



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116555307 A

(43) 申请公布日 2023.08.08

(21) 申请号 202310654393.7 *C12N 1/21* (2006.01)
(22) 申请日 2023.06.02 *A01H 5/00* (2018.01)
(71) 申请人 中国科学院华南植物园 *A01H 6/20* (2018.01)
地址 510000 广东省广州市天河区兴科路 *A01H 6/14* (2018.01)
723号 *C12R 1/01* (2006.01)
申请人 广州立达尔生物科技股份有限公司
(72) 发明人 杨玲 邓书林 喻芳琴 陶正国
崔海滨 黄永奇
(74) 专利代理机构 广州广典知识产权代理事务
所(普通合伙) 44365
专利代理师 万志香
(51) Int. Cl.
C12N 15/61 (2006.01)
C12N 9/90 (2006.01)
C12N 15/84 (2006.01)

权利要求书1页 说明书6页
序列表(电子公布) 附图2页

(54) 发明名称

万寿菊TeLUT2基因在提高植物叶黄素含量中的应用

(57) 摘要

本发明公开了一种万寿菊TeLUT2基因在提高植物叶黄素含量中的应用。所述基因TeLUT2的核苷酸序列如SEQ ID NO.1所示;其编码氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示。本发明在万寿菊成熟花中克隆获得了TeLUT2基因。Atlut2突变体(SALK_005018)相对于野生型拟南芥无法合成叶黄素,而富集β-胡萝卜素衍生物玉米黄质,花药黄质和紫黄质,在Atlut2突变体中表达TeLUT2可以回复其表型。在万寿菊中过表达TeLUT2基因时,可以提高叶黄素的含量。本发明从万寿菊TeLUT2基因在叶黄素合成中发挥重要调控作用,能够用于提高植物中叶黄素含量。

1. 万寿菊TeLUT2基因在提高植物叶黄素含量中的应用,所述万寿菊TeLUT2基因的cDNA序列为如SEQ ID NO.1所示,或为编码SEQ ID NO.2所示氨基酸的核苷酸序列。

2. 氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示的万寿菊TeLUT2编码蛋白在提高植物叶黄素含量中的应用。

3. 插入有权利要求1中所述的万寿菊TeLUT2基因的cDNA序列的重组表达载体。

4. 权利要求3所述的重组表达载体在提高植物叶黄素含量中的应用。

5. 转化有权利要求3所述的重组表达载体的重组基因工程菌。

6. 权利要求5所述的重组基因工程菌在提高植物叶黄素含量中的应用。

7. 根据权利要求1或2或4或6所述的应用,其特征在于,所述植物为万寿菊或拟南芥。

8. 权利要求1所述的万寿菊TeLUT2基因、或权利要求3所述的重组表达载体、或权利要求5所述的重组基因工程菌在培育叶黄素含量高的转基因植物中的应用。

9. 一种提高植物叶黄素含量的生物制剂,其特征是,其活性成份含有万寿菊TeLUT2基因,所述万寿菊TeLUT2基因的cDNA序列为如SEQ ID NO.1所示,或为编码SEQ ID NO.2所示氨基酸的核苷酸序列。

10. 一种提高植物叶黄素含量的方法,其特征是,该方法步骤中包括调控植物中万寿菊TeLUT2基因的表达,所述万寿菊TeLUT2基因的cDNA序列为如SEQ ID NO.1所示,或为编码SEQ ID NO.2所示氨基酸的核苷酸序列。

万寿菊TeLUT2基因在提高植物叶黄素含量中的应用

技术领域

[0001] 本发明属于基因工程技术领域,特别是涉及万寿菊TeLUT2基因在提高植物叶黄素含量中的应用。

背景技术

[0002] 叶黄素属于类胡萝卜素家族,只能由植物合成,在万寿菊、菠菜等深绿色叶类蔬菜中含量丰富。叶黄素不仅可通过血脑屏障,还可能对维持大脑功能有特殊作用,其对维持年长者的认知能力、语言能力有利,此外,可能参与婴幼儿脑部神经系统发育。我国的新生儿数量长期居于世界前列,且随着我国老龄化社会的到来,婴儿和老年人脑部功能保护需求巨大,叶黄素在脑功能保护领域具有巨大的应用潜力。

