

小麦原生质体的电激介导基因转移

李宏潮 胡道芬

(北京市植物细胞工程实验室, 北京 100081)

尾高志 町井博明 平林利郎

(日本国立农业生物资源研究所, 日本, 筑波)

摘 要 从小麦品种“Bodallin”胚性悬浮细胞分离出原生质体, 通过电激将质粒 PBC 1 DNA (携带 β -葡萄糖苷酸酶 (GUS) 标记基因和潮霉素抗性基因 hph) 导入原生质体。采用 BTX 电激系统和 ASP 电激缓冲液, 最佳电激条件为 300V (750V/cm) 和 50ms (约 1000F), 转化的原生质体内 GUS 的活性最高; 质粒 DNA 的有效使用浓度为 $25\mu\text{g/ml}$ 。电激处理后, 原生质体培养 2~3 天, GUS 基因表达最强, 宜于检测其瞬时表达; 牛胸腺 DNA 可协助提高 GUS 基因的导入效果。质粒 PBC 1 DNA 处理的原生质体培养于添加潮霉素的 KM P 培养基。经 4 个月抗性筛选, 选择获得 15 个潮霉素抗性克隆。

关键词 小麦原生质体 电激 基因导入 GUS 活性 潮霉素抗性克隆

电激介导法是禾谷类作物进行直接基因转导的主要方法之一。该方法以原生质体作为外源基因的受体具有几个优点:① 无细胞壁, 易于电激穿孔, 导入外源 DNA;② 提供庞大的单细胞群体作为基因转导受体;③ 减少或消除基因转化的嵌合体。

小麦的原生质体培养已在数个实验室获得成功^[1, 2, 9], 使电激法转化基因成为可能。过去由于受原生质体培养困难的制约, 小麦的电激基因转导工作进展缓慢, 虽有少数几例通过电激成功地把外源基因导入小麦原生质体^[7, 8, 10], 但转化效率较低。例如, Zhou 等^[11]从 60×10^6 个原生质体中仅获 6 个抗性克隆。因此需要研究电激处理的适宜条件, 分析影响基因有效转导的因素, 改善转化效率。

我们已从数个小麦基因型获得了原生质体的再生植株^[1, 2], 并建立了相适应的培养方法。本研究的目标是以小麦原生质体为材料, 利用电激系统转导外源 DNA, 分析影响转导效率的因素, 建立适合于小麦原生质体电激基因转移的方法和程度。

1 材料和方法

1 1 原生质体分离

小麦品种 Bodallin 的幼胚产生的愈伤组织, 经 3~6 个月悬浮培养, 建立起胚性细胞系。继代第 3 天, 收集悬浮细胞酶解 4~6 h, 释放原生质体。酶液成份为: 纤维素 RS 3%, 离析酶 Y-23 0.1%, KHP 培养基的大量元素, MES 0.1%, 甘露酶 11%, pH 5.6。分离的原生质体经 38 μ m 过滤, 两次漂洗和一次纯化, 密度调至 2×10^6 /mL 待用。

1 2 质粒 DNA

质粒 PBC1 (来自 M. Fromm), 全长 8.9 kb, 含 GUS 基因和潮霉素抗性基因 hph, 由花椰菜病毒 35S 启动子和改进的玉米 Adh1 启动子驱动^[3]。PBC1 DNA 提取纯化后溶于 TE 缓冲液中备用。

1 3 电激处理

采用 BTX ECM 600 电激仪, 电极距 4 mm, R=48 BTX 无菌一次性电极杯。

电激缓冲液为 ASP^[6], 含 70 mM 天冬氨酸钾, 5 mM 葡糖酸钙, 5 mM MES, 1% 甘露醇, pH 5.8。

悬浮 2×10^6 原生质体于 1 mL ASP 电激缓冲液中, 添加 0~100 μ g PBC1 DNA, 50 μ g 携带 DNA (牛胸腺 DNA 和鱼精 DNA) 或 0.1% 亚精胺。室温放置 10 min 转入电极杯, 以不同的电场电压和脉冲时间进行电激处理。处理溶液及原生质体冰浴 10 min, 室温 10~20 min, 用 KMP^[5] 培养基洗涤, 液体浅层培养 (26 $^{\circ}$ C, 无光)。每个处理分为 4 个重复, 约 0.5×10^6 个原生质体; 不加质粒 DNA 的原生质体作为对照。

