

## 研究报告 Original Papers

## 过量表达GLOase导致转基因拟南芥中维生素C含量和抗逆能力提高

李坤岚<sup>1</sup>, 郭新波<sup>1</sup>, 康以萌<sup>1</sup>, 孙小芬<sup>1</sup>, 唐克轩<sup>1,2,\*</sup><sup>1</sup>复旦大学生命科学学院遗传工程国家重点实验室, 复旦-交大-诺丁汉植物生物技术研发中心, 上海200433; <sup>2</sup>上海交通大学农业与生物学院植物生物研究中心, 上海200240

**摘要:** *L*-古洛糖酸-1,4-内酯氧化酶(*L*-gulono-1,4-lactone oxidase, GLOase)是维生素C合成途径中最后一步关键酶, 小鼠(*Mus musculus*)编码GLOase的*gulo*基因转化拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)的转基因株系中维生素C含量最高为5.74  $\mu\text{mol}\cdot\text{g}^{-1}$  (FW), 是野生型的3.46倍、转p2301空载体对照的3.19倍。30%聚乙二醇(PEG-6000)模拟干旱胁迫的不同时间梯度中, 幼苗期转基因拟南芥丙二醛含量低于同样处理下野生型和对照组拟南芥。不同NaCl浓度的盐胁迫下, 转基因拟南芥在子叶期比野生型、对照组平均根长更长、侧根发育更好; 幼苗期莲座叶长势更好、丙二醛含量更低。结果显示过量表达GLOase的转基因拟南芥在维生素C含量提高的同时, 抗胁迫能力有所增强。

**关键词:** 维生素C; 拟南芥; *L*-古洛糖酸-1,4-内酯氧化酶; 干旱胁迫; 盐胁迫

Increase of Vitamin C Level and Stress Tolerance of Transgenic *Arabidopsis thaliana* Overexpressing GLOaseLI Kun-Lan<sup>1</sup>, GUO Xin-Bo<sup>1</sup>, KANG Yi-Meng<sup>1</sup>, SUN Xiao-Fen<sup>1</sup>, TANG Ke-Xuan<sup>1,2,\*</sup><sup>1</sup>State Key Laboratory of Genetic Engineering, School of Life Sciences, Fudan-SJTU-Nottingham Plant Biotechnology R&D Center, Fudan University, Shanghai 200433, China; <sup>2</sup>Plant Biotechnology Research Center, School of Agriculture and Biology, Shanghai Jiao Tong University, Shanghai 200240, China

**Abstract:** *L*-gulono-1,4-lactone oxidase (GLOase) was the last key enzyme in native vitamin C synthesis. *Gulo* which encoded GLOase in mice (*Mus musculus*) was transformed into *Arabidopsis thaliana*. Transgenic *A. thaliana* overexpressing GLOase accumulated vitamin C which was 3.46-fold of WT and 3.19-fold of p2301 blank transformed control. During 30% PEG-6000 mocked drought stress, lower malondialdehyde (MDA) content was witnessed in young transgenic *A. thaliana* plants, which was a demonstration of better anti-drought ability. NaCl salt stress assay showed the enhanced salt tolerance of transgenic *A. thaliana* plants concerning root development and MDA level. The results indicated that overexpressing GLOase increased vitamin C level and stress tolerance of transgenic *A. thaliana* plants.

**Key words:** vitamin C; *Arabidopsis thaliana*; *L*-gulono-1,4-lactone oxidase; drought stress; salt stress

维生素C (*L*-ascorbic acid, AsA)是植物抗氧化系统中非酶抗氧化物质的重要成员之一。它协同相关作用酶清除植物在正常生理状态、干旱、盐渍等逆境胁迫中产生的活性氧(reactive oxygen species, ROS), 保护机体免受氧化损伤(Conklin和Barth 2004; Pavet等2005)。人类及部分动物由于自身缺乏有活性的*L*-古洛糖酸-1,4-内酯氧化酶(*L*-gulono-1,4-lactone oxidase, GLOase, EC 1.1.3.8), 无法正常合成维生素C, 必须通过日常饮食补充(Chatterjee 1973; Roig等1993; Nishikimi和Yagi 1994; Inai等2003)。研究高等植物维生素C的合成与代谢对提高植物的特殊营养品质和抵御胁迫能

