

文心兰 *OnAPI* - like 基因表达载体构建和遗传转化体系初探

武振江¹, 刘 佳¹, 崔 波^{1,2}, 叶永忠^{1*}

(1. 河南农业大学 生命科学学院, 河南 郑州 450002; 2. 郑州师范学院 生物工程研究所, 河南 郑州 450044)

摘要: 根据 NCBI 网站上文心兰 *OnAPI*-like 基因序列设计引物, 用 RT-PCR 法从南茜文心兰花萼中扩增 *OnAPI*-like 基因, 对扩增产物进行测序。结果表明, 获得的南茜文心兰 *OnAPI*-like 基因为 690 bp, 与报道序列完全一致。将 *OnAPI*-like 基因插入 pRI101-ON 载体中, 经 PCR、双酶切及测序鉴定, 证实重组表达质粒中含有目的片段, 表明成功构建了高效植物表达载体 pRI101-*OnAPI*。对 *OnAPI*-like 基因的结构域和所表达蛋白质的亲水性进行了分析, 并预测了该基因所表达蛋白的三维结构。结果显示, 该基因包含 MADS-box 和 K-box 保守域, 属于 MADS-box 基因家族, 所表达蛋白为亲水性蛋白。确定了一种文心兰的遗传转化条件, 得到筛选抗生素 G418 的最适质量浓度为 40 mg/L, 为进一步研究文心兰中 *API* 基因的功能奠定基础。

关键词: 文心兰; 载体构建; *OnAPI* 基因; 遗传转化体系

中图分类号: S682.31 文献标志码: A 文章编号: 1004-3268(2014)05-0124-06

Construction of Expression Vector of *OnAPI*-like Gene and Exploration of Genetic Transformation System of *Oncidium*

WU Zhen-jiang¹, LIU Jia¹, CUI Bo^{1,2}, YE Yong-zhong^{1*}

(1. College of Life Science, Henan Agricultural University, Zhengzhou 450002, China;

2. Institute of Biotechnology, Zhengzhou Normal University, Zhengzhou 450044, China)

Abstract: The *OnAPI*-like gene was amplified from the scape of *Oncidium* 'Gower Ramsey' with primers designed according to the *OnAPI*-like gene sequence of *Oncidium* from NCBI website by RT-PCR method. The PCR product was 690 bp which was in fully accord with the sequence published. The *OnAPI*-like gene was inserted into pRI101-ON vector. The recombinant plasmid pRI101-*OnAPI* identified by PCR, double digestion and sequencing was constructed successfully. The multi-domain of the *OnAPI*-like gene and the hydrophilia of the protein encoded by the *OnAPI*-like gene were analyzed. The 3D structure of the protein encoded by the *OnAPI*-like gene was predicted. The results showed that this protein contained the MADS-box and K-box domain, belonging to MADS-box superfamily. The protein encoded by the *OnAPI*-like gene was a hydrophilic protein. The transformation system of *Oncidium* 'Gower Ramsey' mediated by *Agrobacterium* was established, and the optimum concentration of the antibiotic G418 was 40 mg/L for screening transformants. The results provide theoretical foundation for further research of the function of *API* gene in *Oncidium* 'Gower Ramsey'.

Key words: *Oncidium*; vector construction; *OnAPI* gene; genetic transformation system

收稿日期: 2013-11-22

基金项目: 河南省重点科技攻关项目(092102110128); 郑州市重大科技专项(112PZDZX030)

作者简介: 武振江(1985-), 男, 河南滑县人, 在读硕士研究生, 研究方向: 兰花分子育种。E-mail: 8125528xy@163.com

* 通讯作者: 叶永忠(1957-), 男, 湖北黄梅人, 教授, 博士生导师, 主要从事植物生态学方面的研究。E-mail: yeyzh@163.com

文心兰 (*Oncidium* ‘Gower Ramsey’) 是兰科 (Orchidaceae) 文心兰属 (*Oncidium*) 植物, 热带多年生常绿附生草本, 又名舞女兰、跳舞兰, 因其花瓣形态像翩翩起舞的舞女而得名。由于文心兰的花型优美、花色艳丽又分枝良好, 所以深受各地人们的喜爱, 是世界上重要的切花品种。研究转基因文心兰以培育优良品种, 对于满足人们对物质和精神的需求有重要意义。

