

分子生物学技术在枸杞研究上的应用

何 军^{1,2}, 李晓莺¹, 曹有龙¹, 刘 萍², 平吉成²

(1. 宁夏农林科学院枸杞工程技术研究中心, 银川 750002; 2. 宁夏大学农学院, 银川 750021)

摘 要: 分子生物学是从分子水平研究生物大分子的结构与功能, 从而阐明生命现象本质的科学。自 20 世纪 50 年代以来, 分子生物学一直是生物学的前沿与生长点, 推动着整个生命科学的发展。但分子生物学技术在枸杞上的应用还处于刚刚起步阶段, 只进行了一些分子标记、cDNA 文库构建、功能基因的分离克隆、外源基因转入枸杞基因组的研究, 现将分子生物学技术在枸杞研究上的应用进展进行全面综述, 为今后的研究提供经验。

关键词: 分子生物学; 枸杞; 分子标记

中图分类号: Q 75; S 793.9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)07-0062-03

从 20 世纪 50 年代以来, 以生物大分子为研究目标的分子生物学逐步形成了独立的学科, 并迅速成为现代生物领域中最具有活力的学科。目前科学家已经建立了一整套分子生物学研究的方法、系统和一般的逻辑推理原则^[1]。应用分子生物学技术不仅对人类、动物、植物、微生物基因组进行了研究, 而且对农作物抗病虫害、品质改良、抗病毒等方面进行了研究, 对当代农业发展起到了重要的推动作用。枸杞 (*Lycium barbarum* L.) 属茄科枸杞属落叶灌木, 是我国重要的药用植物资源, 随着枸杞需求量的不断增大, 人们对枸杞的研究也不断深入。自 20 世纪末以来, 分子生物学技术被应用到枸杞研究上, 并取得了一些成绩, 现综述分子生物学技术在枸杞上的应用情况, 为今后的研究工作提供一些经验。

第一作者简介: 何军(1978-), 男, 在读硕士研究生, 主要从事植物遗传育种研究, E-mail: hejun1978@126.com。

基金项目: 宁夏回族自治区重大科技攻关资助项目(05GG-10601)。

收稿日期: 2007-03-05

1 分子生物学技术在枸杞研究上的应用

1.1 枸杞基因组总 DNA 和 RNA 的提取

基因组 DNA 和 RNA 的提取通常用于构建基因组文库、Southern 杂交(包括 RFLP)及 PCR 分离基因等。利用基因组 DNA 较长的特性, 可以将其与细胞器或质粒等小分子 DNA 分离。加入一定量的异丙醇或乙醇, 基因组的大分子 DNA 即沉淀形成纤维状絮团漂浮其中, 可用玻棒将其取出, 而小分子 DNA 则只形成颗粒状沉淀附于壁上及底部, 从而达到提取的目的。

1.1.1 枸杞基因组总 DNA 的提取 李树华等^[2]用 SDS-I、SDS-II 和 CTAB 3 种方法提取枸杞果实 DNA, SDS-I 和 CTAB 法提取的枸杞 DNA 纯度和得率都较低, SDS-II 提取的纯度为 $OD_{260}/OD_{280} = 2.8$, 说明含有较多的 RNA, $OD_{260}/OD_{230} = 1.61$, 得率 $180.9 \mu\text{g/g}$ 。孙晓东等^[3]用 CTAB 法提取枸杞果实 DNA, 提取的 DNA 含量为 $100 \mu\text{g/mL}$, 纯度值 $OD_{260}/OD_{280} = 1.3$, 虽未达到比值 1.8 的理想纯度, 经 RAPD 法扩增后进行琼脂糖电泳分析表明对枸杞有 DNA 分子标记意义。张满效

Prospect of Ion Beam Bio-technique in Genetic Improvement of Vegetable Crop

HUANG Qunce

(Provincial Key Laboratory of Ion Beam Bio-engineering, Zhengzhou University, Henan 450052)

Abstract: The research was on ion beam bio-technique and its three problems. The three problems were that the medium-technique of ion beam has larger potential value than the mutation-technique of ion beam, that the effects of genetic improvement on vegetable crops were mainly depended on the distance of the family relation between the supplier and the acceptor of the genetic materials, that the good system of identification and selection in the later generations promoted to gain higher efficiency of breeding on vegetable crops. The technical ideas, including the 1 technique basis in physics, the 2 developmental directions, the 3 effective changes, the 4 research hierarchies and the 5 biological characteristics worthy of notice, were particularly put forward and discussed.

