

# 果聚糖蔗糖转移酶基因的克隆及耐盐转基因烟草的培育

张 慧\*\*\* 董 伟\*\* 周骏马 杜宝兴 谷冬梅 陈受宜\*

(中国科学院遗传研究所 北京 100101)

**摘 要** 采用 PCR 方法克隆了枯草杆菌 (*Bacillus subtilis*) 果聚糖蔗糖转移酶基因 (SacB), 将其与克隆自酵母 (*Saccharomyces cerevisiae*) 的羧肽酶 A 的液泡引导信号序列连接得到嵌合基因。测序验证后, 插入含 NPT II 基因的植物双元表达载体 pBin438 中, 经农杆菌介导转化烟草。部分经卡那霉素筛选的抗性芽能在含 1% NaCl 的 MS 培养基上正常生根, 而未转化芽不能生根或根生长缓慢。转基因小苗移入盛蛭石的花盆并浇灌含 1% NaCl 的 hoagland's 营养液, 17d 后, 其中一些转基因烟草植株生长良好, 而未转化苗出现明显萎蔫。PCR 扩增及 Northern 分析证实 SacB 基因已导入转基因植株并得到转录。此结果表明 SacB 基因的植物基因工程可提高烟草植株的耐盐性。

**关键词** 果聚糖蔗糖转移酶基因, 转基因烟草, 耐盐性

学科分类号 Q933

近年来植物耐旱耐盐基因工程已露端倪<sup>[1]</sup>, 相继克隆了一些与渗透调节物质如甘露醇、脯氨酸、果聚糖等生物合成相关的基因及其它的耐逆有关基因如 SOD 基因及 *Lea* 基因等, 这些基因的转化不同程度地提高了转基因植物的耐盐能力<sup>[2~10]</sup>。植物细胞中的果聚糖是一种天然的渗透调节物, 它在液泡中的大量积累对代谢无不利影响。已有证据表明被子植物演化过程中果聚糖积累与一些植物耐旱(寒)能力相关<sup>[11]</sup>, 因而该基因转入植物并在液胞中积累其表达产物可能提高转基因植物的耐盐能力。本文根据已有的枯草杆菌果聚糖合成酶基因的序列资料及 Ebskamp 等<sup>[12]</sup>和 Van der Meer 等<sup>[13]</sup>的经验, 采用 PCR 方法克隆了果聚糖蔗糖转移酶基因, 并将其与液泡引导序列连接, 构建植物表达载体后转化烟草, 得到了较高耐盐性的烟草工程植株。

## 1 材料和方法

### 1.1 微生物培养及其 DNA 提取

枯草杆菌 (*B. subtilis* 168) 和啤酒酵母 (*S. cerevisiae* X8) 菌种分别由本所章银梅先生和中科院微生物所徐浩教授提供。枯草杆菌菌种活化后, 接种 LB 培养基, 37℃ 培养过夜, 离心收集菌体后按 Ausubel 等<sup>[14]</sup>的方法提取 DNA; 酵母菌的培养采用改良的 LB 液体培养基(用蔗糖代替葡萄糖), 30℃ 培养 24h 后收集菌体, 按 Ausubel 等<sup>[14]</sup>方法提取 DNA。

国家高技术计划资助项目。

\* 通讯联系人。

\*\* 在本文中与第一作者作出相同贡献。

\*\*\* 现在地址: 山东师范大学生物系, 济南 250014。

收稿日期: 1996-02-28, 修回日期: 1997-09-02。

## 1.2 引物设计及基因扩增

根据枯草杆菌果聚糖蔗糖转移酶基因(SacB)的序列资料<sup>[15]</sup>,设计了一对引物:

5'端引物 ga tctagAAAGAAACGAACCAAAAGGCCATATAAG  
Xba I

3'端引物 ca gtcgaccTATTTGTTAACTGTTAATTGTCC  
Sal I

根据酵母菌羧肽酶 A 液泡引导序列(*cpy*)<sup>[16]</sup>,设计了另一对引物

5'端引物 ta ggatccgaccATGAAAGCATTACACAGTTTAC  
BamH I

3'端引物 ctg aatattGACACGAAGCTGATAGTTTTC  
Ssp I

扩增反应在 50 $\mu$ l 体系中进行, 含约 50ng 模板, 5 $\mu$ l 10 $\times$  PCR 缓冲液, 4 $\mu$ l dNTP (2.5mmol/L), 5'端和 3'端引物各 2 $\mu$ l (10 $\mu$ M), 0.4 $\mu$ l Taq 酶 (5u/ $\mu$ l) 及超纯 H<sub>2</sub>O。扩增条件为 94 $^{\circ}$ C, 1min; 56 $^{\circ}$ C, 1min; 72 $^{\circ}$ C, 2min; 共 30 个循环, 最后在 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

