

大肠杆菌海藻糖合成酶基因对提高烟草抗逆性能的研究*

戴秀玉 王忆琴 杨 波 周 坚

(中国科学院微生物研究所 北京 100080)

摘 要:编码大肠杆菌海藻糖合成酶的 *otsA* 基因由农杆菌介导引入野生型烟草植株并在花椰菜花叶病毒启动子序列(CaMV35S)控制下获得表达。蒸发光散射高效液相色谱法测定海藻糖实验表明,转基因烟草能够合成海藻糖,合成量达 $14\mu\text{g/g}$ 叶片湿重;转基因烟草表现为耐盐性生长、干燥失重缓慢等抗逆表型。说明海藻糖合成酶 *otsA* 基因的引入,改变了烟草的糖代谢途径,同时也提高了植物的耐盐碱、耐干旱特性。

关键词: *otsA* 基因, 海藻糖, 转基因烟草, 抗逆

中图分类号: Q789 **文献标识码:** A **文章编号:** 0001-6209 (2001) 04-0427-05

海藻糖(Trehalose)是由两个葡萄糖分子以 α, α 1 \rightarrow 1 糖苷键结合的非还原性双糖,它广泛存在于细菌、真菌、昆虫以及某些低等动植物中^[1-2]。海藻糖对各种不同生物的抗逆耐受性起着重要作用,例如在高温和干燥条件下,酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)细胞合成海藻糖以抵抗逆境的胁迫,其合成量与抗逆能力呈正比关系^[3]。已经证明外加的海藻糖也能保护干燥状态下的酶、蛋白质和细胞膜。因此海藻糖在医药、农业、食品、化妆品等领域均有广阔的应用前景^[4]。利用海藻糖的抗逆耐干特性,采用基因工程技术将海藻糖合成相关酶转入农作物,可望使农作物在干旱、盐碱环境下生长良好,这对培育抗旱耐盐的作物新品种和粮食的增产增收具有重要意义。植物中海藻糖的合成途径还不清楚,但在细菌和酵母中这一途径已被阐明^[5-6]。大肠杆菌(*Escherichia coli*)中由渗透压引起的海藻糖的合成由 *otsA* 基因编码的海藻糖合成酶催化 UDP-葡萄糖和 6-磷酸葡萄糖合成 6-磷酸海藻糖,再经 *otsB* 基因编码的海藻糖磷酸酯酶脱磷酸后生成海藻糖^[7]。Kaasen 等人^[8]的工作证明 *otsA* 和 *otsB* 基因组成一个操纵子。在此研究基础上,我们设计了海藻糖合成酶 *otsA* 基因的 PCR 引物,并将扩增的 DNA 片段连接到植物双元表达载体,经农杆菌介导转化烟草。对获得的转基因烟草测定其叶片中海藻糖合成和含量,耐盐性生长及干燥失重实验均表明, *otsA* 基因在烟草中获得表达,同时海藻糖的合成提高了烟草植株的抗逆性能,现将这一结果报道如下。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株和质粒:根癌土壤杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌种 LBA4404, Str^r, Rif^r, 用于双子叶植物转化, pDW1 是带有完整 *otsBA* 基因的 Mud5005 衍生质粒,本实验室构建^[9];

* 国家自然科学基金资助项目(39980023)

作者简介:戴秀玉(1952-),女,上海人,副研究员,主要从事微生物遗传学研究。

收稿日期:2000-11-06,修回日期:2000-12-22

pYH 含有 35S 启动子和 NOS3' 端转录终止信号的植物表达载体, pBin19 是含有 MCS 的 mini-Ti 植物转化中间载体, 均为本实验室保存。

