

# 基因枪转多基因库安托杨的获得

王建革 苏晓华\* 纪丽丽 张冰玉 胡赞民 黄荣峰 田颖川

( 中国林业科学研究院林业研究所, 北京 100091; 江西农业大学园林与艺术学院, 南昌 330045; 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101; 中国农业科学院生物技术研究所, 北京 100081; 中国科学院微生物研究所, 北京 100080.

\* 联系人, E-mail: [suxh@caf.ac.cn](mailto:suxh@caf.ac.cn)

**摘要** 通过基因枪共转化方法将枯草杆菌果聚糖蔗糖酶基因(*SacB*)、透明颤菌血红蛋白基因(*vgb*)、双价抗蛀干害虫基因(*BtCry3A+OC-*)、调节基因 *JERF36* 及报告基因 *NPT* 等外源基因导入库安托杨, 共获得 25 株抗性植株. PCR 及 Southern 杂交结果表明, 外源基因已整合到库安托杨基因组中, 其中 7 株含有上述全部 5 个外源基因. *BtCry3A* ELISA 实验表明, 上述 7 株库安托杨 *BtCry3A* 基因已得到表达. 且上述转基因植株在滨海盐碱地中生长良好.

**关键词** 库安托杨 基因枪 多基因 共转化 转基因

由于世界上缺水状况的加剧及气候变暖的影响, 各种生物逆境和非生物逆境每年都使林木生产遭受巨大损失. 我国干旱、半干旱、盐碱荒地的面积占国土面积的 1/2 以上, 而且还有加剧的趋势, 如何改造利用干旱、盐碱荒地、恢复生态多年来一直是关注的热点之一.

环境的改善首先要恢复植被. 由于繁殖周期长、遗传杂合性高、许多性状的遗传机理不明、性状分析困难及种间地理隔离、生殖隔离等因素的限制, 利用常规育种手段很难定向培育出林木新品种. 转基因手段能打破远缘物种间难以杂交的界限, 实现传统杂交育种技术所不能实现的目的. 有鉴于此, 人们也寄希望于现代分子生物学技术手段, 尤其是利用基因工程手段解决一些用经典遗传育种方法很难解决或根本解决不了的问题.

多基因转化是指把 3 个以上外源基因导入同一受体, 在水稻<sup>[1-9]</sup>和黑麦草<sup>[10]</sup>中已有多基因转化成功的报道. 据统计, 2003 年商品化的转基因作物中 8% 含多个外源基因<sup>[11]</sup>. 但以前林木遗传转化多以转移单基因或二基因为主, 至今未获得理想的转基因植株, 其中重要的原因是重要的性状多由多基因控制, 开展林木多基因转化研究势在必行.

杨树是世界上重要的经济树种, 同时也是林木基因工程领域的模式树种. 鉴于目前尚未有林木转多基因的报道, 选择杨树作为多基因转化的首选树种, 不仅具有重要的借鉴意义, 还极具实用价值.

1984 年引进的速生欧美杨库安托杨(*P. xeur-*

*mericana* ‘Guariento’) 目前在我国华北地区表现出良好的前景, 但生产上面临蛀干害虫天牛的危害、干旱胁迫及盐碱等主要问题. 我们利用基因枪法将多个外源基因转入库安托杨, 探讨通过基因枪获得转多基因林木的高效方法, 同时尝试研究多个外源基因的协调表达. 一方面培育多基因转化杨树应用于生产实践, 另一方面可以为林木多基因转化研究提供借鉴和理论指导.

## 1 材料和方法

( ) 植物材料. 库安托杨采自中国林业科学研究院苗圃.

( ) 植物表达载体的构建. *Vgb* 和 *SacB* 基因由中国科学院遗传与发育生物学研究所提供(图 1 和 2); *JERF36* 基因的表达载体由中国农业科学院生物技术研究所提供(图 3); *BtCry3A+OC-* 基因由中国科学院微生物研究所提供. 上述 4 种基因均含 35S 启动子和 *NPT* 基因标记基因(图 4).

