

# 甜蛋白基因 *MBLII* 对莴苣的遗传转化

刘敬梅<sup>1,2</sup> 陈大明<sup>2</sup> 陈 杭<sup>2</sup>

(<sup>1</sup> 浙江大学园艺系, 杭州 310029; <sup>2</sup> 北京市农林科学院蔬菜研究中心, 北京 100089)

**摘 要:** 以4日龄莴苣 (*Lactuca sativa* L.) 无菌苗子叶为外植体, 通过根癌农杆菌介导, 成功地进行了马槟榔甜蛋白基因 *MBLII* 对莴苣的遗传转化。抗生素浓度和子叶外植体与农杆菌的共培养时间是影响转化的重要因素。附加卡那霉素 (Kan) 50 mg/L 的诱芽培养基 MS I (MS+ NAA 0.1 mg/L+ 6 BA 0.1 mg/L+ 羧苄青霉素 500 mg/L) 最适于侵染后子叶外植体的诱芽培养。在外植体与农杆菌共培养 0~ 7 d 的范围内, 以共培养 3 d 最佳 (生芽率 58.3%, 白化率 29%)。1~ 2 cm 再生芽移入诱根培养基 MS II (MS+ NAA 0.05 mg/L+ Kan 50 mg/L+ 羧苄青霉素 300 mg/L) 中, 诱根率可达 100%。获得的抗性植株经组织化学及 PCR 特异扩增鉴定和统计, 7.6% 阳性。Southern blot 结果证明 *MBLII* 基因已整合到莴苣基因组中。

**关键词:** 甜蛋白; 莴苣; 遗传转化

中图分类号: S 636. 2; Q 785 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2001) 03-0246-05

关于莴苣的组织培养和遗传转化已有成功的报道<sup>[1-3]</sup>。Curtis 等将硝酸还原酶基因导入4个莴苣主要栽培种, 降低了莴苣叶片的硝酸盐含量, 改善了莴苣的品质, 提高了食用价值和经济价值。莴苣的口味直接影响其受喜爱的程度。Samuel Sun 等<sup>[4]</sup>从中国云南省马槟榔 (*Capparis masaiikai*) 的种子中克隆了甜蛋白基因 *MBLII*, 该蛋白的甜度是相同质量蔗糖的 400 倍, 而且甜味持久。作者采用根癌农杆菌介导的遗传转化方法, 将 *MBLII* 基因导入莴苣中, 为利用基因工程改良莴苣风味品质进行了探索。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料

将莴苣品种‘北山三号’种子用 5% NaClO 灭菌 15 min 后, 无菌水冲洗 4~ 5 次, 置于 1/2 MS 培养基上, 黑暗下 28℃ 萌发。4 d 后切取子叶, 进行遗传转化。

### 1.2 质粒和菌株

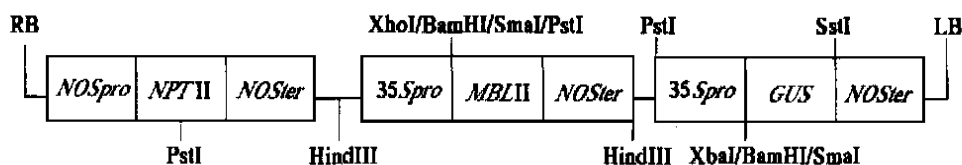


图 1 质粒 pLX10 (1.6 kb 嵌合基因 *MBLII* 位于质粒 pBI121 上)

Fig. 1 pLX10 (1.6 kb chimeric *MBLII* gene in pBI121)

收稿日期: 2000-11-01; 修回日期: 2001-03-27

基金项目: 北京市重点实验室基金资助项目 (951890200)

根癌农杆菌菌株 LBA4404, 含双元载体, 其中质粒 pLX10 含有 *MBLII*、*NPTII* 和 *GUS* 基因 (见图 1)。该基因由美国夏威夷大学植物分子生理学系教授 Samuel Sun 提供。

