

将 GNA 基因导入宁夏枸杞及其表达的研究

曲 玲^{1,2}, 曹有龙², 侯玉霞^{1*}, 吴家和³, 罗 青², 田颖川³

(1. 中国农业大学 理学院, 北京 100094; 2. 宁夏农林科学院, 宁夏 银川 750002; 3. 中国科学院 微生物研究所, 北京 100080)

摘 要:为了解决枸杞蚜虫侵害的难题,以宁夏枸杞主栽品种“宁杞 1 号”叶片为外植体,通过农杆菌介导的转化方法,将改造后的雪花莲凝集素 GNA 基因转入枸杞,以抗性愈伤组织诱导率作为转化效率的指标,对影响转化效率的因素进行了研究,初步建立了转化频率较高的转化系统。对获得的 70 个转基因株系进行 PCR 检测,阳性率为 60%。运用 Western blot 杂交检测了 2 个转化子叶片和果实中 GNA 的表达,结果表明,其中一个转化株系在维管组织成分较高的叶片、青果中得到了 GNA 的表达,而在维管束成分极少的红果中未检测到 GNA 蛋白的表达。

关键词:宁夏枸杞;雪花莲凝集素;CoYMV 启动子;农杆菌介导遗传转化;Western blot 杂交

中图分类号:S793.904

文献标识码:A

文章编号:1001-7461(2007)03-0088-04

A Study of the Introduction and Expression of GNA Gene in *Lycium bararum* L.

QU Ling^{1,2}, CAO You-long², HOU Yu-xia¹, WU Jia-he³, LUO Qing², Tian Ying-chuan³

(1. College of Science, China Agricultural University, Beijing 100095, China; 2. Ningxia Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Yinchuan, Ningxia 750002, China; 3. Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100080, China)

Abstract: A modified *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA) gene was introduced into the genome of main cultivar 'Ningqi No. 1' of *Lycium bararum* in vitro with explants of leaf disks mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Several factors affecting transformation efficiencies were studied based on induction rate of resistant callus. An effective system for genetic transformation of *Lycium bararum* was set up, and 70 kanamycin-resistant transformants were obtained. Results of PCR indicated that 60% kana resistant plants could be detected the *gna* gene. Western blot analysis of leaf and fruit proteins from two PCR positive and aphid resistant transformants was carried out. In one of transformants, the GNA protein was detected in leaves and green fruits where the vascular tissues occupies a relatively larger part of the organs, but in red fruits where the vascular tissues occupy few parts of the organs the GNA protein wasn't detected.

Key words: *Lycium bararum*; *Galanthus nivalis* agglutinin (GNA); CoYMV promoter; *Agrobacterium*-mediated transformation; Western blot analysis

宁夏枸杞(*Lycium bararum*)为茄科多年生落叶灌木,是重要的“药食同源”型植物资源之一,具有抗衰老、抗疲劳、抗肿瘤和降血糖、降血脂等重要功能^[1]。宁夏枸杞易遭受多种病虫害的危害,其中枸杞蚜虫(*Aphis* sp.)是危害性最大的害虫之一,其防治难度大,危害严重,可造成枸杞减产 10%~20%,是当前影响枸杞子产量和质量的重要因子^[2]。雪花莲凝集素(*Galanthus nivalis* agglutinin, GNA)是 1987 年发现的第一个单子叶甘露糖结合植物凝集

素,它对哺乳动物和人比较安全^[3],对蚜虫、叶蝉、稻褐飞虱等同翅目吸食性害虫具有极强的毒性^[4],目前成功转入 GNA 基因的植物有油菜、马铃薯、水稻、甘薯等,均表现出抗虫性^[5]。近年来,通过农杆菌介导的转化方法已将一个改造后的雪花莲凝集素基因^[6]导入高产、优质、适应性强的枸杞主栽品种“宁杞 1 号”中^[7],得到了能表达 GNA 蛋白、具有一定抗蚜性的育种中间材料。

收稿日期:2006-12-12 修回日期:2007-01-25

基金项目:宁夏回族自治区自然科学基金项目(B1006)

