

农杆菌介导的半夏 *GUS* 基因瞬时表达

贾永芳¹, 马玉坤¹, 郭余龙², 李名扬²

(1. 河南师范大学 生命科学学院, 河南 新乡 453007; 2. 西南大学 花卉研究所, 重庆 400716)

摘要: 采用根癌农杆菌感染半夏无菌叶片、叶柄和愈伤组织, 对 *GUS* 基因的瞬时表达进行研究, 并分析了不同转化受体、感染时间、菌液浓度、共培养、预培养时间、菌种对 *GUS* 基因的瞬时表达的影响。结果显示, 以半夏的无菌苗叶柄和愈伤组织, 在 OD 值为 0.2 的 EHA101 或 EHA105 农杆菌液中感染 15 min, 叶柄暗处共培养 3 d, 愈伤组织 2 d, 能够得到较高的 *GUS* 基因瞬时表达。

关键词: 半夏; 根癌农杆菌; *GUS* 基因; 瞬时表达

中图分类号: S567.23⁺9 文献标识码: A 文章编号: 1000-7091(2007)04-0042-04

Research on the Transient Express of *GUS* Gene by *Agrobacterium tumefaciens* in *Pinellia ternata* Breit

JIA Yongfang¹, MA Yurkun¹, GUO Yurong², LI Mingyang²

(1. College of Life Science, Henan Normal University, Xinxiang 453007, China;

2. Flower Research Institute, Southwest University, Chongqing 400716, China)

Abstract: Young leaves, petioles and calli of *Pinellia ternata* Breit were transformed with *GUS* gene via *Agrobacterium tumefaciens*. The effects of different explants, infection period, concentration of *Agrobacterium tumefaciens*, days of co culture and pre culture, and strains on the transient expression of *GUS* gene were analyzed. The result indicated that a higher transient express rate of *GUS* gene could be acquired from the explant petioles and calli which were dipped into *Agrobacterium* suspension EHA102 or EHA105 (OD₆₀₀ adjusted to 0.2) for 15 min, and co cultured for 3 days and 2 days, respectively, in darkness.

Key words: *Pinellia ternata* Breit; *Agrobacterium tumefaciens*; *GUS* gene; Transient express

半夏 (*Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.) 是我国的传统中草药。半夏的遗传转化工作至今还未见报道, 为此, 我们选用半夏的愈伤组织、叶, 采用农杆菌法初步探索半夏的遗传转化, 用 *GUS* 基因的瞬时表达情况来摸索半夏遗传转化的条件。旨在为进一步进行半夏遗传转化的研究提供参考, 同时为以后利用基因工程等技术对半夏品质改良等提供理论依据。

1 材料和方法

1.1 材料

半夏无菌苗及愈伤组织。试验所用质粒为 pIG121 (图 1), 由日本信州大学小岛峰雄教授惠赠。

菌株为 EHA101, EHA105, LBA4404 3 个根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株, 均含有 pIG121 质粒, 17 347 bp。由西南大学花卉研究所分子生物学实验室保存。继代培养基为 MS1: MS+ 2.0 mg/L 2, 4-D+ 0.5 mg/L KT。

1.2 方法

1.2.1 培养条件 25℃, 12 h 光照/12 h 黑暗光周期, 1 500~2 000 lx 光强度的培养室中进行。根癌农杆菌在 28℃, 180 r/min 的条件下, 恒温摇床上培养^[1,2]。

1.2.2 转化方法 取半夏无菌苗的叶片, 切成 0.5 cm×0.5 cm 大小, 叶柄切成约 0.5 cm 长的切段, 愈伤组织块浸入备好的农杆菌菌液中感染, 之后转入

收稿日期: 2006-10-26

作者简介: 贾永芳 (1978-), 女, 河南卫辉人, 讲师, 硕士, 主要从事分子生物学教学与研究工作。

铺有滤纸的 MS1 培养基中, 暗处共培养, 脱菌后接种到 MS1+ 500 mg/L Cef+ 100 mg/L Kan 培养基中进行筛选培养, 20 d 转接 1 次。我们对遗传转化过

