



# (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 101979601 A

(43) 申请公布日 2011.02.23

(21) 申请号 201010288489.9

(22) 申请日 2010.09.21

(71) 申请人 山东省农业科学院高新技术研究中心

地址 250100 山东省济南市历城区桑园路  
11号

(72) 发明人 王兴军 姜娜娜 洛佩斯·哈维尔  
赵传志

(74) 专利代理机构 济南金迪知识产权代理有限公司 37219

代理人 许德山

(51) Int. Cl.

*C12N 15/82* (2006.01)

*C12Q 1/68* (2006.01)

*G01N 33/53* (2006.01)

*G01N 30/02* (2006.01)

*A01H 5/08* (2006.01)

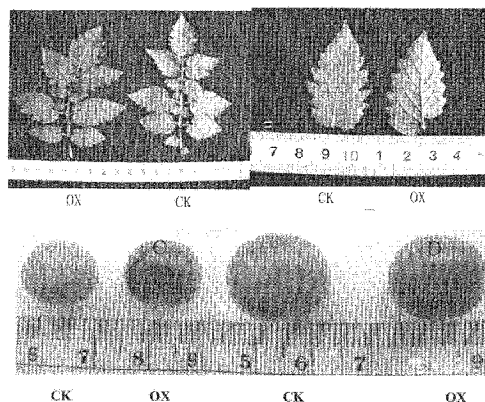
权利要求书 1 页 说明书 8 页 序列表 3 页  
附图 4 页

## (54) 发明名称

一种提高番茄类胡萝卜素含量的方法

## (57) 摘要

本发明公开了一种提高番茄类胡萝卜素含量的方法,是利用基因工程手段构建隐花色素基因1、隐花色素基因1的羧基端和隐花色素基因2的羧基端的过量表达载体,转化番茄,获得转基因番茄。本发明方法实现了转基因番茄果实中番茄红素及总的类胡萝卜素的含量较大幅度的提高,最大可分别提高3.6倍和3.4倍,使得从番茄中提取天然的番茄红素等将更加高效,大大提高了番茄产品的附加值。



1. 一种提高番茄类胡萝卜素含量的方法,步骤包括(1)构建隐花色素基因1(cry1)、隐花色素基因1羧基端(GUS::CCT1)和隐花色素基因2羧基端(GUS::CCT2)的过量表达载体;(2)植物的转化;(3)转基因番茄果实的获得;(4)转基因番茄的PCR检测和Western Blot验证;(5)转基因番茄果实中类胡萝卜素含量的测定;其特征是:

所述构建隐花色素基因1(GFP::CRY1)、隐花色素基因1羧基端(GUS::CCT1)和隐花色素基因2羧基端(GUS::CCT2)的过量表达载体的方法是:通过花椰菜花叶病毒(CaMV)35S启动子构建cry1基因和绿色荧光蛋白标签(GFP tag)的过量表达载体GFP::CRY1;通过花椰菜花叶病毒(CaMV)35S启动子和 $\beta$ -葡糖醛酸糖苷酶(GUS)构建cry1基因羧基端和cry2基因羧基端的GUS::CCT1和GUS::CCT2过量表达载体;其中,所述cry1基因的核苷酸序列如SEQ ID No. 1所示;所述cry1基因羧基端(CCT1)的核苷酸序列如SEQ ID No. 2所示;所述cry2基因羧基端(CCT2)的核苷酸序列如SEQ ID No. 3所示;

所述植物的转化是:将带有目的基因的植物表达载体(GFP::CRY1)、(GUS::CCT1)和(GUS::CCT2)通过农杆菌侵染的方法转化番茄植株;

所述转基因番茄果实的获得是:收获第二代的转基因番茄纯合体的果实;

所述转基因番茄的Western Blot验证方法是:用CRY1和CRY2的抗体作为一抗,用碱性磷酸酶作为二抗的免疫印迹杂交检测;

所述转基因番茄果实中类胡萝卜素含量的测定方法是:将获得的转基因番茄种子研磨,经过丙酮石油醚提取液反复提取,无水硫酸钠脱水,乙酸乙酯溶解步骤后,用高效液相色谱(HPLC)测定其中类胡萝卜素的含量。

2. 根据权利要求1所述提高番茄类胡萝卜素含量的方法,其特征是:所述提高番茄类胡萝卜素含量的方法是在番茄中过量隐花色素基因1(cry1)、隐花色素基因1的羧基端和隐花色素基因2的羧基端调高番茄类胡萝卜素的含量。

3. 根据权利要求1或2所述提高番茄类胡萝卜素含量的方法,其特征是:所述番茄植株品种选用野生番茄或美国品种Money maker。

## 一种提高番茄类胡萝卜素含量的方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种番茄类胡萝卜素含量的方法,尤其涉及一种通过表达隐花色苷基因提高番茄类胡萝卜素含量的方法,属于生物技术领域。

### 背景技术

[0002] 类胡萝卜素是一类重要的天然色素的总称,其主要成分是含 40 个碳 (C) 的类异戊烯聚合物,即四萜化合物。类胡萝卜素普遍存在于动物、高等植物、真菌、藻类和细菌中的黄色、橙红色或红色的色素之中。

[0003] 类胡萝卜素可以抑制人体与衰老有关的疾病,减少某些癌症的发病率<sup>[1]</sup>。多食用富含类胡萝卜素的食物如水果、蔬菜等可减少与老化有关的疾病如冠心病 (Coronary heartdisease)、老年性黄斑退化症 (age-related macular degeneration,AMD)、白内障等疾病的发病率。研究表明,如果人体摄取的类胡萝卜素不足而导致体内类胡萝卜素的整体水平下降,会更容易患退化性疾病<sup>[2]</sup>。而番茄红素是目前被认为在降低这类疾病的发病率上最有功效的<sup>[3,4]</sup>。另外,类胡萝卜素摄入量或在血液中的含量与白内障的发病率呈负相关,当摄取大量叶黄素和玉米黄质时患白内障的风险会降低,但其他类胡萝卜素则无此功效<sup>[5]</sup>。类胡萝卜素就被认为具有抗癌作用,Block 等人研究了 172 例有关富含类胡萝卜素的水果和蔬菜的食用和吸收与人们患癌症的机率的关系,表明吸收功能差的人患某些癌症 (肺癌、喉癌、口腔癌、食管癌、胃癌、肠癌、直肠癌、膀胱癌、宫颈癌和卵巢癌) 的机率是吸收功能好的人的 2 倍左右<sup>[6]</sup>。研究表明,类胡萝卜素能够在细胞水平上抑制肿瘤细胞的增殖,如它可以抑制白血病细胞、神经胶质瘤细胞的发生和生长<sup>[7]</sup>。不同的类胡萝卜素抑制肿瘤细胞增殖的活性不同,其中番茄红素的抑制癌细胞增殖效果最好。在患有子宫内膜癌、乳腺癌和肺癌的人体内注射番茄红素、 $\alpha$ -胡萝卜素、 $\beta$ -胡萝卜素,癌细胞都得到了有效抑制,但是要达到相同的抑制效果, $\alpha$ -胡萝卜素需要四倍于番茄红素的注射量, $\beta$ -胡萝卜素需要 10 倍于番茄红素的注射量<sup>[8]</sup>。多项流行病学研究显示,多摄取番茄及富含番茄红素的其他食物与多种癌症如消化道癌、膀胱癌、皮肤癌、乳腺癌、子宫颈癌的发病率呈负相关性。现在已有多个实验室的研究证明在组织细胞培养实验中番茄红素可抑制癌细胞生长<sup>[9]</sup>。 $\beta$ -胡萝卜素等类胡萝卜素在人体内具有维生素 A 前体 (Provitamin A) 的活性,人体内缺乏维生素 A,会使角膜脱落、增厚和角质化,轻者会导致夜盲症,重者引起角膜溃疡、晶体脱落以致失明。另外,维生素 A 的缺乏还会损害上皮组织细胞的生长与分化,使皮肤变厚、干燥、或发生皱纹,因此维生素 A 可以治疗皮肤角化症<sup>[10]</sup>。番茄红素等类胡萝卜素能防止动脉粥样硬化的发生,降低冠心病的发病率。它还能阻止 IDI-胆固醇氧化物之形成,以防止心血管疾病之发生<sup>[11]</sup>。类胡萝卜素作为抗氧化剂还能防止类脂的过氧化作用,从而保护卵泡和子宫的类固醇生成细胞不被氧化<sup>[12]</sup>。