## 1.3 嵌合基因的构建及全序列分析

嵌合基因的克隆过程见图 1。采用 PCR 方法筛选含嵌合基因(*cpy* + SacB)的重组质粒 pBYU。所用引物对为 *cpy* 基因片段的 5'端引物及 SacB 基因的 3'端引物。

根据嵌合基因的物理图谱, 选择了 EcoR I 和 Kpn I 两种内切酶, 按标准克隆程序<sup>[17]</sup>建立亚克隆并进行序列分析。

序列反应用 ABI 公司的 Taq Dye Primer Cycle Sequencing kit 在 PE GenAmp PCR System 9600 上进行, 序列分析在 ABI 测序仪上完成。

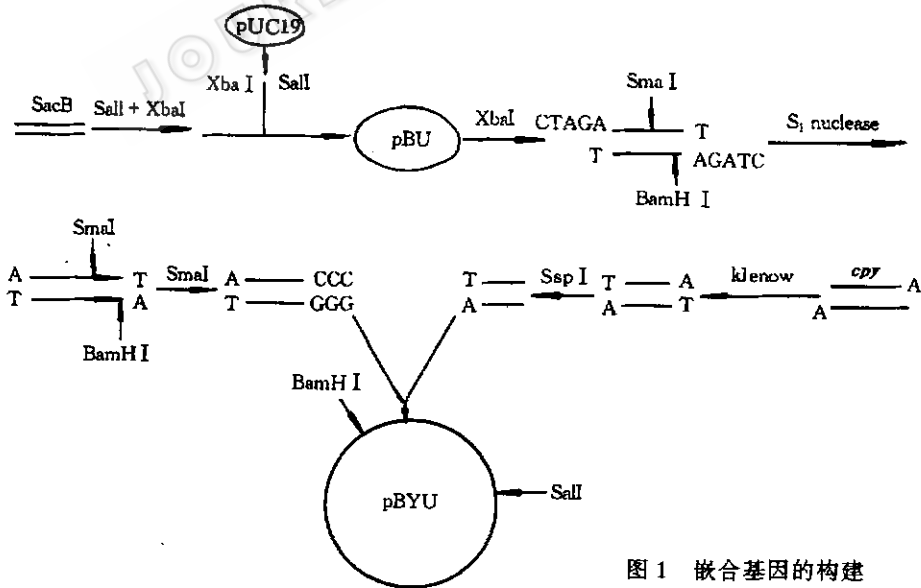


图 1 嵌合基因的构建

Fig. 1 Construction of chimeric gene

## 1.4 植物表达载体构建和农杆菌的转化

用 BamH I 和 Sal I 酶解重组质粒(pBYU), 嵌合基因经 GeneClean 回收后克隆至相同

酶切的双元载体 pBin438 中得到植物表达载体 pBYB, 并按 Horsch 方法<sup>[17]</sup>转化农杆菌。

### 1.5 烟草转化及再生

烟草(*Nicotiana tabacum*)品系为 K326, 按常规程序培养无菌苗。农杆菌介导的叶圆盘法转化按 Horsch 等<sup>[17]</sup>, 在含卡那霉素 200 $\mu$ g/ml 的分化培养基(MS)上筛选抗性芽, 转接 2 次后将抗性芽转移至含 1% NaCl 的培养基中筛选并生根。

### 1.6 转基因植株的 PCR 及 Northern 分析

转基因植株叶片 DNA 的微量提取及 PCR 操作, 根据 Edwards 等<sup>[18]</sup>, PCR 检测用 *cpy* 的 5'端引物和 SacB 的 3'端引物进行。RNA 的提取及 Northern 操作同张劲松等<sup>[19]</sup>。

