

AhNCED1 基因转化花生研究

覃 铭^{1,2}, 胡 博^{1*}, 刘 璨¹, 李 玲^{1**}, 罗 虹¹

(1. 华南师范大学生命科学学院, 广东省植物发育生物工程重点实验室, 广州 510631;

2. 北京师范大学珠海分校工程技术学院, 广东 珠海 519085)

摘要: 构建转化 *AhNCED1* 基因花生 (*Arachis hypogaea* L.) 过表达载体 $35S::AhNCED1::GUS$, 用 $OD_{600} = 0.8$ 的 LBA4404 农杆菌液浸染汕油 523, 抗性芽诱导率达 100%。PCR 检测 89 株筛选苗, 43 株呈阳性, GUS 检测阳性率为 50%。转基因植株地上部分 ABA 含量增加; PEG 胁迫 10 h, 转基因植株叶片 *AhNCED1* 蛋白表达增强, 内源 ABA 水平积累, 超氧化物水平降低。

关键词: *AhNCED1* 基因; 过表达; 转化; 花生; ABA

中图分类号: Q785

文献标识码: A

文章编号: 1005-3395(2010)03-0277-06

Transformation *AhNCED1* Gene in Peanut (*Arachis hypogaea* L.)

QIN Ming^{1,2}, HU Bo^{1*}, LIU Can¹, LI Ling^{1**}, LUO Hong

(1. College of Life Sciences, South China Normal University, Guangdong Provincial Key Laboratory of Biotechnology for

Plant Development, Guangzhou 510631, China; 2. Engineering Technology school, Beijing Normal University Zhuhai, Zhuhai 519085, China)

Abstract: 9-*cis*-epoxycarotenoid dioxygenase (NCED) is the key enzyme of ABA biosynthesis in higher plant. The expression vector $35S::AhNCED1::GUS$ for peanut (*Arachis hypogaea* L.) was constructed. Then *AhNCED1* gene was transformed into cotyledon of 'Shanyou 523', which is sensitive to drought stress, by immersing into *Agrobacterium tumefaciens* strain LBA4404 bacterial suspension solution. The induction rate of adventitious buds with kanamycin-resistant was 100%, and in which there were 48.3% and 50% positive plantlets by PCR amplification and GUS histochemical identification, respectively. The ABA contents in aboveground organs of transgenic plants were higher than that in the wild (non-transformation) plants. When the leaves of the transgenic *AhNCED1* plants subjected to PEG stress for 10 h, the expressions of *AhNCED1* protein and endogenous ABA content were increased, as well as superoxide level decreased.

Key words: *AhNCED1* gene; Expression; Genetic transformation; Peanut; Abscisic acid

脱落酸(ABA)作为一种胁迫信号转导物质,在植物对水分胁迫的适应性反应过程中起着重要作用,施用 ABA 能提高花生 (*Arachis hypogaea* L.) 的抗旱性^[1]。9-顺式环氧类胡萝卜素双加氧酶(NCED)是调节高等植物 ABA 生物合成的关键限速酶,水分胁迫可诱导拟南芥 (*Arabidopsis thaliana*)、玉米 (*Zea mays*)、烟草 (*Stylosanthes guianensis*) 等植物

NCED 的表达^[2-5]。水分胁迫下耐旱花生品种的 ABA 含量高于敏旱品种^[6]。我们前期从花生耐旱品种粤油 7 号叶片中克隆到 *NCED1* 基因 (*AhNCED1*)^[7], 证实其表达受干旱和 ABA 诱导上调^[8]; 转 *AhNCED1* 基因拟南芥植株比野生型植株矮壮, 幼苗期根长、根系发育好, 水分胁迫下, 叶气孔和气孔密度比野生型小, 植株抵抗干旱的能力增

收稿日期: 2009-08-20

接受日期: 2009-11-17

基金项目: 广东省科技计划项目(20065030014); 广东省自然科学基金(06025049); 广东省教育厅自然科学基金重点项目(C10033); 国家自然科学基金面上项目(30771297)资助

