

• 药材与资源 •

PMT 和 H6H 双基因共转化颠茄发根的植株再生杨春贤¹, 周启贵¹, 陈敏², 彭梅芳¹, 张婷婷¹, 张磊³, 廖志华^{1*}

(1. 西南大学生命科学学院 天然产物与代谢工程实验室 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400715;

2. 西南大学药学院, 重庆 400715; 3. 第二军医大学药学院 生药学教研室, 上海 200433)

摘要:目的 获得 1,4-丁二胺-氮-甲基转移酶 (putrescine *N*-methyltransferase, PMT) 和莨菪碱-6 β -羟化酶 (hyoscyamine 6 β -hydroxylase, H6H) 双基因共转化的颠茄发根的再生植株。方法 选用 PMT 和 H6H 双基因共转化的东莨菪碱高产发根单克隆 T4, 用 1/2MS+1.0 mg/L NAA 固体培养基培养 1、5、10 d 后, 转入 1/2MS 固体培养基中诱导不定芽和不定根, 培养条件均为 (25 $\pm$ 1) $^{\circ}$ C, 55 μ mol/(m²·s), 12 h/d。采用 PCR 扩增检测再生植株的 PMT、H6H 和 NPT-I。结果 发根在 1/2MS+1.0 mg/L NAA 固体培养基上培养 5 d 后, 转入 1/2MS 固体培养基上培养, 60% 的外植体能自发长出不定芽, 1/2MS+0.1 mg/L IBA 固体培养基中诱导生根较 1/2MS 固体培养基强, 15 d 产生的条数平均为 9 条, 形成了完整的再生植株。PCR 检测表明所有再生植株均为颠茄的转基因再生植株。结论 建立了颠茄转化发根再生体系, 为实现颠茄托品烷类生物碱的代谢工程及开展分子育种奠定了基础。

关键词: 颠茄; 1,4-丁二胺-氮-甲基转移酶; 莨菪碱-6 β -羟化酶; 发根; 再生

中图分类号: R282.2

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)10-1548-04

**Plantlet regeneration for hairy roots of *Atropa belladonna*
by co-transformed PMT and H6H**YANG Chun-xian¹, ZHOU Qi-gui¹, CHEN Min², PENG Mei-fang¹,
ZHANG Ting-ting¹, ZHANG Lei³, LIAO Zhi-hua¹

(1. Laboratory of Natural Products and Metabolic Engineering, Key Laboratory of Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education, School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China;

2. College of Pharmacy, Southwest University, Chongqing 400715, China; 3. Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China)

Abstract: **Objective** To establish a regeneration protocol for hairy root lines of *Atropa belladonna* by co-transformed putrescine *N*-methyltransferase (PMT) and hyoscyamine 6 β -hydroxylase (H6H) genes. **Methods** To transfer the transgenic hairy root line of T4 to 1/2 MS solid medium + 1.0 mg/L NAA and incubated 1, 5, and 10 d at (25.0 $\pm$ 1.0) $^{\circ}$ C with photoperiod (55 μ mol/m²·s) 12 h/d so as to induce callus, then transfer the explants to hormone-free 1/2 MS solid medium and incubated at the same conditions to induce adventitious buds and roots, and then extract DNA from regeneration plantlets leaves so as to detect PMT, H6H, and NPT-I as well. **Results** After being cultured for 5 d on 1/2 MS solid medium + 1.0 mg/L NAA, the hairy root was transferred to hormone-free 1/2 MS solid medium, then adventitious buds emerged from 60% explant and rooted spontaneously on 1/2 MS solid medium, but the rooting percentage was improved better at the presence in 1/2 MS + 0.1 mg/L solid medium IBA than that in 1/2 MS solid medium. The average twigs were nine produced during 15 d and the complete regeneration plantlets were formed. PCR detection demonstrated that PMT, H6H, and NPT-I had inserted into the genome of the regeneration plantlets of *A. belladonna*. **Conclusion** The results presented here provide a protocol of transgenic hairy root regeneration of *A. belladonna*, which could be helpful in tropane alkaloids metabolic engineering and molecular breeding.

