

转 γ -生育酚甲基转移酶基因大豆的获得^{*}

康小虎^{1,3} 欧阳青^{1,2} 吴存祥¹ 张玉满² 白羊年¹ 曹孜义³
蔡文启^{2,*} 韩天富^{1,*}

(1. 中国农业科学院作物科学研究所, 北京 100081; 2. 中国科学院微生物研究所, 北京 100080;
3. 甘肃农业大学农学院, 兰州 730070)

摘要 以大豆子叶节为外植体, 利用 γ -生育酚甲基转移酶基因(γ -TMT)的种子特异性表达载体p7S-TMTL, 通过农杆菌介导法转化大豆, 获得26株抗卡那霉素再生植株。PCR检测结果表明其中4株为阳性, 初步证明 γ -TMT已整合到这4株大豆的基因组中。

关键词 大豆; γ -TMT; α -生育酚; 农杆菌介导; 子叶节; PCR

中图分类号 S 565.1 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2004)03-0236-03

生育酚(俗称维生素E)是仅由光合生物合成的一类脂溶性的强抗氧化剂, 是人体和动物所必需的维生素之一。维生素E日吸收量达10—13.4 IU(国际单位)(约7—9mg α -生育酚)时方可维持成人肌肉、心血管和中枢神经系统及其它器官的正常功能。临床研究表明, 维生素E可提高人体免疫功能、防治或延缓多种慢性病的进程、降低患心血管疾病和某些癌症的危险^[1]。缺乏时, 很容易出现生殖系统的萎缩和损害。在天然存在的8种生育酚形式中, 完全被甲基化了的 α -生育酚生物活性最高, 而且可被人体优先吸收和利用^[2]。植物油是生育酚的主要膳食来源, 但在大多数植物油中 α -生育酚含量偏低, 而其生物合成前体 γ -生育酚含量则较高。大豆油中 α -生育酚的含量仅占生育酚总量的7%, 而 γ -生育酚却高达70%^[3]。目前, 生育酚生物合成途径的相关基因大多已被克隆、鉴定^[4-6], 现已证实 γ -生育酚甲基转移酶(γ -TMT)催化 γ -生育酚向 α -生育酚的转变^[7,8]。随着分子生物学的迅速发展, 通过基因工程手段可望提高大豆中 γ -TMT的表达, 使 γ -生育酚转变为 α -生育酚。本文旨在利用种子特异性表达载体p7S-TMTL将 γ -TMT转入大豆以提高豆油中 α -生育酚的含量, 从而提高其营养价值。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料及菌株

选作外植体的大豆品种为吉林小粒1号, 由吉林农业科学院杨光宇研究员提供。根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株GV3101(PMP90)由本实验室保存。

1.1.2 种子特异性表达载体

含种子特异性启动子7S的质粒pU8-2由中国科学院植物研究所宋艳茹研究员惠赠。 γ -TMT基因克隆自结球甘蓝^[9], 种子特异性表达载体p7S-TMTL(图1)为本课题组构建。载体p7S-TMTL上带有种子特异性表达的启动子7S和NOS终止子, 顺向插入1.06 kb的 γ -TMT, 筛选标记基因为NPTII(新霉素转移酶基因)。

1.1.3 培养基及化学试剂

实验所用基本培养基为MSB; MS无机盐成分+B5有机成分。诱导丛生芽培养基: MSB培养基中含0.2mg/L IBA, 2.0mg/L 6-BA和30mg/L乙酰丁香酮。筛选丛生芽培养基: MSB培养基中含0.05mg/L IBA、1.5mg/L 6-BA、50mg/L卡那霉素。诱导生根培养基: MSB培养基中含1.2mg/L 6-BA。

PCR引物由上海博亚生物技术有限公司合成, Taq DNA Polymerase购自Takara公司。6-BA、IBA、Cef、Kan、乙酰丁香酮均购自SIGMA公司。

* 收稿日期: 2004-04-05

基金项目: 国家自然科学基金(批准号: 30270856)和国家重点基础研究发展计划(2002CB111301)资助。

* 通讯作者: E-mail: caiwq@sun.im.ac.cn; E-mail: hantf@mail.caas.net.cn

作者简介: 康小虎(1977-), 男, 在读硕士研究生



图 1 种子特异性表达载体 p7S-TMTL

Fig. 1 Seed specific expression vector p7S-TMTL

1.2 方法

1.2.1 农杆菌介导法

农杆菌介导的子叶节转化参照欧阳青^[9]、王萍等^[10]方法。

1.2.2 转基因大豆的 PCR 检测

应用改进的 CTAB 法提取大豆基因组 DNA^[9], 质粒提取和纯化参照标准实验方案进行^[11], 所用引物为 P7S5 和 GSP3, 扩增的目的片段包含种子特异性表达启动子的部分片段和 γ -TMT, 长度为 1.3 kb。

