

# 褪黑素合成酶基因转化烟草及转化植株抗氧化系统变化

王英娟<sup>1</sup>, 贾敬芬<sup>1</sup>, 步怀宇<sup>1</sup>, 赵宇玮<sup>1</sup>, 许耀<sup>2</sup>, Carl Hirschie Johnson<sup>2</sup>, Jan Kolář<sup>3</sup>

1 西北大学生命科学学院 陕西省生物技术重点实验室, 西安 710069

2 Department of Biology, Box 1812-B, Vanderbilt University, Nashville, TN 37235, USA

3 Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, Rozvojová 135, 165 02 Praha 6, Czech Republic

**摘要:** 通过根癌农杆菌(含植物表达载体 YXu55)介导的转化技术, 将褪黑素生物合成酶-芳烷基胺 N-乙酰转移酶(Arylalkylamine N-acetyltransferase, AANAT)与羟基吲哚 O-甲基转移酶(Hydroxyindole O-methyltransferase, HIOMT)基因导入到烟草(秦烟 95)中。对所获得的庆大霉素抗性烟草株系进行 Southern blotting 和 RT-PCR 分子生物学检测, 结果表明, AANAT-HIOMT 基因已成功整合到烟草基因组中, 并且可以在 mRNA 水平上进行转录。用反相高效液相色谱法(RP-HPLC)测定转化株系的褪黑素含量表明, 转 AANAT-HIOMT 基因烟草株系的褪黑素含量均明显高于 pZP122(不含 AANAT 和 HIOMT 基因的空白质粒)转基因株系和未转基因的对照植株, 证明 AANAT-HIOMT 基因在转基因植株中的表达增强了褪黑素的合成能力。对不同株系抗氧化系统的部分指标进行了测定, 并与其亲本对照植株比较, 发现 AANAT-HIOMT 基因在转基因植物中的表达引起超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)活性增加, 谷胱甘肽(GSH)浓度以及总抗氧化能力升高, 且没有引起膜脂质过氧化物丙二醛(MDA)的变化, 说明转基因烟草抗氧化潜能得到提高。

**关键词:** 烟草, 褪黑素, 褪黑素合成酶基因, 遗传转化, 抗氧化

## Genetic transformation of *Nicotiana tabacum* L. by *Agrobacterium tumefaciens* carrying genes in the melatonin biosynthesis pathway and the enhancement of antioxidative capability in transgenic plants

Yingjuan Wang<sup>1</sup>, Jingfen Jia<sup>1</sup>, Huaiyu Bu<sup>1</sup>, Yuwei Zhao<sup>1</sup>, Yao Xu<sup>2</sup>, Carl Hirschie Johnson<sup>2</sup>, and Jan Kolář<sup>3</sup>

1 Shaanxi Provincial Key Laboratory of Biotechnology, College of Life Science, Northwest University, Xi'an 710069, China

2 Department of Biology, Box 1812-B, Vanderbilt University, Nashville, TN 37235, USA

3 Institute of Experimental Botany, Academy of Sciences of the Czech Republic, Rozvojová 135, 165 02 Praha 6, Czech Republic

**Abstract:** Arylalkylamine N-acetyltransferase (AANAT) and Hydroxyindole O-methyltransferase(HIOMT) are the key regulation enzymes in the melatonin biosynthesis pathway in mammals. The AANAT and HIOMT genes were constructed into a binary plant expression vector YXu55. Using leaf strips as the recipients, we efficiently transformed tobacco (*Nicotiana tabacum*) variety qinyan

**Received:** November 20, 2008; **Accepted:** May 11, 2009

**Supported by:** National Science Foundation of China (No. 30671082), National Science Foundation of Shaanxi Province (No. 2007C104), West Light Foundation of the Chinese Academy of Sciences (No. 2008DF01).

**Corresponding author:** Jingfen Jia. Tel: +86-29-88303484; E-mail: jjajf38@nwu.edu.cn

国家自然科学基金(No. 30671082), 陕西省自然科学基金(No. 2007C104), 中国科学院西部之光基金(No. 2008DF01)资助。

95 by the *Agrobacterium* mediated method. After gradient selection with gentamycin, a number of transgenic plants were regenerated. Southern blot and RT-PCR analyses showed that the AANAT-HIOMT genes were integrated into the genome of the transgenic plants and the target genes could express at the level of RNA transcription. By RP-HPLC, we measured the melatonin contents in transgenic plants. The results showed that the melatonin level in YXu55 (containing the gentamycin-resistance gene, the AANAT gene and HIOMT gene) transgenic plants were much higher than those in pZP122 (control containing only the gentamycin-resistance gene) transgenic plants and nontransgenic plants. The content of melatonin in pZP122 transgenic plants was nearly the same as that in nontransgenic plants. Physiological determination of antioxidative characteristics demonstrated that 1) the capacity of total antioxidation, 2) the activities of superoxide dismutase (SOD), peroxidase (POD) and catalase (CAT) and 3) the content of glutathione (GSH) were increased in YXu55 transgenic plants containing the AANAT-HIOMT genes as compared to the control plants (pZP122 or nontransgenic plants). At the same time, malonaldehyde (MDA) content did not appear remarkably difference between transgenic plants and nontransgenic plants. The above mentioned facts indicate enhancement of melatonin levels in YXu55 transgenic plants might help to reduce damage by oxidative stress.