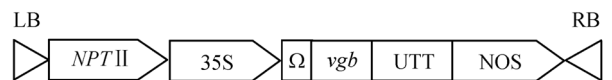


图 1 表达载体上的 *vgb* 基因结构图

( ) 再生转化体系的建立. 选取未木质化和半木质化当年生枝条, 摘除叶片, 选取腋芽饱满的枝条作为接种材料. 按常规设计不同的 6-BA 和 NAA 浓度梯度筛选最佳不定芽诱导培养基和最佳不定芽生根培养基.

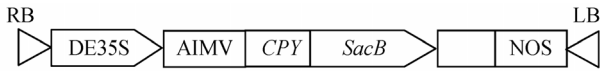


图 2 表达载体上的 *SacB* 基因结构图

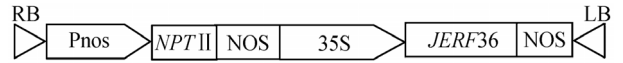


图 3 表达载体上的 *JERF36* 基因结构图

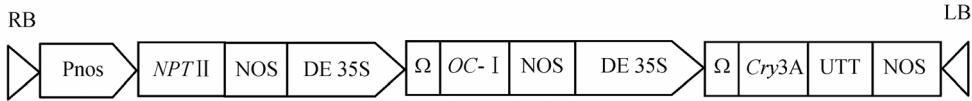


图 4 表达载体上的 *BtCry3A+OC-* 基因结构图

( ) 基因枪法遗传转化。取无菌苗自上而下的第 3、4 个叶片，取叶时叶片连同叶柄一起取下。对叶片进行渗透处理以调节受体细胞渗透压，增加其分化再生能力。渗透培养基为在分化培养基中加入浓度为 0.1 mol/L 的甘露醇和山梨醇，可使其两者的比例为 1:1。叶片处理分为无渗透处理、轰击前处理、轰击前后都处理 3 种形式。

将无菌苗叶片沿主脉横切 3~4 个伤口，处理过的叶柄切恢复培养 2 d 后，切成长约 1 cm 左右的小段，并横切 3~4 个伤口。置于含 0.1 mg/L 甘露醇和 0.1 mg/L 山梨醇的分化培养基中预培养 2~3 d，然后转至不含甘露醇、山梨醇以及抗生素的分化培养基中，在 9 cm 培养皿的中心摆成直径为 3 cm 的圆形备用。

轰击用的金粉直径为 1.0 μm；轰击压力为  $6.2 \times 10^7$ 、 $7.6 \times 10^7$  和  $9.3 \times 10^7$  Pa；轰击距离为 6、9 和 12 cm，每个培养皿轰击一次；真空度调节为  $6.77 \times 10^4$ 、 $8.46 \times 10^4$  和  $9.14 \times 10^4$  Pa。

轰击后，将叶片和叶柄避光培养 16 h 后，转到光下恢复培养 2 d(光周期为 16 h/8 h，光照强度为 2500 lx)，然后再转移到含有卡那霉素的分化筛选培养基上进行选择培养。待抗性芽长至 1.5 cm 长时，将其切下转移至含卡那霉素的生根培养基中，使其生根形成完整植株。

( ) 抗性植株的移栽。移栽前先将生根苗锻炼 1 周，然后，用镊子轻轻夹出小苗，用清水洗去培养基，然后将其栽于移栽盘中。在其上罩一塑料布保湿。一周后，拿去塑料布。

( ) 抗性植株的 PCR 检测。用 CTAB 法提取抗性库安托杨基因组 DNA。*vgb* 基因的引物为 V1 (5'-ccggatccggatgttagaccagcaacca-3')和 V2 (5'-gccgtcgacctttattcaaccgcttgag-3')，扩增的 DNA 片段的长度为 440 bp。*BtCry3A+OC-* 的引物为 CO1 (5'-gcattgcaactggcatcgaca-3')和 CO2 (5'-tcgagcgacggaggccggt-3')，

