

胸腺肽基因转化生菜及其表达的研究

年洪娟^{1,2}, 刘玲¹, 杨淑慎², 王永健¹, 张锡梅², 李霞¹

(¹国家蔬菜工程技术研究中心, 北京 100089; ²西北农林科技大学生命科学院, 杨凌 712100)

摘要: 以4 d苗龄的美国大速生菜无菌苗子叶为外植体, 通过根癌农杆菌介导, 将胸腺肽基因(*thy*)导入生菜。研究表明, 含有卡那霉素 $75\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 的 MS_{1-1} 培养基($\text{MS}+0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{6-BA}+0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{NAA}+\text{Cb}500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)为最适于叶外植体转化后诱导芽再生的培养基, 经抗性筛选, 将抗性芽切下于 MS_{1-2} 培养基($1/2\text{MS} + \text{Kan}50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{Cb}100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$)上诱导生根。通过PCR和Southern杂交分析证明, 胸腺肽基因已经整合到生菜基因组中。RT-PCR检测初步表明, 胸腺肽基因可以在生菜中正常转录。

关键词: 胸腺肽基因; 根癌农杆菌; 生菜; 遗传转化; 基因表达

Transformation and Expression of Thymosin Gene in Lettuce

NIAN Hong-juan^{1,2}, LIU Ling¹, YANG Shu-shen², WANG Yong-jian¹, ZHANG Xi-mei², LI Xia¹

(¹Beijing Vegetable Research Center, Beijing 100089; ²College of Life Science, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling 712100)

Abstract: The thymosin gene (*thy*) was introduced into lettuce by co-culturing excised cotyledon explants with *Agrobacterium tumefaciens*. The best transformation efficiency was obtained when explants were co-cultured on the selective medium MS_{1-1} ($\text{MS}+0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{6-BA}+0.05\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}\text{NAA}+\text{Cb}500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$) containing $75\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ kanamycin. Roots were induced on MS_{1-2} ($1/2\text{MS}+\text{Kan}50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}+\text{Cb}100\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$). Integration of thymosin gene into the genome of lettuce plants was confirmed by PCR and Southern blot analysis. Expression of thymosin gene in transcriptional level was proved by RT-PCR.

Key words: Thymosin gene; *Agrobacterium tumefaciens*; *Lactuca sativa*; Genetic transformation; Gene expression

植物是人类主要的食物来源, 也为人们提供了多种多样的药物。随着现代生物技术的发展, 人们试图把植物作为一种生物反应器, 生产药用蛋白^[1]、抗体^[2, 3]和疫苗^[4]。

胸腺肽是由胸腺分泌的一种促进淋巴细胞合成和成熟的多肽激素, 对于淋巴系统的发育和维持免疫系统的平衡起重要作用, 尤其在抗肿瘤免疫、移植免疫和抗微生物感染等作用中地位十分重要。

利用转基因植物生产基因工程疫苗是目前植物基因工程研究中的一大热点。生菜是一种新鲜、美味、低热量和高营养的蔬菜, 深受大众的喜爱。关于生菜的遗传转化已有成功的报道^[5-9]。笔者将胸腺肽基因(*thy*)导入生菜使其表达, 以期培育出

可生食的具有保健功能的转基因蔬菜。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料 供试生菜品种大速生菜种子购自中国农业科学院蔬菜种子中心。将生菜种子消毒后置于 $1/2\text{ MS}$ 培养基上, 黑暗条件下 $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 萌发。4 d后切取子叶进行遗传转化。

1.1.2 质粒和菌株 质粒pART27及胸腺肽基因由军事医学科学院惠赠, 植物表达载体pART27-*thy*为国家蔬菜工程技术研究中心营养与品质分析实验室构建, 其结构如图1。

收稿日期: 2003-01-10

基金项目: 北京市科委重大资助项目(H012010070113)和北京市新星计划资助项目(951890200)

作者简介: 年洪娟(1974-), 女, 内蒙古宁城人, 硕士, 主要从事植物生理与分子生物学方面的研究。李霞为通讯作者, Tel: 010-51503069; E-mail: Catherine880@sohu.com

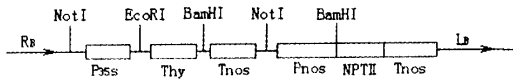


图1 植物表达载体pART27-Thy上T-DNA区结构示意图
Fig.1 Structure of the T-DNA of the binary vector pART27-Thy

