

• 药材与资源 •

植物表达载体在三分三发根中的高效表达

潘夕春¹, 陈 敏¹, 张 磊², 廖志华^{1*}, 张明生³

(1. 西南大学生命科学学院 三峡库区生态环境教育部重点实验室, 重庆 400715; 2. 第二军医大学药学院 生药学教研室, 上海 200433; 3. 贵州大学生命科学学院, 贵州 贵阳 550025)

摘要:目的 建立基于发根培养的三分三 *Anisodus acutangulus* 遗传转化体系及在三分三发根中表达外源基因的方法。方法 由种子直接萌发得到无菌苗, 建立了三分三的无菌苗培养系统。将植物高效表达载体 pCAMBIA1304⁺ 导入经过“disarmed”改造的根癌农杆菌 C58C1 (携带 pRiA4 质粒), 获得了携带外源基因表达载体的重组 C58C1 工程菌。取生长良好的幼嫩真叶作为外植体, 在乙酰丁香酮的诱导下用重组 C58C1 进行感染, 诱导发根。选取在无激素培养基上生长迅速, 分支多的发根单克隆进行继代培养。经过 3 次继代培养, PCR (polymerase chain reaction, 聚合酶链式反应) 检测用于验证发根型质粒 pRiA4 和表达型质粒 pCAMBIA1304⁺ 是否整合到三分三发根基因组内。结果 建立了基于发根培养的三分三遗传转化体系, 发根诱导频率达到 100%, PCR 检测表明 pRiA4 和 pCAMBIA1304⁺ 质粒共转化率达到 32%。结论 该方法可以用于在三分三发根中高效表达外源基因, 为实现基于发根的三分三产托品烷类生物碱的代谢工程奠定了基础。

关键词:三分三; 发根; 共转化**中图分类号:**R282.1**文献标识码:**A**文章编号:**0253-2670(2007)04-0588-04Efficient expression of plant expressing vector in *Anisodus acutangulus* hairy rootsPAN Xi-chun¹, CHEN Min¹, ZHANG Lei², LIAO Zhi-hua¹, ZHANG Ming-sheng³

(1. Key Laboratory of Eco-environments in Three Gorges Reservoir Region, Ministry of Education, School of Life Sciences, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Department of Pharmacognosy, School of Pharmacy, Secondary Military Medical University, Shanghai 200433, China; 3. School of Life Sciences, Guizhou University, Guiyang 550025, China)

Abstract: Objective To establish the genetic transformation system of *Anisodus acutangulus* based on hairy root cultures and the method of expressing exogenous genes in *A. acutangulus* hairy roots. **Methods** The bacteria-free seedlings of *A. acutangulus* were obtained from the sterilized seeds that were used for genetic transformation. The disarmed *Agrobacterium tumefaciens* strain C58C1 harboring the plasmid pRiA4 was engineered by introducing the plant expressing vector pCAMBIA1304⁺. The young leaves of *A. acutangulus* were infected with the engineered C58C1 in the treatment of AS to induce the hairy roots. The independently transformed hairy roots which well-grown on hormone-free medium were subcultured for three times to erase bacteria. Then, genomic PCR was applied to detecting whether pRiA4 and pCAMBIA1304⁺ had integrated into host genome of *A. acutangulus* hairy roots. **Results** The genetic transformation system of *A. acutangulus* was established, the hairy roots were induced from the wounded sites at the frequency of 100%. Both of the two plasmids were simultaneously detected in 32% (co-transformation frequency of pRiA4 and pCAMBIA1304⁺ in hairy roots) hairy root clones. **Conclusion** The results demonstrate that exogenous genes can be expressed in hairy roots of *A. acutangulus* at a relatively high frequency by the method in the present study. And this is a fundamental work for metabolic engineering tropane alkaloids in hairy roots of *A. acutangulus*.

