



结球甘蓝 *BoTCTP* 基因表达载体的构建及转化芥蓝的研究

王静静^{1,2} 曹必好¹ 陈国菊¹ 陈长明¹ 陈清华¹ 雷建军^{1*}

1 华南农业大学 园艺学院, 广州 510642; 2 德州市农业科学研究院, 德州 253015

* 通讯作者, jjlei@scau.edu.cn

摘要 芥蓝(*Brassica alboglabra*)是十字花科重要蔬菜之一,在栽培过程中常常会遭受各种逆境的严重影响,给芥蓝的生产造成很大的损失。为提高芥蓝对逆境胁迫的抵抗能力,本研究根据结球甘蓝翻译控制肿瘤蛋白基因(translationally controlled tumor protein cloned from *Brassica oleracea*, *BoTCTP*)序列设计特异引物,经PCR扩增得到目的片段,然后构建过表达载体,利用农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导法导入芥蓝中,并对其转基因植株进行了分子生物学鉴定。研究结果显示,4株外源目的基因已经整合到受体基因组中,1株以双拷贝形式存在,另外3株以单拷贝形式存在。转基因植株的长势旺盛,生长速率加快,叶面积较大,在逆境胁迫(高低温,盐碱,干旱,重金属等)下转基因植株对胁迫的耐受性明显优于对照植株,从而表明*BoTCTP*基因与芥蓝的生长密切相关,并对芥蓝的抗逆性起调控作用。本研究结果为芥蓝抗逆性的进一步研究提供了科学依据。

关键词 翻译控制肿瘤蛋白基因(*TCTP*),表达载体,芥蓝,遗传转化,生长速度,抗逆性

中图分类号 S635.9 **文献标识码** A

Study on Construction of Expression Vector of *BoTCTP* in Cabbage (*Brassica oleracea*) and Transferring to Chinese Kale (*Brassica alboglabra*)

WANG Jing-Jing^{1,2} CAO Bi-Hao¹ CHEN Guo-Ju¹ CHEN Chang-Ming¹ CHEN Qing-Hua¹ LEI Jian-Jun^{1*}

1 College of Horticulture, South China Agriculture University, Guangzhou 510642, China; 2 Dezhou Academy of Agricultural Sciences, Dezhou 253015, China

* Corresponding author, jjlei@scau.edu.cn

Abstract Chinese kale (*Brassica alboglabra*) is one of the important vegetables in the Cruciferous family. It is often subjected to various adverse effects during the cultivation process, causing great losses to the production. In order to improve the resistance of Chinese kale to stress, the specific primers were designed according to *BoTCTP* (translationally controlled tumor protein cloned from *Brassica oleracea*) in this research. The interest fragment was amplified by PCR, and then the overexpression vector was constructed and transferred into Chinese kale by *Agrobacterium tumefaciens* mediated. The transformants were confirmed by molecular methods and biological assay. Four transgenic plants were obtained, and then taken to design the experiments associated with growth and different stress, such as high temperature, low temperature, salt, heavy metal and so on. The results showed that the transgenic plants grew faster, stronger and had bigger

基金项目:国家自然科学基金项目(No. 31401874)、广东省科技厅攻关项目(No. 2013B051000069和No. 2014B020202005)和广州市科创委项目(No. 201508030021)

收稿日期:2018-07-06 接受日期:2018-07-23

leaves than non-transgenic plants. In the different stress condition, the transgenic plants had obviously stronger resistance than the control, which showed that the *BoTCTP* was closely related to the growth and had a regulatory effect on the stress resistance of Chinese kale. These results provide some scientific basis for the future research on the stress resistance of Chinese kale.

Keywords Translationally controlled tumor protein gene (*TCTP*), Expression vector, Chinese kale, Genetic transformation, Growth rate, Stress resistance

翻译控制肿瘤蛋白(translationally controlled tumor protein, *TCTP*)广泛存在于动物、植物及酵母中(Yenofsky et al., 1983; Sturzenbaum et al., 1998),是一类在序列上高度保守且具有很高的同源性的蛋白家族。*TCTP*具有很多重要的生物学功能,除了调节细胞周期、钙离子结合、微管结合、组胺释放、炎症反应、抗凋亡、抗疟疾等作用(Bommer et al., 2004; 吕素芳等, 2006; Lucibello et al., 2011),还具有参与细胞增殖与分化、细胞骨架重排(Bazile et al., 2009; Tsarova et al., 2010; 陈科等, 2012)以及促进受精能力的提高(Jeon et al., 2017)等功能。医学上,*TCTP*基因在肿瘤发生与逆转中起关键作用,保护癌细胞免受外部应激诱导,是癌症治疗的潜在靶标(Li et al., 2016; Du et al., 2017; Wang et al., 2018)。*TCTP*的表达水平存在高度差异,这些表达差异主要取决于细胞或组织的类型、发育阶段、信号反应、生长信号和细胞因子(Wang et al., 2009)。植物*TCTP*可能具备动物*TCTP*相似的功能(曹必好等, 2006),不仅能够调控植株的营养生长与生殖生长(Hsu et al., 2007; Oliver et al., 2008; Brioudes et al., 2010),同时对逆境胁迫(如温度,光照,盐碱和重金属等)的反应也很敏感(林莎等, 2008; Kim et al., 2012; Deng et al., 2016)。植物*TCTP*基因的表达同样存在组织特异性,而且在不同部位的表达强度也因植物的不同而可能有所不同(Lopez, Franco, 2006; 林莎等, 2008; 梁小莲等, 2009)。植物*TCTP*在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)上研究最多,主要包括*AtTCTP1*和*AtTCTP2*两条序列,*AtTCTP1*在调节细胞生长、控制细胞程序化死亡和信号应激反应中起重要作用(Brioudes et al., 2010; Hoepflinger et al., 2013),*AtTCTP2*对提高植株的生存能力和再生能力是必不可少的(Toscano-Morales et al., 2016)。近年来,学者们对山茶花(*Camellia japonica*) (丁岳炼等, 2014)、木薯(*Manihot esculent*) (Brigida et al., 2014)、

桑树(*Morus atropurpurea*) (雷朋等, 2015)、水稻(*Oryza sativa*) (王步勇等, 2016)、刺槐(*Robinia pseudoacacia*) (Chou et al., 2016)、黄瓜(*Cucumis sativus*) (Meng et al., 2017)、番茄(*Solanum lycopersicum*) (Márcio et al., 2017; Fernanda et al., 2017)、小麦(*Triticum aestivum*) (麻楠等, 2018)等植物也先后开展了*TCTP*基因的克隆与表达分析研究。此外,*AtTCTP*的过表达不仅增强了拟南芥对干旱的忍耐力,而且在脱落酸(abscisic acid, ABA)介导的气孔运动中发挥作用(Kim et al., 2012),刺槐*TCTP*(简称*Rpf41*)的RNAi干涉载体的导入使其根茎长、鲜重和结瘤数均减少(Chou et al., 2016),*TCTP*还参与植物的抗虫性(Zhang et al., 2014)和抗病性(Meng et al., 2018)调控。

