中 国 科 学

1991 年 2 月　　B 辑　　第 2 期

黑麦和水稻与脯氨酸合成有关的基因片段的克隆和鉴定*

陈受宜　王　阁**　劳为德***

（中国科学院遗传研究所，北京 100101）

摘　要

用大肠杆菌营养缺陷互补法得到了含黑麦和水稻染色体 DNA 片段能互补于 proA2⁻ 的转化体．在渗透胁迫下，黑麦和转化体中这些片段的转录物都有明显增加，转化体中游离脯氨酸量也增加了．转化体的抗旱抗盐能力明显优于对照菌．初步分析，所克隆的片段和植物的调渗作用有关．

关键词：　营养缺陷互补，黑麦和水稻，谷氨酰磷酸还原酶基因，调渗作用

已有许多证据表明，在渗透胁迫（干旱、盐碱）下，从细菌到高等植物组织中都有游离脯氨酸的积累[1]．细胞内脯氨酸的积累可能有以下作用：在渗透胁迫下的调渗作用[2]，稳定蛋白质[3]，防止酶的热变性[4] 以及在胁迫下保存氮和能量[5]．

早在 50 年代，由于细菌脯氨酸缺陷株的分离成功，为阐明脯氨酸合成途径提供了基础，微生物中脯氨酸合成途径为：

$$\text{谷氨酸} \xrightarrow[(1)]{\text{ATP}} \text{谷氨酰磷酸} \xrightarrow[(2)]{\text{NADPH}} \text{谷氨酸半缩醛} \xrightarrow{\text{自发}} \text{吡咯啉-5-羧酸} \xrightarrow[(3)]{\text{NADPH}} \text{脯氨酸}$$

此过程涉及 3 个酶：(1)谷氨酸激酶，受脯氨酸的反馈抑制，由ProB 编码．(2)谷氨酰磷酸还原酶，由 ProA 编码．(3)吡咯琳 -5- 羧酸还原酶，由 ProC 编码[2]．大肠杆菌中的这 3 个基因序列均已搞清．植物与细菌相似，脯氨酸的前体是谷氨酸和 a- 酮戊二酸[6]．由谷氨酸为前体的合成途径的最后一步已在植物中发现，并在许多植物中证明了吡咯啉 -5- 羧酸还原酶的存在，并已分离纯化[7]，其它两种，酶的分离、纯化尚未见报道．

在细菌、酵母和高等动物细胞中，用营养缺陷互补法分离、克隆特定的基因已获得成功．1980 年我们以 Cosmid pHC79 为载体，*E. coli* HB101 为受体分别克隆了小鼠和黑斑蛙的与

本文 1990 年 7 月 11 日收到，1990 年 10 月 8 日收到修改稿．

* 本课题由国家“七五”攻关计划资助．

** 现在德国．

*** 中国科学院生物物理研究所．

脯氨酸和亮氨酸合成有关的基因片段[8],1990 年 Verma 等克隆了大豆 Δ'- 吡咯啉 -5- 羧酸还原酶的 cDNA[9]. 植物中其它与脯氨酸合成有关酶的基因的克隆尚未见报道.

本文以质粒 pAT153 为载体,*E. coli* HB101 为受体,克隆了黑麦和抗盐品种水稻的与脯氨酸合成有关的基因,并对这一基因片段在受体菌中表达及其对受体菌抗旱抗盐特性的影响以及黑麦在渗透胁迫下该基因的转录活性作了初步研究.

一、材 料 和 方 法

1. 材料

(1) *E. coli* HB101(rec A proA2 leu r-m-)由 Collins 教授提供,大肠杆菌质粒 pAT153 由王永利先生提供.

黑麦(*Secale cereale*)AR98 种子由中国农业科学院品种资源所提供,水稻(*Oryza Oryza Sativa* L. var 81 — 210)种子由江苏农业科学院提供,为抗盐品种.