Key words: Ion beam bio-technique; Genetic improvement of vegetable crops; Technical ideas

等^[4]、魏玉清等^[5]用改进的 CTAB 法提取了枸杞叶片的 DNA,用于 RAPD 分析。

1.1.2 枸杞基因组总 RNA 的提取 张爱香等^[6]采用异硫氰酸胍—酚—氯仿抽提的方法,从枸杞叶片中提取总 RNA,经甲醛凝胶变性电泳检测 RNA 未被降解且可见 mRNA 弥散在 3 条带中间。 $OD_{260}/OD_{280}=1.94$,说明 RNA 没有蛋白质污染; $OD_{260}/OD_{230}=2.12$,说明 RNA 没有异硫氰酸胍的污染 符合 mRNA 制备的要求。从 1 g 枸杞叶片中共获得 130 μ g 总 RNA。抗艳红等^[7]采用 TR Izol 试剂提取枸杞叶片总 RNA,通过 1%的琼脂糖凝胶电泳检测,可以观测到典型的 5S、18S 和 28S 条带。张爱香等^[8]采用异硫氰酸胍—酚—氯仿抽提的方法,从 1 g 枸杞果实中提取了总 RNA,经甲醛凝胶变性电泳后出现清晰的 3 条带, $OD_{260}/OD_{280}=1.72$,介于 1.7~2.0 之间,说明 RNA 未被降解,没有蛋白质的污染, $OD_{260}/OD_{230}=1.98$ 接近 2.0,说明 RNA 没有异硫氰酸胍的污染,符合 mRNA 制备的要求。

1.2 枸杞叶片进行 RAPD 分析

张满效等^[4]用 RAPD 分析了不同盐碱环境中宁夏枸杞遗传物质的变化,从 34 个随机引物中筛选出电泳谱带清晰且多态性较好的 6 个引物进行扩增,共扩增出 187 个位点,引物扩增出的 DNA 片段大多在 200~2 000 bp 之间,其中有 35 个多态性位点,占总位点数的 18.72%。结果表明宁夏枸杞在生长发育过程中,为了适应环境,在代谢发生了变化后,其遗传物质 DNA 也发生了一定的变异。魏玉清等^[5]利用 RAPD 技术检测了宁夏不同地区种植的宁夏枸杞主栽品种和新育成的枸杞品系基因组 DNA 的多态性,并对其遗传背景进行了初步分析。从 400 条 10 碱基的随机引物中筛选出了 40 条适用于枸杞 RAPD 分析的引物,构建了主要推广品种宁杞 1 号的 RAPD 图谱;并选取了其中 9 种引物对 10 份参试材料进行了扩增,结果显示:宁夏不同地区主要栽培的枸杞品种遗传上没有明显的差异,但新品系大果枸杞 0105 号与宁杞 1 号在基因组上有差异。

1.3 枸杞叶片和果实 cDNA 文库的构建

张爱香等^[6,8]采用异硫氰酸胍—酚—氯仿法提取枸杞叶片和果实完整的总 RNA,用磁珠法分离 mRNA,用 Promega 公司的 cDNA 合成试剂盒合成双链 cDNA,在 cDNA 末端连接上 EcoRI 接头,并与 λ ExCell 载体连接后,用 Promega 公司的蛋白包装系统进行包装,在国内外首次获得滴度为 2.78×10^5 pfu/mL,重组效率为 88.1% 的枸杞叶片 cDNA 文库和滴度为 8.4×10^4 pfu/mL,重组效率为 86.9% 的枸杞果实 cDNA 文库。抗艳红等^[7]采用 TR Izol 试剂提取枸杞叶片总 RNA,然后利

用 PolyATtract mRNA 分离系统分离 mRNA,反转录合成第一链 cDNA 及第二链 cDNA,用 λ -ZAP 为载体,构建了滴度为 2×10^7 pfu/mL,重组率为 91% 的枸杞叶片的 cDNA 文库。

