

段 明. 谷子 *EPSPS* 基因的分离、修饰及表达载体的构建[J]. 江苏农业科学, 2016, 44(5): 51–55.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2016.05.013

谷子 *EPSPS* 基因的分离、修饰及表达载体的构建

段 明

(山西农业大学实验教学中心, 山西太谷 030801)

摘要: 5-烯醇式丙酮酸莽草酸-3-磷酸合酶(*EPSPS*)是植物莽草酸合成途径中的一个重要酶,与芳香族氨基酸及其次生代谢物的合成有关。利用 RT-PCR 方法,从谷子中分离到 5-烯醇式丙酮酸莽草酸-3-磷酸合酶基因 *SiEPSPS*,全长 1 573 bp,开放阅读框 1 536 bp,编码 511 个氨基酸。同源序列比较发现,*SiEPSPS* 氨基酸序列与小麦、短柄草、高粱的 *EPSPS* 序列高度同源。结构同源性分析表明,*SiEPSPS* 与其他植物一样,均具有 2 个序列保守的结构域。对其启动子序列分析显示,该片段富含 ABRE、TC-rich repeats、TCA-element 等响应胁迫的顺式作用元件。针对草甘膦结合位点,对 *SiEPSPS* 基因进行定点修饰。为研究其功能,构建植物表达载体 pWM101-*EPSPS*,并导入农杆菌进行检测。测序结果比对表明,突变型 *EPSPS* 基因在 173 位的脯氨酸变为丝氨酸,为后续 *EPSPS* 的真核表达奠定了基础。

关键词: 谷子;草甘膦;*EPSPS* 基因;表达载体

中图分类号: Q78 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2016)05-0051-05

谷子(*Setaria italic*)属禾本科狗尾草属,在我国有数千年的栽培历史,全国各地均有种植,是我国北方的主要粮食作物之一。谷子具有营养丰富、耐旱耐瘠、粮草兼用等特点,深受人们的喜爱。然而,杂草已成为谷子生产中主要的障碍因素之一,影响农作物对阳光和养分的吸收。目前,化学除草已成为主要的除草手段,被广泛应用于农业生产中。草甘膦(Glyphosate)的学名为 *N*-(膦羧甲基)甘氨酸,是全球使用最广泛的一种除草剂^[1]。起初,草甘膦因其非选择性的特点而被用作非农田区域的除草剂;20 世纪 90 年代,抗草甘膦作物开始大面积种植,至 2012 年种植面积已达 1.2 亿 hm^2 。抗草甘膦生物工程不仅对全球农业生产具有重大贡献,并在一定程度上减轻了机械除草对环境的负面影响^[2-4]。

5-烯醇式丙酮酸莽草酸-3-磷酸合酶(*EPSPS*, EC2.5.1.19)是莽草酸途径中的第 6 个酶,在芳香族氨基酸和次生代谢物的合成中发挥着重要作用^[5]。草甘膦与 *EPSPS* 的底物磷酸烯醇式丙酮酸(PEP)结构相似,在莽草酸途径中能与 PEP 发生竞争作用,特异性地结合到 *EPSPS* 的活性位点,而不与莽草酸-3-磷酸(S3P)发生竞争,生成 *EPSPS*-S3P-草甘膦三元复合物,从而抑制 *EPSPS* 的活性^[6]。目前,全世界 80% 的抗草甘膦作物品种均与 *EPSPS* 有关,*EPSPS* 基因已被广泛应用于抗草甘膦农业生物工程的研究,包括在野生型植株中过量表达 *EPSPS* 基因,以及对 *EPSPS* 基因进行突变使其对草甘膦具有抗性^[7-9]。

基于 *EPSPS* 在抗除草剂方面的重要性,学者针对 *EPSPS* 的酶学特性及草甘膦抑制机理进行了大量研究,目前已从细菌、藻类、植物中分离到了 *EPSPS* 基因并应用于生产^[10-13]。

收稿日期:2016-02-17

基金项目:山西省青年科技研究基金(编号:2015021142);山西农业大学科技创新基金(编号:20142-12)。

作者简介:段 明(1984—),男,山东威海人,博士,讲师,主要从事植物抗逆分子生物学研究。E-mail:duanming840305@163.com。

对农杆菌、大肠杆菌、分枝杆菌、肺炎链球菌中 *EPSPS* 的晶体结构分析表明,它们均包括 2 个相似的结构域,每个结构域由 3 个亚单位组成,3 个亚单位由 4 个 β 折叠、2 个 α 螺旋组成。在没有结合底物或配体时,*EPSPS* 的 2 个结构域是分开的;当有配体存在时,2 个结构域会结合在一起形成活性中心,可能是因为配体的结合促使 *EPSPS* 构象发生改变^[14]。

自然界中的 *EPSPS* 主要分为 2 类,即 Class I 和 Class II。Class I 存在于所有植物以及大肠杆菌、鼠伤寒沙门氏菌等部分细菌中,对草甘膦敏感。在高等植物中,*EPSPS* 主要定位在叶绿体,它含有叶绿体转运肽(chloroplast transit peptide, CTP),可将外源蛋白定位到叶绿体中;因此,*EPSPS* 只有在叶绿体中与其他莽草酸途径的成员共同作用才能合成芳香族氨基酸。Class II 存在于假单胞菌 PG2982、农杆菌 CP4 等对草甘膦具有抗性的细菌中。序列比对发现,2 类 *EPSPS* 的氨基酸同源性低于 50%^[15]。目前针对抗草甘膦基因的研究主要集中于杂草和细菌,关于农田作物的研究较少,且原核生物与真核生物在基因表达调控方面存在显著差异,真核生物的调控机制更为复杂。发掘和改良植物特别是农作物中的抗草甘膦基因显得尤为重要。

