

CsFAD7 基因转化烟草的研究

刘春香, 冷传远, 刘福葵

(潍坊学院 山东省高校生物化学与分子生物学重点实验室, 山东 潍坊 261061)

摘要:以“革新一号”烟草种子为试材,采用根癌农杆菌介导的烟草叶盘转化法将来源于黄瓜的脂肪酸去饱和酶基因(*FAD7*)转入烟草,并在附加 300 mg/L 氨苄青霉素(Amp)的 MS+0.1 mg/L NAA+1.0 mg/L 6-BA 的培养基上诱导植株分化,再生芽在附加 300 mg/L Amp 和 100 mg/L 卡那霉素(Kan)的 MS 培养基上生根,获得再生植株。结果表明:Kan 阳性植株经 PCR 检测筛选,得到转基因阳性植株,证明异源 *FAD* 基因已转入烟草基因组中。 T_1 代经 PCR-Southern 检测证明转化基因可以遗传;转基因烟草在低温胁迫下生长较好,叶绿素荧光参数 F_0 值下降不大, F_v/F_m 值保持较高,表现了对低温的耐受能力,脂肪酸分析表明,该基因可以使烟草叶片的亚麻酸含量比例升高。

关键词:烟草;根癌农杆菌;黄瓜;*FAD7* 基因

中图分类号:S 572.035.2 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)11-0120-04

FAD7 基因是脂肪酸去饱和酶基因的一种^[1],与膜脂不饱和度有关^[2],在拟南芥中其直接作用是催化生物膜上的棕榈二烯酸和亚油酸去饱和形成棕榈三烯酸和亚麻酸^[3]。课题组克隆了黄瓜的 *FAD7*(*CsFAD7*) 基因之后^[4],对其在生物体内的功能进行了鉴定,旨在进一步探索其对烟草抗寒性的影响。作为基因工程遗传转化的模式植物^[5],烟草的遗传转化方法成熟,通过根癌农杆菌叶盘转化法,将 *CsFAD7* 基因导入烟草中,经卡那霉素选择性筛选和 PCR 检测来获得转基因植株,并获得了 T_1 代转基因植株,旨在鉴定所克隆的叶绿体膜表达的 *FAD7* 基因是否具有提高植物抗寒性的功能。

1 材料与方法

1.1 试验材料

“革新一号”烟草种子、根癌农杆菌 EHA105 由山东省农业科学院提供。*CsFAD7* 基因由该试验室克隆^[4]并构建好 pBIN19 的植物表达载体,载体的鉴定采用 *Xba*I 和 *Sac*I 内切酶进行,测序委托上海生工生物技术公司进行。

1.2 试验方法

1.2.1 转化烟草 将烟草种子包裹在纱布中用自来水浸泡冲洗,置于灭菌培养皿中用 70% 酒精浸泡 3 min,无菌水冲洗 3 次,再用 2% 次氯酸钠浸泡 10 min,无菌水洗 3 次,接种在 MS₀ 培养基上,每培养瓶接种 10~15 粒,于

温度 25℃、光照强度 3 000 lx、光照时间 16 h/d 条件下长成无菌苗。烟草转化条件:采用无菌烟草幼苗的叶片,切取一部分叶片,在 MS 培养基预培养 2 d,农杆菌浸染 10 min,黑暗条件下共培养 3 d。再生芽诱导为 MS₀+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA,附加 300 mg/L Amp+100 mg/L Kan,生根培养基 MS₀+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA 附加 300 mg/L Amp+100 mg/L Kan。生根后,将已生根烟草用无菌水冲洗后转移至用灭菌蛭石中培养,代替琼脂培养基,并不再添加有机成分。随后,炼苗,移栽,按常规条件培养。

