

虾青素合成关键酶基因 *bkt* 和 *CrtR-B* 双价植物表达载体的构建及对花生的遗传转化

徐 静^{1,2}, 杨庆利³, 檀琮萍², 侯艳华², 禹山林³, 秦 松^{2*}

(1. 淮海工学院 江苏省海洋生物技术重点建设实验室, 江苏 连云港 222005;

2. 中国科学院 海洋研究所, 山东 青岛 266071; 3. 山东省花生研究所, 山东 青岛 266100)

摘要: 虾青素是一种具有极强抗氧化活性的类胡萝卜素, 具有广泛的应用价值。β-胡萝卜素酮化酶(BKT)和β-胡萝卜素羟化酶(*CrtR-B*)是虾青素的生物合成途径中的两个关键酶。采用 *La Taq* DNA 聚合酶用 PCR 的方法分别从 pET-28a(+)-*bkt*, pET-28a(+)-*CrtR* 中扩增得到 *bkt* 和 *CrtR-B* 基因, 用 *bkt* 基因替换 pBI221 中的 *GUS* 基因形成含有 CaMV 35S 启动子和 NOS 终止子的 *bkt* 基因表达盒, 然后插入植物表达载体 pCambia1301 的多克隆位点, 再用 *CrtR-B* 基因替换 pCambia1301 中的另一个 *GUS* 基因, 形成 *CrtR-B* 基因表达盒, 最终获得带有抗性基因的双价植物表达载体 pCambia1301-*bkt*-*CrtR*。通过农杆菌 EHA105 介导将其转入花生(花育 23), 获得了经卡那霉素筛选的抗性植株, 通过 PCR 扩增验证, 花生基因组中含有这两个基因。

关键词: 虾青素; *bkt* 基因; *CrtR-B* 基因; 载体构建; 花生

中图分类号: S565.2 **文献标识码:** A **文章编号:** 1004-3268(2007)12-0035-05

Construction of Plant Expression Vector Containing Genes Encoding Two Key Biosynthesis Enzymes of Astaxanthin(*bkt* and *CrtR-B*) and Its Expression in *Arachis hypogaea* L.

XU Jing^{1,2}, YANG Qing-li³, TAN Cong-ping²,
HOU Yan-hua², YU Shan-lin³, QIN Song^{2*}

(1. Jiangsu Key Laboratory of Marine Biotechnology, Huaihai Institute of Technology,

Lianyungang 222005, China; 2. Institute of Oceanology, Chinese Academy of Sciences

Qingdao 266071, China; 3. Shandong Peanut Research Institute, Qingdao 266100, China)

Abstract: Astaxanthin with high antioxidant activity is of great application value. BKT and *CrtR-B* are two key biosynthesis enzymes of astaxanthin, encoded by *bkt* gene and *CrtR-B* gene. *Bkt* gene expression cassette was constructed by replacing *GUS* gene in vector pBI221 with *bkt* gene by PCR method, which contained the CaMV 35S promoter and NOS terminator. Plant expression vector pCambia1301-*bkt*-*CrtR* with binary gene was constructed by inserting *bkt* gene expression cassette into multiple cloning site and replacing *GUS* gene with *CrtR-B* gene in vector pCambia1301. *Bkt* gene and *CrtR-B* gene were transferred into peanut mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and under the pressure of Kanamycin selection, the kanamycin resistant transformants were achieved. The PCR amplification confirmed that *bkt* gene and *CrtR-B* gene had been integrated into the peanut genome successfully.

