

怀地黄基因片段及其中转座酶基因的 克隆与序列分析

周延清, 姚换灵, 段红英, 周春娥, 张永华, 陈艳梅, 张 喻

(河南师范大学 生命科学院, 河南 新乡 453007)

摘要: 根据已知裂叶牵牛花 PNZIP 启动子碱基序列的相关信息设计引物, 采用 PCR 方法, 从怀地黄基因组中扩增出 5 个基因片段, 回收和克隆出其中一个 1 096 bp 的基因片段。经过 NCBI 对比分析, 发现它是一个类似转座子的相关蛋白基因序列, 含有一个完整的开放阅读框, 大小为 450 bp, 编码由 150 个氨基酸组成的转座酶。然后, 基于该开放阅读框的碱基序列, 设计另一对引物, 用 PCR 方法, 从中扩增出该完整开放阅读框的序列片段。

关键词: 怀地黄; 转座酶基因; 基因克隆; 开放阅读框; 序列分析

中图分类号: S567.23⁺9 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2012)01-0106-04

Cloning and Sequencing of One DNA Fragment and Its Internal Transposase Gene in *Rehmannia glutinosa*. *f. hueichingensis* (Chan et Seih) Hsiao

ZHOU Yan-qing, YAO Huan-ling, DUAN Hong-ying, ZHOU Chun-e, ZHANG Yong-hua,
CHEN Yan-mei, ZHANG Yu

(College of Life Sciences, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China)

Abstract: A pair of primers were designed according to the base information of the promoter PNZIP in *Pharbitis nil* (L.) Ching using software primer 3.0. Five DNA fragments of the genomic DNA in *Rehmannia glutinosa*. *f. hueichingensis* (Chan et Seih) Hsiao were amplified; one fragment (1 096 bp) was cloned by PCR. The result showed that it was one transposon-like protein gene sequence, including a complete ORF, 450 bp in size and encoding one 150-amino acid transposase (alignment with some gene sequences in NCBI). Furthermore, the another pair of primers were designed according to the base information of the ORF and the ORF was generated completely by PCR. The results will provide significant references for cloning the functional genes from *Rehmannia glutinosa*. *f. hueichingensis* (Chan et Seih) Hsiao and their structural and functional studies in the future.

Key words: *Rehmannia glutinosa*. *f. hueichingensis* (Chan et Seih) Hsiao; transposase gene; gene cloning; ORF; sequencing

地黄(*Rehmannia glutinosa* Libosch)是一种玄参科多年生草本植物, 分布于辽宁、内蒙古、陕西、山西、河北、河南、山东、江苏、安徽、浙江、湖南、湖北、

四川等地。其块根入药, 年需求量约 1.5×10^7 kg, 属于最常用中药材。“怀庆地黄”质量优良^[1]。在药材上地黄分为鲜地黄、生地黄和熟地黄 3 种, 鲜地黄性

收稿日期: 2011-07-11

基金项目: 河南省基础与前沿技术研究计划项目(092300410009); 河南省教育厅自然科学研究计划项目(2011A180022)

作者简介: 周延清(1963-), 男, 河南邓州人, 教授, 博士, 主要从事遗传学教学与作物和微生物遗传研究。

E-mail: yqzhou@htu.cn

寒,味甘苦,能清热生津,凉血止血。生地黄性寒,味甘,能清热凉血,养阴生津。熟地黄性微温,味甘,能滋阴补血,益精填髓。基因克隆的主要目标是识别、分离特异基因并获得基因的完整序列,阐明其生化功能,并明确其对特定性状遗传的控制调节关系^[2]。由于多种植物高密度分子标记、大片段 DNA 克隆系统的建立、连锁图谱的构建、序列测定技术和基因遗传转化技术的发展,许多未知基因的克隆都将成为可能^[3]。关于地黄的基因克隆已有报道,但只有地黄块根发育相关基因,如 *RgPR-10* 基因^[4]、内参基因如肌动蛋白基因片段^[5]、核糖体内转录间隔区序列(ITS)和 *trnL-F* 序列以及 *rps16* 内含子^[6]等几类。因此,地黄的基因克隆及其功能分析研究亟待加强。为此,本研究对怀地黄一个未知功能的基因片段及其中转座酶基因进行了克隆与序列分析。

