

茄红素- β -环化酶反义 RNA 基因对烟草的遗传转化*

梁燕¹, 王鸣¹, 陈杭², 陈大明²

(1 西北农林科技大学 园艺学院, 陕西 杨陵 712100; 2 国家蔬菜系统工程中心, 北京 100081)

[摘要] 采用农杆菌介导的叶盘法, 用胡萝卜茄红素- β -环化酶反义 RNA 基因对烟草 SR I 野生类型种及 Xanthi 品种进行了遗传转化。GUS 检测结果表明, 胡萝卜茄红素- β -环化酶反义 RNA 基因对两个不同烟草材料的遗传转化率均为 41.7%; Xanthi Southern 杂交的阳性率为 67%; 转基因烟草当代叶片组织中茄红素和胡萝卜素含量与对照植株不同。

[关键词] 烟草; 茄红素- β -环化酶反义 RNA 基因; 遗传转化

[中图分类号] S572.035.3

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2003)03-0073-04

近年大量研究发现^[1], 茄红素的强抗氧化特性不仅对植物光合作用器官具有保护作用, 更重要的是对人类的营养和保健及一些癌症的预防具有很高的价值, 但在自然状态下, 多数植物中的茄红素含量均较低。因此, 如何提高植物中茄红素的含量, 已成为研究的主攻方向。由于茄红素是植物类胡萝卜素代谢的中间产物, 类胡萝卜素代谢属于植物类异戊二烯合成代谢的一部分。类异戊二烯合成代谢是一个极其复杂而庞大的代谢系统, 受到发育阶段和生长环境等诸多因素的影响^[2]。因此, 通过外部因子来调节类胡萝卜素代谢和积累很难奏效。

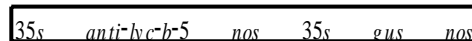
生物基因工程技术使通过基因操作来调节植物类胡萝卜素代谢, 提高茄红素含量成为可能。有人^[3]已经进行了这方面的尝试, 将光合细菌八氢番茄红素脱氢酶基因(*crtI*)转入番茄中, 希望提高茄红素的含量, 结果茄红素的含量没有提高, 胡萝卜素的含量却比对照提高了 3.5 倍。因为茄红素是胡萝卜素的合成前体物, 如果顺向增强有关茄红素合成酶的表达, 而不阻断茄红素向胡萝卜素的转化, 就很难达到提高茄红素含量的目的。尽管提高茄红素含量的目的没有达到, 但给进一步通过转基因提高植物茄红素含量的研究提供了新的思路。本研究试图通过反义 RNA 技术, 抑制茄红素向胡萝卜素的转化, 达到提高茄红素含量的目的。

1 材料与方法

1.1 载体构建与农杆菌的转化

利用国家蔬菜系统工程中心品质改良实验室克

隆的胡萝卜茄红素- β -环化酶基因(*lyc-b*), 构建了包含该基因 5' 端非编码区在内的 397 bp 反义 RNA 基因和 GUS 报告基因的植物表达载体(pB L-5), 大约 12.8 kb, 载体图谱如下。



采用三亲杂交法^[4]转化根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)到 GV 3101 中。

1.2 遗传转化与植株再生

挑选含有 pB L-5 的 GV 3101 单菌落进行液体培养, 当 OD₆₀₀ = 0.5 左右时, 4 × 5 000 r/min 离心 10 min, 弃上清液, 沉淀菌体重悬于 1/2 MS 液体培养基中。

以 SR I 和 Xanthi 为材料, 从 7~10 d 苗龄的无菌苗上采幼嫩健康的叶片, 去掉主叶脉, 切成 0.5~1.0 cm² 小片, 浸入上述菌液 20~30 min, 在无菌滤纸上吸干菌液, 转移至共培养基 MS + 0.5 mg/L 6-BA 上, 28 ℃, 2~3 d 后转至诱芽培养基 MS + 0.5 mg/L 6-BA + 100 mg/L Kan + 250 mg/L Carb 上, 置于 25 ℃, 光照条件下进行诱芽培养, 当芽长 1 cm 左右时, 切芽并将其转入生根培养基 MS + 0.2 mg/L NAA + 100 mg/L Kan + 250 mg/L Carb 中, 同时进行 GUS 检测, 当根长出并有 3~4 片叶时, 将幼苗转入完全苗发育培养基 1/2 MS + 100 mg/L Kan + 250 mg/L Carb, 当幼苗有 4~5 片叶时, 开始练苗, 移入蛭石或直接移入无菌营养土, 温室条件下生长。成株后, 取叶片进行鉴定。