作者简介:曲玲(1972-),女,宁夏银川人,助理研究员,在读硕士研究生,研究方向为农药分子生物学。

* 通讯作者:侯玉霞。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 菌种、质粒和植物材料 根癌农杆菌菌株为LBA4404,所含植物表达载体pBCGm上构建有NptⅡ基因、CoYMV启动子启动的GNA34m基因^[6](图1),均由中国科学院微生物所植物开放实验室提供。植物材料为宁夏枸杞主栽品种“宁杞1号”,抗蚜虫试验所用枸杞蚜虫(*Aphis* sp.)采自非转基因枸杞上。

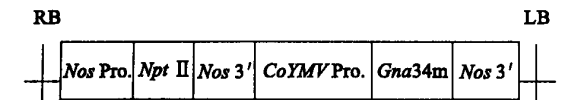


图1 植物表达载体pBCGm中T-DNA区段基因结构
Fig.1 The T-DNA region of plant expression vectors pBCGm

1.1.2 培养基 农杆菌培养培养基:10 g·L⁻¹蛋白胨+10 g·L⁻¹酵母提取物+5.0 g·L⁻¹NaCl, pH7.0;共培养培养基:MS+1.0 mg·L⁻¹NAA+0.5 mg·L⁻¹6-BA, pH6.5;枸杞愈伤组织诱导培养基(MS1):同共培养培养基;分化培养基(MS2):MS+0.2 mg·L⁻¹6-BA+0.01 mg·L⁻¹NAA, pH6.5;增殖培养基(MS3):MS+0.5 mg·L⁻¹6-BA, pH6.5;生根培养基(MS4):MS+0.1 mg·L⁻¹NAA, pH6.5。

1.2 方法

1.2.1 枸杞最适转化外植体的筛选 选取“宁杞1号”当年生嫩枝及顶芽,剪去叶片,用70%乙醇数秒、0.1%氯化汞8 min表面消毒后切成一芽一段,接种于MS3上培养30~40 d。将获得的高约2 cm的丛生芽接入MS4上,当其生根后,将丛生苗和生根苗叶片切成5 mm见方的小块,幼茎切成长5 mm的小段,接种于MS1上,培养20~25 d至愈伤组织大量长出后,接于MS2上培养3~4周,统计愈伤组织诱导率和分化率。培养温度为(25±1)℃,光强度2 500 lx,光周期10~12 h·d⁻¹。

另取丛生苗和生根苗叶片(5 mm见方)及5 mm长的茎段浸入OD₆₀₀=0.5的农杆菌菌液中,浸泡5 min后置于无菌纸上吸去多余菌液,在共培养基上暗培养3 d,保持温度25℃,再转入含羧苄青霉素500 mg·L⁻¹和卡那霉素60 mg·L⁻¹的MS1上,15 d后统计抗性愈伤组织的得率。

1.2.2 农杆菌菌液的准备 在含有100 mg·L⁻¹卡那霉素、100 mg·L⁻¹链霉素和100 mg·L⁻¹利福平的YEP固体平板上选取含植物表达载体的农杆菌单菌落,接种于5 mL含有相同抗生素的液体

YEP培养基中,于28℃、200 r·min⁻¹振荡培养过夜,取该菌液按1:50的比例接种于YEP液体培养基中扩大培养至OD₆₀₀=0.6,于4℃、4 000 r·min⁻¹离心5 min,收集菌体,以MS0液体培养基重悬,调OD₆₀₀值至各合适值。

1.2.3 农杆菌介导的枸杞遗传转化方法 将培养4~5周的无菌生根试管苗叶片切成5 mm见方,浸入上述农杆菌菌液3~20 min后,置于无菌滤纸上吸干多余菌液后转入共培养培养基上,于25℃下暗培养3 d,再转入含500 mg·L⁻¹羧苄青霉素和60 mg·L⁻¹卡那霉素的诱愈培养基MS1中。培养3周后,统计抗性愈伤组织诱导率,并将出现的小颗粒愈伤组织转入分化选择培养基(MS2+500 mg·L⁻¹羧苄青霉素+60 mg·L⁻¹卡那霉素)上再生植株,待抗性再生芽长至2 cm左右时将其切下,转入生根选择培养基(MS4+500 mg·L⁻¹羧苄青霉素+30 mg·L⁻¹卡那霉素)上诱导生根,再将生根植株经炼苗后移栽到温室。

