

HRAP 基因诱导型植物表达载体的构建及烟草转化

王爱英, 缪建锟, 彭晓明, 沈海涛, 祝建波*

(石河子大学 生命科学学院, 石河子大学农业生物技术重点实验室, 石河子 832003)

摘 要: 系统获得性抗性是植物抵御病菌侵染的一种独特的防御机制。HRAP 基因是一种从甜胡椒中克隆的蛋白质激发子, 可以有效引发植物系统性抗性。SAR8. 2b 基因是烟草系统获得性抗性信号传导途径中下游响应基因, 受病原物和水杨酸诱导。本试验根据 Genbank 发布 SAR8. 2b 基因的启动子序列, 利用 PCR 技术, 克隆了 SAR8. 2b 基因的完整启动子, 命名为 SAR8. 2bP, 然后将 SAR8. 2bP 构建到 pUC18-HRAP 载体中命名为 pUC18-SAR8. 2bP-HRAP, 然后用 SAR8. 2bP-HRAP 替换 p2300-121 载体中的 35S 启动子和 GUS 基因, 重组子命名 p2300-SAR8. 2bP-HRAP。将构建的植物表达载体转化农杆菌 GV3101, 利用叶盘法转化烟草, 通过 PCR 筛选, 获得了转基因植株。为进一步验证转基因烟草的抗病效果奠定了基础。

关键词: HRAP 基因; SAR8. 2b 启动子; 系统获得性抗性; 转基因烟草

中图分类号: Q789

文献标识码: A

文章编号: 1004-1389(2009)06-0157-04

Construction of Inducible Plant Expression Vector of HRAP Gene and Transform Tobacco

WANG Aiyong, MIAO Jiankun, PENG Xiaoming, SHEN Haitao and ZHU Jianbo*

(1. Biology College, Key Laboratory of Agriculture Biotechnology of Shihezi University, Shihezi Xinjiang 832003, China)

Abstract: In the co-evolution with pathogens, plants have evolved complex integrated defense mechanisms against pathogens. Systemic acquired resistance is an important component of plant disease resistance mechanisms. HRAP is an elicitor which cloned from sweet pepper. It could trig plant SAR efficiently. SAR8. 2b was cloned gene was at downstream of tobacco SAR transduction pathway. The promoter of SAR8. 2b, which could inducible by SA and pathogens. The SAR8. 2bP was constructed to pUC18-HRAP, then replaced the 35S promoter and GUS by SAR8. 2bP-HRAP. The inducible plant expression vector was named for p2300-SAR8. 2bP-HRAP. The recombine vector was transferred into Gv3101. The tobacco was transformed by leaf-disc method. Transgenic plants were identified by PCR. All of this will make the foundation of plant anti-diseases.

Key words: HRAP gene; SAR8. 2b promoter; Systemic acquired resistance; Transgenic tobacco

植物在与病原菌长期生存斗争中, 进化出一系列复杂而有效的防御机制, 系统性获得抗性就是其中之一。其信号转导途径是近年来研究的热点^[1-4]。HarpinEa 是一种革兰氏阴性细菌 hrp 基因编码的蛋白质激发子, 作为第一信号分子, 与植物表面的信号受体相互作用。目前, 伊甸公司的

科学家们已证实了植物表面普遍存在这种受体。该受体含 284 个氨基酸, 分子量约 30 kD。当 HarpinEa 喷洒到植物表面时, 会很快被植物表面细胞上这种特异蛋白受体 HrBP1 识别接收, 随即产生第二信使, 活化植物中水杨酸、茉莉酸、乙烯等多种信号传导的防御系统。利用 HRAP(Hy-

收稿日期: 2009-03-20 修回日期: 2009-04-24

基金项目: 国家自然科学基金(30860071); 国家转基因重大专项(2009ZX08011-002); 石河子大学高层次人才启动项目; 石河子大学科学研究发展计划“动植物育种专项计划项目”(gxjs2007-yz13)。

作者简介: 王爱英(1972-), 女, 副研究员, 在读博士, 主要从事植物基因工程。Email: way-sh@126.com

* 通讯作者: 祝建波, 副研究员。Email: zjbshz@126.com

persensitive response-assisting protein) 基因在植物中组成型表达, 可以增加对病原物的敏感性, 使得植物迅速发生超敏反应, 从而引发系统性获得抗性, 获得对多种病原物的广谱可持续抗性^[5]。另外利用 HRAP 蛋白作为诱抗剂刺激植物细胞产生防卫反应, 也是目前绿色农药发展的热点。