力, 均具有重要意义。

前人研究表明过量表达维生素C代谢途径的关键酶, 能提高拟南芥、生菜、烟草等植物的维生素C含量。1963年, Loewus提出植物中存在维生素C合成的古洛糖途径。GLOase是古洛糖途径中最后一步关键酶, 催化*L*-古洛糖酸-1,4-内酯(*L*-gulono-1,4-lactone, GulL)转变为维生素C。Jain和Nessler (2000)用大鼠(*Rattus norvegicus*) *gulo*基因

收稿 2010-12-04 修定 2011-02-07

资助 国家重点基础研究发展计划(973)项目(2007CB108805)。

\* 通讯作者(E-mail: kxtang1@yahoo.com; Tel: 021-65643552)。

转化烟草(*Nicotiana tabacum*)和生菜(*Lactuca sativa*), 获得比未转化组高达4倍和7倍的转基因植株。大鼠(*R. norvegicus*)的GLOase在拟南芥中异源表达能恢复拟南芥*vtc*突变体中维生素C含量(Radzio等2003); 在马铃薯(*Solanum tuberosum*)中异源表达不仅能将维生素C含量提高到转化前的1.41倍, 还能提高抵抗如NaCl、甘露醇等非生物胁迫的能力(Hemavathi等2010)。但用小鼠(*Mus musculus*) GLOase转化拟南芥及获得转基因植株的抗逆能力至今未见报道。

本研究以小鼠*gulo*基因转化拟南芥, 结合HPLC、Real-Time PCR分析转基因拟南芥的维生素C含量及*gulo*基因表达水平, 并通过聚乙二醇(PEG-6000)模拟干旱胁迫和NaCl盐胁迫处理, 从拟南芥子叶期、幼苗期的根长、膜脂过氧化损伤指标丙二醛(malondialdehyde, MDA)含量的变化入手, 探讨转基因拟南芥的抗逆能力。

## 材料与方 法

### 1 实验材料

野生型拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)为Columbia生态型, 转空质粒对照拟南芥为本实验室提供。大肠杆菌DH5 $\alpha$ 、根癌农杆菌EHA105为本实验室提供。带MYC标签的p2301-myc为本实验室保存, 用于*gulo*基因的植物表达载体构建。限制性内切酶和T4 DNA连接酶购自NEB公司, PCR DNA聚合酶、RT-PCR试剂盒、荧光定量PCR试剂盒购自宝生物公司(TaKaRa), RNA抽提采用华舜柱离心式小量总RNA抽提试剂盒。

动物材料为小鼠(*Mus musculus*)品系C57BL/6, 由本实验室提供。采用华舜柱离心式小量总RNA抽提试剂盒抽提小鼠肝脏总RNA。参考已经Genbank公布的小鼠L-古洛糖酸-1,4-内酯氧化酶(Gene登录号为20380022)编码区序列, 设计引物Gulo\_F (5' ATACTAGTATGGTCCATGGGTACAAAGGGG 3', 下划线部分为SpeI酶切位点)和Gulo\_R (5' TTG-GATCCGTAGAAAACCTTTTCCA 3', 下划线部分为BamHI酶切位点)。

### 2 实验方法

#### 2.1 转基因拟南芥的获得及分子检测

*gulo*基因编码区序列的RT-PCR克隆采用TaKaRa One Step RNA PCR Kit (AMV)试剂盒, 体系

按照说明书配制。反应条件: 50 °C 30 min, 94 °C 2 min; 94 °C 30 s, 56 °C 30 s, 72 °C 90 s, 32个循环; 72 °C 7 min。克隆产物连入pMD18-T simple载体测序。测序正确的质粒经SpeI/BamHI双酶切, 回收1 323 bp *gulo*基因片段, 插入经同样双酶切的载体p2301-myc。

采用EHA105农杆菌介导的浸花法(Zhang等2006)转化拟南芥, 子代种子经过75%和95%酒精分别表面消毒5 min后无菌水洗3次, 均匀铺在含100 mg·L<sup>-1</sup>卡那霉素的1/2MS固体培养基上。4 °C春化3 d, 置于光周期为16 h / 8 h、光照强度为75  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 、温度为(24 $\pm$ 1) °C的状态下萌发, 约1周后移栽至蛭石:草炭:珍珠岩体积比为9:3:1的营养土中。植物基因组DNA的提取和转基因植株的PCR鉴定时, 取0.1 g拟南芥叶片, 置于液氮中速冻, 采用CTAB法提取叶片核基因组DNA。取1  $\mu\text{L}$ 提取的基因组DNA做为模板, 用前述*gulo*基因特异引物Gulo\_F和Gulo\_R进行PCR检测。PCR条件为: 94 °C 5 min; 94 °C 40 s, 55 °C 40 s, 72 °C 90 s, 30个循环; 72 °C 10 min。逐代筛选直至获得纯系。

