

研究论文

Research Article

含硫氨基酸基因植物表达载体的构建及对百脉根的转化

关宁¹, 王涌鑫¹, 李聪¹, 苗丽宏¹, 张博²

1. 中国农业科学院北京畜牧兽医研究所牧草遗传育种研究室, 北京, 100193
2. 新疆农业大学草地资源与生态自治区重点实验室, 乌鲁木齐, 830052

✉ 通讯作者: licong0520@sina.com; 作者

豆科基因组学与遗传学, 2010年, 第1卷, 第4篇 DOI: 10.5376/lgg.cn.2010.01.0004

收稿日期: 2010年07月25日

接受日期: 2010年10月10日

发表日期: 2010年11月25日

本文首次发表在《分子植物育种》印刷版上。现经版权所有人授权, 采用《Creative Commons Attribution License》在《豆科基因组学与遗传学》中文网络版上再次发表与传播。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

建议的引用格式如下:

Guan et al., 2009, Construction of Plant Expression Vectors for Sulphur-amino acid Gene and Transformation to *Lotus corniculatus* L., *Fenzi Zhiwu Yuzhong* (Molecular Plant Breeding), 7(2): 257-263 (doi: 10.3969/mpb.007.000257) (关宁等, 2009, 含硫氨基酸基因植物表达载体的构建及对百脉根的转化, 分子植物育种, 7(2): 257-263 (doi: 10.3969/mpb.007.000257))

摘要 用限制性内切酶 *Nco* I 和 *Bgl* II 从中间载体 pMD18zeolin 和 pMD18zein 上切下 zeolin 基因(约 1 600 bp)和 γ -zein 基因(约 720 bp), 将其定向连接在经相同酶切的质粒载体 pCAMBIA1302 上, 构建成植物表达载体 pCBzeolin 和 pCBzein。采用冻融法将 pCBzeolin 和 pCBzein 导入根瘤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株 LBA4404, 利用该菌株转化百脉根(*Lotus corniculatus* L.)。经过共培养、筛选分化、再生, 得到抗性植株。对抗性植株进行了 PCR、RT-PCR 检测表明, γ -zein 和 zeolin 基因已经整合到百脉根基因组中, 在核酸水平得到了表达。含硫氨基酸数据分析表明, 转 zeolin 基因植株含硫氨基酸含量极显著高于转 γ -zein 基因植株和对照植株的含量($P < 0.01$), 但转 γ -zein 基因植株与对照植株间差异不显著。

关键词 含硫氨基酸基因; 表达载体构建; 百脉根; 转化

Construction of Plant Expression Vectors for Sulphur-amino acid Gene and Transformation to *Lotus corniculatus* L.

Guan Ning¹, Wang Yongxin¹, Li Cong¹, Miao Lihong¹, Zhang Bo²

1. Forage Plants' Genetics and Breeding Laboratory, Institute of Animal Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing, 100193;
2. Key Laboratory of Grassland Resource and Ecology, Xinjiang Agricultural University, Urumqi, 830052

✉ Corresponding author, licong0520@sina.com; Authors

This paper was first published in *Molecular Plant Breeding*, which redistributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#).

Abstract Zeolin gene (about 1 600 bp) and γ -zein gene (about 720 bp) were got by cutting from the middle vectors pMD18zeolin and pMD18zein respectively, and were linked to the expression vector pCAMBIA1302 in the same endonucleases digestion sites. The plant expression vector pCBzeolin and pCBzein were obtained. Plasmids pCBzeolin and pCBzein were transferred into *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404 by freeze-thaw method, and then were transformed into *Lotus corniculatus* mediated by stain LBA4404. After co-culture, selective differentiation and regeneration, resistant plants were obtained. Resistant plants were detected by PCR, RT-PCR. The results have proved that the γ -zein and zeolin genes have been transformed into the genome of *Lotus corniculatus* L., and expressed on nucleic acid level in the transgenic plants. Sulphur-containing amino acid of transgenic plants analysis showed that the content of sulphur-amino acid of transgenic zeolin plants was significantly higher than that of the content of the transgenic γ -zein plants and control plants ($P < 0.01$), but there was no significant difference between the transgenic γ -zein plants and control plants.