Key words: Astaxanthin; *bkt* gene; *CrtR-B* gene; Plant expression vector; Peanut

收稿日期: 2007-06-04

基金项目: 国家“863”项目(2004AA241150); 青岛市自然科学基金项目(05-1-JC-92)

作者简介: 徐 静(1978-), 女, 江苏连云港人, 助理实验师, 主要从事功能基因高效表达研究。

通讯作者: 秦 松(1968-), 男, 山东曲阜人, 研究员, 主要从事藻类基因工程研究。

虾青素 (astaxanthin) 是一种氧化型类胡萝卜素, 是近年来才走进应用研发领域的高价值生物活性物质。最新的药理学和生理学研究发现它具有强大的生物抗氧化活性, 被称为“超级维生素 E”^[1, 2]。此外还具有促进抗体产生, 增强免疫力, 抗紫外线辐射, 抗癌症, 防止皮肤衰老, 维护眼睛及中枢神经系统健康等多种生理功能^[3, 4]。目前虾青素的生物合成途径已被阐明^{5~7]}, 虾青素是由 β-胡萝卜素 C₃, C₃' 和 C₄, C₄' 分别经过羟基化和酮基化最终形成的。其中 β-胡萝卜素酮化酶 (BKT) 和 β-胡萝卜素羟化酶 (CrtR-B) 是分别控制 β-胡萝卜素的酮基化和羟基化过程的关键酶。

编码这两个关键酶的多个基因已分别从细菌、植物、藻类和真菌的细胞中克隆出来, 这使得运用代谢工程手段在高等植物中合成生产大量天然虾青素成为可能, 现在已经有科研人员在这一领域进行了尝试。Mann 等^[8] 将从单细胞藻类雨生红球藻 (*H. pluvialis*) 中克隆的 β-胡萝卜素酮化酶基因与番茄 *pds* 基因启动子结合转入烟草后, 植株叶片中类胡萝卜素成分及含量没有改变, 但在花的蜜腺有色体中积累了高浓度的虾青素, 使花的颜色从黄变红。结构分析显示, 转基因烟草形成的虾青素与雨生红球藻形成的天然虾青素具有相同的空间螺旋特性。Ralley 等^[9] 将 β-胡萝卜素酮化酶和羟化酶基因与导肽融合, 并在烟草花叶病毒的 (CaMV) 35S 启动子的驱动下转入番茄和烟草, 也成功地在番茄及烟草的叶片中得以表达。

目前, 高等植物中虾青素转基因技术主要集中在烟草和番茄等植物, 对花生的研究鲜有报道。花生是世界上主要的油料作物和经济作物。近年来, 我国花生生产发展迅速, 总产量已经位居世界首位, 对我国农业生产和国民经济发展起到了重要的作用^[10, 11]。利用基因工程途径提高花生种子及制品的虾青素含量, 可改善花生的品质, 提高花生的营养价值, 增强花生的特用性。花生体内不合成虾青素, 但存在虾青素合成的前体物质 β-胡萝卜素, 为此本研究将 *bkt* 基因和 *CrtR-B* 基因构建到同一植物表达载体上获得双价植物表达载体 pCAMBIA1301-*bkt*-*CrtR*, 并通过冻融法转化农杆菌 EHA105, 由其介导转化花生, 获得转基因植株, 为进一步研究和利用虾青素代谢工程改良花生品质打下基础。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 供试花生 (*Arachis hypogaea*

L.) 品种为花育 23, 由山东省花生研究所提供。剥取花生种子完整的成熟胚, 70% 酒精消毒 1 min, 0.1% HgCl₂ 消毒 6 min, 无菌水洗 4 次, 用无菌水浸泡 16~18 h。将浸泡的胚在无菌条件下切取胚生长点, 接于 A 固体培养基 (成分见表 1) 上, 预培养 4 d。

表 1 植物培养基成分

培养基编号	成分
MSB	MS 无机盐+B ₅ 有机物+30 g/L 蔗糖+0.7% 琼脂, pH 5.8
A	MSB + 4 mg/L 6-BA + 1 mg/L NAA
B	MSB + 1 mg/L 6-BA + 0.5 mg/L KIN + 2 mg/L IAA

1.1.2 菌种和质粒 β-胡萝卜素酮化酶基因 (*bkt*) 和 β-胡萝卜素羟化酶基因 (*CrtR-B*) 由本实验室克隆并已连接于 pET-28a(+) 载体中, 分别为 pET-28a(+)-*bkt*, pET-28a(+)-*CrtR*。大肠杆菌 (*E. coli*) TOP10, 质粒载体 pBI221、植物表达载体 pCAMBIA1301 和根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105 由本实验室保存。

