

## *germin* 基因的克隆及其在烟草中的表达

王冰山<sup>1</sup> 窦道龙<sup>2</sup> 张 猛<sup>3</sup> 王志兴<sup>1</sup> 贾士荣<sup>1</sup>

(1. 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081; 2. 中国科学院植物研究所, 北京 100093;

3. 西北农林科技大学园艺系, 杨凌 712100)

**摘要:** 克隆了具有草酸氧化酶活性的小麦(*Triticum aestivum*) Germin 蛋白的基因, 构建了植物表达载体并用根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导法转化烟草。Southern 杂交和酶活性检测表明, *germin* 基因在转基因烟草(*Nicotiana tabacum*)中得到整合、表达, 并正确组合成具有草酸氧化酶活性的同源六聚体蛋白。离体实验表明, 外源 *germin* 基因的表达提高了转基因烟草离体叶片对草酸的耐受性。

**关键词:** *germin* 基因; 转基因烟草; 草酸

## Cloning of *germin* Gene and Its Expression in Tobacco

Wang Bingshan<sup>1</sup> Dou Daolong<sup>2</sup> Zhang Meng<sup>3</sup> Wang Zhixing<sup>1</sup> Jia Shirong<sup>1</sup>

(1. Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081, China;

2. Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China;

3. Horticulture Department, Northwest Science and Technology University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100, China)

**Abstract:** Oxalic acid was produced by several plant pathogenic fungi and thought to play a primary role in the pathogenicity of fungal species, including the wide host-range pathogen *Sclerotinia sclerotiorum*. In the current work, a *germin* gene from wheat (*Triticum aestivum*) was cloned. A plant expression vector containing the *germin* gene was constructed by CaMV 35S promoter, which was used for *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of tobacco (*Nicotiana tabacum*). Southern blotting assay indicated that the target gene was integrated into tobacco genome. Enzymatic activity assay of oxalate oxidase in transgenic tobacco showed that the *germin* gene was expressed, which resulted in the formation of homohexamer with enzymatic activity correctly, and the transgenic plants were tolerant of the exogenously supplied oxalic acid.

**Key words:** *germin* gene, transgenic tobacco, oxalic acid

草酸作为真菌分泌的毒素, 是核盘菌(*Sclerotinia sclerotiorum*)致病过程的决定因子, 不能产生草酸的核盘菌突变株同时丧失其毒性<sup>[1]</sup>。目前已在核盘菌属等 9 个属中有报道<sup>[2]</sup>。核盘菌在油菜、大豆、向日葵及十字花科蔬菜等植物上引起严重的菌核病。油菜菌核病属于油菜三大病害之首, 由于核盘菌为广谱性非专化性病原菌, 油菜中至今未找到对该病原菌免疫的抗原。

鉴于草酸在致病中的重要作用, 我们试图利用具有草酸氧化酶活性的 Germin, 从分解草酸入手进行抗菌核病的研究。Germin 是小麦种子开始萌发的一个标志蛋白, 是带有金属 Mn 离子的同源六聚体

蛋白, 每个 Germin 同源六聚体由 1 206 个氨基酸残基, 6 个 Mn<sup>2+</sup> 和 1 512 个 H<sub>2</sub>O 组成, 每个单体包含 1 个不规则的 N 端延伸、1 个 jellyroll  $\beta$ -桶结构域和 3 个  $\alpha$ -螺旋组成的 C 端  $\alpha$ -螺旋结构域<sup>[3]</sup>。Lane 等发现 Germin 具有一种强的草酸氧化酶活性, 可将草酸分解为 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 和 CO<sub>2</sub><sup>[4]</sup>。国内尚未见利用 *germin* 基因提高转基因植物对草酸的耐受性及菌核病抗性的报道。本研究通过 PCR 扩增克隆了小麦 *germin* 基因, 构建了 CaMV 35S 启动子驱动的 *germin* 基因植物表达载体, 经遗传转化获得了转基因烟草植株。经 Southern 杂交证明 *germin* 基因已整合到烟草的基因组中。酶活性检测表明, 源于单子叶植物小麦的 *germin* 基因能够在双子叶植物烟草中表达并正常装配成具有酶活性的同源六聚体蛋白。Germin 的表

王冰山:男, 33 岁, 博士, 助理研究员。Email:<bswang@mail.caas.net.cn>

收稿日期:2002-06-06 接收日期:2002-06-19

达提高了转基因烟草叶片在体外实验中对草酸的耐受性。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5 $\alpha$ 、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404、质粒 pBluescript(KS)、pBI121 及烟草(*Nicotiana tabacum* cv. NC89)由本实验室保存,质粒 pT(4A)由郭三堆先生惠赠。内切酶、修饰酶为 Biolabs 公司产品。*germin* 基因 PCR 引物由上海生工公司合成。小麦(*Triticum aestivum*) 京 411 由中国农业科学院作物研究所提供。

### 1.2 方法

**1.2.1 *germin* 基因的克隆** 提取小麦京 411 叶片总 DNA。根据小麦 *germin* 基因及其分泌信号肽序列<sup>[5]</sup>,设计 PCR 引物进行 PCR 扩增。

PCR 引物:

引物 G1:5'GGCTGCAGCATGGGGTACTCCAAAAC3';

*Pst*I

引物 G2:5'TCCGTCGACTTAAACCCAGCGGCAAAC3'.

