

类黄酮 3', 5'羟基化酶基因的克隆及转化铁炮百合

徐碧玉 刘菊华 金志强*

(中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 热带作物生物技术国家重点实验室, 海口 571101)

摘要: 利用 RT-PCR 技术从矮牵牛的紫色花瓣中克隆了两个控制花色的类黄酮 3', 5'羟基化酶基因 *Hf 1* 和 *Hf 2*, 并构建了植物表达载体, 利用农杆菌介导法对铁炮百合进行了遗传转化, 获得了转基因植株。

关键词: 铁炮百合; 类黄酮 3', 5'羟基化酶基因; 转化

中图分类号: S 682.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2005) 06-1051-05

Cloning of Flavonoid-3', 5'-hydroxylase Gene and Its Transformation into Lily (*Lilium longiflorum*)

Xu Biyu, Liu Juhua, and Jin Zhiqiang*

(State Key Laboratory of Tropical Crops Biotechnology, Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

Abstract: Flavonoid-3', 5'-hydroxylase (F3', 5'H) is a key enzyme in the biosynthesis of anthocyanins, which can divert the production of delphinidin pigments. Two cDNAs designated as *Hf 1* and *Hf 2* encoding F3', 5'H were isolated from the purple flower of *Petunia hybrida* by using RT-PCR and also sequenced. A construct of *Hf 2* in a sense-orientation driven by CaMV 35S promoter was constructed and transformed into Lily (*Lilium longiflorum*) by using *Agrobacterium tumefaciens* mediated method. The transgenic plants were confirmed that *Hf 2* gene was integrated into lily genome by PCR and Southern blot.

Key words: *Lilium longiflorum*; Flavonoid-3', 5'-hydroxylase; Genetic transformation

植物花色是因为特定色素在花瓣细胞中的存在^[1,2]并受多种因子协同作用的结果。花瓣细胞中决定花瓣颜色的色素主要有 3 类, 即类黄酮 (flavonoids)、类胡萝卜素 (carotenoids) 和甜菜色素 (betalains)。类黄酮色素是植物 3 类色素中最常见的调控花色的色素, 而花色素苷是类黄酮中一类主要色素, 对其生物合成途径研究较多^[2,3]。花色素苷能控制花的红、蓝、紫和紫红等颜色。类黄酮 3', 5'羟基化酶 (flavonoid-3', 5'-hydroxylase; F3', 5'H) 属于细胞色素 P450 家族, 它决定二氢槲皮醇 B 环的羟基模式, 并最终决定产生花色的花色素结构, 是合成蓝色的花翠素 - 3 - 葡萄糖苷的关键酶。矮牵牛编码 F3', 5'H 的基因 *Hf 1* 和 *Hf 2*^[4]的表达均能使花色素生物合成途径趋向于产生蓝色的花翠素 - 3 - 葡萄糖苷, 从而使花趋于蓝色, 其中 *Hf 2* 控制花瓣中 F3', 5'H 的活性^[5,6]。

目前, 对花色素苷代谢途径进行基因操作已在多种植物上获得成功。1988 年首次利用反义 (antisense) 技术将苯基苯乙烯酮合成酶基因 (*CHS*) 反义 RNA 转入矮牵牛, *CHS* 的 mRNA 活性下降, 使花颜色变浅或成白色; 利用共抑制法将 *CHS* 的多个拷贝导入植物体, 可得到白色花或图案变化十分丰富的彩瓣花^[7]。玉米 *DFR* 基因导入矮牵牛 RL01 突变体后, 使二氢槲皮醇还原, 从而提供了天竺葵色素生物合成的中间产物, 使花色变为淡砖红色^[6]。Florigene 和 Suntory 两家公司通过转基因已经获得了蓝色康乃馨, 并在澳大利亚和日本上市^[8]。

我们从蓝色矮牵牛 (*Petunia hybrida*) 花瓣提取 RNA, 经 mRNA 纯化试剂盒纯化, 反转录 cDNA, 采用 RT-PCR 方法获得了编码 F3', 5'H 的 *Hf 1* 和 *Hf 2* 基因, 将 *Hf 2* 连接于 35S 启动子的下游, 构建