Key words: *Anisodus acutangulus* C. Y. Wu et C. Chen; hairy roots; co-transformation三分三 *Anisodus acutangulus* C. Y. Wu et C. Chen 是茄科 (Solanaceae) 一种重要的珍稀药用植

收稿日期: 2006-09-10

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30500303)。

作者简介: 潘夕春 (1982—), 男, 硕士研究生, 从事植物分子遗传学与代谢工程研究。

Tel: (023) 68367146 Fax: (023) 68367146 E-mail: xcpan@swu.edu.cn

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

物,其根中含有多种托品烷类生物碱^[1]。其中莨菪碱、东莨菪碱是重要的反副交感神经作用类药物,临床上主要用作镇静剂^[2],需求量不断增加。由于三分三产地仅限于云南,是一种高海拔植物,野生资源本来就十分稀少;近年来由于人为的滥收,导致三分三野生资源遭到严重破坏。利用植物基因工程技术获取高产托品烷类生物碱的三分三转基因植株,是解决以上问题的有效途径,而首要条件是建立高效的三分三外源基因表达系统。基于发根农杆菌的遗传转化技术是植物基因工程中最成功的转基因方法之一,但目前的报道多停留在利用野生型发根生产次生代谢产物的水平上,外源基因转化的报道并不多见。本研究通过发根农杆菌介导的遗传转化技术,将植物高效表达载体 pCAMBIA1304⁺ 与发根型质粒 pRiA4 共转化到三分三组织中,建立了在三分三发根中表达外源基因的方法,为获得三分三转基因发根和开展基于发根的托品烷类生物碱的代谢工程奠定了基础。

1 材料与方法

1.1 材料及试剂:三分三种子由贵州大学生命科学学院张明生博士提供;Disarmed 根癌农杆菌菌株 C58C1,质粒 pCAMBIA1304⁺ 由本实验室保存,MS (Murashige-Skoog) 培养基、乙酰丁香酮 (acetosyringone, AS) (Sigma, 美国);卡那霉素 (Kana-

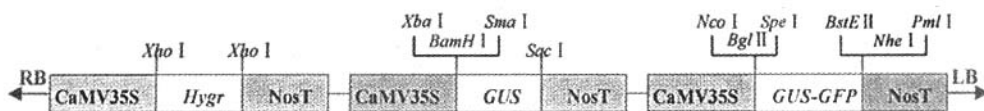
mycin, Kan)、头孢霉素 (Cefotaxime, Cef)、利福霉素 (Riferpin, Rif) (北京鼎国);*Taq* 酶及配套 PCR 试剂 (上海生工);核酸分子量标准 DL2000 (北京天为时代);荧光染料 Goldview, *rolB*、*rolC*、潮霉素基因序列特异性引物 (上海赛百盛)。

1.2 方法

1.2.1 三分三无菌苗系统的建立:用水选法挑选饱满的种子,40 ℃ 温水中浸泡 24 h,然后在流水中冲洗 2 h;无菌条件下用 70% 酒精表面消毒 2 min,0.1% HgCl₂ 消毒 10 min,无菌水冲洗 8 次;用无菌吸水纸吸干表面水分后,接种在 MS^[3] 固体培养基上 (pH 5.8, 8 g/L 琼脂粉作凝固剂),置于温度为 (25±1.0) ℃ 的恒温培养箱中暗培养;约两周后,种子开始萌发,萌发的种子移入温度为 (25±1.0) ℃、光周期为 12 h、光强为 55 μmol/m²·s 的恒温培养箱中继续培养。苗龄约 4~5 周的幼嫩真叶可用于遗传转化。

1.2.2 pCAMBIA1304⁺ 的构建及导入农杆菌 C58C1:pCAMBIA1304⁺ 由廖志华教授构建^[4],其示意图见图 1。用构建好的 pCAMBIA1304⁺ 转化空 C58C1 的感受态细胞,在转化平板上挑取单菌落进行 PCR 验证,即获得携带 pCAMBIA1304⁺ 的重组 C58C1 工程菌。

1.2.3 重组 C58C1 的活化:从 -70 ℃ 超低温冰



CaMV35S 表示 CaMV35S 启动子, NosT 表示 Nos 终止子, RB 和 LB 分别表示 T-DNA 的右边界和左边界

CaMV35S denotes CaMV35S promoter, NosT denotes Nos terminator, RB and LB denote right border and left border of T-DNA

