

在烟草中瞬时表达迷迭香酸的研究

梁童瑶¹,邢丙聪²,张治海³,麻鹏达¹,梁宗锁^{1,2},韩蕊莲^{1,2*}

(1. 西北农林科技大学 生命科学学院,陕西 杨陵 712100;2. 中国科学院 水利部水土保持研究所,陕西 杨陵 712100;
3. 陕西省安塞县果业发展局,陕西 安塞 717499)

摘 要:遗传转化一直以来都是研究药用植物次生代谢物调控的重要手段,虽然具有重现性好的优势,但获得稳定转化的毛状根体系或转基因植株往往费时费力,该方法无法满足大批量药用植物次生代谢调控相关基因的研究需求。农杆菌介导的瞬时转化以其易操作、低成本、短周期的优势,已被广泛应用于植物功能基因的研究中。然而目前药用植物的功能基因研究还常使用稳定遗传转化,或一些高成本、高难度的瞬时转化方法(如基因枪、原生质体转化等)。因此,本研究利用 pEAQ 载体在本氏烟草叶片中高效表达了一个或多个外源基因,这将为外源基因在烟草中快速有效的表达提供新途径,也为进一步探究其功能提供了一条思路。多个外源基因的高效共表达也为在本氏烟草中异源构建次生代谢途径提供了可能。

关键词:瞬时转化;烟草;pEAQ;异源代谢;迷迭香酸

中图分类号:S572 **文献标志码:**A **文章编号:**1001-7461(2017)01-0179-05

Transient Expression of Rosmarinic Acid in Tobacco

LIANG Tong-yao¹,XING Bing-cong²,ZHANG Zhi-hai³,MA Peng-da¹,LIANG Zong-suo^{1,2},HAN Rui-lian^{1,2,*}

(1. College of Life Sciences, Northwest A&F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;
2. Institute of Soil and Water Conservation, CAS & MWR, Yangling, Shaanxi 712100, China;
3. Shaanxi Ansai Fruit Industry Development Bureau, Ansai, Shaanxi 717499, China)

Abstract: Genetic transformation is an important mean in the study of secondary metabolism regulation of medicinal plants. The advantage of this method is its high reproducibility. However, it is time-consuming to get stable hairy root system or difficult for transgenic plants, and it can not operate in large scale as well. Transient transformation mediated by *Agrobacterium* is easy to operate with low cost and short period, which is widely used in the study of functional genes. At present, stable genetic transformation and some high cost, difficult transient transformation methods (e. g. gene gun, protoplast transformation) are usually used in the study of the function genes in medicinal plants. In this paper, one or more exogenous genes were expressed efficiently in *Nicotiana benthamiana* leaf by using the pEAQ system. The results would provide a new way for the exogenous genes express efficiently in tobacco, and also provide an idea way for further study of the genes function. Meanwhile, the high-efficient co-expression of exogenous genes would also provide the possibility for the construction of secondary metabolic pathways in *N. benthamiana*.

Key words: transient transformation; *Nicotiana benthamiana*; pEAQ; heterologous metabolism; rosmarinic acid

瞬时转化系统已经成为可以替代稳定转化的一种手段^[1]。根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 是植物遗传转化的常用工具,因其具有低成本、易操作、成功率高的优点,已应用于包括基因表

收稿日期:2016-05-23 修回日期:2016-06-27

基金项目:国家自然科学基金项目(81373908);国家自然科学基金项目(81403033);国家科技部“十二五”科技支撑项目(2015BAC01B03)。

作者简介:梁童瑶,男,硕士,研究方向:药用植物次生代谢调控。E-mail:liangty89@sina.com

* 通信作者:韩蕊莲,女,博士,研究员,研究方向:中草药规范化栽培的理论与技术。E-mail:hanrl@nwsuaf.edu.cn

达检测、基因沉默、亚细胞定位、蛋白互作分析、抑制子功能鉴定等多种研究当中^[2]。瞬时表达系统在外源重组蛋白的合成、生产中也扮演了重要角色。pEAQ 系列瞬时表达载体是在目的基因两侧添加了 CPMV 病毒 5'-UTR 和 3'-UTR,并同时与病毒沉默抑制因子 P19 共表达,从而实现大量表达目的蛋白的效果^[3]。目前 pEAQ 系列载体已成功用于包括人胃脂肪酶(human gastric lipase,hGL)、重组人血清白蛋白(human serum albumin,HSA)等多种重组蛋白的表达^[4],在木本植物杨树(*Populus*)^[5]、尾巨桉(*Eucalyptus urophylla* × *E. grandis*)^[6]等林木抗病虫害、抵御不良环境等方面也有较多研究^[7]。并且,这些外源蛋白的表达都是在烟草中完成的。因此,我们可以推想,利用该系统能够在烟草中表达药用植物次生代谢物合成相关的一个或多个酶基因,从而实现次生代谢物合成途径的异源构建,也为应用多年生木本植物生产此生代谢物质研究打下基础。

