

菘蓝 APX 基因克隆及序列分析

孙晓东*, 李爱玲, 韩立敏

(陕西教育学院 生物科学与技术系, 西安 710061)

摘要: 为进一步研究菘蓝 APX 基因的功能, 构建了菘蓝 APX 基因真核表达载体。从菘蓝植株中提取总 RNA, 逆转录为 cDNA, 根据 APX 基因在该类植物中的同源性设计简并引物, 利用 PCR 方法钓取目的基因, 将目的基因与 T 载体连接, PCR 检测阳性克隆, 同时菌液送往测序公司进行测序。结果表明: 测序片段的生物信息学分析证实了该序列与 GenBank 登录的 APX 基因一致。说明成功构建了菘蓝 APX 重组质粒和克隆鉴定了菘蓝 APX 基因, 可进一步用于基因表达和表达产物的功能研究。

关键词: 菘蓝; APX 基因; 真核表达载体; 基因克隆

中图分类号: Q943.J522.3 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2012)03-0367-04

Cloning and identification of APX gene from *Isatis indigotica*

SUN Xiao-Dong*, LI Ai-Ling, HAN Li-Min

(Department of Biological Science and Technology, Shaanxi Institute of Education, Xi'an 710061, China)

Abstract: To construct the recombinant eukaryotic expression plasmid of pTZ57R/T/APX, APX gene was amplified from the genomic DNA of *Isatis indigotica* by polymerase chain reaction(PCR). APX gene was then inserted into pTZ57R/T eukaryote expression vector. The positive colonies were screened and identified by PCR and sequencing. The specific gene APX which was about 1 257 bp, was successfully amplified and pTZ57R/T-APX were constructed. The DNA sequence of APX gene was as the same as the APX gene nucleotide sequences published in Genbank. pTZ57R/T-APX recombinant was successfully constructed. And the construction provides the basis for the further study.

Key words: *Isatis indigotica*; APX gene; eukaryote expression vector; gene cloning

菘蓝(*Isatis indigotica*)主产于河北、江苏、浙江、河南、湖北等地,为十字花科(Cruciferae)菘蓝属(*Isatis*)两年生草本植物,是目前常用的大众药材,干燥根入药称板蓝根(Radix Isatidis),干燥叶入药称大青叶(*Folium isatidis*),板蓝根和大青叶都具有清热解毒、凉血、消斑的功效(李玲等,1996)。菘蓝的有效成分能较好地抑制甲型流感病毒的增殖,是一种有效的抗流感病毒的中药成分(Zheng等,2006)。

需氧生物细胞在其代谢过程中总会产生一些有毒害作用的活性氧物质。活性氧可引起蛋白质、膜脂和其它细胞组分的损伤,进而导致细胞及组织死亡。因此,植物本身会逐步地产生一些保护机制来清除过多的活性氧,包括超氧化物歧化酶、抗坏血酸过氧化物酶、过氧化氢酶、抗坏血酸等活性和含量的调节。抗坏血酸过氧化物酶(ascorbate peroxidase, APX)是植物活性氧代谢中重要的抗氧化酶之一,又是维生素 C 代谢的主要酶类。若使其活性极显

* 收稿日期: 2012-01-24 修回日期: 2012-04-18

基金项目: 陕西省教育厅科研计划项目(09JK341); 陕西教育学院科研基金(11KJ006)[Supported by the Scientific Research Project of Shaanxi Provincial Department of Education(09JK341); Scientific Research Fund Project of Shaanxi Institute of Education(11KJ006)]

作者简介: 孙晓东(1962-),女,陕西西安人,副教授,主要从事植物生理学教学及相关研究工作,(E-mail)sxd62@163.com。

* 通讯作者(Author for correspondence)