收稿日期: 2005 - 04 - 20; 修回日期: 2005 - 10 - 26

基金项目: 中国热带农业科学院重点基金资助项目

*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: zhiqiangjin@sohu.com)

了植物表达载体, 转化铁炮百合 (*Lilium longiflorum*), 获得经 PCR 筛选的转化植株。

1 材料与方法

1.1 材料

矮牵牛由中国热带农业科学院品质资源研究所提供。大肠杆菌 DH5⁺, 农杆菌菌株 GV3103 由本实验室保存。其它生化试剂购自北京华美生物试剂公司。

1.2 F3', 5'H基因的克隆和表达载体的构建

取蓝色矮牵牛花瓣, 于液氮中研磨, 采用异硫氢酸胍—苯酚—氯仿法提取 RNA^[9], 用 Promega 公司提供的 mRNA 纯化试剂盒, 按说明书纯化 mRNA。以 mRNA 为模板, oligo (dT) 为引物, 在 AMV 反转录酶的作用下合成 cDNA 第一链。

根据文献 [4] 报道的编码 F3', 5'H 的 *Hf* 1 和 *Hf* 2 基因序列, 设计合成两对特异引物, 在其 5' 端引物的上游加入 *Xba* 酶切位点。

Hf 1 基因的 5' 引物序列为: 5'-GTTCCTAGATGATGCTACTTACTGAGC-3'; 3' 引物为: 5'-TAGCTATGGTACA TAAACA TCCAA TTGTAA -3'。*Hf* 2 基因的 5' 引物序列为: 5'-GTTCCTAGATGGTGC-TACTTAGTGAGCTTGCTGCA-3'; 3' 引物为: 5'-GTTTCAA GCTAAA GGTGCA TAAACA TC-3'。以 cDNA 第一链为模板, 进行 PCR 扩增。反应条件为 94 5 min, 94 1 min, 56 45 s, 72 1 min; 72 10 min, 共 35 个循环。

用 *Xba* 和 *Sac* 双酶切载体 pHF2, 用相同的酶双酶切 pB II21 载体, 分别回收目的片段和载体片段, 用 T4DNA 连接酶连接载体和目的基因片段, 获得植物表达载体 pBHF2。

1.3 转化

1.3.1 外植体处理 挖取铁炮百合鳞茎, 以新鲜鳞片作为外植体, 在流水中冲洗 30 min, 随后在超净工作台上, 用 75% 酒精浸泡 30 s, 无菌水冲洗 3 次, 再用 20% 次氯酸钠浸泡 20 min, 无菌水冲洗 3~5 次, 用灭菌滤纸吸干水分备用。

1.3.2 农杆菌浸染 挑取经转化含有目的基因 (pBHF2) 的单菌落, 在 YEP 液体培养基中, 28℃ 摇至 OD₂₆₀ 为 0.5 左右, 即可浸染外植体, 浸染时间 5 min。用灭菌的滤纸吸干外植体表面的菌液, 放入再生培养基中诱导愈伤组织及分化出苗。

1.3.3 转化植株 PCR 检测 转化植株总 DNA 的提取参照傅荣昭的方法^[10], 用 *Hf* 2 基因的特异引物进行 PCR 反应, 反应条件同上。

1.3.4 转化植株 Southern blot 检测 取转化铁炮百合植株叶片提取总 DNA^[10]。DNA 用内切酶 *Eco*R 消化, 1% 琼脂糖电泳检测, 酶切产物转膜, 杂交^[11]。

2 结果与分析

2.1 矮牵牛 F3', 5'H基因的克隆及序列分析

用 mRNA 反转录的 cDNA 第一链为模板, 在 PE2400PCR 仪进行 RT-PCR, 扩增出两条特异性条带。*Hf* 1 和 *Hf* 2 大小分别与 DNA 标准分子量中的 1.5 kb 和 1.6 kb 相当, 与文献报道的相一致 (图 1)。

PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳分离后, 用 DNA 回收试剂盒回收, 回收产物与 pGEM-T Easy Vector 连接, 通过蓝白筛选, 挑取独立的白菌落, 小量法提取质粒 DNA, 通过酶切鉴定筛选出阳性重组子。阳性重组子由上海生工生物工程公司测