*Sal*I

扩增条件为 94 °C 1 min、52 °C 1 min、72 °C 1 min。循环 35 次。PCR 产物经 *Pst*I + *Sal*I 双酶切后克隆到 pBluescript KS 的相应位点,得到 pBG。

**1.2.2 *germin* 基因植物表达载体的构建及农杆菌的转化** pBG 经 *Pst*I + *Sal*I 双酶切,电泳回收 *germin* 基因片段(680 bp),克隆到 pTQ4A 的 *Pst*I 与 *Xho*I 位点之间,得到 pTG,将 *germin* 基因插入 pTQ4A 上带有两个增强子的 CaMV 35S 启动子、翻译增强片段  $\Omega$  序列和 polyA 序列、Nos 终止子之间,得到重组质粒 pTSH。用 *Eco*R I + *Hind*III 双酶切 pTG。将目的片段(约 2.1 kb)电泳回收后克隆于 pBI121 的相应位点,获得植物表达载体 pBTG(图 1)。

将鉴定正确的 pBTG 以冻融法导入活化的根癌农杆菌 LBA4404 中。

**1.2.3 烟草的遗传转化及转基因烟草的 Southern 杂交分析** 叶盘法转化烟草<sup>[6]</sup>。

取生根培养基上的卡那霉素(Kan)抗性植株叶片提取总 DNA,以引物 G1 和 G2 进行 PCR 扩增

检测,反应条件同 1.2.1。取 10 株 PCR 阳性植株的总 DNA 各 10  $\mu$ g,以 *Pst*I + *Eco*R I 双酶切,以非转基因植株为阴性对照,以 pTG/*Pst*I + *Eco*R I 为阳性对照,电泳,进行 Southern 转移,取 pBG/*Pst*I + *Sal*I 的 *germin* 基因片段,按随机引物标记试剂盒提供的程序进行((-<sup>32</sup>P)-dCTP 标记,制备探针后进行 Southern 杂交。

**1.2.4 转基因植株中草酸氧化酶活性的定性检测** 取 300  $\mu$ g 叶片置 1.5 mL 离心管中,加入 300  $\mu$ L 水及适量 PVP 和石英砂,研磨。取 50  $\mu$ L 粗提液在硝酸纤维素膜上点膜。然后将膜置于显色液中显色[琥珀酸 40 mmol/L,草酸 2 mmol/L,4-氯-1-萘酚 0.5 mg/mL,辣根过氧化物酶(HRP)5 U/mL,酒精 60% (V/V),pH 3.8]<sup>[7]</sup>。

**1.2.5 离体叶片草酸耐受性实验** 选取不同植株相同部位、大小一致的叶片,将叶柄置于 20 mmol/L 草酸溶液(pH 4)中。以水(pH 4)为对照。从第 4 天开始观察叶片变化。

## 2 结果

### 2.1 *germin* 基因的克隆

测序结果表明,克隆的 *germin* 基因和已发表的小麦 *germin* 基因序列在分泌信号肽(23 个氨基酸)编码序列的 31、39、48、56、58、64 及 66 bp 处有 7 个碱基不同,引起信号肽近 3' 端 3 个氨基酸的变化,第 16 位的亮氨酸变为苯丙氨酸,第 19 位的脯氨酸变为亮氨酸,第 20 位的丙氨酸变为苏氨酸。

*Germin* 成熟蛋白编码序列的第 9、12、30、487 bp 处共有 4 个碱基与已报道的序列不同,但并未导致氨基酸的变化。

### 2.2 *germin* 基因植物表达载体的构建

图 1 为载体 pBTG 的构建图,其主要元件包括带 2 个增强子的 CaMV 35S 启动子(780 bp),翻译增强片段(序列(80 bp),*germin* 信号肽(69 bp),*germin* 结构基因(690 bp),poly A 序列(240 bp),Nos 终止子(250 bp),选择标记基因为 *nptII*。

### 2.3 Kan 抗性植株的分子鉴定

共获得 32 株转基因植株。杂交结果表明,10 株中有 9 株为阳性(图 3)。

### 2.4 转基因植株中草酸氧化酶活性的定性检测

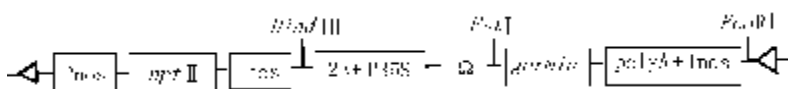


图 1. 植物表达载体 pBTG 的构建示意图

Fig.1. Diagram of the plant expression vector pBTG construction

结果表明,阴性对照未显色,转基因植株中 4 株有显色反应(图 3)。证明外源 *germin* 基因在烟草中得到表达,且具有草酸氧化酶活性。说明单子叶植物来源的 *germin* 基因可以在双子叶的烟草中表达,且能够正常组装成具有酶活性的寡聚体蛋白。