著升高,则可使超氧阴离子自由基(O_2^-)产生速率极显著下降,脂质过氧化作用减弱,从而提高植物体内抗氧化酶活性及增强抗氧化代谢的水平(Asada, 1992)。APX 主要存在于高等植物中,已发现 APX 存在于菠菜、豌豆、浮萍、美国梧桐、棉花、黄瓜、蓖麻子、向日葵、茶叶、小麦、大麦、玉米、烟草、西葫芦等植物的叶片中,同时在豆科植物的根瘤、蓖麻等油料植物种子、马铃薯块茎以及藻类(真核藻类及某些蓝藻)中均检测出 APX 活性(Ishikawa 等,2008),但在菘蓝中尚无该基因的报道。同时,APX 在植物中的克隆和鉴定也缺乏相关的研究。因此,本研究通过基因工程的方法利用 pTZ57R/T 载体构建了菘蓝 APX 基因的重组质粒,克隆和鉴定菘蓝的 APX 基因,为研究菘蓝 APX 基因功能奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 材料与主要试剂

供试菘蓝购自西安市长安区;菘蓝基因组 DNA;pTZ57R/T 质粒;感受态细菌 *E. coli*, DH5 α 均为本实验室保存。

T4 DNA 连接酶(TaKaRa);DNA Marker; D2000(TIANGEN 有限公司);琼脂糖(GENE TECH);Taq DNA 聚合酶(TaKaRa);卡那霉素(使用浓度 100 U/mL);DNA 凝胶回收试剂盒(Gel Extraction Kit,Fermentas 公司产品)。

1.2 试验方法

1.2.1 APX 目的基因的扩增 选取新鲜、茁壮的菘蓝叶片,采用 TRIZOL 方法(GIBCO BRL, Gaithersburg, MD, USA)提取总 RNA,逆转录合成 cDNA。根据 GenBank 提供的 APX 基因序列,应用 Primer Premier 5 软件设计一对简并引物,P1 序列为 5'-ATGGGKNAARWNYTAYCCNACYGT-3'; P2 序列为 5'-TTAAGCNTCAGCAAANCCNAR-TTCAGT-3',引物由北京三博远志生物技术有限公司合成。

利用 P1 和 P2 引物进行 PCR 扩增,扩增体系为 50 μ L,包括 2 \times Dream Taq Green PCR Master Mix 25 μ L;上游引物、下游引物各 1 μ L;DNA 1 μ L;ddH₂O 1 μ L。采用退火梯度,优化 PCR 反应条件,应程序为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min;95 $^{\circ}$ C 变性 1 min;55-56-57-58-59-60-61-62 $^{\circ}$ C 退火 1 min;72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min;进行 35 个循环后,72 $^{\circ}$ C 继续延伸 10

min,4 $^{\circ}$ C 保存扩增产物。扩增产物经 1% 琼脂糖(含溴化乙锭 0.5 g/mL)电泳鉴定。

1.2.2 pTZ57R/T-APX1 的构建与鉴定

1.2.2.1 回收酶切产物 PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳,收集含 DNA 片段的凝胶切片至 1.5 mL 离心管,称重,加入等体积溶液 BD;65 $^{\circ}$ C 水浴 10 min;凝胶溶液置于 DNA 纯化柱,静置 2 min,12 000 r \cdot min⁻¹离心 60 s,弃去滤液;加入溶液 PE,12 000 r \cdot min⁻¹离心 60 s,弃去滤液;DNA 纯化柱置于新离心管;加入 60 $^{\circ}$ C 预热的溶液 E 100 μ L,静置 2 min,12 000 r \cdot min⁻¹离心 60 s,管底即为回收的 DNA,-20 $^{\circ}$ C 保存。回收的 DNA 经 1% 琼脂糖电泳鉴定。

