

孙诗雯,张笑笛,宋宇. 葡萄中白藜芦醇合成酶基因的克隆及其转化黄芪研究[J]. 江苏农业科学,2017,45(9):38-41.
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.09.010

葡萄中白藜芦醇合成酶基因的克隆及其转化黄芪研究

孙诗雯,张笑笛,宋宇

(吉林大学动物科学学院,吉林长春 130062)

摘要:利用 RT-PCR 技术从巨峰葡萄中克隆获得 RS 基因的全长 cDNA 序列,并利用农杆菌侵染法转化黄芪。试验结果表明:经 Vector NTI 11.0 软件分析克隆获得的 RS 基因全长序列长度为 1 241 bp,并带 14 bp 长度的 poly(A)尾巴,包含 930 bp 的开放读码框(ORF),编码 1 个含 310 个氨基酸残基的蛋白质。生物信息学分析结果表明:RS 基因编码白藜芦醇合成酶,对 RS 基因全长序列进行蛋白质结构域分析,证明该基因具有查尔酮合成酶 N 端保守结构域,其长度为 225 个氨基酸。对黄芪进行遗传转化结果表明:获得了 3 棵黄芪转基因阳性植株,通过 DNA、RNA 以及蛋白质水平证明 RS 基因已经完全整合到黄芪基因组中并表达。

关键词:白藜芦醇合成酶基因(RS);白藜芦醇;生物信息学;基因克隆;Blast2go

中图分类号:S663.101 **文献标志码:**A **文章编号:**1002-1302(2017)09-0038-03

白藜芦醇(resveratrol, 3,4',5-trihydroxystilbene, 简称 Res)是 1940 年首次从毛叶藜芦(*Veratrum grandiflorum*)的根部获得的^[1]。多年来,随着植化技术的提高以及药理学试验研究的深入,人们发现 Res 广泛存在于种子植物中,如葡萄^[2]、花生^[3]、虎杖^[4]等。它具有许多医疗保健作用,如抗氧化、抗肿瘤、抗血小板凝聚、抗细菌和真菌、免疫护肝、治疗心血管病以及植物雌激素作用等^[5-6],因此 Res 已成为科学家们高度重视的天然活性成分。白藜芦醇合酶(resveratrol synthase,简称 RS)是 Res 生物合成途径中的关键酶之一,它以 4-香豆酰辅酶 A 和丙二酰辅酶 A 为底物催化合成 Res^[7]。RS 基因已在多种植物和微生物中进行了转化和表达,并在植物的代谢及调控等方面发挥生物学作用。通过植物基因工程改良植物对病原菌的抗性已成为一种有效且切实可行的策略,Res 的高效抗菌能力已得到一致认可,因此基于 RS 基因的转基因植物很具研究前景,其次 Res 的药理活性也已日益引起人们的关注。但天然的植物中存在的 Res 毕竟是微量的,对 RS 的分子生物学研究将使利用基因工程、转基因等生物技术生产大量 Res 成为可能,因此对 Res 和 RS 的深入研究将为提高植物的抗性和人类的健康水平提供有效途径。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 (1)葡萄:巨峰葡萄,购自于水果市场;黄芪:膜荚黄芪,购自于种子公司。

1.1.2 菌种和试剂 (1)大肠杆菌感受态 DH5 α ,购自于天

根试剂有限公司,由笔者所在实验室活化保存。(2)农杆菌菌种 EHA105,购自于天根试剂有限公司,由笔者所在实验室活化备用。(3)植物克隆载体 pMD18-T Vector,购自于天根试剂有限公司。(4)植物表达载体 pBR121,购自于天根试剂有限公司;植物 RNA 快速提取试剂盒,购自于美国 Bio-Rad 公司;PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂盒,购自于大连宝生物公司;罗氏 II 型高效地高辛 DNA 标记和检测试剂盒,购自于美国 Roche 公司;其他分子生物学和组织培养等相关试剂,购自于天根试剂公司和国药集团。

