

大豆 *GmMYB12B2* 植物表达载体的构建及转化烟草的研究

李晓薇¹, 张艳¹, 赵旭², 钱丹丹¹, 闫帆¹, 张庆林¹, 李景文¹, 王庆钰¹
(¹吉林大学植物科学学院, 长春 130062; ²吉林省产品质量监督检验院, 长春 130022)

摘要:为研究大豆 MYB 转录因子—*GmMYB12B2* 在转基因植物类黄酮代谢中的作用, 利用吉林大学植物种质资源与利用研究室前期克隆的 *GmMYB12B2* 基因, 以 PPZP 质粒为表达载体, 构建了由组成型 CaMV35S 启动子驱动 *GmMYB12B2* 基因的植物表达载体 PPZP-*GmMYB12B2*; 然后, 采用冻融法转入农杆菌 EHA105 菌株, 通过叶盘法对烟草进行遗传转化。经 PCR 随机扩增鉴定 9 株转基因烟草, 其中有 6 株是阳性植株, 初步证明已获得转大豆 *GmMYB12B2* 基因的烟草。

关键词: *GmMYB12B2* 转录因子; 植物表达载体; 农杆菌转化; 烟草

中图分类号: S565.1 文献标志码: A 论文编号: 2010-3502

Construction of Plant Expression Vector of Soybean *GmMYB12B2* Gene and Transformation in Tobacco

Li Xiaowei¹, Zhang Yan¹, Zhao Xu², Qian Dandan¹, Yan Fan¹, Zhang Qinglin¹, Li Jingwen¹, Wang Qingyu¹

(¹College of Plant Science, Jilin University, Changchun 130062;

²Jilin province Institute of Product Quality Supervision and Inspection, Changchun 130022)

Abstract: In order to study the application of *GmMYB12B2* gene in transgenic plants involving flavonoids metabolism, the plant expression vector PPZP-*GmMYB12B2* was constructed, in which the *GmMYB12B2* gene was driven by the constitutive promoter CaMV35S. The constructed expression vector was transformed into EHA105 strain by freeze-thaw method. Leaf segments of tobacco were inoculated with EHA105 containing plasmid PPZP-*GmMYB12B2*. The transgenic lines were selected by PCR detection, in nine random transgenic tobaccos, six of them were positive plants. The result showed that *GmMYB12B2* gene had been integrated into the genome of tobacco.

Key words: *GmMYB12B2* transcription factor; plant expression vector; *Agrobacterium*-mediated transformation; tobacco

0 引言

大豆是重要的油料作物, 同时也是蛋白和异黄酮的重要来源。异黄酮类化合物在植物的抗病、抗逆以及促进人类健康方面起着重要作用^[1-4]。异黄酮的杀菌活性和潜在的信号分子作用使其在植物—微生物互作

中显得十分重要^[5]。研究发现, 大多数 MYB 转录因子对植物类黄酮的代谢均有调控作用, MYB12 转录因子就是其中之一。

Mehrtens 等^[6]在拟南芥中分离了 MYB12 转录因子, 它专一性激活类黄酮的生物合成、作用和结构上都

基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项子课题(2008ZX08004-003); 国家自然科学基金面上项目(30971808); 吉林省科技发展计划重点项目(20080204); 长春市科技局国际科技合作项目(08GH10)和“211”三期建设项目资助。

第一作者简介: 李晓薇, 女, 1981 年出生, 吉林省长春市人, 在读博士研究生, 研究方向: 植物种质资源与利用。通信地址: 130062 吉林省长春市西安大路 5333 号 吉林大学农学部植物科学学院。Tel: 0431-87836245, E-mail: plnto2009@yahoo.cn。

