

菠菜磷酸丙糖转移蛋白在烟草中正义及反义表达 及其对碳水化合物转运的影响

刘 晗 赵恢武 陈杨坚 胡鸢雷 高 音 林忠平*

(北京大学蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室 北京 100871)

摘 要 以菠菜(*Spinacia oleracea* L.)为材料,取幼叶分离 mRNA,反转录合成 cDNA,以 cDNA 第一链为模板,通过 PCR 扩增,获得菠菜磷酸丙糖转移蛋白(Triose phosphate translocator, TPT) cDNA 目的片段。对其进行序列分析,结果表明,分离的目的片段核苷酸序列与文献报道相比同源率为 99.9%,只有 1 个碱基发生改变。将得到的菠菜 *tpt* cDNA 与 CaMV 35S 启动子和 NOS 3' 终止子融合,分别构建了正义及反义表达载体。通过根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导转化烟草(*Nicotiana tabacum* L.),在含有卡那霉素的抗性筛选培养基上再生的植株经 PCR 及 Southern 杂交检测,证明 *tpt* 基因已整合到烟草基因组上,菠菜丙糖磷酸转移蛋白基因导入烟草后使叶绿体中 TPT 的含量表现出明显差异,并导致烟草光合作用产物分配的变化,表现在叶绿体中淀粉含量的改变。

关键词 磷酸丙糖转移蛋白 转基因植物 反义 叶绿体 碳水化合物

中图分类号 Q78 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2000)06-0703-05

磷酸丙糖是光合作用合成的最初糖类,它代表着 Calvin 循环的净产物。CO₂ 固定所产生的磷酸丙糖中仅 1/6 又回到 Calvin 循环中,其余的既可以留在叶绿体中合成淀粉和脂类,又可被转运到细胞质中转化为蔗糖或氨基酸,可运到非光合作用组织中^[1]。磷酸丙糖转移蛋白 TPT 是叶绿体内膜上的一种重要的转运蛋白,它可占叶绿体膜蛋白总量的 15%。其作用是以细胞质中的无机磷酸为平衡离子,将磷酸丙糖从叶绿体中输出^[1,2]。磷酸丙糖转移蛋白通过控制叶绿体与细胞质间的物质交流而影响光合作用的速率。当磷酸丙糖的输出受到限制时,被固定的 CO₂ 就以淀粉的形式在叶绿体中沉积下来,叶绿体中沉积的淀粉过多就会影响叶绿体的正常光合作用功能。另一方面,细胞质中蔗糖的合成因得不到充分的磷酸丙糖底物而受到影响,进而使其它非光合作用组织的发育因蔗糖供应不足而受到影响。因此 TPT 通过对碳水化合物的转运而影响光合作用并对“库”(sink)、“源”(source)关系进行调节。

目前已经从菠菜、豌豆、拟南芥、马铃薯、玉米、烟草中克隆了 *tpt* 基因^[1]。菠菜 *tpt* 基因是第一个被克隆的植物膜转运系统基因^[3]。序列分析表明所有这些基因有很高的同源性。通过转基因实验来

研究 TPT 的功能已有一些报道^[4-8]。但这些工作因导入多余拷贝的同源基因有可能会引起共抑制现象^[9],从而使转基因植物达不到预期的目的,因此本工作向烟草中导入正义及反义的菠菜 *tpt* 基因来研究 TPT 的功能及其可能的应用价值。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 菠菜(*Spinacia oleracea* L.)种子(日本大叶菠菜)购自中国农业科学院蔬菜所,烟草(*Nicotiana tabacum* L. cv. Wisconsin 38)为日中型常规品种。

1.1.2 菌株和质粒 大肠杆菌(*Escherichia coli*) JM109、质粒 pGEM-11Z(+)购自 Promega 公司,根癌土壤杆菌[*Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Townsend) Conn JLB4404(含 pLA4404 质粒),质粒 pBI121 购自 Clontech 公司。

1.1.3 主要化学试剂 限制酶、T4 DNA 连接酶、Taq DNA 聚合酶、Superscript II 逆转录酶、CIAP 等酶类购自 BioLabs 公司、Promega 公司、Gibco BRL 公司;pGEM-T Easy Vector System I、PolyAtract mRNA Isolation System II 购自 Promega 公司;PCR DIG Probe Synthesis Kit 和 DIG Luminescent Detec-

