

大麦醇溶蛋白基因片段克隆和 RNAi 植物表达载体构建

闫永荣^{1,2}, 张正英¹, 李静雯¹, 李淑洁¹

1. 甘肃省农业科学院生物技术研究所, 兰州 730070

2. 甘肃农业大学农学院, 兰州 730070

摘要 为了降低啤酒大麦蛋白的含量, 提高啤酒大麦品质, 利用甘肃推广面积最大的品种甘啤 4 号为材料, 克隆大麦醇溶蛋白基因保守区序列, 构建 RNAi 表达载体。根据已知大麦醇溶蛋白基因保守序列设计一对特异性引物 B2PF5'-CAACCATTTC-CACAGCAACCACCAT-3', B2PR5'-GAAAGATAGAGTAGACGATTGCACG-3', 采用 PCR 技术从甘啤 4 号大麦基因组中获得了 1 个 349bp 片段 (GP4)。依据载体 pHANNIBAL 和 pART27 的结构, 分别将 GP4 按所对应酶切位点正反向插入, 利用热激法转化。结果分析显示, 克隆出的片段与 GenBank (NCBI) 中醇溶蛋白基因核苷酸序列同源性高达 92%, 所构建成的 RNAi 表达载体 pART27-pHAN-GP4 中含目标片段。

关键词 大麦; 醇溶蛋白; RNAi 表达载体

中图分类号 Q785

文献标识码 A

文章编号 1000-7857(2010)12-0052-04

Cloning of Hordein Gene in Barley and Construction of RNAi Plant Expression Vector

YAN Yongrong^{1,2}, ZHANG Zhengying¹, LI Jingwen¹, LI Shujie¹

1. Biotechnology Research Institute, Gansu Academy of Agricultural Sciences, Lanzhou 730070, China

2. College of Agronomy, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070, China

Abstract In order to reduce the protein content and improve the quality of beer barley, this paper takes Gansu Beer Barley No. 4, as the material for study, which has a wide promotion area in Gansu Province. Hordein gene was cloned in the conserved sequence, with RNAi expression vector constructed with further improvements on the theoretical basis of barley quality. A pair of primers was designed according to the released DNA sequence of Hordein gene. B2PF5'-CAACCATTTC-CACAGCAACCACCAT-3', B2PR5'-GAAAGATAGAGTAGACGATTGCACG-3', with PCR employed to clone a 349bp fragment (GP4) from Gansu Beer Barley No.4. Based on the structure of vector pHANNIBAL and pART27, GP4 was inserted forward and reversely according to the enzyme position. The sequence analysis shows that the cloned DNA shares 92% of identity with the data. An RNAi expression vector of the Hordein gene, named pART27-pHAN-GP4 was constructed with the RNAi expression vector pART27-pHAN-GP4 containing the object gene.

Keywords barley; Hordein; RNAi expression vector

0 引言

大麦籽粒蛋白质含量的高低是决定本身用途及作为主要品质评价指标之一。大麦籽粒醇溶蛋白质作为种子胚乳中主要的贮藏蛋白质之一, 其含量不仅直接影响制麦过程中籽

粒对水分吸收和发芽速度^[1], 而且与很多麦芽品质指标关系密切。研究表明, 籽粒蛋白质含量与麦芽浸出率呈负相关^[2], 因此籽粒蛋白质含量过高, 会显著降低麦芽浸出率。同时, 籽粒蛋白质含量过高, 也会延长浸麦时间、降低麦芽汁过滤速

收稿日期: 2010-04-08

基金项目: 甘肃省农牧厅生物技术专项 (GNSW-2006-05)

作者简介: 闫永荣, 硕士研究生, 研究方向为作物遗传育种; 电子信箱: yyr_48@163.com; 张正英 (通信作者), 副研究员, 研究方向为农业生物技术, 电子信箱: kege8@sina.com