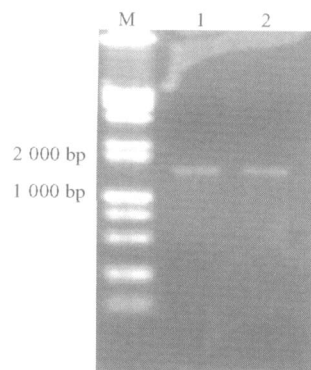


图 1 *Hf* 1、*Hf* 2 的 PCR 扩增图

Fig 1 Electrophoresis of PCR amplification products

M: DL 2 000 ~ 15 000 marker (bp); 1: *Hf* 1; 2: *Hf* 2

序, 序列分析结果表明, *Hf* 1 长度为 1 514 bp, 登陆 NCB 采用 BLASTn 比较, 与 NCB 登录的 cDNA 序列 (Z22545) 同源率为 100%, 编码 504 个氨基酸。*Hf* 2 长度为 1 530 bp, 与 NCB 登录的 cDNA 序列 (Z22544) 同源率均为 94% (图 2), 编码 510 个氨基酸。

```

1 ATGGTGCTACTTAGTGAGCTTGCTGCAGCAACTTCAATCTTTCTAATAGCACATAATCATTTCAACTCTTATTTT
2 ATGGTGCTACTTAGTGAGCTTGCTGCAGCAACTTCAATCTTTCTAACAACACATATCTTCATTTCAACTCTTCTTTT
AAAACTACCGCCGGGCATCTACCGCCGGGCCAAGAGGGTGGCCGGTGATCGGAGCACTTCCACTTTTAGGAGCCA
TATAACTAACGGCCGGGCTCTCCGCCAGGCCAAGAGGGTGGCCGGTGATCGGAGCACTTCCACTTTTAGGAGCCA
TGCCACATGTTTCCTTAGCTAAAAATGGCAAAAAATATGGAGCAATCATGTATCTCAAGTTGGAACATGTGGCATGG
TGCCACATGTTTCCTTAGCTAAAAATGGCAAAAAATATGGAGCAATCATGTATCTCAAGTTGGAACATGTGGCATGG
CAGTTGCTTCTACCCCTGATGCTGCTAAAGCATTCTGAAAAACCTTGATATCGACTTCTCCAATCGTCCACCTAATG
TAGTTGCTTCTACCCCTGATGCTGCTAAAGCGTTCTGAAAAACCTTGATCTCAACTTCTCCAATCGTCCACCTAATG
CAGGTGCCACTCACTTAGCTTATAATGCTCAAGACATGGTTTTTGCACATTATGGACCAGATGGAAGTTGCTAAGGA
CAGGTGCCACCTTAGCTTATGGTCTCAAGACATGGTTTTTGCACATTATGGACCAAGATGGAAGTTGCTAAGGA
AATTAAGCAACTTGATATGCTAGGGGAAAAAGCCTTAGAGAAATTGGGCAAAATGTTCTGCGCAATGAGCTAGGGACA
AATTAAGCAACTTACATATGCTAGGGGAAAGCCTTAGAGAAATTGGGCAAAATGTTCTGCGCAATGAGCTAGGACACA
TGCTAAGATCAATGTCGATATGAGTCGAGAGGGCAGAGGGTTGTTGGTGGCGGAGATGTTGACATTTGCCATGGCCA
TGCTAAATCGATGTTTGATATGAGCAGAGAGGGGAGAGAGTTGTTGGTGGCGGAGATGTTGACATTTGCCATGGCCA
ATATGATCGGACAAAGTGATGCTAAGCAAAAGAGTATTTGTAGATAAAGGTGTTGAGGTAAATGAATTTAAGGACATGG
ATATGATCGGACAGGTGATCTTAGCAAAAGAGTATTTGTAAATAAAGGTGTTGAGGTAAATGAATTTAAGGACATGG
TTGTAGAGTTAATGACAAATAGCAGGGTATTTCAACATTGGTGATTTTATTCCTTGTGTAGCTTGGATGGATTTACAAGG
TGGTAGAGTTAATGACAAAGCAGGGTATTTCAACATTGGTGATTTTATTCCTTGTGTAGCTTGGATGGATTTACAAGG
