



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 104694491 A

(43) 申请公布日 2015.06.10

(21) 申请号 201510025206.4 *C12N 1/21*(2006.01)
(22) 申请日 2015.01.19 *A01H 5/00*(2006.01)
(71) 申请人 华中农业大学 *C12Q 1/68*(2006.01)
地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街 *C12N 15/11*(2006.01)
1号 *C12R 1/19*(2006.01)
(72) 发明人 宁国贵 罗平 包满珠 申玉晓
黄莎莎
(74) 专利代理机构 武汉开元知识产权代理有限公司 42104
代理人 王和平
(51) Int. Cl.
C12N 9/02(2006.01)
C12N 15/53(2006.01)
C12N 15/70(2006.01)
C12N 15/82(2006.01)

权利要求书1页 说明书8页
序列表2页 附图4页

(54) 发明名称

玫瑰的花青素还原酶 RrANR 基因及其编码蛋白和应用

(57) 摘要

本发明公开了一种玫瑰的花青素还原酶 RrANR 基因及其编码蛋白和应用,玫瑰的花青素还原酶 RrANR 基因,其核苷酸序列为 SEQ ID No. 1 所示,其长度为 1020bp。该基因与植物原花青素合成有关。RrANR 基因编码的花青素还原酶 RrANR,其氨基酸序列为由 SEQ ID No. 2 所示的氨基酸序列组成的蛋白质。本发明将玫瑰中克隆分离得到花青素还原酶基因 (RrANR) 导入烟草植株中,可以显著提高转基因植株中原花青素的含量,从而可以提取、分离纯化出更多的原花青素,创造出更大的经济效益有利于提高产品的附加值;并且将 RrANR 转化植株可以增强植物的抗逆性,为下一步培育具有高含量原花青素高抗氧化性的转基因玫瑰新品种奠定基础。

1. 一种玫瑰的花青素还原酶 RrANR 基因,其核苷酸序列为 SEQ ID No. 1 所示,其长度为 1020bp。

2. 根据权利要求 1 所述的 RrANR 基因,其特征在于:获得所述 RrANR 基因核苷酸序列引物对为:

P1 正向引物:5' - ATGGCCACCCCCCAACCC-3' ;

P2 反向引物:5' -CTAGCTCTGCAGCTCCCC-3'。

3. 一种权利要求 1 所述的 RrANR 基因编码的花青素还原酶 RrANR,其氨基酸序列为由 SEQ ID No. 2 所示的氨基酸序列组成的蛋白质。

4. 一种重组表达载体,其特征在于:它含有权利要求 1 所述的原核表达载体。

5. 根据权利要求 4 所述的重组表达载体,其特征在于:所述的原核表达载体为遗传转化载体 pCAMBIA2300s。

6. 含有权利要求 4 或 5 所述重组表达载体的大肠杆菌 DH5 α 表达菌株。

7. 含有权利要求 4 或 5 所述重组表达载体的宿主细胞,其特征在于:所述宿主细胞为农杆菌 EHA105。

8. 下述各项之一在提高植物原花青素合成和增强抗逆性上的应用,其特征在于:

1) 权利要求 4 或 5 所述的重组表达载体;

2) 含有权利要求 4 或 5 所述重组表达载体的大肠杆菌 DH10Bac 表达菌株;

3) 含有权利要求 4 或 5 所述重组表达载体的宿主细胞,其特征在于:所述宿主细胞为农杆菌 EHA105。

9. 根据权利要求 8 所述的应用,其特征在于:所述的植物为烟草。

10. 一种培育具有干旱性和盐害性的转基因植物的方法,其特征在于:包括以下步骤:

1) 目的基因的克隆;

2) 植物表达载体构建;

3) 受体的遗传转化;

4) 阳性转基因植株的鉴定;

5) 转基因植物表型及生理分析。

11. 根据权利要求培育转基因植物的方法,其特征在于:所述阳性转基因植株的鉴定的引物对为:

P3 正向引物:5' -TGAAGGGAGCTTCGATGCTGCTA-3' ;

P4 反向引物:5' - TTTCGTCCGCAATCAAGCCTGTG-3'。

玫瑰的花青素还原酶 RrANR 基因及其编码蛋白和应用

技术领域

[0001] 本发明涉及植物基因工程技术领域,具体地指一种玫瑰的花青素还原酶 RrANR 基因及其编码蛋白和应用,该基因与植物原花青素合成有关。

背景技术

[0002] 原花青素 (Procyanidins, PAs) 是植物界中广泛存在的一大类多酚类化合物的总称 (吕丽爽等,2007)。大量研究发现原花青素是迄今为止所发现的最强有效的自由基清除剂之一,其清除氧自由基的能力比常用的天然抗氧化剂,比如类胡萝卜素、维生素 C 和维生素 E 等都要强很多,它可以保护植物不受 UV 的伤害以及真菌的侵染,原花青素含量的增加可以提高植物的抗氧化能力 (Winkel-Shirley, 2002 ;Dixon, 2005 ;Yuan, 2013)。国内报道从黑莓、葡萄、荔枝、茶和落叶松等提取原花青素都具有不同程度抗氧化作用 (徐怀德等,2008 ;周玮婧等,2012 ;王威等,2011 ;姜贵全,2013 ;蒋其钟,2010)。自由基和氧化应激是导致众多心血管疾病的重要原因,原花青素可通过强大的抗氧化活性,保护心血管系统。动物实验和临床研究表明,原花青素可通过降低胆固醇水平,减少血管壁上的胆固醇沉积,提高血管弹性来降低血压 (Packer et, 1998)。原花青素的抗肿瘤功效国外已有许多研究报道,证实原花青素对多种癌细胞有不同程度的抑制作用,对皮肤癌、口腔癌、肝癌、肺癌、胰腺癌、胃癌、结肠癌等均有一定的预防或治疗作用 (杜晓芬等,2005)。原花青素的抗癌机制,主要由于原花青素具有强大的抗氧化和清除自由基的能力,而致癌的诱发阶段与促进阶段均与活性氧自由基相关,原花青素可以抑制诱导癌细胞生长并诱导细胞调亡。