[0004] 类胡萝卜素在自然界中广泛存在,高等植物、藻类和少数微生物的体内都含有类胡萝卜素。在人体中存在的主要有  $\alpha$ -胡萝卜素、 $\beta$ -胡萝卜素、叶黄素、玉米黄质、番茄红素以及  $\beta$ -隐黄素等。类胡萝卜素是人体必不可少的一类物质,但人体不能自行合成类胡

萝卜素,只能从外界摄取这些物质<sup>[13]</sup>。目前人们获取类胡萝卜素的途径主要有3种:化学合成方法、微生物发酵法和直接从植物中提取。化学合成法已经比较成熟,但是化学合成的类胡萝卜素不具有天然类胡萝卜素那样的生理和药理功能,而且,随着毒理学和分析检测技术的发展,合成色素的安全性也受到质疑。微生物发酵途径只能生产 $\beta$ -胡萝卜素、虾青素等少数几种类胡萝卜素,远远不能满足当前的需求。相比之下,直接从植物中提取类胡萝卜素活性高、安全可靠,而且利于规模化生产。然而植物中类胡萝卜素的含量有限,所以培育高类胡萝卜素含量的蔬菜和水果有重要的应用价值。

[0005] 番茄富含类胡萝卜素,是人们摄取类胡萝卜素的重要来源,在番茄成熟过程中其类胡萝卜素含量增加10至14倍,其中以番茄红素的积累为主。在成熟的番茄果实中,番茄红素含量占总类胡萝卜素的70%左右[14]。从番茄中提取番茄红素是目前世界上生产天然番茄红素的最主要的途径。据有关资料报导,目前全球每年大约消耗西红柿7000万吨用于番茄红素的提取。近年来,番茄红素的生产有了长足的发展,但仍不能满足市场需求。特别是当今在人们更加注重天然植物的活性成分对疾病的预防作用,更注重饮食对健康的重要性的形势下,使得番茄红素等类胡萝卜素越来越受到人们的普遍关注。因此提高番茄中番茄红素或其它类胡萝卜素的含量将有重要的应用价值。

[0006] 隐花色素(cryptochrome, CRY)是生物体内的一类吸收蓝光和近紫外光的光受体,它与修复被紫外光(UV)照射后受损的DNA的光裂解酶具有很高的同源性,是一种黄素蛋白。植物的隐花色素家族调控植物的光形态建成,包括抑制下胚轴伸长、刺激子叶扩展、调节开花时间、引导昼夜节律时钟等。已有研究表明,在拟南芥中过量表达拟南芥的CRY1\CRY2基因后,引起植株下胚轴缩短,叶绿素、花青素及类黄酮的合成增加等一系列的反应。同时,在拟南芥中过量表达拟南芥CRY1\CRY2基因的C末端和GUS的融合基因(GUS::CCT1\GUS::CCT2)后,植株呈现组成性光形态建成,无论在黑暗或是光照条件下,下胚轴的伸长受到抑制,叶绿素、花青素、类黄酮的合成增加等。在番茄中过量表达番茄的CRY2基因,植株矮化,分枝增多,叶片中叶绿素、花青素的合成增加,特别是番茄果实中类胡萝卜素、类黄酮的含量提高。

[0007] 现代分子生物学研究手段的发展,使得类胡萝卜素生物合成途径中的一系列关键酶的基因被陆续分离鉴定,这为进一步利用基因工程途径提高作物中类胡萝卜素含量创造了条件。然而在可检索的现有技术中,通过表达隐花色素基因提高番茄类胡萝卜素含量的方法还未见报道。

[0008] 参考文献:

[0009] [1]Rice-Evans CA, Sampson J, Bramley PM and Holloway DE. Why do we expect carotenoids to be antioxidants in vivo? Free Rad. Res, 1997, 26 :381-398.

[0010] [2]Mayne ST.  $\beta$ -carotenoids and disease prevention in humans. FASEB J, 1996, 10 :690-701.

[0011] [3]Giovannucci E. Tomatoes, tomato-based products, lycopene and cancer: review of the epidemiologic literature. Natl, Cancer Inst, 1999, 91 :317-331.

[0012] [4]Bramley PM. Is lycopene beneficial to human health? Phytochemistry, 2000, 54 :233-236.

[0013] [5]Brown L, Rimm EB, Seddon JM, Giovannucci EL, Chasan Taber L, Spiegelman

D, Willett WC and Hankison SE. A prospective study of carotenoid intake and risk of cataract extraction in US men. *Am. Clin. Nutr.*, 1999, 70 :517-524.

[0014] [6] 王永华, 梁世中. 类胡萝卜素的结构和生理功能研究. *广州食品工业科技*, 2000, 16(04) :1-4.

[0015] [7] Wolf G. Retinoids and carotenoids as inhibitors of carcinogenesis and inducers of cell-cell communication. *Nutrition Review*, 1992, 50 :270-274.

[0016] [8] Levy J, Bosin E, Feldman B, Giat Y, Miinster A, Danilenko M, Sharoni Y. Locopenis a more potent inhibitor of human cancer proliferation than either alpha-carotene or beta-carotene. *Nutr. Cancer*, 24, 257-266.

[0017] [9] Organ JF, Sowell A, Swanson CA, Potischman N, Miller R, Schussler N, Stephenson Jr. HE. Relationship of serum carotenoids, retinal,  $\alpha$ -tocopherol and selenium with breast cancer risk: results from a prospective study in Columbia, Missouri. *Cancer Causes Control*, 1998, 9 :89-97.

[0018] [10] 韩雅珊. 类胡萝卜素的功能研究进展. *中国农业大学学报*, 1999, 4(01) :5-9.

[0019] [11] 李璐. 番茄红素的预防保健作用及其分子生物学机制. *长春中医学院学报*, 2003, 19(03) :121-122.

[0020] [12] 李福枝, 刘飞, 曾晓希, 李小龙, 张凤琴. 天然类胡萝卜素的研究进展. *食品工业科技*, 2007, 28(09) :227-231.

[0021] [13] Eugenia M. A. Enfissi, Paul D. Fraser and Peter M. Bramley. Genetic engineering of carotenoid formation in tomato. *Phytochemistry Reviews*, 2006, 2 :59-65.

