

研究报告 Original Papers

转基因香石竹中 *F3'5'H* 基因的克隆、表达和免疫学鉴定白蓝^{1,2}, 贾军伟^{1,*}, 孙建萍¹, 李鹏¹, 赵明文², 潘爱虎^{1,**}¹上海市农业科学院生物技术研究所, 上海市农业遗传育种重点实验室, 农业部转基因植物环境安全监督检验测试中心(上海), 上海 201106; ²南京农业大学生命科学学院, 农业部农业环境微生物工程重点开放实验室, 南京 210095

摘要: 在研究转基因香石竹品系月之霓裳(Moonshade)、月之伊人(Moonlite)中外源基因 *F3'5'H* 的表达中, 本文克隆了 *F3'5'H* 全长基因 1.5 kb, 构建获得工程菌株 *Escherichia coli* BL21(DE3) (+*F3'5'H*)。SDS-PAGE 分析的结果显示, 该菌株高效表达出 *F3'5'H* 重组蛋白, 约占菌体总蛋白的 30%。用纯化的 *F3'5'H* 重组蛋白作为抗原, 制备 *F3'5'H* 重组蛋白的抗血清, 经 ELISA 免疫学分析表明, 该抗血清的效价为 1:25 600。Western blot 结果表明 *F3'5'H* 重组蛋白具有良好的 IgG 结合活性, 且抗血清与转基因香石竹品系月之霓裳和月之伊人中的外源基因 *F3'5'H* 所表达的蛋白发生明显的抗原抗体反应。这样, 月之霓裳和月之伊人用于评价转基因香石竹品系的环境安全性在我国也得到了验证。

关键词: 转基因香石竹; *F3'5'H*; 原核表达; 免疫学鉴定

Cloning, Expression and Immunological Identification of *F3'5'H* Gene in Transgenic Carnation (*Dianthus canpphyllus* Linn.)BAI Lan^{1,2}, JIA Jun-Wei^{1,*}, SUN Jian-Ping¹, LI Peng¹, ZHAO Ming-Wen², PAN Ai-Hu^{1,**}

¹Biotech Research Institute of Shanghai Academy of Agricultural Sciences, Shanghai Key Laboratory of Agricultural Genetics and Breeding, Supervision, Inspection and Test Center for Environment Safety of GM Crops of MOA (Shanghai), Shanghai 201106, China; ²College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Key Lab of Microbiological Engineering of Agricultural Environment, Ministry of Agriculture, Nanjing 210095, China

Abstract: In order to study the expression of exogenous gene *F3'5'H* in transgenic carnation lines Moonshade and Moonlite, the full-length *F3'5'H* gene of 1.5 kb was cloned, and the strain *Escherichia coli* BL21(DE3) (+*F3'5'H*) was obtained. SDS-PAGE analysis showed that the high-level expressed recombinant protein *F3'5'H* was detected and the expression level was almost 30% of the total protein. The recombinant protein was used as antigen to obtain the antiserum. And the immunological analysis of ELISA showed the antiserum titer was 1:25 600. Western blot analysis indicated that the recombinant protein *F3'5'H* could combine with sera IgG, and the antiserum showed specific immunological response to the *F3'5'H* protein extracted from Moonshade and Moonlite.

Key words: transgenic carnation (*Dianthus canpphyllus*); *F3'5'H*; prokaryotic expression; immunological identification

蓝色花的色素苷类型主要是飞燕草色素苷及其衍生物, 即 3',5'-羟基花色苷。在花色苷的合成途径中, 类黄酮-3',5'-羟基化酶(flavonoid-3',5'-hydroxylase, *F3'5'H*)是合成3',5'-羟基花色苷的关键酶, 也称为蓝色基因(blue gene) (Holton 等 1993)。自然界中, 大多数天然蓝色花是由于 *F3'5'H* 基因的有效表达所致。因此, 通过导入 *F3'5'H* 基因来补充某些花卉缺少合成蓝色色素的能力已成为现在采用基因工程技术创造蓝色花卉的途径之一。

香石竹不具有 *F3'5'H* 基因(张石宝等 2001), 因此自然界中不存在蓝色康乃馨。澳大利亚 Florigene 公司和日本三得利公司(Suntory)从杂交矮牵牛中克隆到二氢黄酮醇-4-还原酶(dihydroflavonol-4-

reductase, DFR)基因和 *F3'5'H* 基因, 构建载体 pCGP1470 (Holton 2000), 并通过农杆菌介导转化白色的香石竹品种 'FE123', 经筛选获得了花色呈蓝紫色的转基因香石竹(Raghothama 等 1991; Park 等 1992)。月之霓裳(Moonshade)、月之伊人(Moonlite)是其中的两个品系。作为第一例商业化的转基因花卉, 这两个品系已获准在美国、加拿大、澳大利亚、日本、哥伦比亚、厄瓜多尔和欧盟等国家或地区进行种植或释放, 在我国也进行

