

白藜芦醇合酶基因表达载体构建及对马铃薯的遗传转化

付洪冰¹, 刘丽艳², 刘昭军², 盛万民², 王 珣², 李 铁², 王俊河², 杨 学², 王秀君², 赵 曦²
(1. 东北农业大学园艺学院, 黑龙江哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省农业科学院, 黑龙江哈尔滨 150086)

摘要: 利用从葡萄中克隆到的白藜芦醇合酶基因(Resveratrol Synthase 简称 RS)构建了含有 35S 组成型启动子的植物表达载体 P35s-2300-RS 应用农杆菌介导方法对马铃薯品种进行遗传转化。通过对抗性芽、生根、再生植株的筛选, 得到 5 株再生小苗。经 PCR、Southern 检测证实, 有 3 株为真正的转基因植株。
关键词: 白藜芦醇合酶; 马铃薯; 表达载体; 农杆菌介导; 遗传转化
中图分类号: S531 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2767(2009)05-0001-04

Construction of Resveratrol Synthase Gene Expression Vector and the Genetic Transformation of Potato

FU Hong-bing¹, LIU Li-yan², LIU Zhao-jun², SHENG Wan-min², WANG Xun², LI Tie², WANG Jun-he², YANG Xue², WANG Xiu-jun², ZHAO Xi²
(1. Horticultural College of Northeast Agricultural University, Harbin, Heilongjiang 150030; 2 Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: The resveratrol synthase gene expression vector has been constructed with the construction of constitutive 35S promoter of the plant expression vector P35s-2300-RS (Resveratrol Synthase referred to as RS). The gene was originally cloned from grapes. The gene was transferred by the Agrobacterium-mediated into the potato varieties. The study obtained 5 regenerated seedlings by screening the resistant shoot, root, the regenerated plant, 3 of which were the real transgenic plant confirmed by PCR, Southern Testing.
Key words: resveratrol synthase; potato; expression vector; agrobacterium-mediated; genetic transformation

白藜芦醇(Resveratrol, 简称 Res)是由一些种子植物对受伤做出反应时产生的一种植保素。它由白藜芦醇合酶催化一分子香豆酰 CoA 和三分子丙二酸单酰 CoA 而形成^[1]。研究表明:作为一种植物化学物质,它具有抗真菌病害^[2]、抗肿瘤^[3]、抗氧化^[4]、抗突变^[5]、类似雌激素^[6]以及免疫系统调节^[7]等多种生物活性功能。本试验旨在利用白藜芦醇的特有性质,通过构建白藜芦醇合酶(Resveratrol Synthase, 简称 RS)基因植物表达载体,并将它导入马铃薯,以获得具有多种保健特性的马铃薯新品种。

1 材料与方法

1.1 供试材料

马铃薯品种 303 的脱毒小薯和脱毒苗由黑龙江省

农业科学院生物技术研究所以基因工程研究室提供。
1.2 基因及菌种和质粒
RS 基因从东北山葡萄品种“贝达”中克隆;质粒载体 P35s-2300 由上海交通大学赵凌侠副教授惠赠,大肠杆菌 DH5α 由本实验室保存。
1.3 酶及试剂
各种内切酶购于 MBI 公司, Taq 酶购于 TAKARA 公司, 去磷酸化酶购于 TAKARA 公司, 质粒小量提取试剂盒购自上海华舜公司, PCR 产物胶回收试剂盒购于上海华舜公司, 其他试剂为国产分析纯。
1.4 所用培养基
基本培养基: MS; 预培养培养基: MS+ZT3.5 mg[°]L⁻¹+IAA1.0 mg[°]L⁻¹; 共培养基: MS+ZT3.5 mg[°]L⁻¹+IAA1.0 mg[°]L⁻¹+AS100 mg[°]L⁻¹; 抑菌培养基: MS+ZT3.5 mg[°]L⁻¹+IAA1.0 mg[°]L⁻¹+Cef500 mg[°]L⁻¹; 筛选培养基: MS+ZT3.5 mg[°]L⁻¹+IAA1.0 mg[°]L⁻¹+Kan50 mg[°]L⁻¹; 生根培养基: MS。
1.5 方法
1.5.1 植物表达载体 P35s-2300-RS 的构建 将质粒

收稿日期: 2008-12-26
基金项目: 黑龙江省留学回国人员科技活动项目(黑人函(2005)307); 黑龙江省博士后资助项目(1SZH-04086)
第一作者简介: 付洪冰(1979-), 男, 黑龙江人, 博士, 从事蔬菜分子育种研究
通讯作者: 刘丽艳, 博士, 研究员。 E-mail: liuliyancus@yahoo.com.cn.

