

兔角蛋白基因转化棉花及其纤维品质的改良*

上官小霞 吴 霞 梁运生 张林水 李燕娥**

(山西省农业科学院棉花研究所 运城 044000)

摘 要 利用农杆菌介导转化法,将棉纤维特异表达启动子 *GAE6-3A* 驱动的兔角蛋白基因(*KAP*)转入常规棉花“冀合713”中。PCR及Southern杂交分析表明,兔角蛋白基因已整合进棉花基因组。6个转基因株系中,4个为单拷贝插入,转基因后代的分离符合孟德尔3:1的1对基因的分离规律,外源基因在这些转基因后代中能稳定遗传。对这4个转基因株系T₁代纤维检测结果表明,兔角蛋白基因对棉花纤维品质的影响主要是纤维强度的提高,其中3个株系纤维强度提高率达10%以上。

关键词 棉花 转基因 兔角蛋白基因 纤维品质

中图分类号: Q943.2 **文献标识码**: A **文章编号**: 1671-3990(2008)02-0451-04

Improvement of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) fiber quality by rabbit keratin gene transformation

SHANGGUAN Xiao-Xia, WU Xia, LIANG Yun-Sheng, ZHANG Lin-Shui, LI Yan-E

(Cotton Research Institute, Shanxi Academy of Agricultural Sciences, Yuncheng 044000, China)

Abstract Through *Agrobacterium*-mediated transformation, a rabbit keratin gene driven by a fiber-specific promoter *GAE6-3A*, was introduced into upland cotton cultivar “Jihe 713”. PCR analysis and Southern bolt indicate integration of exogenous rabbit keratin gene into “Jihe 713” genome. The inserted exogenous gene are mono-copies in four of the six cases, and the separation of transgenic progenies of the four lines follow Mendelian pattern of 3:1 in the inheritance of one pair of genes. The foreign gene can be inherited stably through resistance screening by generation. Analyses of fiber quality trait show that the main function of rabbit keratin gene is enhancement of fiber strength. Fiber strength of all the four transgenic lines increases significantly compared with the control, with incremental ratio of the three lines surpassing 10%.

Key words Cotton, Transgene, Rabbit keratin gene, Fiber quality

(Received Dec. 10, 2006; accepted March 9, 2007)

棉纤维的品质主要决定于纤维强度、长度、伸长率等性状,基因型是控制这些性状的主要因素^[1]。由于棉花纤维品质与产量之间为遗传负相关,用传统育种技术同步改良纤维品质与产量有很大困难。随着分子生物学研究的深入和植物转基因技术的逐渐成熟,用基因工程方法改良棉纤维品质已经成为培育优质棉的重要手段。John等^[2]利用棉纤维特异表达启动子将外源合成PHB的基因转入棉花,使棉花纤维中产生脂肪聚酯复合物多羟基丁酸酯(PHB),从而提高了棉纤维的保暖性。Li等^[3]利用农杆菌介导与真空渗透相结合的方法将纤维素合成相关基因 *acsA* 和 *acsB* 导入棕色棉品种,

所获得的转基因棉花纤维长度和强度都有一定的提高。

与棉纤维相比,兔毛在光泽、强度、长度、手感等方面有明显优势。兔毛含50~100种角蛋白成分,可分为中间细丝蛋白和角蛋白相关蛋白KAP。本研究利用农杆菌介导的方法,将中国科学院上海植物生理生态研究所提供的兔角蛋白基因KAP导入常规棉花中,以期改良棉花纤维品质特性,获得高品质的转基因棉花。