植物叶片蛋白提取采用液氮速冻后加入5% (W/V) SDS研磨, 沸水浴5 min, 11 000 $\times$ g离心10 min后取上清。SDS-PAGE、Western Blot步骤参照《分子克隆试验指南》(第3版)。碱性磷酸酶标记的羊抗鼠免疫球蛋白、鼠抗MYC蛋白单克隆抗体购自Santa Cruz公司。PVDF膜购自Millipore公司, 检测底物的Western Blue Stabilized Substrate for Alkaline Phosphatase购自Promega公司。

用华舜公司植物总RNA小型抽提试剂盒提取拟南芥RNA。TaKaRa公司 Prime Script RT Reagent Kit试剂盒反转录为cDNA。体系参照说明书, 反应程序为37 °C 15 min, 85 °C 5 s。采用TaKaRa公司SYBR Premix Ex Taq (Perfect Real Time, Lot: BKA504) 试剂盒, Bio-Rad公司i-Cycler定量PCR仪分析不同株系中*gulo*基因表达水平, 用2<sup>- $\Delta\Delta\text{Ct}$</sup> 分析相对表达量的差别。定量PCR引物分别为Gulo-F (5' TGGGACTATGCCATTGGGTTCTA 3')和Gulo-R (5' GCAGTTGAACAGCCAGAAG 3')。以泛素基因作为内参, 引物分别为Ubiquitin\_F (5' TGCGC-TGCCAGATAATACACTATT 3')和Ubiquitin\_R (5' TGCTGCCCAACATCAGGTT 3')。以10倍为梯度稀释模板cDNA, 摸索实时定量 PCR适合的模板浓

度, 并最终以1/10原液浓度的cDNA作为模板, 做3次平行。体系参照说明书, 反应程序为95 °C 30 s, 95 °C 5 s, 60 °C 30 s, 循环40次。

## 2.2 胁迫处理

子叶期盐胁迫处理方法如下。将拟南芥种子播种于含0、50、100、150和200 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl的1/2MS培养基中。萌发8 d后每株系每浓度随机挑选6株拟南芥拍照并用精确到0.5 mm钢尺测量根部长度, 再过6 d后每株系每浓度随机挑选6株拍照纪录其侧根发育情况。

幼苗期盐胁迫处理方法如下。将拟南芥移栽到土壤中并正常灌溉2周后, 用0、50、100、150和200 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl水溶液每4 d浇灌1次, 处理2周后拍照, 并测定MDA含量。

聚乙二醇(PEG-6000, 北京鼎国)模拟干旱胁迫方法如下。拟南芥移栽到土壤中4周后, 用30%的PEG-6000水溶液分别处理0、90和120 min, 测定MDA含量。

## 2.3 指标测定

用日立公司Hitachi L-2000高效液相色谱仪测定维生素C含量, 色谱柱symmetry shield RP18柱(5 μm, 150×4.6 mm)。流动相为甲醇:0.1%草酸=5:95, 检测波长为245 nm, 柱温为30 °C, 流速为1.0 mL·min<sup>-1</sup>, 外标法定量, 保留时间为2.44 min。生长4周, 取0.01 g新鲜叶片用液氮充分研磨后, 用1 mL 0.1% (W/V)草酸悬浮, 4 °C保存1 h以上。超声处理30 min, 破碎细胞。11 000×g离心10 min, 取上清, 过0.2 μm水性滤膜, 3次重复。

MDA含量测定按照硫代巴比妥酸法(李合生2000; Verma和Dubey 2003), 略有改动。取单位重量拟南芥叶片, 加入4倍体积0.25%硫代巴比妥酸(溶于10%三氯乙酸)溶液后充分研磨, 于95 °C水浴加热30 min, 冰浴快速冷却, 11 000×g离心10 min, 取上清液测定OD<sub>532</sub>、OD<sub>600</sub>和OD<sub>450</sub>。按照下列公式计算MDA浓度, 并换算成单位鲜重叶片的MDA含量: MDA (μmol·L<sup>-1</sup>)=6.45(OD<sub>532</sub>-OD<sub>600</sub>)-0.56OD<sub>450</sub>。