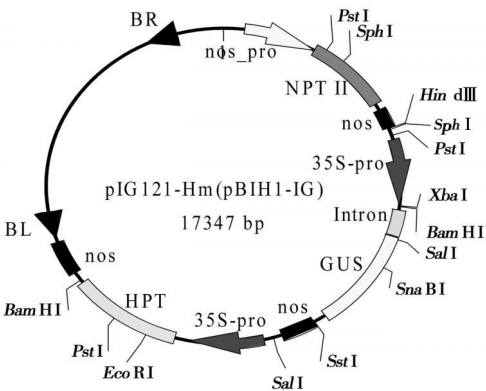


图 1 pIG121-Hm 质粒图谱

Fig. 1 Plasmid pIG121-Hm atlas

程中的几个影响因子进行了初步的研究, 包括转化

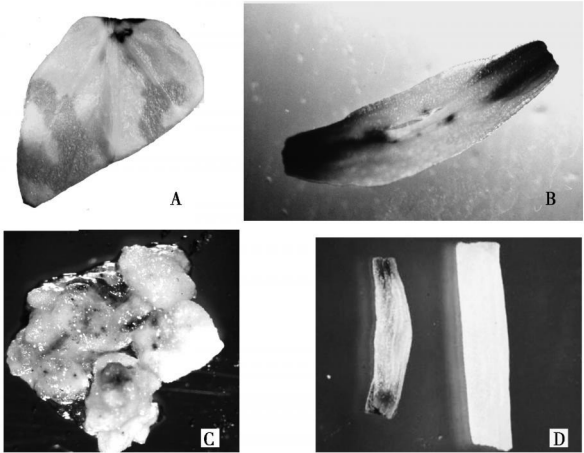
表 1 转化受体对 GUS 基因瞬时表达的影响

Tab. 1 Effect of explant on transient express of GUS gene

转化受体 Explant	GUS 染色个体数 No. of explant	有蓝点的体数 No. of GUS explant	染色频率 ^a / % Frequency of GUS explant	染色状态 State of GUS
叶片 Leaves	32	14	43. 8	+
叶柄 Petioles	39	31	79. 5	++
愈伤 Calli	42	34	80. 9	++

注: ^a. (有 GUS 蓝点的外植体数/ 总的外植体数) × 100%; + . 蓝点较小, 数目较少; ++ . 蓝点多亦大

Note: ^a. (Number of GUS explant/ no. of explant) × 100%; + . GUS spots are smaller and fewer; ++ . GUS spots are bigger and more



A. 叶片, 32×; B. 叶柄, 50×; C. 愈伤, 50×; D. 叶柄对照, 32×

A. Leaves, 32×; B. Petiole, 50×; C. Calli, 50×; D. CK of petiole, 32×

图 2 根癌农杆菌感染后 GUS 基因的瞬时表达

Fig. 2 Transient express of GUS gene after transformed

2.2 根癌农杆菌菌液浓度及感染时间对 GUS 基因瞬时表达的影响

根癌农杆菌浓度及感染时间是影响遗传转化频率的重要因子。我们以半夏叶柄为受体, 以不同的菌液浓度与时间的组合进行研究。调整根癌农杆菌菌液 OD(600) 值为 0. 2, 0. 5, 0. 6, 1. 0, 感染时间设置为 5, 10, 15, 30 min 4 个梯度, 共培养后检测 GUS 基

植物材料、根癌农杆菌菌液浓度和感染时间、共培养、预培养和根癌农杆菌菌株等因子。重复 3 次。共培养后检测 GUS 基因瞬时表达率, 即在 28℃、避光条件下按王关林^[3] GUS 染色的方法(即组织化学染色定位法), 以 5-溴-4-氯-3-吲哚-β-D 葡萄糖苷酸脂为底物, 染色 12 h 后检测, 并统计结果。

2 结果与分析

2.1 转化受体对 GUS 瞬时表达的影响

分别取叶片和叶柄、愈伤组织用同一条件转化, 叶柄的 GUS 瞬时表达频率要远远高于叶片, 叶柄切口两端均能被感染, 叶片的切口很少被感染, 感染处多集中在叶脉附近, 且频率较低(表 1)。愈伤组织的感染频率同叶柄(图 2)。因此, 本试验选用叶柄与愈伤组织作为农杆菌转化的遗传转化受体。

因瞬时表达率。发现半夏叶柄对农杆菌不敏感, 需要较长的感染时间, 宜采用较低的菌液浓度。这与汲逢源等^[4]研究大豆下胚轴转化菌液浓度 OD= 0. 5 时, 菌液稀释倍数越高, 转化率大幅度降低有一定的差异。叶柄感染后的 GUS 瞬时表达显示: 感染时间为 15 min, 农杆菌 OD 值为 0. 2, GUS 瞬时表达率最高。当感染时间过长(30 min), 外植体容易因农杆菌毒害缺氧而软腐, 并且脱菌困难。感染时间过短(5 min), 则在其共培养时农杆菌生长不良, GUS 瞬时表达率较低。较高的菌液浓度也会造成农杆菌毒害并在共培养时过度生长, 我们用 GUS 染色其瞬时表达的情况如图 3 所示。

2.3 共培养对 GUS 基因瞬时表达的影响

共培养时间设置为 0, 1, 2, 3, 4, 6 d 6 个梯度, 共培养后检测 GUS 基因瞬时表达率, 20 d 后统计污染率, 结果见表 2。发现共培养后 GUS 染色瞬间表达显示叶柄共培养 3 d 后可以达到最大的 GUS 基因瞬间表达率(95%), 愈伤组织共培养 2 d 达到最高的 GUS 基因瞬间表达率(80. 4%)。综合研究结果, 我们确定了叶柄最佳共培养的天数为 3 d, 愈伤组织为 2 d。

