

簇毛麦(*Dasypyrum villosum*) GA20ox基因的 分离和鉴定*

刘英华^{1, 2#} 赵桃^{1, 3#} 龙海¹ 邓光兵¹ 潘志芬¹ 余懋群^{1**}

(¹中国科学院成都生物研究所 成都 610041)

(²西华大学 成都 610039; ³上海工程技术大学 上海 201620)

摘要 通过RT-PCR技术克隆了簇毛麦(*Dasypyrum villosum*)赤霉素生物合成关键酶GA20ox基因的全长序列, 命名为DvGA20ox, GenBank登录号为EU142949. 该基因全长1 080 bp, 推测编码359个氨基酸的蛋白质, 具有植物GA20ox基因的典型保守结构域LPWKET和NYYPXCQKP. 该基因推导编码蛋白质与小麦、大麦和黑麦草GA20ox蛋白的同源性分别为98%、97%和91%. 该序列重组到原核表达载体pET-32a(+)获得的重组子pET-32a(+)-DvGA20ox转化大肠杆菌BL21pLysS后, IPTG诱导表达, SDS-PAGE分析表明, DvGA20ox基因在大肠杆菌中获得了高效表达, 融合蛋白相对分子质量为55×10³, 与理论值相符. 结果为深入研究DvGA20ox蛋白的结构与功能以及该基因与株高发育的关系奠定了基础. 图3 参19

关键词 簇毛麦; 赤霉素; GA20ox; RT-PCR; 原核表达

CLC S512.03 : Q78

Cloning and Characterization of A cDNA Encoding Gibberellin 20-oxidase from *Dasypyrum villosum**

LIU Yinghua^{1, 2#}, ZHAO Tao^{1, 3#}, LONG Hai¹, DENG Guangbing¹, PAN Zhifen¹ & YU Maoqun^{1**}

(¹Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences, Chengdu 610041, China)

(²Xihua University, Chengdu 610039, China; ³Shanghai University of Engineering Science, Shanghai 201620, China)

Abstract Gibberellin 20oxidase (GA20ox) is a key regulatory enzyme in the GA-biosynthetic pathway of plants. The full-length cDNA of *Dasypyrum villosum* GA20ox (Designated as DvGA20ox) was isolated and consisted of 1 080-bp and encoded 359 amino acid residues. Comparative and bio-informatics analyses revealed that the deduced amino acid sequence of DvGA20ox shared 98%, 97% and 91% homology with those of wheat, barley and *Lolium perenne*, respectively, and contained conserved LPWKET and NYYPXCQKP domains. The amplified fragments were cloned into pET-32a(+) vector, and after restriction analysis the gene was transferred into *Escherichia coli* strain BL21. The recombinant gave rise to a 55×10³ fusion protein in response to the IPTG induction. Fig 3, Ref 19

Keywords *Dasypyrum villosum*; gibberellin; GA20ox; RT-PCR; heterologous expression

CLC S512.03 : Q78

赤霉素(Gibberellins, GAs)在植物的生长发育活动中发挥着重要作用, 如促进种子萌发、节间和叶片伸长、花器官形成和孤雌生殖及果实形成等^[1-3]. 根据反应类型和酶的种类, 可将赤霉素生物合成成分成3个阶段: 第一阶段, 从牻牛儿苗牻牛儿苗焦磷酸合成内根-贝壳杉烯; 第二阶段, 内根-贝壳杉烯氧化为GA₁₂-醛; 第三阶段, GA₁₂-醛进一步氧化为不同的GA^[4]. 其中GA20-氧化酶属于第3阶段的双加氧酶, 需要2-酮戊二酸和氧分子作为辅底物.

GA20-氧化酶(GA20ox)是催化赤霉素生物合成倒数第二步的关键酶, 如今已从拟南芥^[1]、水稻^[5]、菠菜^[6]、豌豆^[7]、

南瓜^[8]等植物中克隆出GA20氧化酶基因的全长cDNA, 序列分析表明, 不同植物的GA20氧化酶存在较大差异. 簇毛麦(*Dasypyrum villosum*, 2n=14, VV)是禾本科簇毛麦属一年生二倍体异花授粉植物, 为栽培小麦的近缘属. 原产于地中海及高加索地区, 具有抗锈病、抗白粉病、抗全蚀病、抗根腐病、耐旱、多蘖、高蛋白等许多优良性状^[9, 10]. 本研究以簇毛麦为材料, 利用RT-PCR技术克隆GA20ox基因, 以期探讨簇毛麦GA20-氧化酶基因的遗传多样性及其结构与功能的关系.

