

带有 GFP 标签的油松苯丙氨酸解氨酶基因表达载体的构建

李 薇<sup>1</sup>, 徐 华<sup>2</sup>, 樊军锋<sup>1\*</sup>

(1. 西北农林科技大学 林学院, 陕西 杨陵 712100; 2. 陕西省林业厅 种苗工作站, 陕西 西安 710082)

**摘 要:**利用基因重组技术,将油松的苯丙氨酸解氨酶基因(TaPAL)克隆到 PBI121 植物表达载体中,并且用报告基因 GFP 替换了 GUS,构建了包含绿色荧光蛋白(GFP)基因的植物重组表达载体 PBI121-GFP-TaPAL,GFP 标签比 GUS 基因更加易于检测,方便进行 TaPAL 功能鉴定方面的研究。利用电击法将重组表达载体成功的转化进农杆菌 GV3301 中。该研究可以为深入研究苯丙氨酸解氨酶的结构及功能及进一步通过导入次生代谢关键酶来提高植物的抗病育种提供基础。

**关键词:**苯丙氨酸解氨酶基因;植物表达载体;基因重组;农杆菌;绿色荧光蛋白

**中图分类号:**S791.254      **文献标志码:**A      **文章编号:**1001-7461(2014)05-0084-04

Construction of GFP Tagged Phenylalanine Ammonialyase Gene  
of *Pinus tabulaeformis* Expression Vector

LI Wei<sup>1</sup>, XU Hua<sup>2</sup>, FAN Jun-feng<sup>1\*</sup>

(1. College of Forestry, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2. Tree and Seed Workstation of Department of Forest of Shaanxi Province, Xian, Shaanxi 710082, China)

**Abstract:** The research aim of this study was to transfer the Phenylalanine ammonialyase of *Pinus tabulaeformis* into plants expression vector PBI121 by using the gene recombination technology, and by replacing report gene GUS with GFP. We constructed the recombinant expression plasmid PBI121-GFP-TaPAL which contained the green fluorescent protein gene. Compared to GUS gene GFP labels was easier to detect and identify the TaPAL function. By using the electric shock method we transformed the recombinated expression vector into agrobacterium GV3301. The research provided the basis for further study of the structure and function of phenylalanine ammonialyase and by importing the key secondary metabolism enzymes to improve the plant disease resistance.

**Key words:** phenylalanine ammonialyase; plant expression vector; gene recombination technology; agrobacterium; GFP

油松栽培广,适应性强,在中国北方大面积栽培,有良好的保护水土及美化环境的功能。苯丙氨酸解氨酶(Phenylalanine ammonia-lyase, PAL)是苯丙烷类代谢过程中的关键酶和限速酶,其代谢产物参与黄酮、木质素和植保素等物质的合成,这些化合物对植物的生长发育、抗病虫以及抗逆性等具有重要作用<sup>[1-2]</sup>。此外,苯丙氨酸解氨酶也是一种可用于商业途径的非水解酶<sup>[3]</sup>。前人的研究表明,植物

在受到低温、机械损伤、病虫害侵染时均会诱导 PAL 基因的表达<sup>[4-6]</sup>。

目前,油松的病虫害防治途径主要集中在生物、化学、物理的层面,通过导入次生代谢的关键酶基因来提高其的抗性尚处于研究阶段。本试验通过前期从油松中克隆得到 PAL 基因的 DNA 序列<sup>[7]</sup>为基础,将油松的苯并氨酸解氨酶基因(TaPAL)克隆到 PBI121 植物表达载体中,以期将来的油松或者其