芥蓝(*Brassica alboglabra*)是十字花科重要蔬菜之一,风味别致,营养丰富,其中富含的萝卜硫苷具有很强的抗癌功效(司雨等, 2009; 孙勃等, 2011; Qian et al., 2015)。为了提高芥蓝在栽培中对各种逆境的抵抗能力,本研究从分子水平研究芥蓝的抗逆性。关于芥蓝生理生化指标(温度,水分,光照等)的研究报道较多(杨云英, 杨暹, 2002; Issarakraisila et al., 2007; 杨云英, 杨暹, 2008; Chen et al., 2008; Deng et al., 2017),但其抗逆相关基因的克隆与功能鉴定研究较少。Zhu等(2016)将拟南芥抗逆基因*AtEDT1/HDG11*导入芥蓝,发现转基因植株的抗旱性和渗透胁迫耐受性明显提高。曹必好等(2002)构建了1个结球甘蓝(*Brassica oleracea*) cDNA文库,随后在筛选抗病基因时得到1个阳性克隆*BoTCTP*,该基因可能与植物抗逆性有关(曹必好等, 2006)。干涉该基因在芥蓝中的表达,植株生长缓慢,对逆境的抵抗力减弱(Cao et al., 2010)。目前关于该基因在芥蓝中的过表达反应还未见报道。本研究将*BoTCTP*基因克隆到植物表达载体pFGC5941上,利用农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导法将其导

入芥蓝,研究该基因的过表达情况,旨在通过转基因技术提高芥蓝的抗逆性,同时发掘该基因更多潜在功能,为植物抗逆基因工程研究提供科学依据。

1 材料与方法

1.1 材料

本研究在华南农业大学园艺学院生物技术实验室完成,供试材料为芥蓝(*Brassica alboglabra*)‘小香菇’品种由本实验室保存;*BoTCTP* 基因的 cDNA 序列、大肠杆菌(*Escherichia coli*) Top10、根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 以及植物表达载体 pFGC5941,均由本实验室保存;DNA marker、dNTPs、*Taq* DNA polymerase、限制性内切酶和 pMD19-T 连接试剂盒购自大连 TaKaRa 公司;质粒提取试剂盒和 DNA 回收试剂盒购自上海生物工程有限公司;Southern 杂交试剂盒、尼龙膜和滤纸购自 Roche 公司(上海);聚乙二醇、醋酸铅和氯化镉购自成硕生物技术公司(广州);PCR 引物合成与测序由上海生物工程有限公司完成。

1.2 目的基因的克隆

用于扩增目的基因全长的上、下游引物分别为:UP-*BoTCTP*: 5' - CATGCCATGGAAAACAATAAGCGACC ATGT-3'; DW-*BoTCTP*: 5' - CGCGGATCCGCAAGAAAGAAAAGC AAAC-3'。

PCR 扩增体系为:2.5 μ L 10 $\times$ PCR buffer、1.5 μ L $MgCl_2$ (25 mmol/L)、0.5 μ L dNTP (10 mmol/L)、1.0 μ L 上游引物(25 μ mol/L)、1.0 μ L 下游引物(25 μ mol/L)、0.2 μ L *Taq* DNA 酶(4 U/ μ L)和 40 ng cDNA,加 ddH₂O 至终体积 25 μ L,混匀。PCR 反应程序为:94 $^{\circ}C$, 5 min;94 $^{\circ}C$, 30 s;54 $^{\circ}C$, 30 s;72 $^{\circ}C$, 1 min (30 个循环);72 $^{\circ}C$ 延伸 10 min。

PCR 产物经电泳和回收,然后连接到 pMD19-T 载体。将连接产物通过热激法(42 $^{\circ}C$, 90 s)导入大肠杆菌 Top10 感受态细胞,经平板培养、蓝白斑筛选、PCR 检测,最后将阳性克隆进行测序。

1.3 表达载体的构建

用碱裂解法提取重组子和表达载体 pFGC5941 的质粒 DNA,然后分别进行 *Bam*H I 和 *Nco* I 双酶切,再将回收到的目的基因片段和 pFGC5941 载体片段进行连接,连接反应体系为:2.5 μ L T₄ Buffer、

10 μ L 目的片段、2.0 μ L 载体片段、1.0 μ L T₄ DNA 连接酶,加 ddH₂O 至终体积 25 μ L,混匀。

将连接产物转化 Top10 感受态细胞,筛选阳性克隆,摇菌并提取质粒后,利用冻融法(液氮速冻 5 min, 37 $^{\circ}C$ 水浴热激 1 min, 迅速冰浴 2 min)转到农杆菌 LBA4404 中,经抗性筛选及 PCR 阳性鉴定,将获得的阳性克隆保存在 -70 $^{\circ}C$ 下,以备遗传转化之用。

1.4 芥蓝的遗传转化

1.4.1 种子消毒及外植体的获得

挑选饱满的种子,在超净台上用无菌水冲洗 2 次,然后用 75% 的酒精浸泡 1 min,再用 0.1% 氯化汞消毒 10 min,期间不断摇动,最后用无菌水浸泡约 1 h,用灭菌滤纸吸去种子表面残留水分,播种于 1/2 MS 培养基上。置于 26 $\pm$ 1 $^{\circ}C$ 、光照/黑暗为 16 h / 8 h 的条件下生长。

待芥蓝小苗长出两片子叶并且顶芽微露时,在子叶节的上方,紧靠子叶节用无菌的手术刀片将一片带柄子叶连同顶芽切去,再从子叶节以下 0.3~0.5 cm 处切下,形成所需的外植体-带下胚轴的子叶。

1.4.2 农杆菌侵染及抗性苗的获得

将外植体放在分化培养基(MS+2.0 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA+7.0 mg/L AgNO₃)中预培养 2 d;浸入 OD₆₀₀ 值约为 0.5 的农杆菌菌液中侵染 8 min,无菌纸吸去残留菌液,重新接入分化培养基中共培养 2 d;转接至含头孢霉素(cefotaxime, Cef)的抑菌培养基上(MS+2.0 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA+7.0 mg/L AgNO₃+300 mg/L Cef)抑菌培养 7 d,抑制农杆菌的生长;然后接入含磷化麦黄酮(phosphinothricin, PPT)的筛选培养基中(MS+2.0 mg/L 6-BA+0.05 mg/L NAA+7.0 mg/L AgNO₃+300 mg/L Cef+一定浓度的 PPT),2 周继代 1 次。对获得的不定芽进行多代筛选,PPT 浓度为 5~10 mg/L,筛选浓度逐渐升高,至最后获得少数具 PPT 抗性的绿色芽;将伸长至 2~3 cm 高的不定芽切下,转到生根培养基上(1/2 MS+0.2 mg/L NAA)诱导生根,获得抗性小苗,待根粗壮后炼苗、移栽。