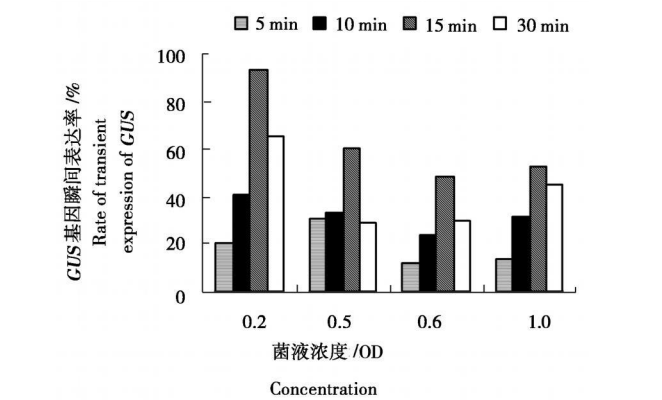


图3 根癌农杆菌感染浓度及感染时间对 *GUS* 基因瞬时表达的影响

Fig.3 Effect of *Agrobacterium* concentration and infection period on transient express of *GUS* gene

2.4 预培养对转化的影响

试验中发现,叶柄是否预培养是转化工作成功与否的关键。取叶柄在固体 MS1 培养基上分别预培养 0, 2, 4, 6 d, 并用同一条件转化。检测 *GUS* 基因瞬时表达率。发现只有不经过预培养 的感染受体能够检

测到 *GUS* 染色瞬间表达, 经过预培养的受体没有检测到 *GUS* 染色瞬间表达(图 4)。可能半夏的器官过于幼嫩, 转化时叶柄暴露的时间不宜过长, 否则易使转化失败。愈伤组织在转化前是否进行预培养对 *GUS* 基因的瞬时表达影响不大。

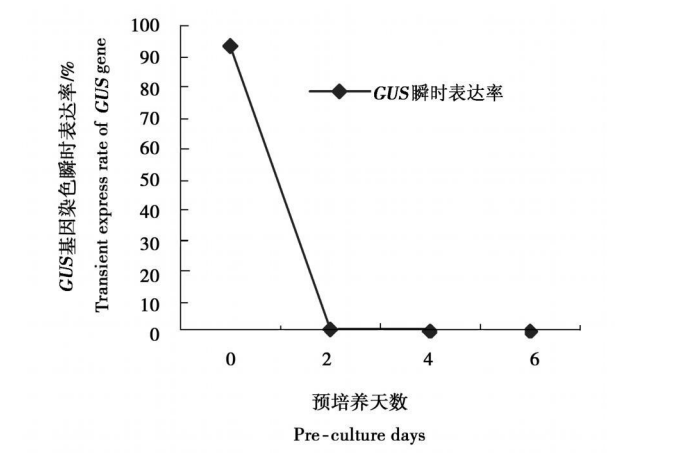


图4 预培养对 *GUS* 基因瞬时表达的影响

Fig.4 Effect of pre culture on transient express of *GUS* gene

表 2 共培养天数对 <i>GUS</i> 基因瞬时表达的影响				
Tab.2 Effect of co culture days on transient express of <i>GUS</i> gene				
共培养天数/d Co culture days	叶柄 <i>GUS</i> 瞬间表达率/% Transient express of <i>GUS</i> gene in petiole	叶柄污染率/% Rate of polluted petiole	愈伤 <i>GUS</i> 瞬间表达率 ^a / % Transient express of <i>GUS</i> gene in calli	愈伤污染率 ^b / % Rate of polluted calli
0	0	0	0	0
1	1. 1	0. 5	10. 5	0
2	30. 2	0. 5	80. 4	0
3	95. 0	0. 5	42. 3	0. 5
4	60. 5	2. 1	46. 5	2. 5
6	20. 3	10. 2	39. 8	7. 3

注: a. (有蓝点的愈伤块数/ 总的染色块数) × 100%; b. (污染的愈伤块数/ 总的愈伤块数) × 100
Note: a. (Number of calli/no. of calli) × 100% . b. (Number of polluted calli/ no. of calli) × 100

2.5 不同菌株对 *GUS* 基因瞬时表达的影响

取叶柄, 采用 EHA101, EHA 105, LBA 4404 3 个菌株, 进行感染, 共培养后检测 *GUS* 基因瞬时表达率。结果显示, EHA101, EHA 105 2 个菌株的感染毒力要