目前,使植物对草甘膦产生抗性的机制主要有以下 3 种。(1)在植物体内引入过量表达载体,使植物体内产生较多 *EPSPS*。Chen 等研究发现,在高选择压下,牛筋草 R3 株系中的 *EPSPS* 表达量提高了 13.8 倍,表现出对草甘膦的抗性^[16]。(2)引入能够降解草甘膦的酶,在除草剂产生作用前将其降解或解毒。如代谢基因 *GAT* 编码草甘膦 *N*-乙酰转移酶(NAT),通过乙酰化使草甘膦失活^[17]。(3)修饰 *EPSPS* 使其对草甘膦不敏感,该方法已成为商业化应用的主要方法。已有研究表明,牛筋草 *EPSPS* 氨基酸序列中的脯氨酸位点发生突变时,会在一定程度上表现出对草甘膦的抗性^[18]。由突变而引起对草甘膦产生抗性的机制,在黑麦草、芒稗等植物中也被陆续发现^[19]。

本研究利用 RT-PCR 方法分离谷子 *EPSPS* 基因,通过

定点突变获得了突变基因 *SiEPSPS*, 并将 2 个基因的编码序列连入表达载体中, 为真核表达及谷子抗草甘膦的研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

选用“豫谷 1 号”为试验材料, 种植于人工气候室中。pLB 零背景快速克隆试剂盒、胶回收试剂盒、质粒提取试剂盒、大肠杆菌 DH5 α 均购自天根生化科技(北京)有限公司, 植物表达载体 pWM101、农杆菌菌种均由笔者所在实验室保存。高保真 PCR 酶 - KOD - Plus 购自东洋纺(上海)生物科技有限公司, 限制性内切酶 *Kpn* I、*Xba* I 以及 T₄ DNA 连接酶均购自 NEB(北京)有限公司。PCR 引物均由上海生工生物有限公司合成。

1.2 方法

1.2.1 *SiEPSPS* 基因的克隆 根据数据库已公布的谷子 *EPSPS* 基因序列设计扩增引物, 引物序列如下: *SiEPSPS* - F: 5' - GGTACCATGGCGCCATGGCGTCC - 3'; *SiEPSPS* - R: 5' - TCTAGAATCACTTCAACATGGCCTGGT - 3'。

PCR 总体体系为 25 μ L, 包括 10 \times PCR buffer 2.5 μ L、dNTP 2.5 μ L、cDNA 模板 2 μ L、MgCl₂ 1 μ L、引物 F 及引物 R 各 1.5 μ L、*Taq* 酶 2 μ L、ddH₂O 12 μ L。反应程序为: 94 $^{\circ}$ C 预变性 2 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 15 s, 68 $^{\circ}$ C 延伸 1.5 min, 68 $^{\circ}$ C 后延伸 10 min, 35 个循环。

1.2.2 基因的定点突变 以质粒 pLB - *EPSPS* 为模板, 采用重叠延伸 PCR 法突变 *SiEPSPS* 基因的第 517 位, 由 C 突变为 T, 其蛋白序列第 173 位由 Pro 突变为 Ser。重叠延伸 PCR 法所用引物如下: *Siepsps* - F: 5' - TGGAACAGCGATGCGGTCGTTGACAGCAGCCGT - 3'; *Siepsps* - R: 5' - ACGGCTGCTGTCAACGACCGCATCGCTGTTCCA - 3'。

1.2.3 植物表达载体的构建 提取测序正确的 pLB - *EPSPS* 载体质粒, 用 *Kpn* I、*Xba* I 双酶切质粒 pLB - *EPSPS*, 回收 *EPSPS* 片段; 同样用 *Kpn* I、*Xba* I 双酶切质粒 pWM - *EPSPS*, 回收载体片段。采用 T₄ DNA 连接酶将目的基因与载体以体积比约 2 : 1 进行连接, 并用热激法转入大肠杆菌 DH5 α 。在含有 50 μ g/mL Kan 的 LB 培养基平板上筛选转化菌落, 提取质粒采用 *Kpn* I、*Xba* I 双酶切鉴定。

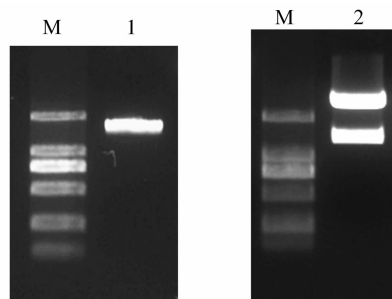
2 结果与分析

2.1 谷子 *EPSPS* 基因的分离及氨基酸序列分析

采用 RNA 提取试剂盒从谷子叶片中提取总 RNA, 反转录为 cDNA。根据数据库中已公布的序列设计特异性引物 *SiEPSPS* - F 和 *SiEPSPS* - R, 以反转录产物为模板进行 RT - PCR 反应, 电泳检测扩增出 1 条长度约为 1 573 bp 的条带(图 1 - a)。

将扩增得到的目的基因与克隆载体连接, 转化至大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 过夜培养, 提取质粒并进行酶切鉴定, 得到与 PCR 产物大小相同的目的条带(图 1 - b)。送样测序并对序列进行 Blast 分析, 证明分离得到的片段是 *SiEPSPS* 基因全长(GenBank 注册号: XM_004964389.1)。