1.2.4 转基因再生植株的PCR检测 待上述转基因再生植株在温室移栽成活且生长健壮后转移至大田,剪取其幼嫩叶片,采用CTAB方法^[8]提取植物总DNA。用GNA编码序列特异性的P1正链引物和NOS负链引物进行PCR扩增,其引物序列分别为:5'-CTCTCTCTACCGGGAATTTC-3'和5'-CATCGCAAGACCGGCTTC-3',设阳性对照(pBCGm为模板)、阴性对照(未转化的“宁杞1号”枸杞为模板)。PCR反应体系:总反应体积20 μL,1×PCR缓冲液,dNTP各0.2 mmol·L⁻¹,2种引物各0.5 μmol·L⁻¹,TaqDNA聚合酶1 μL,模板DNA(约100 ng)1 μL。PCR反应程序:94℃预变性3 min;循环参数:94℃变性30 s,54℃退火30 s,72℃延伸1 min,共35个循环。反应结束后,72℃延伸反应10 min。PCR扩增产物于0.8%琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.5 转基因枸杞的Western blot杂交分析 称取PCR检测呈阳性及虫试效果好的转基因枸杞2个株系的新鲜叶片、青果及红果各0.2 g,液氮冷冻后,加入1 mL提取缓冲液匀浆,4℃下12 000 r·min⁻¹离心,取微量上清液,用Bradford方法进行定量,剩余上清液与1/10最终体积的三氯乙酸混合,充分沉淀蛋白质。离心去上清,用-20℃预冷的丙酮清洗3遍后干燥,根据各样品的蛋白质含量加入一定量的蛋白上样缓冲液使蛋白终浓度一致,然后等体积上样进行SDS-PAGE(分离胶浓度为15%,浓缩胶浓度为5%),GAN成熟标准蛋白作为阳性对

照,非转基因枸杞植株的总可溶性蛋白为阴性对照。190 mA 恒电流电转 2 h,将蛋白转至聚偏乙烯二氟膜上,依次用兔抗 GNA 抗血清和 HRP(辣根过氧化物酶)标记的羊抗兔抗体与膜杂交,最后用 SuperE-CL Plus Western Blot 超敏发光液进行检测。

2 结果与分析

2.1 枸杞最适转化外植体的筛选

研究表明(表 1),以枸杞叶片及茎段作材料,均可高频率地诱导出小植株。将枸杞叶片和茎段转入诱导愈伤组织培养基中后(茎段约 7 d、叶片约 9 d),在切口边缘可见绿色愈伤组织产生,培养 15 d 左右,可形成大量绿色愈伤组织,将其转入分化培养基上后,12 d 左右愈伤组织开始不断分化出芽。从表 1 可看出,2 种外植体的愈伤组织诱导率和愈伤组织分化率相差不大,而从转化结果上看,以叶片为转化外植体较好,其抗性愈伤组织诱导率为 84.7%,而茎段与未转化相比,抗性愈伤组织诱导率明显下降,只有 63.8%,其原因是农杆菌介导的转化方法中农杆菌主要作用于外植体切口处的表层细胞,实验中在切叶片时造成了叶块四周的伤口,伤口面积大,农杆菌侵染转化的机率较高。茎段诱导的愈伤组织虽然也起源于切口及其附近部位,但茎段只有两端的切口,组培苗茎很细,因此,附着于伤口细胞表面的农杆菌数目少,造成转化效率较低。

表 1 “宁杞 1 号”不同外植体对农杆菌 LBA4404 的敏感性比较

Table 1 Comparison of sensitivity to *Agrobacterium* of different explants of a Ningxia No. 1

外植体	愈伤组织诱导率 /%	愈伤组织分化率 /%	抗性愈伤组织 诱导率/%
叶片	92	89	84.7
幼茎	88	92	63.8

2.2 农杆菌菌液浓度和侵染时间对遗传转化的影响

研究表明(表 2),在 3~5 min 内,抗性愈伤诱导率随侵染时间的延长而升高;在 5~20 min 内,抗性愈伤诱导率随时间的延长而下降,以 5~10 min 的侵染时间为最佳,其中,以 OD_{600} 为 0.5 的菌液侵染 5 min,抗性愈伤组织诱导率最高,可达 84.7%。实验表明,菌液浓度过低($OD_{600}<0.5$)或侵染时间过短(<5 min),抗性愈伤组织诱导率较低,可能是因为吸附于受伤部位植物细胞壁上的农杆菌数目较少,未达到饱和,造成转化细胞过少。但菌液浓度过高($OD_{600}=1.0$)或侵染时间过长(≥ 15 min),不但会造成外植体周围附着过多的农杆菌,导致在后续