作者简介: 覃铭(1981~), 女, 湖南常德人; 硕士, 助教, 从事植物细胞工程研究, email: lilab@scnu.edu.cn

* 与第一作者对本文有同等贡献

** 通讯作者 Corresponding author, email: lilab@scnu.edu.cn

强^[9]。本研究构建了 *AhNCED1* 转化花生的表达载体,由农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导转化抗旱品种汕油 523,在证实其成功转入植物基因组的基础上,分析转基因植株 *AhNCED1* 基因 mRNA 和 *AhNCED1* 蛋白的表达,以及水分胁迫下 ABA 水平和超氧化物水平的影响,为研究 *AhNCED1* 在 ABA 提高花生抗旱性的作用提供依据。

1 材料和方法

1.1 材料及菌种

实验材料花生(*Arachis hypogaea* L.)品种为汕

油 523,由广东省农业科学院作物研究所梁炫强研究员提供。农杆菌 LAB4404 为本实验室保存。

1.2 35S::AhNCED1::GUS 双元表达载体的构建

设计上游引物 AhNCED1-F 和下游引物 AhNCED1-R(表 1),利用 PCR 方法获得 *AhNCED1* 基因片段,利用 *Xba* I 和 *Sma* I 将该片段插入到植物表达载体 pBI121 的多克隆位点,构建成双元表达载体 35S::AhNCED1::GUS(图 1)。通过限制性内切酶酶切以及测序鉴定后,将该表达载体转化农杆菌 LAB4404。

表 1 所用引物
Table 1 Primers used

引物 Primer	序列 Sequence (5' ~ 3')
AhNCED1-F	<u>TCTAGAATGGCAGCAACTTCAAACACATG</u>
AhNCED1-R	<u>CCCGGGGAAGCCTGCTTCCGGAGATCCTTG</u>
GUS-1	GGTCAGTCCCTTATGTTACG
GUS-2	GTGTAGAGCATTACGCTGCG
Northern-F	GGATCCATGGCTGCTTACACGTGT
Northern-R	GAGCT CAGTAGATAGGTTAAAGGT

下划线为酶切位点。The underlined sequences show the site of enzymatic lysis.

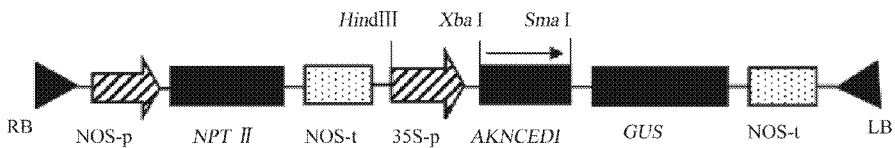


图 1 35S::AhNCED1::GUS 表达载体构建图谱

Fig. 1 Construct of expression vector of 35S::AhNCED1::GUS

RB: T-DNA 右边界 Right border of T-DNA; LB: T-DNA 左边界 Left border of T-DNA; 35S-p: CaMV 35S 启动子 Cauliflower mosaic virus (CaMV) 35S promoter; *NPT II*: 新霉素磷酸转移酶基因(卡那霉素筛选基因) Neomycin phosphotransferase II gene; NOS-p: NOS 启动子 NOS promoter; NOS-t: NOS 终止子 NOS terminator; *GUS*: β -葡萄糖醛酸酶基因 β -glucuronidase gene.

1.3 花生遗传转化

去壳种子分别用 70% 乙醇和 2% (W/V) 次氯酸钠表面消毒,无菌水漂洗,切取单片子叶接种于 MS₀ 培养基上,25 ± 1°C,暗培养 0、2 和 4 d。

