

抗病基因质粒 pAHCGG 的构建及应用研究

谢晓亮¹, 赵 和², 温春秀¹

(1. 河北省农科院经济作物研究所, 河北 石家庄 050051; 2. 河北省农科院遗传生理研究所, 河北 石家庄 050051)

摘要: 将位于 pCHIT 质粒上、已证明在植物中对真菌确有抗性、由 35S 启动子驱动的几丁质酶 chi5B 基因, 插入到适于农杆菌介导转化的 pCAMBLA1304 质粒的 HindIII 酶切位点, 构建出 pAHCGG 新质粒。以 pAHCGG 质粒为供体, 通过根癌农杆菌介导转化烟草, X-Gluc、荧光检测表明, gus 和 gfp 基因均能在植物体内表达; PCR 检测证明 chi5B 基因在植物体内整合, 并获得了转 pAHCGG 基因的烟草植株。

关键词: 质粒构建; GFP 荧光基因; chi5B 基因; pAHCGG; 农杆菌; 转化; 烟草

中图分类号: S567. 01 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000- 7091(2003)院庆专辑- 0059- 04

Construction of Resistant Gene Vector pAHCGG and It's Application on Tobacco Genetic Transformation

XIE Xiao-liang¹, ZHAO He², WEN Chun-xiu¹

(1. Institute of Economic Crops, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051, China; 2. Plant Genetic Engineering Center, Hebei Academy of Agriculture and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract: The fungal disease resistant gene, chitinase gene chi5B driven by CaMV 35S promoter, was stickily inserted into Hind III site of the vector pCAMBLA1304 that is suitable for *Agrobacterium*-mediated DNA transformation. The new constructed plasmid pAHCGG included gus and gfp (reported), nptII (bacterial antibiotic selection), hph (plant antibiotic selection), and chi5B (fungal disease resistant) gene constructs. The plasmid could be used by the researches not only on improving techniques of plant genetic transformation, but also on chi5B gene expression in transgenic apples.

Key words: Vector construction; GFP gene; Chitinase gene; Genetic transformation; Tobacco

抗病育种是控制植物病害的安全有效方法, 但由于常规育种周期长效率低, 难以有效解决作物病害问题。转抗病基因的植物, 首先在水稻、棉花、马铃薯等作物以及蔬菜上得到应用, 抗病性明显。几丁质酶对病原真菌起直接的杀抑作用, 它能催化真菌细胞壁中几丁质的水解, 从而抑制真菌的生长增殖^[1]。几丁质酶 chi5B 基因转入烟草、油菜、水稻, 在植物体内均能高效表达, 抗病性明显^[2,3]。本文报道了一个抗病几丁质酶 chi5B 基因质粒的构建及转化烟草的初步结果。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 菌株 大肠杆菌 *E. coli* DH5 α 和根癌农杆菌 LBA4404 由河北农科院植物转基因中心保存。

1.1.2 质粒 (1) pCAMBIA1304 由中国农科院生物中心张春义博士惠赠, 该质粒含 pUC18 多克隆位点(MCS)、gus、gfp 报告基因及 npt-II 细菌抗生素筛选和 hph 植物抗生素筛选标记基因。其结构如图 1。

(2) pCHIT 由河北农科院植物转基因中心赵和提供, 该质粒含 CaMV 35S 启动子驱动的几丁质酶

基因(*chi5B*), 不能直接用于农杆菌介导转化, 其结

构如图 2 所示。

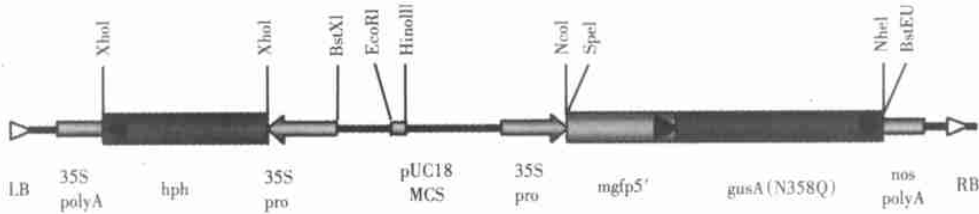


图 1 pCambia1304 T-DNA fragment(6128bp)