**Keywords:** *Nicotiana tabacum* L., melatonin, melatonin biosynthesis genes, transgenic plants, antioxidative capability

褪黑素(N-乙酰基-5-甲氧色胺, melatonin, MT)最早发现于牛松果体<sup>[1]</sup>。后来研究发现,它不仅普遍存在于脊椎动物,也存在于单细胞生物和真菌。褪黑素作为一种动物激素,主要用来调控脊椎动物的生物节律和光周期反应,因此常用于调整由于飞行时差或其他睡眠失调导致的生物钟紊乱,改善睡眠,治疗神经衰弱。近年研究表明,褪黑素还具有提高身体免疫功能、延缓衰老等生物学作用<sup>[2]</sup>。褪黑素作为动物体内一种广谱抗氧化剂,对自由基引起的DNA、膜脂质和细胞质蛋白的氧化损伤具有保护作用,并可明显改善自由基引起的损害<sup>[3,4]</sup>。1995年首次在植物中发现有褪黑素<sup>[5,6]</sup>。近来的报道表明,在所测过的100多种植物中普遍含有褪黑素<sup>[7,8]</sup>。有些药用植物,特别是高山药用植物中,其含量还相当高<sup>[9,10]</sup>。有关植物褪黑素的研究与动物相比资料还很少,内容多着重于对一些植物内源褪黑素含量的测定。对植物褪黑素的功能研究已开始引起关注<sup>[11]</sup>。在用C<sup>14</sup>标记的色氨酸体外供给贯叶连翘(*Hypericum perforatum* L.)植物幼体研究中发现植物中褪黑素合成途径可能与脊椎动物中相似<sup>[12]</sup>。有研究表明,短日照植物红藜(*Chemopodium rubrum*)的褪黑素合成有昼夜节律和光周期反应,夜间可达到最大值<sup>[13]</sup>。另外,褪黑素可能有类似于植物生长素,如吲哚乙酸类促进生长<sup>[14]</sup>和器官发生<sup>[15]</sup>的作用。还有报道推测植物褪黑素可能也是一种自由基清除剂<sup>[16]</sup>。

以上这些研究只用了极少数植物种类为材料,对于褪黑素在植物中的功能还需要进行多方面的实验研究,提供更多的科学依据。利用转基因技术提高植物褪黑素合成水平,进而研究过量积累褪黑素

引起的转基因植物的变化特征,可以建立起适合研究植物褪黑素功能的一种实验体系。鉴于此,本试验用已经成功构建的褪黑素合成酶基因植物表达载体,将褪黑素合成关键酶基因(AANAT和HIOMT)通过农杆菌介导的转化技术导入烟草(*Nicotiana tabacum* L.),以获得褪黑素生物合成酶基因表达的转基因植株,进而分析由于褪黑素的含量提高所引起转基因植物抗氧化系统的部分指标变化,以探讨褪黑素基因在植物抗氧化方面可能具有的潜能。目前尚未见有关这一方面的报道。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料及转化载体

所用材料烟草(*Nicotiana tabacum* 秦烟95)种子来自陕西省烟草研究所。

酶切电泳验证后的植物表达载体YXu55载体及pZP122空白载体,均由美国Vanderbilt大学Xu Yao博士提供,在15%甘油中、-70°C冰箱保存。其中转化载体YXu55(图1)是在pZP122空白载体上插入人源芳烷基胺N-乙酰转移酶(Arylalkylamine N-acetyltransferase, AANAT)基因(GenBank Accession No. U40347)与羟基吲哚O-甲基转移酶(Hydroxyindole O-methyltransferase, HIOMT)基因(A型, GenBank Accession No. U11090)的表达盒,含CaMV 35S启动子和根癌农杆菌终止子(NOS); pZP122含有庆大霉素(Gen.)抗性基因。

### 1.2 引物、试剂及试剂盒

AANAT基因上游引物(Ns)5'-CCTGCCAGTG AGTTTCGC-3', 下游引物(Na)5'-TCAGCAGCCG

CTGTT CC-3'; HIOMT 基因上游引物(Hs)5'-AGCGA CTACCTGACCACG-3', 下游引物 (Ha)5'-TACCA GAATGCCACCACC-3'。所需引物是根据 GenBank 中的 AANAT 和 HIOMT 基因的相关序列(序列号分别为 U40347 和 A 型的 U11090)设计, 均由 Genaray Biotech 公司合成。

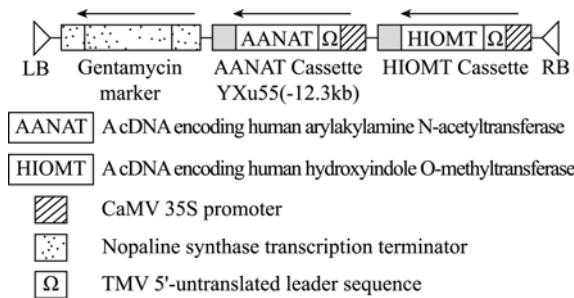


图 1 YXu55 基因结构图

Fig. 1 Gene structure of YXu55.