收稿 2009-07-30 修定 2009-12-30

资助 上海市科技兴农重点攻关项目(沪农科攻字 2008 第 8-9 号)。
* 与第一作者同等贡献。

** 通讯作者(E-mail: aihup@yahoo.com.cn; Tel: 021-62208750)。

了环境安全性评价的中间试验。

本文对转基因香石竹月之霓裳和月之伊人中的外源基因 *F3'5'H* 进行了克隆、表达、纯化和免疫学鉴定,为转基因香石竹遗传稳定性研究提供了分子生物学数据,并为其用于进行环境安全性评价建立了基础。

材料与方法

转基因香石竹(*Dianthus caryophyllus* Linn.)品系月之霓裳(Moonshade)、月之伊人(Moonlite)及其亲本非转基因香石竹品系 FE123 的插条由澳大利亚 Florigene 公司提供,经扦插生根后种植于上海市农业科学院白鹤基地(农业部转基因植物环境安全评价试验基地)的大棚中,同时种植本地非转基因香石竹品系兰贵人作为对照。以不同品系的香石

竹花朵为试验材料,用离心柱式DNA抽提试剂盒提取基因组 DNA。

构建的质粒 pCGP1470 (图1)中含有来源于矮牵牛的 *F3'5'H* 基因,根据这一基因的全长序列设计一对PCR引物,上游引物序列: 5' CGGGATCCA-TGATGCTACTTACTGAGCT 3', 下游引物序列: 5' CGGAATTCTTGTAACCTTGGAGTAACCA 3', 并在上游引物中引入 *Bam*HI 限制性内切酶位点,在下游引物中引入 *Eco*RI 限制性内切酶位点。以月之霓裳和月之伊人的基因组 DNA 为模板,采用 *pfu* DNA 聚合酶扩增出 *F3'5'H* 全长基因。PCR 反应条件如下: 94 °C 中变性 4 min, 然后按 94 °C 30 s、58 °C 1 min、72 °C 2 min 进行 35 轮的循环反应,最后在 72 °C 下延伸 10 min。Taq DNA 聚合酶加尾。

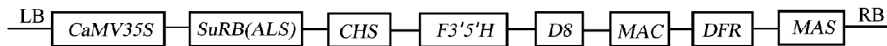


图1 pCGP1470 质粒构建示意图

Fig.1 Schematic diagram of plasmid pCGP1470

LB 和 RB: 根癌农杆菌章鱼碱菌株的 Ti 质粒的左边界和右边界; *CaMV35S*: 花椰菜花叶病毒 35S 启动子; *SuRB(ALS)*: 烟草的乙酰胺合成酶(ALS)基因; *CHS*: 金鱼草查尔酮合酶(CHS)基因启动子; *F3'5'H*: 矮牵牛类黄酮 3'5'-羟化酶基因; *D8*: 来源于杂交矮牵牛转脂蛋白终止子; *MAC*: 花椰菜花叶病毒 35S 启动子的增强子序列和农杆菌甘露碱合成酶基因启动子; *DFR*: 矮牵牛二氢黄酮醇 4-还原酶基因; *MAS*: 农杆菌甘露碱合成酶基因启动子。

PCR 扩增得到的特异性片段用捷瑞生物的 GenClean 琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒回收,宝生物工程(大连)有限公司 pMD18-T 载体连接, *Escherichia coli* DH5 α 转化,经 Amp 抗性筛选,随机挑选克隆进行 PCR 鉴定为阳性后,由上海英骏生物技术有限公司完成测序。

参照 Sambrook 等(1995)书中的方法完成质粒的提取和纯化、限制性内切酶反应,将 *F3'5'H* 基因连接到 pET28a(+)表达载体上,转化到大肠杆菌 BL21(DE3)中,挑选阳性克隆,保存大肠杆菌 BL21(DE3) (+*F3'5'H*)工程菌株。