取 OD₆₀₀ = 0.8、含 35S::AhNCED1::GUS 重组子的农杆菌菌液,2300 × g 离心 20 min,1/2MS 重悬后与子叶分别浸染 5 ~ 10 min。无菌水漂洗,置于共培养基(MS + 4.5 mg L⁻¹ BA + 2.2 mg L⁻¹ 2,4-D + 100 μmol L⁻¹ AS)中,在 27°C 暗培养 3 d;无菌水冲洗,置于 MS + 4.5 mg L⁻¹ BA + 2.2 mg L⁻¹ 2,4-D + 500 mg L⁻¹ Cef)中培养 1 周,转接至筛选培养基(MS 含有 0.1 mg L⁻¹ 4-PU,2 mg L⁻¹ BA 和 300 mg L⁻¹ Kan),7 d 继代 1 次;培养 30 d 后切取不定芽转移到含有 400 mg L⁻¹ Kan,0.1 mg L⁻¹ 4-PU 和 2 mg L⁻¹

BA 的 MS 培养基中,培养 40 d 转接到芽伸长培养基 MS + 0.1 mg L⁻¹ 4-PU + 4 mg L⁻¹ BA 上培养;取苗高 ≥ 3 cm 的试管苗转移到 MS + 0.3 mg L⁻¹ NAA^[10] 培养基上诱导生根。

1.4 抗性芽统计

对转化的外植体在抗生素培养基上筛选,统计抗性芽诱导率(%) = 抗性芽的外植体数/除菌培养后外植体数总数;每个外植体形成抗性芽数 = 存活的抗性芽总数/产生抗性芽外植体数。

1.5 GUS 检测

将抗性芽或叶片切块置于 GUS 染色液(0.5 mmol/L 铁氰化钾、0.5 mmol/L 亚铁氰化钾、1 mmol/L EDTA、20% 甲醇;1 mg mL⁻¹ X-Gluc 溶解

于 50 mmol/L K_3PO_4 缓冲液, pH = 7.0) 中, 37℃ 温育 48 h, 70% 乙醇脱色, 观察拍照。统计 GUS 瞬时阳性表达率 = GUS 检测呈兰色的外植体数/随机抽取检测外植体的总数。

1.6 抗性植株 PCR 检测

按照 Endo 等的方法^[11]提取抗性植株的基因组 DNA, 以 GUS-1 和 GUS-2 为引物, 用 PCR 法检测抗性植株基因组中外源片段的插入。PCR 扩增条件: 94℃ 30 s; 55℃ 30 s; 72℃ 30 s, 共 35 个循环, 72℃ 延伸 5 min。目的片段为 525 bp。

1.7 Northern Blot 分析

按照 Cheng 等的方法^[12]提取叶片总 RNA。探针合成采用特异引物 Northern-F/Northern-R, 以 *AhNCED1* 的 cDNA 为模板, 用 [$\alpha^{32}P$] dCTP 标记: 35℃ 杂交 12 ~ 24 h; 按照 Yang 和 Guo^[5]的方法分析 *AhNCED1* 基因表达。

1.8 Western Blot 分析蛋白表达

将 *AhNCED1* 基因片段定向克隆到原核表达载体 pPROEX HTa 的 *EcoR* I 和 *Pst* I 酶切位点之间, 构建原核表达质粒, PCR 鉴定和 *EcoR* I / *Pst* I 双酶切鉴定。重组质粒转化表达宿主菌 *E. coli* 中, 扩大培养后诱导表达。经 SDS-PAGE 电泳检测, 表达产物大小与理论预计值相符, 确定此表达蛋白为目的蛋白 AhNCED1。将原核表达系统中表达和纯化的 AhNCED1 蛋白作为抗原, 制备抗 AhNCED1 多克隆抗体作为一抗, Sigma 公司的碱性磷酸酶标记羊抗

兔 IgG (IgG-AP) 为二抗, 采用 Dupont 公司的 Polyscreen PVDF 膜, NBT/BCIP 显色。用三氯醋酸-丙酮沉淀法从叶片提取总蛋白, 按照 Maliyakal 等^[13]方法分析 AhNCED1 蛋白表达。