## 结果与讨论

### 1 *gulo*基因的克隆

抽提经饥饿处理的小鼠C57肝脏总RNA (图

1-A), 采用Gulo\_F和Gulo\_R引物对总RNA进行RT-PCR, 获得1 323 bp *gulo*基因片段(图1-B)。将*gulo*插入p2301-myc构建植物表达载体(图2)。

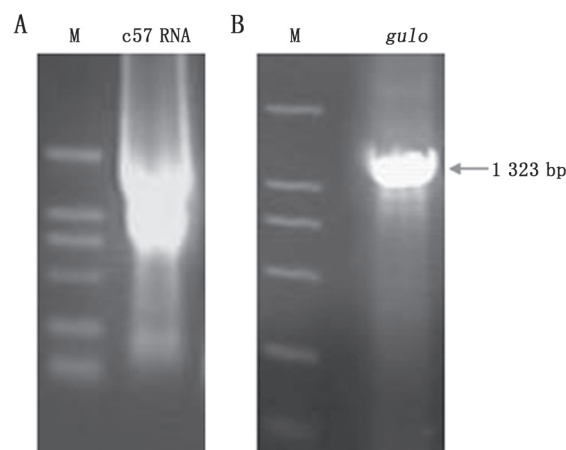


图1 *gulo*基因的分子克隆

Fig.1 Molecular clone of *gulo*

A: 小鼠肝脏总RNA提取; B: RT-PCR克隆*gulo*基因; M: DNA分子量标准, 条带由大到小分别是2 000、1 000、750、500、250和100 bp。



图2 *gulo*表达框

Fig.2 Expression box of *gulo*

### 2 转基因拟南芥PCR和Western Blot鉴定

用农杆菌EHA105介导的浸花法转化拟南芥, 共获得21个独立转化株系。PCR检测21个转基因株系植株总DNA, 均扩增出与目标片段大小一致的条带(图3), 表明外源基因*gulo*成功整合到拟南芥基因组中。对21个株系拟南芥Western Blot分析表明, 带MYC标记的GLOase蛋白在11个株系中有不同丰度的表达(图4)。其中*gulo*-12和*gulo*-21获得纯系, 用于后续分析。

### 3 *gulo*基因表达量与维生素C含量分析

过量表达*gulo*基因拟南芥株系中, 最高为*gulo*-21, 其维生素C含量达到5.74 μmol·g<sup>-1</sup> (FW), 是野生型(WT)的3.46倍, 空质粒转化对照组(CK)的3.19倍(图5)。株系*gulo*-21与*gulo*-12相比, 维生素C含量前者为后者的2.27倍, *gulo*转录水平前者为后者的18.4倍。

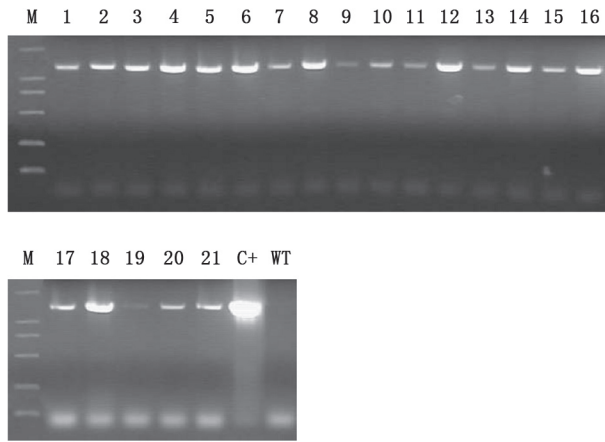


图3 转基因拟南芥PCR鉴定

Fig.3 PCR identification of transgenic *Arabidopsis* plant

PCR 检测转基因拟南芥T<sub>1</sub>代植株gulo基因转入情况。M: DNA分子量标准, 为Takara公司DL2000。WT: 野生型; C+: 质粒p2301-gulo; 1~21: 1~21株系。