SAR8.2b 基因是烟草在系统获得性抗性过程中下游响应基因。研究表明: 它的启动子在一728 到-927 区和-197 到-351 区存在着响应高浓度水杨酸诱导的顺式元件。野生型 SAR8.2b 基因的表达, 在水杨酸处理 12 h 左右被激活, 36 h 后检测活性最高^[6]。

本试验通过 PCR 的方法, 直接从普通烟草的基因组中, 克隆 SAR8.2b 基因启动子的+7 到-1191 区核酸序列, 利用植物表达载体 pBI121、pCambia2300, 将 HRAP 基因置 SAR8.2b 基因启动子驱动下, 成功构建的诱导型表达载体 p2300-SAR8.2bP-HRAP, 通过叶盘法转化烟草, 再生植株经 PCR 检测, 初步获得转基因烟草植株。为进一步验证其转基因抗病效果奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料

克隆载体 pGM-T easy, DNA marker 购自北京 TianGen 公司, 植物表达载体 pBI121、pCambia2300、大肠杆菌 (*Escherichia coli*) DH5 α 、根癌农杆菌 GV3101 由本实验室保存。pBI121-HRAP 由北京大学林忠平教授赠送。

1.2 酶、试剂盒、常用生化试剂

Taq DNA 聚合酶、琼脂糖凝胶回收试剂盒、DNA Marker 购自北京天为时代科技公司; 内切酶 *Pst*I、*Hind* III、*Xba*I、*Eco*R I、*Bam*H I、*Sac*I、T₄ DNA ligase、购自大连宝生物技术公司; 其他试剂均为国产或进口分析纯试剂, 引物合成、测序均由上海生物工程公司完成。

1.3 方法

1.3.1 烟草总 DNA 的提取 通过 SDS 法从烟草叶片中提取总 DNA, 按参考文献^[7]中的方法进行。

1.3.2 SAR8.2b 启动子的克隆 根据 Genebank 收录的 HRAP 基因序列 (af168415), 利用设计 PCR 上下游引物 HRAP-1 和 HRAP-2, 在引物的上下游分别引入 *Bam*H I 和 *Sac*I 酶切位

点, 序列如下:

HRAP-1: 5' GGA TCC ATG AAA ATG AAG AAC CTC TC 3'

HRAP-2: 5' GAG CTC TTA AAA TAG TTG ACC AAG GGT 3'

根据 Genebank 收录的烟草 SAR8.2b 启动子序列 (U64816), 利用设计 PCR 上下游引物 SAR-1 和 SAR-2, 在引物的上下游分别引入 *Pst*I 和 *Xba*I 位点, 序列如下:

SAR-1: 5' CTG CAG CTT GTA GTC TAT TAG CAT TGA GGT 3';

SAR-2: 5' TCT AGA GCT GTG AAA AGG GAA ATA ATG T 3';

以烟草基因组 DNA 为模板, 利用引物 SAR-1、SAR-2 扩增 SAR8.2b 启动子。

PCR 反应体系: 10 $\times$ PCR buffer, 2.0 μ L; dNTPs (各 2.5 mmol/L), 0.3 μ L; *MgCl*₂ (25 mmol/L), 1.0 μ L; 上下游引物 (各 25 μ mol/L), 0.5 μ L; 模板 DNA, 0.5 μ L; Taq DNA 聚合酶 (2.5 U/ μ L), 0.3 μ L, 总体积 20.0 μ L

反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 56 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 90 s, 30 个循环后, 72 $^{\circ}$ C 保温 7 min。

PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后, 用琼脂糖凝胶回收试剂盒回收目的基因, 与 pGM-T easy 载体连接, 转化, 筛选重组质粒, 经 PCR、*Eco*R I 酶切鉴定, 送上海生工测序, 分析结果, 将正确的克隆命名为 SAR8.2bP。