收稿日期 2000-03-10,修回日期 2000-06-19。

基金项目 国家高技术研究发展计划项目(101-04-03-01)。

* 通讯作者 e-mail 信箱 linzp@lsc.pku.edu.cn

tion Kit 购自 Roche 公司 ;TRIzol Reagent 购自 Gibco BRL 公司。

1.1.4 寡核苷酸引物 :引物 40440(基因 5'端):

5'CAATGGAGTCGCGAGTTTTGTCTG ,引物 40441 (基因 3'端):

5'ACTCAAGTAGACTTCATTTGTCTG ,由 Cybersyn 公司合成。

1.2 方法

1.2.1 菠菜磷酸丙糖转移蛋白基因 cDNA 克隆及序列分析

液氮中研磨成粉末 ,应用 TRIzol 和 Poly-A Tract RNA Isolation System II 制备菠菜总 RNA 和 mRNA ,进一步反转录合成 cDNA。以 cDNA 为模板 ,利用人工合成的 5'和 3'端的两个引物 ,通过 PCR 扩增 TPT 编码序列。

PCR 扩增 :100 μ L 反应体系中 ,以 2 μ L cDNA 为模板 ,引物 40440 和 40441 各 100pmol ,循环参数为 94 $^{\circ}$ C 1min ,55 $^{\circ}$ C 1 min ,72 $^{\circ}$ C 2min ,共 30 个循环 ,最后 72 $^{\circ}$ C 保温 10min。经 1% 琼脂糖电泳分离后 ,回收 1.2kb 大小片段。回收片段经酶切图谱分析初步确认为菠菜磷酸丙糖转移蛋白基因 cDNA。将回收的片段克隆到 pGEM T-Easy 上 ,名之为 pSTPT-Te。序列测定在 ABI 373A DNA 自动测序仪上进行。

1.2.2 植物表达载体的构建与鉴定

将 pSTPT-Te 用 *Eco*RI 酶切 ,电泳回收目的基因片段 ,抽提纯化。同时将 pGEM-11Z(+)用 *Eco*RI 酶切 ,并用 CIAP 脱磷酸化 ,抽提纯化后与目的基因片段连接并转化大肠杆菌 JM109 ,分别得到插入的目的基因与载体上 *lacZ* 同向及反向的中间载体 pSTPT-11(+)和 pSTPT-11(-)。上述中间载体分别用 *Bam*HI/*Sac*I 双酶切 ,回收含目的基因的片段 ,与同样用 *Bam*HI/*Sac*I 双酶切除去 GUS 基因的表达载体 pBI121 连接 ,得到 CaMV35S 启动子驱动下的正义表达载体 pSTPT-12(+)及反义表达载体 pSTPT-12(-)。

1.2.3 表达载体向根癌土壤杆菌的转化及阳性克隆的鉴定

按冻融法转化根癌土壤杆菌 LBA4404 ,在 Sm 100mg/L 和 Km 100mg/L 的双抗性 YEB 培养基上进行筛选 ,通过 PCR 检测证明两种表达载体质粒已分别进入根癌土壤杆菌。

1.2.4 烟草的叶盘法遗传转化及再生

按文献 [1] 进行。

1.2.5 转化体的分子鉴定

用 CTAB 法从烟草叶片中分离植物总 DNA。取 0.5g 材料于液氮中研成粉末 ,移至预热的 500 μ L 2 \times CTAB 缓冲液中(2% CTAB ,100 mmol/L Tris-Cl ,20mmol/L EDTA ,

1.4mmol/L NaCl ,pH = 8.0) ,加等体积氯仿抽提 ,2/3 体积异丙醇沉淀 ,70% 乙醇清洗。用转化植株的总 DNA 为模板 ,未转化植株作负对照 ,pSTPT-Te 质粒作正对照进行 PCR 扩增反应 ,反应条件为 :94 $^{\circ}$ C 预变性 10min 后 ,94 $^{\circ}$ C 变性 1min ,55 $^{\circ}$ C 退火 1min ,72 $^{\circ}$ C 延伸 2min ,进行 30 个循环 ,最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10min。