[0022] [14] 李京, 惠伯棣, 裴凌鹏. 番茄果实在成熟过程中类胡萝卜素含量的变化. *中国食品学报*, 2006, 6(02) :122-125.

## 发明内容

[0023] 针对现有技术的不足, 本发明要解决的问题是提供一种在番茄果实中提高番茄类胡萝卜素含量的方法, 实现转基因番茄果实中番茄红素及总的类胡萝卜素的含量较大幅度的提高。

[0024] 本发明所述的在番茄果实中提高番茄类胡萝卜素含量的方法, 步骤包括 (1) 构建隐花色素基因 1 (cry1)、隐花色素基因 1 羧基端 (GUS::CCT1) 和隐花色素基因 2 羧基端 (GUS::CCT2) 的过量表达载体; (2) 植物的转化; (3) 转基因番茄果实的获得; (4) 转基因番茄的 PCR 检测和 Western Blot 验证; (5) 转基因番茄果实中类胡萝卜素含量的测定。其中:

[0025] 所述构建隐花色素基因 1 (GFP::CRY1)、隐花色素基因 1 羧基端 (GUS::CCT1) 和隐花色素基因 2 羧基端 (GUS::CCT2) 的过量表达载体的方法是: 通过花椰菜花叶病毒 (CaMV) 35S 启动子构建 cry1 基因和绿色荧光蛋白标签 (GFP tag) 的过量表达载体 GFP::CRY1; 通过花椰菜花叶病毒 (CaMV) 35S 启动子和  $\beta$ -葡糖醛酸糖苷酶 (GUS) 构建 cry1 基因羧基端和 cry2 基因羧基端的 GUS::CCT1 和 GUS::CCT2 过量表达载体; 其中, 所述 cry1 基因的核苷酸序列如 SEQ ID No. 1 所示; 所述 cry1 基因羧基端 (CCT1) 的核苷酸序列如

SEQID No. 2 所示 ;所述 cry2 基因羧基端 (CCT2) 的核苷酸序列如 SEQID No. 3 所示。

[0026] 所述植物的转化方法是 :将带有目的基因的植物表达载体 (GFP::CRY1)、(GUS::CCT1) 和 (GUS::CCT2) 通过农杆菌侵染的方法转化番茄植株。

[0027] 所述转基因番茄果实的获得是 :收获第二代的转基因番茄纯合体的果实。

[0028] 所述转基因番茄的 Western Blot 验证方法是 :用 CRY1 和 CRY2 的抗体作为一抗,用碱性磷酸酶作为二抗的免疫印迹杂交检测。

[0029] 所述转基因番茄果实中类胡萝卜素含量的测定方法是 :将获得的转基因番茄种子研磨,经过丙酮石油醚提取液反复提取,无水硫酸钠脱水,乙酸乙酯溶解步骤后,用高效液相色谱 (HPLC) 测定其中类胡萝卜素的含量。

[0030] 上述提高番茄类胡萝卜素含量的方法是在番茄中过量隐花色素基因 1 (cry1)、隐花色素基因 1 的羧基端和隐花色素基因 2 的羧基端调高番茄类胡萝卜素的含量。

[0031] 上述番茄植株品种优先选用野生番茄或美国品种 Money maker。

[0032] 类胡萝卜素是人体必不可少的一类物质,具有抗氧化、免疫调节、延缓衰老和抗癌等功效。但人体不能自行合成类胡萝卜素,只能从外界摄取这些物质。目前直接通过化学合成法人工合成的类胡萝卜素不具有天然类胡萝卜素那样的生理和药理功能,而且合成色素的安全性也受到质疑 ;利用微生物发酵的途径也只能生产  $\beta$ -胡萝卜素、虾青素等少数几种类胡萝卜素,远远不能满足当前的需求。直接从植物中提取类胡萝卜素活性高、安全可靠,然而植物中类胡萝卜素含量有限,所以培育高类胡萝卜素含量的蔬菜和水果有重要的应用价值。

[0033] 本发明以番茄为受体植物,采用构建隐花色素基因 1 (cry1)、隐花色素基因 1 羧基端 (GUS::CCT1) 和隐花色素基因 2 羧基端 (GUS::CCT2) 的过量表达载体,番茄的遗传转化,转基因植株的 Western 检测,转基因番茄果实中类胡萝卜素含量的测定等方法,成功实现了一种在番茄果实中提高番茄类胡萝卜素含量的方法,实现转基因番茄果实中番茄红素及总的类胡萝卜素的含量得到了较大幅度的提高,最大可分别提高 3.6 倍和 3.4 倍。

[0034] 本发明的突出优点是 :

[0035] (1) 番茄是深受全世界人民喜爱的一种营养丰富的蔬菜和水果,番茄中富含番茄红素、胡萝卜素、维生素、矿物质等营养成分,提高类胡萝卜素的含量可以增加番茄产品的附加值。

[0036] (2) 类胡萝卜素在番茄果实中高水平积累,在其成熟过程中类胡萝卜素含量可以增加 10 至 14 倍,其中以番茄红素的积累为主。本发明可以将番茄果实中番茄红素和类胡萝卜素的含量分别提高 3.6 倍和 3.4 倍,使得从番茄中提取天热的番茄红素将更高效。

[0037] (3) 番茄栽培面积广、产量高、生产容易,而且从番茄果实中提取类胡萝卜素的方法简单、易操作、成本低。

## 附图说明

[0038] 图 1 隐花色素基因 1 (cry1)、隐花色素基因 1 羧基端 (GUS::CCT1) 和隐花色素基因 2 羧基端 (GUS::CCT2) 的过量表达载体构建图。

[0039] 图 2 番茄再生体系的建立。

[0040] 图 3 农杆菌介导的番茄遗传转化体系 ;其中 :A :抗生素筛选培养基上的再生小苗 ;

B:再生小苗生根;C:转化苗的移栽;D:获得的转基因番茄植株。

[0041] 图4转基因番茄的PCR鉴定;其中:M,分子量标准;1-13,转基因植株;14,野生型;15,正对照。

[0042] 图5Western blot鉴定;其中:A:CRY1在转基因植株中的表达;B:CRY2在转基因植株中的表达。

[0043] 图6转基因番茄的表型分析;其中:A:叶片腹面的颜色比较;B:叶片背面的颜色比较;C:未成熟果实的颜色比较;D:成熟果实的颜色比较。

## 具体实施方式

[0044] 以下结合实例对本发明做进一步说明,但不限于此。

[0045] 实施例1构建隐花色素基因1(cry1)、隐花色素基因1羧基端(GUS::CCT1)和隐花色素基因2羧基端(GUS::CCT2)的过量表达载体。

[0046] 根据NCBI(美国国立生物技术信息中心)中拟南芥隐花色素基因cry1(基因登录号:AY124863.1)和cry2(基因登录号:NM\_100320.3)设计引物。提取拟南芥总RNA,RT-PCR的方法从拟南芥中扩增得到cry1、CCT1、CCT2的序列(见序列表)。如图1所示,改造植物表达载体pBI121,用绿色荧光蛋白标签(GFP tag)基因替换其 $\beta$ -葡糖醛酸糖苷酶(GUS),将CRY1基因正向连接到花椰菜花叶病毒(CaMV)35S启动子的后面,构建入植物表达载体pBI121中,得到植物表达载体GFP::CRY1;将CRY1基因的羧基端和CRY2基因的羧基端分别正向连接到pBI121载体花椰菜花叶病毒(CaMV)35S启动子的后面,构建GUS::CCT1和GUS::CCT2过量表达载体(图1)。

