

一个可介导链霉菌 PKS 基因 向植物转化的杂合质粒的构建

陶美凤 胡志浩 周秀芬 邓子新

(华中农业大学生命科技学院 武汉 430070)

David A Hopwood Tobias Kieser

(John Innes Center, Norwich, U. K.)

抗生素 FR-008 是由链霉菌 FR-008 所产生的一种七烯大环内酯类抗真菌抗生素。胡志浩等^[1]已克隆了长达约 105kb 的 FR-008 聚酮合酶 (PKS) 基因簇, 对该基因簇中相邻于 pabAB 基因下游的 3.8kb DNA 进行序列分析, 找到一个多功能聚酮合酶基因的起点, 与数据库中蛋白质序列的比较分析揭示出一个尚未结束的大型开读框架的存在, 它与抗细菌大环内酯类抗生素-红霉素生物合成所需的 I 型聚酮合酶 (PKS) 基因中的乙酰转移酶 (AT) 和 β -酮酰合酶 (KS) 的功能结构域显示出了高度的同源性, 从分子水平上证实了 FR-008 抗生素由 I 型 PKS 所合成^[2]。本实验将 3.8kb 中的编码聚酮合酶的部分开读框架通过基因工程的方法插入植物表达载体 WRG2410 上, 从而成功构建了表达性质粒 pHZ321。pHZ321 的构建主要是为了从分子水平上探索高 G+C (76%) 含量的链霉菌 PKS 基因能否在植物 (如水稻、烟草) 中表达, 从而为进一步利用这个巨大的抗真菌抗生素基因簇进行植物抗真菌的基因工程育种提供理论依据。遭受病原真菌危害的植物种类均可用此材料开始前期转化的探索。

1 材料和方法

1.1 质粒及菌株

pHZ317 系大肠杆菌表达性质粒, 它由表达载体 pET-15b 衍生, 携带了长 2671bp 的部分 PKS 基因, 是为了在大肠杆菌中表达 PKS 基因以制备抗体, 用来检测 PKS 蛋白在异源宿主中的表达所构建的。WRG2410 系可转化植物的基因表达性载体, 由英国 John Innes 研究中心的 P. Christou 博士赠送。该质粒上具有花椰菜花叶病毒 35s 启动子及玉米乙醇脱氢酶 (ADH) 内元中的增强子, 农杆菌 Ti 质粒上胭脂碱合成酶基因的聚腺苷位点以及潮霉素抗性 (hyg) 基因作为植物细胞克隆选择标记, 同时亦克隆有来自苏云金杆菌的昆虫毒素基因 Bt5。pIJ2925 系 pUC19 的衍生质粒, 该质粒上的多用接头两侧各有一个 Bgl I 位点。DH5 α 系本室保藏菌种, 它是本实验中的大肠杆菌质粒的宿主。

1.2 DNA 操作

质粒的 DNA 提取, 纯化及 DNA 酶切片段分离, DNA 的连接, 转化等方法均见文献 [3]。

2 结果和讨论

2.1 质粒 pHZ321 的构建

将 pHZ317 上的 Bgl I-EcoRI 片段切下, 与 BamH I-EcoRI 双酶切后的 pIJ2925 相连接, 从而得到中间质粒 pHZ322 (图 1); 再将 pHZ322 的 2.9kb 带 PKS 基因的 Bgl I 片段与 Bel I (位点位于 Bt5 基因的 3' 末端) 线性化和 CIAP 处理的 WRG2410 酶连, 进而获得另一个中间质粒 pHZ323。在 pHZ323 中, PKS 基因紧挨着 Bt5 基因的 3' 末端, PKS 和 Bt5 基因的转录方向一致 (通过 BamHI 和 SalI 的酶切即可

