

长期培养的黄瓜毛状根中外源基因遗传稳定性分析

曹庆丰, 向太和*, 孟莎莎, 王沙沙, 陆文怡

(杭州师范大学生命与环境科学学院, 杭州 310036)

摘要: 对在固体培养基上培养 3 年的黄瓜转 *gfp* 基因毛状根进行 *gfp* 和 *rol* 位点系列基因的 PCR 扩增、*gfp* 的荧光定量 PCR、Western blot 杂交以及荧光观察分析。结果显示, 由组成型启动子 35S 驱动的 *gfp* 在转录水平上能正常表达, 而且能够翻译出编码蛋白; 此外, 培养 3 年后的毛状根, 能扩增出与毛状根形态构成有关的 *rol* 系列基因。本研究结果表明长期培养的毛状根能保持其遗传稳定性, 这为利用毛状根长期工厂化生产外源基因表达的蛋白产物和药用植物的活性成分提供了理论依据。

关键词: 黄瓜; 毛状根; 基因; 表达; 稳定性

中图分类号: S 642.2

文献标识码: A

文章编号: 0513-353X (2012) 08-1583-06

Genetic Stability Analysis of Exogenous Gene in Long-term Cultured Cucumber Hairy Roots

CAO Qing-feng, XIANG Tai-he*, MENG Sha-sha, WANG Sha-sha, and LU Wen-yi

(College of Life and Environment Sciences, Hangzhou Normal University, Hangzhou 310036, China)

Abstract: In this study, it was investigated that the genetic stability of *gfp* gene in the cucumber hairy roots that had been cultured on solid medium for 3 years. The analysis of PCR for *gfp* and *rol* (root loci) genes, qRT-PCR for *gfp* gene and Western blot for GFP protein were conducted, while green fluorescence was checked on hairy roots. The results showed that the expression of *gfp* driven by constitutive promoter 35S was relatively stable at both mRNA and protein levels. Furthermore, the morphology-related *rol* genes of the hairy roots after 3-year culturing can be amplified. Overall, this study provided important experimental supports for using hairy roots in the long-term industrial production of proteins and active ingredients of medicinal plants.

Key words: cucumber; *Cucumis sativus*; hairy root; gene; expression; stability

转基因毛状根 (hairy root) 是由发根农杆菌 (*Agrobacterium rhizogenes*) 侵染植物细胞诱导形成的, 它是发根农杆菌所含 Ri 质粒的 T-DNA 片段在植物细胞基因组中插入、整合并表达的结果 (Tepfer & Casse-Delbart, 1987)。毛状根在无植物生长调节剂的培养基上表现出自主生长、生长快速、无向地性 (plagiotropic) 等显著特征, 其在适宜条件下可以再生出完整植株, 由于它起源

收稿日期: 2012-05-02; 修回日期: 2012-06-26

基金项目: 浙江省自然科学基金项目 (Y3080184); 杭州市科技发展计划项目 (20110232B10)

* 通信作者 Author for correspondence (E-mail: xthen@163.com)

于单细胞因此不存在嵌合体。含有外源基因的毛状根可直接用于外源基因功能的分析,也可直接作为植物根部线虫等病虫害的宿主,还可以作为生物反应器,从中分离获得外源基因表达的蛋白产物以及生产药用植物的活性成分。利用烟草、马铃薯和矮牵牛转基因毛状根可以获得有医用价值的抗原,利用人参的毛状根能有效地合成人参皂甙(赵寿经等, 2004; Chang et al., 2005; Guillon et al., 2006; Georgiev et al., 2007; Wubben et al., 2009; de Guzman et al., 2011)。当毛状根用于生产外源基因表达的蛋白产物和药用植物的活性成分,或作为根部病虫害的宿主时,都需要长时间周期性培养繁殖, Peebles 等(2007, 2009)报道转 *gfp* 的长春花(*Catharanthus roseus*)毛状根培养 5 年后,荧光定量 PCR 仍然能检测到 *gfp* 的表达信号。本研究中以长期继代培养的黄瓜毛状根为材料,对其长期培养后外源基因的遗传稳定性进行了分析。