1.3.3 HRAP 基因诱导型植物表达载体的构建

碱裂解法提取克隆载体 pUC18-HRAP 质粒和 SAR8.2bP 质粒, 用 *Pst*I/*Xba*I 双酶切, 分别回收载体大片断和目的片断, 按载体: 片断为 1:3 的比例, 16 $^{\circ}$ C 连接 16 h, 转化 DH5 α , 筛选重组子质粒, 命名为 pUC18-SAR8.2bP-HRAP。

再将 pBI121 与植物表达载体 pCambia2300 提取质粒后用 *Hind* III/*Eco*R I 双酶切, 得到的 Gus 基因的整个表达框和 pCambia2300 载体大片断, 按载体: 片断为 1:3 的比例连接、转化, 分别进行 PCR 鉴定和 *Hind* III/*Eco*R I 双酶切鉴定, 将重组子命名为 p2300-121。将此重组子和 pUC18-SAR8.2bP-HRAP 用 *Hind* III/*Sac*I 双酶切, 分别回收载体大片断和目的片断。按载体: 目的片断 1:3 比例, 16 $^{\circ}$ C 连接, 转化 DH5 α , 筛选重组子, 命名为 p2300-SAR8.2bP-HRAP。

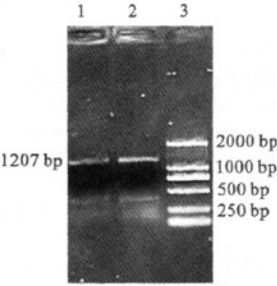
1.3.4 转基因烟草的获得^[14] 重组质粒 p2300-SAR8.2*bP*-*HRAP* 转化农杆菌 GV3101, 然后通过叶盘法转化烟草。经过抗生素筛选, 获得抗性的再生植株, 经 PCR 检测, 初步表明已获得转基因烟草。

2 结果与分析

2.1 SAR8.2 bP 的 PCR 扩增及酶切鉴定

烟草基因组 DNA 通过 PCR 扩增, 得到的烟草 SAR8.2 bP 启动子片段大小与理论相符(图 1)。

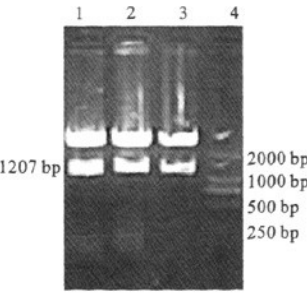
目的片段克隆到 pGM-T Easy 载体后, 对质粒经 *EcoR* I 酶切鉴定, 得到与预期大小一致的特异目的片段(图 2)。送上海生工测序, 进行序列分析, 将正确克隆命名为 SAR8.2 bP。与原序列相似性达 98.76%。



1-2. SAR8.2*bP* 扩增结果; 3. DNA 分子量标准 DL 2000

图 1 SAR8.2*bP* 的扩增结果

Fig. 1 Amplification of SAR8.2*bP*



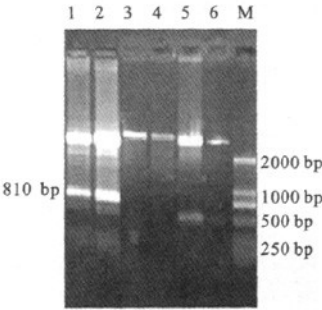
1-3. SAR8.2*bP* /*EcoR*I 酶切结果; 4. DNA 分子量标准 DL 2000

图 2 SAR8.2*bP* 的酶切结果

Fig. 2 Restriction enzyme digestion identification of of SAR8.2*bP*

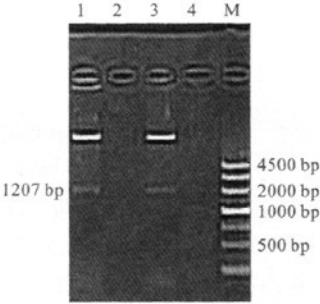
2.2 HRAP 基因的鉴定

由于采用 PCR 方法将 pBI121-*HRAP* 中 *HRAP* 基因亚克隆到 pUC18 载体中, 为了确定 PCR 过程中的突变没有改变读码框编码, *Bam* H I/*Sac*I 酶切(图 3)鉴定后送上海生工测序。



1-2. pUC18 *HRAP* / *Bam*HI, *Sac*I; M. DNA 分子量标准 DL 2000

图 3 pUC18-*HRAP* 限制性内切酶鉴定
Fig. 3 Restriction enzyme digestion identification of pUC18-*HRAP*