P7S5: 5'-CCCAAGCTTCCTATCTGTCAC-TTC-3'
GSP3: 5'-GCAGATTCTGTCCAAGAGGTTC-3'

PCR 反应体系: 10—50ng 大豆基因组 DNA 为模板, 以 P7S5 和 GSP3 为引物对目的片段进行 PCR 扩增, 反应程序为: 94℃ 4min; 94℃ 40s, 55℃ 40s, 72℃ 40s, 35 个循环; 72℃ 10min。反应在 PTC-200 型 PCR 仪上进行, 扩增产物用 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测, 所用凝胶成像系统为 BIO-RAD Universal Hood II。

2 结果与分析

2.1 农杆菌介导的大豆子叶节转化

大豆子叶节用农杆菌侵染后, 在诱导丛生芽培养基上培养 10 天, 可观察到丛生芽出现(图 2, I), 伸长至 1—2cm 时, 转移到筛选丛生芽培养基上。

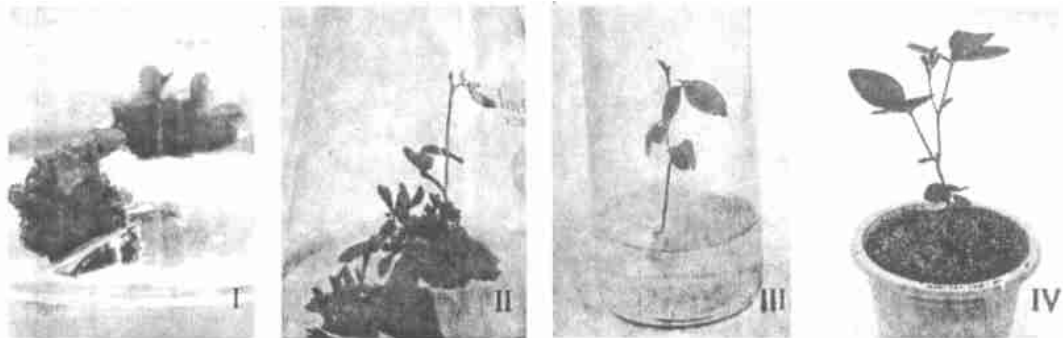


图 2 转基因大豆的再生

Fig 2 Regeneration of transgenic soybean

I 丛生芽 II 丛生芽筛选 III 抗性苗生根 IV 移栽后的转基因大豆
I Multiple shoot-buds; II Screening of multiple shoot-buds
III Induction of root regeneration; IV Transplanted transgenic soybean

在含有卡那霉素的培养基上, 筛选丛生芽, 能很好地抽长且生长健壮的丛生芽称为抗性苗(图 2, II)。待其抽长至 4—5cm 后开始在诱导生根培养基中诱导生根(图 2, III), 生根后移栽(图 2, IV)。

2.2 PCR 检测结果

移栽成活后剪取约 1cm² 叶片提取基因组 DNA 进行 PCR 检测。以 P7S5 和 GSP3 为引物, 以 p7S-TMTL 质粒作为阳性对照, 野生型的吉林小粒 1 号为阴性对照。PCR 检测结果显示, 26 株抗性植株中有 4 株扩增出 1300bp 的目的片段, 而阴性对照中未能扩增出相应片段(图 3)。初步证明目的基因已整合进大豆基因组。

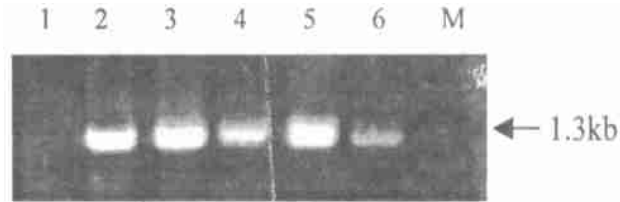


图 3 Kan 抗性苗的 PCR 鉴定

Fig. 3 PCR detection of Kanamycin resistant soybean 1: 野生型大豆; 2—5: 转基因植株; 6: 阳性对照(质粒 p7S-TMTL); M: DNA marker (DL2000)
1: Wild type soybean; 2—5: Transgenic plants; 6: Positive control(plasmid p7S-TMTL); M: DNA marker (DL2000)