## 2 结果及分析

### 2.1 目的基因的 PCR 扩增

分别以枯草杆菌及酵母菌的总 DNA 为模板, 用本文所设计的引物进行 PCR 扩增, 产物经 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳分析(图 2), SacB 和 *cpy* 片段大小分别与预期的 1.3kb 和 0.3kb 相似。SacB 基因扩增产物用 Xba I 和 Sal I 双酶切后, 定向克隆于 pUC19 的 Xba I 和 Sal I 位点, 获得重组质粒 pBU。

### 2.2 嵌合基因的构建及序列分析

与枯草杆菌不同, 植物细胞内果聚糖的合成及积累部位均为液泡, 实现 SacB 基因在植物中的定位表达的策略之一便是在 SacB 基因 5'端连接来自酵母的羧肽酶 A 的液泡引导肽(*cpy*)序列<sup>[12, 13, 20]</sup>。为实现此目标, 实验中先将 SacB 基因定向克隆于 pUC19 的 Xba I 和 Sal I 位点, 获得重组质粒 pBU, 然后用 Xba I 酶切 pBU 质粒, 再在温和的条件下用 S1 酶处理, 除去 Xba I 酶切残存的多余单链碱基(4 个碱基), 回收片段后再用 Sma I 酶切, 除去原载体中的 BamH I 位点, 最后与经补平及 Ssp I 酶切的 *cpy* 基因片段连接(参见图 1), 转化大肠杆菌后, 采用 PCR 筛选转化子, 得到了 3 个含嵌合基因的重组克隆, 其中 1 个克隆经正向测序证实重组质粒(pBYU)内 *cpy* 基因片段与

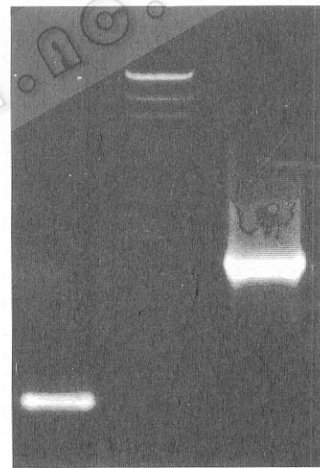


图 2 SacB 和 *cpy* 基因片段 PCR 扩增产物的电泳分析

Fig.2 Electrophoresis of PCR amplified product  
A is *cpy*; B is MW  $\lambda$  DNA digested by EcoRI and Hind III; C is SacB

SacB 基因连接无误。含嵌合基因(接近 1.7kb)的重组质粒 pBYU 的正向和反向测序不能获得嵌合基因全序列资料, 因而分别采用 BamH I -EcoR I、EcoR I -Kpn I、Kpn I -Sal I 共 3 组酶酶切 pBYU, 获得了 3 个亚克隆 PSBE, PSEK 及 PSKS(见图 3), 分别测序表明嵌合基因开放阅读区全长 1664bp, 编码 558 个氨基酸(图 4), 与前人的报道一致, 而且由于引物设计及嵌合基因构建过程精密, SacB 基因和 *cpy* 的连接准确符合原序列, 与前