1.2 方法

1.2.1 遗传转化和抗性植株的筛选 以4 d苗龄的生菜无菌苗子叶为试验材料, 将子叶外植体切去尖端和基部浸入根癌农杆菌菌液中30 min, 然后用无菌滤纸吸干菌液, 转移到MS₁₋₀培养基(MS+0.1 mg·L⁻¹6-BA +0.05 mg·L⁻¹ NAA)上, 28℃黑暗条件下共培养2 d后, 转移到分别含卡那霉素(kan)0、50、75、100、150和200 mg·L⁻¹的筛选培养基MS₁₋₁上光照培养2~3周, 筛选转化体。分化出来的抗性芽长至1~2 cm时, 切下转到MS₁₋₂培养基上诱导生根。将生根的植株先移入蛭石中炼苗10~15 d后, 再移入土壤, 于温室自然光照下生长。

1.2.2 转基因植株的PCR检测 用CTAB法提取抗性植株叶片DNA, 以P₁和P₂为特异引物进行PCR扩增。引物设计: 根据thy基因序列设计1对特异引物P₁和P₂, 其序列如下: 上游引物P₁ 5' > GCC GAC AGT GGT CCC AAA GAT G < 3'; 下游引物P₂ 5' > GCG GAT CCT TAG TCA TCC TCG TCG GCC < 3'。反应程序: 94℃变性10 min后进入循环, 94℃变性30 s, 45℃复性30 s, 72℃延伸30 s, 30个循环后, 72℃延伸10 min。预期的PCR产物长度为300 bp左右。PCR扩增产物用1.0%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.3 PCR阳性株的扩繁 取PCR检测呈阳性的生菜植株叶片, 自来水冲洗干净。用70%酒精擦洗叶片表面, 再用10% NaClO消毒15 min, 无菌水冲洗4~5遍。然后切成0.5 cm左右方块, 接种到MS₁₋₁培养基上, 光照下培养, 待芽长至2 cm左右时切下于1/2 MS培养基上诱导生根。

1.2.4 转基因植株的Southern杂交分析 用CTAB法提取PCR阳性株叶片总DNA, 取约20 μg DNA用限制性内切酶EcoR I完全酶切后, 0.8%琼脂糖凝胶电泳分离, 然后转至尼龙膜上进行杂交。本试验采用Boehringer Mannheim公司生产的地高辛标记检测试剂盒, 所有操作均按照试剂盒操作指南进行。

1.2.5 RT-PCR检测 取阳性株的幼嫩叶片0.1 g, 用异硫氰酸胍法提取叶片总RNA。反转录采用Promega公司的OligdT(15)及逆转录酶M-MLV, 反

转录出mRNA的cDNA第一链, 然后以此为模板, 进行常规PCR扩增反应。

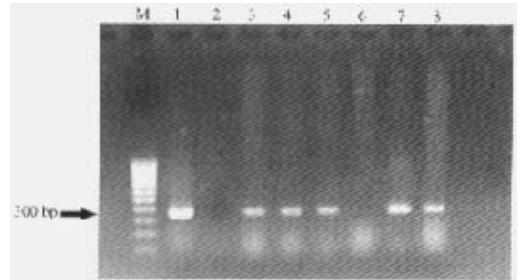
2 结果与分析

2.1 kan抗性植株的获得及PCR鉴定

以生长在1/2MS培养基上的无菌苗子叶为外植体, 其中, 对照子叶外植体在无卡那霉素的MS₁₋₁培养基中再生率可达100%, 经农杆菌侵染处理的外植体在含卡那霉素的培养基中出芽比对照稍迟, 且每块外植体上的芽数也少于对照。在50~200 mg·L⁻¹卡那霉素浓度敏感性试验中, 芽的再生率随卡那霉素浓度提高而降低, 达到200 mg·L⁻¹后芽再生困难。当卡那霉素浓度为75 mg·L⁻¹时, 出芽多, 芽长势最好。经抗性筛选和诱导生根, 共获得256株抗性植株。

取幼嫩的抗性植株叶片提取DNA做PCR检测(图2), 扩增出目的条带的为阳性株, 共检测到阳性株12株, 阳性率为4.6%。初步说明目的基因已整合到生菜基因组中。