1 材料与方法

1.1 试验材料

转绿色荧光蛋白基因(*gfp*)毛状根是本实验室在 2008 年 10 月由黄瓜碱型发根农杆菌 K599(带有内源质粒 pRi2659 和外源质粒 pBIN-35S-GFP)侵染黄瓜品种‘NC-46’子叶诱导获得(徐纪明和向太和, 2008; 孟莎莎等, 2010)。含 *gfp* 质粒载体 pBIN-35S-GFP 图谱见图 1。同时,利用野生型发根农杆菌 K599(只带有内源质粒 pRi2659)侵染黄瓜品种‘NC-46’诱导获得野生型的毛状根,以野生型毛状根和非转基因实生苗的根作为对照材料。

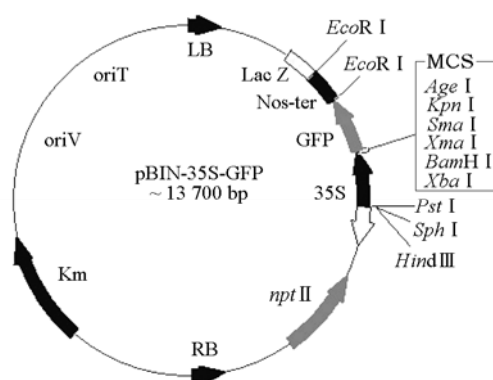


图 1 pBIN-35S-GFP 图谱

Fig. 1 Diagram of the vector pBIN-35S-GFP

1.2 毛状根的长期继代培养

对获得的毛状根,每隔 30 d 左右取生长旺盛的毛状根顶端 3~5 cm 转入新的培养基进行继代,培养基为不含任何植物激素的 MS(0) 固体培养基,培养温度为 $(22 \pm 2)^\circ\text{C}$, 散射光。

1.3 *gfp* 和 *rol* (root loci) 位点系列基因的 PCR 扩增

在 2011 年 10 月,取继代培养 3 年以上的毛状根独立根系以及野生型的毛状根独立根系和实生苗的根,利用上海 Sangon 公司柱式植物基因组提取试剂盒提取基因组 DNA。根据 *gfp* 序列(GenBank 登记号 U17997)设计 PCR 引物,进行 PCR 扩增,检测目标基因;同时,根据质粒 pRi2659 上 T-DNA

所含有的 *rolA*、*rolB* 和 *rolC* 序列 (GenBank 登记号 EF433766) 设计 PCR 引物, 进行 PCR 扩增, 检测与毛状根形态建成有关的基因。引物序列见表 1, 引物由上海 Sangon 公司合成。

PCR 扩增反应体积为 35 μL , 其中包括 0.2 μL 10 mmol $\cdot\text{L}^{-1}$ dNTP 混合物, 2 μL 10 pmol $\cdot\text{L}^{-1}$ PCR 引物, 2 U *Taq* DNA 聚合酶和约 0.2 μg DNA。用美国 ABI 公司 PE9700 型 DNA 扩增仪进行扩增反应。PCR 反应程序为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min; 94 $^{\circ}\text{C}$ 变性 60 s, 55 $^{\circ}\text{C}$ 退火 60 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 90 s, 共 30 个循环; 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存备用。

扩增产物在 1.2% 的琼脂糖凝胶上电泳 1.5 h (5 V $\cdot\text{cm}^{-1}$), 溴化乙锭 (EtBr) 染色, 用美国 Bio/Rad 凝胶成像系统观察并拍照记录。

表 1 对毛状根进行 PCR 扩增使用的引物
Table 1 PCR primers used in hairy root identification

引物名称 Primer name	引物序列 (5'→3') Primer sequences (5'→3')	PCR 产物长度/bp Length of PCR products
GFP-P1	GTCAGTGGAGAGGGTGAAGG	538
GFP-P2	AAAGGGCAGATTGTGTGGAC	
<i>rolA</i> -P1	GCTCGTTGTCTCCGACCTAT	215
<i>rolA</i> -P2	GGTCTGAATATTCCGGTCCA	
<i>rolB</i> -P1	GCCAGCATTTTGGTGAAC	703
<i>rolB</i> -P2	GGCACTGAACCTGCCGTAT	
<i>rolC</i> -P1	ATGGCGGAATTTGACCTATG	433
<i>rolC</i> -P2	TTAGTTCCATCTGCCCATCC	