(2) 培养基 丰富培养基是 LB 培养基. 基本选择培养基为无脯氨酸 M63,每升含 13.6g KH_2PO_4,2g $(NH_4)_2SO_4$,0.5 mg $FeSO_4 \cdot 7H_2O$,1 mmol/L $MgSO_4$,2g 葡萄糖,40 mg L-亮氨酸,40 mg L- 谷氨酸,9mg 盐酸硫胺素,用 NaOH 调 pH 至 7.0,必要时加终浓度为 50 μg/ml 的铃兰氨酸,培养基的渗透胁迫由加入 NaCl 或聚乙二醇(m.w. 6000)来调节,所用氨基卞青霉素的终浓度为 50 μg/ml.

(3) 酶和化学试剂 限制性内切酶为 Biolabs 产品,T_4 DNA 连接酶,DNA 聚合酶 I 等为 BRL 公司产品,核糖核酸酶、碱性磷酸酯酶、铃兰氨酸、聚乙二醇为 Sigma 产品,氨基酸为上海东风试剂厂产品.

2. 方法

(1) 植物 DNA 的提取与纯化 黑麦或水稻种子经 15% 过氯酸钠消毒 15 min 后放在暗室中发芽,待芽至 2 — 3cm 长时剥取幼芽,加液氮冷冻,同时研磨破碎细胞,再悬于 10ml 预冷的提取液中(0.2 mol/L NaCl, 50 mmol/L Tris-HCl pH8.0, 10 mmol/L EDTA pH8.0, 10 mmol/L DTT, 0.2% Triton X100, 100 μg/ml 蛋白酶),37°C 保温 3h 后加 SDS 至 0.2%,用酚抽提液抽提两次再用 Sevag 反复抽提至界面无残留物,吸出上层水相,加入二倍体积的无水乙醇,用玻棒搅出 DNA,干燥后溶于 1ml TE 缓冲液(10 mmol/L Tris-HCl, 1 mmol /L EDTA pH8.0)中,其 A280/A260 < 0.55,电泳鉴定出分子量大于 50kb.

(2) 质粒 DNA 分离、纯化 限制性内切酶酶解和琼脂糖凝胶电泳,DNA 缺口转移均参照 Maniatis[10].

(3) 互补于 *E.coli* HB101 proA2 突变的植物 DNA 片段的克隆(图 1) 将 3μg 黑麦或水稻总 DNA 用 BamHI 进行不同程度的水解,酶浓度为 0.5 U/μg DNA,37°C 保温 20, 30, 40 和 60 min 后经碱性磷酸酯酶处理,然后与经 BamHI 彻底水解的 2μg 质粒 pAT153 DNA 连接,转化 *E. coli* HB101,转化液经 37°C 保温 1h 后,无菌条件下离心沉淀菌体,用无脯氨酸的 M63 培养液洗一次,铺于含氨基卞青霉素的 M63 选择平板上. 37°C 培养 24h,挑取单菌落.

(4) 谷氨酸激酶活力测定 1 升培养物,收集,洗一次,称湿重后加液氮和少许金刚砂研磨,以破碎菌体,混合物悬于 10 ml 抽提液中(50 mmol/L 磷酸钾缓冲液,1 mmol/L EDTA,

0.2 mol/L KCl,1 mmol/L PMSF),0—4°C, 20 kg 离心30min. 取上清,加 1/10 体积20%硫酸链霉素,离心去核酸沉淀. 上清液经硫酸铵分级沉淀,分别收集 0 —30% 和30 —60% 硫酸铵饱和度的沉淀部分,溶于1ml 50 mmol/L 磷酸钾缓冲液(pH7.6)中,在相同缓冲液中透析过夜.

谷氨酸激酶活力测定参照Smith 方法[11].

(5)游离脯氨酸的测定　含不同浓度(0,5,10,15,20%)聚乙二醇(PEG)的100ml 细菌培养物,经离心分开菌体和上清培养液,将菌体称重后悬于 3ml 双蒸水中,超声破碎细胞,离心, 20 kg, 30min, 取上清液定容至 3ml 待测. 在上清培养液中均补加 PEG 至 20%,浓缩至 20ml 加 $(NH_4)_2SO_4$ 至 40% 饱和度,溶解后离心分相,吸取水相待测.