1.9 ABA 含量测定

按照 Wan 和 Li^[8]的方法提取和纯化叶片内源 ABA, 并用高效液相色谱仪 (GS168) 测定其含量。

1.10 超氧阴离子水平分析

取水分胁迫处理 10 h 的植株叶片浸入 NBT 染色液 (含 1 mg mL⁻¹ NBT 的 10 mmol 磷酸缓冲液, pH 7.8) 2 h, 加入无水乙醇, 沸水中煮 30 min, 清水洗涤 2 次, 70% 乙醇保存, 照相。

2 结果和分析

2.1 抗性植株的获得

分别将预培养 0、2 和 4 d 的花生子叶, 用农杆菌浸染和共培养 3 d 后, 检测其 GUS 瞬时转化率, 结果表明, 在 9 个组合中, 预培养 0 d 的外植体的瞬时转化率为 100% (表 2); 浸染 5 min 的抗性芽诱导率为 99.3%; 外植体以 OD₆₀₀ = 0.8 的菌液浸染 5 min 的 GUS 瞬时转化率和芽诱导率皆为 100%, 每个外植体平均形成 1.67 个抗性芽 (表 2)。

外植体经筛选培养后, 随机抽取 64 个外植体进行 GUS 染色, 不定芽呈现蓝色 (图版 I: 1 ~ 4); 有 6 个处理组合的外植体瞬时转化率皆达到 100% (表 2)。

表 2 影响花生子叶转化效率的因素

Table 2 Several factors on transformation efficiency of peanut cotyledon

编号 No.	预培养天数 Days of preculture	菌液浓度 Concentration of bacterial suspension (OD ₆₀₀)	浸染时间 Time of immersion (min)	外植体数 Number of explants	瞬时转化率 Transient transformation rate (%)	抗性芽诱导率 Induction rate of resistant buds (%)	平均存活 抗性芽数 Average survival resistant buds
1	0	0.4	1 ~ 2	83	100	84	0.74
2	0	0.8	5 ~ 6	82	100	100	1.67
3	0	1.2	10 ~ 11	86	100	96	0.54
4	2	0.4	5 ~ 6	80	100	98	0.72
5	2	0.8	10 ~ 11	83	60	82	0.96
6	2	1.2	1 ~ 2	80	100	100	0.70
7	4	0.4	10 ~ 11	74	100	91	0.55
8	4	0.8	1 ~ 2	85	75	90	1.29
9	4	1.2	5 ~ 6	75	50	100	0.78

浸染的外植体在抗生素筛选过程中,卡那霉素(Kan)浓度影响不定芽的形成(图 2),300 mg L⁻¹ Kan 使 4% 外植体产生不定芽;Kan 浓度为 400 mg L⁻¹ 时,外植体不能产生不定芽且褐化。经 400 mg L⁻¹ 筛选后,获得 209 株能生长正常的抗性植株。

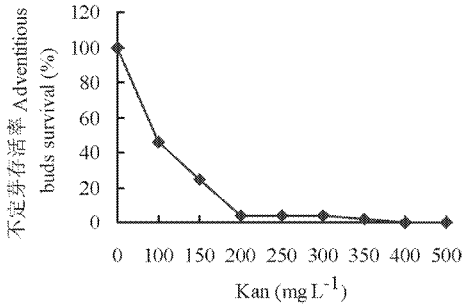


图 2 不同浓度卡那霉素对花生子叶不定芽存活率的影响
Fig. 2 Effect of kanamycin on survival of adventitious buds from peanut cotyledon

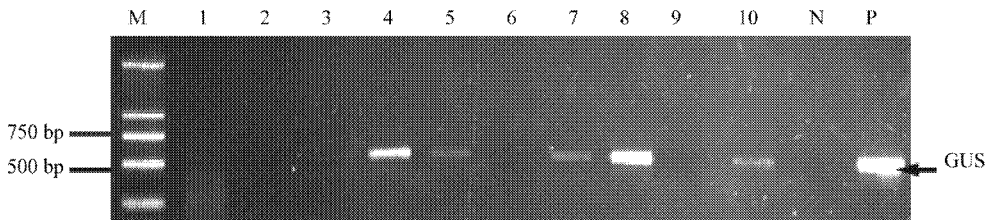


图 3 抗性植株 PCR 检测

Fig. 3 PCR amplification of kanamycin-resistant plants

M: DL2000 DNA Marker; 1~10: 拟转基因抗性植株 Kanamycin-resistant plants; N: 负对照(无 DNA) Negative control; P: pBIA121-AhNCED1 重组质粒 Positive control (pBIA121-AhNCED1 plasmid).