度、影响啤酒的清澈度以及啤酒泡沫的稳定性。适宜酿造的大麦要求籽粒蛋白质含量适中。籽粒蛋白质含量既受遗传因素控制,同时品种间差异也很大^[3]。醇溶蛋白质一般不受种植环境的影响,可作为品种的生化“指纹”^[4-5]。近年来,中国大麦总产量为 300~420 万 t,大部分只能做饲料,啤酒大麦只有 100 万 t 左右。每年需从澳大利亚、加拿大、法国进口啤酒大麦 200 万 t 左右,中国已成为世界上最大的啤酒大麦进口国,占世界啤麦用量的 60%~70%^[6]。因此,发展中国优质啤用大麦、提高大麦生产水平,不仅可以增加农民收入,而且还可以为国家节约大量外汇,具有重要的战略意义。

研究人员已经利用 RNAi 技术有效沉默基因改良作物品种。夏琼梅^[7]利用 RNAi 技术成功构建了美洲黑杨 *CCoA OMT* 基因的反义表达载体 pBI-CCoAOMT,为进一步通过反义技术降低杨树木质素含量奠定基础。郭志鸿^[8]利用 RNAi 技术获得了高直链淀粉含量的马铃薯。张广辉^[9]构建了 *TCS* 基因的 RNA 干扰载体,为培育低咖啡因茶树奠定了基础。目前国内利用 RNAi 技术改良大麦品质尚未见报道。本研究利用甘肃省推广面积最大的品种甘啤 4 号为材料,克隆大麦醇溶蛋白基因保守区序列,构建 RNAi 表达载体,以期为进一步通过 RNAi 技术改良大麦品质奠定理论基础。

1 材料与方法

1.1 材料

甘啤 4 号大麦 (Gansu Beer Barley No.4), 大肠杆菌 DH5 α 、克隆载体 pHANNIBAL、表达载体 pART27 均由本实验室保存;Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4-DNA 连接酶均购自 TaKaRa 公司(日本);DNA Marker 购自 Tiangen 公司(北京);DNA 快速胶回收试剂盒购自北京百泰克生物技术有限公司;其他试剂未经说明均为国产分析纯。

1.2 目标基因片段的克隆

根据已报道的大麦醇溶蛋白基因保守序列,使用 Primer 5.0 软件,设计特异性引物 B2PF5'-CAACCATTTCACAGCAACCACCAT-3';B2PR5'-GAAAGATAGAGTAGACGATTGCACG-3'(上海英骏公司合成),采用 PCR 技术从甘啤 4 号基因组 DNA 中克隆。PCR 扩增体系:DNA 100ng、0.1 μ mol/L 的上下游引物、1.5U ExTaq DNA 聚合酶,加水至 25 μ L。反应条件:94 $^{\circ}$ C 变性 5min;94 $^{\circ}$ C 30s,55 $^{\circ}$ C 30s,72 $^{\circ}$ C 1min,30 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10min;4 $^{\circ}$ C 保存。

1.3 RNA 干扰载体的构建

根据干扰载体酶切位点设计正反向 2 对引物 (上海英骏公司合成):

LB2PF 5'-CAA ctcgag CCATTTCCACAGCAACCACCAT-3',

LB2PR 5'-GAA gaattc AGATAGAGTAGACGATTGCACG-3';

RB2PF 5'-CAA tctaga CCATTTCCACAGCAACCACCAT-3',

RB2PR 5'-GAA aagctt AGATAGAGTAGACGATTGCACG-3'。

采用正反向引物对目标片段分别进行亚克隆,然后酶切相应的亚克隆载体及表达载体,通过胶回收纯化,最后进行连接。

利用热激法将各重组子导入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,在含相应抗生素的 LB 固体培养基上 37 $^{\circ}$ C 倒置培养 12~16h。挑选阳性克隆提取质粒,碱裂解法小量提取质粒,通过 PCR 和酶切对重组克隆进行鉴定。