1.1.2 植物: 烟草 (*Nicotiana tabacum*) 品种为三生烟, 本实验室保存。

1.1.3 培养基和抗生素浓度: LB 培养基^[10]、YEP^[11] 培养基分别用于大肠杆菌和农杆菌的培养和保存; MSo 分化培养基、MS 选择培养基、MS 生根培养基^[11] 用于转化烟草的组织培养。氨基苄青霉素 (Ap)、羧苄青霉素 (Cb)、卡那霉素 (Km) 和利福霉素 (Rif) 选择浓度分别为 50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 、100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 和 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 。

1.1.4 酶和试剂: 酶和分子生物学试剂购自华美公司, 海藻糖为 Sigma 公司产品。

1.2 方法

1.2.1 载体构建: 根据已知 *otsA* 基因序列设计 PCR 引物, 并由中国科学院微生物研究所技术中心合成。

Primer I: GTGGTCGACATGAGTCGTTTAGTCGTA;

Sal I

Primer II: GCGAATTCTACGCAAGCTTTGCAAAGGTAGC.

Eco R I

以 pDW1 质粒 (含完整 *otsBA* 基因) DNA 为模板进行 PCR 反应。将获得的 1.5kb 的 Sal I / Eco R I DNA 片段连接到 pYH 中间载体, 经 *Kpn* I / *Xho* I 切下含 35S CaMV 病毒增强启动子的 2.8kb 片段, 再将该片段克隆到 pBin19 二元表达载体, 通过三亲交配引入农杆菌, 用于植物转化。

1.2.2 植物转化: 用农杆菌感染叶圆片法, 将含 *otsA* 基因片段的载体 DNA 引入三生烟烟草, 选择抗 Km 的再生组织, 诱导成苗后转移到 MS 生根培养基进行培养, 待植株生长有 5 ~ 6 片真叶时可用于分子生物学检测和分析。

1.2.3 转基因烟草的耐盐性测定: 当转基因烟草长至 5 ~ 6 片叶时, 将其带有腋芽的茎段切下, 分别移栽到含 1%、1.5%、2% NaCl 的选择生根培养基中, 与同样条件下培养的野生型及转入了 pBin19 载体的烟草苗对比其生根情况。

1.2.4 转基因烟草叶片的耐干性分析: 将烟草植株移植土壤, 一个月后摘取植株的新鲜叶片数克, 置于室温下自然干燥, 每间隔 3 ~ 12h 称重测定, 计算每个时间下叶片的湿重比, 得出不同植株湿重比随时间的变化关系。

1.2.5 转基因烟草的糖分测定: 取 10g 左右烟草叶片, 用液氮在研钵中研碎, 按比例加入蒸馏水, 100℃ 加热 15min, 5000r/min 离心 10min 取上清, 加入一定体积的无水乙醇, 轻微振荡 10min 左右, 用 Waltman 滤纸滤去不溶物并加热以除去乙醇, 结晶物溶于水后进行糖分的定性和定量分析。HPLC 测定糖分参照文献^[12], 按照公式: (上样液中海藻糖浓度 × 稀释倍数 × 提取液体积) ÷ 叶片重量, 计算海藻糖含量。

2 结果和讨论

2.1 转基因烟草中基因片段的检测

分别提取三生烟烟草、转 pBin19 空载体烟草和转 *otsA* 基因烟草的染色体 DNA 为模

板,与 *otsA* 基因的 PCR 引物进行扩增反应,以检测转基因烟草中 *otsA* 基因的存在,图 1 是转 *otsA* 基因烟草再生苗的 PCR 分析。

从电泳照片上可看到 1.5kb DNA 条带,说明 *E. coli* 海藻糖合成酶 *otsA* 基因稳定地整合到烟草染色体并获得表达。对所获得的 114 株转化苗的 PCR 检测表明有 84 株呈现 1.5kb DNA 条带,所占比率为 72%。

2.2 转基因烟草的耐盐性分析

选取 PCR 呈阳性的再生烟草进行耐盐性分析。分别截取野生型烟草、pBin19 空载体转化株及 *otsA* 基因转化株的含腋芽茎段部分移栽到含 1%、1.5%、2% 和 3% NaCl 的生根培养基中,两个星期后观察其生根情况。