1 4 GUS 活性检测

基因处理和对照的原生质体, 电激后 1~6 天按 Jefferson^[4] 法测定 GUS 活性。每个重复约 0.5×10^6 原生质体在提取缓冲液 (50 mM NaPO₄ pH 7.0, 10 mM β -mercaptoethanol, 10 mM NaEDTA, 0.1% Sodium lauryl sarcosinate, 0.1% Triton X-100) 中, 超声波处理 2 次, 共 30 秒; 12000g 离心 10 min, 取上清液与 2 mM 4-methylumbelliferyl glucuronide (MUG) 混合, 37 $^{\circ}$ C 反应 1 h 后, 加 0.2 M Na₂CO₃ 中止反应, 于波长 365 nm 和 460 nm 处, 测定 4-methylumbelliferone (MU) 的含量, 以 MU /min 的 P.mole 表示 GUS 的活性值。

1 5 转化原生质体的培养和抗性筛选

电激处理后的原生质体用含 1.2% 低熔点琼脂糖的 KMP 培养基固化培养。7 天后, 将固化的培养物切成 4 小块, 依次转入含 5~10 25 μ g/mL 潮霉素的液体培养基各 1 周; 随后用 50~100 μ g/mL 潮霉素继续培养和抗性选择, 同时将表现抗性的愈伤组织分离, 并单独繁殖成抗性克隆。

2 结果与分析

2 1 电激强度对 GUS 转导和表达的影响

电激处理是在外加电场条件下, 通过高压直流电脉冲将无壁原生质体的细胞膜击穿成孔, 使外源 DNA 进入。因而电激处理势必造成一部分原生质体破损, 但同时必须保持较高的原生质体生活率, 保证外源基因的成功导入和表达, 故此需要选择适宜的电激强度。

根据预备实验的结果, 我们首先固定脉冲时间 (50 ms), 对 0~500 V 的不同电压的影响进

行了试验(图 1)。经过电激处理, GUS 导入并在原生质体中表达能力均高于对照(0V)。其中 300V 的处理作用最佳, 相应的 GUS 活性值最高; 500V 和 400V 次之, 100V 最弱, 但 400~500V 造成较多的原生质体破碎, 其生活率均低于 300V, 不利于以后的抗性筛选。

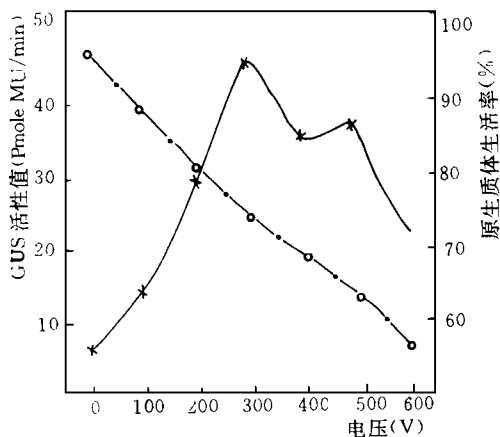


图 1 不同电激电压(脉冲时间 50 μ s)

对 GUS 活性值的影响

-x-x-x-: GUS 活性值 (0.5~10⁶ 个原生质体); -o-o-o-: 电激原生质体的生活率。

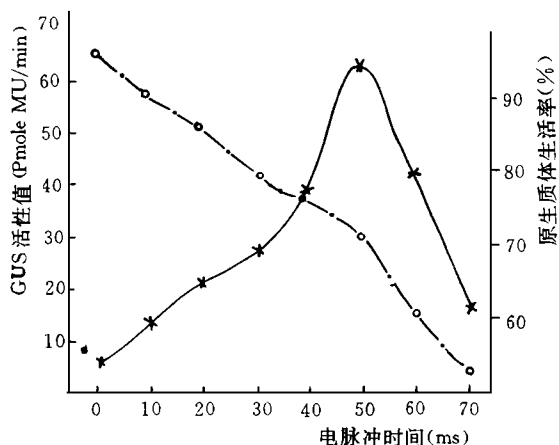


图 2 不同电激时间(电压 300V)