2 结果与分析

2.1 醇溶蛋白基因保守区片段的克隆

以甘啤 4 号幼苗基因组 DNA 为模板,通过 PCR 获得 1 条特异性片段(图 1)。对该片段进行克隆及测序表明,片段长为 349bp(图 2),编码 109 个氨基酸。序列比对表明,该片段与大麦醇溶蛋白基因保守序列同源率为 92%。说明该片段为大麦醇溶蛋白基因保守序列片段,可用于 RNAi 研究。

2.2 表达载体的构建

如图 3 示,用 *Xho* I, *Eco*R I 双酶切 GP4-R 与克隆载体 pHANNIBAL(I),回收相应片段 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,收集菌体涂布于含 Amp(100mg/L)的 LB

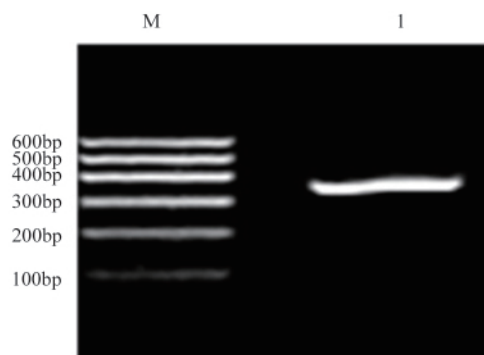


图 1 甘啤 4 号 PCR 扩增结果

Fig. 1 Results of PCR amplification for Gansu Beer Barley No. 4

CAACCATTTC	CACAGCAACC	ACCATTTTGG	CAACAACAAC	CAATTCTATC	GCAGCAACAA
CCATGTACAC	CACAACAAAC	ACCACTCCCA	CAAGGACAAC	AAGATCAAAT	GCTTGTGCAA
GTACAAATAC	CATTTGTTCA	TCCATCTATT	TTGCAGCAGC	TAAACCCATG	CAAGGTATTG
CTCCAGCAAC	AGTGCAGCCC	TGTGGCAATG	TCACAACGTA	TTGCAAGGTC	GCAAATGTTG
CAACAGAGCA	GTTGCCATGT	GTTGCAGCAA	CAATGTTGCC	AACAACCTGCC	GCAAATCCCC
GAACAACCTCC	GCCATGAGGT	AGTCCGTGCA	ATCGTCTACT	CTATCTTTTC	

图 2 醇溶蛋白序列保守区

Fig. 2 Conservative region of Hordein

固体平板上,37℃倒置培养 12~16h,挑取单菌落,碱法提取质粒,得到重组子 PHAN-GP4R,PCR 检测和酶切鉴定。以相同的方法用 *Xba* I,*Hind* III 双酶切 GP4-L 与 PHAN-GP4R(II),回收目标片段连接得到重组子 pHAN-GP4。

用 *Not* I 酶切 pHAN-GP4(III)和 pART27,回收相应的片段进行连接,构建成植物 RNAi 表达载体 pART-27-pHAN-GP4(IV)。

利用热激法将 pART-27-pHAN-GP4 导入大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞,在含 Kan(100mg/L)的 LB 固体培养基上 37℃倒置培养 12~16h。挑选阳性克隆提取质粒,碱裂解法小量提取质粒通过 PCR 和酶切对重组克隆进行鉴定。