[0003] 玫瑰 (*Rosa rugosa* Thunb.) 是蔷薇科蔷薇属落叶丛生灌木,花型秀美,芳香四溢,色彩绚丽,在中国传统名花中评价极高,素有“花中皇后”之称。玫瑰具有重要的经济价值,其花瓣果实均含有原花青素,可以提取、分离纯化出原花青素,进行工艺优化,使之更加科学化、高效化和产业化,创造出更大的经济效益有利于提高产品的附加值,开发出符合人们需要的功能食品、保健食品、营养滋补品和药品等系列产品,使特种资源变成经济优势,其前景将更加广阔。

发明内容

[0004] 本发明所要解决的技术问题就是提供一种玫瑰的花青素还原酶 (Anthocyanidin Reductase) RrANR 基因及其编码蛋白和应用。该基因与植物原花青素合成有关。将该基因的完整翻译区与花椰菜花叶病毒启动子结合后直接转入一般植物体,转基因植株的花色发生变化,原花青素含量显著增加,转基因植株的抗氧化能力明显增强。

[0005] 为解决上述技术问题,本发明提供的一种玫瑰的花青素还原酶 RrANR 基因,其核苷酸序列为 SEQ ID No. 1 所示,其长度为 1020bp。

[0006] 进一步地,获得所述 RrANR 基因核苷酸序列引物对为:

[0007] P1 正向引物 :5' -ATGCCACCCCCCAACCC-3' ;

[0008] P2 反向引物 :5' -CTAGCTCTGCAGCTCCCC-3'。

[0009] 本发明还提供了一种 RrANR 基因编码的花青素还原酶 RrANR, 其氨基酸序列为由 SEQ ID No. 2 所示的氨基酸序列组成的蛋白质, 其长度为 339bp。

[0010] 本发明还提供一种重组表达载体, 它含有权利要求 1 所述的原核表达载体。

[0011] 进一步地, 所述的原核表达载体为遗传转化载体 pCAMBIA2300s。

[0012] 本发明还提供了一种含有重组表达载体的大肠杆菌 DH5 α 表达菌株。

[0013] 本发明还提供了一种含有重组表达载体的宿主细胞, 其特征在于: 所述宿主细胞为农杆菌 EHA105。

[0014] 本发明还提供了下述各项之一在提高植物原花青素合成和增强抗逆性上的应用, 包括:

[0015] 1) 权利要求 3 或 4 所述的重组表达载体,

[0016] 2) 含有权利要求 3 或 4 所述重组表达载体的大肠杆菌 DH10Bac 表达菌株;

[0017] 3) 含有权利要求 3 或 4 所述重组表达载体的宿主细胞, 其特征在于: 所述宿主细胞为农杆菌 EHA105。

[0018] 进一步地, 所述的植物为烟草。

[0019] 本发明还提供了一种培育转基因植物的方法, 包括以下步骤:

[0020] 1) 目的基因的克隆;

[0021] 2) 植物表达载体构建;

[0022] 3) 受体的遗传转化;

[0023] 4) 阳性转基因植株的鉴定;

[0024] 5) 转基因植物表型及生理分析。

[0025] 进一步地, 所述阳性转基因植株的鉴定的引物对为:

[0026] P3 正向引物: 5' -TGAAGGGAGCTTCGATGCTGCTA-3' ;

[0027] P4 反向引物: 5' -TTTCGTCCGCAATCAAGCCTGTG-3' 。

[0028] 本发明可利用任何一种可以引导外源基因在植物中表达的载体, 通过直接 DNA 转化、电导、农杆菌介导等常规生物技术方法将本发明提供的 RrANR 的编码基因导入植物细胞或组织, 并将转化的植物组织培育成植株。使用本发明的基因片段构建到植物表达载体中时, 在其转录起始核苷酸前面可加上任意一种增强启动子或诱导型启动子。为了便于对转基因植物细胞或者植株进行鉴定及筛选, 可对所使用的载体进行加工, 如加入具有抗性的抗生素标记物 (例如卡那霉素 或潮霉素等)。被转化的宿主是包括烟草在内的多种植物, 培育不同花色的植物种类。

[0029] 本发明的有益效果在于:

[0030] 本发明将玫瑰中克隆分离得到花青素还原酶基因 (RrANR) 导入烟草植株中, 可以显著提高转基因植株中原花青素的含量, 从而可以提取、分离纯化出更多的原花青素, 创造出更大的经济效益有利于提高产品的附加值; 并且将 RrANR 转化植株可以增强植物的抗逆性, 为下一步培育具有高含量原花青素高抗氧化性的转基因玫瑰新品种奠定基础。

附图说明

[0031] 图 1 为是本发明的超量植物表达载体 pCAMBIA2300s 结构示意图;

[0032] 图 2 为本发明的超量植物表达载体 pCAMBIA2300s---RrANR 构建示意图;