Keywords Sulphur-amino acid genes; Expression vector construction; *Lotus corniculatus* L.; Transformation

研究背景

含硫氨基酸在饲料植物中含量较少, 特别是半胱氨酸和蛋氨酸, 常成为第一限制性必需氨基酸。培育高含硫氨基酸的牧草品种是当前牧草品质改良的

研究热点之一。百脉根(*Lotus corniculatus* L.)是多年生优良豆科牧草之一, 但其蛋白质含硫氨基酸含量低(Mainieri et al., 2004)。因此, 利用一些高含硫氨基酸蛋白基因, 通过遗传工程手段来提高植物蛋白

质中含硫氨基酸水平具有十分重要的意义。

目前已经从多种作物中分离得到富硫氨基酸的蛋白及其编码基因, 如玉米(*Zea mays* L.)、水稻(*Oryza sativa* L.)、向日葵(*Helianthus annuus*)及豌豆(*Pisum sativum* L.)等。玉米醇溶蛋白(zein)是玉米种子中的主要贮藏蛋白质, 可分为 α -、 β -、 γ -和 δ -zein 等四种主要类型。其中 β -、 γ -和 δ -zein 富含蛋氨酸和半胱氨酸(Shewry and Casey, 1999)。 γ -zein 基因在模式植物拟南芥的叶片和根中可以稳定表达(Geli et al., 1994)。Bellucci 等(2000)通过添加内质网引导肽序列(KDEL)来提高 γ -zein 在转基因烟草中的累积。zein 基因也已在白三叶草(*Trifolium repens* L.)、紫花苜蓿(*Medicago sativa* L.)等牧草植物中成功表达(Sharma et al., 1998; Bellucci et al., 2002), 为增加牧草可食性组织的含硫氨基酸含量提供了途径, 而 zeolin 基因是菜豆球蛋白(phaseolin)基因与部分 γ -zein 基因构成的融合基因。本研究通过分子克隆技术, 构建了两个含硫氨基酸基因的植物表达载体, 并分别转化豆科模式植物百脉根验证所构建植物表达载体的正确性和可用性, 以期对豆科牧草品质改良奠定基础。

1 结果与分析

1.1 植物表达载体的构建

以质粒 pDHA 和 pROK.TG1LK 为模板, 分别扩增 zeolin 基因和 γ -zein 基因。PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳检测, 扩增得到片段与估计的片段大小符合(zeolin 基因约 1 600 bp, γ -zein 基因约 720 bp), 如图 1 所示。用试剂盒回收纯化目的片段, 连接到 pMD18-T 克隆载体上, 转化大肠杆菌 DH5 α 。从转化的平板上挑选白斑划线, 初步筛选出带有插入片段的克隆。随机挑选抗性克隆提取质粒 DNA, 进行酶切鉴定, 可以切出目的片段, 如图 2。用 *Nco* I 和 *Bgl* II 双酶切 pMD18zeolin 和 pMD18zein, 回收 zeolin 和 γ -zein 基因片段, 将其与 pCAMBIA1302 的大片段进行连接, 转化大肠杆菌 DH5 α 感受态, 命名为 pCBzeolin 和 pCBzein。经 *Nco* I 和 *Bgl* II 双酶切质粒 pCBzeolin 和 pCBzein 检测证明 zeolin 和 γ -zein 基因片段已经插入表达载体 pCAMBIA1302 (图 3A)。将鉴定好的菌液送往中国农业科学院重大科学工程开放实验室测序, 结果表明插入的目的基

因与 zeolin 和 γ -zein 基因序列一致。

采用冻融法将 pCBzeolin 和 pCBzein 导入农杆菌 LBA4404 感受态细胞。少量提取质粒 DNA, 进行 PCR 鉴定后(图 3B; 3C), 准备转化百脉根。

1.2 外源基因转化百脉根

百脉根子叶用 pCBzeolin/LBA4404 和 pCBzein/LBA4404 浸染, 共培养 3 d 后, 转置筛选培养基。40 d 后诱导分化出具有抗性的不定芽(图 4A), 抗性芽的平均诱导率为 3.2%, 对照(在 LBA4404 中浸泡过的百脉根叶盘)逐渐褪绿、白化, 不能诱导分化出不定

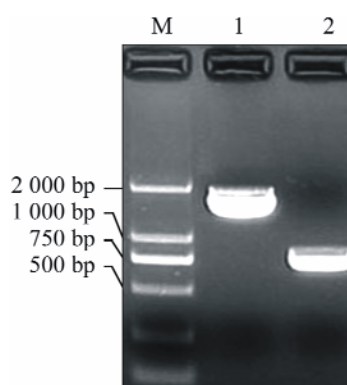


图 1 zeolin 和 γ -zein 基因的扩增

注: 1: zeolin 基因的扩增; 2: γ -zein 基因的扩增; M: DL2000; 以下同

Figure 1 Amplification of γ -zein and zeolin genes

Note: 1: Amplification of γ -zein gene; 2: Amplification of zeolin genes; M: DL2000; The same as below

