

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 *rolC*1: 5'-ACA AGC CAC TTC TGT TTC CC-3; *rolC*2: 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 <i>E. coli</i> 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 *Eco*R V 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-*Eco*R I 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)。

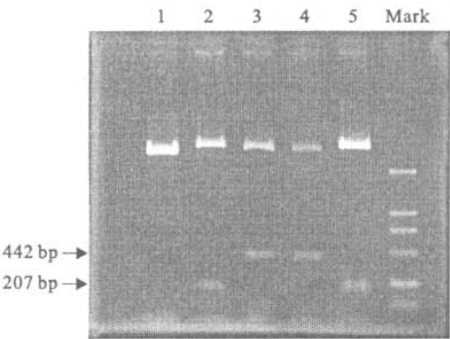


图 1 *E. coli* R V 酶切鉴定
Fig. 1 Identification of *E. coli* R V by enzyme restriction
1 为 pUCm-T 载体;3,4 为正向克隆;2,5 为反向克隆

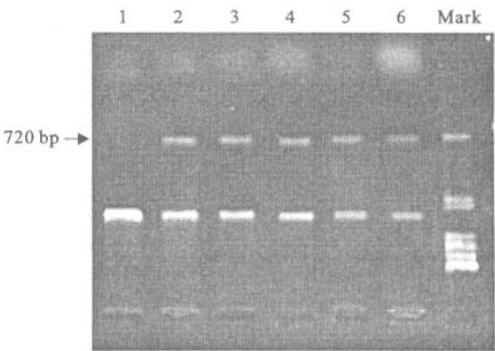


图 2 *E. coli* R I+Hind III 酶切鉴定
Fig. 2 Identification of *E. coli* R I+Hind III by enzyme restriction
1 为 pUCm-T 载体;3,4 为正向克隆;2,5 为反向克隆

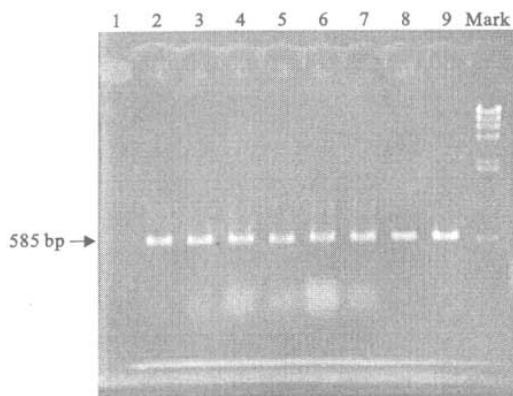


图3 PCR 鉴定

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

```

ATATGATCGATGATATCCCATGGGCGGCCGCTGCAGACCAGGTCTACAAGCCACTTCTGTTCCCACT
TTTGTAAC[CATGGCTGAAGTTGACCTGTGTGCTCTCTTTTCCAATCTTAGGGTTAAGGATGTGGCGTCA
AGCGATGAGCTGATGAAGCACATCCAAAGCGTCTCAGACGAGCGGGTTTCCCTGATCGAACTCGGTG
AGAACCCGTGATGGATATCGACGAAGAGCATCCTCCCCAAACGCCTGAGACACTGTTCTCTACGTT
GACTGCCCAACGATGATGCAATGCTTCTATGGAGGGTGGTTGCCCTACAATTCGACGCGATGGAGCGCT
TTCACCAATCTGCCGCGTACCAGAAGAATGTAAGTTTCAATGAAGTGAATAGGGGGCTTAGGGAGG
CATCAGGTTTCGTCGGGTACGAGGATCCTATCCGGAGCGCCTACTTCGCGGCACTTAGTTTCCCTGGCC
ACGTCGCCAAGCTGGATGAGCAGTTGAGGCTCACTTCGACAGACGGAGAGACTCTGATCTTTGACCT
CTATGCAACCCGGCGCATGAGCTCGACCGTGATAAGGTGGTAAGCCATGGTGAATGCATGTTTGGAT
AA[ACTGGTTGCAGTCGCTCAAGACTGGAGATCTGGATCCCTCGAGTCTAGAGT

TATGATCGATGATATCCCATGGGCGGCCGCTGCAGACCAGGTCTCAGCGACTGCAACCAGTTTATCC
AAACATGCATTACCATGGCTTACCACCTTATCAGGTCGAGCTCATGCCGCCGGGTTGCATAGAGGTG
AAAGATCAGAGTCTCTCCGTCTGTGCAAGTGAGCCTCAACTGCTCATCCAGCTTGGCGACGTGGCCAG
GGAAACTAAGTGCCGCGAAGTAGGCGCTCCGGATAGGATCCTCGTACCCGACGAAACCTGATGCCCTCC
CTAAGCCCCCTATTCACTTCATTGAACTTACATTCTTCTGGTACGGCGA(g)ATTGGTGAGGAGCGCTC
T(c)GTCGAATTGTAGGGCT(a)CCCTCCATAGAAGCATTGCATCATCGTTGGGCAGTCAACGTAGAGGAA
CAGTGTCTCAGGCGTTTGGGGAGGATGCTCTTCGTCGATATCCATCGACGGGTTCTACCGAGTTTCGAT
CAGGGAAACCCGCTCGTCTGAGACGCTTTGGATGTGCTTCATCAGCTCATCGTTGACC(g)CATCCTTA
ACCCTAAGATTGAAAAAGAGACACACAGGC(t)TCAGCCATGJTTACAAAAGTGGGAAACAGAAAGTC
GCCTGTAAAGACTGGAGATCTGGATCCCTCGAGTCTAG