GATAGAAAAACGAATGAACGTTTACATAAGAAGTTTGATGCTTTATTGACAAAGATGTTTGATGAACACAAAGCAACT
GATAGAAAAAGGAATGAACGTTTACATAAGAAGTTTGATGCTTTATTGACAAAGATGTTTGATGAACACAAAGCAACT
ACCTATGAACGTAAGGGGAAACAGATTTTCTTGATGTTGTTATGGAATAAGGGGCAATCTGAAAGGAGAAAGACTCA
AGCTATGAACGTAAGGGGAAACAGATTTTCTTGATGTTGTTATGGAATAAGGGGCAATCTGAAAGGAGAAAGGCTCA
GTACAACCAACATCAAAAGCACTTTTGCTGAATTTGTTACAGCTGGTACGACACTTCTCTAGTGCAATAGAATGGGCTT
GTACAACCAACATCAAAAGCACTTTTGCTGAATTTGTTACAGCTGGTACGACACTTCTCTAGTGCAATAGAATGGGCTT
ACGCAGAAATGATGAAGAACCCTGCCATTTTAAAAAGCACAAGCAGAAATGGATCAAGTCATTGGAAGAAATAGGCGTT
TTGGCAAGATGATGAAGAACCCTGCCATTTTAAAAAGCACAAGCAGAAATGGATCAAGTCATTGGAAGAAATAGGCGTC
TACTCGAATCCGATATCCCAATCTCCCTTACCTCCGAGCAATTTGCAAAAGAAACATTTGCAAAACACCCCTTCTACACCAT
TGCTCGAATCCGATATCCCAATCTCCCTTACCTCCGAGCAATTTGCAAAAGAAACATTTGCAAAACACCCCTTCTACACCAT
TAAATCTTCCTAGGATCTCGAAGCAACCATGCATAGTCGATGGTTATTACATACCAAAAAACACTAGGCTTAGTGTTAACA
TAAATCTCCCTAGGATCTCGAAGCAACCATGCATAGTCGATGGTTATTACATACCAAAAAACACTAGGCTTAGTGTTAACA
TATGGGCAATTGGAAGAGATCCCAAGTTTGGGAAAAATCCACTAGAGTTTAAATCCCGAAAGATTCTTGAGTGGAAAGAACT
TATGGGCAATTGGAAGAGATCCCAAGTTTGGGAGAACCACTAGAGTTTATCCTGAAAGGTTCTTGAGTGGAAAGAACT
CCAAGATTGATCCTCGAGGGAACGATTTTGAATTGATACCATTTGGTGTGGACGAAGAATTTGTGCAGGAACAAGAATGG
CGAAGATTGATCCTCGAGGGAACGATTTTGAATTGATACCATTTGGTGTGGACGAAGAATTTGTGCAGGACAAGAATGG
GAATTGTAATGGTGGAAATATATAGGAACCTTGGTTTCATTCAATTTGATTGGAAATTACCAAGTGAAGTTATTGAGTTGA
GAATCGTAATGGTGGAAATATATAGGAACCTTGGTTCATTCAATTTGATTGGAAATTACCAAGTGAAGTTATTGAGTTGA
ATATGGAAGAAGCTTTTGGCTTAGCTTTGCAGAAAGCTGTCCCTCTTGAAGCTATGGTTACTCCAAGGTTACAATGGATG
ATATGGAAGAAGCTTTTGGATTAGCTTTGCAGAAAGCTGTCCCTCTTGAAGCTATGGTTACTCCAAGGCTGCCTATTGATG
TTTATGCACCTTTAGCTTGAAC
TTTTATGCACCTTTAGCTTGAAC
TTTTATGCACCTTTAGCTTGAAC

```

图 2 *Hf* 2 序列测定结果 (1) 与 Z22544 序列 (2) 比较

1: 本文克隆序列; 2: Z22544 序列

Fig. 2 *Hf* 2 gene sequencing result (1) and comparison with Z22544 (2)

