

# MAR序列介导野苋菜凝集素基因在白菜中的表达

邓智年<sup>1, 2\*</sup>, 魏源文<sup>1, 2</sup>, 吕维莉<sup>1</sup>, 李杨瑞<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> 广西农业科学院广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室, 南宁 530007; <sup>2</sup> 广西大学农学院, 南宁 530004)

**摘要:** 以‘丰顺’白菜带柄子叶为转化受体, 用带有 MAR (Matrix Attachment Region) 和不带 MAR 的两种植物表达载体进行农杆菌介导转化野苋菜凝集素基因 (*Amaranthus viridis* L. agglutinin, AVA) 获得转基因的抗蚜小白菜。分析 MAR 序列介导对转基因表达的影响。表明利用 MAR 序列介导 AVA 基因表达, 获得转基因植株的数量比对照提高 29.63%; 转 AVA 基因白菜对桃蚜 (*Myzus persicae*) 的群体发展有一定的抑制作用, 平均抑制率为 55.8%; MAR 序列介导 AVA 基因表达的转基因植株中, 该基因的表达水平比对照高, 并且不同转基因单株间 AVA 基因表达差异比对照小。

**关键词:** 白菜; MAR; 野苋菜凝集素基因; 桃蚜; 转基因表达

**中图分类号:** S 634.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2007) 02-0381-06

## Expression of *Amaranthus viridis* L. Agglutinin Mediated by Matrix Attachment Region (MAR) Sequence in Transgenic Chinese Cabbage

DENG Zhi-nian<sup>1, 2\*</sup>, WEI Yuan-wen<sup>1, 2</sup>, LÜ Wei-li<sup>1</sup>, and LI Yang-rui<sup>1</sup>

(<sup>1</sup> Key Laboratory of Crop Genetic Improvement and Biotechnology of Guangxi, Guangxi Academy of Agricultural Sciences, Nanning 530007, China; <sup>2</sup> Agricultural College, Guangxi University, Nanning 530004, China)

**Abstract:** The cotyledons with petiole as acceptors, Chinese cabbage genetic transformation system mediated by *Agrobacterium tumefaciens* was set up and *Amaranthus viridis* L. agglutinin (AVA) transformed plants resistant to *Myzus persicae* were acquired. The effects of MAR (matrix attachment region) on AVA gene expression in transgenic Chinese cabbage were studied with two different plant expression vectors. The number of transgenic plants was 29.63% higher than that of the control. The bioassay of *Myzus persicae* revealed that transgenic plants showed more or less enhanced resistance and inhibition to population, and the average inhibition rate was 55.8%. Among the transgenic plants that AVA gene were mediated by MAR, the expression level of AVA gene was higher than that of the control, and the expression variance of AVA gene among transgenic plants was smaller as well.

**Key words:** Chinese cabbage; Matrix attachment regions; AVA gene; *Myzus persicae*; Transgene expression

白菜类蔬菜中缺乏抗蚜虫种质资源, 至今无法通过常规育种手段培育出抗虫品种。借助转基因技术获得抗蚜白菜, 结合常规育种手段培育抗蚜新品种是防治蚜虫的有效途径之一。携带苋菜凝集素家族基因 ACA、AHA 的转基因烟草表现出对桃蚜良好的抑制作用 (Rinderle et al, 1990; 周永刚等, 2001; Guo et al, 2004)。目前应用于白菜类蔬菜作物分子改良的抗蚜基因主要是雪花莲凝集素基因 GNA (杨广东等, 2003; 张扬勇等, 2003; 王忠华, 2004), 尚未见苋菜凝集素基因导入白菜的报道。

收稿日期: 2006 - 08 - 14; 修回日期: 2007 - 01 - 25

基金项目: 广西自然科学基金项目 (桂科青 0640062); 广西农业科学院科技发展基金项目 (2002008)