迷迭香酸具有抗病毒、抗菌、抗炎、抗血栓等多方面的生物活性^[8],在食品、保健品、防腐剂、化妆品、医药等方面已有着广泛应用^[9-10],随着人们健康意识的不断增强,对植物来源的迷迭香酸需求日益增大,但目前生产的迷迭香酸难以满足日益增长的市场需求。因此利用基因工程方法在生物量大、生长周期短的异源植物中高效生产迷迭香酸是有效的解决途径。迷迭香酸通过苯丙氨酸代谢途径产生,与木质素、黄酮类等的代谢上游途径一致,这也为其他苯丙素类代谢调控打下研究基础。烟草具有生长快速、生物量大的特点,适合用于生产迷迭香酸,而 pEAQ 载体,能在烟草中高效表达一个或多个外源基因。因此可以推测,应用 pEAQ 载体在烟草叶片中同时表达迷迭香酸合成相关转录因子和结构基因,能异源合成迷迭香酸。

1 材料与方法

1.1 材料

本氏烟草(*Nicotiana benthamiana*)的萌发与培养:本氏烟草种子来自陕西省中药指纹图谱与天然产物库研究中心实验室保存。将种子均匀撒在装有植物幼苗培养基质的穴盘中,浇水浸透。将穴盘置于植物培养间萌发培养,培养条件:温度 25±2℃,光照时间 12~14 h,定期浇水保证培养基质湿润。选生长状态相近的 1 月龄本氏烟草作为农杆菌注射材料。

1.2 方法

1.2.1 载体构建 pEAQ 载体为陕西省中药指纹图

谱与天然产物库研究中心实验室保存,载体 pEAQ-HT-GFP、pEAQ-HT-DEST1、pEAQ-HT-DEST1-Cb-HPPR、pEAQ-HT-DEST1-AtMYB12、pEA Q-HT-DEST1-AtMYB15、pEAQ-HT-DEST1-AtMYB 75 的构建按照 Invitrogen 公司 GATEWAY® 试剂盒说明书操作。

1.2.2 农杆菌介导转化烟草叶片

1.2.2.1 EHA105 感受态细胞的制备

1)挑取根癌农杆菌 EHA105 单菌落,接种于 2 mL LB 液体培养基(50 mg · L⁻¹ Rif),恒温摇床中 28℃,220 r · min⁻¹震荡培养过夜。