大肠杆菌 BL21(DE3)(+*F3'5'H*)工程菌株经 IPTG 诱导处理 3 h 后,离心(3 500 \times g, 5 min)收集菌体,用重悬液(50 mmol \cdot L $^{-1}$ 、50 mmol \cdot L $^{-1}$ 葡萄糖、1 mmol \cdot L $^{-1}$ EDTA, pH7.9)悬浮,加入 40 mg 溶菌酶,冰上放置 30 min,再经超声波破碎,将破碎的溶液进行离心(1 500 \times g, 10 min),用溶液 I [0.2 mol \cdot L $^{-1}$ NaCl、1% 脱氧胆碱、1% NP-40、50 mmol \cdot L $^{-1}$

Tris (pH 7.5)和 1 mmol \cdot L $^{-1}$ EDTA]洗沉淀 2 次,每次 50 mL,离心(1 500 \times g, 10 min),弃去上清液。用溶液 II [1% TritonX-100、50 mmol \cdot L $^{-1}$ Tris (pH 7.5)和 1 mmol \cdot L $^{-1}$ EDTA]洗沉淀 2 次,每次 50 mL,离心(1 500 \times g, 10 min),弃去上清液。用双蒸水洗沉淀 2 次,离心(1 500 \times g, 10 min),弃去上清液。用溶液(8 mol \cdot L $^{-1}$ 尿素、0.5% SDS)溶解重组蛋白,加等体积的 1 \times SDS 凝胶加样缓冲液(50 mmol \cdot L $^{-1}$ Tris, pH 6.8、100 mmol \cdot L $^{-1}$ 二硫苏糖醇、2% SDS、0.1% 溴酚蓝和 10% 甘油),放入沸水浴中 5 min 后加样,以 15% SDS-PAGE 分析。

将重组蛋白与弗氏完全(或不完全)佐剂充分混匀后,免疫新西兰大白兔。首次免疫 2 周后,隔周加强免疫,共免疫 4 次。末次免疫后 1 周,颈动脉放血,血液于 4 °C 冰箱放置过夜后,析出的透明、淡黄色血清即为 *F3'5'H* 重组蛋白的多克隆抗体。

F3'5'H 重组蛋白的多克隆抗体进行 ELISA 检测时,将重组蛋白用包被液稀释至 5 μ g \cdot mL $^{-1}$,向酶

标板中每孔加入 200 μ L, 于 4 $^{\circ}$ C 下包被过夜。经封闭洗涤后加入 200 μ L 稀释的兔抗血清, 稀释度分别为: 1:400、1:1 600、1:6 400、1:12 800、1:25 600, 在 37 $^{\circ}$ C 中保温 1 h, 加入 200 μ L 碱性磷酸酶标记的羊抗兔 IgG (1:5 000), 在 37 $^{\circ}$ C 中保温 1 h, 洗涤后加入底物溶液显色 30 min, 终止反应后测定 405 nm 处 OD 值。

月之霓裳和月之伊人花蕾期和盛花期花朵中总蛋白的抽提, 参照萨姆布鲁克等(1995)文中的方法, 对多克隆抗体进行 Western blot 鉴定。以制备的 F3'5'H 重组蛋白的抗血清作为第一抗体, 按 1:

1 000 稀释; 碱性磷酸酶标记羊抗兔 IgG 抗体作第二抗体, 按 1:2 000 稀释使用。

实验结果

1 重组质粒的构建和鉴定

以转基因香石竹的基因组 DNA 为模板用 *pfu* DNA 聚合酶进行 PCR 扩增, 产物大小约 1.5 kb, 与预期大小一致(图 2)。PCR 产物经回收纯化后克隆到 pMD18-T 载体中, 测序结果经 Blast 序列比对表明, 扩增得到的 F3'5'H 基因序列与矮牵牛中的 F3'5'H 基因序列同源性为 100%。

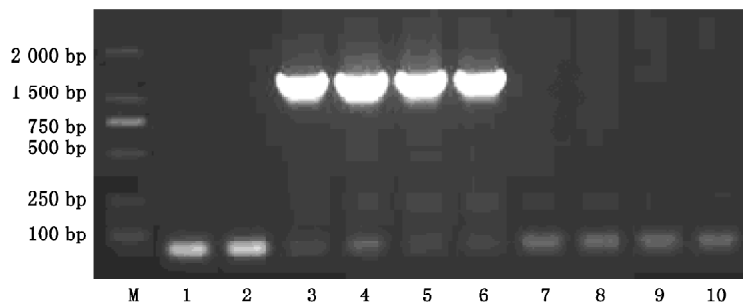


图 2 F3'5'H 全长基因的 PCR 产物的琼脂糖凝胶电泳图谱

Fig. 2 Agarose gel electrophoretogram of PCR products of the full-length F3'5'H gene