脯氨酸的测定运用酸性茚三酮显色法.

(6)Southern 和 Northern 印迹分析按分子克隆一书进行[10].

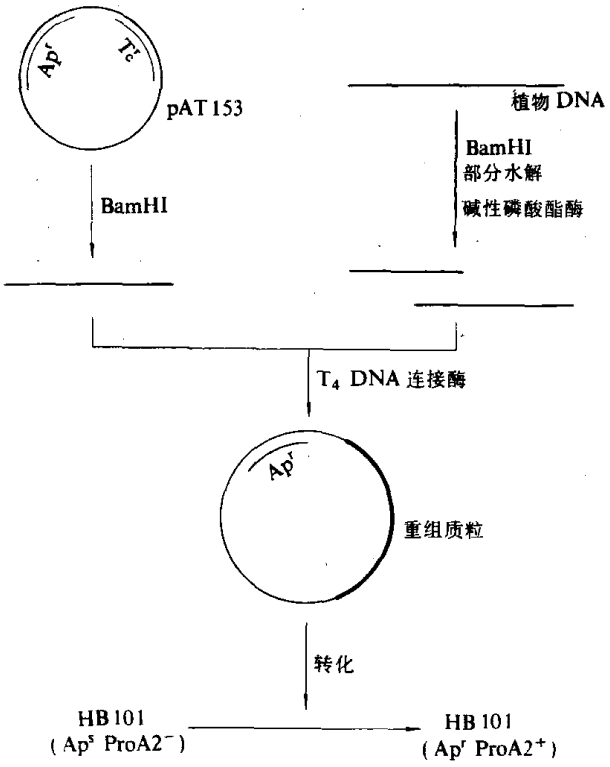


图 1　互补于 *E. coli* HB101 ProA2 突变的植物 DNA 片段克隆图解

(7) 黑麦总 RNA 提取　按照 EMBO 植物分子生物学讲座所列方法[12].

二、结　果

1. 构建含有互补于 *E. coli* HB101 proA2⁻ 的黑麦片段的重组质粒

为测定 *E. coli* HB101 和含质粒 pAT153的HB101由 $proA_2^-$ 变为 $proA_2^+$ 的自发突变率,将 10^7 的该两种菌铺在不含脯氨酸的选择培养基上,37°C 培养 36h 均未见菌落生长. 3μg 黑麦或水稻 DNA 经 BamHI 部分水解后与经 BamHI 完全水解的 2μg pAT153 DNA连接,转化 *E. coli* HB101 后可得到约 10^5 的转化体,在选择培养基上,分别筛到了 3 和 25 个含黑麦和水稻的转化体,含黑麦片段的命名为 pRCP1,2,3, 含水稻片段的为 pOOP1 — 25.

这些转化体都能在含脯氨酸拮抗物 - 铃兰氨酸而不含脯氨酸的基本选择培养基中生长,虽然生长速度略慢于在丰富培养基中生长的对照,但仍可说明这些转化体是大量合成脯氨酸的. 少量提取重组质粒 DNA,经 BamHI 水解鉴定 3 个含黑麦片段的转化体中有相似大小的插入片段(图 2),25 个含水稻片段的转化子中插入片段几近相似(材料未列出). 因此,在两类转

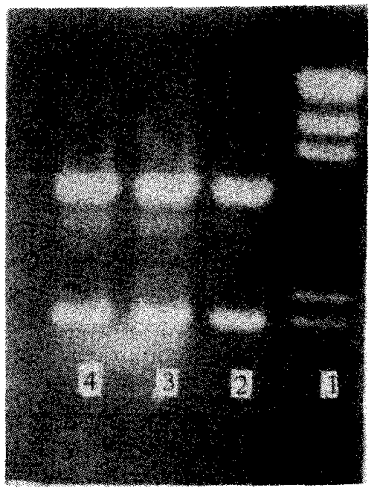


图 2　重组质粒 pRCP 1—3 插入片段琼脂糖凝胶电泳分析
(1——λ Hind III 片段 2,3,4——pRCP 1— 3 BamHI 酶切片段)