```

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

	5 15 25 35 45 55
pRi1724	MAEFDLCALF SSLKVGDVSS SDELKKHIQS ASKERTPLTE PEGEQSMDVD EEGGRQDPGI
pRiA4b	MAEFDLCALF SSLKVGDVSS SDELKKHIQS ASKERTPLTE PEGEQSMDID EEGGRQDPGI
pRi8196	MAEVDLCALF SNLRVKDVAS SDELMKHIQS VSDERVSLIE LGENPSMDID EEHPPQTPET
Clustal	***.***** *:.*: *:* ***** .*.**.* * ** *.**:* ** *
	MAEVDLCALF SNLRVKDVAS SDELMKHIQS VSDERVSLIE LGENPSMDID EEHPPQTPET

	65 75 85 95 105 115
pRi1724	LYLYVDCPTM MRCFYGGSLP YNSTHGALIT NLPPYQKDVS LGEVCRGLRQ ASGFFGYEDV
pRiA4b	LYLYVDCPTM MRCFYGGSLP YNSRHGALIT NLPPYQKDVS LGEVCRGLRQ ASGFFGYEDV
pRi8196	LFLYVDCPTM MQCFYGGWLP YNSTHGALLT NLPPYQKNVS FNEVNRGLRE ASGFVGYEDP
Clustal	*:***** *:***** ** *** *****:* *****:* .** *****:****.****
	LFLYVDCPTM MQCFYGGWLP YNSTHGALLT NLPPYQKNVS FNEVNRGLRE ASGFVGYEDP

	125 135 145 155 165 175
pRi1724	IRSAYFAALS VPGYFVKLDG QMELTSTKGK SLTFDLYASN QLRLEPGALV RHGECKFG
pRiA4b	IRSAYFAALS VPGYFVKLDG QMELTSTKGK SLTFDLYASN QLRLEPGALV RHGECKFG
pRi8196	IRSAYFAALS FPGHVAKLDE QLRLTSTDGE TLIFDLYATR RHELDKRVV SHGECMFG
Clustal	***** .**:.*** *:*****:* :* *****:. :.*: .:* *****
	IRSAYFAALS FPGHVAKLDE QLRLTSTDGE TLIFDLYATR RHELDKRVV SHGECMFG

万方数据

阴影部分为所克隆 rolC DNA 序列推导的氨基酸序列。

rolC 基因不仅能诱导植物产生发根,而且还具有影响植物次生代谢产物合成的能力^[10]。对 rolC 基因的克隆,为进一步开展该基因表达产物对植物生长的调控研究奠定了基础。还可对所克隆的碱基发生变异的基因进一步研究,确定其是否为突变,以及碱基突变将来转化植物时对基因表达的影响。同时,也为开展相关基因工程研究(如对已通过发根农杆菌转化的植物进行转化,达到调控该基因的表达等)打下了良好基础。

参考文献:

[1] 梁机,陈晓阳,林善枝,等.发根农杆菌 Ri 质粒 rol 基因研究进展及在林木改良上的应用[J]. 植物学通报,2002,19(6):650-658.

[2] Bell R L, Scorza R, Srinivasan C, et al. Transformation of beurre bosc pear with the rolC gene[J]. J. Aemr. Soc. Hort. Sci., 1999,124(6):570-574.

[3] Kiyokawa S, Kuchi Y K, Kamada H. Genetic transformation of *Bgonia tuberhybrida* by Ri rol genes[J]. Plant Cell Rep., 1996,15:606-609.

[4] Schmülling T, Schell J, Spena A. Single genes from *Agrobac-*

terium rhizogenes influence plant development[J]. EMBO J., 1988,(7):2621-2629.

[5] Schmülling T, Schell J, Spena A. Promoters of the rolA,B, and C genes of *Agrobacterium rhizogenes* are differentially regulated in transgenic plants[J]. Plant Cell, 1989,(1):665-670.

[6] Scorza R, Zimmerman T W, Cordts T M, et al. Horticultural characteristics of transgenic tobacco expressing the rolc gene from *Agrobacterium rhizogenes* [J]. J. Amer. Soc. Hort. Sci., 1994,199:1091-1098.

[7] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 EF, 曼尼阿蒂斯 T 著. 金冬雁, 黎孟枫译. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1999.

[8] Hansen G, Larribe M, Vaubert D. et al. *Agrobacterium rhizogenes* pRi8196 T-DNA; mapping and DNA sequence of functions involved in mannopine synthesis and hairy root differentiation [J]. Journal Proc. Natl. Acad. Sci., 1991,88 (17): 7763-7767.

[9] Estruch J J, Chriqui D, Grossmann K, et al. The plant onco gene rolC is responsible for the release of cytokinins from glucoside conjugates[J]. EMBO J., 1991,(10):2889-2895.

[10] SPena A, Schmülling T, Koncz C. Independent and synergistic activity of rol A,B and C loci in stimulating abnormal growth in plant[J]. EMBO J,1987,(13):3891-3899.