PCR 反应所需试剂和限制性内切酶购于 Tiangen 公司, DNA、RNA 提取纯化试剂盒购自 V-gene 公司, cDNA 第一链合成试剂盒(RevertAid™ First Strand cDNA Synthesis Kit)购自 MBI Fermentas 公司。植物抗氧化系统测试采用的系列试剂盒均购于南京建成生物工程研究所。HPLC 检测用 Waters2695-2996 型高效液相色谱仪(美国 Waters 公司), 色谱柱(SymmetryC<sub>18</sub>, 5 μm, 150 mm×4.6 mm)。抗生素、褪黑素标准品和其他各种分析纯试剂购自 Sigma 公司。

### 1.3 烟草无菌苗的获得及其对庆大霉素敏感性的确定

将秦烟 95 种子用 75%乙醇处理 30 s, 0.1% HgCl<sub>2</sub> 表面灭菌 8 min, 无菌水洗涤 6 次, 在无激素的 MS 培养基上萌发无菌苗。取 4 周龄的烟草叶片在无菌条件切成 5 mm×5 mm 左右的小方块接种到附加不同浓度梯度 Gen.(0、20、30、40、50、60、70、80、90、100 mg/L)、1.0 mg/L 6-BA 和 0.2 mg/L NAA 的 MS 固体培养基上。接种时下表皮与培养基接触, 每瓶接种 8~10 块, 每个浓度接 3 瓶。在 25°C±2°C、光照强度为 30~50 mol/(m<sup>2</sup>·s)的培养室内, 每日 16 h/8 h 光/暗条件下培养, 观察不定芽分化及存活情况, 选择出用于筛选转化体的 Gen.最适浓度。

### 1.4 含有 YXu55 和 pZP122 的农杆菌转化烟草及转化材料的培养

含 YXu55 和 pZP122 的农杆菌(LBA4404)经常

规活化, 在含有 100 μg/mL Str.和 50 μg/mL Chl.的 YEB 液体培养基培养至对数生长期, 于 4°C、2700×g 离心 1 min, 弃去培养液, 用一定体积的无激素 MS 液体培养基(MS<sub>0</sub>)悬浮菌体, 稀释至 OD<sub>600</sub>=0.5。采用叶圆盘法, 将 4 周龄的烟草叶切块浸在农杆菌菌液中, 28°C、200 r/min 条件下培养 20 min。然后用无菌吸水纸吸去多余的菌液, 接种于含 1.0 mg/L 6-BA 及 0.2 mg/L NAA 的 MS 固体培养基上, 每瓶 8~10 块, 共接 3 瓶。共培养 2~4 d 后, 转至含有 300 mg/L Cef.和 60 mg/L Gen., 附加 1.0 mg/L 6-BA 及 0.2 mg/L NAA 的 MS 固体培养基上进行 Gen 抗性筛选培养, 同时接种未转染材料到非选择性培养基和选择性培养基上作为对照。

所有处理均在 25°C±2°C、光照强度为 30~50 mol/(m<sup>2</sup>·s)的培养室内进行 16 h/8 h 光/暗培养。每 2 周转接 1 次, 连续继代培养。在培养过程中随时淘汰白化和死亡的培养物, 将能在 Gen.选择压力下正常生长分化出的不定芽从外植体上分离下来, 对其进行编号, 并在保持选择压力的情况下扩增培养和诱导分化。待转化小苗高 2~3 cm 时, 小心切下再生苗转接至附加 0.2 mg/L NAA 的 MS 固体培养基上诱导生根。之后炼苗移栽至花盆土中。

### 1.5 转基因烟草的鉴定

#### 1.5.1 转基因烟草的 Southern blotting

采用 CTAB<sup>[17]</sup> 多次提取制备植物亲本及 YXu55 转基因烟草的基因组 DNA, 将来自同一植株的多份基因组 DNA 样本合并后, 用常规乙醇沉淀法浓缩, TE 重悬后调节浓度达到 1.0 μg/mL。每组取 20 μg 用过量的 EcoR I 酶切过夜, 依据试剂盒(DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II)说明进行 Southern blotting, 检测目的基因整合到烟草的基因组 DNA 情况。

#### 1.5.2 转基因烟草的 RT-PCR 检测

按照 TRIpure Reagent 试剂法 (BioTeke Corporation 公司)提取植物总 RNA 并按照 MBI 试剂盒法合成 cDNA 第一链, 以其为模板(包括转基因植株和未转基因植株), RNA 作为对照模板, 进行逆转录 PCR 检测。其中 PCR 扩增程序 AANAT 基因为: 94°C 4 min; 94°C 1 min, 59°C 1 min, 72°C 1 min, 循环 33 次; 72°C 10 min。HIOMT 基因为: 94°C 4 min; 94°C 45 s, 55°C 45 s, 72°C 30 s, 循环 30 次; 72°C 10 min。

### 1.6 RP-HPLC 法测定转基因植株中褪黑素含量

HPLC 分析所用烟草叶片均取自组培苗, 在电热恒温鼓风干燥箱 55°C 干燥 20 h 后, 碾成细粉, 微量提取褪黑素<sup>[18]</sup>。以褪黑素标准品为对照品溶液, 采用色谱条件为 SymmetryC<sub>18</sub>(150 mm×4.6 mm, 5.0 μm) 色谱柱(美国 Waters 公司); 流动相为 100 mmol/L 乙酸铵(80%)-甲醇(20%), 流速约为 0.8 L/min, 柱温为常温; 检测波长为 270 nm, 灵敏度为 2.00AUFS; 进样量为 10 μL; 褪黑素保留时间约 8 min, 进行供试品褪黑素含量测定。每项测定重复 3 次, 用 EXCEL 软件处理平均值及标准差, 用 *t* 检验分析不同株系的转基因烟草与 CK 植株的差异显著性( $P < 0.05$ )。