收稿日期:2014-01-09 修回日期:2014-03-07

基金项目:油松高世代育种材料的创造测定及选择研究;林业公益性行业科研专项(200704039)。

作者简介:李薇,女,在读硕士,研究方向:林木遗传育种。E-mail:lwzcc1987@163.com

\* 通信作者:樊军锋,男,教授,博士,研究方向:林木遗传育种及林业生物技术。E-mail: fanjf28@163.com

他造林树种转基因工程育种提供一定的理论依据,同时也为深入研究苯丙氨酸解氨酶结构和功能奠定分子基础。

GFP 绿色荧光蛋白来源于海洋水母生物,作为基因及蛋白标记物具有表达检测方便,分子量小,荧光稳定,对细胞无毒害,对光漂白具有较强的耐受性,不受种属范围限制等优点,因此利用其作报告基因,可以在不干扰活细胞功能的情况下检测基因表达、信号转导、蛋白运输与定位等<sup>[8-9]</sup>。GFP 蛋白可以克服 GUS 蛋白检测成本高、操作繁琐的缺点,相比 GUS 基因检测更加快捷方便,可以在荧光显微镜下方便检测。本试验采用 GFP 标签来构建油松的苯丙氨酸解氨酶的植物表达载体,以期在后期试验中为研究目标基因的亚细胞定位及检测转基因个体是否成功表达,用于细胞新号转导等方面的研究做铺垫。

1 材料与方法

1.1 材料

PBI121 质粒由西北农林科技大学李厚华老师惠赠、含 GFP 基因片段的载体质粒 pEGFP-N1 与带油松 TaPAL 基因的 PET-28a-TaPAL 重组表达载体保存于本实验室;限制性内切酶、T4 DNA 连接酶购自大连宝生物公司;质粒提取试剂盒、PCR 产物胶回收试剂盒为 OMEGA 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 TaPAL 基因的获得 根据油松的苯丙氨酸解氨酶(TaPAL)基因的全长 CDNA 序列设计 1 对 PCR 引物, PAL-F : CGCCTCGAGATGGTTG-CAGCAGCAG(下划线为 *Xho* I 酶切位点), PAL-R: TTAGAGCTCTCAGAATGGGCCAGGAGT (下划线为 *Sac* I 酶切位点)以保存有 TaPAL 基因的 pET-28a-TaPAL 载体为模板,扩增 TaPAL 片段,预测基因长度为 2 200 bp,扩增程序为:95℃预变性 5 min;95℃变性 30S,55℃复性 30S,72℃延伸 1 min,30 个循环;最后 72℃延伸 10 min, 12℃,结束程序。

1.2.2 GFP 基因的获得 PCR 方法扩增带 GFP 片段,预测长度为 717 bp,模板为 pEGFP-N1 质粒, GFP-F: CGCTCTAGAATGGTGAGCAAGGGCG (下划线为 *Xba* I 酶切位点), GFP-R: CGC-CTCGAGCTTGTACAGCTCGTCCATG (下划线为 *Xho* I 酶切位点)扩增程序同上,退火温度为 58℃。

1.2.3 融合基因 GFP-TaPAL 片段的获得 分别

对上述的 GFP 及 TaPAL 片段胶回收,并用 *Xho* I 单酶切这 2 个片段,经 T4 DNA 连接酶 4℃连接过夜,连接体系为 30 μL; T4 DNA ligase 3 μL, T4 DNA ligase Buffer 3 μL, GFP 及 PAL 单酶切胶回收产物各 12 μL。

连接产物直接作为模板,用 GFP-F 作上游引物与 PAL-R 作下游引物扩增 GFP-PAL 连接体,预测产物长度为 2 874 bp,扩增产物胶回收。

1.2.4 植物重组表达载体 pBI121-GFP-TaPAL 的构建

1)融合基因 GFP-TaPAL 片段与 PBI121 进行 *Xba* I 与 *Sac* I 双酶切, 37℃后酶切过夜。酶切体系见表 1。

表 1 GFP-TaPAL 片段和 PBI121 载体的双酶切

Table 1 Double digest of GFP-TaPALand PBI121 vector

序号	组分	用量/μL
1	<i>Xba</i> I	2
2	<i>Sac</i> I	2
3	10×Buffer M	5
4	PBI121/GFP-TaPAL	41

