

武 慧,宋明霞,宁思淇,等. 紫花苜蓿的抗菌肽基因 *Rev4* 遗传转化[J]. 江苏农业科学,2017,45(7):44-46.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.07.010

紫花苜蓿的抗菌肽基因 *Rev4* 遗传转化

武 慧,宋明霞,宁思淇,武翠玲,周晓馥

(吉林师范大学植物资源科学与绿色生产吉林省重点实验室,吉林四平 136000)

摘要:抗菌肽是机体先天免疫的重要组成成分,是许多生物体抵抗外来致病菌侵袭的第 1 道屏障。Indolicidin 是一个 13 氨基酸残基肽,从牛的嗜中性粒细胞的胞浆小颗粒分离而来,具有广谱抗菌性,*Rev4* 是其人工设计的反向序列。利用经典叶盘法,以根癌农杆菌 A. GV3850 介导紫花苜蓿遗传转化,GUS 瞬时表达检测转化体系建立成功;压力筛选后叶片基因组 DNA 的 PCR 成功检测到抗菌肽基因条带,PCR 产物回收测序得到 13 株转化紫花苜蓿。

关键词:紫花苜蓿;抗菌肽;遗传转化

中图分类号: Q785 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)07-0044-03

紫花苜蓿 (*Medicago sativa* L.) 为四倍体异花授粉的多年生草本植物,属于豆科苜蓿属,基因组大,是很好的水土保持植物与绿肥植物,在世界范围内广泛种植,以“牧草之王”著称^[1]。长期以来,人们围绕经济有效地提高紫花苜蓿产量和品质两大目标进行了不懈的努力^[2-3],但由于传统的紫花苜蓿育种方法时间长、成本高且可利用的种质资源有限,基因工程的方法更具有科学性和准确性^[4]。

抗菌肽 (antimicrobial peptides, AMPs) 是生物体天然免疫的重要组成部分,是机体抵御外源致病菌的第 1 道屏障,由于

其独特且多样的生物学功能和作用机制,引起了科学界的广泛关注和研究^[5]。抗菌肽是自然进化的产物,它可以干扰病原微生物,使其细胞膜结构发生改变,通透性增加,进而起到杀菌作用,又因病原体不易对其产生抗药性,因此成为新型高效的抗生素替代品^[6]。目前,人们一方面研究抗菌肽在先天免疫中发挥作用的机制,一方面设计新型抗菌、抗感染的抗菌肽制剂^[7],抗菌肽研究前景非常广阔。

Indolicidin 是一个 13 残基肽 (IL-PWKWPWWPWRR-NH₂),从牛的嗜中性粒细胞的胞浆小颗粒分离而来,具有广谱的抗菌和抗病毒活性^[8]。针对外源抗菌肽基因转入植物体内容易被消化分解的不足,有人设计了抗菌肽 Indolicidin 的反向序列 *Rev4*,合成的反向肽仍然有高的抗菌活性,且相比其他的抗菌肽,对植物蛋白酶的稳定性更高^[9]。本研究利用经典叶盘法,以根癌农杆菌 A. GV3850 介导紫花苜蓿遗传转化,GUS 瞬时表达检测转化体系建立成功;压力筛选后叶

收稿日期:2016-02-15

基金项目:国家自然科学基金(编号:31070224)。

作者简介:武 慧(1986—),女,吉林长春人,硕士,助理实验师,从事植物分子生物学方向研究。E-mail: sunflower329@163.com。

通信作者:周晓馥,博士,教授,博士生导师,从事植物基因工程方向研究。E-mail: zhouxiaofu@jlnu.edu.cn。

[3]郑彩玲. 棉蚜寄生专化性及其形成机制的研究[D]. 南京:南京农业大学,2007:47-59.

[4]邹晨辉,杨效文,陈晓峰,等. 不同冬夏寄主棉蚜种群重复序列引物 DNA 多态性分析[J]. 应用与环境生物学报,2000,6(6):560-564.

[5]龚 鹏,杨效文,张孝羲,等. 棉蚜 (*Aphis gossypii*) 种群寄生分化和季节分化的微卫星引物 PCR 研究[J]. 生态学报,2001,21(5):765-771.