对 GUS 活性的作用。

-x-x-x-: GUS 活性值 (0.5~10⁶ 个原生质体); -o-o-o-: 电激后原生质体的生活率。

图 2 则表明在相同电压 (300V) 下, 不同的电脉冲长度 (即电激时间) 对 GUS 基因转导效果的影响。在 0~70ms 的范围内, 以 50ms 产生的 GUS 活性值最高, 比对照 (0ms) 高 6 倍多; 60ms 和 40ms 的 GUS 活性值较高, 10ms 的电激作用弱, 与对照的差异不明显。

上述结果表明: 在本研究的条件下, 适宜的电激参数为 300V 和 50ms, 可获得较理想的小麦原生质体电激基因转导效率, 因而作为此后转导实验的标准参数采用。

此外, 还比较了二次电激与一次电激对影响基因转导的差异 (表略)。二次电激 (累积脉冲时间与一次电激相同) 产生的 GUS 活性值均稍高于一次电激, 其中以二次电激时间为 50ms 的效果最理想。

2.2 质粒 DNA 浓度对基因转导的作用

外源基因的转导和表达需要选用适量的质粒 DNA 浓度。我们比较了 0~100 μ g PBC1 的浓度梯度, 旨在选择适合于本研究条件的 DNA 用量。从表 1 可见, GUS 在小麦原生质体中的表达能力随着 PBC1 的使用浓度的升高而增强。25~100 μ g 的 GUS 活性值比对照 (0 μ g) 高 4 倍多, 比 10 μ g 高约 2 倍; 但 100 μ g 和 50 μ g 的作用仅略高于 25 μ g, 无显著差异。试验表明, 基因转导的频率虽因质核 DNA 用量的增加而提高, 但达到一个适量 (25 μ g) 后继续增加 DNA 用量, 不能使基因的转化效率继续大幅度提高。对本实验的试用材料和电激条件, 25 μ g 质粒可为被处理的原生质体群体提供足够的 DNA 分子。

2.3 电激后培养时间对基因转导的影响

为了研究电激处理后, 小麦原生质体中 GUS 基因表达的变化规律, 对培养 1~6 天的处理原生质体进行了 GUS 活性检测。从图 3 可以看出, 原生质体培养 2~3 天, GUS 基因的表达呈

表 1 不同 PBC 1 使用量对小麦电激 (330V, 50ms) 基因转导效果的影响

质粒 PBC 1 使用量 (μg)	GUS 活性值 ($\text{PmoleMU/min/0.5}\times 10^6$ 个原生质体)				
	重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	平均
0(对照)	17.71	3.23	2.55	10.77	8.56
10	15.80	10.02	21.44	17.20	16.11
25	48.61	19.51	28.47	34.55	32.80
50	20.40	32.02	36.21	55.24	35.97
100	38.61	20.68	36.35	62.03	39.42

高峰期,并以第 2 天的 GUS 活性值最高,比第 1 天和 6 天高约 2 倍,此后 GUS 的表达强度逐渐减弱。此结果表明:在电激小麦原生质体 1 周内,虽然均能检测出 GUS 的活性,但以 2~3 天的检测效果最好,这 2 天为鉴定基因瞬时表达的敏感期。