扩增的片段长度为 302 bp。*SacB* 基因的引物为 S1 (5'-atctctcagtagttagttgtcg-3')和 S2 (5'-ggttatgagccttgaaactccact-3')，扩增的片段长度为 1270 bp。*JERF36* 调节基因的引物为 J1 (5'-ccagactagacaggttcaactgtctc-3')和 J2 (5'-gcagcgaattccacccaaaatgttctc-3')，扩增片段的长度为 320 bp。PCR 反应程序为：94 预变性 5 min；94 变性 40 s，退火 40 s，72 延伸 60 s，共 35 个循环；72 延伸 10 min。其中，各基因的退火温度为：*vgb* 基因 55，*BtCry3A+OC-* 基因 46，*SacB* 基因 56，*JERF36* 基因 57。PCR 扩增产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳，检查结果，并拍照。

( ) Southern 杂交检测。对获得的抗性植株首先进行 PCR 检测，有阳性结果的进一步进行 Southern 杂交。杂交方法按 Sambrook 等人 [12] 的方法进行，根据不同的基因，库安托杨基因组 DNA 分别用 *EcoR*、*BamH* 和 *Hind* 单酶切，电泳，Southern 杂交。Southern 杂交中对照和探针杂交采用同一张膜、两次杂交的方法。

( ) *BtCry3A* ELISA 实验。取点杂交、PCR 验证过的抗性植株叶片，进行 *BtCry3A* ELISA 实验。具体方法按照 *BtCry3A* ELISA (PSA 05900) 程序进行。

( ) 经过验证的转基因植株在天津大港滨海盐碱地进行中试，实验地盐碱度 9‰ 左右。

## 2 结果与分析

### 2.1 优化再生体系的建立

( ) 库安托杨组培环境条件的优化。在参照相关文献的基础上筛选出了库安托杨的最佳生根培养基为 1/2MS 附加 0.02 mg/L IBA 和 0.02 mg/L NAA，最佳生长培养基的 pH 为 7.0。在此培养基上 7 d 后生根率可达 95%，而且幼苗生长健壮(表 1)。

( ) 库安托杨优化再生体系的建立。从表 1 中可以看出，库安托杨叶片不定芽诱导，第 8 组处理效果最

表 1 不同的激素浓度和对比对库安托杨树不定芽诱导培养基筛选的影响

分组	激素浓度及比例			外植体/个	开始分化时间/d	分化外植体/d	不定芽总数/d	分化率(%)
	BA	NAA	BA:NAA					
1	0.1	0.02	5:1	20	12	9	9	45
2	0.3	0.02	15:1	20	12	10	12	50
3	0.5	0.02	25:1	20	11	16	36	80
4	1.0	0.02	50:1	20	13	7	9	35
5	0.1	0.05	2:1	20	16	10	9	50
6	0.3	0.05	6:1	20	13	6	8	30
7	0.5	0.05	10:1	20	14	14	22	70
8	1.0	0.05	20:1	20	11	19	52	95
9	0.1	0.10	1:1	20	12	12	8	60
10	0.3	0.10	3:1	20	17	10	8	50
11	0.5	0.10	5:1	20	14	8	17	40
12	1.0	0.10	10:1	20	12	10	25	50

好,分化效率最高,为 95%,分化时间最短,获得的不定芽数量最多,平均每片分化不定芽 2.7 个,且玻璃化苗数量最少.处理 1 和 11,虽然激素浓度比例相同,但分化结果有差异,说明分化效果主要决定激素浓度含量关系,而比值关系却不是很大.库安托杨最佳再生培养基为 MS + 1.0 mg/L BA + 0.05 mg/L NAA.

2.2 杨树基因枪遗传转化体系的建立

( ) 杨树基因枪遗传转化参数的确立.以库安托杨叶片为受体,确定了基因枪转化的最佳转化参数.最佳基因枪转化参数为:轰击距离 9 cm;氦气压  $7.6 \times 10^7$  Pa;真空度  $8.46 \times 10^4$  Pa.而叶片是否经过渗透处理对转化效果没有影响(表 2~5).