通讯作者: 王庆钰, 女, 1963 年出生, 吉林省梅河口市人, 教授, 博士生导师。主要从事基因工程在育种上的应用与植物杂种优势的理论与应用研究, 在国内外期刊上发表学术论文 20 余篇。通信地址: 130062 吉林省长春市西安大路 5333 号 吉林大学农学部植物科学学院。Tel: 0431-87836255, E-mail: wqy414cn@yahoo.com.cn; 李景文, 男, 1972 年出生, 江苏省邳州市人, 讲师。主要从事大豆遗传育种研究, 在国内外期刊上发表学术论文 10 余篇。通信地址: 130062 吉林省长春市西安大路 5333 号 吉林大学农学部植物科学学院。Tel: 0431-87835716, E-mail: ljwk9@163.com.cn。

收稿日期: 2010-12-03, **修回日期:** 2010-12-23。

与玉米的P因子非常相近,具有相似目的基因专一性,激活 *CHS*, *CHI*, *F3H*, *FLS*^[6-7]。 *AtMYB12* 在烟草和番茄中表达都能够激活黄酮醇途径,产生更多的黄酮醇及其衍生物。在烟草中 *AtMYB12* 的表达使得花的颜色变浅,并且花青素的含量下降。在番茄中 *AtMYB12* 还能激活咖啡奎尼酸的合成途径。转 *AtMYB12* 的番茄植株能够正常生长、发育,只是在果实变色时才显现差异。 *AtMYB12* 在后续世代中能够稳定遗传^[8-9]。

Jose等^[10]研究葡萄转熟之后的阳光照射对于葡萄果皮中花青苷和黄酮醇含量的影响,他们发现在类黄酮合成这一途径中,许多MYB转录因子都对相关基因有调控作用。MYBA1和MYBA2控制花青苷合成的最后一步糖基化反应。MYB5a, MYB5b, MYBPA1和MYBPA2对大多分支途径均有调节作用。MYB4转录因子是这条途径中发现的一个转录抑制因子。葡萄的MYB12转录因子专一性调节黄酮醇衍生物合成相关基因,并且作用极显著,它受光的影响也十分明显。

前人的研究结果显示,MYB12转录因子及其类似基因对类黄酮代谢途径有调控作用。但是,到目前为止,对于大豆MYB12转录因子在异黄酮代谢途径中的作用研究还未见报道。 *GmMYB12B2* 是吉林大学植物种质资源与利用研究室前期从大豆中克隆的MYB12同源基因。为了进一步研究大豆 *GmMYB12B2* 的潜在功能,为植物类黄酮代谢基因工程提供新的基因资源,笔者构建了大豆 *GmMYB12B2* 基因的植物表达载体,并通过农杆菌介导进行烟草转化,以期提高转基因烟草中的类黄酮含量,为大豆 *GmMYB12B2* 基因在植物类黄酮代谢基因工程中的应用研究奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

烟草品种NC89的种子用纱布包裹,清水冲洗30 min,控干;75%乙醇浸泡1 min,2% NaClO(含0.1% Tween 20)浸泡30 min;无菌水浸洗3次,每次3 min;无菌干燥滤纸吸干种子,铺于1/2 MS培养基上,于25℃,16 h光/8 h暗条件下萌发,取萌发后生长1~2个月的叶片,作为遗传转化的初始材料。

1.2 菌株及质粒

大肠杆菌菌株(*E.coli*)DH5 α 、根癌农杆菌菌株EHA105、携带 *GmMYB12B2* 的克隆载体pMD18-T-*GmMYB12B2* 及植物表达载体质粒PPZP均为吉林大学植物种质资源与利用研究室保存。

1.3 工具酶及分子生物学试剂

限制性内切酶 *Kpn*I、*Sac*I、Taq DNA 聚合酶、T4 DNA 连接酶、DL2000™ DNA marker 均购自 TaKaRa 公司;DNA 纯化回收试剂盒、质粒DNA 提取试剂盒购自爱思进生物技术有限公司;其他生化试剂均为国产分析纯。

1.4 大豆 *GmMYB12B2* 基因植物表达载体的构建

在基因的5'端和3'端分别设计含 *Kpn*I 和 *Sac*I 酶切位点的引物,以质粒pMD18-T-*GmMYB12B2* 为模板,进行PCR扩增。引物为:

GmMYB12B2-F: 5'-CgAGGTACCATggAgAggAgTTT-3'

GmMYB12B2-R: 5'-CAgGAGCTCTCACgACAAgTCA-3'

将扩增产物经DNA纯化回收试剂盒纯化后,用 *Kpn*I 和 *Sac*I 双酶切,回收纯化后,与同样用 *Kpn*I 和 *Sac*I 双酶切的PPZP载体连接,构建成由CaMV35S启动子驱动 *GmMYB12B2* 基因的植物表达载体PPZP-*GmMYB12B2*。构建载体转化大肠杆菌(*E.coli*)DH5 α ,提取质粒,经 *Kpn*I 和 *Sac*I 双酶切鉴定正确后,送北京六合华大基因科技股份有限公司测序验证。

1.5 烟草的遗传转化与鉴定

将重组质粒PPZP-*GmMYB12B2* 通过冻融法转入农杆菌EHA105,再利用叶盘法转化烟草NC89,最后将经过10 mg/L潮霉素筛选的抗性植株移入温室培养。以具潮霉素抗性的烟草转化苗幼嫩叶片为材料,用改良SDS法小量提取烟草基因组DNA。以DNA为模版,非转基因烟草NC89基因组DNA为阴性对照,PPZP-*GmMYB12B2* 质粒DNA为阳性对照,分别以 *GmMYB12B2* 基因特异引物及潮霉素 *hpt* 基因特异引物进行转基因植株的PCR鉴定。 *hpt* 基因引物为:

hpt-F: 5'-TGCTTTCAGCTTCGATGTAGG-3'

hpt-R: 5'-AGAAGAAGATGTTGGCGACC-3'

PCR反应条件:94℃预变性5 min;94℃30s,56℃30 s/50℃30 s,72℃1 min;共30个循环;72℃后延伸10 min。

2 结果与分析

2.1 大豆 *GmMYB12B2* 基因植物表达载体的构建及鉴定

大豆 *GmMYB12B2* 基因植物表达载体构建策略如图1所示:将 *GmMYB12B2* 基因的PCR产物回收,经 *Kpn*I 和 *Sac*I 双酶切后插入载体PPZP。重组质粒转化大肠杆菌(*E.coli*)DH5 α ,阳性克隆用酶切验证(图2)。从图2中可以看出,重组质粒用 *Kpn*I 和 *Sac*I 双酶

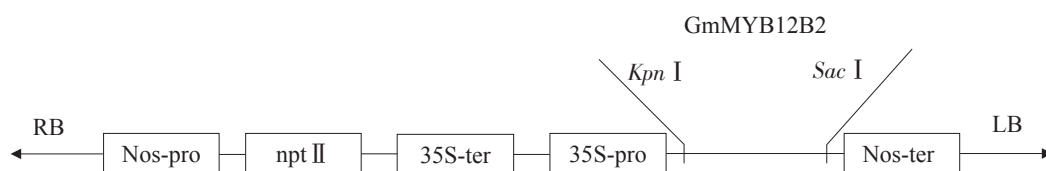
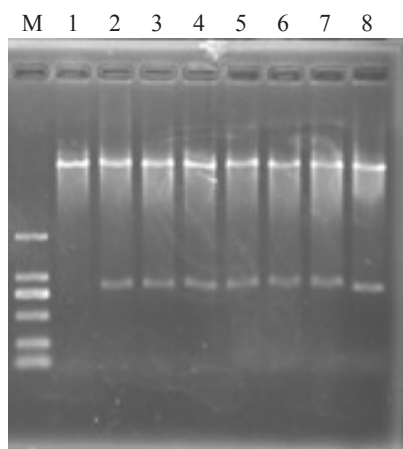


