

抗线虫基因表达载体构建与转化甘蔗研究初报*

陈平华 许莉萍 陈如凯

福建农林大学甘蔗研究所 福州 350002
农业部甘蔗生理生态与遗传改良重点实验室

摘要 试验研究利用德国引进的抗线虫基因 *Hs1 pro-1* 构建表达载体并转化甘蔗 (*Saccharum officinarum* L.), 以获得抗线虫转基因植株。提取克隆载体 P1832 用 *Nco* I 酶切、Klenow 补平和 *Sac* I 酶切, 回收基因片段; 提取表达载体 pBIL-1 用 *Kpn* I 酶切、T4 DNA polymerase 补平和 *Sac* I 酶切, 回收大片段; 目的片段用 T4 DNA ligase 连接并转化 *E. coli*, 鉴定重组质粒; 用基因枪轰击转化甘蔗品种“ROC”16 获得 16 株再生苗, 其中 4 株经 PCR 检测呈阳性, 通过 Southern 杂交, 证明 *Hs1 pro-1* 基因已整合到其中 3 株甘蔗基因组中。

关键词 抗线虫基因 表达载体构建 基因枪轰击 甘蔗

Construction of expression vector of nematode-resistant gene and transformation of sugarcane. CHEN Ping-Hua, XU Li-Ping, CHEN Ru-Kai (Institute of Sugarcane, Fujian Agricultural and Forestry University; Key Lab of Eco-physiology and Genetic Improvement for Sugarcane, Ministry of Agriculture, Fuzhou 350002), *CJEA*, 2004, 12(4): 57~59

Abstract The expression vector of *Hs1 pro-1* of nematode-resistant gene cloned by the Germany scientists was constructed and transformed into sugarcane to get the transgenic plants. The cloned vector P1832 was digested with restriction nuclease *Nco* I, DNA polymerase I Large Fragment and *Sac* I in order. The short fragment was purified. Expression vector pBIL-1 was digested with *Kpn* I, blunted with T4 DNA polymerase and digested again with *Sac* I. The large fragment was isolated. The short fragment of P1832 was ligated with the large fragment of pBIL-1 by T4 DNA ligase and the reactant was transferred into *E. coli*. The recombinant plasmid was identified and transformed into sugarcane genotype “ROC” 16 via particle bombardment. Sixteen kanamycin-resistant sugarcane seedlings were obtained and four seedlings were positive by PCR, of which three were proved to be transgenic plants by southern blot.

Key words Nematode resistance gene, Construction of expression vector, Particle bombardment, Sugarcane

线虫 (*Heterodera avenae*) 侵入或取食甘蔗幼嫩根尖, 造成根尖畸形或侧根消失, 使植株丧失吸收功能而变黄甚至萎焉死亡。传统采用土施农药防治线虫, 成本高且严重污染环境。本研究利用德国引进的抗线虫基因 *Hs1 pro-1*^[3,4], 通过基因枪轰击法^[4-6] 获得转基因甘蔗植株, 使甘蔗自身获得线虫病抗性, 为降低甘蔗生产农药使用量寻求有效途径^[7]。

1 试验材料与方法

供试甘蔗材料为引进优良品种“ROC”16, 取自福建农林大学农业部甘蔗生理生态与遗传改良重点开放实验室农场。由德国引进含有 *Hs1 pro-1* 基因的克隆载体 P1832, 载体大小约 4kb, *Hs1 pro-1* 长 1.4kb, 植物表达载体 pBIL-1 大小约 12kb, 含有玉米泛激素 UBI 启动子、1 个外源基因 (*Lfy*)、胭脂碱合成酶基因终止子和 NPT II 选择标记基因, 克隆载体和表达载体的宿主菌为 *DH5 α* 。pBIL-1 和菌株由中国热带农业科学院热带作物生物技术国家重点实验室提供。本研究所用限制性内切酶购自华美生物工程公司, 其他工具酶和 DNA 纯化回收试剂盒及合成特异引物由上海生物工程公司提供, 基因枪 PDS-1000/He、金粉、可裂膜、载体膜等为 Bio-Rad 公司产品, DIG DNA Labeling and Detection Kit (Cat. No. 1093657) 为 Roche 公司产品, 常规药品均为分析纯。表达载体构建流程按图 1 设计, 细菌生长培养基为 LB, 质粒提取与纯化采用碱裂解法^[1]。根据 P1832 上基因片段两端单一酶切位点 *Nco* I、*Sac* I 和 pBIL-1 上单一酶切位点 *Kpn* I、*Sac* I 进行酶切鉴定。提取克隆载体 P1832, 用 *Nco* I 酶切、Klenow 补平和 *Sac* I 酶切, 回收基因片段; 提取表达载体 pBIL-1