三种烟草在 1% NaCl 培养基中的生根情况无明显差别;在 1.5% NaCl 培养基中,一些转基因植株有正常的根和绿芽生出,但野生型和转空载体对照生长缓慢,生出少量的根;在 2% NaCl 培养基中仍有少数转基因植株正常长出根、芽,而两种对照株均表现为极度萎蔫,没有任何生长;在 3% NaCl 培养基中,转基因植株也不能很好生长。图 2 是转基因植株在 2% NaCl 生根培养基中生长一个月后的状况。

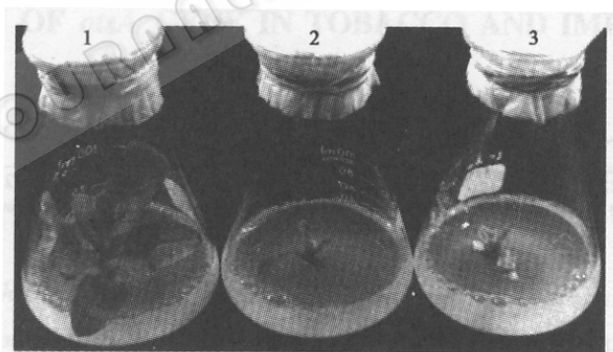


图 2 转基因烟草在 2% NaCl 生根培养基中的生长

Fig.2 The growth of transgenic plant in rooting medium containing of 2% NaCl.

1. *otsA* transgenic plant; 2. pBin19 transformed plant; 3. untransformed control.

2.3 转基因烟草叶片的耐干性分析

海藻糖除了可提供生物体在高盐环境下的生长功能外,还能使生物体耐受极度干燥的胁迫。为了验证这一作用,我们对转基因植物进行耐干性分析。将转基因烟草植株与对照株移至土壤,45d 后摘取其新鲜叶片,于室温下自然干燥,间隔一定时间称重,观察不同植株的叶片失水和抗干燥状况(图 3)。

按照糖标样检测峰指认,所测定的三种样品中均出现葡萄糖峰,计算含量均在 $22\mu\text{g}\cdot(\text{g FW})^{-1}$ 左右,还检测到低浓度的果糖。所分析的三种样品,只有图 4-3 显示有海藻糖峰。根据材料与方法中的公式计算其含量为 $14.714\mu\text{g}\cdot(\text{gFW})^{-1}$,可见 *otsA* 基因转化株中