化子中各取一个 $pRCP_2$ 和 $pOOP_7$ DNA 转化 *E. coli* HB101，以同样方法筛选 $proA2^+$ 转化体得到的转化频率分别为 $7.1\times10^4/\mu g$ DNA 和 $6.3\times10^4/\mu g$ DNA.

2. $pRCP_2$ 和 $pOOP_7$ 的限制性内切酶图谱

$pRCP_2$ 和 $pOOP_7$ 的插入片段分别约为 2.5kb 和 2.3kb，用 BamHI, PstI, Ec. RI, HindIII 及 PvuII 等限制性内切酶水解后绘出了这两个插入片段的物理图谱(图 3)，在该两片段中没有 EcoRI, HindIII 的切点.

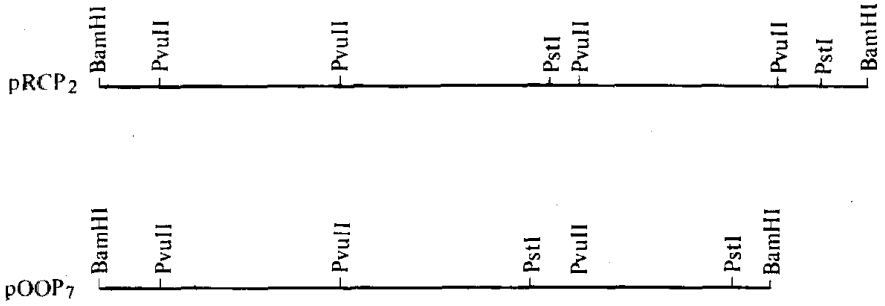


图 3 $pRCP_2$ 和 $pOOP_7$ 的限制性内切酶图谱

3. $pRCP_2$ 和 $pOOP_7$ 中的插入片段分别来自黑麦和水稻

$pRCP_2$ 和 $pOOP_7$ DNA 被 BamHI 水解后经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离，回收插入片段. 标记后与经 BamHI 完全水解的黑麦或水稻总 DNA 杂交. 图 4 示出 Southern 印迹分析图. 如图所示，黑麦和水稻总 DNA 经 BamHI 完全水解后在与 $pRCP_2$ 和 $pOOP_7$ 的插入片段相似的位点上有明显的杂交带，说明 $pRCP_2$ 和 $pOOP_7$ 的插入片段分别来自黑麦和水稻.

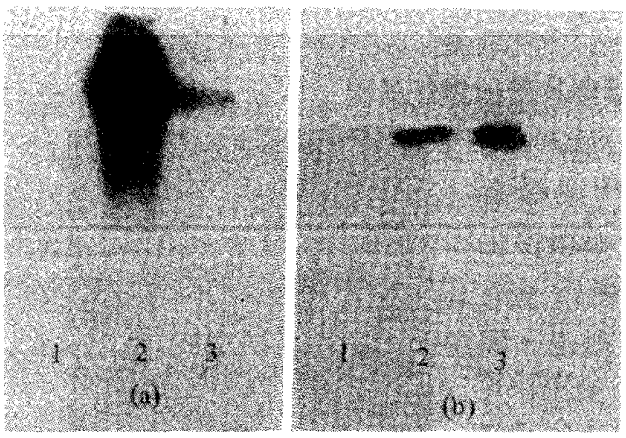


图 4 以 $pRCP_2$ 和 $pOOP_7$ 插入片段为探针的黑麦、水稻总 DNA Southern 印迹分析

((a)以 $pRCP_2$ 插入片段为探针，1 —— λ HindIII 片段；2 —— $pRCP_2$ BamHI 酶切片段；3 —— 黑麦总 DNA BamHI 酶切.

