

doi:10.3969/j.issn.1003-5060.2016.03.023

ZmBK2L3 在番茄果实中的特异表达及其功能研究

杨潇怡，隋媛，唐晓凤，曹徐绿，岳俊阳，刘永胜

(合肥工业大学 生物与食品工程学院,安徽 合肥 230009)

摘要:文章通过构建玉米 *BK2L3* 基因果实特异表达的过量表达载体,对转基因番茄果实进行研究,实现以基因工程手段延长番茄果实货架期的目的。利用逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR)技术从玉米 cDNA 中扩增出 *ZmBK2L3* 基因全长,导入启动子为果实特异表达的 TFM7 植物表达载体 pBI121 上,经农杆菌介导转入野生型番茄中,获得转基因阳性植株。分别以野生型番茄和转基因番茄为材料,分析 *BK2L3* 在果实中的表达情况,观察绿熟期果实果皮细胞壁结构,测定红熟期果实的硬度、货架期和果皮纤维素质量比。结果表明:转基因番茄果实中 *BK2L3* 的表达量明显高于野生型果实。转基因番茄果实的硬度、果皮纤维素质量比和果皮厚度均比野生型有所提高,果实货架期明显增长。因此, *BK2L3* 基因的过量表达与细胞壁代谢和货架期有关,可改良果实的品质。

关键词:*BK2L3* 基因;货架期;过量表达;果实特异表达;转基因番茄;遗传转化

中图分类号:S641.2;Q786 **文献标识码:**A **文章编号:**1003-5060(2016)03-0410-05

Fruit-specific gene expression of ZmBK2L3 in tomato and its function

YANG Xiao-yi, SUI Yuan, TANG Xiao-feng,

CAO Xu-lu, YUE Jun-yang, LIU Yong-sheng

(School of Biotechnology and Food Engineering, Hefei University of Technology, Hefei 230009, China)

Abstract: Fruit-specific overexpression vector of maize *BK2L3* was constructed to investigate the effect of gene engineering on fruit firmness and shelf life. The full-length cDNA sequence of maize *Zm-BK2L3* gene was amplified by reverse transcription polymerase chain reaction (RT-PCR) and pBI121-*BK2L3* overexpression construction driven by a fruit-specific promoter TFM7 was made to generate Agrobacterium mediated tomato transformants. In view of the transgenic tomatoes and the wild type tomatoes, the *BK2L3* expression in the fruit was analyzed, the pericarp cell wall structure of fruit at green ripe stage was observed, and the firmness, cellulose content and shelf life of fruit at red ripe stage were determined. The result of molecular analysis demonstrated a significant increase of *BK2L3* expression in the transgenic tomatoes. The positive transgenic tomatoes displayed enhanced pericarp thickness. The firmness, cellulose content and shelf life of the transgenic red ripe fruits were higher than those of the wild type species. These results demonstrated that fruit-specific overexpression of maize *BK2L3* in tomato could improve fruit quality in terms of cell wall metabolism and shelf life.

Key words:*BK2L3* gene; shelf life; overexpression; fruit-specific expression; transgenic tomato; genetic transformation

COBRA 基因影响植物细胞壁纤维素和微纤丝的正确定位,对细胞的定向伸长起关键作用^[1]。

收稿日期:2015-01-12;修回日期:2015-03-27

基金项目:国家自然科学基金资助项目(31171179)

作者简介:杨潇怡(1988—),女,安徽合肥人,合肥工业大学硕士生;

刘永胜(1964—),男,重庆市人,博士,合肥工业大学教授,博士生导师。

COBRA 基因的突变体导致正在伸长的根部组织细胞性状异常和纤维素含量的明显减低^[2]。目前,已有多个 *COBRA* 基因突变体的研究证实,纤维素含量的降低引起明显的易脆表型^[3-7]。*COBRA* 基因家族在玉米中有 9 个成员^[8]。通过对 *COBRA* 基因在植物中的表达分析,*ZmBK2L3* 属于玉米 *ZmBK2L* 家族成员,与拟南芥 *AtCOB* 具有很高的同源性,其编码的蛋白也含有 CCVS 保守基序、N 端的跨膜信号肽、C-末端的疏水性尾部以及 GPI 锚定 ω-位点^[9]。*ZmBK2L3* 在玉米发育的各个时期与各个器官中均有表达,尤其是在根系组织、叶片组织、外果皮和营养器官中有较高表达量,*ZmBK2L3* 参与了纤维素合成相关基因的调控^[10]。