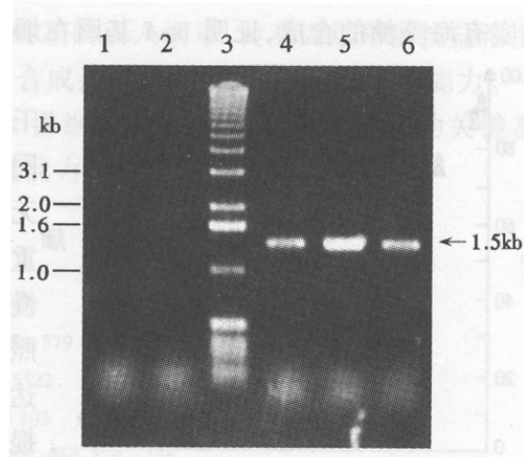


图 1 转 *otsA* 基因烟草再生苗的 PCR 分析

Fig.1 PCR analysis of *otsA* transgenic tobacco plants

1. Untransformed control; 2. pBin19 transformed plant; 3. lkb DNA marker; 4~6. *otsA* gene transformed plants.

确实有海藻糖的合成,证明 *otsA* 基因在烟草中得到表达。

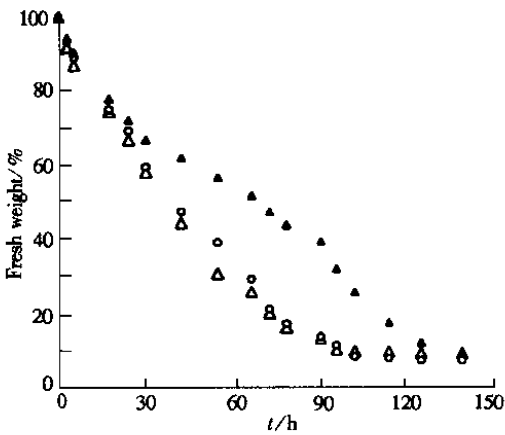


图 3 转基因烟草叶片的干燥失重与时间的关系

Fig.3 The relationship of weight loss and drying time for transgenic plant leaves

△. *Nicotiana tobacum*; ○. Transgenic plant with pBin19; ▲. Transgenic plant with *otsA*.

三生烟野生型的 pBin19 转化株叶片的湿重随干燥时间的延长而下降,二者的下降速度几乎相同, *otsA* 转基因植株在实验开始后的 24h 与对照无明显区别。随着实验时间的延长,对照植株严重失水,叶重明显下降;而 *otsA* 转基因植株失水缓慢,直至 126h 后,叶片才开始萎蔫、干枯,这比对照至少推迟了 48h。这一结果说明 *otsA* 基因的表达能延缓转基因烟草叶片的失重,海藻糖的合成提高了植物的抗干燥性能。

2.4 转基因烟草的糖份测定

为了证实转基因植株的耐盐、抗干燥性能与海藻糖存在有直接关系,我们对转基因烟草中的海藻糖进行测定。如材料与方法中所述,提取植株中的糖份,应用 HPLC 技术分离和蒸发光散射 (ELSD) 检测器的检测,测得三生烟野生型、pBin19 空载体转化株和转 *otsA* 基因株的糖份,结果如图 4 所示。