1 材料和方法

1.1 试验材料

怀地黄 85-5 组培苗, pMD18-T 载体(购于大连宝生物工程有限公司), 大肠杆菌 JM109 菌株, TaKaRa 胶回收试剂盒(TaKaRa Code: D301 或 DV805A), TaKaRa 公司的 PMD18-T 试剂盒。

1.2 PCR 引物设计

根据 Yang 等^[7]报道的裂叶牵牛花 PNZIP 启动子碱基序列,利用 Primer 3.0 软件设计 1 对 PCR 扩增引物(Pair1)。

上游引物: 5'-GCTCCTACAAATGCCATCA-3';

下游引物: 5'-GATAGTGGGATTGTGCGTCA-3'。

根据上述引物对 PCR 扩增基因片段的碱基序列中一个开放阅读框的碱基序列(转座酶基因),利用 Primer 3.0 软件设计 1 对特异引物(Pair2)。

上游引物: 5'-GCCGTCTAGAATGGTGTATCATTATGGATAT-3';

下游引物: 5'-ATCACCCGGGATTCACGCGTTATTTGCCTTAT-3'。

1.3 基因片段的 PCR 克隆

PCR 反应体系体积为 50 μ L,包括 1 \times Reaction Buffer、dNTP 混合物(0.25 mmol/L)、 Mg^{2+} (2.5 mmol/L)、引物(Pair1) (0.32 mmol/L)和 *Taq* DNA 聚合酶(1.5 U)。PCR 反应循环参数: 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 40 s, 58 $^{\circ}$ C 退火 40 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 结

束以后,取 10 μ L PCR 扩增产物与 2 μ L 溴酚蓝混合后,在含有 EB(0.5 g/mL)的 2.0% 琼脂糖凝胶(1 \times TAE)上电泳。采用 OLYMPUS 数码相机在紫外灯拍摄。按照 TaKaRa 胶回收试剂盒中的说明书,进行目的片段的回收。按照载体(pMD18-T)试剂盒中的说明书,进行连接反应,其中连接液为 2.5 μ L,载体为 0.5 μ L,回收 DNA 的量为 7 μ L,共计 10 μ L, 16 $^{\circ}$ C 连接过夜。取 10 μ L 连接产物转化大肠杆菌 JM109 感受态细胞,筛选阳性菌落,进行 PCR 扩增检测。

1.4 克隆基因片段的序列分析

把 PCR 法检测所得的阳性克隆送上海英骏生物技术有限公司测序。

1.5 转座酶基因的克隆和序列分析

使用引物对(Pair2)和 1.3—1.4 相同的技术方法克隆转座酶基因并测序。

2 结果与分析

2.1 目的片段的克隆

利用根据裂叶牵牛花 PNZIP 启动子碱基序列设计的 1 对 PCR 引物,扩增怀地黄基因组 DNA,扩增出 5 条带(图 1),大小约 450~1 000 bp。因为约 1 000 bp 的条带大小与裂叶牵牛花 PNZIP 启动子的大小相近,所以从凝胶回收得到该基因片段(图 2)。