的选择培养时难以抑制农杆菌生长,而且外植体受农杆菌侵染和菌液环境的损害程度大,生长受到抑制,组织严重褐化甚至死亡,因此最佳转化条件是 OD_{600} 为 0.5~0.7,菌液侵染叶片 5~10 min。

表 2 农杆菌菌液浓度和侵染时间对枸杞遗传转化的影响
Table 2 Effect of *Agrobacterium* concentration and infecting period on transformation

菌液浓度 (OD_{600})	侵染时间/min	抗性愈伤 诱导率/%	污染愈伤率 /%
0.2	3	12.4	0
	5	65.5	0
	10	57.5	2.4
	15	50.0	2.9
	20	33.9	5.0
0.5	3	16.9	0
	5	84.7	4.7
	10	75.3	4.6
	15	35.4	15.5
	20	29.6	36.4
0.7	3	32.2	7.7
	5	78.6	10.4
	10	79.2	7.9
	15	35.8	14.7
	20	23.5	30.0
1.0	3	20.8	5.0
	5	75.9	13.6
	10	69.4	10.2
	15	17.9	20.0
	20	15.3	38.5

2.3 转化植株的 PCR 检测

以 70 个 Kan 抗性株系的植株叶片总 DNA 作为模板进行 PCR 扩增,电泳检测结果(图 2)显示,共有 42 株能扩增出与阳性对照相同数目的条带,大小约 500 bp,而非转化植株则没有产生特异性的扩增靶 DNA 带,初步证明 GNA 基因已转入了部分转化再生的抗性枸杞植株中。图 2 为部分 PCR 检测结果,部分泳道下面出现的一条带为引物二聚体。

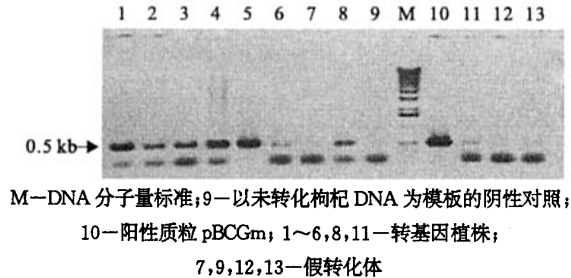


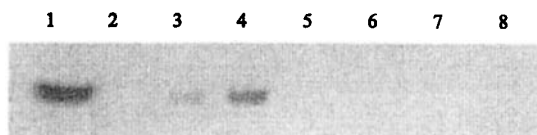
图 2 部分枸杞抗性植株的 PCR 检测

Fig. 2 PCR analysis of some transformed Ningxia lycium plants

2.4 转基因枸杞植株的 Western blot 检测结果

对 PCR 检测呈阳性且虫试效果好的转基因枸杞 2 个株系(对其连续观察 20 d,平均蚜口密度抑制率均在 67%以上)的叶片、青果、红果进行了 West-

ern blot 分析,图3为检测结果。从图中可看出,非转基因枸杞植株作为阴性对照未见杂交带,其中一个转化株系的叶片、青果在与阳性对照(标准GNA蛋白)相同的位置上出现一条特异杂交带,而成熟红果所在泳道未出现与阳性对照同样大小的免疫反应带,上述结果初步表明所转GNA34m基因在枸杞植株体内特定的组织或器官得到了特异性表达。



1—GNA成熟标准蛋白50ng;2—非转基因枸杞植株的总可溶性蛋白样品;3、4、5—转基因枸杞一株系的叶片、青果和红果蛋白样品;6、7、8—转基因枸杞另一株系的叶片、青果和红果蛋白样品

图3 转基因枸杞的Western印迹法检测

Fig. 3 Western blot analysis of transformed Ningxia lycium plants

3 结论与讨论

Gna34m基因是使用定点突变技术将编码GNA前体蛋白的DNA序列Gna34中的植物稀有密码子改造成植物优化密码子后获得的基因序列,可在转基因植物中实现较高水平的表达^[6]。针对蚜虫主要危害植物韧皮部的特点,在构建植物表达载体时采用了韧皮部特异表达启动子竹节花黄斑驳病毒(CoYMV)启动子,其可提高GNA在韧皮部的相对表达强度,降低在转基因植物其他部位的表达量,不但可减少不必要的物质和能量的浪费,同时可提高抗虫效果^[6]。在对36个转基因枸杞株系的抗蚜试验中,有26个株系的20d平均蚜口密度抑制率达到65%以上,说明转基因枸杞植株对枸杞蚜虫的生长、繁殖具有较为理想的抑制作用;另外,通过对2个转基因株系的Western blot杂交检测,初步证实了目的基因在维管组织成分较高的叶片、青果得到了表达,而在韧皮部组织成分很少的红果未检测到GNA蛋白的表达。由于人们主要食用枸杞蚜虫基本上不侵害的枸杞成熟红果,所以目的基因的组织特异性表达不但不会影响抗蚜效果,而且还使转基因枸杞的食用和药用安全性得到了提高。

