

## 转入 *HPT1* 基因的油菜种子中维生素 E 含量的提高

黄智明<sup>1,2</sup> 翁海波<sup>2,\*</sup> 席宇<sup>2</sup> 韩绍印<sup>2</sup> 王时征<sup>2</sup>

<sup>1</sup> 南京大学生命科学学院, 南京 210093; <sup>2</sup> 郑州大学生物工程系, 郑州 450001

**摘要** 尿黑酸植基转移酶(HPT)是天然维生素 E 合成途径中的关键酶, 拟南芥中编码 HPT 的基因 *HPT1* 转入油菜种子特异表达后得到转基因油菜。初步的检测发现, 其种子中的维生素 E 含量有所提高。

**关键词** 油菜; 维生素 E; *HPT1* 基因

## Increase of Vitamin E Content in the Seeds of *Brassica napus* L. with Expression of *HPT1*

HUANG Zhi-Ming<sup>1,2</sup>, WENG Hai-Bo<sup>2,\*</sup>, XI Yu<sup>2</sup>, HAN Shao-Yin<sup>2</sup>, WANG Shi-Zheng<sup>2</sup>

<sup>1</sup>School of Life Sciences, Nanjing University, Nanjing 210093, China; <sup>2</sup>Department of Bioengineering, Zhengzhou University, Zhengzhou 450001, China

**Abstract** The committed step in vitamin E biosynthesis was catalyzed by the homogentisate phytyltransferase (HPT). *HPT1* which encoded HPT in *Arabidopsis thaliana* was specifically expressing in the seeds of *Brassica napus* L.. Primary results showed that vitamin E content was higher in transgenic *B. napus* than that in the control.

**Key words** *Brassica napus* L.; vitamin E; *HPT1*

尿黑酸植基转移酶(homogentisate phytyltransferase, HPT)是叶绿体中的一种膜结合蛋白酶, 催化维生素 E (vitamin E, VE)合成途径中的尿黑酸盐(homogentisate, HGA)和植酸盐(phytyldiphosphate, PDP)的缩合反应。编码 HPT 的 *slr1736* 和 *HPT1* 的基因已分别从蓝细菌集胞藻(*Synechocystis* sp. PCC 6803)和拟南芥中得到克隆(Savidge等 2002; Collakova和DellaPenna 2001, 2003)。业已证实, 拟南芥叶中的 HPT 活性制约 VE 的合成, 是 VE 合成中的关键酶。拟南芥植物组织中的 HPT 酶活性对生育酚合成有限制性作用也已得到证实, 拟南芥中 HPT 过量表达的叶中 VE 含量增加 4.4 倍, 种子中增加 1.4 倍(Collakova和DellaPenna 2003)。油菜(*Brassica napus* L.)是仅次于大豆的第二大植物油脂来源, 油脂中 VE 含量与食用油的抗氧化活性有关, 它可增加油的储藏时间和稳定性。油菜与拟南芥同属于十字花科植物, 有很高的同源性。如果能将拟南芥中与 VE 合成有关的 *HPT1* 基因转入油菜, 以提高油菜种子中 VE 的含量, 其意义是不言而喻的。为此, 本文对此问题初步作了探讨, 现报道如下。

## 材料与方法

双低油菜优良品种‘沪油-15’(*Brassica napus* L. cv. Huyou-15)由上海农业科学院提供, 哥伦比亚型拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)为郑州大学生物工程系保存植株。大肠杆菌菌株 JM109 和 HB101、根癌农杆菌菌株 LBA4404、植物表达载体 pCambia3301 由郑州大学生物工程系保存。限制性内切酶、高保真 DNA 聚合酶 Primerstar、Taq DNA 酶、逆转录酶以及载体 pMD18-T 购自大连 Takara 生物工程有限公司。DL- $\alpha$ -生育酚(VE)购自 Sigma 公司; FeCl<sub>3</sub> 和 1, 10-邻菲啰啉购自上海生工生物技术有限公司。

构建植物双元转化载体 p3301-HPT1 时, 以油菜 DNA 为模版, PCR 扩增 Napin 启动子。扩增引物为 *Napin-F*: 5' GGGTCTAGATCTTCATCGG-GATTGATTCC 3'; *Napin-R*: 5' GGCCATGGAT-CCTGTATGTTTTAATCTTGTTTGT 3'。装入

收稿 2006-04-21 修定 2006-08-24

\*通讯作者(E-mail: hbweng@163.com, Tel: 0371-65038081)。

pMD18-T 载体, 测序鉴定。提取拟南芥总 RNA, RT-PCR 扩增 *HPT1* 基因。扩增引物 *HPT1*-F: 5' AAAGGATCCATGGAGTCTCTGCTCTCTAGTTC-TTCTC 3'; *HPT1*-R: 5' AAAGAGCTCTCACTT-CAAAAAAGGTAACAGCAAGTAC 3'。装入 pMD18-T 载体, 测序鉴定。