由 *SiEPSPS* 的序列分析可知, 基因全长为 1 573 bp, 开放



a. *SiEPSPS* 基因 PCR 扩增 b. 克隆载体酶切鉴定

M—DNA marker; 1—*SiEPSPS* 基因 cDNA 扩增片段;
2—pLB-*SiEPSPS* 克隆载体酶切鉴定

图1 谷子 *SiEPSPS* 基因的扩增和克隆载体酶切鉴定

阅读框 1 536 bp, 3' 端非编码区 37 bp, 编码 1 个含 511 个氨基酸的蛋白。将该基因编码的氨基酸序列与 GenBank 中所有氨基酸序列进行比对, 结果显示, 谷子的 5 - 烯醇式丙酮酸莽草酸 - 3 - 磷酸合酶与黑麦草、小麦、短柄草、高粱等植物的 *EPSPS* 高度同源(图 2), 表明成功克隆到了谷子 5 - 烯醇式丙酮酸莽草酸 - 3 - 磷酸合酶基因的序列。

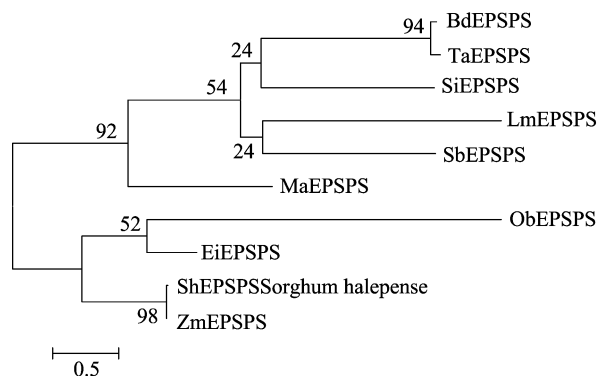


图2 不同植物中5-烯醇式丙酮酸莽草酸-3-磷酸合酶氨基酸序列的系统发育树

系统发育树由 MEGA 5 分析软件完成, 5 - 烯醇式丙酮酸莽草酸 - 3 - 磷酸合酶的来源如下。谷子: *SiEPSPS* (XM_004964389.1), *Setaria italica*; 多花黑麦草: *LmEPSPS* (AAZ79230.2), *Lolium multiflorum*; 短柄草: *BdEPSPS* (XP_003557242.1), *Brachypodium distachyon*; 野生稻: *ObEPSPS* (XP_006656606.1), *Oryza brachyantha*; 小麦: *TaEPSPS* (ACH72672.1), *Triticum aestivum*; 高粱: *SbEPSPS* (XP_002436424.1), *Sorghum bicolor*; 牛筋草: *EiEPSPS* (CAD01096.1), *Eleusine indica*; 玉米: *ZmEPSPS* (CAA44974.1), *Zea mays*; 石茅: *ShEPSPS* (AEP26124.1), *Sorghum halepense*; 芭蕉: *MaEPSPS* (CAA44974.1), *Musa acuminata* AAA Group; 芭蕉: *ZmEPSPS* (XP_009418331.1), *Musa acuminata* AAA Group。