* 国家自然科学基金项目 (39870545)、国家高技术发展 (863) 计划项目 (2001AA241191, 2002AA241031) 共同资助

收稿日期: 2003-09-20 改回日期: 2003-10-31

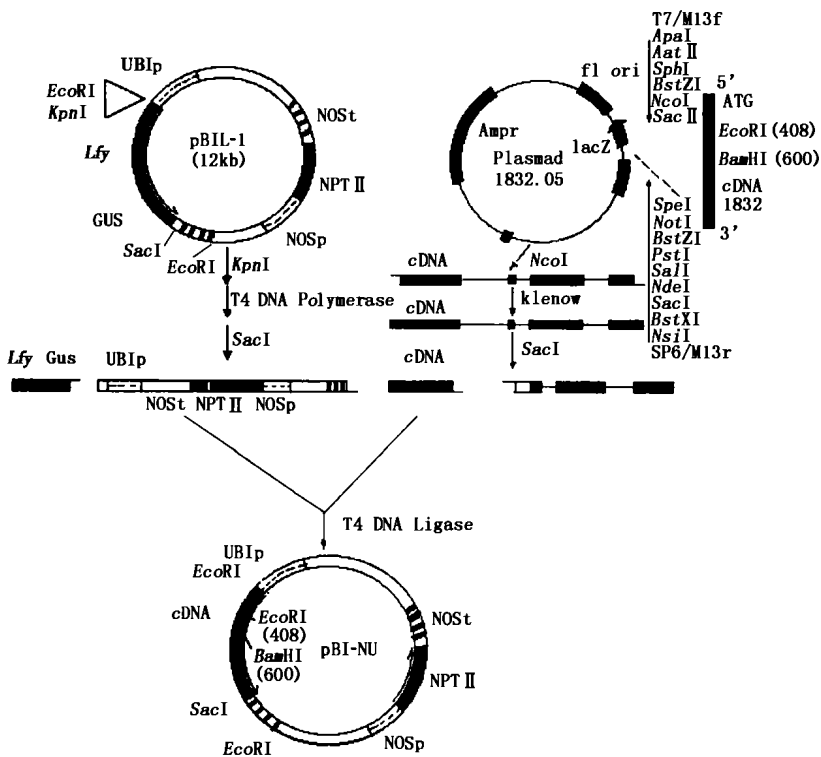


图 1 UBI 启动子表达载体构建

Fig. 1 Construction of the expression vector pBI-NU

用 *Kpn* I 酶切、T4 DNA polymerase 补平和 *Sac* I 酶切,回收大片段;基因片段和载体大片段用 T4 DNA ligase 连接。选定 *Hs1 pro-1* 上单一酶切位点 *Bam*HI 和连接位点之一 *Sac* I 作为重组质粒鉴定的酶切组合,双酶切位点之间片段长度为 800bp 左右。鉴定的重组质粒命名为 pBI-NU,用碱裂解法大量提取。本实验室成熟的甘蔗再生技术包括诱导培养基 MS + 2,4-D 3mg/L;继代培养基 MS + 2,4-D 2mg/L;分化培养基 MS + BA 2mg/L + NAA 0.1mg/L;促根培养基 MS + NAA3mg/L + BA0.1mg/L,依据上述技术建立甘蔗再生体系。选继代 1 次生长良好的胚性愈伤组织,切成直径 2mm 左右的粒状小块并分 3 瓶,每瓶 20 粒,接入含卡那霉素的继代培养基上,测定“ROC”16 胚性愈伤组织最低抑制浓度。卡那霉素浓度设 210mg/L、240mg/L、270mg/L、300mg/L、330mg/L 和 360mg/L 6 种梯度,以不含卡那霉素的培养基为对照。每 10d 继代 1 次,40d 后记载胚性愈伤组织相对生长量,以相对生长量无变化的最低浓度为最低抑制浓度,相对生长量表达式为:

$$\text{相对生长量} = \frac{\text{处理生长量}}{\text{对照生长量}} \times 100\% \quad (1)$$

选甘蔗继代 1 次生长良好的胚性愈伤组织,切成直径 2mm 左右的粒状小块,接入预处理培养基 MS + 2,4-D 2mg/L + Sorbitol 0.2mol/L + Mannitol 0.2mol/L,预脱水 8h 后进行轰击。将重组质粒 pBI-NU 浓缩至 $1\mu\text{g}/\mu\text{L}$ 。金粉预处理、微弹制备与涂膜过程均按基因枪 PDS-1000/He 说明书进行。轰击参数:可裂膜选 900psi、1100psi 和 1350psi 3 种规格,可裂膜与发射盘相距 1/4 英寸,轰击距离设 6cm 和 9cm 2 种,真空度设定为 28inches Hg。轰击后的愈伤组织仍放回预处理培养基上继续处理 18h,其后接入继代培养基上恢复培养 7d,之后愈伤组织转移至 MS + 2,4-D 2mg/L + kanamycin 300mg/L 培养基上筛选,10d 继代 1 次,继代 5 次后将存活的愈伤组织接入分化培养基,抗性苗长至 5cm 高后转入促根培养基上培养。根据 *Hs1 pro-1* 的碱基序列,从设计的几种上、下游引物中筛选出特异性较强的上游引物 P1:5'-GGGCGCGTTGGATT-3' 和下游引物 P2:5'-CTCCATAACCTCCCTATCGC-3' 作为转基因植株 PCR 检测特异引物,以 820bp 长度的特异扩增条带作为基因检测特异条带。用 CTAB 法微量提取 DNA^[2],对抗性苗 DNA 进行 PCR 检测,加样成分为双蒸水 $13.35\mu\text{L}$,10 倍反应缓冲液 $2\mu\text{L}$,4 种三磷酸脱氧核苷酸混合物(dNTP,10mmol/L) $0.25\mu\text{L}$,镁离子(MgCl_2 25mmol/L) $1.6\mu\text{L}$,上、下游引物 P1、P2($10\mu\text{mol}/\text{L}$)各 $1\mu\text{L}$,Taq DNA 聚合酶($5\text{u}/\mu\text{l}$) $0.3\mu\text{L}$,抗性再生苗模板 DNA $0.5\mu\text{L}$,反应总体积 $20\mu\text{L}$ 。PCR 反应程序为 94°C 预变性 5min,循环参数为 94°C 变性 30s, 58°C 退火 50s, 72°C 延伸 90s,共 35 个循环,反应结束后 72°C 延伸反应 10min 后置 4°C 保存。Southern blot 按照 DIG DNA Labeling and Detection Kit 说明进行。

2 结果与分析

UBI 启动子表达载体构建。根据单一酶切位点对 P1832 和 pBIL-1 进行酶切鉴定,结果无误(见图 2)。pBIL-1 经 *Kpn* I 和 *Sac* I 双酶切,大片段长约 9kb;P1832 经 *Nco* I 和 *Sac* I 双酶切,小片段长约 1.4kb 左右。回收纯化并连接 pBIL-1 大片段和 P1832 小片段,连接反应液直接转化 *E.coli* 感受态细胞,用含 Kanamycin 平板筛选,对产生的抗性单菌落进行扩增和质粒提取,用 *Bam*HI 和 *Sac* I 双酶切鉴定,筛选出 1 个重

组质粒,命名为 pBI-NU,结果见图 3。图 3 表明抗性单菌落质粒用 *Bam*H I 和 *Sac*I 消化后,在第 7 泳道出现 2 个条带,1 条分子量为 800bp 左右的片段,小于第 16 泳道的小片段(全基因片段),与设计酶切小片段大小一致;另 1 条分子量略大于第 15 泳道大片段(载体大片段),这与其比载体大片段多 600bp 一致,说明含 *Hs1 pro-1* 的表达载体构建正确。

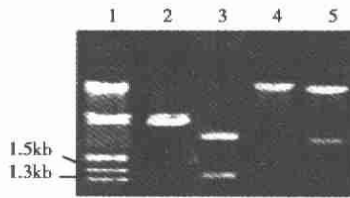


图 2 P1832、pBIL-1 酶切鉴定*

Fig. 2 Identification of P1832 and pBIL-1 by enzymes

*图中 1 为 λ DNA/*Eco*R I + *Hind* III Marker 2 为 P1832 质粒,3 为 P1832 *Sac*I、*Nco*I 双酶切,4 为 pBIL-1 质粒,5 为 pBIL-1 *Kpn*I、*Sac*I 双酶切。