\* E-mail: dzn620@163.com

与其它作物相比,转基因白菜类植株的抗虫性较差,这可能与抗虫基因表达水平低有关(王忠华, 2004)。

MARs (Matrix Attachment Regions) 序列在转基因动植物中具有稳定和提高基因表达水平的作用 (Breyne et al, 1992; Allen et al, 1993, 1996, 2000; Han et al, 1997; Lee et al, 1998; Gutierrez-Adan et al, 2000), 研究其在决定基因表达中所处的位置及对目的基因表达的作用, 具有重要的实际意义。

本研究利用自主克隆的野苋菜凝集素基因 (*Amaranthus viridis* L. agglutinin, AVA), 通过构建 MAR-AVA-MAR 植物表达载体, 利用农杆菌介导法转化白菜, 获得抗蚜转化植株, 并研究 MAR 序列介导对 AVA 基因表达水平的影响。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料与质粒

供试‘丰顺’白菜种子购自农贸市场。根癌农杆菌 EHA105 为本实验室保存, 植物表达载体质粒 pC1300-2MARAVA 及 pC1300-AVA 为本实验室所构建, 各元件结构见图 1 (箭头方向表示 MAR 以相同方向排列)。

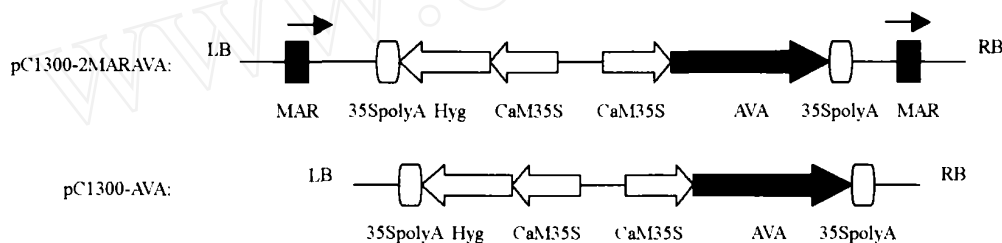


图 1 植物表达载体 T-DNA 结构

Fig. 1 T-DNA structure of plant expression vectors

### 1.2 转化方法

种子消毒后接种于  $1/2MS_0$  培养基上, 取 5~7 d 无菌苗的带柄子叶为外植体, 将子叶柄基部插入预处理培养基 ( $MS_0 + 2,4-D$  0.2 mg/L + NAA 0.1 mg/L +  $AgNO_3$  7.5 mg/L) 中预培养 2 d, 放在培养皿中, 加入用乙酰丁香酮 AS (终浓度为 50 mmol/L) 活化的农杆菌菌液 (按 1:5 稀释) 浸染 10 min, 用无菌滤纸将菌液吸干后转接到无抗生素的共培养基 ( $MS_0 + TDZ$  1.0 mg/L + NAA 0.1 mg/L +  $AgNO_3$  7.5 mg/L + ABA 0.5 mg/L) 中暗培养 2 d, 再转入附加 500 mg/L 羧卞青霉素 (Carb) 和 20 mg/L 潮霉素 (Hyg) 的筛选培养基中, 每 2 周继代 1 次。

培养 4 周即可得到抗性芽, 长到 2 cm 高时切下转入壮苗培养基 ( $MS_0 + BA$  0.5 mg/L + NAA 0.1 mg/L + Carb 500 mg/L + Hyg 20 mg/L) 中培养 1~2 周, 移入生根培养基 ( $1/2MS_0 + BA$  2.0 mg/L + Carb 500 mg/L + Hyg 20 mg/L)。

生根后移栽于土壤中发育至成熟。

### 1.3 转化植株的分子鉴定

少量抽提植物总 DNA 的方法 (Edwards et al, 1991) 提取白菜总 DNA, 用 AVA 基因 5 端引物 (5'-GGAA GATCTACCATGCGGGATTACCA GTG-3') 和 3 端引物 (5'-AGCGTCGACTTAGTTGTG-GATCCCAATTC-3') 进行 PCR 扩增, 扩增产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。

PCR-Southern 杂交采用 Roche 公司的 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit 试剂盒。