表 2 不同氦气压对转化效率的影响

氦气压力/Pa	轰击叶片数/个	抗性芽个数/个	抗性芽的转化效率(%)
$7.6 \times 10^7$	126	55	40
$9.3 \times 10^7$	126	33	26

表 3 不同轰击距离对转化频率的影响

轰击距离/cm	轰击叶片数/个	抗性芽个数/个	抗性芽的转化效率(%)
3	63	2	3
6	63	25	40
9	63	33	52
12	63	21	30

表 4 不同真空度对转化效率的影响

真空度/Pa	轰击叶片数/个	抗性芽个数/个	抗性芽的转化效率(%)
$6.77 \times 10^4$	126	19	15
$8.46 \times 10^4$	126	25	20

表 5 叶片在轰击前后不同的处理对转化效率的影响

处理方法	轰击叶片数/个	抗性芽个数/个	抗性芽的转化效率(%)
没有处理	49	11	22
只有前处理	49	10	20
前后处理	49	11	22

( ) 卡那霉素筛选.正常的对照外植体接种在不含卡那霉素的培养基中,20 d 左右分化产生不定芽.库安托杨接种在附加卡那霉素 30 mg/L 时,产生不定芽呈黄白色,继续培养则完全白化,死亡.

实验采用的是库安托杨带有叶柄无菌苗叶片,结果发现在同样的条件下,叶柄产生抗性芽的数量明显多于叶片部位,但抗性芽转化率稍低于叶片部位,这可能是由于在同样的选择压下,叶柄抗卡那能力要高于叶片(表 6).

表 6 不同浓度卡那霉素对库安托杨不定芽分化的影响

卡那霉素浓度/mg·L <sup>-1</sup>	总叶片数/个	总叶柄数/个	分化叶片数/个	分化叶柄数/个
0	20	20	15	17
10	20	20	16	14
20	20	20	10	10
30	20	20	9	7
40	20	20	5	3
50	20	20	2	1
60	20	20	0	0
70	20	20	1	0

一般情况下试管苗对卡那霉素不如愈伤组织那样敏感,非转化试管苗也可能在选择培养基上生长.但根对抗菌生素的敏感性很强,因此在含高浓度卡那霉素选择压力的选择培养基上非转化苗很难生根,只有转化苗才可能生根,所以苗生根能力是实现

转化的一个有力证据. 当卡那霉素浓度为 0 时, 5 d 左右就能产生不定根; 当卡那浓度为 10 mg/L 时, 就会对生根产生影响, 而且根数目也少, 不利于产生不定根; 而卡那浓度为 20 mg/L 时, 生根受到明显抑制, 因此可以认为供试杨树在卡那浓度为 20 mg/L 时是最佳筛选浓度(表 7).

表 7 不同浓度卡那霉素对库安托杨生根的影响

卡那霉素浓度/mg·L <sup>-1</sup>	组培苗总株数/株	生根株数/株
0	10	9
10	10	5
20	10	2
30	10	0

库安托杨产生的抗性芽呈丛状, 要在减少细胞分裂素的情况下促使其高生长, 获得真正的植株. 目前, 我们采用在 BA 减半的情况下, 加入 0.02 mg/L GA, 促使其高生长, 待植株长到 1 cm 时, 将其转入含有 30 mg/L 卡那霉素的选择生根培养基上进行生根培养, 待植株长大后进行扩繁.

## 2.2 抗性植株的 PCR 和 Southern 杂交分析

对获得的 25 个库安托杨抗性株系首先进行了 PCR 检测. 部分基因的抗性植株检测结果见图 5. PCR 检测结果显示, 阳性植株与质粒均可扩出一致的特征带, 而未转化的对照库安托杨呈阴性 PCR 带.

PCR 检测结果表明, 有 8 株库安托杨均可扩增出 *vgb*, *BtCry3A+OC-*, *SacB*, *JERF36* 基因的特征带, 3 株可扩出 4 基因带, 4 株可扩出 3 基因带, 3 株可扩出 2 基因带, 7 株可扩出单基因带. 对这 8 株可扩出全部外源基因特征带的植株进一步进行 Southern 杂交验证表明, 其中 7 株含有全部的外源基因, 许多基因呈现多拷贝, 对照无杂交信号, 说明外源基因已经整合进库安托杨中(图 6~9). 由于对同一株系基因组进行单酶切, 许多杂交信号处于同一位置.

