

高山离子芥磷脂酶 D α 编码区基因序列克隆 与表达载体构建

杨宁, 强治全, 陈霞, 丁芳霞, 王程亮

(西北师范大学 生命科学学院, 甘肃 兰州 730070)

摘要: 磷脂酶 D(PLD)是重要的细胞磷脂代谢酶, 在植物的生长及对不良环境胁迫的抵御反应中起重要作用。本试验以高山离子芥(*Chorispora Bungeana*)为材料, 取幼叶分离 mRNA, 反转录合成 cDNA, PCR 扩增加 XbaI 和 SacI 酶切位点的高山离子芥磷脂酶 D α (PLD α)编码区序列、测序。结果表明插入片段为 PLD α 目的基因片段, 全长约 1 600 bp, blast 比对发现该序列与 Genbank 中报道的拟南芥 PLD α 基因相比同源率为 94.6%。回收纯化 PCR 产物, 克隆至 pTG19-T 载体双酶切后将目的基因片段定向克隆至 pBI121 载体, 构建高山离子芥 PLD α 基因编码区片段的表达载体 pBI121-PLD α , 双酶切及 PCR 鉴定结果显示表达载体构建成功, 为下一步进行抗逆转基因作物选育奠定了基础。

关键词: 高山离子芥; PLD α 基因; 编码区序列; 表达载体构建

中图分类号: Q 78

文献标志码: A

文章编号: 1001-988X(2014)03-0094-05

The coding sequence clone and expression vector construction of PLD α gene from *Chorispora Bungeana*

YANG Ning, QIANG Zhi-quan, CHEN Xia, DING Fang-xia, WANG Cheng-liang

(College of Life Sciences, Northwest Normal University, Lanzhou 730070, Gansu, China)

Abstract: Phospholipase D(PLD) is a major kind of phospholipid hydrolase in plant, and play important roles in response to environmental stress. According to coding sequence of PLD α gene from *Chorispora Bungeana* and the sequence of pBI-121 vector, a pair of specific primers add XbaI and SacI restriction sites to the ends of PLD α gene is designed. The purified PCR product is linked to pTG19-T vector and the sequencing results show that the full-length of the inserted gene fragment is about 1 600 bp and showing 94.6% homology to the sequence of *Arabidopsis thaliana* PLD α . The recombinant plasmid is identified by restriction analysis and PCR, sequence analysis indicates that the pBI121-PLD α expression vector is constructed successfully.

Key words: *Chorispora bungeana*; PLD α gene; coding sequence; construction of expression vector

植物在环境中不断地进行物质和能量的交换, 只有在适应的环境条件下才能正常生长与发育。但是各种不利环境条件, 如低温、高温、干旱、盐害等的存在, 会抑制植物的新陈代谢和生长, 甚至在胁迫严重时会导致植株死亡^[1]。高山离子芥(*Chorispora bungeana*)是代表性的高山冰缘植物之一, 它属于十字花科离子芥属多年生草本植物,

主要分布在亚洲中部海拔 3 800 m 以上的高山地区, 地理上紧邻永久冰雪带, 具有先锋植物的特点, 能适应低氧分压、冰冻和强紫外线辐射的环境, 尤其是高山冻融过程中剧烈的气温波动^[2]。研究表明, 高山离子芥虽然是冰缘植物, 但并没有抵御冷冻环境的特殊形态结构, 该植物具有生理生化和分子水平上的抗冷冻调节机制, 是研究植物适

收稿日期: 2014-01-17; 修改稿收到日期: 2014-03-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(31160087, 31360061); 甘肃省财政厅高校基本科研业务费项目; 甘肃省教育厅科研基金(1101-06)

作者简介: 杨宁(1973—), 女, 山东青州人, 副教授, 博士, 硕士研究生导师。主要研究方向为植物分子细胞生物学。

E-mail: xbsd-yn@163.com

应冷冻环境分子机制的理想材料^[3]。

磷脂酶 D(PLD)是植物组织中普遍存在的一种酶, PLD 及其产物 PA 在信号转导、膜脂降解中起重要作用, 与植物胁迫密切相关。PLD 在信号转导、小泡运输、有丝分裂、激素作用的发挥、细胞骨架组装、防御反应以及种子萌发和衰老过程中都起重要作用, 因此越来越引起人们的重视^[4]。许多研究已经证明了膜脂降解酶在冷害中的作用, PLD 的活性与植物对冷害与冻害条件的响应有密切联系^[5]。

