

超强表达豇豆胰蛋白酶抑制剂基因 (CpTI) 转化苹果的研究

达克东¹ 崔德才¹ 张松¹ 金德敏² 王斌² 束怀瑞¹

(¹ 山东农业大学园艺系, 泰安 271018; ² 中国科学院遗传研究所, 北京 100101)

摘要: 通过农杆菌介导法将超强表达载体 PECp 中的豇豆胰蛋白酶抑制剂基因 CpTI 转入了苹果品种‘嘎拉’。GUS 检测和 Southern 杂交结果证明 CpTI 基因已经整合进苹果基因组。

关键词: 苹果; CpTI; 超强启动子; 基因转化

中图分类号: S 661.1 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2001) 01-0057-02

1 目的、材料与方法

苹果遗传转化工作有一些报道, 多是以报告基因为目的基因的转化^[1,2], 功能基因转化工作报道较少。启动子是 DNA 分子上结合 DNA 聚合酶并形成转录起始复合物的区域, 真核基因表达受启动子控制, 花椰菜花叶病毒启动子 (CaMV35S) 是广泛用于植物遗传转化的启动子。但在一些植物转化中, 存在表达量不足的问题。由于抗性能力取决于基因表达积累量, 基因表达量可以通过使用强于 35S 的强启动子或超强启动子来提高。本试验使用的超强启动子来自增加了 ocs 上游调控序列的甘露碱合酶启动子, 该启动子启动的 GUS 基因在烟草中的表达强度分别是 35S 和双 35S 启动子的 156 倍和 26 倍^[3]。豇豆胰蛋白酶抑制剂基因 CpTI 具有广谱抗虫特性, 是目前比较理想的抗虫基因。本文报道豇豆胰蛋白酶抑制剂基因超强表达载体对苹果的遗传转化。

苹果栽培品种‘嘎拉’脱毒试管苗由本室保存, 培养方法见参考文献 [4], 含有超强启动子和 CpTI 基因的双元表达载体质粒 PECp 是由作者在中国科学院遗传研究所构建的, 农杆菌 LBA4404 为本室保存菌种, 限制性内切酶和琼脂糖购自 Promega 公司, 蛋白胨、酵母提取物购自 Oxoid 公司, ³²P-dATP 购自北京亚辉公司, 细胞分裂素、6-苄基腺嘌呤 (BA) 为华美公司产品, 其它化学试剂为国产分析纯试剂。引物 1: 5' GATGATGGTGC-TAAAGGTG3'; 引物 2: 3' CCTACTTCTACTACTCATTC5' 是根据报道序列, 由上海生工生物工程公司合成。

农杆菌介导的苹果遗传转化: 以 30 日龄无菌试管苗顶部前 3 片展开叶为外植体, 在 MS+ BA 1 mg/L 培养基上预培养 2 d 后, 用培养至对数生长期的用等体积 MSO 悬浮的农杆菌中浸泡 5~10 min, 无菌滤纸吸除叶片上多余菌液, 将叶片接种于共培养培养基 MS+ BA 1 mg/L 上。培养 2 d 后叶片用无菌水洗 3 遍, 再用含 Cef 400 mg/L 的 MSO 冲洗 2 遍, 无菌滤纸吸除叶片上的多余液体, 将叶片置于选择培养基 MS+ BA 1 mg/L+ Km 5 mg/L+ Cef 300 mg/L 上。培养 10 d 后转入去掉 Km 的分化培养基, 分化出芽后将分化芽转至含 Km 的繁殖培养基再选择培养, 获得抗性植株后转入 MS+ IBA 0.2 mg/L 生根培养基中生根。

收稿日期: 2000-04-22; 修回日期: 2000-11-20

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (39670521); 山东省“三零”工程资助项目

GUS 染色、DNA 提取、PCR 和 Southern 杂交方法按参考文献〔5〕进行。探针来自 PBluescriptL3 经 Hind III/ BamHI 双酶切后 GeneClean 回收的 326bp 的 CpTI 基因片段。

2 结果与分析

2.1 卡那霉素对苹果叶片再生的影响 卡那霉素是遗传转化中转化体的选择剂, 随 t-DNA 进入转化体的 NPT- II 基因具有卡那霉素抗性。在选择培养基上, 转化体表现为绿色, 非转化体表现为白色。试验中以附加卡那霉素 0、1、2、4、8 mg/L 的分化培养基进行嘎拉叶片卡那霉素抗性试验, 结果叶片再生率分别为 90%、78%、38%、0 和 0。可以看出, 嘎拉苹果对卡那霉素非常敏感, 4 mg/L 浓度足以抑制叶片分化。试验中以 5 mg/L 卡那霉素进行转化体筛选。