1.1.3 培养基 大肠杆菌的培养基为 LB 培养基,农杆菌的培养基为 YEB 固体培养基和 YEB 液体培养基,植物材料的培养基为 MS 培养基。

1.2 试验方法

1.2.1 葡萄总 RNA 的提取 将从市场上买回的巨峰葡萄经过液氮处理,然后参考 Bio-Rad 公司植物 RNA 快速提取试剂盒说明书进行总 RNA 提取,电泳检测提取的 RNA 质量,并将其保存在 -80℃ 冰箱中,为下一步反转录备用。

1.2.2 RS 基因的克隆 (1)cDNA 第一条链合成:参考大连宝生物公司 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit 反转录试剂的说明书进行 cDNA 第一条链的合成,反应体系在 42℃ 条件下合成 1 h,待反应结束后再将反应体系转到 65℃ 条件的恒温金属浴中处理 5~10 min,使反应体系过程中的逆转录酶失活,最后放置 -20℃ 冰箱保存备用。(2)RT-PCR 反应体系:根据 GenBank 中已经注册的 RS 基因(基因编号为:NM_001281044.1,GI 编号为:526118256)序列,利用在线 ORF Finder 软件和 MEME 软件寻找序列的开放阅读框,利用 Vector NTI 11.0 软件设计引物。其中引物上添加相对应的酶切位点,上游引物 PF 序列为:CTACCCGGGTGGCTTCAGTCGAGGAATT,其中下划线为 *Sma* I 的限制性酶切位点;下游引物 PR 序列为:GTAGAGCTCTACGGTTACAAATTAAGTG,其中下划线为 *Sac* I 的限制性酶切位点。PCR 反应体系为 100 μ L,其中包括:20 μ L cDNA 模板,10 μ L 10 \times Taq DNA Polymerase Buffer,8 μ L 10 mmol/L dNTPs,5 μ L 引物 PF,

收稿日期:2017-01-14

基金项目:吉林大学农学部杰青培育计划择优资助项目(编号:4305050102TW)。

作者简介:孙诗雯(1990—),女,吉林长春人,硕士研究生,主要从事生物化学与分子生物学研究。E-mail:434227760@qq.com。

通信作者:宋宇,博士,教授,硕士生导师,主要从事中药、天然产物的抗炎、抗菌、抗病毒作用及机制研究。E-mail:71177282@qq.com。

5 μL 引物 PR, 6 μL Taq DNA Polymeras, ddH₂O 补齐至 100 μL 。PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s, 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。(3) 产物序列测序以及其生物信息学分析: PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后, 利用 AxyPrep DNA 凝胶回收试剂盒回收目的基因片段。再将纯化回收的目的基因片段与 pMD18-T 载体连接, 并将连接好的产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞中, 通过蓝白斑筛选试验, 并进行 PCR 验证。最后将验证的菌液以 M13 通用引物进行测序, 该工作由北京华大公司测序完成。

1.2.3 RS 基因测序结果生物信息学分析 将测序的结果在 GenBank 中进行 Blast 比对。利用 Blast2go 软件^[6-7] (<http://www.blast2go.com/b2ghome>) 进行生物信息学分析。利用 Pfam 在线软件^[8] (<http://pfam.xfam.org/>) 进行蛋白质结构域预测。

1.2.4 RS 基因转化黄芪的研究 首先绘制农杆菌 EHA105 的生长曲线, 确定 $O_{550} = 0.6$ 时候为农杆菌的对数生长期。然后将 RS 基因与表达载体 pBR121 连接, 并将连接好的产物转化农杆菌 EHA105 中, 备用。最后, 转化笔者所在实验室已经建立好的黄芪再生体系中, 筛选抗性植株, 并对抗性植株进行炼苗、移栽, 最终收获转基因黄芪阳性植株。

1.2.5 黄芪转基因抗性植株的鉴定 (1) 转基因阳性黄芪植株基因组 DNA 提取: 参考天根公司植物 DNA 快速提取试剂盒说明书进行转基因阳性黄芪植株的基因组 DNA 提取, 然后进行纯化, 保存于 -20 $^{\circ}\text{C}$ 冰箱备用。(2) 转基因阳性黄芪植株 PCR 检测: PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。反应结束后通过 1% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测。(3) 转基因阳性黄芪植株 Southern blot 杂交检测: Southern blot 杂交检测参考罗氏 II 型高效地高辛 DNA 标记和检测试剂盒说明书进行, 然后进行预杂交、杂交、洗膜和显色。最后将滤膜, 置于含有 NBT/BCIP 的 Detection buffer 中, 避光静置 16 h, 观察斑点颜色变化; 完成后用 TE 缓冲液清洗滤膜 5 min, 观察、成像、记录。(4) 转基因阳性黄芪植株 RT-PCR 检测: PCR 反应条件为: 95 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 3 min; 95 $^{\circ}\text{C}$ 变性 30 s, 60 $^{\circ}\text{C}$ 退火 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 60 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 7 min; 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。反应结束后通过 1% 琼脂糖凝胶电泳对 PCR 产物进行检测。