目前,在植物转基因研究中,农杆菌介导法是一种进行最早、应用最为广泛有效的成熟转化方法,其成功转化的关键是将外源基因导入具有再生能力的细胞,由于枸杞叶诱导的愈伤组织首先起源于切口处的叶肉细胞^[9](其是农杆菌的主要作用处),因此可保证转化细胞与再生细胞的一致性,得到较高的转化频率。由于茎段两端切口的面积较小,农杆菌侵染转化的机率与叶片相比较低,造成抗性愈伤组织

诱导率较低。因此,如果茎段比较粗壮,采用纵切比横切可获得更高的转化频率。另外,转化外植体采自叶片浓绿宽大、茎较粗壮的无菌生根苗比采自分枝较多的分化苗效果要好,可能是无菌生根苗的生长势较好,外植体的再生能力强。实验中采用了2种生根培养基,即MS+NAA0.1 mg·L⁻¹,pH6.5和1/2MS+IBA0.1 mg·L⁻¹,pH6.5,两者相比,前者比后者虽然生根较迟、发根的数目较少,但根系和整个植株的长势健壮。因此,转化外植体及转基因植株的生根培养基均采用MS+NAA0.1 mg·L⁻¹,pH6.5。在70个Kan抗性株系中,PCR检测阳性率为60%,说明在筛选过程中有较多的非转化体存活了下来,分析其原因可能是枸杞再生芽原基起源于愈伤组织外缘表面的几层细胞^[9],因此如果这几层细胞位于愈伤组织上部,未接触含有抗生素的培养基,即使是非转化细胞也可能逃开有效浓度卡那霉素的筛选而再生成小植株。另外,对2个PCR检测为阳性的株系进行了Western blot分析,只有1个转化株系可表达出GNA蛋白,这可能是因为外源目的DNA进入受体细胞后并没有插入到植物分生组织细胞的染色体中,而只是游离在细胞核中,导致PCR的结果出现假阳性;或是插入到寄主染色体基因组中的外源目的基因的拷贝数、构型、插入方式、插入部位等引起了转基因沉默而影响了其表达^[10]。因此,对转基因枸杞株系中目的基因的表达、表达效率的高低、遗传稳定性等还需要进一步的研究。

参考文献:

- [1] 杜毅,高华,班长俊,等.枸杞的化学与药理研究新进展[J].内蒙古中医药,2000(4):40-41.
- [2] 钟铨元.枸杞高产栽培与育种[M].银川:宁夏人民出版社,1994.116-117.
- [3] Pusztai A S. Plant lectins[M]. Cambridge:Cambridge University Press,1991.1-271.
- [4] 周兆澜,刘春明,朱杭.植物基因工程[M].济南:山东科学技术出版社,1996.145-164.
- [5] Schuler T H, Poppy G M, Kerry B R, et al. Insect-resistant transgenic plants[J]. Trends in Biotechnology, 1998, 16(4): 168-175.
- [6] 袁正强,赵存友,周岩,等.雪花莲凝集素基因(gna)的改造及其抗蚜性[J].植物学报,2001,43(6):592-597.
- [7] 钟铨元,李健,樊梅花,等.枸杞新品种“宁杞1号”的选育[J].宁夏农林科技,1988(2):28-30.
- [8] McCouth S R, Kochert G, Yu Z H, et al. Microsatellite marker development, mapping and applications in rice genetics and breeding [J]. Plant Mol. Biol., 1997, 35: 89-99.
- [9] 王亚馥,王仑山,丁惠宾.枸杞组织培养中形态发生的细胞组织学观察[J].兰州大学学报(自然科学版),1989,25(4):88-92.
- [10] 吴乃虎.基因工程原理(下册)[M].北京:科学出版社,2003.282-286.