

发根农杆菌 *rolC* 基因的克隆及序列分析

刘兴菊, 梁海永, 杨敏生*, 周怀军

(河北农业大学 林学院, 河北 保定 071000)

摘要:以发根农杆菌 30148 为材料,设计了 *rolC* 基因的特异性引物,应用 PCR 技术,扩增出了正确序列的 *rolC* 基因 585 bp 片段,并利用 pUCm-T 载体对此片段进行了克隆,并进行了序列分析。所克隆 *rolC* 基因与已发表的序列相比较,核苷酸序列的同源性达到 100%,但另一个克隆中部分碱基发生了改变,同源性达到 99%。

关键词:Ri 质粒; *rolC* 基因; 克隆

中图分类号:S718.46

文献标识码:A

文章编号:1001-7461(2007)02-0072-04

Cloning of *rolC* Gene of Ri Plasmid and Sequence Analysis

LIU Xing-ju, LIANG Hai-yong, YANG Min-sheng*, ZHOU Huai-jun

(College of Forestry, Agricultural University of Hebei, Baoding, Hebei 071000, China)

Abstract: Ri plasmid was developed and a 585bp fragment of *rolC* gene was amplified by PCR via primer of *rolC* gene, and the fragment was cloned into vector pUCm-T. Comparison with previously published nucleotide sequence showed that the homology was 100%. But another clone gene nucleotide sequence showed that the homology was 99% with it.

Key words: Ri plasmid; *rolC* gene; sequence analysis

Ri 质粒 *rol* 基因转化的植株不仅表现出生根能力明显提高,而且通常还表现出叶片和花的形态、色素形成、节间长短、生活周期及向地性等性状的可遗传的变异,其中许多变异如植株矮化、节间缩短、花形和叶形改变等在园林植物品种改良中有很大的应用价值^[1]。在果树生产上,使用矮化和根系发达的砧木能使果树树型矮化,吸收功能增强,不仅便于经营管理,也大大提高果树的生产率。为了改良梨树砧木高生长的特性, Bell 等(1999)将 *rolC* 基因导入了西洋梨中,并成功地获得了高生长下降、茎节数减少、叶片变小的转基因植株^[2]。日本学者 Kiyokawa 等(1996)利用 *rol* 基因对秋海棠进行转化,获得了矮生型与超矮生型的转基因植株,表现出叶片浓绿、皱缩,花瓣卷皱,叶量增多,株型矮化等一系列的可利用的形态变异,为培育具有更高观赏价值的新品系提供了选择基础^[3]。所以克隆 *rolC* 基因将为遗传育

种提供更广泛的变异来源,近年来许多学者已经从多种发根农杆菌中克隆到 *rolC* 基因并广泛应用于多种植物的遗传转化^[4-6]。

1 材料与方法

1.1 菌株

发根农杆菌 30148、大肠杆菌 DH10B,河北农业大学林学院生物技术研究室保存。

1.2 PCR 扩增用试剂

根据 GENE BANK 中发表的 Ri 质粒 T-DNA *rolC* 基因上下游序列设计了 1 对引物(TAKARA 公司合成)。PCR 试剂盒为 TAKARA 公司产品,引物序列 *rolc1*: 5'-ACA AGC CAC TTC TGT TTC CC-3; *rolc2*: 5'-CAG CGA CTG CAA CCA GTT TA-3。 *rolC* 基因的克隆试剂:PCR 产物胶回收试剂盒、T-载体试剂盒为上海生物工程公司产品。

收稿日期:2006-04-27 修回日期:2006-06-27

基金项目:河北省自然科学基金(302312)

作者简介:刘兴菊(1976-),女,河北涿州人,硕士,从事林业生物技术及林木育种研究。

*通讯作者:杨敏生(1962-),男,内蒙古多伦人,教授,博士生导师,从事林木遗传育种工作。

1.3 rolC 基因与 T-载体的连接反应

反应在 10 μL 体系内进行,取 T-载体 1 μL (约 50 ng),PCR 的 rolC 基因产物 2 μL (约 100 ng),5 倍连接缓冲液 5 μL,T4 连接酶(3 U/mL)2 μL。在进行目的基因与载体的连接反应时,按 PCR 产物与 T-载体的分子比为 3 : 1~9 : 1,设计了 3 个处理 (I、II、III),体系为 10 μL。

1.4 rolC 基因的克隆

采用分子克隆中常用的蓝白斑筛选法,将 PCR 扩增产物 rolC 基因与 pUCm-T 载体连接物置于冰上,取 4 μL 连接产物,转化大肠杆菌 DH10B 感受态细胞。在含 X-Gal 与 IPTG 的平板上(50 μg/mL Amp)进行蓝白斑筛选。

1.5 rolC 基因序列分析

测序方法采用双脱氧自动测序法,利用 pUCm-T 载体上 T7 启动子和 M13 启动子的特异引物,对插入片段测序(rolC 基因序列由 TAKARA 公司测定)。