外源基因在其自身不表达的同时也造成与之同源的内源基因的沉默的现象称为同源共抑制现象^[11],高度转录的外源基因产生的紊乱 RNA 引发了 RNA 干涉机制。TFM7 果实特异性 *SiCOBRA-like-OE* 转基因植株,在生长至绿果时期时,其果实出现了裂果表型^[9]。文献[10]指出拟南芥 *COBRA* 基因会发生 100% 同源共抑制。

果蔬的运输、贮藏、采后处理、货架期的延长等一直是食品保鲜技术关注的问题。番茄果实硬度是衡量果实货架寿命长短的重要指标,而且可溶性果胶的含量直接影响番茄果实的硬度^[12]。因此,本研究通过构建 TFM7 启动子的果实特异性表达载体,将外源的玉米 *ZmBK2L3* 基因转入野生型番茄,有效避免转基因植株的同源共抑制现象,不产生裂果表型,实现促进基因的高效稳定表达、减少株系差异的目的,为反向遗传学的进一步研究提供有价值的参考信息。通过转基因技术可有效提高植物细胞壁中的纤维素质量比和果实硬度,延长货架期。同时,通过制作石蜡切片,观察果皮细胞壁结构,为玉米 *ZmBK2L3* 基因参与细胞壁的生物合成假说提供证据。转基因番茄的营养品质良好,实现了果实品质的改良。这为进一步使用基因工程手段解决食品贮藏问题提供了新思路。

1 材料与方法

1.1 材料

野生型番茄 (*Solanum lycopersicum*) 来自美国康乃尔大学 THOMPSON 植物研究所;大肠杆菌 DH5α 菌株、农杆菌 EH105、番茄果实特异表达载体 pBI121-TFM7 均为本实验室保存;感受态细胞 Trans1-T1 Chemically Competent Cell、

克隆载体 pEASY-Blunt Simple Cloning Kit 均购于 TaKaRa 公司。

Trizol 购自 Invitrogen 公司;反转录酶、Taq DNA 聚合酶、限制性内切酶和 T4 DNA 连接酶购于 TaKaRa 公司;反转录试剂盒购于 Transgen 公司;质粒提取试剂盒、琼脂糖凝胶回收试剂盒购自 TIANGEN 公司;聚合链式反应 (polymerase chain reaction, PCR) 引物由南京金斯瑞公司合成,测序由南京金斯瑞公司完成;组培试剂购于 Sigma 公司;其余试剂均为进口分装或国产分析纯产品。

1.2 方法

1.2.1 *ZmBK2L3* 目的基因的克隆

按照 GenBank 中玉米 *ZmBK2L3* 序列(登录号 EF078698.1)设计全长引物 *BK2L3-F1* 和 *BK2L3-R1* 及 *BK2L3-F2* 和 *BK2L3-R2* 引物具体序列如下。

BK2L3-F1:GCGGCTCTGTATCTATCTGTGCG。

BK2L3-R1:CAACTTGAAACTTGCTAACCTCT。

BK2L3-F2:TCTAGAATGGCGCGAGCGGCA,酶切位点在 TCTAGA (Xba I)。

BK2L3-R2:GAGCTCCACTAATCATGCATAAGCC AACAGAGC,酶切位点在 GAGCTC (Sac I)。

NPTII-F:AGACAATCGGCTGCTCTGAT。

NPTII-R:TCATTTCGAACCCAGAGTC。

ACTIN-F:CGAGCAGTGTTCAGTATT。

ACTIN-R:AGCCTGGATAGCAACATACATAG。

SLBK2L3-F:CTCCATCCTGCTGTGTATCTCT。

SLBK2L3-R:CGTATCATTATGCCACCACC。

以野生型玉米 cDNA 为模板,通过巢式 PCR 扩增 *ZmBK2L3* 基因全长编码序列。其中,PCR 反应条件为:94 °C 预变性 5 min;94 °C 变性 30 s,58 °C 退火 30 s,72 °C 延伸 80 s,29 个循环;72 °C 延伸 5 min。然后将 PCR 产物与 pEASY-Blunt 载体连接后转化进入大肠杆菌并进行 PCR 验证,最后阳性克隆送至南京金斯瑞公司测序。