### 1.7 转基因植株的抗氧化指标分析

选取不同株系的转基因烟草以及未转化的亲本植株(CK), 同批继代培养 14 d 左右, 高 3~4 cm 的组培苗, 利用测试盒法测定其抗氧化系统的部分常用指标, 以分析植物抗氧化系统的变化。每项测定重复 3 次, 用 EXCEL 软件处理平均值及标准差, 用 *t* 检验分析不同株系的转基因烟草与 CK 植株的差异显著性( $P < 0.05$ )。

## 2 结果与分析

### 2.1 受体植物对庆大霉素的敏感性

观察叶片切块在附加浓度梯度为 0~100 mg/L Gen.、1.0 mg/L 6-BA 和 0.2 mg/L NAA 的 MS 固体培养基上, 培养 14 d 后不定芽分化及存活情况, 结果表明(表 1): 培养基中 Gen. 的存在抑制烟草叶片切块的外植体的正常生长, Gen. 的浓度影响外植体的存活率和分化率。当 Gen. 浓度高于 60 mg/L 时, 存活率仅为 8% 和 2.3%, 发芽率为 0, 而在 20~60 mg/L Gen. 浓度范围内, 随着培养基中 Gen. 浓度的增加, 烟草叶片切块的存活率(绿色视为存活)从 100% 下降至 21%, 这时, 不定芽平均诱导率从 80.7% 下降至 2.7%。据此, 选用 60 mg/L Gen. 作为筛选转基因烟草植株时筛选剂的筛选压。

### 2.2 农杆菌介导的 AANAT-HIOMT 基因对烟草的遗传转化及转基因植株的获得

预培养 2 d 的烟草叶片用无激素的 MS 液体培养基稀释至  $OD_{600} = 0.5$  的农杆菌液感染 20 min, 置于附加 1.0 mg/L 6-BA 及 0.2 mg/L NAA 的 MS 固体培养基上共培养。2~5 d 后在含 60 mg/L Gen.+300 mg/L

表 1 不同浓度 Gen. 对烟草外植体的存活率和不定芽诱导率的影响

Table 1 Survive rates and buds induction frequency of the explants under various concentrations of gentamycin

Gen. concentrations (mg/L)	Survive rates (%)	Buds induction frequency (%)
0	100	100
20	100	80.7
30	85	61.3
40	72.7	56.3
50	35	10.7
60	21	2.7
80	8	0
90	2.3	0
100	0	0

Cef. 并附加 1.0 mg/L 6-BA 及 0.2 mg/L NAA 的 MS 选择培养基上诱导抗性不定芽。被转化处理的烟草外植体选择培养 2~4 d 时, 外植体边缘开始形成大量不定芽(图 2 A), 但这些不定芽中的绝大多数在含 60 mg/L Gen. 的筛选培养基上继代培养过程中逐渐黄化或褐化, 只有少数不定芽可以分化出绿色再生苗(图 2 B、C); 随着在筛选培养基上继代次数的增多, 有些再生苗出现白化现象(图 2 D)。待再生绿苗生长到 1~2 cm 高时, 将其从母体不定芽上切下, 随即插入附加 60 mg/L Gen. 的生根培养基上诱导生根(图 2 E)。3~5 周形成生长健壮的抗 Gen. 再生植株, 经过炼苗即可移栽到土壤中(图 2 F), 从而获得 AANAT-HIOMT 基因转化的烟草再生植株。

### 2.3 转基因植株的分子生物学鉴定

#### 2.3.1 转基因植物的 Southern blotting

进行亲本及转基因烟草的 Southern blotting, 结果(图 3)表明, 亲本基因组(泳道 2)没有杂交信号, 转基因植株中目的基因 AANAT 在烟草基因组(泳道 3、5、6 和 7)中, HIOMT 在烟草基因组(泳道 3、4、5、6 和 7)中出现阳性杂交信号。其中目的基因 AANAT-HIOMT 同时在泳道 3、5、6 和 7 中有阳性杂交信号, 说明目的基因已经整合到烟草基因组(泳道 3、5、6 和 7)的 DNA 中。

#### 2.3.2 转基因植物的 RT-PCR 检测

提取经 Southern blotting 检验阳性的转基因植株和未转基因野生型植株的总 RNA。各取 11 μL 依照 cDNA 第一链反应试剂盒说明, 分别以 oligo(dT)