2 结果与分析

万方数据

2.1 rolC 基因的 PCR 扩增

挑取发根农杆菌 30148 单菌落,接种于 5 mL YEB 液体培养基中,于 28℃ 下暗振荡培养 24 h。采用分子克隆实验指南的质粒提取方法[7],用于 Ri 质粒的提取。在 0.2 mL 离心管中加 10×PCR 缓冲液 5 μL,10×dNTP(各 25 μmol/L)4 μL,2 种引物各 2 μL,TaqDNA 聚合酶 1 μL,Ri 质粒 DNA 1 μL,加无菌重蒸水至 50 μL,混匀。在 PCR 仪上进行以下反应过程:95℃,5 min(预变性),94℃,50 s(变性)→50℃,50 s(退火)→72℃,80 s(延伸),进行 30 个循

环;最后于 72℃,延伸 8 min。扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳分析。回收目的基因片段,约 600 bp 左右,通过上海生物工程公司胶回收试剂盒纯化备用。

2.2 rolC 基因的克隆与序列分析

2.2.1 用 T-载体克隆 PCR 扩增产物 rolC 基因 连接产物在 1% 琼脂糖凝胶上进行电泳,结果表明, T-载体条带与对照相比明显变暗,其与 PCR 产物 之间有大量的连接产物条带。其中处理 II [T-载体 1 μL (约 50 ng),2 倍连接 Buffer 5 μL,PCR 产物(约 200 ng)与 T4 连接酶均为 2 μL] 获得了很好的连接 效果,连接产物转化大肠杆菌 DH10B 效率高,产生 了大量的白斑菌落,并从中选出了目的克隆(表 1)。

表 1 不同连接比率对大肠杆菌 DH10B 转化率的影响

Table 1 Effect of ligation rates on transforming rates of E. coli DH10B

处理	PCR 产物 T-载体分子	T4 连接酶	大肠杆菌转化率 (白斑数)
1	3 : 1	1	5
2	5 : 1	1	16
3	9 : 1	1	7

挑取 4 个中等大小白色菌落,提取质粒。所提 4 个质粒均比 pUCm-T 载体慢,4 个质粒用 EcorV 酶 切,有 2 个质粒中切出 442bp 片段,在另 2 个质粒中 切出 207bp 片段(图 1)。Hind III-Ecol RI 酶切,有 4 个质粒切出 720bp 片段,其可能为阳性克隆质粒 (图 2)。根据已知序列分析,说明了有 2 个质粒为 可能为所需的正向克隆,另 2 个为反向连接克隆。将 所得克隆进行 PCR 检测,均可扩增出 585bp 的目的 片段(图 3)。

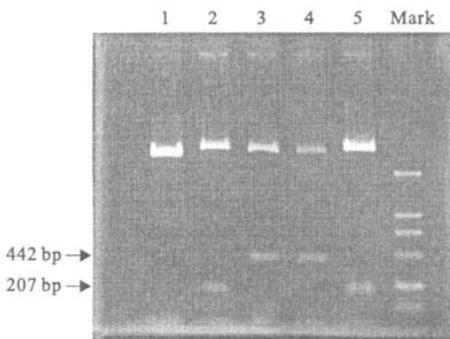


图 1 E. coli R V 酶切鉴定

Fig. 1 Identification of E. coli R V by enzyme restriction 1 为 pUCm-T 载体;3,4 为正向克隆;2,5 为反向克隆

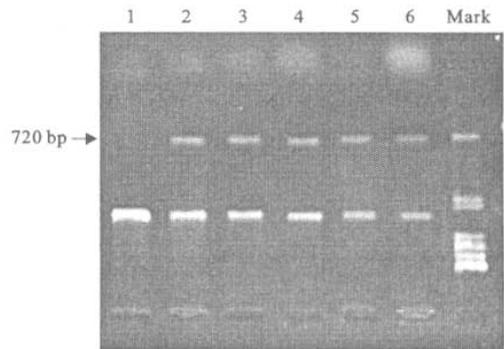


图 2 E. coli R I+Hind III 酶切鉴定

Fig. 2 Identification of E. coli R I+Hind III by enzyme restriction 1 为 pUCm-T 载体;3,4 为正向克隆;2,5 为反向克隆