1 材料与方法

1.1 材料

供试材料簇毛麦(*Dasypyrum villosum*, 2n=14, VV)来自法国农业科学院雷恩作物改良研究所, 现由本实验室收集保存. 大肠杆菌菌株DH5α、BL21以及原核表达载体pET-32a(+)为本实验室保存. pMD 18-T Vector、PCR试剂, 如dNTP-mix、TaKaRa Taq DNA聚合酶、TaKaRa One Step RNA PCR Kit等, 购于宝生物(大连)有限公司. 凝胶回收试剂盒购自北京百泰

收稿日期: 2008-05-19 接受日期: 2008-10-08

*中国科学院成都生物研究所知识创新工程领域前沿项目(No. CIB-2007-LYQY-Q03)和中国科学院“西部之光”西部博士项目资助 Supported by the Knowledge Innovation Program of Chengdu Institute of Biology, Chinese Academy of Sciences (CAS) (No. CIB-2007-LYQY-Q03)and the West Light Foundation of CAS

**通讯作者 Corresponding author (E-mail: yumq@cib.ac.cn)

#并列第一作者 Both the first authors

克生物技术有限公司, 其他化学试剂均为进口或国产分析纯试剂。

1.2 引物设计与合成

根据已知大麦、小麦 GA20ox 序列设计一对全长引物。正向引物 GA20sense: 5'-CCGGAATTCATGGTGC-AGCCGGTGTTCG-3' (带 *EcoR* I 酶切位点) 和反向引物 GA20anti: 5'-CCCAAGCTTCAATGGCGACGACGATG-3' (带 *Hind* III 酶切位点), 引物由宝生物(大连)有限公司合成。

1.3 总RNA的提取和RT-PCR

利用 TRIzol 试剂从簇毛麦幼嫩叶片提取 RNA。RT-PCR 扩增体系: RNA 1 μ L, 10 $\times$ One Step RNA PCR Buffer 5 mL, MgCl₂ (25 mmol/L) 10 μ L, dNTP mixture (10 mmol/L) 10 μ L, RNase Inhibitor (40 U/ μ L) 1 μ L, AMV RTase XL (5 U/ μ L) 1 μ L, AMV-Optimized Taq (5 U/ μ L) 1 μ L, 特异引物(20 μ mol/L) 各 1 μ L, RNase Free dH₂O 24 μ L。反应程序为: 50 $^{\circ}$ C 30 min, 94 $^{\circ}$ C 2 min, 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 退火 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环, 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物用 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 用柱离心式琼脂糖 DNA 小量快速纯化试剂盒进行纯化。

1.4 原核表达载体的构建

将上述 PCR 产物经凝胶回收试剂盒回收纯化后连接入克隆载体 pMD18-T, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞。经蓝白斑筛选提取质粒序列测定鉴定后, 获得的重组质粒 pMD18-T-GA20ox 经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切回收目的片段, 定向插入 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切的原核表达载体 pET-32a(+) Vector 中, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 经双酶切和 DNA 测序鉴定筛选后, 得到重组质粒 pET-32-GA20ox。

1.5 原核表达和蛋白纯化

用构建的表达载体 pET-32GA20ox 转化大肠杆菌 BL21, 在同时含 Kan(25 μ g/mL) 和氯霉素(34 μ g/mL) 的平板上挑选单菌落, 接种于同时含 Kan(25 μ g/mL) 和氯霉素(34 μ g/mL) 的 LB 中, 37 $^{\circ}$ C、160 r/min 震荡培养过夜, 次日按体积分数 1% 接种到新鲜培养基中, 37 $^{\circ}$ C、160 r/min 震荡培养至 D_{600} nm 值达 0.6~1.0。

在培养基中加入终浓度为 1 mmol/L 的 IPTG, 37 $^{\circ}$ C 诱导表达 3 h, 取 1 mL 菌液, 4 $^{\circ}$ C、8 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体, 加 200 μ L 的 5 $\times$ SDS 上样缓冲液, 100 $^{\circ}$ C 煮沸 3 min, 离心后取上清进行 12% SDS-PAGE 检测。用考马斯亮蓝染色, 脱色液脱色后观察结果。

1.6 序列分析

序列分析在 NCBI 网站上的 blastn 程序及 DNAMAN 软件进行。

2 结果与分析

2.1 簇毛麦 GA20ox 编码基因全长 cDNA 的分离

利用扩增 GA20ox 编码基因的引物, 采用 RT-PCR 方法(一步法)从簇毛麦幼嫩叶片总 RNA 扩增目的条带, 琼脂糖凝胶电泳检测的结果表明, 得到了长度为 1.1 kb 左右的单一片段(图1)。回收、纯化后的目的片段连接到 T-载体上并转化至大肠杆菌 DH5 α 内。通过 PCR 扩增筛选阳性克隆, 并进行双向序列