1.1.3 试剂和培养基 所有 DNA 限制性内切酶, T₄DNA 连接酶, *La Taq* DNA 聚合酶, *Taq* DNA 聚合酶, DNA 分子量 Marker λDNA/EcoRI + Hind III 均购自大连 Takara 公司, 小量质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒、植物总基因组提取试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司。LB, YEB 培养基配方参照《分子克隆实验指南》(第 3 版)^[12]; 其他常规试剂均为分析纯。

1.2 方法

1.2.1 *bkt* 基因的扩增 根据载体 pET-28a(+)-*bkt* 基因的碱基序列设计 1 对引物, 并在上游引物和下游引物的 5' 端分别引入 *Bam*H I 和 *Sac* I 酶切位点。由上海 Sangon 合成。P₁: 5'-AAAG-GATCCATGCACGTCGCATC-3', P₂: 5'-AAC-GAGCTCTCATGCCAAGGCAG-3'。PCR 扩增反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 59 °C 退火 1 min, 72 °C 延伸 1.5 min, 循环 35 次; 72 °C 继续延伸 10 min。

1.2.2 *CrtR-B* 基因的扩增 根据载体的 pET-28a(+)-*CrtR* 基因的碱基序列设计 1 对引物, 并在上游引物和下游引物的 5' 端分别引入 *Bgl* II 和 *Bst* E II 酶切位点。由上海生工生物工程技术服务有限公司合成。P₃: 5'-CCCAGATCTATGCT-GTCGAAGCTGC-3', P₄: 5'-AAAGGTCAC-CCTACCGCTTGGACCA-3'。PCR 扩增反应条件: 95 °C 预变性 5 min; 94 °C 变性 1 min, 63 °C 退火

1min, 72℃延伸 1.5min, 循环 35 次; 72℃继续延伸 10min。

1.2.3 双价植物表达载体 pCAMBIA1301-*bkt*-*CrtR* 的构建、质粒的提取、酶切、连接、转化等具体操作方法参照文献[12] 进行。

利用 PCR 的方法以质粒 pET-28a(+)-*bkt* 为模板, 用引物组合 P₁/P₂ 和 *La Taq* DNA 聚合酶进行 PCR 扩增得到含有 *Bam*H I 和 *Sac* I 酶切位点的约 963bp 的 *bkt* 基因片段, 用 *Bam*H I, *Sac* I 双酶切后回收。质粒 pBI221 用 *Bam*H I, *Sac* I 双酶切后回收的大片段和回收后的 *bkt* 基因片段用 T₄DNA 连接酶连接获得载体 pBI221-*bkt*, 再用 *Hind* III, *Eco* RI 双酶切后回收约 2kb 的小片段, 与植物表达载体 pCAMBIA1301 也用 *Hind* III *Eco* RI 双酶切后回收的大片段连接并转化大肠杆菌 TOP10, 获得载体 pCAMBIA1301-*bkt*。

利用 PCR 的方法以质粒 pET-28a(+)-*CrtR* 为模板, 用引物组合 P₃/P₄ 和 *La Taq* DNA 聚合酶进行 PCR 扩增得到含有 *Bgl* II 和 *Bst* E II 酶切位点的约 879bp 的 *CrtR*-*B* 基因片段, 用 *Bgl* II 和 *Bst* E II 双酶切后回收。已经构建好的载体 pCAMBIA1301-*bkt* 用 *Bgl* II, *Bst* E II 双酶切后回收的大片段和回收后的 *CrtR*-*B* 基因片段用 T₄DNA 连接酶进行连接并转化大肠杆菌 TOP10, 得到载体 pCAMBIA1301-*bkt*-*CrtR* (图 1), 该载体中包含 *bkt* 基因和 *CrtR*-*B* 基因两个完整表达盒(分别含有 CaMV 35S 启动子和 NOS 终止子), 为双价植物表达载体, 筛选标记为 Km。