2.2 转基因生菜的扩繁



M. DNA 分子量标准; 1. 阳性对照; 2. 阴性对照; 3~5、7、8 转基因植株; 6. 未转化植株

M. DNA ladder marker; 1. Positive control; 2. Negative control; 3-5, 7, 8. Transgenic lettuce; 6. Non-transgenic lettuce

图2 转基因生菜的PCR检测

Fig.2 PCR analysis of transgenic lettuce plants

将PCR检测呈阳性的生菜叶片在MS₁₋₁培养基上光照培养2周, 外植体周围长出幼芽。提取扩繁植株的叶片DNA进行PCR扩增, 结果可以扩增出目的条带。说明这些阳性株经无性繁殖后仍然呈阳性, 从而扩大了阳性株的群体。

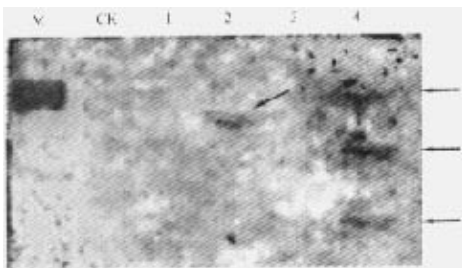
2.3 thy基因在生菜基因组中的整合

选取4株PCR呈阳性的生菜植株, 用CTAB法

提取叶片总 DNA 后, 取约 20 μg DNA 用 EcoRI 完全酶切后做 Southern 杂交分析, 结果表明, 2 株检测到了杂交条带(图 3)。其中 1 株有 1 条杂交带, 推断此植株基因组中插入 1 个拷贝的目的基因; 另 1 株有 3 条杂交带, 推断此植株基因组中插入 3 个拷贝的目的基因。对照没有条带, 进一步证明 *thy* 基因已经插入到生菜基因组中。

2.4 *thy* 基因在转基因生菜中的转录表达

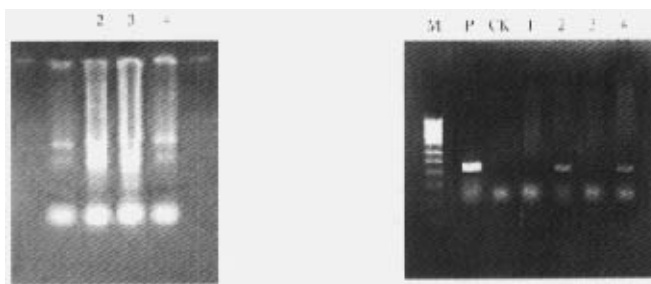
为了进一步证明 *thy* 基因在转基因植株中的转录表达情况, 取 4 株阳性植株提取 RNA 做 RT-PCR 检测(图 4)。以 mRNA 反转录出的 cDNA 链为模板进行 PCR 扩增, 结果 2 株能够扩增出 300 bp 左右的条带, 与 Southern 杂交结果一致, 初步表明 *thy* 基因在转录水平上进行了表达。



M. 阳性对照; CK. 阴性对照; 1、3. 未转化植株; 2、4. 转基因植株
M. Positive control; CK. Negative control; 1,3. Non-transgenic plants; 2,4. Transgenic plants

图 3 转基因植株的 Southern 杂交分析

Fig.3 Southern blot analysis of transgenic plants



M. 分子量标准; P. 阳性对照; CK. 阴性对照; 1、3. 未转化植株; 2、4. 转化植株

M. DNA Ladder marker; P. Positive control; CK. Negative control; 1,3. Non-transgenic plants; 2,4. Transgenic lettuce plants

图 4 转基因生菜的 RNA 提取及 RT-PCR 检测

Fig.4 RNA extraction and RT-PCR analysis of transgenic lettuce plants

3 讨论

生菜可以生食, 为廉价生产可食疫苗提供了一条新途径。通过将胸腺肽基因转化生菜, 经 PCR 检测、Southern 杂交和 RT-PCR 检测可知, 胸腺肽基因已经在生菜基因组中得到整合并初步验证在转录水平上得以表达。而且通过阳性株的无性繁殖可以扩大阳性植株的数量。但胸腺肽蛋白在生菜中的表达量、免疫原性以及能否在后代中稳定遗传的研究有待进一步进行。