2)胶回收融合基因 GFP-TaPAL 片段与 PBI121 的酶切片段,T4 DNA 连接酶的作用下连接过夜,连接体系为 30 μL(表 2)。

表 2 pBI121 与 GFP-TaPAL 片段的连接

Table 2 The ligation of pBI121 and GFP-TaPAL

序号	组分	用量/μL
1	T4 Ligase	2
2	10×Ligase buffer	2
3	PBI121 双酶切片段	3
4	GFP/GFP-PAL 片段	13

连接产物转化大肠杆菌感受态 DH5α,涂含有卡纳抗性的 LB 平板,培养过夜,挑单菌落,接种到液体 LB 培养基中,37℃,220 r/min 扩大培养,摇菌 12 h 后,保菌,提质粒,阳性菌送测序,质粒命名为 PBI121-GFP-TaPAL。

1.3 对照质粒 PBI121-GFP 载体的构建

重新设计 GFP 下游引物 GFP-R2: CGCGATCTCCTTGTACAGCTCGTCCATG (下划线为 *Sac* I 酶切位点),上游引物 GFP-F CGCTCTAGAATGGTGAGCAAGGGCG(下划线为 *Xba* I 酶切位点)组合扩增带 *Xba* I、*Sac* I 酶切位点的 GFP 片段,同上方法连接 PBI121 载体,重组子经 *Xba* I + *Sac* I 双酶切和 PCR 鉴定,构建重组质粒载体 PBI121-GFP。

1.4 植物表达载体转化农杆菌

按照文献上的步骤制备农杆菌感受态<sup>[10]</sup>,采用电击法将 2 个重组表达载体导入到 GV3301 中。取

农杆菌感受态细胞,置于冰上解冻.加 2  $\mu$ L 质粒于菌液中,混匀并转移至无菌预冷的电击杯中,吸干电击杯表面的水.将电击杯放入电转化仪的电极之间,电击 4~5 ms;取出电击杯。

## 2 结果与分析

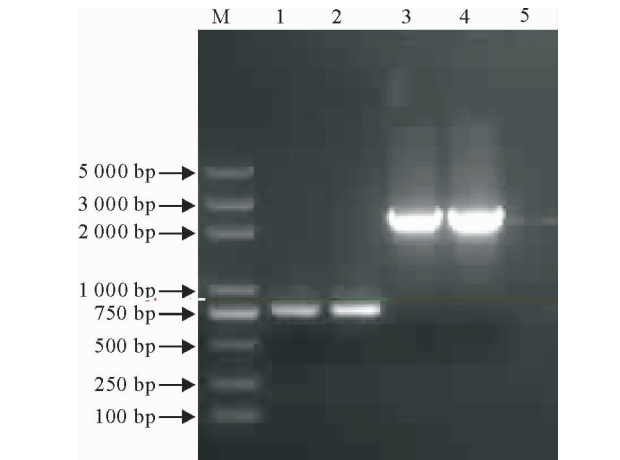
### 2.1 GFP 及 TaPAL 基因片段的扩增

PCR 方法扩增 GFP 及 TaPAL 基因,其中 GFP

基因大小 717 bp,TaPAL 基因大小 2 157 bp,基因扩增大小与预期相符,基因扩增结果如图 1。

### 2.2 PCR 扩增 GFP-TaPAL 连接产物的获得

待得到 GFP 及 TaPAL 基因序列后,分别用 *Xho*I 单酶切这 2 个胶回收产物,用 T4 DNA 连接酶连接此 2 段序列,分别用 GFP 上游引物与 TaPAL 下游引物,以连接产物为模板,成功扩增出两者的连接产物,序列大小为 2 874 bp(图 2)。



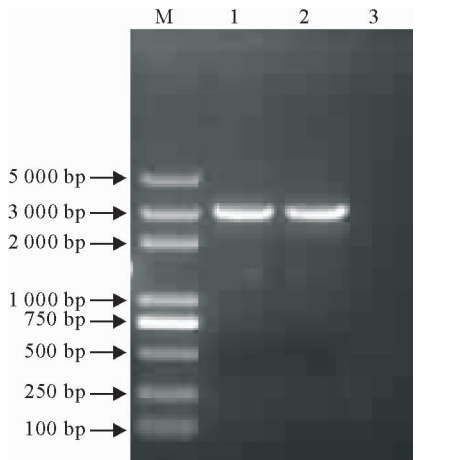
注:M. DL5000marker;1~2. PCR 扩增 GFP 基因;3~4. PCR 扩增 TaPAL 基因;5. 阴性对照。