Key words: *Atropa belladonna* L.; putrescine *N*-methyltransferase (PMT); hyoscyamine-6 β -hydro-

收稿日期: 2006-12-31

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30500303); 重庆市自然科学基金资助项目 (CSTC2006BB5307)

作者简介: 杨春贤 (1975-), 男 (穿青族), 贵州省织金县人, 助理研究员, 硕士, 研究方向为植物次生代谢。E-mail: yangchunxian@163.com

* 通讯作者 廖志华 Tel: (023)68367146 Fax: (023)68252365 E-mail: zhiliao@swu.edu.cn

xylase (H6H); hairy roots; regeneration

颠茄 *Atropa belladonna* L. 是一种茄科重要药用植物,一直作为商业化生产东莨菪碱和莨菪碱的主要药源,我国南北部药物种植场有引种栽培。天然的颠茄中托品烷类生物碱的量很低^[1],而且东莨菪碱的量远远低于莨菪碱。随着需求量不断增加,人们越来越迫切希望获得高产托品烷类生物碱特别是东莨菪碱的转基因颠茄。目前托品烷类生物碱的生物合成途径已较为清楚,1,4-丁二胺-氮-甲基转移酶(PMT)和莨菪碱-6 β -羟化酶(H6H)是托品烷类生物碱生物合成途径中催化关键步骤的限速酶^[2,3],国内外有大量关于莨菪烷类生物碱的代谢工程研究的报道^[2~4]。但至今未见有 PMT、H6H 双基因共转化

颠茄以及转基因颠茄植株再生的报道。

1 材料和方法

1.1 材料: PMT 和 H6H 双基因共转化的东莨菪碱高产的颠茄发根单克隆 T4。来源: 将“卸甲”根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* C58C1 菌株(含 pRi-A4 质粒和携带均以 CaMV35S 为启动子的来源于烟草 *Nicotiana tabacum* L. 的 PMT 和来源于莨菪 *Hyoscyamus niger* L. 的 H6H 的植物双价表达载体 pXI(图1)^[3], 采用叶盘法转化颠茄无菌苗叶片获得发根^[5,6], 经分子检测和定量筛选出 PMT 和 H6H 双基因共转化的东莨菪碱高产颠茄发根单克隆。

1.2 方法: 将在无激素的 1/2MS 培养基(本研究所

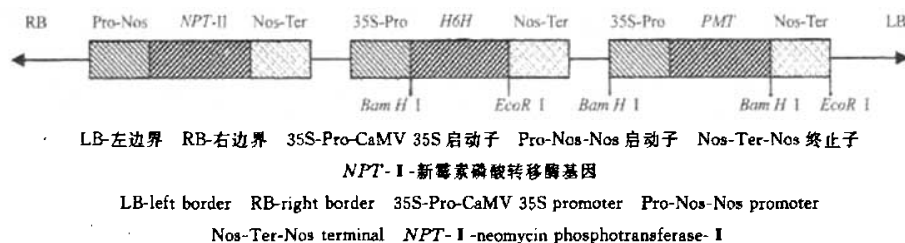


图1 带有 PMT 和 H6H 的植物双价表达载体 pXI

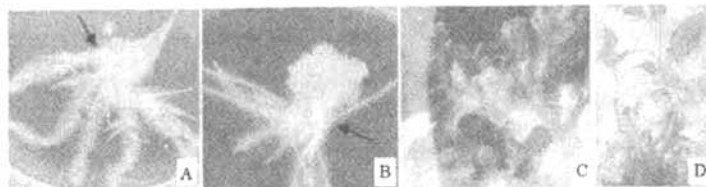
Fig. 1 Dual expression of pXI plasmid with PMT and H6H