### 1.3 共培养及抗性芽筛选

莴苣子叶外植体去尖端和基端, 浸入 28℃ 液体 YEB 培养基中培养 2 d 的根癌农杆菌菌液中, 1 h 后取出, 用无菌滤纸吸干菌液, 28℃ 培养基上暗培养 0、1、3、5、7 d 后, 转移到含卡那霉素 (Kan) 0 (对照)、25、50、100、200、250 mg/L 的筛选培养基 MSI 上筛选转化芽。20 d 左右, 在外植体切口边缘的白色愈伤组织上长出 1~2 cm 芽。将芽切下放入 MS II 培养基 (MS+ NAA 0.05 mg/L+ Kan 50 mg/L+ 羧苄青霉素 300 mg/L) 中诱根。生根后将小植株先移入含 Hogland 和 Snyder 营养液的蛭石中炼苗 10~15 d, 再移入土壤, 置于温室自然光照下生长。

### 1.4 *GUS* 检测

*GUS* 活性采用 Jefferson 等<sup>[5]</sup>的方法检测。选取 Kan 抗性芽叶片, 浸入 *GUS* 染色液 (100 mmol/L 磷酸缓冲液, 0.1% Triton X-100, 1.0 mmol/L EDTA, 0.5 mmol/L  $K_3Fe(CN)_6$ , 0.05 mmol/L  $K_4(CN)_6$ , 1 mmol/L X-Gluc) 中, 37℃ 保温 3~5 h, 吸弃染色液, 加入 70% 酒精脱色, 待绿色褪尽, 整张叶片或叶脉处呈现深兰色者为阳性。

### 1.5 PCR 扩增

1.5.1 引物设计 根据 *MBLII* 序列设计一对特异引物  $P_1$ 、 $P_2$ , 序列如下:

$P_1$ : 5' ACCTTGGCTCTCTCGTCT 3';

$P_2$ : 5' GCTCCGATGTTGGGTATGTT 3'。

1.5.2 DNA 快速提取及 PCR 从 *GUS* 染色阳性植株上取半片小幼叶, 放入 1.5 mL 离心管中, 加入 100  $\mu$ L 0.5 mol/L NaOH 溶液, 匀浆, 立即 13 000 g 离心 1 min, 取 5  $\mu$ L 上清液至一个含 45  $\mu$ L 100 mmol/L Tris-HCl (pH 8.0) 的新离心管中, 混匀, 取 2  $\mu$ L 用于 20  $\mu$ L 体系 PCR 反应。PCR 反应在 PERKIN ELMER GeneAmp PCR System 9600 上进行, 反应条件为 94℃ 30 s, 55℃ 30 s, 72℃ 1 min, 进行 30 个循环。PCR 扩增产物用 1.5% 琼脂糖凝胶电泳检测。

### 1.6 Southern blot 分析

参照陈大明等<sup>[6]</sup>报道的方法, 提取转基因莴苣植株总 DNA, 取 20  $\mu$ g DNA 用限制性内切酶 EcoRI 酶切, 0.7% 琼脂糖凝胶电泳 12~16 h, DNA 充分分离后, 转移到尼龙膜上<sup>[7]</sup>。采用 Boehringer 公司地高辛标记试剂盒, 操作步骤按厂商说明书进行。将甜蛋白基因 400 bp PCR 产物进行标记, 并用含 7% SDS 和 50% 去离子甲酰胺杂交液进行预杂交和杂交。杂交膜经 2×SSC、0.1% SDS 室温洗涤两次, 0.1×SSC、0.1% SDS 68℃ 洗涤两次后再经抗原抗体显色反应, 然后进行 X 光片曝光处理。

