

外源甜菜碱醛脱氢酶(BADH)基因对小麦合成甜菜碱的影响

丁占生¹, 张艳敏¹, 张光荣², 温之雨¹, 郭北海¹

(1. 河北省农林科学院遗传生理研究所, 石家庄, 050011; 2. 涿鹿县农业技术推广中心, 涿鹿县, 075600)

摘要: 通过毛细管电泳, 对转入山菠菜 BADH 基因的小麦品系 T1, T4, T6 及受体石 4185 的甜菜碱含量进行了检测, 发现在胁迫与未胁迫条件下, T1, T4, T6 的甜菜碱含量均高于受体石 4185, T1, T6 与受体差异显著, T4 与受体差异不显著。说明外源 BADH 基因可提高小麦中甜菜碱含量, 但在不同品系中的表达有一定差异。

关键词: BADH; 甜菜碱; 毛细管电泳; 小麦

中图分类号: S512.01 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2003)院庆专辑-0040-03

The Effect of Foreign Betaine Aldehyde Dehydrogenase Gene on the Synthesis of Betaine in Wheat

DING Zhan-sheng¹, ZHANG Yan-min¹, ZHANG Guang-rong²,
WEN Zhi-yu¹, GUO Bei-hai¹

(1. Institute of Genetics and Physiology, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Science, Shijiazhuang 050051, China; 2. Zhuolu Extension Center of Agricultural Technology, Zhuolu 075600, China)

Abstract: By capillary electrophoresis, the betaine content of T1, T4, T6 showed with foreign BADH from *Atriplex hortensis*, and the accepted wheat of shi 4185, was determined. The results that the betaine content of T1, T4, T6 was higher than shi 4185, and the difference between T1, T6 and shi 4185, except T4 and shi 4185, was significant. It was indicated that the foreign BADH gene could improve the betaine content in wheat, but the improvements were not the same in different stains.

Key words: BADH; Betaine; Capillary electrophoresis; Wheat

甜菜碱有甘氨酸甜菜碱(GB)、丙氨酸甜菜碱(AB)、脯氨酸甜菜碱(PB)、羟脯氨酸甜菜碱(HPB)4种, GB在植物中最常见。

本实验室用于遗传转化的 BADH 基因来源于耐盐植物山菠菜^[1] (中科院遗传发育研究所克隆)。本实验室通过基因枪转化方法将 BADH 基因转入小麦石 4185, 经过连续 4 代选择和 PCR 检测, 已得到几个外源目的基因纯合、遗传稳定、表型一致转基因品系^[2]。经耐旱、耐盐鉴定, 这些品系表现出较

高耐旱耐盐特性^[3]。为进一步研究外源 BADH 基因对小麦抗旱耐盐性的影响, 有必要对转基因小麦的 GB 含量进行检测。植物组织中甜菜碱的检测方法, 主要有碘量法、高压液相层析、毛细管电泳、核磁共振和快原子轰击质谱等方法。碘量法操作简便, 但灵敏度低, 核磁共振和快原子轰击质谱虽灵敏度高, 但一般实验室难以应用。用水提取植物组织中的甜菜碱, 将其酯化, 通过毛细管电泳进行检测, 具有操作简便、检测灵敏度高等优点^[4]。

收稿日期: 2003-06-20

基金项目: 国家 863 计划(2001A A212121-3); 植物转基因及其产业化专项资助课题(J99-B-010)。

作者简介: 丁占生(1971-), 男, 河北定州人, 硕士, 助理研究员, 主要从事植物生物技术研究工作, 郭北海为通讯作者。

1 材料和方法

1.1 仪器

毛细管电泳仪, Beckman system 5500 型。

1.2 药品

对一溴苯醯甲基溴 (4-bromophenacyl bromide)、分析纯 GB 和乙腈, 均从 Sigma 公司购买。酯化反应缓冲液: 100 mmol/L KHCO_3 ; 100 mmol/L KH_2PO_4 ; 乙腈=1:1:4 v/v; 酯化试剂: 20 mg/mL 对一溴苯醯甲基溴 (溶于乙腈中); 电泳缓冲液: 100 mmol/L NaH_2PO_4 , pH 3.0, 用磷酸调 pH。

1.3 检测分析材料

受体冬小麦品种石 185, 转 BADH 基因小麦品系 T1, T4, T6, 检测组织为小麦苗期叶片。对石 4185, T1, T4, T6 进行两种处理, 处理 1 为正常浇水, 处理 2 为限制浇水, 干旱胁迫 8 d 后采样。