图 1 pCAMBIA1304⁺ 质粒示意图

Fig. 1 Sketch map of pCAMBIA1304⁺

箱中取保存的重组 C58C1,接种到 YEB 液体培养基 + Kan 50 mg/L + Rif 40 mg/L 中,200 r/min,28 ℃ 下快速振荡培养,连续活化 2 次;第 2 次活化至菌液 $A_{600}=0.3$ 左右,加入 AS 至终浓度为 100 μmol/L,继续振荡培养至 $A_{600}=0.5$ 左右;室温下 4 000 r/min 离心 10 min,弃上清液;沉淀下来的菌体用等体积未加抗生素的 MS 液体培养基悬浮,加入 AS 至终浓度为 100 μmol/L,相同条件下振荡培养,继续活化 30 min,可用于转化。

1.2.4 发根农杆菌介导的三分三遗传转化体系的建立:取苗龄约 4~5 周的无菌幼嫩真叶,剪成约 2 cm² 见方的叶片;将叶片放入已活化好的菌液中,浸

泡 3~5 min 后吸干多余菌液;将浸泡过的叶片接种在 MS 固体培养基 + AS 100 μmol/L 上,置于温度为 (25±1.0) ℃ 的恒温暗培养箱中,使发根农杆菌和外植体共培养 48 h;共培养结束后,将外植体接种到 MS+Cef 500 mg/L 的固体除菌培养基上,置于温度为 (25±1.0) ℃ 的恒温培养箱中暗培养。

1.2.5 三分三发根的继代培养:共培养结束约一周后,从叶片伤口边缘长出发根。发根长约 5 cm 时剪下,接种到 MS+Cef 500 mg/L 固体除菌培养基上培养 3 周;挑选生长迅速,分支多的发根,每 4 周继代一次;继代 3 次后,转到不含抗生素的 MS 固体培养基上继续培养。在无抗生素 MS 培养基上不长出

农杆菌的发根系可用于 PCR 检测。

1.2.6 三分三发根的 PCR 检测:上述在无抗生素 MS 培养基上不长出农杆菌的发根系均用于 PCR 检测。按照 SDS 法^[5]抽提发根基因组 DNA,检测合格后用于 PCR 检测。*rolB* 基因片段 (423 bp) 的正向引物为 *frolB*: 5'-GCTCTTGCAGTGCTAG-ATTT-3', 反向引物为 *rolB*: 5'-GAAGGTG-CAAGCTACCTCTC-3'; *rolC* 基因片段 (626 bp) 的正向引物为 *frolC*: 5'-CTCCTGACATCA-AACTCGTC-3', 反向引物为 *rrolC*: 5'-TGCTTC-GAGTTATGGGTACA-3'^[6]; 潮霉素基因片段 (812 bp) 根据潮霉素基因序列设计, 正向引物为 *fhgr*: 5'-CGATTTGTGTACGCCCCACAGTC-3', 反向引物为 *rhgr*: 5'-CGATGTAGGAGG-GCGTGGATATG'-3'。PCR 的反应体系均为 100 ng DNA 模板, 5 μ L 10 $\times$ PCR 反应缓冲液, 3 μ L 25 mmol/L 的 $MgCl_2$, 200 μ mol/L dNTPs, 2.5 单位的 *Taq* DNA 聚合酶和 10 mmol/L 的引物各 1 μ L, 最后用灭菌双蒸水补至总体积为 50 μ L。*rolB* 和 *rolC* 基因的 PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}C$ 预变性 5 min, 然后开始 34 个循环包括 94 $^{\circ}C$ 变性 40 s, 55 $^{\circ}C$ 退火 40 s, 72 $^{\circ}C$ 反应 1 min, 最后于 72 $^{\circ}C$ 延伸 8 min; 潮霉素基因的 PCR 反应条件为 94 $^{\circ}C$ 预变性 5 min, 然后开始 35 个循环包括 94 $^{\circ}C$ 变性 45 s, 55 $^{\circ}C$ 退火 45 s, 72 $^{\circ}C$ 反应 1 min, 最后于 72 $^{\circ}C$ 延伸 8 min。PCR 检测时均采用普通三分三 DNA 作为阴性对照, 重组 C58C1 工程菌 DNA 作为阳性对照。PCR 扩增产物采用 0.8% 琼脂糖凝胶 (Gold View 染色) 进行电泳检测 (120 V, 100 mA, 25 min), DNA 相对分子质量标准为 DL2000。电泳结束后在凝胶成像系统 (Bio-RAD) 下观察分析 (UV, 260 nm) 并拍照。