1.2.2 转基因检测 烟草基因组 DNA 的提取采用 CTAB 法。PCR 鉴定用的引物采用 Primer premier 5.0 软件设计,目的产物长度为 1 474 bp。上游引物 sense209:5'-TTCTTTGTCCCTTGCTTT-3',下游引物 antisense1683:5'-GCTCTTCCATTCCTATC-3',引物由上海生工合成。PCR 反应体系:在 200 μ L EP 管中依次加入 ddH₂O 19.9 μ L、10 \times 缓冲液(含 MgCl₂) 2.5 μ L、dNTPs (10 mmol/L) 0.5 μ L、Primer I (10 μ mol/L) 0.5 μ L、Primer II (10 uM) 0.5 μ L、模板 DNA 1.0 μ L、*Taq* 酶 0.1 μ L。因为基因组 DNA 较大,因此 94℃ 变性 8 min 后,加入 *Taq* 酶。PCR 扩增总反应体系为 25 μ L。混匀后瞬间离心,于 PCR 仪中进行扩增反应。PCR 反应程序如下:94℃ 预变性 2 min、94℃ 变性 30 s、52.6℃ 退火 30 s、72℃ 延伸 90 s;30 Cycles,最后 72℃ 延伸 10 min。琼脂糖凝胶电泳检测目的产物。CR Southern 杂交采用文献 5 的方法,杂交试剂盒及生物素发光检测试剂盒为 MBI 公司的产品,按照试剂盒说明进行生物素标记,进

第一作者简介:刘春香(1974-),女,博士,副教授,研究方向为蔬菜育种及分子克隆。

基金项目:山东省自然科学基金资助项目(ZR2009DQ003)。

收稿日期:2012-03-09

一步进行杂交和检测,采用 BCIP-NBT 显色。

1.2.3 叶绿素荧光参数测定 利用 PAM2100 型叶绿素荧光仪,将烟草定植在花盆内,室内 20~25℃ 培养,8~10 片叶后,暗适应 30 min,测定室温下的 F_0 , F_v/F_m 值,然后经过昼温 10℃,夜温 5℃ 低温处理 1 d 后,观察生长状态,并再按上面的方法测定转基因烟草和野生型烟草的 F_0 , F_v/F_m 值。每处理测定 3 次,取平均值。

1.2.4 转基因烟草的亚油酸和亚麻酸含量分析 烟草叶片低温处理条件同叶绿素荧光参数分析,脂肪酸提取及甲酯化分析采用张一波报道的方法^[6],采用外标法定性,GC 条件,PEG 毛细管柱,柱长 30 m,液膜厚度 0.5 μm ,汽化室温度 250℃,柱温 200℃,检测器温度 250℃。脂肪酸含量比例以大于或等于 C16 的脂肪酸为总脂肪酸,根据各自的峰面积比例计算相应的百分含量。

2 结果与分析

2.1 植物表达载体的构建检测

用 *Xba*I 和 *Sac*I 内切酶分步酶切连接到 *Phin19* 上的 *CsFAD7* 基因,酶切后电泳图谱见图 1,第 1 和第 2 点样孔显示 pBIN19 载体带和 1 470 bp 左右的的目的基因带,

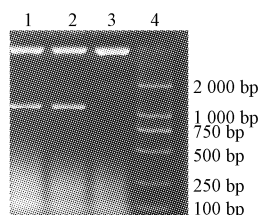


图 1 *FAD7*-pBIN19 载体的酶切图谱



图 2 Kan 筛选培养基上长出的不定芽



图 3 诱导生根的不定芽



图 4 T_0 代转基因烟草种子

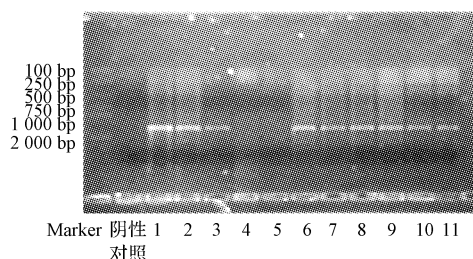


图 5 T_1 代转基因烟草 PCR 检测

2.4 T_1 代烟草的 PCR-Southern 检测

将收获的 T_0 代转基因烟草种子进行育苗、移栽,定植后长势良好,提取基因组 DNA,进行 PCR-Southern 扩增检测,以野生型烟草基因组 DNA 的 PCR 扩增产物为阴性对照。PCR 产物琼脂糖凝胶电泳结果与 PCR-Southern 印迹结果相似,杂交结果见图 6,CK 即野生型没有目的杂交带,可以推断 A、B 2 株烟草 *FAD* 基因已经遗传到 T_1 代。

说明载体有插入片段,将鉴定好的载体进行测序,符合所克隆基因的序列特征,未发现突变点,可以进行农杆菌的转化和植物侵染。

2.2 转化体筛选及植株再生

CsFAD7 基因对烟草的转化试验结果表明,在含 100 mg/L 卡那霉素和 300 mg/L 氨基青霉素的 MS 筛选培养基上几天后大部分外植体膨大,约 3~4 周时,外植体切口两端的膨大突起部位形成许多不定芽(图 2)。多数为有卡那霉素抗性的绿色芽,少数为黄白色非抗性芽,将数个再生芽接入含抗生素 MS 生根培养基上(图 3)。2~3 周后将卡那霉素抗性植株移入盆钵中栽培。套袋自交,到成熟时,收获种子(图 4)。