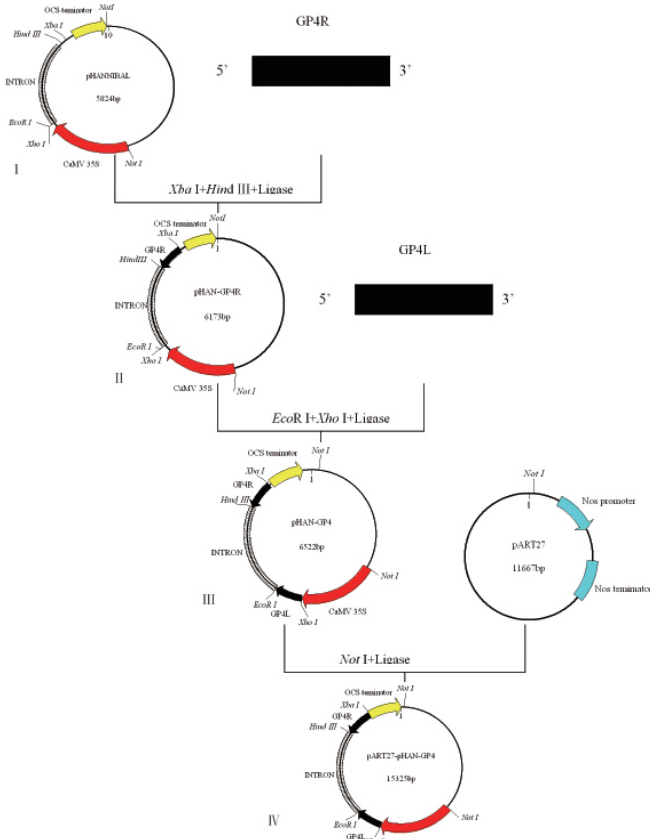


图 3 RNAi 表达载体构建

Fig. 3 Construction of RNAi expression vector icon

2.3 重组质粒的鉴定

Xho I,*Eco*R I 与 *Xba* I,*Hind* III 酶切中间载体 pHAN-GP4,如图 4 所示,分别得到一条 349bp 的片段,而只用 *Not* I 酶切大约可得到一条 1698bp 的片段。

扩增 pART-27-pHAN-GP4 可扩增出 349bp 的目标片段(图 5)。说明所构建载体中含有目标片段。

2.4 测序验证

将构建完成的载体进行测序,与克隆的甘啤 4 号醇溶蛋白保守区序列比对,如图 6 所示,醇溶蛋白保守区序列(下)与测序序列(上)的同源度达到 98.45%。说明所构建的载体中,含有目标片段。