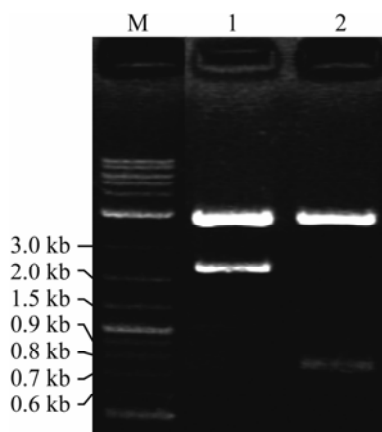


图 2 中间载体的酶切鉴定

注: 1: pMD18zeolin 的酶切鉴定; 2: pMD18zein 的酶切鉴定

Figure 2 Restriction analysis of the middle vectors

Note: 1: Restriction analysis of pMD18zeolin; 2: Restriction analysis of pMD18zein

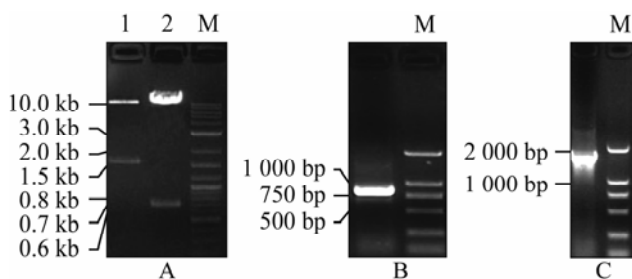


图3 重组质粒 pCBzeolin 和 pCBzein 酶切及转化农杆菌的鉴定
注: A: 重组质粒的酶切鉴定; 1: pCBzeolin 酶切鉴定; 2: pCBzein 酶切鉴定; M: 2-Log DNA Ladder; B: 农杆菌中质粒 pCBzein 的 PCR 鉴定; M: DL2000; C: 农杆菌中质粒 pCBzeolin 的 PCR 鉴定

Figure 3 Restriction analysis of recombinant plasmid pCBzeolin and pCBzein and PCR detection of plasmid DNA from transformed strain LBA4404

Note: A: Restriction analysis of recombinant plasmid; 1: Restriction analysis of pCBzeolin; 2: Restriction analysis of pCBzein; M: 2-Log DNA Ladder; B: PCR detection of pCBzein plasmid DNA in strain LBA4404; M: DL2000; C: PCR detection of pCBzeolin plasmid DNA in strain LBA4404

芽(图 4B), 说明选择基因潮霉素(*Hyg*)得到了正确表达并且显示了其应有的作用。将得到的抗性芽移至生根培养基(MSB+0.1 mg/L IBA+25 mg/L *Hyg*+200 mg/L Cef) (图 4C)。完整植株进行温室盆栽, 最终获得 9 株抗性再生植株, 且形态特征正常(图 4D)。

1.3 抗性植株的 PCR 检测

用 *zeolin* (P5, P6)和 γ -*zein* (P7, P8)基因的一对引物, 分别对转化植株及非转基因植株总 DNA 进行 PCR



图4 百脉根转化植株分化与再生

注: A: 筛选得到的不定芽; B: 在筛选培养基上未经处理的外植体; C: 再生的抗性苗; D: 移栽成活的抗性植株

Figure 4 Differentiation and regeneration of transformed *L. corniculatus*

Note: A: Buds on screened medium; B: Untreated explants on selected medium; C: The *Hyg*-resistant regeneration seeding; D: The survival *Hyg*-resistant regeneration plant transplanted to soil

扩增, 结果显示转化 *zeolin* 基因的再生植株均可扩增出 890 bp 左右的预期片段, 4 株转化 γ -*zein* 基因的抗性植株中有 3 株扩增出大小为 290 bp 左右的预期片段, 非转基因植株均未扩增出任何条带(图 5; 图 6), 初步说明目的基因已整合到百脉根基因组中。

1.4 抗性植株的 RT-PCR 检测

用 Trizol 提取转基因百脉根和非转基因百脉根的总 RNA 为模板, 进行反转录得到 cDNA。用其特异引物进行 PCR 检测, 转化 *zeolin* 基因百脉根 RNA 反转录产物可扩增出 890 bp 左右的特异性条带, 4 株转化 γ -*zein* 基因百脉根中有 3 株的 RNA 反转录产物扩增出 290 bp 左右的特异性条带, 非转基因百脉根的 RNA 反转录产物未扩增出相应条带(图 7; 图 8), 进一