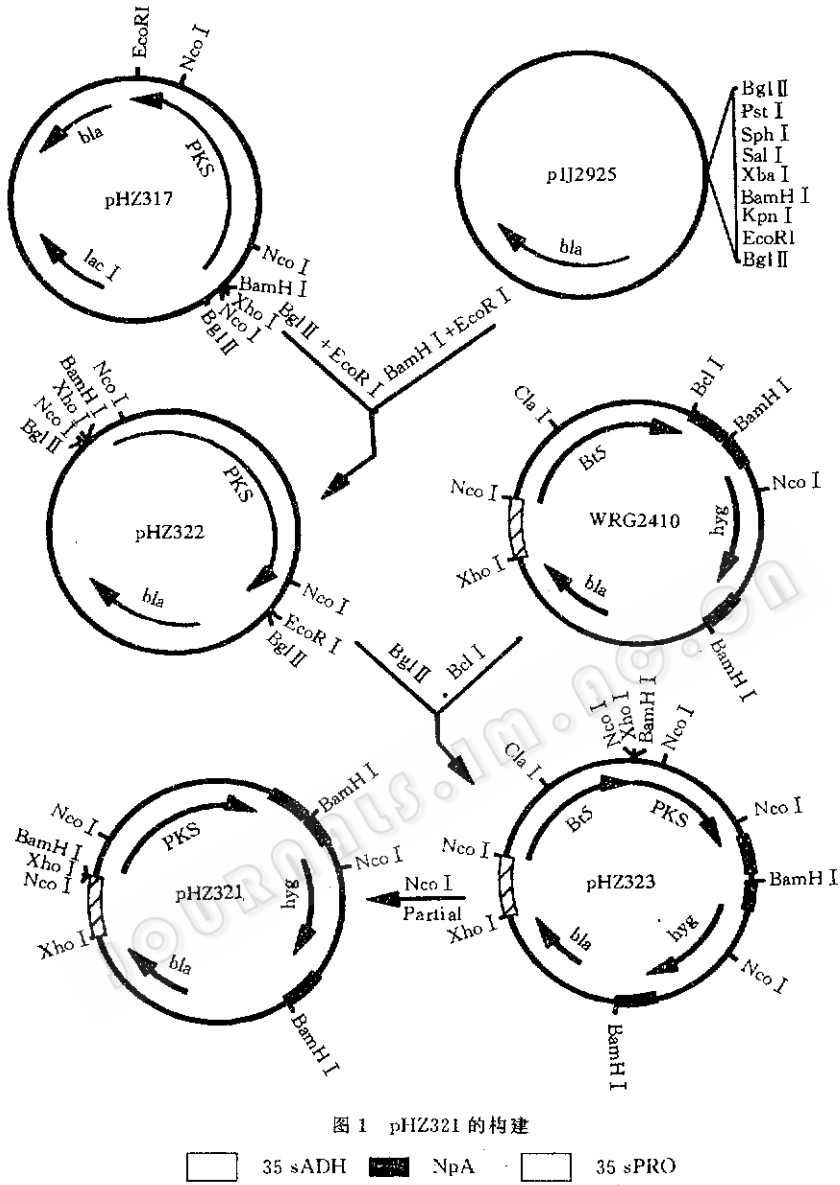


图1 pHZ321的构建

判定 *PKS* 的插入方向)。随后我们将 pHZ323 先用 *ClaI* 酶切,再用 *NcoI* 进行部分酶切以切去 pHZ323 中携带的 *B5* 结构基因,用部分酶切后的酶连产物转化大肠杆菌,筛选氨苄青霉素抗性转化子即获得了可用于在植物中表达链霉菌 *PKS* 基因的质粒 pHZ321 (图 2)。在该质粒的构建过程中,我们依据已知 *PKS* 序列的限制酶位点,密切追踪了各个质粒衍生物结构的正确性,也利用 Southern 杂交技术证明了 pHZ321 中的插入片段确为预期大小的 *PKS* 基因片段。

构建出来的 pHZ321 质粒可用于转化高等植物以探索高 G+C 含量的链霉菌基因在植物中表达的可能性。在此阶段我们尚无法预测转入后的 *PKS* 基因在植物基因组中的稳定性,也难以奢望转入的基因在水稻或其它植物中产生功能蛋白或产生抗真菌活性,但希望此工作能够提供高 (G+C)% 含量 (76%) 的 FR-008 *PKS* 基因能否在植物 (如水稻) 中表达的分子证据,从而为进一步利用整个 FR-008 *PKS* 基因簇进行植物抗真菌的基因工程育种提供理论依据。整个基因簇的分子生物学研究仍在深入进

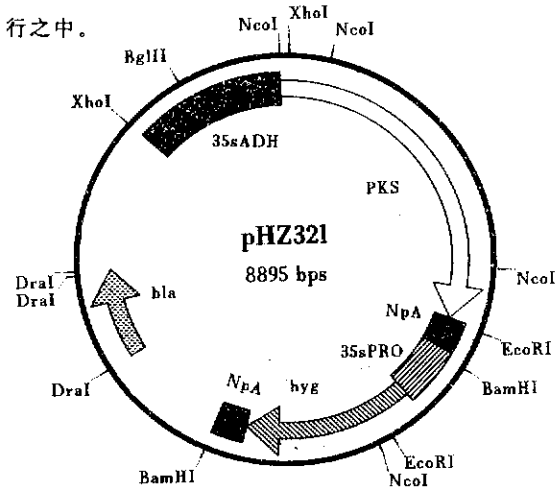


图2 用于转化植物的携带链霉菌 FR-008 PKS 基因的质粒 pHZ321

35sPRO: 花椰菜花叶病毒 35s 启动子; NpA: 农杆菌 Ti 质粒上胭脂碱合成酶基因的聚腺苷位点; 35 sADH: 花椰菜花叶病毒 35S 启动子与玉米乙醇脱氢酶内元中的增强子; hyg: 潮霉素抗性基因; PKS: FR-008 聚酮合酶基因。

致谢 衷心感谢英国 John Innes 中心 P. Christou 博士提供尚未正式发表的载体 WRG2410。

参 考 文 献

- (1) Hu Z., Bao K., Zhou X *et al.* Mol Microbiol, 1994, 14: 163~172.
- (2) 胡志浩, 周秀芬等. 农业生物技术学报, 1995, 3 (4): 71~77.
- (3) Sambrook J., Fritsch E.F., Maniatis T. Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition. Cold Spring Harbor Laboratory, New York, 1989.

A Construct for the Trial Expression of *Streptomyces* PKS Gene in Plant

Tao Meifeng¹ Hu Zhihao¹ Zhou Xiufen¹ Deng Zixin¹

David A Hopwood² Tobias Kieser²

(Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070)¹

(John Innes Centre, Colney Lane, Norwich NR4 7UH, UK)²

Abstract 3.8kb DNA immediately downstream of *pabAB* genes was sequenced and it was confirmed that the FR-008 antibiotic was synthesised by Type 1 PKS. We were interested to see whether the FR-008 PKS genes can be expressed in plant. The sequence information was thus used to make a construct for gene expression in plant. Plasmid WRG2410 containing 35S promoter was chosen as a vector to construct pHZ321 which is now ready for introduction into plant. At this stage, we neither expect the introduced construct in plant to produce a functional enzyme, nor to confer fungal resistance to plant, but it will give some indication whether the *Streptomyces* PKS gene, which has an extremely high G+C content (76%) can be expressed in various plants.

Key words PKS, *Streptomyces*