(b)以 $pOOP_7$ 插入片段为探针，1 —— λ HindIII 片段；2 —— $pOOP_7$ BamHI 酶切片段；3 —— 水稻总 DNA BamHI 酶切)

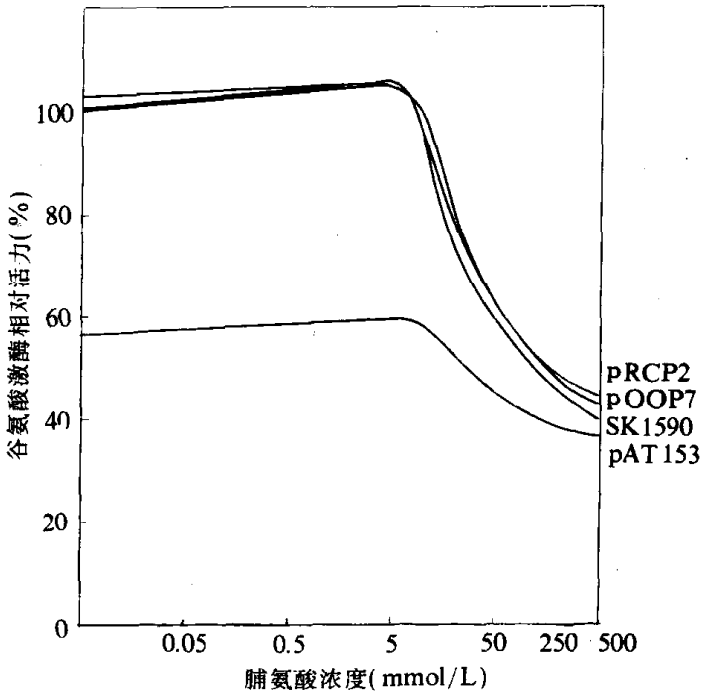


图 5 脯氨酸浓度对谷氨酸激酶活力的影响

4. $pRCP_2$ 和 $pOOP_7$ 转化体对盐及干旱的耐受性测定

在 M_{63} 培养基中分别加入 0.3, 0.5, 0.6, 0.7, 0.8 为 mol/L NaCl 或 5,10,15,20%PEG，比较含 pAT153, $pRCP_2$ 和 $pOOP_7$ DNA 的 *E.coli* HB101 转化体在上述培养基中的生长速度，结果表明，对照菌只能耐受 0.3mol/L NaCl 或 5%PEG，含 $pRCP_2$ 的转化体能耐受 0.6 mol/L NaCl 和 15%PEG，含 $pOOP_7$ 转化体能耐受 0.7 mol/L NaCl 和 20%PEG. 由此可见 2.5kb 黑麦片段和 2.3kb 水稻片段使受体菌提高了抗旱耐盐能力(表 1).

表 1　$pRCP_2$, $pOOP_7$ 和 pAT153 转化体抗旱抗盐性比较 *

菌　株	培养基中 NaCl 浓度 (mol/L)					培养基中 PEG 浓度 (%)			
	0.3	0.5	0.6	0.7	0.8	5	10	15	20
HB101 (pAT153)	++	+	−	−	−	+	−	−	−
HB101 ($pCRP_2$)	++	++	+	−	−	++	++	+	−
HB101 ($pOOP_7$)	++	++	+	+	−	++	++	+	+

* 表中 ++ 正常生长，+ 生长稍弱，− 不生长.