测定, 得到长度为 1 080 bp 的序列。将所得序列在 NCBI 非冗余数据库中进行序列相似搜索, 发现该序列与已知大麦、小麦和水稻等 GA20ox 基因序列具有很高的序列一致性, 因此确认所得为 GA20ox 编码基因。

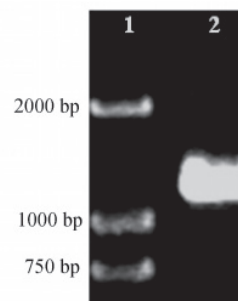


图1 簇毛麦 GA20ox RT-PCR 产物凝胶电泳

Fig. 1 Electrophoresis of RT-PCR product of GA20ox gene

1. DNA 标准 DL 2000; 2. 扩增产物

1. DL 2000 marker; 2. Amplification product

2.2 序列分析

进一步对获得的 cDNA 片段进行生物信息学分析, 发现该 cDNA 片段可推导编码具有 359 个氨基酸的蛋白质, 推测相对分子质量为 40.083×10^3 。多序列比对结果表明, 不同物种的 GA20ox 氨基酸序列有高度的相似性, 并且在已知功能的氨基酸位点都高度一致, 均含有 GA20ox 与底物和酮戊二酸共底物相结合的 LPWKET 和 NYYPXCQKP 保守序列。通过同源性比较可知, 该基因推导编码的蛋白质与大麦^[11]、小麦^[12]、黑麦草^[13]等 GA20ox 氨基酸序列同源性分别为 98%、97% 和 91%。

2.3 重组质粒 pET32-GA20ox 的构建及酶切鉴定

从已转化重组质粒的 DH5 α 菌株中提取质粒, 经 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切后, 琼脂糖凝胶电泳检测插入载体中的 GA20ox 基因片段。随机挑选克隆测序, 结果显示 GA20ox 成功地连入 pMD18-T 载体。大规模提取重组重组质粒, 双酶切后纯化插入片段, 并将其连接到双酶切后的表达载体 pET-32a(+) 中, 连接产物转化大肠杆菌 BL21, 在同时含 Kan (25 μ g/mL) 和氯霉素(34 μ g/mL) 的平板上挑选单菌落, 经小规模液体培养、提取质粒、进行双酶切后的电泳。酶切检测表明有插入片段的阳性克隆, 相对应的电泳中有约 1.1 kb 条带的酶切片段(图2, 泳道2)。取阳性克隆测序, 结果与所选取的原 GA20ox

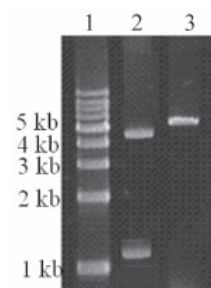


图2 pET32-GA20ox 质粒双酶切鉴定

Fig. 2 Identification of plasmid pET32-GA20ox by enzyme digestion

1. DNA Marker 1 kb ladder; 2. pET32-GA20ox 质粒双酶切; 3. pET32 质粒双酶切

1. DNA marker 1kb ladder; 2. pET32-GA20ox digested by *EcoR* I/*Hind* III; 3. pET32 digested by *EcoR* I/*Hind* III

列完全相符, 没有发生移码的现象, 即得到拥有正确读码框的表达载体。

2.4 GA20ox cDNA的原核表达

pET32-GA20ox表达载体转化大肠杆菌BL21后, 经1 mmol/L的IPTG诱导3 h, 煮沸破碎细菌后, 离心并取上清液浓缩后SDS-PAGE电泳显色。观察发现, 转入重组pET32-GA20ox载体的细菌总蛋白提取物中出现了相对分子质量约为 55×10^3 左右的蛋白质(图3, 箭头所示)。分析表明, 重组pET32-GA20ox载体中产生的是His-GA20ox融合蛋白。其蛋白质分子量大小与预期大小一致, 基本确定载体构建成功, 而且适合于蛋白质的高效表达。

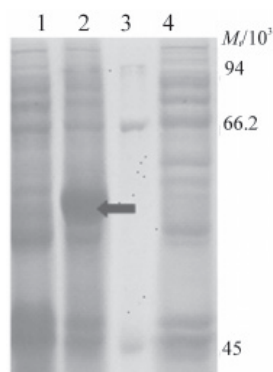


图3 GA20ox在大肠杆菌BL21中表达的SDS-PAGE分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of GA20ox expression in *E. coli* BL21

