

番茄cry1 基因果实特异性植物表达载体的构建及其转化番茄的研究

孙艳 (四川大学生命科学学院生物资源与生态环境教育部重点实验室, 四川成都610064)

摘要 隐花色素(cryptochrome) 是一类对UV-A/蓝光作出应答的光受体。果实特异性植物表达载体是用在番茄果实中特异表达的 *Lefsm1* 基因的启动子(*fsp*) 替换质粒pBI121原有的35S启动子构建而成(称为pBI121 *fsp*)。将番茄隐花色素家族成员之一-cryptochrome1中465 bp特异片段导入到植物载体pBI121 *fsp* 构建成果实特异性表达的RNAi植物表达载体(pBI121 *fsp*-cry1), 通过根癌农杆菌介导转入番茄子叶, 经组织培养成功获得转基因植株。为后续对CRY1与番茄果实中抗氧化剂番茄红素之间的关系研究提供了材料。

关键词 隐花色素; 果实特异性启动子; 子叶; 番茄转化

中图分类号 Q343.1 文献标识码 A 文章编号 0517-6611(2007)03-0065-02

Construction of Plant Expression Vector with Specific Fruit Promoter of Gene Cry1 in Transgenic Tomato

SUN Yan et al (Key Laboratory of Bio-resources and Eco-environment of Ministry of Agriculture, College of Life Sciences, Sichuan University, Chengdu, Sichuan 610064)

Abstract Cryptochrome is one of the UV-A/blue light photoreceptors. A part of gene cry1 was inserted into the T-DNA of the binary plant expression vector with pBI121 plasmid, which contained specific fruit promoter. The cotyledon of tomato was transformed with agrobacterium *tumefaciens* EHA105, some regenerated tomato plants were obtained through the tissue culture.

Key words Cryptochrome; Specific fruit promoter; Cotyledon; Tomato transformation

植物通过不同的光受体进行光的吸收, 目前已知的受体主要有3大类: UV-A/蓝光受体隐花色素(cryptochrome)和向光素(phototropin)、红光及远红光受体光敏素(phytochrome)基因家族。隐花色素最早是在拟南芥中发现的^[1]。隐花色素蛋白同光裂解酶蛋白具有高度的同源性, 但并不具有光裂解酶的DNA修复功能^[2], 它具有DNA裂解酶所不具有的C末端区域^[3], Haiyang Wang等^[4]发现了隐花色素蛋白的C末端区域通过与COPI蛋白直接的相互作用来调控在光下拟南芥的生长发育。Jian Mo等^[5]发现隐花色素蛋白与COPI的相互作用可以控制植物气孔的开闭。已有研究表明在拟南芥中, 隐花色素调控下胚轴的伸长^[1,6-7], 子叶的伸展^[8], 花青素的合成^[7,9-10], 茎的生长及节间的伸长, 以及开花的时间和植物的向光性^[11]。对于拟南芥的cry3, 目前研究还不甚明了^[12]。目前对于cry基因家族的研究主要集中在拟南芥, 拟南芥作为模式生物有它得天独厚的优势, 但却不利于对cry与果实色素间关系的研究。Leonardo等^[13]利用番茄为研究对象, 表明cry2影响番茄的营养生长、开花时间以及抗氧化剂番茄红素的含量。到底cry1对番茄红素是否有影响, 跟番茄的营养品质调控途径有着怎样的清晰联系, 这方面的研究还未见报道。笔者在已有研究的基础上, 通过对番茄果实中cry1基因的组织特异性干涉, 期望能够对CRY1与果实色素的联系以及番茄营养品质形成的分子调控机理有更清晰的认识, 以便更好地改造番茄的营养品质。

1 材料与方

1.1 材料和试剂 大肠杆菌(*Escherichia coli*) DH5, 根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) 工程菌株EHA105含有果实特异性启动子的pBI121质粒, 质粒pMD18-T, pSK。

以番茄无菌苗子叶为试验材料。预培养基: MS + 蔗糖(20.0 g/L) + 琼脂(7.0 g/L); 诱导培养基(100 ml): 5 ml AB盐 + 2 ml MES缓冲剂 + 2 ml 磷酸钠盐缓冲剂 + 91 ml 1%葡萄糖; 共培养基(500 ml): 500 ml MS + 1 ml KH_2PO_4 (100 ng/ml) +

250 μM Kinetin (0.2 ng/ml) + 100 μM 2,4-D (1 ng/ml) + 735 μM 乙酰丁香酮 (10 ng/ml); 再生培养基(500 ml): 500 ml MS + 5.0 ml 羧苄青霉素钠 (50 ng/ml) + 1.0 ml 硫酸卡那霉素 (50 ng/ml) + 1.0 ml 6-BA (1 ng/ml) + 0.1 ml IAA (1 ng/ml); 生根培养基(500 ml): 500 ml MS + 5.0 ml 羧苄青霉素钠 (50 ng/ml) + 1.0 ml 硫酸卡那霉素 (50 ng/ml) + 1.0 ml IAA (1.0 ng/ml)。以上各培养基的pH值均为6.0。