1.5 抗性植株的检测

利用改良 CTAB 法提取抗性植株的基因组 DNA。由于芥蓝本身存在目的基因片段的表达,

根据双丙氨磷抗性(bialaphos resistance, *Bar*)基因序列设计引物进行 PCR 扩增检测(臧宁等, 2008), 上、下游引物分别为:

UP-*BoTCTP*: 5'-ATGAGCCCAGAACGACGC-3';

DW-*BoTCTP*: 5'-TCTCAAATCTCGGTGACG-3'。

以质粒 DNA 为阳性对照, 未转化的再生植株叶片 DNA 为阴性对照。PCR 扩增体系以及反应程序同 1.2。

对 PCR 结果呈阳性的植株进行 Southern 杂交, 以确定目的基因是否转入芥蓝的基因组, 及其在芥蓝 DNA 中的拷贝数。以载体序列上的 *Bar* 基因片段作探针, 用地高辛(digoxin, DIG)标记试剂盒进行探针标记。根据表达载体 pFGC5941 的质粒图谱, 将抗性植株的总 DNA 选用 *EcoR* I 进行酶切, 将酶切产物浓缩纯化, 并转膜, 洗膜后进行曝光、显影和定影。

1.6 转基因植株的功能鉴定

将 T₀代转基因植株进行扩繁培养, 挑选苗高及长势基本一致的抗性植株和对照植株, 进行与生长相关性以及不同外界逆境胁迫实验, 观察比较植株的生长情况, 以及对不同逆境胁迫的反应(表 1)。为保证实验的精确性, 实验苗来源于单拷贝的同一

转基因单株。每瓶放 2~3 株组培苗, 每个处理重复 3 次, 均为 1/2 MS 培养基。

2 结果与分析

2.1 表达载体的构建

利用特异引物对 *BoTCTP* 的 cDNA 序列进行 PCR 扩增, 得到基因全长(图 1A), 约为 750 bp, 与预期一致。将其连接到 pMD19-T 载体后送样测序, 同源率达到 90% 以上。构建好的克隆载体经过 *Bam*H I、*Nco* I 双酶切, 得到了目的片段的条带(图 1B), 连接到用相同双酶切的 pFGC5941 质粒大片段中, 成功构建了 pFGC5941-*BoTCTP* 表达载体(图 1C)。将构建好的 pFGC5941-*BoTCTP* 表达载体利用冻融法转化农杆菌 LBA4404 感受态细胞, 然后进行菌液 PCR 检测, 均能得到 750 bp 的单一目的条带(图 1D), 说明表达载体 pFGC5941-*BoTCTP* 已成功转入农杆菌 LBA4404 中。

2.2 转基因植株的获得

以 *Bar* 两端序列设计引物, 以 T₀代转基因植株叶片的总 DNA 为模板, 进行 PCR 检测。结果显示

表 1 转基因植株生长相关性以及逆境胁迫实验
Table 1 Growth correlation and different stress tests of transgenic plant

处理	实验条件	观察周期
Treatment	Experimental condition	Observation period
生长相关性	26±1 °C, 昼夜为 16 h/8 h 的人工培养箱培养	3 d
Growth correlation	Artificial culture incubator at 26±1 °C for 16 h/8 h (day/night)	
高温	40 °C 恒温	24 h
High temperature	40 °C constant temperature	
低温	4 °C 恒温	3 d
Low temperature	4 °C constant temperature	
干旱	PEG-6000 模拟干旱环境, 添加在 1/2 MS 培养基的浓度依次为 5%、10%、15%、20%、24 h	
Drought	25%、30% PEG-6000 were added to the 1/2 MS medium with the concentrations of 5%, 10%, 15%, 20%, 25% or 30% to simulate the arid environment	
盐害	添加在 1/2 MS 培养基上的 NaCl 浓度依次为 100、200、300 和 400 mmol/L	24 h
Salt damage	The NaCl concentration added to the 1/2 MS medium were 100, 200, 300 or 400 mmol/L	
重金属污染	添加在 1/2 MS 培养基上的 pb(CH ₃ COO) ₂ ·3H ₂ O 浓度依次为 27、270 和 540 mg/kg, 投	24 h
Heavy metal	放浓度以纯铅计	
pollution	The pb(CH ₃ COO) ₂ ·3H ₂ O concentration added to 1/2MS medium were 27, 270 or 540 mg/kg, which were determined by pure lead	
重金属污染	添加在 1/2 MS 培养基上的 CdCl ₂ ·25H ₂ O 浓度依次为 5、10、30 和 50 mg/L, 投放浓度	24 h
Heavy metal	以纯镉计	
pollution	CdCl ₂ ·25H ₂ O concentration added to 1/2 MS medium were 5, 10, 30 or 50 mg/L, which were determined by pure cadmium	

(图2),抗性植株(泳道1, 3, 4, 8, 9, 11)和阳性对照菌液(泳道14)均能扩增出约550 bp的特异条带。通过测序比对,同源率高达99%以上,说明目的基因片段已经整合到芥蓝植株的DNA中。PCR检测阳性率为46.15%。

以 *Bar* 为探针,阳性对照(CK^+)设为质粒DNA,阴性对照(CK^-)设为未转化植株,将PCR检测的阳性植株进行 Southern 杂交(图3),有4株(泳道2, 3, 5, 6)出现明显的杂交信号,而且杂交带与阳性对照的大小一致,其中1株(泳道3)为双拷贝,其他3株(泳道2, 5, 6)均为单拷贝。有2株(泳道1, 4)PCR检测呈阳性,但是 Southern 检测未出现杂交信号,证

明其为假阳性。通过 Southern 杂交检测分析,转基因植株的转化率约为1.2%。

2.3 转基因植株的功能表现

芥蓝本身对逆境具有一定抵抗能力,比如高温、低温或干旱等,所以处于逆境胁迫时植株不一定立即表现出明显的反应,但是随着逆境胁迫时间的延长或者胁迫程度的加重,转基因植株和对照植株的差异性逐渐显现。