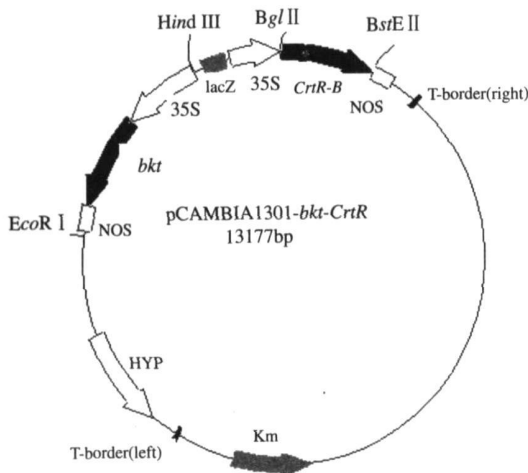


图 1 植物表达载体 pCAMBIA1301-*bkt*-*CrtR*

1.2.4 序列测定 将菌样送上海生工生物工程技术服务有限公司进行双向测序, 证明 *bkt* 基因和 *CrtR*-*B* 基因两个完整表达盒的序列完全正确后

进入下一步。

1.2.5 转化根癌农杆菌 EHA105 提取 pCAMBIA1301-*bkt*-*CrtR* 质粒, 采用冻融法^[13] 转化感受态农杆菌 EHA105, 涂布于含有利福平 (50 mg/L)、卡那霉素 (50mg/L) 的固体 YEB 培养基皿上, 28℃暗培养 48h。挑取单菌落采用带有相同抗生素的 YEB 液体培养基培养, 采用 PCR 法用引物组合 P₁/P₂ 对 *bkt* 基因以及用引物组合 P₃/P₄ 对 *CrtR*-*B* 基因分别进行检测, 双阳性克隆即为含有双价植物表达载体的农杆菌工程菌株 EHA105/pCAMBIA1301-*bkt*-*CrtR*。

1.3 双价植物表达载体对花生的遗传转化

转化方法参照文献[14] 略作修改。接种农杆菌 EHA105/pCAMBIA1301-*bkt*-*CrtR* 单克隆在 5mL 含利福平 (50mg/L)、卡那霉素 (50mg/L) 的 YEB 液体培养基中, 28℃, 200r/min 振荡培养过夜, 取 1mL 移入 25mL YEB 液体培养基中继续培养至 OD₆₀₀ 为 0.65 左右, 6000r/min 离心 15min 后, 用 A 液体培养基悬浮至 OD₆₀₀ = 0.65。将预培养的受体材料放入该悬浮液中 15min, 取出用无菌滤纸吸干表面液体, 接于 A 固体培养基上, 光照 16h/d, 28℃共培养。共培养 4d 后, 外植体用无菌水洗 4 次, 在含头孢霉素 (650mg/L) 的 MSB 液体培养基中振荡杀菌 6h, 吸干表面水分, 转接在含头孢霉素 (500mg/L)、卡那霉素 (100mg/L) 的 A 固体培养基上筛选并诱导再生芽。诱导形成的芽转入含头孢霉素 (250mg/L)、卡那霉素 (100mg/L) 的 B 固体培养基上继续筛选并促进芽伸长形成无根苗。