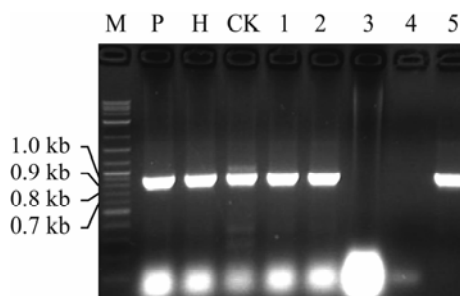


图5 *zeolin* 基因转化百脉根植株的 PCR 鉴定
注: P: 质粒 pCBzeolin; H: 空白对照; CK: 阴性对照(非转基因百脉根); 1~5: 转化植株; M: 2-Log DNA Ladder

Figure 5 PCR analysis of *zeolin* gene from transformed *L. corniculatus*

Note: P: Plasmid pCBzeolin; H: Blank control; CK: Negative control (non-transgenic *L. corniculatus*); 1~5: Transformed plants; M: 2-Log DNA Ladder

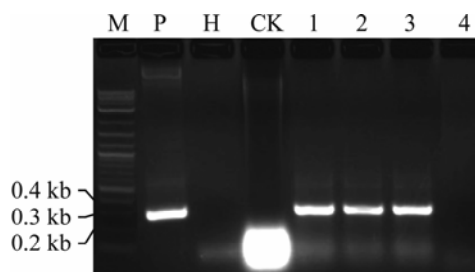


图6 γ -*zein* 基因转化百脉根植株的 PCR 鉴定
注: P: 质粒 pCBzein; H: 阳性对照; CK: 阴性对照(非转基因百脉根); 1~4: 转化植株; M: 2-Log DNA Ladder

Figure 6 PCR analysis of γ -*zein* gene from transformed *L. corniculatus*

Note: P: Plasmid pCBzein; H: Positive control; CK: Negative control (non-transgenic *L. corniculatus*); 1~4: Transformed plants; M: 2-Log DNA Ladder

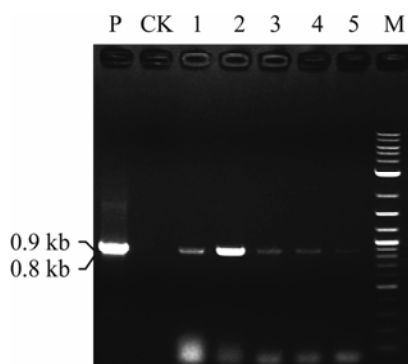


图 7 *zeolin* 基因转化百脉根植株的 RT-PCR 鉴定
注: P: 质粒 pCBzeolin; CK: 阴性对照(非转基因百脉根); 1~5: 转化植株; M: 2-Log DNA Ladder
Figure 7 RT-PCR analysis of *zeolin* gene from transformed *L. corniculatus*
Note: P: Plasmid pCBzeolin; CK: Negative control (non-transgenic *L. corniculatus*); 1~5: Transformed plants; M: 2-Log DNA Ladder

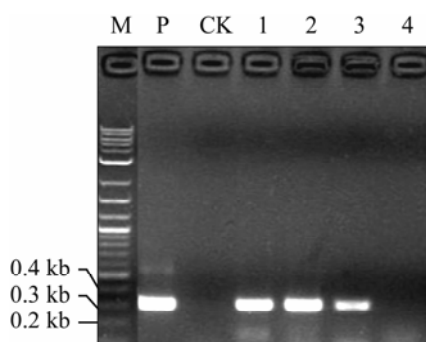


图 8 γ -zein 基因转化百脉根植株的 RT-PCR 鉴定
注: P: 质粒 pCBzein; CK: 阴性对照(非转基因百脉根); 1~4: 转化植株; M: 2-Log DNA Ladder
Figure 8 RT-PCR analysis of γ -zein gene from transformed *L. corniculatus*
Note: P: Plasmid pCBzein; CK: Negative control (non-transgenic *L. corniculatus* plant); 1~4: Transformed plants; M: 2-Log DNA Ladder

步证明外源基因 *zeolin* 和 γ -zein 已经整合到百脉根基因组中, 并可以在转基因百脉根中正常转录。

1.5 转基因植株含硫氨基酸含量分析

由表 1 可知, 转 *zeolin* 基因百脉根中的蛋氨酸含量极显著高于转 γ -zein 基因植株和非转基因植株中的含量($P<0.01$), 转 γ -zein 基因百脉根和非转基因植株中的蛋氨酸含量无显著差异; 转基因百脉根和非转基因植株中的胱氨酸含量无显著性差异($P<0.05$)。转 *zeolin* 基因百脉根中含硫氨基酸的总量极显著高于转 γ -zein 基因植株和非转基因植株中的含量($P<0.01$), 转 γ -zein 基因百脉根和非转基因植株中含硫氨基酸总量无显著差异, 表明 *zeolin* 基因能更有效地提高百脉根中含硫氨基酸的含量。