载体 P35s-2300 和 pMD-18T-RS 质粒用 BamHI 和 SacI 双酶切, 回收前者的大片段和后者的的小片段, 用 T₄ DNA 连接酶在 22℃下连接过夜, 转化大肠杆菌 DH5 α , 提取质粒, 进行双酶切鉴定。

1.5.2 根癌农杆菌介导马铃薯的遗传转化程序 在超净工作台上, 将侵染用菌液倒入无菌表面皿中, 把消毒后的小薯块外植体放入其中直接侵染, 侵染 5 min 后取出, 用无菌水冲洗 2~3 次, 无菌滤纸吸干; 将侵染后的外植体接种于共培养培养基上, 在 26℃条件下进行暗培养; 48 h 后外植体转移至除菌培养基中, 培养 10~14 d 再转入新鲜除菌培养基中培养, 最后转入选择培养基中直至形成抗性芽; 待抗性芽长到 2 cm 长时, 切下并接种于生根培养基上进行生根培养和驯化移栽。

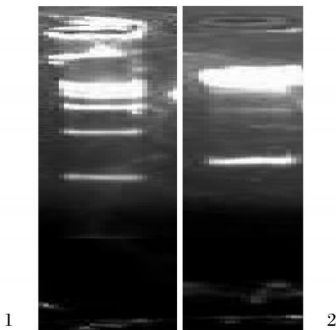
1.5.3 转基因植株的 PCR 和 Southern 检测 提取抗性植株总 DNA 为模板, 以 RS 基因特异引物进行 PCR 检测。探针标记、膜杂交和显色处理均按 Boehringer Mannheim 公司 DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit I 进行。

2 结果与分析

2.1 表达载体 P35s-2300-RS 的构建

根据目的植物表达载体 P35s-2300, 设计引物引入 BamHI、SacI 酶切位点, 把 RS 基因克隆至 PMD18-T 中, 得到 PMD18-T-RS, 然后用 BamHI、SacI 双酶切 PMD18-T-RS, 获得的 RS 片段与经过同样酶消化具有相同的粘性末端 P35s-2300 载体连接, 得到 P35s-2300-RS 植物表达载体。

植物表达载体 P35s-2300-RS 经筛选转化子, 做 BamHI/SacI 双酶切鉴定, 所切下的片段与预期结果相符(见图 1), 说明构建正确(见图 2)。