1.3 转基因植株的检测与鉴定

GUS 检测 用甲醇 X-glc 贮存液体积比为

* [收稿日期] 2002-06-11

[基金项目] 国家自然科学基金资助项目(30070525); 北京市科技新星项目(9558101400)

[作者简介] 梁燕(1963-), 女, 陕西渭南人, 副研究员, 博士, 主要从事蔬菜遗传育种及基因工程研究。

1 4 配制成 X-gluc 工作液,从植株上随机取 1 片叶子,加入适量的工作液于 37 °C 过夜,用体积分数 70% 的酒精脱色。

Southern 杂交 采用 CTAB 法提取烟草 GU S 检测阳性株和未转化植株的总 DNA^[5]。取 8~10 μ g DNA 用 *Hind*III 消化,阳性对照 pB L-5 同样消化,消化完全的酶切液用 0.8% 琼脂糖凝胶, TBE 缓冲液, 30 V 电泳过夜。用碱转移法转膜^[6], 转至 Nybond-N⁺ 尼龙膜上。用放射性标记法进行杂交, 杂交由中国科学院遗传研究所完成。

茄红素及胡萝卜素含量的测定 具体方法参照 Nishi 等^[7] 的方法, 用 U-340 Spectrophotometer HITACHI (Japan) 分别测定 445, 470 nm 处的光吸收值, 茄红素和胡萝卜素含量分别用 470, 445 nm 处的光吸收值表示。

2 结果与分析

2.1 GU S 检测

报告基因是一种编码可被检测的蛋白质或酶的基因, 该基因的表达产物非常容易被鉴定出来。所以, 通常在转基因过程中将其与目的基因相融合, 以便对转化体进行随时筛选减少工作量及盲目性。GU S (β -葡萄糖苷酸酶) 基因是最常用的一种报告基因, 由于植物体中不存在此基因, 没有检测背景问题, 而且表达稳定、检测结果明显易见, 所以广泛用于植物转化体的检测。对烟草转化体在不同发育阶

段进行跟踪检测, 结果见表 1。

表 1 烟草转基因植株不同发育阶段的 GU S 检测

Table 1 GU S test for infected tobacco plants at different stages

类型 Type	发育时期 Stage	检测数 Tested plants	检出数 Number of positive plant	检出率/% Positive rate
Xanthi	幼芽 Bud	24	12	50.0
	成株 Plant	24	10	41.7
SR I	幼芽 Bud	24	6	25.0
	成株 Plant	24	10	41.7

从表 1 可以看出, 在 Xanthi 的 24 株被检植株中, 幼芽期阳性株有 12 株, 成株期阳性株 10 株, 在这 10 株当中有 4 株在幼芽期未被检出, 而幼芽期检出的 6 株阳性株在成株期却表现为阴性。SR I 也有类似的情况。这说明 GU S 基因的表达具有阶段性, 而且在不同植株中的表达强弱也不同(图 1), 2 号植株叶片表达强于 1 号植株。所以, 在转基因植株的 GU S 检测中, 一方面要注意进行多次检测, 另一方面, 不能将某次检测呈阴性的植株轻易抛弃掉, 造成阳性植株的丢失。

2.2 Southern 杂交结果

以目的基因为探针 (397 bp), 并用 ³²P 标记, 用 CTAB 法提取总 DNA, 用 *Hind*III 消化 pB L-5 质粒及未进行转化的烟草植株和部分 GU S 检测阳性株总 DNA, 电泳转膜, 进行 Southern 杂交, 结果如图 2。

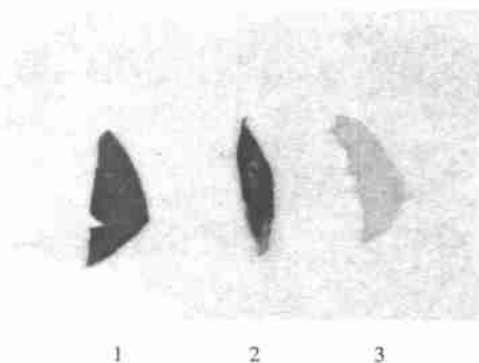


图 1 烟草转基因植株 GU S 检测结果

1~2 GU S 检测阳性; 3 GU S 检测阴性

Fig 1 GU S test of Xanthi infected plants

1- 2 Leaves positive to GU S test;
3 Leaves negative to GU S test

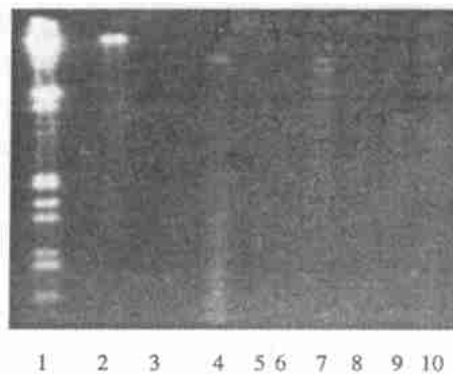


图 2 转基因 Xanthi 植株总 DNA 的 Southern 杂交结果

1. DNA/*Hind*III+*Eco*R I 分子质量标准; 2 + CK (pB L-5/*Hind*III);
3 - CK (未转化株); 4, 7~10 已转化; 5~6 未被转化株

Fig 2 Southern blot hybridization of genomic DNA from Xanthi plants positive to GU S test