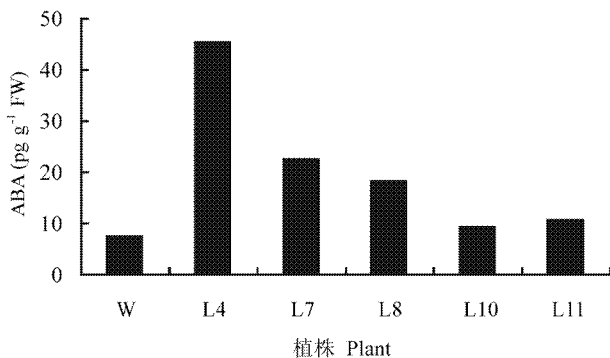


图 4 转基因花生植株地上部分内源 ABA 含量

Fig. 4 ABA contents in the shoot of transgenic peanut plants

W: 野生型植株 Wild-type plants; L4~L11: 转基因植株系 Transgenic plants.

2.4 水分胁迫下转基因植株叶片的变化

转基因植株 L4 的 *AhNCED1* 基因表达在 PEG 处理 0 和 10 h 无明显差异;非转基因的野生型植株经 PEG 处理 10 h, *AhNCED1* 基因明显上调表达(图 5A)。转基因花生植株 L4 幼苗在水分胁迫下, *AhNCED1* 蛋白表达增强,明显高于野生型植株(图

2.2 抗性植株分子检测

随机对 89 株抗性植株进行 PCR 检测,其中 43 株为阳性,阳性率为 48.3%。图 3 泳道 4、5、7、8、10 分别代表抗性植株 L4、L5、L7、L8、L10,PCR 检测扩增出与阳性对照(P)一致的长度为 525 bp 的目标带;从中取 12 株阳性转基因植株进行 GUS 染色,其中 6 株(株系编号为 L4、L7、L8、L10、L11)在不定芽基部(图版 I: 5)和茎段维管组织边沿(图版 I: 6)有 GUS 染色,阳性率为 50%。

2.3 转基因植株 ABA 含量分析

分析转基因植株 L4、L7、L8、L10 和 L11 地上部分内源 ABA 含量,结果表明,转基因植株地上部分的内源 ABA 含量高于野生型植株,其中 L4、L7 和 L8 的含量分别比野生型高 5.9 倍、2.7 倍和 2.4 倍(图 4)。

5B), ABA 表达量比正常条件下的含量增加,是未转化对照植株的 1.69 倍(图 5C),说明水分胁迫加强了转基因花生植株体内 *AhNCED1* 蛋白的表达,促进了 ABA 的生物合成。

分析转基因植株 L4、L8 在水分胁迫 10 h 的 NBT 染色结果显示,转基因植株叶片呈现蓝色程度低于未转化的野生型植株,表明叶片超氧阴离子的浓度降低(图版 I: 7)。

3 讨论

花生的遗传转化体系存在着稳定性差、转化率不高的特点。本研究以花生子叶为外植体,农杆菌 LBA4404 为目的基因携带菌株,外植体不经预培养,在农杆菌菌液浓度 OD₆₀₀ = 0.8 中浸染 5 min 为适宜的转化条件,瞬时转化率和抗性芽发生率均可达到 100%,与已报道的花生转化体系^[14]相比,本研究获得的转化效率和 PCR 阳性率较高。