与其他植物中 *EPSPS* 所编码的氨基酸序列进行同源性比较, 发现 *SiEPSPS* 基因所编码的氨基酸与其他已知 *EPSPS* 所编码的氨基酸序列同源性较高, 且有 2 个序列保守区域 (conserved site I、conserved site II)。其中, conserved site I 是该酶的激活位点, 同时是该酶与除草剂草甘膦的结合位点(图 3)。

```

SiEPSPS : MAA-----MASRAAAA---A-TASLDLAAAPALSRRCRHTS-ARPSAA-AA-AARGLRMRGAAR---VVUAAAAAAXAPAKAGAEVVIQPIREISGVNLPGSKSLNRRILLALSAL : 104
bDEPSPS : MAMAGATTMASK-AA---A-AVSLDRAAGPTASSNLSRRL---RMP---AR-SARGLRLRGRGG---VVLAASVAAPAPAGAEVVIQPIREISGVNLPGSKSLNRRILLALSAL : 103
ObEPSPS : -----SVAA-PAAKSAAEEVVIQPIREISGVNLPGSKSLNRRILLALSAL : 41
LmEPSPS : -----QPIKEISGVNLPGSKSLNRRILLALSAL : 30
SHEPSPS : MAA-----MAT---K---A-TVSLDLAAGP---RHHHRFPSSAARPSARPAASAAVGRLRAGRLV---VPLAAAAAPA-VQAGAEVVIQPIKEISGVNLPGSKSLNRRILLALSAL : 100
EIAPSPS : -----AGAEVVIQPIKEISGVNLPGSKSLNRRILLALSAL : 36
SHEPSPS[50] : -----AGAEVVIQPIKEISGVNLPGSKSLNRRILLALSAL : 36
TaEPSPS : TVA-----KGFE-ANFVLSFSLRGGARFTTLYSLVPGVSG-AK-P---GS-FG-GLRAGGCGRRSAPLRVSVASVYAEKSPSAVEIPIQPIKEISGVNLPGSKSLNRRILLALSAL : 107
ZmEPSPS : MAMAAATTAASASS---S-AVSLDRAA-PAPSRLPMPA---ARP---AR-RG-AVRLWGRFG---AAARATSVAAAPAPSGAEVVIQPIREISGVNLPGSKSLNRRILLALSAL : 103
ZmEPSPS : -----AGAEVVIQPIKEISGVNLPGSKSLNRRILLALSAL : 38
aee VLIQPIAIEISG V LFGSKSLNRRILLALSAL

*          *          *          *          *          *          *          *          *          *          *          *          *          *          *
          140          160          180          200          220          240
SiEPSPS : GTTVVDNLILNSDhVYHMLALITGLSVEADKRAKRAVVGCGGCFPEVFKDAEEVQLFLGNAGTAMRPLTAAVAAAGNATVYLLDGVPMRMRERFIQDLVGLKQLGADDCFLGTCPPVR : 226
bDEPSPS : GTTVVDNLILNSDhVYHMLALITGLSVEADKRAKRAVVGCGGCFPEVFKDAEEVQLFLGNAGTAMRPLTAAVAAAGNATVYLLDGVPMRMRERFIQDLVGLKQLGADDCFLGTCPPVR : 225
ObEPSPS : GTTVVDNLILNSDhVYHMLALITGLSVEADKRAKRAVVGCGGCFPEVFKDAEEVQLFLGNAGTAMRPLTAAVAAAGNATVYLLDGVPMRMRERFIQDLVGLKQLGADDCFLGTCPPVR : 167
LmEPSPS : GTTVVDNLILNSDhVYHMLALITGLSVEADKRAKRAVVGCGGCFPEVFKDAEEVQLFLGNAGTAMRPLTAAVAAAGNATVYLLDGVPMRMRERFIQDLVGLKQLGADDCFLGTCPPVR : 152
SHEPSPS : GTTVVDNLILNSDhVYHMLALITGLSVEADKRAKRAVVGCGGCFPEVFKDAEEVQLFLGNAGTAMRPLTAAVAAAGNATVYLLDGVPMRMRERFIQDLVGLKQLGADDCFLGTCPPVR : 221
EIAPSPS : GTTVVDNLILNSDhVYHMLALITGLSVEADKRAKRAVVGCGGCFPEVFKDAEEVQLFLGNAGTAMRPLTAAVAAAGNATVYLLDGVPMRMRERFIQDLVGLKQLGADDCFLGTCPPVR : 166
SHEPSPS[50] : GTTVVDNLILNSDhVYHMLALITGLSVEADKRAKRAVVGCGGCFPEVFKDAEEVQLFLGNAGTAMRPLTAAVAAAGNATVYLLDGVPMRMRERFIQDLVGLKQLGADDCFLGTCPPVR : 155
MaEPSPS : GTTVVDNLILNSDhVYHMLALITGLSVEADKRAKRAVVGCGGCFPEVFKDAEEVQLFLGNAGTAMRPLTAAVAAAGNATVYLLDGVPMRMRERFIQDLVGLKQLGADDCFLGTCPPVR : 225
TaEPSPS : GTTVVDNLILNSDhVYHMLALITGLSVEADKRAKRAVVGCGGCFPEVFKDAEEVQLFLGNAGTAMRPLTAAVAAAGNATVYLLDGVPMRMRERFIQDLVGLKQLGADDCFLGTCPPVR : 224
ZmEPSPS : GTTVVDNLILNSDhVYHMLALITGLSVEADKRAKRAVVGCGGCFPEVFKDAEEVQLFLGNAGTAMRPLTAAVAAAGNATVYLLDGVPMRMRERFIQDLVGLKQLGADDCFLGTCPPVR : 155
engIIGLPGGKVKLSGISISSQVLSLLMAAPLALGDVEIEIDKLSIPVYVNTILRMERFGVhEHSdWDRFYIKGQKYSRPNAYVEGDASSAVFLAGAAITGGTVIVEGCGGTSLSQ : 346
SiEPSPS : VRIGLPGGKVKLSGISISSQVLSLLMAAPLALGDVEIEIDKLSIPVYVNTILRMERFGVhEHSdWDRFYIKGQKYSRPNAYVEGDASSAVFLAGAAITGGTVIVEGCGGTSLSQ : 346
bDEPSPS : INIGLPGGKVKLSGISISSQVLSLLMAAPLALGDVEIEIDKLSIPVYVNTILRMERFGVhEHSdWDRFYIKGQKYSRPNAYVEGDASSAVFLAGAAITGGTVIVEGCGGTSLSQ : 347
ObEPSPS : INIGLPGGKVKLSGISISSQVLSLLMAAPLALGDVEIEIDKLSIPVYVNTILRMERFGVhEHSdWDRFYIKGQKYSRPNAYVEGDASSAVFLAGAAITGGTVIVEGCGGTSLSQ : 286
LmEPSPS : INIGLPGGKVKLSGISISSQVLSLLMAAPLALGDVEIEIDKLSIPVYVNTILRMERFGVhEHSdWDRFYIKGQKYSRPNAYVEGDASSAVFLAGAAITGGTVIVEGCGGTSLSQ : 274
SHEPSPS : INIGLPGGKVKLSGISISSQVLSLLMAAPLALGDVEIEIDKLSIPVYVNTILRMERFGVhEHSdWDRFYIKGQKYSRPNAYVEGDASSAVFLAGAAITGGTVIVEGCGGTSLSQ : 346
EIAPSPS : VRIGLPGGKVKLSGISISSQVLSLLMAAPLALGDVEIEIDKLSIPVYVNTILRMERFGVhEHSdWDRFYIKGQKYSRPNAYVEGDASSAVFLAGAAITGGTVIVEGCGGTSLSQ : 282
SHEPSPS[50] : INIGLPGGKVKLSGISISSQVLSLLMAAPLALGDVEIEIDKLSIPVYVNTILRMERFGVhEHSdWDRFYIKGQKYSRPNAYVEGDASSAVFLAGAAITGGTVIVEGCGGTSLSQ : 281