- [0033] 图 3 为对照早花烟草与转化 RrANR 基因的早花烟草的花色比较图；
- [0034] 图中：图 3A 为对照早花烟草花色；图 3B 为本发明转 RrANR 早花烟草的花色；
- [0035] 图 4 为 RrANR 基因在转基因植株中的表达量情况图；
- [0036] 图中：Co1 为早花烟草（作为转基因早花烟草的对照），#5，#9 和 #12 为 3 个转基因株系；
- [0037] 图 5 为对照早花烟草与转化 RrANR 基因的早花烟草花瓣花青素含量图；
- [0038] 图中：Control 为早花烟草（作为转基因早花烟草的对照），#5，#9 和 #12 为 3 个转基因株系，*，** 和 *** 分别表明 $P < 0.05$ ， $P < 0.01$ 和 $P < 0.001$ 的差异水平；
- [0039] 图 6 为对照早花烟草与转化 RrANR 基因的早花烟草花瓣原花青素含量图；
- [0040] 图中：Control 为早花烟草（作为转基因早花烟草的对照），#5，#9 和 #12 为 3 个转基因株系。*，** 和 *** 分别表明 $P < 0.05$ ， $P < 0.01$ 和 $P < 0.001$ 的差异水平；
- [0041] 图 7 为脱水前后未转化植株和三个转基因株系表型；
- [0042] 图中：图 7A 为脱水前后氮蓝四唑 (NBT) 对超氧阴离子的染色；
- [0043] 图 7B 为脱水处理后电导率的测定；*，** 和 *** 分别表明 $P < 0.05$ ， $P < 0.01$ 和 $P < 0.001$ 的差异水平；Control 为早花烟草（作为转基因早花烟草的对照），#5，#9 和 #12 为 3 个转基因株系。
- [0044] 图 8 为过氧化氢处理未转化植株和三个转基因株系表型；
- [0045] 图中：图 8A 为过氧化氢处理后二氨基联苯胺 (DAB) 对过氧化氢染色；图 8B 为过氧化氢处理后丙二醛含量的测定。*，** 和 *** 分别表明 $P < 0.05$ ， $P < 0.01$ 和 $P < 0.001$ 的差异水平；Control 为早花烟草（作为转基因早花烟草的对照），#5，#9 和 #12 为 3 个转基因株系。

具体实施方式

[0046] 为了更好地解释本发明，以下结合具体实施例进一步阐明本发明的主要内容，但本发明的内容不仅仅局限于以下实施例。

[0047] 实施例 1 分离克隆 RrANR 基因

[0048] 本发明的前期对丰花玫瑰（又称“平阴一号”，<http://tc.cctv.com/20100412/103621.shtml>，丰花玫瑰的选育文献已经公开发表，见：吕传润（平阴玫瑰研究所），玫瑰新品种—丰花玫瑰及栽培技术，山东林业科技，2007，5：77；华中农业大学园艺林学学院园艺植物生物学花卉实践教学基地从山东省平阴县平阴玫瑰研究所引种）不同时期的花朵进行了转录组测序（转录组测序由深圳华大基因科技有限公司完成），在转录组测序结果设计特异引物：

[0049] P1 正向引物：5'-ATGGCCACCCCAACCC-3'，

[0050] P2 反向引物：5'-CTAGCTCTGCAGCTCCCC-3'；

[0051] 将测序序列的 1-1020bp 从玫瑰品种‘丰花’（即丰花玫瑰）花瓣 RNA 反转录得到的 cDNA 中扩增出来，扩增得到的片段如 SEQ ID No. 1 所示：

[0052] 其具体步骤如下：具体步骤为：

[0053] 1、采用常用的 CTAB 法（参照：《植物基因工程》，王关林，方宏筠主编）从玫瑰品种‘丰花’中提取花瓣总 RNA，具体步骤如下：

[0054] 1) 向离心管中加入 CTAB(十六烷基三甲基溴化铵)提取缓冲液(2% (W/V)CTAB, NaCl 1.4mol/L, EDTA(乙二胺四乙酸)20mmol/L, Tris·Cl 100mmol/L, 2% (W/V)pvp) 和 10%的 β -巯基乙醇,在水浴锅中预热;

[0055] 2) 将玫瑰花瓣用液氮冷却研磨,加入提取液中,混匀,65℃水浴 10 分钟;

[0056] 3) 加入等体积的氯仿:异戊醇(体积比 24:1)混合液,颠倒混匀,静置 10min,4℃下 12000g 离心 10min;

[0057] 4) 取上清,重复步骤 3);

[0058] 5) 取上清,加入终浓度为 2mol/L 的 LiCl,冰浴 10-12 小时,12000g,4℃离心 15 分钟,弃上清,用 75%乙醇清洗沉淀两次,溶于适量的 DEPC(焦碳酸二乙酯)处理水中待用;

[0059] 6) 以从玫瑰品种‘丰花’中提取花瓣总 RNA 为模板,利用反转录酶(购自宝生物工程大连有限公司)将其反转录合成 cDNA 第一条链,反应条件为:65℃ 5min,42℃ 50min,70℃ 10min;

[0060] 7) 根据转录测序中的序列设计的特异引物:

[0061] P1 正向引物:5'-ATGGCCACCCCAACCC-3',

[0062] P2 反向引物:5'-CTAGCTCTGCAGCTCCCC-3';

[0063] 将 RrANR 从玫瑰品种‘丰花’花瓣 RNA 反转录得到的 cDNA 中扩增出来;

[0064] 反应条件:

[0065] 94℃预变性 4min;94℃ 30sec,60℃ 30sec,72℃ 1min,37 个循环;72℃延伸 10min。

将扩增获得的 PCR 产物连入 pMD[®] 18-T 载体(购自宝生物工程大连有限公司),筛选阳性克隆并测序,获得所需的全长基因。该克隆被命名为 pMD[®] 18-RrANR 质粒。

[0066] 实施例 2RrANR 基因超量表达载体的构建,转化

[0067] 为了能更好地阐明该基因的功能,将其在烟草中超量表达,从转基因植株的表型来验证。具体步骤是:

[0068] 首先将实施例 1 中得到的阳性克隆 pMD[®] 18-RrANR 质粒用 BamH I 和 Sal I 双酶切,回收目的片段;同时,用同样的方法酶切携带双烟草花叶病毒启动子 35S 的遗传转化载体 pCAMBIA2300s(该遗传转化载体来自湖北省武汉市华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室构建和赠送)。酶切完毕,用包含 RrANR 基因的酶切片段和酶切的 pCAMBIA2300s(图 1)载体做连接反应,转化大肠杆菌 DH5 α (大肠杆菌菌株购自宝生物工程大连有限公司)。通过酶切筛选阳性克隆,获得转化载体,将其命名为 pCAMBIA2300s-RrANR。