以 pCambia3301 为骨架, 构建植物双元转化载体。XbaI 和 BamHI 双酶切装入 pMD18-T 的 Napin 启动子, 与同酶切的 pCambia3301 载体连接。以 BamHI 和 SacI 酶切 pMD18-T 载体上的 *HPT1* 基因, 装入同酶切的主载体上。以 SacI 和 EcoRI 酶切 pBI121 上的 Nos 终止子 (nopaline synthase terminator), 装入主载体 *HPT1* 基因后面, 构建载体 p3301-HPT1, 质粒图谱见图 1。

转化油菜用三亲杂交法 (Draper 等 1988), 质粒转化农杆菌 LBA4404。叶柄转化法转化油菜, 农杆菌侵染后, 转入含有 3 mg·L<sup>-1</sup> 草胺磷 (PPT)、250 mg·L<sup>-1</sup> 羧苄青霉素 (Cb) 的 MS 分化培养基 (MS+2 mg·L<sup>-1</sup> 6-BA+0.15 mg·L<sup>-1</sup> IBA+3.5 mg·L<sup>-1</sup> AgNO<sub>3</sub>) 上。出现抗性愈伤组织和长出绿芽后, 切下转入含相同抗生素的 MS 培养基中继代培养。当芽长成 2~3 cm 高的小苗时, 转入含相同抗生素的 1/2 MS 生根培养基诱导生根。

获得 T<sub>0</sub> 代转基因油菜后, PCR 初步检测转基因植株, 提取转基因植物 DNA, 用限制性内切酶 HindIII 完全酶切, 随机引物法探针标记, α-P<sup>32</sup>-dCTP 标记 *HPT1* 基因为探针, Southern 杂交分析, 采用 Sambrook 等 (1989) 的杂交方法。检

测阳性植株进行 GUS 染色检测, 分析标记基因 *GUS* 能否正常表达。采用 Jefferson (1987) 的染色方法, 将剪成小块的油菜叶片浸泡在 100~200 μL 染色液中, 于 25~37°C 中保温 3~4 h 或过夜。然后, 转入 70% 乙醇中脱色 2~3 次, 阳性显蓝色, 阴性样品无色或白色。

VE 含量分析采用分光光度法 (刘云等 2005; 邢志等 1999)。取转基因油菜, 每株取 5 g, 研磨后溶于 10 mL 无水乙醇, 非转基因油菜作为对照。每份种子的乙醇抽提液, 快速风干浓缩后马上加入 350 μL 乙醇充分溶解, 然后加入 50 μL 6.0013 mmol·L<sup>-1</sup> 的 1,10-邻菲罗啉和 50 μL 1.0011 mmol·L<sup>-1</sup> 的 FeCl<sub>3</sub> 溶液, 显色 15 s 后立即加入 50 μL 4.0125 mmol·L<sup>-1</sup> 的 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 溶液终止显色, 于 510 nm 处测定吸光度, 与 DL-α-生育酚作成的标准曲线对比, 计算含量。

## 结果与讨论

### 1 转化油菜 p3301-HPT1 载体的构建

以 pCambia-3301 为骨架, 在多克隆位点先后加上 Napin 启动子、*HPT1* 基因和 Nos 终止子 (图 1)。测序鉴定正确, 酶切鉴定如图 1。

### 2 转基因油菜的获得

获得 T<sub>0</sub> 代转基因油菜后, PCR 初步检测, Southern 杂交做进一步分析, HindIII 完全酶切, *HPT1* 为探针。在 65 株转化植物中, 有 16 株杂交为阳性, 部分杂交结果如图 2。取 16 株转基因油菜叶子进行 GUS 染色, 12 株染色为阳性, 染

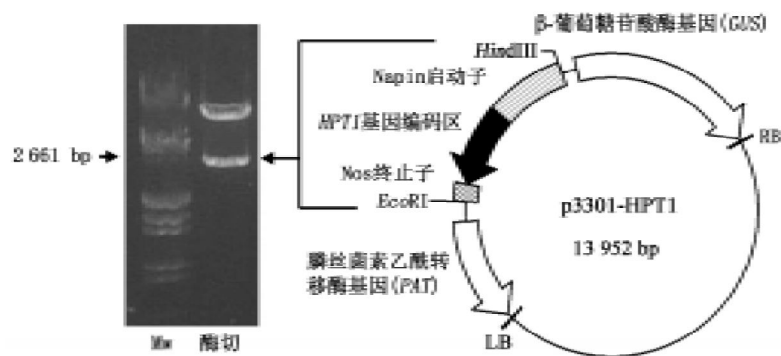


图1 p3301-HPT1质粒图谱与酶切鉴定

Fig. 1 Diagram of p3301-HPT1 vector and its identification of restriction sites  
酶切: EcoRI 和 HindIII 双酶切鉴定; Mw: DNA Marker ( $\lambda$ DNA/EcoRI+HindIII)。