1: LD15000; 2: 重组子 P35s-2300-RS 的双酶切
图 1 重组子 P35s-2300-RS 酶切鉴定结果

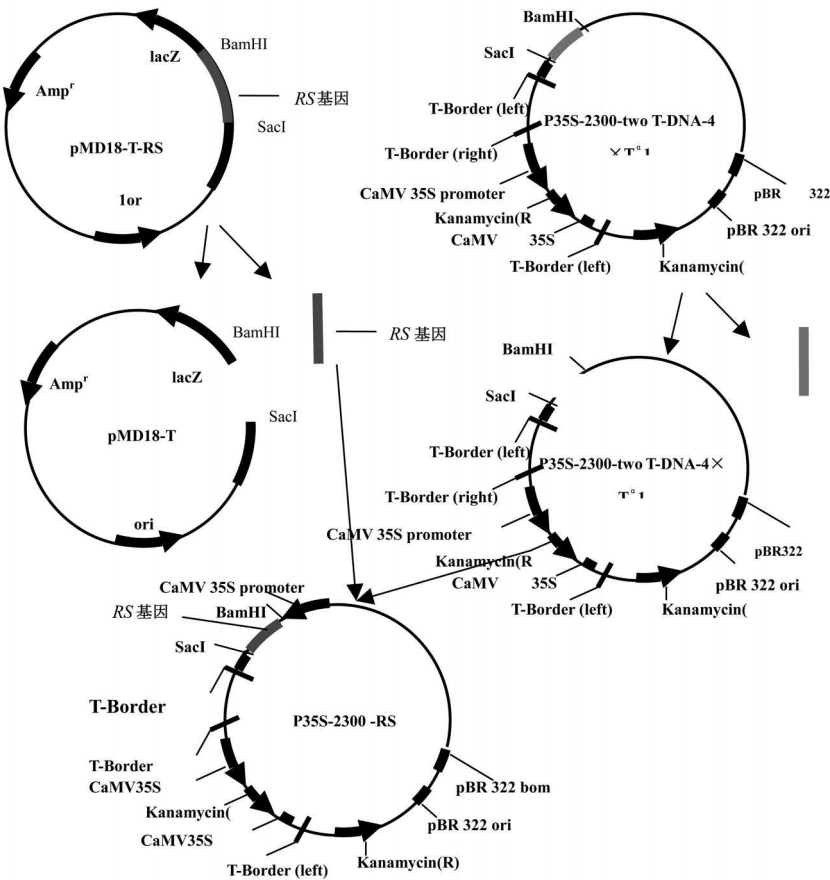


图 2 含有 35S 组成型启动子的植物表达载体 P35s-2300-RS 的构建

2.2 马铃薯转化系统的建立

2.2.1 茎段外植体最佳预培养时间为2 d, 最佳共培养时间为3 d, 薯块外植体不需预培养, 最佳共培养时间为2 d。

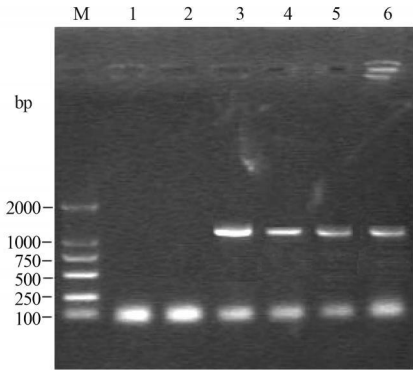
2.2.2 农杆菌侵染时间和菌液浓度因外植体类型的不同而异, 对于茎段外植体, 最佳菌液浓度为OD₆₀₀=0.5, 最佳侵染时间为10 min, 此时抗性愈伤率最高, 为70.50%; 对于薯块外植体, 最佳菌液浓度为OD₆₀₀=0.5, 最佳侵染时间为5 min, 此时出芽率最高为50.6%。

2.2.3 选用头孢噻肟钠抑菌效果很好, 且在有效的抑菌浓度下对外植体的再生无明显影响, 其对薯块和茎段的脱菌浓度500 mg·L⁻¹。

2.2.4 抗性选择剂为卡那霉素(Kan)。对于不同外植体选择压力不同, 茎段诱导愈伤组织和诱导芽阶段, Kan浓度为50 mg·L⁻¹; 薯块诱导芽阶段, Kan的浓度为100 mg·L⁻¹。转化植株生根阶段, Kan的浓度为100 mg·L⁻¹。

2.3 抗性植株的 PCR 检验

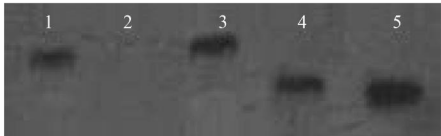
以转化植株总 DNA 为模板, 以 RS 基因为阳性对照, 未转化马铃薯 DNA 为阴性对照, 对转化植株进行 PCR 检测, 共获得3株阳性植株。图3中用 RS 基因特异引物, 阳性对照和阳性样品均扩增出1 282 bp 的目的条带, 阴性对照没有扩增出相应条带, 初步证明 RS 基因已经导入马铃薯中。



M: LD2000; Lane 1: 水; Lane 2: 未转化植株
Lane 3: 阳性对照; Lane 4-6: 抗性植株
图 3 抗性植株 PCR 检测结果

2.4 抗性植株的 Southern 检测

3株 PCR 检测的阳性苗作为 Southern 杂交材料, 采用 EcoRI 酶切转化马铃薯基因组 DNA, 以 RS 基因 PCR 胶回收产物标记探针, RS 基因杂交结果如图4, 其中3~5号样品均有较明显的杂交条带, 说明 RS 基因已转入马铃薯中。



Lane 1: 阳性对照 RS 基因; Lane 2: 阴性对照 未转化植株; Lane3~5: PCR 鉴定阳性植株的 DNA。
图 4 PCR 阳性植株基因组 DNA Southern 杂交结果

