

东方百合“元帅”查尔酮合酶基因表达载体构建

和凤美¹, 朱永平²

(1. 云南农业大学 园林园艺学院, 云南 昆明 650201; 2. 云南农业大学 农学与生物技术学院, 云南 昆明 650201)

摘要: 利用 Genbank 中公布的东方百合“元帅”查尔酮合酶 cDNA 序列, 从东方百合“元帅”花瓣中扩增 CHS1 的 cDNA 开放阅读框, 正向插入植物表达载体 pBI121, 并采用液氮冻融法将其转化到根癌农杆菌 EHA105 中。结果表明: 经酶切和菌液 PCR 分析鉴定, 获得与预期大小相符的 1 200 bp 片段, 得到含有目的片段表达载体 pBI121-CHS1 的农杆菌菌株, 可用于新铁炮百合的遗传转化。

关键词: 百合; CHS; 表达载体; pBI121; 基因

中图分类号: S 682.2⁺9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)16-0145-04

花色是花卉观赏价值的重要标准。自然界花色繁多, 但一些重要花卉却色彩有限, 这是运用传统杂交育种方法无法解决的问题。在充分了解花色形成的化学基础和调控机制的基础上, 应用基因工程技术可以改造花色^[1]。查尔酮合酶(Chalcone synthase, CHS)是花色素合成途径中的一个关键酶, 它在植物中表达的量影响花的颜色。1988 年 Vander Krol 等首次将反义 CHS 基因导入矮牵牛中, 抑制了花色苷的形成, 引起花色改变^[2]。反义 CHS 基因导入非洲菊, 导致花瓣着色异常^[3]。Gutterson 等通过根癌农杆菌介导转化法, 将一个从菊花中分离到的 CHS 基因, 以反义和正义方向分别导入开粉红色花的菊花中, 获得开浅红色和白色花的转基因植株^[4]。Aida 等用相同的方法将 CHS1 基因导入蓝猪耳, 结果反义方向导入的转化株花色均一变亮, 而正义方向导入的转化株花色不均一变亮。

新铁炮百合是高砂百合与铁炮(麝香)百合杂交育成的种间杂种, 自交亲和性大, 结实率高, 可用种子直接生产切花, 这比常规的用种球生产百合切花(亚洲百合、东方百合)大大降低生产成本, 且抗病、耐热性强。新铁炮百合花色洁白, 花姿优美, 花型较大, 香气馥郁, 深受广大消费者喜爱^[5-9]。但其颜色比较单一, 基本上是白色, 观赏效果和商品价值都受到很大限制^[7]。为了培育新的花色品种, 提高新铁炮百合的综合品质, 现以从东方百合“元帅”中克隆到的查尔酮合酶基因作为目的基因, 构建表达载体, 为新铁炮百合花色转基因培育打下

基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

东方百合“元帅”品种, 采自云南农业大学园林园艺学院温室。经液氮冻存过夜, 放入 -80℃ 冰箱保存备用。

RNA 提取试剂盒购自北京天根生物技术有限公司; Primer Powerscript 反转录酶、PCR 酶、限制性内切酶 *SacI* 和 *XbaI* 购自大连宝生物工程有限公司; DNA 胶回收试剂盒、胶回收纯化试剂购自北京鼎国生物技术有限公司; 大肠杆菌 DH5 α 菌株、载体 pBI121 均为云南省农业科学院分子生物实验室保存; 卡那霉素及其它试剂均为国产分析纯。引物由上海生工生物公司合成。

1.2 试验方法

1.2.1 CHS 基因的获得 采用北京天根植物 RNA 提取试剂盒提取东方百合“元帅”花瓣 RNA, -20℃ 保存。按 Clontech SMART PCR 合成试剂盒说明书进行反转录, 取 1.5 μ g 总 RNA 在 cDNA 合成引物 SMART Oligo II、CDS primer 和 BD PowerScript 反转录酶作用下合成 1 链 cDNA。反应完成后, 取 1 μ L 第 1 链, 加入 5 μ L 10 \times pyrobest PCR buffer、1 μ L dNTP、1 μ L Smart PCR 引物、1 μ L pyrobestase, 37 μ L H₂O, 于 50 μ L 反应体系中进行如下 PCR 循环: 95℃ 预变性 1 min, 25 个循环 (95℃ 30 s, 65℃ 30 s, 68℃ 4 min), 合成 2 链 cDNA, 电泳分析 PCR 产物。根据 Genbank 中公布的东方百合“元帅”查尔酮合酶 cDNA 序列 (序列号为 AF169800) 设计引物 CHS3 primer 1 和 CHS3 primer 2, 取 1 μ L 2 链 cDNA, 在 *Taq* 酶 (TaKaRa 公司) 的作用下进行 PCR 扩增, 经 94℃ 2 min 预变性, 94℃ 30 s, 68℃ 30 s, 70℃ 45 s, 30 个循环, 72℃ 10 min 延伸, 扩增目的基因。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳, 试剂盒回收目标条带后, 送上