我们前期研究表明,花生不同品种的抗旱性与

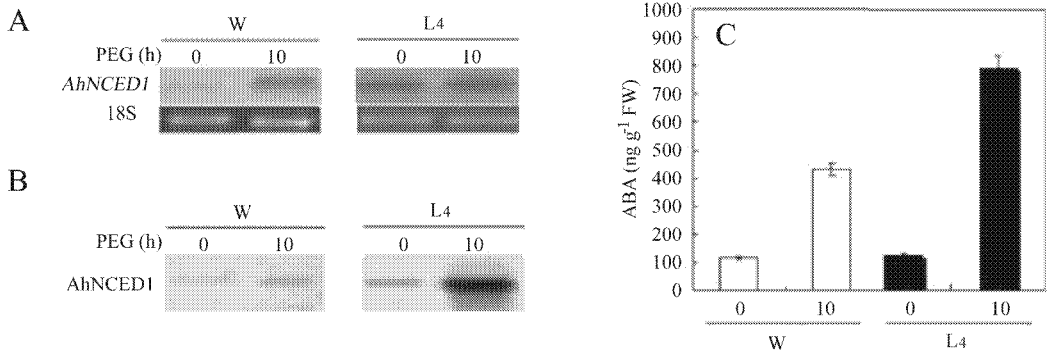


图5 水分胁迫下转基因植株叶片 *AhNCED1* 基因(A)和蛋白表达(B)以及 ABA 含量(C)

Fig. 5 Expression of *AhNCED1* gene (A), *AhNCED1* protein (B) and ABA content (C) in leaves of transgenic peanuts under water-stress for 10 h
W: 野生型植株(对照) Wild type (no-transformation) plant; L4: 转基因花生系 Transgenic peanut lines.

其体内 ABA 水平呈正相关,耐旱品种粤油 7 号在水分胁迫下体内 ABA 含量明显高于敏旱品种汕油 523^[6], *AhNCED1* 在拟南芥的异源表达,提高了植株 ABA 生物合成和抗水分胁迫的能力^[8]。本研究将 *AhNCED1* 转化花生敏感品种汕油 523,获得的转基因植株 *AhNCED1* 基因表达高于非转基因的野生型花生植株,由于 *AhNCED1* 基因受 CaMV 35S 启动子驱动,呈组成型表达,其基因 mRNA 表达不受水分胁迫诱导。

Gao 等^[15]用拟南芥 LFR 重组蛋白制备出的多克隆抗体,经 Western blotting 检测后可识别拟南芥中天然 LFR 蛋白。本研究通过原核表达获得重组蛋白后制备 *AhNCED1* 抗体,经检测可识别花生体内天然 *AhNCED1* 蛋白,用于研究转基因花生植株中该蛋白的表达。水分胁迫下,耐旱品种粤油 7 号 *AhNCED1* 基因表达水平高于敏旱品种汕油 523,与 ABA 累积水平同样存在差异(待发表)。转 *AhNCED1* 基因花生植株在水分胁迫下,叶片 *AhNCED1* 蛋白超表达,与其 ABA 含量的提高一致。与野生型植株比较,转基因植株有效降低了植物叶片组织内超氧阴离子含量。植株体内 ABA 含量增加,促进 CAT、SOD 等抗氧化酶的活性增强^[16-17],防御水分胁迫的伤害。*AhNCED1* 蛋白影响植物组织活性氧的原因正在开展研究。

参考文献

[1] Li L, Pan R C. Increasing yield and drought resistance of groundnut using plant growth regulators [C]// Cowda C L L, Nigam S N, Johansen C, et al. Achieving High Groundnut Yields, Proceedings of an International Workshop. Andhra Pradesh, India: ICRIASAT Press, 1996: 147-55.
[2] Tan B C, Joseph L M, Deng W T, et al. Molecular characterization of the *Arabidopsis* 9-*cis* epoxy-carotenoid dioxygenase gene family