采用总 RNA 抽提试剂盒提取 PCR 呈阳性的植株总 RNA, 以 RNA 作为模板进行 RT-PCR。

#### 1.4 转基因植株的抗蚜性测定

选取 PCR-Southern 检测呈阳性的转基因植株 10 株进行抗蚜性测定。每棵白菜植株上接 10 头 1~2 龄桃蚜 (*Myzus persicae* Sulzer), 每天观察统计桃蚜的存活和生长情况, 共观察 12 d。每处理重复 3 次, 非转基因植株为对照。桃蚜抑制率 (%) = (对照平均桃蚜量 - 样品平均桃蚜量) / 对照平均桃蚜量 × 100。

## 2 结果与分析

### 2.1 白菜转化及再生植株的筛选

带柄子叶与携带质粒的农杆菌 EHA105 共培养 2 d 后转到筛选培养基上进行抗性芽的诱导和筛选。10~15 d 后, 含 20 mg/L Hyg 的筛选培养基上, 一部分外植体子叶柄膨大, 伤口基部长出绿色不定芽; 一部分基部变黄, 最终死亡。经过 4 周筛选, 将保持绿色的抗性芽切下转至壮苗培养基上培养 1~2 周, 然后再转至生根培养基上培养 3~4 周可形成具有发达根系的完整植株, 炼苗后移栽到营养土中。

### 2.2 白菜转化植株的分子检测

根据 AVA 基因序列设计特异引物扩增, 两种质粒的转化植株均扩增出长度为 1 900 bp 的 AVA 基因, 而阴性对照没有 (图 2), 初步证明该基因已经整合到白菜基因组中。

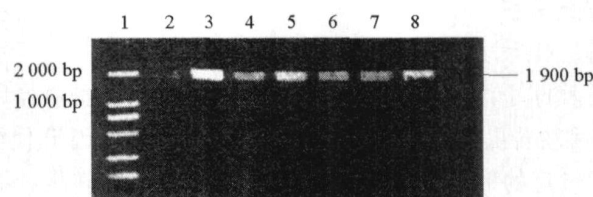


图 2 抗性植株的 PCR 检测

1. Marker DL-2000; 2 非转化植株; 3~5. 含有 MAR 抗性植株; 6~8. 无 MAR 抗性植株。

Fig. 2 PCR of resistant plants

1. Marker DL-2000; 2 Non-transgenic plants; 3 - 5. Resistant plants with MAR;  
6 - 8. Resistant plants without MAR.

随机选取 4 株 PCR 检测为阳性的植株进行 PCR-Southern 分子杂交, 结果见图 3。共获得 PCR 阳性植株 82 株, 其中转化 pC1300-2MARAVA 质粒获得 11 个基因系, 55 株 PCR 阳性植株; 转化 pC1300-AVA

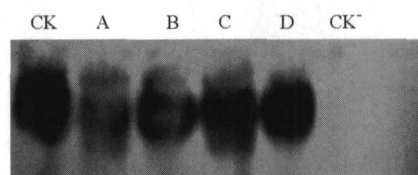


图 3 抗性植株 Southern 杂交

CK pC1300-2MARAVA PCR 产物; A, B. 含有 MAR 抗性植株; C, D. 无 MAR 转化植株; CK+. 非转基因植株。

Fig. 3 Southern blot of DNA from resistant plants

CK pC1300-2MARAVA PCR products; A, B. Transgenic plants with MAR;  
C, D. Transgenic plants without MAR; CK+. Wild type plants as negative control

质粒获得 7 个基因系, 27 株 PCR 阳性植株。

MAR 序列介导的转基因系数数量提高了 57.14%, 抗性子叶平均再生植株数提高了 29.63%。

### 2.3 RT-PCR 鉴定

RT-PCR 验证含有内含子的 *AVA* 基因在白菜中的表达。结果表明扩增到约 900 bp 的片段, *AVA* 基因的内含子得到正确剪切, 进一步证明了转基因白菜中不仅整合了 *AVA* 基因, 而且该基因获得了正确的表达 (图 4)。

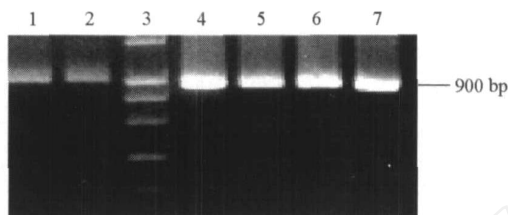


图 4 抗性植株的 RT-PCR

1, 2, 4. 含有 MAR 转化植株; 3. Marker DL-2000; 5~7. 无 MAR 的转化植株。

Fig 4 RT-PCR of resistant plants

1, 2, 4. Transgenic plants with MAR; 3. Marker DL-2000;

5 - 7. Transgenic plants without MAR.