2.3 T_0 代 PCR 检测

将得到的抗性植株提取 DNA,采用外源目的基因 *FAD* 两端的特异引物,进行 PCR 扩增,以野生型烟草基因组 DNA 的 PCR 扩增产物为阴性对照,将 PCR 产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳分析,转基因烟草扩增出一段大小约 1 474 bp 的片段,而野生型烟草总 DNA 经 PCR 扩增后在该位置没有条带产生。由此可初步证明,有 9 株烟草已经成功转化了 *CsFAD* 基因(图 5)。

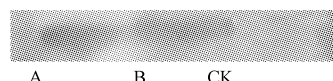
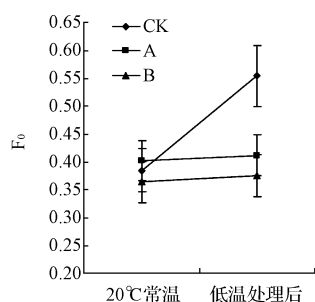
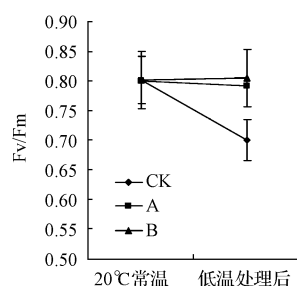


图 6 T_1 代转基因烟草的 PCR-Southern 检测

2.5 转基因烟草最小叶绿素荧光和最大光化学效率分析

F_0 是在充分暗适应后,光系统 II 没能用于光化学反应的叶绿素荧光,在逆境下, F_0 值一般呈现升高趋势。 F_v/F_m 反应的是光系统 II 的光化学效率。经过低温处理后,转基因与非转基因烟草表型上未见显著的差别。但其内在伤害还是存在的,测定其叶片 F_0 ,比较 F_0 的变化(图 7)发现,转脂肪酸去饱和酶基因的烟草 A 和 B F_0 值变化不大,而野生型烟草的 F_0 值显著升高;说明其光能利用能力下降。测定 F_v/F_m 发现,5~10℃ 突然降温对野生型烟草光化学效率的伤害较大,下降明显(图 8),而转基因烟草 A 和 B 的光化学效率均为轻微下降,说明骤然降温对野生型烟草烟草光合能力的伤害明显,而转基因烟草则适应性较强。

图7 转基因烟草叶片 F_0 值的变化图8 转基因烟草叶片 F_v/F_m 值的变化

2.6 转基因烟草叶片的脂肪酸含量分析

在 20~25℃ 常温下不经适应就转入 5~10℃ 处理,转基因烟草脂肪酸饱和度发生明显变化,其中亚麻酸的比例更高些。仪器分析结果显示,在处理条件下野生型烟草亚油酸含量为(9.78±0.31)%,亚麻酸的比例是(66.53±2.43)%,转基因烟草的亚油酸含量(7.82±0.96)%,亚麻酸含量为(70.16±0.61)%,经过转基因处理后,适当降低了亚油酸含量,以提升亚麻酸含量比例。

3 讨论与结论

FAD7 基因是 Iba K^[3] 1993 年从拟南芥突变体中克隆出来的,发现其功能与已报道的质体中得 *FAD3* 功能互补,都是催化 C18:2 脂肪酸转变为 C18:3 脂肪酸的,*FAD7* 的氨基端含有叶绿体转运肽的共有序列,认为其定位在叶绿体膜上^[3]。Kodama H 等^[7] 将拟南芥 *FAD7* 基因转化烟草,发现转化后可以提高烟草中 C18:3 脂肪酸的水平,当将烟草暴露在 1℃ 低温下 7 d 后恢复 25℃,转基因烟草的叶片生长抑制现象明显减轻,非转基因烟草则生长受抑制。而该研究中转 *CsFAD7* 烟草的低温处理时间较短,且降温幅度较小,因而未见明显的生长受抑制现象,但其它抗寒指标都有变化。Kodama 等报道在非结冰的低温条件下,增加 TA 含量是叶片在低温下正常生长的前提,通过过量表达外