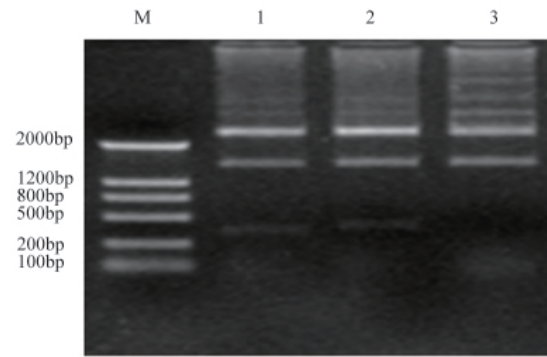


图 4 酶切 pHAN-GP4 电泳

Fig. 4 Enzymes digest of pHAN-GP4 vector

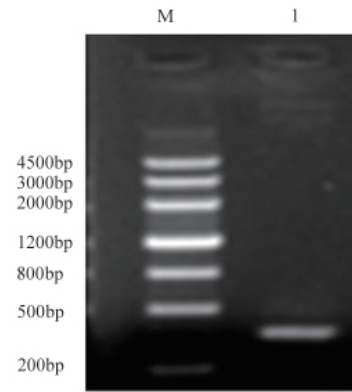


图 5 pART-27-pHAN-GP4 的 PCR 鉴定

Fig. 5 PCR identification of expression vector pART-27-pHAN-GP4

3 讨论

来源于不同植物种类的醇溶蛋白基因之间存在较高的保守性,故利用同源保守序列设计引物,从大麦基因组中利用 PCR 技术扩增目标片段,是目前克隆醇溶蛋白基因的最佳选择。在种质改良方面,RNAi 技术已成为分子生物学研究的有力工具,广泛应用于植物基因功能分析、植物抗病抗逆及物种改良等各个方面^[10-11],其中 RNAi 载体的构建十分关键。Smith 等^[12]认为在载体的基因正反向片段中间插入一段内含子序列能够大大提高基因的沉默效率。另外,RNAi 所引起的基因表达抑制要比单独应用正义或反义 RNA 强^[13]。因此,本实验构建的 RNAi 载体 pART27-pHAN-GP4 含有醇溶蛋白基因正反向互补片段,能够在植物体内转录形成具有发夹结构,可抑制醇溶蛋白基因的表达,为将来利用 RNAi 技术降低大麦蛋白含量,提高啤酒大麦品质奠定基础。这与大多数通过载体构建技术改良种质不谋而合。例如,张景涛^[14]构建小麦 *TaPHR1* 基因表达载体,为农杆菌介导缺磷响应基因 *TaPHR1* 的小麦遗传转化和小麦磷高效遗传改良研究提供了研究数据。丁勇^[15]构建了甘蓝型油菜 *BnClo1* 基因表达载体,为原核表达研究,进一步纯化和鉴定目标蛋白及研究其功能奠定了试验基础。于丛丛^[16]据已测序的上西早生柿 *ETR5* 基因序列,

```

3   TTTTGGCCCAACCAACCAATTCTATCGCAGCAACAACCATGTACACCACAACAAACACCA
   |||||
25  TTTTGGCAACAACAACCAATTCTATCGCAGCAACAACCATGTACACCACAACAAACACCA

63  CTCCCAACAAGGACAACAAGATCAAATGCTTGTGCAAGTACAAATACCATTTGTTTCATCCA
   |||||
85  CTCCCAACAAGGACAACAAGATCAAATGCTTGTGCAAGTACAAATACCATTTGTTTCATCCA

123 TCTATTTTGCAGCAGCTAAACCCATGCAAGGTATTCTCCAGCAACAGTGCAGCCCTGTG
   |||||
145 TCTATTTTGCAGCAGCTAAACCCATGCAAGGTATTCTCCAGCAACAGTGCAGCCCTGTG

183 GCAATGTCACAACGTATTGCAAGGTCGCAAAATGTTGCAACAGAGCAGTTGCCATGTGTG
   |||||
205 GCAATGTCACAACGTATTGCAAGGTCGCAAAATGTTGCAACAGAGCAGTTGCCATGTGTG

243 CAGCAACAATGTTGCCAACAACTGCCGCAAAATCCCCGAACAACCTCCGCCATGAGGTAGTC
   |||||
265 CAGCAACAATGTTGCCAACAACTGCCGCAAAATCCCCGAACAACCTCCGCCATGAGGTAGTC

303 CGTGCAATCGTCTACTCTATCTA
   |||||
325 CGTGCAATCGTCTACTCTATCTT
    
```

图 6 测序结果比对图

Fig. 6 Result of sequencing

注:上排为测序序列,下排为醇溶蛋白保守区序列。

Notes: Upper lines are sequencing result, and lower lines are the conservative region of Hordein.

构建 RNAi 表达载体,为培育具有抗软化、耐贮运特性的柿果奠定基础。殷冬梅^[17]构建了花生油酸脱氢酶基因 RNAi 表达载体,为获得高油酸亚油酸比值的花生种质奠定基础。秦智慧^[18]已成功构建具有发夹结构的 RNAi 载体 pART-F-R,可有效的抑制紫花苜蓿 *MsZFN* 基因。利用这一技术唯一缺点是成本高,电泳时所用的 EB 对人体有一定的伤害。

4 结论

成功克隆了醇溶蛋白基因保守序列,并依据载体 pHANNIBAL 与 pART27 结构,将目标片段正反向插入,成功构建 RNAi 表达载体。

参考文献 (References)