References

- [1] Leite A, Kemper E, da Silva M, Luchessi A, Silote R, Bonaccorsi E. Expression of correctly processed human growth hormone in seeds of transgenic tobacco plants. *Molecular Breeding*, 2000, 6: 47-53.
- [2] Zeitlin L, Olmsted S S, Moench T R, Co M S, Martinell B J, Paradkar V M. A humanized monoclonal antibody produced in transgenic plants for immunoprotection of the vagina against genital herpes. *Nature Biotechnology*, 1998, 16: 1361-1364.
- [3] Sroger E, Vaquero C, Torres E, Sack M, Nicholson L, Drossard J, Williams S, Keen D. Cereal crops as viable production and storage systems for pharmaceutical scFv antibodies. *Plant Molecular Biology Reporter*, 2000, 42:583-590.
- [4] Carrillo C, Wigdorovitz A, Oliveros J C, Zamorano P L, Sadir A M. Protective immune response to foot and mouth disease virus with VP1 expressed in transgenic plants. *Journal Virology*, 1998, 72: 1688-1690.
- [5] Michelmore R W, Marsh E, Seely S, Landry B. Transformation of lettuce (*Lactuca sativa*) mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Cell Reports*, 1987, 6:439-442.
- [6] Curtis I S, Power J B, de Laat A M M, Caboche M, Dabey M R. Expression of a chimeric nitrate reductase gene in transgenic lettuce reduces nitrate in leaves. *Plant Cell*

- Reports*, 1999, 18:889-896.
- [7] McCabe M S, Schepers F, van der Arend A, Mohapatra U, de Laat A M M, Power J B, Davey M R. Increased stable inheritance of herbicide resistance in transgenic lettuce carrying a petE promoter-bar gene compared with a CaMV 35S-bar gene. *Theoretical and Applied Genetics*, 1999, 99: 587-592.
- [8] 左晓峰, 张晓钰, 单 龙, 肖传英, 何笃修, 茹炳根. 人小肠三叶因子基因在生菜中的整合与表达. *植物学报*, 2001, 43:1 047-1 051. Zuo X F, Zhang X Y, Shan L, Xiao C Y, He D X, Ru B G. Expression of human intestinal trefoil factor(hITF) gene in lettuce. *Acta Botanica Sinica*, 2001, 43:1 047-1 051. (in Chinese)
- [9] 刘敬梅, 陈大明, 陈 杭. 甜蛋白基因MBLII对莴苣的遗传转化. *园艺学报*, 2001, 28: 246-250. Liu J M, Chen D M, Chen H. Genetic transformation and plant regeneration of lettuce with sweet protein MBLII. *Acta Horticulturae Sinica*, 2001, 28: 246-250. (in Chinese)

(责任编辑 曲来娥)

欢迎订阅 2005 年《中国生态农业学报》

《中国生态农业学报》(原刊名《生态农业研究》)是由中国科学院石家庄农业现代化研究所和中国生态经济学会主办的大农业学术期刊, 科学出版社出版, 主要刊登生态学、生态经济学、农、林、牧、副、渔业及资源与环境保护等领域创新的学术论文、技术报告(包括理论与应用研究、农业生态工程技术及实用生物技术、生物多样性保护、湿地保护、城镇绿地生态建设、无公害农产品生产技术、农业环境污染防治技术及农业可持续发展技术体系研究等方面)、研究简报及综述、生态农业建设和生态示范区典型模式与典型经验等, 适于国内外从事生态学、生态经济学、农、林、牧、副、渔、资源与环境保护等领域科技人员、高等院校相关专业师生、管理工作者和基层从事生态农业建设的广大技术人员等阅读与投稿。

《中国生态农业学报》国内外公开发刊, 国际标准刊号: ISSN1671-3990, 国内统一刊号: CN13-1315/S, 季刊, 国际标准大 16 开本, 每期定价 14.60 元, 全年 58.40 元, 由北京市报刊发行局发行, 邮发代号: 82-973, 全国各地邮局均可订阅, 漏订者可直接汇款至编辑部补订(若从编辑部补订全年需另加邮资 12.00 元)。

地址: 050021 河北省石家庄市槐中路 286 号中国科学院《中国生态农业学报》编辑部,
电话: 0311-5818007