[0003] 万寿菊(*Tagetes erecta*)为菊科万寿菊属植物,提取类胡萝卜素的优质植物源材料。万寿菊是一种具有多种功能和用途的植物,其花色艳丽,花期较长,抗性强,且适应性强,常作为观赏植物;其富含天然食用黄色素,尤其是叶黄素,约占万寿菊所含类胡萝卜素总量的90%,具有抗癌和提高免疫的功能。万寿菊对环境适应力强,耐瘠薄土壤,在全世界有广泛的栽培。国际上对万寿菊的需求量不断增加,品种不断更新,美国的保尔种子(Ball Seed)公司自收购泛美种子(PanAmerican Seed)公司后,已成为全球最大的万寿菊种子生产公司。目前,人们主要围绕色素用和观赏用万寿菊展开育种研究,因此育种者们一方面致力于提高万寿菊中叶黄素的产量,另一方面通过控制株型和花部性状以提高万寿菊的观赏价值。国内万寿菊规模化发展较快,现已成为我国主要栽培草本花卉之一,广泛用于室内外环境布置,并已自主培育出大量富含天然食用色素的品种。

[0004] 番茄红素 β -环化酶是类胡萝卜素合成途径中的关键酶,是调控番茄红素向叶黄素分化的限速酶。目前有关植物类胡萝卜素生物合成途径的研究很多,参与其代谢的酶主要有八氢番茄红素合成酶(PSY)、八氢番茄红素脱氢酶(PDS)、 ξ -胡萝卜素脱氢酶(ZDS)、番茄红素 β -环化酶(LCYb)和番茄红素 ϵ -环化酶(LCYe)等。其中番茄红素 β -环化酶(LCYb)是类胡萝卜素合成途径的关键酶,其基因转录水平会影响上游番茄红素和下游 β -胡萝卜素、叶黄素等产物的积累。MORENO等发现超量表达DcLCYb1的胡萝卜株系中能促进 β -胡萝卜素积累,沉默DcLCYb1则会降低 β -胡萝卜素含量;从番茄品种中克隆得到两种番茄红素 β -环化酶基因,分别为LCYB和CYCB,研究发现红色果肉番茄与浅色果实的番茄相比,两个基因的表达量逐渐降低随着果实的成熟,但红色果肉上游番茄红素积累量显著高于浅色果实的番茄。因此,番茄红素环化酶在参与类胡萝卜素组分调节中起着重要的作用。LUT2编码番茄红素 ϵ -环化酶(lycopene epsilon cyclase),拟南芥Atlut2突变体(SALK_005018)相对于野生型拟南芥无法合成叶黄素(Lutein, α -胡萝卜素衍生物),而富集 β -胡萝卜素衍生物玉米黄质(Zeaxanthin),花药黄质(Antheraxanthin)和紫黄质(Violaxanthin)。

发明内容

[0005] 基于此,本发明的目的是提供万寿菊TeLUT2基因在提高植物叶黄素含量中的应

用。

[0006] 本发明的第一方面,是提供万寿菊TeLUT2基因在提高植物叶黄素含量中的应用,所述万寿菊TeLUT2基因的cDNA序列为如SEQ ID NO.1所示,或为编码SEQ ID NO.2所示氨基酸的核苷酸序列。

[0007] 本发明的第二方面,是提供氨基酸序列如SEQ ID NO.2所示的万寿菊TeLUT2编码蛋白在提高植物叶黄素含量中的应用。

[0008] 本发明的第三方面,是提供插入有上述的万寿菊TeLUT2基因的cDNA序列的重组表达载体及其在提高植物叶黄素含量中的应用。

[0009] 本发明的第四方面,是提供转化有上述的重组表达载体的重组基因工程菌及其在提高植物叶黄素含量中的应用。

[0010] 本发明的第五方面,是提供上述的万寿菊TeLUT2基因、或所述的重组表达载体、或所述的重组基因工程菌在培育叶黄素含量高的转基因植物中的应用。

[0011] 本发明的第六方面,是提供一种提高植物叶黄素含量的生物制剂,其活性成份含有万寿菊TeLUT2基因,所述万寿菊TeLUT2基因的cDNA序列为如SEQ ID NO.1所示,或为编码SEQ ID NO.2所示氨基酸的核苷酸序列。

