林业科学研究 2004,17(1):1～5
Forest Research

文章编号:1001-1498(2004)01-0001-05

香石竹 ACC 氧化酶重复基因植物表达载体的构建及转基因植株的获得

余义勋[1], 包满珠[1], 孙振元[2]
(1. 华中农业大学园艺林学学院,湖北 武汉 430070; 2. 中国林业科学研究院花卉中心,北京 100093)

摘要:香石竹 ACC 氧化酶基因从核 NDA 中克隆之后,将其首先构建成正义及反义的单拷贝植物表达载体,在此基础上又同向插入一个 ACO 基因片段,从而获得 ACO 的正义重复基因和反义重复基因植物表达载体,所得载体已通过酶切分析和 PCR 鉴定。将该表达载体导入根癌农杆菌 LBA4404 菌株,并转化香石竹品种 Master、爱卡迪幼叶,经 PCR 检测和 Southern 杂交鉴定,获得了 8 株转化植珠。

关键词:香石竹;ACC 氧化酶;重复基因;重组载体构建;遗传转化
中图分类号:S722.3 **文献标识码**:A

香石竹(*Dianthus caryophyllus* L.)是世界四大切花之一,长期以来人们一直在致力于延长其瓶插寿命的研究。由于香石竹是典型的乙烯致衰植物,ACC 氧化酶(ACO)是植物乙烯合成途经中的关键酶,催化 ACC 生成乙烯,因此应用 ACC 氧化酶基因的反义 RNA 技术和共抑制效应,可望有效抑制乙烯生物合成,从而延长切花植物的瓶插寿命。1995 年澳大利亚花卉基因有限公司将香石竹 ACO 基因反义 cDNA 导入香石竹后,使香石竹花瓣衰老明显延迟[1]。ACO 基因的克隆已在番茄(*Lycopersicon esculetum* Mill.)[2]、桃(*Amygdalus persica* L.)[3]、苹果(*Malus pumila* Mill.)[4]、短牵牛(*Petunia hybrida* Vilm.)[5]、香石竹[6]等植物上有报道,不同植物 ACO 基因的产物同源性在 70 %左右。转基因沉默理论认为,转基因与内源基因较高的同源性,以及重复基因的导入均可加强内源基因的沉默[7]。Angel[8]和 Hamilton[9]等的研究表明,重复 DNA 片段能够引起内源基因近 100 %的转录后沉默。这为转基因沉默内源基因提供了更加高效的方法。本实验室已从香石竹基因组中克隆到香石竹 ACO 基因,并构建到植物表达载体上[10]。在此基础上,又构建了正义同向重复和反义同向重复的香石竹 ACO 基因植物表达载体。通过农杆菌介导法获得转基因植株。

1 材料与方法

1.1 菌种、质粒与植物材料

大肠杆菌(*Escherichia coli* (Migula) Castellani and Chelmers) DH5α、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens* (Smith et Townsend) Conn) LBA4404 菌株为本实验室保存,含香石竹 ACO 基因的

收稿日期: 2003-05-10
基金项目: 国家自然科学基金(39970532)项目及"948"项目(96-4-06)资助
作者简介: 余义勋(1973—),男,河南新县人,华中农业大学博士生.

pMD-ACO 载体、植物正义表达载体 pMACO1 和植物反义表达载体 pMACO2 由本实验室构建[10],pIC19R 载体为荷兰自由大学馈赠,其余分子生物学试剂均购自华美生物工程公司。酶切片段用上海生工试剂盒进行回收。香石竹品种 Master、爱卡迪组培苗购自云南省农科院。

1.2 载体构建

1.2.1 含 ACO 基因的中间载体构建 用 *Pst* Ⅰ和 *BamH* Ⅰ双酶切 pMD-ACO 载体,回收小片断与经 *Pst* Ⅰ和 *BamH* Ⅰ双酶切的 pIC19R 载体连接,转化 *E. coli* DH5α 感受态细胞,在 x-gal/ IPTG 培养基上挑取白色菌落,用碱法小批量抽提质粒,作电泳鉴定和限制性内切酶分析。以得到含香石竹 ACO 基因的 pIC-ACO 中间载体,见图 1。