1 材料与方法

1.1 植物材料

基因转化所用受体材料为棉花陆地棉品种“冀

* 国家高技术研究发展计划(863计划)项目(2004AA212102, 2003AA222050)资助

** 通讯作者, E-mail: ly8270@126.com

上官小霞(1974~),女,汉族,助研,在读博士,主要从事棉花转基因及棉纤维发育相关基因功能研究。E-mail: sgxx@sibs.ac.cn

收稿日期:2006-12-10 接受日期:2007-03-09

合 713”(JH713)。

1.2 转基因表达载体

棉纤维特异表达启动子 *GAE6-3A* 和兔角蛋白基因 *KAP* 由中国科学院上海植物生理生态研究所提供。植物表达载体为 PCAMBIA2301, 含由 35S 启动子驱动的可那霉素筛选标记基因 *npt II* 及 *GUS* 报告基因, 在此基础上, 构建了含棉纤维特异表达启动子 *GAE6-3A* 驱动兔角蛋白基因 *KAP* 的双元植物表达载体 14BKT(图 1)。

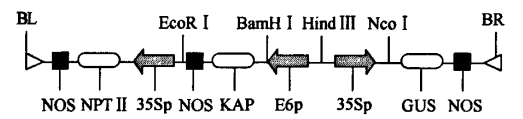


图 1 转基因表达载体 14BKT 示意图
Fig. 1 Sketch map of transgenic vector 14BKT

1.3 转基因棉花的获得

以 5~7 d 的无菌苗下胚轴为外植体, 采用农杆菌介导法^[4]进行转化研究。

1.4 转基因棉花的分子生物学鉴定

1.4.1 卡那霉素涂抹叶片实验

用浓度为 1% 的卡那霉素涂抹转基因棉株及其衍后代植株的顶部叶片, 7 d 后观察叶片对卡那霉素的反应, 叶色正常的为抗卡那霉素植株, 叶色变黄的为卡那霉素敏感植株。

1.4.2 组织化学染色

取 T_0 代或转基因后代棉花不同组织, 浸泡于含 X-gluc 的 GUS 染色液 [$100\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}$ pH 7.0 磷酸缓冲液, $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{K}_3<\text{Fe}(\text{CN})_6>$, $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{K}_4<\text{Fe}(\text{CN})_6\cdot 3\text{H}_2\text{O}>$, $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1}\text{EDTA}$, $0.1\%\text{ TritonX-100}$] 中, 反应终浓度 $0.25\text{ mg}\cdot\text{mL}^{-1}$, $37\text{ }^\circ\text{C}$ 温浴 4 h 以上, 70% 乙醇脱色, 观察。

1.4.3 棉花叶片 DNA 的提取及 T_0 代转基因再生株的 PCR 检测

棉花 DNA 提取参考文献^[5]进行。PCR 检测引物为 5'-CACCATTACCACTTGCTC-3' 和 5'-GTTGTTGCTTTGGCTGTTGC-3'。扩张片段大小为 340 bp。

1.4.4 Southern 杂交分析

20 μg DNA 用 Hind III 和 Xba I 限制性内切酶 $37\text{ }^\circ\text{C}$ 酶切过夜。酶切产物琼脂糖凝胶电泳、凝胶变性、转膜、杂交及洗膜等步骤参照文献^[6]进行。杂交所用探针为 25 ng 经割胶纯化兔角蛋白基因 *KAP* 的 PCR 产物, 用随机引物标记试剂盒 (Primer-a-Gene Labeling System, Promega) 及 $\alpha\text{-}^{32}\text{P}$ -dCTP 标记探针。杂交液购自 Sigma 公司, 杂交温度 $60\text{ }^\circ\text{C}$, 时间 2~4 h。洗去杂交背景后的尼龙膜, 压 X-ray 胶

片进行放射自显影。

1.5 转基因棉花纤维品质检测

收获不同转基因株系的 T_0 代阳性皮棉样品及对照, 送农业部棉花品质监督检验测试中心进行纤维品质 HVI900 (ICC 标准) 测试。

2 结果与分析

2.1 T_0 代再生株的检测分析

对来自 6 个不同转基因株系的 15 株 T_0 代再生试管苗进行了 GUS 组织化学染色和 PCR 检测分析, 结果见表 1。其中 PCR 检测 11 株阳性, GUS 检测 10 株阳性, 兔角蛋白基因 *KAP* 的 PCR 检测阳性率达 73.3%, GUS 检测和 PCR 检测结果相关性较明显。图 2 显示了表 1 中编号为 1~12 转基因再生株兔角蛋白基因 *KAP* 的 PCR 检测结果, 初步证明该基因已经被转入常规棉花中。

