

一种新的抗真菌几丁质酶基因的分离及其植物表达载体的构建

陈崇顺^{1,2}, 斯琴巴拉^{3,*}

(1. 南京师范大学生命科学学院分子医学生物技术实验室, 江苏南京 210097; 2. 南京农业大学园艺学院, 江苏南京 210095; 3. 南京农业大学理学院, 江苏南京 210095)

摘要: 以西瓜尖镰孢菌诱导、提纯的豇豆抗真菌 I 类几丁质酶 N 端前 10 个氨基酸序列测定的基础上, 设计合成了引物, 运用 PCR 等分子生物学技术, 从豇豆基因组中分离克隆了该特异几丁质酶成熟蛋白基因, 测定分析了其全序列。该新基因全长 894 bp, 无内含子; 具 Aat I、Aat II、Bgl I、Dpn I、Dpn II、EcoR II、Hae I、Hae II、Hae III、Hinf I、Hpa II、Mae II、Mae III、Nba I、Oxa I 和 Sst IV 酶切位点 43 个; 豇豆、*Vigna unguiculata*、菜豆、豌豆、烟草、小麦、水稻的同源性依次递减。扩增克隆了菜豆几丁质酶信号肽基因, 并将其与豇豆几丁质酶成熟蛋白基因连接, 再与 pBI 121 重组, 成功构建了特异几丁质酶基因的植物表达载体, 为进一步培育抗真菌转基因西瓜新品种打下了坚实基础。

关键词: 抗真菌; 几丁质酶; 基因分离; 基因克隆; 基因序列分析; 植物表达载体构建

中图分类号: Q943.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-3142(2002)04-0375-07

Isolation of a novel gene encoding the chitinase with antifungal activity and construction of the plant expression vector

CHEN Chong-shun^{1,2}, Si-qin-ba-la^{3,*}

(1. *Molecular & Medical Biotechnology Laboratory, College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China*; 2. *College of Horticulture, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China*; 3. *College of Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China*)

Abstract: On the basis of the sequence of the first ten N-terminal amino acids from the *Vigna sesquipedalis* antifungal chitinase Class I, induced with *Fusarium oxysporum* f. *niveum*, purified and determined by our laboratory, certain primers for PCR had been designed and synthesized. With PCR and other techniques used in molecular biology, the gene encoding the specific chitinase mature protein was isolated from *V. sesquipedalis* genome, transferred into *Escherichia coli* and cloned. And the complete sequence for the specific gene was analyzed. The full length of the novel gene covers 894 bp, and there are no introns in it. It contains 43 restriction sites for Aat I, Aat II, Bgl I, Dpn I, Dpn II, EcoR II, Hae I, Hae II, Hae III, Hinf I, Hpa II, Mae II, Mae III, Nba I, Oxa I and Sst IV. The sequence homology for the chitinase (Class I) mature protein genes between *V. sesquipedalis* and *V. unguiculata*, *Phaseolus vulgaris*, *Pisum sativum*, *Nicotiana tabacum*, *Triticum aestivum* and *Oryza sativa* is decreased

收稿日期: 2001-08-17

作者简介: 陈崇顺(1958-), 男, 江苏江都市人, 生物学博士, 主要从事生物工程及分子生物学等方面的研究与教学。同为第一作者。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目(39670515)

respectively. Equally, the *Phaseolus vulgaris* chitinase signal peptide gene was amplified and cloned, and combined with the *V. sesquipedalis* chitinase mature protein gene, and further recombined with pBI 121 vector. Finally, the plant expression vector with the specific chitinase gene was successfully constructed, which enables researchers to create novel antifungal germ plasm by transferring the recombined gene encoding the specific chitinase into *Citrullus lanatus*.

Key words: antifungi; chitinase; gene isolation; gene cloning; gene sequence analysis; construction of plant expression vector

