

文章编号:1001-1498(2005)03-0231-05

# 甜菜碱合成调控基因共表达载体的构建与抗盐初步研究\*

高志民<sup>1,2</sup>, 彭镇华<sup>1</sup>

(1. 中国林业科学研究院林业研究所,北京 100091; 2. 国际竹藤网络中心,北京 100102)

**摘要:**甘氨酸甜菜碱是植物体内重要的渗透调节物质,通过逐步克隆方法,将甜菜碱合成途径中编码三个关键酶(PEAMT、CMO 和 BADH)的基因构建到同一表达载体中,并经过酶切检测,证明得到了正确表达载体质粒——pCBP。将 pCBP 转入农杆菌 GV3101,用真空渗透法转化拟南芥(Col-0)植株,通过抗性筛选获得了转基因植株,PCR 检测证实三个目的基因已经转入到拟南芥植株中。抗盐性检测表明,在含 NaCl 125 mmol L<sup>-1</sup>的 1/2MS 培养基上,转基因植株的生长明显优于 Col-0。

**关键词:**甜菜碱;表达载体;抗盐

**中图分类号:**Q75 **文献标识码:**A

## Construction of Co-expressing Vector for GlyBet Synthesis and Salt Tolerance

GAO Zhi-min<sup>1,2</sup>, PENG Zhen-hua<sup>1</sup>

(1. Research Institute of Forestry, CAF, Beijing 100091, China; 2. International Center for Bamboo and Rattan, Beijing 100102, China)

**Abstract:** Glycine betaine (GlyBet) is an established target for metabolic engineering of stress tolerance because it is a potent osmoprotectant that many plants lack. GlyBet is synthesized in the chloroplast by a two-step oxidation of choline (Cho) that is catalyzed by CMO and BADH. Cho is one of essential precursors for the synthesis of GlyBet. PEAMT is a key enzyme in the Cho biosynthetic pathway and serves as a step-limiting controller. The CMO cDNA and BADH cDNA driven by 35S and the PEAMT genomic DNA were cloned into the binary vector (pCAMBIA1300) containing HPT gene step by step. The plasmid was checked by 7 enzymes, and the fingerprints were expected. The plasmid of this expressing vector was transferred into the *Agrobacterium tumefaciens* (GV3101) by electroporation, then used in genetic transformation of *A. thaliana* mediated by vacuum infiltration. The primary transgenic plants were selected for hygromycin resistance and verified by PCR. The transgenic lines showed less growth inhibition than control on 1/2MS containing 125 mmol L<sup>-1</sup> NaCl.

**Key words:** GlyBet; expressing vector; salt resistance

干旱、盐害是自然界中生物体所面临的最常见的不利因素,生物体通过各种方式来适应逆境。长期以来的抗逆研究表明:生物体内存在着多种机制抵御外界渗透压胁迫,如通过离子泵调节维持胞内

外离子平衡、水分平衡;通过积累甜菜碱提高胞内渗透压等<sup>[1]</sup>。甘氨酸甜菜碱是无毒的细胞质渗透调节物质,起无毒渗透保护剂的作用,多种高等植物在盐碱和缺水环境下,在细胞中积累甘氨酸甜菜碱类物

收稿日期:2004-08-05

基金项目:科技部转基因专项:“抗干旱耐盐碱基因工程麻黄新品种培育(J2002-B-007)”;科技部 973 项目:“林木育种的分子机理”(G199916003)

作者简介:高志民(1971—),男,河北唐山人,博士。

\*致谢:本实验在中国科学院遗传与发育研究所开放实验室 804 组完成,得到了该实验室老师的指导和同学的帮助,在此深表谢意!