## 2 结果与讨论

### 2.1 Kan 抗性植株的获得及影响因子

2.1.1 抗 Kan 植株的再生 莴苣对照子叶外植体在无 Kan 的 MS I 培养基中再生率可达 100%, 当 Kan 浓度达到 50 mg/L 时难以再生出正常芽。经根癌农杆菌侵染的部分外植体在含 Kan 培养基中首先膨大, 然后在切口处形成白色愈伤组织, 10 d 左右在愈伤组织中间

可见绿色小芽, 但比对照出芽稍迟, 而且每块外植体上的芽数也少于对照 (对照一般 7~8 个芽/外植体, 经侵染处理的则为 4~5 个芽/外植体)。与农杆菌共培养后的外植体在 Kan 25~250 mg/L 的浓度梯度中, 芽再生率随 Kan 浓度升高而降低, 达到 250 mg/L 后, 芽再生困难 (图 2)。待抗性芽长至 1~2 cm 后, 移入筛选生根培养基, 均能 100% 生根。再生植株在蛭石中炼苗 10~15 d 后, 移入土壤成活率达到 100%。

**2.1.2 共培养时间对 Kan 抗性芽分化的影响** 莴苣子叶外植体经根癌农杆菌侵染后在无 Kan 培养基中共培养是成功转化的重要因素。不经过共培养阶段的子叶外植体, 在筛选培养基上能够在伤口处产生愈伤组织, 但很难再生出芽。这可能是由于共培养时间过短, T-DNA 转移不充分造成的。而共培养 7 d 或更长, 则根癌农杆菌过度繁殖, 外植体受伤严重, 芽再生率迅速降低。图 3 结果表明, 外植体在共培养 0~5 d 范围内, 虽然随共培养时间的增加, 抗性芽分化频率提高, 但再生芽中假阳性芽也大幅度升高。这些芽在筛选生根培养基上逐渐白化死去, 为无效芽。这与 Sueo 等<sup>[3]</sup>的报道相一致。因此莴苣的转化以共培养 3 d 最佳 (生芽率为 58.3%, 白化率 29%)。试验中还发现, 暗培养对转化率有很大影响。光照下共培养的再生率仅为 2.1%, 而在黑暗下进行共培养的外植体的出芽率达到 58.3%。

## 2.2 转基因莴苣的鉴定

### 2.2.1 *GUS* 基因在莴苣叶片中的表达

*GUS* 检测结果表明, 不同抗性芽叶片 *GUS* 基因表达部位和表达程度各不相同。一般情况下, *GUS* 基因在叶片的叶脉处表达较强, 叶脉呈蓝色; 有些叶片 *GUS* 基因表达特别强, 则全部呈深蓝色; 有的叶片 *GUS* 基因表达很弱, 只有零星蓝色斑点 (图 4)。统计 *GUS* 染色结果, Kan 抗性芽中 7.6% 为 *GUS* 阳性芽。大量非转化芽的存在, 可能是由于在遗传转化过程中, 子叶外植体与农杆菌共培养的同时, 形成了许