2.3.1 与生长的相关性

与对照相比,转基因植株长势旺盛,根系较健壮,叶面积较大,相对生长率明显高于对照,移栽后

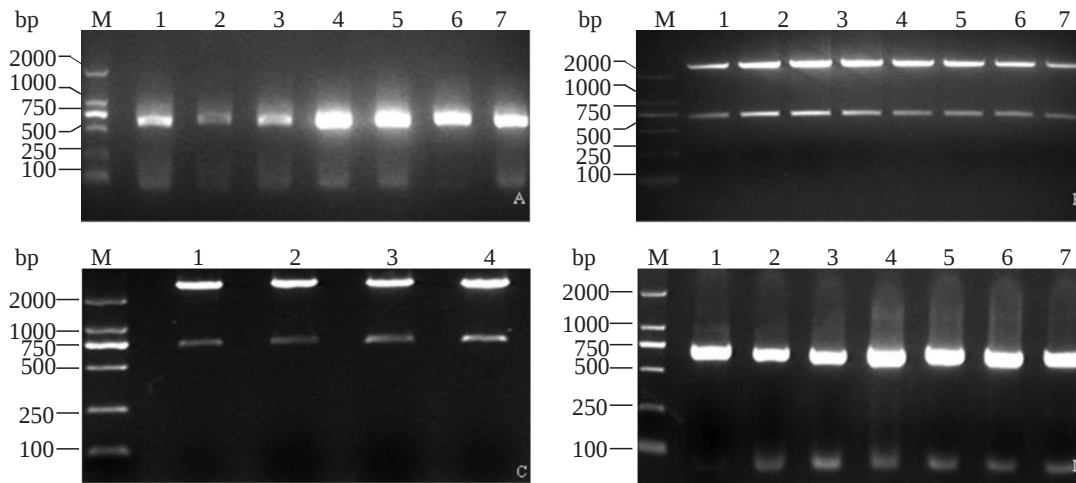


图1 表达载体的构建过程

Figure 1 Expression vector construction process

M: DL2000 分子量标记,下同。A. 目的片段扩增。1~7: DNA 目的片段。B. 连接之后的 pMD19-T 载体酶切。1~7: T-*BoTCTP* 载体; C. *Bam*H I+*Nco* I 酶切重组体。1~4: 重组体 pFGC5941-*BoTCTP*。D. 重组体农杆菌 LBA4404 的 PCR 检测。1~6: 重组体质粒, 7: 阳性对照(重组体 pFGC5941-*BoTCTP*)

M: DL2000 marker, and the same below. A. Amplification of the target DNA fragment. 1~7: The target fragment. B. pMD19-T vector digestion after ligation. 1~7: T-*BoTCTP* vector. C. Digestion of recombinant vector with *Bam*H I+*Nco* I. 1~4: Recombinant pFGC5941-*BoTCTP* vector. D. PCR identification of recombinant LBA4404. 1~6: Recombinant LBA4404; 7: Positive control (recombinant pFGC5941-*BoTCTP*)

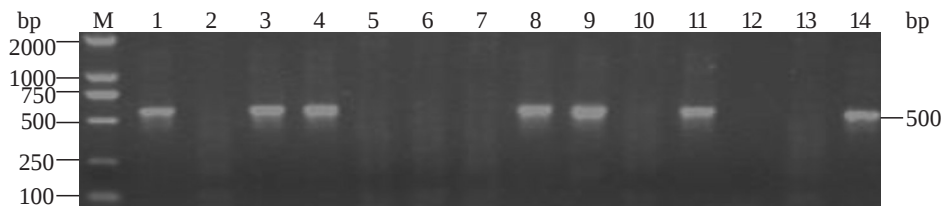


图2 抗性植株 PCR 检测

Figure2 PCR identification of the transgenic plants

M:DL2000 分子量标记;1~11:抗性植株;12:空白对照;13:阴性对照;14:阳性对照

M: DL2000 marker; 1~11: Transgenic plants; 12: Blank control; 13: Negative control; 14: Positive control

生长也较快(图4)。

2.3.2 耐热及耐寒性

本研究中 40 ℃ 高温处理结果显示,转基因植株耐热性较强,持续高温 7 d 后才开始出现少许的失绿症状;而对照植株 3 d 即开始出现失绿、萎蔫症状,7 d 后全部干枯、死亡(图 5A)。芥蓝对低温具有一定的耐受性,本研究将其置于 4 ℃ 条件下培养结果显示,植株并无明显失绿症状,但生长速度减缓;而转基因植株的相对生长率明显高于对照(图 5B)。

2.3.3 耐旱性

干旱处理结果显示,转基因植株在 5%、10%、15%、20% 聚乙二醇(polyethylene glycol, PEG)的培养基上均正常生长,在 25% PEG 培养基上慢慢枯

萎;而对照组在 5%、10% PEG 的培养基上也能正常生长,说明芥蓝具有一定耐旱性,但在 15%、20%、25% PEG 的培养基上不能正常生长,且随着浓度加大,枯萎速度逐渐加快(图 6A)。

2.3.4 耐盐性

转基因植株在 100、200 mmol/L 的 NaCl 培养基上均正常生长;而 300 mmol/L 时 3 d 后植株开始出现轻微的白化现象;增至 400 mmol/L 时 1 d 即出现

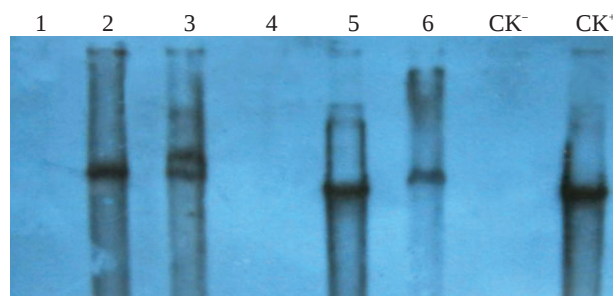


图3 Southern blotting 杂交检测

Figure 3 Southern blotting hybridization

1~6: 转基因植株;CK⁻: 阴性对照;CK⁺: 重组质粒

1~6: Transgenic plants; CK⁻: Nontransformed plants; CK⁺: Recombinant plasmid

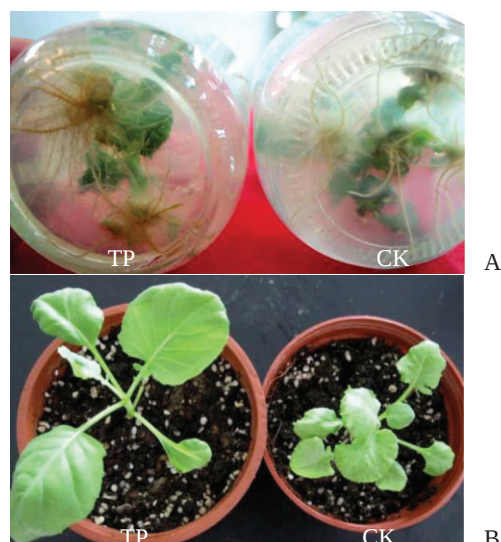


图4 移栽前生根量(A)与移栽后生长量(B)的比较

Figure 4 Comparison of rooting before transplanting (A) and growth after (B)