API 基因是植物特有的 MIKC-type MADS-box 基因^[1], 属于“ABC”模型中的 A 类基因, 具有多内含子基因结构, 所编码的 MADS-box 转录因子主要由 MADS 盒、K 盒、I 区、C 末端等部分组成。*API* 基因既调控花分生组织的分化, 又调控花器官形态的建成^[2-3], 它处于 *LFY* (*LEAFY*) 的下游, 编码 MADS-box 转录因子, 抑制 *TFL1* (TERMINAL FLOWER 1) 基因, 抑制 *SVP*、*AGL24*、*SOCI* 表达, 可调控 *AP3*, 使花中有花, 萼片向叶的同源异形转变, 花瓣缺失或数量减少^[4]。在不同物种中 *API* 同源基因的表达存在一定差异^[5]。本研究以文心兰 *OnAPI*-like 基因为对象构建植物表达载体并进行遗传转化, 从而为探索 *API* 基因的功能奠定基础。此外, 本研究对单子叶植物遗传转化体系的建立具有参考价值。

1 材料和方法

1.1 材料

以南茜文心兰 (来自郑州师范学院智能温室) 组培保存的愈伤组织作为遗传转化材料。*E. coli* DH5 α 菌株和 EHA105 农杆菌菌株由本实验室保存, 克隆载体 pMD19-T、Pfu DNA 聚合酶、*Taq* DNA 聚合酶、限制性内切酶、T4 DNA 连接酶、表达载体 pRI101-ON 均购于 TaKaRa 公司; 植物总 RNA 提取试剂盒、普通琼脂糖 DNA 回收试剂盒、质粒小提试剂盒、IPTG、dNTPs 及 DNA Marker 购于 TIANGEN 公司。带有酶切位点的用于 *OnAPI*-like 基因扩增的上游引物 *OnAPI*-F 为 5'-CATCTAGAAAAGAGATG-AGGAGGGG-3', 下游引物 *OnAPI*-R 为 5'-TCCCCCGGTCATTTCGAACAAATGTG-3', 下划线部分分别为 *Xba* I 和 *Sma* I 酶切位点。引物合成和基因测序由上海英骏公司完成。

1.2 方法

1.2.1 文心兰总 RNA 的提取与反转录 用 Trizol (Invitrogen 公司) 试剂提取文心兰花葶总 RNA, 用琼

脂糖凝胶电泳鉴定 RNA 的完整性。以提取的总 RNA 为模板, 用 M-MLV 反转录酶 (TaKaRa 公司) 合成第一链, 反转录反应参照 Reverse Transcriptase M-MLV (RNase H⁻) 使用说明。

1.2.2 PCR 扩增与鉴定 以 cDNA 为模板进行 PCR 反应。PCR 反应体系为 20 μ L: 10 \times PCR buffer 2 μ L、dNTP Mix 1.6 μ L、上游引物 *OnAPI*-F (10 μ mol/L) 1.0 μ L、下游引物 *OnAPI*-R (10 μ mol/L) 1.0 μ L、文心兰 cDNA 1 μ L、*Taq* 酶 (5 U/ μ L) 0.2 μ L, 加灭菌双蒸水至总体积 20 μ L; 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min; 94 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 58 $^{\circ}$ C 复性 30 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 30 个循环; 最后 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。PCR 产物在琼脂糖凝胶 (1.0%) 中电泳检测并回收, 然后克隆到 pMD19-T 载体中, 转化 *E. coli* DH5 α , 通过蓝白斑筛选阳性克隆, 命名为 DH5 α -pMD19-*OnAPI*, 选取 10 个克隆进行 DNA 测序, 并与数据库核酸序列进行比较。

1.2.3 *OnAPI*-like 的生物信息学分析 用 NCBI 网站上的 Blast (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/blast/>) 将 *OnAPI*-like 与其他同源序列进行同源性对比, 用 ProtScale 程序 (<http://expasy.org/tools/protscale.html>) 分析蛋白质亲、疏水性, 用 ExPASy 网站上的 SWISS-MODEL Workspace (<http://swissmodel.expasy.org/>) 预测蛋白质的结构。