图1 质粒 PPZP-GmMYB12B2 图谱



M: DNA Marker (DL2000); 1: PPZP 质粒酶切; 2—8: 重组质粒 PPZP-GmMYB12B2 酶切

图2 重组质粒 PPZP-GmMYB12B2 双酶切鉴定结果

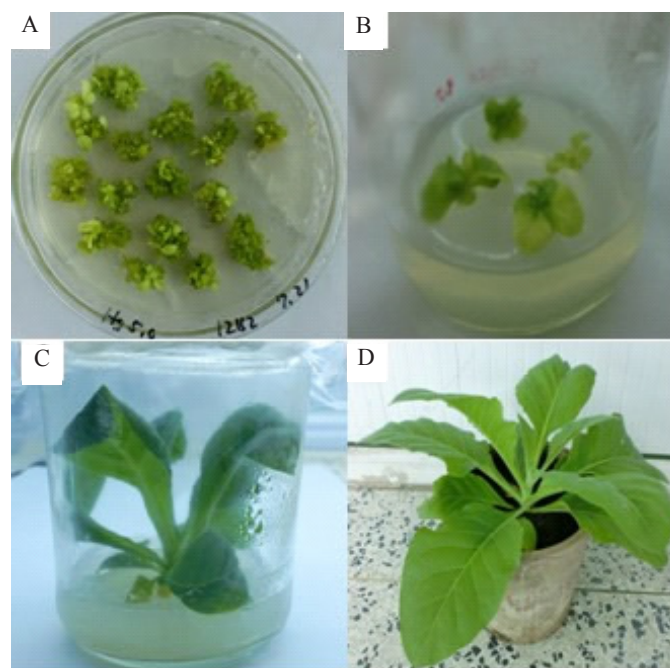
切获得一条约 783 bp 左右的条带, 说明构建的植物表达载体已经成功将大豆 *GmMYB12B2* 基因整合进去。

2.2 烟草转基因植株的获得

用含有 PPZP-GmMYB12B2 的农杆菌 EHA105 浸染烟草 NC89 叶片, 首先转入含有 5 mg/L 潮霉素的分化培养基培养, 15 天后, 继代一次, 将潮霉素浓度提高到 10 mg/L, 待抗性芽长至 1 cm 时, 切下, 转入生根培养基, 促其生根。待根系发育好后, 移入无菌土中, 塑料膜保湿 2 天后, 温室常规管理, 获得完整转基因烟草植株, 见图 3。

2.3 转基因烟草的 PCR 检测

通过农杆菌转化获得的烟草抗性植株移栽成活后, 以叶片为材料提取基因组 DNA, 以 DNA 为模板, 非转基因烟草 NC89 基因组 DNA 为阴性对照,



A: 农杆菌侵染后抗性芽分化; B: 抗性芽继续筛选; C: 抗性苗诱导生根; D: 抗性苗移栽成活

图3 转 *GmMYB12B2* 基因烟草植株获得

PPZP-GmMYB12B2 质粒 DNA 为阳性对照, 以 *GmMYB12B2* 基因及潮霉素 *hpt* 基因特异引物进行转基因植株的 PCR 鉴定。随机扩增鉴定 9 株转 PPZP-GmMYB12B2 烟草抗性苗中有 6 株是 PCR 阳性