M: DNA 分子量标准; 1、2: 空白对照; 3、4: 月之霓裳; 5、6: 月之伊人; 7、8: 亲本 FE123; 9、10: 兰贵人。

另用 *Eco*RI 和 *Bam*HI 将 F3'5'H 从 pMD18-T 载体上切出, 与经同样酶切处理的表达载体 pET28a (+) 连接, 构建重组质粒 pET28a(+)(+F3'5'H), 用 PCR 方法和限制性内切酶酶切鉴定重组质粒的结果与预期一致。

2 重组 F3'5'H 蛋白基因的表达

将 pET28a(+)(+F3'5'H) 导入到表达菌株大肠杆菌 BL21(DE3) 中, 诱导处理后, SDS-PAGE 分析的结果(图 3)表明, 重组 F3'5'H 基因获得高效表达, 该重组蛋白约占菌体总蛋白的 30%, 分子量大小约 58.6 kDa, 与预期的分子量大小一致。

3 F3'5'H 重组蛋白抗血清的免疫学检测

用 F3'5'H 重组蛋白对新西兰大白兔进行免疫, 每次加强免疫后 14 d 采血, 并用 ELISA 反应检测抗体效价的结果表明, 2 只新西兰兔对 F3'5'H 重组蛋白都产生了特异性的免疫反应, 血清中抗体的效价达到 1:25 600。此外, 由 Western blot 鉴定结果(图 4)可见, 在 58.6 kDa 处有非常明显的条带, 表明

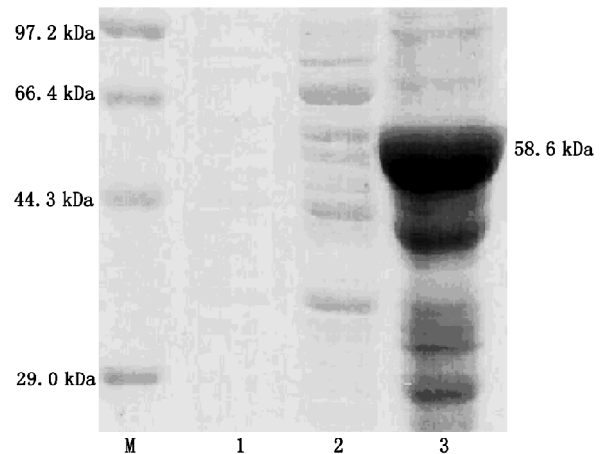


图 3 菌株大肠杆菌 BL21(DE3) 表达的 F3'5'H 重组蛋白的 SDS-PAGE 分析

Fig. 3 SDS-PAGE analysis of F3'5'H recombinant protein expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3)

M: 蛋白质分子量标准; 1: 大肠杆菌 BL21(DE3) (+F3'5'H), 未经 IPTG 诱导; 2: 大肠杆菌 BL21(DE3) (+F3'5'H), 经 IPTG 诱导、超声波破碎后的上清; 3: 大肠杆菌 BL21(DE3) (+F3'5'H), 经 IPTG 诱导、超声波破碎后的沉淀。

F3'5'H重组蛋白具有良好的IgG结合活性,同时抗血清与转基因香石竹外源基因表达的目的蛋白也能够发生特异的抗原抗体反应。

另外,采用 Western blot 检测了 F3'5'H 在转基因香石竹盛花期和花蕾期花中表达的结果(图 5)显示,花蕾期间,花中 F3'5'H 的表达明显高于盛花期。



图4 F3'5'H重组蛋白兔抗血清的 Western blot 检测

Fig.4 Western blot analysis of the rabbit antiserum against F3'5'H recombinant protein

1: 兰贵人花的蛋白; 2: 亲本 FE123 花的蛋白; 3: 月之霓裳花的蛋白; 4: 月之伊人花的蛋白; 5: F3'5'H 包涵体蛋白。



图5 F3'5'H在转基因香石竹中不同花期的表达的 Western blot 检测

Fig.5 Western blot analysis of F3'5'H expressed in different flowering phase of transgenic carnation