1.2.4 高效植物表达载体的构建与鉴定 提取阳性单克隆 DH5 α -pMD19-*OnAPI* 的质粒, 经过 *Xba* I / *Sam* I 双酶切, 用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳分离并回收目的基因, 通过 T4 DNA 连接酶将目的基因片段定向连接到经同样处理的植物表达载体 pRI101-ON 中, 命名为 pRI101-*OnAPI*, 转化 *E. coli* DH5 α 感受态细胞, 涂布于含有卡那霉素 (Kan 50 mg/L) 的 LB 平板上, 37 $^{\circ}$ C 培养过夜, 挑取单菌落。提取质粒后进行 PCR 扩增检测, 对 PCR 检测为阳性的质粒进行双酶切鉴定, 将经 PCR 以及双酶切鉴定均为阳性的质粒进行测序, 测序结果用 Primer Premier 5.0 软件进行分析。

1.2.5 遗传转化 通过冻融法^[6] 将植物表达载体 pRI101-*OnAPI* 转化农杆菌感受态细胞, 用 1.2.2 的 PCR 扩增体系与程序检测已转化的农杆菌单克隆, 对 PCR 检测为阳性的克隆在含有卡那霉素的 YEB 液体培养基中扩大培养并提取质粒进行 *Xba* I / *Sam* I 双酶切验证, 对验证正确的克隆加甘油至

终浓度 20%, 分装保存于 -80°C 备用。

文心兰愈伤组织的侵染过程参照崔波等^[7]的方法, 将保存的农杆菌在含有卡那霉素的 YEB 液体培养基中分别扩大培养至 $\text{OD}_{600} = 0.6 \sim 1.0$, $2\ 700\ \text{g}$ 离心 6 min, 倒掉上清加同体积的 1/2MS 培养基, 并加入乙酰丁香酮(AS)至终浓度 0.1 mmol/L, 在 28°C 、75 r/min 的条件下横摇 2 h 活化。用解剖刀将文心兰愈伤组织切成直径 3 mm 左右的小块儿并轻轻划出伤口或用钝器按压使其受伤, 放入已活化好的菌液中, 在 28°C 、75 r/min 的条件下横摇 2 h, 转入共培养培养基(1/2MS+6-BA 1 mg/L+NAA 0.1 mg/L)中, 28°C 暗培养 2 d, 而后转入含有不同质量浓度 G418 的筛选培养基(1/2MS+6-BA

1 mg/L+NAA 0.1 mg/L+G418)中, G418 的质量浓度分别设为 10、20、30、40、50、60 mg/L, 在 25°C 、光照 12 h/黑暗 12 h、光照强度 2 000 lx 的条件下进行筛选培养。每隔 15 d 将未死亡的愈伤组织更换一次培养基, 直至文心兰愈伤组织分化为原球茎。

2 结果与分析

2.1 *OnAPI*-like 基因鉴定

2.1.1 *OnAPI*-like 基因 PCR 扩增与测序结果

根据 NCBI 已报道的 *OnAPI*-like mRNA 序列(登录号: KC426946)设计引物, 目的片段大小为 690 bp。经琼脂糖凝胶电泳, 文心兰 cDNA 的 PCR 扩增产物片段大小约为 700 bp, 与预期结果一致。测序结果见图 1。

```

1      CATCTAGAAAAGAGATGAGGAGGGGAAAGGTGCAGCTGAAGCGGATCGAGAATAAGATAAGTCGGCAGGT
1      M R R G K V Q L K R I E N K I S R Q V
71     GACCTTTTCGAAGAGGCGGTCGGGTTTGCTTAAGAAAGCACACGAGATTTCATTCTCTGCGATGCAGAA
20     T F S K R R S G L L K K A H E I S I L C D A E
141    TTAGCTCTCATTATCTTCTCAGGCAGGGGAAAGCTCTACGAGTTGCGCTCGGACAACTGCATGGATAGAA
43     L A L I I F S G R G K L Y E F A S D N C M D R
211    TTCTTGATCGCTATGAGAGATACCGCCACGCGGAAAAAAGTGTGTCGTAACGAATCCAGCCTCAGGA
66     I L D R Y E R Y R H A E K T V V V N E S Q P Q E
281    AAATTTTCGTCATGAATATGGATATCTTAAGAGTAAGGTTGATGCCTTGCAGAGACGCCAAAGCCATCTC
90     N F R H E Y G Y L K S K V D A L Q R R Q S H L
351    TTGGGTGAGAAGCTTGGCACTTTAAGCCTAAAAGAGCTCAACAACTGAGCAGCAGCTTGAAACTTCTT
113    L G E K L G T L S L K E L Q Q L E Q Q L E T S
421    TGAAGCAAATAAGGTCTCAAATGAGTCAACAACTACTTGATTCCATTGCCGAGCTTCACACAAAGGAGAA
136    L K Q I R S Q M S Q Q L L D S I A E L H T K E K
491    GTCACCTCTGGAGCAAAAGACTCTTCTTAAGGAGAAGATAACTGAGAGTGAGAATATCTTGAAGATGCTG
160    S L L E Q K T L L K E K I T E S E N I L K M L
561    CACCAAATGAGCCCAAAAGAGCAGAGCCAGCCCTAGCAAGCTCCTCCTCGCCACTAACCGTCTCCTCCA
183    H Q M S P K E Q S Q A L A S S S S P L T V S S
631    TAAACATTGGGACATGCTATTTAACGTGCAAGTAGTGTCCCTCACGAATTTGAAGATCCACATTGTTCGA
206    I N I G T C Y L T C S S V P H E F E D P H L F E
701    ATGACCCGGGGGA
230    *
```