图 1 PCR 扩增 GFP 及 PAL 基因

Fig.1 PCR amplification of GFP and TaPAL gene

### 2.3 植物重组表达载体的构建及鉴定

将获得带酶切位点的 GFP 片段与 GFP-TaPAL 片段胶回收并经 *Xba*I + *Sac*I 的双酶切,与同样经过这 2 个酶酶切的载体 PBI121 在 T4DNA 连接酶作用下连接,连接产物直接转化大肠杆菌 DH5 $\alpha$ 。提取质粒,重组载体分别命名为 PBI121-GFP-TaPAL 及 PBI121-GFP,经过华大基因的测序

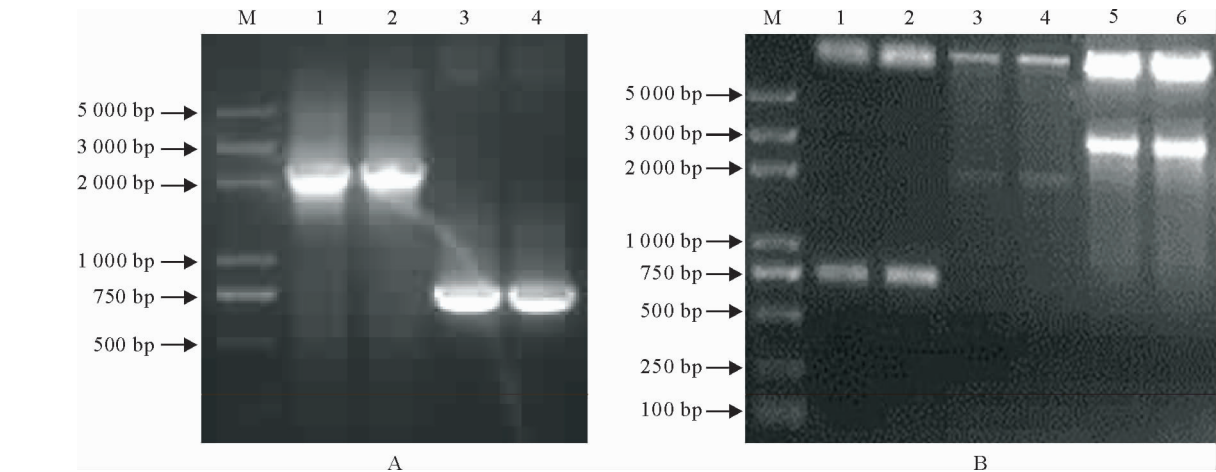


注:M. DL5000Marker;1~2. PCR 扩增 GFP-PAL;3. 阴性对照。

图 2 PCR 扩增 GFP-TaPAL 连接体

Fig.2 PCR amplification Of GFP-TaPAL connection body

结果表示外源片段的插入方向及序列是正确的。分别将成功构建的植物重组表达载体 PBI121-GFP-TaPAL 及 PBI121-GFP 转化农杆菌 GV3301 中,涂带 Kan 抗性与利福平的平板培养,挑取单菌落,摇菌并提取质粒,质粒经过 PCR 及 *Xba*I + *Sac*I 的双酶切鉴定,PCR 及双酶切均能获得目的大小片段,鉴定结果如图 3。说明重组质粒载体构建成功。



注:图 A 中,1~2 以 PBI121-GFP-TaPAL 重组质粒为模板,Per 扩增 TaPAL 基因;3~4 以 PBI121-GFP 质粒为模板,Per 扩增 GFP 基因。图 B 中,1~6 都用 *Xba*I + *Sac*I 双酶切重组质粒及空 PBI121 质粒。其中:1~2 质粒为 PBI121-GFP;3~4 质粒为 PBI121;5~6 质粒为 PBI121-GFP-TaPAL。