第一作者简介: 和凤美(1964), 女, 博士, 副教授, 研究方向为园林植物分子生物学。E-mail: hefengmei918@126.com.

基金项目: 云南省教育厅重点基金资助项目(07Z10035)。

收稿日期: 2010-03-31

| 寡核苷酸 | 序列 |
|------------------|--|
| SMART Oligo II | 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTACGGGG-3' |
| CDS primer | 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGTA-d(T) ₃₀ -3' |
| SMART PCR 引物 | 5'-AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3' |
| CHS3 primer 1 | 5'-GTGCATGTCGAAGACCGTTGAG-3' |
| CHS3 primer 2 | 5'-GCTCAG TTGCTAGTGA TCGGAAG-3' |
| 内切酶 <i>Xba</i> I | 5'-GCTCTAGAGC ATGTCGAAGACCGTTGAG-3' |
| CHS3 primer 1 | |
| 内切酶 <i>Sac</i> I | 5'-CGAGCTCGCTCAGTTGCTAGTGA TCGGAAG-3' |
| CHS3 primer 2 | |

注: 划线部分为引入的酶切位点。

海生工测序。

1.2.2 载体构建 利用引物 CHS3 primer I *Xba* I 和 CHS3 primer 2 *Sac* I, 在上述 PCR 的条件下扩增 CHS1 基因, 使 CHS3 基因两侧加入 *Sad* 和 *Xba* I 双酶切位点, 经 PCR 扩增后, 胶片回收纯化, 进行 *Sad* 和 *Xba* I 的双酶切, 酶切产物经 1% 的琼脂糖凝胶电泳, 回收目的片段。同样地, 用 *Sad* 和 *Xba* I 双酶切 pBI121 质粒, 胶回收大片段。2 个目地片段在 T4DNA 连接酶作用下, 置 16℃ 过夜连接。取 10 μL 连接产物用热激法转化 DH5α 感受态细胞。将全部转化细胞均匀涂布在含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 固体培养基上, 37℃ 培养过夜, 挑取克隆用含有 50 mg/L 卡那霉素的 LB 液体培养基培养过夜。然后采用质粒小量提取法提取重组质粒, 琼脂糖凝胶电泳检测

质粒的浓度和纯度。

1.2.3 重组质粒酶切鉴定和测序鉴定 取上述重组质粒 10 μL, 用 *Sad* 和 *Xba* I 双酶切。反应体系如下: 质粒 DNA 10 μL, 0.5× MBuffer 缓冲液 2 μL, 2 种限制酶各 1 μL, 双蒸去离子水 6 μL, 总反应体系为 20 μL。37℃ 过夜酶切, 酶切产物用 1% 琼脂糖凝胶进行电泳检测, 试剂盒回收目标条带后, 送上海生工测序。

1.2.4 农杆菌的转化及鉴定 取 1 g 左右的重组质粒 DNA 加入到 200 μL EHA105 感受态细胞中, 混匀后, 冰浴 30 min; -70℃ 放置 10 min; 取出后 37℃ 水浴 5 min; 冰浴 2 min; 加入 800 μL YM 液体培养基, 28℃ 下, 175 r/min 摇培 3 h; 取出后涂在含 50 μg/mL 卡那霉素的 YM 平板上, 28℃ 培养到形成单菌落。挑取单菌落接种于含 50 μg/mL 卡那霉素的 YM 液体培养基中, 于 28℃ 下, 220 r/min 摇培 16 h, 直接用菌液做 PCR。PCR 反应体系如下: 农杆菌转化子菌液 2 μL, CHS3 primer1 1 μL, CHS3 primer 2 1 μL, 10×PCR Buffer 2 μL, Mg²⁺ 1 μL, dNTP 1 μL, *Taq* 酶 0.2 μL, H₂O 11.8 μL; PCR 反应参数设置如下: 94℃ 预变性 3 min 后开始以下循环反应, 94℃ 40 s, 65℃ 1 min, 72℃ 1 min, 35 个循环后, 72℃ 延伸 10 min。反应结束后, 取 10 μL 反应液在 1.0% 琼脂糖凝胶中电泳。