### 2.4 转基因阳性植株的抗蚜分析

对 PCR-Southern 检测呈阳性的白菜植株进行抗蚜性分析。

图 5 显示含有 *AVA* 基因的白菜植株对桃蚜的群体发展有一定的抑制作用。与对照相比, 在转基因抗性植株上都观察到有桃蚜若虫死亡的现象, 其中含 MAR 的转基因  $T_0$  代植株表现出明显的对桃蚜生长的抑制作用, 接种 12 d 后的平均抑制桃蚜密度达 55.8%; 而非转化对照为 0; 无 MAR 的转基因植株平均抑制桃蚜密度为 34.3%。

不同抗性植株抗虫性差异很大 (图 6)。无 MAR 的  $T_0$  代转 *AVA* 基因植株中, 大部分植株的桃蚜

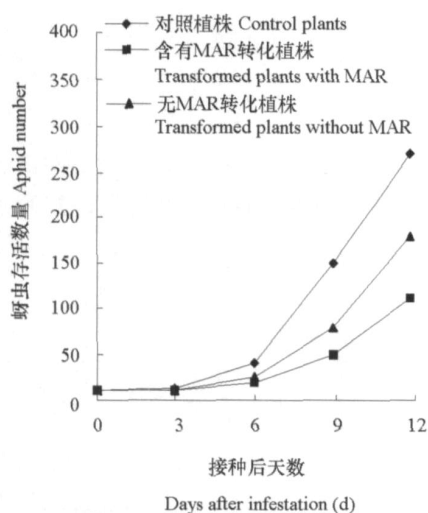


图 5 转基因植株的抗蚜分析图

Fig 5 Aphid resistance bioassay of transgenic plants

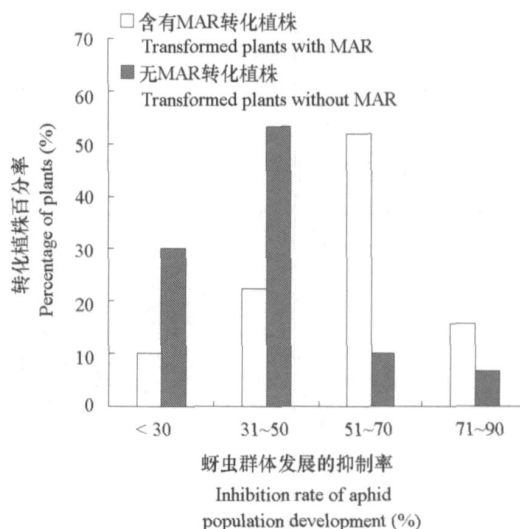


图 6 具有不同抗蚜性的两种转化植株的百分率分布

Fig 6 Percentage distribution of the two transgenic plants with different levels of aphid resistance

抑制率在 30% ~ 50% 之间, 有的单株最高可达 72.4%, 18% ~ 20% 的植株几乎没有抗蚜性。含 MAR 的转基因单株的基因表达也仍存在一定的差异, 超过 28.3% 的植株桃蚜抑制率超过 70%, 有的甚至高达 85%, 但有的植株仅为 10% ~ 15%。