1. 大肠杆菌BL21; 2. 重组质粒转化大肠杆菌BL21; 3. 蛋白质分子量标准; 4. pET-32a (+)质粒转化大肠杆菌BL21

Lane 1: Protein extracted from *E. coli* BL21; Lane 2: *E. coli* BL21 transformed with pET32-GA20ox; Lane 3: Protein marker; Lane 4: *E. coli* BL21 transformed with pET-32a (+)

3 讨论

GA20氧化酶是最重要的也是目前研究最多的赤霉素生物合成限速酶^[14]。20世纪50年代的“绿色革命”中, 水稻GA20氧化酶功能的丧失产生半矮秆植株, 提高了水稻的抗倒伏能力且显著提高了水稻的产量^[15, 16], 由此引发了人们对植株株高和赤霉素生物合成酶类的广泛关注。由于GA20氧化酶直接催化生成具有生物活性的GAs, 而且GA20氧化酶基因在植物矮化型、徒长型突变体内表达丰度差别很大。GA-20 (GA-20 oxidase)由小的多基因家族编码, 基因家庭成员的表达模式既重叠, 也存在区别^[1, 17]。本研究分离克隆到的簇毛麦GA20ox推导氨基酸序列与已知的单子叶作物如大麦、小麦、黑麦草GA20氧化酶的氨基酸序列一致性分别高达98%、97%和91%, 而与双子叶植物如烟草、拟南芥、豌豆以及莠苣等GA20氧化酶的氨基酸序列一致性只有66%~61%。这可能是由于在高等植物体内至少存在两条平行途径形成有生物活性的赤霉素, 即C13羟基化(GA53)和非C13羟基化(GA12)^[14, 18]。两种底物的亲和力因GA20-氧化酶的来源而异: 拟南芥、豌豆等双子叶植物来源的GA20-氧化酶对GA12的亲和力高于对GA53的亲和力^[8], 而麦类作物体内的GA20-氧化酶对GA53的亲和力高于对GA12的亲和力^[15]。这表明单子叶植物和双子叶植物的赤霉素生物合成途径差异与序列一致性

分析的结果一致。在推测的氨基酸序列中均含有LPWKET和NYYPXCQKP的保守结构, GA20ox是一个水溶性的依赖2-酮戊二酸的双加氧酶^[19], 其保守序列分别与GA底物和酮戊二酸相结合, 这些保守序列对于GA20氧化酶发挥功能是极其重要的。

谈心等利用烟草GA20氧化酶核心序列构建了植物反义表达载体, 并进一步转化得到了矮化的转基因烟草^[19], 本研究选择pET-32a(+) Vector载体及宿主菌大肠杆菌BL21, 成功表达了约 55×10^3 大小的簇毛麦GA20氧化酶融合蛋白, 为GA20氧化酶的真核表达奠定了基础。随着赤霉素生物合成及代谢调控研究的深入, 对GA20-氧化酶的认识也越来越清楚。尤其是各种GA突变体的发现及许多植物中GA20-氧化酶基因的克隆, 为在分子水平上利用反义技术、基因敲除、定向突变等手段研究GA20氧化酶的作用与功能开辟了新的途径。

References

- Phillips AL, Ward DA, Uknes S, Appleford NEJ, Lange T, Huttly AK, Gaskin P, Graebe JE, Hedden P. Isolation and expression of three gibberellin 20-oxidase cDNA clones from *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 1995, **108** (3): 1049~1057
- Richards DE, King KE, Ait-ali T, Harberd NP. How gibberellin regulates plant growth and development: A molecular genetic analysis of gibberellin signaling. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 2001, **52**: 67~88
- Olszewski N, Sun T, Gubler F. Gibberellin signaling: Biosynthesis, catabolism, and response pathways. *Plant Cell*, 2002, **14** (Suppl): 61~80
- Shi YJ (石琰璟), Sha GL (沙广利), Shu HR (束怀瑞). Research advances in gibberellins biosynthesis and its molecular mechanism. *Acta Bot Bor-Occid Sin* (西北植物学报) 2006, **26** (7): 1482~1489
- Zhao XQ, Liang GH, Zhou JS, Yan CJ, Cao XY, Gu MH. Molecular mapping of two semidwarf genes in an indica rice variety Aitaiyin 3 (*Oryza sativa* L.). *Frontiers Biol China*, 2006, **1** (2): 93~98
- Wu K, Li L, Gage DA, Zeevaart JAD. Molecular cloning and photoperiod-regulated expression of gibberellin 20-oxidase from the long-day plant spinach. *Plant Physiol*, 1996, **110** (2): 547~554.
- Van Huizen R, Ozga JA, Reinecke DM. Seed and hormonal regulation of gibberellin 20-oxidase expression in pea pericarp. *Plant Physiol*, 1997, **115** (1): 123~128.
- Lange T, Hedden P, Graebe JE. Expression cloning of a gibberellin 20-oxidase, a multifunctional enzyme involved in gibberellin biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, **91** (18): 8552~8556.
- Liu DJ (刘大钧). 向小麦转移外源抗病性的回顾与展望. *J Nanjing Agric Univ* (南京农业大学学报), 1994, **17** (3): 1~7.
- Frederiksen S. Taxonomic studies in *Dasypyrum* (Poaceae). *Nordic J Bot*, 1991, **11** (22): 135~142
- Spielmeier W, Ellis M, Robertson M, Ali S, Lenton JR, Chandler PM. Isolation of gibberellin metabolic pathway genes from barley and comparative mapping in barley, wheat and rice. *Theor Appl Genet*, 2004, **109** (4): 847~855