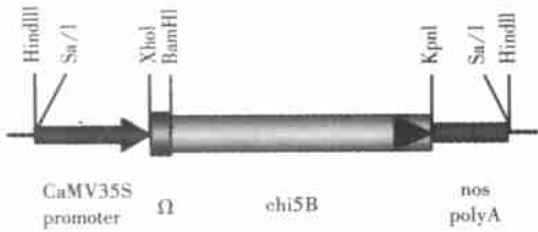


图 2 pCHIT 的 *chi5B* 基因结构部分

1. 1. 3 植物材料: 烟草 G140 由河北农科院植物转基因中心保存。

1. 2 试验方法

所涉及的内容见分子克隆实验指南^[4]。

1. 2. 1 质粒构建 各种质粒用碱裂解法进行质粒 DNA 的小量提取, 然后进行质粒酶切: 取 5~ 10 μ g pCHIT、pCambia1304, *Hind* III 消化闭环质粒 DNA。凝胶电泳分离 pCHIT 酶的后产物, 收获、提纯 CaMV 35S 启动子/ *chi5B*/ nos 终止子结构片段, 将 pCambia1304 *Hind* II 酶切产物进行去磷酸化处理, 用于连接反应, 取 10 μ L 连接物转化 *CaCl*₂ 法制备的感受态大肠杆菌, 筛选克隆后经限制性内切酶分析、检测, 获得构建质粒 pAHCGG。

1. 2. 2 农杆菌转化 取 2 μ g 已构建的质粒 pAHCGG, 加入到 50 μ L 农杆菌感受态细胞中, 混匀, 冰浴 5 min。将离心管置液氮中冷冻 5 min, 迅速转至 37 $^{\circ}$ C 水浴 5 min。加入 1 mL YEB 液体培养基, 28 $^{\circ}$ C 200 r/ min 培养 2~ 4 h。取适量菌液涂布到含适当抗生素的 YEB 琼脂培养基上, 28 $^{\circ}$ C 培养过夜, 可出现菌落。

1. 2. 3 烟草基因转化

共培养培养基 MS+ 6- BA 1. 0 mg/ L+ NAA 0. 05 mg/ L; 筛选再生培养基: MS+ 6- BA 2. 0 mg/ L+ NAA 0. 05 mg/ L+ Hm20 mg/ L+ Carb 500 mg/ L。

烟草对潮霉素敏感性试验 取烟草组培苗幼嫩叶片切割成 1 cm^2 左右的小块, 平铺到含不同潮霉

素浓度(0, 10, 15, 20, 25, 30, 35, 40 mg/ L) 的共培养培养基上, 确定所需的潮霉素筛选浓度。

活化菌液制备 从平板上挑取含 pAHCGG 质粒的农杆菌菌落, 接种到 50 mL 附加卡那霉素 50 mg/ L 的 YEB 细菌液体培养基中, 在恒温摇床上 28 $^{\circ}$ C, 200 r/ min 过夜培养(16 h 左右)。按 1% ~ 2% 比例取该菌液转入无抗生素的 YEB 液体培养基中, 在与上述相同的条件下培养 2~ 3 h, 测 OD₆₀₀ 值为 0. 5 左右时即可用于转化。

侵染、共培养、筛选与再生 于超净工作台, 将菌液倒入无菌培养皿中, 切取烟草试管苗顶部幼嫩叶片, 将叶片切成 0. 5~ 1. 0 cm^2 的小块置于浸染液中, 浸染 10~ 20 min。取出叶片置于无菌滤纸上吸去附着的菌液。将浸染过的烟草叶片, 平铺于烟草共培养基上, 25 $^{\circ}$ C 避光培养 2~ 4 d, 待叶缘部位出现微小农杆菌菌落时, 转入筛选培养基, 置于光照 14 h, 光强 2 500~ 8 000 lx, 温度 25 \pm 2 $^{\circ}$ C 培养。