[0069] 通过农杆菌介导的烟草遗传转化方法将其导入到早花烟草中,经过侵染、共培养、筛选同时具有卡那霉素抗性和潮霉素抗性的转化苗,再通过生根、练苗移栽等常规步骤,得到转基因植株。

[0070] 遗传转化的主要步骤和应用试剂如下所述:

[0071] (1) 试剂和溶液缩写

[0072] 本发明中培养基所用到的植物激素的缩写表示如下:6-BA(6-BenzylaminoPurine,6-苄氨基嘌呤);NAA(Naphthalene acetic acid,萘乙酸);Kan(Kanamycin,卡那霉素);Cef(Cefotaxime,头孢霉素);Hyg(Hygromycin,潮霉素)

[0073] (2) 用于早花烟草遗传转化的培养基配方

[0074] 表 1 列出了本发明的各种培养基的成分及其用量。

[0075] 表 1 早花烟草转化培养基设计

[0076]

| 培养基名称 | 培养基成分 |
|---------|--|
| 共培养培养基 | MS 培养基, 6-BA 2.25mg/L, NAA 0.3mg/L, 蔗糖 30.0g/L, 琼脂 8.0g/L, 加蒸馏水至 1L; 调培养基的 pH 至 6.0 |
| 出芽选择培养基 | MS 培养基, 6-BA 2.25mg/L, NAA 0.3mg/L, Kan100mg/L, Cef 400mg/L, Hyg 25mg/L, 蔗糖 30.0g/L, 琼脂 8.0g/L, 加蒸馏水至 1L; 调培养基的 pH 至 6.0 |
| 壮苗选择培养基 | MS 培养基, 6-BA 0.1mg/L, NAA 0.01mg/L, Kan100mg/L, Cef 400mg/L, Hyg 25mg/L, 蔗糖 30.0g/L, 琼脂 8.0g/L, 加蒸馏水至 1L; 调培养基的 pH 至 6.0 |
| 生根选择培养基 | MS培养基, Kan100mg/L, Cef400mg/L, Hyg 25mg/L, 蔗糖30.0g/L, 琼脂8.0g/L, 加蒸馏水至 1L; 调培养基的pH至 6.0 |

[0077] 注:1/2MS, MS 培养基的配制参见:Murashige T.and F. Skoog. *Physiol. Plant*, 1962, 15:473-497 报道的方法。

[0078] 表 1 中的 Kan(Kanamycin, 卡那霉素)、Cef(Cefotaxime, 头孢霉素), Hyg(Hygromycin, 潮霉素), 采用 0.45 μm 滤膜过滤方法灭菌, 在上述除 Kan、Hyg、Cef 成分以外的培养基经常规 121℃ 高压蒸汽灭菌 20min 后, 待培养基冷却至 50-60℃ 时, 在超净工作台上加入。

[0079] (1) 农杆菌介导的遗传转化步骤

[0080] 1) 农杆菌的培养

[0081] 首先, 在带有对应抗性选择的固体 LB 培养基 (10g/L 蛋白胨 +5g/L 酵母提取物 +10g/L 氯化钠 +Kan100mg/L+ 琼脂 1.5g/L) 上预培养农杆菌 EHA10548 小时, 培养温度 28℃; 挑取预培养农杆菌单菌落, 接种于对应抗性选择的液体 LB 培养基 (10g/L 蛋白胨 +5g/L 酵母提取物 +10g/L 氯化钠 +Kan100mg/L) 中, 于 28℃ 200rpm 摇床培养过夜, 至菌液浓度 OD₆₀₀ 值大约为 0.6。

[0082] 2) 叶盘转化法

[0083] a. 剪取早花烟草无菌苗上部完全展开的幼嫩叶片,将叶片剪成 0.8cm² 0.8cm 大小小块,放入无菌烧杯中;

[0084] b. 将准备好的菌液倒入烧杯,轻轻摇晃烧杯。叶片在菌液中浸泡 10min;

[0085] c. 将步骤 b 中的叶片取出,转移至灭好菌的滤纸上吸干;然后放置在如上所述的共培养培养基上暗培养三天,培养温度为 28℃;

[0086] d. 三天后,将叶片转入如表 1 所述的出芽选择培养基上,光照和暗培养交替(光照强度 1000-1500lx,光照时间:16h/d,黑暗时间:8h/d)下培养,进行 Kan 和 Hyg 抗性芽的筛选分化,培养温度为 28℃;

[0087] e. 抗性芽形成后,将其切下,转入如上所述的壮苗选择培养基上,在光照和暗培养交替(光照强度 1000-1500lx,光照时间:16h/d,黑暗时间:8h/d)下培养,进行 Kan 和 Hyg 抗性苗的筛选,培养温度为 28℃;

[0088] f. 将筛选得到的抗性苗转入如上所述的生根选择培养基上使其生根,在光照和暗培养交替(光照强度 1000-1500lx,光照时间:16h/d,黑暗时间:8h/d)下培养,培养温度为 28℃。

[0089] 2) 移栽

[0090] 洗掉转基因早花烟草植株根上的残留培养基,将具有良好根系的幼苗转入温室,同时在最初的一个周内保持水分湿润。

[0091] 结果共获得 20 个株系的 PCR 检测结果为阳性的转入质粒 pCAMBIA2300s-RrANR 的 T₀代转基因烟草。

[0092] 实施例 3:RrANR 基因转基因 T₀代在田间的表型观测与 RT-PCR 检测

[0093] 转基因早花烟草植株下地移栽后,直至开花期,将转基因早花烟草的花型与未转化早花烟草的花型进行比较,发现转 RrANR 基因的烟草的花色发生改变:没有转化的早花烟草花色为花色(图 3A);转 RrANR 基因的早花烟草花色变为白色(图 3B)。

[0094] 为了验证转基因早花烟草花色的改变是否与转入的 RrANR 基因有关,其采用了常用的 RT-PCR 方法对部分转基因早花烟草植株中 RrANR 基因表达进行了检测(结果见图 3)。具体步骤如下:

[0095] 采用 TRIZOL 试剂(购自宝生物工程大连有限公司)从转基因烟草 1-6 号株系中提取花的总 RNA(提取方法根据上述 TRIZOL 试剂说明书操作),利用反转录酶(购自宝生物工程大连有限公司)将其反转录合成 cDNA 第一条链,

[0096] 反应条件为 65℃ 5min, 42℃ 50min, 70℃ 10min。

[0097] 先用报道的看家基因 EF1 α 对反转录得到的 cDNA 进行检测和浓度调整,根据看家基因 EF1 α 的序列设计一对引物:

[0098] P5 正向引物:5' -TGGTTGTGACTTTTGGTCCCA-3',

[0099] P6 反向引物:5' -ACAAACCCACGCTTGAGATCC)-3';进行 PCR 检测,反应条件为:94℃ 预变性 4min;94℃ 30sec,60℃ 30sec,72℃ 30sec,28 个循环;72℃ 延伸 10min。试验结果如图 3 所示,看家基因 EIF 在早花烟草和转基因早花烟草中均能扩出,并且亮度一致。

[0100] 然后,根据 RrFLS1 基因的序列,在靠近 3' 端设计一对引物:

[0101] P3 正向引物:5' -TGAAGGGAGCTTCGATGCTGCTA-3',

[0102] P4 反向引物:5' -TTTCGTCCGCAATCAAGCCTGTG-3';

[0103] 进行 RT-PCR 检测, 反应条件为: 94 °C 预变性 4min; 94 °C 30sec, 60 °C 30sec, 72 °C 1min, 35 个循环; 72 °C 延伸 10min。试验结果表明, 3 株转基因烟草内均检测到有 RrANR 基因的表达, 结果如图 3 所示。图 3 中显示: 1: 为没有转化的早花烟草的 PCR 扩增结果, 2-4: 为转入质粒 pCAMBIA2300s-RrANR 的转基因早花烟草的 PCR 扩增结果。

[0104] 实施例 4 转 RrANR 早花烟草原花青素的提取与测定

[0105] 准确称取 0.4g 叶片和花瓣, 加入 3mL 提取液 (丙酮: 水: 冰醋酸 = 70 : 29.5 : 0.5, 体积比) 于水浴条件下 35 °C 超声 1h, 期间每隔 20min 用旋转振荡器振荡 2min。12000rpm 离心 10min, 取上清至新的离心管中, 再分别用氯仿和正己烷抽提 2 次, 然后用孔径 0.45 μm 的尼龙微孔滤器过滤, 保存于 -40 °C 冰箱中。使用 NanoDrop2000C 光谱系统进行定量分析, 50 μL 中加入 200 μL 对二甲氨基肉桂醛 (DMACA; Sigma-Aldrich, MO, USA) (0.1% DMACA, 90% reagent-grade ethanol, 10% HCl), 在 640nm 下每隔 1min 测定一次, 连续测定 10min, 取读数最大值, 采用 3 次重复, 取平均值。原花青素含量采用标准品 (+) 儿茶素 (Sigma-Aldrich, MO, USA) 定量。

[0106] 实施例 5 转 RrANR 早花烟草花青素的提取与测定

[0107] 准确称取 0.5g 叶片和花瓣, 加入 2.5mL 提取液 (甲醇: 盐酸: 水 = 70 : 0.1 : 29.9, 体积比) 于黑暗条件下 4 °C 浸提 24h, 期间每隔 6h 用旋转振荡器振荡 1min。12000rpm 离心 10min, 取上清至新的离心管中, 再用孔径 0.22 μm 的尼龙微孔滤器过滤后, 保存于 -40 °C 冰箱中, 用于花青苷与其他类黄酮的 HPLC-DAD 分析。使用岛津液相系统进行定性, 包括: LC-20AT 型二元梯度泵, SIL-20AC 自动进样器, CTO-20AC 色谱柱控温箱, SPD-20AC 检测器, LC-Solution 工作站; 色谱柱为日本 Tosoh 株式会社生产的 TSK gel ODS-80Ts QA 反相硅胶柱 (4.6mm × 250mm, 粒径 5 μm, 日本 Tosoh 株式会社)。

[0108] 分析条件: 流速 0.8mL · min⁻¹, 柱温 35 °C, 进样体积 10 μL, 200 ~ 800nm 范围内全波长扫描吸收光谱。流动相组成为: A 相, 10% 甲酸 - 超纯水 (体积比); B 相, 乙腈。分析时间 35min。梯度洗脱程序为: 0min, 90% A, 10% B; 20min, 70% A, 30% B; 25min, 90% A, 10% B。

[0109] 运用 HPLC-DAD 方法, 分别用 520nm 检测花瓣中花青苷。采用标准品半定量法分别计算干花中含有的相对于标准品的花青苷和花 黄素的含量 (μg · g⁻¹FW) (Wang et al., 2001)。其中花青苷标准品使用上海同田生物技术有限公司生产的矢车菊素 - 3 - 葡萄糖苷 (cyanidin-3-O-glucoside, Cy3G)。

[0110] 实施例 6 转 RrANR 早花烟草抗氧化能力测定

[0111] 为了能更好地阐明该基因的功能, 申请人选用, #5, #9 和 #12 用半定量 RT-PCR 鉴定为三个超表达系, 选用这三个系及对照 (Control) 进行脱水及 H₂O₂ 处理。具体步骤是: 首先将每个系取 45 天大的转基因苗的同一部位叶片置于培养皿上自然脱水 90 分钟, 对脱水前后未转化植株及三个转基因株系活性氧积累进行组织化学染色分析, 分别采用二氨基联苯胺 (DAB) 和氮蓝四唑 (NBT) 对 H₂O₂ 及 O₂ 积累情况进行分析 (根据染色的深浅及程度); 并测定最后一个时间点 (脱水 90 分钟) 的电导率以及丙二醛 (MDA) 含量; 同时, 将生长约 45d 的烟草苗打成圆孔后浸入 2% H₂O₂ 溶液中, 处理 2d, 对 H₂O 处理前后未转化植株及三个转基因株系活性氧积累进行组织化学染色分析, 采用二氨基联苯胺 (DAB) 对 H₂O₂ 积累情况进行分析 (根据染色的深浅及程度); 并测定丙二醛 (MDA) 含量和叶绿素含量。