1.2.2.2 感受态细胞的制备 从 37 $^{\circ}$ C 培养 16 h 的平板中挑取单菌落,转到一个含有 100 mL LB 培养基的摇瓶中。于 37 $^{\circ}$ C 剧烈振荡培养 3 h(旋转摇床,300 r \cdot min⁻¹)。无菌条件下将细菌转移到一个无菌、一次性使用的、用冰预冷的 50 mL 聚丙烯管中,在冰上放置 10 min,使培养物冷却至 0 $^{\circ}$ C。4 $^{\circ}$ C,以 4 000 r \cdot min⁻¹离心 10 min,回收细胞。倒出培养液,将管倒置 1 min,使最后残留的痕量培养液流尽。以 10 mL 用冰预冷的 0.1 mol/L CaCl₂ 重悬每份沉淀,冰浴。4 $^{\circ}$ C 以 4 000 r \cdot min⁻¹离心 10 min,回收细胞。倒出培养液,将管倒置 1 min,使最后残留的痕量培养液流尽。每 50 mL 初始培养物用 2 mL 用冰预冷的 0.1 mol/L CaCl₂ 重悬每份细胞沉淀。将细胞分装成小份,放于-70 $^{\circ}$ C 冻存。

1.2.2.3 DNA 连接及转化 利用 Fermentas 公司产品 PCR Cloning Kit 进行,建立连接反应体系:5 \times 连接酶缓冲液 6 μ L;T4 连接酶 1 μ L;Vector pTZ57R/T 0.18 pmol(3 μ L);胶回收的 PCR 产物 0.54 pmol(5 μ L);加入三蒸水至 30 μ L;22 $^{\circ}$ C,连接 16 h;次日将连接产物转化入感受态细胞接种到 LB 固体选择性培养基(含卡那抗性 100 μ g/mL)37 $^{\circ}$ C 过夜,挑取在选择性培养基上生长的菌落制备菌液,一部分作为模板用针对目的基因 APX 的引物做 PCR,通过琼脂糖凝胶电泳鉴定阳性克隆,克隆阳性的菌液送至生物公司进行序列测定。

2 结果与分析

2.1 PCR 扩增菘蓝茎叶 APX 基因

用 P1 和 P2 引物对 APX 基因进行扩增,琼脂糖电泳。图 1 显示 57 $^{\circ}$ C 时扩增的条带最长,与预期

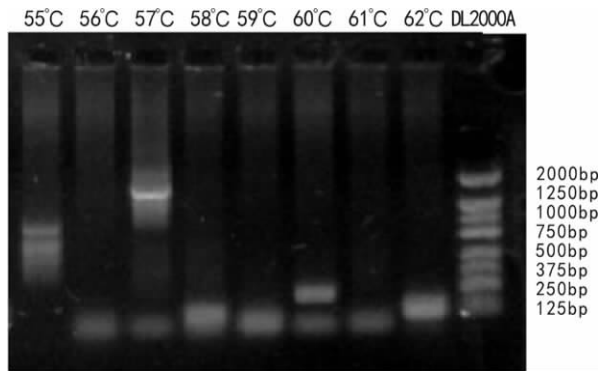


图 1 APX 基因的 PCR 扩增产物
Fig. 1 APX gene PCR amplification product

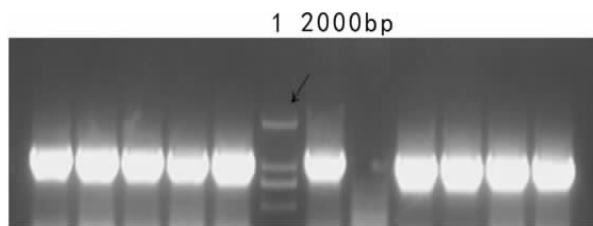


图 2 重组质粒菌落 PCR 结果
Fig. 2 Bacterial colony of Recombinant plasmid
1 泳道为 2 000 bp DNA 标准分子量 Marker;
其余泳道均为 APX 基因 PCR 扩增产物。
Lane 1:2 000 bp DNA Marker; others:APX PCR products.