[0012] 在其中一些实施例中,含有万寿菊TeLUT2基因的活性成份可以是上述重组表达载体、或上述的重组基因工程菌。

[0013] 在其中一些实施例中,重组基因工程菌为根癌农杆菌。

[0014] 本发明的第六方面,是提供一种提高植物叶黄素含量的方法,该方法步骤中包括调控植物中万寿菊TeLUT2基因的表达,所述万寿菊TeLUT2基因的cDNA序列为如SEQ ID NO.1所示,或为编码SEQ ID NO.2所示氨基酸的核苷酸序列。

[0015] 将万寿菊TeLUT2基因在植物中过表达,可以促进植物细胞内提高叶黄素含量。

[0016] 在其中一些实施例中,所述植物为万寿菊或拟南芥。

[0017] 本发明的有益效果是:本发明发现万寿菊中的TeLUT2基因,在Atlut2突变体中表达TeLUT2基因可以回复其表型,从而合成叶黄素。在万寿菊(品系Discovery)中超表达TeLUT2基因可以提高叶黄素的含量。因此,将该万寿菊中的TeLUT2基因、以及相应的插入该基因的重组表达载体、或相应重组基因工程菌用于提高植物叶黄素含量,或者用于培育叶黄素含量高的转基因植物。

附图说明

[0018] 图1为TeLUT2超表达载体。

[0019] 图2为万寿菊TeLUT2回补拟南芥lut2突变体的叶黄素含量测定。

[0020] 图3为TeLUT2过表达万寿菊植株鉴定。

[0021] 图4为万寿菊TeLUT2过表达植株与野生型植株叶黄素含量测定。

具体实施方式

[0022] 为了便于理解本发明,下面将对本发明进行更全面的描述。本发明可以以许多不同的形式来实现,并不限于本文所描述的实施例。相反地,提供这些实施例的目的是使对本发明公开内容的理解更加透彻全面。

[0023] 下列实施例中未注明具体条件的实验方法,通常按照常规条件,例如Green和 Sambrook主编的第四版《分子克隆实验指南》(Molecular Cloning:A Laboratory Manual)已于2013年出版,或按照制造厂商所建议的条件。实施例中所用到的各种常用化学试剂,均为市售产品。

[0024] 除非另有定义,本发明所使用的所有的技术和科学术语与属于本发明的技术领域的人员通常理解的含义相同。本发明的说明书中所使用的术语只是为了描述具体的实施例的目的,不用于限制本发明。本发明所使用的术语“和/或”包括一个或多个相关的所列项目的任意的和所有的组合。

[0025] 本发明从万寿菊中克隆提高叶黄素含量相关基因,命名为Tagetes erecta lycopene epsilon cyclase(以下简称TeLUT2)。

[0026] 上述所述的万寿菊TeLUT2基因在提高植物叶黄素含量中的应用。

[0027] 进一步地,通过在拟南芥Atlut2突变体中表达TeLUT2可以回复其表型。

[0028] 进一步地,通过超表达万寿菊TeLUT2基因提高万寿菊中叶黄素Lutein含量。

[0029] 进一步地,通过超表达万寿菊TeLUT2基因,例如将上述的万寿菊TeLUT2基因、或所述的重组表达载体、或所述的重组基因工程菌进行转化,构建超表达TeLUT2万寿菊的植株,在培育叶黄素含量高(相对于野生型而言)的转基因植物中的应用。

[0030] 万寿菊TeLUT2基因的cDNA序列如下:

[0031] SEQ ID NO:1

[0032] >TeLUT2,1551bp

[0033] atgagtatgagagctggacacatgacggcaacaatggcggcttttacatgccctaggtttatgactag
catcagatacacgaagcaaattaagtgcaacgctgctaaaagccagctagtcgttaacaagagattgaggaggaa
gaagattatgtgaaagccggtggatcggagctgctttttgttcaaatgcaacagaataagtccatggatgcacagt
ctagcctateccaaaagctcccaagggtaccaataggaggaggagacagtaactgtatactggatttggttgt
aatttggttgtggtcctgctggccttgctcttgctggagaatcagccaagctaggcttgaatgtcgcacttatcggc
cctgatcttcttttacaataactatgggtgtttgggaggatgaatttataggtcttgacttgagggtgtattg
aacatgtttggcgagatactgtagtatacttgatgacaacgatcccatctcataggtcgtgcctatggacgagt
tagtcgtgatttacttcacgaggagttgttgactaggtgcatggagtcaggcgtttcatactgagctccaaagt
gaacggattactgaagctccaaatggcctaagtctcatagagtgtgaaggcaatatcacaattccatgcaggcttg
ctactgtcgttcttgagcagcttctggaaaacttttgagatgaacttggcgggtccccgtgtttgcgttcaaac
agcttatggtatagaggttgaggtgaaagcataccctatgatccaagcctaattggtttcatggattatagagac
tacaccaaacataaatctcaatcaactagaagcacaatatccaacattttgtatgtcatgccaatgtctccaacta
aagtattctttgaggaaacttgtttggcttcaaaagaggccatgccttttgagttatgaaagcaaaactcatgtc
aagattaaagactatgggatccgaataacaaaacttatgaagaggaaatggtcatalattccagtaggtggatcc
ttaccaataaccgagcaaaagaaccttgcaatttggtgctgctgctagcatggatgcatccagccacaggatatccg
ttgtaagatacactgtcagaagctcctaattatgcagcagtaattgcaaagatttagggaaaggaaattcaaaaca
gatgcttgatcatggaagatacacaaccaacatctcaaagcaagcttgggaaacacttggccccctgaaaggaaa
agacagagagcattctttctctttggattagcactgattgtccagatggatattgaggggacccgcacattcttcc
ggactttcttccgcttgccacatggatgtggtgggggtttcttgatcttctgttatcatcaactgacttgataat
atgtgcgttttacatgtttatcatagcaccgatagcctgagaatgggtctggtagacatttgccttctgaccg

acaggaggaacaatgtttaaagcgtatctcagatataa

[0034] TeLUT2基因的编码氨基酸序列如下:

[0035] SEQ ID NO:2

[0036] >TeLUT2,516aa

[0037] MSMRAGHMTATMAAFTCPRFMTSIRYTKQIKCNAAKSQLVVKQEIEEEEDYVKAGGSELLFVQMQQNKS
MDAQSSLSQKLPRVPIGGGGDSNCILDLVVI GCGPAGLALAGESAKLGLNVALIGPDLPTNNYGVWEDEFI GLGLE
GCIEHVWRD TVVYLDDNDP ILIGRAYGRVSRDLLHEELLTRCME SGVSYLSSKVERITEAPNGLSLIECEGNITIPC
RLATVASGAASGKLLQYELGGPRVCVQTAYGIEVEVESIPYDPSLMVFM DYRDYTKHKSQSLEAQYPTFLYVMPMSP
TKVFFEETCLASKEAMPFELLKTKLMSRLKTMGIRI TKTYEEEWSYIPVGGSLP NTEQKNLAFGAAASMVHPATGYS
VVRSLSEAPNYAAVIAKILGKGNKQMLDHGRYTTNISKQAWETLWPLERKRQRAFFL FGLALIVQMDIEGTRTFFR
TFFRLPTWMMWGLGSSLSSTDLII FAFYMFIIAPHSLRMGLVRHLLSDPTGGTMLKAYLTI

[0038] 为了更好地理解本发明的内容,下面结合具体实施方法对本发明内容作进一步说明,但本发明的保护内容不局限以下实施例。

[0039] 实施例1:万寿菊TeLUT2基因的克隆

[0040] 利用引物设计软件Primer Premier 5.0设计PCR特异引物(TeLUT2_AscIF:gacggcgcgccc atgagtatgagagctggacaca (SEQ ID NO:3);TeLUT2_XbaIR:gtgtctagattatcgtgagatacgttttaaca SEQ ID NO:4),从万寿菊成熟花中提取总RNA,反转录PCR(RT-PCR),克隆获得TeLUT2基因。

