

# 农杆菌介导 *GNA* 基因转化菜薹

张扬勇\* 李汉霞\*\* 叶志彪 卢永恩 陆芽春

(华中农业大学作物遗传改良国家重点实验室, 武汉 430070)

**摘要:** 以菜薹带柄子叶为外植体, 采用农杆菌介导法将特异启动子  $P_{RS-1}$  与雪花莲凝集素 (*GNA*) 基因构建的嵌合基因转化菜薹, 获得 26 株 Km 抗性植株, 经过 PCR 检测和 PCR-Southern 杂交分析证明其为转基因植株。

**关键词:** 菜薹; 遗传转化; 雪花莲凝集素基因 (*GNA*)

**中图分类号:** S 634.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2003) 04-0473-03

## 1 目的、材料与方法

菜薹 (*Brassica campestris* ssp. *chinensis* var. *parachinensis*) 又名菜心, 是我国南方很重要的蔬菜作物之一。蚜虫是危害很严重的刺吸式害虫, 其造成的伤口为其他病原体的侵染提供了通道。研究表明, 雪花莲凝集素对刺吸式昆虫有较好的抗虫效果<sup>[1,2]</sup>。本试验通过农杆菌介导法将韧皮部特异表达启动子  $RSs-1$  (rice sucrose synthase-1, 水稻蔗糖合成酶) 与雪花莲凝集素 (*Galanthus nivalis* Agglutinin, *GNA*) 基因构成的嵌合基因转化菜薹, 获得转基因植株。

菜薹品种为‘45 天油青菜心’, 市售种子。农杆菌菌株为 LBA4404, 其所含质粒为 pRSSGNA1。在质粒的 T-DNA 区段上携带有  $RSs-1$  启动子控制的 *GNA* 基因, CaMV35S 启动子驱动的 *NPT II* 基因。该质粒由复旦大学遗传所唐克轩教授提供。

PCR 引物由上海生物工程公司合成, 左引物 (Left Primer) 序列为: 5'-AGACAATCGGCT GCTCT-GAT-3', 右引物 (Right Primer) 序列为: 5'-TCATTTCGAACCC CAGAGTC-3'。

将种子表面灭菌后, 接种于 1/2MS 培养基上。切取 4~5 d 无菌苗的带柄子叶为外植体, 将子叶柄基部插入分化培养基 (MS + 2 mg/L BA + 0.5 mg/L NAA + 5 mg/L AgNO<sub>3</sub>) 中 2~3 mm, 预培养 2 d 后取出放在培养皿中, 加入准备好的菌液 (OD 值为 0.3~0.6) 浸染 10 min, 取出放在灭菌滤纸上将菌液吸干后, 接回到原来的分化培养基中。共培养 2~3 d 后, 再转入到附加 500 mg/L 头孢霉素 (Cef) 和 5 mg/L 卡那霉素 (Km) 的筛选培养基中, 每 2 周继代 1 次, 同时逐渐降低 Cef 浓度。培养 4 周即可得到抗性芽, 芽长到 2 cm 高时, 切下不定芽并转入到生根培养基 (MS + 0.5 mg/L NAA + 5 mg/L Km + 200 mg/L Cef)。

采用 SDS 方法, 提取转化和对照植株叶片 DNA, 进行 PCR 检测。扩增产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。分子杂交所用的探针为 740 bp 的 *NPT II* 基因片段, 探针标记采用随机引物法<sup>32</sup>P-dCTP 10~20  $\mu$ Ci 放射标记。

## 2 结果分析与讨论

### 2.1 转化植株的获得

预培养 2 d 后, 将子叶转到筛选培养基上, 进行抗性芽的筛选。两周后, 含有 5 mg/L Km 的培养

收稿日期: 2002-08-28; 修回日期: 2003-03-11

\* 现工作单位: 中国农科院蔬菜花卉研究所。

\*\* 通讯作者: lhx02@hotmail.com

基上的菜薹子叶外植体的子叶柄处白化并且膨大, 然后出现白色或紫色芽, 没有绿芽出现。因此本研究延迟选择, 先在不加 Km 的筛选培养基上 1 周左右, 然后转到含 Km 的筛选培养基上, 大多数子叶基部变黄, 最终死亡, 有少数子叶的伤口基部能长出绿色愈伤组织, 在愈伤组织上分化出绿色不定芽, 经过 4 周的 Km 筛选, 仍为绿色。在 Km 筛选过程中, 如果共培养后立即施加筛选压, 则很难得到抗性芽。而采用延迟选择进行筛选在油菜、甘蓝上都已取得成功<sup>[3]</sup>, 在本试验中将其用于菜薹也获得成功, 表明延迟选择可行。