ATG 为起始密码子; TGA 为终止密码子; 双下划线为 MADS-box; 单下划线为 K-box

图 1 *OnAPI*-like 基因全长与预测的氨基酸序列

2.1.2 重组质粒的鉴定 重组克隆质粒 pMD19-OnAP1 的 PCR 及双酶切鉴定: 对重组克隆质粒进行 PCR 扩增和电泳, 结果也出现 1 条约 700 bp 的特异条带; 经 *Xba*I/*Sma*I 双酶切, 电泳出现 2 条带, 1 条为质粒片段, 约 2 700 bp, 另 1 条为克隆的文心兰 *OnAPI*-like 基因片段, 约 700 bp(图 2A), 与预期结果一致。

重组表达质粒 pRI101-OnAP1 的鉴定: 对 PCR 检测为阳性的重组质粒进行双酶切, 用 1.0% 的琼脂糖凝胶对酶切产物进行电泳检测。结果显示, 共出现 2 条带, 1 条约 10 500 bp, 为质粒片段; 另 1 条

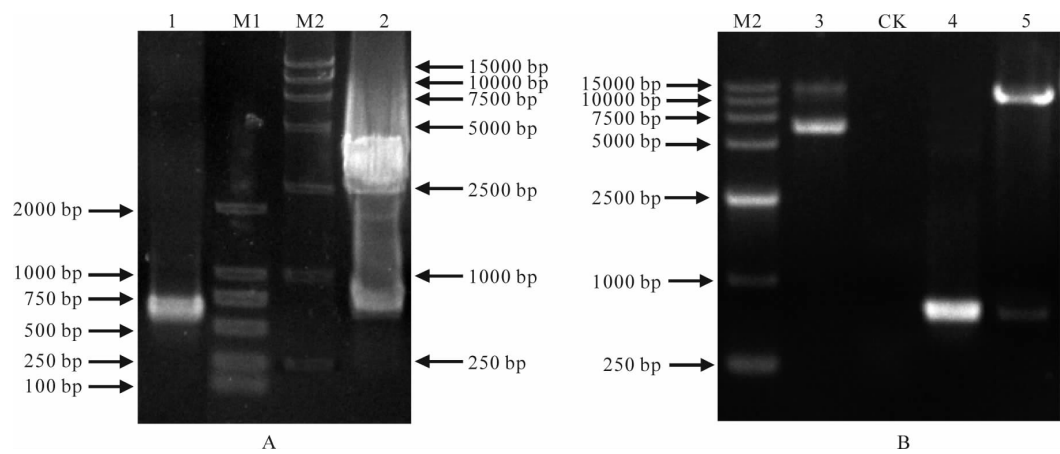
约 700 bp, 为克隆的 *OnAPI*-like 基因片段(图 2B), 与预期结果一致。将 PCR 和双酶切鉴定为阳性的重组表达质粒进行测序, 测序结果与报道的序列完全一致, 并带有完整的酶切位点。证明重组表达质粒 pRI101-OnAP1 中含有目的基因, 表达载体构建成功。

2.2 生物信息学分析

为了进一步了解 *OnAPI*-like 基因的特性, 便于同其他植物的 *API* 基因进行比较, 对该基因进行了生物信息学分析。用 Blastn 分析该基因保守域(图 3A), 其有完整的 MADS-box 和 K-box, 属于