质,以维持细胞的正常膨压<sup>[2]</sup>,因此,近年来甘氨酸甜菜碱的生物合成与代谢成为人们研究植物抗逆机制的重要对象之一,以期通过基因工程手段来提高植物的抗逆性。研究表明:在具有甜菜碱合成途径的植物中,甜菜碱由胆碱经两步氧化得到,两步反应发生在叶绿体基质中,催化第1步反应的酶是一类单氧化物酶,为胆碱单氧化物酶(CMO);催化第2步反应的是甜菜碱醛脱氢酶(BADH),因此,胆碱是甘氨酸甜菜碱生物合成必要的前体物质<sup>[3]</sup>。CMO基因和BADH基因已经通过基因工程途径转入烟草(*Nicotiana tabacum* L.)、拟南芥(*Arabidopsis thaliana* L.)、小麦(*Triticum aestivum* L.)、水稻(*Zoysia japonica* L.)等植物中,并且提高了植物的抗逆能力。通过基因工程产生的甘氨酸甜菜碱的水平并不显著,植物抗逆性提高的程度并不十分明显。许多研究证明,在基因工程中导致甘氨酸甜菜碱合成含量低的原因,很大程度上是甘氨酸甜菜碱的合成前体——胆碱合成不足<sup>[4]</sup>,而胆碱的合成是在磷酸乙醇胺N-甲基转移酶(PEAMT)的催化下,通过磷脂酰乙醇胺逐步甲基化来实现的<sup>[5]</sup>。将甜菜碱合成途径中编码的三个关键酶(PEAMT、CMO和BADH)的基因同时构建到同一表达载体中,用含有这三个关键基因的表达载体转化植物,在植物体内人为地创造一条甜菜碱合成途径,为甜菜碱的生物合成创造有利条件,提高植物体内的甜菜碱含量,从而提高植物的抗盐性,将是培育植物新品种的一条有效途径。

## 1 材料与方 法

### 1.1 实验材料

实验材料为野生型拟南芥 Col-0。

### 1.2 目的基因、中间载体与构建

CMO基因cDNA(1.732 kb)和BADH基因cDNA(1.513 kb)由中国科学院遗传与发育研究所开放实验室提供,PEAMT基因全长(5.401 kb)由作者从拟南芥中克隆;所用载体为:pBluescriptII SK(+),pJL453、pJL700、pJL1276、pJL1279、pJL1280、pBII01、pCAMBIA1300,构建采取逐步亚克隆的方法<sup>[6]</sup>。

### 1.3 转化所需菌株

大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株为:NM538、DH5、DH10B和XL1-Blue;农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株为:GV3101。

### 1.4 酶、试剂盒及各种分子生物学和化学药品

各种DNA内切酶、T<sub>4</sub>DNA连接酶为Biolab产

品;质粒回收试剂盒为鼎国公司产品;其它实验室常用分子生物学及化学试剂均为分析纯试剂。

### 1.5 基因转化与筛选

农杆菌转化采用电激法,拟南芥植株转化采用真空渗透法。在1/2MS培养基上以潮霉素作为筛选标记进行转基因后代的筛选<sup>[7]</sup>。

### 1.6 核苷酸酶切位点分析

根据目的基因与载体的序列,应用DNASTAR软件进行分析目的基因与载体上酶切位点,预测酶切产物中的片段大小。

### 1.7 转基因拟南芥DNA的提取与检测

取转基因拟南芥T<sub>4</sub>代抗性植株的叶片10~20 mg,采用CTAB法提取基因组DNA。在PTC200 PCR仪上进行扩增;PCR反应体系选用20 μL,40个循环;反应产物于1%琼脂糖凝胶电泳检查。

引物 :B-type F2:5' CCC CgT TIC TAT TCC AAg gTT C-3'

B-type R2:5' AAg TCC CCA TTT CTg CIC AIC C-3'

引物 :BADH-F:5' AgA ATg gCg TIC CCA ATT CCT gCT C-3'

BADH-R:5' TIC AAg gAg ACT TGT ACC ATC CCC A-3'

引物 :CMO-F1:5' CAT ACA ACA ATC ATg gCA gC-3'