PLD 是一个多基因家族, 根据 PLD 基因序列的特点, 植物的 PLD 被分为六大类: PLD α , PLD β , PLD γ , PLD δ , PLD ϵ , PLD ζ ^[6-7]。目前已从多种植物中获得了 PLD cDNA 的全序列, 包括水稻、玉米、拟南芥、甘蓝、棉花、烟草、花生等。不同植物中分离出的 PLD 的数目和种类不同^[8]。本实验室首次从高山离子芥这种具有天然抗性冰缘植物中成功的克隆出高山离子芥 PLD α 基因(cbPLD α , Gene Bank accession NO. KF248008), 并在此基础上进一步构建高山离子芥 PLD α 基因的表达载体, 为进一步研究利用该抗逆响应基因奠定了基础。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 植物材料 取高山离子芥(*Chorispora Bungeana*)试管苗叶片用于 RNA 的提取, 以提取的 RNA 为模板, 用 PrimerScript RT reagent Kit With gDNA Eraser(Perfect Real Time)逆转录试剂盒(TAKARA 公司)反转录合成第一链 cDNA。

1.1.2 菌种、载体与试剂 植物表达载体 pBI121, 大肠杆菌菌株 DH α 购于全式金公司, 连接载体购自捷瑞公司。胰蛋白胨(Tryptone)、酵母提取物(Yeast Extract)、琼脂、琼脂糖、氨苄青霉素(Amp)、卡那霉素(Kan)、异丙基硫代半乳糖苷(IPTG), 5-溴-4-氯-3-吡啶- β -D-半乳糖苷(X-gal)、Ex Taq DNA 聚合酶、PCR 反应 Buffer、T4DNA 连接酶、T4DNA 连接酶 Buffer、限制性内切酶 Xba I 和 Sac I、DNA 分子量标准(Marker)购于宝生物有限公司; 质粒提取试剂盒购于上海生工生物技术有限公司; 凝胶回收试剂盒购于爱思进生物技术有限公司; 其余常规试剂均为国产分析纯或化学纯。本试验所用引物由北京六合华大基因科技股份

有限公司合成。

1.1.3 引物序列 利用 DNASTAR 软件以及本实验室已经克隆获得的高山离子芥 PLD α 基因的编码区设计引物, 上游引物为: PLD α Upper Primer 5'-ATAGTTGGGCCAAACAAAC-3'(含 XbaI 酶切位点); 下游引物为: PLD α Lower Primer 5'-ACCGCGAGGACCAGA-3'(含 SacI 酶切位点)。

1.2 方 法

1.2.1 PLD α 基因编码区克隆 以高山离子芥总 cDNA 为模板, 以 Upper Primer、Lower Primer 为引物进行 PCR 基因扩增, 反应体系为: 模板 cDNA 1.0 μ L, Upper Primer(10 μ M) 1.0 μ L, Lower Primer(10 μ M) 1.0 μ L, Ex Taq DNA Polymerase 12.5 μ L, 加 H₂O 至 25.0 μ L。PCR 反应参数为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 57 $^{\circ}$ C 退火 1 min, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 循环 35 次, 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min; 4 $^{\circ}$ C 保存。经琼脂糖凝胶电泳分离 PCR 扩增产物后, 扩增产物用普通琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(离心柱型)回收目的片段。

1.2.2 pTG19-T 克隆载体构建 取回收产物 7 μ L, pTG19-T Vector 1 μ L, T4DNA Ligase 1 μ L, 10 \times T4 DNA Ligase Buffer 1 μ L, 混匀, 4 $^{\circ}$ C 连接过夜。取连接产物 5 μ L 加入到 50 μ L 的 DH5 α 感受态细胞中, 混匀, 冰浴 30 min, 42 $^{\circ}$ C 水浴中热激 45 s, 冰浴 2 min, 加入 50 μ L LB 液体培养基, 置于 37 $^{\circ}$ C, 振荡培养 1 h。取转化的菌液涂布于预先涂好 IPTG(200 mg \cdot mL⁻¹) 7 μ L 和 X-gal(20 mg \cdot mL⁻¹) 40 μ L 的含 Amp 抗生素的 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 至液体被吸收, 倒置平板, 37 $^{\circ}$ C 过夜培养。挑取平板上的白色单克隆菌落, 接种于 1 mL 含 Amp(1 mL \cdot L⁻¹) 的 LB 液体培养基中, 置于 37 $^{\circ}$ C, 振荡至菌液浑浊。对菌悬液进行 PCR 扩增鉴定, 阳性克隆送检测序。同时, 提取阳性克隆载体菌液质粒, 按如下体系进行双酶切($V_{\text{总}}=20 \mu\text{L}$): pTG19-T-PLD 质粒 14 μ L, XbaI 1 μ L, SacI 1 μ L, 0.1% BSA 2 μ L, 缓冲液 2 μ L, 37 $^{\circ}$ C 酶切 2 h。用琼脂糖凝胶电泳分离回收目的片段。将回收纯化的目的片段, 贮存于 -20 $^{\circ}$ C, 用于后续的连接。