1.2.2 *ZmBK2L3* 果实特异表达载体构建

参照载体 pBI121-TFM7 的酶切位点,采用 Sequencher 软件对 *ZmBK2L3* 基因序列进行限制性内切酶分析,运用 Primer Premier5 软件设计含有酶切位点的特异引物。将已测序正确的 *ZmBK2L3* 全长序列进行 Xba I 和 Sac I 双酶切后插入植物表达载体的多克隆位点区域,构建成番茄果实特异的 pBI121-TFM7-BK2L3OE 表达载体。将得到的连接产物转化进入大肠杆菌感受态细胞,筛选阳性菌落,提取质粒酶切验证。

1.2.3 番茄的遗传转化及转基因植株的鉴定

将重组质粒 pBI121-TFM7-BK2L3-OE 通过冻融法导入农杆菌 EH105, 在含有利福平和卡那霉素双抗生素的培养基上, 28 ℃暗培养 2 d, 筛选阳性菌用以转化野生型番茄。

将野生型番茄的种子用自来水在 37 ℃浸泡 12 h, 然后用 20% 次氯酸钠溶液浸泡 15 min, 再经过无菌水漂洗 10 次后播种至 1/2 MS 培养基。25 ℃暗培养 4 d, 露白后转至光照条件下培养, 待子叶展平, 剪下置于预培养基上培养 3 d, 接下来用带有目的基因的农杆菌(经 28 ℃过夜培养)侵染子叶 10~15 min 后转入共培养基上培养 2 d。经过不同梯度抗性筛选, 培育出转基因材料, 最后移入温室土壤中栽培。

以转基因番茄幼苗叶片为材料, 提取番茄基因组 DNA。根据 pBI121 载体筛选标记基因新霉素磷酸转移酶基因 *NPT*Ⅱ(登录号: AF485783) 的序列合成引物 *NPT*Ⅱ-F 和 *NPT*Ⅱ-R, 进行 PCR 鉴定。PCR 反应条件: 94 ℃预变性 5 min; 94 ℃变性 30 s; 64 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 45 s, 29 个循环; 72 ℃延伸 5 min。

1.2.4 半定量 RT-PCR 分析

分别提取野生型和转基因 T1 代番茄绿熟期果实总 RNA, 经 DNase 处理, 反转录合成第 1 条 cDNA, 以此为模板进行半定量逆转录聚合酶链式反应(reverse transcription polymerase chain reaction, RT-PCR) 检测。以番茄 *ACTIN*(登录号: AB199316.1)作为内参基因, 设计 *BK2L3* 基因半定量引物。反应条件: 94 ℃预变性 5 min; 94 ℃变性 30 s; 64 ℃退火 30 s, 72 ℃延伸 80 s, 24 个循环; 72 ℃延伸 5 min。

1.2.5 石蜡切片实验

分别取野生型和转基因 T1 代番茄绿熟期果实, 选取果实赤道部位的果皮, 经 FAA 固定、脱水至透明, 石蜡包埋后, 用石蜡切片机切片, 制得厚度为 10 μm 的石蜡切片, 固绿染色后, 在光学显微镜下观察果皮细胞壁结构。

1.2.6 果皮细胞壁成分提取及分析

分别取野生型和转基因 T1 代番茄绿熟期果实, 称 15 g 果皮在液氮中充分研磨, 经 70% 乙醇、氯仿甲醇混合液(体积比为 1:1)、丙酮、90% DM-SO 依次浸提, 离心, 去上清, 用丙酮清洗 2 次后在 37 ℃烘箱烘干至恒质量, 保存于真空干燥器中^[13]。

将提取的果皮细胞壁成分先经酸性水解, 再进行浓硫酸脱水, 在 620 nm 下对其与蒽酮结合

反应后产物进行比色, 测定细胞壁纤维素质量比。

1.2.7 果皮质构分析及货架期实验

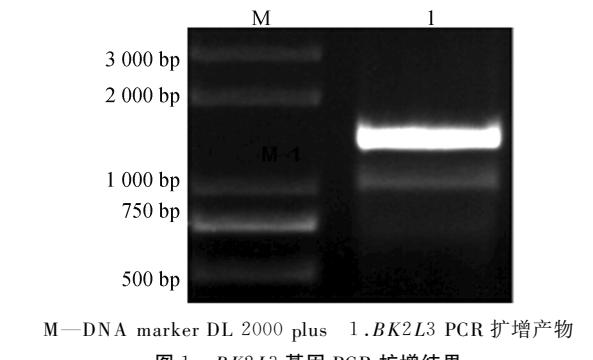
分别取野生型和转基因 T1 代红熟期番茄果实, 选取果实赤道部位三等分点, 利用物性仪 TA-XT Plus 检测果皮硬度。选用 P/2N 探头, 以 2 mm/s 测速, 50% 应力, 进行穿刺实验^[10]。

