

刘 艺,朱 杰,苑 平,等. 农杆菌介导的猕猴桃 *ACO* 反义基因遗传转化[J]. 江苏农业科学,2013,41(5):26-27.

农杆菌介导的猕猴桃 *ACO* 反义基因遗传转化

刘 艺,朱 杰,苑 平,田宏现

(吉首大学,湖南吉首 416000)

摘要:以猕猴桃米良 1 号的当年生嫩枝及叶片为外植体,构建了双右边界双元载体 pCambia1300-actin-term-2,通过根癌农杆菌 EHA105 菌株介导,将 *ACO* 反义基因导入猕猴桃植株基因组。结果表明,愈伤组织预培养 20 d,农杆菌侵染 30 min,EHA105 菌液浓度 $D=0.6$,共培养 5 d,经 PCR 法检测证明 *ACO* 反义基因已转入转化植株基因组中。

关键词:猕猴桃;*ACO* 反义基因;遗传转化;双 T-DNA 载体

中图分类号: Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)05-0026-02

猕猴桃是典型的呼吸跃变型果实^[1],因为其果实在幼果期时有着很高的呼吸速率,当果实不断增大时减弱呼吸作用,伴随着呼吸速率的急剧升高和大量乙烯的释放这一个跃变过程,果实成熟,因此称为呼吸跃变型果实^[2]。乙烯(ethylene)是最早发现的植物气体激素之一,它主要作用于组织和器官的成熟和衰老,由 2 个碳原子和 4 个氢原子组成^[3]。Lieberman 等^[4]于 1964 年率先发现乙烯的前体 S-腺苷甲硫氨酸,1934 年 Gane 等首先证明乙烯能由植物自身合成,次年,Crocker 证明乙烯在促进果实成熟的过程中同时会对果实的生长有抑制作用^[5]。在乙烯生物合成的过程中,有 3 个酶起着相当重要的作用,分别为:腺苷蛋氨酸合成酶(SAM synthetase)、ACC 合成酶(ACC synthase)、ACC 氧化酶(ACC oxidase),其中 ACC 氧化酶和 ACC 合成酶起到了关键作用^[5-6]。通过调控 *SAMS*、*ACS* 和 *ACO* 3 个基因的表达,便能较好地控制内源乙烯在果实内的合成,即可达到延长果实贮藏时间的目

的^[7]。采用反义技术去调控 *ACO* 基因在植物体内的表达,从而达到控制乙烯生物合成已经在现代基因工程研究中获得成功^[8-9]。1990 年,Hamilton 等^[10]成功在转基因番茄果实中实现了通过反义 RNA 技术抑制乙烯的合成和延长果实的贮藏时间,这是世界上首次得到了控制乙烯合成的转基因植株^[11]。而采用反义 RNA 技术抑制 *ACO* 活性的研究在猕猴桃转化的研究尚未见报道。

1 材料与方法

1.1 材料

本试验采用米良 1 号猕猴桃优良单株上无病虫害的当年生嫩枝及叶片为外植体材料。根癌农杆菌菌株为 EHA105,表达载体为 pCambia1300-actin-term-2,均为中国科学院亚热带农业生态研究所提供。该质粒结构如图 1,其中含有潮霉素磷酸转移酶基因(*hpt*)。主要试剂:连接酶,试剂盒,限制性内切酶,聚合酶均采购于 TaKaRa 公司;乙酰丁香酮,抗生素等主要生化试剂都采购于上海生物工程有限公司;引物由华大基因合成,其他试剂均采用国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 培养基 共培养基:MS+0.35 mg/L 6-BA+2 mg/L TDZ+25 g/L 蔗糖+0.1 mmol/L 乙酰丁香酮+7.2 g/L 琼脂,pH 值 5.6;筛选培养基:MS+0.5 mg/L 6-BA+2 mg/L NAA+

收稿日期:2013-01-07

基金项目:湖南省科技计划(专项计划)项目(编号:2008JT3008);湖南省高校产学研合作示范基地开放项目(编号:2011jsjk003)。

作者简介:刘 艺(1989—),男,湖南邵阳人,硕士研究生,主要从事植物分子生物学方面的研究。E-mail:autolucifer@foxmail.com。

通信作者:田宏现,教授,博士生,硕士生导师,主要从事微生物学和林业生物技术方面的研究。E-mail:jstianhx@163.com。

效地去除多糖、分类和蛋白质等物质,但是该方法步骤繁琐,需 12~15 h,长时间的提取过程容易造成 RNA 降解。改良的 Trizol 法提取过程仅需 2~3 h,操作简便,多次抽提和离心能有效去除杂质,在短时间内获得纯度高、完整性好的 RNA,且能够进一步满足分子生物学的试验要求,是提取三色堇花瓣总 RNA 的理想方法。同时,该方法也对其他植物花瓣总 RNA 的提取提供了一定的借鉴。