MaEPSPS : VNTIGLPGGKVKLSGISISSQVLSLLMAAPLALGDVEIEIDKLSIPVYVNTILRMERFGVhEHSdWDRFYIKGQKYSRPNAYVEGDASSAVFLAGAAITGGTVIVEGCGGTSLSQ : 351
TaEPSPS : INIGLPGGKVKLSGISISSQVLSLLMAAPLALGDVEIEIDKLSIPVYVNTILRMERFGVhEHSdWDRFYIKGQKYSRPNAYVEGDASSAVFLAGAAITGGTVIVEGCGGTSLSQ : 347
ZmEPSPS : VNTIGLPGGKVKLSGISISSQVLSLLMAAPLALGDVEIEIDKLSIPVYVNTILRMERFGVhEHSdWDRFYIKGQKYSRPNAYVEGDASSAVFLAGAAITGGTVIVEGCGGTSLSQ : 281
engIIGLPGGKVKLSGISISSQVLSLLMAAPLALGDVEIEIDKLSIPVYVNTILRMERFGVhEHSdWDRFYIKGQKYSRPNAYVEGDASSAVFLAGAAITGGTVIVEGCGGTSLSQ

*          *          *          *          *          *          *          *          *          *          *          *          *          *          *
          260          280          300          320          340          360
SiEPSPS : VRIGLPGGKVKLSGISISSQVLSLLMAAPLALGDVEIEIDKLSIPVYVNTILRMERFGVhEHSdWDRFYIKGQKYSRPNAYVEGDASSAVFLAGAAITGGTVIVEGCGGTSLSQ : 346
bDEPSPS : INIGLPGGKVKLSGISISSQVLSLLMAAPLALGDVEIEIDKLSIPVYVNTILRMERFGVhEHSdWDRFYIKGQKYSRPNAYVEGDASSAVFLAGAAITGGTVIVEGCGGTSLSQ : 347
ObEPSPS : INIGLPGGKVKLSGISISSQVLSLLMAAPLALGDVEIEIDKLSIPVYVNTILRMERFGVhEHSdWDRFYIKGQKYSRPNAYVEGDASSAVFLAGAAITGGTVIVEGCGGTSLSQ : 286
LmEPSPS : INIGLPGGKVKLSGISISSQVLSLLMAAPLALGDVEIEIDKLSIPVYVNTILRMERFGVhEHSdWDRFYIKGQKYSRPNAYVEGDASSAVFLAGAAITGGTVIVEGCGGTSLSQ : 274
SHEPSPS : INIGLPGGKVKLSGISISSQVLSLLMAAPLALGDVEIEIDKLSIPVYVNTILRMERFGVhEHSdWDRFYIKGQKYSRPNAYVEGDASSAVFLAGAAITGGTVIVEGCGGTSLSQ : 346
EIAPSPS : VRIGLPGGKVKLSGISISSQVLSLLMAAPLALGDVEIEIDKLSIPVYVNTILRMERFGVhEHSdWDRFYIKGQKYSRPNAYVEGDASSAVFLAGAAITGGTVIVEGCGGTSLSQ : 282
SHEPSPS[50] : INIGLPGGKVKLSGISISSQVLSLLMAAPLALGDVEIEIDKLSIPVYVNTILRMERFGVhEHSdWDRFYIKGQKYSRPNAYVEGDASSAVFLAGAAITGGTVIVEGCGGTSLSQ : 281
MaEPSPS : VNTIGLPGGKVKLSGISISSQVLSLLMAAPLALGDVEIEIDKLSIPVYVNTILRMERFGVhEHSdWDRFYIKGQKYSRPNAYVEGDASSAVFLAGAAITGGTVIVEGCGGTSLSQ : 351
TaEPSPS : INIGLPGGKVKLSGISISSQVLSLLMAAPLALGDVEIEIDKLSIPVYVNTILRMERFGVhEHSdWDRFYIKGQKYSRPNAYVEGDASSAVFLAGAAITGGTVIVEGCGGTSLSQ : 347
ZmEPSPS : VNTIGLPGGKVKLSGISISSQVLSLLMAAPLALGDVEIEIDKLSIPVYVNTILRMERFGVhEHSdWDRFYIKGQKYSRPNAYVEGDASSAVFLAGAAITGGTVIVEGCGGTSLSQ : 281
engIIGLPGGKVKLSGISISSQVLSLLMAAPLALGDVEIEIDKLSIPVYVNTILRMERFGVhEHSdWDRFYIKGQKYSRPNAYVEGDASSAVFLAGAAITGGTVIVEGCGGTSLSQ

*          *          *          *          *          *          *          *          *          *          *          *          *          *          *
          380          400          420          440          460          480
SiEPSPS : GDVKFAEVLNMGAKVTTTSVTVTGPGRPPRGKRHLKALDVNMNMKMPDVTMLAVVALFADGPTAIRDVASWRVKTERVMAITELKIGAVVEEGDYCIITPPEKLNIVTIDTYDDH : 470
bDEPSPS : GDVKFAEVLNMGAKVTTTSVTVTGPGRPPRGKRHLKALDVNMNMKMPDVTMLAVVALFADGPTAIRDVASWRVKTERVMAITELKIGAVVEEGDYCIITPPEKLNIVTIDTYDDH : 465
ObEPSPS : GDVKFAEVLNMGAKVTTTSVTVTGPGRPPRGKRHLKALDVNMNMKMPDVTMLAVVALFADGPTAIRDVASWRVKTERVMAITELKIGAVVEEGDYCIITPPEKLNIVTIDTYDDH : 411
LmEPSPS : GDVKFAEVLNMGAKVTTTSVTVTGPGRPPRGKRHLKALDVNMNMKMPDVTMLAVVALFADGPTAIRDVASWRVKTERVMAITELKIGAVVEEGDYCIITPPEKLNIVTIDTYDDH : 396
TaEPSPS : GDVKFAEVLNMGAKVTTTSVTVTGPGRPPRGKRHLKALDVNMNMKMPDVTMLAVVALFADGPTAIRDVASWRVKTERVMAITELKIGAVVEEGDYCIITPPEKLNIVTIDTYDDH : 426
EIAPSPS : GDVKFAEVLNMGAKVTTTSVTVTGPGRPPRGKRHLKALDVNMNMKMPDVTMLAVVALFADGPTAIRDVASWRVKTERVMAITELKIGAVVEEGDYCIITPPEKLNIVTIDTYDDH : 404
SHEPSPS[50] : GDVKFAEVLNMGAKVTTTSVTVTGPGRPPRGKRHLKALDVNMNMKMPDVTMLAVVALFADGPTAIRDVASWRVKTERVMAITELKIGAVVEEGDYCIITPPEKLNIVTIDTYDDH : 403
MaEPSPS : GDVKFAEVLNMGAKVTTTSVTVTGPGRPPRGKRHLKALDVNMNMKMPDVTMLAVVALFADGPTAIRDVASWRVKTERVMAITELKIGAVVEEGDYCIITPPEKLNIVTIDTYDDH : 473
TaEPSPS : GDVKFAEVLNMGAKVTTTSVTVTGPGRPPRGKRHLKALDVNMNMKMPDVTMLAVVALFADGPTAIRDVASWRVKTERVMAITELKIGAVVEEGDYCIITPPEKLNIVTIDTYDDH : 465
ZmEPSPS : GDVKFAEVLNMGAKVTTTSVTVTGPGRPPRGKRHLKALDVNMNMKMPDVTMLAVVALFADGPTAIRDVASWRVKTERVMAITELKIGAVVEEGDYCIITPPEKLNIVTIDTYDDH : 4
```