得到的抗性芽在生根培养基上 4~5 周后就可以形成具有发达根系的完整植株, 炼苗后移栽到花钵中, 按实生苗管理, 能正常开花、结实。

## 2.2 菜薹转化植株的分子检测

本试验共获得 26 株 Km 抗性植株, 采用小量法提取菜薹转化植株和对照植株 DNA, 进行 PCR 检测。结果见图 1。从图 1 可以看出, 阳性对照质粒 DNA 在 740 bp 处有一条特异扩增的电泳带, 而阴性对照没有扩增带, 在 26 株 Km 抗性植株中, PCR 检测为阳性的有 24 株。由此表明外源基因已经整合到菜薹基因组中。

PCR 检测为阳性的植株, 将 PCR 产物电泳后转膜, 进行分子杂交, 结果如图 2。可以看出, 质粒 DNA 和转化植株 DNA 均有杂交信号, 而未转化植株的 DNA 无杂交信号。

已获得的转基因植株的目的基因能否表达, 表达效率的高低如何, 是不是韧皮部组织特异表达等, 都有待于进一步研究。

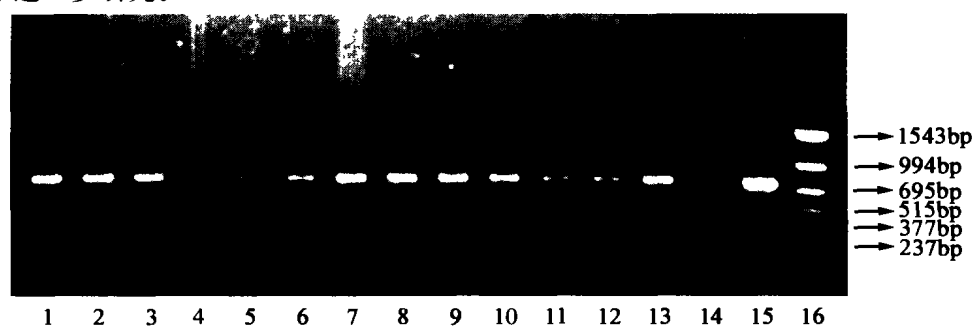


图 1 转化植株的 PCR 检测

1~3, 5~13. 转化植株; 4. 未转化植株; 14. 阴性对照; 15. 质粒 DNA; 16. PCR marker

Fig. 1 PCR analysis in transgenic plants

1-3, 5-13. Transgenic plants; 4. Untransformed plants; 14. Negative control; 15. Plasmid DNA; 16. PCR marker

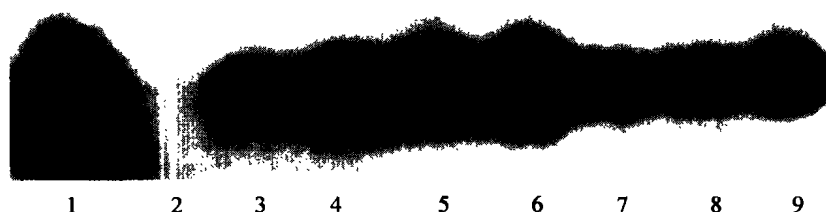


图 2 转基因植株 PCR 产物的 Southern blotting 检测

1. 质粒 DNA; 2. 阴性对照; 3~9. 转化植株

Fig. 2 Southern blot analysis of PCR products from transgenic plants

1. Plasmid DNA; 2. Negative Control; 3-9. Transgenic plants

## 参考文献:

- 1 Rao K V, Rathore K S, Hodges T K, et al. Expression of snowdrop lectin (*GNA*) in transgenic rice plants confers resistance to rice brown planthopper. *Plant J.*, 1998, 4 (15): 469~477
- 2 Hilder V A, Powell K S, Gatehouse, et al. Expression of snowdrop lectin in transgenic tobacco plants results in added protection against aphids.

Transgenic Res., 1995, 4: 18~25

3 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术. 北京: 科学出版社, 1998. 194~236

## Genetic Transformation of Flowering Stalk with Snowdrop Lectin Gene (GNA)

Zhang Yangyong, Li Hanxia, Ye Zhibiao, Lu Yong'en, and Lu Yachun

(National Key Laboratory of Crop Genetic Improvement, Huazhong Agricultural University, Wuhan 430070, China)

**Abstracts:** Cotyledons with petiole of Flowering stalk were transformed with the vector carrying a snowdrop lectin gene (*Galanthus nivalis* Agglutinin, GNA). Twenty-six transformants were obtained from cotyledons of Flowering Stalk. They were confirmed to be transformants by the PCR and PCR-Southern blot analysis.