这些结果暗示构建在外源基因两侧的 MAR 序列在一定程度上可以提高 AVA 的表达水平, 但是并不能明显降低其在不同转基因系间的表达差异。

从总体上来说含有 MAR 的转基因白菜植株较不含的转化植株对桃蚜具有更明显的抑制作用, 且抗性程度与 AVA 基因的表达量呈正相关。

### 3 讨论

利用植物凝集素基因进行的植物抗虫基因工程刚起步不久, 获得的转基因植株是否对人畜无害, 还有待进一步证实。

研究结果表明, 转野苋菜凝集素基因 AVA 的白菜有一定抑制桃蚜群体发展的作用, 证明 AVA 基因是一个有潜在应用前景的抗蚜基因。

转基因沉默、基因表达不稳定及转基因株系间的基因表达差异是制约植物转基因研究的瓶颈问题。当转基因两侧连有 MAR 序列时, MAR 序列之间就会形成一个位置独立、结构较为松散的 DNA 环状结构域, 从而使转基因表达的位置效应降到最低 (Allen et al, 1996; Spiker & Thompson, 1996)。Allen 等 (1993, 1996) 认为 MAR 对转基因表达水平的提高主要是通过减少同源依赖性基因沉默的负影响而提高转基因的表达效率, 无 MAR 的对照转基因系中由于基因沉默使转基因表达效率减低。

MAR 序列介导的植物转基因研究还处在初级阶段, MAR 总体上表现为稳定和提高转基因表达水平, 但对降低转基因株系间的基因表达差异结果却不相同 (Breyné et al, 1992; Schoffl et al, 1993; Mlynarova et al, 1994, 1995; Spiker et al, 1996)。另外转基因两侧 MAR 的同源性也是必需的, 只有这样 MAR 才能提高外源基因在转基因植株中的表达水平 (Slatter et al, 1991; Liu & Tabe, 1998)。

本研究的结果初步证实了 MAR 序列在影响转基因表达方面的作用。两种不同结构的质粒在相同的试验条件下进行转化, 结果却有着明显的差异, 显而易见, 这是由质粒本身所引起的, 这个结果与伍成祥等 (2002) 利用基因枪转化 MAR 序列介导水稻 *bar* 基因的表情的研究结果一致。

### References

- Allen G C, Hall G E Jr, Childs L C, Weissinger A K, Spiker S, Thompson W F. 1993. Scaffold attachment regions increase reporter gene expression in stably transformed plant cells. *Plant Cell*, 5 (6): 603 - 613.
- Allen G C, Hall Jr G, Michalowski S, Newman W, Spiker S, Weissinger A K, Thompson W F. 1996. High-level transgene expression in plant cell: effects of a strong scaffold attachment region from tobacco. *Plant Cell*, 8: 889 - 913.
- Allen G C, Spiker S, Thompson W F. 2000. Use of matrix attachment regions (MARs) to minimize transgene silencing. *Plant Molecular Biology*, 43 (2 - 3): 361 - 376.
- Breyné P, van Montagu M, Depicker A, Gheysen G. 1992. Characterization of a plant scaffold attachment region in a DNA fragment that normalizes transgene expression in tobacco. *Plant Cell*, 4 (4): 463 - 471.
- Edwards K, Johnstone C, Thompson C. 1991. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acid Research*, 19 (6): 1349.
- Guo Hong-nian, Jia Yan-tao, Zhou Yong-gang, Zhang Zhen-shan, Ouyang Qing, Jiang Ying, Tian Ying-chuan. 2004. Effects of transgenic tobacco plants expressing ACA gene from *Amaranthus caudatus* on the population development of *Myzus persicae*. *Acta Botanica Sinica*, 46 (9): 1100 - 1105.
- Gutierrez-Adan A, Pintado B. 2000. Effect of flanking matrix attachment regions on expression of microinjected transgenes during preimplantation