3 讨论

随着对生育酚生物合成途径的进一步了解,应用生育酚生物合成过程中的关键基因提高 α -生育酚含量成为可能。自1998年Shintani和DellaPenna^[4]将拟南芥的 γ -TMT基因置于种子特异性表达的启动子DC3下转化拟南芥获得成功之后,Alison^[12]等于2003年将拟南芥的 γ -TMT在大豆种子中特异性表达也取得显著进展,这些工作为进一步揭示 α -生育酚合成途径奠定了良好基础。同年,欧阳青^[9]等从结球甘蓝中克隆了 γ -TMT(命名为BoTMT),并构建了种子特异性表达载体p7S-TMTL。为提高豆油中 α -生育酚含量,我们利用p7S-TMTL转化大豆。该转基因大豆的获得,是培育高 α -生育酚含量大豆新品种的良好开端,也为以后的研究工作奠定坚实的基础。

本研究通过POR检测试验4株为阳性,植株初步证明 γ -TMT已整合到这4株大豆基因组中,但仍需进一步进行分子杂交验证。

参 考 文 献

- 1 National Research Council (U. S.), Food and Nutritional Board. NAS—NRC Recommended Dietary Allowances (10th ed.)[R]. Washington DC., National Academy Press, 1989, 284.
- 2 Shintani D., DellaPenna D. Elevating the vitamin E content of

- plants through metabolic engineering. Science, 1998, 282: 2098—2100.
- 3 黄筱声. 天然维生素 E 与人体健康[J]. 粮食与油脂, 2001, 9: 35—36.
- 4 Shintani D.K., Cheng Z., DellaPenna D. The role of 2-methyl-6-phytylbenzoquinone methyltransferase in determining tocopherol composition in *Synechocystis* sp[J]. PCC6803. FEBS Lett, 2002, 511: 1—5.
- 5 Soll J., Schultz G. 2-methyl-6-phytylquinol and 2, 3-dimethyl-5-phytylquinol as precursors of tocopherol synthesis in spinach chloroplasts[J]. Phytochem, 1980, 19: 215—218.
- 6 Ouyang Q., Fan C., Sun H. et al. Cloning and analysis of a γ -tocopherol methyltransferase gene from *Brassica oleracea* and the function of its recombinant protein[J]. Progress in Natural Science, 2003, 13: 709—715.
- 7 Eckardt N. A. Vitamin E—defective mutants of *Arabidopsis* tell tales of convergent evolution[J]. Plant Cell, 2003, 15: 2233—2235.
- 8 Karin H. Vitamin production in transgenic plants[J]. Plant Physiol, 2003, 160: 821—829.
- 9 欧阳青. 结球甘蓝 γ -生育酚基因的克隆及转基因大豆研究[D]. 中国科学院研究生院博士学位论文, 2003.
- 10 王萍, 王军军, 商德虎, 等. 影响大豆子叶节丛生芽形成的诱导因子的研究[J]. 吉林农业科学, 2001, 26(6): 20—23.
- 11 J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔 著 黄培堂 等译. 分子克隆实验指南(第三版)[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- 12 Alison L., Eenennaam V., Lincoln K., et al. Engineering Vitamin E content: from *Arabidopsis* mutant to soy oil. Plant Cell, 2003, 15: 3007—3019.

TRANSFORMATION OF SOYBEAN WITH γ -TMT FROM *BRASSICA OLERAEA* FOR α -TOCOPHEROL ELEVATION

Kang Xiaohu^{1,3} Ouyang Qing^{1,2} Wu Cunxiang¹ Zhang Yuman² Bai Yangnian¹
Cao Ziyi³ Cai Wenqi² Han Tianfu¹

- (1. *Institute of Crop Science, The Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081;*
- Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080;*
- College of Agronomy, Gansu Agricultural University, Lanzhou 730070*)

Abstract Transformation of soybean with seed specific expression vector p7S-TMTL was conducted through *Agrobacterium*-mediated co-transformation. Twenty-six Kanamycin resistant plants were examined by PCR with specific primers. Four plants showed positive signals, indicating that γ -TMT was transformed into the genome of these four plants.

Key words Soybean; γ -TMT; α -tocopherol; *Agrobacterium*-mediated co-transformation; Cotyledonary node; PCR