[0112] (1) DAB 和 NBT 组织化学染色分析步骤

[0113] 对 O_2^- 的检测, 叶片浸在 1mg ml^{-1} NBT 溶液中 (pH7.8 磷酸缓冲液) 1-2h 叶片有明显表型 (叶片蓝色)。 H_2O_2 的检测, 叶片浸在 1mg ml^{-1} pH7.8 磷酸缓冲液的 DAB 工作液中 (pH7.8), 光下染色 8 个小时, 等有明显表型进行脱色 (褐色), 再用无水乙醇将叶片绿色完全脱除后, 最后用清水洗;

[0114] (2) 丙二醛 (MDA) 含量测定步骤

[0115] 取 0.2g 叶片加入 2ml 5% TCA (三氯乙酸) 震荡混匀, 12000rpm 离心 5min 取上清加入 0.67% TBA (β -硫代巴比妥酸) 2ml 100 度煮沸 30min 冷却后离心取上清, 分别在 450nm 532nm 600nm 测定吸光度, 计算公式为 MDA 含量 ($\mu\text{mol/l}$) = $6.45 \times (A_{532} - A_{600}) - 0.56 \times A_{450}$;

[0116] (3) 相对电导率的测定步骤

[0117] 叶片被采集放入装有 25ml 去离子水 50ml 离心管中, 将其置于旋转摇床在室温摇 2 个小时最初的电导率 (C1) 用电导仪 (STARTER-3C, Shanghai, China) 进行测定。样品在 100°C 沸水煮 10min 导致细胞内离子最大的渗漏, 当其冷却至室温测其电导率为 C2, 相对电导率 (C%) 的计算公式为 $100 \times C1/C2$ 。

[0118] 其它未详细说明的部分均为现有技术。尽管上述实施例对本发明做出了详尽的描述, 但它仅仅是本发明一部分实施例, 而不是全部实施例, 人们还可以根据本实施例在不经创造性前提下获得其他实施例, 这些实施例都属于本发明保护范围。

[0001]

- <110> 华中农业大学
<120> 玫瑰的花青素还原酶 *RrANR* 基因及其编码蛋白和应用
<211> 1020
<212> DNA
<213> 玫瑰的花青素还原酶 *RrANR* 基因
<400> 1

ATGGCCACCCCCCAACCCATCGTCTCAAACAAGACTGCTTGTGT
GATCGGCGGCACCGGCTTCGTGGCGTCTCTGCTGGTCAAGCTCTTGCT
AGAGAAGGGCTATGTCGTCAAACCACTGCTAGAGACCCTGACAATC
TGAAGAAGATCTCCACCTCACAGCACTACAAGAGTTGGGAAAGCTG
ACTATTTTTCGTGGTGATTAAACCGATGAAGGGAGCTTCGATGCTGCTA
TAGCAGGTTCTGATCTTGTTTTCCATGTTGCCACACCAGTCAACTTTG
GCTCACCGGACCCGGAGAATGACATGATCAAGCCAGGAGTCCAAGGA
GTACTAAATGTTCTGAAATCATGTGTGAAAGCAAAAACAGTTAAGCG
AGTTGTTTTAACATCATCAGCAGCTGCAGTAACTGTCAATACTCTTAGT
GGCACAGGCTTGATTGCGGACGAAAATGATTGGTCTGATGTTGAGTTC
TTGACCACTGCCAAGCCACCTACTTGGGGGTATCCTGTTTCCAAGGTA
CTAGCTGAGAAGACAGCTTGGAATTTGCTGAAGAAAACAACATTGA
TCTCATCACTGTGATCCCTTCTCTCATGGCTGGTGCTTCTCTCACTCCA
GACATCCCCAGCAGTATAGGCCTCGCCACATCTTTAATTACAGGAAAT
GAATTCCTTATAAATGGCTTGAAAGGCATGCAAATGCTATCAGGTTCCA
TATCCATTACACATGTGGAGGATGTCTGCCGAGCTCATATCTTTTTGGC
AGAGAAAGAATCTGCTTCCGGTCGGTACATATGCTGTGCTGAAAATAG
CAGTGTTCCCTGAGGTTGCAAAGTTCCTCAGCAAAGATATCCCGGCTA
CAAAGTCCCGACTGAGTTTGGAGATTTTCCATCCAAGGCCAAGACCAT
ACTCTTTCGGAAAAGCTTAAGAAGGAGGGGTTCACTTTCAAGTATG
GGATTGAAGACATATATGACCAAGCTGTGGAGTACTTGAAAGTTAAGG
GGGAGCTGCAGAGCTAG

[0002]

- <110> 华中农业大学
<120> 玫瑰的花青素还原酶 *RrANR* 基因及其编码蛋白和应用
<211> 339
<212> PRT
<213> 玫瑰的花青素还原酶 *RrANR*
<400> 2

**MATPQPIVSNKTACVIGGTGFVASLLVKLLLEKGYVVKTTARDP
DNLKKISHLTALQELGKLTIFRGDLTDEGSFDAAIAGSDLVFHVATPV
NFGSPDPENDMIKPGVQGVNLNVLKSCVKAKTVKRVVLTSSAAAVTV
NTLSGTGLIADENDWSDVEFLTAKPPTWGYPVSKVLAEKTAWKEA
EENNIDLITVIPSLMAGASLTPDIPSSIGLATSITGNEFLINGLKGMQ
MLSGSISITHVEDVCRAHIFLAEKESASGRYICCAENSSVPEVAKFLSK
RYPGYKVPTEFGDFPSKAKTILSSEKLLKKEGFTFKYGIEDIYDQAVEY
LKVKGELQS**