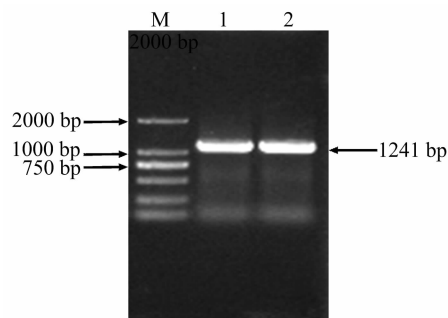
2 结果与分析

2.1 RS 基因全长序列的克隆与分析

以提取的巨峰葡萄 cDNA 为模版, 利用设计好的引物 PF 和 PR 进行 RT-PCR, 结果获得大约为 1 200 bp 的目的条带。将目的条带经过纯化后转化到大肠杆菌感受态中, 通过筛选阳性菌落进行 PCR 检验和测序分析, 结果表明: RT-PCR 获得的目的片段长度为 1 241 bp (图 1), 同时将该片段的核苷酸序列与 NCBI 中的序列比对, 其结果与已经公布的 RS 基因 (登录号: AF128861) 的同源性达到 95%。因此, 认为已经成功获得了 RS 基因的全长编码序列。

2.2 RS 基因全长 cDNA 序列生物信息学分析

通过 Vector NTI 11.0 软件对已经获得的 RS 基因的全长



M—DL2000 marker; 1、2泳道—RS 基因全长序列

图1 RS 基因全长序列 RT-PCR 电泳

序列进行分析, 获得葡萄中的 RS 基因序列全长为 1 241 bp, 并带有 14 bp 长的 Poly(A), 克隆获得的 RS 基因起始密码子 ATG 位于 194 nt 处, 终止密码子 TAG 位于 1 124 nt 处。全长为 1 241 bp 序列中包含 194 bp 长度的 5' 端非翻译区 (UTR, untranslated region), 117 bp 长度的 3' 端非翻译区以及 930 bp 长度的开放读码框 (ORF) 区, RS 基因编码 1 个含 310 个氨基酸残基的蛋白质, 经预测编码白藜芦醇合成酶。

再将已经获得的葡萄中的 RS 基因全长序列编辑成 fasta 格式文件, 利用生物信息学软件 Blast2go 对 RS 基因进行功能注释分析和 KEGG 代谢途径分析。由功能注释结果可知, RS 基因被功能注释为白藜芦醇合成酶。由 KEGG 代谢途径注释结果分析可知, RS 基因的酶标号为 EC 2.3.1.95, 是黄酮类以及黄酮醇类化合物生物合成过程中的关键酶基因。由图 2 对该基因编码的蛋白保守域分析结果可知, 获得的 RS 基因全长序列包含了完整的查尔酮合成酶 N 端保守结构域, 其长度为 225 个氨基酸。综上所述, 通过生物信息学分析为 RS 基因参与的黄酮类和黄酮醇类化合物生物合成机制的研究提供了生物信息学基础数据支撑。

2.3 RS 基因转化黄芪的研究

将已经克隆获得的 RS 基因, 与表达载体 pBR121 连接, 构建成为 pBR121-RS 表达载体, 并将其转化到农杆菌 EHA105 中, 最后对黄芪子叶和胚轴为外植体进行农杆菌侵染进行遗传转化, 获得再生植株。本试验共分 40 批接种外植体 2 080 块, 其中子叶 1 040 块, 胚轴 1 040 块。培养 2 d 后进行侵染; 侵染后共培养 2 d; 最后筛选培养, 每 10 d 继代 1 次。培养 30 d 统计不定芽再生率, 其中胚轴不定芽再生率为 22.1%, 子叶的不定芽再生率为 15.9%。对所获得的抗性芽进行生根、炼苗、移栽, 最后共获得抗性植株 11 棵 (图 3)。