1.4 枸杞叶片中功能基因的克隆

张爱香等^[8]从枸杞叶片中克隆出了类胡萝卜素合成酶基因—番茄红素 β -环化酶基因 LycB 和 IPP 异构酶基因 IPI。用 Digoxigenin (DIG) 标记龙胆草 LycB 探针,并对构建的枸杞叶片 cDNA 文库^[6]进行筛选,获得 5 个 LycB cDNA 阳性克隆,释放质粒后,进行酶切鉴定, LycB 阳性克隆 cDNA 插入片段的大小为 2.1 kb 左右;用 DIG 标记龙胆草 IPI 探针,并对枸杞叶片 cDNA 文库进行筛选,获得 7 个 IPI cDNA 阳性克隆。释放质粒后,进行酶切鉴定, IPI 阳性克隆 cDNA 插入片段的大小为 1.5 kb 左右^[9]。郑阳霞^[10]从枸杞叶片中克隆出了类胡萝卜素合成酶基因 PSY、LycB。分离克隆的 PSY 基因 cDNA 全长 1 292 bp,阅读框位于 7~1 284 bp 之间,共编码 425 个氨基酸;克隆的 LycB 基因 cDNA 全长 1 541 bp(包含引物),共编码 508 个氨基酸。

1.5 转基因技术在枸杞上的应用

孙晓光等^[11]将水稻中富含甘氨酸蛋白的信号肽序列 (GRP) 引入 MA4-CA 融合基因,构建了含 MA4-CA 基因的植物分泌表达载体 pCAMP IA1305.2-MA4-CA。通过根瘤农杆菌对枸杞进行转化,并筛选出阳性克隆植株。杜国利等^[7]在植物培养箱中,对该转基因植株成功地进行了分化及生根的诱导。PCR 扩增分析表明转基因植株内存在目的基因,并与启动子 p35S 相连。ELISA 及 Western blot 实验证实转基因枸杞叶子提取物中存在壳体蛋白。初步建立了表达具有免疫原性 H IV 壳体蛋白的转基因枸杞表达系统。

王慧中等^[12]成功地将外源 npt-II 基因和胭脂碱合成酶基因通过根瘤农杆菌介导转入宁夏枸杞的基因组内,经胭脂碱检测, NPT-II 活性测定及 Southern 分子杂交,证明外源基因已导入枸杞植株,并能在愈伤组织及植株水平上表达。

曹有龙等^[13,14]通过农杆菌介导法将对蚜虫具有明显抗性的外源基因—雪花莲凝集素酶基因 GNA34 基因导入枸杞细胞,使其结合到枸杞染色体 DNA 上,并能很好表达。获得的转基因植株经过 PCR、Southern blot、Northern blot 检测,证明外源基因已整合到枸杞染色体上。获得的转基因枸杞株系对枸杞蚜虫的繁殖表现出明显的抑制作用。

2 展望

分子生物学技术在枸杞上的应用还不到 10 年时

间,属于刚刚起步阶段,应用的技术手段还十分有限,但也取得了一些成绩,如:构建了枸杞叶片和果实的 cDNA 文库,分离克隆了 3 个功能基因,将外源基因转入枸杞基因组并使其表达。今后这方面的研究还会不断加强,使分子生物学的先进技术更好地为枸杞研究服务。

2.1 构建枸杞的分子指纹图谱

应用分子标记技术对枸杞的 7 种 3 变种、各农家品种、育成品种及野生种基因组 DNA 进行分析,并通过相似系数分析、聚类分析等数量遗传分析手段,对它们之间的遗传距离、系统发育、亲缘关系等进行研究,构建枸杞的分子指纹图谱,为枸杞种质资源评估、品种的鉴定和保护,宁夏枸杞的道地性研究提供科学依据。

2.2 克隆枸杞功能基因

现代医学对枸杞子的药理成分进行了深入广泛的研究,发现多种高含量的功效成分,如:胡萝卜素、甜菜碱、枸杞多糖、黄酮、SOD、牛磺酸等^[5]。张爱香、郑阳霞已经克隆出了类胡萝卜素合成酶基因 PSY、LycB、IPI。其它众多的功能基因有待于人们去挖掘、利用,这些基因克隆出来后将人们对人们的健康有重要意义。