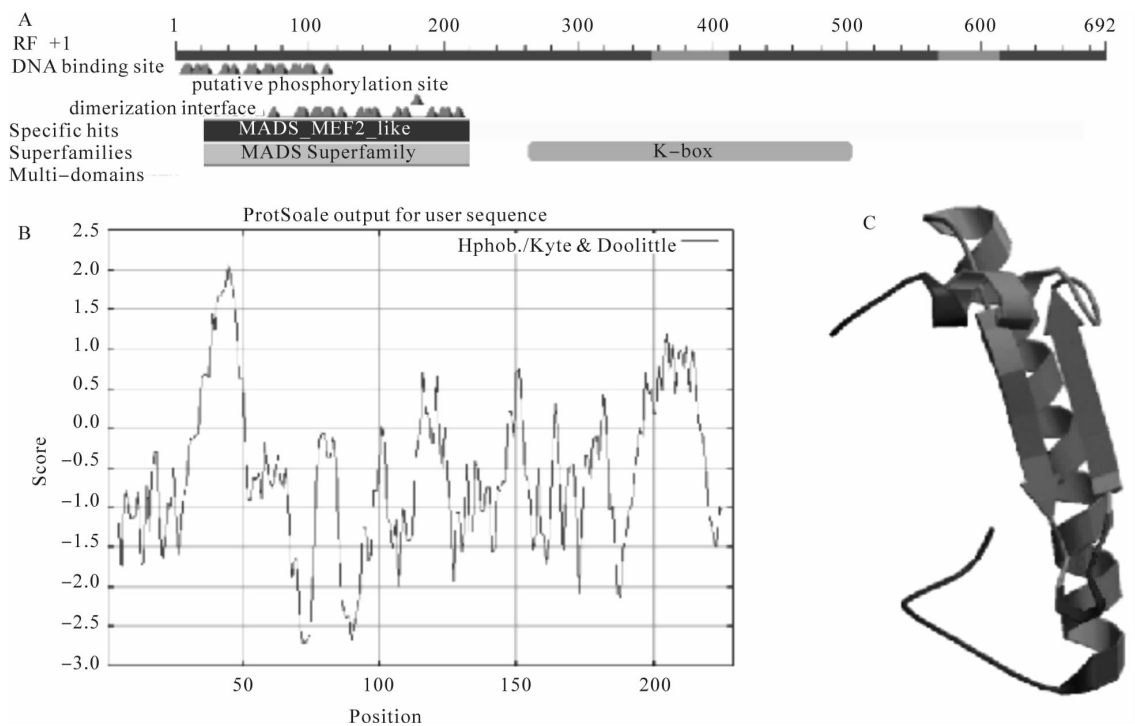
MDAS-box 基因家族;经蛋白质亲、疏水性分析,该基因所表达蛋白属于亲水性蛋白(图 3B);蛋白质三

维结构预测结果显示,该蛋白的主要元件是 α 螺旋,其次为 β 折叠(图 3C)。



A. 重组克隆质粒 pMD19-OnAPI 的鉴定; B. 重组表达质粒 pRI101-OnAPI 的鉴定; 1. 以 pMD19-OnAPI 为模板的 *OnAPI*-like PCR 产物; 2. pMD19-OnAPI 的双酶切; 3. pRI101-OnAPI 表达质粒; 4. 以 pRI101-OnAPI 为模板的 *OnAPI*-like PCR 产物; 5. pRI101-OnAPI 的双酶切; CK. 用水取代 pRI101-OnAPI 模板的 *OnAPI*-like PCR 扩增结果; M1、M2. DNA marker