2.4 转基因黄芪植株的鉴定

对取得转基因阳性的抗性 11 棵植株的基因组进行 DNA 提取, 经检测质量和纯度完好, 结果见图 4。

利用试验所述方法对 11 棵转基因黄芪阳性植株进行 PCR 检测, 检测表达载体的左右 2 个区是否成功转入到黄芪基因组中。PCR 结果如图 5 和图 6 所示, 左区扩增条带为 750 bp 左右, 右区扩增条带为 400 bp 左右, 均与载体左右 2 个区设计的 PCR 目的引物大小相同, 初步鉴定目的基因整合入黄芪基因组中。

为进一步鉴定 RS 基因在黄芪基因组中的整合及转录, 进行 Southern blot 杂交, 结果如图 7 所示, 转基因植株 3 棵具有杂交信号, 其余 8 数植株无明显信号, 进一步证明目的基因

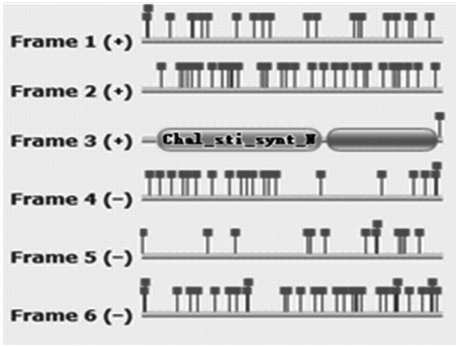
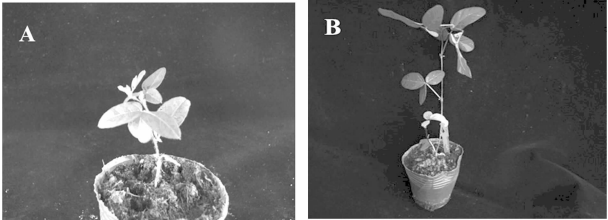


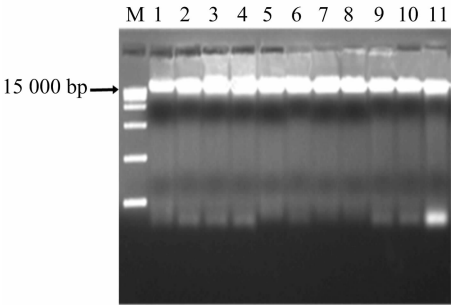
图2 *RS* 基因蛋白保守域分析

Frame (sense)	Family	Description	Entry type	Clan	Envelope		Alignment		HMM		HMM length	Bit score	E-value
					Start	End	Start	End	From	To			
3 (+)	Chal_sti_synt_N	Chalcone and stilbene synthases, N-termi	Domain	CL0046	23	247	24	247	2	225	225	413.0	2.4e-124



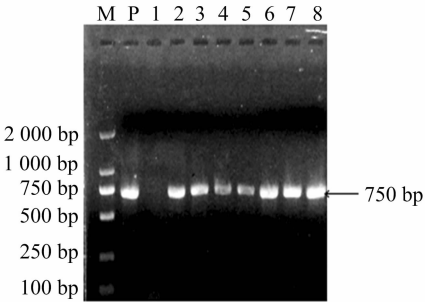
A.野生黄芩植株 B.转基因黄芩阳性植株

图3 转基因黄芩阳性植株



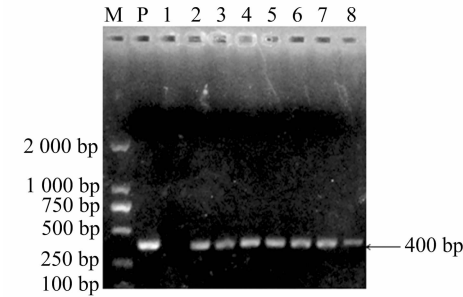
M—DL15000 marker; 1~11—11棵转基因黄芩基因组 DNA

图4 转基因黄芩基因组 DNA 的提取



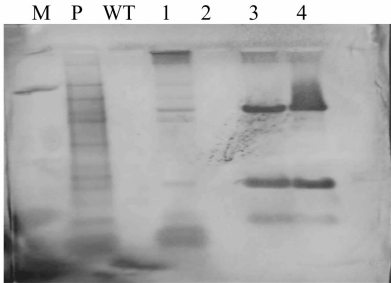
M—DL2000 marker; P—阳性对照; 1—阴性对照; 2~8—黄芩转基因阳性植株