1. 2. 4 基因转化检测

GUS 检测 按参考文献进行^[3], 将适量的 GUS 检测液分置于若干 Eppendorf 离心管中, 然后切取筛选再生的抗性植株叶片、芽点或组织, 放到检测液中, 以未转化叶片为对照; 将离心管置于培养箱中 25~ 37 $^{\circ}$ C 3 h。然后取出用 95% 酒精脱色, 至阴性对照为白色, 观察染色情况。

GFP 荧光检测 将筛选获得的抗性再生植株, 在体视荧光显微镜下(395 nm 远紫外或 495 蓝光激发), 以未转化的烟草为对照, 观察 GFP 发出的绿色荧光。

PCR 检测 有关 *chi5B* PCR 的引物: 意义链引物: 5' GGC TTC TAC ACC TAC GAT GCC TT 3', 互补链引物: 5' CCT CCG TTG ATG ATG TTC GTC ACA 3', 扩增长度 521 bp。CTAB 法提取植物的 DNA, 取 50~ 100 ng 进行 PCR 反应。在 0. 5 mL Eppendorf 管中加入、混合如下溶液: 5 μ L DNA 或植物样本提取液, 2. 5 μ L 10 \times PCR 缓冲液, 2 μ L dNTP (各 2 mmol/ L), 1 μ L MgCb(25 mmol/ L), 0. 5

μL Tag 聚合酶(2 u/ μL), 1 μL 混合引物(各 25 μmol/L), 13 μL H₂O。PCR 反应程序: 94 ℃ 1 min, 58 ℃ 30s 72 ℃ 1 min, 35 个循环; 然后在 72 ℃条件下延伸 10 min。PCR 产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳检测。

2 结果与分析

2.1 质粒 pAHC GG 的构建

用 Hind II 酶切质粒 pCHIT, 收获 CaMV 35S 启动子/chi5B/nos 终止子片段, 在 T4 连接酶的催化作用下, 将该片段粘性连接插入 pCAMBIA 1304-

Hind II 酶切点。用连接好的 DNA 转化感受态大肠杆菌, 挑选单克隆菌落培养, 提取质粒 DNA。用经酶切检测正确的质粒 DNA 转化农杆菌感受态细胞, 挑单菌落培养, 提取质粒 DNA, 进行 PCR 分析, 保留 PCR 阳性质粒。新构建的目标质粒被命名为 pAHC GG, 其结构见图 3。该质粒具有以下的特点: 一是用潮霉素做筛选基因代替对植物的转化再生有明显影响用的卡那霉素; 二是加入了 GFP 荧光基因, 可实现对活体材料的快速检测; 三是质粒中插入了抗真菌病害的几丁质酶基因 chi5B。

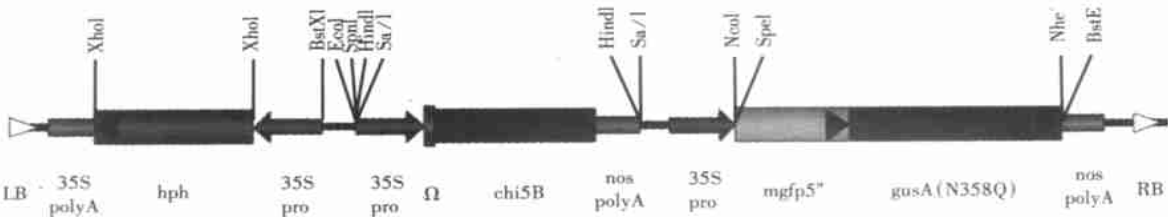


图 3 pAHC GG T-DNA fragment(8898bp)

2.2 烟草转化

2.2.1 烟草对潮霉素敏感性试验 切取烟草叶片平铺到含有不同潮霉素浓度的培养基上, 每个浓度 3 皿, 每皿 5 个叶片。选取非转化细胞逐渐死亡, 而又不影响转化细胞再生的筛选浓度。试验表明, 潮