几丁质酶(EC 3. 2. 1. 14)是一种以几丁质(聚乙酰氨基葡萄糖)为底物的水解酶。植物几丁质酶具有抑制真菌菌丝生长和孢子萌发、释放信号分子、参与发育调控、参与共生固氮调控、抑制细菌生长和虫类消化及发育等生物功能^(1,2)。然而,就抑菌作用而言,几丁质酶似乎只对一部分真菌(尤其是绿木霉、立枯丝核菌和一些镰刀菌)具有抑菌活性,而对另一些真菌无效或结果不一⁽³⁾。同时,并非所有几丁质酶都有抗真菌活性⁽⁴⁾。因此,为了充分发挥作为目的基因的几丁质酶基因在抗真菌病基因工程中的作用,在分离、克隆、制备该目的基因前,首先必须了解其编码的几丁质酶的抗真菌活性及其它相关特性。本研究室率先开展了豇豆几丁质酶抗西瓜枯萎病基因工程的研究。笔者首先从豇豆幼苗中诱导、纯化出了一种对 *Fusarium oxysporum* 等指示真菌具强抑制作用的新的几丁质酶^(5,6),并研究了该酶的等电点、分子量以及 N 端氨基酸序列等重要的生化特性^(7,8)。本论文所报告的是在前期工作的基础上进行的该抗真菌几丁质酶新基因的分离克隆、序列分析及其植物表达载体的构建。具体在本研究室以西瓜尖镰孢菌诱导表达的豇豆特异几丁质酶 N 端氨基酸序列测定的基础上,设计、合成了有关引物,从豇豆基因组中分离、克隆了该特异几丁质酶成熟蛋白基因,测定、分析了该基因的全序列;同时分离、克隆了菜豆几丁质酶信号肽基因,并将其与上述豇豆特异几丁质酶成熟蛋白基因拼接,进而将此两种基因嵌合体与双元载体重组,构建了该特异几丁质酶基因的植物表达载体,为进一步开展培育抗真菌病的转基因西瓜新品种等基因工程研究打下坚实基础。

1 材料与方 法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 “早熟二号”豇豆 (*Vigna*

sesquipedalis) 种子(江西省赣州地区群力种子公司产品);“长白七号”菜豆 (*Phaseolus vulgaris*) 种子(江苏省扬州市蔬菜种子公司产品)。

1.1.2 引物 扩增豇豆几丁质酶成熟蛋白基因的引物:根据本研究室诱导、纯化、测定的“早熟二号”豇豆特异几丁质酶 N 端前 10 个氨基酸序列⁽⁸⁾和 GenBank 中检索到的豇豆属植物 (*Vigna unguiculata*) 的 3' 端核苷酸序列设计, P1(Vs): 5' gaa ttc gag cag tgt gga agc caa gcg ggg ggt gc 3'; P2(Vs): 5' gga tcc tca gac gat ggg atg gag att 3'。扩增菜豆几丁质酶信号肽基因的引物:根据菜豆几丁质酶基因⁽⁹⁾设计, P1(Pv): 5' tct aga atg aag aag aat agg at 3'; P2(Pv): 5' gaa ttc tcc gta gct tcc tcc aac 3'。以上引物由宝生物工程(大连)有限公司合成。

1.1.3 菌株和质粒 pMD18-T Vector, 购于宝生物工程(大连)有限公司; pcDNA3.1(+), 购于博彩公司; pBI 121 由中科院遗传所植物生物技术开放实验室翟文学副研究员惠赠; JM109 由南京农业大学动物传染病组惠赠; 大肠杆菌 DH5 α 、TG1 由南京农业大学动物传染病组戴亚斌博士惠赠。

1.1.4 主要酶类和生化试剂 Taq DNA 聚合酶, 购于上海生工生物工程有限公司; T4 DNA 连接酶、限制性内切酶、dNTP Mixture、DL2000 DNA Marker 等购于宝生物工程(大连)有限公司; DNA 快速纯化回收试剂盒, 购于博大科技公司。

1.1.5 序列分析软件 Goldenkey、Dnastar 序列分析软件由中国农业大学张曼夫教授惠赠。

1.2 方法

1.2.1 植物材料的培养 参照文献⁽¹⁰⁾。

1.2.2 豇豆、菜豆 DNA 的提取 参考文献⁽¹¹⁾。

1.2.3 豇豆几丁质酶成熟蛋白基因和菜豆几丁质酶信号肽基因的 PCR 扩增 豇豆几丁质酶基因扩增: 根据优化条件, 在 PCR 反应管内依次加入 10 \times PCR 缓冲液 10 μ L, MgCl₂ 1.5 mmol/L, dNTP 各

0.2 mmol/L,引物 P1(Vs)和 P2(Vs)各 0.2 μ mol/L,豇豆 DNA 5.5 μ L,加入灭菌纯水至终体积 100 μ L;反应条件为:在 97 $^{\circ}$ C 预变性 10 min 后,加入 5 U/ μ L Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L,94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,55 $^{\circ}$ C 复性 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,循环 35 次。菜豆几丁质酶基因扩增:参照豇豆几丁质酶基因扩增,但其引物为 P1(Pv)和 P2(Pv);反应条件为:97 $^{\circ}$ C 预变性 10 min 后加入 5 U/ μ L Taq DNA 聚合酶 0.5 μ L,94 $^{\circ}$ C 变性 1 min,55 $^{\circ}$ C 复性 30 s,72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s,循环 40 次。