2)将 1 mL 过夜菌液加入到 50 mL 同样抗生素的 LB 液体培养基中,28℃、220 r · min⁻¹培养至 OD₆₀₀=0.5。

3)5 000 r · min⁻¹离心 5 min,弃上清。加入 40 mL 10%甘油(*v/v*)充分震荡混匀,冰浴 30 min。

4)4℃、5 000 r · min⁻¹离心 5 min,弃上清。加入 30 mL 10%甘油悬浮菌体,4℃、5 000 r · min⁻¹离心 5 min。

5)加入 30 mL 10%甘油悬浮菌体,4℃、5 000 r · min⁻¹离心 5 min。

6)弃上清,加入 2 mL 10%甘油充分悬浮菌体。

7)分装于 1.5 mL 的无菌离心管中(100 μL · 管⁻¹)。液氮中速冻,-80℃ 保存备用。

1.2.2.2 感受态细胞的电击转化

1)取 1 μL 重组质粒加入到 100 μL EHA105 感受态细胞中,轻轻混匀,冰浴 30 min。

2)调节电转仪的电压为 2.5 kV,电击时间为 5 ms。

3)把质粒和感受态细胞的混合物转移入电击杯底部,迅速放进电转仪。

4)按设定的参数,启动电脉冲。

6)电击以后尽快取出样品,加入 1 mL 新鲜 LB 液体培养基,28℃、150 r · min⁻¹轻摇 4~6 h。

7)取菌液涂布于含 Rif(50 mg · L⁻¹)及质粒所含抗性卡那霉素(50 mg · L⁻¹)的 LB 固体培养基上 28℃ 暗培养 2~3 d。

8)挑取单菌落,摇菌后提取质粒,测序验证载体。

1.2.2.3 农杆菌质粒提取与测序 农杆菌质粒提取按照 TaKaRa 质粒小提试剂盒说明书进行。提取的重组质粒测序由 Invitrogen 公司完成。

1.2.2.4 农杆菌注射法转化烟草叶片 转化入农杆菌中的重组质粒经测序鉴定序列正确后,活化对应的转化农杆菌 EHA105 用于注射侵染。

1)挑取转化成功的农杆菌菌落,于固体抗性培养基平板(含 50 mg · L⁻¹ Rif,50 mg · L⁻¹ Kan)上

划线培养。28℃ 培养 3 d。

2)刮取平板上农杆菌,接种于含对应抗性筛选的 LB 液体培养基中,28℃、220 r·min⁻¹ 震荡培养 18~24 h。

3)将 25 mL 菌液转移至 50 mL 离心管中,4℃、5 000 r·min⁻¹ 离心 10 min,用 5 mL 接种缓冲液重悬菌体。

4)将重悬液置于室温孵育不少于 2 h。

5)分光光度计检测菌液 OD₆₀₀ 值,用接种缓冲液调节接种菌液浓度至 OD₆₀₀ = 1.0。

6)将需要混合注射的菌液按相同体积混匀,用于注射接种。

7)用针头轻点待接种植物叶片下表皮,注意尽量不要刺穿叶片。用 5 mL 无菌注射器吸取适当菌液,于叶片破口处缓慢注入菌液,直到叶片内部被菌液浸润。

8)用无菌水以相同方式注射叶片作为阴性对照。

9)接种后约 5 d 左右观察报告基因表达情况。

10)若需进一步分析试验,叶片液氮速冻后于 -80℃ 冰箱保存备用。

1.2.3 HPLC 检测转化烟草叶 4-羟基苯乳酸 4-羟基苯乳酸的 HPLC 检测参照沐万孟^[11]等,略有改动。

HPLC 条件:测定采用 Waters 液相系统,配置 Waters 1525 二元色谱泵,Waters 2996 PAD 检测器,色谱柱型号为 Waters SunFireC18 (250 mm×4.6 mm,5 μm)。色谱条件为:流速 1 mL·min⁻¹,柱温 30℃,进样体积 10 μL,检测波长 210 nm。流动相为甲醇和 0.05% 三氟乙酸水溶液(*m/v*)。梯度洗脱程序为:0~20 min 为 10%~100% 甲醇,20~23 min 保持 100% 甲醇。

本氏烟草叶样品冷冻干燥处理:将新鲜的烟草叶片用锡纸包裹,在液氮中速冻。将速冻样品置于真空冷冻干燥机样品仓内。真空冷冻干燥 2 d 后,取出干燥样品。将干燥叶在研钵中研磨成粉,以备 HPLC 分析。

本氏烟草叶次生代谢物提取:精密称取上述干燥样品粉末 0.050 g,加入 10 mL 甲醇-水(7:3 *v/v*)提取液,超声 45 min,13 000 g 离心 10 min,取上清液过 0.45 μm 滤膜备用。

2 结果与分析

2.1 农杆菌介导转化烟草叶片

pEAQ 载体转化本氏烟草叶片,选用以下 5 个侵染或组合侵染方式:*GFP*、*GFP*+*CbHPPR*、*CbHPPR*+*AtMYB75*、*CbHPPR*+*AtMYB12*、*CbH*

PPR+*AtMYB15*。注射后第 5 天,于长波紫外灯下观察。结果如图 1、图 2 所示,混合注射的 *GFP*+*CbHPPR* 与单独注射 *GFP* 的本氏烟草叶片均大量表达了报告基因绿色荧光蛋白的表达。并且混合注射的表达量也有很高的水平,与单独注射 *GFP* 并无明显差异。