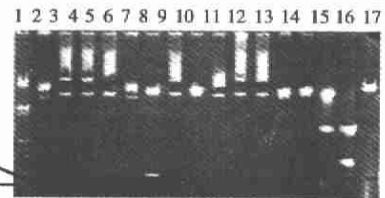


图 3 UBI 启动子重组质粒筛选*

Fig. 3 Screening of the recombinant plasmid driven by UBI promoter

*图中 1 为 λ DNA/*Eco*R I + *Hind* III 标准分子量,2~14 为各处理质粒经 *Bam*H I + *Sac*I 双酶切,15 为 pBIL-1 用 *Kpn*I/*Sac*I 双酶切,16 为 P1832 用 *Nco*I/*Sac*I 双酶切,17 为 pBIL-1 质粒。



图 4 甘蔗转化抗性再生苗 PCR 检测*

Fig. 4 Detection of the kanamycin-resistant seedlings of sugarcane by PCR

*图中 1、2、3、4 为“ROC”16 转化再生苗,5 为对照 P1832,6 为“ROC”16 未转化苗,7 为 GeneRuler(SM0321, Sangon)。

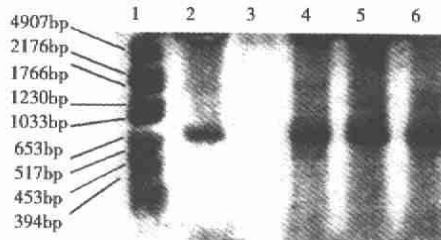


图 5 PCR 阳性再生苗 Southernblot 杂交鉴定*

Fig. 5 Southern blot identification of the PCR-positive seedlings of sugarcane

*图中 1 为 Control DNA,2 为 pBI-NU 质粒,3 为对照(“ROC”16 未转化苗),4、5、6 为“ROC”16 转化苗。

基因枪轰击遗传转化。根据“ROC”16 胚性愈伤组织在含卡那霉素培养基上的重量是否增加确定其生长情况,处理与对照相比所得相对生长量若在某一浓度以上连续恒定在同一水平,说明愈伤组织未生长,则该浓度为最低抑制浓度,本研究确定 300mg/L 为卡

那霉素最低抑制浓度。利用 PDS-1000/He 基因枪,按照设计参数进行轰击,将构建的质粒转化入甘蔗愈伤组织,经筛选分化,在轰击参数 1100psi、轰击距离 6cm、真空度 28inches Hg 处理中获得 16 株抗性再生苗,其中 4 株经 PCR 检测呈阳性反应(见图 4),3 株经 Southern blot 鉴定有杂交信号(见图 5)。

3 小 结

甘蔗遗传转化最困难,目前基因枪轰击被认为是禾本科植物遗传转化最有效的方法^[5-7]。本试验在卡那霉素筛选过程中发现虽有抗性愈伤组织生长,但分化成苗困难,尤其是筛选代数增加时更甚,且甘蔗组织对卡那霉素反应较迟钝,最低致死浓度很高,导致有些愈伤组织缓慢生长,而内部生理机制有可能已受到伤害而分化困难,易出现黄化苗,降低正常抗性植株比率,故用卡那霉素作为甘蔗筛选抗生素尚待完善。

参 考 文 献

- 1 Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. 著,金冬雁,黎孟枫等译. 分子克隆实验指南(第二版). 北京:科学出版社,1993. 26~28
- 2 Clark M.S. 主编,顾红雅,瞿礼嘉主译. 植物分子生物学试验手册. 北京:高等教育出版社,1998. 6~7
- 3 Cai D. Position cloning of a gene for nematode resistance in sugar beet. *Science*, 1997, 275:832~834
- 4 Gheysen G. The exploitation of nematode-responsive plant genes in novel nematode control methods. *Pestic. Sci.*, 1996, 47:95~101
- 5 Becker D. Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue. *Plant J.*, 1994, 5:299~307
- 6 Cassas A. M. Transgenic sorghum plants via microprojectile bombardment. USA: *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 1993, 90:11212~11216
- 7 Nehra N. S. Self-fertile transgenic wheat plants regenerated from isolated scutellar tissues following microprojectile bombardment with distinct gene constructs. *Plant J.*, 1994, 5(2):285~297