- [1] Schwarz P B, Horsley R D. Malt quality improvement in north American six rowed barley cultivars since 1910[J]. *Journal of American Society of Brewing Chemists*, 1995, 53: 14-18.
- [2] Arends A M, Fox G P, Henry R J, et al. Genetic and environmental variation in the Diastatic power of Australian barley[J]. *Journal of Cereal Science*, 1995, 21: 63-70.
- [3] Zhang G P, Chen J X, Wang J M, et al. Cultivar and environmental effects on β -Glucan and protein content in malting barley [J]. *Journal of Cereal Science*, 2001, 34: 295-301.
- [4] 周静文, 万平, 陈佩度, 等. 麦胚贮藏蛋白组分遗传研究进展 [J]. *麦类作物学报*, 2000, 20 (2): 78-83.
Zhou Jingwen, Wang Ping, Chen Peidu, et al. *Journal of Triticeae Crops*, 2000, 20(2): 78-83.
- [5] 齐军仓, 张国平. 大麦醇溶蛋白与麦芽品质关系的研究进展 [J]. *麦类作物学报*, 2005, 25(3): 115-118.
Qi Juncang, Zhang Guoping. *Journal of Triticeae Crops*, 2005, 25 (3): 115-118.
- [6] 杨建明, 沈秋泉, 汪军妹, 等. 我国大麦生产、需求与育种对策[J]. *大麦科学*, 2003(1): 1-6.
Yang Jianming, Shen Qiuquan, Wang Junmei, et al. *Barley Science*, 2003 (1): 1-6.

- [7] 夏琼梅. 美洲黑杨 *CCoAOMT* 基因 cDNA 克隆及反义植物表达载体构建[J]. *分子植物育种*, 2008, 6(1): 136-140.
Xia Qiongmei. *Molecular Plant Breeding*, 2008, 6(1): 136-140.
- [8] 郭志鸿. 用 RNA 干扰技术创造高直链淀粉马铃薯材料[J]. *中国农业科学*, 2008, 41(2): 494-501.
Guo Zhihong. *Scientia Agricultura Sinica*, 2008, 41(2): 494-501.
- [9] 张广辉. 茶树咖啡因合成酶基因 RNA 干扰表达载体构建 [J]. *茶叶科学*, 2006, 26(4): 243-248.
Zhang Guanghui. *Journal of Tea Science*, 2006, 26(4): 243-248.
- [10] Wassenegger M, Pelissier T. A model for RNA-mediated gene silencing in higher plants[J]. *Plant Mol Biol*, 1998, 37(2): 349-362.
- [11] Cogoni C, Macino G. Homology-dependent gene silencing in plants and fungi: A number of variations on the same theme [J]. *Curr Opin Microbiol*, 1999, 2(6): 657-662.
- [12] Smith N A, Singh S P, Wang M B, et al. Total silencing by intron spliced hairpin RNAs[J]. *Nature*, 2000, 407: 319-320.
- [13] Fire A, Xu S, Montgomery M K, et al. Potent and specific genetic interference by double stranded RNA in *Caenorhabditis elegans* [J]. *Nature*, 1998, 391: 806-811.
- [14] 张景涛. 小麦 *TaPHR1* 基因表达载体的构建[J]. *分子植物育种*, 2010, 8(1): 161-166.
Zhang Jingtao. *Molecular Plant Breeding*, 2010, 8(1): 161-166.
- [15] 丁勇. 甘蓝型油菜 *BnClo1* 基因克隆、表达载体的构建及原核表达[J]. *中国农业科学*, 2010, 43(2): 252-258.
Ding Yong. *Scientia Agricultura Sinica*, 2010, 8(1): 252-258.
- [16] 于丛丛. 上西早生柿 *ETR5* 基因 RNAi 植物表达载体构建及遗传转化研究[J]. *华北农学报*, 2010, 25(1): 84-87.
Yu Congcong. *Acta Agriculturae Boreali-Sinica*, 2010, 25(1): 84-87.
- [17] 殷冬梅. 花生油酸脱氢酶基因 RNAi 表达载体的构建[J]. *河南农业大学学报*, 2010, 44(1): 24-28.
Yin Dongmei. *Journal of Henan Agricultural University*, 2010, 44(1): 24-28.
- [18] 秦智慧. 紫花苜蓿锌指蛋白基因 RNAi 表达载体的构建及在苜蓿的转化[J]. *作物学报*, 2010, 36(4): 596-601.
Qin Zhihui. *Acta Agronomica Sinica*, 2010, 36(4): 596-601.

(责任编辑 吴晓丽)