1-2. p2300-SAR8.2*bP*-*HRAP* / *Hind*III/*Sac*I; M. DNA 分子量标准 III

图 4 p2300-SAR8.2*bP*-*HRAP* 的酶切鉴定

Fig. 4 Restriction enzyme digestion identification of of p2300-SAR8.2*bP*-*HRAP*

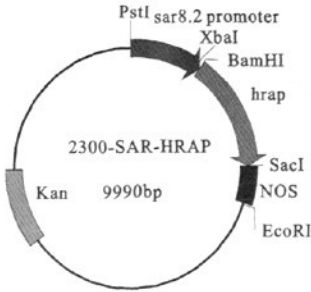


图 5 *HRAP* 的植物诱导表达载体的构建

Fig. 5 Inducible plant expression vector of *HRAP* gene

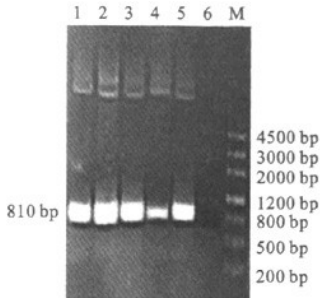
2.3 p2300-SAR8.2 bP-HRAP 载体的酶切鉴定

提取 p2300-SAR8.2*bP*-*HRAP* 质粒, *Hind* III/*Sac*I 酶切, 电泳, 得到与预期大小一致的特异的目的片段(图 4)。载体构建示意图见图 5。

2.4 转基因烟草的检测^[15]

提取转基因烟草基因组总 DNA, 应用

HRAP 特异性引物进行 PCR 检测,结果显示转基因阳性植株得到条带大小与理论相符(图 6),由此可以确定已获得转基因烟草。



1. 阳性对照;2~5. *HRAP* 基因的扩增结果;6. 阴性对照
M. DNA 分子量标准 III

图 6 转基因烟草 *HRAP* 基因的扩增结果

Fig. 6 Amplification of *HRAP* from transgenic tobacco

3 讨论

Harpins 是革兰氏阴性植物病原细菌通过Ⅲ型分泌系统产生的一类蛋白质。研究发现,大多数 harpins 在细菌致病过程中都可作为毒性因子起作用,协助病原物无毒蛋白(avirulence, Avr)或其他毒性因子进入寄主细胞,而在非寄主上使用,都可诱导抗病反应^[8-9]。转基因 Harpins 拟南芥和马铃薯的抗病性增强,研究表明,Harpins 诱导的 SAR 与植物的 SA 积累关系密切^[10]。大量实验证明,SA 是植物抗病反应的重要信号分子,在植物的 SAR 信号转导和抗病反应中起着关键的作用。Verberne 等^[11]通过提高植物内源 SA 量的方法成功地提高了植物的整体抗病水平。

由于组成型启动子驱动的外源基因在植物各组织中均有不同程度的表达,应用中逐渐暴露出一些问题;外源基因在受体植物中持续、高效的表达,产生大量异源蛋白质或代谢产物在植物体内积累,打破了植物原有的代谢平衡,往往还会引起植物的形态发生改变,影响植物的生长发育,有些产物对植物并非必需甚至有毒,因而阻碍了植物的正常生长,甚至导致死亡。为了使外源基因在植物体内有效发挥作用,同时又可减少对植物的不利影响,目前人们对诱导型启动子的研究和应用越来越重视^[12-13]。

SAR8.2b 基因是烟草系统获得性抗性中的下游防御响应基因,它的启动子受病原物和水杨

酸(SA)诱导,本试验克隆了全长的 SAR8.2b 基因启动子,用来控制 *HRAP* 基因的表达。当转基因受到病原物侵染时,通常会引发产生 SA 信号分子,进而启动 *HRAP* 基因转录,放大产生第一信号分子,加快植物产生 HR 的速度以及提高系统获得抗性的强度,从而达到广谱抗病的目的。本研究目前正在进行转基因烟草的 TMV 病毒的攻毒实验,以验证转基因烟草植株的抗病效果。

参考文献:

- [1] 金巧玲,王 钧. 植物系统获得性抗性的信号转导[J]. 生命科学,1998(10):7-12.
- [2] 赵淑清,郭剑波. 植物系统获得抗性及其信号转导途径[J]. 中国农业科学,2003,36(7):781-787.
- [3] 陈慧勤,赵淑清. 植物抗病反应及系统获得抗性研究进展[J]. 山西农业大学学报,2003(3):1671-8151.
- [4] Cao H, Bowling S A, Gordon AS, et al. Characterization of an Arabidopsis mutant that is non-responsive to inducers of systemic acquired resistance [J]. Plant Cell, 1994, (6): 1583-1592.
- [5] Cheng-hsien, Hao-jan Lin, Mang-jye Ger. cDNA cloning and characterization of a plant protein that may be associated with the harpin PSS-mediated hypersensitive response [J]. Plant Molecular Biology, 2000(43):429-438.
- [6] Fengming Song, Robert M. Goodman. Cloning and identification of the promoter of the tobacco SAR8.2b gene, a gene involved in systemic acquired resistance [J]. ELSEVIER, 2002, 115-124.
- [7] 萨姆布鲁克 J, 费里奇 E F, 曼尼阿蒂斯大林 T. 分子克隆实验指南[M]. 金东雁, 黎孟枫. 北京: 科学出版社, 1996.
- [8] Galán J, E, Collmer A. Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells[J]. Science, 1999, 284(21):1322-1328.
- [9] Staskawicz BJ. Genetics of plant pathogen interactions specifying plant disease resistance[J]. Plant Physiol, 2001, 125(1):73-76.
- [10] Keller H, Pamboukdjian N, Ponchet M, et al. Pathogen-induced elicitor production in transgenic tobacco generates a hypersensitive response and nonspecific disease resistance [J]. Plant Cell, 1999, 11:223-235.
- [11] Verberne Mc, Verpoorte R, Bol J E, et al. Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance[J]. Nature Biotechnology, 2000, 18: 779-783.
- [12] 张春晓, 王文棋, 蒋湘宁. 植物基因启动子研究进展[J]. 遗传学报, 2004(12):1455-1464.
- [13] 王 颖, 麦维军, 梁承鄯. 高等植物启动子的研究进展[J]. 西北植物学报, 2003, 23(11):2040-2048.
- [14] 崔百明, 任艳利, 乐锦华, 等. 水杨酸诱导表达 AtCBF1 的转基因烟草研究[J]. 西北农业学报, 2007, 16(6):90-93.
- [15] 司爱君, 祝建波, 李吉莲, 等. F3'5'H 基因的克隆、表达载体构建与烟草遗传转化[J]. 西北农业学报, 2008, 17(5):306-309, 329.

刊名: [西北农业学报](#) **ISTIC** **PKU**
英文刊名: [ACTA AGRICULTURAE BOREALI-OCCIDENTALIS SINICA](#)
年, 卷(期): 2009, 18(6)
被引用次数: 1次

参考文献(15条)

1. 金巧玲;王钧 [植物系统获得性抗性的信号转导](#) 1998(10)
2. 赵淑清;郭剑波 [植物系统性获得抗性及其信号转导途径](#)[期刊论文]-[中国农业科学](#) 2003(07)
3. 陈慧勤;赵淑清 [植物抗病反应及系统获得抗性研究进展](#)[期刊论文]-[山西农业大学学报\(自然科学版\)](#) 2003(03)
4. Cao H;Bowling S A;Gordon AS [Characterization of an Arabidopsis mutant that is non-responsive to inducers of systemic acquired resistance](#) 1994(06)
5. Cheng-hsien;Hao-jan Lin;Mang-jye Ger [cDNA cloning and characterization of a plant protein that may be associated with the harpin PSS-mediated hypersensitive response](#) 2000(43)
6. Fengming Song;Robert M. Goodman [Cloning and identification of the promoter of the tobacco SAR8.2b gene, a gene involved in systemic acquired resistance](#) 2002
7. 萨姆布鲁克·J;费里奇 E F;金东雁;黎孟枫 [曼尼阿蒂斯大林T. 分子克隆实验指南](#) 1996
8. Galán J;E;Collmer A [Type III secretion machines: bacterial devices for protein delivery into host cells](#) 1999(21)
9. Staskawicz BJ [Genetics of plant pathogen interactions specifying plant disease resistance](#)[外文期刊] 2001(01)
10. Keller H;Pamboukdjian N;Ponchet M [Pathogen-induced elicitor production in transgenic tobacco generates a hypersensitive response and nonspecific disease resistance](#) 1999
11. Verberne Mc;Verpoorte R;Bol J E [Overproduction of salicylic acid in plants by bacterial transgenes enhances pathogen resistance](#) 2000
12. 张春晓;王文棋;蒋湘宁 [植物基因启动子研究进展](#)[期刊论文]-[遗传学报](#) 2004(12)
13. 王颖;麦维军;梁承邨 [高等植物启动子的研究进展](#)[期刊论文]-[西北植物学报](#) 2003(11)
14. 崔百明;任艳利;刘锦华 [水杨酸诱导表达AtCBF1的转基因烟草研究](#)[期刊论文]-[西北农业学报](#) 2007(06)
15. 司爱君;祝建波;李吉莲 [F3' 5' H基因的克隆、表达载体构建与矮牵牛遗传转化](#)[期刊论文]-[西北农业学报](#) 2008(05)

