100bp ladder Marker
2. Lane(-): control
3. Lane (+): pCambia1300-PaAFP
4. Lane CK1 - 2: the plants of non-transgenic maize
5. Lane 1 - 5: the plants of transgenic maize

图 5 玉米基因组 DNA 的 PCR 检测

Fig.5 PCR analysis of transgenic maize genome DNA

2.4.2 转基因玉米的 PCR-Southern 检测

为了进一步鉴定 PCR 产物是否为 200bp 的 PaAFP 前体蛋白基因 cDNA 片段，将所得样品的 PCR 扩增产物进行 Southern 杂交,以 PaAFP 前体蛋白基因 cDNA 片段的 PCR 产物回收片段为探针进行杂交,杂交结果与 PCR 扩增结果完全一致,证明所得到的 200bp 的片段确为 PaAFP 前体蛋白基因 cDNA 片段,结果见图 6。



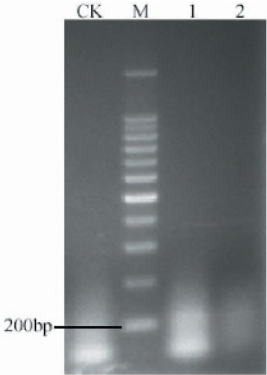
1. 泳道(+): pCambia1300-PaAFP 质粒
2. 泳道 CK:非转基因玉米植株
3. 泳道 1~3:转基因玉米植株
1. Lane (+): plasmid pCambia1300-PaAFP
2. Lane CK: the plant of non-transgenic maize
3. Lane 1 - 3: the plants of transgenic maize

图 6 玉米基因组 DNA 的 PCR-Southern 检测

Fig.6 PCR-Southern identification of transgenic maize genome DNA

2.4.3 转基因玉米 RT-PCR 检测结果

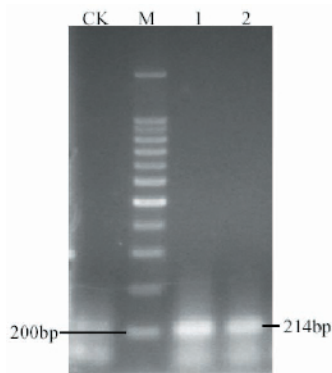
设置不加反转录酶的对照,没有产生目的条带,说明 RNA 提取物中的基因组 DNA 未影响实验结果,结果见图 7。加入反转录酶的 RT-PCR 的结果见图 8,扩增出了约 200bp 的目的条带。这初步证明了转基因玉米中存在 PaAFP 前体蛋白基因的 mRNA,表明了 PaAFP 前体蛋白基因在转录水平上已经得到了表达。



1. 泳道 CK:非转基因玉米植株
2. 泳道 M:200bp DNA 标记物
3. 泳道 1~2:转基因玉米植株
1. Lane CK: the plant of non-transgenic maize
2. Lane M: 200bp ladder Marker
3. Lane 1~2: the plants of transgenic maize

图 7 未加 AMV Reverse Transcriptase 的 RT-PCR 分析

Fig.7 RT-PCR analysis without AMV Reverse Transcriptase



1. 泳道 CK:非转基因玉米基因

2. 泳道 M:200bp DNA 标记物

3. 泳道 1~2:转基因玉米植株
1. Lane CK: the plant of non-transgenic maize;

2. Lane M: 200bp Ladder Marker;

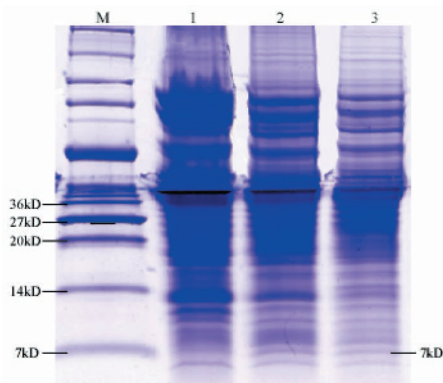
3. Lane 1 - 2: the plants of transgenic maize

图 8 加 AMV Reverse Transcriptase 的 RT-PCR 分析

Fig.8 RT-PCR with AMV Reverse Transcriptase

2.4.4 转基因玉米的 Tris-Tricine SDS-PAGE 分析结果

采用 Tris-Tricine-SDS-PAGE 电泳分析,结果显示转基因玉米比非转基因玉米多一条 7kD 的条带,这与 PaAFP 前体蛋白的分子量相符,初步证明 PaAFP 前体蛋白基因在转基因玉米中已经翻译成了 PaAFP 前体蛋白(图 9)。