2 讨论

植物表达载体的构建, 由于目的片段的长度(约 1.6 kb 和 0.7 kb)以及其两端需要引入表达载体的酶切位点 *Nco* I 和 *Bgl* II, 应避免使用 *Taq* 酶, 因其在 PCR 产物 3'末端添加一个突出 A, 从而造成移码。本研究使用 *Ex Taq*, 具有 3'→5'校读功能(王涌鑫和李聪, 2008), 能很好地按照设计扩增出我们所需要的目的片段。测序结果表明, 即使采用了保真性较好的 *Ex Taq*, PCR 过程中仍发生错配。因此, 选择具有高度保真性的 PCR 聚合酶非常必要, 这与刘玲丽等(2004)的研究结果相一致。

豆科牧草百脉根易于培养和再生, 是研究外源基因转化、牧草品质改良的模式植物(王广立等, 1994)。本试验选择以百脉根作为转化受体, 将 pCBzeolin/

表1转基因百脉根中含硫氨基酸的含量比较

Table1 Comparison of the content of sulphur-containing amino acid of transgenic *L. corniculatus*

氨基酸(mg/g) Amino acid (mg/g)	转 <i>zeolin</i> 植株 Transgenic <i>zeolin</i> plants	转 γ -zein 植株 Transgenic γ -zein plants	CK
胱氨酸 Cystine	2.1±0.3abA	1.8±0.3aA	2.1±0.1aA
蛋氨酸 Methionine	4.3±0.1aA	3.9±0.2bB	3.8±0.2bB
总量 Total	6.4±0.3aA	5.7±0.4bB	5.9±0.3bB

注: 表中数据为平均值±标准差, 同一行内字母相同者表示无显著差异; a,b: $P<0.05$ 的显著水平; A,B: $P<0.01$ 的显著水平
Notes: Data (mean±SD) followed by the same letters in the same row show no significant difference; a,b: Significant at $P<0.05$; A,B: significant at $P<0.01$

LBA4404 和 pCBzein/LBA4404 导入百脉根基因组, 检验所构建的植物表达载体的正确性和可行性, 并为三叶草、紫花苜蓿等豆科牧草的转化和品质改良提供了技术支持。经过潮霉素的筛选培养, 诱导再生得到了抗性植株, 通过 PCR 检测证明了 γ -zein 基因和 zeolin 基因的存在。通过 RT-PCR 进一步证明了 γ -zein 基因和 zeolin 基因已分别整合到百脉根基因组中, 并在转录水平上得到了正确表达。

含硫氨基酸有蛋氨酸、半胱氨酸和胱氨酸三种。本研究中 γ -zein 基因和 zeolin 基因编码的蛋白富含蛋氨酸和半胱氨酸, 在样品的前处理过程中半胱氨酸易氧化转变成成为胱氨酸(刁其玉, 2007), 因此在含硫氨基酸分析中胱氨酸含量表示半胱氨酸和胱氨酸的总量。氨基酸结果分析表明, 在转 zeolin 基因植株中蛋氨酸含量及含硫氨基酸总量极显著地高于转 γ -zein 百脉根中的含量($P < 0.01$), 而转 γ -zein 百脉根与非转基因百脉根中含硫氨基酸含量无显著性差异, 表明与 zeolin 基因相比, γ -zein 基因在百脉根植株中的表达量低。有研究报道, 在转基因植物中各种为基因表达的时空专一性所必需的顺式序列和反式作用因子, 在单子叶植物和双子叶植物之间它们是不同的(马荣才和李季伦, 1993)。由此我们推测, γ -zein 基因在百脉根中的表达量可能与双子叶植物中的反式作用因子不能正确识别单子叶植物中的调控序列有关, 从而影响其表达。此外转基因是插入到核基因组中, 其表达量较低、且不太稳定, 目前转基因叶片中含硫氨基酸蛋白的最高表达量仅有 0.1%~0.8%, 还未达到实际的营养价值 1%~5% (Bellucci et al., 2000)。目前已有研究者将这些基因插入到叶绿体基因组中表达, 由于叶绿体基因组是母性遗传的, 并具有 DNA 的多拷贝数和特殊细胞结构等优点, 有可能大大地增加外源基因的表达量, 使转基因产物得到稳定高效地表达(杨宗岐等, 2007)。