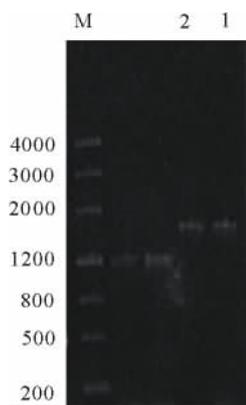
1.2.3 pBI121-PLD α 植物表达载体的构建及阳性菌株检验 此过程通过提取质粒、酶切转化、目的片段的回收、连接与重组 DNA 的鉴定等常规 DNA 重组技术进行。通过用 XbaI 和 SacI 限制性内切酶双酶切 pBI121 质粒, 酶切体系: pBI121

质粒溶液 14 μL , Xba I 1 μL , Sac I 1 μL , 0.1% BSA 2 μL , 10 \times M Buffer 2 μL . 利用试剂盒回收带有 XbaI 和 SacI 粘性末端的大片段. 将回收产物与回收的 *PLD α* 目的基因片段进行连接, 产物转化大肠杆菌 *DH 5 α* 感受态细胞中进行修复, 检菌, XbaI 和 SacI 双酶切鉴定并测序检测.

2 结果与分析

2.1 *PLD α* 目的片段的扩增及克隆载体构建

2.1.1 目的片段的 PCR 扩增产物测定 以高山离子芥总 cDNA 为模板, 以 Upper Primer、Lower Primer 为引物进行 PCR 扩增, PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分析后, PCR 扩增片段的大小约为 1 600 bp 左右(图 1).



M. DNA Marker; 1, 2. PCR 扩增产物(PCR product)

图 1 目的基因扩增电泳图谱

Fig 1 Agrose gel electrophoresis of target gene amplification

2.1.2 菌液 PCR 鉴定及阳性克隆的序列测定 由图 2 可见, 在第 1 泳道有一条清晰的菌液 PCR 扩增产物扩增条带, 与预期 *PLD α* 基因片段大小吻合. 为了进一步检测目的片段是否引入酶切位点,

将阳性克隆送检测序. 测序结果表明, 所克隆的基因序列两端成功引入 Xba I 和 Sac I 酶切位点, blast 比对建立系统树分析表明, 高山离子芥 *PLD α* 编码区序列, 与已报道的拟南芥 *AtPLD α 1* 的遗传距离最短, 同源率为 94.6%, 与玉米 *ZmPLD* 亲缘关系较远, 同源率 77.7%(图 3). 所克隆的基因序列为目的基因.



M. DNA MarkerIII; 1. PCR 产物(PCR product)

图 2 PCR 鉴定的电泳图谱

Fig 2 Agrose gel electrophoresis of PCR identification

2.1.3 pTG19-T 克隆载体的构建检测 将测序正确的菌液进行质粒的提取, 并进行电泳检测, 该质粒大小与预期相符. 用 Xba I 和 Sac I 对抽提质粒双酶切. 若抽提质粒中含有插入的目的片段, 则酶切后除应得到一条较大的载体片段, 还应有一条较小目的基因片段. 酶切产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测(图 4). 结果显示与预期一致, 约为 1 600 bp 处有一条清晰的扩增条带, 即我们所需的 *PLD α* 目的基因片段, 而在约为 2 700 bp 处的另一条扩增条带, 即为较大的载体片段. 采用 DNA 凝胶回收试剂盒回收该目的片段, 进行电泳检测, 结果显示目的片段得到纯化.