分别取野生型和转基因 T1 代红熟期番茄果实, 于 25 ℃温度、60%~65% 湿度条件下贮存。每隔 5 d 进行称质量, 计算果实失水率。

2 结果与分析

2.1 *ZmBK2L3* 基因的扩增和测序

经以 *BK2L3*-F1 和 *BK2L3*-R1 为引物的 PCR 扩增产物凝胶电泳检测, 扩增产物约为 1 400 bp 的特异条带, 结果如图 1 所示, 由图 1 可看出, 与预期的玉米 *ZmBK2L3* 基因片段大小一致。测序结果经比对, 与 GenBank 的序列一致。

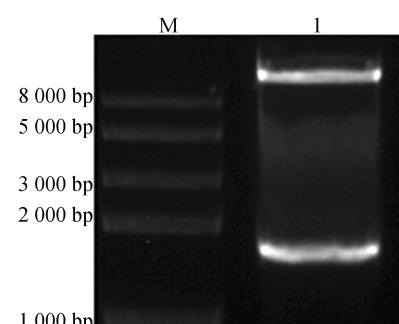


M—DNA marker DL 2000 plus 1. *BK2L3* PCR 扩增产物

图 1 *BK2L3* 基因 PCR 扩增结果

2.2 *ZmBK2L3-OE* 载体鉴定

将载体 pEASY-Blunt-BK2L3-OE 和 pBI121-TFM7-BK2L3-OE 分别用 Xba I、Sac I 双酶切, 所得到的片段大小均为 1 400 bp 左右, 结果如图 2 所示, 图 2 证明了获得 pBI121-TFM7-BK2L3-OE 重组载体。



M—DL 2000 plus 1. Xba I 和 Sac I 双酶切

图 2 pBI121-TFM7-BK2L3-OE 载体酶切

2.3 转基因植株阳性鉴定

以番茄叶片为材料提取基因组DNA,利用NPTⅡ引物进行PCR鉴定,结果如图3所示。图3表明,转基因植株扩增出857 bp的条带,而阴性对照野生型植株未扩增出857 bp的条带,说明NPTⅡ基因已整合于植株核染色体组中。

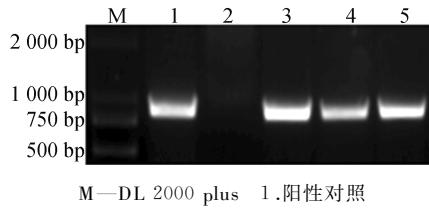


图3 转基因番茄植株的PCR鉴定

2.4 ZmBK2L3 表达分析

分别提取野生型和转基因番茄绿熟期果实的RNA,利用半定量RT-PCR方法,分析转基因植株中ZmBK2L3基因的表达水平,结果如图4所示。由图4可知,ZmBK2L3基因在野生型番茄果实中无表达,而在ZmBK2L3-OE转基因番茄果实中有较好表达;同时,不同株系的转基因果实表达量有差异。