3 材料与方法

3.1 植物材料

百脉根“里奥”(Lotus corniculatus L. “Leo”)由中国农业科学院北京畜牧兽医研究所牧草遗传育种实验室提供。

3.2 质粒及菌种

本实验中使用的大肠杆菌(*E. coli*)菌株为 DH5 α (天根公司), 克隆载体为 pMD18-T (TaKaRa 公司); 根癌农杆菌菌株 LBA4404、植物表达载体 pCAMBI-A1302 均由本实验室保存。质粒 pROK.TG1LK 和 pDHA 为意大利 CNR 的 Michele Bellucci 博士惠赠。

3.3 工具酶及主要试剂

各种限制性内切酶、LongAmp Taq 酶、T 逆转录酶、Oligo(dT)₁₅ Primer 及 DNA 片段回收试剂盒购自美国 Promega 公司, dNTP、DNase I、Ribonuclease Inhibitor 和 Ex Taq 为 TaKaRa 公司出品, 其余常规药品均为进口或国产分析纯级。

3.4 外植体培养

百脉根基本培养基是 MS 盐+B5 维生素(MSB 培养基) (Aoki et al., 2002), pH 5.8。

挑选饱满的百脉根种子, 用 75%酒精振荡 30 s, 无菌水冲洗 3 次, 再放入 0.1% (HgCl₂+SDS)溶液振荡灭菌 8~10min, 无菌水冲洗 4~6 次, 灭菌滤纸吸干水分, 接种于 MSB 培养基。取 7~10 d 的无菌苗子叶(3~5 mm²)作为外植体, 用于再生芽诱导。培养条件为光照周期 14 h/d, 光照强度 2 000 Lx, 培养温度(25 \pm 1) $^{\circ}$ C。

3.5 植物表达载体的构建

用碱裂解法制备模板 DNA, zeolin 基因引物: P1: 5'-GGTTTGACCATGGGCATGATGAGAGCAAGGG TTCCACTCC-3', Nco I; P2: 5'-TAAAAAATA GATCTACCATCTGGCACGGGCTTGGATGCGGC TGTTG-3', Bgl II。

γ -zein 基因引物: P3: 5'-ATAAAAATACCATGGGC ATGAGGGTGT TGCTCGTTGCCCT-3', Nco I; P4: 5'-CGCCTATCAGATCTACCATTAGCTCATC TTTCTACTAGTGTGGGG-3', Bgl II。

引物由 Invitrogen 公司合成。采用 50 μ L 反应体系, 含 PCR buffer 5 μ L, 0.2 mmol/L dNTP, 上下游引物各 0.4 μ mol/L, 模板 DNA 0.5 μ g, Ex Taq 1 U。PCR 扩增程序为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 61 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 3 个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 65 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 5 个循环; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 30 s, 72 $^{\circ}$ C 3 min, 30

个循环; 72°C 10 min。目的条带经胶回收纯化后, 连接到 pMD18-T 载体上, 转化感受态细胞 DH5 α 。重组质粒分别命名为 pMD18zeolin 和 pMD18zein。

将重组质粒 pMD18zeolin 和 pMD18zein 进行 *Nco* I 和 *Bgl* II 酶切, 回收目的片段(zeolin 基因和 γ -zein 基因), 插入到经 *Nco* I、*Bgl* II 酶切的植物表达载体 pCAMBIA1302 中, 转化感受态细胞 DH5 α , 提取质粒, 进行酶切鉴定, 并将经过鉴定的表达载体分别命名为 pCBzeolin 和 pCBzein (图 9)。