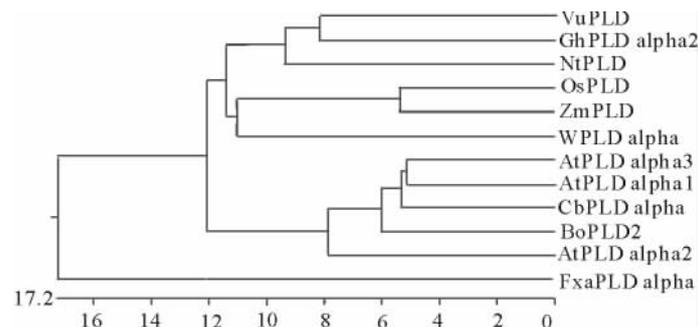
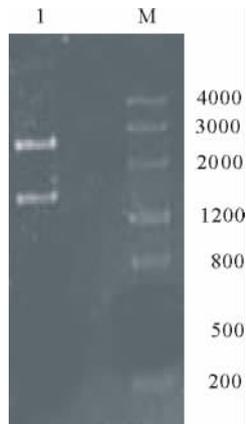


图 3 高山离子芥 *PLD α* 基因编码区与多种植物的 *PLD* 基因序列遗传进化树分析

Fig 3 The relationship of the CbPLD α with other PLDs from plant species

* The sequences of the PLDs used for construction of the tree are listed in the GenBank data base under the following accession numbers: *AtPLD* alpha1 (GenBank accession No. NM112443); *AtPLD* alpha2 (No. NM104135); *AtPLD* alpha3 (No. NM122446); *BoPLD2* (No. AF090444); *VuPLD* (No. U92656); *FxaPLD* alpha (No. AY758359); *GhPLD* alpha2 (No. GU569953); *NtPLD* (No. Z84822); *OsPLD* (No. D73411); *VvPLD* alpha (No. XM002268159); *ZmPLD* (No. D73410).



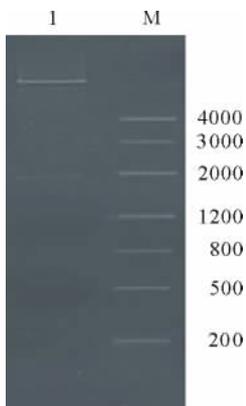
M. DNA MarkerIII; 1. 酶切产物(PCR product)

图 4 PTG19-T-PLD α 质粒酶切电泳图谱

Fig 4 Identification of PTG19-T-PLD α vector with XbaI and SacI digestion

2.2 高山离子芥磷脂酶 D α 基因表达载体的构建检测

2.2.1 表达载体的构建 采用 SanPrep 柱式质粒 DNA 小量抽提试剂盒方法对本实验室保存的含有 pBI121 载体的大肠杆菌菌液进行质粒抽提。经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测，该质粒大小与预期相符。用 Xba I 和 Sac I 限制性双酶切抽提的 pBI121 质粒，酶切产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测，结果显示酶切成功（图 5）。采用 DNA 凝胶回收试剂盒回收载体大片段，将获得的片段贮存于 -20 °C，用于后续的连接。



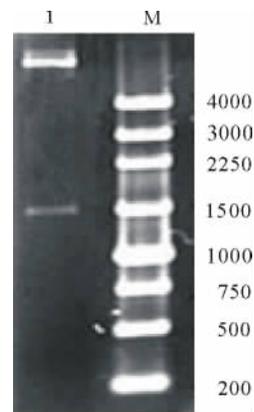
M. DNA Marker; 1. PCR 扩增产物(PCR product)

图 5 pBI121 双酶切

Fig 5 Identification of pBI121 vector with XbaI and SacI digestion

2.2.2 表达载体的检测 将回收的酶切 PLD α 目的基因片段和表达载体大片段进行连接、转化，将转化的菌液涂布于 LB 平板，将培养的单克隆菌液进行 PCR 扩增，并进行电泳检测，结果显示在约 1 600 bp 处有条带，与预期结果一致，表明其为阳性克隆。选择检测正确的菌液用于进一步的抽提质粒酶切鉴定。用 Xba I 和 Sac I 限制性内切酶双酶切重组质粒 pBI121-PLD α 。酶切产物电泳检测如图 6 所示，pBI121-PLD α 质粒双酶切后，得到一条大载体片段和一条约 1 600 bp 的目的片段。

为了进一步检测表达载体是否构建成功，将阳性克隆送检测序。测序结果表明，重组质粒中确实含有 PLD α 目的基因片段，且读码框正确，重组质粒 pBI121-PLD α 质粒构建成功。



M. DNA Marker; 1. 酶切产物(PCR product)

图 6 pBI121-PLD α 质粒酶切电泳图

Fig 6 Identification of pBI121-PLD α vector with XbaI and SacI digestion

3 讨论

低温作为一种严重的自然灾害，不仅限制着农作物的分布区域，影响着农作物的产量、质量，有时甚至影响到其生存。每年冷害带来的损失高达数千亿美元，而传统的育种方式得不到具有高效抗寒能力的品种。近几年利用外源基因进行作物遗传改良已成为植物育种的重要手段。通过转基因技术对作物进行抗寒性遗传改良，对于农业生产中的抗低温育种以及提高寒区农作物产量具有重要的指导意义^[9-11]。