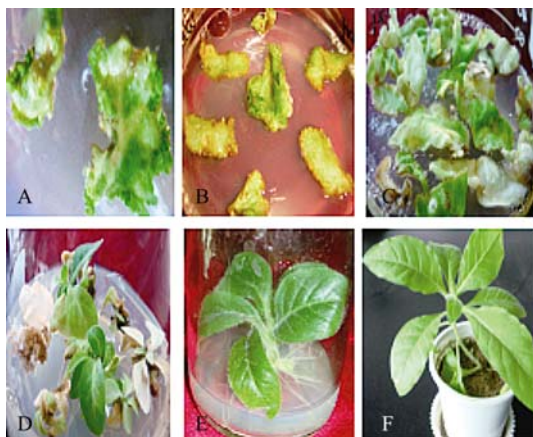


图 2 转 AANAT-HIOMT 基因烟草的获得  
Fig. 2 Transgenic plants of tobacco (harboring AANAT-HIOMT genes)

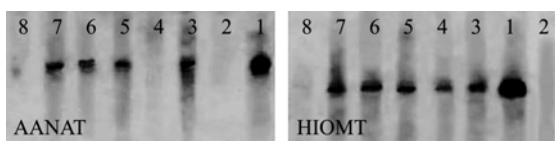


图 3 转基因植株 AANAT-HIOMT 基因 Southern blotting 分析  
Fig. 3 Southern blotting analysis of the AANAT and HIOMT genes in some transgenic plants 1: plasmid control; 2: wild type; 3-8: YXu55 transgenic plants.

为引物合成 cDNA 第一链, 用 AANAT 和 HIOMT 基因的引物进行 RT-PCR 检测, 结果显示: 用经 DNase 处理并且未进行反转录的 YXu55 转化系 RNA 直接作为模板进行 PCR 反应, 均未见 AANAT 和 HIOMT 基因的扩增条带(图 4), 这说明 RT-PCR 扩增避免了由于基因组 DNA 的存在而可能导致的假阳性反应。而以总 RNA 反转的 cDNA 第一链为模板的 RT-PCR 结果(图 5)显示, 质粒 DNA 阳性对照(Lane1)和 YXu55 转基因系, 除 Lane8 外, 在 527 bp(Lane3~8, Left)和 572 bp(Lane3~8, Right)的左右位置均扩增出条带, 并且其条带大小与 AANAT 和 HIOMT 基因的大小相吻合, 而未转基因的阴性对照则没有任何条带出现。RT-PCR 反应检测的结果初步证明了 AANAT 和 HIOMT 目的基因已经整合到烟草的基因组中, 并且能在 RNA 水平上进行转录。

2.4 转基因植株中褪黑素含量的测定

按照“1.2.4”测定方法, 分别对供试的实验材料, 即组织培养的不同株系的转基因烟草以及其 CK 进行测定, 以 3 次平均峰面积通过回归方程进行计算, 得到每个样品中褪黑素的含量。由图 6 可以看出, pZP122 转基因株系(P1、P2 和 P3)和 CK 褪黑

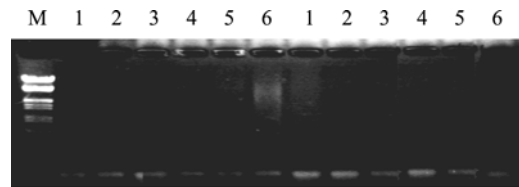


图 4 转基因植株中 RNA 的 PCR 分析  
Fig. 4 PCR analysis of the RNA in transgenic plants. M: DNA marker; 1-6: PCR analysis of the AANAT (Left) and HIOMT(Right) genes of the RNA.



图 5 转基因植株中 AANAT-HIOMT 基因的 RT-PCR 分析  
Fig. 5 RT-PCR analysis of the AANAT and HIOMT genes in transgenic plants. M: DNA marker; 1: plasmid control; 2: wild type; 2-8: RT-PCR analysis of the AANAT (Left) and HIOMT(Right) genes.

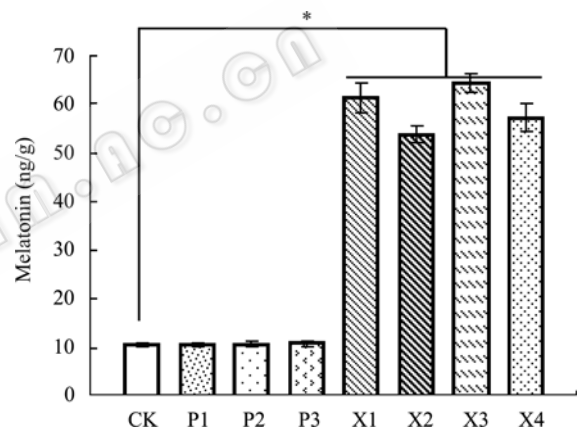


图 6 不同株系植株的褪黑素含量比较(n=3, mean ±SD)  
Fig. 6 Content of melatonin in transgenic plants (n=3, mean ±SD). CK: wild type; P1-P3: pZP122 transgenic plants; X1-X4: YXu55 transgenic plants. Error bars represent SD. Statistically significant changes (P<0.05, using Student's t-test) are identified by asterisks.