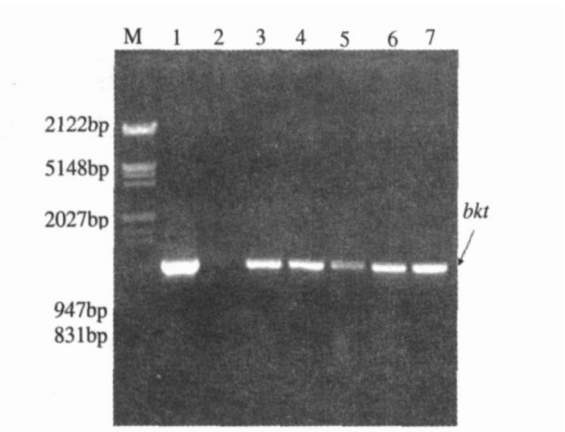
1.4 转基因花生植株 DNA 的提取及 PCR 鉴定

用小量抽提植物总基因组的方法^[15] 提取花生总 DNA, 以总 DNA 为模板进行 PCR 扩增。引物与扩增反应条件同 1.2.1 和 1.2.2。

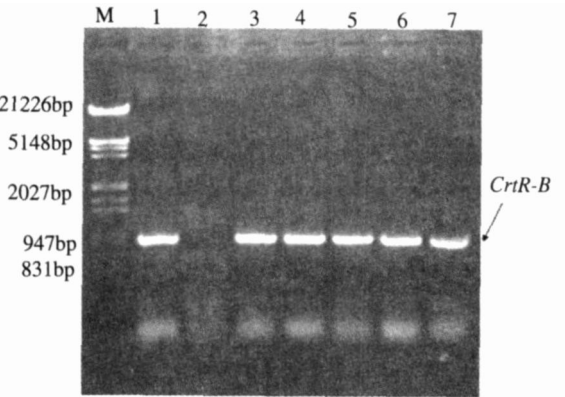
2 结果与分析

2.1 双价植物表达载体 pCAMBIA1301-*bkt*-*CrtR* 的检测

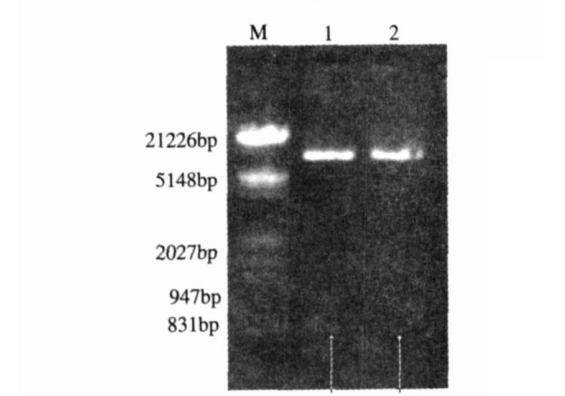
载体 pCAMBIA1301-*bkt* 用 *Bgl* II, *Bst* E II 双酶切后回收的大片段和回收后的 *CrtR*-*B* 基因片段连接并转化大肠杆菌 TOP10, 按 1.2.1 和 1.2.2 的方法进行扩增, 挑选两个基因都检测为阳性的单克隆 (图 2、图 3)。进一步酶切鉴定显示 (图 4), pCAMBIA1301-*bkt*-*CrtR* 经 *Bam*H I, *Sac* I 双酶切产生 963bp 一条带, 经 *Bgl* II, *Bst* E II 双酶切产生 879bp 一条带, 说明 *bkt* 基因和 *CrtR*-*B* 基因已



M. Marker (λ DNA/ *Eco*RI + *Hind*III); 1. 阳性对照; 2. 阴性对照; 3~7. pCAMBIA1301-*bkt*-*CrtR* 中 *bkt* 基因的 PCR 检测



M. Marker (λ DNA/ *Eco*RI + *Hind*III); 1. 阳性对照; 2. 阴性对照; 3~7. pCAMBIA1301-*bkt*-*CrtR* 中 *CrtR-B* 基因的 PCR 检测

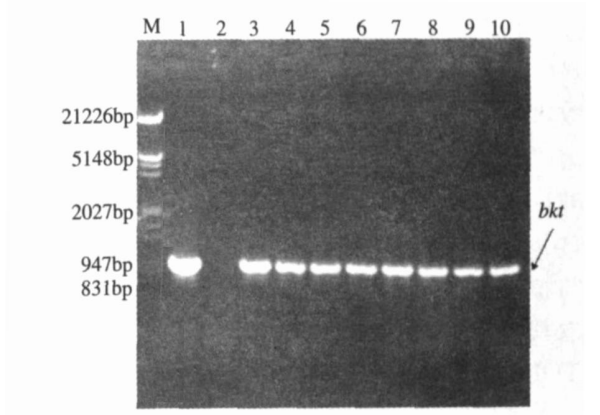


M. Marker (λ DNA/ *Eco*RI + *Hind*III); 1. pCAMBIA1301-*bkt*-*CrtR* 用 *Bam*HI, *Sac*I 双酶切结果; 2. pCAMBIA1301-*bkt*-*CrtR* 用 *Bgl*II, *Bst*EII 双酶切结果