表 1 T_0 代转基因再生株的检测分析
Tab. 1 Analysis of T_0 transgenic regenerative plants

编号 Code	克隆号 Transformant	PCR 检测 PCR analysis	GUS 检测 GUS analysis
1	L18-a	-	-
2	L18-b	+	+
3	L18-c	-	-
4	L18-d	+	+
5	L18-e	-	-
6	L16	+	+
7	L12	+	+
8	L25-a	+	+
9	L25-b	+	+
10	L45-a	+	+
11	L45-b	+	+
12	L45-c	-	-
13	L41-a	+	+
14	L41-b	+	+
15	L41-c	+	-

+ 表示阳性, - 表示阴性。+ stands for positive plant; - stands for negative plant.

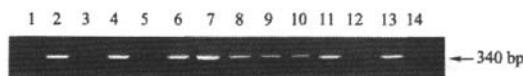


图 2 部分 T_0 代再生株的 PCR 检测
Fig. 2 PCR analysis of part T_0 regenerative plants
图中 1~12 为 T_0 转基因再生株; 13 为 14BKT 质粒; 14 为非转基因棉株。1~12 are T_0 regenerative plants; 13 is 14BKT plasmid; 14 is non-transformed plant.

2.2 转基因棉花的 Southern blot 检测

选取 T₁ 代不同株系的转基因阳性植株叶片, 提取总 DNA, 用 Hind III 酶切过夜, 以免角蛋白基因 KAP 作探针进行 Southern 杂交, 结果见图 3。图 3 表明外源兔角蛋白基因 KAP 已经整合进棉花基因组中。图 3a 所选的 6 个株系中, 4 个为单拷贝插入。

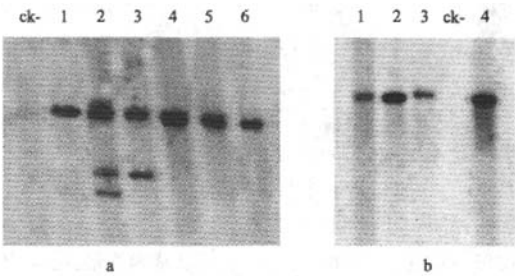


图 3 T₁代转基因阳性植株的 Southern blot 分析
Fig. 3 Southern blot analysis of T₁ positive transgenic plants
a 图中 1~6 分别为 L18、L16、L12、L25、L41、L45 转基因株系 T₁ 代阳性株, ck- 为非转基因植株;
b 图中 1~4 分别代表 a 图中 1、4、5、6 株系, ck- 为非转基因植株。
Fig. a, 1~6 are positive transgenic plants L18, L16, L12, L25, L41 and L45; ck- is non-transformed plant; Fig. b, 1~4 represent line 1, 4, 5, 6 in Fig. a, respectively; ck- is non-transformed plant.