1.2 RNAi植物表达载体的构建 采用常规DNA重组技术, 涉及质粒提取、转化酶切、片段回收、连接和重组子的鉴定等(图1)。

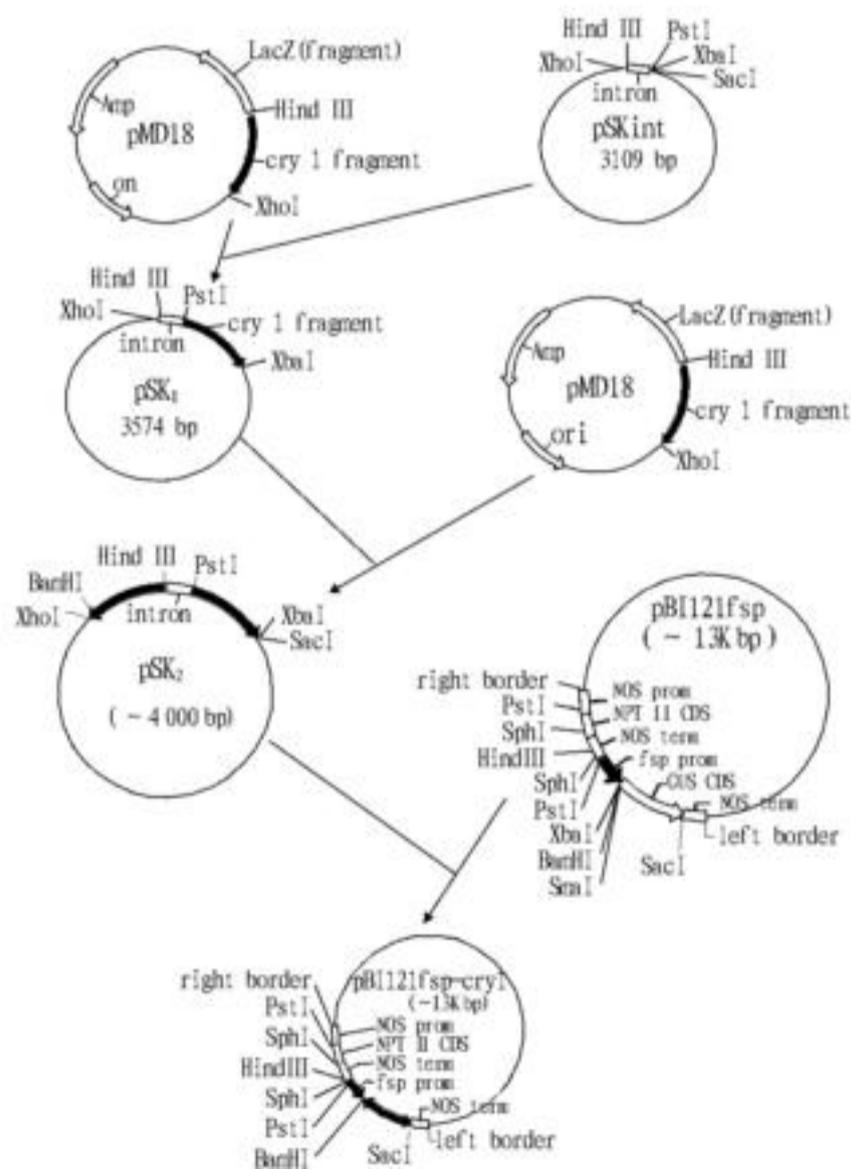


图1 RNAi果实特异性植物表达载体构建线路

通过查找NCBI基因库查到cry1基因序列(序列号为: AF130423), 利用设计的引物(上游为5' TTGAAGGAAGATGT-

作者简介 孙艳(1982-), 女, 四川广安人, 硕士研究生, 研究方向: 植物基因克隆与功能分析。

收稿日期 2006-10-31

CAGGTGG 3' 下游为 5' CCGCCTTGTTGCTATCGTAAAC 3') PCR 得到 2 084 bp 的全长,之后再利用第 2 对引物(通过 NCBI gene bank 与其相近的家族基因的 Blast 后选取无同源性的一段设计的特异引物:上游为 5' TGGCTCATCTTGATTCATCTT 3' 下游为 5' TATCAGCACTACTCCAGCCAG 3') PCR 后得到 465 bp 的片段。再用 Pst + XbaI 对回收后的片段进行双酶切,连接到用同样双酶切的 pMD18-T 载体上,得到图 1 中的 pMD18, 让其在 大肠杆菌 DH5 中扩增,将质粒回收,再用 PstI + XbaI 双酶切,得到的片断连接到中间表达载体 pSK 上成为第 2 个中间表达载体 pSK1,这时利用 pMD18-T 上的 XhoI 位点,用 XhoI + Hnd 分别双酶切第 2 个中间载体 pSK1 和 cry1,连接后成为第 3 个中间载体 pSK2,利用 BamHI + SacI 分别双酶切 pH121fsp 植物表达载体和 pSK2,连接成 RNAi 植物表达载体,命名为图 1 中的 pH121fsp-cry1。pH121fsp 是将原有的启动子用基因 Lefsm1^[14] 的启动子替换(由汪松虎构建,未发表)。