1.2.4 PCR 产物的克隆 豇豆几丁质酶成熟蛋白基因和菜豆几丁质酶信号肽基因 PCR 扩增产物用 DNA 快速纯化回收试剂盒回收,方法参照纯化回收试剂盒说明书。回收产物分别利用 EcoR I 和 BamH I 及 Xba I 和 EcoR I 酶切位点与 pMD18-T 载体连接重组,方法参照 T 载体使用说明书。大肠杆菌 JM109 感受态细胞的制备、重组体的转化及转化体的检测方法参考文献^[11]。

1.2.5 基因序列测定 在宝生物工程(大连)有限公司进行。具体测序方法参照文献^[12]。

1.2.6 序列分析 用 Goldenkey 软件对所测得的豇豆几丁质酶成熟蛋白基因序列进行酶切位点分析,并将该序列与从 NCBI 的 GenBank 中检索到的 *V. unguiculata*、菜豆、豌豆(*Pisum sativum*)、烟草(*Nicotiana tabacum*)、小麦(*Triticum aestivum*)、水稻(*Oryza sativa*)等植物的 I 类几丁质酶成熟蛋白的基因序列进行比较,并用 Dnastar 等分析其基因序列的同源性。

1.2.7 植物表达载体的构建 分别利用 PCR 扩增产物菜豆几丁质酶信号肽基因的 Xba I 和 EcoR I 及豇豆几丁质酶成熟蛋白基因的 EcoR I 和 BamH I 酶切位点,将两基因片段连接重组进 pBI 121' 质粒的 Xba I 和 BamH I 位点,进而构建成植物表达载体。具体构建方法参照文献^[12]。

2 结果与分析

2.1 豇豆几丁质酶成熟蛋白基因序列和菜豆几丁质酶信号肽基因序列的 PCR 扩增

在优化反应条件的基础上,以 P1(Vs)和 P2(Vs)及 P1(Pv)和 P2(Pv)为引物,分别进行了豇豆几丁质酶成熟蛋白基因和菜豆几丁质酶信号肽基

因的 PCR 扩增,分别获得了 900 bp 左右的成熟蛋白基因的特异条带(图 1)和 90 bp 左右的信号肽基因的特异条带(图 2)。

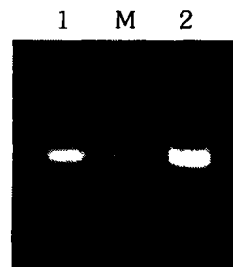


图 1 豇豆几丁质酶成熟蛋白基因的 PCR 产物
Fig. 1 PCR products of the chitinase mature protein gene from *V. sesquipedalis*

1,2:分别为来自豇豆种子 DNA 和来自豇豆营养器官 DNA 的 PCR 产物;M:DNA 分子量标准 DL2000. 从上至下(bp): 2000, 1000, 750, 500, 250, 100. 1,2: PCR products from the seed DNA, and from the vegetative organ DNA, respectively; M: DNA marker DL2000, from up to down(bp): 2000, 1 000, 750, 500, 250, 100.

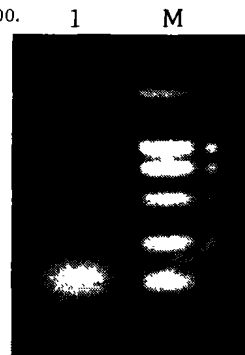


图 2 菜豆几丁质酶信号肽基因的 PCR 产物
Fig. 2 PCR product of the chitinase signal peptide gene from *P. vulgaris*

1:信号肽基因的 PCR 产物;M:DNA 分子量标准 DL2000. 从上至下(bp): 2000, 1000, 750, 500, 250, 100. 1: PCR product of the signal peptide gene; M: DNA marker DL2000, from up to down(bp): 2000, 1000, 750, 500, 250, 100.

2.2 豇豆几丁质酶成熟蛋白基因和菜豆几丁质酶信号肽基因的克隆及其鉴定

挑选阳性克隆进行限制酶切分析鉴定。豇豆几丁质酶成熟蛋白基因重组转化阳性克隆(pMD18-T-成熟蛋白基因)用 EcoR I 和 BamH I 双酶切,结果得到分子量为 900 bp 和 2 500 bp 左右的两条电泳条带(图 3);菜豆几丁质酶信号肽基因重组转化阳性克隆(pMD18-T-信号肽基因)用 Xba I 和 EcoR I 双酶切,结果得到分子量为 90 bp 和 2 500 bp 左右的两条电泳条带(图 4)。