源 *FAD7* 基因和诱导内源脂肪酸去饱和酶高表达具有相似的作用,低温处理后在恢复 25℃ 下生长,过量表达 *FAD7* 基因冷害程度轻^[8]。1995 年 Kodama 等又将从拟南芥中获得的 *FAD7* 基因转化进烟草,进行过量表达。转基因烟草在 25℃ 生长条件下叶组织中 TA 含量增加了 10% 左右,而且只有不饱和脂肪酸含量增加。该研究通过过量表达 *CsFAD7* 基因后,烟草在 5~10℃ 低温处理后其脂肪酸含量比野生型烟草 18:3 脂肪酸的含量升高了,这与报道的结果相似。

刘训言^[9] 采用番茄作为转化载体,发现 *LeFAD7* 过量表达后,膜中 6 种类脂的 18:3 脂肪酸均有显著升高,而 18:2 脂肪酸的含量均有不同程度的下降,4℃ 低温胁迫 6 h,番茄出现 PSII 光抑制, F_v/F_m 在所有番茄中都下降,但过量表达 *LeFAD7* 的转基因番茄下降缓慢,未发现 F_0 值的升高,这可能是低温处理的时间短,PSII 未出现明显伤害的原因。该研究认为 *CsFAD7* 的功能与番茄的 *FAD7* 功能基本相似, F_0 的变化可能与所选受体植物本身有关,转基因烟草叶片的 F_v/F_m 值在低温下也是下降缓慢,18:3 脂肪酸含量升高,总体看提高了植物对低温的适应性。

参考文献

- [1] Arondel V, Lemieux B, Hwang I, et al. Map-based cloning of a gene controlling omega-3 fatty acid desaturation in Arabidopsis [J]. Science, 1992, 258:1353-1355.
- [2] Murakami Y, Tsuyama M, Kobayashi Y, et al. Trienoic fatty acids and plant tolerance of high temperature [J]. Science, 2000, 287(5452):476-479.
- [3] Iba K, Gibson S, Nishiuchi T, et al. A gene encoding a chloroplast omega-3 fatty acid desaturase complements alterations in fatty acid desaturation and chloroplast copy number of the *fad7* mutant of *Arabidopsis thaliana* [J]. J Biol Chem, 1993, 268:24099-24105.
- [4] 刘春香, 何启伟, 赵光强, 等. 黄瓜 ω -3 脂肪酸去饱和酶基因 cDNA 的克隆及表达 [J]. 园艺学报, 2008, 35(9):1357-1362.
- [5] 刘进元, 张淑平, 武耀庭. 分子生物学实验指导 [M]. 2 版. 北京: 高等教育出版社, 2006:7-8.
- [6] 张一波, 王丽红, 周青. Tb(III) 对辣根叶片膜脂脂肪酸构成的影响 [J]. 环境化学, 2009, 28(3):392-394.
- [7] Kodama H, Hamada T, Horiguchi G, et al. Genetic enhancement of cold Tolerance by expression of a gene for chloroplast [omega]-3 fatty acid desaturase in transgenic tobacco [J]. Plant Physiol, 1994, 105(2):601-605.
- [8] Kodama H, Horiguchi G, Nishiuchi T, et al. Fatty acid desaturation during chilling acclimation is one of the factors involved in conferring low-temperature tolerance to young tobacco leaves [J]. Plant Physiol, 1995, 107(4):1177-1185.
- [9] 刘训言. 番茄叶绿体-3 脂肪酸去饱和酶 (*LeFAD7*) 的克隆及其在低温逆境下的功能分析 [D]. 泰安: 山东农业大学, 2006.

Study on the Transformation of *Cs-FAD7* Gene into *Nicotiana tabacum*

LIU Chun-xiang, LENG Chuan-yuan, LIU Fu-yan

(Weifang University, Key Laboratory of Biochemistry and Molecular Biology of University in Shandong Province, Weifang, Shandong 261061)

均匀设计法优化彩色马蹄莲品种的 RAPD-PCR 反应体系

陆 波¹, 郑玉红¹, 彭 峰¹, 束晓春¹, 陈晓萱²

(1. 江苏省中国科学院植物研究所 南京中山植物园, 江苏 南京 210014; 2. 江苏大千生态景观股份有限公司, 江苏 南京 210024)