[6]杨效文,张广学,陈晓峰. 棉蚜微卫星 DNA 的克隆及其多态性检测[J]. 昆虫学报,2001,44(4):586-589.

[7]Fuller S,Chavigny P,Lapchin L,et al. Variation in clonal diversity in glasshouse infestations of the aphid, *Aphis gossypii* Glover in southern France[J]. Molecular Ecology,1999,8(11):1867-1877.

[8]Carletto J,Lombaert E,Chavigny P,et al. Ecological specialization of the aphid *Aphis gossypii* Glover on cultivated host plants[J]. Molecular Ecology,2009,18(10):2198-2212.

[9]Thomas S,Boissot N, Vanlerberghe - Masutti F. What do spring migrants reveal about sex and host selection in the melon aphid? [J]. BMC Evolutionary Biology,2012,12(1):47.

[10]Skinner D,Beattie W,Blattner F,et al. The repeat sequence of a

hermit crab satellite deoxyribonucleic acid is (- T - A - G - G -)_n - (- A - T - C - C -)_n [J]. Biochemistry,1974,13(19):3930-3937.

[11]彭建新,杨 红,洪华珠. 昆虫分子遗传学[M]. 武汉:华中师范大学出版社,2006:142.

[12]张 羽. 分子标记技术的产生与引物设计[J]. 江苏农业科学,2014,42(6):47-51.

[13]Vanlerberghe - Masutti F,Chavigny P,Fuller S. Characterization of microsatellite loci in the aphid species *Aphis gossypii* Glover[J]. Molecular Ecology,1999,8(4):693-695.

[14]杨子祥,冯 颖,陈晓鸣. 一种有效的蚜虫基因组 DNA 提取方法[J]. 林业科学研究,2005,18(5):641-643.

[15]何正文,刘运生,陈立华,等. 正交设计直观分析优化 PCR 条件[J]. 湖南医科大学学报,1998,23(4):403-404.

[16]刘永刚,漆永红,赵丽娟,等. 桃蚜基因组 DNA 提取及 SSR 反应体系优化和应用[J]. 植物保护,2009,35(4):96-100.

[17]谢家楠,郭建军,金道超. 白背飞虱 ISSR-PCR 反应体系构建的正交设计优化[J]. 植物保护,2014,40(2):109-112.

[18]张敏哲,庞保平,周晓榕. 宽翅曲背蝗 SSR 反应体系的优化[J]. 内蒙古农业大学学报,2013,34(3):26-31.

片基因组 DNA 的 PCR 成功检测到抗菌肽基因条带,PCR 产物回收测序得到 13 株转化紫花苜蓿。本研究提高紫花苜蓿自身抗病性,紫花苜蓿作为绿色饲料具有重大的生态和社会效益。

1 材料与方法

1.1 植物材料

供试紫花苜蓿种子为吉林省农业科学院惠赠,吉林师范大学资源科学与绿色生产吉林省重点实验室保存。

1.2 菌种和质粒

根癌农杆菌菌株 A. GV3850 - pKLP36. PeRIL(149) 的 pKLP36 质粒上含有抗菌肽基因,根癌农杆菌 A. GV3850 - PKYLX35S2(194) 中含有 *gus* 基因。以上 2 种菌株均由美国迈阿密大学惠赠。

1.3 PCR 扩增引物序列

以 Primer 5.0 软件设计正向引物 AnF 和反向引物 AnR。具体序列如下: AnF: 5' - CACGAAGCTTACCATGGGATTTTTCTCTTTTCAC - 3'; AnR: 5' - GACTGGAGCTCTTAATAAGAGGCCATTTC - 3'。

1.4 试验试剂

GUS 染色液,FAA 固定液,离心柱琼脂糖凝胶回收试剂盒, Premix Ex Taq[®] Version 2.0 为 TaKaRa 公司产品,低熔点琼脂糖为 Sigma 公司产品, X - Gluc、5 - 溴 - 4 - 氯 - 3 - 吡啶半乳糖苷(X - gal) 试剂、异丙基 - β - D - 硫代半乳糖苷(IPTG) 为 BBI 公司产品,其他国产试剂购自北京鼎国生物公司。