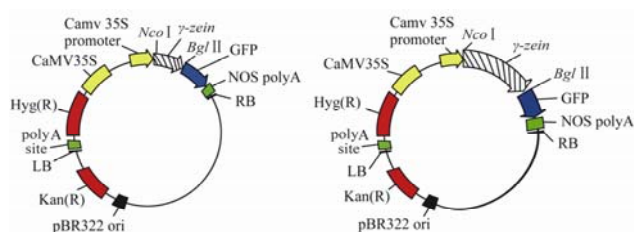


图 9 植物表达载体 pCBzein、pCBzeolin 的结构图

注: LB: 左边界; RB: 右边界

Figure 9 Schematic maps of plant expression vectors pCBzein and pCBzeolin

Note: LB: Lift T-border; RB: Right T-border

采用冻融法将 pCBzeolin 和 pCBzein 导入 LBA4404 菌株。提取质粒 DNA, 进行 PCR 扩增鉴定。

3.6 外源基因转化百脉根

挑取含有外源基因质粒的农杆菌 LBA4404 单菌落, 接种到 20 mL 含有链霉素(Str, 50 mg/L)和硫酸卡那霉素(Kan, 50 mg/L)的液体 LB 培养基中, 28°C 振荡培养过夜; 将培养物于 3 500~4 000 r/min 离心 10 min 收集菌体, 用 MSB 液体培养基重悬, 28°C 继续培养至 OD600 值为 0.4~0.6。将无菌苗子叶在农杆菌菌液中浸染 5~10 min 后, 置于无菌滤纸上吸去附着的菌液, 转入共培养基培养基, 25°C 暗培养 3 d, 接种至筛选培养基上进行抗性芽的诱导分化。

共培养基培养基: MSB+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+100 mg/L AS; 筛选培养基: MSB+1.0 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+50 mg/L Hyg+500 mg/L Cef。

3.7 转化植株的 PCR 检测

采用 CTAB 方法提取百脉根转化植株的基因组 DNA, 并以此 DNA 为模板。根据 zeolin 基因和 γ -zein 基因序列设计 PCR 引物, zeolin 基因引物: P5: 5'-AA

CTCTGACAACCTCCTGGAACACT-3'; P6: 5'-GTA GCCTTGATGGCAACTGG-3'。

γ -zein 基因引物: P7: 5'-CCACCATGCCACTACCC TACTCAACC-3'; P8: 5'-GGACTGGAGGACCAAG CCGAAGAT-3'。

以未转化的植株作为阴性对照, 以质粒 pCBzeolin 和 pCBzein 作为阳性对照。PCR 扩增反应程序为 95°C 5 min; 95°C 10 s, 53°C 30 s, 65°C 1 min, 45 个循环, 65°C 10 min。PCR 产物经 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离。

利用 TRIzol 提取百脉根转化植株和非转化植株的总 RNA, 进行反转录得到 cDNA。用 zeolin 基因(P5, P6)和 γ -zein 基因(P7, P8)引物进行 PCR 检测和电泳分析。逆转录反应体系为 25 μ L, 含模板 RNA 2 μ g, Oligo(dT)₁₅ Primer 1 μ L, M-MLV Reaction Buffer 5 μ L, dNTP (10 mmol/L) 5 μ L, Ribonuclease Inhibitor 1 μ L, M-MLV RT 200 U, 加 DEPC 水补足 25 μ L。

3.8 转基因植株含硫氨基酸含量的测定

在植株现蕾期, 取转基因百脉根植株和非转基因植株茎上部的茎叶, 烘干, 粉碎, 氧化水解, 上机测定, 含硫氨基酸分析(仪器为岛津 LC-10A 高效液相色谱)由农业部饲料工业中心进行。用 SAS9.0 进行数据分析(周霞等, 2006)。


致谢

本研究由国家十一五科技支撑计划(2006BAD01A19)和新疆农业大学草地资源与生态自治区重点实验室开放课题(XJDX0201-2005-03)资助。

参考文献

- Aoki T., Kamizawa A., and Ayabe S., 2002, Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of *Lotus japonicus* with reliable antibiotic selection, *Plant Cell Rep.*, 21(3): 238-243 doi:10.1007/s00299-002-0494-4
- Bellucci M., Alpini A., and Arcioni S., 2002, Zein accumulation in forage species (*Lotus corniculatus* and *Medicago sativa*) and co-expression of the γ -zein: KDEL and β -zein: KDEL polypeptides in tobacco leaf, *Plant Cell Rep.*, 20(9): 848-856
- Bellucci M., Alpini A., Paolocci F., and Cong L., and Arcioni S., 2000, Accumulation of maize γ -zein and γ -zein: KDEL to high levels in tobacco leaves and differential increase of