2.3 克隆基因的序列测定

该从豇豆基因组 PCR 扩增分离到的特异抗真

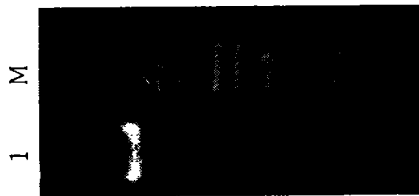


图3 EcoR I 和 BamH I 双酶切 pMD18-T-豇豆几丁质酶成熟蛋白基因

Fig. 3 pMD 18-T-mature protein gene for the chitinase from *V. sesquipedalis* digested by EcoR I and BamH I

1: 酶切结果。从上至下: 第一条带为 T 载体; 第二条带为成熟蛋白基因 M; DNA 分子量标准 DL2000。从上至下 (bp): 2000、1000、750、500、250、100。1: digestion result. from up to down; the first band is T-vector; the second band is mature protein gene; M: DNA marker DL2000. from up to down (bp): 2000、1000、750、500、250、100.

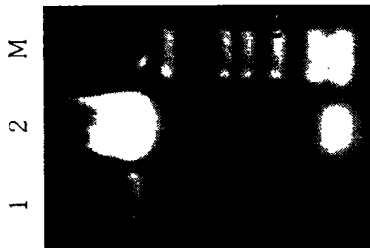


图4 Xba I 和 EcoR I 双酶切 pMD 18-T-菜豆几丁质酶信号肽基因

Fig. 4 pMD 18-T-signal peptide gene for the chitinase from *P. vulgaris* digested by Xba I and EcoR I

1: 对照 (Xba I 和 EcoR I 酶切的 T 载体); 2: 酶切结果。从上至下: 第一条带为 T 载体; 第二条带为信号肽基因; M: DNA 分子量标准 DL2000。从上至下 (bp): 2000、1000、750、500、250、100。1: Control (T-vector digested by Xba I and EcoR I); 2: digestion result. from up to down; the first band is T-vector; the second band is signal peptide gene; M: DNA marker DL2000. from up to down (bp): 2000、1000、750、500、250、100.

菌 I 类几丁质酶成熟蛋白新基因的序列测定结果 (已在 GenBank 登录, Accession: AF307511) (图 5) 表明, 该基因长 894 bp。经与其它相关基因序列比较分析及根据笔者对该基因所编码的几丁质酶蛋白分子量的测定结果 (33 kD)^[7] 可推测, 该基因没有内含子。

从菜豆基因组 PCR 扩增分离到的抗真菌 I 类几丁质酶信号肽基因的序列测定结果与文献 [9] 所报告的相同, 具体为: 5' ATG AAG AAG AAT AGG ATG ATG ATT ATG ATA TGC AGT GTA GGA GTG GTG TGG ATG CTG TTA GTT GGA

GGA AGC TAC GGA 3'。

2.4 克隆基因的序列分析

2.4.1 酶切位点分析 用 Goldenkey 软件对上述豇豆几丁质酶成熟蛋白基因序列酶切位点分析结果表明, 该基因序列上具 43 个限制性内切酶酶切位点 (数字为开始碱基位置): Aat I: 735; Aat II: 643; Bgl I: 247; Dpn I: 139, 306, 483, 543, 556, 805; Dpn II: 139, 306, 483, 543, 556, 805; EcoR II: 37, 158, 251, 494, 700, 738; Hae I: 456, 735; Hae II: 145, 415; Hae III: 162, 312, 353, 457, 736; Hinf I: 663; Hpa II: 127, 278, 344, 364, 689; Mae II: 328, 644; Mae III: 386, 715; Nba I: 126; Oxa I: 265; Sst IV: 542。

2.4.2 与几种主要植物 I 类几丁质酶成熟蛋白基因序列的同源性分析 用 Dnastar 软件对上述测得的豇豆 I 类几丁质酶成熟蛋白基因序列与从 NCBI 的 GenBank 中检索到的 *Vigna unguiculata*、菜豆、豌豆、烟草、小麦、水稻等植物的 I 类几丁质酶成熟蛋白的基因序列进行同源性比较分析的结果 (表 1) 表明, 豇豆与 *Vigna unguiculata* 两者之间的同一性最高 (98.3%), 而烟草与水稻两者之间的同一性最低 (44.3%), 其它彼此之间的同一性则介于上述二者之间。该分析结果在一定程度上反映了上述各植物种间的系统进化亲缘关系; 上述六种植物按与豇豆亲缘关系由近及远的排列顺序依次为: *Vigna unguiculata*、菜豆、豌豆、烟草、小麦、水稻。