片段大小一致,有可能是我们需要钓取的基因 APX,胶回收该片段,准备连入 T 载体。

2.2 pTZ57R/T/APX 重组表达质粒构建与鉴定

用含氨苄青霉素的 LB 培养基筛选生长的菌落制备菌液进行 PCR,琼脂糖电泳初步筛选阳性克隆,结果见图 1。可见 pTZ57R/T/APX 阳性重组质粒,经 PCR 扩增,随机挑选的 10 个单克隆中 9 个扩增出目的片段。

2.3 APX 核苷酸序列分析

总共挑取了 15 个克隆,只有 2 个克隆的测序符合 PCR 产物的长度;APX 测序结果与 Genbank 登录的 APX 基因碱基、氨基酸序列完全一致,并对其 ORF 框进行分析,包含 255 个氨基酸,证实目的基因已成功插入真核表达载体 pTZ57R/T 中。

3 结论与讨论

APX 作为植物体内抗氧化酶类,其活性的增强可植物增加耐逆性。转基因植物中 APX 的过量表达可以提高转基因植物的抗性(Mittler 等,2010)。在棉花、拟南芥等植物中的研究表明,克隆 APX 基因并进行转基因后,可有效增加植物的耐逆性。例

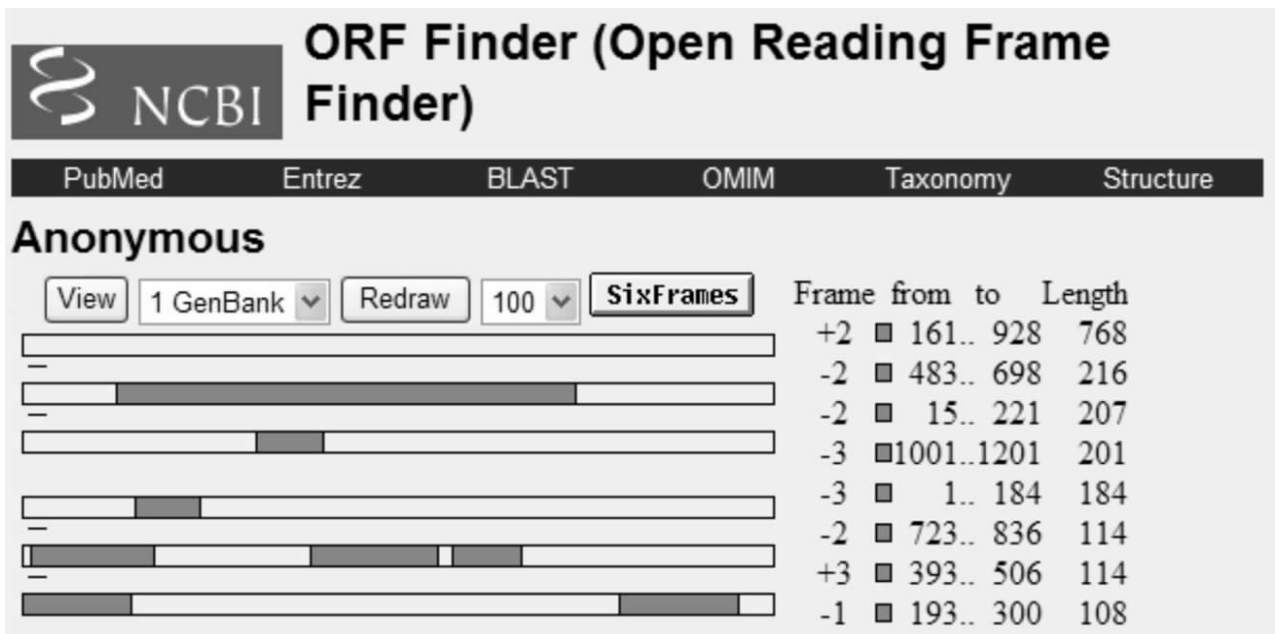


图 3 NCBI 提供的 ORF 阅读框分析
Fig. 3 The ORF analysis of APX from NCBI

如,拟南芥中 tAPX 的过量表达可增强对除草剂 (Paraquat) 诱导的光氧化胁迫和氧化氮诱导的细胞死亡的抗性(Murgia 等,2004)。此外,番茄中细