[0047] 实施例2植物的转化

[0048] 一、番茄组培再生体系的建立

[0049] 将番茄种子用次氯酸钠消毒10分钟,用无菌水冲洗5遍,种植在1/2MS培养基上,在25℃培养室中萌发6天,当幼苗的子叶完全伸开,真叶刚刚出现时,剪取幼苗的子叶或下胚轴,放在再生培养基上培养。1个月后,当外植体上长出明显的小芽时,将外植体连同小芽移到伸长培养基上。当再生芽长到1cm左右时,将小芽剪下,置于生根培养基上,诱导生根。当根的长度在1cm左右时,将再生苗移到土壤中。

[0050] 通过培养基、培养条件的优化以及外植体的龄龄的选择,番茄的再生频率可以达到90%以上,该再生系统适于多个番茄品种的再生,如野生番茄,美国品种Money maker,我国栽培品种中蔬4号等(图2)。再生芽的生根率可达100%。

[0051] 二、根癌农杆菌介导的番茄外植体的遗传转化

[0052] 利用农杆菌介导的转化体系,将不同载体转入番茄,经卡那霉素筛选获得抗性小苗(图3),具体实验步骤如下:

[0053] (1)快速将-70℃储备的菌液转入YEB筛选培养基上,28℃培养24-48小时;

[0054] (2)挑选生长良好的单克隆转入20ml YEB筛选培养基上,28℃摇床转速250rpm培养过夜;检测菌液OD值,最适 $OD_{600} = 0.6-0.7$ ;

[0055] 如果 $OD_{600} > 1.0$ ,稀释 $OD_{600}$ 低于0.5再培养一个小时,定期检测OD值;

[0056] (3)将菌液在常温转速6000rpm离心10min;菌液沉淀用10ml MSO液体培养基冲洗两次;没有必要重悬沉淀,每次清洗后6000rpm离心5min;

- [0057] (4) 清洗后的菌液沉淀用 10ml MS0 液体培养基重悬, 稀释到  $OD_{600} = 0.3-0.4$  ;
- [0058] (5) 在 10ml MS0 培养基菌液离心管中加入 18.5 $\mu$ l 0.2M 的乙酰丁香酮; 1 小时左右农杆菌就会聚集, 因此菌液应该立即使用;
- [0059] (6) 用灭过菌的 5ml 移液枪将 10ml 菌液吸到在预培养培养基上预培养 1-2 天的子叶外植体上;
- [0060] (7) 子叶外植体在菌液中处理 10min, 其间时常摇晃菌液;
- [0061] (8) 将多余的菌液用移液枪移出; 将子叶外植体用刀刃转移入一新的含有滤纸和共培养培养基的 90mm 培养皿中 (滤纸事先放入培养皿上)。每盘放置大约 20 个子叶; 培养皿用封口膜封好;
- [0062] (9) 培养皿于 28 $^{\circ}$ C 培养箱中放置 2 天 (16h 光照 /8h 黑暗);
- [0063] (10) 将子叶外植体转入后培养培养基 (不带滤纸), 培养基中添加不同浓度的头孢霉素: 150mg/L、200mg/L、250mg/L、300mg/L、400mg/L。观察不同浓度的头孢霉素对农杆菌的抑制效果; 每盘 10-20 个子叶以预留出生长空间;
- [0064] (11) 培养皿用封口膜封好, 于 24 $^{\circ}$ C 培养箱中放置 10 天 (16h 光照 /8h 黑暗);
- [0065] (12) 第 10 天, 将子叶转入新鲜的分化培养基, 之后, 每隔 2-3 周继代一次。

### [0066] 三、生根

- [0067] (1) 当幼苗长至 2cm 且至少包含一个节点时从外植体上切除下来 (不包含愈伤); 将幼苗转入含 40ml 生根培养基 (加 0.5mg/L IBA, 25mg/L 卡那霉素和 200mg/L 头孢霉素) 的 100ml 三角瓶内培养;
- [0068] (2) 根会在 2 周左右开始出现。当幼苗长到足够大时就转入含蛭石与土的栽培钵内进行培养, 并浇营养液;
- [0069] (3) 转入栽培钵中的小苗可在普通的培养室内生长。为防止小苗萎蔫, 将小苗放入方形的塑料盆中并用地膜覆盖。2-3 天后当小苗坚挺后可以逐步掀开地膜, 1 周后将地膜撤掉。之后, 植株被移入大盆的土中并置于温室培养, 称之为 T0 代。

### [0070] 实施例 3 转基因番茄果实的获得

[0071] 收获番茄种子, 种植并获得第二代种子, 提取 DNA 进行 PCR 检测和 Western 杂交, 验证转基因植株, 收获得 T2 代纯合体的果实。

### [0072] 实施例 4 转基因番茄的 PCR 检测和 Western Blot 验证

#### [0073] 一、转基因番茄的 PCR 检测

[0074] 番茄基因组 DNA 的提取: 将番茄叶片放入 1.5ml 离心管中, 加入 100 $\mu$ l DNA 提取液, 研磨; 加入 300 $\mu$ l DNA 提取液, 冲洗研磨棒; 涡旋 20Sec; 13000rpm 室温离心 5min, 将上清转到新的离心管中; 加入等体积的预冷的异丙醇, 颠倒 5-6 次, 混匀; 室温静止 5min; 室温 13000rpm 离心 10min; 倒掉上清, 加入 500 $\mu$ l 70% 的乙醇, 涡旋; 室温离心 5min, 倒掉上清, 室温凉干, 加 100 $\mu$ l TE (含 0.5 $\mu$ l RNase) 溶解 DNA。

[0075] 以 (GUSF: 5' GGGCAGGCCAGCGTATCGTG 3', GUSR: 5' GTCCCGCTAGTGCCTGTCCAGTT 3') 为引物, 番茄基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 GUS 基因。反应程序如下: 模板 DNA 1 $\mu$ L, 2x pfumix 10.0 $\mu$ L, GUSF (10 $\mu$ m) 0.5 $\mu$ L, GUSR (10 $\mu$ m) 0.5 $\mu$ L, ddH<sub>2</sub>O 8.0 $\mu$ L。在 PCR 仪 (TaKaRa TP650) 上设置 94 $^{\circ}$ C 5min, 随后 94 $^{\circ}$ C 50s, 58 $^{\circ}$ C 45s, 72 $^{\circ}$ C 2min, 共 30 个循环后 72 $^{\circ}$ C 7min 结束反应。

[0076] 以 (NPT II-F :5' GTGGAGAGGCTATTCGGCTATGACTG 3', NPT II-R :5' GGCTCTTCAGCAATATCACGGGTAGC 3') 为引物, 番茄基因组 DNA 为模板, PCR 扩增 GUS 基因。反应程序如下: 模板 DNA 1  $\mu$  L, 2x pfu mix 10.0  $\mu$  L, NPT II-F (10um) 0.5  $\mu$  L, NPT II-R (10um) 0.5  $\mu$  L, ddH<sub>2</sub>O 8.0  $\mu$  L。在 PCR 仪 (TaKaRa TP650) 上设置 94  $^{\circ}$ C 5min, 随后 94  $^{\circ}$ C 50s, 54  $^{\circ}$ C 45s, 72  $^{\circ}$ C 2min, 共 30 个循环后 72  $^{\circ}$ C 7min 结束反应。