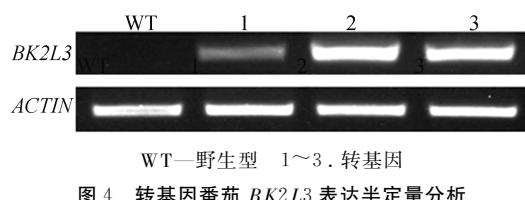


图4 转基因番茄BK2L3表达半定量分析

2.5 石蜡切片实验

分别取野生型和转基因T1代番茄绿熟期果实,选取果实赤道部位的果皮,制得石蜡切片后,在光学显微镜下观察果皮细胞壁结构,结果如图5所示。

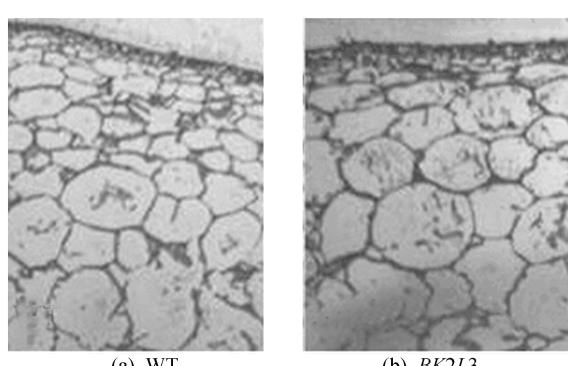
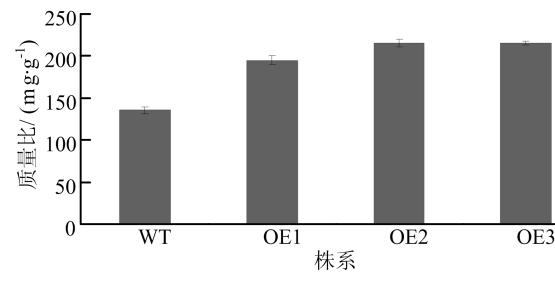


图5 番茄果皮纤维结构

由图5可看出,绿熟期转基因番茄果实的果皮厚度比野生型明显增加,而且转基因番茄中果皮细胞大小均匀。

2.6 细胞壁纤维素质量比

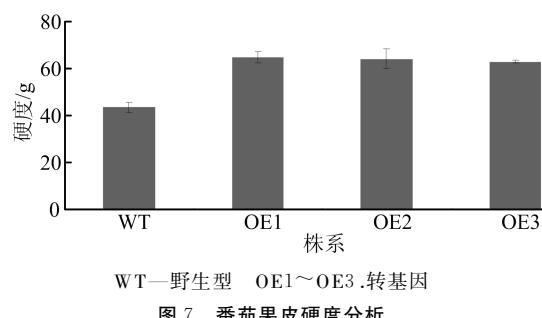
提取番茄细胞壁纤维素成分后,每株系取红熟期番茄果实5个,共3个株系,3次重复测定果实细胞壁纤维素的质量比,结果如图6所示。由图6可看出,转基因番茄细胞壁纤维素的质量比野生型提高约42%。



WT—野生型 OE1~OE3.转基因
图6 番茄果实细胞壁纤维素质量比

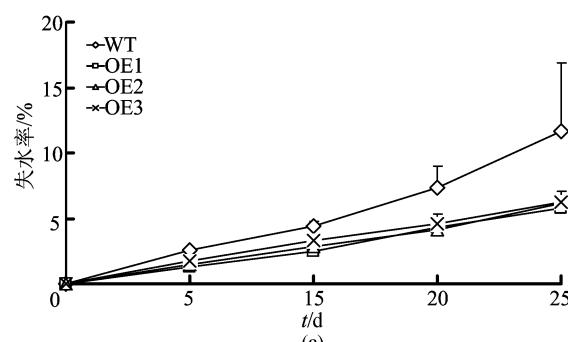
2.7 转基因番茄果皮硬度、细胞壁结构和货架期

每个株系取红熟期番茄果实5个,共3个株系,测定果实硬度,每个果实赤道面三等分位置取平均值,结果如图7所示,转基因番茄果皮硬度比野生型高约48%。



WT—野生型 OE1~OE3.转基因
图7 番茄果皮硬度分析

每一个株系取红熟期番茄果实9个,共3个株系,失水率结果及果实照片如图8所示。



(a)

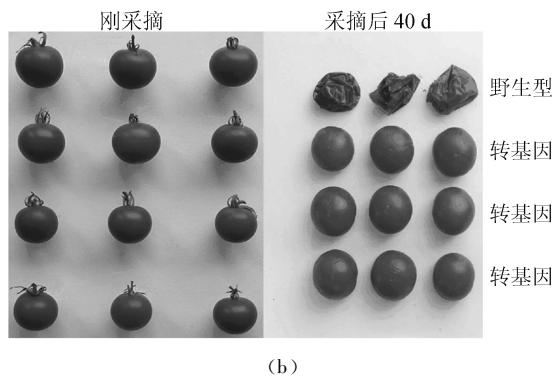


图 8 番茄果实失水率及货架期实验

由图 8a 可知,转基因番茄干质量变化较小,野生型果实在 20 d 后失水率显著增加,果皮开始皱缩。40 d 后番茄果实照片如图 8b 所示,野生型果实已发生完全形变,水分严重损失,而转基因果实仍形态完好。