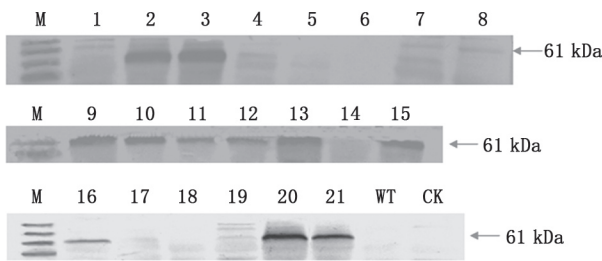


图4 Western Blot检测GLOase表达情况

Fig.4 Western Blot of GLOase

转基因拟南芥T<sub>1</sub>代1~21号植株Western Blot检测GLOase蛋白表达情况。M: 蛋白分子量标准, 为NEB Prestain Marker, 条带由大到小分别为175、80、58、46 kDa。2、3、9~13、15、16、20、21为阳性; WT为野生型, CK为转p2301空载体对照。

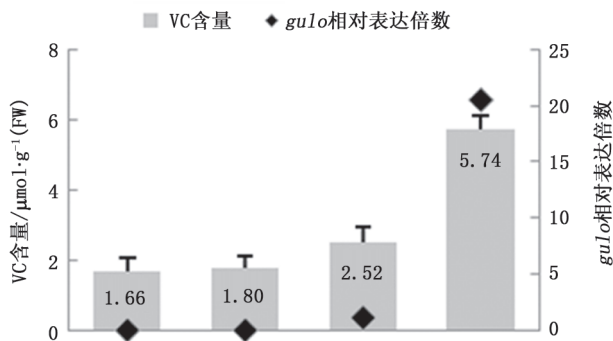


图5 拟南芥维生素C含量及gulo相对转录水平

Fig.5 Vitamin C level and relative *gulo* transcript level of *Arabidopsis*

#### 4 转基因拟南芥抗逆性分析

##### 4.1 抗盐能力

拟南芥种子分别在含0、50、100、150和200 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl的1/2MS培养基中萌发8 d后, 转gulo基因的拟南芥株系平均根长长于WT和对照; 同一处理浓度下WT与对照根长的差异未达到显著水平。在50 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl浓度下, 转gulo基因的拟南芥株系的平均根长显著高于WT ( $P < 0.05$ ); 维生素C含量更高的株系gulo-21根长长于gulo-12, 暗示维生素C含量的提高有助于拟南芥子叶期抗盐能力的增强。100 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl浓度下, 维生素C含量最高的gulo-21相比WT表现出极显著的根长优势( $P < 0.01$ ); 而维生素C含量仅为WT 1.52倍的gulo-12无法有效耐受盐胁迫, 根长与WT差异未达显著水平。150 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl浓度下, 4种基因型拟南芥根长趋于一致, 表明该浓度超出了转基因拟南芥可调节的范围(图6)。在200 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl的1/2MS培养基上, 4种基因型拟南芥均发黄死亡, 表明200 mmol·L<sup>-1</sup> NaCl为拟南芥萌发的致死盐浓度(图未显示)。在萌发14 d时, 侧根生长形态出现明显差异。WT、对照拟南芥侧根数量、长度明显低于gulo-12和gulo-21 (图7)。总之, 提高维生素C含量能够增强拟南芥子叶期对盐胁迫的耐性。

幼苗期拟南芥在各浓度NaCl浇灌下, 维生素C含量更高的gulo-21组叶片生长状态优于gulo-12组, 后者优于WT、对照, 具体表现在相同盐浓度处理下高维生素C含量组叶片更绿、莲座叶叶面