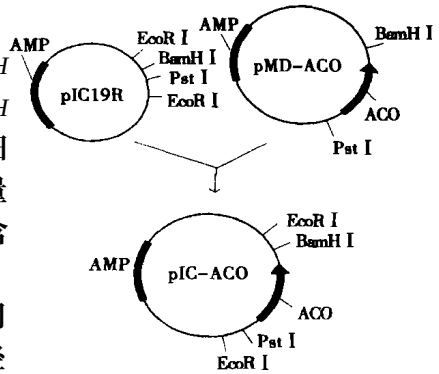


图 1 中间载体 pIC-ACO 的构建示意图

1.2.2 正义重复 ACO 基因的植物表达载体构建 用 *EcoR* Ⅰ酶切 pIC-ACO 中间载体,回收小片断插入到经 *EcoR* Ⅰ酶切的 pMACO1 植物表达载体上,用 *BamH* Ⅰ酶切鉴定是否插入及确定 ACO 基因的连接方向,构建正义重复表达载体,见图 2。

1.2.3 反义重复 ACO 基因的植物表达载体构建 用 *EcoR* Ⅰ酶切 pIC-ACO 中间载体,回收小片段插入到经 *EcoR* Ⅰ酶切的 pMACO2 植物表达载体上,也用 *BamH* Ⅰ酶切鉴定是否插入及确定 ACO 基因的连接方向,构建反义重复表达载体,见图 2。

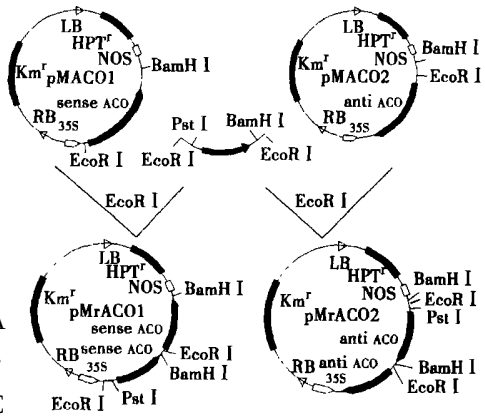


图 2 pMrACO1 和 pMrACO2 载体构建示意图

1.3 PCR 扩增

参照 Wang 等[7]报道的香石竹 ACO 基因 cDNA 序列,设计一对特异引物,5′> GCAAACATTGTCAACTTCCC < 3′和 5′> TCAAGCAGTTGGAATGGGAC < 3′(由上海博亚生物技术工程公司合成)。以香石竹核 DNA 为模板,扩增出香石竹 ACO 基因,经测序,该其因片段长 1 205 bp[10]。

1.4 含重复 ACO 基因的植物重组表达载体转化根癌农杆菌

用碱法大量制备质粒 DNA,经 RNase 消化 RNA,然后用氯仿∶异戊醇(24∶1)抽提 3 次,上清液转入另一离心管,加 0.6 倍体积异丙醇(-20 ℃)放置 3 min,沉淀 DNA;12 000 r·min^{-1}离心 2 min 弃上清,沉淀用 70 %酒精漂洗;干燥 DNA,加 50 μL TE 溶解 DNA,用冻融法导入农杆菌。

1.5 香石竹遗传转化

香石竹遗传转化参照林荣呈等的方法进行[11]。用香石竹组培苗顶芽下 3 对幼叶作外植体。将幼叶顺茎轴撕下,先在预培养基(PM,MS + BA1.0 mg·L^{-1} + NAA0.3 mg·L^{-1},pH5.8 ~ 6.0)上预培养 2 d 后,于 OD600 = 0.5 的工程菌液侵染 8 min,取出外植体用无菌滤纸吸干,转入培养基(CoM,PM + AS100 μmol·L^{-1},pH5.8 ~ 6.0)25 ℃条件暗培养 1 d,再光培养 2 ~ 3 d。共培养结束后将外植体移入选择分化培养基(SM,即 PM + HPT 5 mg·L^{-1} + 头孢酶素 400 mg·