1. 泳道 M:蛋白质标准分子量标记

2. 泳道 1:非转基因玉米植株总蛋白

3. 泳道 2~3:转基因玉米植株总蛋白
1. LaneM: broad range protein marker

2. Lane1: total protein of non-transgenic maize plant

3. Lane 2 - 3: total protein of transgenic maize plant

图 9 玉米叶片总蛋白 SDS-PAGE

Fig.9 SDS-PAGE analysis of maize total protein

3 结论与讨论

本试验结果表明, PaAFP 基因已经被转移并整

合到玉米自交系齐 319 基因组中, 并且翻译出前体蛋白,为培育抗真菌玉米新品系提供了育种资源。

农杆菌介导的玉米遗传转化的研究发现, 对受体基因型、受体状态、受体高渗预处理、农杆菌菌液状态、金属离子、共培养天数的依赖性很大。因此, 选择了国内骨干自交系齐 319, 生长到 1 ~ 1.2 mm 的幼胚为受体材料, 侵染时利用葡萄糖制造高渗环境, 浸染农杆菌菌液 OD 为 0.3, 培养时添加 Ag⁺ 离子, 共培养 3 d 等操作, 以提高转化效率。结果表明, 这些处理都是有效的。但就转化效率而言, 还需要进一步改进方法。

PaAFP 前体蛋白前 27 个氨基酸就是一段转运型信号肽(transit signal peptide), 它对于蛋白的正确运输到液泡和细胞外、加工成成熟蛋白具有重要作用。通过 SDS-PAGE 发现了一条 7kD 的新增条带, 认为是 PaAFP 前体蛋白。但没有发现 3kD 的蛋白条带, 即 PaAFP 成熟蛋白。所以无法确定前体蛋白上的转运信号肽是否正确切割。需要进一步进行蛋白纯化、分析等方面的研究。

在 PaAFP 前体蛋白基因转化烟草的试验中, 发现在植株上出现了白斑, 但是在玉米植株上没有发现明显的白斑, 但转基因苗生长相对缓慢, 移栽后不易成活, 怀疑 PaAFP 蛋白对植株生长有一定危害作用。另外, PaAFP 只在美洲商陆的种子中存在, 萌发时释放到周围的土壤中, 其他组织中没有, 所以 PaAFP 可能会对帮助植株正常生长的一些根系微生物产生影响, 因此, 应在以后的转化试验中考虑使用特异启动子, 以减少此蛋白的一些副作用。或对 PaAFP 基因片段进行改造, 使其既保持抗真菌活力, 又对植株没有危害。

参考文献:

[1] 唐海涛, 等. 玉米纹枯病研究进展[J]. 玉米科学, 2004, 12(1): 93-96, 99 .

[2] Shao F, Hu Z, Xiong Y M, Huang Q Z, et al. A new antifungal peptide from theseeds of *Phytolacca americana*: characterization, amino acidse-quence and cDNA cloning[J]. *Biochim Biophys Acta*, 1999, 1430: 262-268.

[3] Liu Y F, Luo J C, Xu C Y, et al. Purification, Characterization, and Molecular Cloning of the Gene of a Seed-Specific Antimicrobial Pro-tein from Pokeweed[J]. *Plant Physiology*, 2000, 122: 1015-1024.

[4] Gao G H, Liu W, Dai J X, et al. Solution structure of PAFP-S: a new knottin-type antifungal peptide from the seeds of *Phytolacca americana* [J]. *Biochemistry*. 2001, 40(37): 10973-10978.

[5] Peng C, Dong C X, Hou Q M, et al. The hydrophobic surface of PaAMP from pokeweed seeds is essential to its interaction with fungal mem-brane lipids and the antifungal activity[J]. *FEBS Letters* 2005, 579: 2445-2450.

(下转第 38 页)

(上接第 35 页)

- [6] 王关林,方宏筠.植物基因工程(第二版)[M].科学出版社,2002.
- [7] Zhao Z-Y, Gu W, Tagliani L, et al. High throughput genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* in maize[J]. Mol. Breed., 2002, 8(4):323-333.
- [8] Lupotto E, Reali A, Passera S, Chan M-T. Maize elite inbred lines are susceptible to *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation[J]. Maydica, 1999, 44: 211-218.
- [9] 张艳贞,王 罡,胡汉桥,等.农杆菌介导将 Bt 杀虫蛋白基因导入优良玉米自交系的研究[J].遗传,2002,24(1):35-39.
- [10] 张 荣,王国英,张晓红.根癌农杆菌介导的玉米遗传转化体系

的建立[J].农业生物技术学报,2001,19(1):45-48.

- [11] Popelka J C, Altpeter F. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated genetic transformation of rye (*Secale cereale* L.)[J]. Mol Breed. 2003, 11(3): 203-211.
- [12] Carvalho C H S, Bohorova N, Bordallo P N, et al. Type II callus production and plant regeneration in tropical maize genotypes[J]. Plant Cell Rep, 1997, 17: 73-76.
- [13] Hansen G, et al. Evidence for *Agrobacterium*-induced apoptosis in maize cells[J]. Molecular Plant-Microbe Interactions, 2000, 13(6): 649-657.

(责任编辑:朴红梅)