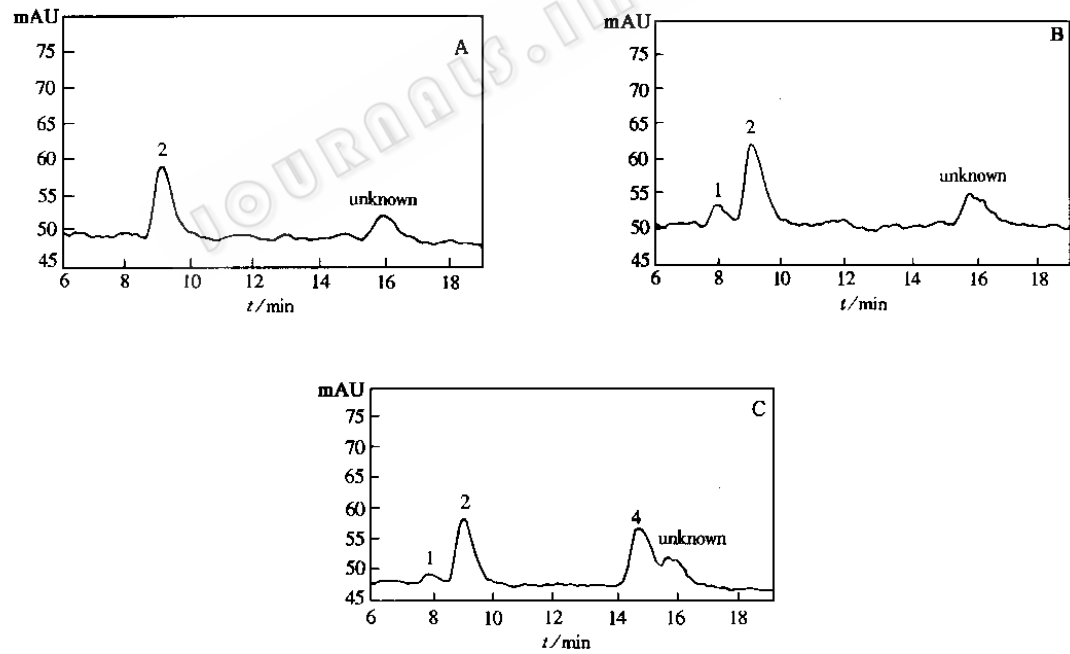


图 4 糖份的 HPLC-ELSD 检测峰

Fig.4 HPLC-ELSD profile of sugars

A. Untransformed control; B. pBin19 transgenic plant; c. *otsA* transgenic plant.

1. Fructose; 2. Glucose; 4. Trehalose.

在植物抗逆研究中,海藻糖合成酶基因是继谷氨酸、脯氨酸、甜菜碱合成酶基因之后的又一个抗逆相关基因^[13-14],因而对海藻糖代谢调控和转基因植物的研究引起人们广泛

的关注。我们利用基因工程技术,将海藻糖合成酶基因引入烟草,转基因烟草的抗盐浓度可达2%;叶片干燥速率明显降低,说明海藻糖的合成提高了植物的耐盐、抗干旱能力。

转基因植物中检测到海藻糖的合成,证明 *ots* 操纵子中, *otsA* 是合成海藻糖的关键基因,从而为将该基因转入其它经济作物,提高抗逆能力提供了实验依据。

参 考 文 献

- [1] Crowe J H, Crowe L M, Chapman D. *Science*, 1984, **223**:701 ~ 703.
- [2] Crowe J H, Hoekstra F A, Crowe L M. *Annu Rev Physiol*, 1992, **54**:579 ~ 599.
- [3] Hottiger T, Boller T, Wiemken A. *FEBS Lett*, 1987, **255**:5518 ~ 5522.
- [4] 戴秀玉,程 苹,周 坚,等.微生物学通报,1995, **22**:102 ~ 103
- [5] De Virgilio C, Hottiger T, Dominguez J, et al. *Eur J Biochem*, 1994, **219**:179 ~ 186.
- [6] Bell W, Klaassen P, Ohnacker M, et al. *Eur J Biochem*, 1992, **209**:915 ~ 959.
- [7] Kaasen I, Faldenberg P, Styrvold O B, et al. *J Bacteriol*, 1992, **174**:889 ~ 898.
- [8] Kaasen I, McDougall J, Strom A R. *Gene*, 1994, **145**:9 ~ 15.
- [9] 戴秀玉,吴大鹏,周 坚,等.遗传学报,2000, **27**:158 ~ 164.
- [10] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [11] John D, Roderick S, Philip A, et al. *Plant Genetics Transformation and Gene Expression*. The Alden Press. 1989.
- [12] 魏 泱,丁明玉.分析实验室.2001,待发表.
- [13] Kishor P B K, Hong Z, Miao G-H, et al. *Plant Physiol*, 1995, **108**:1387 ~ 1394.
- [14] Liang Z, Ma D Q, Dai X Y, et al. *Chinese Journal of Biotechnol*, 1997, **13**:153 ~ 159.

EXPRESSION OF *otsA* GENE IN TOBACCO AND IMPROVEMENT STRESS TOLERANCE *

Dai Xiuyu Wang Yiqin Yang Bo Zhou Jian

(Institute of Microbiology, The Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: The *Escherichia coli* trehalose-6-phosphate synthase gene (*otsA*) was engineered under the control of cauliflower mosaic virus regulatory sequences (CaMV35S) for expression in plants. *OtsA* gene was incorporated into the chromosome DNA by *Agrobacterium*-mediated transfer and expressed in *Nicotiana tabacum*. The *otsA* gene transgenic plant exhibited multiple phenotypic alteration: improved stunted growth and drought tolerance. The detached leaves from the transgenic plant, their water loss slower than that of the controls. Trehalose accumulated in transgenic plant was determined by HPLC suggest that synthesis of the sugar improving plant to stress tolerance.

Key words: *otsA* gene, Trehalose, Stress tolerance, Tobacco

* Project Granted by National Natural Science Foundation of China(39980023)