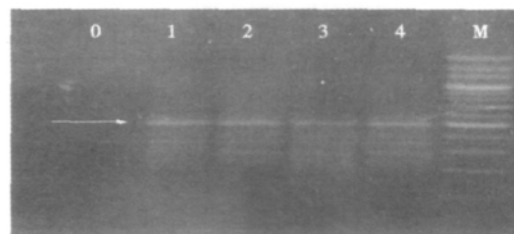


图 1 怀地黄基因组 DNA PCR 产物电泳结果

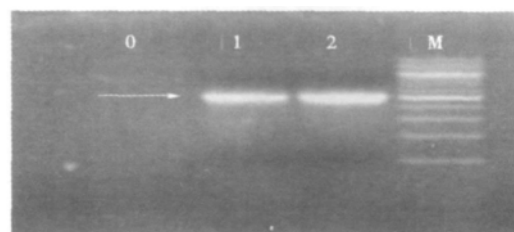


图 2 回收的怀地黄基因组 DNA PCR 产物电泳结果

2.2 目的基因片段测序

上述基因片段克隆后,送上海英骏生物技术有限公司测序得到 1 096 bp 大小的基因序列(图 3)。

5'-TGATTACGATTCGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGATTACATGGGGAT
GAGGCAGGGGGTAAGGCTCCTTAGGGCATGCCTTATTCAGATCTTTGAGGTCTGTG
CACATCCTCTATTATTGTTAGCCTTGGGCACTACAACATACATTGACAACCATTCGTG
TGAAGTGCATCTCGACGACATATCCCGCTTCCAATAGTTTGTTCACCTCGTTTCTAT
AATTTTGTCTTTTACTACCAAACTTCGCTTTTCTGTCTTACTGGCCTCGCTAAT
GGGTCCACATTCAGTCGGTGAACCATCACTTCGGGGACTATGCTTTGGAAATCAGA
AGGTTTCCAAGCAAAGATGTCCACGTTCTCCTTAAGAAATTGAATCATCATCACTTC
TAGCTTCGAGTCCATTTGCGACCCTATCTCAGTGAACCTTATCCGGGTGCGCTGGCTC
GAGCTCAATTACCTTGATTGCTCCGCTCTCAACCCTATACTTCGCTATTGCTCTAGC
TTTTTTAACTTCTCTTTTCTTTTACTCAGCCCAACCTCTTCTCTACGCGTTATTT
GCCTTATGGTTCATTCTCTCCCTCCTTGTTTTTTAGGGAAACGTTATAGCATT
CTCTAGCCGTCTTCTGATCACCTCGCACTTCGCTACCCCTCCTGTTGTAGGGAAC
TCATCTTCAGGTGGTAGGTGGATACACGGCTTGAAACTGATTACAGTCCGAGTCGC
CCCATGATCACATTATAAGCAAATGGGGCGTCTACTACCAGATACTTGATCATGATTG
TCTTTCGGCACGGCGCTTGCCTAGCGAGGTGGGGAGATCAATGGTTCATGGGGA
ACCATTTCGCTTCTCCAAACCCCATCAACGAGTGTCAACTGGACGTAAGGTGGT
GACATCCAATTCCATCTTCTCAACACATGCATAAATAATATGCTGCCGATCTCCCA
TTGTCAACCAACACCTTTGTACCGCGAAGTTGGCGATATCCATAGTGATCACCATC
GGGTGCTTCTGGCTGCCTCATCCCATGTAATCGTCGACCTGCAGAAGTGAAGG
CTGGCACTGCCGTC-3'

图 3 怀地黄目的基因片段测序结果

2.3 序列比对分析

将上述序列在 NCBI 上进行对比分析。经对比分析发现一个开放阅读框,类似转座子的转座酶基因序列,450 bp,编码 150 个氨基酸。该开放阅读框与对应的氨基酸序列如图 4。

```

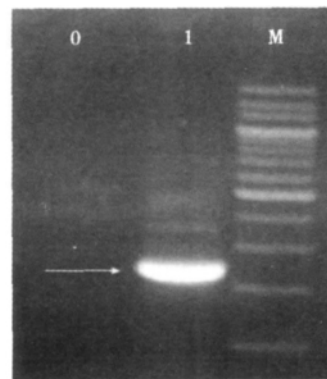
1025 atg gtc atc act atg gat atc gcc aac ttc ggc gta caa aag gtc
      M V I T M D I A N F A V Q K V
980  ttg gtt gac aat ggg aga tgc gca gac ata tta ttt atg cat gtc
      L V D N G R S A D I L F M H V
935  ttg agg aag atg gaa ttg gat gtc acc acc tta cgt cca gtt gac
      L R K M E L D V T T L R P V D
890  act ccg ctg atg ggg ttt gga gga agc gaa gtc gtt ecc cta gga
      T P L M G F G S E V V P L G
845  acc att gat ctc ecc acc tgc cta ggc aaa ggc cgc tgc cga aag
      T I D L P T S L G K A P C R K
800  aca atc atg atc aag tat ctg gta gta gac gcc cca ttt gct tat
      T I M I K Y L V V D A P F A Y
755  aat gtc atc atg ggg cga ctc gga ctg aat cag ttt caa gcc gtc
      N V I M G R L G L N Q F Q A V
710  gta tcc acc tac cac ctg aag atg aag ttc cct aca aca gga ggg
      V S T Y H L K M K F P T T G G
665  gta ggc gaa gtc cga ggt gat cag aag acg gct aga gaa tgc tat
      V G E V R G D Q K T A R E C Y
620  aac gtt tcc cta aaa aaa caa gga ggg gag aga aat gag aac cat
      N V S L K K Q G G E R N E N H
575  aag gca aat aac ggc tga
      K A N N A *
  