2.2 植物表达载体 pBHF2 构建

构建的含有目的基因片段的植物表达载体 pBHF2 如图 3 所示。经酶切鉴定表明, *Hf* 2 基因已正方向插入到植物表达载体的启动子下游 (图 4)。



图 3 植物表达载体 pBHF2构建示意图

Fig 3 Signal figure of the construction of plant expression vector pBHF2

2.3 转化

2.3.1 转化铁炮百合出愈、分化及生根 经农杆菌浸染的铁炮百合鳞茎在 MS+NAA 1.0 mg/L +30%蔗糖的培养基上培养 3 周长出愈伤组织, 5 周开始分化出苗。苗高 1 cm 左右时将其转入 MS+NAA 2 mg/L +30%蔗糖的培养基上培养 3~4 周开始生根。本研究初步获得 57 株抗性筛选植株, 并将其移栽大田进一步筛选及鉴定性状 (图 5)。

2.3.2 PCR 及 Southern 检测 转化植株 PCR 检

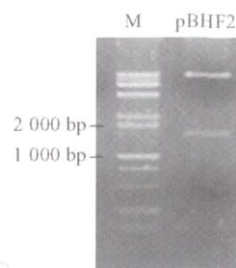


图 4 植物表达载体 pBHF2-Xba、Sac 双酶切鉴定

Fig 4 Identification of plant expression vector pBHF2 with Xba, Sac digestion

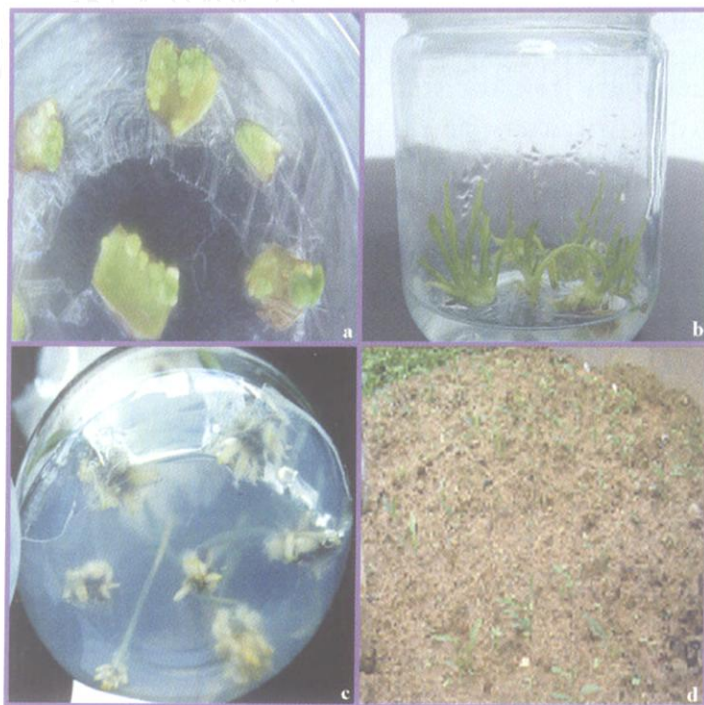


图 5 转化铁炮百合出愈 (a)、分化 (b)、生根 (c) 及大田移栽 (d)

Fig 5 Calli formation (a), differentiation (b), root formation of transformed lily (c) and transferred them into field (d)

测显示, 57 株抗性植株中 23 株为阳性, 阳性植株又经 Southern blotting, 结果显示有 16 株有杂交信号, 确定为转基因植株, 图 6 显示为部分植株 Southern 杂交结果。