胞质 APX(cAPX)基因的过量表达,可显著提高转基因番茄的抗寒和抗盐能力(Wang 等,2005)。辣椒 APX 基因转入烟草,同样提高可转基因烟草的抗氧

化胁迫与抗真菌能力(Sarowar 等, 2005)。因此, APX 基因在植物耐逆性的研究中有着重要的意义。

在分子克隆的过程中, 利用 Taq 酶具有的非模板依赖性末端转移酶活性, 将 PCR 产物 3' 末端加入一个脱氧腺嘌呤核苷(A)。同时将克隆载体平端线性化后, 在其 3' 末端加入一个脱氧胸腺嘧啶核苷(T)(本研究中所用的 pTZ57R/T 载体已有商品化供应)。从而根据 T/A 碱基互补配对原理, 可以将加 A 后的 PCR 产物直接克隆入 T 载体, 这种方式称为 TA 克隆(于永利等, 1994)。本研究利用 pTZ57R/T 载体, 利用 TA 克隆的方法成功地构建了 pTZ57R/T/APX 重组质粒, 为采用 T 载体克隆其它目的基因扩增片段提供了经验; 同时, 菘蓝 APX 基因重组质粒的构建, 可为下一步深入研究其作用机制及其临床应用奠定基础。

参考文献:

Yu YL(于永利), MATH(麻彤辉), Yang GZ(杨贵贞). 1994. TA cloning and double stranded DNA sequencing; an introduction of a method for rapid cloning and analysis of PCR products (TA 克隆及双链 DNA 测序: 介绍一种快速克隆及分析 PCR 产物的方法)[J]. *Chin J Immunol* (中国免疫学杂志), **10**

(1): 5-7

- Li L(李玲), Yang GJ(杨根金), Dong TY(董同义), et al. 1996. Studies on the chemical constituents of Dyers Woad(*Isatis tinctoria*) (菘蓝化学成分研究)[J]. *Chin Trad Herbal Drugs* (中草药), **27**(7): 389-391
- AsadAK. 1992. Ascorbate peroxidase - Ahydrogen peroxide-scavenging enzyme in plants[J]. *Physiol Plant*, **85**(2): 235-241
- IshikawaAT, ShigeokAS. 2008. Recent advances in ascorbate biosynthesis and the physiological significance of ascorbate peroxidase in photosynthesizing organisms[J]. *Biosci Biotech Biochem*, **72**(5): 1 143-1 154
- Mittler R, Blumwald E. 2010. Genetic engineering for modern agriculture: challenges and perspectives[J]. *Annu Rev Plant Biol*, **61**: 443-462
- Murgi AI, Tarantino D, Vannini C, et al. 2004. Arabidopsis thaliana plants overexpressing thylakoidal ascorbate peroxidase show increased resistance to paraquat-induced photooxidative stress and to nitric oxide-induced cell death[J]. *Plant J*, **38**(6): 940-953
- Sarowar S, Kim EN, Kim YJ, et al. 2005. Overexpression of a pepper ascorbate peroxidase-like 1 gene in tobacco plants enhances tolerance to oxidative stress and pathogens[J]. *Plant Sci*, **169**(1): 55-63
- Wang YJ, Wisniewski M, Meilan R, et al. 2005. Overexpression of cytosolic ascorbate peroxidase in tomato confers tolerance to chilling and salt stress[J]. *J Am Soc Hortic Sci*, **130**(2): 167-173
- Zheng WF, Chen CF, Cheng QP, et al. 2006. Oral administration of exopoly saccharide from *Aphanotheca halophytica* (Chroococcales) significantly inhibits influenza A virus (H1N1)-induced pneumonia in mice[J]. *Interna Immunopharm*, **6**(7): 1 093-1 099