[0077] 取上述 PCR 反应的产物 5  $\mu$  L 经 1% 琼脂糖凝胶电泳, 紫外灯下观察结果。结果见图 4。

[0078] 二、转基因番茄的 Western Blot 鉴定

[0079] 番茄总蛋白的提取: 取野生和转基因番茄叶片, 称重, 在研钵中用液氮研磨; 根据重量 (1 克样品加入 3.5ml 提取液), 加入预冷的提取液 (Tris-HCl, Glycerol, Polyvinylpolypryrodone), 混匀在冰上静止 3-4 小时; 12000rpm, 4  $^{\circ}$ C 离心 20 分钟; 取上清; 用 BCA 法蛋白质定量试剂盒定量。

[0080] 制备 12% 的 SDS-PAGE 胶, 加入提取的总蛋白, 电泳; 电泳结束后拆下电泳板, 将胶切角, 切去点样孔, 用转膜液平衡 3 次, 每次 5 分钟, 同时将 PVDF 膜剪成胶的大小, 在甲醇中润洗; 电转膜 (北京六一转膜仪, 2h, 100V); 转膜后用 PBS 洗膜 3 次, 每次 15 分钟; 用 5% 的脱脂奶粉 4  $^{\circ}$ C 浸泡包被 2 小时; 取出膜, 用 PBS 洗膜 2 次, 每次 10 分钟; 加入一抗, 室温培养 2h; 弃一抗, 用 PBS 洗膜 4 次, 每次 5 分钟; 加入碱性磷酸酶的二抗, 室温摇 2h; 弃二抗, 加入显色液显色。结果见图 5。

[0081] 实施例 5 转基因番茄的表型分析和类胡萝卜素含量的测定

[0082] 一、转基因番茄果实的表型分析

[0083] 观察转基因番茄植株与对照植株它们的生长情况, 结果发现, 转基因番茄植株的叶片较对照植株的叶片均呈现更深的绿色, 叶脉的颜色也更深。与叶片类似, 转基因番茄植株的果实与对照植株相比, 无论是在未成熟的绿色果实阶段还是在成熟的红色果实阶段, 着色更深 (图 6)。

[0084] 二、转基因番茄类胡萝卜素含量的测定

[0085] 称取 3g 样品, 液氮中研成粉末, 迅速转移到离心管中, 加入 30ml 丙酮: 石油醚 (1 : 2) 提取液, 常温条件下提取 1h; 12000rpm 离心 3min, 留取液相, 重复三次, 合并提取液, 35  $^{\circ}$ C 减压蒸干, 加入石油醚溶解, 加等体积 10% KOH- 甲醇溶液, 皂化 3h, 加等体积的 10% NaCl 使之分层, 取石油醚相, 水相用石油醚反复提取至醚相无色, 合并石油醚相, 蒸馏水洗至中性; 无水 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 脱水 10min, 35  $^{\circ}$ C 减压蒸干, 乙酸乙酯溶解, 高效液相色谱 (HPLC) 法测定其中类胡萝卜素的含量。测定结果见表 1 和表 2。

[0086] 表 1 转基因的野生番茄植株成熟果实中类胡萝卜素的含量 (ug/g)

[0087]

类胡萝卜素	基因型						
	wild type	<i>CRY1</i>			<i>GUS::CCT1</i>		
	株系 W1	株系 A1	株系 A4	株系 A5	株系 D1	株系 D2	株系 D5
ζ-胡萝卜素	2.23±0.85	9.75±1.10	3.05±0.09	12±0.95	24±4.66	17±2.31	3.94±0.95
链孢红素	16±1.12	32±2.30	25±2.23	30±1.81	42±8.01	42±6.78	21±1.86
番茄红素	150±13	562±23	293±19	458±31	439±17	550±29	320±11
β-胡萝卜素	13±0.90	8.15±1.14	14±1.43	8.75±0.86	12±1.34	14±3.10	10±1.95
叶黄质	1.88±0.11	0.76±0.05	1.47±0.10	1.91±0.35	1.64±0.13	0.06±0.01	1.28±0.68
紫黄质	0.73±0.09	0.22±0.01	0.37±0.09	0.38±0.06	0.80±0.01	0.94±0.09	0.43±0.17
玉米黄质	1.00±0.03	0.25±0.03	0.65±0.03	0.57±0.01	0.70±0.02	0.36±0.05	0.49±0.22
类胡萝卜素总量	187±11	614±32	342±17	512±31	531±27	627±53	359±46

[0088] 表 2 转基因的 MoneyMaker 植株成熟果实中类胡萝卜素的含量 (ug/g)

[0089]

类胡萝卜素	基因型						
	wild type	<i>GUS::CCT1</i>			<i>GUS::CCT2</i>		
	株系 M1	株系 B3	株系 B4	株系 B7	株系 C1	株系 C3	株系 C5
ζ-胡萝卜素	0.85±0.11	5.71±1.61	7.63±2.18	6.38±1.08	5.45±1.31	8.34±0.99	6.67±0.77
链孢红素	19±0.97	24±3.53	23±2.56	25±5.51	22±3.30	31±2.89	24±4.13
番茄红素	239±24	341±55	303±22	296±18	239±7.90	423±8.01	301±10
β-胡萝卜素	1.93±0.09	3.59±0.97	6.26±0.99	4.50±1.03	3.25±1.01	6.22±0.86	4.88±0.69
叶黄质	0.38±0.10	0.63±0.19	0.56±0.08	0.48±0.19	0.65±0.13	0.78±0.17	0.50±0.21
紫黄质	0.10±0.03	0.15±0.01	0.31±0.05	0.25±0.04	0.09±0.01	0.21±0.05	0.30±0.03
玉米黄质	0.04±0.01	0.10±0.03	0.05±0.02	0.06±0.01	0.02±0.01	0.16±0.07	0.20±0.05
类胡萝卜素总量	261±18	374±35	341±43	333±29	271±6.93	470±15	338±17

[0090] 由以上两表可以看出:过量表达 *CRY1* 的番茄植株, ζ-胡萝卜素, 链孢红素和番茄红素的含量与对照植株相比有较大提高, 而紫黄质、玉米黄质的含量减少, β-胡萝卜素、叶黄质的含量变化不明显, 总的类胡萝卜素含量提高了 1.8-3.3 倍。过量表达 *GUS::CCT1* 的野生番茄植株, ζ-胡萝卜素, 链孢红素和番茄红素的含量提高, β-胡萝卜素、紫黄质的含量变化不明显, 叶黄质、玉米黄质的含量减少。总的类胡萝卜素含量提高了 1.9-3.4 倍。过量表达 *GUS::CCT1* 的 MoneyMaker 植株, ζ-胡萝卜素的含量提高了 6.7-9 倍, β-胡萝卜素的含量提高了 1.9-3.2 倍, 链孢红素、番茄红素、叶黄质的含量稍有提高, 与对照相比差异不显著。紫黄质、玉米黄质的含量提高。过量表达 *GUS::CCT2* 的 MoneyMaker 植株, ζ-胡萝卜素的含量提高了 6.4-9.8 倍, β-胡萝卜素的含量提高了 1.7-3.2 倍, 链孢红素、番茄红素、叶黄质和总的类胡萝卜素含量 C1、C5 株系与对照相比变化不明显或无变化, C3 株系提高程度较大, 番茄红素的含量较对照相比提高了 1.8 倍, 总的类胡萝卜素含量也提高了 1.8 倍。

