

野生天麻 DNA 导入马铃薯实现 遗传转化的研究

周鹤峰¹, 邵敏², 葛正龙^{2*}

(1. 遵义医学院珠海校区生物工程教研室, 广东珠海 519041; 2. 遵义医学院生物化学教研室, 贵州遵义 563003)

摘要: 采用浸苗法将野生天麻总 DNA 导入马铃薯试管苗, 对筛选得到的转化植株进行蛋白及药用成份的分析。结果显示: (1) 在 200 株转化的马铃薯中有 21 株的紫外扫描图谱与正常对照组有显著差异, 且在 220nm 有明显吸收峰。 (2) 5 株经 PCR 扩增出野生天麻抗真菌蛋白(GAFP)基因。 (3) 转基因马铃薯与正常马铃薯的蛋白表达有明显差异, 并且在转基因马铃薯中有一条与野生天麻抗真菌蛋白(GAFP)相同的条带。而正常马铃薯中无此条带。 (4) 通过薄层层析法检测出 3 株转基因马铃薯表达野生天麻的有效药用成份天麻素。说明采用浸苗法进行外源总 DNA 导入是可行的。

关键词: 野生天麻; 浸苗法; 天麻素; 转基因

中图分类号: Q943.2 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2005)04-0353-03

A genetic transformation study of introducing wild *Gastrodia elata* DNA into potato

ZHOU He-feng¹, SHAO Min², GE Zheng-long^{2*}

(1. Department of Bioengineering, Zhuhai Campus, Zunyi Medical College, Zhuhai 519041, China;

2. Department of Biochemistry, Zunyi Medical College, Zunyi 563003, China)

Abstract: After the tuber had grown up, the solution of gastrodin was extracted from the potatoes which were transformed by wild *Gastrodia elata* DNA. SDS-PAGE was used to analyze GAFP gene. TLC was used to analyze the gastrodin of transformed potatoes. Results: (1) 21 transformed plants had obvious absorption peak at 220nm in 200 transformed potatoes. (2) The fragment of wild *Gastrodia elata* GAFP gene was found by PCR from 5 transformed plants. (3) The protein expressions in transgenic potatoes were obviously different from normal potatoes; A band was detected in transgenic potato and wild *Gastrodia elata*, but wasn't detected in normal potatoes. (4) We detected the expression of the gastrodin by TLC from 3 transformed plants. It is feasible to use the soaking seedling method to introduce exogenous DNA into plants.

Key words: wild *Gastrodia elata*; soaking plantlets method; gastrodin

野生天麻(*Gastrodia elata*, BI)属兰科,是名贵传统中药,有着非常广泛的药用价值,近年来随着过度的采伐以及病虫害等原因,其资源已受到严重威胁,因此对珍稀濒危的野生天麻进行可持续利用的研究已迫在眉睫。自从二十世纪 70 年代周光宇教授提出 DNA 片段杂交假设以来,应用“花粉管通道

法”、“浸泡法”等方法将外源 DNA 导入植物已成为一种新的有效的遗传转化方法。作为外源基因导入技术之一的“浸苗法”已在烟草、大豆、蚕豆等作物中得到了实际应用,并实现了遗传转化,朱生伟等(1999)应用浸苗法成功的将外源 DNA 导入烟草,导入后代在形态、品质和成分含量等方面已产生广

收稿日期: 2004-11-29 修订日期: 2005-03-20

基金项目: 贵州省省长基金; 贵州省科技厅社发基金(编号: 2001112)。

作者简介: 周鹤峰(1980-),男,山东莱阳人,硕士,研究方向为植物转基因。* 通讯作者

泛的变异。本研究旨在探索通过转基因植物来生产野生天麻的有效药用成份的可行性,试图通过转基因技术将野生天麻总 DNA 导入马铃薯,培育出具有药用价值或保健作用的山铃薯新材料和新品系。

1 材料和方法

1.1 材料

野生天麻,购于遵义,经贵阳中医学院李涛副教授鉴定。马铃薯(中薯 1 号),由遵义农科所提供。

1.2 野生天麻总 DNA 的提取

采用本实验室改进的 CTAB 法,琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 片段完整性,以 λ -DNA 作为分子量参照,电压 4 V/cm,电泳 4 h。

1.3 野生天麻 DNA 对马铃薯试管苗的转化

实验组:选择生长一致的马铃薯壮苗(5~7 片真叶)200 株,在超净工作台上,用无菌水将根部冲洗干净,滤纸吸净水滴,用提取的野生天麻 DNA 溶液(浓度为 500 μ g/mL)浸泡 36 h,转到 MS 高糖培养基上,温度 25 $^{\circ}$ C,暗培养两个半月。