5. $pRCP_2$ 和 $pOOP_7$ 转化体中谷氨酸激酶活力测定

$pRCP_2$ 和 $pOOP_7$ 转化体在基本选择培养基中培养，对照 pAT153 转化体的培养基为 M_{63}，含 40 mg/L 脯氨酸. 培养至对数中期，制备细胞粗提液，用不同饱和度的 $(NH_4)_2SO_4$ 沉淀蛋白，测定每一分部的谷氨酸激酶活力，发现酶活力高峰在 30 — 60% 硫酸铵饱和度沉淀部分. 测定该分部的谷氨酸激酶活力表明，$pRCP_2$ 和 $pOOP_7$ 转化体的酶活力分别比 pAT153 转化体高 67%，3 种菌体及野生型大肠杆菌 SK1590 中脯氨酸抑制酶活力曲线基本相同，均在脯氨酸

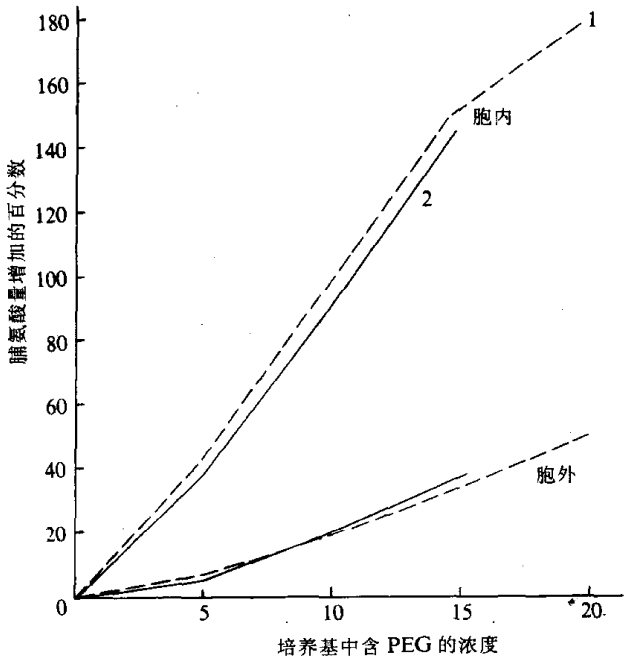


图 6　培养基中 PEG 浓度对 $pRCP_2$ 和 $pOOP_7$ 转化体胞内外游离脯氨酸积累的影响

(1 —— $pOOP_7$ 转化体，2 —— $pRCP_2$ 转化体)

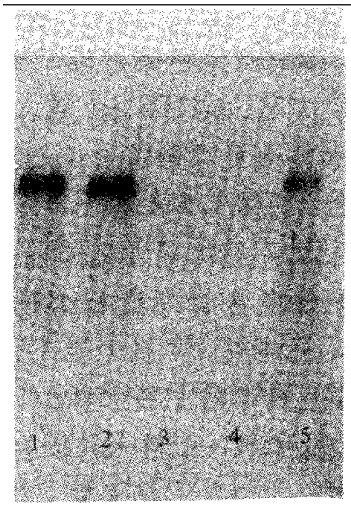


图 7　渗透胁迫下 $pRCP_2$ 转化体中插入片段的 Northern 印迹分析

(1 —— 在10%PEG 中生长 $pRCP_2$ 转化体总 RNA; 2 —— 在15%PEG 中生长 $pRCP_2$ 转化体总 RNA; 3 —— HB101 总 RNA; 4 —— 含 pAT153 HB101 总 RNA; 5 —— 在0%PEG中生长 $pRCP_2$ 转化体总 RNA)

浓度为 5 mmol/L 时酶活力开始受抑制，250 mmol/L 时接近最低值(图 5).

6. 培养基中 PEG 含量对 $pRCP_2$ 和 $pOOP_7$ 转化体胞内外游离脯氨酸积累的影响

为了近一步阐明在渗透胁迫下脯氨酸积累情况，对 $pRCP_2$ 和 $pOOP_7$ 转化体在含不同浓度 PEG的基本选择培养中生长的胞内、外游离脯氨酸含量进行了测定，结果见图 6. $pRCP_2$ 转化体在15%PEG 中生长，胞内游离脯氨酸量可积累至 391 μg/g 湿菌，无 PEG 时为 160 μg/g 湿菌，增加144%，$pOOP_7$ 在 15%PEG 中生长，胞内脯氨酸量的增加与 $pRCP_2$ 近似，而当 PEG 浓度增加至 20% 时胞内游离脯氨酸量仅增加 167%.

