

⑬
431-433含改良植物蛋白质品质基因
的工程农杆菌转化马铃薯

S532.035

李霞

(西北大学生物学系, 710069, 西安; 31岁, 女, 讲师)

A 摘要 利用工程农杆菌 CA3-3T, CA3B10-3 转化马铃薯叶盘, 得到了转化愈伤组织和转化植株。实验证明了叶盘法转化的高效性。

关键词 叶盘; 工程农杆菌; 转化植株; 马铃薯

分类号 Q943

蛋白质, 叶盘法

野生型农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 转化双子叶植物及单子叶植物已获得成功 (陈章良 1989, Dodds 1988)。野生型农杆菌一般不含人类所需求的外源目的基因, 因而也不可能用于转化植物创造出理想的转基因植物。通过分子遗传工程技术, 可以构建成含有外源目的基因的工程农杆菌, 利用工程农杆菌转化植物能力强的特点, 将外源目的基因转入植物体内, 从而获得转基因植物。目前利用构建成功含有外源目的基因的工程农杆菌转化烟草、蕃茄、矮牵牛、马铃薯、棉花、苜蓿、甘蓝、油菜等植物, 国内外均有报道。

本实验采用的工程农杆菌 CA3-3T 及 CA3B10-3 的质粒中均插入了外源基因, 该基因能改良植物蛋白质的品质, 可编码赖氨酸、蛋氨酸、色氨酸等 20% 以上人体必需氨基酸。转化的马铃薯氨基酸含量提高, 营养价值也得到提高。

本实验采用的工程农杆菌 CA3-3T 及 CA3B10-3 的质粒还含有 NPT I (neomycin phosphotransferase) 即新霉素磷酸转移酶基因, 该基因使被转化的马铃薯呈现对抗菌素卡那霉素的抗性, 便于筛选转化细胞及转化植株。转化方法为叶盘法, 分子杂交结果证明叶盘法转化频率较高, 操作简便快速, 转化愈伤组织及转化植株中均具有目的基因。转基因植物的创造, 对于提高单位面积的植物的产量与质量, 增加经济效益, 均具有重要的深远意义。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 工程农杆菌 CA3-3T, CA3B10-3 均由中国农科院作物所遗传工程室提供。二者均含有改良植物蛋白质品质的外源基因和 nos-npt 基因, 使转化后的植物能呈现抗卡那霉素抗性, 并能整合到植物染色体上。质粒 CA3-3T 为单元载体, 用于转化植物细胞; 质粒 CA3B10-3 为双元载体, 用于制备 DNA 分子杂交的探针。工程农杆菌培养基采用 TY 配方。

大肠杆菌 (*E. coli*) HB101, 用于扩增 CA3B10-3 质粒的受体菌, *E. coli* HB101 培养基为 LB。

1.1.2 马铃薯植物材料 采用国内品种。将马铃薯块茎种入土中, 待长出叶子取其叶片转化。愈伤组织诱导培养基为 CMS, 菌分化培养基为 DMS, 根诱导培养基为 RMS。

- 1.1.3 培养基 农杆菌 TY 培养基 5 g/L 蛋白胨, 3 g/L 酵母膏, pH7.0, 28℃ 培养。
 Ecoli HB101 培养基 LB 10 g/L 蛋白胨, 5 g/L 氯化钠, 5 g/L 酵母膏, pH7.0, 37℃ 培养。
 马铃薯 CMS MS(基本培养基)+2 mg/L 的 2,4-D-0.4 mg/L 的激动素 KT(C₁₀H₉N₅O)
 马铃薯 DMS MS+2%蔗糖+2 g/L 酵母提取物+2 mg/L 吲哚乙酸 IAA(C₁₀H₉NO₂)+0-4 mg/L
 的 KT+0-4 mg/L 的 6-苄氨基嘌呤 BAP(C₁₂H₁₁O₅)+0-5 mg/L 的 α-萘乙酸 NAA(C₁₂H₁₀O₂)
 +0-5 mg/L 赤霉素(C₁₉H₂₂O₆)。
 马铃薯 RMS MS+1 mg/L 的 NAA+1%蔗糖。

1.2 方法

1.2.1 工程农杆菌培养 取-20℃甘油保存的工程菌在 TY 培养中活化 48 h, 再取 0.1 ml 活化菌株菌液至 20 ml 的 LB 液体培养基中扩大培养至对数期, 约需 6-12 h, 在该 LB 培养液中加入氯霉素(AP), 卡那霉素(km)和四环素(Tc), 因为 CA3-3T 中有这三种抗菌素的抗性基因。离心分离培养好的菌体, 并加入 1 ml 的 50 mmol 的 CaCl₂ Tris·Cl, 以备转化马铃薯细胞作用。

1.2.2 工程农杆菌转化马铃薯叶片细胞 将马铃薯的幼嫩叶片经 10%过氧化氢消毒, 切成 0.5×0.5 cm 的小叶片, 与工程农杆菌 CA3-3T 菌液共培养, 25℃ 48 h 之后转移到含有 100 Hg/ml 的 km 和 500 Hg/ml 的 AP 的 CMS 培养基上。光照 28℃ 培养, 得愈伤组织长出后, 再移到 DMS 培养基上诱导菌的分化, 分化成的菌再转到 RMS 培养基上, 诱导根的产生。