本文读者也读过(10条)

1. 张赛群. 邹燕红. 吴素琴. 胡菁捷. 周涵韬. ZHANG Sai-qun. ZOU Yan-hong. WU Su-qin. HU Jing-jie. ZHOU Han-tao [青枯雷尔氏菌无致病力菌株诱导番茄系统获得性抗性研究](#)[期刊论文]-[厦门大学学报\(自然科学版\)](#) 2008, 47(z2)
2. 贾建军. 周晓黎. 董俊. 花群义. 李文贵. 周力兵. 徐自忠 [转基因烟草检测技术研究](#)[期刊论文]-[生物技术通讯](#) 2002, 13(4)
3. 王永胜. 扈廷茂. 刘明秋. 李丽莉. 孔威. WANG Yong-sheng. HU Ting-mao. LIU Ming-qiu. LI Li-li. KONG Wei [马铃薯天冬氨酸蛋白酶抑制剂基因转化烟草研究](#)[期刊论文]-[遗传](#) 2000, 22(3)
4. 王先艳. 单晓昝. 杨爱芳. 张举仁 [植物表达载体构建和转基因烟草抗除草剂及耐盐性的分析](#)[期刊论文]-[农业生物技术学报](#) 2003, 11(6)
5. 武东亮. 崔洪志. 郭三堆 [融合杀虫基因植物表达载体的构建及转基因烟草的获得](#)[期刊论文]-[中国农业科学](#)

6. [黄明星](#), [魏琴](#), [徐莺](#), [陈放](#), [HUANG Ming-xing](#), [WEI Qin](#), [XU Ying](#), [CHEN Fang](#) 麻疯树逆境蛋白(curcin 2)基因在烟草中的表达[期刊论文]-[中国生物工程杂志](#)2007, 27(4)
7. [刘红莉](#), [陈宏伟](#), [李文生](#), [雷霆](#), [王喆之](#), [王一理](#), [司履生](#) HPV-16L1植物表达载体的构建及HPV-16L1在转基因烟草中表达的鉴定[期刊论文]-[生物工程学报](#)2004, 20(6)
8. [方玉达](#), [刘大钧](#), [Fang Yuda](#), [Liu Dajun](#) 转水稻几丁质酶基因烟草植株及其对烟草赤星病(*Alternaria alternata*)的抗性[期刊论文]-[南京农业大学学报](#)2000, 23(1)
9. [李文兰](#), [李景剑](#), [李华英](#), [LI Wen-lan](#), [LI Jing-jian](#), [LI Hua-ying](#) 农杆菌介导系统获得性抗性调节基因(NPR1)转化罗汉果的研究[期刊论文]-[上海农业学报](#)2010, 26(4)
10. [林毅](#), [吴祖建](#), [谢联辉](#), [林奇英](#) 绞股蓝RIP基因双子叶植物表达载体的构建及其对烟草叶盘的转化[期刊论文]-[江西农业大学学报](#)2004, 26(4)

引证文献(1条)

1. [冯玉杰](#), [王爱英](#), [沈海涛](#), [祝建波](#) 新疆甜瓜高效再生体系的建立及NPR1/HRP双价抗病基因转化[期刊论文]-[北方园艺](#) 2011(3)

引用本文格式: [HRAP基因诱导型植物表达载体的构建及烟草转化](#)[期刊论文]-[西北农业学报](#) 2009(6)