2.4 不同辅助物对小麦电激基因转导的影响

前人报道,在水稻、大豆等作物的原生质体基因转移中,添加携带 DNA 和其他辅助物可以提高质粒 DNA 的转化效果^[8-12]。我们在本实验中,试用了牛胸腺 DNA、鱼精 DNA 和亚精胺,结果列于表 2。在用 PBC 1 电激处理小麦原生质体的同时,添加牛胸腺 DNA 使 GUS 的平均值达到 53.76,比对照 (42.01) 高 11.75。添加亚精胺亦提高了 GUS 的活性值,但提高的幅度小于牛胸腺 DNA。然而将这两种辅助物配合使用,未能进一步提高 GUS 的转导和表达能力,说明这两种物质的正作用并没有累加效应。鱼精 DNA 没有辅助提高质粒 PBC 1 转导频率的作用,加或不加无明显差异。

2.5 潮霉素抗性愈伤组织的选择

电激处理后,原生质体在不加潮霉素的培养基上培养 1 周,有利于分裂和小细胞团形成。随后,逐步添加和提高潮霉素浓度 (5、10、25 μg) 明显有助于原生质体再生小细胞团和小细胞团。

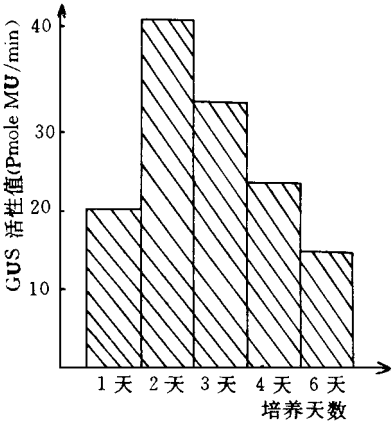


图 3 电激后不同培养天数对基因转导的影响。图内数据为 4 次重复的平均值,1 次重复测定的原生质体数量为 0.5×10^6 个。

表 2 不同辅助物对小麦原生质体基因转导的影响

质粒 PBC 1+ 不同辅助物	GUS 活性值 ($\text{PmoleMU/min/0.5}\times 10^6$ 个原生质体)				
	重复 1	重复 2	重复 3	重复 4	平均
对照 (不加辅助物)	52.15	32.43	47.67	36.03	42.07
鱼精 DNA	49.92	35.18	39.45	47.16	42.93
亚精胺	68.59	53.14	42.54	31.09	49.84
牛胸腺 DNA	66.92	54.51	48.15	50.47	55.76
牛胸腺 DNA+ 亚精胺	41.16	63.68	61.78	38.63	52.31

长大; 而未经质粒 PBC1 转导的对照原生质体则分裂能力下降, 细胞团逐渐停止生长; 当潮霉素的水平提高至 $50 \sim 100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 绝大多数来源于对照原生质体的细胞团停止发育, 生长严重受抑制, 而基因转导的原生质体和细胞团则能继续生长, 未转化的细胞团生长受阻。继续在 $50 \sim 100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素浓度下培养 3 个月后, 从电激基因处理的 40×10^6 个原生质体再生和选择出 15 个抗性克隆。这些抗性愈伤组织在添加 $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 潮霉素的继代培养基上生长正常, 表现出较强的抗性; 相反从对照原生质体未获得抗性愈伤组织。有些潮霉素抗性克隆在 $\text{N}^6 + 0.5 \sim 1 \text{mg}/\text{mL}$ 2, 4-D + $1 \text{mg}/\text{mL}$ ABA 的培养基上形成类似胚状体的结果, 我们将进一步鉴定这些抗性克隆的分化能力和分子杂交确认其稳定转化。

实验中, 直接将电激处理的原生质体转入含潮霉素的培养基上培养, 对照和处理均未得到大细胞团和愈伤组织; 只有逐渐提高潮霉素用量, 使处理的原生质体有一个恢复和适应的过程, 才有可能形成抗性愈伤组织。该结果与国外的报道相吻合^[2]。在本研究获得的抗性克隆频率略高于他人的报道^[11]。

3 小结

选择出了适合于 BTX 电激系统应用于小麦原生质体基因转化的电激条件, 采用 300V 和 $50 \mu\text{s}$ 可重复获得理想的转导效果。

确认了 DNA 的有效使用浓度 ($25 \mu\text{g}$), 继续提高质粒 DNA 的使用量未能进一步提高 GUS 的表达水平; GUS 瞬时表达的适宜检测期为电激后培养的第 2 天, 该基因在处理原生质体培养的 2~3 天内表达能力最强。