素含量非常微量, 二者无显著差异。而含 AANAT-HIOMT 基因的 YXu55 转化的转基因株系(X1、X2、X3 和 X4)褪黑素含量显著提高(t= 0.0003, 0.0014, 0.0002, 0.0010, P < 0.05)。

2.5 转基因植株抗氧化系统的变化

测定经上述转化后所获褪黑素含量明显提高的烟草抗氧化系统的生理生化指标, 并与 CK 作比较。结果发现, 与 CK 相比, YXu55 转化的不同株系中, 除丙二醛(MDA)含量外, 超氧化物歧化酶(SOD)、过氧化物酶(POD)、过氧化氢酶(CAT)、谷胱甘肽(GSH)

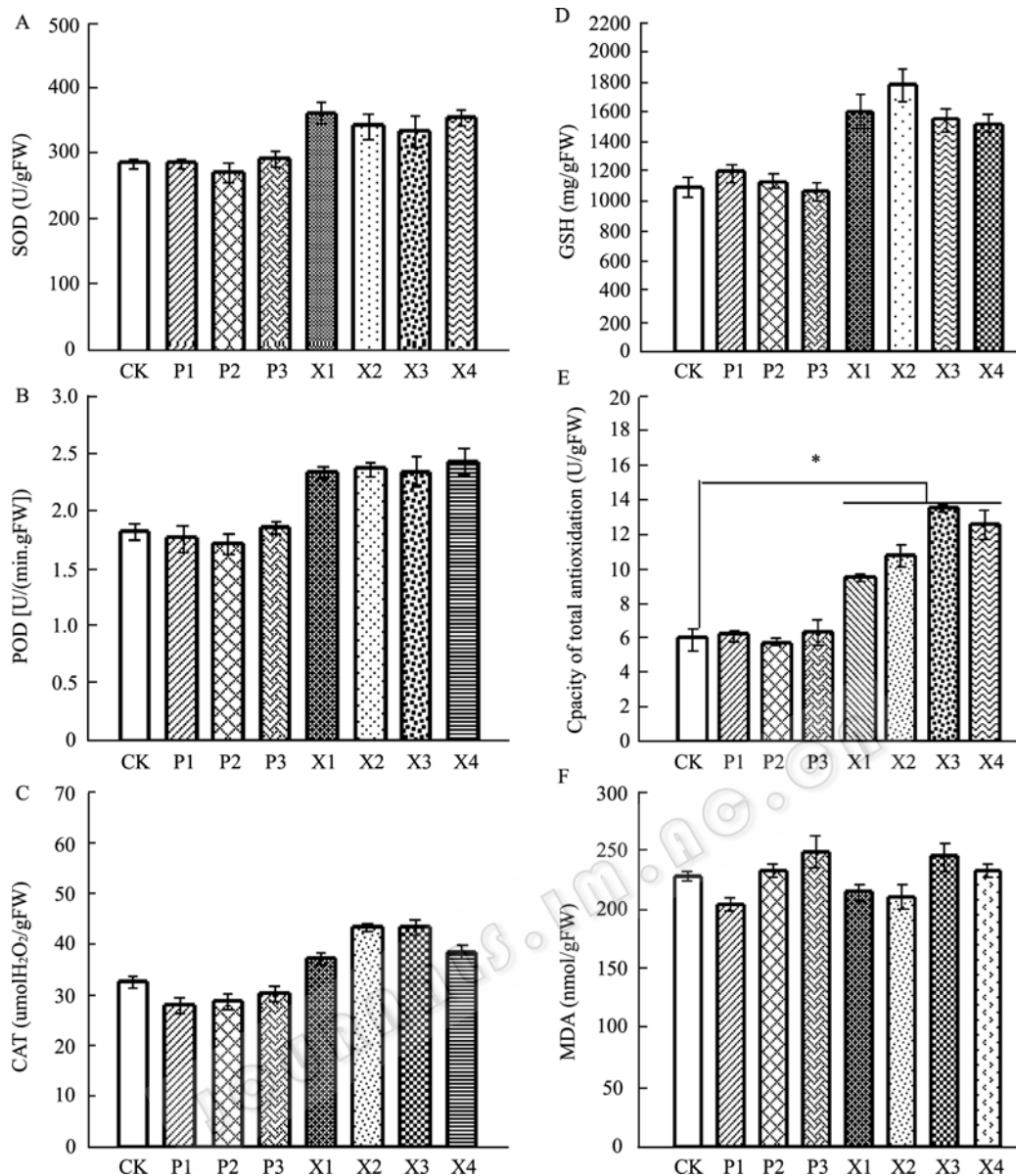


图 7 转基因植株的抗氧化系统分析( $n=3$ , mean  $\pm$ SD)

Fig. 7 Analyses of antioxidative capability in transgenic plants. CK: wild type; P1-P3: pZP122 transgenic plants; X1-X4: YXu55 transgenic plants. Error bars represent SD. Statistically significant changes ( $P < 0.05$ , using Student's  $t$ -test) are identified by asterisks.