图 2 重组质粒的鉴定



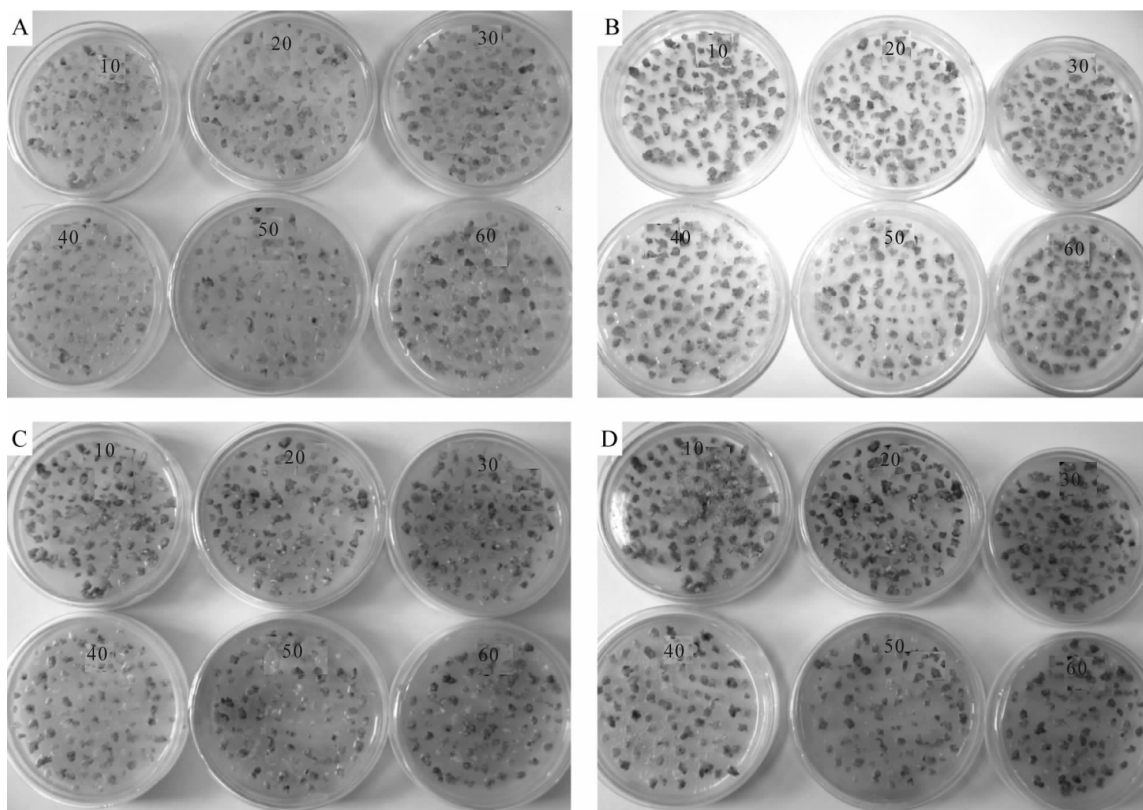
A. *OnAPI*-like 基因的功能域分析; B. *OnAPI*-like 所表达氨基酸序列的亲水性分析;
C. *OnAPI*-like 所表达氨基酸序列的三维结构预测

图 3 *OnAPI* - like 基因的生物信息学分析

2.3 农杆菌介导转化文心兰愈伤组织筛选压的确定

将被农杆菌侵染后的文心兰愈伤组织放入含有不同质量浓度 G418 的培养基中进行抗性筛选,每天观察其生长状态,分别在第 4 天(图 4A)、第 11 天(图

4B)、第 18 天(图 4C)、第 25 天(图 4D)照相计数。当 G418 质量浓度由 30 mg/L 增加到 40 mg/L 时,愈伤组织死亡率骤然升高,未转化文心兰愈伤组织几乎全部死亡(死亡率达 95%),故 40 mg/L 可作为区分转化与未转化文心兰愈伤组织的有效筛选压。



A、B、C、D 分别为文心兰愈伤组织经过筛选培养基培养的第 4 天、第 11 天、第 18 天、第 25 天结果,培养皿上的数字表示 G418 质量浓度(mg/L)

图 4 抗性筛选压测试

3 讨论

目前,对于 *AP1* 基因的研究已有很多报道。Mandel 等^[3]利用 *CaMV 35S* 启动子使 *AP1* 基因在拟南芥中组成型表达,转基因拟南芥开花时间早于野生型。此后,Weigel 等^[8]和 Sarah 等^[9]验证了 *35S::AP1* 转基因植株不论在长日照还是短日照条件下都能提早开花。安利忻等^[10]将 *AP1* 基因转化矮牵牛,转基因矮牵牛 R_0 代表现出提前且持续不断的开花特性。Peña 等^[11]将 *AP1* 基因和 *LFY* 基因导入柑橘,转基因柑橘当年开花结果。由此说明, *AP1* 基因具有促进植物开花的作用。本试验构建了 *OnAP1-like* 基因的表达载体,为分析文心兰中 *AP1* 的具体功能奠定基础;生物信息学分析表明,该基因结构与性质同报道的 *AP1* 基因极为相似^[12-14],是文心兰的 *AP1* 基因之一。