1.4 *gfp* 的荧光定量 PCR 分析

用 RNA 提取试剂盒 (TaKaRa 公司) 根据操作说明书提取毛状根总 RNA; 用 Fermentas 公司试剂盒 RevertAidTM First Strand cDNA Synthesis Kit 进行逆转录, 按照操作说明进行; 用 SYBR Green Realtime PCR Master Mix (TaKaRa 公司) 进行荧光定量 PCR (qRT-PCR) 扩增。根据黄瓜 *actin* 序列 (GenBank 登记号 DQ115883) 设计引物 *actin*-P1 (5'-TTGAACCACCACTGAGGACA-3') 和 *actin*-P2 (5'-GGAGCTGAGAGATTCCGTTG-3'), 扩增长度为 160 bp, 其扩增结果作为内参。根据 *gfp* 序列 (GenBank 登记号 U17997) 设计引物 *gfp*-qP1 (5'-GGTGATGCAACATACGGA-3') 和 *gfp*-qP2 (5'-TACATAACCTTCGGGCATGG-3'), 扩增长度为 177 bp, 进行 *gfp* 的定量分析, 用 Strategene 公司 MX3000P 型荧光定量 PCR 仪进行扩增。荧光定量 PCR 条件是起始 95 $^{\circ}\text{C}$ 2 min; 随后 95 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 59 $^{\circ}\text{C}$ 30 s, 72 $^{\circ}\text{C}$ 20 s, 进行 40 个循环, 结束后 4 $^{\circ}\text{C}$ 保存。参考 Livak 和 Schmittgen (2001) 的方法计算 *gfp* 相对表达量, 即: 相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$, 其中 CT 为样品管的荧光信号达到某一固定阈值的 PCR 反应循环数。

1.5 Western blot 杂交以及荧光观察

利用 Roche 公司蛋白抽提试剂盒抽提毛状根总蛋白质, 用 Bradford 法进行蛋白定量, 配制 15% 的分离胶和 5% 的浓缩胶, 调节各泳道总蛋白上样量均为 12 μg , 按常规方法进行 SDS-PAGE 变性电泳, 利用湿式电转膜法将蛋白印迹在 PVDF 膜上。依次经 5% 脱脂牛奶封闭, 加 1:1000 兔源抗 GFP 抗体或肌动蛋白 (广谱) Actin 抗体作为内参对照 (一抗, 美国 Cell Singal Technology 公司) 以及 1:500 HRP-羊抗兔 IgG (二抗), 杂交结果进行 X-film 曝光显色。

用蔡氏 (Zeiss) 多功能显微镜 (型号 Axio imager) 在蓝色激发光下 (滤光片 FITC) 对毛状根进行荧光观察, 在可见光下进行对比形态观察, 并拍照记录。

2 结果与分析

2.1 长期培养的毛状根中 *gfp* 和 *rol* 系列基因的 PCR 扩增结果

取继代培养 3 年的毛状根 3 个独立根系 (编号为 L1、L2 和 L3) 进行 *gfp* 以及 *rolA*、*rolB* 和 *rolC* 的扩增, 结果扩增出预期大小约 540、220、700 和 430 bp 的片段 (图 2, A、B、C 和 D); 野生型的毛状根能扩增出 *rolA*、*rolB* 和 *rolC* 片段, 但无 *gfp* 片段; 实生苗的根未扩增出任何条带。