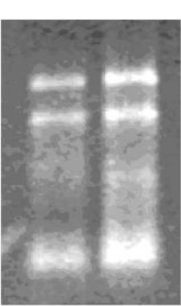


图 1 RNA 电泳检测

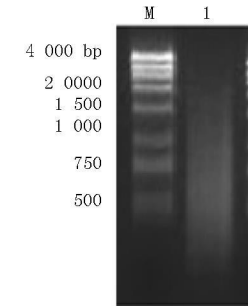


图 2 百合双链 cDNA
注: M: DGL 4 000 marker; 1: Lily cDNA。



图 3 百合“元帅”花瓣中克隆的
CHS3 cDNA 开放阅读框
注: M: DL 2 000 marker; 1: CHS3 cDNA ORF。

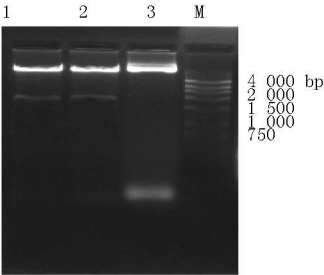


图 4 pBI121 酶切检测

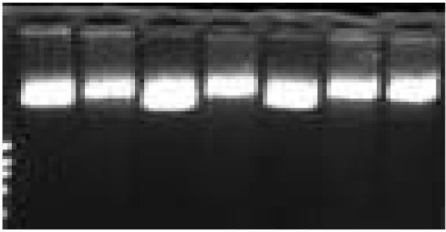


图 5 pBI121-CHS3 重组质粒

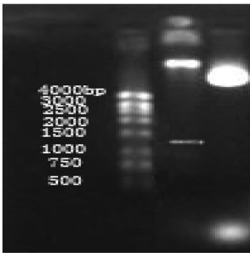


图 6 pBI121-CHS3 植物
表达载体酶切检测

注: M: DGL 4 000 Marker; 1~2
Sad/*Xba* I; 3: pBI121 control。

注: M: DGL 4 000 Marker; 1: pBI121-CHS3
control; 2: *Sad*/*Xba* I。

2 结果与分析

2.1 RNA 的提取及 CHS3 基因的获得

用北京天根植物 RNA 提取试剂盒提取东方百合“元帅”花瓣 RNA, 经 1% 琼脂糖电泳检测, 28S、18S、5S rRNA 清晰可见, 说明 RNA 没有降解(图 1); 按 Clontech SMART PCR 试剂盒说明书进行反转录, 电泳检测, 得到大约 500~4 000 bp 的双链 cDNA(图 2); 以双链 cDNA 为模板, PCR 扩增 CHS3 基因, 产物经琼脂糖凝胶电泳检测显示, 有约 1 200 bp 的目的条带出现(图 3), 与预期目标大小一致。将目的条带胶回收纯化后, 送上海生工测序, 序列分析表明, 该扩增产物与 Genbank 公布的东方百合“元帅”查尔酮合酶 cDNA(序列号为 AF169800) 开放阅读框序列一致, 说明 CHS3 基因已获得。

2.2 pBI121-CHS3 重组载体构建及鉴定

在 CHS3 基因两端经 PCR 扩增引入 *Sad* 和 *Xba*I 酶切位点, 双酶切, 回收 CHS3 片断(约 1 000 bp); 同时用 *Sad* 和 *Xba*I 将表达载体 pBI121 的 GUS 编码序列切除(约 1 700 bp), 回收大片段(图 4)。用 T4 连接酶连接 2 个目的片段, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 挑取抗性克隆提取质粒(图 5), 用 *Sad* 和 *Xba*I 双酶切鉴定, 检测结果证实切下 1 条 1 200 bp 左右的片段(图 6), 胶回收后送上海生工测序, 测序结果证实该片段序列与 Genbank 公布的东方百合“元帅”的 CHS3 cDNA 开放阅读框序列一致, 说明 CHS3 基因已插入到 pBI121。重组质粒构建成功并命名为 pBI121-CHS3。