1.5 主要仪器设备

德国 QIAGEN 高通量组织研磨仪,美国 Quawell 超微量紫外分光光度计(UV - Vis Spectrophotometer Q5000), HC - 2518R 高速冷冻离心机,紫外凝胶电泳成像系统,Agilent 温度梯度 PCR 扩增仪,Nikon 荧光体式显微镜等。

1.6 试验方法

1.6.1 根癌农杆菌 A. GV3850 介导的苜蓿遗传转化 将苜蓿组培苗叶片预培养 3 d 后,分别转入 $D_{600\text{nm}}$ 为 0.5 的根癌农杆菌 149 和 194 菌液中,26 ℃、166 r/min 振荡培养 15 min;倒掉菌液,无菌水冲洗 3 次,置于共培养基培养基,25 ℃ 黑暗条件下,共培养 3 d。

叶片转接到 Kan 压力筛选培养基上培养 30 d,获得抗性植株;待抗性植株长到 2 ~ 3 cm,切段后置于 1/2 MS 培养基中扩繁,智能人工气候箱中培养。

1.6.2 转化植株的 GUS 表达检测 取 194 侵染后 5 d 的转化叶片制成徒手切片,非转化植株叶片作为对照;取 1 mL 染色液放入 2 mL 离心管中,将准备好的叶片浸泡在染液中,抽真空 5 min,37 ℃ 过夜;取出染液,加入 800 μ L FAA 固定液,颠倒混匀,倒掉,重复 2 次;依次加入 30%、75%、95% 乙醇,进行脱色,至阴性对照呈黄白色,倒掉 95% 乙醇,加入 FAA 固定液;压片后以 Nikon 荧光体式显微镜观察并采集图像。

1.6.3 转化植株的 PCR 分子检测 取 149 转化的苜蓿叶片,研磨后加入 250 μ L CTAB 提取缓冲液(2% CTAB, 100 mmol/L Tris - HCl pH 值为 8.0, 20 mmol/L EDTA, 1.4 mol/L NaCl, 3% PVP) 和 10 μ L β - 巯基乙醇,65 ℃ 温浴;

加入体积比为 25 : 24 : 1 的酚、三氯甲烷、异戊醇,混匀后 4 ℃、12 000 r/min 离心 10 min;取上清,无水乙醇醇沉 1 h 后离心 30 min,75% 乙醇洗涤沉淀 2 次;水酶混合液消化 RNA;琼脂糖凝胶电泳检测。

PCR 反应为 25 μ L 体系,其中含 12.5 μ L Premix Ex Taq, 正向引物 AnF 1 μ L,反向引物 AnR 1 μ L,模板 DNA 1 μ L, ddH₂O 9.5 μ L;PCR 程序:94 ℃ 10 min;94 ℃ 1 min,58 ℃ 1 min,72 ℃ 1 min,35 个循环;72 ℃ 10 min。

1.6.4 PCR 产物测序 对阳性质粒 PCR 产物和 68 个呈阳性的 PCR 产物进行切胶回收,送至北京六合华大基因科技有限公司进行测序。

2 结果与分析

2.1 转化植株的 Gus 表达检测

通过 GUS 组织化学定位法,对根癌农杆菌 194 菌液侵染的苜蓿组培苗叶片进行 GUS 瞬时表达检测,转化植株的 GUS 瞬时表达呈现出蓝色斑点(图 1 - B),而对照叶片无蓝色斑点(图 1 - A),初步证明转化体系的成功建立。

2.2 转化植株的分子鉴定

本研究利用 CTAB 法分别提取对照和转化苜蓿组培苗的基因组 DNA,琼脂糖凝胶电泳检测,结果如图 2 - A 所示,原种与转化种苜蓿基因组 DNA 都较完整、浓度大、无脱尾。根癌农杆菌菌株 149 的 pKLP36 质粒上含有抗菌肽基因,包括烟草中 PR - 1b 部分编码区及抗菌肽基因 RIL,长约 200 bp;根据图 2 - B 可知,阳性质粒 PCR 产物(泳道 1)在 100 ~ 250 bp 处有条带,紫花苜蓿原种基因组 DNA 的 PCR 产物(泳道 2)无目标条带,而转化植株基因组 DNA 的 PCR 产物有较为清晰的目标条带(泳道 3)。