1. DNA/*Hind*III+*Eco*R I marker; 2 + CK (pB L-5/*Hind*III); 3 - CK; 4, 7- 10. Transgenic plants;
5- 6 non-transgenic plants

由图 2 可见, 在被检的 6 株中共有 4 株显示为转基因植株, 阳性率为 67%, 其中 2 株是在成株期检测出来的 GU S 阳性株, 4 株是在幼芽期检测出来

的 GU S 阳性株。杂交带位置和条数的不同, 说明 T-DNA 整合在烟草染色体上的位点不同和拷贝数不同, Line 4 的拷贝数为 1, Line 7 的拷贝数为 3, Line

8的拷贝数为2, Line9和10的拷贝数为3。

2.3 转基因植株当代的表现

用丙酮法对 Southern 杂交阳性株叶片中茄红素及胡萝卜素含量测定结果如图3。由图3可以看出, 未转化的烟草植株(第1株)中茄红素含量低于胡萝卜素。在2株转基因植株中, 有1株(第2株)茄红素含量高于胡萝卜素含量; 另1株(第3株)茄红素和胡萝卜素的相对含量与对照植株相同, 表现为茄红素含量低于胡萝卜素含量, 但是茄红素含量的绝对值高于对照植株, 而胡萝卜素含量绝对值低于对照。转基因植株与对照植株相比, 茄红素含量的绝对值明显提高。这些变化可能就是胡萝卜茄红素- β 环化酶反义RNA基因表达的结果, 转基因植株间的差异可能由转入基因的位点及拷贝数不同所致。从外部特征看, 阳性株与对照植株的外部特征及生长势之间没有明显的不同。

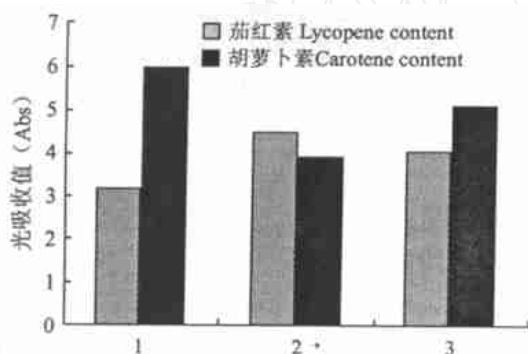


图3 转基因烟草茄红素及胡萝卜素含量的变化

1. 未转化植株; 2, 3. 转基因植株

Fig. 3 Contents of lycopene and carotene in transgenic tobacco plant

1. Non-transgenic plant; 2, 3. Transgenic tobacco plants

3 讨论

反义技术又称反义RNA (Anti-sense RNA) 技术, 是近年来刚发展起来的一种分子生物学新技术, 这项技术在基因的定向表达、调控及基因功能研究等方面具有很重要的作用^[8]。根据靶基因序列设计

一段与靶基因mRNA互补的RNA (反义RNA) 或是编码与靶基因mRNA互补的RNA的基因 (反义RNA基因), 将反义RNA或反义RNA基因导入受体细胞, 通过反义RNA与靶基因mRNA特异性的互补结合, 抑制靶基因mRNA的翻译与加工, 实现对靶基因表达的抑制或阻断^[8]。有研究表明^[9], 在真核生物中对应于5'端非编码区的反义RNA可能比针对编码区的反义RNA更有效。笔者根据这些原理设计和构建了胡萝卜茄红素- β 环化酶反义RNA基因, 并对烟草进行了遗传转化, 希望通过该基因在烟草细胞中转录出一段茄红素- β 环化酶mRNA的反义RNA, 并与烟草的茄红素- β 环化酶基因mRNA结合, 抑制烟草茄红素- β 环化酶基因的表达, 使烟草类胡萝卜素代谢过程停留在茄红素, 而不进一步转化为胡萝卜素。

从本研究结果可以看出, 转入的基因对烟草当代植株的茄红素和胡萝卜素合成代谢已表现出一定的影响, 而且这一结果与预期目标相吻合。只是转入基因对烟草不同植株茄红素和胡萝卜素代谢的影响不同, 对照杂交结果, 这2株都有3个以上的目的基因拷贝, 但转基因的表现型却不同, 这也是植物转基因中普遍存在的现象^[10]。然而对于植株(第3株)中茄红素与胡萝卜素只是绝对量有变化而两者的相对关系与对照并无区别, 转入的基因是否是导致这一结果的直接原因尚需进一步研究。