(上接第 339 页 Continue from page 339)

- water deficit: If not for carbon gain, what is facultative CAM good for[J]. *Ann Bot*, **103**(4): 645-653
- Hubrick KT, Farquhar GD. 1989. Carbon isotope discrimination and the ratio of carbon gained to water lost in barley cultivars[J]. *Plant Cell Environ*, **12**(8): 795-804
- Huc R, Ferhi A, Guehl M. 1994. Pioneer and late stage tropical rain-forest tree species (French Guiana) growing under common conditions differ in leaf gas exchange regulation, carbon isotope discrimination and leaf water potential[J]. *Oecologia*, **99**(3-4): 297-305
- Johnson HB, Poly HW, Mayerux HS. 1993. Interacting CO₂ and plant-plant interactions: Effects on natural vegetation[J]. *Vegetatio*, **105**(1): 157-170
- Kluge M, Ting IP. 1978. Crassulacean acid metabolism[M]// Analysis of an ecological adaptation. Ecological studies vol 30. Berlin, Heidelberg. New York; Springer-Verlag
- Lauteri M, Brugnoli E, Spaccino L. 1993. Carbon isotope discrimination in leaf soluble sugars and in whole-plant dry matter in *Helianthus annuus* grown under different water conditions [M]// Ehleringer JR, Farquhar GD(eds). Stable Isotopes and Plant Carbon-Water Relations. San Diego; CA Academic; 93-108
- Lüttge U, Beck F. 1992. Endogenous rhythms and chaos in crassulacean acid metabolism[J]. *Planta*, **188**: 28-38
- Lüttge U. 2004. Ecophysiology of Crassulacean Acid Metabolism (CAM)[J]. *Ann Bot*, **93**(6): 629-652
- Ning YF(宁有丰), Liu WG(刘卫国), Cao YN(曹蕴宁). 2002. How does the carbon isotope composition response to the climated during the plant growing(植物生长过程中碳同位素分馏对气

候的响应)[J]. *Mar Ecol Quat Geol* (海洋地质与第四世纪地质), **22**(3): 105-108

- Osmond CB. 1978. Crassulacean acid metabolism: a curiosity in context[J]. *Ann Rev Plant Physiol*, **29**: 379-414
- Schreiber U, Schliwa U, Bilger W. 1986. Continuous recording of photochemical and nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching with a new type of modulation fluorometer[J]. *Photosynth Res*, **10**(2): 51-62
- Shulze ED. 1986. Whole-plant response to drought[J]. *Austr J Plant Physiol*, **13**(1): 127-141
- Urey HC. 1947. The thermodynamic properties of isotopic substances[J]. *J Chem Soc*, **152**: 562-581
- Walter A, Christ MM, Rascher U, et al. 2008. Diel growth cycles in *Clusia* spp are related to changes between C₃ photosynthesis and Crassulacean Acid Metabolism during development and during water stress[J]. *Plant Cell Environ*, **31**: 484-491
- Winter K, Holtum JAM, Edawrs GE, et al. 1982. Effects of low relative humidity on $\delta^{13}C$ value in two C₃ grasses and in *Panicum milioides*, a C₃-C₄ intermediates species[J]. *J Exp Bot*, **33**(1): 88-91
- Winter K, Smith JAC. et al. 1996. Crassulacean acid metabolism [M]// Biochemistry, ecophysiology and evolution. Ecological studies vol 114. Berlin, Heidelberg. New York; Springer-Verlag
- Zhao BZ, Kondo M, Meada M, et al. 2004. Water-use efficiency and carbon isotope discrimination in two cultivars of upland rice during different developmental stages under three water regimes [J]. *Plant & Soil*, **261**(2): 61-75