用 PCR DIG Probe Synthesis Kit 合成 DIG 标记的 *tpt* 探针 ,引物为 40440 和 40441。转基因植株及未转基因的对照植株 DNA 样品 ,用 *Bam*HI 酶切 ,1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离 ,经变性和中和后转移至尼龙膜(0.45 μ m ,Charge Modified ,SIGMA)。干燥后 ,将膜于 Stratalinker UV Crosslinker 1800 (STRATAGENE)中交联(0.15J/cm²) ,加入预杂交液 2h 后 ,换含 DIG 标记探针的杂交液于 68 $^{\circ}$ C 杂交 14h。杂交之后的膜在 2 \times SSC 0.1% SDS 溶液中室温洗 2 次 ,每次 5min ;换 0.1 \times SSC 0.1% SDS 溶液于 68 $^{\circ}$ C 洗膜 2 次 ,每次 15min。检测按 DIG Luminescent Detection Kit 说明书进行。

1.2.6 叶绿体蛋白的提取和电泳分析

叶片于冰浴叶绿体提取缓冲液(0.4mol/L 蔗糖 ,10mmol/L Na-Cl ,50mmol/L Tricine ,pH = 7.6)中研成匀浆 ,8 层纱布过滤 ,滤液于 4 $^{\circ}$ C 300 \times g 下离心 5min ,取上清 1500 \times g 离心 10min ,叶绿体沉淀悬浮于适量提取缓冲液中。取部分进行 10% SDS-PAGE 分析。

1.2.7 烟草叶片中淀粉含量的分析

转基因烟草及未转基因的对照叶片中淀粉含量的定性染色分析按 Caspar T. 等人的方法 [10] 进行 :叶片在 95% 的乙醇浸泡 ,80 $^{\circ}$ C 水浴中脱色完全后 ,用 I₂-KI 染色液(5.7mmol/L I₂ ,43.4mmol/L KI ,0.2mol/L HCl)染色过夜。淀粉含量的定量分析按文献 [12] 所述的碘量法进行。

1.2.8 烟草叶片叶绿体中淀粉粒的电镜观察 [13] :

取植株叶片 ,经 2.5% 戊二醛-PBS(pH 7.2)固定 40min ,1% 锇酸固定 1h ,乙醇系列脱水 ,丙酮置换后用环氧树脂 812 包埋。LKB V 型超薄切片机切片 ,醋酸双氧铀染色 15min ,柠檬酸铅染色 15min ,H-9000 型日立透射电镜观察和照相。

2 实验结果与讨论

2.1 菠菜磷酸丙糖转移蛋白 *tpt* 基因 cDNA 克隆及表达载体的构建

经序列分析 ,得到的 *tpt* 基因 cDNA 片段与文献所报道的序列碱基数相同 ,仅在 392 位上的 A 突

变为 G (编号以 GenBank gi | 21274 | emb | CAA32016.1 序列为标准)。这样使所编码的前体蛋白的 124 位氨基酸 Tyr 变为 Cys。Tyr 和 Cys 都为中性的极性氨基酸。因用于扩增的为高保真的

Taq 酶, 推测这些碱基变化为物种内不同品种间正常的变异, 蛋白的功能不受影响。图 1 为正义表达载体 pSTPT-121(+) 及反义表达载体 pSTPT-121(-) DNA 部分的结构示意图。

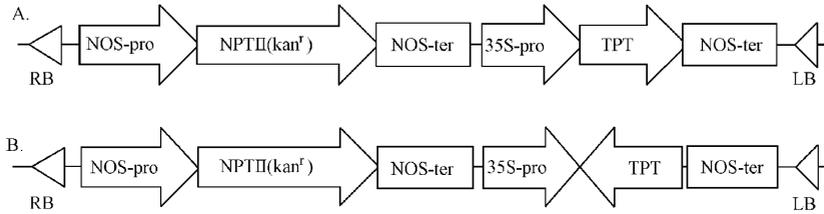


图 1 表达载体 T-DNA 部分的结构示意图

Fig. 1 The sketch map of expression vector showing T-DNA region

A. pSTPT-121(+); B. pSTPT-121(-)

2.2 转基因植株的鉴定

转基因植株的 PCR 如图 2。含 *tpt* 的 pSTPT-Te 质粒在 1.2kb 处有一条带, 转 pSTPT-121(+) 的植株 +6 和 pSTPT-121(-) 的植株 -1 在相同位置也分别有一条带, 而未转基因的对照烟草 W38 植株却未能扩出对应的条带。说明 *tpt* 已转入烟草细胞内。