电激法应用于小麦原生质体基因转移, 操作简便、快速, 结果的重复性好; 配合使用牛胸腺 DNA 和亚精胺等辅助物可在一定程度上改善质粒 DNA 的转导频率。

从 40×10^6 个电激法基因处理的原生质体中, 选择出 15 个潮霉素抗性克隆, 表明我们的实验方法具有一定的应用前景。

参 考 文 献

- 1 王海波等. 小麦原生质体培养—高频率的细胞团形成和植株再生. 中国科学 (B 辑), 1990(8): 828~835
- 2 李宏潮等. 冬小麦原生质体培养及植株再生. 植物学报, 1991, 33(9): 706~711
- 3 Hagi T, Bhowers AD, Earle ED. Stable transformation of sorghum cell cultures after bombardment with DNA-coated microprojectiles. Plant Cell Reports, 1991(10): 260~264
- 4 Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW. GUS fusions β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO J, 1987(6): 3901~3907
- 5 Kao KN, Michaylik M R. Nutritional requirements for growth of *Vicia hajastana* cells and protoplasts at very low population density in liquid media. Planta, 1975, 126: 105~110
- 6 Tada Y, Sakanoto Fujimura T. Theor Appl Genet, 1990, 80: 475~480
- 7 Tian W, Huang J, Zeng W, et al. Transient expression of β -glucuronidase gene in protoplast of *Triticum aestivum* L. Genetic Manipulation in Plants, 1989, 5(2): 29~35
- 8 Tsai Mei-Ou-lee, Turgeon R, Wu R. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83: 6815~6819

- 9 Vasil V, Redway F, Vasil K. Regeneration of plants from embryogenic suspension culture protoplasts of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Bio/technology*, 1986 8 429– 434
- 10 Zaghmout OM-F, Trolinder NL. Factors affecting transient gene expression in protoplasts isolated from very slowly growing embryogenic callus cultures of wheat (*Triticum aestivum* L.). *Theor Appl Genet* 1993 86 721– 730
- 11 Zhou H, Stiff CM, Konzak CF. Stably transformed callus of wheat by electroporation-induced direct gene transfer *Plant Cell Reports* 1993 12 612– 616
- 12 Vasil V, Brown SM, Red D. Stably transformed callus lines from microprojectile bombardment of cell suspension cultures of wheat *Bio/technology*, 1991 9 743– 747

Gene Transformation of Wheat Protoplasts by Electroporation

Li Hongchao Hu Daofen

(Beijing Plant Cell Bioengineering Laboratory, Beijing 100081)

Toshio Hirabayashi Hiroaki Machii Takashi Hagiio

(National Institute of Agricultural Resources, Japan)

Abstract Protoplasts were isolated from suspension cells of a wheat cultivar “Bodallin”. The protoplasts were transformed by electroporation with uptake of PBC1 plasmid containing both β -glucuronidase (GUS) and hygromycin B phosphotransferase (HPT) genes. By means of BTX ECM 6000 Electroporation System and ASP buffer, maximal GUS activity of the transformed protoplasts was obtained under the condition of 300 V (750 V/cm) and 50 ms (app 1000 μ F), when an effective concentration (25 μ g/ml) of PBC1 plasmid was employed. After gene transfer via electroporation, transient expression of GUS in the protoplasts cultured for 2– 3 days was able to reach a high level. In addition, GUS activity could be enhanced to certain level by the aid of calf DNA used as a carrier DNA during electroporation. Protoplasts electroporated with PBC1 DNA were cultured on KM P medium containing 50– 100 μ g/ml hygromycin for 3– 4 months and selection of hygromycin-resistant callus was conducted. A total of 15 calli from transformed protoplasts survived in selective cultures on 100 μ g/ml hygromycin a concentration that completely inhibited the growth of non-transformed wheat callus.

Key words Wheat protoplasts Electroporation Gene transfer GUS activity Hygromycin-resistant callus