图 3 重组质粒 PBI121-GFP-TaPAL 及 PBI121-GFP 的 PcR 鉴定及双酶切结果

Fig.3 PCR identification and Restriction enzyme digestion of PBI121-GFP-TaPAL and PBI121-GFP

### 3 结论与讨论

试验通过前期从油松中克隆得到的苯丙氨酸解氨酶基因为基础,成功构建了携带 35S 的强组成型启动子的 pBI121-GFP-TaPAL 植物重组表达载体。采用同样的方法我们也成功构建了对照表达载体 PBI121-GFP。Tag DNA 聚合酶在克隆功能基因时会出现碱基的插入或者缺失突变,因此采用高保真酶进行扩增。利用电击法将重组载体导到农杆菌中,在农杆菌转化的过程中发现采用电击法比冻融法更利于提高转化效率,提取质粒并进行 PCR 及双酶切鉴定,结果表明重组子已经成功转化到农杆菌中,利用农杆菌的侵染特性我们可以开展进一步的转基因等相关研究<sup>[11]</sup>。

GFP 基因由于诸多的优点目前已经广泛的用于细胞中启动子活性基因表达及蛋白质定位等检测,它克服了植物分子生物学中传统的报告基因的不足<sup>[12-13]</sup>。

石伟<sup>[14]</sup>等研究表明 GFP 与 GUS 基因相比在于它不需要固定材料和碱性处理,同一细胞可以在不同条件下进行反复观察。王锐<sup>[15]</sup>等采用 GFP 标签构建植物表达载体 pGWB14-GFP 时认为,GUS 检测时对材料具有破坏性,GFP 具有适于活细胞检测的特点,可实现对样品非损伤性实时鉴定,利于进一步需要基因表达的材料的相关研究。P. Vain<sup>[16]</sup>研究报道 GFP 能大大提高转化工作的效率,减少了转基因植株分子检测步骤和工作量。黄国存<sup>[17]</sup>等认为由于植物细胞其它因素的干扰以及有些植物材料本身也能产生内源 GUS 活性,反应颜色的深浅有时不能说明 GUS 活性高低或有无。PBI121 是一个常用的植物表达载体,其多克隆酶切位点有限,仅有 3 个酶切位点(*Xba* I、*Bam*H I 和 *Sma* I),而 TaPAL 基因序列中也包含 *Bam*H I 和 *Sma* I 这 2 个酶切位点,所以想在多克隆位点中插入目的基因是不可能实现的,而载体上 GUS 两端的酶切位点恰好适合 TaPAL 基因。综合以上原因,本试验在构建载体时将 GUS 切掉,用 GFP 作为报告基因。

苯丙氨酸解氨酶是植物的苯丙烷代谢中的限速酶及关键酶,其相关代谢产生的黄酮体、木质素、生物碱类次生代谢物对植物生长发育、抵御病虫害、防止紫外线伤害及构成植物支撑系统等方面意义重大<sup>[18-19]</sup>。油松是我国北方地区的主要造林树种,利用基因工程技术创制该树种新种质已成为一项重要研究课题。利用绿色荧光蛋白报告基因与油松的苯丙氨酸解氨酶和 PBI121 质粒构建重组体,为油松转基因工程育种奠定基础。利用植物基因工程技术

将 TaPAL 基因 转入油松或者其他重要的造林树种中,利用植物自身的防御系统来提高其抗性,这样可以减轻农药对生态环境的危害及压力。

### 参考文献:

[1] 贺立红,张进标,宾金华. 苯丙氨酸解氨酶的研究进展[J]. 食品科技,2006(7):31-34.

[2] 欧阳光察,薛应龙. 植物苯丙烷类代谢的生理意义及其调控[J]. 植物生理学通讯,1988,24(3):9-16.

OUYANG G C, XUE Y L. Physiological role and regulation of phenylpanoid metablism in plant[J]. Plant Physiology Communications,1988,24(3):9-16.