TP: 转基因植株;下同

TP: Transgenic plant; The same below

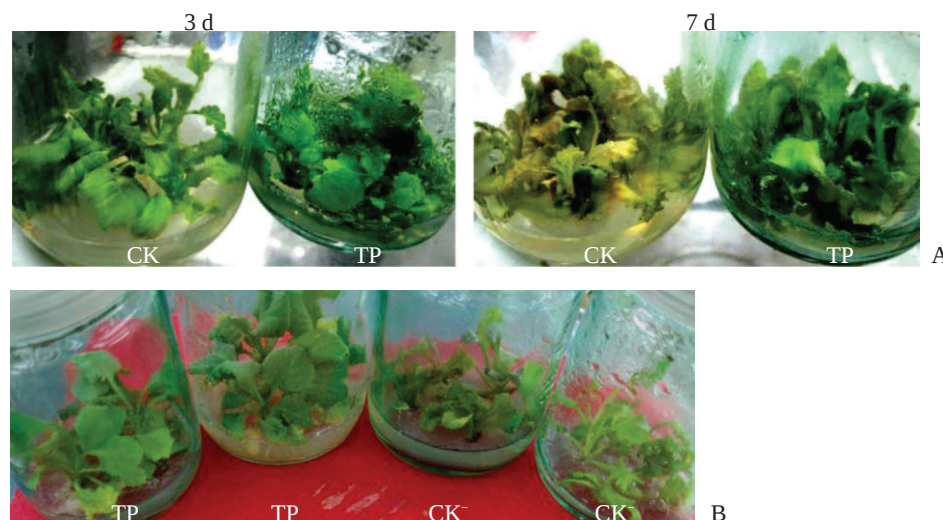


图5 40 ℃ 高温胁迫(A)和 4 ℃ 低温胁迫(B)下转基因植株与对照组生长状况

Figure 5 Growth condition of transgenic plants and control group under 40 ℃ high temperature stress (A) and 4 ℃ low temperature stress (B)

白化苗。相比之下,对照组在 100 mmol/L NaCl 培养基上能正常生长,200 mmol/L 时 2 d 后开始由茎的基部向上慢慢白化,300 mmol/L 时 1 d 后茎部即开始白化(图 6B)。

2.3.5 耐重金属性

重金属污染处理结果显示,在含铅的培养基上,转基因植株在铅浓度为 27、270 mg/kg 时正常生长,540 mg/kg 时 2 d 后开始在茎基部出现褐化现象。而对照组在铅浓度为 27 mg/kg 时正常生长;270 mg/kg 时由茎基部向上慢慢褐化,生根困难;增至 540 mg/kg 时 1 d 后即出现褐化现象(图 6C)。

在含镉的培养基上,转基因植株在镉浓度为 5、10 mg/L 时正常生长,30 mg/L 时 7 d 后开始由茎基部向上出现白化现象,增至 50 mg/L 时 4 d 后茎部出现轻微白化。而对照在镉浓度为 5、10 mg/L 时

正常生长,30 mg/L 时 3 d 后出现白化苗,增至 50 mg/L 时 2 d 即出现白化苗(图 6D)。

3 讨论

3.1 关于芥蓝遗传转化体系

甘蓝类蔬菜转基因一直是研究热点之一,但近几年其遗传转化研究报道较少,其主要瓶颈是转化效率低。本研究中,最适合芥蓝遗传转化的体系为:带下胚轴的子叶作为外植体,预培养 2 d,侵染 8 min,共培养 2 d,抑菌培养 7 d 后转入筛选培养基。外植体的选择、农杆菌侵染时间与浓度以及抗性芽的筛选压力等 3 个方面因素均是提高植株转化率的关键。黄科等(2004)研究发现,影响芥蓝植株再生的最主要因素是外植体类型。本研究也对芥蓝的子叶、带柄子叶、下胚轴、带下胚轴的子叶 4



图 6 转基因植株分别在干旱(A)、盐、(B)、铅(C)、镉(D)胁迫下的生长

Figure 6 Growth of transgenic plants under drought (A), salt (B), lead (C) and cadmium (D) stress

种外植体进行了分化率比较,结果发现带下胚轴的子叶分化率高达90%,与前人研究一致,这可能因为带下胚轴的子叶含有较多分化能力强的分生细胞,分化能力较强。农杆菌侵染过程中,侵染时间过长或浓度过大,菌液对外植体的毒害严重,后期抑菌困难;侵染时间过短或浓度过低,转化效率会降低。本研究结果表明,农杆菌菌液浓度为 $OD_{600} \approx 0.5$ 、侵染时间8 min最利于抗性芽的分化,这与黄科等(2007)研究一致,但是陈长明等(2016)认为芥蓝遗传转化的农杆菌菌液浓度为 $OD_{600} \approx 0.4$ 、侵染时间10 min为最佳。说明农杆菌菌液侵染时间的长短与其侵染浓度直接有关。在进行抗性芽筛选时,选择压力过低(逃逸芽大量出现)或过高(抗性芽可能致死)均会给鉴定带来许多麻烦。本研究所用转化载体带有PPT抗性基因,而且完全抑制芥蓝外植体带下胚轴的子叶再生的PPT浓度为10 mg/L(吕亚清, 2009)。本研究采用循序渐进地加大选择压力的方法,延迟筛选后首先以PPT浓度5.0 mg/L进行筛选,每14 d继代一次,最终所用的筛选培养基的PPT浓度达到10 mg/L,这样既可以降低假阳性率,又可以保证真正转化植株的存活,提高了转化效率。此外,芥蓝品种也是影响遗传转化效率的重要因素(黄科等, 2007),本研究中芥蓝品种为‘小香菇’,与陈长明等(2016)实验中所选品种相同,但是其转基因芥蓝的转化率分别为1.2%和0.37%,这有可能与所选的植物表达载体种类有关,不同的植物表达载体携带不同的筛选抗性基因,不同的筛选抗生素适宜不同的芥蓝品种。由此说明,本研究转基因芥蓝的遗传转化体系更适合芥蓝‘小香菇’品种采用,但是需要进一步优化与探索,以获得更高的转化率。