- BiP synthesis in transformants, *Theor. Appl. Genet.*, 101(5-6): 796-804 doi:10.1007/s001220051546
- Diao Q.Y., ed., 2007, *Amino acids in animal nutrition and feed*, Chemical Industry Press, Beijing, China, pp.123-125 (刁其玉, 编著, 2007, 动物氨基酸营养与饲料, 化学工业出版社, 中国, 北京, pp.123-125)
- Geli M.I., Torrent M., and Ludevid D., 1994, Two structural domains mediate two sequential events in γ -zein targeting: protein endoplasmic reticulum retention and protein body formation, *Plant Cell*, 6(12): 1911-1922 doi:10.1105/tpc.6.12.1911 PMID:12244234 doi:10.2307/3869917 PMID:12244234 PMCID:160571
- Liu L.L., Tan Y., Liu L.H., Zhang K., Shi Y., Xu S.F., Fang Y.Q., Duan X.M., Jiang Y.F., and Wang X.Q., 2004, Splicing overlap extension by PCR: a convenient method to obtain recombinant gene, *Jilin Daxue Xuebao (Journal of Jilin University (Medicine Edition))*, 30(5): 713-716 (刘玲丽, 谭岩, 刘力华, 张琨, 时阳, 许淑芬, 方艳秋, 段秀梅, 姜艳芳, 王晓祺, 2004, 获得重构基因的简捷方法—重叠延伸 PCR, 吉林大学学报(医学版), 30(5): 713-716)
- Ma R.C., and Li J.L., 1993, Gene engineering of seed storage protein, *Shengwu Gongcheng Jinzhan (Progress in Biotechnology)*, 13(4): 25-29 (马荣才, 李季伦, 1993, 种子储藏蛋白的基因工程, 生物工程进展, 13(4): 25-29)
- Mainieri D., Rossi M., Archinti M., Bellucci M., Marchis F.D., Vavassori S., Pompa A., Arcioni S., and Vitale A., 2004, *Zeolin*. A new recombinant storage protein constructed using maize γ -zein and bean phaseolin, *Plant Physiology*, 136: 3447-3456 doi:10.1104/pp.104.046409 PMID: 1550 2013 PMCID:527144
- Sharma S.B., Hancock K.R., Ealing P.M., and White D.W.R., 1998, Expression of a sulphur-rich maize seed storage protein, δ -zein, in white clover (*Trifolium repens*) to improve forage quality, *Molecular Breeding*, 4: 435-448 doi:10.1023/A:1009656002068
- Shewry P.R., and Casey R., eds., 1999, *Seed protein*, Kluwer Academic Publishers, Netherlands, pp.109-139
- Wang G.L., Qian Z.X., Liu B.X., Ma M., and Lin Z.P., 1994, Cloning and sequencing of the gene encoding 10 kD prolamins of rice and transformation in *Lotus corniculatus*, *Zhiwu Xuebao (Acta Botanica Sinica)*, 36(5): 351-357 (王广立, 潜忠兴, 刘宝先, 麻密, 林忠平, 1994, 水稻 10 kD 醇溶蛋白基因克隆、序列分析及对植物百脉根的转化, 植物学报, 36(5): 351-357)
- Wang Y.X., and Li C., 2008, Construction of plant expression vector containing *DREB1C* and *GFP* fusion gene, *Feizi Zhiwu Yuzhong (Molecular Plant Breeding)*, 6(3): 603-607 (王涌鑫, 李聪, 2008, *DREB1C-GFP* 融合基因植物表达载体的构建, 分子植物育种, 6(3): 603-607)
- Yang Z.Q., Li Y.N., Zhang Z.F., Wang Y., and Shen G.F., 2007, Site-specific integration vector construction of *E2* gene in Hog Cholera virus for chloroplast transformation of *Lotus corniculatus* genome, *Zhongguo Nongye Kexue (Scientia Agricultura Sinica)*, 40(11): 2648-2654 (杨宗岐, 李轶女, 张志芳, 王勇, 沈桂芳, 2007, 猪瘟疫病毒 E2 基因在百脉根叶绿体基因组中定点整合载体的构建, 中国农业科学, 40(11): 2648-2654)
- Zhou X., Cheng J.A., and Lou Y.G., 2006, Effects of transgenic *cry1Ab* rice on population development of the white-backed planthopper, *Sogatella furcifera* (Horvath) (Homoptera: Delphacidae), *Kunchong Xuebao (Acta Entomologica Sinica)*, 49(5): 786-791 (周霞, 程家安, 娄永根, 2006, 转 *cry1Ab* 基因水稻对非靶标昆虫白背飞虱种群增长的影响, 昆虫学报, 49(5): 786-791)



BioPublisher是一个致力于发表生物科学研究论文、开放取阅的出版平台

在BioPublisher上发表论文, 任何人都可以免费在线取阅您的论文

- ※同行评审, 论文接受严格的高质量的评审
- ※在线发表, 论文一经接受, 即刻在线发表
- ※开放取阅, 任何人都可免费取阅无限使用
- ※快捷搜索, 涵盖谷歌学术搜索与知名数据库
- ※论文版权, 作者拥有版权读者自动授权使用

在线投稿: <http://chinese.sophiapublisher.com>