CMO-R1:5' gTT CAT AgA CAA TCT CAT AgT TCC-3'

### 1.8 转基因拟南芥抗盐性检测

将Col-0和转基因后代纯系种子分别播种在1/2 MS培养基上,3 d后将培养基上的苗转到含0、50、100、125、150、200 mmol L<sup>-1</sup> NaCl的1/2MS培养基上进行垂直板培养试验<sup>[7]</sup>;将转基因后代纯系和Col-0分别直接播种到含不同浓度NaCl的1/2MS培养基上进行垂直板培养试验。

## 2 结果与分析

### 2.1 植物表达载体的构建与检测

第1步,用单酶切(PstI)将pJL453上的2×35S和NOS连接到SK上,之后将2×35S去掉,仅在SK上引入NOS(EcoRI),再将pJL1279上的2×35S和BADH基因引入(HindⅢ/KpnI),这样在SK上就引入了NOS、2×35S和BADH基因;第2步在pCAMBIA1300载体上引入来自pJL700上的NOS(SacI/EcoRI),并引入来自pJL1280的2×35S和CMO基因

(BamHI / SalI) ;第 3 步,将第 1 步中 SK 上的 NOS、2 × 35S 和 BADH 基因连接到第 2 步的载体上 (BamHI/ KpnI) ;第 4 步,将 pJL1276 中的 PEAMT 基因连接到第 3 步的载体上 (SalI) ,这样在 pCAMBIA1300 载体上

就包含了 PEAMT 基因的全长以及分别由 2 ×35S、 NOS 启动和终止的 CMO 基因、BADH 基因,由此,即完成了含有甜菜碱合成调控的 3 个基因共表达载体的构建(图 1)。