MYB 家族的 3 个转录因子 *AtMYB75*、*AtMYB12*、*AtMYB15* 与功能基因 *CbHPPR* 共注射后对本氏烟草叶片产生明显的表形差异。*AtMYB75* 注射后叶片保持正常形态,而 *AtMYB12* 与 *AtMYB15* 的注射组均表现为叶片注射部位的枯萎坏死。说明,上述 3 个转录因子在烟草中产生了其他的生理作用。

2.2 HPLC 检测转化烟草的叶片成分变化

经 HPLC 检测,4-羟基苯乳酸的保留时间 8.7 min,而各侵染组合下的本氏烟草叶片中均未检测到对应保留时间的 4-羟基苯乳酸。其中 *GFP*+*CbHPPR*、*CbHPPR*+*AtMYB75* 转化组合下的本氏烟草叶与单独转化 *GFP* 的样品具有相似的色谱峰型。而转化 *CbHPPR*+*AtMYB12* 与 *CbHPPR*+*AtMYB15* 的本氏烟草叶呈现的色谱峰与上述 3 个侵染组呈现出明显不同,两者之间也存在明显差异。这可能与转录因子 *AtMYB12*、*AtMYB15* 大量过表达后枯萎致死有关(图 3)。

3 结论与讨论

从侵染结果可以明显看出,pEAQ 系列载体能够在本氏烟草叶片中大量表达外源基因。这得益于该载体在目的基因两侧添加了 CPMV 5'-UTR 和 3'-UTR,提高了表达效率。此外,从图 1、图 2 中转化 *GFP* 与 *CbHPPR*+*GFP* 的结果来看,无论是用单独注射的方式转化单个外源基因,还是采用混合注射法转化多个外源基因,都能得到良好的表达效果。

MYB 转录因子在植物生长发育、代谢调控、非生物和生物胁迫响应中起到重要作用。丹参中分别过表达 *AtMYB75*/PAP1、*AtMYB90*/PAP2 均可显著上调苯丙烷代谢的通用途径基因表达,促进迷迭香酸合成,同时提高木质素和类黄酮的含量^[12]。Y. H. Chen^[13]等研究发现过表达 *AtMYB15* 基因上调拟南芥莽草酸途径中几乎所有酶基因的表达。过表达 *AtMYB12* 基因上调拟南芥、烟草和番茄中黄酮醇合成酶基因的表达,提高黄酮醇含量^[14-15]。橡树中 *HbMYB85a/b* 和 *HbMYB103a/b* 可以正调控橡胶树次生长和木质素合成^[16]。这说明植物 MYB 转录因子基因在不同植物种促进苯丙烷代谢的通用



图 1 携 pEAQ 系列载体的农杆菌 EHA105 注射烟草,接种 5 d 后观察(叶片)

Fig. 1 Transient express of the pEAQ series vectors in tobacco by EHA105 injection assays(leaves)

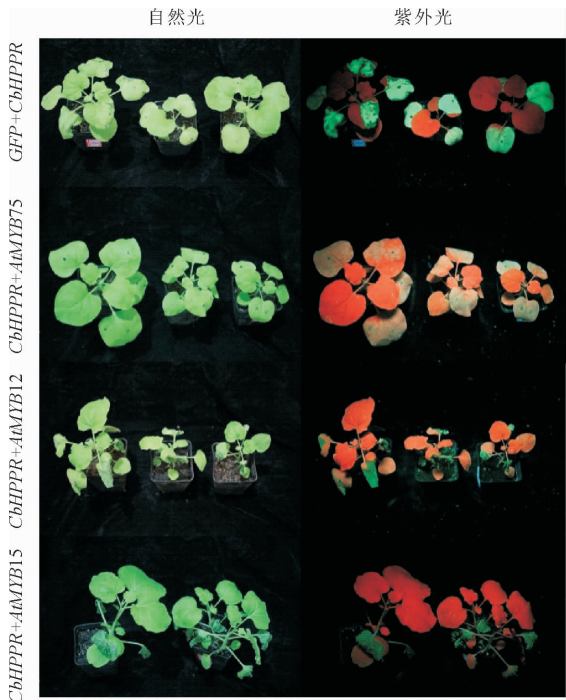


图 2 携 pEAQ 系列载体的农杆菌 EHA105 注射本氏烟草,接种 5 d 后观察(整株)

Fig. 2 Transient express of the pEAQ series vectors in tobacco by EHA105 injection assays(Whole plant)