霉素筛选浓度在 20 mg/L 以上时, 植物组织很快白化, 失去再生能力。20 mg/L 潮霉素浓度下, 25 d 时, 叶片平展、失绿、白化, 但部分叶片仍有再生能力, 故确定 20 mg/L 为烟草的筛选浓度(表 1)。

表 1 烟草对潮霉素敏感性试验

培养基	潮 霉 素 浓 度 (mg/L)				
	0.0	20.0	40.0	60.0	80.0
MS+ 6BA 1.0 mg/L+ NAA 0.05 mg/L 能否再生	+	+, -	-	-	-
叶片状况 (25 d 时调查)	保持原深绿色, 叶片 边缘隆起膨大, 出现 再生芽点	叶片变浅绿, 部分组织 失绿白化, 边缘无膨大 隆起, 但仍有活性	叶片失绿白化, 组织基本死亡, 不能再生	叶片全部白化 死亡	叶片全部白 化死亡

2.2.2 羧苄青霉素抑制农杆菌试验 在农杆菌介导的基因转化中, 抗生素杀菌是必不可少的过程。但抗生素对外植体的再生均有影响, 且羧苄青霉素还可促进愈伤的产生, 随着 Carb 浓度的增高, 愈伤量增加, 对不定芽的直接形成不利。本试验就是为了尽量减少抗生素的影响, 而选择最有效杀菌的最低羧苄青霉素浓度。结果表明在转化筛选过程中, 羧苄青霉素浓度在 50~ 200 mg/L 基本抑制不住农杆菌的生长, 10 d 内即可长出农杆菌菌落。300 mg/L 杀菌虽然基本上能够抑制, 但时有抑制不住的情况。400 mg/L 以上即可有效抑制农杆菌生长,

一次即可达到完全抑制的目的。在上述浓度下杀菌 7 d 或 14 d, 转到羧苄 200 mg/L 或 300 mg/L 的低浓度杀菌培养基上, 农杆菌基本不复发。因此确定 400 mg/L 作为羧苄青霉素的杀菌浓度(表 2)。

2.2.3 烟草转化 取烟草的无菌苗叶片作为转化受体, 在 pAHC GG 的活化菌液中侵染 10~ 20 min, 然后放到烟草共培养基上培养 3 d, 转至烟草筛选培养基上进行选择培养, 每隔 14~ 21 d 周继代 1 次, 经过 30 d 左右即可在失绿白化的叶片上出现极少量绿色的再生芽点, 35 d 左右获得抗性烟草再生苗。

表 2 羧苄青霉素抑制农杆菌试验

培 养 基			羧 苄 青 霉 素 浓 度 (mg/L)			
MS+ 6BA 4.0 mg/L + NAA 0.05mg/L	50	100	200	300	400	500
杀菌状况	3 d 后叶缘 周围有农杆 菌菌迹出现	7 d 后 1/3 的叶 片边缘长出了农 杆菌	7 d 后少部分叶 片边缘出现了农 杆菌菌落	有个别叶片边缘出现 农杆菌, 绝大部分能 得到控制	未见农杆菌 生长	农杆菌得到 完全抑制未 见生长