对这几个单拷贝插入的株系 DNA 用 Xba I 酶切, 进行杂交验证(结果见图 3b), 进一步证明外源基因在这几个株系中为单拷贝插入。

2.3 转基因棉花后代的纯合选育及遗传分析

通过卡那霉素检测和 GUS 组织化学检测, 对 L18、L25、L41、L45 4 个转基因株系 T₁ 材料的分离规律进行了分析, 结果表明(表 2), 转兔角蛋白基因棉花 T₁ 代的遗传分离基本符合孟德尔的 1 对基因的遗传规律($\chi^2 < \chi^2_{0.05} = 3.841$)。这进一步验证了上述 Southern 杂交的结果, 即外源兔角蛋白基因在这 4 个转基因株系中为单拷贝插入。因 npt II 基因和 GUS 基因连锁于同一个 T-DNA 上, 且都由组成型表达的 35S 启动子驱动, 所以这两个基因的表达有较明显的相关性。但表 2 中 T₁ 代材料卡那霉素检测和 GUS 组织化学检测结果表明, npt II 基因和 GUS 基因的表达存在着一定的差异, 其原因一方面由于田间卡那霉素检测受外界环境因素影响, 可能存在部分假阳性; 另一方面可能是转基因后代中基因沉默现象所致。所以在转基因后代的选育过程中, 将卡那霉素检测和 GUS 组织化学检测两种方法相结合, 可大大提高转基因后代纯合选育的速度与效率。

表 2 不同转基因株系 T₁ 代的遗传分析
Tab. 2 Genetic analysis of T₁ transgenic progenies of different lines

株 系 Line	总株数 Total plant number	Km+	Km+ (%)	χ^2	GUS+	GUS+ (%)	χ^2
L18	45	33	73.3	0.007 4 (3:1)	30	66.7	1.251 8 (3:1)
L25	38	27	71.0	0.140 3 (3:1)	25	65.7	1.263 1 (3:1)
L41	55	40	72.0	0.054 5 (3:1)	39	70.9	0.296 9 (3:1)
L45	16	13	81.3	0.083 3 (3:1)	11	68.8	0.083 3 (3:1)

表中 Km+ 为卡那霉素检测阳性株, GUS+ 为 GUS 组织化学检测阳性株; 卡方临界值 $\chi^2_{0.01} = 6.635, \chi^2_{0.05} = 3.841$ 。Km+ means the plants tested positive by kanamycin; GUS+ means the plants tested positive by GUS staining. $\chi^2_{0.01} = 6.635, \chi^2_{0.05} = 3.841$.

4 个转基因株系选育到 T₃ 代, 共得到 33 个株行材料。从表 3 可以看出, 转 KAP 基因 T₃ 代材料, npt II 基因表达阳性率均达到 90% 以上。其中 14 个株行阳性率达 100%, 表明到 T₃ 代这些转基因材料已经基本纯合, 外源基因在这些转基因棉花中可以稳定的遗传。

表 3 T₃ 代转基因棉花的纯合选育
Tab. 3 Breeding of homozygous lines of T₃ generation transgenic plants

株系 Line	株行数 No. of lines	Km+ 为 100% 的株行数 Lines no. of 100% Km+	Km+ 为 90% ~ 100% 的株行数 Lines no. of 90% ~ 100% Km+	Km+ 为 90% 以下 的株行数 Lines no. of Km+ lower than 90%	总株数 Total plant number	Km+	Km+ (%)
L18	13	7	6	0	342	334	97.4
L25	6	4	1	1	268	258	96.2
L41	10	1	6	3	461	424	92.0
L45	4	2	0	2	157	142	90.4

表中 Km+ 为卡那霉素检测阳性株。Km+ means the plants tested positive by kanamycin.

表 4 转基因棉花不同株系纤维品质检测结果
Tab. 4 Statistic of physical parameters of transgenic cotton fiber

样品 Sample	长度 Length (mm)	整齐度 Trimness (%)	比强度 Strength (cn·tex ⁻¹)	马克隆值 Micronaire	伸长率 Elongation ratio
L18	28.4 ± 0.230 9	84.8 ± 1.222 0	30.2 ± 0.208 2	4.9 ± 0.173 2	6.3 ± 0.057 7
L41	27.4 ± 0.404 1	84.2 ± 0.435 9	30.0 ± 0.986 5	5.1 ± 0.115 4	6.4 ± 0.208 2
L25	27.6 ± 0.257 1	83.7 ± 0.435 9	30.0 ± 0.173 2	4.9 ± 0.173 2	6.1 ± 0.208 2
L45	27.6 ± 0.230 9	83.2 ± 0.871 8	29.0 ± 1.357 6	5.0 ± 0.251 6	6.4 ± 0.200 0
CK	27.8 ± 0.070 7	82.6 ± 0.848 5	27.0 ± 0.000 0	4.7 ± 0.000 0	6.4 ± 0.070 7