1: F3'5'H包涵体蛋白; 2: 月之霓裳盛花期花的蛋白; 3: 月之伊人盛花期花的蛋白; 4: 月之霓裳花蕾期花的蛋白; 5: 月之伊人花蕾期花的蛋白。

讨 论

转基因香石竹品系中的外源F3'5'H基因来源于杂交矮牵牛。有研究表明,矮牵牛作为外源基因的主要来源,具有非常大的优势。将矮牵牛(*Petunia hybrida*)、草原龙胆(*Eustoma russellianum*)和风铃草(*Campanula medium*) F3'5'H基因转入到不含或F3'5'H含量很少的矮牵牛和烟草(*Nicotiana tabacum*)品种中,转化株比其野生型植株能积累更多的飞燕草色素。同时矮牵牛F3'5'H基因在矮牵牛和烟草的转基因研究还发现,转基因的矮牵牛明显比烟草能合成更多的飞燕草色素(Shimada等1999, 2001; Okinaka等2003)。澳大利亚 Florigene 公司和日本 Suntory 公司的研究人员将矮牵牛 F3'5'H 和 DFR 基因导入缺乏DFR的白色香石竹,培育出紫色品种月之清辉'Moondust',成为第一例上市的转基因花卉植物,现已在多个国家生产和销售(Meyer等1987)。随后用同样的技术方法获得转基因香石竹品系月之霓裳(Moonshade)和月之伊人(Moonlite)。

经过多代的扦插繁殖后,从转基因香石竹中克隆得到的F3'5'H基因全长序列与其基因来源杂交矮牵牛的同源性仍为100%,没有出现碱基突变等情况,F3'5'H基因表达正常,表明转基因香石竹遗传比较稳定。

SDS-PAGE分析表明F3'5'H重组蛋白在大肠

杆菌BL21(DE3)中得到了高效表达,并且主要以包涵体的形式存在。本文在研究中发现F3'5'H基因的表达有时间差异性,花蕾期间表达量高,盛花期基本不表达,这与Menting等(1994)研究的矮牵牛花朵微粒体膜上的F3'5'H酶活性随着花朵的发育而改变,以及开花期间和盛开前酶活性最高,但在已开放的花朵中未检测到的结果相符合。

总之,本文通过制备转基因香石竹外源基因目的蛋白的多抗血清,为建立蛋白质检测方法作出了技术储备,同时也为此类研究提供了初步的遗传稳定性分析的分子生物学数据,并为其环境安全性评价建立了基础。

参考文献

- 张石宝, 胡虹, 李树云 (2001). 花卉基因工程研究进展I: 花色. 云南植物研究, 23 (4): 479~487
- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1995). 金冬雁, 黎孟枫译. 分子克隆实验指南(第2版). 北京: 科学出版社
- Holton TA, Brugliera F, Lester DR, Tanaka Y, Hyland CD, Menting JGT, Lu CY, Farcy E, Stevenson TW, Cornish EC (1993). Cloning and expression of cytochrome P450 genes controlling flower colour. *Nature*, 366: 276~279
- Holton TA (2000). Transgenic plants exhibiting altered flower color and methods for producing same. US Patent 6080920
- Menting JGT, Scopes RK, Stevenson TW (1994). Characterization of flavonoid 3', 5'-hydroxylase in microsomal membrane fraction of *Petunia hybrida* flowers. *Plant Physiol*, 106: 633~642
- Meyer P, Heidmann I, Forkmann G, Saedler H (1987). A new

- petunia flower colour generated by transformation of a mutant with a maize gene. *Nature*, 330: 677~678
- Okinaka Y, Shimada Y, Nakano-Shimada R, Ohbayashi M, Kiyokawa S, Kikuchi Y (2003). Selective accumulation of delphinidin derivatives in tobacco using a putative F3'5'H-hydroxylase cDNA from *Campanula medium*. *Biosci Biotechnol Biochem*, 67 (1): 161~165
- Park KY, Drory A, Woodson WR (1992). Molecular cloning of an l-aminocyclopropane-l-carboxylate synthase from senescing carnation flower petals. *Plant Mol Biol*, 18 (2): 377~386
- Raghothama KG, Lawton KA, Goldsbrough PB, Woodson WR (1991). Characterization of an ethylene-regulated flower senescence-related gene from carnation. *Plant Mol Biol*, 17 (1): 61~71
- Shimada Y, Nakano-Shimada R, Ohbayashi M, Okinaka Y, Kiyokawa S, Kikuchi Y (1999). Expression of chimeric P450 genes encoding flavonoid-3', 5'-hydroxylase in transgenic tobacco and petunia plants. *FEBS Lett*, 461 (3): 241~245
- Shimada Y, Ohbayashi M, Nakano-Shimada R, Okinaka Y, Kiyokawa S, Kikuchi Y (2001). Genetic engineering of the anthocyanin biosynthetic pathway with flavonoid-3', 5'-hydroxylase: specific switching of the pathway in petunia. *Plant Cell Rep*, 20: 456~462