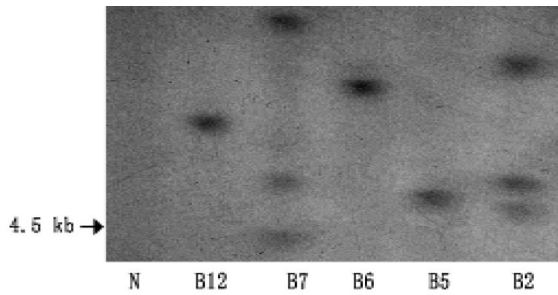


图2 部分 $T_0$ 代转基因油菜株系Southern杂交图谱  
Fig. 2 The graph of southern blot hybridization of some  $T_0$  transgenic strains of *B. napus*

N: 非转基因油菜; B2、B5、B6、B7 和 B12:  $T_0$  代转基因油菜。

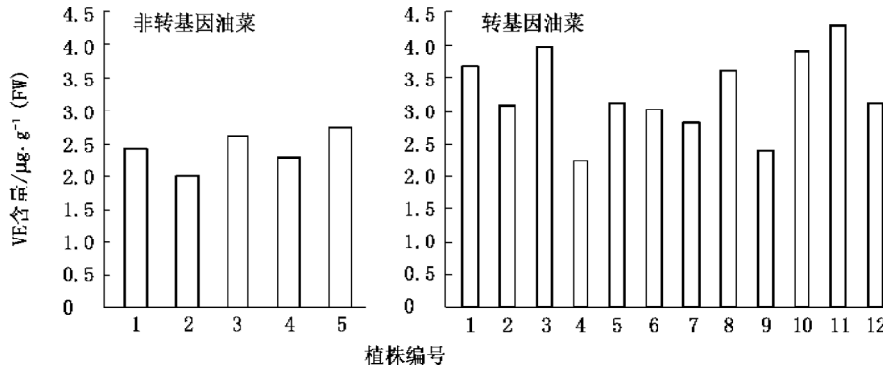


图3 非转基因与转基因油菜籽中VE的含量

Fig. 3 VE contents in non-transgenic and transgenic seeds of *B. napus*

于性状分离, 有些种子可能没有转基因的性状。因此, 从总体上讲, VE 含量可能低于实际转基因种子的含量。

### 参考文献

- 刘云, 丁霄霖, 胡长鹰 (2005). 分光光度法测定天然维生素E总含量. 粮油食品科技, 13 (4): 47~49
- 邢志, 陈培榕, 刘芳 (1999). 测定维生素E的分光光度法研究. 现代仪器, 4: 19~21
- Collakova E, DellaPenna D (2001). Isolation and functional analysis of homogentisate phytyltransferase from *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Arabidopsis*. Plant Physiol, 127 (3): 1113~1124
- Collakova E, DellaPenna D (2003). Homogentisate phytyltrans-

色结果未显示。

### 3 转基因油菜中的脂肪酸含量分析

用DL- $\alpha$ -生育酚作成了标准曲线, 回归方程为 $y=0.0097x-0.0043$ , 一致性系数为0.9972 (资料未列出),  $x$ 为VE的质量浓度( $\mu\text{g}\cdot\text{mL}^{-1}$ ),  $y$ 为吸光度。取非转基因油菜5株, 测定新鲜种子中VE含量的结果表明, 每克种子VE含量约为2.42  $\mu\text{g}$ ; 12株 $T_0$ 代转基因油菜, 测定种子中VE含量的结果表明, 每克种子VE含量约为3.27  $\mu\text{g}$  (图3)。由此可见, 在特异表达 *HPT1* 基因的转基因油菜籽中, VE含量明显提高, 约增加1/3。

本文中分析的是 $T_0$ 代转基因的油菜种子, 由

ferase activity is limiting for tocopherol biosynthesis in *Arabidopsis*. Plant Physiol, 131 (2): 632~642

Draper J, Scott R, Armitage P, Walden R (1988). Plant Genetic Transformation and Gene Expression. Oxford: Blackwell Scientific Publications

Jefferson RA (1987). Assaying chimeric genes in plants: the GUS gene fusion system. Plant Mol Biol Rep, 5: 387~405

Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Molecular Cloning: A Laboratory Manual. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press

Savidge B, Weiss JD, Wong YH, Lassner MW, Mitsky TA, Shewmaker CK, Post-Beittenmiller D, Valentin HE (2002). Isolation and characterization of homogentisate phytyltransferase genes from *Synechocystis* sp. PCC 6803 and *Arabidopsis*. Plant Physiol, 129 (1): 321~332