参考文献:

- [1] 赵钟鑫,王 健,李 琴,等. 阔叶薰衣草叶片总 RNA 两种提取法的比较[J]. 热带农业科学,2011,31(8):55-58.
- [2] 孙德权,郭启高,胡玉林,等. 改良 Trizol 法提取香蕉叶片总 RNA[J]. 广农业科学,2009(5):162-164.
- [3] 郭翠英,王跃进,刘雅丽,等. 富含多糖葡萄风信子花瓣总 RNA

- 提取方法研究[J]. 西北农学报,2007,16(3):188-191.
- [4] 杜运鹏,李 双,何恒斌,等. 百合鳞片总 RNA 提取方法的比较[J]. 分子植物育种,2010,8(4):832-836.
- [5] 李 宏,王新力. 植物组织 RNA 提取的难点及对策[J]. 生物技术通报,1999(1):36-39.
- [6] 王暑辉,徐 倩,徐 筱,等. 富含多糖多酚的侧柏叶片总 RNA 提取方法[J]. 吉林农业大学学报,2012,34(1):76-80,89.
- [7] Ainsworth C. Isolation of RNA from floral tissue of *Rumex acetosa* (Sorrel)[J]. Plant Mol Biol Rept,1994,12(3):198-203.
- [8] 朱 昀,王 猛,贾志伟,等. 一种从富含多糖的玉米幼穗中提取 RNA 的方法[J]. 植物学通报,2007,24(5):624-628.
- [9] 葛晓萍,石琰琼. 一种适合富含多糖、多酚植物的 RNA 提取方法[J]. 青岛科技大学学报:自然科学版,2007,28(1):6-8.
- [10] 王文锋,穆灵敏,张光谋. 富含多糖·多酚植物组织 RNA 的提取[J]. 安徽农业科学,2009,37(12):5383,5417.

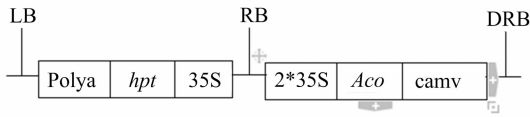


图1 植物表达载体pCambia1300-actin-term-2的T-DNA区

800 mg/L 头孢霉素 + 500 mg/L 羧苄青霉素 + 20 mg/L 潮霉素 + 25 g/L 蔗糖 + 7.2 g/L 琼脂, pH 值 6.0; 预分化培养基: MS + 1.5 mg/L ZT + 2.5 mg/L 6-BA + 0.25 mg/L TDZ + 30 g/L 蔗糖 + 400 mg/L 羧苄青霉素 + 7.2 g/L 琼脂, pH 值 6.0; 分化培养基: MS + 1.0 mg/L ZT + 25g/L 蔗糖 + 400 mg/L 羧苄青霉素 + 7.2 g/L 琼脂, pH 值 6.0; 生根培养基: 1/2 MS + 0.8 mg/L IBA + 0.75 mg/L 6-BA + 12.5 g/L 蔗糖 + 7.2 g/L 琼脂, pH 值 6.0。

1.2.2 农杆菌介导遗传转化 挑取携带目的基因的根癌农杆菌单菌落 EHA105 接种于含潮霉素的 LB 液体培养中, 28 ℃、200 r/min 振荡培养过夜, 取 200 μL 该菌液接种到 20 mL 液体 LB 培养基中, 相同条件下培养到 $D = 6, 4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、4 000 r/min 离心 15 min, 用附加 10 mg/L AS (acetosyringone, 乙酰丁香酮) 的液体 MS 培养基重悬沉淀, 28 ℃、220 r/min 振荡培养 2 h, EHA105 D 值至 0.6 以备侵染材料。以愈伤组织为外植体浸入上述菌液中, 28 ℃轻轻摇动侵染, 侵染时间为 30 min, 侵染后用无菌滤纸吸去表面菌液, 转入共培养基, 25 ℃暗培养 5 d。然后将愈伤组织转入筛选培养基, 25 ℃暗培养 20 d 后将抗性愈伤转入新的筛选培养基, 筛选抗性愈伤组织。2 次筛选后, 将抗性愈伤转移至预分化培养基, 置于

25 ~ 26 ℃, 14 h/d 光照培养, 光强 1 000 ~ 1 500 lx, 每 20 d 更换 1 次新培养基。当愈伤开始变成红褐色并开始分化出芽时将愈伤转移至分化培养基上。绿苗长至 3 ~ 5 cm 时转移到生根培养基, 置光照培养箱中, 条件同预分化。