明显大于 LBA4404。这可能是农杆菌吸附数目与菌株类型有关, 胭脂碱型农杆菌比章鱼碱型农杆菌更易附着在单子叶植物细胞的表面的缘故。结果如表 3。

表 3 不同菌株对 <i>GUS</i> 基因瞬时表达的影响					
Tab.3 The effect of <i>Agrobacterium</i> strain on transient express of <i>GUS</i> gene					
菌株 <i>Agrobacterium</i> strain	感染叶柄个数 Number of petiole	<i>GUS</i> 染色叶柄数 Number of <i>GUS</i> petiole	<i>GUS</i> 蓝点数(两端) Number of <i>GUS</i> spot(two ends)	叶柄 <i>GUS</i> 染色频率 ^a / % Frequency of <i>GUS</i> petiole	<i>GUS</i> 染色平均蓝点数 ^b Average <i>GUS</i> spots
LBA4404	96	11	19	11. 46	0. 19
EHA101	89	80	142	89. 90	1. 60
EHA105	90	69	112	76. 70	1. 24

注: a. (有 *GUS* 蓝点的叶柄数/ 总的叶柄数) × 100%; b. *GUS* 蓝点总数/ 总的叶柄数
Note: a. (Number of *GUS* petiole/no. of petiole) × 100%; b. Number of *GUS* spots/no. of petiole

3 讨论

3.1 *GUS* 标记基因在植物遗传转化中的应用

GUS 基因存在于某些细菌体内, 编码 β-葡萄糖

苷酸酶(β-glucuronidase, *GUS*)。绝大多数植物内不存在内源的 *GUS* 活性, 许多细菌和真菌菌也缺乏内源 *GUS* 活性, 因而 *GUS* 基因广泛用做转基因植物、细菌、真菌的报告基因, 尤其在研究外源基因的瞬时

表达的转化试验中, *GUS* 基因应用最多^[3]。本试验选用的质粒 pIG121 含有带内含子的 *GUS* 基因, 菌液无法用 *GUS* 染液染出蓝色, 只有该质粒转化到植物细胞之后, *GUS* 基因才能表达; 三叶半夏经检测其细胞不存在内源 *GUS* 活性, 在我们做 *GUS* 基因瞬时表达的检测时, 设置了非转化材料为对照 (图 2-D), 基本上保证了 *GUS* 基因表达结果的可靠性。

3.2 转化条件对 *GUS* 基因瞬间表达的影响

以半夏的无菌苗叶柄和愈伤组织, 进行遗传转化工作, 能够得到较高的 *GUS* 基因瞬间表达率。说明在半夏的遗传转化工作中, 转化材料、根癌农杆菌菌液浓度和感染时间、共培养和根癌农杆菌菌株等因素的选择都起着至关重要的作用。而是否进行预

培养工作是本试验成败的关键, 这可能与半夏材料过于幼嫩, 伤口脱分化速度快, 以及经过预培养后转化材料对农杆菌更加不敏感有关。

参考文献:

- [1] 郭余龙, 贾永芳, 杨星勇, 等. 半夏的组织培养及其成分比较[J]. 农业生物技术学报, 2003, 11(3): 259–262.
- [2] 贾永芳, 侯玉杰. 三叶半夏细胞悬浮培养和植株再生的研究[J]. 河南师范大学学报, 2004, 32(4): 141–143.
- [3] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学技术出版社, 1998.
- [4] 汲逢源, 王戈亮, 许亦农, 等. 抗氧化剂对农杆菌介导的大豆下胚轴 *GUS* 基因瞬间表达的影响[J]. 植物生态学报, 2006, 30(2): 330–334.

欢迎订阅 2008 年《大豆科学》

《大豆科学》是由黑龙江省农科院主办的学术性期刊。《大豆科学》是中国自然科学核心期刊, 中国科学引文数据库来源期刊及国内外多家权威数据库收入期刊源。主要刊登有关大豆的遗传育种, 品种资源, 生理生态, 耕作栽培、病、虫、杂草防治, 营养施肥, 生物技术、食品加工、药理研究和工业用途等方面的科研报告, 学术论文, 国内、外研究进展评述, 研究简报, 学术活动简讯、新品种介绍等。

《大豆科学》主要面向从事大豆科学研究的科技工作者, 大专院校师生、各级农业技术推广部门的技术人员及科技种田的农民。

国内外公开发行, 双月刊, 16 开本, 每期 200 页。国内每期订价: 10.00 元, 全年 60.00 元, 邮发代号: 14–95。国外每期订价: 10.00 美元(包括邮资), 全年 60 美元。国外由中国国际图书贸易总公司发行, 北京 399 信箱。国外代号: Q5587。

本刊热忱欢迎广大科研及有关企事业单位刊登广告, 广告经营许可证号: 2301004010071。

地址: 哈尔滨市南岗区学府路 368 号《大豆科学》编辑部。

邮编: 150086

电话: 0451–86668735

E-mail: dadoux@sina.com ddkexue@126.com