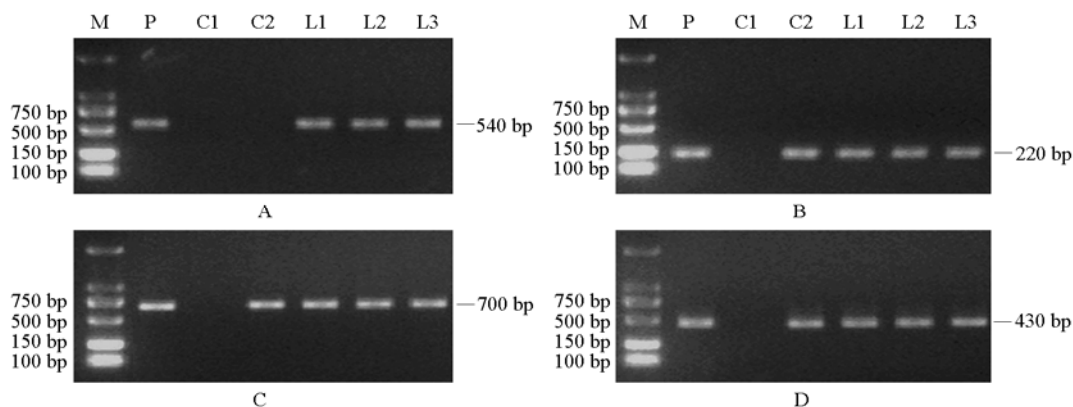


图 2 继代培养 3 年的毛状根中 *gfp* (A)、*rolA* (B)、*rolB* (C) 和 *rolC* (D) 基因的 PCR 扩增结果

M: DS2000 DNA 标准分子量; P: 质粒 pBIN-35S-GFP/pRi2659; C1: 非转基因实生苗根;

C2: 野生型毛状根; L1、L2、L3: 毛状根根系。

Fig. 2 PCR amplification results of *gfp* (A), *rolA* (B), *rolB* (C) and *rolC* (D) genes in hairy roots subcultured 3 years

M: DS2000 DNA molecular marker; P: Plasmid pBIN-35S-GFP/pRi2659; C1: Non-transgenic root;

C2: Wild-type hairy root; L1, L2, L3: Hairy root lines.

2.2 长期培养的毛状根中 *gfp* 的表达结果

荧光定量 PCR 分析结果显示, 转 *gfp* 的 3 个根系能检测到 *gfp* 的转录表达, 表达强度稍有差异; 1 个实生苗的根和 1 个野生型毛状根均没有检测到 *gfp* 的表达信号 (图 3)。

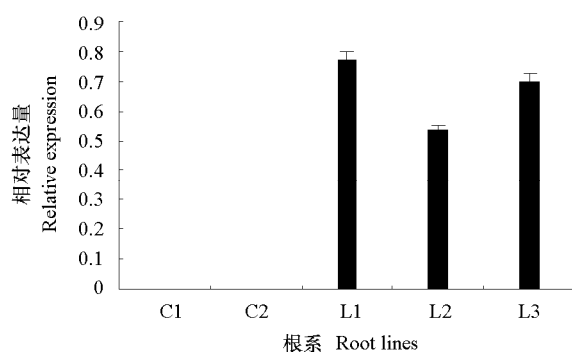


图 3 继代培养 3 年的毛状根中外源基因 *gfp* 荧光定量 PCR 分析

C1: 非转基因实生苗根; C2: 野生型毛状根; L1、L2、L3: 毛状根根系。

Fig. 3 qRT-PCR analysis of *gfp* gene in hairy roots subcultured 3 years

C1: Non-transgenic root; C2: Wild-type hairy root; L1, L2, L3: Hairy root lines.

Western blot 结果显示, 转 *gfp* 的 3 个毛状根根系中杂交出预期大小约 26 kD 的蛋白质条带 (图 4), 实生苗的根和野生型毛状根未见条带, 而 5 个样本均能杂交出 Actin 内参蛋白质条带。在荧光显微镜下观察, 转 *gfp* 的毛状根能发出强烈的绿色荧光 (图 5), 表明 *gfp* 在毛状根中能正常编码绿色荧光蛋白。