有培养基均附加 30 g 蔗糖和 7 g 琼脂, pH 5.8) 上暗培养生长的发根系 T4 转入 1/2MS + 1.0 mg/L NAA 培养基上诱导愈伤组织, 培养时间分 A: 1 d, B: 5 d, C: 10 d 3 种处理组, 每 1 处理组外植体数均为 10 个, 再转入 1/2MS 培养基中诱导不定芽, 20 d 继代 1 次, 60 d 统计丛生芽诱导率和丛生芽个数。长出芽后将芽切下, 转入 1/2MS + 0.1 mg/L IBA 和 1/2MS 培养基中诱导不定根, 20 d 调查不定根的数量。小苗长至 4 cm 时, 切成 2 片展开叶的节段继代于 1/2MS 培养基中扩大繁殖。用 SDS 法^[7] 抽提再生植株的叶片 DNA 对目标基因 PMT 和 H6H 及筛选标记基因 NPT-I 进行 PCR 检测^[4], PMT (451 bp) 正向引物 fPMT: 5'-GCCATTCCCATTGAACG GCC-3', 反向引物 rPMT: 5'-CCTCCGCCGATGATCAAAACC-3', PCR 反应条件为: 94 °C、5 min, 35 个循环(94 °C、1 min, 60 °C、1 min, 72 °C、1.5 min), 72 °C、5 min; H6H (1.2 kb) 正向引物 fH6H: 5'-GGATCCCAACGTATAGATTTC TTC-3', 反向引物 rH6H: 5'-CGGGAATTCGGATCCCAAACCATCACTGCAAT-3', PCR 反应程序为: 94 °C、5 min, 35 个循环(94 °C、1 min, 54 °C、1 min,

72 °C、1.5 min), 72 °C、5 min; NPT-I (568 bp) 正向引物为 fNPT-I: 5'-CCAACGCTATGTCCTGATAG-3', 反向引物为 rNPT-I: 5'-CTGAATGAAGTCCAGGACGAG-3', PCR 反应条件为: 94 °C 预变性 5 min, 然后开始 35 个循环包括 94 °C 变性 60 s, 54 °C 退火 60 s, 72 °C 反应 1.5 min, 最后于 72 °C 延伸 5 min。

2 结果

2.1 愈伤组织的诱导及不定芽的分化: 将暗培养在无激素的 1/2MS 培养基上生长的发根系 T4 转入 1/2MS + 1.0 mg/L NAA 培养基上, (25 ± 1) °C, 55 μmol/(m² · s) 12 h/d 培养, C 处理组第 4 天发根开始变粗、膨大, 在发根剪切的伤口处逐渐产生少量疏松的淡黄色愈伤组织, 第 10 天的发根完全愈伤化, 转入 1/2MS 培养基后随着培养时间延长, 愈伤组织体积迅速增大, 愈伤组织淡黄色、且质地疏松, 继代培养 60 d 后仍未见不定芽的分化。B 处理组第 4 天出现发根开始变粗、膨大, 转入 1/2MS 培养基后在发根剪切的伤口处逐渐产生少量较致密的浅黄色愈伤组织, 且愈伤组织仍不断长出少量的发根, 最早在 30 d 愈伤组织上长出淡黄绿色不定芽(图2-B)。



A-*PMT* 和 *H6H* 双基因共转化的发根单克隆(1/2MS 培养基),箭头所示为自发形成少量愈伤组织 B-转基因发根诱导的愈伤组织及芽点,箭头所示为幼芽 C-转基因发根诱导的丛生芽 D-转基因再生植株

A-hairy root line by co-transformed *PMT* and *H6H* cultured on 1/2 MS medium, arrow indicates that a little callus was spontaneously formed B-callus and adventitious bud formation from, hairy roots arrow indicates tender buds

C-regeneration shoots from *PMT* and *H6H* by co-transformed hairy root line D-regeneration plantlets

图 2 *PMT*、*H6H* 双基因共转化的颠茄发根的植株再生

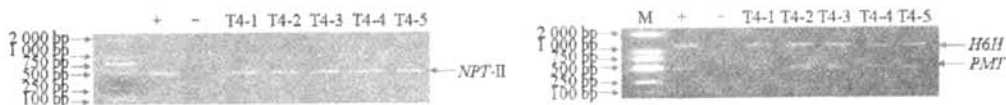
Fig. 2 Regeneration plantlet of hairy root of *A. belladonna* by co-transformed *PMT* and *H6H*

45 d 后长出真叶,丛生芽诱导率达 60%,平均不定芽为 6 个(图 2-C)。A 处理组第 8 天观察到部分发根形成少量愈伤组织,在培养过程中愈伤组织生长缓慢,发根生长迅速,第 45 天形成少量不定芽点。丛生芽诱导率为 20%,平均不定芽为 2.4 个。结果表明,发根在 1/2MS+1.0 mg/L NAA 培养基上培养的时间长短对不定芽的影响极大,培养时间过长,导致发根完全愈伤化,难以分化出不定芽,而培养时间过短则导致发根生长旺盛,不定芽数量偏少。