[3] 缪元颖,杨顺楷,刘成君. 苯丙氨酸解氨酶的分子生物学研究进展[J]. 应用与环境生物学报,2002,8(6):672-675.

MIAO Y Y, YANG S K, LIU C J. Research progress in molecular biology of phenylalanine ammonia-lyase (E. C. 4. 3. 1. 5) [J]. Chin. J. Appl Environ Biol., 2002,8(6):672-675. (in Chinese)

[4] BROWN G E. Changes in phenylalanine ammonia-lyase, soluble phenolics and lignin in injured orange exocarp[J]. Proceedings of the Annual Meeting of the Florida State Horticulture Society,1991,103: 234-237.

[5] LEYVA A. Low temperature induces the accumulation of phenylalanine ammonia-lyase and chalcone synthase mRNA of arabidopsis thaliana in a light-dependent manner[J]. Plant Physiology,1995,108(1): 39-46.

[6] 李莉,赵越,马君兰. 苯并氨酸代谢途径关键酶 PAL、C4H、4CL 研究新进展[J]. 生物信息学,2007,5(4):187-189.

[7] 魏宁,樊军锋,杨培华,等. 油松苯丙氨酸解氨酶基因的克隆与序列分析[J]. 西北林学院学报,2013,28(3):98-103.

WEI N, FAN J F, YANG P H, et al. Molecular cloning and sequence analysis of phenylalanine ammonia-lyase gene in *Pinus tabulaeformis* [J]. Journal of Northwest Forestry University, 2013,28(3):98-103. (in Chinese)

[8] 吴瑞,张树珍. 绿色荧光蛋白及其在植物分子生物学中的应用[J]. 分子育种学,2005,3(2):240-244.

WU R, ZHANG S Z. Green fluorescent protein and its application in plant molecular biology[J]. Molecular Plant Breeding, 2005,3(2):240-244. (in Chinese)

[9] STEWART J C N. The utility of green fluorescent protein in transgenic plants[J]. Plant Cell Rep., 2001, 20(5): 376-382.

[10] CLOUGH S J, BENT A F, FLORAL DIP. A simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* [J]. Plant J., 1998,16: 735-743.

[11] 贾小明,樊军锋. 影响农杆菌介导的河北杨遗传转化的因素[J]. 西北林学院学报,2006,21(5): 102-105.

JIA X M, FAN J F. Factors affecting *Agrobacterium* mediated transformation of *Populus hopeiensis* [J]. Journal of Nonhwest Forestry University, 2006, 21(5): 102-105. (in Chinese)

[12] 黄国存,朱生伟,覃越梅,等. 绿色荧光蛋白及其在植物研究中的应用 [J]. 植物学通报,1998,15(5):24-30.

[13] CHAU. I E M. Green fluorescent protein[J]. Photochem Photobiol,1995,62 (4):651-656.

定[J]. 西北林学院学报, 2008, 23(1): 166-168.

LUO D Y, FENG D J, MU Y P, *et al.* Wood species identification of woody structure in ancient architecture at Jintaiguan Temple in Baoji[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2008, 23(1): 166-168. (in Chinese)

[8] 李敏华, 谭必明, 黄志同, 等. 古家具木材无损鉴定方法研究[J]. 西北林学院学报, 2012, 27(6): 165-167.

LI M H, TAN B M, HUANG Z T, *et al.* A study on wood non-destructive identification method of ancient furniture[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2012, 27(6): 165-167. (in Chinese)

[9] 徐峰. 木材鉴定图谱[M]. 北京: 化学工业出版社, 2008.

[10] 曾月星, 许明坤, 丁水汀. 鉴定木材显微切片制作技术[J]. 人造板通讯, 2002(7): 13, 20.

[11] 徐斌, 陶武先. 徒手切片法在进口材木材识别中的应用[J]. 木材工业, 2006, 20(1): 41-43.