[J]. *Plant J*, 2003, 35: 44-56.
[3] Rodrigo M J, Alquezar B, Zacarias L. Cloning and characterization of two 9-*cis*-epoxy-carotenoid dioxygenase genes, differentially regulated during fruit maturation and under stress conditions, from orange (*Citrus sinensis* L. Osbeck) [J]. *J Exp Bot*, 2006, 57: 633-643.
[4] Soar C J, Loveys B R. Gradients in stomatal conductance, xylem sap ABA and bulk leaf ABA along canes of *Vitis vinifera* cv. Shiraz: Biochemical and molecular biological evidence indicating their source Function [J]. *Plant Biol*, 2004, 31: 659-669.
[5] Yang J F, Guo Z F. Cloning of a 9-*cis*-epoxy-carotenoid dioxygenase gene (*SgNCED1*) from *Stylosanthes guianensis* and its expression in response to abiotic stresses [J]. *Plant Cell Rep*, 2007, 26: 1383-1390.
[6] Liu J S (刘吉升), Li L (李玲). The relationship between drought tolerance and endogenous ABA level in some kinds of peanut (*Arachis hypogaea* L.) variety [J]. *Plant Physiol Commun* (植物生理学通讯), 2006, 42(6): 1115-1116. (in Chinese)
[7] Wan X R, Li L. Molecular cloning and characterization of a drought-inducible cDNA encoding a putative 9-*cis*-epoxy-carotenoid dioxygenase in *Arachis hypogaea* L. [J]. *DNA Seq*, 2005, 6: 217-223.
[8] Wan X R, Li L. Regulation of abscisic acid level and drought tolerance of transgenic *Arabidopsis* by ectopic expression of a peanut 9-*cis*-epoxy-carotenoid dioxygenase gene which is in response to water stress, high salinity and exogenous ABA [J]. *Biochem Biophys Res Commun*, 2006, 347: 1030-1038.
[9] Li R M (黎瑞敏), Guo D L (郭栋梁), Wan X R (万小荣), et al. Study on phenotype characters and drought resistance of the *AhNCED1* transgenic *Arabidopsis* plants under drought stress [J]. *Biotechnology* (生物技术), 2008, 18(5): 16-18. (in Chinese)
[10] Qin M (覃铭), Liu C (刘璨), Li L (李玲). Effects of 4-PU and 6-BA on formation of calli and adventitious buds in epicotyl explants of *Arachis hypogaea* [J]. *Subtrop Plant Sci* (亚热带植物科学), 2008, 37(4): 15-17. (in Chinese)
[11] Akira E, Yoshiaki S, Hirokazu T, et al. Drought induction of *Arabidopsis* 9-*cis*-epoxy-carotenoid dioxygenase occurs in vascular parenchyma cells [J]. *Plant Physiol*, 2008, 147: 1984-1993.
[12] Cheng F S, Brown S K, Weeden N F. A DNA extraction protocol from various tissues in woody species [J]. *HortScience*, 1997, 32

(5): 921-922.

[13] Maliyakal E J. An efficient method for isolation of RNA and DNA from plants containing polyphenolics [J]. Nucl Acids Res, 1992, 9: 751-758.

[14] Liu F(刘峰), Shan S H(单世华), Yan C X(闫彩霞). Research of influence factors on peanut cotyledon regeneration in genetic transformation [J]. J Peanut Sci(花生学报), 2007, 36(1): 13-19. (in Chinese)

[15] Gao N(高宁), Wang Z J(王志娟), Zeng B(曾博), et al. Purification of *Arabidopsis* LFR recombinant protein in engineering bacteria and preparation of its antibody [J]. Prog Biochem Biophys(生物化学与生物物理进展), 2008, 35(9): 1059-1064.(in Chinese)

[16] Zhang Y M, Yang J F, Lu S Y, et al. Overexpressing *SgNCED1* in tobacco increases ABA level, antioxidant enzyme activities, and stress tolerance [J]. J Plant Growth Regul, 2007, 10: 1007-1014.

[17] Zhang A, Jiang M, Zhang J, et al. Nitric oxide induced by hydrogen peroxide mediates abscisic acid-induced activation of the mitogen-activated protein kinase cascade involved in antioxidant defense in

maize leaves [J]. New Phytol, 2007, 175: 36-50.