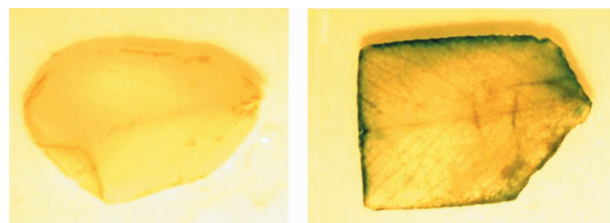
2.3 PCR 产物测序

对阳性质粒及 PCR 呈阳性的产物进行回收后测序,发现测序片段与 149 质粒对比结果一致,信号值基本在正常范围内,即 150 ~ 500,测序片段质量较高,峰图噪音较低,模板纯度较高。由图 3 可知,149 质粒和 13 个样品 PR - 1b 编码区部分基因以及抗菌肽基因 RIL 区段均无突变碱基,即测序成功。

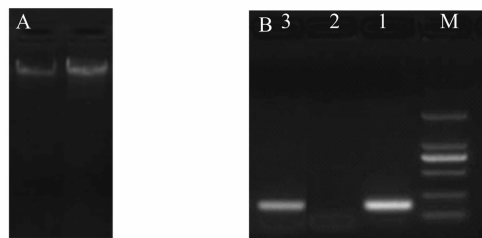
3 讨论

3.1 利用 GUS 瞬时表达检测转化体系

Jefferson 等首次提出 β - 葡萄糖苷酸基因 GUS 可作为植物遗传转化的报告基因之后,在许多国家都得到了广泛应用,其方法操作简单,灵敏度高,在基因工程领域得到广泛地应用。可以用于瞬时表达检测的报告基因还有绿色荧光蛋白基因(greenfluorescent protein, GFP),但由于有些植物组织中有自发荧光,会影响 GFP 检测的准确性,产生弱荧光背景,检测弱启动子驱动的 GFP 活性较难,致使转基因植物的筛选受到限制^[10]。GUS 酶有产物的放大作用,可以通过 GUS 染色来进行检测,而未转化植株无 GUS 活性,因此 GUS 瞬时表达检测对遗传转化的检测更加简便、可靠^[11]。因此,GUS 是目前转基因植物中应用最为广泛的报道基因。关于植物叶片的脱色问题,Bowling 等通过 30%、75%、95% 对拟南芥进行脱色,结果对照呈白色,脱色效果好^[12]。因此,本试验中脱色步骤借



A. 对照
B. 转化
图1 转化苜蓿叶片的 GUS 瞬时表达检测



A. 苜蓿基因组 DNA 电泳
B. PCR产物电泳
图2 转化苜蓿叶片的 PCR 分子鉴定

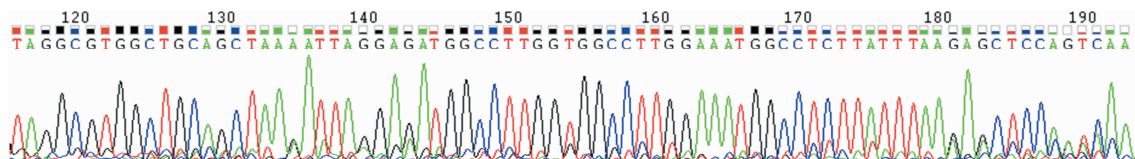


图3 样品测序峰图

鉴此方法,且脱色效果很好,便于结果观察。

3.2 改良的 CTAB 法提取苜蓿基因组 DNA

苜蓿叶片中常含有糖类等物质,使其基因组 DNA 的提取受限。试验结果表明:经典的 CTAB 提取缓冲液法最大的优点是能除去多糖,可用于草本植物基因组 DNA 提取。本研究在传统 CTAB 法的基础上加入了 PVP,可以有效地裂解植物组织细胞,保证核酸完整性。同时,PVP 可以与酚类产生络合物,防止多酚对 DNA 的污染,还可与多糖结合,除去糖类物质。此外,加入抗氧化剂 β -巯基乙醇,可有效地防止酚氧化成醌,避免褐变,使酚容易去除。利用改良法提取的苜蓿基因组 DNA 完整性好、亮度高、浓度较大,可满足 PCR 检测要求。