2.3 农杆菌转化与鉴定

利用冻融法将表达载体 pBI121-CHS3 重组质粒导入农杆菌 EHA 105, 在卡那霉素的 YM 平板上, 挑取转化的农杆菌单菌落接种于含 500 g/mL 卡那霉素的 YM 液体培养基中, 28℃下, 220 r/min 摇培 16 h, 直接用菌液做 PCR。经 PCR 鉴定扩增得到与预期大小相符的片段 1 200 bp(图 7), 表明已获得了含有目的片段的表达载体的农杆菌菌株, 可用于新铁炮百合的遗传转化。

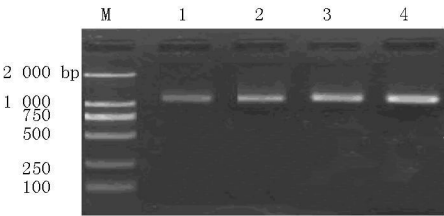


图 7 pBI121-CHS3 植物表达载体菌落 PCR 鉴定

注: M; DL 2 000 Marker; 1~7: CHS3 gene.

3 结论与讨论

植物表达载体中广泛应用的启动子是组成型启动子, 绝大多数双子叶转基因植物均使用 CaMV35S 启动子, 在组成型表达启动子的控制下, 外源基因在转基因

植物的所有部位和所有的发育阶段都会表达^[8]。pBI121 是一种常用的植物表达载体, 含有 CaMV35S 启动子和 Nost 终止子。从 pBI121 物理图谱可知, 植物二元表达载体 pBI121 多克隆位点含有限制性内切酶 *Sad* 和 *Xba*I 位点, 说明载体 pBI121 能被 *Sad* 和 *Xba*I 酶切成粘性末端。利用 Dnaman 软件分析 CHS1 基因, 可知该花色基因不含限制性内切酶 *Sad* 和 *Xba*I 的位点, 因此, 用 PCR 的方法在 CHS1 基因两端加上 *Sad* 和 *Xba*I 位点, 酶切后使其形成粘性末端, 成功地与 pBI121 连接。在 pBI121 启动子和终止子之间含有 GUS 报告基因, 由于 GUS 基因上下游分别含有 *Xba*I 和 *Sac*I 酶切位点, 因此, 在构建植物表达载体时, CHS1 基因被定向插入 35S 启动子下游, 同时 GUS 基因被切除, 避免了融合蛋白的形成。

农杆菌介导的植物表达系统是一种高效的外源蛋白表达系统, 为了利用农杆菌介导在新铁炮百合中表达 CHS1, 该试验将重组质粒 pBI121-CHS3 转化到农杆菌 EHA105 中, 为下一步农杆菌侵染新铁炮百合并在新铁炮百合中特异性表达查尔酮合酶基因做好充分的准备。农杆菌中重组质粒的提取难度大, 所以采用了菌液 PCR 检测的方法, 鉴定结果与酶切后结果完全一致, 所以在 PCR 条件控制严格的情况下, 简易的 PCR 可以作为植物表达载体是否导入农杆菌的依据。

重组质粒 pBI121-CHS3 的成功构建为进一步通过转基因技术培育带色新铁炮百合奠定基础。花色是衡量观赏植物的重要指标之一, 改变花色一直是转基因花卉研究比较热门的问题, 查尔酮合酶是花色素苷生化合成途径中的关键酶, 是一个重要的调控点^[9], 对百合 CHS3 基因的研究对于了解百合花色素苷和原花色素合成途径的分子机制也有重要的意义。

参考文献

[1] 李美茹, 陈金婷, 孙梓健, 等. 花卉分子育种的研究进展[J]. 热带亚热带植物学报, 2003, 11(1): 87-92.
[2] Vander Krol A R, Lenting P E, Veenstra J. An anti sense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation[J]. Nature, 1988, 333: 866-869.
[3] Elomaa P, Honhanen J, Puska R. Agrobacterium mediated transfer of antisense chalcone synthase cDNA to Gerbera hybrida in Hibits flower pigmentation[J]. Bio/ Technology, 1993(11): 508-511.
[4] Gutterson N C, Napoli C, Lemieux C. Modification of flower color in florists' *Chrysanthemum*; production of a white genetics[J]. Bio/ Technology, 1994(12): 268-271.
[5] 周厚高, 宁云芬, 江如蓝, 等. 新铁炮百合主要性状发育的动态变化[J]. 北方园艺, 2003(2): 60-61.
[6] 李守丽, 石雷, 张金政, 等. 百合育种研究进展[J]. 园艺学报, 2006, 33(1): 203-210.
[7] 张聪敏. 新铁炮百合生长发育特性研究[J]. 漳州师范学院学报, 2007, 57(3): 57-85.
[8] Singh N P, McCoy M T, Tice R R. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells[J]. Exp Cell Res, 1988,