人<sup>[12,13,20]</sup>在两个基因连接区域制造突变迥然有别。

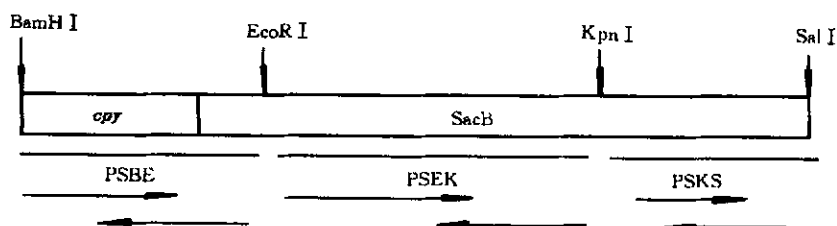


图 3 亚克隆的构建策略

Fig.3 Strategies for construction of subclone

#### ATTCGAGCTCGGTACCCC A TAGGATCCGACC

ATGAA	AGCAT	TCACC	AGTTT	ACTAT	GTGGA	CTAGG	CCTGT	CCACT	ACACT	CGCTA	AGGCC	60
ATCTC	ATTGC	AAAGA	CCGTT	GGGTC	TAGAT	AAGGA	CGITT	TGCTG	CAAGC	TGCGG	AAAAA	120
TTTGG	TTTGG	ACCTC	GACCT	GGATC	ATCTC	TTGAA	GGAGT	TGGAC	TCCAA	TGTAT	TGGAC	180
GCTTG	GGCCC	AAATA	GAGCA	TTTGT	ACCCA	AACCA	GGITA	TGAGC	CTTGA	AACTT	CCACT	240
AAGCC	AAAAT	TCCCT	GAAGC	AATCA	AAACG	AAGAA	AGACT	GGGAC	TTTGT	GGTCA	AGAAT	300
GACGC	AAGTG	AAAAC	TATCA	GCTTC	GTGTC	AATAA	AGAAA	CGAAC	CAAAA	GCCAT	ATAAG	360
GAAAC	ATACG	GCATT	TCCCA	TATTA	CACGC	CATGA	TATGC	TGCAA	ATCCC	TGAAC	AGCAA	420
AAAAA	TGAAA	AATAT	CAAGT	TCCTG	AATTC	GATTC	GTCCA	CAATT	AAAAA	TATCT	CTTCT	480
GCAAA	AGGCC	TGGAC	GTTTG	GGACA	GCTGG	CCATT	ACAAA	ACGCT	GACGG	CACTG	TCGCA	540
AACTA	TCACG	GCTAC	CACAT	CGTCT	TTGCA	TTAGC	CGGAG	ATCCT	AAAAA	TGCGG	ATGAC	600
ACATC	GATTT	ACATG	TTCTA	TCAAA	AAGTC	GGCGA	AACCT	CTATT	GACAG	CTGGA	AAAAC	660
GCTGG	CCGCG	TCTTT	AAAGA	CAGCG	ACAAA	TTCGA	TGCAA	ATGAT	TCTAT	CCTAA	AAGAC	720
CAAA	ACAA	AATGG	TCAGG	TTCAG	CCACA	TTTAC	ATCTG	ACGGA	AAAAT	CCGTT	TATTG	780
TACAC	TGATT	TCTCC	GGTAA	ACATT	ACGGC	AAACA	AACAC	TGACA	ACTGC	ACAAG	TTAAC	840
GTATC	AGCAT	CAGAC	AGCTC	TTTGA	ACATC	AACGG	TGTAG	AGGAT	TATAA	ATCAA	TCTTT	900
GACGG	TGACG	GAAAA	ACGTT	ACAAA	ATGTA	CAGCA	GTTCA	TCGAT	GAAGG	CAACT	ACAGC	960
TCAGG	CGACA	ACCAT	ACGCT	GAGAG	ATCCT	CACTA	CGTAG	AAGAT	AAAGG	CCACA	AATAC	1020
TTAGT	ATTTG	AAGCA	AACAC	TGGAA	CTGAA	GATGG	CTACC	AAGGC	GAAGA	ATCTT	TATTT	1080
AACAA	AGCAT	ACTAT	GGCAA	AAGCA	CATCA	TTCTT	CCGTC	AAGAA	AGTCA	AAAAC	TTCTG	1140
CAAA	CGATA	AAAAA	CGCAC	GGCTG	AGTTA	GCAAA	CGGCG	CTCTC	GGTAT	GATTG	AGCTA	1200
AACGA	TGATT	ACACA	CTGAA	AAAG	TGATG	AAACC	GCTGA	TTGCA	TCTAA	CACAG	TAACA	1260
GATGA	AATTG	AACGC	GCGAA	CGTCT	TAAAA	ATGAA	CGGCA	AATGG	TACCT	GTTCA	CTGAC	1320
TCCCG	CGGAT	CAAAA	ATGAC	GATTG	ACGGC	ATTAC	GTCTA	ACGAT	ATTTA	CATGC	TTGGT	1380
TATGT	TTCTA	ATTCT	TTAAC	TGGCC	CATAC	AAGCC	GCTGA	ACAAA	ACTGG	CCTTG	TGTTA	1440
AAAAT	GGATC	TTGAT	CCTAA	CGATG	TAACC	TTTAC	TTACT	CACAC	TTCGC	TGTAC	CTCAA	1500
GCGAA	AGGAA	ACAAT	GTCGT	GATTA	CAAGC	TATAT	GACAA	ACAGA	GGATT	CTACG	CAGAC	1560
AAACA	ATCAA	CGTTT	GCGCC	AAGCT	TCCTG	CTGAA	CATCA	AAGGC	AAGAA	AACAT	CTGTT	1620
GTCAA	AGACA	GCATC	CTTGA	ACAAG	GACAA	TTAAC	AGTTA	ACAAA	TAG			1668
GTCGACCTGCAGGCATGCAAGCT												