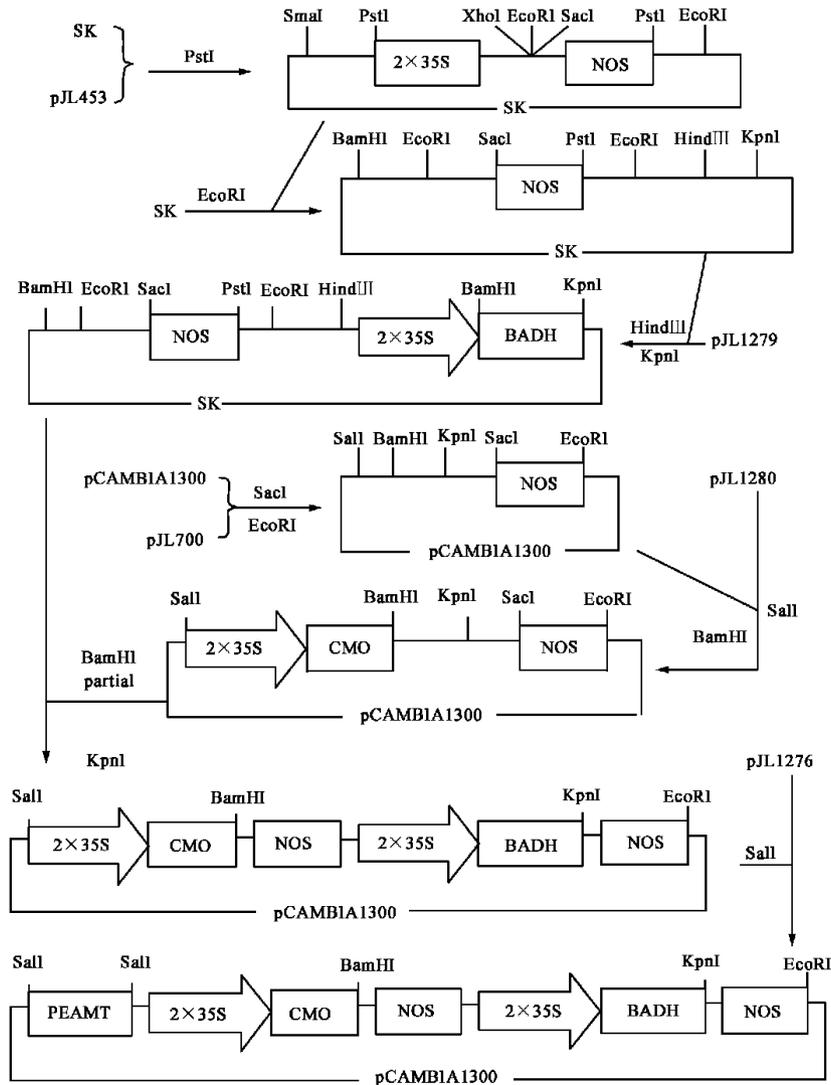


图 1 共表达载体的构建

为检测共表达载体构建的正确性,进行了酶切指纹分析。根据预测,共表达载体质粒上 Hind 有 6 个酶切位点,酶切产物为 11.7、2.3、1.6、1.5、1.4、1.3 kb 等 6 条带;KpnI 有 3 个酶切位点,酶切产物为 9.9、6.8、3.1 kb 3 条带;SalI 有 2 个酶切位点,酶切产物为 14.4、5.4 kb 2 条带;BamHI 有 2 个酶切位点,酶切产物为 18.7、1.1 kb 2 条带;SacI 有 4 个酶切位点,酶切产物为 11.8、4.6、2.6、0.8 kb 4 条带;XhoI 有 4 个酶切位点,酶切产物为 10.6、5.6、2.5、1.1 kb 4 条带;PstI 有 5 个酶切位点,酶切产物为 10.8、5.4、2.5、0.8、0.3 kb 5 条带。

对构建的共表达载体质粒采用 Hind、KpnI、SalI、BamHI、SacI、XhoI、PstI 等 7 种酶切,结果如图 2 所示,酶切结果与预测完全吻合,证明甜菜碱合成调控的 3 个基因共表达载体的构建是正确的。

2.2 基因转化与抗性筛选

将植物表达载体质粒通过电激法转入农杆菌中,并通过真空渗透法转化拟南芥植株。将转化植株进行正常培养,至成熟后收集种子,并对收获的种子进行筛选。将种子处理好后播种于含潮霉素 40 mg L<sup>-1</sup> 的 1/2MS 固体培养基上,经过筛选获得了 65 个抗性株系,取其中 10 个株系进行纯系筛选与实验。

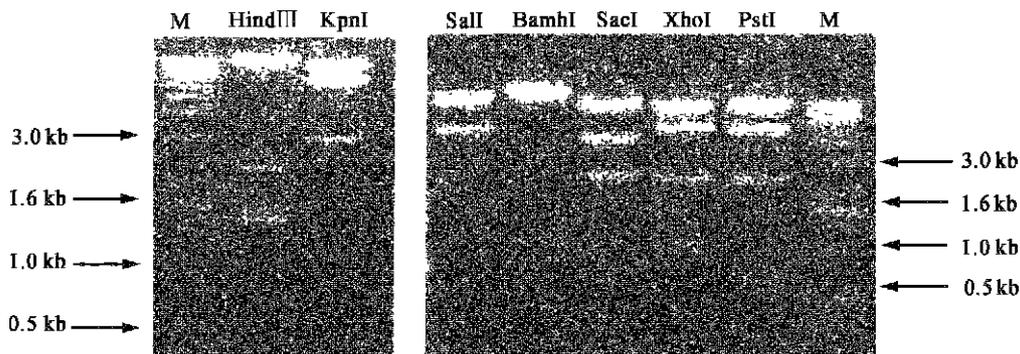


图2 酶切检测结果

### 2.3 转基因植株纯系 T<sub>4</sub> 代 PCR 检测

以转基因纯系 T<sub>4</sub> 代抗性植株的基因组 DNA 为模板,根据 PEAMT 基因、CMO 基因和 BADH 基因的序列设计的引物 (DNA 片段为 2.2 kb)、(DNA 片段为 1.5 kb)、(DNA 片段为 1.6 kb),进行 PCR 检测,PCR 条件分别如下:

引物 :94 变性 1 min、55 退火 1 min、72 延伸 2.5 min;引物 :94 变性 1 min、55 退火 1 min、72 延伸 2 min;引物 :94 变性 1 min、52 退火 1 min、72 延伸 2 min。

PCR 反应均为 20 μL 体系,40 个循环。PCR 产物电泳结果如图 3 所示。

PCR 产物电泳结果表明:所检测的 T<sub>4</sub> 代 4 个单株中都能扩增出相应的带,引物 、 、 扩增产物分别在 2.2、1.6、1.5 kb 有一条明显的主带,而以水和野生型 (Col-0) 基因组 DNA 为模板的对照则无扩增产物。由此可以证明转基因 T<sub>4</sub> 代植株中含有转入的 3 个目的基因。

### 2.4 转基因植株 T<sub>4</sub> 代抗盐检测

取 Col-0 和转基因后代 T<sub>4</sub> 代纯系种子分别播种在 1/2MS 培养基上,3 d 后将培养基上的苗转到含 NaCl 0、50、100、125、150、200 mmol L<sup>-1</sup> 的 1/2MS 培养基上进行垂直板培养 (图 4 中黑点位置为转接时根尖的位置)。结果表明:在含 NaCl 0、50、200 mmol L<sup>-1</sup>

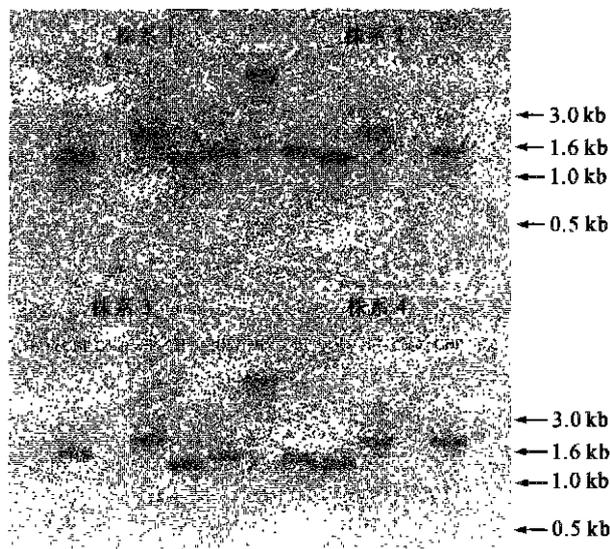


图3 PCR 检测结果

的 1/2MS 培养基上 Col-0 和转基因后代生长没有明显差异,50 mmol L<sup>-1</sup> 的 NaCl 对 Col-0 和转基因后代的生长都影响不大,100、150 mmol L<sup>-1</sup> 时都受到抑制,但差异不明显,达到 200 mmol L<sup>-1</sup> 时均生长受到强烈抑制,很快黄化,7 d 即死亡;而在 125 mmol L<sup>-1</sup> 时 Col-0 和转基因后代 T<sub>4</sub> 植株的差异最明显 (图 4), Col-0 的根系和叶片都明显受到抑制,而转基因植株的长势则明显优于 Col-0。