图 4 表达载体 pCAMBIA1301-*bkt*-*CrtR* 的酶切分析成功克隆到 pCAMBIA1301 中。

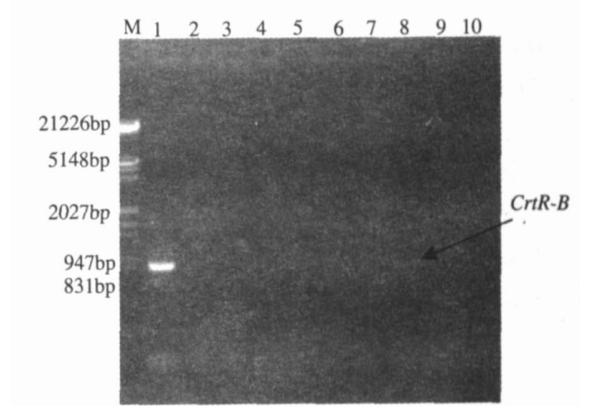
2.2 双价植物表达载体向花生的导入及 PCR 检测
由农杆菌菌株 EHA105 介导转化花生(花育 23), 通过 100mg/L 卡那霉素筛选共获得再生花生

植株 35 株。以重组质粒 pCAMBIA1301-*bkt*-*CrtR* 为阳性对照, 未转化植株的为阴性对照, 各取 1 μ L DNA 为模板, 分别进行 *bkt* 基因和 *CrtR-B* 基因的 PCR 扩增。其中有 8 株 *bkt* 基因检测为阳性(图 5), 未检测到仅有 *CrtR-B* 基因阳性的植株, 而 *bkt* 基因和 *CrtR-B* 基因检测都为阳性的仅有 1 株(图 6, 8 道)。



M. Marker (λ DNA/ *Eco*RI + *Hind*III); 1. 阳性对照; 2. 阴性对照; 3~10. 转基因植株

图 5 转基因植株中 *bkt* 基因的 PCR 检测



M. Marker (λ DNA/ *Eco*RI + *Hind*III); 1. 阳性对照; 2. 阴性对照; 3~10. 转基因植株

图 6 转基因植株中 *CrtR-B* 基因的 PCR 检测

3 讨论

经 PCR 检测的抗性植株中, *bkt* 基因检测为阳性的有 8 株, 其中 *bkt* 基因和 *CrtR-B* 基因同时检测为阳性的植株有 1 株, 未检测到仅有 *CrtR-B* 基因阳性的植株。推测可能携带双基因的 T-DNA 片段整合进入花生基因组时, *CrtR-B* 基因被剪切, 或发生了重组, 但具体原因仍在分析之中。PCR 阳性植株的虾青素含量检测也正在进行中。

近年来, 随着花生基因工程研究的不断深入, 将基因转化应用于花生品种改良的研究取得了一定进展, 其中以抗病、抗虫的转基因改良研究居多, 如: 番

茄斑萎病毒外壳蛋白基因^[16, 17], *BtCryIA (c)* 基因^[18], *CpTI* 基因^[19], 抗除草剂的 *bar* 基因^[20], 抗真菌病害的几丁质酶基因^[21, 22] 等已成功转入花生栽培品种, 但利用转基因技术进行花生品质改良的研究报道较少。通过转基因手段改善花生的品质, 提高花生的营养价值, 将使花生产业具有更广阔的市场前景。本研究获得了 *bkt* 基因和 *CrtR-B* 基因转化花生植株, 为利用转基因技术提高花生虾青素有效成分的研究及应用提供了重要的材料。

参考文献:

- [1] Nakagawa K, Kang S, Park D, *et al.* Inhibition by beta-carotene and astaxanthin of NADPH-dependent microsomal phospholipid peroxidation[J]. *Nutrit Sci Vitamin*, 1997, 43: 345—348.
- [2] Naguib Y M A. Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids[J]. *Agric Food Chem*, 2000, 48 (1): 150—154.
- [3] Tutujman S A, Wamer W G, Wei R R, *et al.* Rapid liquid chromatographic method to distinguish wild salmon from aquacultured salmon fed synthetic astaxanthin [J]. *AOAC Int*, 1997, 80: 622—625.
- [4] Nishikawa Y, Minenaka Y, Ichimura M. Physiological and biochemical effects of carotenoid(beta-carotene and astaxanthin) on rat[J]. *Kashien Daigku Kiyu*, 1997, 25: 19—21.
- [5] Cunningham F X, Gantt E. Genes and enzymes of carotenoid biosynthesis in plants[J]. *Annu Rev of Plant Physiol and Plant Mol Biol*, 1998, 49: 557—583.
- [6] Grunewald K, Eckert M, Hirschberg J, *et al.* Phytoene desaturase is localized exclusively in the chloroplast and up-regulated at the mRNA level during accumulation of secondary carotenoids in *Haematococcus pluvialis* (*Volvlcales chlorophyceae*) [J]. *Plant Physiol*, 2000, 122: 1261—1268.
- [7] Grunewald K, Hirschberg J, Hagen C. Ketocarotenoid biosynthesis outside of plastids in the unicellular green alga *Haematococcus pluvialis* [J]. *J Biol Chem*, 2001, 276(8): 6023—6029.
- [8] Mann V, Hacker M, Pecker I, *et al.* Metabolic engineering of astaxanthin production in tobacco flowers [J]. *Nat Biotechnol*, 2000, 18: 888—892.
- [9] Ralley L, Enfissi E M A, Misawa N, *et al.* Metabolic

engineering of ketocarotenoid formation in higher plants[J]. *The Plant Journal*, 2004, 39: 477—486.

- [10] 翁跃进. 植物组培技术在花生育种方面的应用[J]. *中国油料*, 1989(1): 86—89.
- [11] 周桂元, 梁炫强, 李一聪, 等. 花生遗传转化的研究[J]. *花生科技*, 1998(3): 7—9.
- [12] 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 W D. 分子克隆实验指南[M]. 3 版. 黄培堂, 王嘉玺, 朱厚础, 等译. 北京: 科学出版社, 2002.
- [13] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2002.
- [14] 刘凤珍. Rs-afp1 基因和 γ -tmt 基因转化花生及高效遗传转化体系的研究[D]. 泰安: 山东农业大学, 2004.
- [15] Horsch R B, Fry J E, Hoffman N L, *et al.* A simple and general method for transferring genes into plants [J]. *Science*, 1985, 227: 1229—1231.
- [16] Li Z, Jarret R L, Demski J W. Engineered resistance to tomato spotted wilt virus in transgenic peanut expressing the viral nucleocapsid gene[J]. *Transgenic Research*, 1997, 6: 297—305.
- [17] Yang H, Singsit C, Wang A, *et al.* Transgenic peanut plants containing a nucleocapsid protein gene of tomato spotted wilt virus show divergent levels of gene expression[J]. *Plant Cell Report*, 1998, 17: 693—699.
- [18] Singsit C, Adang M J, Lynch R E, *et al.* Expression of a *Bacillus thuringiensis cryIA(c)* gene in transgenic peanut plants and its efficacy against lesser cornstalk borer[J]. *Transgenic Research*, 1997, 6: 169—176.
- [19] 徐平丽, 单雷, 柳展基, 等. 农杆菌介导抗虫基因的花生遗传转化及转基因植株的再生[J]. *中国油料作物学报*, 2003, 25(2): 5—8.
- [20] Brar G S, Cohen B A, Vick C L, *et al.* Recovery of transgenic peanut(*Arachis hypogaea* L.) plants from elite cultivars utilizing ACCELL technology[J]. *The Plant Journal*, 1994, 5(5): 745—753.
- [21] Rihini V K, Rao K S. Transformation of peanut (*Arachis hypogaea* L.) with tobacco chitinase gene: variable response of transformants to leaf spot disease[J]. *Plant Science*, 2001, 160(5): 889—898.
- [22] 单世华, 李春娟, 刘思衡, 等. 以农杆菌为介导花生遗传转化研究[J]. *中国油料作物学报*, 2003, 25(1): 9—12.