1.3 番茄的组织培养

1.3.1 无菌苗的培养。用 10% 次氯酸钠溶液浸泡番茄种子 15 min,再用无菌水冲洗 4~5 次,用无菌滤纸将种子吸干种于 MS 培养基上,光照 1 500 lx,16 h/d,25℃,1 周后长出番茄苗,在其第 1 片真叶长出前取下子叶。

1.3.2 子叶预培养。将子叶尖端剪去后再将子叶横剪一分为二,并将其反贴于预培养基上培养 2 d。

1.3.3 愈伤组织的诱导及不定芽的分化。将子叶置于再生培养基上,1 周后长出愈伤组织,每 3 周换 1 次培养基,继续培养分化出不定芽。

1.3.4 小苗的生根及移栽。当小苗长到 3 cm 以上就可将其切下移至生根培养基中生根,1 周便有根长出,等根发育好后,炼苗移出盆栽。

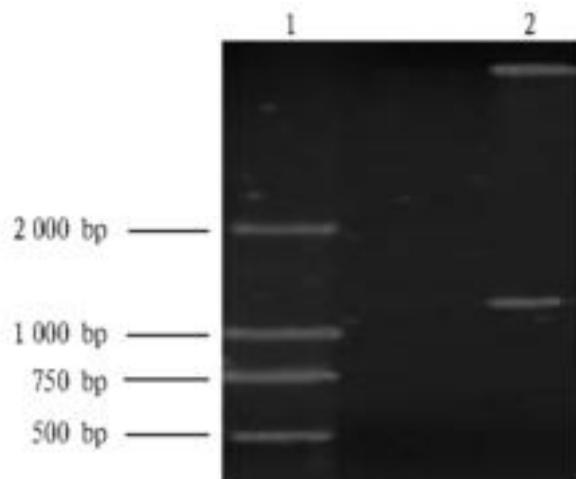
1.4 番茄的遗传转化 转化采用叶盘法^[15],剪取无菌苗子叶,预培养 2 d,将带有目的基因的农杆菌 28 过夜培养,4 000 r/min,10 min,4℃ 离心,去除上清后用诱导培养基将农杆菌稀释到 OD=0.1,再将预培养 2 d 后的子叶与稀释后的农杆菌共培养 15 min,用无菌滤纸吸干后置于共培养基上培养 2 d。然后转入再生培养基上继代筛选培养,在 不定芽长到 3 cm 以上切下转入生根培养基中生根。

2 结果与分析

2.1 pH121fsp-cry1 重组质粒的鉴定 将图 1 中的 pH121fsp-cry1 质粒转入 DH5,让其扩增,提取质粒后,用 BamHI + SacI 双酶切该质粒,以鉴定该植物表达载体构建的正确性,酶切后电泳图见图 2。从电泳图可看出,酶切后得到 2 条清晰的条带,一条带大概 1 100 bp,与预期得到的小片段大小相符,另一条为线型载体大小。

2.2 番茄遗传转化体系的建立 以 pH121fsp 为载体,通过农杆菌介导法转化番茄。在番茄与农杆菌共培养过程中,农杆菌的浓度宜保持在 OD 值 0.1 左右,之后宜用无菌滤纸将农杆菌液吸干,菌液浓度过高以及菌液残留量大都会导致在后续培养中农杆菌生长过多致使子叶死亡。再生培养基中激素浓度配比为 6-BA 2.0 ng/L,IAA 0.2 ng/L,硫酸卡那霉素筛选浓度为 100 ng/L。在继代培养时每 3 周换 1 次培养基为宜,时间太短子叶存活率下降,时间太长又会导致培养基营