2.2 农杆菌介导的 CpTI 基因转化苹果 以嘎拉叶片不定芽再生体系为转化受体系统, 进行农杆菌介导的 CpTI 基因转化试验, 结果如下: 接种叶片 500 个, 产生抗性芽叶片 63 个, 产生抗性芽数 85 个, 抗性芽产生率为 17%。产生的卡那霉素抗性芽 (插页 1, 图版, A), 每 20 d 转接 1 次, 连续转接 3 次后大部分芽生长不正常, 表现为生长势弱, 连续选择后失去生活力, 逐渐死亡, 白化, 基部愈伤化; 少数生长正常。取生长正常植株器官进行组织化学和分子检测。

2.3 转化植株的分子生物学检测 GUS 染色鉴定: 转化植株根可以被 GUS 染色剂染色而显蓝色, 未转化植株的根不能被染色 (插页 1, 图版, B)。从 3 次转接后生长正常的 16 个单株中得到 4 株 GUS 阳性株系。Southern 杂交检测: 质粒 PECp 经 XbaI/ SmaI 双酶切后在 326bp 处产生目的基因条带, 转基因株系 1 号的 DNA 经 PstI 完全酶解, 转膜杂交后有两条杂交信号带产生 (插页 1, 图版, C), 说明目的基因存在于苹果基因组上。阴性对照植株无杂交信号。苹果转化植株的表达研究正在进行中。

参考文献:

- 1 程家胜, Dandekar A M, Uratsu S L, 等. 苹果转基因技术初报. 园艺学报, 1992, 19: 101~ 104
- 2 张志宏, 景士西, 王关林, 等. 新乔纳金苹果遗传转化及转基因植株再生. 园艺学报, 1997, (4): 378~ 380
- 3 Ni M, Cui D, Einstein S, et al. Strength and tissue specificity of chimeric promoters derived from the octopine and mannopine synthase genes. The Plant Journal, 1995, 7 (4): 661~ 676
- 4 达克东, 李雅志, 束怀瑞. 苹果叶片愈伤组织植株再生研究. 核农学报, 1995, 9 (3): 139~ 143
- 5 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. 585~ 625

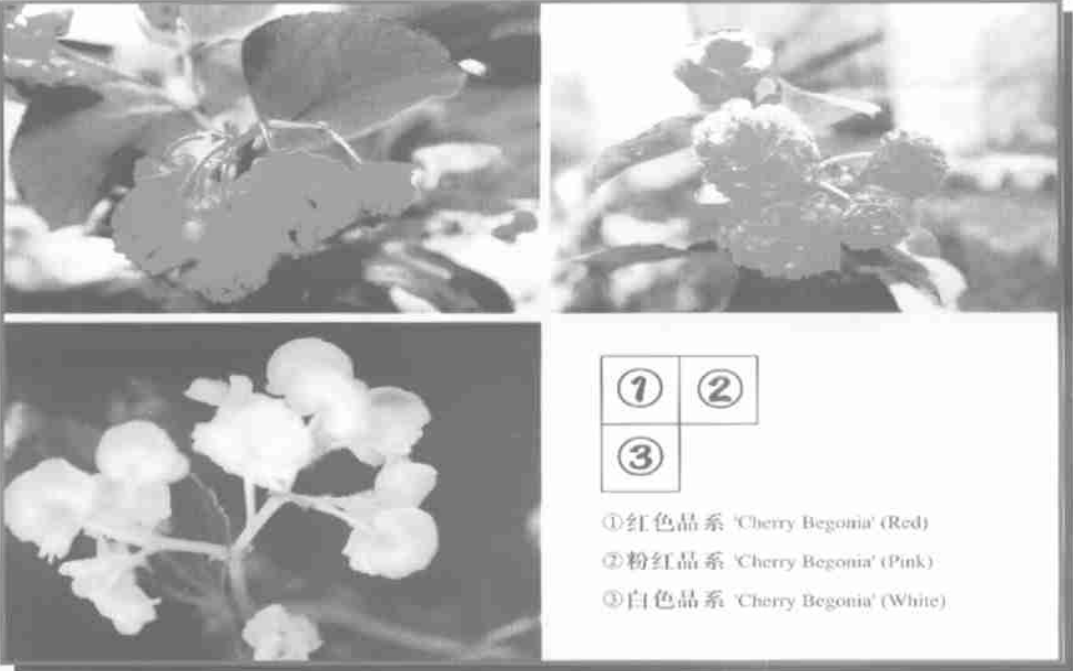
Transformation of Apple Using Super Expression Cowpea Trypsin Inhibitor (CpTI) Gene