[0041] 1、植物材料

[0042] 万寿菊成熟花组织。

[0043] 2、方法

[0044] 2.1 RNA提取

[0045] 1)取约100mg样品,加1,000 μ l含5%巯基乙醇的4 \times CTAB缓冲液,摇匀。室温放置60min,间中震荡。

[0046] 2)500 μ l氯仿:异戊醇(24:1)充分混匀,4 $^{\circ}$ C,12,000rpm离心15min。

[0047] 3)上清转移至新的1.5mL离心管中,加入氯仿:异戊醇(24:1)约600 μ l充分混匀。4 $^{\circ}$ C,12,000rpm离心15min。

[0048] 4)上清转移至新的1.5mL离心管中,加预冷的1/3体积8M氯化锂溶液,1/10体积3M醋酸钠溶液,颠倒混匀。-80 $^{\circ}$ C冰箱保存过夜。

[0049] 5)4 $^{\circ}$ C,12,000rpm离心15min。

[0050] 6)弃上清,70%乙醇及无水乙醇各洗一次沉淀。

[0051] 7)晾干,用30~50 μ l的RNase-free水溶解,加入0.1 μ l RNA酶抑制剂,保存-80 $^{\circ}$ C冰箱。

[0052] 8)测定RNA的浓度,1.2%的琼脂糖凝胶电泳检测RNA的完整性和纯度,提取的总RNA均呈现两条清晰且无明显拖尾条带,表明样品总RNA的完整性较好可进行下一步实验。

[0053] 9)RNA中DNA的消化与纯化:用Promega公司DNase I(RNase Free)消化总RNA中掺杂的基因组DNA。

[0054] 10)用Promega公司RNA反转录试剂盒将提取的RNA反转录为cDNA。

[0055] 2.2 PCR

[0056] 利用上述所获得的万寿菊成熟花的cDNA,进行TeLUT2基因的克隆。将200 μ L EP管放置于冰上,加入试剂:

	PrimeStar	0.5 μ L
	5*PrimeStar Buffer	10 μ L
	dNTP Mixture (2.5 mM)	4 μ L
[0057]	cDNA	1 μ L
	TeLUT2_AscI	1 μ L
	TeLUT2_XbaIR	1 μ L
	Nuclease-free Water	32.5 μ L

[0058] 按以下程序进行扩增:98 $^{\circ}$ C 2min (预变性),98 $^{\circ}$ C 10s (变性),55 $^{\circ}$ C 20s (复性),72 $^{\circ}$ C 100s (延伸),所述变性——复性——延伸32个循环,72 $^{\circ}$ C 5min (总延伸)。

[0059] 通过上述操作,获得了TeLUT2基因PCR扩增产物。

[0060] 2.3高保真PCR产物与超表达载体(pUBQ10-3Flag,酶切位点AscI和SpeI)利用同源重组法构建TeLUT2超表达载体,如图1所示。

[0061] 2.4 TeLUT2回补拟南芥lut2突变体植株的构建

[0062] 将UBQ10-TeLUT2超表达载体转化根癌农杆菌GV3101,并利用浸染花序法转化拟南芥lut2突变体植株,通过潮霉素筛选以及Western Blot鉴定筛选阳性植株。

[0063] 2.5测定拟南芥叶黄素含量

[0064] 取野生型,lut2突变体以及突变体背景下超表达TeLUT2的拟南芥植株样品,45 $^{\circ}$ C烘干,将烘干后样品液氮研磨,称重0.15g,加入1mL乙醇(含0.1%2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚),涡旋15s,加入400mL 50%KOH水溶液,涡旋15s,于50 $^{\circ}$ C水浴60min,每15min涡旋一次。用3.3mL正己烷提取3次,合并提取液,取50 μ L滤液上样。色谱条件:高效液相色谱仪。色谱柱SymmetryC18(250mmx 4.6mm,5 μ m)。流动相:乙腈:二氯甲烷:甲醇为70:20:10(v:v)。流速1mL/min。检测波长475nm。柱温30 $^{\circ}$ C。根据叶黄素标准评判标准曲线以及HPLC结果计算叶黄素含量,结果如图2所示。结果表明Atlut2突变体相对于野生型拟南芥无法合成叶黄素(Lutein, α -胡萝卜素衍生物),在Atlut2突变体中超表达TeLUT2可以回复其表型。