途径基因表达,因此它们有可能是植物苯丙烷类生物合成的正调节因子,可以提高林木抗病虫以及抵抗不良环境能力。

通过 MYB 转录因子与功能基因 *CbHPPR* 共注射的方式,发现起正调控的 *AtMYB12*、*AtMYB15* 转录因子的过表达对本氏烟草叶片有明显的致死作用,表现为注射部位的萎蔫坏死。而这种致死现象却在同样条件下同样起正调控作用的 *AtMYB75* 转录因子过表达时没有发生。因此推测,都起正调控

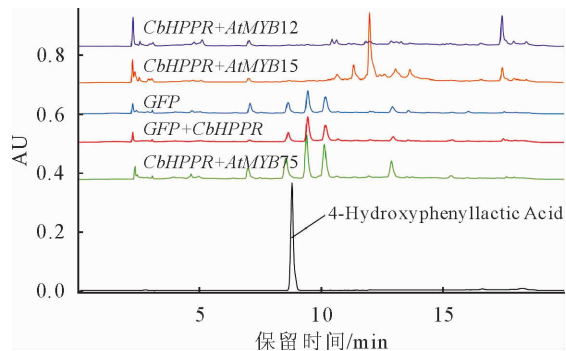


图 3 pEAQ 系列载体转化烟草叶片后 HPLC 分析

Fig. 3 The HPLC map of pEAQ series vectors transformation tobacco leaves

作用的 MYB 转录因子 *AtMYB12*、*AtMYB15*、*AtMYB75* 在本氏烟草中起到了不同的代谢调控作用,其中某些调控作用的过量放大会导致植物致死。

利用基因工程的方法在生物量大、生长快速及多年生的异源植物中高效生产迷迭香酸是满足日益增长的市场需求的有效途径。因此,利用 pEAQ 载体能高效表达外源基因的特点,在烟草中过表达 HPPR,检测其底物 4-羟基苯乳酸的积累变化情况,探讨 HPPR 在该代谢途径中的作用。但 HPLC 结果(图 3)显示,几个试验组本氏烟草叶中均未检测到 4-羟基苯乳酸。可能由于 4-羟基苯乳酸为代谢途径的中间产物,若非通过基因沉默或酶抑制等方式阻断代谢途径,便不能产生 4-羟基苯乳酸的积累。通过图 3 还能发现单独转化 *GFP*、混合转化 *CbHPPR*+*GFP*、*CbHPPR*+*AtMYB75* 的本氏烟草叶片具有相似的色谱峰形。而致死的 *CbHPPR*+*AtMYB12* 与 *CbHPPR*+*AtMYB15* 转化叶片,却呈现不同的色谱峰形。

瞬时表达是一种常规技术,目前主要应用于基因表达检测、基因沉默、亚细胞定位、蛋白互作分析、抑制子功能鉴定等多种研究中。但是作为一种试验技术应用于某种药用成分的生产还未见报道。本试验证明利用瞬时表达系统在烟草中表达药用植物次生代谢物生物合成相关的一个或多个酶基因的可能,为实现次生代谢物合成途径的异源构建提供参考,为利用林木等多年生植物生产药用物质研究打下基础。

总之,本试验成功通过 pEAQ 载体在本氏烟草叶片中高效表达了一个或多个外源基因。这在烟草中快速有效的表达外源基因并进一步探究其功能提供了有力方法。多个外源基因的高效共表达也给异源构建次生代谢途径提供了可能。根据已知的迷迭香酸合成途径,在烟草叶片中共表达彩叶草 *Cb-HPPR*、*CbRAS*、*CbCYP98A14* 结构基因,有望在烟草中构建出迷迭香酸合成途径,在烟草中构建出迷迭香酸合成途径,这也为以后在林木等多年生植物中生产迷迭香酸打下基础。

参考文献:

[1] MCINTOSH K B, HULM J L, YOUNG L W. A rapid *Agrobacterium*-mediated *Arabidopsis thaliana* transient assay system[J]. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2004, 22 (1):53-61.

[2] 赵文婷,魏建和,刘晓东,等. 植物瞬时表达技术的主要方法与应用进展[J]. *生物技术通讯*, 2013(2):294-300.

ZHAO W T, WEI J H, LIU X D, *et al.* Advance of the main methods and applications of plant transient expression system [J]. *Letters in Biotechnology*, 2013(2):294-300. (in Chinese)

[3] SAINSBURY F, THUENEMANN E C, LOMONOSSOFF G P. pEAQ: versatile expression vectors for easy and quick transient expression of heterologous proteins in plants[J]. *Plant Biotechnology Journal*, 2009, 7(2):682-693.