3.3 抗菌肽基因的遗传转化前景

抗菌肽分子较小,动物源抗菌肽在植物体内易被蛋白酶快速降解,成为外源抗菌肽在植物体内表达的限制因素。但在作物中表达动物源与植物源的肽是可能的,可通过消除蛋白酶敏感位点来修饰肽,或设计反向类似物,从而实现对抗原抗性的提高^[13]。Xing 等采用来自异源物种中的肽来抵抗植物病原,研究了来自动物源的肽,筛选了肽对植物蛋白酶的敏感性,结果发现,基于反向序列的肽拥有特别强的对植物叶片中蛋白酶的抵抗能,并同时拥有抗菌活性^[14]。本研究以根癌农杆菌介导抗菌肽基因 *Rev4* 的遗传转化并获得成功,转化植株作为绿色饲料具有重大的生态和社会效益。

参考文献:

- [1] Samac D A, Bucciarelli B, Miller S S, et al. Transgene silencing of sucrose synthase in alfalfa (*Medicago sativa* L.) stem vascular tissue suggests a role for invertase in cell wall cellulose synthesis[J]. BMC Plant Biology, 2015, 15(1): 283.
- [2] Aung B, Gruber M, Amyot L, et al. MicroRNA156 as a promising tool for alfalfa improvement[J]. Plant Biotechnology Journal, 2015, 13(6): 779-790.
- [3] Zhang Y M, Liu Z H, Wen Z Y, et al. The vacuolar $\text{Na}^+ - \text{H}^+$ antiporter gene *TaNHX2* confers salt tolerance on transgenic alfalfa (*Medicago sativa*) [J]. Functional Plant Biology, 2012, 39(8): 708-716.
- [4] Zhang Y, Zhang H, Liu Z, et al. The wheat NHX antiporter gene *TaNHX2* confers salt tolerance in transgenic alfalfa by increasing the

retention capacity of intracellular potassium [J]. Plant Molecular Biology, 2015, 87(3): 317-327.

- [5] Anupa G, Bhat M A, Srivastava A K, et al. Cationic antimicrobial peptide, magainin down-regulates secretion of pro-inflammatory cytokines by early placental cytotrophoblasts [J]. Reproductive Biology and Endocrinology, 2015, 13(1): 121.
- [6] Urfer M, Bogdanovic J, Lo Monte F, et al. A peptidomimetic antibiotic targets outer membrane proteins and disrupts selectively the outer membrane in *Escherichia coli* [J]. The Journal of Biological Chemistry, 2016, 291(4): 1921-1932.
- [7] Chou S, Shao C, Wang J, et al. Short, multiple-stranded β -hairpin peptides have antimicrobial potency with high selectivity and salt resistance[J]. Acta Biomaterialia, 2016, 30: 78-93.
- [8] Selsted M, Novotny M, Morris W, et al. Indolicidin, a novel bactericidal tridecapeptide amide from neutrophils [J]. The Journal of Biological Chemistry, 1992, 267(7): 4292-4295.
- [9] Li Q, Lawrence C B, Davies H M, et al. A tridecapeptide possesses both antimicrobial and protease-inhibitory activities[J]. Peptides, 2002, 23(1): 1-6.
- [10] Zhang Q, Walawage S, Tricoli D, et al. A red fluorescent protein (DsRED) from *Discosoma* sp. as a reporter for gene expression in walnut somatic embryos[J]. Plant Cell Reports, 2015, 34(5): 861-869.
- [11] Liu X, Lang S, Su L, et al. Improved agrobacterium-mediated transformation and high efficiency of root formation from hypocotyl meristem of spring *Brassica napus* 'Precocity' cultivar[J]. Genetics and Molecular Research, 2015, 14(4): 16840-16855.
- [12] Bowling S, Guo A, Cao H, et al. A mutation in *Arabidopsis* that leads to constitutive expression of systemic acquired resistance[J]. The Plant Cell, 1994, 6(12): 1845-1857.
- [13] Anantharaman A, Sahal D. Reverse engineering truncations of an antimicrobial peptide dimer to identify the origins of potency and broad spectrum of action [J]. Journal of Medicinal Chemistry, 2010, 53(16): 6079-6088.
- [14] Xing H, Lawrence C, Chambers O, et al. Increased pathogen resistance and yield in transgenic plants expressing combinations of the modified antimicrobial peptides based on indolicidin and magainin[J]. Planta, 2006, 223(5): 1024-1032.