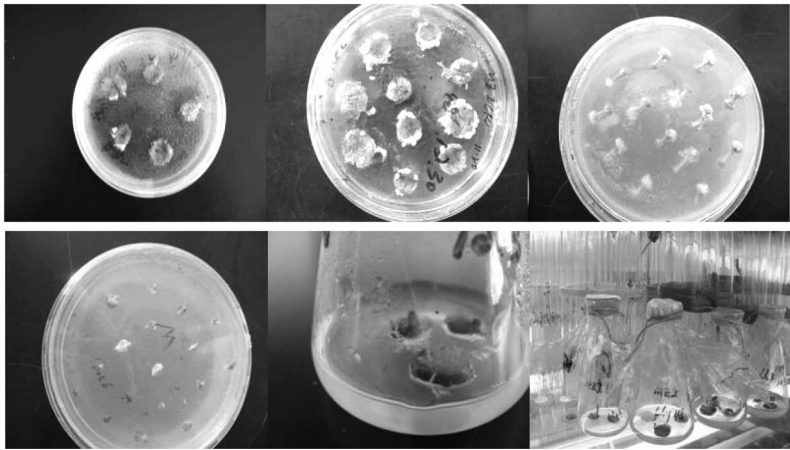


图 5 马铃薯转化及再生

3 讨论

3.1 表达载体 P35s-2300 的优点

P35s-2300 作为一种新型植物表达载体, 已经广泛用于植物的遗传转化, 它相对于一般的植物表达载体如PBI121, 含有双 T-DNA 区, 将目标基因与选择标记基因分开在不同的 T-DNA 区, 通过基因植株后代基因的分离使标记基因与目标基因分离, 从而获得仅含目

标基因的安全转基因后代植株, 真正实现转基因植物的无毒标记, 为转基因植物商品化提供很好的思路, 因此有巨大的应用前景。

3.2 外植体类型对遗传转化的影响

目前作为遗传转化的外植体材料已经研究得非常广泛, 涉及到植物的各个组织、器官和部位。但各种外植体材料的转化率差异显著。不同植物的最佳外植体

种类不同。

我们选用马铃薯茎段的愈伤组织诱导率高,而分化率低,供试马铃薯品种薯块的转化率明显高于茎段。以薯块作为外植体不经愈伤过程直接分化出芽,转化周期短。15~20 d左右微型薯产生芽,6~7周可得到转化植株。微型薯与试管薯转化率相差不大。这与杨美珠^[8]和岳东霞^[9]等的报道不一致,可能是不同的基因型和不同转化条件所致。

3.3 预培养时间与共培养时间对遗传转化的影响

植物在受到带有外源基因的农杆菌侵染之后,能否实现外源基因的转化,还取决于植物受体系统的反应。这种反应主要表现在植物细胞的感受态和农杆菌*Vir*基因的活化。而预培养过程是促进细胞分裂,分裂状态的细胞更容易整合外源DNA,因而提高外源基因的瞬时表达率和转化率,可降低外植体转化过程中的杂菌污染率,预培养有利于转化的外植体与培养基平整接触,防止外植体因迅速生长出现上翘或卷曲,使农杆菌的接种面脱离培养基而不能实现转化。预培养的时间因各种植物启动脱分化或再分化的时间而异,每一种外植体均有其最佳预培养时间。本试验中,马铃薯茎段外植体预培养2 d得到的抗性愈伤率最高。而试管微薯和微薯块无须预培养过程。

农杆菌与外植体共培养在整个转化过程中是非常重要的环节,因为农杆菌附着、T-DNA的转移及整合都在这个时期内完成。农杆菌附着后必须经过16 h的细胞调节期才能实现转化,因此,共培养时间必须长于16 h。但是共培养时间太长,会由于农杆菌的过度生长,使植物细胞受到毒害而死亡。不同物种、外植体种类、农杆菌菌株的最佳共培养时间不同。对于本试验所选用的马铃薯品种,茎段外植体的最佳共培养时间为3 d,薯块外植体最佳共培养时间为2 d。

3.4 选择压力的确定

对选择性压力的要求是:既能有效地抑制非转化细胞的生长,使之缓慢地死亡,又不影响转化细胞的生长。为了适当使用抗生素,就需对其浓度进行外植体的敏感性试验。Kan作为选择剂,不同植物、不同基因型及不同外植体所要求的浓度不同。马铃薯遗传转化过程中的选择压力,因转化的外源基因和外植体的不同报道不一致。茎段愈伤组织诱导阶段及分化阶段Kan浓度为30~50 mg·L⁻¹;薯块外植体再生阶段Kan浓度为50~100 mg·L⁻¹;生根选择压为20~100 mg·L⁻¹。本试验确定茎段愈伤组织诱导阶段及分化阶段Kan的浓度为50 mg·L⁻¹;薯块再生阶段Kan的浓度为100 mg·L⁻¹;生根筛选阶段Kan浓度为100 mg·L⁻¹。