黑色代表相同的氨基酸, 各种5-烯醇式丙酮酸莽草酸-3-磷酸合酶缩写代表植物如下。SiEPSPS(XM_004964389.1), *Setaria italica*; 多花黑麦草: LmEPSPS(AAZ79230.2), *Lolium multiflorum*; 短柄草: BdEPSPS(XP_003557242.1), *Brachypodium distachyon*; 野生稻: ObEPSPS(XP_006656606.1), *Oryza brachyantha*; 小麦: TaEPSPS(ACH72672.1), *Triticum aestivum*; 高粱: SbEPSPS(XP_002436424.1), *Sorghum bicolor*; 牛筋草: EiEPSPS(CAD01096.1), *Eileusine indica*; 玉米: ZmEPSPS(CAA44974.1), *Zea mays*; 石茅: ShEPSPS(AEP26124.1), *Sorghum hale-pense*; 芭蕉: MaEPSPS(CAA44974.1), *Musa acuminata* AAA Group; 芭蕉: ZmEPSPS(XP_009418331.1), *Musa acuminata* AAA Group。采用T-Coffee(<http://tcoffee.crg.cat/apps/tcoffee/do:regular>)、GeneDoc软件进行同源性比较。

图3 *SiEPSPS* 基因编码氨基酸序列与其他植物中该序列的比较

2.2 谷子 *EPSPS* 基因的定点突变

将扩增得到的基因片段连接到 pLB 载体,测序正确后将质粒命名为 pLB - *SiEPSPS* (图 1 - b)。根据序列比对找到谷子中 EPSPS 的保守位点。谷子 EPSPS (*SiEPSPS*) 第 162 ~ 174 位之间的氨基酸序列是草甘膦的结合位点,根据相关研究推测第 173 位脯氨酸 (Pro) 是重要位点之一,设计引物将此位点的氨基酸进行突变。以质粒 pLB - *SiEPSPS* 为模板,采用重叠延伸 PCR 定点突变技术,以前 2 次的 PCR 产物为模板进行第 3 次 PCR,获得突变后的目的 DNA 片段。送样测序,获得重组突变质粒 pLB - *Siepsps* (图 4)。突变后的 *Siepsps* 基因编码的蛋白有 1 个氨基酸发生变化,即 173 位脯氨酸 (Pro) 变为丝氨酸 (Ser) (图 5)。

2.3 谷子 *EPSPS* 基因启动子的生物信息学分析

由表 1 可知, *SlEPSPS* 启动子中含有多个参与响应激素和逆境胁迫的应答元件, 如参与干旱胁迫的 MYB 转录因子结合位点 (MYB binding site, MBS)、ABA 响应元件 (ABA-responsive element, ABRE)、赤霉素响应元件 (gibberellin-responsive element, P-box)、生长素响应元件 (auxin-responsive element, TGA)、生理节奏控制元件 (involved in circadian con-

trol, circadian) 等。

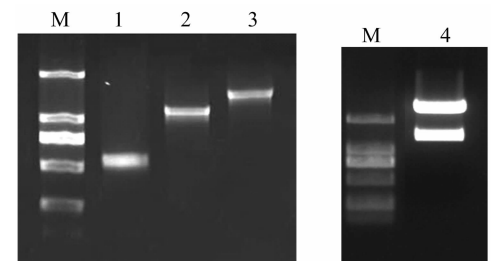


图4 谷子 *Siepsps* 基因 cDNA 扩增片段和酶切鉴定

PSPS GGAACAGCGATGCGGCCGTTGACAGCAGCC
psps GGAACAGCGATGCGGTCGTGTTGACAGCAGCC

编码Pro的密码子第1个碱基C突变为T(下划线),
 编码氨基酸由Pro变为Ser

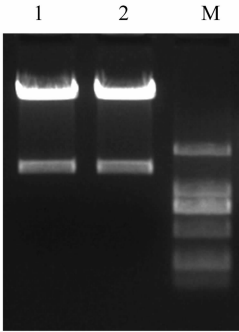
图5 *SiEPSPS* 基因点突变示意

表 1 *SiEPSPS* 启动子顺式作用元件分析

元件名称	物种	碱基数(个)	序列	作用
5UTR Py - rich stretch	<i>Lycopersicon esculentum</i>	10	TTTCTTCTCT	与强转录表达有关
ABRE	<i>Hordeum vulgare</i>	10	CCTACGTGGC	参与脱落酸反应
ACE	<i>Petroselinum crispum</i>	10	ACTACGTTGG	参与光反应
GCN4 - motif	<i>Oryza sativa</i>	7	TGACTCA	参与胚乳特异基因表达
MBS	<i>Zea mays</i>	6	CGGTCA	与 MYB 转录因子结合相关
O2 - site	<i>Zea mays</i>	10	GATGACATGA	参与玉米蛋白代谢调节
P - box	<i>Oryza sativa</i>	7	CCTTTTG	参与赤霉素反应
Skn - 1 - motif	<i>Oryza sativa</i>	5	GTCAT	参与分生组织调节
TC - rich repeats	<i>Nicotiana tabacum</i>	10	ATTTTCTCCA	参与抗逆反应基因表达
TCA - element	<i>Brassica oleracea</i>	10	GAGAAGAATA	参与水杨酸反应
TGA - element	<i>Brassica oleracea</i>	6	AACGAC	参与生长素反应
TGACG - motif	<i>Hordeum vulgare</i>	5	TGACG	参与茉莉酸甲酯反应
circadian	<i>Lycopersicon esculentum</i>	10	CAANNNNATC	参与光周期调控