图 4 嵌合基因的核苷酸序列

Fig.4 Nucleotide sequence of the chimeric gene

Arrow shows the linkage of SacB and cpy

### 2.3 植物表达载体的构建

用 BamH I 和 Sal I 切取重组质粒 pBYU 的嵌合基因, 插入 pBin438 的相应酶切位点, 获得了含嵌合基因的双元载体 pBYB, 其结构如图 5 所示。

2.4 烟草的转化及耐盐性鉴定

烟草小圆片与导入植物表达载体的农杆菌(*A. tumefaciens*)共培养后转

入含卡那霉素及头孢霉素的 MS 培养基上筛选抗性芽,经 3 轮筛选后,自 300 个转化子中共获得 61 个绿色抗性芽(芽长 2~3cm),将其转移至含 1% NaCl 的 MS 生根培养基,经过 20d 后有 17 株不仅正常生根且长势良好,而对照(未经卡那霉素筛选,直接转至含盐培养基中)仅有个别能生根,且根长及根数均大大低于转基因植株,生长受抑(见图 6)。

转基因烟草小苗移入盛蛭石的花盆看护培养(Hoagland 营养液)5d 后,用含 1% NaCl 的 Hoagland 营养液处理 17d,其生长状况明显好于未转化的烟草再生苗,且无明显受害迹象,而未转化对照的下部叶出现严重萎蔫。

2.5 转基因烟草的 PCR 分析

提取转基因烟草(5 株)及对照(2 株)叶片的 DNA,用嵌合基因 PCR 扩增引物进行扩增,转基因植株均给出了与含嵌合基因的质粒扩增片段相同分子量(1.7kb)的条带,而对照植株未扩增出相应条带,说明外源基因已整合至耐盐转基因植株中(图 7)。Northern 结果(图 8)表明所有能经受盐胁迫选择的转基因植物的外源基因均有不同程度的转录。

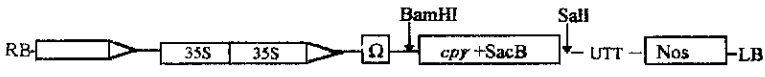


图 5 嵌合基因的植物表达载体结构  
Fig.5 Structure of plant expression vector of chimeric gene

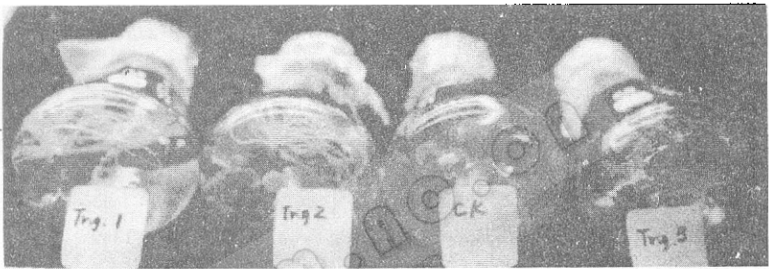


图 6 烟草 K<sub>n</sub> 抗性芽与对照在含盐培养基上的生根比较  
Fig. 6 Comparison between the Kan-resistant and control shoots in growth on MS medium containing 1.0% NaCl