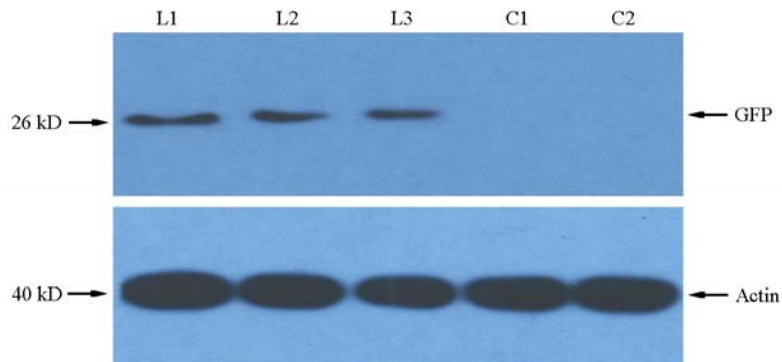


图 4 继代培养 3 年的转 *gfp* 毛状根 Western blot 分析

L1、L2、L3: 毛状根根系; C1: 非转基因实生苗根; C2: 野生型毛状根。

Fig. 4 Western blot of hairy roots harbouring *gfp* subcultured for 3 years

L1, L2, L3: Hairy root lines; C1: Non-transgenic root; C2: Wild-type hairy root.

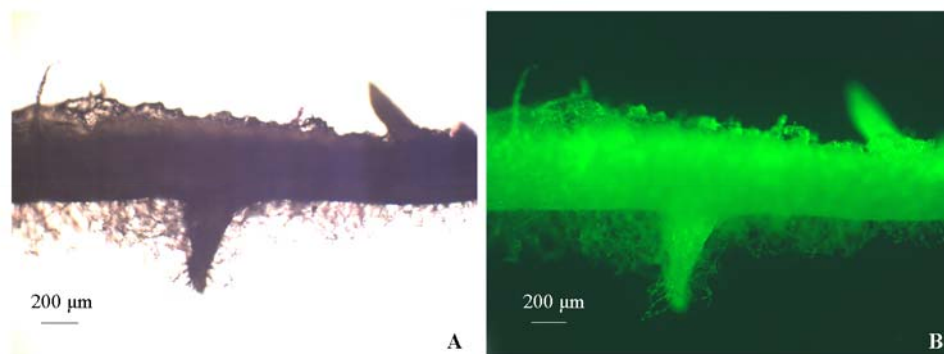


图 5 显微观察继代培养 3 年的转 *gfp* 毛状根

A: 可见光下显微观察; B: 荧光显微镜下观察发出强烈的绿色荧光。

Fig. 5 The hairy roots subcultured for 3 years observed under microscope

A: Observed under visible light microscope; B: The strong green fluorescence emitted under fluorescent microscope.

3 讨论

由发根农杆菌侵染植物细胞诱导形成的转基因毛状根具有重要的应用价值, 如: 药用植物的毛状根可直接用于生产生物碱等药用活性成分; 将含有目标基因的表达载体转入发根农杆菌, 这种重组型发根农杆菌侵染植物诱导获得的毛状根可用于表达转入的外源基因, 进而生产目标基因蛋白; 此外, 毛状根还可以作为宿主直接繁殖线虫等根部害虫。这些应用都需要长期周期性地培养繁殖毛状根, 而长期繁殖过程中保持转入毛状根的外源基因表达的稳定性至关重要。Hughes 等 (2002) 通过农杆菌型发根农杆菌 15834 侵染长春花获得转 *gfp* 的毛状根, 其中 *gfp* 基因由糖皮质激素诱导型启动子 (glucocorticoid inducible promoter) 驱动; Peebles 等 (2007, 2009) 进一步通过荧光定量 PCR 检测显示, 转 *gfp* 的长春花毛状根在液体培养条件下继代培养 5 年后, 在转录水平上 *gfp* 仍能被诱

导表达,但未检测表达蛋白,也未分析与毛状根形态有关的 *rol* 系列基因的情况。本研究中转 *gfp* 毛状根由黄瓜碱型发根农杆菌 K599 侵染黄瓜获得, *gfp* 由组成型启动子 35S 驱动,在固体培养基上继代培养 3 年,分析结果显示, *gfp* 不仅在转录水平上能够正常表达,而且能够正常翻译出编码蛋白;此外,培养 3 年后的毛状根中均扩增出与毛状根形态构成有关的 *rol* 系列基因。结合本研究结果和前人的报道,认为由不同类型的发根农杆菌(如:农杆菌型和黄瓜碱型)诱导的毛状根在不同的培养条件下(如:固体和液体培养)经过长期培养后不仅能够保持其原来的生长状态,并且由不同类型的启动子(如:组成型启动子和诱导型启动子)驱动的外源基因,在转录和翻译水平上均能正常表达,即长期培养的毛状根能保持其遗传稳定性,这为利用毛状根长期工厂化生产外源基因表达的蛋白产物和药用植物的活性成分提供了理论依据。