3 讨论

蓝色在花卉和果实中属于稀有色系, 尤其是切花用百合、香石竹、月季、玫瑰等都缺乏蓝色

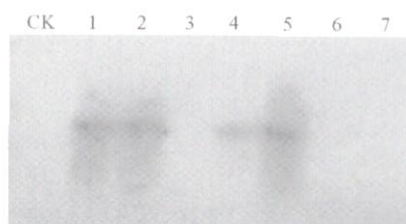


图 6 转化植株 Southern blotting

CK: 阴性对照; 1~7: 转基因植株。

Fig 6 Southern blotting of transformed plantlets

CK: Negative control; 1 - 7: Transformed plantlets

花系。我们克隆了可影响蓝色形成的关键酶基因, 希望通过转基因培育出蓝色花卉, 不仅可增加花卉品种, 而且其经济价值亦会有极大的提高。百合为重要的切花花卉, 近几年通过杂交育种培育了一些新品种, 但蓝色百合的培育还未见报道。我们通过转基因技术初步获得数十株铁炮百合转化植株, 目前正在大田移栽, 以进一步确定其性状。

参考文献:

- 1 赵云鹏, 陈发棣, 郭维明. 观赏植物花色基因工程研究进展. 植物学通报, 2003, 20 (1): 51~58
Zhao Y P, Chen F D, Guo W M. Advances in genetic engineering of flower color of ornamental plants. Chinese Bulletin of Botany, 2003, 20 (1): 51~58 (in Chinese)
- 2 姜卫兵, 庄 猛, 韩浩章, 戴美松, 花国平. 彩叶植物呈色机理及光合特性研究进展. 园艺学报, 2005, 32 (2): 352~358
Jiang W B, Zhuang M, Han H Z, Dai M S, Hua G P. Progress on color emerging mechanism and photosynthetic characteristics of colored-leaf plants. Acta Horticulturae Sinica, 2005, 32 (2): 352~358 (in Chinese)
- 3 Forkmann G. Flavonoids as flower pigments: the formation of the natural spectrum and its extension by genetic engineering. Plant Breed, 1991, 106: 1~26
- 4 Holton T A, Brugliera F, Lester D R, Tanaka Y, Hyland C D, Menting J G T, Lu C Y, Farcy E, Stevenson T W, Comish E C. Cloning and expression of cytochrome P450 gene controlling flower colour. Nature, 1993, 366: 276~279
- 5 Stotz G, Devlaming P, Wierong H. Genetic and biochemical studies on flavonoid-3-hydroxylation in flowers of *Petunia hybrida*. Theor Appl, 1985, 70: 300~305
- 6 Meyer P, Heidmann I, Forkmann G. A new *Petunia* flower colour generated by transformation of a mutant with a maize gene. Nature, 1987, 330 (6149): 677~678
- 7 Vanderkrol A R, Lenting P E, Veenstra J. An antisense chalcone synthase gene in transgenic plants inhibits flower pigmentation. Nature, 1988, 333: 866~869
- 8 Tanaka Y, Tsuda S, Kusumi T. Metabolic engineering to modify flower color. Plant Cell physiol, 1998, 39: 1119~1126
- 9 Chomczynski P, Sacchi N. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal Biochem, 1987, 162: 156~159
- 10 傅荣昭, 孙勇如, 贾世荣. 植物遗传转化技术手册. 北京: 中国科学技术出版社, 1994. 134~143
Fu S Z, Sun Y R, Jia S R. Plant genetic transformation. Beijing: Chinese Science and Technology Press, 1994. 134~143 (in Chinese)
- 11 J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔著. 分子克隆实验指南. 第3版. 北京: 科学出版社, 2002. 474~569
Sambrook J, Dussell D W. Molecular cloning: a laboratory manual. 3rd ed. Beijing: Science Press, 2002. 474~569 (in Chinese)

新书推荐

《新编拉汉英植物名称》 王宗训主编

本书收集具有经济价值和学术价值和学术价值或通俗常见的种子植物、蕨类植物、苔藓植物、藻类植物、真菌、地衣名称约 55 800 条。每种植物名称有拉、汉、英三种文字对照, 按拉丁文字母顺序排列。书后附有英文俗名和汉名索引。

本书可供农、林、医药、环境保护等学科的管理机构、科研单位、大学中的科技人员以及生物工程、植物检疫、花卉园艺、新闻出版、旅游、外贸等专业的技术人员使用, 也是各类图书馆典藏的重要工具书。定价: 185 元 (含邮费)。

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所 《园艺学报》编辑部, 邮编 100081。