**Key words:** Flowering stalk; Genetic transformation; Snowdrop lectin gene (GNA)

## 姜花挥发性成分的固相微萃取—气相色谱质谱分析

范燕萍<sup>1</sup> 余让才<sup>2</sup> 黄 蕴<sup>1</sup> 陈玉芬<sup>2</sup> (华南农业大学<sup>1</sup> 园艺学院; <sup>2</sup> 生命科学学院, 广州 510642)

### Studies on the Essential Constituent of *Hedychium flavum* and *H. coronarium*

Fan Yanping<sup>1</sup>, Yu Rangcai<sup>2</sup>, Huang Yun<sup>1</sup>, and Chen Yufen<sup>2</sup> (<sup>1</sup> College of Horticulture, <sup>2</sup> College of Life Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, China)

**关键词:** 姜花; 挥发性成分; 固相微萃取; 气相色谱—质谱联用法

**中图分类号:** S 68 **文献标识码:** A **文章编号:** 0513-353X (2003) 04-0475-01

分别采取 1 g 新鲜黄姜花 (*Hedychium flavum* Roxb.) 和白姜花 (*H. coronarium* Koen.) 花瓣和花柱, 置 4 mL 螺口玻璃瓶中, 用聚四氟乙烯衬里的硅橡胶垫密封, 插入 100  $\mu$ m 聚二甲基硅氧烷 (PMDS) 萃取纤维头, 于室温下顶空取样 60 min。采用 FINNIGAN TRACE MS 气质联用仪 (美国) 进行分析。色谱条件为 DB-5 石英毛细管柱长 30 m, 内径 0.25 mm, 液膜厚 0.25  $\mu$ m, 载气 He, 柱头压力 68.974 kPa, 程序分流/不分流 (LSS) 进样口温度 250℃。程序升温: 50℃, 保持 2 min; 以 3℃/min 的升温速度升至 250℃, 保持 30 min。在 SPME 分析中, PSS 进样口设定为不分流进样方式, 不分流时间为 2 min, 衬管采用 1.5 mm 内径的玻璃管, 脱附时间为 3 min; 在 DHS 进样口分流比为 20:1, 进样量为 2.0  $\mu$ L。GC/MS 传输线温度为 250℃, 质量扫描范围是 30~350 amu, 扫描时间 0.3 s, 扫描间隔 0.2 s, EI 离子源温度 170℃, EI 电子能量 70 eV, 光电倍增管 (PMT) 电压 230 V, 对采集到的质谱图用 WILEY、MAINLIB、REPLIB 及 NISIDEMO 4 个库进行分析, 按各峰的质谱裂片图与有关文献进行核对, 确定姜花挥发性物质的化学成分, 通过峰面积进行归一化定量。

试验结果表明, 黄姜花花瓣挥发性成分共检测有 10 种, 鉴定成分占总峰面积的 99.87%。其中主成分是 1,8-桉油醇 (35.71%) 和沉香醇 (35.37%), 两者之和占全部挥发性成分的 71.08%; 金合欢烯占全部挥发性成分的 17.70%; 香叶烯占 3.39%; 蒎烯 2.94%; 橙花叔烯 2.85%。

黄姜花花柱共检测出 13 种成分, 鉴定成分占总峰面积的 99.51%。1,8-桉油醇占 37.19%, 沉香醇 26.45%, 金合欢烯 13.71%, 异法呢醇 5.31%, 吲哚 4.52%, 子丁香烯 4.46%, 橙花叔醇 3.75%。

白姜花花瓣共检测出 16 种成分, 鉴定成分占总峰面积的 99.22%。其中顺式-罗勒烯酮占 47.42%, 沉香醇占 21.52%, 3-(4,8-二甲基-3,7-壬二烯基) 呋喃 7.55%, 桉烯 5.69%, 金合欢烯 3.90%, 十八烷基吗啉 2.56%。

白姜花花柱共检测出 21 种成分, 鉴定成分占总峰面积的 99.94%。顺式-罗勒烯酮占 30.05%, 沉香醇 19.36%, 桉烯 16.03%, 1,8-桉油醇 9.72%, 异法呢醇 4.77%, 顺式-甲基异丁子香酚 3.96%,  $\alpha$ -金合欢烯 3.16%。

另外, 还从黄姜花和白姜花的花瓣与花柱中检测出吲哚、反式- $\alpha$ -金合欢烯、 $\alpha$ -绿叶烯、 $\alpha$ -子丁香烯、反式子丁香烯、四氢沉香醇、8-羟基沉香醇、 $\alpha$ -蒎品醇、二氢- $\alpha$ -紫罗酮、6-十一烷胺、4,8-二甲基-1,3,7-壬三烯、十六烷酸、反式- $\alpha$ -金合欢烯、2-乙基-1,1-二甲基-3-亚甲基环己烯、苯乙腈、4-吗啉基-5-甲基-2-呋喃酮等挥发性成分。

**收稿日期:** 2002-11-08; **修回日期:** 2003-05-06

**基金项目:** 广东省科技攻关项目 (2002C20010302)