摘 要:以 7 个彩色马蹄莲品种为研究对象,以品种 Prafait DNA 为模板,采用均匀设计法对影响彩色马蹄莲 RAPD-PCR 反应的 4 因素(模板 DNA 浓度、引物浓度、 Mg^{2+} 浓度、dNTPs 浓度)在 3 个水平上进行 $U_{12}(3^4)$ 优化试验。结果表明:最佳的彩色马蹄莲 RAPD-PCR 的反应体系为: 20 μ L 体系中含有 25 ng 的模板 DNA, 0.125 mmol/L dNTPs, 1.5 mmol/L Mg^{2+} , 1 \times buffer 反应缓冲液, 0.55 mmol/L 引物, 1.0 U 的 *Taq* DNA 聚合酶。

关键词:彩色马蹄莲;均匀设计法;RAPD-PCR

中图分类号:S 682.2⁺64 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)11-0123-04

彩色马蹄莲(*Zantedeschia hybrida*)为天南星科(Araceae)马蹄莲属(*Zantedeschia* Spreng.)多年生草本花卉。马蹄莲属原产于非洲中南部,共有 7 个种(表 1),可分为白花马蹄莲和彩色马蹄莲两大类。目前世界上栽培的彩色马蹄莲多为彩色马蹄莲的 6 个原种杂交及回交形成的园艺品种^[1-3]。彩色马蹄莲因其典雅别致的花形、花色及叶形,早在 1664 年就作为观赏花卉引入欧洲,栽植于法国巴黎皇家花园。1925 年意大利植物学家 Frangcesco Zantedeschia 首次命名彩色马蹄莲^[4]。但其商业化生产直到 20 世纪初才正式展开,20 世纪 70 年代后,新西兰、荷兰及美国等国家开始了对彩色马蹄莲的

品种改良;20 世纪 80 年代更是出现了不少杂交园艺品种,这也带动了世界范围内彩色马蹄莲研发,促进了彩色马蹄莲产业的发展。我国虽然从 20 世纪 80 年代开始引种栽培彩色马蹄莲,但近年来关于种球休眠机理、花期调控和育种及品种鉴定等方面研究报道很多,发展也较快。

随着国外新的杂交园艺品种的大量引入及国内自身新品种培育,彩色马蹄莲在推广过程中所面临的品种权、细菌性软腐病问题,对彩色马蹄莲的产业发展造成了极大的束缚。因此,有必要对现有的杂交园艺种进行分类整理,利用分子技术确定品种间亲缘关系远近,这既可以选择亲本、构建分离群体和基因定位的基础,同时又可用来预测其杂种优势^[5]。这方面的研究,Yao J L 等^[6]利用 *Z. odorata* 与 *Z. aethiopica* 杂交,研究品种间的染色体组和质体基因组不相容的原因。张永春等^[7]从 ISSR 分子标记入手,对 10 个彩色马蹄莲进行了遗传多样性和品种的分子鉴定,为系统分析彩色马蹄莲的遗传多样性和品种选育做了开拓性的工作。随着新的杂

第一作者简介:陆波(1979-),男,安徽马鞍山人,硕士,现主要从事观赏植物快繁与栽培及产业化研究工作。

责任作者:彭峰(1955-),男,硕士,研究员,现主要从事观赏植物育种与快繁及产业化研究工作。E-mail:pfeng@vip.sina.com。

基金项目:江苏省科技支撑计划资助项目(BE2009324);常州市科技支撑计划资助项目(CE20112015)。

收稿日期:2012-03-15

Abstract: Using 'Gexin No. 1' tobacco seeds as test materials, *FAD7* gene was transferred into tobacco leaves with the help of *Agrobacterium tumefaciens*. Shoots were regenerated on MS medium supplemented with 300 mg/L Ampicillin, 1.0 mg/L 6-BA and 0.1 mg/L NAA and rooted on MS medium with 300 mg/L Ampicillin and 100 mg/L Kanamycin. PCR analysis proved *FAD7* gene integration into Kanamycin resistance plants. The results of PCR analysis in T_1 generation transgenic plants showed that the transformed gene could inherit to next generation, it grew well under low temperature. The parameters of leave chlorophyll fluorescence F_0 decreased slightly, and the values of F_v/F_m kept high level after *CsFAD7* gene transformed into tobacco. fatty acid analysis showed that the contents ratio of linolenic acid in leaves were higher in transgenic tobacco than in wild type tobacco.

Key words: *Nicotiana tabacum*; *Agrobacterium tumefaciens*; cucumber; *FAD 7* gene