2.5 植物表达载体的构建及其鉴定

分别利用 PCR 扩增产物菜豆几丁质酶信号肽基因的 Xba I 和 EcoR I 及豇豆几丁质酶成熟蛋白基因的 EcoR I 和 BamH I 酶切位点, 将两基因片段连接重组进 pBI 121 质粒的 Xba I 和 BamH I 位点, 进而构建成植物表达载体。用 Xba I 和 BamH I 双酶切该重组表达载体, 得到 1 kb 左右片段; 而同样用 Xba I 和 BamH I 双酶切对照 pBI 121 载体, 则没有该片段 (图 6)。该酶切结果表明了菜豆几丁质酶信号肽基因与豇豆几丁质酶成熟蛋白基因组成的几丁质酶嵌合基因植物表达载体的构建成功。该植物表达载体部分序列测定结果进一步证明了这一点。

3 讨论

3.1 植物材料总 DNA 的提取

笔者预备性试验结果表明, 以豇豆 (菜豆) 营养

器官(例如:根、茎、叶)和种子分别为试材提取的总 DNA 作为模板进行 PCR 扩增的效果基本相同。由于一般豆科种子蛋白含量较高,在以其为试材提取总 DNA 时,用酚:氯仿:异戊醇(25:24:1)抽提 5~6 次后仍含有蛋白;而以营养器官为试材,用相同试剂抽提 1 次即可将蛋白完全抽提干净,因此如果时间允许的话,那么最好待豆种发芽后以营养器

官为试材提取总 DNA。这样,既简化提取过程又节省试剂。

3.2 完整目的基因的重组及其植物表达载体的构建

本研究用于构建植物表达载体的完整目的基因为菜豆几丁质酶信号肽基因和豇豆几丁质酶成熟蛋白基因连接成的嵌合基因。用嵌合基因作为目的基因的考虑主要基于以下几点:(1)在遗传信息

```

1  GAGCAGTGTG GAAGCCAAGC GGGGGGTGCG CTGTGTCCAG GGGGTCTCTG TTGCAGTCAG TTCGGGTGGT 70
71  GCGGCTCCAC CGACGACTAC TGC GGCAAGG GTTGCCAGAG CCAGTGCGGG GGACAGCCGG CTCCGTCTGA 140
141 TCTCAGCGCT CTGATACCCA GGGCCACCTT CGACCAGATG CTCAAACATC GCAACGACGG AGCCTGCCCA 210
211 GCCAGAGGCT TCTACACCTA CGATGCCTT ATCGCCGCCG CCAGGGCTTT CCCAGCTTC GGCAACACCG 280
281 GAGACACAGC CACTCGAAAG AGAGAGATCG CGGCCTTCTT GGGGCAAACG TCTCACGAAA CAACCGGGGG 350
351 ATGGCCCTCT GCACCGGACG GACCATACGC ATGGGGTTAC TGCTTCGTGA GAGAGCAGAA CCCAAGCGCC 420
421 TACTGCTCCC CAACCCCCCA GTTCCCCTGC GCTTCTGGCC AGCAATACTA TGGCAGGGGT CCGATCCAGA 490
491 TATCCTGGAA CTACAACCTAC GGTCAGTGCG GAAATGCAAT TGGAGTGGAT TTGATCAACA ACCCTGATCT 560
561 CGTCGCCACC GACCCCGTCG TCTCCTTCAA GTCCGCCATC TGGTTCTGGA TGACCCCGCA GTCCCCAAG 630
631 CCTTCTCCC ACGACGTCAT CACCTCTCAG TGGACTCCCT CCGCCGCCGA TGTCGCCGCC GGGAGGCTTC 700
701 CAGGCTACGG CACTGTGACG AACATCATCA ACGGAGGCCT GGAGTGC GGC AGAGGACAGG ATAGCAGGGT 770
771 GGAGGACCGC ATCGGGTTCT TCAAGCGATA CTGTGATCTG TTTGGAGTTG GTTATGGCAA CAACCTTGAC 840
841 TGCTACTCTC AGGCCCCATT TGGAAATTCC CTGCTTAATC TCCATCCCAT CGTC — 910
    
```

图 5 豇豆 I 类几丁质酶成熟蛋白新基因的全序列

Fig. 5 Complete sequence of a novel gene encoding the chitinase (Class I) mature protein from *V. sesquipedalis*