图版说明

箭头示 GUS 组织化学分析抗性植株蓝色部位 Arrows indicate the positive spots (blue) of GUS histochemical analysis for kanamycin-resistant plants; W: 野生型花生 Wild-type (no-transformation) peanut; L: 转基因花生 Transgenic peanut.

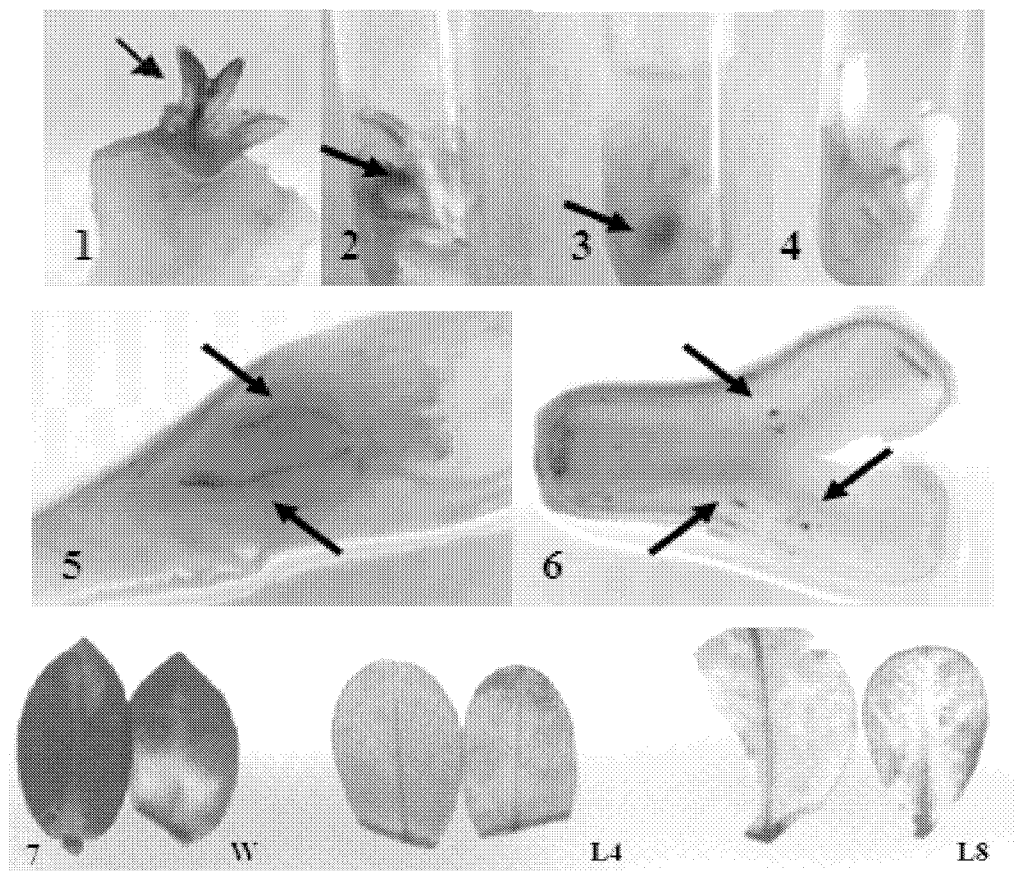
图版 I

1. 不定芽; 2. 75% 乙醇脱色的外植体; 3. 拟转基因外植体; 4. 非转基因外植体; 5. L4 不定芽; 6. L8 茎段; 7. 水分胁迫下植株 NBT 染色叶片

Explanation of plate

Plate I

1. Adventitious bud; 2. Explants decolorized by 75% ethanol; 3. Kanamycin-resistant buds; 4. No-transgenic explants; 5. Adventitious bud of L4; 6. Stem segment of L8; 7. Leaves of transgenic peanut lines stained with NBT under water stress.



覃铭等: 图版 I

QIN Ming, et al.: Plate I