植株(图4), 初步证明已获得转大豆 *GmMYB12B2* 基因的烟草。

3 结论

采用常规 PCR、酶切、连接等技术, 成功构建了

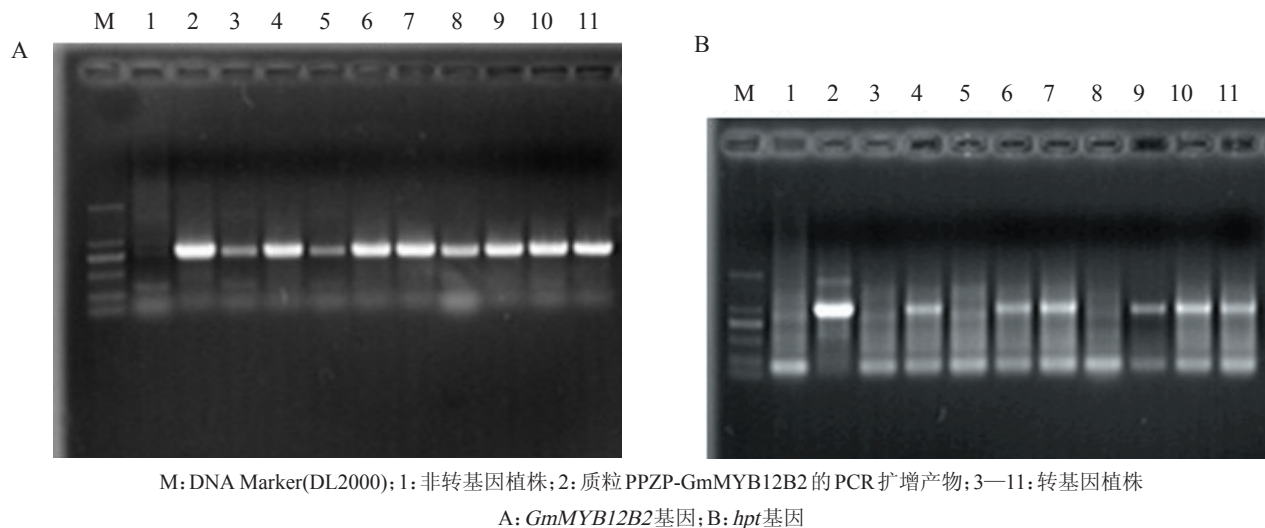


图4 转基因烟草植株的PCR检测

GmMYB12B2 基因的 植物 表达 载体 PPZP-*GmMYB12B2*。PPZP 质粒含有组成型 CaMV35S 启动子,为 *GmMYB12B2* 基因在转基因植物中的表达提供条件;它还含有潮霉素筛选基因 *hpt*,为转基因植物的筛选奠定基础。

通过农杆菌介导的遗传转化,将 *GmMYB12B2* 基因转入烟草叶片。在转基因烟草抗性苗筛选过程中,采用逐步筛选的方法,有效去除了假阳性植株。

利用 PCR 技术,对转基因烟草进行分子鉴定。使用特异基因 *GmMYB12B2* 及抗性筛选基因 *hpt* 进行双筛选,能够有效筛选转基因植株。

4 讨论

转录因子在转录水平调控目的基因的不同时空和不同条件下的表达水平,是植物对其生长发育及生理代谢的一种重要的调控方式。在植物体中存在大量的转录因子基因,据推测拟南芥中至少有 1553 个转录因子基因,约占其基因总数的 5.9%^[11]。转录因子可以调控代谢途径中的多个基因,它们通过与靶基因启动子区的相互作用来调控不同目的基因的表达和 mRNA 的转录起始,从而,特异性的调控目的产物合成的形式和强度。前人研究结果表明,MYB12 转录因子及其类似基因能够调控类黄酮代谢途径中多个关键酶基因的表达。因此,转入 *GmMYB12B2* 基因就相当于转入了多个酶基因,从而提高转基因植物类黄酮合成的总量,通过对已克隆的其他作物 MYB12 及类似基因的遗传转化研究证实了这一观点^[6-10]。因此,MYB12 及其类似基因在植物类黄酮代谢基因工程中具有广泛的应用前景。