1.2.3 转基因植株目的基因的 PCR 检测 取米良 1 号猕猴桃再生苗嫩叶 0.2 ~ 1.0 g, 采用 CTAB 法提取基因组 DNA。根据载体上的 *ACO* 基因序列, 设计合成引物 (表 1)。

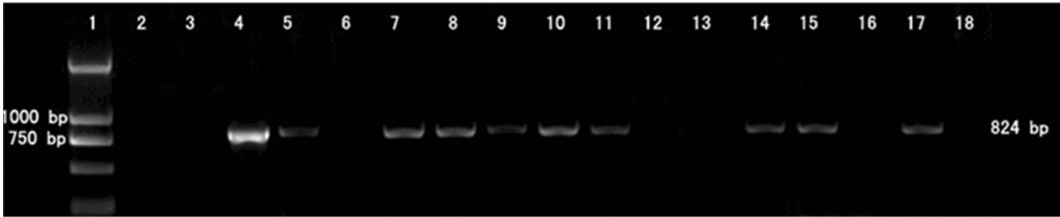
表 1 PCR 引物

引物	序列 (5'→3')	退火温度 (℃)
Primer - 35S - F	GACGCACAATCCCACCCCTA	56.9
Primer - 35S - R	GTCCCAACCAATGAAACACTCCA	56.0

以基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 检测。PCR 反应体系为 20 μL, 反应程序为: 95 ℃预变性 5 min; 94 ℃变性 35 s, 56 ℃复性 35 s, 72 ℃延伸 1 min, 30 个循环; 72 ℃延伸 10 min, 25 ℃30 s。琼脂糖凝胶电泳分析 PCR 产物。

2 结果与分析

转化共获得 27 株具有潮霉素抗性的米良 1 号猕猴桃, 从中随机选取 14 株提取基因组 DNA, 用跨 35S 启动子的引物对其进行 PCR 扩增, 扩增结果显示有 9 株植株成功地获得与阳性对照相同的目的条带 (824 bp), 而阴性对照 (无模板对照和野生型米良 1 号猕猴桃植株) 没有目的条带 (图 2), 所以初步鉴定这 9 株为阳性植株。



1—D2000 marker; 2—无模板阴性对照; 3—野生型米良 1 号猕猴桃; 4—质粒阳性对照; 5~18—待检测抗性植株。目标片段的大小为 824 bp。

图2 转化植株的PCR检测

3 总结

本试验利用双右边界双元载体通过共转化法获得包含 *ACO* 目的基因与筛选标记的转基因植株后可通过后代遗传分离后得到无筛选标记的转 *ACO* 基因米良 1 号猕猴桃。双 T-DNA 载体去除筛选标记的方法简单易行, 但是目的基因和筛选标记均没有比较容易识别的性状, 故选用 PCR 法检测目的植株, 由于 PCR 法的步骤比较繁琐, 而且猕猴桃的挂果所需时间比较长, 所以需要再寻找更加简洁的方法。

参考文献:

[1] 张计育, 周振兴, 宣继萍, 等. 猕猴桃果实采后成熟衰老与植物生长调节物质的关系[J]. 北方园艺, 2011(24): 228-231.
[2] 李合生. 现代植物生理学[M]. 北京: 高等教育出版社, 2002.
[3] 陈晓亚, 汤章城. 植物生理与分子生物学[M]. 3 版. 北京: 高等教育出版社, 2007.
[4] Lieberman M, Mapson L W. Genesis and biogenesis of ethylene[J].

Nature, 1964, 204(495): 343-345.
[5] Yu Y B, Adams D O, Yang S F. 1-Aminocyclopropanecarboxylate synthase, a key enzyme in ethylene biosynthesis[J]. Archives of Biochemistry and Biophysics, 1979, 198(1): 280-286.
[6] 姚泉洪, 黄晓敏, 刘宗镇. 植物乙烯生物合成与抗衰老基因工程[J]. 上海农业学报, 1994, 10(2): 89-96.
[7] 周胜军. 园艺作物成熟和衰老的分子生物学[J]. 生物学杂志, 2002, 19(5): 5-8.
[8] 王金发, 申煌煌. ACS 和 ACO 基因克隆及植物转化[J]. 热带亚热带植物学报, 1998, 6(2): 105-110.
[9] Oeller P W, Lu M W, Taylor L P. Reversible inhibition of tomato fruit senescence by antisense RNA[J]. Science, 1991, 254: 437-439.
[10] Hamilton A J, Lyett G W, Grierson D. Antisense gene that inhibit synthesis of hormone ethylene in transgenic plants[J]. Nature, 1990, 346(6281): 284-287.
[11] 张建鑫, 刘雅莉, 孟 芮, 等. 农杆菌介导的百合 *ACO* 反义基因遗传转化的研究[J]. 西北农业学报, 2008(6): 158-163.