3.2 关于*BoTCTP*基因功能研究

随着*TCTP*在越来越多的动植物中发现与克隆,可以预见*TCTP*可能存在更广泛的生物学功能和重要性。到目前为止,动物*TCTP*的功能研究已经取得重大进步,但在植物上该基因并没有被广泛的深入研究,尤其是分子功能和生理机制尚不完全清楚。数据显示,植物*TCTP*基因的功能主要集中在促进细胞增殖、分化和再生(Toscano-Morales et al., 2014; Toscano-Morales et al., 2015),以及对抗生物或非生物胁迫(Fernanda et al., 2017; Meng et al., 2017)。Tuynder等(2002)发现*TCTP*的过表达或者基因沉默会导致细胞周期和生长模式的改变。所

以,鉴定结球甘蓝*BoTCTP*基因的功能,需要将该基因进行过表达或使之沉默,根据其表型变化来进行判断。已知在芥蓝中干涉该基因的表达,植株生长缓慢,对逆境的抵抗力减弱(Cao et al., 2010),本研究构建了该基因的过表达载体并成功转入芥蓝中,与对照相比,其生长速率加快,叶面积较大,抗逆性明显增强。本研究从另一方面补充并证明了*BoTCTP*基因具有促进生长、增强抗逆性的功能。拟南芥的*TCTP*基因也与生长相关,并且将其敲除之后,导入果蝇(*Drosophila melanogaster*)的*TCTP*基因又能使其恢复正常生长(Brioudes et al., 2010),从而说明植物和动物中的*TCTP*基因功能有共同之处。植物*TCTP*的表达可通过不同的逆境胁迫来诱导,铝胁迫能够使耐铝大豆根尖处*TCTP*的积累量增加(Ermolayev et al., 2003),乙烯处理之后的胶乳*TCTP*的表达量会增加(梁小莲等, 2009),受盐胁迫之后木薯体内*TCTP*含量增加(Brigida et al., 2014),*OsTCTP*在水稻抗汞方面起重要作用(Wang et al., 2015)。拟南芥*AtTCTP*的过表达能提高植株的抗旱性(Kim et al., 2012),黄瓜*CsTCTP*的过表达能提高植株对高温胁迫的抗性,但是却降低了植株对干旱和氯化汞的耐受力(Meng et al., 2017),这可能是由于不同植物对外界刺激的响应机制不完全相同。本研究只对过表达的芥蓝植株进行了初步的功能鉴定,需要进一步研究各种抗逆性相关的生理生化指标(如脯氨酸, 抗氧化酶等)的变化及其相关性,为植物*TCTP*基因的生理功能与调控机理的深入研究奠定基础,为改良植物抗逆性、培育抗逆新品种提供新思路。

4 结论

本研究根据结球甘蓝翻译控制肿瘤蛋白基因*BoTCTP*序列设计特异引物,经PCR扩增得到约750 bp目的片段,然后将其构建过表达载体导入芥蓝。经PCR和Southern杂交检测后,得到了4株转基因芥蓝,1株以双拷贝形式存在,另外3株以单拷贝形式存在。与对照相比,转基因植株的长势旺盛,生长速率加快,叶面积较大,对各种逆境胁迫(高低温, 盐碱, 干旱, 重金属等)的忍受力明显优于对照。研究表明*BoTCTP*基因与芥蓝的生长密切相关,并且对芥蓝的抗逆性起一定的调控作用,为今后开展芥蓝的逆境育种提供了重要的科学依据。

参考文献

- 曹必好, 雷建军, 陈国菊, 等. 2006. 结球甘蓝转录调控肿瘤蛋白基因(*TCTP*)的分离与表达特性初步分析[J]. 农业生物技术学报, 14(6): 996-997. (Cao B H, Lei J J, Chen G J, et al. 2006. Isolation and expression analysis of the gene encoding translationally controlled tumor protein (*TCTP*) in Cabbage[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 14(6): 996-997.)
- 曹必好, 雷建军, 宋洪元, 等. 2002. 结球甘蓝 cDNA 文库的构建和鉴定[J]. 园艺学报, 29(6): 579-580. (Cao B H, Lei J J, Song H Y, et al. 2002. cDNA library construction and identification of cabbage[J]. Acta Horticulturae Sinica, 29(6): 579-580.)
- 陈长明, 赵祥明, 雷建军, 等. 2016. 基因枪法和农杆菌介导的 *Bt* 抗虫基因转化芥蓝[J]. 中国蔬菜, (8): 21-28. (Chen C M, Zhao X M, Lei J J, et al. 2016. Pyramiding of *Bt* gene into *Brassica alboglabra* L. H. Bailey by biolistic and *Agrobacterium*-mediated transformation methods[J]. China Vegetables, (8): 21-28.)
- 陈科, 程汉华, 周荣家. 2012. 翻译调节肿瘤蛋白(*TCTP*)与细胞生长调控[J]. 农业生物技术学报, 20(1): 1-8. (Chen K, Cheng H H, Zhou R J. 2012. Translationally controlled tumour protein (*TCTP*) and growth regulation of cells[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 20(1): 1-8.)
- 丁岳炼, 赵鸿杰, 柯欢, 等. 2014. 山茶花翻译控制肿瘤蛋白 *CjTCTP* 基因的电子克隆及生物信息学分析[J]. 黑龙江农业科学, (8): 18-22. (Ding Y L, Zhao H J, Ke H, et al. 2014. Electronic cloning and bioinformatics analysis of *CjTCTP* gene from *Camellia japonica* L.[J]. Heilongjiang Agricultural Sciences, (8): 18-22.)
- 黄科, 余小林, 吴秋云, 等. 2004. 芥蓝植株再生体系的优化[J]. 细胞生物学杂志, 26(3): 313-316. (Huang K, Yu X L, Wu Q Y, et al. 2004. The optimization of plant regeneration protocol of Chinese broccoli (*Brassica oleracea* L. var. *alboglabra*) [J]. Chinese Journal of Cell Biology, 26(3): 313-316.)
- 黄科, 叶纨芝, 余小林, 等. 2007. 农杆菌介导的芥蓝遗传转化体系的建立[J]. 细胞生物学杂志, 29(1): 147-152. (Huang K, Ye W Z, Yu X L, et al. 2007. The establishment of *Agrobacterium*-mediated transformation system in *Brassica oleracea* L. var. *alboglabra*[J]. Chinese Journal of Cell Biology, 29(1): 147-152.)
- 雷朋, 何庆玲, 贺芳, 等. 2015. 桑树翻译调控肿瘤蛋白(*TCTP*)基因的克隆及其在温度胁迫下的表达变化[J]. 蚕业科学, 41(3): 405-409. (Lei P, He Q L, He F, et al. 2015. Cloning of mulberry translationally controlled tumor protein (*TCTP*) gene and expressional variation under temperature stress[J]. Science of Sericulture, 41(3): 405-409.)
- 梁小莲, 李辉亮, 彭世清. 2009. 巴西橡胶树 *HbTCTP* 基因的克隆及表达[J]. 分子植物育种, 7(1): 188-193. (Liang X L, Li H L, Peng S Q. 2009. Cloning and expression of *HbTCTP* from *Hevea brasiliensis*[J]. Molecular Plant Breeding, 7(1): 188-193.)
- 林莎, 高帆, 罗洪, 等. 2008. 麻疯树 *Jc-Tctp1* 基因的同源性分析及时空表达模式鉴定[J]. 中国生物化学与分子生物学报, 24(8): 727-734. (Lin S, Gao F, Luo H, et al. 2008. Sequencing and expression of translationally controlled tumor protein (*TCTP*) of *Jatropha curcas* L. [J]. Chinese Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 24(8): 727-734.)
- 吕素芳, 郭广君, 蔡永萍. 2006. 翻译控制肿瘤蛋白(*TCTP*)研究进展[J]. 科学技术与工程, 6(4): 424-428. (Lv S F, Guo G J, Cai Y P. 2006. Progress in *TCTP*[J]. Science Technology and Engineering, 6(4): 424-428.)
- 吕亚清. 2009. 芥蓝 *TCTP* 基因片段 RNAi 载体的构建及遗传转化[D]. 硕士学位论文, 华南农业大学, 导师: 雷建军, pp. 30-33. (Lv Y Q. 2009. Construction and genetic transformation of *Brassica TCTP* gene fragment RNAi vector [D]. Thesis for M.S., South China Agricultural University, Supervisor: Lei J J, pp. 30-33.)
- 麻楠, 乔金柱, 孙天杰, 等. 2018. 小麦翻译控制肿瘤蛋白(*TCTP*)与索马甜类蛋白(*TLP*)的相互作用[J]. 农业生物技术学报, 26(6): 911-919. (Ma N, Qiao J Z, Sun T J, et al. 2018. Interaction between translationally controlled tumor protein (*TCTP*) and thaumatin-like protein (*TLP*) in Wheat (*Triticum aestivum*) [J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 26(6): 911-919.)
- 司雨, 陈国菊, 雷建军, 等. 2009. 不同基因型芥蓝硫代葡萄糖苷组分与含量分析[J]. 中国蔬菜, (6): 7-13. (Si Y, Chen G J, Lei J J, et al. 2009. Analysis on composition and content of glucosinolates in different genotypes of Chinese kale[J]. China Vegetables, (6): 7-13.)
- 孙勃, 方莉, 刘娜, 等. 2011. 芥蓝不同器官主要营养成分分析[J]. 园艺学报, 38(3): 541-548. (Sun B, Fang L, Liu N, et al. 2011. Studies on main nutritional components of Chinese kale among different organs[J]. Acta Horticulturae Sinica, 38(3): 541-548.)
- 王步勇, 李丹蕾, 王峰, 等. 2016. 水稻干尖线虫翻译控制肿瘤蛋白基因的克隆及表达分析[J]. 湖南农业大学学报(自然科学版), 42(1): 20-26. (Wang B Y, Li D L, Wang F, et al. 2016. Clone and expression analysis on the gene of translationally controlled tumor protein from *Aphelenchoides besseyi*[J]. Journal of Hunan Agricultural University, Natural Sciences, 42(1): 20-26.)