```

左侧数字:碱基编号;上方小写字母:碱基缩写符号及三联体密码;下方大写字母:氨基酸缩写符号

图 4 怀地黄基因片段中开放阅读框(转座酶基因)碱基序列及其对应的氨基酸序列

2.4 开放阅读框(转座酶基因)的扩增与序列分析

利用根据 PCR 扩增基因片段的碱基序列中上述开放阅读框的碱基序列合成的 1 对引物(Pair2),以上述目的片段为模板,对这个完整的开放阅读框进行 PCR 扩增,琼脂糖凝胶电泳后得到 1 个大小为 450 bp 的清晰的条带(图 5)。回收开放阅读框片段,送上海英骏生物技术有限公司测序,结果与 2.2 基因片段中开放阅读框的碱基序列和组成完全相同。



M. 200 bp Ladder; 0: 水对照; 1. 回收开放阅读框片段(450 bp); 箭头表示约 450 bp 基因片段

图 5 回收的怀地黄基因组 DNA PCR 扩增开放阅读框(转座酶基因)产物的琼脂糖凝胶电泳

3 讨论

植物的生命活动是基因时空表达所控制的繁多的代谢和生理过程,分离有潜在价值的基因并深入研究它的表达机制,对作物品种的改良具有十分重要的意义。植物基因克隆技术早已引起人们的广泛关注,近年来其方法不断改进,新技术不断涌现。其中一个重要技术是 PCR 技术,即在已知基因序列的基础上进行基因序列克隆的一种方法,具有特异性强、灵敏度高、简便快速和对标本的纯度要求低等特点。迄今,它已经成功用于玉米、水稻、向日葵、巴西豆等多种植物基因的克隆^[8]。PCR 反应的特异性决定因素为①引物与模板 DNA 特异正确的结合;②碱基配对原则;③Taq DNA 聚合酶合成反应的忠实性;④靶基因的特异性与保守性。其中引物与模板的正确结合是关键。聚合酶合成反应的忠实性及 Taq DNA 聚合酶耐高温性,使反应中模板与引物的结合(复性)可以在较高的温度下进行,结合的特异

性大大增加,被扩增的靶基因片段也就能保持很高的精确度。再通过选择特异性和保守性高的靶基因区,其特异性程度就更高。本研究基于裂叶牵牛花 PNZIP 启动子的已知碱基序列设计引物,用 PCR 技术从怀地黄基因组 DNA 中扩增出 5 条 DNA 片段,并且克隆了其中一个大小近似于裂叶牵牛花的 PNZIP 启动子的 1 096 bp 的 DNA 片段,经在 NCBI 中 BLAST 基因序列比对分析,发现其是一个类似于转座子的基因序列,其中含有一个编码转座酶的开放阅读框,长 450 bp,编码 150 个氨基酸。并且用 PCR 方法克隆得到此完整的开放阅读框。但是,其序列与启动子序列关系不大,而是一个含有类似转座子的转座酶基因的基因片段。这些结果可能与设计的 PCR 引物特异性不强有关,也可能与没有将 5 个 DNA 片段都克隆、测序有关。今后,有关克隆到基因片段的功能鉴定、其他 4 个 DNA 片段的克隆与测序及其功能研究有待进一步研究。