PLD 是调控磷脂降解的关键酶, 在信号转导、激素作用的发挥、细胞骨架组装、细胞分裂的发生、穿膜运输、分泌作用、逆境防御反应以及种子萌发和细胞衰老中都扮演着重要角色^[5,8,13,14], 因此在植物育种上有很大的发展前景. 已从蓖麻、烟草、拟南芥等植物上克隆得到 PLD 的 cDNA 构建 PLD 超表达载体和反义表达载体, 并成功获得蓖麻、烟草、拟南芥等的转化植株, 得到了许多有特殊性状的植株及其后代^[14]. 对拟南芥的研究发现, *PLD α* 有助于减轻细胞膜冻害特征^[14,16]. 本实验室已成功克隆高山离子芥细胞 PLD 基因, 并揭示了 PLD 在高山离子芥特殊抗寒机制中扮演着重要角色^[17], 表明其参与植物响应胁迫的保护机制. 虽然 *PLD α* 受胁迫而被诱导, 但其在适应或耐受逆境的具体功能尚待进一步鉴定.

参考文献:

- [1] 高媛, 齐晓花, 杨景华. 高等植物对低温胁迫的响应研究[J]. 北方园艺, 2007(10): 58-61.
- [2] 常建锋. 高山离子芥线粒体交替途径介导的抗寒特征研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2000.
- [3] 李玉华. 高山离子芥再生苗响应低温和干旱的生理机制研究[D]. 兰州: 兰州大学, 2010.
- [4] 王国泽. 磷脂酶 D 感应和接受低温胁迫的功能及在黄瓜冷害中的作用[D]. 杭州: 浙江大学, 2006.
- [5] 王国泽, 茅林春, 潘妍. 植物磷脂酶 D 对环境胁迫的响应和传导信号的功能[J]. 西北农林科技大学学报: 自然科学版, 2005, 33(2): 147-154.
- [6] WANG X. Regulatory functions of phospholipase D and phosphatidic acid in plant growth, development, and stress responses[D]. *Plant Physiology*, 2005, 139: 566-73.
- [7] 杜栋良. 黄瓜磷脂酶 D α 基因的克隆及其正反义表达载体的构建[D]. 济南: 山东农业大学, 2008.
- [8] 张充, 蒋继志, 廖祥儒, 等. 植物中的磷脂酶[J]. 植物生理学通讯, 2005, 41(5): 691-697.
- [9] 安黎哲. 高山冰缘植物响应极端环境的机理研究[C]. 中国植物学会七十五周年年会论文摘要汇编, 2008.
- [10] 王鸣刚, 骆换涛, 李志忠. AtPCSI 基因表达载体构建与转化苜蓿的研究[J]. 草业学报, 2011, 28(2): 201-206.
- [11] 包永霞, 李雪, 满达. 转 DREBIA 基因多年生黑麦草 T1 代萌发期耐盐性研究[J]. 草业学报, 2011, 28(8): 1440-1444.
- [12] YUAN H, CHEN L, PALIYATH G, et al. Characterization of microsomal and mitochondrial phospholipase D activities and cloning of a phospholipase D alpha cDNA from strawberry fruits [J]. *Plant Physiol Biochem*, 2005, 43: 535-547.
- [13] WANG X M. Lipid signaling[J]. *Current Opinion in Plant Biology*, 2004, 7: 329-336.
- [14] 郑风荣, 李德全. 磷脂酶 D(PLD)基因的结构、表达及其表达产物在信号转导中的作用[J]. 植物学通报, 2002, 19(2): 256-163.
- [15] WELTI R, LI W, LI M, et al. Profiling membrane lipids in plant stress responses. Role of phospholipase D infreezing-induced lipid changes in Arabidopsis [J]. *Biol Chem*, 2002, 277: 31994-32002.
- [16] RAJASHEKAR C B, ZHOUA H E, ZHANG Y, et al. Suppression of phospholipase D α 1 induces freezing tolerance in Arabidopsis: response of cold responsive genes and osmolyte accumulation [J]. *Plant Physiol*, 2006, 163: 916-926.
- [17] YANG N, YUE X L, CHEN X L, et al. Molecular cloning and partial characterization of a novel phospholipase D gene from *Chorispora bungeana*[J]. *Plant Cell Tiss Organ Cult*, 2011, 108: 201-212.

(责任编辑 俞诗源)