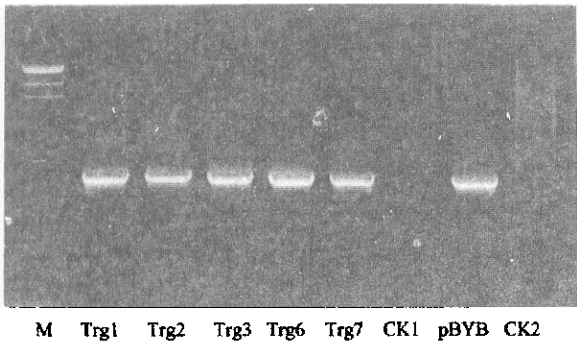


图 7 转基因烟草植株的 PCR 检测  
Fig.7 PCR analysis of the transgenic plants

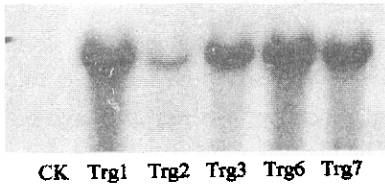


图 8 转基因烟草植株的 Northern 检测  
Fig. 8 Northern analysis of the transgenic plants

**致 谢** 作者感谢方荣祥教授提供植物双元载体质粒, 章银梅和徐浩教授提供枯草杆菌和酵母菌种。

### 参 考 文 献

- 1 Bohnert H J, Jensen R G. TIBTECH, 1996, 14: 89~97
- 2 刘俊君、彭学贤、王海云等. 生物工程学报. 1996, 12: 206~210
- 3 Kishor PBK, Hong Z, Miao G H *et al.* Plant Physiol. 1995, 108: 1387~1394
- 4 Tarczynski M C, Jensen R G, Bohnert H J. Proc Natl Acad Sci, USA. 1992, 89: 2600~2604
- 5 Tarczynski M C, Jensen R G, Bohnert H J. Science. 1993, 259: 508~510
- 6 Thomas J C, Sepahi M, Bohnert H J. Plant Cell Environ. 1995, 18: 57~61
- 7 Lilies G L, Holmberg N, Bulow L. Biotech. 1996, 14: 177~180
- 8 Mckersie B D, Bowley S R, Harjanto *et al.* Plant Physiol. 1996, 111: 1177~1181
- 9 Xu D P, Duan X L, Wang B Y *et al.* Plant Physiol. 1991, 110: 249~257
- 10 Pollock C J, Cairns A J. Ann Rev Plant Physiol. 1991, 42: 77~101
- 11 Van Camp W, Capiou K, Montagu M V. Plant Physiol. 1996, 112: 1703~1714
- 12 Ebskamp M J M, Van der I M *et al.* Biotechnol. 1994, 12: 272~275
- 13 Van der Meij I M, Ebskamp M J M, Visser RGF *et al.* The Plant Cell. 1994, 6: 561~570
- 14 Ausubel F M, Brent R, Kingston R E, *et al.* Current Protocols in Molecular Biology. New York. 1987, John Wiley and Sons.
- 15 Steinmetz M, Le Coq D, Aymerich S *et al.* Mol Gen Genet. 1985, 200: 220~228
- 16 Valls L A, Hunter C P, Rothman J H *et al.* Cell. 1987, 48: 887~897
- 17 张劲松, 周骏马, 张 弛等. 中国科学 B 辑. 1995, 25: 1172~1177
- 18 Edwards K, Johnstone C, Thomson C. Nucleic Acids Res. 1991, 19: 1349
- 19 Horsch R B, Fry J E, Hoffman N L. Science. 1985, 227: 1229~1232
- 20 Maniatis T, Fritsch E F, Sambrook J. Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY 1989
- 21 Pilon-Smits E A H, Ebskamp M J M, Paul M J *et al.* Plant Physiol. 1995, 107: 125~130

## The Cloning of Levansucrase Gene and Its Engineering of Salttolerant Tobacco Plants

Zhang Hui Dong Wei Du Baoxing Zhou Junma Gu Dongmei Chen Shouyi

(Laboratory of Plant Biotechnology, Institute of Genetics, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100101)

(Chinese Center, DeMontfort University, Norman Borlaug Center for Plant Science, China)

**Abstract** SacB gene from *Bacillus subtilis*, which encodes levansucrase, was cloned by the PCR method and then coupled to the carboxypeptidase Y vacuolar sorting signal (cpy) from *Saccharomyces cerevisiae*. The chimeric gene was sequenced and inserted into the plant binary expression vector (pBin438) containing NPT II gene, then transferred into tobacco (*Nicotiana tabacum* var. K326) by agrobacterium mediated transformation. Following selection by kanamycin, some transformed shoots were normally rooted on MS medium supplemented 1% NaCl, but the controls were not. The plantlets were transferred to pots containing vermiculite and watered with hoagland's nutrient solution added 1% NaCl and showed less growth inhibition than controls. By PCR and Northern analysis, it was verified that the SacB gene had been integrated and transcribed in those transgenic plants. The results indicated that the SacB gene could enhance salt tolerance of transgenic plant.

**Key words** SacB, gene, transgenic tobacco, salt tolerance