含量、总抗氧化能力均有提高(图 7)。YXu55 转基因株系 X1、X2、X3 和 X4 的 SOD 活性(图 7A)比未转化的对照株系(CK)平均高出其对照株系 22.91%; 其 POD 活性(图 7B)平均高出 CK 27.23%; CAT 活性(图 7C)平均高出 CK 45.15%; GSH 含量(图 7D)平均高出 CK 47.51%; 总抗氧化能力(图 7E)也显著提高( $t = 0.0025, 0.0008, 0.0003, 0.0004, P < 0.05$ ), 平均是 CK 的 1.61 倍; 而 pZP122 转基因株系 P1、P2、P3 的 SOD、POD、CAT 活性, GSH 含量, 总抗氧化能力均与其未转基因的对照株系近乎相等。而 MDA 的平均含量(图 7F)YXu55 转基因株系为 226.15 nmol/g FW,

pZP122 转基因株系为 229.30 nmol/g FW, 其未转基因的对照株系为 229.24 nmol/g FW, 三者相差不显著。

### 3 讨论

现有的资料表明, 褪黑素普遍存在于植物<sup>[8,9]</sup>, 但对于褪黑素在植物中的功能还了解甚少。现有报道多采用了施加外源褪黑素来研究对整株植物的生长效应和生理作用, 离体培养材料极少用到。基因工程和转基因技术为利用外源基因改良植物的品质提供了有力的技术支持, 这已为无数的研究所证明。烟草是常用的农杆菌转化法转基因受体植物,

其组织培养的易操作性和较强的再生能力,使其已成为植物基因工程操作的模式植物。本研究用烟草作为受体材料还因为烟草本身几乎测不出褪黑素<sup>[5]</sup>,这作为植物中褪黑素功能的研究是很好的对照材料。本研究通过农杆菌介导法成功地将褪黑素合成酶基因 AANAT 和 HIOMT 转到烟草(秦烟 95)中,获得了转基因植株,证明了农杆菌转化法在褪黑素合成酶基因转化烟草中的可行性。

在选取部分转基因植株检测基因转录表达时,经典的 Northern 印迹方法可进行特异和定量检测,但灵敏度低,很难检出微量基因的表达式,且操作比较烦琐,而 RT-PCR 法比 Northern 印迹法更灵敏,需要的 RNA 量及序列信息较少<sup>[19,20]</sup>。本研究选用了常用于 mRNA 丰度定量的 RT-PCR 手段。为了避免因总 RNA 受基因组 DNA 污染而导致 RT-PCR 的假阳性结果,试验曾以总 RNA 作为模板进行 PCR 扩增,以确定基因组 DNA 是否去除干净。本实验表明,总 RNA 中无 DNA 污染,并且以此 RNA 作为模板进行 RT-PCR 可以扩增出目的片段,这说明目的基因 AANAT 和 HIOMT 基因均已经全部或部分表达产生了 mRNA,在转基因的烟草植株基因组中进行基因转录。

本研究将 YXu55 转基因株系的褪黑素含量与 pZP122 转基因株系和 CK 相比较显示,其褪黑素含量有了明显的上升;pZP122 转基因株系褪黑素含量与 CK 的含量甚微,且相差不多,仅在检测最低限上有微弱信号,与文献报道的烟草中低褪黑素含量相类似<sup>[9]</sup>。而 AANAT-HIOMT 基因在转基因株系中表达使褪黑素合成水平有了显著的提高,使转化植株内源褪黑素含量达到 50~70 ng/g。从而为植物褪黑素功能研究提供了很适宜的材料。

植物体内的抗氧化系统是植物用于保健和药用功能的重要物质基础,也是直接影响植物生长过程中一系列生理生化变化的指标,反应植物正常生长的情况<sup>[21]</sup>。本试验所得到的转基因烟草抗氧化系统发生了很大的变化。与转空白质粒 pZP122 转化烟草和其未转化亲本对照相比,转 AANAT-HIOMT 基因的烟草株系的 SOD、POD、CAT 活性和 GSH 浓度有所提高,而其总抗氧化能力明显提高,该结果的形成推测可能是由于几种抗氧化酶类和非酶类抗氧化的物质活性的某种叠加。由此可见通过 AANAT-

HIOMT 基因导入,使受体植物具有了较好的抗氧化酶类和非酶类抗氧化的物质基础,提高了维持植物的正常代谢活动的抗氧化潜力。而不含 AANAT-HIOMT 基因的空白质粒 pZP122 转化的烟草,其内部的 SOD、POD、CAT 活性, GSH 浓度以及总抗氧化能力均没有明显变化,与对应的 YXu55 转基因株系相比差异很大,这也进一步说明转 AANAT-HIOMT 基因的烟草抗氧化能力的上升是由于 AANAT-HIOMT 基因的整合,褪黑素过量合成而引起的。这一结果为褪黑素在植物中充当类似于动物机体中抗氧化、自由基清除剂的作用提供了实验证据。

抗氧化系统中活性氧类伤害植物细胞的重要证据之一是它们使细胞膜脂过氧化,使细胞膜的通透性增大,外渗物质增加,对细胞造成伤害。其中细胞膜脂过氧化的终产物之一 MDA 产生的数量多少可间接反映植物组织抗氧化能力的强弱<sup>[21]</sup>。但本实验的 YXu55 转基因株系的 MDA 含量并没有因为外源基因的导入而明显改变。同样,空白质粒 pZP122 转化株 MDA 含量也没有太大变化,这反映出褪黑素合成过程中的关键酶基因 AANAT-HIOMT 在转基因植物的表达在植物体内引起了 SOD、POD、CAT 活性, GSH 浓度以及总抗氧化能力的升高,同时没有导致其膜脂质过氧化物 MDA 的变化,从而可能增强烟草抗氧化潜能。