- development of mouse embryos Transgenic Research, 9 (2): 81 - 89.
- Han K H, Ma C P, Strauss S H. 1997. Matrix attachment regions (MARs) enhance transformation frequency and transgene expression in poplar Transgenic Research, 6: 415 - 420.
- Lee T H, Kim S J, Han Y M, Yu D Y, Lee C S, Choi Y J, Moon H B, Baik M G, Lee K K. 1998. Matrix attachment region sequences enhanced the expression frequency of a whey acidic protein/human lactoferrin fusion gene in the mammary gland of transgenic mice Molecular Cells, 8 (5): 530 - 536.
- Liu J W, Tabe L M. 1998. The influences of low plant nuclear matrix attachment regions (MARs) on gene expression in transgenic plants Plant Cell Physiology, 39 (1): 115 - 123.
- Mlynarova L, Loonen A, Heldens J, Jansen R C, Keizer P, Stiekema W J, Nap J P. 1994. Reduced position effect in mature transgenic plants conferred by the chicken lysozyme matrix associated regions Plant Cell, 6 (3): 417 - 426.
- Mlynarova L, Jansen R C, Conner A J, Stiekema W J, Nap J P. 1995. The MAR mediated reduction in position effect can be uncoupled from copy number-dependent expression in transgenic plants Plant Cell, 7 (5): 599 - 609.
- Rinderie S J, Goldstein I J, Remsen E E. 1990. Physicochemical properties of amaranthin, the lectin from *Amaranthus caudatus* seeds Biochemistry, 29 (46): 10555 - 10561.
- Schoff F, Schroder G, Kliem M, Rieping M. 1993. A SAR sequence containing 395 bp DNA fragment mediates enhanced, gene-dosage-correlated expression of a chimaeric heat shock gene in transgenic tobacco plants Transgenic Research, 2 (2): 93 - 100.
- Slatter R E, Dupree P, Gray J C. 1991. A scaffold-associated DNA region is located downstream of the pea plastocyanin gene Plant Cell, 3: 1239 - 1250.
- Spiker S, Thompson W F. 1996. Nuclear matrix attachment regions and transgene expression in plants Plant Physiology, 110: 15 - 21.
- Wang Zhong-hua. 2004. Advances in development of insect-resistant transgenic Chinese cabbage group. Acta Agriculturae Shanghai, 20 (4): 53 - 56. (in Chinese)
- 王忠华. 2004. 抗虫转基因白菜类蔬菜作物培育研究进展. 上海农业学报, 20 (4): 53 - 56.
- Wu Cheng-xiang, Wan Yu-song, Xu Jun, Su Jin, Fang Xuan-jun. 2002. Expression analysis of rice bar gene mediated matrix attachment region (MAR) sequence transformed by a gene bombardment Journal of Agricultural Biotechnology, 10 (3): 227 - 230. (in Chinese)
- 伍成祥, 宛煜嵩, 徐俊, 苏金, 方宣钧. 2002. 基因枪转化 MAR 序列介导水稻 *bar* 基因的表达分析. 农业生物技术学报, 10 (3): 227 - 230.
- Yang Guang-dong, Zhu Zhen, Li Yan-e, Zhu Zhu-jun, Shanguan Xiao-xia, Wu Xia. 2003. Expression and inheritance of snowdrop lectin gene (*GNA*) in Chinese cabbage Acta Horticulturae Sinica, 30 (3): 473 - 475. (in Chinese)
- 杨广东, 朱祯, 李燕娥, 朱祝军, 上官小霞, 吴霞. 2003. 雪花莲外源凝集素基因在大白菜中的表达和抗蚜性遗传分析. 园艺学报, 30 (3): 341 - 342.
- Zhang Yang-yong, Li Han-xia, Ye Zhi-biao, Lu Yong-en, Lu Ya-chun. 2003. Genetic transformation of flowering stalk with snowdrop lectin gene (*GNA*). Acta Horticulturae Sinica, 30 (4): 473 - 475. (in Chinese)
- 张扬勇, 李汉霞, 叶志彪, 卢永恩, 陆芽春. 2003. 农杆菌介导 *GNA* 基因转化菜薹. 园艺学报, 30 (4): 473 - 475.
- Zhou Yong-gang, Tian Ying-chuan, Mang Ke-qiang. 2001. Cloning of *AHA* gene from *Amaranthus hypochondriacus* and its aphid inhibition effect in transgenic tobacco plants Chin. J. Biotechnology, 17 (1): 34 - 39. (in Chinese)
- 周永刚, 田颖川, 莽克强. 2001. 苋菜凝集素基因的克隆及在转基因烟草中抗蚜性研究. 生物工程学报, 17 (1): 34 - 39.