2 结果与讨论

2.1 三分三无菌苗系统的建立:三分三种子较小, 外种皮较厚且木质化严重, 其种子多为半饱满种子, 导致其萌发率只有 10% 左右。采用水选法净选后, 选取饱满的种子用于实验, 萌发率提高到 20% 以上。萌发后的种子在温度为 (25 $\pm$ 1.0) $^{\circ}C$, 光周期为 12 h, 光强为 55 μ mol/m²·s 的恒温培养箱中生长良好。

2.2 发根农杆菌介导的三分三遗传转化体系的建立:农杆菌介导的遗传转化是外源 DNA 进入植物细胞最成功和应用最广泛的方法之一^[7]。本实验采用的 C58C1 本来是根癌农杆菌, 经“Disarmed”改造

后, 保留 Helper 质粒, 导入 pRiA4 质粒, 改造后的 C58C1 失去使植物长冠瘿组织的能力, 转而使植物长出发根^[8]。在预实验中, 三分三的下胚轴可以在无激素 MS 培养基上再生出真根。为了避免下胚轴长出真根而造成的实验统计误差, 本实验只采用叶片作为外植体。活化后的 C58C1 对三分三叶片的感染效率非常高, 所有被感染的叶片均从有伤口的部位长出毛状根, 诱导频率达到 100%。被感染的叶片, 发根诱导频度 (每个外植体长出的发根平均条数) 达到 23.5。从图 2 可以看到, 经过诱导后, 所有发根均从叶片上有伤口的部位长出; 完好无损的部位则不能受到发根农杆菌的感染。该现象与之前 Stachel 等^[9]的报道一致。

2.3 三分三发根的继代培养:在除菌培养基上继代培养的发根经过 3 次继代后, 农杆菌已基本除尽, 转到无抗生素的 MS 固体培养基上继续培养。4 周后, 获得 25 个除菌彻底的发根单克隆系。从图 3 可以看出三分三发根具有斜向生长, 分支多, 无向地性, 在无激素培养基上生长十分迅速等特点, 与 Giri 等^[7]报道的典型发根的生物学形态一致。

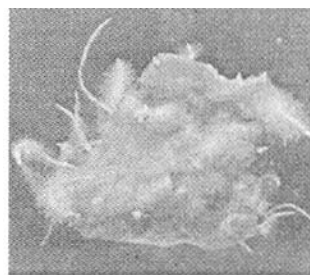


图 2 从叶片伤口处诱导出的发根

Fig. 2 Hairy roots induced from wounded sites of leaf

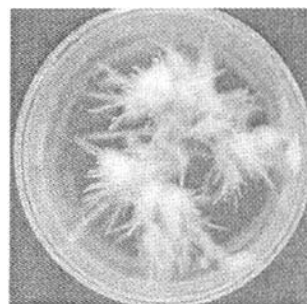


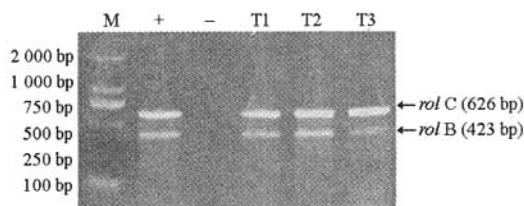
图 3 三分三发根单克隆

Fig. 3 Monoclonal hairy root of *A. acutangulus*

2.4 三分三发根的 PCR 检测与共转化发根的分析:发根农杆菌的 T-DNA 插入植物基因组时, 携带的 *rol* 家族特定发根基因 (因不同菌株而异) 随 T-DNA 插入基因组, 从宿主细胞上诱导出发根。所以

只要检测到上述 *rol* 家族的特定基因,就可以确定被检测的单克隆系是真正的发根^[10]。本实验选取 C58C1 中 pRiA4 质粒携带的 *rolB* 和 *rolC* 两个基因作为检测对象。在检测到 *rolB* 和 *rolC* 基因的单克隆中,再检测 pCAMBIA1304⁺ 质粒上携带的潮霉素 (hygromycin) 抗性基因,就可以确认出转入了 pCAMBIA1304⁺ 的发根单克隆,进而确认出 pRiA4 和 pCAMBIA1304⁺ 共转化的毛状根。