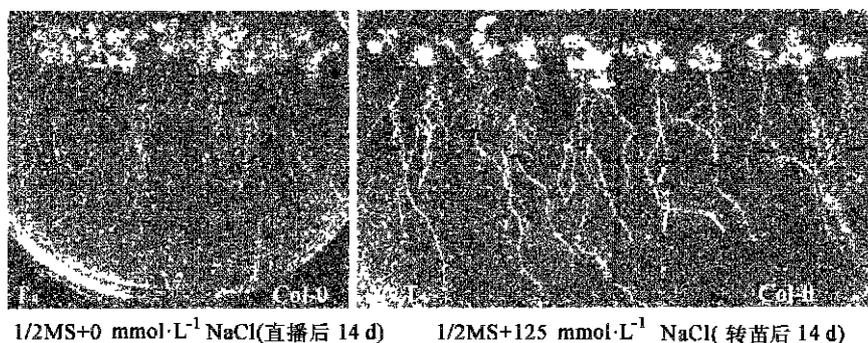
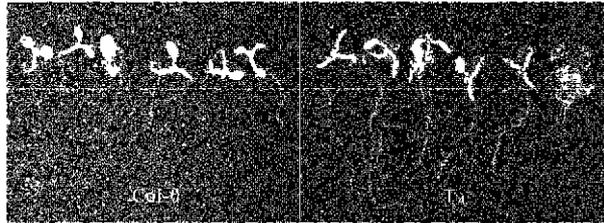


图4 抗盐实验结果

将 Col-0 和转基因后代  $T_4$  代纯系种子直接播种到含不同浓度 NaCl 的培养基上,结果与萌发后再转接到 NaCl 培养基上的相似,在  $125\text{mmol L}^{-1}$  时 Col-0 和转基因植株的差异也最明显,转基因植株的抗盐性较 Col-0 有所提高(图 5)。



1/2MS+125 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl(直播后 14 d)

图 5 抗盐实验结果

### 3 讨论

(1) 本研究通过将甜菜碱合成途径中编码 3 个关键酶 (PEAMT、CMO 和 BADH) 的基因构建到同一表达载体中,并将其转入拟南芥植株中,使得植株的抗盐性得到了提高。由此证明,通过基因工程手段,为不能自身合成甘氨酸甜菜碱的植物提供一套完整的甘氨酸甜菜碱合成途径所需要的酶,是提高植物的抗盐性和培育林木抗盐新品种的有效途径之一。

(2) 从 3 次在盐培养基上的表型来看,无论是转基因植株还是转基因种子在含有不同浓度 NaCl 的培养基上都表现出一致的结果,都是在含  $125\text{mmol L}^{-1}$  NaCl 的 1/2MS 培养基上差异最明显。由此来看,

$125\text{mmol L}^{-1}$  NaCl 可能是拟南芥对 NaCl 抗性的一个阈值,在该浓度附近的研究测试需要再深入。

(3) 本研究发现,转基因植株的抗盐性并非预期想象的那样理想,外源基因在转基因植株的表达情况如何,植株体内甘氨酸甜菜碱的生物合成是否顺利进行,甘氨酸甜菜碱积累的情况又怎样,需要进一步测定,而转入的基因是否能高效表达,需要通过 Northern 杂交来进一步证实。

### 参考文献:

- [1] 赵可夫,李法曾. 中国盐生植物[M]. 北京:科学出版社,1999
- [2] Sentenac H, Bonneaud N, Minet M, et al. Cloning and expression in yeast of a plant potassium ion transport system[J]. Science, 1992, 256: 663 ~ 665
- [3] McNeil S D, Nuccio M L, David R, et al. Radiotracer and computer modeling evidence that phospho-base methylation is the main route of choline synthesis in tobacco[J]. Plant Physiology, 2000, 123:371 ~ 380
- [4] Huang J, Hirji R, Adam L, et al. Genetic engineering of glycinebetaine production toward enhancing stress tolerance in plants: metabolic limitations[J]. Plant Physiol, 2000, 122:747 ~ 756
- [5] McNeil S D, Rhodes D, Russell B L, et al. Metabolic modeling identifies key constraints on an engineered glycine betaine synthesis pathway in tobacco[J]. Plant Physiol, 2000, 124(1):153 ~ 162
- [6] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. Molecular Cloning[M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- [7] Mou Z, Wang X, Fu Z, et al. Silencing of phosphoethanolamine N-methyltransferase results in temperature-sensitive male sterility and salt hypersensitivity in Arabidopsis[J]. Plant Cell, 2002, 14(9):2031 ~ 2043