对照组:采用 TE 液同样条件下处理。

1.4 筛选转化植株

1.4.1 粗筛(紫外扫描法) 分别取实验组和对照组试管薯,称重,液氮研碎,按 1:30(W/V)的比例加入甲醇,置超声波浴中超声 1 h 后静置 24 h,再超声 1 h,静置 2 h,1 000 rpm/min,离心 10 min,取上清 2 mL,通过紫外分光光度计在 200~300 nm 下进行波长扫描。

1.4.2 细筛(PCR 扩增野生天麻抗真菌蛋白) 分别提取通过粗筛得到的转化株试管薯总 DNA,进行野生天麻抗真菌蛋白(GAFP)的 PCR 扩增。野生天麻抗真菌蛋白(GAFP)基因引物参照相关文献设计,引物序列如下:上游 5'-AGGGATCGGTT-GAATTCGGGC-3';下游 5'-GCCAGACGCCGCGCTGT-3'。

PCR 反应条件:94 $^{\circ}$ C,10 min;94 $^{\circ}$ C,1 min;52 $^{\circ}$ C,45 s;72 $^{\circ}$ C,45 s;72 $^{\circ}$ C,6 min,30 个循环。PCR 产物进行琼脂糖凝胶上电泳。

1.5 转基因马铃薯中天麻抗真菌蛋白(GAFP)基因表达的分析

分别取实验组和对照组试管薯,按照王义琴等方法制成总的可溶性蛋白溶液。采用 5%的浓缩胶,15%的分离胶,用考马斯亮兰 G250 染色。

1.6 转基因马铃薯中天麻素成份的分析

分别取实验组和对照组试管薯,称重,液氮研碎,按 1:30(W/V)的比例加甲醇,置超声波浴中超声 1 h 后静置 24 h,再超声 1 h,静置 2 h,1 000 rpm/min,离心 10 min,取上清进行浓缩处理。以 0.5%羧甲基纤维素钠、硅胶 H 自制薄板,110 $^{\circ}$ C 活化 30 min,各取样品及天麻素标准品 4 μ L 点样,以氯仿:甲醇:冰醋酸(6:2:0.15)为展开剂,展距为 15 cm,10%磷钼酸乙醇溶液为显色剂,105 $^{\circ}$ C 烘烤 6 min,观察并拍照。

2 结果与分析

2.1 DNA 片段的大小

提取的野生天麻 DNA 样品在 0.3%琼脂糖凝胶上电泳,电压为 5 V/cm,电泳 3 h,以 λ -DNA 作为分子量参照,电泳结果显示:通过改进的 CTAB 法所提取的野生天麻 DNA 样品为单一条带,且片段大小为 50 kb 左右(图版 I:A),符合分子导入要求。

2.2 紫外扫描图谱分析

对 200 株转化植株和 20 株正常的试管薯甲醇提取液进行紫外扫描,扫描波长是 200~300 nm,结果显示:有 21 株转化马铃薯的紫外扫描图谱与正常马铃薯有显著差异,并且转化马铃薯的甲醇提取液在 220 nm 处有明显吸收峰(图版 I:B、C)。

2.3 野生天麻抗真菌蛋白基因的 PCR 分析

抗真菌蛋白是野生天麻皮层中的一种能强烈抑制真菌生长的蛋白,马铃薯中不存在此蛋白,因此分别以野生天麻总 DNA 和通过粗筛的转化植株总 DNA 为模板,通过 PCR 扩增来分析野生天麻抗真菌蛋白(GAFP)基因是否已转到马铃薯中,电泳结果发现在 5 株转基因马铃薯中扩增出与野生天麻抗真菌蛋白位于同一位置(380 bp)的条带,结果见图版 I:D。

2.4 转基因马铃薯中野生天麻抗真菌蛋白(GAFP)基因表达分析

野生天麻抗真菌蛋白(GAFP)是一种分子量为 14 kD 的蛋白质,我们通过 PCR 扩增的方法从粗筛的 21 株马铃薯中细筛得到 3 株含有野生天麻抗真菌蛋白(GAFP)基因,此三株经过 SDS-PAGE 分析蛋白表达情况,结果显示:经过转基因的马铃薯植株中含有野生天麻抗真菌蛋白(14 kD 处),而正常马

铃薯中无此带,且转基因马铃薯与正常马铃薯的蛋白表达有明显差异,见图版 I :E。

2.5 药用成份分析

天麻素是野生天麻的有效药用成份,通过薄层层析(TLC)法分析转基因马铃薯、正常马铃薯、野生天麻三者中天麻素,结果可见,转基因马铃薯中可检测到天麻素(图版 I :F)。