## REFERENCES

- [1] Lerner AB, Takahashi Y, Lee TH, *et al.* Isolation of melatonin, the pineal gland factor that lightens melatoninocytes. *J Am Chem Soc*, 1958, **80**: 2578.
- [2] Liu JZ, Zhu YJ, Zhou LF. Recent research progress in pharmaceutical and physiological effects of melatonin. *J Wuhan Yejin Univ Sci Technol*, 2004, **27**(2): 198-200. 刘建忠,朱艳君,周丽芳.褪黑素生理及药理作用研究进展. *武汉科技大学学报*, 2004, **27**(2): 198-200.
- [3] Tomás-Zapico C, Coto-Montes A. Melatonin as antioxidant under pathological processes. *Recent Pat on Endocr, Metab & Immune Drug Disc*, 2007, **1**(1): 63-82.
- [4] Yon JH, Carter LB, Reiter RJ, *et al.* Melatonin reduces the severity of anesthesia-induced apoptotic neurodegeneration in the developing rat brain. *Neurobiol Dis*, 2006, **21**(3): 522-530.
- [5] Hattori A, Migita H, Iigo M, *et al.* Identification of melatonin in plants and its effects on plasma melatonin

levels and binding to melatonin receptors in vertebrates. *Biochem Mol Biol Int*, 1995, **35**: 627-634.

[6] Dubbels R, Reiter RJ, goebel A, *et al*. Melatonin in edible plants identified by highperformance liquid chromatography-mass spectrometry. *J Pineal Res*, 1995, **18**: 28-31.

[7] Hardeland R, Pandi-Perumal SR, Poeggeler B. Melatonin in plants-focus on a vertebrate night hormone with cytoprotective properties. *Funct Plant Sci Biotech*, 2007, **1**(1): 32-45.

[8] Tettamanti C, Cerabolini B, Gerola P, *et al*. Melatonin identification in medicinal plants. *Acta Phytotherap*, 2000, **3**: 137-144.

[9] Zhang Z, Chen GF, Huo YS, *et al*. Melatonin in Chinese medicinal plants. *Life Sci*, 2003, **73**: 19-26.

[10] Zhang GY, Liu WH, Dai YR. Presence and possible function of melatonin in plants. *Chin Trad Herbal Drugs*, 2003, **34**(1): 87-89.  
张贵友, 刘伟华, 戴尧仁. 植物中的褪黑激素及其功能. *中草药*, 2003, **34**(1): 87-89.

[11] Wolf K, Kolae J, Witters E, *et al*. Daily profile of melatonin levels in *Chemopodium rubrum* L. depends on photoperiod. *J Plant Physiol*, 2001, **158**: 1491-1493.

[12] Van Tassel DL, Roberts N, Lewy A, *et al*. Melatonin in plant organs. *J Pineal Res*, 2001, **31**(1): 8-15.

[13] Arnao MB, Hernandez-Ruiz J. Melatonin promotes adventitious-and lateral root regeneration in etiolated hypocotyls of *Lupinus albus* L. *J Pineal Res*, 2007, **42**(2): 147-152.

[14] Murch SJ, Campbell SSB, Saxena PK. The role of serotonin and melatonin in plant morphogenesis: Regulation of auxin induced organogenesis in *in vitro*-cultured explants of John's Wort(*Hypericum perforatum* L.). *In Vitro Cell Dev BiolPlant*, 2001, **37**(6): 786-793.

[15] Hardeland R, Poeggeler B. Non-vertebrate melatonin. *J Pineal Res*, 2007, 2003, **34**: 233-241.

[16] Kolář J, Machachaova I. Melatonin in higher plants: Occurrence and possible functions. *J Pineal Res*, 2005, **39**: 333-341.

[17] Wang GL, Fang HD. Principle and Technique of Plant Genetic Engineering. 2nd Ed. Beijing: Science Press, 2002.  
王关林, 方宏笃主编. 植物基因工程原理与技术. 第二版. 北京: 科学出版社, 2002.

[18] Liu WH, Zhang GY, Dai YR. Detection and quantification of melatonin in leaves, flowers and seeds of baikal skullcap (*Scutellaria baicalensis*) by HPLC. *Chin Bull Bot*, 2003, **20**(1): 75-79.  
刘伟华, 张贵友, 戴尧仁. HPLC 法测定黄芩叶、花、种子中褪黑激素的含量. *植物学通报*, 2003, **20**(1): 75-79.

[19] Hayward AL, Oefner PJ, Sabatini S, *et al*. Modeling and analysis of competitive RT-PCR. *Nucl Acids Res*, 1998, **26**(11): 2511-2518.

[20] Viganó F, Stevens M. Development of RT-PCR for simultaneous detection of BMV and BChV in plants and single aphids. *J Biol Methods*, 2007, **146**(1-2): 196-201.

[21] Pan RZ, Wang XQ, Li NH. Plant Physiology. 4th Ed. Beijing: Higher Education Press, 2004.  
潘瑞炽, 王小青, 李娘辉. 植物生理学. 第四版. 北京: 高等教育出版社, 2004.

本 期 广 告 索 引

企 业	版 位	企 业	版 位
GE Healthcare 公司	封 底	美国 Promega 公司	内 页
Roche 诊断产品有限公司	封 二	生物谷网站	内 页
赛默飞世尔科技有限公司	封 三	上海国强生化工程装备有限公司	内 页
泰州贝今生物技术有限公司	内 页	镇江东方生物工程公司	内 页