[0001]

## 序列表

&lt;110&gt; 山东省农业科学院高新技术研究中心

&lt;120&gt; 一种提高番茄类胡萝卜素含量的方法

&lt;141&gt; 2010-8-30

&lt;160&gt; 3

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 2046

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 番茄

&lt;221&gt; cry1 基因

&lt;222&gt; (1)···(2046)

&lt;400&gt; 1

atgtctggtt ctgtatctgg ttgtggttct ggtggttgta gtattgtatg gtttagaaga	60
gatcttaggg ttgaagataa tccagcttta gcagcagcag taagagctgg tccagtgatt	120
gctctgtttg tttgggcacc agaagaagaa ggacactatc atccaggtag ggtttctagg	180
tggtggctca agaacagttt ggctcagctt gattcttctc ttagaagtct tggtacttgt	240
cttatacca agagatctac tgatagtgtt gcttctcttc ttgatgttgt taaatccact	300
ggtgcttctc agatcttctt caaccatttg tatgatccat tgcctttggt gcgtgatcac	360
cgagctaaag atgttttgac ggcgcaaggc atagcggttc gatcattcaa cgcagacttg	420
ctttatgagc catgggaagt gactgatgaa ttaggccgtc ctttctctat gtttgctgcg	480
ttttgggaga gatgtcttag tatgccttat gaccctgagt ctctcttct tccacctaag	540
aagatcattt caggggatgt gtctaaatgt gttgcggatc catgggtgtt tgaggatgac	600
tctgagaaag gaagcaatgc acttctggct cgtgcttggc ctctggatg gagtaatggt	660
gataaagctc tcacaacgtt tataaacggt ccattgcttg aatactctaa gaaccgcaga	720
aaagccgata gtgctacaac ctcgtttctt tctccacact tgcattttgg ggaagtgagt	780
gtgagaaaag tttttcatct tgttcggatc aaacaggctc cgtgggcaa cgaaggaaac	840
gaggccgggg aagaaagcgt gaatcttttc ctgaaatcta ttggtctcag ggagtattct	900
aggtacataa gttttaacca tccatattcc catgaaagac cacttcttgg ccatctaaag	960
ttcttccctt gggctgtgga tgagaactat ttcaaggcat ggaggcaagg cggactgga	1020
tatccgttgg tcgatgccgg gatgagagag ttatgggcta ctggttgggt gcatgatcgc	1080
ataagagtag ttgtttcaag cttctttgtt aaagtgttc aattaccatg gagatggggg	1140
atgaagtatt tctgggacac acttcttgat gcggatttag aaagcgtatgc tcttggttgg	1200

## [0002]

caatacatta ccggtactct cccggatagc cgggagtttg atcgcataga taaccctcag	1260
tttgaagggt acaagtttga tccaaatggt gaatacgtaa ggcgatggct tcctgaactc	1320
tctagactcc cgacagactg gatacatcat ccgtggaacg cacctgagtc cgttcttcaa	1380
gctgctggta tcgagcttgg atcaaaactat cctctaccaa ttgtaggatt agacgaagca	1440
aaagcacggc ttcatgaagc gctttcacag atgtggcaac tagaagctgc ttcaagagct	1500
gcaatagaga acggatccga agaaggactt ggagattctg ctgaggtaga ggaagctcct	1560
atagagtcc caaggacat tacaatggaa gagactgaac caaccagact caaccctaac	1620
aggagatatg aggatcagat ggttccaagc attacttctt ctttgatcag acctgaagaa	1680
gacgaagagt cgtctcttaa ttgagaaat tcagtaggag atagcagagc agaggttcca	1740
aggaacatgg ttaacaccaa ccaagctcag cagcggagag cagaaccggc ttcaaaccaa	1800
gtcactgcta tgattccaga atttaatatc agaattgttg cagagagcac tgaagactca	1860
acagcggaat cttccagcag cggaaggaga gaaagaagcg gaggcatagt ccccagatgg	1920
tctccagggt actcagagca gttccctagt gaagaaaatg gtattggagg aggaagtaca	1980
acgtctagct acttgcagaa tcacatgaa atactgaact ggagacggct ttcacaaacc	2040
ggtaa	2046

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 576

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 番茄

&lt;221&gt; cry1 基因羧基端 (CCT1)

&lt;222&gt; (1)···(576)

&lt;400&gt; 2

atgtggcaac tagaagctgc ttcaagagct gcaatagaga acggatccga agaaggactt	60
ggagattctg ctgaggtaga ggaagctcct atagagtcc caaggacat tacaatggaa	120
gagactgaac caaccagact caaccctaac aggagatatg aggatcagat ggttccaagc	180
attacttctt ctttgatcag acctgaagaa gacgaagagt cgtctcttaa ttgagaaat	240
tcagtaggag atagcagagc agaggttcca aggaacatgg ttaacaccaa ccaagctcag	300
cagcggagag cagaaccggc ttcaaaccaa gtcactgcta tgattccaga atttaatatc	360
agaattgttg cagagagcac tgaagactca acagcggaat cttccagcag cggaaggaga	420
gaaagaagcg gaggcatagt ccccagatgg tctccagggt actcagagca gttccctagt	480
gaagaaaatg gtattggagg aggaagtaca acgtctagct acttgcagaa tcacatgaa	540
atactgaact ggagacggct ttcacaaacc gggtaa	576

## [0003]

- <210> 3  
<211> 360  
<212> DNA  
<213> 番茄  
<221> cry2 基因羧基端 (CCT2)  
<222> (1)···(360)
- <400> 3

```
atgatcggag cagcacctga tgagattgta gcagataget tcgaggcctt aggggctaataat      60
accattaaag aacctggtct ttgcccatct gtgtcttctata atgaccaaca agtaccttctg      120
gctgttcgtt acaacgggctc aaagagagtg aaacctgagg aagaagaaga gagagacatg      180
aagaaatcta ggggattcga tgaaaggagag ttgttttcga ctgctgaatc ttcttcttct      240
tcgagtgtgt ttttcgtttc gcagtcttgc tcgttggcat cagaaggaa gaatctggaa      300
ggtattcaag attcatctga tcagattact acaagtttgg gaaaaaatgg ttgcaaataga      360
```