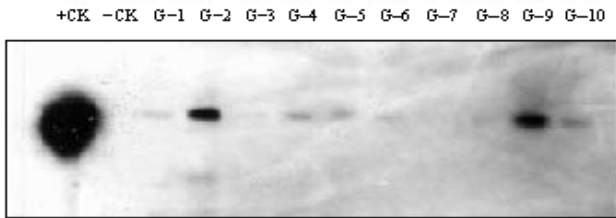


图 2. 转基因烟草的 Southern 杂交检测

Fig. 2. Southern blot hybridization of transgenic tobacco plants +CK, pTG/*Pst*I + *Eco*R I ; -CK, 非转基因烟草; 1~10, 转基因烟草。+CK, pTG/*Pst*I + *Eco*R I ; -CK, non-transgenic tobacco; 1~10, transgenic tobacco plants.

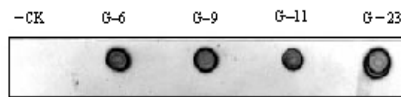


图 3. 转基因烟草的草酸氧化酶活性检测

Fig. 3. Enzymatic activity of oxalate oxidase in transgenic tobacco plants -CK, 非转基因烟草; G-6、G-9、G-11、G-23, 转基因烟草。-CK, non-transgenic plant; G-6, G-9, G-11, G-23, transgenic tobacco plants.

### 2.5 离体叶片草酸耐受性实验

非转基因叶片在 20 mmol/L 草酸溶液 (pH 4) 中于第 4 天开始表现明显的萎蔫症状(图 4)。G-6、G-23 转基因叶片在第 4 天、甚至第 5、6 天仍可保持膨胀状态。

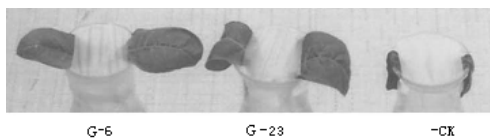


图 4. 转基因烟草离体叶片的耐草酸(20 mmol/L, pH 4.0)实验(处理后第 4 天照相)

Fig. 4. Wilting test of leaves of transgenic tobacco plants treated with oxalic acid (20 mmol/L, pH 4.0)(the photo was taken after 4 d of treatment)

G-6、G-23, 转基因烟草; -CK, 非转基因烟草。

G-6, G-23, transgenic tobacco plants; -CK, non-transgenic plant.

### 3 讨论

本实验通过 PCR 扩增克隆了小麦 *germin* 基因,构建了 CaMV 35S 启动子驱动的 *germin* 基因植物表达载体,经遗传转化获得了一批转基因烟草植株。经 Southern 杂交,证明 *germin* 基因已整合进烟草基因组中。转基因烟草的草酸氧化酶活性检测证明, *germin* 基因在转基因烟草中得到表达,说明单子叶植物小麦的 *germin* 基因可在双子叶植物烟草中表达,且 Germin 蛋白可以正常组装成有酶活性的同源六聚体。外源 *germin* 基因的表达提高了转基因植株离体叶对草酸的耐受性,为抗菌核病育种研究提供一条新的技术路线。

### 参 考 文 献

- 1 Godoy G, Steadman J R, Dickman M B, et al. Use of mutants to demonstrate the role of oxalic acid in pathogenicity of *Sclerotinia sclerotiorum* on *Phaseolus vulgaris*. *Physiol Mol Plant Pathol*, 1990, 37: 179~191
- 2 董金皋,李树正.植物病原菌毒素研究进展.北京:中国科学技术出版社,1997.
- 3 Woo E J, Dunwell J M, Goodenough P W, et al. Germin is a manganese containing homohexamer with oxalate oxidase and superoxide dismutase activities. *Nature Struct Biol*, 2000, 7: 1036~1040
- 4 Lane B G, Dunwell J M, Ray J A, et al. Germin, a protein marker of early plant development, is an oxalate oxidase. *J Biol Chem*, 1993, 268: 12239~12242
- 5 Dratewka-Kos E, Rahman S, Grzelczak Z F, et al. Polypeptide structure of germin as deduced from cDNA sequencing. *J Biol Chem*, 1989, 264: 4896~4900
- 6 Horsch R B, Fry J E, Hoffman N L, et al. A simple and general method for transferring genes into plants. *Science*, 1985, 227: 1229~1231
- 7 Zhang Z, Yang J, David B C, et al. Ethanol increases sensitivity of oxalate oxidase assays and facilitates direct activity staining in SDS gels. *Plant Mol Biol Rep*, 1996, 14: 266~272