烟草是基因工程模式植物,是植物界的“果蝇”,有

较成熟的遗传转化体系。此文在参考前人烟草遗传转化研究^[12-15]的基础上,在筛选过程中做了适当调整,即采用逐步筛选的方法。转化体的筛选是遗传转化中的重要步骤,一般采用适当的抗性选择标记(此实验中用潮霉素)进行筛选,同时还要添加抑制农杆菌生长的抗生素,比如头孢霉素。所选择的筛选剂及抗生素的浓度因实验不同而不同。此实验中的筛选剂使用的是潮霉素,在浸染初期,由于外植体经打孔、浸染,受到伤害较大,分化再生能力相对较弱,使用较低浓度的潮霉素 5 mg/L,更适于其芽的分化再生,同时也能够起到抗性筛选的目的;经过一次继代后,已经有许多小芽分化,外植体对于潮霉素的耐受力增强,这时要提高潮霉素浓度到 10 mg/L,才会更好的去除假阳性植株;待抗性芽长至 1 cm 时,就要转入生根培养基,促其生根,这时潮霉素的浓度很关键。当潮霉素浓度仍为 10 mg/L 时,抗性芽几乎不生根;潮霉素浓度为 7.5 mg/L 时,抗性芽的生根率能够达到 67%,但是根不够健壮,在后期移栽时,抗性苗不易成活;当潮霉素浓度调整到 5 mg/L,抗性苗都能更好的生根,利于移栽成活。此研究的开展将为其他转基因植物的筛选工作提供一个新思路。

参考文献

- [1] 郝青南,马超,马兵钢.大豆异黄酮的生理功能及其分离检测方法研究进展[J].中国医药生物技术,2007,2(5):383-386.
- [2] 张乐.大豆异黄酮药理作用研究进展[J].草业科学,2007,24(4):54-57.
- [3] 吴素萍,葛志军.大豆异黄酮生物学功能的研究进展[J].江西科学,2007,25(5):651-655.
- [4] 於将林,李学刚,李宗澧.大豆异黄酮的毒性研究进展[J].安徽农业科学,2007,35(9):2526-2527.

- [5] 刘晓艳. 大豆异黄酮抗氧化活性及构效关系[J]. 安徽农业科学, 2009,37(19):8837-8839.
- [6] Frank M, Harald K, Pawel B, et al. The *Arabidopsis* Transcription Factor MYB12 Is a Flavonol-Specific Regulator of Phenylpropanoid Biosynthesis[J]. *Plant Physiology*,2005,138: 1083-1096.
- [7] Kristine M O, Rune S, Unni S L, et al. Temperature and nitrogen effects on regulators and products of the flavonoid pathway: experimental and kinetic model studies[J]. *Plant Cell and Environment*,2009,32:286-299.
- [8] Jie L, Eugenio B, Lionel H, et al. *AtMYB12* regulates caffeoyl quinic acid and flavonol synthesis in tomato: expression in fruit results in very high levels of both types of polyphenol[J].*The Plant Journal*,2008,56:316-326.
- [9] Ralf S, Hirofumi I, Gunnar H, et al. Differential regulation of closely related R2R3-MYB transcription factors controls flavonol accumulation in different parts of the *Arabidopsis thaliana* seedling [J].*The Plant Journal*,2007,50:660-677.
- [10] Jose T M, Rodrigo L, Andrea V, et al. Post-veraison sunlight exposure induces MYB-mediated transcriptional regulation of anthocyanin and flavonol synthesis in berry skins of *Vitis vinifera* [J].*Experimental Botany*,2009,60(3):853-867.
- [11] Ohme-Takagi M, Shinshi H. Ethylene-inducible DNA binding proteins that interact with an ethylenen-responsivi element[J]. *Plant Cell*,1995,7:173-182.
- [12] 陈观水,张铮,周以飞,等.甘薯 *IbNPR1* 基因表达载体的构建及转化烟草[J].*热带作物学报*,2009,30(10):1484-1487.
- [13] 陈秋苹,刘学群,王春台.根癌农杆菌介导的糖苷转移酶基因转化烟草的条件研究[J].*化学与生物工程*,2005,6:9-11.
- [14] 杨玉婷,陈武,李颖,等.拟南芥抗病基因 *RPP8* 转化烟草及其表达分析[J].*作物研究*,2009,23(2):125-128.
- [15] 王全伟,曲敏,张海玲,等.菜豆几丁质酶基因 *Bchi* 的克隆及其在转基因烟草中的表达[J].*分子植物育种*,2008,6(1):53-58.