## 2.3 *BtCry3A* ELISA 实验

*BtCry3A* ELISA 实验检测的 Bt 蛋白最低浓度为 1 ng/mL. 实验结果显示, 在 PCR 鉴定挑选出的 8 株库安托杨中, 其中 7 株检测到了 Bt 蛋白, 这表明

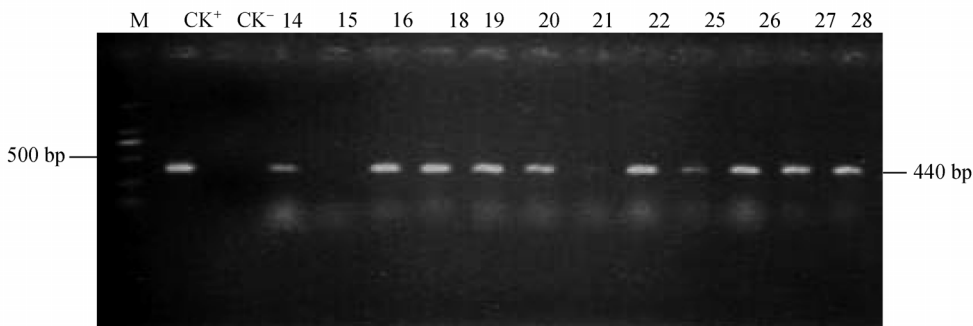


图 5 转 *vgb* 基因的库安托杨 PCR 检测图

M, Marker; CK<sup>+</sup>, 含 *vgb* 基因质粒; CK<sup>-</sup>, 未转基因株; 14~28, 转基因株

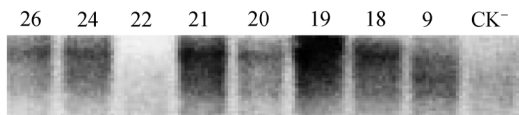


图 6 *SacB* 基因 *Bam*H 单酶切杂交图  
CK<sup>+</sup>, 阳性对照; CK<sup>-</sup>, 未转基因株; 9~26, 转基因株

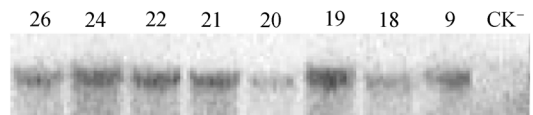


图 8 *vgb* 基因 *Bam*H 单酶切杂交图  
CK<sup>+</sup>, 阳性对照; CK<sup>-</sup>, 未转基因株; 9~26, 转基因株

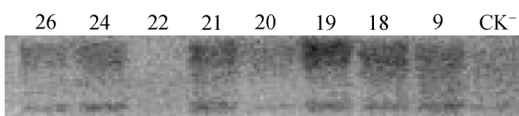


图 7 *BtCry3A+OC-* 基因 *Bam*H 单酶切杂交图  
CK<sup>+</sup>, 阳性对照; CK<sup>-</sup>, 未转基因株; 9~26, 转基因株

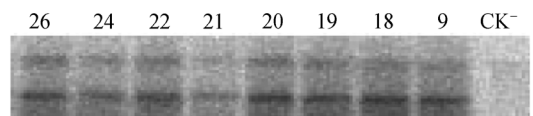


图 9 *JERF36* 基因 *Bam*H 单酶切杂交图  
CK<sup>+</sup>, 阳性对照; CK<sup>-</sup>, 未转基因株; 9~26, 转基因株

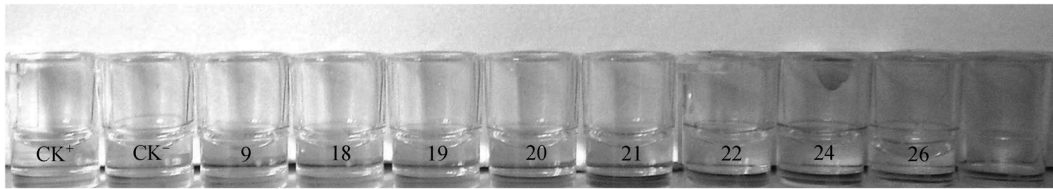


图 10 *BtCry3A* ELISA 实验  
CK<sup>+</sup>, 阳性对照; CK<sup>-</sup>, 未转基因株; 9~26, 转基因株

*BtCry3A* 基因在这 7 株中得到了较好的表达, 与 Southern 杂交的结果相符(图 10).