表 1 七种植物 I 类几丁质酶成熟蛋白基因的序列同源性分析

Table 1 Sequence identity analysis for the chitinase (Class I) mature protein genes from seven species of plants (%)

| 种类 Species | <i>V. sesquipedalis</i> | <i>V. unguiculata</i> | <i>P. vulgaris</i> | <i>P. sativum</i> | <i>N. tabacum</i> | <i>T. aestivum</i> | <i>O. sativa</i> |
|----------------------------|-------------------------|-----------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|------------------|
| <i>Oryza sativa</i> | 51.3 | 51.9 | 50.0 | 45.5 | 44.3 | 65.9 | — |
| <i>Triticum aestivum</i> | 58.7 | 58.9 | 59.5 | 58.6 | 57.5 | — | — |
| <i>Nicotiana tabacum</i> | 60.5 | 59.7 | 60.7 | 59.5 | — | — | — |
| <i>Pisum sativum</i> | 69.8 | 68.9 | 67.7 | — | — | — | — |
| <i>Phaseolus vulgaris</i> | 86.1 | 84.9 | — | — | — | — | — |
| <i>Vigna unguiculata</i> | 98.3 | — | — | — | — | — | — |
| <i>Vigna sesquipedalis</i> | — | — | — | — | — | — | — |

传递过程中,所形成的初级转译产物多以前体蛋白质的形式存在,一般不具有正常的生物学功能。该初级转译产物通常还需经过加工修饰以及正确折叠才能成为具有正常功能活性的成熟蛋白质。在此过程中,前体蛋白质 N 端的信号肽是相当重要的,因其与蛋白质的转运、定位和分泌有关^[11]。而直接根据提纯的豇豆几丁质酶 N 端前 10 个氨基酸序列和 *Vigna unguiculata* 的 I 类几丁质酶 C 端氨基酸序列设计引物,PCR 扩增分离到的基因仅为几丁质酶成熟蛋白基因,缺少信号肽序列。(2)本研究所分离的豇豆几丁质酶基因是未知新基因,只有本研究室诱导、纯化、测定的其特异成熟蛋白 N 端前 10 个氨基酸序列是已知的。理论上,可以根据这段已知序列设计引物用 cDNA 末端快速扩增技术(RACE)等

方法扩增出目的基因的上游片段。然而,要成功地应用该技术是很困难的,因为该技术涉及三个连续的酶促反应步骤(逆转录、末端脱氧核苷酸转移酶同聚尾及 PCR),每一步骤都有可能失败;再者即使三个酶促反应都能顺利进行,也常常会产生大量的非特异性或截短的产物^[12]。(3)信号肽引导外源成熟蛋白质的转运、定位和分泌在原核表达系统中已被普遍采用,例如:来自大肠杆菌分泌蛋白(外膜蛋白)基因序列作为信号肽编码序列构建了分泌型表达载体^[13]。研究人员将人、鼠、酵母等真核来源信号肽与原核信号肽在引导异源蛋白质在大肠杆菌原核系统中转运、定位和分泌等方面的能力作了比较。研究表明,编码区密码子经优化后的真核信号肽也能非常有效地发挥其正常的生物学功

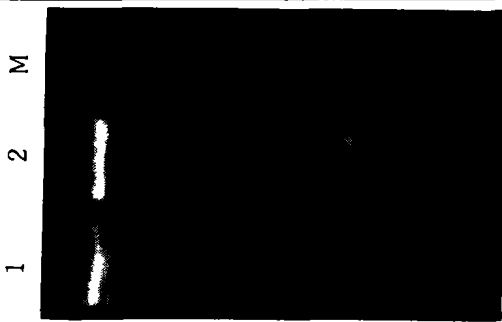


图6 Xba I 和 BamH I 双酶切的几丁质酶植物表达载体(pBI 121-信号肽基因-成熟蛋白基因)

Fig. 6 Plant expression vector(pBI 121-signal peptide gene-mature protein gene for the chitinase) digested by XbaI and BamHI

1:对照(Xba I 和 BamH I 酶切的 pBI 121); 2: Xba I 和 BamH I 双酶切的几丁质酶植物表达载体, 从上至下: 第一条带为 pBI121; 第二条带为几丁质酶信号肽基因和成熟蛋白基因的重重组体; M: DNA 分子量标准 DL2000. 从上至下(bp): 2000, 1000, 750, 500, 250, 100. 1: control(pBI121 digested by XbaI and BamHI); 2: plant expression vector digested by XbaI and BamHI. from up to down; the first band is pBI121; the second band is the recombinant of the signal peptide gene and the mature protein gene for the chitinase; M: DNA marker DL2000. from up to down(bp): 2000, 1000, 750, 500, 250, 100.