References

- Chang C K, Chang K S, Lin Y C, Liu S Y, Chen C Y. 2005. Hairy root cultures of *Gynostemma pentaphyllum* (Thunb.) Makino: A promising approach for the production of gypenosides as an alternative of ginseng saponins. *Biotechnol Lett*, 27 (16): 1165 - 1169.
- de Guzman G, Walmsley A M, Webster D E, Hamill J D. 2011. Hairy roots cultures from different *Solanaceous* species have varying capacities to produce *E. coli* B-subunit heat-labile toxin antigen. *Biotechnol Lett*, 33 (12): 2495 - 2502.
- Georgiev M I, Pavlov A I, Bley T. 2007. Hairy root type plant *in vitro* systems as sources of bioactive substances. *Appl Microbiol Biotechnol*, 74 (6): 1175 - 1185.
- Guillon S, Tremouillaux-Guiller J, Pati P K, Rideau M, Gantet P. 2006. Hairy root research: Recent scenario and exciting prospects. *Curr Opin Plant Biol*, 9 (3): 341 - 346.
- Hughes E H, Hong S B, Shanks J V, San K Y, Gibson S I. 2002. Characterization of an inducible promoter system in *Catharanthus roseus* hairy roots. *Biotechnol Prog*, 18 (6): 1183 - 1186.
- Livak K J, Schmittgen T D. 2001. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. *Methods*, 25 (4): 402 - 408.
- Meng Sha-sha, Xiang Tai-he, Wang Lin. 2010. Induction of hairy root on cucumber inbred line NC-46 with high frequency and construction of a hairy root cDNA library. *Acta Horticulturae Sinica*, 37 (4): 567 - 574. (in Chinese)
- 孟莎莎, 向太和, 王琳. 2010. 黄瓜多抗自交系 NC-46 转基因不定根的高频诱导及其 cDNA 文库的构建. *园艺学报*, 37 (4): 567 - 574.
- Peebles C A, Gibson S I, Shanks J V, San K Y. 2007. Long-term maintenance of a transgenic *Catharanthus roseus* hairy root line. *Biotechnol Prog*, 23 (6): 1517 - 1518.
- Peebles C A, Sander G W, Li M, Shanks J V, San K Y. 2009. Five year maintenance of the inducible expression of anthranilate synthase in *Catharanthus roseus* hairy roots. *Biotechnol Bioeng*, 102 (5): 1521 - 1525.
- Tepfer M, Casse-Delbart F. 1987. *Agrobacterium rhizogenes* as a vector for transforming higher plants. *Microbiol Sci*, 4 (1): 24 - 28.
- Wubben M J, Callahan F E, Triplett B A, Jenkins J N. 2009. Phenotypic and molecular evaluation of cotton hairy roots as a model system for studying nematode resistance. *Plant Cell Rep*, 28 (9): 1399 - 1409.
- Xu Ji-ming, Xiang Tai-he. 2008. Construction of a novel vector harboring green fluorescence protein gene (*gfp*) and high expression of *gfp* in transformed roots of *Petunia hybrida*. *Hereditas*, 30 (8): 1069 - 1074. (in Chinese)
- 徐纪明, 向太和. 2008. 含 *gfp* 植物转基因表达载体的构建及在矮牵牛转基因不定根中的高效表达. *遗传*, 30 (8): 1069 - 1074.
- Zhao Shou-jing, Li Chang-yu, Qian Yan-chun, Luo Xiao-pei, Zhang Xin, Wang Xue-song, Kang Bo-yu. 2004. Induction of hairy roots of *Panax ginseng* and studies on suitable culture condition of ginseng hairy roots. *Chinese Journal of Biotechnology*, 20 (2): 215 - 220. (in Chinese)
- 赵寿经, 李昌禹, 钱延春, 骆晓佩, 张昕, 王雪松, 康波愈. 2004. 人参发根的诱导及其适宜培养条件的研究. *生物工程学报*, 20 (2): 215 - 220.