地黄作为一种具有重要药用价值、保健功能和经济价值的大宗中草药而受到人们广泛关注和喜爱。因此,克隆并鉴定地黄功能基因,尤其是地黄有效成分合成代谢途径的关键基因和块根膨大发育相关基因,将为地黄有效成分代谢途径工程和块根膨大发育的研究奠定基础,为进一步进行其高产优质转基因育种提供试验素材。

参考文献:

- [1] 温学森,李先恩,赵华英,等. 地黄常见种质的染色体观察[J]. 中草药,2005,36(1):124-125.
- [2] 孙艳琼,段红平. 植物基因克隆方法在作物上的应用[J]. 广西农业科学,2005,36(3):275-279.
- [3] 李敏,李焕秀,李靖,等. 植物基因克隆技术研究进展[J]. 生命科学研究,2004,8(2):116-120.
- [4] 孙鹏,郭玉海,祁建军,等. 地黄 *RgPR-10* 基因的克隆与表达[J]. 西北农业学报,2009,18(1):300-304.
- [5] 孙鹏,郭玉海,祁建军,等. 地黄肌动蛋白基因片段的克隆与序列分析[J]. 安徽农业科学,2008,36(20):8470-8471.
- [6] Dirk C, Li Hong-Qing, Zhao Nan, *et al.* Molecular systematics and phytochemistry of *Rehmannia* (*Scrophulariaceae*) [J]. *Biochemical Systematics and Ecology*, 2007,35(5):293-300.
- [7] Yang Yu-tao, Yang Guo-dong, Liu Shi-juan, *et al.* Isolation and functional analysis of a strong specific promoter in photosynthetic tissues [J]. *Science in China (Series C)*, 2003,46:651-660.
- [8] 吴琦,李成磊,陈惠,等. 苦荞查尔酮合酶基因 CHS 的结构及花期不同组织表达量分析[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2010,26(12):1151-1160.
- [9] Merz U, Martinez V, Schwarzel R. The potential for the rapid screening of potato cultivars (*Solanum tuberosum*) for resistance to powdery scab (*Spongospora subterranea*) using a laboratory bioassay [J]. *European Journal of Plant Pathology*, 2004,110: 71-77.
- [10] Harrison J G, Searle R J, Williams N A. Powdery scab disease of potato—a review [J]. *Plant Pathology*, 1997, 46:1-25.
- [11] Jellis G J, Phul P S, Starling N C. Evaluation of potato germplasm for resistance to powdery scab (*Spongospora subterranea*) [J]. *Tests of Agrochemicals and Cultivars*, 1987,110:154-155.
- [12] Kirkham R P. Screening for resistance to powdery scab of potatoes [J]. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 1986,26:247.
- [13] 杨艳丽,王利亚,罗文富,等. 马铃薯粉痂病综合防治技术初探[J]. 植物保护,2007,33(3):118-121.
- [14] Wallroth F W. Der knollenbrand der kartoffel [J]. *Lirra Naea*, 1842,16:332.
- [15] de Boer R F. Evaluation of potato cultivars in the greenhouse and field for resistance to powdery scab [J]. *Australian Journal of Experimental Agriculture*, 1991,31:699-703.
- [16] Christ B J, Weidner R J. Incidence and severity of powdery scab on potatoes in Pennsylvania [J]. *American Potato Journal*, 1988,65:583-588.
- [17] Genet R A. Resistance to powdery scab [C] // *Proceeding of the seventh national potato research workshop*, Tasmania, Devonport: Workshop Organising Committee, 1993:117-120.
- [18] Wastie R L, Caligari P D S, Wale S J. Assessing the resistance of potatoes to powdery scab (*Spongospora subterranea* (Wallr.) Lagerh) [J]. *Potato Research*, 1988, 31:167-171.

(上接第 105 页)