- 12 Appleford NEJ, Evans DJ, Lenton JR, Gaskin P, Croker SJ, Devos KM, Phillips AL, Hedden P. Function and transcript analysis of gibberellin-biosynthetic enzymes in wheat. *Planta*, 2006, **223** (3): 568~582
- 13 Macmillan CP, Blundell CA, King RW. Flowering of the grass *Lolium perenne*: Effects of vernalization and long days on gibberellin biosynthesis and signaling. *Plant Physiol*, 2005, **138** (3): 1794~1806
- 14 Li W (李伟), Chen XY (陈晓阳). 高等植物GA 20-氧化酶研究进展. *Chin Bull Life Sci* (生命科学), 2003, **15** (1): 42-47
- 15 Spielmeyer W, Ellis MH, Chandler PM. Semidwarf (sd-1), "green revolution" rice, contains a defective gibberellin 20-oxidase gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (13): 9043~9048
- 16 Spielmeyer W, Ellis MH, Chandler PM. Semidwarf (sd-1), "green revolution" rice, contains a defective gibberellin 20-oxidase gene. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2002, **99** (13): 9043~9048.
- 17 Liu J (刘洁), Li RZ (李润植). Dwarfing gene and GA signal transduction pathway in crops. *Chin Agric Sci Bull* (中国农学通报), 2005, **21** (1): 37~40
- 18 Hedden P, William MP. Genetic analysis of gibberellin biosynthesis. *Plant Physiol*, 1999, **119**: 365~370.
- 19 Tan X (谈心), Ma XR (马欣荣). Advance in research of gibberellin biosynthesis pathway. *Chin J Appl Environ Biol* (应用与环境生物学报), 2008, **14** (4): 571~577

欢迎订阅 2010年《分子植物育种》

《分子植物育种》是一份为转基因育种、分子标记辅助育种及常规育种服务的科学杂志,也是中国唯一的一份以育种为名的科学杂志。于2003年创刊,创刊伊始即被美国化学文摘(CA),中国科学引文数据库、中国科技期刊全文数据库、中国引文数据库,中国科技期刊数据库、中文科技期刊数据库,中国核心期刊(遴选)数据库,中国生物学文摘和中国生物学数据库等多家中外文献数据库收录。2008年中国CNKI影响因子达到1.23的新高度,中国自然科学核心期刊影响因子达到1.229的新起点。同时,《分子植物育种》已建立了全英文的期刊网站,定期发布学术动态、出版信息及期刊近期目录等,实现作者编者读者同步分享。

《分子植物育种》包括专题评述、研究论文、研究报告、专题介绍、学位论文简报、新基因新种质新品种、新思路新技术新方法和信息索引等栏目。主要围绕水稻、小麦、玉米、油菜、大豆、棉麻、薯类、果树、蔬菜、花卉、茶叶、林草等方面。《分子植物育种》已经成为植物育种及相关研究领域研究成果发表和交流的最重要学术平台,代表了目前中国分子植物育种的现实情况,是了解中国分子植物育种的一个重要窗口。

欢迎订阅《分子植物育种》,本刊单月28日出版,国内定价:¥40.00/期,¥240.00/年;国际定价:\$20.00/期,\$120.00/年。国内统一刊号:CN46-1068/S,国际标准刊号:ISSN1672-416X,邮发代号:84-23。订户可到当地邮局订,或直接汇款至编辑部,免收邮费。

地址: 海南省海口市海秀大道128号双岛公寓13B室 邮编: 570206

联系电话: 0898-68966415 传真: 0898-68958180

E-mail: mpb@hibio.org, mpb@molplantbreed.org 网址: www.molplantbreed.org