XU B, TAO W X. Application of a hand-held slicing method for wood species identification[J]. China Wood Industry, 2006, 20(1): 41-43. (in Chinese)

[12] 赵泾峰, 段新芳, 冯德君, 等. 西藏古建筑房椽木构件树种鉴定研究[J]. 西北林学院学报, 2007, 22(6): 138-143.

ZHAO J F, DUAN X F, FENG D J, *et al.* Identification of wood species in Tibet ancient buildings[J]. Journal of Northwest Forestry University, 2007, 22(6): 138-143. (in Chinese)

[13] 林晓木. 如何软化处理木材[J]. 湖南林业, 2004(2): 23.

[14] 李杰. 木材的识别方法[J]. 安徽林业, 2006(4): 23.

[15] 陈柏林, 洛向玉, 王萃. 玻璃刀制备木材超薄切片的研究[J]. 东北林业大学学报, 1996, 24(3): 84-89.

CHEN B L, LUO X Y, WANG C. The technology of making wood ultrathin slices with glass-knife[J]. Journal of Northeast Forestry University, 1996, 24(3): 84-89. (in Chinese)

(上接第 87 页)

[14] 石伟, 李东栋, 邓秀新, 等. 根癌农杆菌介导绿色荧光蛋白基因转化印度酸桔的研究[J]. 园艺学报, 2002, 29(2): 109-112.

SHI W, LI D D, DENG X X, *et al.* Transformation of gfp in cleopatra (*Citrus reticulata*) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2002, 29(2): 109-112. (in Chinese)

[15] 王锐, 王俊斌, 丁博, 等. 适于植物转基因体系优化的绿色荧光蛋白表达载体构建及其瞬时表达验证[J]. 中国农学通报, 2013, 29(15): 164-168.

[16] VAIN P, WORLAND B, KOHLI A, *et al.* The green fluorescent protein (GFP) as a vital screen-able marker in rice transformation[J]. Theor. Appl. Genet., 2000(96): 164-169.

[17] 黄国存, 朱生伟, 董越酶, 等. 绿色荧光蛋白在植物研究中的应用[J]. 植物学通报, 1998, 15(5): 24-30.

[18] CRAMER C L, LIANG X W, DRON M. Differential regulation of phenylalanine ammonia-lyase genes during plant development and environmental cues[J]. Journal of Biological Chemistry, 1989, 264(24): 14486-14492.

[19] 程水源, 陈昆松, 刘卫红, 等. 植物苯丙氨酸解氨酶基因的表达调控与研究展望[J]. 果树学报, 2003, 20(5): 351-357.

CHENG S Y, CHENG K S, LIU W H, *et al.* Regulation and expression of the PAL in plant and its outlook[J]. Journal of Fruit Science, 2003, 20(5): 351-357. (in Chinese)

(上接第 180 页)

[17] ILIC J. Shrinkage-related degrade and its association with some physical properties in *Eucalyptus regnans* F. Muell [J]. Wood Science and Technology, 1999, 33: 425-437.

[18] WU Y Q, HAYASHI KAZUO, LIU Y, *et al.* Collapse-type shrinkage characteristics in plantation-grown Eucalypts: I. correlations of basic density and some structural indices with shrinkage and collapse properties[J]. Journal of Forestry Research, 2005, 16(2): 83-88.

[19] LUIGI T, LUIGI Z, MARIO M, *et al.* Steaming effects on selected wood properties of turkey oak by spectral analysis [J]. Wood Science and Technology, 2012: 46: 89-100.

[20] 江泽慧, 王喜明. 桉树人工林木材干燥与皱缩[M]. 北京: 中国林业出版社, 2003.

[21] 马世春. 汽蒸处理改善木材尺寸稳定性初探[J]. 木材工业, 1998, 12(5): 36-39.

MA S C. Study on improving dimensional stability of wood after saturated steam treatment[J]. China Wood Industry, 1998, 12(5): 36-39. (in Chinese)

[22] 段新芳, 常德龙, 李增超. 木材颜色调控技术[M]. 北京: 中国建材工业出版社, 2002: 55-57.