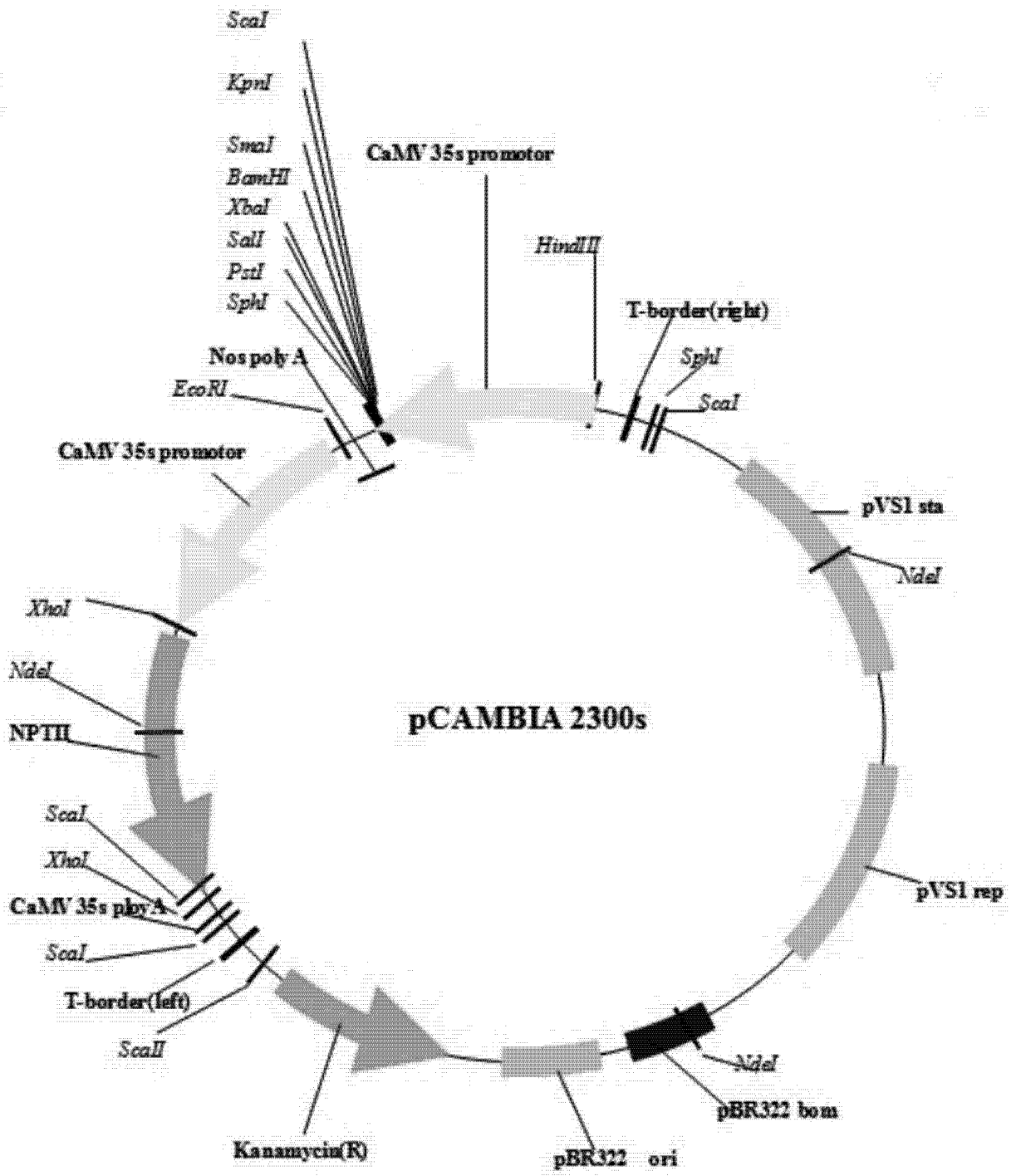


图 1

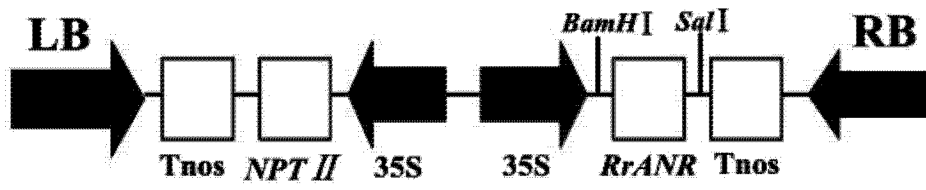


图 2

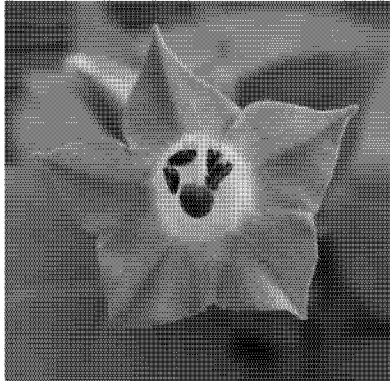


图 3A

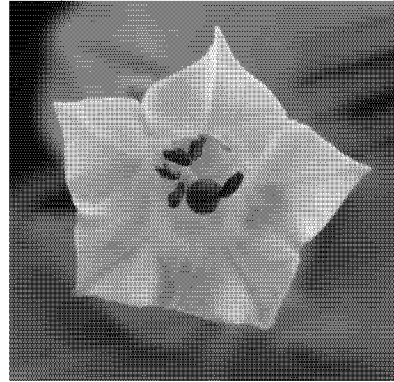


图 3B

图 3

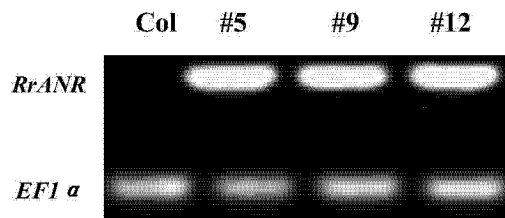


图 4

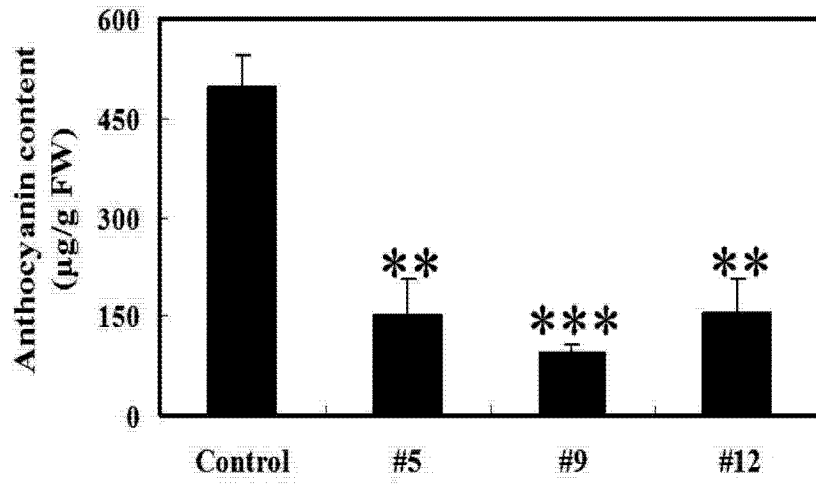