3 讨论

本实验从转化的马铃薯中检测到 5 株含有野生天麻的抗真菌蛋白基因,其转化效率为 2.5%,比用农杆菌介导的转化法效率要低,可能原因是:野生天麻的总 DNA 导入马铃薯后其基因与受体马铃薯细胞整合与转化完全是随机的,缺乏控制机制,因而实现的目的性较差,以致转化效率低。尽管采用此法转化效率不高,但仍表明:采用浸苗法将野生天麻总 DNA 导入马铃薯中的方法是可行的。

野生天麻抗真菌蛋白(GAFP),其分子量为 14 kD,它能强烈抑制腐生性真菌生长,从而阻止密环菌侵染顶生球茎,使其得以正常生长。马铃薯中不存在此蛋白,我们通过 SDS-PAGE 发现在转化的植株中有野生天麻抗真菌蛋白,说明 GAFP 基因已整合到马铃薯基因组中,并且通过基因表达调控而翻译成野生天麻抗真菌蛋白。

野生天麻的有效药用成份为天麻素(gastrodin)即对羟基苯-β-D-葡萄糖吡喃糖甙,它是一种小分子有机物质,其甲醇液在 220 nm 有最大吸收峰,本实验通过紫外扫描法从 200 株转化的马铃薯中检测到有 21 株的扫描图谱与正常对照组有明显差异,说明天麻的基因在马铃薯中已经表达并且导致马铃薯发生变异。变异的发生可能通过受、供体基因同源重组这一整合途径或通过供体 DNA 片断插入到受体基因组中。

我们通过薄层层析法在 3 株转化的植株中检测到天麻素,而天麻素不属于蛋白质,说明天麻的基因在马铃薯中已经表达并且通过一系列复杂的体内代谢产生了天麻的有效药用成份天麻素。但在转基因

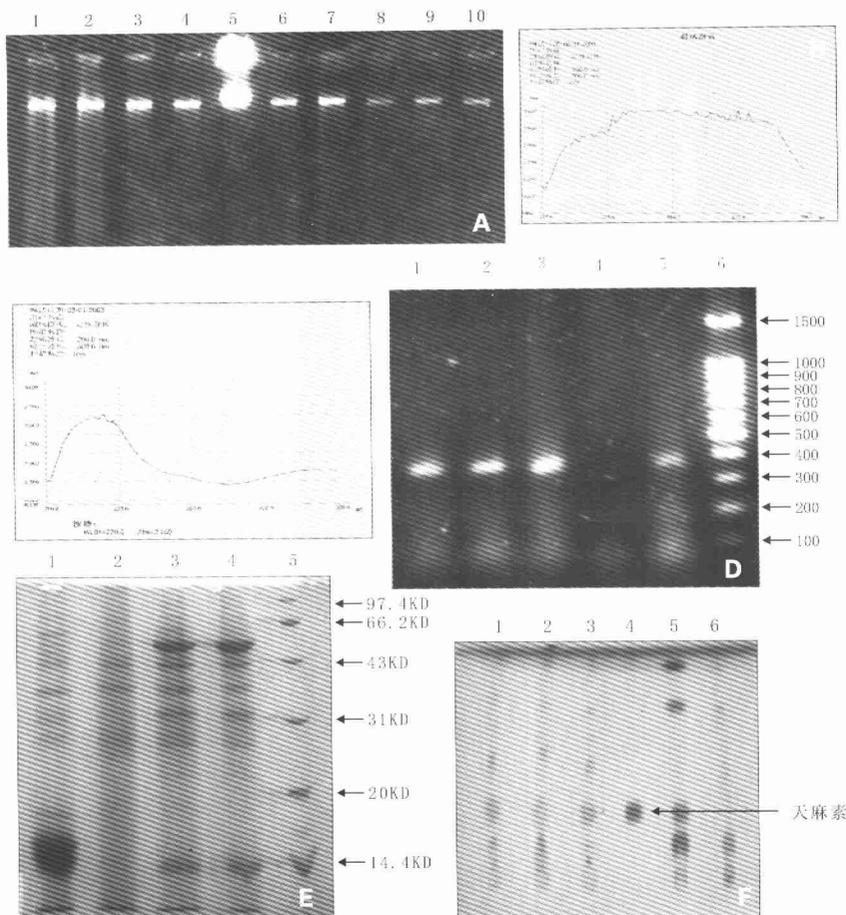
马铃薯中天麻素的含量很少(样品浓缩 200 倍),如何提高转基因马铃薯中野生天麻的有效药用成份——天麻素的含量有待于进一步研究。