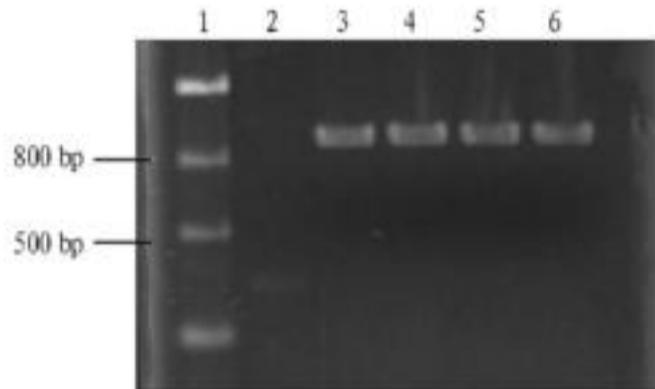
养匮乏,材料长得不好。在小苗切下生根时,苗高 3 cm 适宜,太矮不容易生根,太高在根系还不发达时植株就可能长太高以致培养瓶装不下。等苗根系发达后移栽,移栽后用透明的瓶子将苗罩住,保持湿度以提高苗的存活率。



注:DNA 分子量标准物 DL2000 marker ;2. BamHI + SacI 双酶切产物。

图 2 pH121fsp-cry1 重组质粒的鉴定

2.3 转基因植株的 PCR 检测 用 NP111(新霉素磷酸转移酶)基因的引物(上游为 5' TCTCATGCTGGAGTTCCTCGC 3' 下游为 5' GTCACCGACTTGAGCCATTG 3')对获得的转基因植株进行 PCR 检测,扩增出 857 bp 的特异带,表明目的基因已插入番茄基因组中(图 3)。



注:1. DNA 分子量标准物 Marker III ;2. 负对照;3. 质粒;4~6. 转基因番茄植株。

图 3 PCR 检测转基因再生番茄植株

3 小结

该试验通过农杆菌介导法转化番茄,成功获得了转基因植株,后期将会对其后代进行后续分析(另文发)。

参考文献

- [1] AHMAD M, CASHMORE A R. HY4 gene of *A. thaliana* encodes a protein with characteristics of a blue-light photoreceptor[J]. *Nature*, 1993, 366: 162-166.
- [2] LIN C, ROBERISON D E, AHMAD M, et al. Association of flavin adenine dinucleotide with the *Arabidopsis* blue light receptor CRY1[J]. *Science*, 1995, 269: 968-970.
- [3] CASHMORE A R, JARILLO J A, WU Y J, et al. Cryptochromes: blue light receptors for plants and animals[J]. *Science*, 1999, 284: 760-765.
- [4] HAIYANG WANG, LI-GENG MA, JIN MING LI, et al. Direct Interaction of *Arabidopsis* Cryptochromes with COP1 in Light Control Development[J]. *Science*, 2001, 294: 154-158.
- [5] JIAN MAO, YAN CHUN ZHANG, YI SANG, et al. A role for *Arabidopsis* cryptochromes and COP1 in the regulation of stomatal opening[J]. *PNAS*, 2005, 102: 12270-12275.
- [6] LIN C, AHMAD M, GORDON D, et al. Expression of an *Arabidopsis* cryptochrome gene in transgenic tobacco results in hypersensitivity to blue, UV-A, and green light[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1995, 92: 8423-8427.
- [7] LIN C, AHMAD M, CASHMORE A R. *Arabidopsis* cryptochrome 1 is a soluble protein mediating blue light-dependent regulation of plant growth and development[J]. *Plant J*, 1996, 10: 893-902.
- [8] LIN C, YANG H, GUO H, et al. Enhancement of blue-light sensitivity of *Arabidopsis* seedlings by a blue light receptor cryptochrome 2[J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95: 2686-2690.

(上接第666 页)

- [9] AHMAD M, JARILLO J A, CASHMERE A R. Chimeric proteins between cry1 and cry2 *Arabidopsis* blue light photoreceptors indicate overlapping functions and varying protein stability[J]. *Plant Cell*, 1998, 10:197-207.
- [10] YANG H Q, WU Y J, TANG R H, et al. The C termini of *Arabidopsis* cryptochromes mediate a constitutive light response[J]. *Cell*, 2003, 103:815-827.
- [11] LIN C. Plant blue-light receptors[J]. *Trends Plant Sci*, 2000, 5:337-342.
- [12] KLEINE T, LOCKHART P, BAISCHAUER A. An *Arabidopsis* protein closely related to *Synechocystis* cryptochrome is targeted to organelles[J]. *Plant J*,

2003, 35:93-103.

- [13] LEONARDO GILIBERTO, GAETANO PERROTTA. Manipulation of the Blue Light Photoreceptor Cryptochrome 2 in Tomato Affects Vegetative Development, Flowering time, and Fruit Antioxidation Content[J]. *Plant Physiol*, 2005, 137:199-208.
- [14] RIVKA BARG, IRINA SOBOLEV, TALI HLON, et al. The tomato early fruit specific gene *Lfs1* defines a novel class of plant-specific SAND/ MYB domain proteins[J]. *Plant*, 2005, 221:197-211.
- [15] HORSCH RB, FRY J, HOFFMANN N, et al. Leaf disc transformation[J]. *Plant Molecular Biology Manual*, 1988, 10:1-9.