图5 载体左区的 PCR 检测结果



M—DL2000 marker; P—阳性对照; 1—阴性对照; 2~8—黄芩转基因阳性植株

图6 载体右区的 PCR 检测结果



M—marker; P—阳性对照; WT—野生型; 1~4—转基因阳性植株

图7 部分黄芩阳性再生植株的 Southern Blot 检测

基因的全长序列。通过生物信息学分析该基因全长序列,并利用农杆菌浸染的方法将其对黄芩进行遗传转化,通过对黄芩阳性植株鉴定,从 DNA、RNA 以及蛋白质水平证明 *RS* 基因已经完全整合到黄芩基因组中并表达。本研究通过结合生物学知识和生物信息学分析,更进一步对 *RS* 基因的信息进行解读,重点从转录组学层面上解释了 *RS* 基因参与黄酮类和黄酮醇类化合物生物合成途径中的关系,更明晰了白藜芦醇的生物合成代谢的积累机制,为日后提高白藜芦醇的定向生成提供了有价值的理论参考。

参考文献:

[1] 赵霞,陆阳,陈泽乃. 白藜芦醇的化学药理研究进展[J]. 中草药,1998,29(12):837-839.
[2] Yao L L, Dai G H, Liu Y M, et al. Resveratrol analysis in Chinese medicinal plants and grape seeds[J]. Journal of Shanghai Jiaotong

已整合到黄芩基因组中进行转录。从杂交结果可以看出,不同植株的信号强弱不同,说明其表达量不同,可能与不同植株个体整合外源基因的拷贝数及插入位点不同有关。

3 结论

本研究利用 RT-PCR 技术从巨峰葡萄中克隆获得 *RS*

李勤霞, 张 萍. 新疆野核桃 F_1 表型性状与 SSR 标记连锁分析[J]. 江苏农业科学, 2017, 45(9): 41–45.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2017.09.011

新疆野核桃 F_1 表型性状与 SSR 标记连锁分析

李勤霞¹, 张 萍^{1,2}

(1. 新疆农业大学林学与园艺学院, 新疆乌鲁木齐 830052; 2. 新疆教育厅干旱区林业生态与产业技术重点实验室, 新疆乌鲁木齐 830052)

摘要:以新疆伊犁巩留县平底圆核桃、椭圆核桃及其杂种 F_1 , 以及随机选取的 60 份野核桃种质资源为研究材料, 对其表型性状、SSR 遗传多样性及其亲缘关系进行分析和评价。研究发现, 8 个表型性状在群体中呈连续分布, 与其正态分布曲线拟合较好, 彼此之间具有相关性。变异系数表明各个性状的变异均超过 10%, 说明个体间的表型值变异较大。进一步对其进行主成分分析, 表明株高、茎粗、最大叶长、最小叶长、最小叶宽这 5 个指标是引起野核桃表型差异较大的因子。通过 10 对多态性高的 SSR 引物共检测出 35 个等位变异位点, 变异范围在 2~6 之间, 平均每对 SSR 引物可检测到 3.5 个等位位点。遗传相似系数(GS)变异范围为 0.51~0.95。GS 值在 0.55 水平上的 UPGMA 聚类分析可将供试的野核桃种质资源划分成 I、II、III、IV 共 4 个组。丰富的遗传变异可为野核桃遗传改良及分子育种提供依据。

关键词:野核桃; 遗传多样性; SSR 标记; 表型性状

中图分类号: S664.101 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2017)09-041-05