参考文献:

- Potrykus I, Paszkowski J, Saul MW, *et al.* 1985. Molecular and general genetics of a hybrid foreign gene introduced into tobacco by direct gene transfer [J]. *Mol Gen Genet*, **199**(2): 169—177.
- Huang J, Ge X, Sun M. 2000. Modified CTAB protocol using a silica matrix for isolation of plant genomic DNA [J]. *Bio-techniques*, **28**(3): 432—434.
- Li XB(李晓波), Feng B(冯波), Zhang CH(张朝晖), *et al.* Isolation of total DNA from plant Chinese medicinal materials(植物药材总 DNA 提取)[J]. *Chinese Traditional and Herbal*(中草药), **33**(7): 652—654.
- Zhu SW(朱生伟), Xu Z(徐仲), Zhu XC(朱祥春), *et al.* 1999. A preliminary study on using the seedling soaking method to induce the genetic characters in flue-cured tobacco (应用浸苗法导入外源 DNA 转化烤烟遗传性状变异的初步研究)[J]. *J Northeast Agri Univ*(东北农业大学学报), **30**(2): 190—194.
- Ding Lu(丁丽玉), Huang Y(黄燕). 1996. Detecting gastrodin by TLC-UV in *Gastrodia elata* patch(TLC-UV 法检出天麻片中的天麻素)[J]. *Chinese Traditional Patent Medicine*(中成药), **18**(1): 48—49.
- Zhou J(周娟), Jia E(贾恩), Liu FT(刘福堂). 2002. The Methods of gastrodin's determination in *Gastrodia elata*. (天麻中天麻素含量测定方法)[J]. *Prac J Med & Pharm*(实用医药杂志), **19**(9): 713—714.
- Hu Z(胡忠), Huang QZ(黄清藻), Liu XZ(刘小浊), *et al.* 1999. Primary structure and cDNA cloning of the antifungal protein GAFP-1 from *Gastrodia elata* (天麻抗真菌蛋白 GAFP-I 的一级结构和 cDNA 克隆)[J]. *Acta Bot Yunnan*(云南植物研究), **21**(2): 131—138.
- Wang XC(王晓晨), Willson Ardiles Diaz, GUY BAUW. 1999. Molecular cloning of GAFP-1 an antifungal protein from *Gastrodia elata* (天麻中一种抗真菌蛋白基因的克隆)[J]. *Acta Bot Sin*(植物学报), **41**(10): 1 041—1 045.
- Ding GH(丁国华), Chi CY(池春玉), XU QJ(徐启江), *et al.* 2003. Electrophoretic analysis of proteins in D1 generation after exogenous DNA introduced of tobacco(外源 DNA 导入烟草后 D1 代植株的蛋白质电泳分析)[J]. *Plant Physiol Commun*(植物生理学通讯), **39**(2): 153—155.

周鹤峰, 等: 野生天麻 DNA 导入马铃薯实现遗传转化的研究
 ZHOU He-feng, et al.: A genetic transformation study of introducing wild
Gastrodia elata DNA into potato

图版 I
 Plate I



A. 野生天麻 DNA 琼脂糖凝胶电泳图; 1,2,3,4,6,7,8,9,10; 野生天麻 DNA; 5; λ -DNA(48.5kb)。B. 正常马铃薯紫外扫描图谱。C. 转化马铃薯紫外扫描图谱。D. PCR 扩增结果。1,2,3; 转基因马铃薯; 4; 正常马铃薯; 5; 野生天麻; 6; Marker。E. SDS-PAGE 电泳图谱; 1; 野生天麻; 2; 正常马铃薯; 3,4; 转基因马铃薯; 5; Marker。F. 薄层层析图谱; 1,2,3; 转化株; 4; 天麻素标准品; 5; 野生天麻; 6; 正常株。

A. The agarose gel electrophoretogram of wild *Gastrodia elata* DNA; 1,2,3,4,6,7,8,9,10; wild *Gastrodia elata* DNA; 5; λ -DNA(48.5kb)。B. The ultraviolet scan figure of normal potato。C. The ultraviolet scan figure of transgenic potato。D. Results of PCR amplification; 1,2,3; transgenic potato; 4; normal potato; 5; wild *Gastrodia elata*; 6; Marker。E. The gram of SDS-PAGE; 1; wild *Gastrodia elata*; 2; normal potato; 3,4; transgenic potato; 5; Marker。F. The gram of thin-layer chromatography; 1,2,3; transgenic potato; 4; gastrodin; 5; wild *Gastrodia elat*; 6; normal potato。