- 杨云英, 杨暹. 2002. 温度对芥蓝幼苗叶片内源多胺含量的影响[J]. 华南农业大学学报(自然科学版), 23(3): 9-12. (Yang Y Y, Yang X. 2002. Effect of temperature on endogenous polyamines content of leaves in Chinese kale (*Brassica alboglabra* Bailey) Seedlings[J]. Journal of South China Agricultural University (Natural Science Edition), 23(3): 9-12.)
- 杨云英, 杨暹. 2008. 温度对芥蓝幼苗膜脂过氧化系统的影响[J]. 西南大学学报(自然科学版), 30(8): 124-127. (Yang Y Y, Yang X. 2008. Effect of temperature on membrane lipid peroxidation system in leaves of Chinese kale (*Brassica alboglabra* Bailey) [J]. Journal of Southwest University (Natural Science Edition), 30(8): 124-127.)
- 臧宁, 张美彦, 翟红, 等. 2008. 根癌农杆菌介导的抗除草剂转基因甘薯植株的获得[J]. 农业生物技术学报, 16(1): 103-107. (Zang N, Zhang M Y, Zhai H, et al. 2008. Generation of transgenic herbicide - resistant sweetpotato plants by *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation[J]. Journal of Agricultural Biotechnology, 16(1): 103-107.)
- Bazile F, Pascal A, Arnal I, et al. 2009. Complex relationship between TCTP, microtubules and actin microfilaments regulates cell shape in normal and cancer cells[J]. Carcinogenesis, 30(4): 555-565.
- Berkowitz O, Jost R, Pollmann S, et al. 2008. Characterization of TCTP, the translationally controlled tumor protein, from *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Cell, 20(12): 3430-3447.
- Bommer U A, Thiele B J. 2004. The translationally controlled-tumour protein (TCTP)[J]. The International Journal of Biochemistry and Cell Biology, 36(3): 379-385.
- Brioudes F, Thierry A M, Chambrier P, et al. 2010. Translationally controlled tumor protein is a conserved mitotic growth integrator in animals and plants[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 107(37): 16384-16389.
- Bruckner F P, Xavier A D, Cascardo R D, et al. 2017. Translationally controlled tumour protein (TCTP) from tomato and *Nicotiana benthamiana* is necessary for successful infection by a potyvirus[J]. Molecular Plant Pathology, 18(5): 672-683.
- Cao B H, Lu Y Q, Chen G J, et al. 2010. Functional characterization of the translationally controlled tumor protein (TCTP) gene associated with growth and defense response in cabbage[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 103(2): 217-226.
- Chen R Y, Liu H C, Huang Q, et al. 2008. Changes of chlorophyll and anthocyanin content and related enzyme activities of flower stalk in Chinese kale under different light intensities[J]. Acta Horticulture, 769: 103-111.
- Chou M X, Xia C C, Feng Z, et al. 2016. A translationally controlled tumor protein gene *Rpf41* is required for the nodulation of *Robinia pseudoacacia*[J]. Plant Molecular Biology, 90(4): 389-402.
- Deng M D, Qian H M, Chen L L, et al. 2017. Influence of pre-harvest red light irradiation on main phytochemicals and antioxidant activity of Chinese kale sprouts[J]. Food Chemistry, 222: 1-5.
- Deng Z, Chen J, Leclercg J, et al. 2016. Expression profiles, characterization and function of *HbTCTP* in rubber tree (*Hevea brasiliensis*)[J]. Frontiers in plant science, 7: 789.
- Du J H, Yang P, Kong F H, et al. 2017. Aberrant expression of translationally controlled tumor protein (TCTP) can lead to radioactive susceptibility and chemosensitivity in lung cancer cells[J]. Oncotarget, 8(60): 101922-101935.
- Ermolayev V, Weschke W, Manteuffel R. 2003. Comparison of Al-induced gene expression in sensitive and tolerant soybean cultivars[J]. Journal of Experimental Botany, 54 (393): 2745-2756.
- Hoepflinger M C, Reitsamer J, Geretschlaeger A M, et al. 2013. The effect of translationally controlled tumour protein (TCTP) on programmed cell death in plants[J]. BMC Plant Biology. 13(1): 135.
- Hsu Y C, Chern J J, Cai Y, et al. 2007. Drosophila TCTP is essential for growth and proliferation through regulation of dRheb GTPase[J]. Nature, 445(7129): 785-788.
- Issarakraisila M, Ma Q F, Turner D W. 2007. Photosynthetic and growth responses of juvenile Chinese kale(*Brassica oleracea* var. *alboglabra*) and Caisin (*Brassica rapa* subsp *parachinensis*) to water logging and water deficit[J]. Scientia Horticulture, 111(2): 107-113.
- Jeon H J, Cui X S, Guo J, et al. 2017. TCTP regulates spindle assembly during postovulatory aging and prevents deterioration in mouse oocyte quality[J]. Elsevier Journal, 1328-1334.
- Kim Y M, Han Y J, Hwang O J, et al. 2012. Overexpression of *Arabidopsis* translationally controlled tumor protein gene *AtTCTP* enhances drought tolerance with rapid ABA-induced stomatal closure[J]. Molecules and Cells, 33(6):617-626.
- Li S, Chen M H, Xiong Q, et al. 2016. Characterization of the translationally controlled tumor protein (TCTP) interactome reveals novel binding partners in human cancer