生物体遗传多样性的实质是其在遗传物质组成、结构上的变异, 表现在群体、个体、组织、细胞、分子水平等不同层次上^[1]。以往人们常根据植株形态鉴定杂交子代, 但形态学鉴定周期较长, 易受栽培环境影响, 具有很大的局限性。近年发展起来的基于物种 DNA 水平的分子标记技术, 具有不易受环境影响、引物信息共享、鉴定速度快等优点, 是鉴定杂交子代的有力手段^[2]。于是, 将形态学与分子手段相结合的研究方法随之兴起^[3], 如对不同类型小豆的 SSR 标记及其性状进行研究^[4], 对大豆 [*Glycine max* (L.) Merr] 农艺性状与 SSR 标记进行研究^[5], 以及对桃 (*Amygdalus persica* L.) 的形态特征进行研究^[6-8]等, 类似研究较多。

新疆野核桃 (*Juglans regia*) 为胡桃科胡桃属植物, 是栽培核桃的直系祖先, 具有许多优良的遗传特性, 在我国仅分布于新疆伊犁巩留县野核桃沟自然保护区内, 是我国珍贵的天然野生资源。新疆野核桃不仅是我国重要的野生核桃资源, 更是研究栽培核桃起源、进化、自然选择不可多得的原始材料。曾有报道, 遗传多样性越高或遗传变异越丰富, 林木对环境变

化的适应能力也就越强, 而遗传多样性的降低或消失将导致林木在适应、繁殖方面产生衰退, 同时抵抗力也会下降^[9-10]。新疆野核桃作为一种重要的林木, 对其遗传多样性的研究显得尤为重要。目前, 关于新疆野核桃的研究较多, 王肇延对其 DNA 的提取方法以及野核桃遗传多样性进行了研究^[11]; 王磊等对野核桃的形态特征进行了研究^[12]; 袁海涛利用野核桃的表型基础数据全面构建了新疆野核桃的基础数据库, 并对其构建野核桃核心种质的方法进行了研究^[13]; 张维等对其种群动态进行了研究^[14], 但对表型性状还没有进行较深入研究, 而表型性状不仅是遗传多样性的组成部分, 更为野核桃的遗传育种提供了依据。因此, 本研究将野核桃的表型性状及 SSR 标记的多态性相结合, 以期了解其表型性状的同时, 更加全面地了解其形态多样性的来源。

1 材料与方法

1.1 试验材料

材料选自新疆伊犁河谷地巩留县西北部的野核桃沟, 2014 年 5 月下旬选取 2 棵长势较好且表型性状差异较大的野核桃树(父本: 平底圆核桃, 母本: 椭圆核桃, 两树相隔 50 m 左右)进行人工授粉杂交, 待果实成熟后, 将 F_1 种子移栽到新疆乌鲁木齐县花卉生产基地内, 共计培养幼苗 368 株。

1.2 研究方法

1.2.1 表型性状的选取

从培养的 F_1 幼苗中随机选取 60

收稿日期: 2016-01-29

基金项目: 国家自然科学基金(编号: 31260187)。

作者简介: 李勤霞(1988—), 女, 汉族, 河南三门峡人, 硕士研究生, 从事林木遗传育种相关研究。E-mail: 1194907351@qq.com。

通信作者: 张 萍, 博士, 副教授, 从事林木遗传育种相关研究。E-mail: zhang2003215@126.com。

University (Agricultural Science), 2005, 23(1): 31–35.

[3] 田立荣, 廖伯寿, 黄家权, 等. 花生白藜芦醇研究进展[J]. 中国油料作物学报, 2008, 30(4): 522–528.

[4] 谢 磊, 李志光, 周 军. 等用不同方法提取虎杖中白藜芦醇的比较[J]. 生物质化学工程, 2007(2): 28–30.

[5] 程建蕊, 王振月, 胡 风, 等. 白藜芦醇在植物中的分布及其生理活性研究进展[J]. 世界科学技术(中医药现代化), 2007, 9(5):

91–96.

[6] 王 华, 尉亚辉, 王庆俐, 等. 葡萄酒中白藜芦醇的 HPLC 测定[J]. 西北农业大学学报, 1999, 27(4): 83–87.

[7] Schroder G, Brown J W, Schroder J. Molecular analysis of resveratrol synthase: cDNA, genomic clones and relationship with chalcone synthase[J]. European Journal of Biochemistry, 1998, 172(1): 161–169.