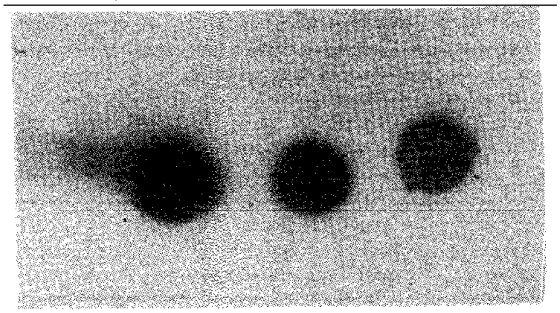


图 8 黑麦在渗透胁迫下 $pRCP_2$ 插入片段的转录分析

(从右至左在水，1/5，1/3 海水下生长的黑麦总 RNA，点样量为 20μg/样品，探针为 $pRCP_2$ 插入片段)

7. 培养基中 PEG 含量对 $pRCP_2$ 转化体中插入片段转录的影响

$pRCP_2$ 转化体生长于含 0，10，15%PEG 的 M63 培养基中，提取总 RNA，以插入片段为探针 Northern 印迹分析说明随着 PEG 溶度的增加插入片段的转录也增加了(图 7).

8. 黑麦在渗透胁迫下2.5kb片段转录物的变化

将黑麦在水 1/5 或 1/3 人工海水中发芽长至 5cm 左右，收集提取总 RNA，以 $pRCP_2$ 的插入片段为探针，杂交说明在渗透胁迫下生长的黑麦中该片段的转录增加了(图 8).

三、讨 论

1. 本文所克隆的黑麦2.5kb 和水稻2.3kb 两个片段互补于 *Ecoli* HB101 的 proA2突变

将 10^7 *E. coli* HB101 或含质粒 pAT153 的 HB101 接种在无脯氨酸的选择平板上，37°C 培养 36h，未见有菌落生长，表明该两种菌在选择培养基上的自发突变率低于 10^{-7}. 当将黑麦或水稻染色体 DNA 经 BamHI 水解后由质粒 pAT153 带入 *E. coli* HB101 中得到了 $<10^6$ 的转化体，用选择培养基筛选得到了 3 个含黑麦片段的和 25 个含水稻片段的转化体，这两类转化体各自含有几近相似的插入片段. 将 $pRCP_2$ 和 $pOOP_7$DNA 提纯后再转化 *E. coli* HB101 可得到 10^4 以上能在选择培养基上生长的菌落，这些结果说明所选出来的这两类转化体具有互补于宿主细胞 proA2 突变的能力，并非来自宿主菌的自发回复突变，而是由于含有插入片段所致. 以插入片段为探针的黑麦和水稻总 DNA 的 Southern 印迹分析表明这两个转化体中的插入片段来源于黑麦或水稻.

2. $pRCP_2$ 和 $pOOP_7$ 的插入片段可能含有黑麦或水稻的 proA2 基因片段

$pRCP_2$ 和 $pOOP_7$ 插入片段能互补于 *E. coli* HB101 的 proA2 突变有两种可能，一是插入片段能利用细菌的转录、翻译系统合成 proA 编码的谷氨酰磷酸还原酶，因而互补了受体菌该酶的缺失. 另一种可能是插入片段含有校正基因，如抑制终止密码的 tRNA 基因，它产生的 tRNA 能识别细菌中的 proA 突变(假定它是抑制突变)的密码，从而校正 proA2 突变，产生正常的基因产物. 但是，从插入片段与渗透胁迫下生长的黑麦总 RNA 杂交结果，似乎是前者.