2.4 植物表达载体 pWM - EPSPS 的构建

为转化植物构建真核表达载体。将 *EPSPS*、*epsps* 与克隆载体相连,连接产物转化大肠杆菌,提取质粒。分别采用限制性内切酶将克隆载体和表达载体双酶切,回收后将含有 *EPSPS*、*epsps* 基因编码区插入表达载体 pWM,构成过表达、定点突变表达载体,分别命名为 pWM - *EPSPS*、pWM - *epsps* (图 3)。酶切鉴定表明,2 种表达载体已构建成功(图 6)。

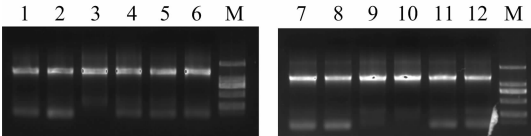


M—DNA marker; 1—pWM-*EPSPS*的酶切鉴定;
2—pWM-*epsps*的酶切鉴定

图6 表达载体酶切鉴定

2.5 重组表达载体导入农杆菌

将植物表达载体 pWM - *EPSPS*、pWM - *epsps* 转化农杆菌 LBA4404 感受态细胞,在含有卡那霉素的培养基上进行筛选,挑选克隆并进行菌液 PCR 扩增。结果显示,获得 1.5 kb 的预期片段(图 7),表明表达载体已成功导入农杆菌中。



M—DNA marker; 1~6—pWM-*EPSPS*表达载体PCR产物;
7~12—pWM-*epsps*表达载体PCR产物

图7 表达载体菌液PCR检测

3 结论与讨论

草甘膦是一种环境友好、无污染、高效的除草剂,对杂草具有极强的清除能力,自问世以来已在中国使用了 30 余年^[20-21]。然而,长期施用草甘膦必将导致一些抗性杂草的产

生。*EPSPS* 保守区中脯氨酸(Pro)位点的突变是杂草获得抗性的一个重要机制。迄今为止,抗草甘膦杂草中 *EPSPS* 基因的突变主要涉及到 106 位脯氨酸突变为丙氨酸、亮氨酸,以及亲水性氨基酸丝氨酸、苏氨酸。此外,有学者通过定向诱变技术改造 *EPSPS*,产生双位点突变的 *EPSPS*,使玉米和油菜获得抗性^[22-24]。Yu 等研究发现,在具有草甘膦抗性的牛筋草中,其体内 *EPSPS* 的苏氨酸突变为异亮氨酸,脯氨酸突变为丝氨酸^[25]。与单一位点突变相比,*EPSPS* 双位点突变能够赋予植物对草甘膦更强的抗性。Pro 单个位点的突变仅轻微影响了 *EPSPS* 对草甘膦/烯醇式丙酮酸的结合能力,赋予植物草甘膦抗性的同时又不影响 *EPSPS* 正常的生物学功能。与此相比,双位点突变在获得较高抗性的同时,导致 *EPSPS* 对草甘膦/烯醇式丙酮酸的结合能力较大程度降低,使莽草酸途径受阻,最终抑制植物体内芳香族氨基酸的合成,对植物的生长发育等代谢过程产生影响。综合考虑,单一位点突变在抗草甘膦的研究与应用中更具优势。

本研究采用 RT - PCR 和定点突变技术分别获得全长 1 573 bp 的 *EPSPS* 和 *epsps* 基因,该序列开放阅读框 1 536 bp,编码 511 个 *EPSPS* 前体多肽。经 ChloroP 1.1 Server 软件在线预测,前体多肽中含有叶绿体转运肽,可将 *EPSPS* 蛋白定位到叶绿体中行使功能。启动子元件分析表明, *EPSPS* 含有多个与光响应的元件,这与 *EPSPS* 的定位相符合。而对草甘膦具有抗性的 *EPSPS* 基因大多来源于不具有叶绿体转运肽的细菌,在植物中应用须整合外源叶绿体转运肽。经 ProtParam tool 软件预测,该基因编码的蛋白质分子量为 51.3 ku,等电点(pI)为 8.05。在谷子基因组序列中, *SiEPSPS* 具有 8 个外显子、7 个内含子,位于第 4 号染色体上。进化树分析表明, *SiEPSPS* 与黑麦草、小麦、短柄草、高粱等植物的 5 - 烯醇式丙酮酸莽草酸 - 3 - 磷酸合酶高度同源。 *SiEPSPS* 基因具有与其他植物中 5 - 烯醇式丙酮酸莽草酸 - 3 - 磷酸合酶基因相同的 2 个序列保守区域,即 conserved site I、conserved site II,分别位于 162 ~ 174、423 ~ 442 bp。conserved site I 是 *EPSPS* 的活性位点,也是草甘膦的作用位点,保守序列为 LFLGNAGTAMRPL,该区域某些位点发生突变将导致对草甘膦具有抗性;conserved site II 保守序列为 RVKET-ERMVAIRTELTKLGA,位于 *EPSPS* 的 C 端,含有保守的赖氨