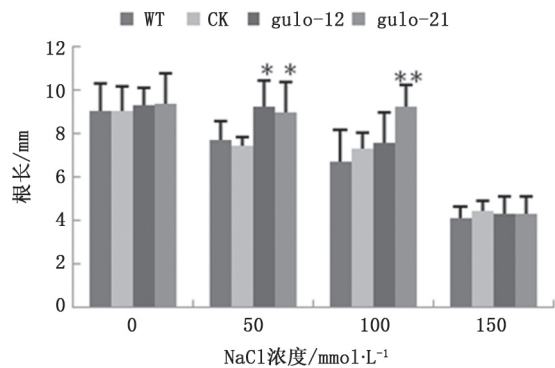


图6 盐胁迫下拟南芥根长

Fig.6 Root length of *Arabidopsis* under salt stress

\*和\*\*分别代表同浓度NaCl处理后各株系根长在 $P < 0.05$ 和 $P < 0.01$ 水平有显著差异。

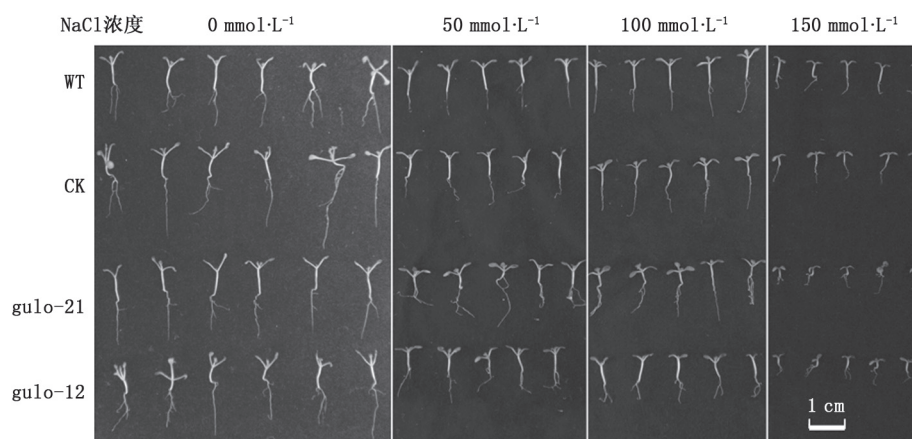


图7 盐胁迫下拟南芥侧根形态  
Fig.7 Lateral roots of *Arabidopsis* under salt stress

积更大、枯黄坏死现象更少(图8), MDA含量更低(图9), 表明提高维生素C含量有助于增强拟南芥子叶期对盐胁迫的耐性。

#### 4.2 抗干旱能力

30% PEG-6000模拟的干旱条件下, 随着时间的推移, WT、对照拟南芥叶片中MDA含量增加量大于转基因拟南芥gulo-12和gulo-21。其中, 高维生素C含量组gulo-21在各取样时间的MDA含量均为最低(图10)。由此可见, 维生素C水平的提高有助于增强拟南芥的耐旱性。

本实验初步探讨了过量表达GLOase对拟南芥维生素C含量的影响及其对增强拟南芥抗逆能

力的作用。我们的研究表明, 过量表达GLOase的拟南芥维生素C含量最高为野生型的3.46倍、转化空载体对照的3.19倍。NaCl模拟盐胁迫实验

NaCl浓度 0 mmol·L<sup>-1</sup> 50 mmol·L<sup>-1</sup> 100 mmol·L<sup>-1</sup> 150 mmol·L<sup>-1</sup>