2.3 应用转基因技术培育枸杞新品种

常规育种不仅周期长,费时费力,而且不能定向改变某一性状。应用转基因技术可以将功能基因导入枸杞细胞染色体中,使枸杞具有某一优良性状,如:抗病、抗虫、抗旱等。目前曹有龙已培育出了抗蚜虫转基因枸杞,可以减少农药的使用量,减少枸杞中的农药残留和环境污染。今后将有更多的抗性基因和功能基因转入枸杞基因组,使其具有更好的抗性和更高的药用价值。

参考文献

- [1] 赵亚华. 分子生物学教程[M]. 北京:科学出版社, 2004: 1-8.
- [2] 李树华, 何军, 杨淑琴, 等. 野生稻、野燕麦、枸杞 DNA 的提取方法[J]. 干旱地区农业研究, 2005, 23(3): 166-169.
- [3] 孙晓东, 李军, 施京红. 枸杞基因组 DNA 的提取与分析[J]. 陕西中医, 2003, 24(12): 1129-1130.
- [4] 张满效, 陈拓, 肖雯, 等. 不同盐碱环境中宁夏枸杞叶生理特征和 RAPD 分析[J]. 中国沙漠, 2005, 25(3): 391-395.
- [5] 魏玉清, 许兴, 王掌军, 等. 宁夏不同地区主要栽培枸杞的 RAPD 分析[C]//2005 植物分子育种国际学术研讨会论文集, 2005: 54-57.
- [6] 张爱香, 季静, 王昱, 等. 枸杞叶片 cDNA 文库的构建[J]. 吉林农业大学学报, 2005, 27(2): 155-157, 161.
- [7] 杜国利, 宋长征, 张更林, 等. 转基因枸杞表达重组 HIV 壳体蛋白的鉴定[J]. 中国生物制品学杂志, 2006, 19(2): 127-129, 133.
- [8] 张爱香, 季静, 王昱, 等. 枸杞中番茄红素 β -环化酶基因 LycB 的分离[J]. 中国农学通报, 2005, 21(1): 46-49.
- [9] 张爱香, 季静, 王昱, 等. 枸杞中 IPP 异构酶相关基因 IPI 的分离[J]. 西北农业学报, 2006, 15(3): 186-189.
- [10] 郑阳霞. 枸杞类胡萝卜素合成酶基因 PSYLycB 的克隆及其转化洋桔梗的研究[D]. 成都:四川农业大学, 2006: 35-42.
- [11] 孙晓光, 宋长征, 张更林. 转基因枸杞表达 HIV-1 壳体蛋白病毒样颗粒疫苗表达载体的构建[J]. 中国生物工程杂志, 2005, 25(8): 51-55.
- [12] 王慧中, 杜立群, 黄发灿, 等. 根瘤农杆菌介导的枸杞转化及转化植株的获得[C]//白寿宁. 宁夏枸杞研究. 银川:宁夏人民出版社, 1998: 149-152.
- [13] 罗青, 曲玲, 曹有龙, 等. 抗蚜虫转基因枸杞的初步研究[J]. 宁夏农林科技, 2001(1): 1-3.
- [14] 李晓莺, 曹有龙, 何军, 等. 抗蚜虫转基因枸杞株系的光合生理特征[J]. 江西农业大学学报, 2005(6): 864-866.
- [15] 周元满. 枸杞的利用价值、栽培技术及产业化开发[J]. 防护林科技, 2005(1): 74-76.

Applications in Studying Wolfberry by Technique of Molecule Biology

HE Jun^{1,2}, LI Xiaoying¹, CAO Yourlong¹, LIU Ping², PING Ji-cheng²

(1. Engineering Technology Research Center of Chinese Wolfberry, Ningxia Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Yinchuan 750002;
2. Agriculture College of Ningxia University, Yinchuan 750021)

Abstract: Molecular biology is the science which in order to study the structure and function of biological macromolecules from the molecular level to clarify the biological phenomena in nature. Since the 1950s, molecular biology has been biology point of the frontier and promoted the development of the entire life sciences. However, the applications of molecular biology techniques in Wolfberry still at the initial stage, only molecule marker, cDNA library were constructed, the functional gene isolation and cloning, exogenous gene into the genome of Chinese wolfberry. In this paper, the study of molecular biology techniques in Wolfberry application was reviewed, to provide experience for future research.

Key words: Molecule biology; Wolfberry; Molecule marker