农杆菌介导法遗传转化条件比较成熟,关于兰科植物的遗传转化也有报道^[15-16],如吴锦娣等对建兰转化体系的研究^[17],王微等对大花蕙兰遗传转化的研究^[18],张妙彬等对石斛兰遗传转化的研究^[19]。不同植物对抗生素 G418 的敏感性不同,本试验对

抗生素的筛选压做了探索,确定当 G418 质量浓度为 40 mg/L 时,筛选效果最好。此外,试验中还发现将未转化的愈伤组织提前黑暗处理 2 d,有利于提高其转化效率。试验中用的共培养培养基和筛选培养基的不同点仅在于筛选培养基中含有 G418,而且此培养基可以同时作为文心兰愈伤组织扩增培养基和分化培养基,使试验过程中省去了转换培养基的步骤。

参考文献:

- [1] Adrian J, Torti S, Turck F. From decision to commitment: the molecular memory of flowering [J]. *Molecular Plant*, 2009, 2(4): 628-642.
- [2] Irish V F, Sussex I M. Function of the *apetala-1* gene during *Arabidopsis* floral development [J]. *Plant Cell*, 1990, 2(8): 741-753.
- [3] Mandel M A, Gustafson-Brown C, Savidge B, et al. Molecular characterization of the *Arabidopsis* floral homeotic gene *APETALA1* [J]. *Nature*, 1992, 360: 273-277.

- [4] 吴笑女,徐启江.被子植物的花器官发育和功能基因活性模式的建立[J].植物生理学通讯,2009,45(1):89-96.
- [5] 邹冬梅,刘月学,张志宏,等.草莓 *AP1* 同源基因的克隆、表达及启动子分析[J].中国农业科学,2012,45(10):1972-1981.
- [6] 杨金慧,王丕武,曲静,等. *BADH/pepB* 双价基因无选择标记表达载体转化苜蓿的初步研究[J].中国草地学报,2009,31(4):20-23.
- [7] 崔波,蒋素华,牛苏燕,等.农杆菌介导蝴蝶兰的遗传转化研究[J].河南农业大学学报,2012,46(6):642-645.
- [8] Weigel D, Nilsson O. A developmental switch sufficient for flower initiation in diverse plants[J]. Nature, 1995, 377:495-500.
- [9] Sarah J L, Cindy G B, Anusak P, *et al.* Interactions among *APETALA1*, *LEAFY*, and *TERMINAL FLOWER1* specify meristem fate[J]. Plant Cell, 1999, 11(6):1007-1018.
- [10] 安利忻,刘荣维,陈章良,等.花分生组织决定基因 *AP1* 转化矮牵牛的研究[J].植物学报,2001,43(1):63-66.
- [11] Peña L, Martín-Trillo M, Juárez J, *et al.* Constitutive expression of *Arabidopsis* *LEAFY* or *APETALA1* genes in citrus reduces their generation time [J]. Nature Biotechnology, 2001, 19:263-267.
- [12] 刘敏,赖钟雄.孔雀草试管苗叶片 *AP1* 基因的克隆及其生物信息学分析[J].热带作物学报,2012,33(10):1778-1783.
- [13] 吴菁华,吴少华,杨超,等.建兰 *AP1* 基因的克隆、表达及其与 *MADS-box* 转录因子相互作用的分析[J].园艺学报,2013,40(10):1935-1942.
- [14] 孙海峰,孟玉平,曹秋芬,等.枣中 *APETALA1 (AP1)* 同源基因的克隆及其表达特征分析[J].山西大学学报,2009,32(2):266-272.
- [15] 吕永杰,李仕贵,周晓禾.观赏兰科植物组培快繁及遗传转化的研究进展[J].中国生物工程杂志,2003,23(10):42-46.
- [16] 李杰.几种名贵洋兰转基因受体系统的建立及遗传转化[D].南京:南京林业大学,2005.
- [17] 吴锦娣,安娜,刘运权,等.建兰遗传转化体系之筛选体系的建立[C].中国观赏园艺研究进展,2011:305-310.
- [18] 王微,杨晓伶,杨婧,等.根癌农杆菌介导大花蕙兰遗传转化的研究[J].西北植物学报,2011,31(1):27-32.
- [19] 张妙彬,梁擎中,肖浩,等.农杆菌介导石斛兰遗传转化的研究[J].园艺学报,2008,35(4):565-570.