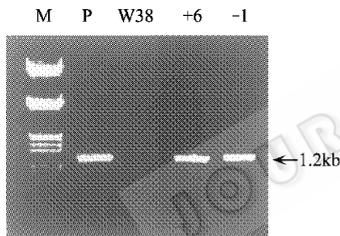


图 2 转基因植株的 PCR 结果

Fig. 2 PCR identification of transgenic tobacco

M: DNA *EcoRI/HindIII* marker; P: pTE-STPT; +6: Transgenic tobacco with sense *tpt*; -1: Transgenic tobacco with antisense *tpt*; W38: non-transgenic tobacco

转基因植株的 Southern 杂交结果如图 3。菠菜 *tpt* 基因 cDNA 序列中无 *Bam*HI 酶切位点, 所以用

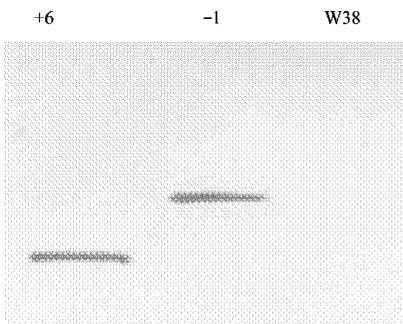


图 3 转基因植株的 Southern blotting

Fig. 3 Southern blotting analysis of transgenic tobacco

*Bam*HI 消化总 DNA。转基因株系 +6 和转基因株系 -1 的杂交结果都仅一条带, 未转化的 W38 则无杂交信号。表明在 +6 和 -1 转基因植株中, 菠菜 TPT 基因已整合入烟草基因组内, 且可能都仅整合入 1 个拷贝。同时也说明了在所用的条件下, 菠菜 *tpt* 基因与烟草本身的 TPT 基因不能杂交。

2.3 烟草叶绿体蛋白的分析

从图 4 所示的结果来看, 转反义 TPT 的植株-1

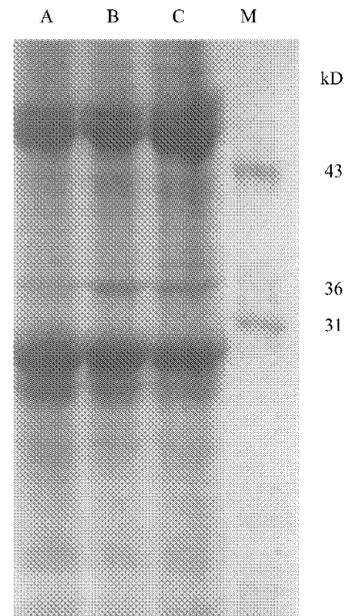


图 4 叶绿体蛋白的 SDS-PAGE

Fig. 4 SDS-PAGE of the proteins in chloroplasts

M: Protein MW marker; A: Transgenic tobacco-1 with antisense *tpt*; B: Transgenic tobacco +6 with sense *tpt*;

C: Non-transgenic tobacco W38

的叶绿体中,烟草本身的成熟 TPT 蛋白对应的条带(36kD)^[14]明显地较未转基因的对照要弱,说明反义菠菜 *tpt* 基因的导入抑制了烟草本身的 TPT 的表达。而转正义 *tpt* 的植株 +6 的叶绿体中,因烟草自身蛋白的干扰观察不到明显的菠菜成熟 TPT 蛋白对应的条带(29kD)^[3]。

2.4 烟草叶片中淀粉含量的分析

文献所报道的关于 *tpt* 转基因研究的工作都是对普通光照条件下的植株作一些生理学上的测定。这种温和的条件下,TPT 的作用可能没有充分的体现出来。在本实验中,着重研究强光长时间照射的极端条件下转 *tpt* 基因对植物的影响,光照度约为 100000lx。

不同发育阶段的叶子其能量的供应和需求各不相同,因此细胞内光合作用产物(蔗糖和淀粉)之间的分配也不同。实验中取生长位置、叶面积、叶绿素含量都相似的叶片作分析。叶片的 I₂-KI 染色结果如图 5。烟草叶片中淀粉含量的碘量法测定结果见表 1。