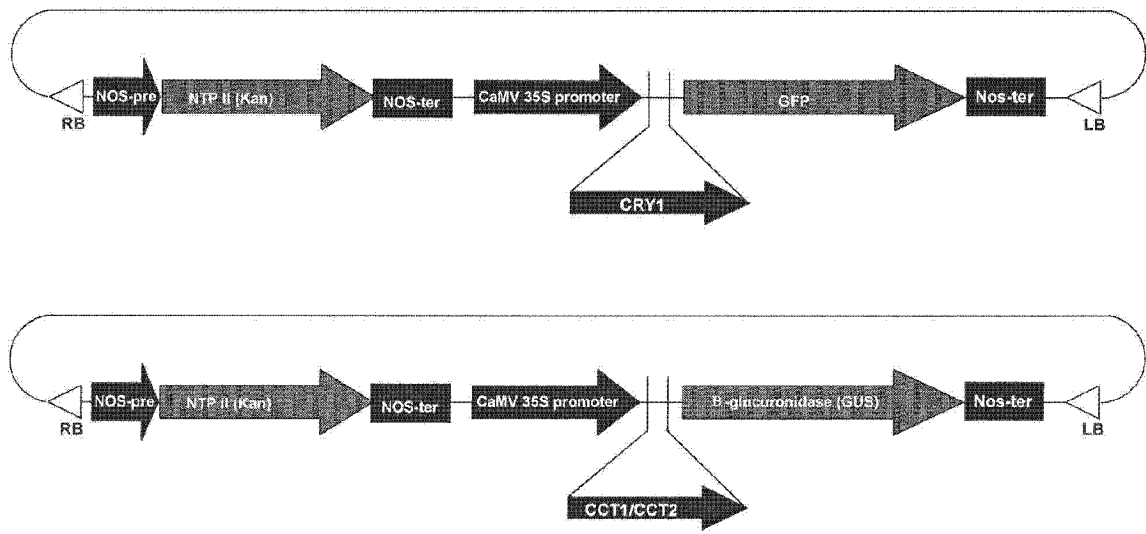


图 1



图 2

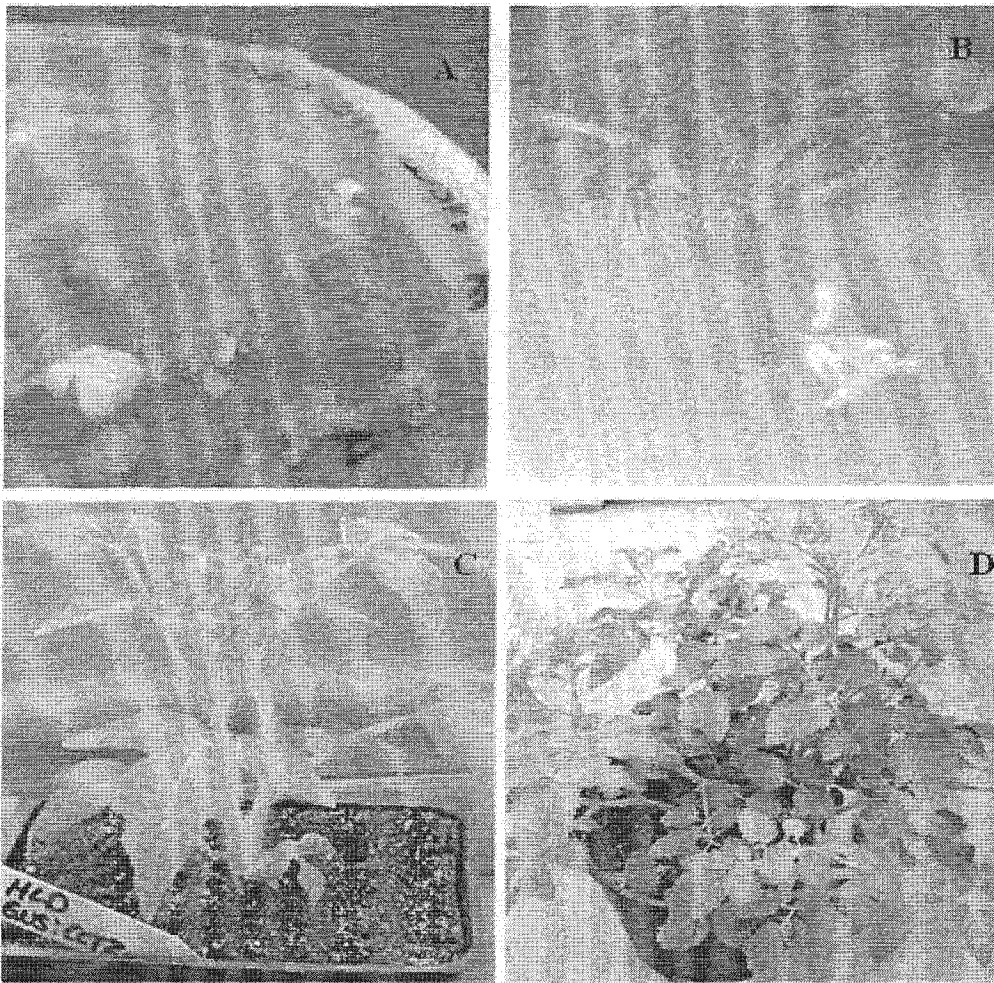


图 3

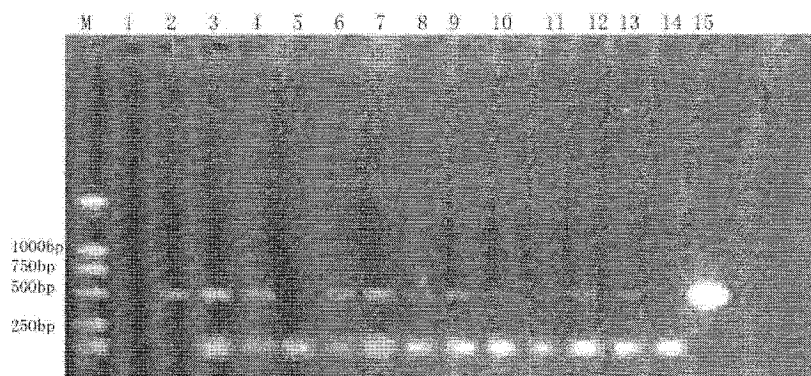
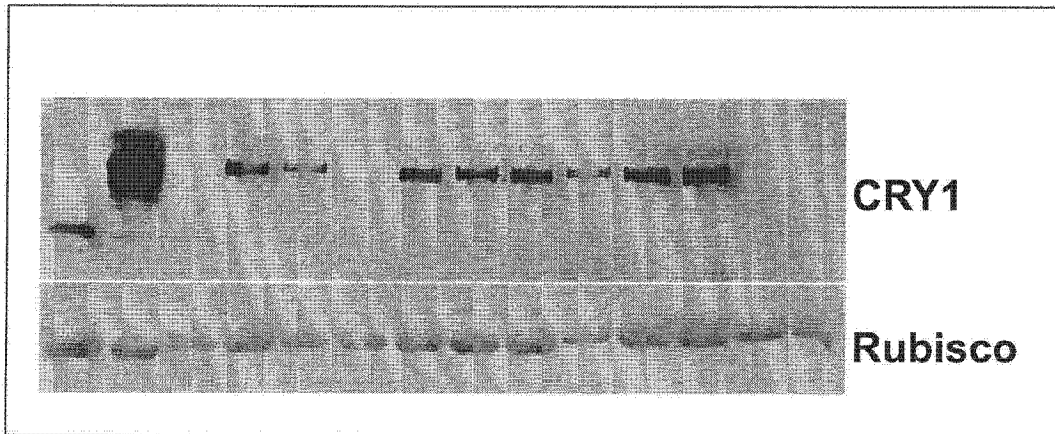