L^{-1},pH5.8)上进行筛选,4 周后将外植体移入头孢酶素减半的选择分化培养基中。当幼叶基部分化芽(非腋芽)长至 1 cm 左右时,将其切下转至选择生根培养基(RM,MS + NAA 0.1 mg·L^{-1} + HPT 3.5 mg·L^{-1})中,诱导生根及植株伸长。

1.6　转化植株的检测

1.6.1　PCR 检测　根据 HPT 基因序列设计一对引物,5′-CGTCTGTCGAGAAGTTTC-3′和 5′-TACTTCTACACAGCCATC-3′。PCR 反应采用 20 μL 体系,模板 DNA 20 ng,两个引物各 0.5 μmol·L^{-1},1 U Taq 聚合酶。94 ℃变性 4 min。然后依次在 94 ℃变性 1 min,57 ℃复性 1 min,72 ℃延伸 1 min,循环 35 次后在 72 ℃保温 10 min,最后在 4 ℃保存。取样 10 μL 在 8 g·kg^{-1}的琼脂糖凝胶上进行电泳检查。

1.6.2　Southern blot 杂交分析　取 PCR 呈阳性的植株基因组 DNA 及非转化香石竹 DNA(阴性对照),*EcoR* Ⅰ37 ℃酶切 16 h,*EcoR* Ⅰ酶切 pMOGMONACO2 为阳性对照,通过纸吸印法将酶切的 DNA 转移到 Hybond-N + (Amersham)膜上,上海生工 DNA 回收试剂盒回收 HPT 基因片段作探针。预杂交、杂交均参照 Sambrook 等的方法[12]。

2　结果

2.1　含 ACO 基因的中间载体构建

pMD-ACO 载体经 *Pst* Ⅰ和 *BamH* Ⅰ双酶切后,回收小片段插入到用 *Pst* Ⅰ和 *BamH* Ⅰ双酶切的 pIC19R 载体上,得到的重组载体定名为 pIG-ACO。对 pIG-ACO 的酶切和 PCR 分析表明:PCR 片段已插入 pIC19R 载体中。

2.2　正义重复 ACO 基因的植物表达载体构建和鉴定

pIG-ACO 载体经 *EcoR* Ⅰ酶切后,回收小片段插入经 *EcoR* Ⅰ酶切的 pMACO1 载体上,经 *BamH* Ⅰ酶切得到一条约 1.2 kb 的条带,可确定为正义重复表达载体,定名为 pMrACO1。对重组表达载体进行 PCR 扩增,可扩增出约 1.2 kb 和 2.4 kb 两条带,分别为一个 ACO 基因片段和两个 ACO 基因片段,而阴性对照只能扩增出一条约 1.2 kb 条带,如图 3。

1. *BamH* Ⅰ酶切 pMACO1;
2. *BamH* Ⅰ酶切 pMACO2;
3. *BamH* Ⅰ酶切 pMrACO1;
4. *BamH* Ⅰ酶切 pMrACO2;
5. 以 pMACO1 为模板 PCR 扩增;
6. 以 pMACO2 为模板 PCR 扩增;
7. 以 pMrACO1 为模板 PCR 扩增;
8. 以 pMrACO2 为模板 PCR 扩增;
9. λDNA/ *Hind* Ⅲ+ *EcoR* Ⅰ分子量标记

图 3　pMrACO1 和 pMrACO2 的酶切和 PCR 鉴定

2.3　反义重复 ACO 基因的植物表达载体构建和鉴定

pIG-ACO 载体经 *EcoR* Ⅰ酶切后,回收小片段插入经 *EcoR* Ⅰ酶切的 pMACO2 载体上,也用 *BamH* Ⅰ酶切,得到一条约 1.2 kb 的条带,可确定为反义重复表达载体,定名为 pMrACO2。对重组表达载体进行 PCR 扩增,可扩增出约 1.2 kb 和 2.4 kb 两条带,分别为一个 ACO 基因片段和两个 ACO 基因片段,而阴性对照只能扩增出一条约 1.2 kb 条带,如图 3。

2.4　根癌农杆菌的转化与鉴定

用冻融法将正义重复和反义重复表达载体转化到根癌农杆菌 LBA4404 菌株中,分别得到 10 多个转化子。以根癌农杆菌中纯化的质粒为模板,用 ACO 基因的特异引物进行 PCR 扩增,