2.2 生根与扩繁:将幼芽切下转入 1/2MS+0.1mg/L IBA 培养基中诱导生根,5~6 d 后开始长出不定根,15 d 产生的条数平均为 9 条,形成了完整的再生植株。所产生的幼芽在无激素的 1/2MS 培养基中培养 8~9 d 后,也可见从其基部形成不定根,数目明显比 1/2MS+IBA 0.1 mg/L 培养基所诱导

产生的少。Subroto 等^[a]研究表明,转基因颠茄不定芽生根较困难,在 MS 培养基中添加不同浓度的 2,4-D、NAA 等均未成功,可能是使用的工程菌不同所致。再生苗长势良好,小苗长至 4~5 cm 时,将其切成两片展开叶的节段接种于 1/2MS 培养基上继代扩繁。

2.3 再生植株的 PCR 检测:对目标基因 *PMT* 和 *H6H* 及筛选标记基因 *NPT-Ⅰ* 进行 PCR 检测表明,所有再生植株和阳性对照 pXI 质粒均能扩增出了预期的目的片段,非转化的植株不能扩增出对应的片断,与转基因发根的分子检测结果完全吻合。进一步证明发根为获得了外源基因的发根,通过诱导愈伤组织,获得的再生植株后外源 DNA 仍整合在植物基因组,所有再生植株均为 *PMT* 和 *H6H* 双基因共转化。部分 PCR 检测结果见图 3。



M-DNA 分子量标准(100~2 000 bp) +pXI 质粒阳性对照 -野生型颠茄阴性对照 T-双基因共转化发根的再生植株

M-DNA Marker (100-2 000 bp) +-plasmid pXI as positive control -DNA of wild *A. belladonna* as negative control

T-DNA of regeneration plant of *PMT* and *H6H* by co-transformed hairy root line of *A. belladonna*

图 3 转基因颠茄再生植株的 *PMT*(451 bp)、*H6H*(1.2 kb)、*NPT-Ⅰ*(568 bp)基因的 PCR 检测

Fig. 3 PCR Amplified DNA bands of *PMT* (451 bp), *H6H* (1.2 kb), and *NPT-Ⅰ* (568 bp) of regeneration plantlet transformed with pXI plasmid

3 讨论

转基因发根在 1/2MS 培养基上继代培养过程中发现,极个别发根单克隆先出现少量愈伤(图 2-A),将愈伤在光照培养条件下继代培养后长出不定芽,因此设想通过诱导愈伤组织后在诱导不定芽,从而获得颠茄转基因再生植株。结果表明,在获得 *PMT*、*H6H* 双基因共转化的颠茄东莨菪碱高产发根系 T4 的再生植株的适宜条件为:1/2MS+1.0

mg/L NAA 培养基培养 5 d 后转入无激素的 1/2MS 培养基诱导不定芽和不定根,在附加 0.1 mg/L IBA 的 1/2MS 培养基上不定根长势较 1/2MS 培养基好,培养条件均为 $(25 \pm 1) ^\circ\text{C}$, $55 \mu\text{mol}/(\text{m}^2 \cdot \text{s})$, 12 h/d。所有在无激素的 1/2MS 培养基上长出不定芽的外植体均带有愈伤组织和发根,完全愈伤化的外植体和完全是发根的外植体未长出不定芽,可能是发根和愈伤组织的内源激素发生变化所

致,有待对其内源激素水平等进一步研究其机制。本实验的丛生芽诱导率、每个外植体产生的不定芽数量均较低,有待进一步优化。同时再生植株的东莨菪碱、莨菪碱的量及其遗传稳定性等有待研究。基于发根的转基因颠茄植株再生体系的建立,为利用植物基因工程技术实现颠茄托品烷类生物碱特别是东莨菪碱的代谢工程及开展分子育种奠定了基础。

References:

- [1] Strahl B, Atanas P. A rapid densitometric method for the analysis of hyoscyamine and scopolamine in solanaceous plants and their transformed root cultures [J]. *Phytochem Anal*, 2004, 15: 141-145.
- [2] Zhang L, Kai G Y, Lu B B, et al. Metabolic engineering of tropane alkaloid biosynthesis in plants [J]. *J Integr Plant Biol*, 2005, 47(2): 136-143.
- [3] Zhang L, Ding R X, Chai Y R, et al. Engineering tropane biosynthetic pathway in *Hyoscyamus niger* hairy root cultures [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2004, 101: 6786-6894.
- [4] Lu B B, Zang L, Kai G Y, et al. Establishment of hairy root culture of *Hyoscyamus niger* [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 2005, 36(12): 1864-1868.
- [5] Yang C X, Yang Y J, Peng M F, et al. Establishment of hairy root cultures of *Atropa belladonna* [J]. *J Southwest China Norm Univ* (西南师范大学学报), 2006, 31(2): 115-118.
- [6] Yang C X, Chen M, Liao Z H, et al. Establishment of the exogenous gene expression system based on *Atropa belladonna* hairy roots [J]. *Acta Horticult Sin* (园艺学报), 2006, 33(5): 1103-1105.
- [7] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning, A Laboratory Manual* [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [8] Subroto M A, John D H, Pauline M D. Development of shooty teratomas from several solanaceous plants: growth kinetics, stoichiometry and alkaloid production [J]. *J Biotechnol*, 1996, 45: 45-57.

茅苍术 *HMGR* 基因保守区片段的克隆与分析

刘 群¹, 曹小迎¹, 蒋继宏^{1*}, 戴传超²

(1. 徐州师范大学 江苏省药用植物生物技术重点实验室, 江苏 徐州 221116;

2. 南京师范大学生命科学学院, 江苏 南京 210097)

摘要:目的 对茅苍术 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶 (3-hydroxy-3-methylglutaryl-CoA reductase, *HMGR*) 进行基因克隆及序列分析。方法 采用 cDNA 末端快速扩增技术, 以茅苍术嫩叶总 RNA 的 cDNA 为模板扩增茅苍术 *HMGR* 基因的保守区片段。结果 序列分析表明, 所克隆的 cDNA 保守区序列长度为 458 bp, 而且同时得到了两个核苷酸序列的同源性为 84.28% 的片段, 相应的氨基酸序列的同源性为 92.11%。分别命名为 *HMGRcr1*, *HMGRcr2*。推断这可能是该基因家族中的两个成员。而且同源序列比对发现, 推断的 *HMGRcr1* 氨基酸序列和 *HMGRcr2* 氨基酸序列与其他植物都有较高的同源性。结论 首次分离并报道了茅苍术 *HMGR* cDNA 克隆, 为进一步研究萜类生物合成机制及其在提高植物药用价值方面提供理论依据。

关键词:茅苍术; 3-羟基-3-甲基戊二酰辅酶 A 还原酶; 基因克隆

中图分类号: R282.1

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2007)10-1551-04

Cloning and analysis of *HMGR* gene conserved fragments in *Atractylodes lancea*

LIU Qun¹, CAO Xiao-ying¹, JIANG Ji-hong¹, DAI Chuan-chao²

(1. Key Laboratory of Biotechnology for Medicinal Plant, Xuzhou Normal University, Xuzhou 221116, China;

2. College of Life Sciences, Nanjing Normal University, Nanjing 210097, China)

Abstract: **Objective** To clone and sequence cDNA encoding 3-hydroxy-3-methylglutaryl-coenzyme A reductase (*HMGR*) from *Atractylodes lancea*. **Methods** The cDNA, encoding *HMGR* in *A. lancea*, was amplified by RACE strategy with the cDNA of the total RNA of young leaves as the template. The partial fragments of *HMGR* were cloned and sequenced. **Results** The analysis results revealed that the conserved fragments were 458 bp. At the same time, the two fragments had been obtained 84.28% identification in nucleotide acid and 92.11% identification in corresponding amino acid, named as *HMGRcr1* and *HMGRcr2*, respectively. It was deduced that they may be members of the *HMGR* gene family in *A. lancea*. **Se-**

收稿日期: 2006-12-20

基金项目: 江苏省药用植物重点实验室开放课题资助(02AXL12)

作者简介: 刘 群 (1984-), 女, 江苏宿迁人, 硕士研究生, 主要从事药用植物生物技术的研究工作。

* 通讯作者 蒋继宏 Tel: (0516)83403515 E-mail: jhjiang@xznu.edu.cn