能^[14]。甚至随机多肽序列也具信号肽引导蛋白质转运、定位和分泌的功能^[15,16]。此外,尚有其它许多异源信号肽引导蛋白质有效转运、定位、分泌等的研究报告,其中大部分是有关大肠杆菌等原核表达系统的,也有一些是有关植物等真核表达系统的^[17~34]。(4)将菜豆几丁质酶信号肽基因和豇豆几丁质酶成熟蛋白基因重组成的嵌合基因作为目的基因构建植物表达载体进而转化植物在转基因植物中表达,不仅避免了应用 cDNA 末端快速扩增技术等方法的困难,而且可研究蛋白质在信号肽引导下的转运、定位等问题。因此,本研究所构建的植物表达载体不仅可以具体应用于转化西瓜等的优良品种,创建和培育抗枯萎病等真菌病害的优良种质、品种,而且还可以应用于深入研究异源信号肽引导蛋白质在高等植物这个真核表达系统中的转运、定位等理论问题^[35~37]。

之所以选择菜豆几丁质酶信号肽基因构建嵌合基因,是因为主要从以下几个方面来考虑的:(1)选用的菜豆几丁质酶与豇豆几丁质酶一样属于 I 类几丁质酶,其成熟蛋白基因与豇豆成熟蛋白基因的序列同一性高达 86.1%,仅低于几种主要植物中 *Vigna unguiculata* 的 I 类几丁质酶成熟蛋白基因(但 *Vigna unguiculata* 的信号肽序列未知,而菜豆的则

已知)。(2)菜豆几丁质酶信号肽序列完全具备一般信号肽的所有主要特征:在氨基末端有一段带正电荷的氨基酸序列;在中间有一个疏水的核心区,常含亮氨酸或异亮氨酸残基;在羧基端有一个能被信号肽酶水解的切割位点,这个位点常在丙氨酸之后,或者在甘氨酸或丝氨酸之后^[13,38]。(3)菜豆几丁质酶基因在转基因植物中定位正确、表达高效^[39]。

参考文献:

- [1] Graham L S, Sticklen M B. Plant chitinases[J]. *Can J Bot*, 1994, 72: 1 057-1 083.
- [2] 朱雪峰, 陈崇顺, 郁志芳. 植物几丁质酶的生物功能[J]. 生命的化学, 2000, 20(1): 36-37.
- [3] 高必达. 转几丁质酶基因防植物病害研究: 进展、问题与展望[J]. 生物工程进展, 1999, 19(2): 21-28.
- [4] Kim Y J, Hwang B K. Purification, N-terminal amino acid sequencing and antifungal activity of chitinases from pepper stems treated with mercuric chloride[J]. *Physiological and Molecular Plant Pathology*, 1996, 48: 417-432.
- [5] 陈崇顺, 朱雪峰, 郁志芳. 豇豆几丁质酶的诱导与纯化[J]. 园艺学报, 2000, 27(5): 351-355.
- [6] 陈崇顺, 朱雪峰, 郁志芳. 豇豆几丁质酶纯酶液对不同真菌的作用[J]. 植物保护学报, 2000, 27(4): 375-376.
- [7] 朱雪峰, 陈崇顺, 郁志芳. 豇豆几丁质酶部分酶学特性的研究[J]. 生物技术, 1999, 9(6): 15-19.
- [8] 陈崇顺, 朱雪峰, 郁志芳. 豇豆几丁质酶 N 端序列测定及与其它植物的比较[J]. 广西植物, 2001, 21(2): 177-182.
- [9] Broglie K E, Biddle P, Cressman R, et al. Functional analysis of DNA sequences responsible for ethylene regulation of a bean chitinase gene in transgenic tobacco[J]. *The Plant Cell*, 1989, 1: 599-607.
- [10] 陈崇顺, 朱雪峰, 郁志芳. 不同豇豆品种几丁质酶粗提液对尖镰孢菌生长的影响[J]. 南京农业大学学报, 1999, 22(4): 23-26.
- [11] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998. 646.
- [12] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. (金冬雁, 黎孟枫, 等). 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社, 1996. 1 062.
- [13] 卢圣栋. 现代分子生物学实验技术(第二版)[M]. 北京: 中国协和医科大学出版社, 1999. 813.