1.4 检测样品的制备

将小麦叶片在 80 °C 下烘干, 研成细粉末; 称 0.1 g 粉末 (每份材料的每个处理称 3 份), 加入 5 mL 去离子水, 浸泡过夜; 先后用滤纸和孔径为 0.45 μm 的滤膜先后过滤; 取 100 μL 过滤液, 加入 50 μL 缓冲液, 混匀后加入 300 μL 酯化试剂; 80 °C 下 90 min, 进行酯化反应; 80 °C 下蒸发约 3 h, 烘干; 加入电泳缓冲液 300 μL , 充分震荡溶解; 离心, 12 000 r/min, 10 min, 留上清液。

1.5 标准 GB 样品的制备

用分析纯 GB 配置 0.05, 0.1, 0.15, 0.2 mg/mL 的标准溶液, 通过酯化反应生成酯, 具体步骤与上述检测样品制备相同。

1.6 电泳及 GB 含量的确定

电泳时电压为 15 kv, 检测波长为 261 nm。依据标准样品的吸收峰面积与 GB 含量的回归关系, 推算出小麦样品的 GB 含量。数据分析采用 Excel 2000 软件。

2 结果与分析

2.1 GB 吸收峰的确定

对小麦样品石 4185 (处理 1) 进行检测, 发现 4 个紫外吸收峰 (图 1)。在小麦样品中加入标准样 (0.1 mg/mL), 第二个出现的吸收峰明显增高 (图 2), 说明此峰为 GB (酯化 GB) 吸收峰。其余 3 个吸收峰可能为 AB、PB、HPB, 也可能是叶片组织中游离氨基酸与对一溴苯醯甲基溴生成的酯, 但据以往报道, 这种可能性不大。

2.2 GB 含量与吸收峰面积的回归关系

标准样品的检测设 3 次重复, 结果 (吸收峰面积) 如下: 0.05 mg/mL: 205194, 187857, 196652; 0.1 mg/mL: 385521, 368961, 404521; 0.15 mg/mL: 699669, 668494, 649505; 0.2 mg/mL: 815905, 788062, 799846。经回归分析, 吸收峰面积与 GB 含量的关系如图 3 所示, Y (吸收峰面积) = $4344319.8 \times X$ (GB 含量, mg/mL) - 18624.3, R (相关系数) = 0.98647。

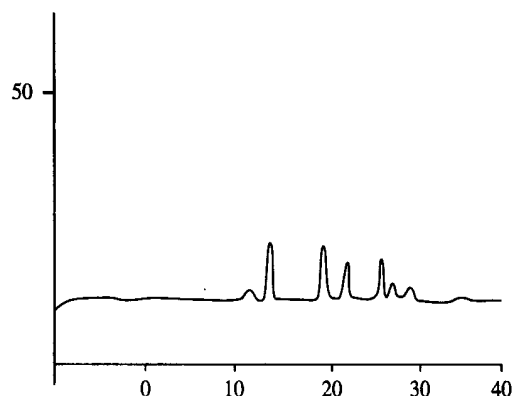


图 1 石 4185 的吸收峰

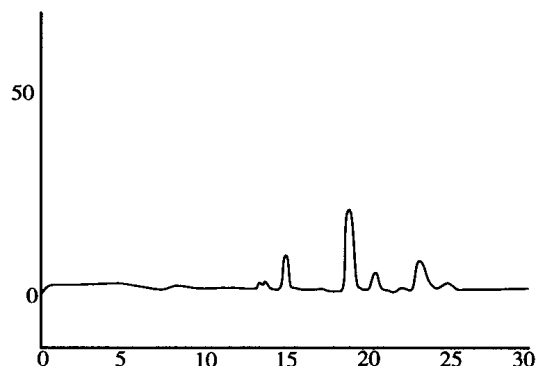


图 2 石 4185 加标样后吸收峰

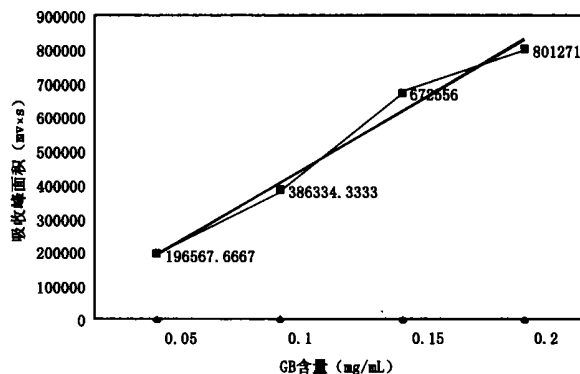


图 3 吸收峰面积与 GB 含量的关系

2.3 不同小麦材料间GB含量的比较

依据小麦样品的吸收峰面积与GB含量的回归关系,得出小麦样品的GB含量(mg/ mL),将此结果乘以系数150,单位由mg/ mL转换为mg/g叶片干重,结果如表1所示。在胁迫与未胁迫条件下,T1,T4,T6分别与石4185进行t测验,结果如表2,3所示,转BADH基因品系的GB含量均高于受体石4185,但增加幅度有一定差异,T1最高,T6次之,T1,T6与受体差异显著,T4与受体差异不显著。