图 5

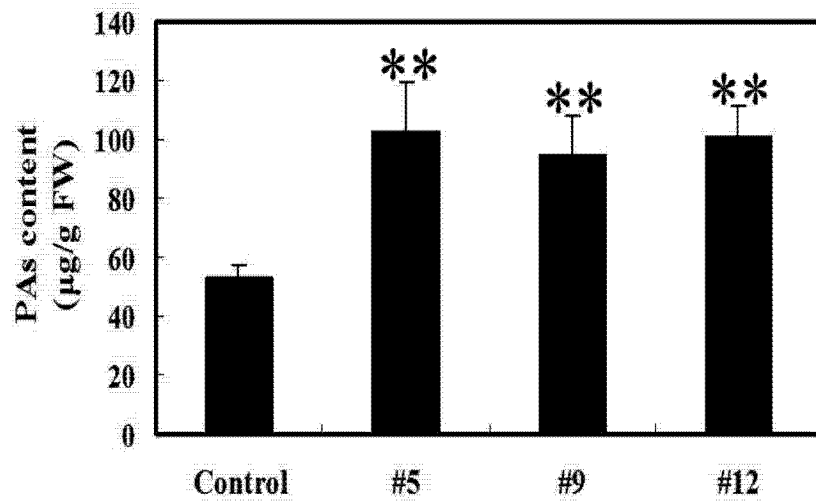


图 6

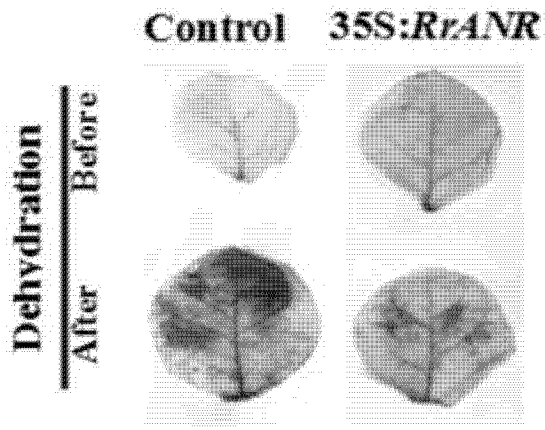


图 7A

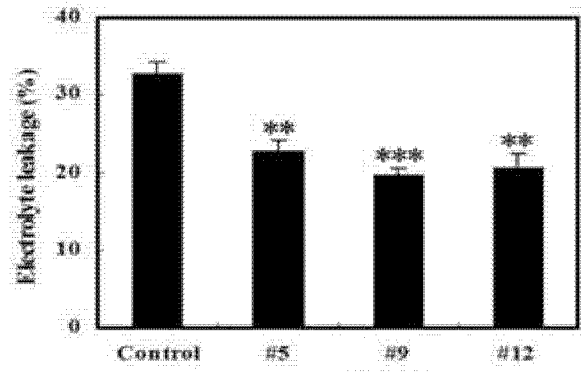


图 7B

图 7

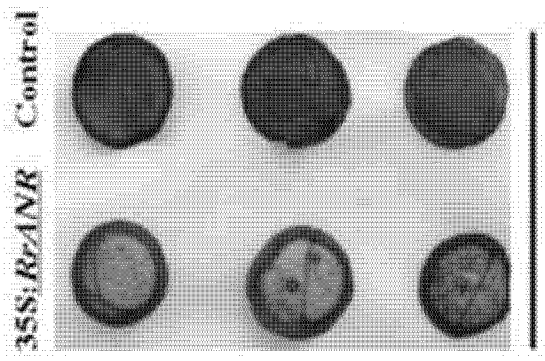


图 8A

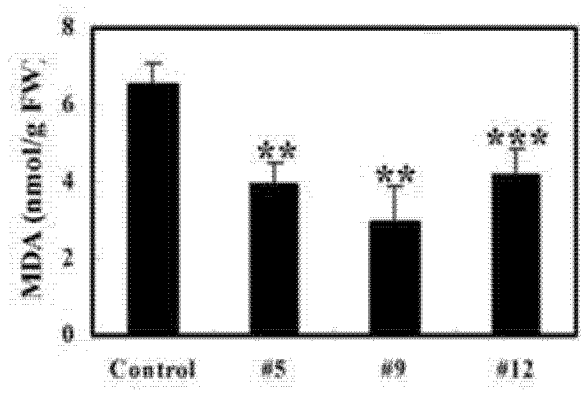


图 8B

图 8