2.4 转兔角蛋白基因棉花的纤维品质检测

各选取 4 个不同转基因株系 T₃ 代棉纤维的 3 个样品,送农业部棉花纤维品质监督检验测试中心进行 HVI900(ICC 标准)检测。结果表明,与非转基因对照相比,4 个转基因棉花株系纤维强度均有不同程度的提高。其中 L18、L25、L41 株系纤维强度提高率达 10% 以上。纤维长度、整齐度、伸长率与对照相比无明显差异,马克隆值与对照相比有所提高但不太明显(表 4),表明兔角蛋白基因的功能主要是对棉花纤维强度的影响。

3 讨论

前面已有报道利用花粉管通道法将兔角蛋白基因导入到常规棉花中,获得了高强度的转基因棉花^[7],但由于花粉管通道的转化机理不清楚,转基因棉花后代遗传不稳定,且没有提供更可靠的分子证据。本研究通过农杆菌介导的方法,将兔角蛋白基因导入到常规棉花品种中,并对转基因后代进行了 Southern 杂交验证。农杆菌介导转化方法的优点之一在于其外源基因为多拷贝或低拷贝插入,本文所检测的 6 个转基因株系,4 个为单拷贝插入,后代遗传较稳定。

转基因棉花纤维品质检测结果表明,外源兔角蛋白基因对棉花纤维品质产生了一定的影响。转兔角蛋白基因棉花纤维比强度比对照提高 10% 左右,但棉纤维长度、整齐度、伸长率等性状无明显变化。棉花纤维品质强调的是一定绒长基础上的纤维强度和马克隆值在内的综合品质。已报道结果表明转基因棉花马克隆值比对照有不同程度的下降^[7],本研究中,转外源兔角蛋白基因棉纤维马克隆值与对照相比有所提高但不太明显,这与已报道的结果相反。可能原因一方面是其转化方法及转

基因受体不同,另一方面受不同的栽培环境和条件所影响。总体认为外源兔角蛋白基因对棉纤维品质的影响突出体现在强度方面,对马克隆值的影响效果不稳定。虽然外源兔角蛋白基因在棉花体内的作用机理还不太明确,但从本文研究结果看,通过转化外源动物角蛋白基因来改良棉花纤维品质显示出了良好的发展前景。

致谢 中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所陈晓亚研究员对本研究给予支持和帮助,谨表谢意!

参考文献

[1] 袁有禄,张天真,郭旺珍,等. 棉花优异纤维品质性状的双列杂交分析[J]. 遗传学报,2005,32(1):79-85
[2] John M. E., Keller G. Metabolic pathway engineering in cotton: Biosynthesis of polyhydroxybutyrate in fiber cells [J]. Proc. Natl. Acad. Sci. USA,1996,93:12768-12773
[3] Li X., Wang X. D., Zhao X., et al. Improvement of cotton fiber quality by transforming the *acsA* and *acsB* genes into *Gossypium hirsutum* L. by means of vacuum infiltration [J]. Plant Cell Reports,2004,22:691-697
[4] 李燕娥,焦改丽,吴家和,等. 棉花农杆菌介导高效转化体系[J]. 中国棉花,2000,27(5):10-11
[5] Li H. W., Luo J. H., Hemphill J. K., et al. A rapid and high yielding DNA miniprep for cotton (*Gossypium* spp.) [J]. Plant Molecular Biology Reporter,2001,19:183a-183e
[6] 萨姆布鲁克 J.,弗里奇 E. F.,曼尼阿蒂斯 T. //金冬雁,黎孟枫译. 分子克隆实验指南(第 2 版)[M]. 北京:科学出版社,1992
[7] 张震林,刘正奎,周宝良,等. 转兔角蛋白基因改良棉纤维品质研究[J]. 棉花学报,2004,16(2):72-76