### 2.4 中试实验

实验地盐碱度在 9‰左右. 实验显示, 与未转基因植株相比, 多数转基因植株生长表现良好(图 11). 表明在这些转基因植株中 *vgb*, *SacB*, *JERF36* 外源基因得到了表达, 与 Southern 杂交的结果相符.

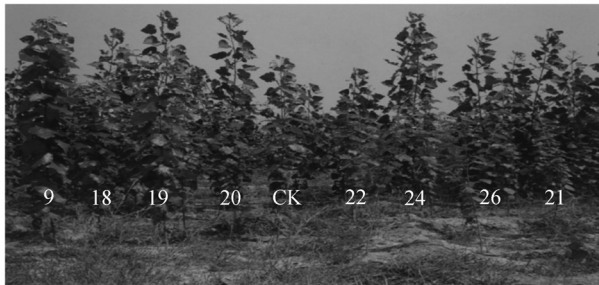


图 11 转基因库安托杨棉植株在天津大港中试实验中的生长状况  
CK, 未转基因株; 9~26, 转基因株

## 3 讨论

### 3.1 多基因共转化中多基因的联合转移

把多个基因构建在同一载体上, 可避免或减少非载体DNA转化法的不确定性和共转化频率低、整合模式复杂以及多个外源基因在后代中分离与重组等问题. 但目前多基因载体的构建和组装面临着一系列的技术难题, 如载体容量、大片段DNA的定点切割与连接等. 因而, 许多实验室采用把多基因构建到不同载体上共转化并取得了较好的效果. Chen等人<sup>[13]</sup>用基因枪法将 14 个带有不同基因的质粒共转化水稻, 有 17%的转化子带有 9~13 个外源基因. Nicholson等人<sup>[8]</sup>通过基因枪法把参与免疫球蛋白抗体形成的 4 个基因及一个选择标记基因同时转化了水稻. 对 64 种转基因水稻代表性群体深入研究表明, 除了选择标

记外, 12 个株系(19%)表达所有 4 种免疫球蛋白组分. Wu等人<sup>[6]</sup>检验了利用基因枪对水稻法进行了 9 个外源基因的共转化, 他们发现, 56%的植株带有 7 个或更多基因. 我们的实验结果表明, 25 个株系中有 7 株(28%)带有全部外源基因. 这些实验表明, 共转化的整合比率比假定的独立整合比率要高得多, 支持多基因共转化时多基因联合转移的结论.

### 3.2 高拷贝数与转基因沉默

传统的观点认为, 基因枪方法易产生多拷贝、导致基因组重排、不稳定和转基因沉默等现象. 不过, 许多实验并不支持上述说法. 研究发现, 在水稻和马铃薯中, 单一拷贝插入和多拷贝插入可以产生等同的效果<sup>[7,14-17]</sup>. 用金色水稻所做的实验表明<sup>[7]</sup>, 高拷贝转基因与高表达水平相伴, 导致胚乳中产生更多的β胡萝卜素. 超过一个拷贝的Bt水稻在大田中也表现了很好的抗虫特性, 表明外源基因得到有效表达<sup>[18,19]</sup>. 在有多拷贝报告基因的转基因小麦得到了外源基因高水平表达的类似观察<sup>[20]</sup>. 在本研究中, 5 个外源基因构建在 4 个表达载体上, 每个表达载体上都带有NPT 基因. 卡那霉素筛选的结果表明, 转基因沉默现象并未发生.

致谢 感谢胡军博士在 Southern 杂交中的帮助.