烟草叶片中淀粉含量的定性及定量分析都表明转反义 *tpt* 的植株叶片中淀粉含量要比转正义 *tpt* 的植株高。即使强光长时间照射后,转正义 *tpt* 的植株也能有效地防止淀粉过多积累;而转反义 *tpt* 的植株在黑暗处理后淀粉仍维持在较高水平。未转基因的对照烟草虽然在光照后积累了大量淀粉,但在黑暗处理后仍能保持淀粉含量降低到正常水平。叶

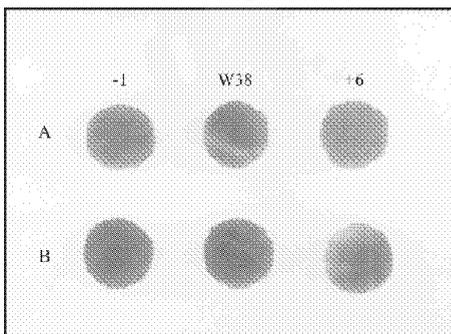


图 5 烟草叶片 I₂-KI 染色结果

Fig. 5 I₂-KI staining of leaf disc

A. After 48 h darkness ; B. After 48 h illumination

表 1 烟草叶片中淀粉含量(mg/g 鲜重)

Table 1 The starch content in the transgenic tobacco leaves (mg/g fresh weight)

	+6	-1	W38
After 48 h darkness	5.0±1.3	13.3±1.0	7.7±0.3
After 48 h illumination	12.3±1.0	18.7±0.3	17.0±0.8

子中淀粉主要贮存在细胞的叶绿体中,因此该结果也说明了叶绿体中淀粉含量的变化。

烟草叶片叶绿体中淀粉粒的电镜观察结果如图 6。转反义 *tpt* 的植株 -1 的叶绿体中淀粉颗粒数目较多,转正义 *tpt* 的植株 +6 的叶绿体中淀粉颗粒数目较少,而未转基因的对照居于两者之间。尽管由于切片、观察的随机性,淀粉粒数目的多少无法作为衡量淀粉含量的标准,但从电镜观察结果中比较直观、形象地看出叶绿体中淀粉含量的变化。

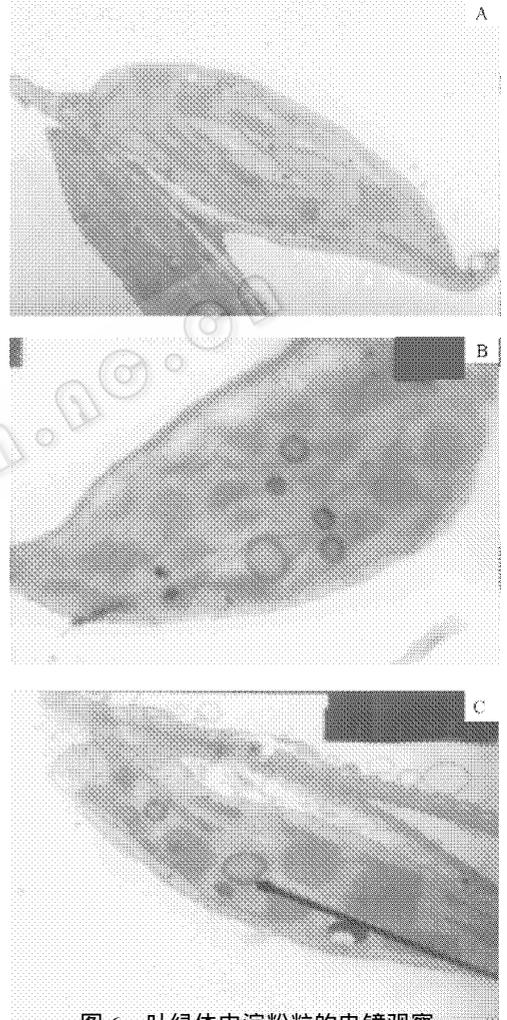


图 6 叶绿体中淀粉粒的电镜观察

Fig. 6 The observation of starch granule in the chloroplasts by electron microscope