图 4

A



B

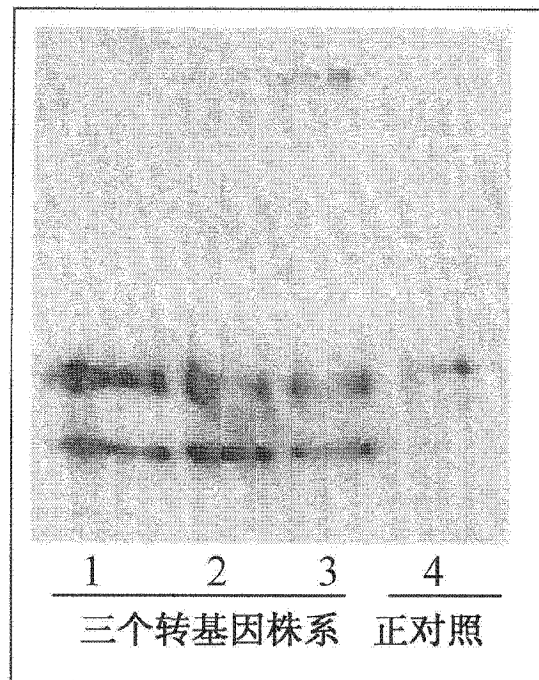


图 5

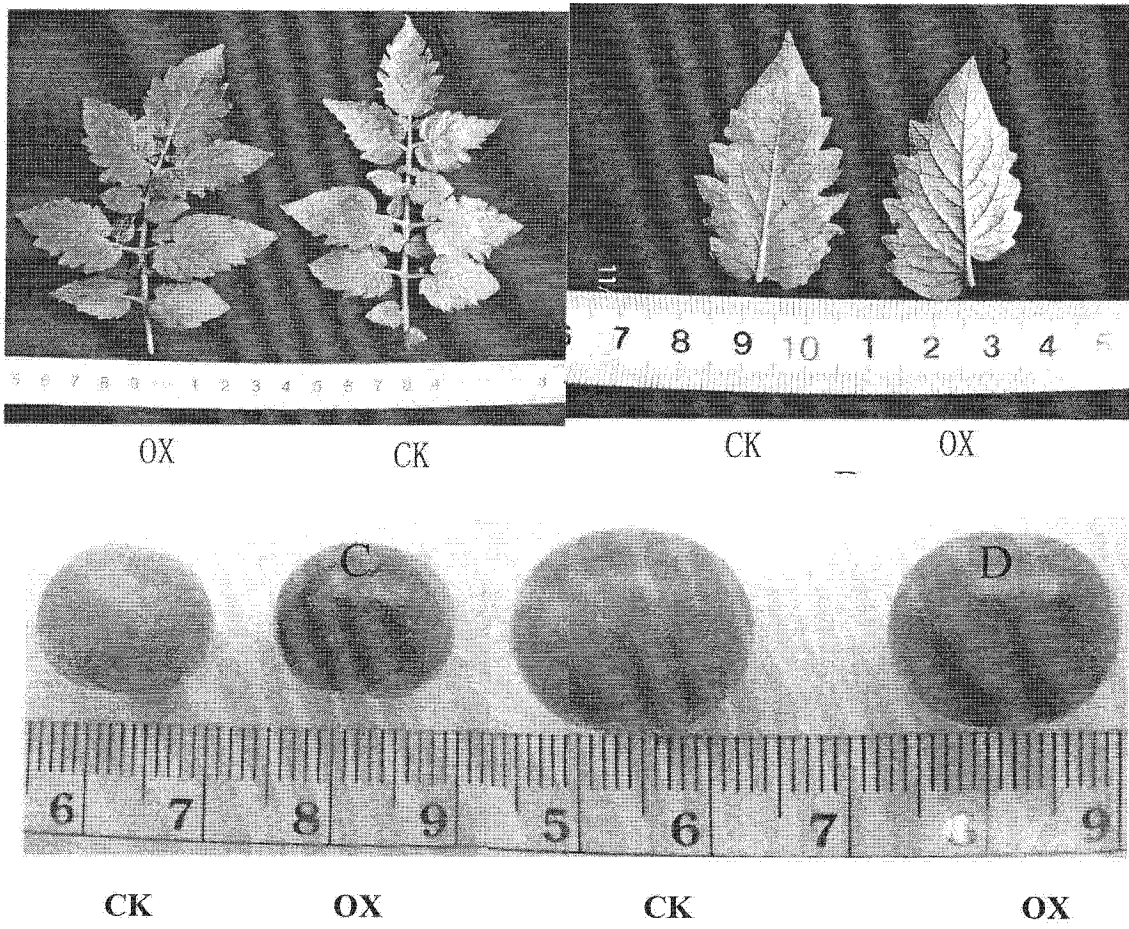


图6

专利名称(译)	一种提高番茄类胡萝卜素含量的方法		
公开(公告)号	<a href="#">CN101979601A</a>	公开(公告)日	2011-02-23
申请号	CN201010288489.9	申请日	2010-09-21
[标]申请(专利权)人(译)	山东省农业科学院高新技术研究中心		
申请(专利权)人(译)	山东省农业科学院高新技术研究中心		
当前申请(专利权)人(译)	山东省农业科学院高新技术研究中心		
[标]发明人	王兴军 姜娜娜 洛佩斯哈维尔 赵传志		
发明人	王兴军 姜娜娜 洛佩斯·哈维尔 赵传志		
IPC分类号	C12Q1/68 G01N33/53 A01H5/08 G01N30/02 C12N15/82		
代理人(译)	许德山		
外部链接	<a href="#">Espacenet</a> <a href="#">SIPO</a>		

摘要(译)

本发明公开了一种提高番茄类胡萝卜素含量的方法，是利用基因工程手段构建隐花色素基因1、隐花色素基因1的羧基端和隐花色素基因2的羧基端的过量表达载体，转化番茄，获得转基因番茄。本发明方法实现了转基因番茄果实中番茄红素及总的类胡萝卜素的含量较大幅度的提高，最大可分别提高3.6倍和3.4倍，使得从番茄中提取天然的番茄红素等将更加高效，大大提高了番茄产品的附加值。

类胡萝卜素	基因型						
	wild type	CRY1			GUS::CCT1		
	株系 W1	株系 A1	株系 A4	株系 A5	株系 D1	株系 D2	株系 D5
α-胡萝卜素	2.23±0.85	9.75±1.10	3.05±0.09	12±0.95	24±4.66	17±2.31	3.94±0.95
链孢红素	16±1.12	32±2.30	25±2.23	30±1.81	42±8.01	42±6.78	21±1.86
番茄红素	150±13	562±23	293±19	458±31	439±17	550±29	320±11
β-胡萝卜素	13±0.90	8.15±1.14	14±1.43	8.75±0.86	12±1.34	14±3.10	10±1.95
叶黄素	1.88±0.11	0.76±0.05	1.47±0.10	1.91±0.35	1.64±0.13	0.06±0.01	1.28±0.68
紫黄质	0.73±0.09	0.22±0.01	0.37±0.09	0.38±0.06	0.80±0.01	0.94±0.09	0.43±0.17
玉米黄质	1.00±0.03	0.25±0.03	0.65±0.03	0.57±0.01	0.70±0.02	0.36±0.05	0.49±0.22
类胡萝卜素总量	187±11	614±32	342±17	512±31	531±27	627±53	359±46