为避免因除菌不彻底造成 PCR 结果的误差,本实验用于检测的 25 个发根单克隆均已彻底除菌。全部 25 个发根单克隆均检测到 *rolB* 和 *rolC* 基因片段 (图 4)。在这 25 个检测到 *rolB* 和 *rolC* 基因片段的发根单克隆中,检测到 8 个含有潮霉素基因片段 (图 5)。结果表明 pCAMBIA1304⁺ 与 pRiA4 对三分三叶片的共转化率达到 32%。

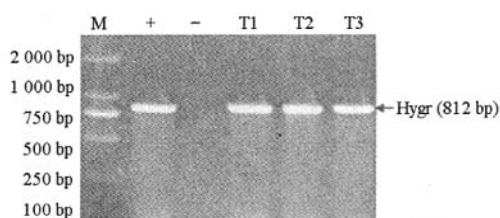


M-核酸相对分子质量标准 DL2000 +—作为阳性对照的重组 C58C1 —作为阴性对照的三分三普通根
T1~T3-不同的发根单克隆 *rolB/rolC-rolB* 和 *rolC* 基因
M-DL2000 Marker +—positive control of C58C1 transformed with pCAMBIA1304⁺ —negative control of normal roots T1—T3-different monoclonal hairy roots *rolB/rolC-rolB* and *rolC* genes

图 4 三分三发根 *rolB* 和 *rolC* 基因的 PCR 检测

Fig. 4 PCR Analysis of *rolB* and *rolC* genes in *A. acutangulus* hairy roots

本实验采用共转化策略建立了基于三分三发根的外源基因表达系统,其外源基因表达载体 pCAMBIA1304⁺ 在三分三发根中的转化率达到 32%,该载体可用于在三分三发根中同时表达多个目的基因。该方法的建立为实现三分三及同类药源植物产托品烷类生物碱的代谢工程,开发高产托品烷类生物碱的发根型生物反应器提供了一种高效的外源基因表达方法。



M-核酸相对分子质量标准 DL2000 +—作为阳性对照的重组 C58C1 —作为阴性对照的三分三普通根
T1~T3-不同的发根单克隆 Hygr-潮霉素基因
M-DL2000 Marker +—positive control of C58C1 transformed with pCAMBIA1304⁺ —negative control of normal roots T1—T3-different monoclonal hairy roots Hygr-hygromycin genes

图 5 三分三发根潮霉素基因的 PCR 检测

Fig. 5 PCR Analysis of hygromycin gene in *A. acutangulus* hairy roots

References:

- [1] Xiao P G, Xiao G C, He L Y. The occurrence of some important tropane alkaloids in Chinese *Solanaceous* plants [J]. *J Integr Plant Biol*, 1973, 15: 187-194.
- [2] Yamada Y, Tabata M. Plant biotechnology of tropane alkaloids [J]. *Plant Biotechnol*, 1997, 14: 1-10.
- [3] Murashige T, Skoog K. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures [J]. *Plant Physiol*, 1962, 15: 473-479.
- [4] Liao Z H. Molecular biology of the biosynthetic pathways of taxol precursors and metabolic engineering of anti-tumor terpenoid indole alkaloids [A]. *Ph D Thesis of Fudan University* (复旦大学博士论文) [D], Shanghai: Fudan University, 2004.
- [5] Sambrook J, Russell D, Maniatis T. *Molecular Cloning. A Laboratory Manua* [M]. New York: Cold Springer Harbor Laboratory Press, 2002.
- [6] Furner I J, Huffman G A, Amasino R M, et al. An *Agrobacterium* transformation in the evolution of the genus *Nicotiana* [J]. *Nature*, 1986, 319: 422-427.
- [7] Giri A, Narasu M L. Transgenic hairy roots: recent trends and applications [J]. *Biotechnol Adv*, 2000, 18: 1-22.
- [8] Mozo T, Hooykaas P J J. Electroporation of megapasmids into *Agrobacterium* [J]. *Plant Mol Biol*, 1991, 16: 917-918.
- [9] Stachel S E, Messens E, Van Montagu M, et al. Identification of signal molecules produced by wounded plant cells that activate T-DNA transfer in *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Nature*, 1985, 318: 624-629.
- [10] Cardarelli M, Mariotti D, Pomponi M, et al. *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA genes capable of inducing hairy root phenotype [J]. *Mol Gen Genet*, 1987, 209: 475-480.