在细菌中，proA，B是连锁的[13]．这里所克隆的两种插入片段是否含 proB，从转化体谷氨酸激酶活力测定结果看来，两种转化体的酶活力均比对照高，但是受脯氨酸抑制及硫酸铵沉淀的特性均与对照相同．同时两种转化体中此酶活性与非脯氨酸缺陷的 *E. coli* SK1590 的有同样高的水平(图 5)．这些结果似乎说明了转化体中测得的谷氨酸激酶活力是宿主菌本身的产物，转化体中该酶活力升高达到野生型菌的水平，可能由于 proA 基因得以表达后脯氨酸合成途径畅通所致．

植物的核基因能在大肠杆菌中表达，其 5′端上游区应在大肠杆菌中有启动功能的序列，根据对 $pRCP_2$ 的黑麦插入片段 5′区已测定的序列看来，这样的序列是存在的(结果另文发表)．

3. $pRCP_2$ 和 $pOOP_7$ 的插入片段与细胞的调渗作用有关

从对照和 $pRCP_2$，$pOOP_7$ 在含 NaCl 或 PEG 的培养基中生长情况来看，$pRCP_2$ 和 $pOOP_7$ 对 NaCl 和 PEG 的耐受力都提高了．$pRCP_2$ 能耐受 0.6 mol/L NaCl 和 15%PEG，$pOOP_7$ 能耐受 0.7mol/L NaCl 和 20%PEG，看来这两类转化体中的插入片段不仅赋予宿主菌在选择培养基中生长的能力，也提高了其抗旱耐盐能力．

与对照相比，两种转化体都在 PEG 造成的渗透胁迫下，在胞内、外积累较大量的游离脯氨酸．比较胞内、外游离脯氨酸量的积累速率可见随 PEG 浓度升高胞外脯氨酸积累量增加速度远比胞内的增加速度为低，在 PEG 浓度为 5—15%间非常显著(图6)．例如在 10%PEG 时，胞内游离脯氨酸量约增加一倍，胞外只增加了 21%，表明在高渗条件下胞内积累了更多的游离脯氨酸，从而起到抵抗渗透胁迫的作用，而当 PEG 浓度上升至 20% 时，$pOOP_7$ 中，游离脯氨酸增加速度明显降低，可能反映了细胞的抗渗极限．Northern 印迹分析结果说明在渗透胁下，在转化体或是黑麦中插入片段的转录都增加了，这些插入片段可能与渗透调节有关．

中国农业科学院品资所，江苏农业科学院提供实验材料，在此一并表示感谢．

参　考　文　献

[1] Stewart, G. R. & Larher, F., in *The Biochemistry of Plant* (Eds. Stumpf, P. K. & Conn, E. E.), Vol 5, 1980, 609—635, Academic Press, Inc., New York, N. Y. ISBNO-12-675405.

[2] Wyn Jones, R. G. & Storey, R., *Aust. J. Plant Physiol.*, **5**(1978), 817—829.

[3] Schobert, B. & Tschesche, H., *Biochim. Biophys. Acta.*, **541**(1978), 270—277.

[4] Paleg., L. G. et al., *Aust. J. Plant Physiol.*, **8**(1981), 107—114.

[5] Barnett, N. M. & Naylor, A. W., *Plant Physiol.*, **41**(1966), 1222—1230.

[6] Rad, R. C. N., Krishnasastry, K. S. & Udayakumar, M., *Plant Science Letters*, **23**(1981), 327—334.

[7] Krueger, R. et al., *Plant Physiol.*, **80**(1986), 142—144.

[8] Chen, S. Y. et al., *Scientia Sinica*, **25**(1982), 1:62—68.

[9] Delauney, A. J. & Verma, D. P., *Mol. Gen. Genet.*, **221**(1990), 299—305.

[10] Maniatis, T., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.

[11] Smith, C. J., *Journal of Bacteriology*, **143**(1984), 545—551.

[12] Montagu, M. V. et al., *BMBO Practical Course on Plant Molecular Biology*, 1987, August 3—20, Belgium.

[13] Deutch, A. H., Rushlow, K. & Smith, C. J., *Nucleic Acids, Res.*, **12**(1984), 6337—6355.