长白山野生梅花草组培快繁技术研究

刘宝光¹, 田春雨²

(1. 北华大学 林学院, 吉林 吉林 132013; 2. 吉林市林业局林业总站, 吉林 吉林 132013)

摘要: 用长白山野生梅花草嫩叶为外植体, 进行了组织培养研究, 建立了无性繁殖体系。结果表明: 适于愈伤组织诱导培养基为改良 MS+BA 1.0 mg/L+NAA 0.5 mg/L, 愈伤组织诱导率达 65%; 适于不定芽分化的培养基为改良 MS+BA 1.0 mg/L+KT 1.0 mg/L+NAA 0.3 mg/L, 不定分化效率达 11.2 个/g; 适于生根诱导的培养基为 1/2MS+NAA 0.05 mg/L+IBA 0.05 mg/L, 生根达 97.2%; 适于练苗的基质组合为 1/2 珍珠岩+1/2 蛭石, 苗木成活过 90% 以上。

关键词: 梅花草; 组织培养; 诱导

中图分类号: S 682.1⁺9 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2010)16-0148-03

梅花草是虎耳草科多年生草本植物, 分布于我国东北、华北、西北、日本、北温带与亚寒带也有分布。长白山野生梅花草高 20~60 cm, 叶片圆形或心形, 花单生顶端, 白色或黄色, 花瓣数 5, 形似梅花, 花期 7~8 月^[1]。常生于湿草甸子、林下潮湿处及水沟旁。梅花草花艳丽且具有浓郁香味, 可用于湿地、水景园或室内观赏, 在国外早有园林应用, 观赏价值较高^[2]。全草入药, 具清热凉血, 解毒消肿, 化痰止咳功效。长白山野生梅花草分

布海拔较高, 种子细小, 采摘和调制困难, 并且种子发芽率低, 苗生长缓慢, 苗期长, 播种繁殖困难。通过组织培养可以缩短长白山野生梅花草的育种周期, 加快优良品系的驯化、选育进程, 提高苗木品质, 快速满足生产实际的需要, 为生产经营部门创造较好的经济效益。

1 材料与方法

1.1 试验材料

外植体来自于从吉林省白河林业局采挖回的梅花草盆栽植株。

1.2 试验方法

1.2.1 外植体处理 外植体均来自越冬后在室内萌发出的幼嫩叶片, 外植体分上、中、下部, 剪切规格为 0.25~0.64 cm², 外植体材料表面消毒: 用软毛刷刷洗叶片后,

第一作者简介: 刘宝光(1972-), 男, 吉林省吉林人, 硕士, 工程师, 现从事林木遗传育种研究工作。E-mail: liubaoguang2005@yahoo.

com.cn.

收稿日期: 2010-04-10

175(1): 184-191.

[9] Thilo C F, Heidrun H, Barbara M, et al. Molecular cloning, substrate specificity of the functionally expressed dihydroflavonol 4-reductase from *Malus domestica* and *Pyrus communis* cultivars and the consequences for

flavonoid metabolism [J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 2003, 412: 223-230.

Construction of Expressing Vector Containing Chalcone Synthase Gene from *Lilium* 'Acapulco'

HE Feng-mei¹, ZHU Yong-ping²

(1. College of Horticulture and Landscape Yunnan Agricultural University, Kunming Yunnan 650201; 2. College of Agriculture and Biotechnology, Yunnan Agricultural University, Kunming Yunnan 650201)

Abstract: In this article, CHS1 cDNA ORF was cloned from flower petals of 'Acapulco' according to the *Lilium* 'Acapulco' CHS1 cDNA sequences published by GenBank and inserted pBI121 expression vector, and then transferred into competent cells of *Agrobacterium tumefaciens* EHA105; The digestion test and colony PCR showed that the specific expression vector designated as pBI121-CHS1 was constructed successfully. It provides a basis for the research on color transgene of *Lilium* Formolongi.

Key words: lily; CHS; expression vector; pBI121; gene