[4] SUN Q Y, DING L W, LOMONOSSOFF G P, *et al.* Improved expression and purification of recombinant human serum albumin from transgenic tobacco suspension culture[J]. *Journal of Biotechnology*, 2011, 155(2):164-172.

[5] 冯连荣,宋立志,张妍,等. 根癌农杆菌介导杨树遗传转化的影响因素[J]. *西北林学院学报*, 2015, 30(3):120-126.

FENG L R, SONG L Z, ZHANG Y, *et al.* Influence factors on agrobacterium mediated transformation efficiency of *Populus* [J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2015, 30 (3): 120-126. (in Chinese)

[6] 刘国花,刘奕清,阳佳位,等. 尾巨桉遗传转化体系研究[J]. *西北林学院学报*, 2010, 25(5):64-67.

LIU G H, LIU Y Q, YANG J W, *et al.* Establishment of genetic transformation of *Eucalyptus urophylla* × *E. grandis*[J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2010, 25(5):64-67. (in Chinese)

[7] 姜金仲,李云,薛诺稳,等. 林木遗传转化及其潜在生态风险研究进展[J]. *西北林学院学报*, 2012, 27(1):103-108.

JIANG J Z, LI Y, XUE N W, *et al.* Researches progress on forest transformation and related potential ecological risks[J]. *Journal of Northwest Forestry University*, 2012, 27 (1): 103-108. (in Chinese)

[8] 尤茹,马雪倩,吴炳火,等. 迷迭香酸药理作用研究进展[J]. *四川生理科学杂志*, 2015(2):93-96.

YOU R, MA X Q, WU B H, *et al.* Advance in pharmacological effects of rosmarinic acid[J]. *Sichuan Journal of Physiological Sciences*, 2015(2):93-96. (in Chinese)

[9] 孙岫,汪靖超,李洪涛,等. 迷迭香酸的抗菌机理研究[J]. *青岛大学学报:自然科学版*, 2005(4):41-45.

SUN X, WANG J C, LI H T, *et al.* A study on the antibacterial mechanism of rosmarinic acid[J]. *Journal of Qingdao University: Natural Science Edition*, 2005(4):41-45. (in Chinese)

[10] 方晓璞,解克伟,任春明,等. 迷迭香天然抗氧化剂的应用研究[J]. *中国油脂*, 2014(7):27-29.

FANG X P, XIE K W, REN C M, *et al.* Application of rosemary as a natural antioxidant [J]. *China Oils and Fats*, 2014 (7):27-29. (in Chinese)

[11] 沐万孟,杨钰,贾江花,等. 4-羟基苯乳酸的 HPLC 检测研究[J]. *食品工业科技*, 2011(7):432-434.

MU W M, YANG Y, JIA J H, *et al.* Study on the determination of 4-hydroxy-phenyllactic acid by HPLC[J]. *Science and Technology of Food Industry*, 2011(7):432-434. (in Chinese)

[12] WANG D H, SONG Y, CHEN Y Q, *et al.* Metabolic pools of phenolic acids in *Salvia miltiorrhiza* are enhanced by co-expression of *Antirrhinum majus* Delila and Roseal transcription factors [J]. *Biochemical Engineering Journal*, 2013, 74 (7):115-120.

[13] CHEN Y H, ZHANG X B, WU W, *et al.* Overexpression of the wounding-responsive gene AtMYB15 activated the shikimate pathway in *Arabidopsis*[J]. *Journal of Integrative Plant Biology*, 2006, 48(6):1084-1095.

[14] MEHRTENS F, KRANZ H, BEDNAREK P, *et al.* The *Arabidopsis* transcription factor MYB12 is a flavonol-specific regulation of phenylpropanoid biosynthesis[J]. *Plant Physiology*, 2005, 138(2):1083-1096.

[15] LUO J, BUTELLI E, HILL L, *et al.* AtMYB12 regulates caffeoylquinic acid and flavonol synthesis in tomato; expression in fruit result in very high levels of both types of polyphenol [J]. *Plant Journal*, 2008, 56(2):316-326.

[16] 刘彤. 橡胶树木质素合成相关 MYB 基因的功能鉴定[D]. 海口:海南大学, 2015.