烟草是一种非积累茄红素和胡萝卜素的植物, 这2种物质仅仅是烟草合成光合作用所需类胡萝卜素的中间物质。如果茄红素- β 环化酶基因被完全抑制, 那么, 光合作用所需的环化类胡萝卜素就不能合成, 光合作用将无法进行甚至会导致植株的死亡。实际上, 转基因植株与对照植株的外部特征和生长状况几乎没有区别。这可能预示着转入基因对烟草茄红素- β 环化酶只有部分的抑制作用, 不至于影响其光合作用的正常进行。这与反义技术或PTGS/RNAi (RNA interference) 的作用特点相一致^[8, 10]。

致谢: 对曹宛虹和刘敬梅女士在杂交方面的帮助特表谢忱。

[参考文献]

- [1] Stahl W, Sies H. Lycopene: a biologically important carotenoid for humans? [J]. Arch Biochem Biophys, 1996, 336: 1- 9.
- [2] Gerster H. The potential role of lycopene for human health [J]. J Amer Coll Nutr, 1997, 16: 109- 126.
- [3] Rone G, Cohen M, Zamir D, et al Regulation of carotenoid biosynthesis during tomato fruit development [J]. Plant J, 1999, 17: 341- 351.
- [4] Hirschberg J. Production of high-value compounds: carotenoids and vitamin E [J]. Current Opin in Biotechnology, 1999, 10: 186- 191.
- [5] [美]萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. 分子克隆实验指南 [M]. 金冬雁, 黎孟枫译. 北京: 科学出版社, 1998.

- [6] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学技术出版社, 1998
- [7] Nishi A, Yoshida A, Mori M, et al. Isolation of variant carrot cell lines with altered pigmentation[J]. *Phytochemistry*, 1974, 13: 1653-1656
- [8] Andrew J H, David C B. A species of small antisense RNA in posttranscriptional gene silencing in plants[J]. *Science*, 1999, 286: 950-951
- [9] Wassenegger M, Pelissier T. A model for RNA-mediated gene silencing in higher plants[J]. *Plant Mol Biol*, 1998, 37: 349-362
- [10] Sharp R A, Zamore P D. RNA interference[J]. *Science*, 2000, 287: 2431-2433

Transformation of anti-lyc-b in carrot to tobacco

LIANG Yan¹, WANG Ming¹, CHEN Hang², CHEN Da-ming²

(¹ College of Horticulture, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China;

² National Vegetable System Engineer Center, Beijing 100081, China)

Abstract: Transformation of anti-lyc-b in carrot to tobacco varieties SR I and Xanthi was done by infecting leaf plates with *Agrobacterium tumefaciens* carrying expression vector of the gene GUS test and Southern hybridization revealed that the rates of transformation basing on the GUS test were all 41.7%; Southern hybridization of Xanthi plants positive to GUS test showed the transformation ratio was 67%. Analysis on the contents of lycopene and carotene in Xanthi transgenic plants indicated that there were differences not only between transgenic and non-transgenic plants but also between two different transgenic plants

Key words: tobacco; anti-lyc-b; transformation

(上接第 72 页)

Study on *in vitro* selection for glyphosate-resistant callus of garlic

ZHANG En-rang, CHENG Zhi-hui

(College of Horticulture, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Four different ecotypic garlic cultivars: Gailiang, Jintang early, Cangshan and Europe 01 were chosen for this experiment. Their store-leaf with part of stem plate and callus established from it was used to select glyphosate-resistant on solid MS medium containing gradually increased concentrations of Glyphosate from 0.02%, 0.04%, 0.06%, 0.08% to 0.10%. The results show that Glyphosate inhibited callus growth completely in all tested concentration levels; direct selection on medium containing different concentration of Glyphosate showed that callus of four cultivars all had Glyphosate-resistant at lower concentration (< 0.04%) of Glyphosate; Glyphosate-resistant of callus enhanced obviously when selected by step-to-step increasing concentration of Glyphosate from MS medium. The survival rate of callus of four garlic cultivars on medium containing 0.06% glyphosate was in the range of 10.3% ~ 18.2%; Measurement of growth rate indicates that callus development was good. Some callus were survivor on medium containing 0.08% and 0.10% Glyphosate. Stability test of glyphosate-resistant showed the induced glyphosate-resistant could keep for a long time.

Key words: garlic; callus; variation; selection of glyphosate-resistant