结果表明:大多数转化子的 DNA 中均能扩增出约 1.2 kb 和 2.4 kb 两条带,分别为一个 ACO 基因片段和两个 ACO 基因片段。

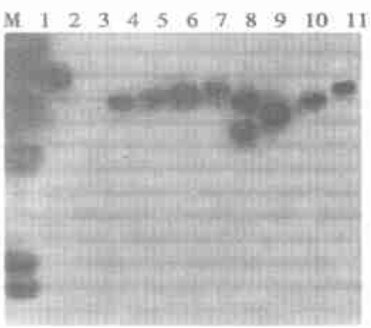
M.λDNA/ Hind Ⅲ分子量标记;1. 质粒;2. 未转化植株;3 ～ 17. 转化植株(其中 6、8、12、14 为假阳性)

图 4 转化植株的 PCP 检测

2.5 转基因植株的鉴定

2.5.1 转基因植株的 PCR 分析 将获得的 15 株抗性再生植株各取叶片约 0.1 g,分别提取总 DNA,用 HPT 引物进行 PCE 扩增。在 15 株植株中有 11 株得到了预期分子量 947 bp 的条带,与质粒 DNA 扩增出的条带完全相同,而未转化的香石竹 DNA 未扩增出相应的条带,如图 4。

2.5.2 Southern 杂交检测 用 ^{32}P 标记的 HPT 基因片段为探针,分别与经 *EcoR* Ⅰ酶切的转基因植株、未转化的植株总 DNA 和质粒 DNA 进行杂交,结果表明:经 PCR 分析的 11 株转化植株中有 8 株和质粒有同源的杂交带出现,而未转化的植株则无杂交带出现。证明重复 ACO 基因已整合到转基因植株中。在显阳性 8 株中 Master 品种有 5 株,其中,转正义重复 ACO 基因 3 株,转反义重复 ACO 基因 2 株;爱卡迪 3 株,其中,转正义重复 ACO 基因 2 株,转反义重复 ACO 基因 1 株。Southern 杂交结果如图 5。



M.λDNA/ Hind ⅢMaker;1. 质粒 DNA;2. 对照;3 ～ 10. 转因基植株

图 5 转基因香石竹植株的 Southern blot 结果(*EcoR* Ⅰ酶切)

3 讨论

重复基因的导入可以导致更高程度的基因沉默[7,13],而有关利用反义和正义重复基因共同转化进行探索沉默机制还未见报道。人们普遍认为转基因沉默分为两类:转录基因沉默(Transcriptional gene silencing,TGS)和转录后基因沉默(Post-transcriptional gene silencing,PTGS)。PTGS 可能是真核生物普遍存在的一种现象,Fire 等人将体外合成的与线虫内源基因同源的小分子 dsRNA 注射到线虫 *Caenorhabditis elegans* 体内,发现 dsRNA 可沉默与其同源的内源基因,即 RNA 干扰(RNAi)现象[14]。进一步的研究发现,RNAi 现象与植物的 PTGS 极为相似。

本研究在转化植株的鉴定中,15 株抗性苗中有 11 株 PCR 显阳性,8 株 Southern 杂交显阳性,有一定数量的假转化体出现。形成假转化体的原因可能有以下几个方面:(1)外植体细胞暂时表达外源选择抗性基因,从而为其它非转化细胞提供了一道屏障,逃避了选择压力的影响而继续分化;(2)外植体的某些表层细胞稳定表达外源选择抗性基因降低了其周围培养基的抗生素浓度,为其它非转化细胞提供屏障;(3)植物对选择抗生素具有较高的内源抗性;(4) PCR 检测的是长到 1 ～ 2 cm 的小苗,可能存在根癌农杆菌污染导致非转化体 PCR 鉴定呈阳性。

所得到 Southern 杂交显阳性的 8 株中,只有 1 株为 2 个拷贝,其余均为单拷贝,表明根癌农杆菌介导香石竹拷贝数较低。

对这些转基因植株的进一步栽培及生理生化分析研究可望筛选瓶插寿命延长的香石竹新品种,同时也将对转基因沉默机制进行进一步的探讨。

参考文献:

[1] Savin K L ,Baidoete S C ,Graham M W ,et al. Antisense ACC oxidase RNA delays carnation petal senescence[J]. Hortscience ,1995 ,30 (5) :970 ～ 972

[2] Holdsworth M J ,Bird C R ,Ray J ,et al. Structure and expression of an ethylene-related mRNA from tomato[J]. Nucl Acid Res ,1987 ,15 : 731 ～ 739

[3] Callahan A M ,Morgens P H ,Wright P ,et al. Comparison of pch313 (pTOM13homolog) RNA accumulation during fruit softening and wounding of two phenotypically different peach cultivars[J]. Plant Physiol ,1992 ,100 (1) :482 ～ 488

[4] Dong J G ,Olaon D ,Silverstone A. Sequence of a cDNA coding for a 1-aminocyclopropae-1-carboxylate oxidase homolog from apple fruit [J]. Plant Physiol ,1992 ,98 (4) :1530 ～ 1531

[5] Tang X Y ,Wang H ,Brandt A S ,et al. Organization and structure of the ACC oxidase gene family from *Petunia hybrida*[J]. Plant Mol Biol ,1993 ,23 :1151 ～ 1164

[6] Wang H ,William R W. A flower senescene-related mRNA from carnation shares sequence similarty with fruit-related mRNA involved in ethylene biosynthesis[J]. Plant Physiol ,1991 ,96 :1000 ～ 1001

[7] Meins F. RNA degradation and models for post-transcriptional gene silencing[J]. Plant Molecular Biology ,2000 ,43 :261 ～ 273

[8] Angel S M. Consistent gene silencing in transgenic plants expressing a replicating potato virus X RNA [J]. EMBO J ,1997 ,16 : 3675 ～ 3684

[9] Hamilton A J. Brown S ,Yuanhai H ,et al. A transgene with repeated DNA causes high frequency ,post-transcriptional suppression of ACC-oxidase gene expression in tomato[J]. Plant J ,1998 ,15 (6) :737 ～ 746

[10] 余义勋,张俊卫,孙振元,等. 香石竹 ACC 氧化酶基因的克隆与植物表达载体构建[J]. 林业科学研究,2002 ,15 (3) : 256 ～ 260

[11] 林荣呈,陈龙清,包满珠,等. 提高根癌农杆菌介导的香石竹遗传转化率的研究[J]. 林业科学研究,2003 ,16 (3) : 123 ～ 128

[12] Sambrook J ,Fritsch E F ,Maniatis T. Molecular Cloning :A Laboratory Manual 2nd ed. [M]. New York :Cold Spring Harbour Laboratory Press. 1989. 565 ～ 572

[13] Sijen T ,Wellink J ,Hiriart J B ,et al. RNA-mediated virus resistance :Role of repeated transgenes and delineation of targeted region[J]. Plant Cell ,1996 ,8 (11) :2277 ～ 2294

[14] Fire A ,Xu S ,Montgmery M K ,et al. Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*[J]. Nature ,1998 ,391 :806 ～ 811

Construction of Repeated Carnation ACC Oxidase Gene Plant Recombinant Expression Vectors

YU Yi-xun[1] ,　*BAO Man-zhu*[1] ,　*SUN Zhen-yuan*[2]

(1. Huazhong Agricultural University ,Wuhan　430070 ,Hubei ,China ; 2. Flower Center ,CAF ,Beijing　100091 ,China)

Abstract : The genomic fragment of carnation ACC oxidase ,the key enzyme in ethylene biosynthesis ,was cloned and single copy plant recombinant expression vectors were constructed first. The sense and antisense repeated plant recombinant expression vectors were constructed based on the single copy vectors. The repeated vectors were indentified by restriction enzyme and PCR analysis. The vectors were transformed into *Agrobacterium tumefaciens* ,which was confirmed by PCR analysis. Transgenic plants of carnation were obtained by using those vectors ,which were confirmed by PCR analysis and Southern blotting. The transgenic plants were under further analysis for transgene silence effect.

Key word :carnation (*Dianthus caryophyllus* L.) ;ACC oxidase (ACO) ;repeat gene ;gene cloning ;construction of recombinant vector ;transformation