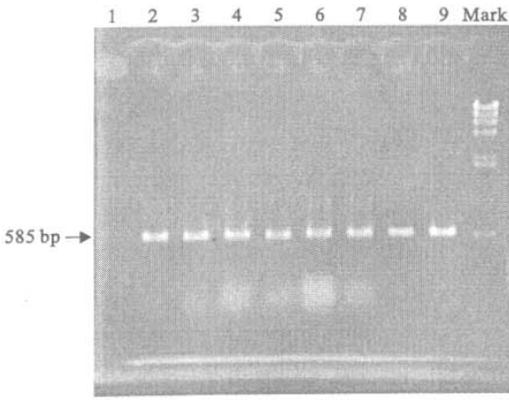


图 3 PCR 鉴定

Fig. 3 PCR identification

1 为 pUCm-T 载体;2,3,4 为正向克隆;
5,6,7 为反向克隆;8,9 为 Ri 质粒阳性对照

2.2.2 *rolC* 基因的序列测定 将疑似的 2 个阳性克隆质粒纯化后,进行测序。基因序列其中 1 个克隆所测定结果与 Hansen, G. 等^[8]报道的 *rolC* 基因序列完全一致。但另外 1 个克隆通过测序确定为反向插入载体,其基因序列在阅读框第 15、57、237、257、278 个碱基处发生了改变。导致整个读框共 178 个氨基酸中 5 个氨基酸发生了改变。这种情况的产生可能是由于测序时碱基的摆动造成的,也有可能造成的原因是 PCR 扩增时,碱基摆动错配形成的,否则可能是变成了点突变,这有可能对以后的基因表达有一定的影响。但是,如果此氨基酸不在基因的活性中心部位,则对基因的表达无影响。序列测定结果如下:

万方数据

```

ATATGATCGATGATATCCCATGGGCGGCCCTGCAGACCAGGCTCTACAAGCCACTTCTGTTCGCCACT
TTTGTAACATGGCTGAAGTTGACCTGTGTGCTCTCTTTTCCAATCTTAGGGTTAAGGATGTGGCGTCA
AGCGATGAGCTGATGAAGCACATCCAAAGCGTCTCAGACGAGCGGGTTTCCCTGATCGAACTCGGTG
AGAACCCGTGATGGATATCGACGAAGAGCATCCTCCCAAACGCCTGAGACACTGTTCCCTACGTT
GACTGCCAACGATGATGCAATGCTTCTATGGAGGGTGGTTGCCCTACAATTCGACGCATGGAGCGCT
TTCACCAATCTGCCCGCTACCAGAAGAAATGTAAGTTTCAATGAAGTGAATAGGGGGCTTAGGGAGG
CATCAGGTTTCGTGGGTACGAGGATCCTATCCGGAGCGCCTACTTCGCGGCACTTAGTTTCCCTGGCC
ACGTCGCCAAGCTGGATGAGCAGTTGAGGCTCACTTCGACAGACGGAGAGACTCTGATCTTTGACCT
CTATGCAACCCGGCGGCATGAGCTCGACCGTGATAAGGTGGTAAGCCATGGTGAATGCATGTTGGAT
AAACTGGTTGCAGTCGCTCAAGACTGGAGATCTGGATCCCTCGAGTCTAGAGT

TATGATCGATGATATCCCATGGGCGGCCCTGCAGACCAGGCTCTCAGCGACTGCAACCAGTTTCTCC
AAACATGCATTCACCATGGCTTACCACCTTATCACGGTCGAGCTCATGCCGCCGGGTTGCATAGAGGTC
AAAGATCAGAGTCTCTCCGTCTGTGCAAGTGAGCCTCAACTGCTCATCCAGCTTGGCGACGTGGCCAG
GGAAACTAAGTGCCGCGAAGTAGGCGCTCCGGATAGGATCCTCGTACCCGACGAAAACCTGATGCCTCC
CTAAGCCCCCTATTCACTTCATTGAAACTTACATCTTCTGGTACGGCGA(g)ATTGGTGAGGAGCGCTC
T(c)GTCGAATGTAGGGCT(a)CCCTCCATAGAAGCATTGCATCATCGTTGGGCAGTCAACGTAGAGGAA
CAGTGTCTCAGGCGTTTGGGGAGGATGCTCTTCGTCGATATCCATCGACGGGTTCTACCGAGTTCGAT
CAGGGAAACCCGCTCGTCTGAGACGCTTTGGATGTGCTTCATCAGCTCATCGCTTGACC(g)CATCCTTA
ACCCTAAGATTGAAAAGAGAGCACACAGGC(t)TCAGCCATG]TTACAAAAGTGGGAAAACAGAAAGTC
GCTTGTAAAGACTGGAGATCTGGATCCCTCGAGTCTAG

```

阴影部分的碱基序列为引物序列,方括号内为 ORF12 读框,小括号内为改变的碱基。

2.2.3 氨基酸序列分析 根据 DNA 序列推导的蛋白质的氨基酸序列,与 GENBANK 中现有发根农杆菌的 Ri 质粒的 *rolC* 序列比较,与 pRi8196、pRiA4b、pRi1724 分别有 100%、80%、78% 的同源性。所克隆基因与 pRi8196 质粒所具有的 *rolC* 基因完全相同。

3 结论与讨论

发根农杆菌的 *rolC* 基因,其编码的细胞分裂素 β-葡萄糖苷酶,至少能够水解 N7 和 N9 位 2 种细胞分裂素葡萄糖苷^[9]。*rolC* 基因的表达产物能够利用贮存形式的细胞分裂素,释放自由态细胞分裂素,从而影响植物的生长发育。有研究指出,质粒上的