3 讨 论

玉米 *ZmBK2L3* 基因属于 *COBRA* 基因家族,广泛涉及调控植物生长发育以及果实成熟和采后病原体易感性。表达模式分析结果表明,*COBRA* 基因在幼嫩果实组织中表达量较高,随果实成熟度增加,其表达量急剧下降^[2]。本文通过构建转基因载体并转入番茄组织,分析 *BK2L3* 在果实中的表达水平后,证实与果实的成熟软化有一定相关性。本研究以 3 个不同的转基因番茄株系为主要研究对象,较好地验证了基因的表达效果。转基因番茄果实纤维素质量比明显增高,果实硬度增加,因此赋予果实更好的坚韧度,有效延长货架期。

与前人报道的番茄 *COBRA-like* 基因的功能性基本一致。这一转基因技术应用于食品行业,实现了以基因工程为手段,改善番茄果实品质,创新食品保鲜技术。本文采用的外源基因转化方式可消除同源共抑制现象,有效避免 RNA 干涉机制引发的内源基因沉默,从而促进基因高效稳定表达,减少转基因株系间差异,为遗传学研究提供了新思路。

[参 考 文 献]

[1] 李 玲,赖钟雄,陈裕坤,等.文心兰 *OnCOBRA* 基因克隆及

- 表达模式分析 [J]. 热带作物学报, 2014, 35 (8): 1551—1558.
- [2] 曹 颖,唐晓凤,刘永胜,等.番茄 *COBRA* 基因克隆、表达模式及生物信息学分析 [J]. 植物研究, 2012, 32 (3): 304—310.
- [3] Schindelman G ,Morikami A ,Jung J ,et al .*COBRA* encodes a putative GPI-anchored protein, which is polarly localized and necessary for oriented cell expansion in *Arabidopsis* [J].*Genes & Development*, 2001, 15(9):1115—1127.
- [4] Brummell D A ,Harpster M H .Cell wall metabolism in fruit softening and quality and its manipulation in transgenic plants [J].*Plant Mol Biol*, 2001, 47(1):311—340 .
- [5] Smith D L ,Gross K C .A family of at least seven β -galactosidase genes is expressed during tomato fruit development [J].*Plant Physiol*, 2000, 123 :1173—1183 .
- [6] Roudier F ,Femandez A G ,Fujita M ,et al .*COBRA* , an *Arabidopsis* extracellular glycosyl-phosphatidyl inositol-anchored protein, specifically controls highly anisotropic expansion through its involvement in cellulose microfibrill orientation [J].*The Plant Cell*, 2005, 17(6):1749—1763 .
- [7] Sindhu A ,Langewisch T ,Olek A ,et al . Maize brittle stalk 2 encodes a *COBRA*-like protein expressed in early organ development but required for tissue flexibility at maturity [J].*Plant Physiol*, 2007, 145(4):1444—1459 .
- [8] 高志民,陈 颖,胡 陶,等.绿竹 *BoCOBL* 基因的分子特征及其表达分析 [J].热带亚热带植物学报, 2013, 21(6): 560—565 .
- [9] Cao Ying ,Tang Xiaofeng , Giovannoni J ,et al .Functional characterization of a tomato *COBRA*-like gene functioning in fruit development and ripening [J].*BMC Plant Biology* , 2012, 12:211 .
- [10] Brady S M ,Shuang S ,Dhugga K S ,et al .Combining expression and comparative evolutionary analysis: the *COBRA* gene family [J].*Plant Physiol* , 2007, 143 (1): 172—187 .
- [11] 孔莹莹,蒋 丽,韩 凝,等.植物转基因中同源共抑制的机制及其解决措施 [J].生命科学, 2012, 24(5):399—402 .
- [12] 魏宝东,姜炳义,冯 辉.番茄果实货架期硬度变化及其影响因素的研究 [J].食品科学, 2005, 26(3):249—252 .
- [13] Updegraff D M .Semimicro determination of cellulose in biological materials [J].*Analytical Biochemistry* , 1969, 32 : 420—424 .

(责任编辑 闫杏丽)