3.5 脱菌剂的选择

与农杆菌共培养后的外植体表面及浅层组织中共生有大量农杆菌。为杀死和抑制农杆菌的生长必须进行脱菌,使外植体更好地生长发育。常用的脱菌抗生素有羧苄青霉素(carbenicillin, Carb)、头孢霉素(Cefo-

taxine, Cef)、及羧吩青霉素(timentin)等。这些抗生素不仅对农杆菌有杀伤或抑制作用,而且对植物细胞也有一定的生物效应,但对不同植物的不同外植体产生的影响不同。脱菌抗生素对外植体的影响作用在不同的植物中有很大差异。目前多数报道^[9-11]在马铃薯遗传转化过程中使用的脱菌抗生素均为羧苄青霉素,使用浓度为500 mg·L⁻¹。本试验选用头孢霉素,使用浓度为500 mg·L⁻¹。

3.6 研究展望

利用转基因动植物作为生物反应器生产有价值的功能蛋白和医用药物是目前生物技术和基因工程的一大热点,本研究选用马铃薯作为研究对象,是基于马铃薯生长容易、生物量大、遗传转化体系比较完善、转化周期短,且马铃薯可以无性繁殖,所以只要得到少量的转化体,就可以通过快繁得到大量的转基因植株。马铃薯有特异性的启动子,可以进行特异性的诱导表达,从而产生大量的可溶性蛋白。本研究将白藜芦醇合成的关键酶基因转化到马铃薯中,并获得了转基因植株。我们正在对所获得的转基因植株进行白藜芦醇活性测定,拟筛选表达量高的植株作免疫实验,为进一步研究利用转基因植物生产白藜芦醇疫苗及新型基因工程药物提供了新的材料和途径。

参考文献:

[1] Selhwakendiek A, Pfeffer G, Kindl H. Pine stillene synthase cDNA, a tool for probing environmental stress[J]. FEBS, 1992, 301(1): 41-44.

[2] Jeandet P, Bessis R, Maume B F, et al. Effect of enological practices on the resveratrol isomer content of wine[J]. Agric Food Chem, 1995, 43(2): 316-319

[3] Jang M, Cai L, Udeani G O, et al. Cancer chemopreventive activity of resveratrol, a natural product derived from grapes[J]. Science, 1997, 275(5297): 218-220.

[4] Juan Emilia Gonzalez-Pons Eulalia Munuera, et al. Trans-Resveratrol, a Natural Antioxidant from Grapes, Increases Sperm Output in Healthy Rats[J]. Journal of Nutrition, 2005, 135(4): 757-760.

[5] Sgambato A, Ardito R, Faraglia B, et al. Resveratrol, a natural phenolic compound, inhibits cell proliferation and prevents oxidative DNA damage[J]. Mutat Res, 2001, 496(1-2): 171-180.

[6] Padilla-Banks E, Jefferson, Newbold R R. The immature mouse is a suitable model for detection of estrogenicity in the uterotrophic bioassay[J]. Environ Health Perspect, 2001, 109: 821-826.

[7] Park J W, Choi Y J, Jang M A, et al. Chemopreventive agent resveratrol, a natural product derived from grapes, reversibly inhibits progression through S and G2 phases of the cell cycle in U937 cells[J]. Cancer Lett, 2001, 163(1): 43-49.

[8] 杨美珠, 潘乃穗, 陈章良. 高效马铃薯遗传转化体系的建立及外源甜蛋白基因的导入[J]. 植物学报, 1992, 34(1): 31-36.

[9] 岳东霞, 金红, 周良炎, 等. 外源类甜蛋白基因在马铃薯中的表达[J]. 华北农学报, 2000, 15(1): 12-16.

[10] 甄伟, 陈溪, 梁浩博, 等. 转基因马铃薯中病原诱导GO基因的表达及其对晚疫病的抗性[J]. 科学通报, 2000, 45(10): 1071-1076.

[11] 陈峥, 金红, 罗智敏, 等. 提高马铃薯遗传转化体系再生频率的研究[J]. 天津农业科学, 2002, 8(4): 4-6.