表1 小麦叶片中GB含量检测结果				
材料	处理	吸收峰面积	GB含量 (mg/ mL)	GB含量 (mg/g)
4185	I 干旱胁迫	377413	0.093051613	13.95774199
		364614	0.090004714	13.50070703
		377630	0.093103272	13.96549077
4185	II 未胁迫	289999	0.072242043	10.83630641
		321792	0.079810609	11.97159139
		281609	0.070244739	10.53671087
T1	I 干旱胁迫	626693	0.152394622	22.85919327
		536889	0.131016093	19.65241402
		665844	0.161714816	24.25722247
T1	II 未胁迫	496652	0.121437368	18.21560523
		478889	0.11720875	17.58131255
		536083	0.130824219	19.62363285
T4	I 干旱胁迫	416354	0.102321816	15.34827238
		493858	0.120772235	18.11583528
		413126	0.101553366	15.23300487
T4	II 未胁迫	320172	0.079424956	11.91374338
		372949	0.091988924	13.7983386
		378869	0.093398225	14.00973378
T6	I 干旱胁迫	583621	0.142141003	21.32115047
		556891	0.135777722	20.36665836
		603101	0.146778366	22.01675489
T6	II 未胁迫	392819	0.096719129	14.50786939
		400178	0.098470995	14.77064932
		456504	0.11187983	16.78197451

上述结果表明,转入的BADH基因可明显提高小麦合成GB的量。在转BADH基因小麦品系的抗旱耐盐性鉴定试验中,转基因品系的抗性强于受体石4185,说明BADH基因通过提高GB表达量而提高小麦的抗旱耐盐性。T1,T4,T6的GB含量不同,说明同一BADH基因在转入受体中时,受体的不同个体之间形成某些差异,可能有插入位点的不同、插入基因的拷贝数不同等现象,造成BADH基因的表达情况不尽相同,表现在不同品系间GB含

量不同。无论在未胁迫,还是在胁迫条件下,转BADH基因品系的GB含量均高于受体,说明转入的BADH基因在两种情况下均表达,这与表达载体所用的启动子是35S启动子(属于组成型启动子)相符合。对于T1,T4,T6和石4185,胁迫条件下的GB含量均比未胁迫条件下高,说明在小麦中GB的合成不仅与基因型有关,也与环境条件关系密切,干旱条件下基因表达水平提高。

表2 T1,T4,T6与石4185分别进行双样本异方差假设测验结果(干旱胁迫)				
	石4185	T1	T4	T6
平均	13.80797993	22.25627659	16.23237084	21.2348546
方差	0.070827487	5.573696603	2.663900364	0.68628988
观测值	3	3	3	3
假设平均差	0	0	0	0
Df	2	2	2	2
t(stat)		6.159083862	2.539254423	14.7837673
t(双尾临界)		4.302655725	4.302655725	4.302655725

表3 T1,T4,T6与石4185分别进行双样本异方差假设测验结果(未胁迫)				
	石4185	T1	T4	T6
平均	11.11487	18.47352	13.24061	15.3535
方差	0.572919	1.092657	1.331594	1.547673
观测值	3	3	3	3
假设平均差		0	0	0
Df		4	3	3
t(stat)		9.875895	2.667952	5.041473
t(双尾临界)		2.776451	3.182449	3.182449

鸣谢:甜菜碱检测由河北分析测试中心协助完成。

参考文献:

[1] 肖岗. 山菠菜甜菜碱醛脱氢酶基因研究[J]. 科学通报, 1995, 40: 741—745.

[2] 郭北海, 张艳敏, 李洪杰, 等. 甜菜碱醛脱氢酶(BADH)基因转化小麦及其表达[J]. 植物学报, 2000, 42: 279—283.

[3] 张艳敏, 郭北海, 蒋春志, 等. 转甜菜碱醛脱氢酶(BADH)基因小麦的耐盐耐旱性[J]. 华北农学报, 2003, 18(1): 29—32.

[4] Naoki NISHIMURA, ZHANG Jing-hua Mitsuru A B O, *et al.* Application of Capillary Electrophoresis to the Simultaneous Determination of Betaines in Plants [J]. Analytical Sciences 2001, 17: 103—106