- [14] Humphreys D P, Sehdev M, Chapman A P, *et al.* High-level periplasmic expression in *Escherichia coli* using a eukaryotic signal peptide: Importance of codon usage at the 5' end of the coding sequence[J]. *Protein Expression & Purification*, 2000, **20**(2): 252—264.
- [15] Kaiser C A, Preuss D, Grisafi P, *et al.* Many random sequences functionally replace the secretion signal sequence of yeast invertase[J]. *Science*, 1987, **235**: 312—317.
- [16] Williams E J B, Pal C, Hurst L D. The molecular evolution of signal peptides[J]. *Gene*, 2000, **253**(2): 313—322.
- [17] Lund P, Dunsmuir P. A plant signal sequence enhances the secretion of bacterial ChiA in transgenic tobacco[J]. *Plant Molecular Biology*, 1992, **18**: 47—53.
- [18] Lee J-W, Kang D-O, Kim B-Y, *et al.* Mutagenesis of the glucoamylase signal peptide of *Saccharomyces diastaticus* and functional analysis in *Saccharomyces cerevisiae*[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, **193**(1): 7—11.
- [19] 杨运桂, 徐京宁, 胡泰山, 等. 信号肽疏水性的提高促进青霉素 G 酰化酶分泌[J]. *生物化学与生物物理学报*, 2000, **32**(2): 163—168.
- [20] 季朝能, 白晓阳, 盛小禹, 等. 信号肽去除的耐热碱性磷酸酯酶 FD-TAP 在大肠杆菌中的亚克隆和高表达[J]. *生物工程学报*, 2000, **16**(6): 690—694.
- [21] 张 华, 李 元. 链霉菌—大肠杆菌穿梭质粒载体 pSGL.gpp 的构建及应用[J]. *微生物学报*, 2000, **40**(6): 605—609.
- [22] 黄家强, 卜 夏, 史 须, 等. 单纯分泌型 TNF α 真核表达质粒的构建及表达细胞株的建立[J]. *细胞与分子免疫学杂志*, 2000, **16**(1): 6—9.
- [23] Koyanagi T, Matsumura K, Kuroda S, *et al.* Molecular cloning and heterologous expression of pea seedling copper amine oxidase[J]. *Bioscience Biotechnology & Biochemistry*, 2000, **64**(4): 717—722.
- [24] Goda S, Takano K, Yamagata Y, *et al.* Effect of extra N-terminal residues on the stability and folding of human lysozyme expressed in *Pichia pastoris*[J]. *Protein Engineering*, 2000, **13**(4): 299—307.
- [25] Brinch-Pedersen H, Olesen A, Rasmussen S K, *et al.* Generation of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) for constitutive accumulation of an *Aspergillus phytase*[J]. *Molecular Breeding*, 2000, **6**(2): 195—206.
- [26] Dai Z, Hooker B S, Anderson D B, *et al.* Improved plant-based production of E1 endoglucanase using potato: Expression optimization and tissue targeting[J]. *Molecular Breeding*, 2000, **6**(3): 277—285.
- [27] Arie M, Hikichi K, Takahashi K, *et al.* Characterization of a basic chitinase which is secreted by cultured pumpkin cells[J]. *Physiologia Plantarum*, 2000, **110**(2): 232—239.
- [28] Mhiri S, Mezghani M, Mellouli L, *et al.* Efficient synthetic signal peptides for *Streptomyces*[J]. *Biotechnology Letters*, 2000, **22**(16): 1 305—1 310.
- [29] Dahl S W, Slaughter C, Lauritzen C, *et al.* Carica papaya glutamine cyclotransferase belongs to a novel plant enzyme subfamily: Cloning and characterization of the recombinant enzyme[J]. *Protein Expression & Purification*, 2000, **20**(1): 27—36.
- [30] Martinez-Ruiz A, Garcia-Ortega L, Kao R, *et al.* Ribonuclease U2: Cloning, production in *Pichia pastoris* and affinity chromatography purification of the active recombinant protein[J]. *FEMS Microbiology Letters*, 2000, **189**(2): 165—169.
- [31] Moreno J I, Miernyk J A, Randall D D. Staphylococcal protein A as a fusion partner directs secretion of the E1 α and E1 β subunits of pea mitochondrial pyruvate dehydrogenase by *Bacillus subtilis*[J]. *Protein Expression & Purification*, 2000, **18**(2): 242—248.
- [32] Leite A, Kemper E L, da Silva M J, *et al.* Expression of correctly processed human growth hormone in seeds of transgenic tobacco plants[J]. *Molecular Breeding*, 2000, **6**(1): 47—53.
- [33] Horvath H, Huang J, Wong O, *et al.* The production of recombinant proteins in transgenic barley grains[J]. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 2000, **97**(4): 1 914—1 919.
- [34] Maras M, Callewaert N, Piens K, *et al.* Molecular cloning and enzymatic characterization of a *Trichoderma reesei* 1,2- α -D-mannosidase[J]. *Journal of Biotechnology*, 2000, **77**(2~3): 255—263.

(下转第 367 页 Continue on page 367)