A. Transgenic tobacco +6 with sense *tpt* ;

B. Transgenic tobacco -1 antisense *tpt* ;

C. Non-transgenic tobacco W38 (the needle point out the starch granule)

转正义 *tpt* 的植株及转反义 *tpt* 的植株在转基因当代也发生了一些形态学和其它方面的变化,如 +6 长势比 -1 良好, -1 的叶子衰老得较快。关于 *tpt* 转基因对植物形态学和生理学的影响有待于在

转基因植物后代中进行更细致的研究。

从实验结果可以看出,转反义菠菜 *tpt* 的烟草植株,其自身 TPT 因受反义抑制而表达量降低,从而导致叶绿体中淀粉的异常积累。说明 TPT 对植物体内碳水化合物的转运有着重要的调节作用。正义 *tpt* 基因在转基因烟草的作用表明异源的磷酸丙糖转移蛋白也可以通过增加磷酸丙糖的转运和防止

叶绿体中淀粉的积累,来提高光合作用的效率,增加作物的产量。这种作用对于那些在光照强烈的条件下生长的作物可能更为重要。*tpt* 作为一种碳水化合物转运的功能基因有着良好的应用前景。

致谢 感谢北京大学电镜室马淑芳等老师在电镜实验中所给予的帮助。

参 考 文 献

- [1] Flügge U I. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* ,1999 **50** :27~45
- [2] Frommer W B ,Sonnewald U. *Journal of Experimental Botany* ,1995 **A6** :587~607
- [3] Flügge U I ,Fischer K ,Gross A *et al.* *EMBO J* ,1989 **1** :39~46
- [4] Barnes S ,Aknight J S ,Gray J C. *Plant Physiol* ,1994 **106** :1123~1129
- [5] Hattenbach A ,Rober B M ,Nast G *et al.* *Plant Physiol* ,1997 **115** :471~475
- [6] Höusler R E ,Schlieben N H ,Schulz B *et al.* *Planta* ,1998 **204** :366~376
- [7] Heineke D ,Kruse A ,Flügge U I *et al.* *Planta* ,1994 **193** :174~180
- [8] Riesmeier J W ,Flügge U I ,Schulz B *et al.* *Proc Natl Acad Sci USA* ,1993 **90** :6160~6164
- [9] Stam M ,Mol J N M ,Kooer J M *et al.* *Annals of Botany* ,1997 **79** :3~12
- [10] Caspar T ,Huber S C ,Somerville C *et al.* *Plant Physiol* ,1985 **79** :11~17
- [11] Horsch R B ,Fry J ,Hoffman N L *et al.* *Science* ,1985 **227** :1229~1231
- [12] 波饮诺克 H X. 植物生物化学分析方法,北京:科学出版社,1981,pp. 158~164
- [13] 朱丽霞. 生物学中的电子显微镜技术,北京:北京大学出版社,1983
- [14] Knight J S ,Gray J C. *Mol Gen Genet* ,1994 **242** :586~594

Sense and Antisense Expression of Spinach Triose Phosphate Translocator in Tobacco and Its Effects on Carbohydrate Partitioning

LIU Han ZHAO Hui-Wu CHEN Yang-Jian HU Yuan-Lei GAO Yin LIN Zhong-Ping
(National Laboratory of Protein Engineering and Plant Genetic Engineering ,Peking University ,Beijing 100871)

Abstract mRNAs were isolated from the young leaves of spinach (*Spinacia oleracea* L.) and cDNAs were synthesized from reverse transcription. The triose phosphate translocator (TPT) cDNA was amplified by PCR using cDNA first strains as templates. Sequence analysis indicated that the cloned cDNA fragment was showing 99.9% homology to the sequence reported before. Only one base is different. The sense and antisense expression vector with TPT full length cDNA under the control of CaMV 35S promoter were constructed respectively and were transformed into tobacco (*Nicotiana tabacum* L.) by leaf disc transformation. The transformed tobaccos were selected in the medium containing kamamycin, and were identified by PCR and Southern blotting analysis. The carbon partitioning of photosynthates is affected in *tpt* transgenic tobacco resulting in the alternation of the TPT content and the starch accumulation in the chloroplasts.

Key words Triose phosphate translocator (TPT), transgenic plants, antisense, chloroplast, carbohydrate