1.2.3 分子杂交鉴定被转化马铃薯组织中的改良蛋白基因

(1) 转化组织中目的 DNA 的提取。准确称取 0.5 g 转化组织加入 SDS-EDTA 溶液 0.5 ml (1 mol 的 Tris·cl, pH8.0, 0.5 mol 的 EDTA, 5 mol 的 NaCl, 20% 的 SDS) 及少量石英砂, 在研钵内研成浆状, 离心取上清液去除 RNA 及蛋白质, 乙醇沉淀 DNA, 重新溶于 TE 缓冲液中 (TE: pH7.5, EDTA, Tris·Cl 缓冲液), 将该 DNA 样品转移到硝酸纤维素滤膜 (NC) 上, 烘干滤膜, 以备进行 DNA 和 DNA 的分子杂交鉴定。

(2) 合成分子杂交的 DNA 分子杂交探针。用沸水煮法制备质粒 CA3B10-3 核酸, 纯化之后转化大肠杆菌 HB101, 检出阳性转化子, 扩增 CA3B10-3 DNA, 提取该质粒再次纯化分离, 用限制性内切酶 BamHI 酶解, 进行琼脂糖凝胶电泳获得分离带, 电泳脱法回收含有目的基因的带 (6.41 kb) 将该片段 DNA 用酚及氯仿抽提纯化后再用放射性同位素标记。

(3) 分子杂交。将标准探针与 NC 上的转化植物组织样品按 Southern 印迹法进行 DNA-DNA 分子杂交, 42℃ 保温 16 h, 杂交后样品进行放射性自显影鉴定。

2 实验结果及讨论

2.1 实验结果

2.1.1 马铃薯叶片与工程农杆菌共培养 工程农杆菌活化后经共培养过程转化马铃薯叶片细胞, 共培养时间 8 min 为宜。未活化工程农杆菌或活化时间过长均减低转化频率。转化后的叶片置于无抗菌素的培养基上, 为了转化充分并表达出外源基因中抗性特征, 培养 48 h 以上为宜。

2.1.2 抗性愈伤组织形成与植株的再生 共培养转化后的叶片, 在含 100 Hg/ml 的 km 和 500 Hg/ml 的 AP 培养基 CMS 上 2 周后, 产生白色毛状的愈伤组织, 再经 2 周形成 0.4×0.4 cm 大小的愈伤组织, 此现象可延续 6~8 周, 仍具有分化能力。6 周后, 愈伤组织转移到含有同样抗菌素的 DMS 培养基上, 2 个月后少数愈伤组织分化出芽。分化所用的激素试剂为 N₂, K₂ (2.8 mg/L 的 NAA+0.6 mg/L 的 KT); G₃B₃ (5 mg/L 的 GA₃+3 mg/L BAP)。当分化出的芽长到合适的尺寸, 将芽点切下移到含有同样抗菌素的 RMS 培养基上, 诱导根的发生。

2.1.3 Southern 印迹确证改良蛋白质基因的 DNA-DNA 分子杂交 由 CA₃B₁₀₋₃ DNA 制备的带有同位素标记的 DNA 分子探针与硝酸纤维素滤膜上的转化马铃薯组织中 DNA 分子杂交之后, 呈阳性反应, 而非转化的马铃薯样品无此反应。杂交阳性反应中各个体的杂交强度不同, 说明在不同植株中改良

蛋白的外源基因拷贝数不同。

2.2 讨论

(1)过氧化氢和次氯酸钠均可用于消毒马铃薯叶片,但次氯酸钠消毒作用强,易损伤叶片,且不易从叶片上去除,具有残留毒性。10~12%的过氧化氢消毒不易损伤叶片,消毒时间为 20 min 最适。过氧化氢易从叶片上消除,不易残留毒性。

(2)抗性愈伤组织形成较快,而分化成苗的速度较慢,且分化率也低。可能是由于 km 时植物组织有一定损伤作用,因此应控制 km 用量在合适的水平。另外 T-DNA(转移 DNA)从工程农杆菌中转移到马铃薯细胞内,并与其 DNA 整合,也往往引起植物染色体 DNA 的表达产生变异。

(3)不同基因型的植物细胞分化所需的激素条件不同,影响到愈伤组织,芽苗和根的诱导效果。其他因素如:糖、光照、温度等理论与环境因素,同样会影响到分化效果。

(4)实验中采用毒霉素(GA₃)对促进马铃薯的细胞分化具有特殊作用,证明了 GA₃ 是一种有效的促马铃薯分化剂。

参 考 文 献

- 1 陈章良,潘乃穰. 植物基因工程的现状、前景及问题. 生物工程进展, 1989, 3(1): 20~25
- 2 严凤喜译. 马铃薯的遗传工程和原生质体融合. 生物地质工程通讯, 1988(创刊号): 53~54
- 3 Maniatis T. Molecular Cloning. New York: Cold Spring Harbor, 1983. 64~65
- 4 Gheysen G M. Integration of *Agrobacterium tumefaciens* transfer DNA (T-DNA) involves rearrangements of target plant DNA sequences. Proc. Natl. Sci. USA., 1987, 84: 6 169~6 173
- 5 Stavarek S. Regeneration of plants from long-term cultures of Alfalfa. Cell. Plant Science letters, 1980, 19: 253~261

责任编辑 徐象平

Transformation to Potato Using Engineering *Agrobacterium Tumefaciens* (A. t.) which Containing Protein-improved Gene

Li Xia

(Department of Biology, Northwest University, 710069, Xi'an)

Abstract By transforming the leaves of potato using engineering A. t. CA3-3T, the transformed callus and plant are obtained. The aimed gene which engineering A. t. contained can improve the quality of protein in plant. It is useful for rising up the nourishment of plant and easy to prove the high effectiveness of leaves transformation.

Key words leaf disc; engineering *Agrobacterium tumefaciens*; transformed plant; potato