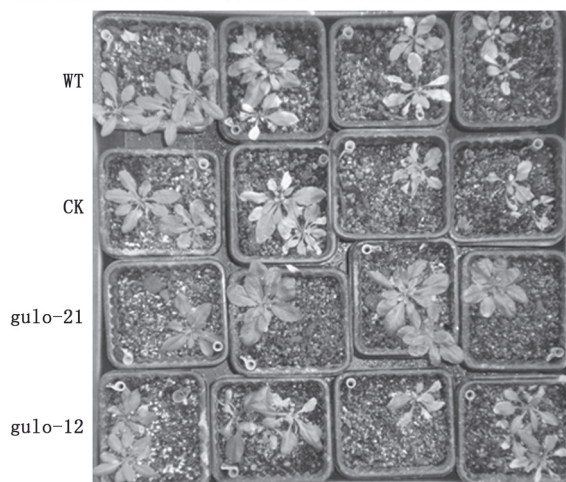


图8 盐胁迫下拟南芥叶片形态  
Fig.8 Leaves of *Arabidopsis* under salt stress

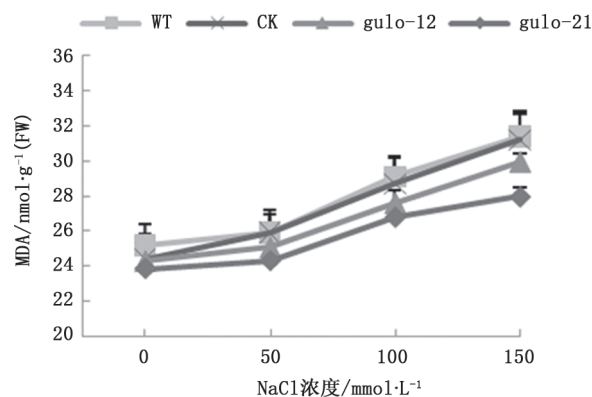


图9 拟南芥幼苗期盐胁迫下MDA含量  
Fig.9 MDA level of *Arabidopsis* under salt stress

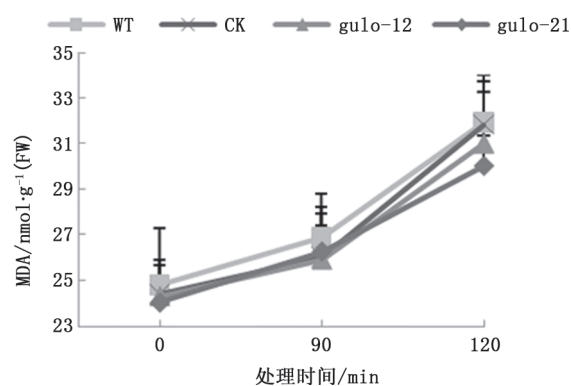


图10 30% PEG-6000处理下拟南芥MDA含量  
Fig.10 MDA level of *Arabidopsis* under 30% PEG-6000

中,子叶期的转基因拟南芥相比于对照平均根长更长,侧根发育更充分;幼苗期的转基因拟南芥莲座叶显著优于对照,并且叶片所含MDA含量更低,暗示了转基因拟南芥的耐盐性有所提高。用30% PEG-6000模拟干旱胁迫,不同时间梯度下转基因拟南芥MDA含量低于同样处理下野生型拟南芥。这表明着转基因拟南芥随着维生素C含量提高抗干旱能力得到增强。在上述两组环境胁迫实验中,通过比较过量表达GLOase的不同转基因株系gulo-12和gulo-21可以发现,随着维生素C含量的提高拟南芥抗胁迫的能力进一步得到了改善。因此,过量表达GLOase对提高拟南芥的维生素C含量和抗胁迫能力有一定的参考价值。

#### 参考文献

- 李合生(2000). 植物生理生化实验原理和技术. 北京: 高等教育出版社, 260~261
- Chatterjee IB (1973). Evolution and the biosynthesis of ascorbic acid. *Science*, 182: 1271~1272
- Conklin PL, Barth C (2004). Ascorbic acid, a familiar small molecule intertwined in the response of plants to ozone, pathogens, and the onset of senescence. *Plant Cell Environ*, 27: 959~970
- Hemavathi, Upadhyaya CP, Akula N, Young KE, Chun SC, Kim DH, Park SW (2010). Enhanced ascorbic acid accumulation in transgenic potato confers tolerance to various abiotic stresses. *Biotechnol Lett*, 32: 321~330
- Inai Y, Ohta Y, Nishikimi M (2003). The whole structure of the human nonfunctional *L*-gulono-gamma-lactone oxidase gene - the gene responsible for scurvy and the evolution of repetitive sequences thereon. *J Nutr Sci Vitaminol*, 49: 315~319
- Jain AK, Nessler CL (2000). Metabolic engineering of an alternative pathway for ascorbic acid biosynthesis in plants. *Mol Breeding*, 6: 73~78
- Loewus FA (1963). Tracer studies on ascorbic acid formation in plants. *Phytochemistry*, 2: 109~128
- Nishikimi M, Yagi K (1991). Molecular basis for the deficiency in humans of gulonolactone oxidase, a key enzyme for ascorbic acid biosynthesis. *Am J Clin Nutr*, 54: 1203~1208
- Pavet V, Olmos E, Kiddle G, Mowla S, Kumar S, Antoniow J, Alvarez ME, Foyer CH (2005). Ascorbic acid deficiency activates cell death and disease resistance responses in *Arabidopsis*. *Plant Physiol*, 139 (3): 1291~1303
- Radzio JA, Lorence A, Chevone BI, Nessler C (2003). *L*-Gulono-1,4-lactone oxidase expression rescues vitamin C-deficient *Arabidopsis* (*vtc*) mutants. *Plant Mol Biol*, 53: 837~844
- Roig MG, Rivera ZS, Kennedy JF (1993). *L*-Ascorbic acid: an overview. *Int J Food Sci Nutr*, 44: 59~72
- Verma S, Dubey RS (2003). Lead toxicity induces lipid peroxidation and alters the activities of antioxidant enzymes in growing rice plants. *Plant Sci*, 164: 645~655
- Zhang XR, Henriques R, Lin SS, Niu QW, Chua NH (2006). *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana* using the floral dip method. *Nat Protoc*, 1: 1~6