- cells[J]. Journal of proteome research, 15(10): 3741-3751.
- Lopez A P, Franco A R. 2006. Cloning and expression of cDNA encoding translationally controlled tumor protein from strawberry fruits[J]. Biologia Plantarum, 50(3): 447-449.
- Lucibello M, Gambacurta A, Zonfrillo M. 2011. TCTP is a critical survival factor that protects cancer cells from oxidative stress induced cell-death[J]. Experimental Cell Research, 317(17): 2479-2489.
- Márcio de C, Márcio L A, Alessandra V N L, et al. 2017. Impacts of the overexpression of a tomato translationally controlled tumor protein (TCTP) in tobacco revealed by phenotypic and transcriptomic analysis[J]. Plant Cell Reports, 36(6): 887-900.
- Meng X, Chen Q, Fan H, et al. 2017. Molecular characterization, expression analysis and heterologous expression of two translationally controlled tumor protein genes from *Cucumis sativus*[J]. PLoS One, 12(9): e0184872
- Meng X N, Yu Y, Zhao J Y, et al. 2018. The two translationally controlled tumor protein genes, CsTCTP1 and CsTCTP2, are negative modulators in the *Cucumis sativus* defense response to *sphaerotheca fuliginea*[J]. In Plant Science, 9: 544.
- Qian H M, Sun B, Miao H Y, et al. 2015. Variation of glucosinolates and quinone reductase activity among different varieties of Chinese kale and improvement of glucoraphanin by metabolic engineering[J]. Food Chemistry, 168: 321-326.
- Santa Brigida A B, Dos Reis S P, Costa C N M, et al. 2014. Molecular cloning and characterization of a cassava translationally controlled tumor protein gene potentially related to salt stress response[J]. Molecular Biology Reports, 41(3): 1787-1797.
- Sturzenbaum S R, Kille P, Morgan A J. 1998. Identification of heavy metal induced changes in the expression patterns of the translationally controlled tumour protein (TCTP) in the earthworm *Lumbricus rubellus*[J]. Biochimica et Biophysica Acta, 1398(3): 294-304.
- Tsarova K, Yarmola E G, Bubb M R. 2010. Identification of a cofilin-like actin-binding site on translationally controlled tumor protein (TCTP)[J]. FEBS Letters, 584(23): 4756-4760.
- Toscano-Morales R, Xoconostle-Cázares B, Martínez-Navarro A C, et al. 2014. Long distance movement of an arabidopsis translationally controlled tumor protein (AtTCTP2) mRNA and protein in tobacco[J]. Frontiers in Plant Science, (5): 705.
- Toscano-Morales R, Xoconostle-Cázares B, Cabrera-Ponce J L, et al. 2015. *AtTCTP2*, an *Arabidopsis thaliana* homolog of translationally controlled tumor protein, enhances *in vitro* plant regeneration[J]. Frontiers in Plant Science, (6): 468.
- Toscano-Morales R, Xoconostle-Cázares B, Martínez-Navarro A C, et al. 2016. *AtTCTP2* mRNA and protein movement correlates with formation of adventitious roots in tobacco[J]. Plant Signaling & Behavior, 11(3): e1071003.
- Tuynder M, Susini L, Prieur S, et al. 2002. Biological models and genes of tumor reversion: Cellular reprogramming through *tpt1*/TCTP and *SIAH-1*[J]. Proceedings of the National Academy of Sciences, 99(23): 14976-14981.
- Wang L L, Tang Y F, Zhao M J, et al. 2018. Knockdown of translationally controlled tumor protein inhibits growth, migration and invasion of lung cancer cells[J]. Life Sciences, 193: 292-299.
- Wang S, Zhao X F, Wang J X. 2009. Molecular cloning and characterization of the translationally controlled tumor protein from *Fenneropenaeus chinensis*[J]. Molecular Biology Reports, 36(7): 1683-1693.
- Wang Z Q, Li G Z, Gong Q Q, et al. 2015. OsTCTP, encoding a translationally controlled tumor protein, plays an important role in mercury tolerance in rice[J]. BMC Plant Biology, 15(1): 1-15.
- Yenofsky R, cerehini S, kraowczynska A, et al. 1983. Regulation of mRNA utilization in mouse erythroleukemia cells induced to differentiate by exposure to dimethyl sulfoxide[J]. Molecular Cell Bioogy, 3(7):1197-1203.
- Zhang J M, Ma L F, Li W, et al. 2014. Cotton *TCTP1* gene encoding a translationally controlled tumor protein participates in plant response and tolerance to aphids[J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 117 (2): 145-156
- Zhu Z S, Sun B M, Xu X X, et al. 2016. Overexpression of *AtEDT1/HDG11* in Chinese kale (*Brassica oleracea* var. *alboglabra*) enhances drought and osmotic stress tolerance [J]. Frontiers in Plant Science, (7): 1285