## 参 考 文 献

- 1 Sivamani E, Huet H, Shen P, et al. Rice plant (*Oryza sativa* L) containing rice tungro spherical virus (RTSV) coat protein transgenes are resistant to virus infection. *Mol Breeding*, 1999, 5: 177—185[DOI]
- 2 冯道荣, 卫剑文, 许新萍, 等. 转多个抗真菌蛋白基因水稻植株的获得及其抗稻瘟病菌的初步研究. *中山大学学报(自然科学版)*, 1999, 38(4): 62—66
- 3 Ye X D, Salim A B, Andreas K, et al. Engineering the provitamin A (beta-carotene) biosynthetic pathway into (carotenoid-free) rice endosperm. *Science*, 2000, 287(14): 303—305[DOI]
- 4 冯道荣, 许新萍, 邱国华, 等. 多个抗病抗虫基因在水稻中的遗传和表达. *科学通报*, 2000, 45(15): 1593—1599

- 5 Maqbool S B, Riazuddin S, Loc N T, et al. Expression of multiple insecticidal genes confers broad resistance against a range of different rice pests. *Mol Breeding*, 2001, 7: 85—93[DOI]
- 6 Wu L, Nandi S, Chen L, et al. Expression and inheritance of nine transgenes in rice. *Transgenic Res*, 2002, 11: 533—541[DOI]
- 7 Datta K, Baisakh N, Oliva N, et al. Bioengineered 'golden' indica rice cultivars with beta-carotene metabolism in the endosperm with hygromycin and mannose selection systems. *Plant Biotechnol J*, 2003, 1: 81—90[DOI]
- 8 Nicholson L, Gonzalez-Melendi P, van Dolleweerd C, et al. A recombinant multimeric immunoglobulin expressed in rice shows assembly dependent subcellular localization in endosperm cells. *Plant Biotechnol*, 2005, 3: 115—127[DOI]
- 9 曹明霞, 黄健秋, 卫志明, 等. 农杆菌介导的水稻多基因转化. *植物学报*, 2005, 47(2): 233—242
- 10 Altpeter F, Fang Y D, Xu J, et al. Comparison of transgene expression stability after *Agrobacterium* mediated or biolistic gene transfer into perennial ryegrass. In: Hopkins A, Wang Z Y, Mian R, et al, eds. *Molecular Breeding of Forage and Turf*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2004. 255—260
- 11 Halpin C. Gene stacking in transgenic plants: The challenge for 21st century plant biotechnology. *Plant Biotechnol J*, 2005, 3: 141—155[DOI]
- 12 Sambrook J, Fritsch E, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 1989
- 13 Chen L, Marmey P, Taylor N J, et al. Expression and inheritance of multiple transgenes in rice plants. *Nat Biotechnol*, 1998, 16: 1060—1064
- 14 Datta K, Vasquez A, Tu J, et al. Constitutive and tissue-specific differential expression of *cryIA* (b) gene in transgenic rice plants conferring resistance to rice insect pest. *Theor Appl Genet*, 1998, 97: 20—30[DOI]
- 15 Tu J, Datta K, Alam M F, et al. Expression and function of a hybrid Bt toxin gene in transgenic rice conferring resistance to insect pests. *Plant Biotechnol*, 1998, 15: 183—191
- 16 Tu J, Ona I, Zhang Q, et al. Transgenic rice variety IR72 with Xa21 is resistant to bacterial blight. *Theor Appl Genet*, 1998, 97: 31—36[DOI]
- 17 Romano A, Raemakers K, Bernardi J, et al. Transgene organization in potato after particle bombardment-mediated (co)transformation using plasmids and gene cassettes. *Transgenic Res*, 2003, 12: 461—473[DOI]
- 18 Tu J, Zhang G, Datta K, et al. Field performance of transgenic elite commercial hybrid rice expressing *Bacillus thuringiensis* d-endotoxin. *Nat Biotechnol*, 2000, 18: 1101—1104[DOI]
- 19 Ye G, Tu J, Hu C, et al. Transgenic IR72 with fused Bt gene *cry1AB/cry1Ac* from *Bacillus thuringiensis* is resistant against four lepidopteran species under field conditions. *Plant Biotechnol*, 2001, 18: 125—133
- 20 Stoger E, Williams S, Keen D, et al. Molecular characteristics of transgenic wheat and the effect on transgene expression. *Transgenic Res*, 1998, 7: 463—471[DOI]

(2006-07-18 收稿, 2006-11-02 接受)