2.2.4 转化植株检测 (1) GUS 组织化学染色检测 取筛选再生的烟草植株叶片浸泡在 GUS 染色液中, 25~ 37 ℃保温 1 h 至过夜。然后将叶片转入 95% 的酒精中脱色, 至阴性对照材料呈白色。经对 20 株抗性再生苗进行检测, 有 9 株染成蓝色, 表明获得了 GUS 表达的转基因烟草; (2) 烟草转化植株 PCR 检测 对 GUS 检测阳性的烟草, 取 6 株进一步做了有关 *chi5B* 基因的 PCR 分析检测。试验以质粒 pCHIT 为阳性对照, 未转化烟草和 H₂O 为阴性对照, 在经过 35 个循环的扩增反应后, 对 PCR 产物进行琼脂糖凝胶电泳分析。结果显示(图 4), 在被测的 6 株转化烟草中, 有 5 株出现了与阳性对照位置一样的电泳谱带(521 bp), 而在未转化烟草和 H₂O 中没有扩增出相应带。进一步证明, *chi5B* 基因已整合到这 5 株烟草的细胞染色体中。(3) GFP 荧光检测 取筛选再生的抗性烟草植株材料, 在体视荧光显微镜下观察, 可以看到 GFP 在 400 nm 远紫外光激发下发出绿色微带黄的荧光, 绿色荧光强而稳定, 植株可通体表达, 而未转化植株在 400 nm 远紫外光下呈暗红色, 与绿色荧光区别明显。通过本试验, 认为 GFP 做为新型的标记基因, 有其独特的优点, 特别是在活体材料的检测上快捷、廉价。可用于大量转基因植株的初步检测和基因漂移监控。

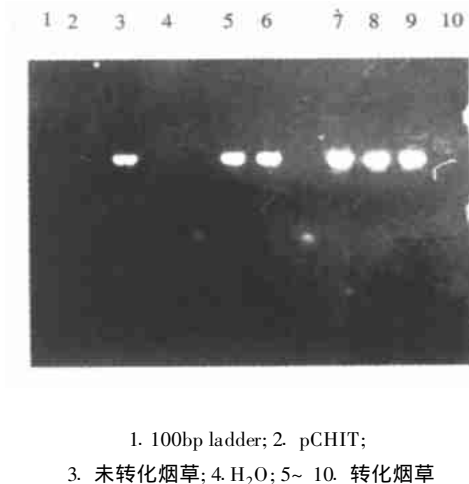


图 4 烟草转化植株 PCR 检测

4 讨 论

本研究构建了适于农杆菌介导转化的质粒 pAHCGG。该质粒含几丁质酶基因 *chi5B*, *gus*, *gfp* 报告基因和 *hph* 抗潮霉素筛选基因。通过烟草转化证明该质粒所涉及的有关基因在植物中能够表达与整合。Gfp 荧光基因, 可起到报告基因的作用, 实现活体材料检测, 但需要借助体视荧光显微镜进行。经 PCR 检测虽然已经证明 *chi5B* 整合到了烟草细胞内, 但仍需进行 southern blot 杂交进一步证实。本试验发现, 烟草的筛选采用直接连续高强度筛选效果最好。在 20 mg/L 潮霉素筛选的基础上适当提高筛选浓度, 采用 25 mg/L 的筛选强度, 叶片组织在筛选 25~ 30 d 时, 基本白化死亡, 但在近乎失去再生能力的时候, 往往冒出极少量的抗性再生芽点, 这种芽点虽然非常难以获得, 但转化率很高。而 15 mg/L 的浓度下筛选会产生许多再生芽点, 可能是正常细胞生长迅速造成转化细胞埋没或丢失, 下一步几乎检测不到 GUS 表达的植株, 并给后期工作造成很大难度。此方法在烟草转化中最为有效, 在其他植物转化中这种连续高强度的筛选法是否可行需要进一步试验。

鸣谢: 王海波博士对本试验给予了多方面指导, 在此表示感谢。

参考文献:

- [1] Brogile K, Chet I, Holliday, M, Transgenic Plants with enhanced resistance to the fungal pathogen *Rhizoctonia solani* [J]. Science, 1991, 254: 1194- 1197.
- [2] 王关林. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [3] 傅荣昭, 孙勇如, 贾士荣, 等. 植物遗传转化手册[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1994.
- [4] 萨姆布鲁克 J, 弗里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T. (金冬雁, 黎孟枫等译). 分子克隆实验指南第二版[M]. 北京: 中国科学技术出版社, 1999.
- [5] Draper J. Plant Genetic Transformation and Gene Expression (a Laboratory Manual) [M]. The Alden Press, 1998.