[0065] 2.6超表达TeLUT2万寿菊植株构建

[0066] 将UBQ10-TeLUT2超表达载体转化根癌农杆菌GV3101,并利用浸泡法转化万寿菊子叶,通过潮霉素筛选得到阳性植株,并利用Western Blot鉴定检测蛋白表达情况如图3所示。

[0067] 2.7测定万寿菊叶黄素含量

[0068] 取野生型万寿菊(品系Discovery)和超表达TeLUT2的万寿菊植株样品,45 $^{\circ}$ C烘干,将烘干后样品液氮研磨,称重0.15g,加入1mL乙醇(含0.1%2,6-二叔丁基-4-甲基苯酚),涡旋15s,加入400mL 50%KOH水溶液,涡旋15s,于50 $^{\circ}$ C水浴60min,每15min涡旋一次。用3.3mL

正己烷提取3次,合并提取液,取50 μ L滤液上样。色谱条件:高效液相色谱仪。色谱柱SymmetryC18(250mmx 4.6mm,5 μ m)。流动相:乙腈:二氯甲烷:甲醇为70:20:10(v:vv)。流速1mL/min。检测波长475nm。柱温30 $^{\circ}$ C。根据叶黄素标准评判标准曲线以及HPLC结果计算叶黄素含量,结果如图4所示。结果表明在万寿菊(品系Discovery)中过表达TeLUT2基因时,可以提高叶黄素的含量。

[0069] 以上所述实施例仅表达了本发明的几种实施方式,其描述较为具体和详细,但不能因此而理解为对发明专利范围的限制。应当指出的是,对于本领域的普通技术人员来说,在不脱离本发明构思的前提下,还可以做出若干变形和改进,这些都属于本发明的保护范围。因此,发明专利的保护范围应以所附权利要求为准。



图1

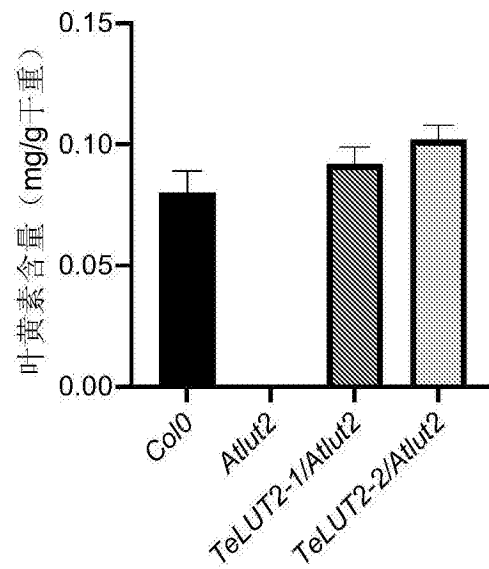


图2

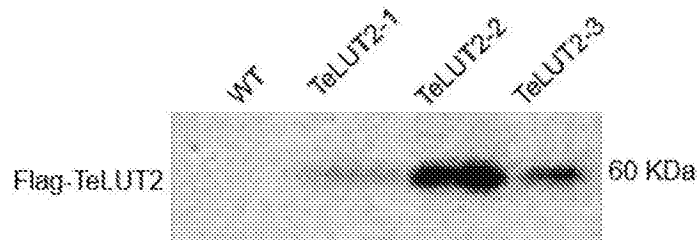


图3

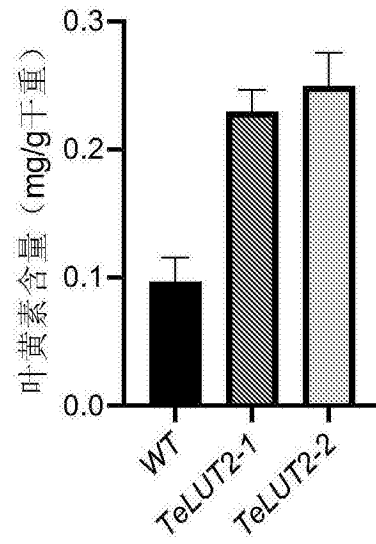


图4