Da Kedong¹, Cui Decai¹, Zhang Song¹, Jing Demin², Wang Bin², and Shu Huairui¹
(¹Department of Horticulture, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018; ²Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing 100101)

Abstract: Cowpea trypsin inhibitor (CpTI) gene in super expression binary vector PECp was transferred to apple cultivar 'Gala' using *Agrobacterium* mediated leaf disc transformation method. GUS staining and southern blot confirmed that CpTI gene was inserted into apple genome.

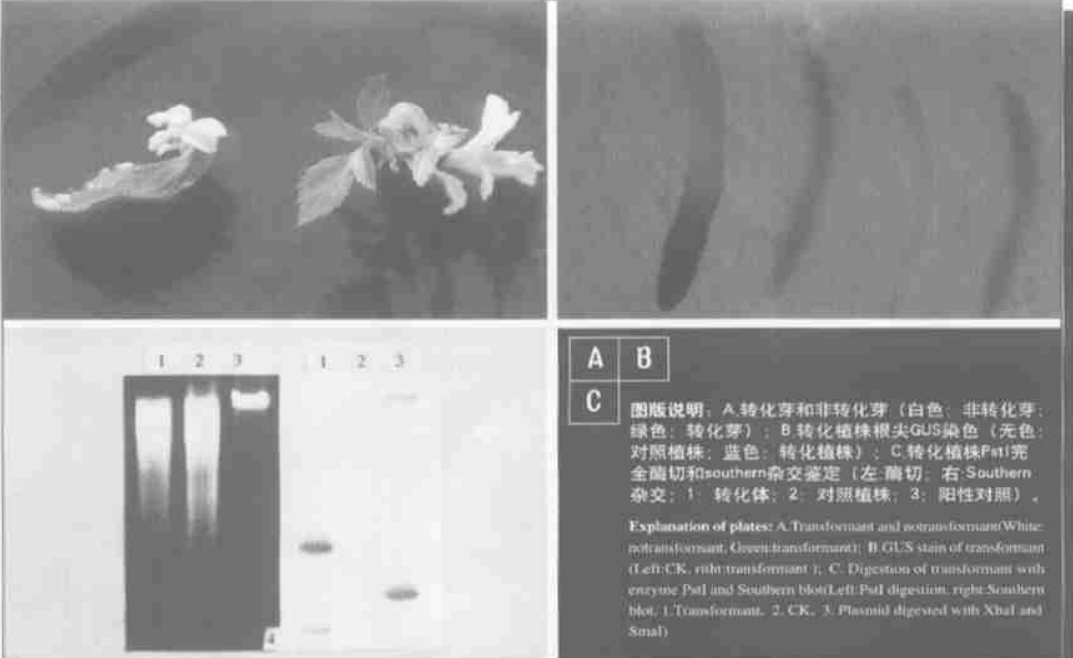
Key words: Apple; CpTI gene; Super Promoter; Transformation

张成敏等：四季秋海棠与球根秋海棠远缘杂种——樱桃海棠
 Zhang Chengmin, et al. F₁ 'Cherry Begonia' Series from Interspecific Hybridization of *Begonia semperflorens* × *Begonia tuberhybrida*



- ①红色品系 'Cherry Begonia' (Red)
- ②粉红品系 'Cherry Begonia' (Pink)
- ③白色品系 'Cherry Begonia' (White)

达克东等：超强表达豇豆胰蛋白酶抑制剂基因（CpTI）转化苹果的研究
 Da Kedong, et al. Transformation of Apple Using Super Expression Cowpea Trypsin Inhibitor (CpTI) Gene



图版说明：A. 转化芽和非转化芽（白色：非转化芽；绿色：转化芽）；B. 转化植株根尖GUS染色（无色：对照植株；蓝色：转化植株）；C. 转化植株PstI完全酶切和southern杂交鉴定（左：酶切；右：Southern杂交）；1：转化体；2：对照植株；3：阳性对照。

Explanation of plates: A. Transformant and nottransformant(White: nottransformant, Green:transformant); B. GUS stain of transformant (Left:CK, right:transformant); C. Digestion of transformant with enzyme PstI and Southern blot(Left: PstI digestion, right: Southern blot; 1: Transformant, 2. CK, 3. Plasmid digested with XbaI and SmaI)