酸,对 EPSPS 的活性具有重要作用。

本研究利用基因重组技术成功构建了由 CaMV35S 启动子调控的植物表达载体 pWM-EPSPS、pWM-epsps,并将其导入根癌农杆菌 LBA4404,为该基因功能的研究、进一步转化谷子、培育抗除草剂谷子新品种提供依据。

参考文献:

- [1] Duke S O, Powles S B. Glyphosate: a once-in-a-century herbicide[J]. Pest Management Science, 2008, 64(4): 319-325.
- [2] Brookes G, Barfoot P. The global income and production effects of genetically modified (GM) crops: 1996—2011[J]. GM Crops & Food, 2013, 4(1): 74-83.
- [3] Gardner J G, Nelson G C. Herbicides, glyphosate resistance and acute mammalian toxicity: simulating an environmental effect of glyphosate-resistant weeds in the USA[J]. Pest Management Science, 2008, 64(4): 470-478.
- [4] Bonny S. Herbicide-tolerant transgenic soybean over 15 years of cultivation: pesticide use, weed resistance, and some economic issues[M]. Sustainability, 2011, 3(9): 1302-1322.
- [5] Steinrücken H C, Amrhein N. The herbicide glyphosate is a potent inhibitor of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase[J]. Biochemical and Biophysical Research Communications, 1980, 94(4): 1207-1212.
- [6] Alibhai M F, Stallings W C. Closing down on glyphosate inhibition: with a new structure for drug discovery[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(6): 2944-2946.
- [7] Howe A R, Gasser C S, Brown S M, et al. Glyphosate as a selective agent for the production of fertile transgenic maize (*Zea mays* L.) plants[J]. Molecular Breeding, 2002, 10(3): 153-164.
- [8] Wang H Y, Li Y F, Xie L X, et al. Expression of a bacterial aroA mutant, aroA-M1, encoding 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase for the production of glyphosate-resistant tobacco plants[J]. Journal of Plant Research, 2003, 116(6): 455-460.
- [9] Ye G N, Hajdukiewicz P T, Broyles D, et al. Plastid-expressed 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase genes provide high level glyphosate tolerance in tobacco[J]. Plant Journal, 2001, 25(3): 261-270.
- [10] Garbe T, Jones C, Charles I, et al. Cloning and characterization of the aroA gene from *Mycobacterium tuberculosis* [J]. Journal of Bacteriology, 1990, 172(12): 6774-6782.
- [11] Ream J E, Steinrücken H C, Porter C A, et al. Purification and properties of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase from dark-grown seedlings of *Sorghum bicolor* [J]. Plant Physiology, 1988, 87(1): 232-238.
- [12] Xu J W, Feng D J, Li X G, et al. Cloning of genomic DNA of rice 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene and chromosomal localization of the gene[J]. Science in China: Series C, Life Sciences, 2002, 45(3): 251-259.
- [13] Gong Y, Liao Z, Chen M, et al. Characterization of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene from *Camptotheca acuminata* [J]. Biologia Plantarum, 2006, 50(4): 542-550.
- [14] Funke T, Han H, Healy F M L, et al. Molecular basis for the herbicide resistance of Roundup Ready crops[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2006, 103(35): 13010-13015.
- [15] Sun Y C, Chen Y C, Tian Z X, et al. Novel AroA with high tolerance to glyphosate, encoded by a gene of *Pseudomonas putida* 4G-1 isolated from an extremely polluted environment in China[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2005, 71(8): 4771-4776.
- [16] Chen J C, Huang H J, Zhang C X, et al. Mutations and amplification of EPSPS gene confer resistance to glyphosate in goosegrass (*Eleusine indica*) [J]. Planta, 2015, 242(4): 859-868.
- [17] Castle L A, Siehl D L, Gorton R, et al. Discovery and directed evolution of a glyphosate tolerance gene[J]. Science, 2004, 304(5674): 1151-1154.
- [18] Baerson S R, Rodriguez D J, Tran M, et al. Glyphosate-resistant goosegrass. Identification of a mutation in the target enzyme 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase[J]. Plant Physiology, 2002, 129(3): 1265-1275.
- [19] González T F, Gil-Humanes J, Barro F, et al. Target site mutation and reduced translocation are present in a glyphosate-resistant *Lolium multiflorum* Lam. biotype from Spain[J]. Plant Physiology and Biochemistry, 2012, 58(3): 16-22.
- [20] 陈建华, 卢敏, 蔡志斌. 维生素 C 拮抗草甘膦对蚯蚓急性毒性的作用[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(7): 411-413, 425.
- [21] 王莹, 袁英. 抗除草剂转基因玉米的快速鉴定方法[J]. 江苏农业科学, 2014, 42(4): 54-56.
- [22] Alarcon R R, Garcia A, Urzua J A. Resistance to glyphosate in jungerice (*Echinochloa colona*) from California[J]. Weed Science, 2013, 61(1): 48-54.
- [23] Howe A R, Gasser C S, Brown S M, et al. Glyphosate as a selective agent for the production of fertile transgenic maize (*Zea mays* L.) plants[J]. Molecular Breeding, 2002, 10(3): 153-164.
- [24] Kahrizi D, Salmanian A H, Afshari A, et al. Simultaneous substitution of Gly96 to Ala and Ala183 to Thr in 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase gene of *E. coli* (k12) and transformation of rapeseed (*Brassica napus* L.) in order to make tolerance to glyphosate[J]. Plant Cell Reports, 2007, 26(1): 95-104.
- [25] Yu Q, Jalaludin A, Han H, et al. Evolution of a double amino acid substitution in the 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase in *Eleusine indica* conferring high-level glyphosate resistance[J]. Plant Physiology, 2015, 167(4): 1440-1447.