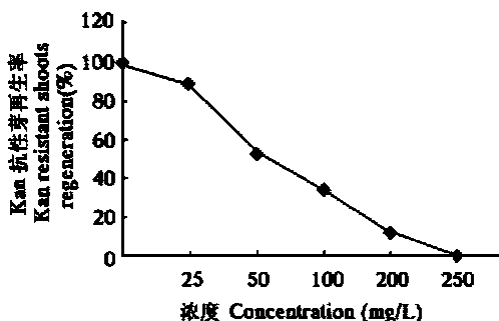


图 2 Kan 浓度对莴苣抗性芽分化的影响

Fig. 2 Effects of Kan concentration on shoot differentiation frequency

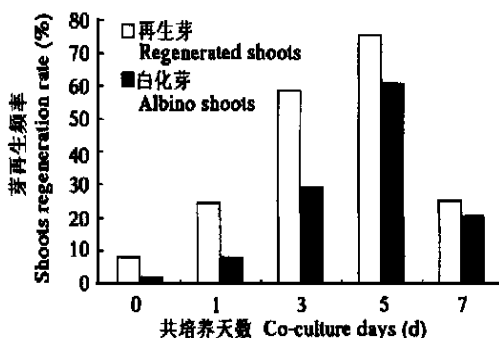


图 3 不同共培养时间对芽再生的影响

Fig. 3 Effect of duration of co culture on shoot regeneration

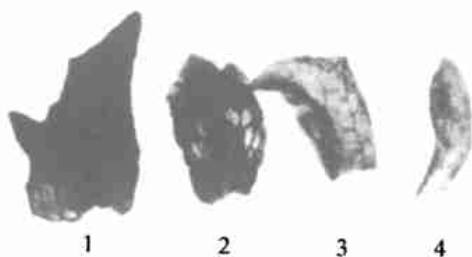


图 4 抗 Kan 再生芽叶片的 *GUS* 染色分析

1. 整张叶片蓝色; 2, 3. 叶脉蓝色为主; 4. 零星蓝斑。

Fig. 4 *GUS* histochemical assay of leaves of kanamycin resistant shoots.

1. Whole leaf in blue; 2, 3. Mainly vein in blue; 4. Sporadic blue spots.

多非转化芽原基。这些芽原基在移入筛选培养基后, 能够利用子叶中储藏的养分, 发育成假阳性再生芽。

**2.2.2 莴苣总 DNA 的 PCR 特异扩增检测** 利用甜蛋白基因序列内部的一对特异引物, 对 *GUS* 阳性植株进行 PCR 特异扩增, 发现 *GUS* 染色阳性植株均可扩增出特异的 400 bp 条带 (图 5)。

**2.2.3 转基因莴苣植株的 Southern blot** 从图 6 结果可以看出, 转基因莴苣总 DNA 与 *MBLII* 400 bp 探针均有一条杂交带, 而且两植株的杂交带大小不同, 表明 *MBLII* 基因已单拷贝整合到莴苣基因组 DNA 中, 而且整合的位置不同。甜蛋白基因在莴苣中的表达水平, 仍需做进一步的蛋白检测。



图 5 转基因莴苣植株的 PCR 特异扩增检测

1. DL2000 分子量标准; 2. pLX10 质粒 (含 *MBLII* 基因); 3. 未经转化植株; 4~ 8. 转基因植株

Fig. 5 PCR screening of transformed lettuce

1. DL2000 DNA marker 2. pLX10 plasmid with *MBLII* gene  
3. Non transformed plant 4~ 8. Transformed plant



图 6 转基因莴苣植株的 Southern blot 分析

1. 阳性对照 (含 *MBLII* 基因的质粒 pLX10 0.8 kb 酶切片段); 2. 未转基因植株; 3. 4. 转基因植株

Fig. 6 Southern blot analysis of transformed lettuce

1. Positive control (0.8 kb fragment with *MBLII* gene);  
2. Non transformed plant; 3, 4. Transformed plants.

## 参考文献:

- Richard M, Ellen M, Susan S, et al. Transformation of lettuce (*Lactuca sativa*) a mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. Plant Cell Reports, 1987, 6: 439~ 442
- Curtis L S, Power J B, De Laat A M M, et al. Expression of a chimeric nitrate reductase gene in transgenic lettuce nitrate in leaves. Plant Cell Reports, 1999, 18: 889~ 896
- Sueo E, Hirotsuka I, Masahiro O, et al. Induced expression of a chimeric gene construct in transgenic lettuce plants using tobacco pathogenesis related protein gene promoter region. Plant Cell Reports, 1990, 9: 6~ 9
- Samuel S, Liwen X, Zhong H, et al. Recombinant sweet protein Mabinlin. PCT Patent 1997, WO 97/00945
- Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W. GUS fusion:  $\beta$ -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. EMBO. J., 1987, 6: 3901~ 3907
- 陈大明, 张上隆, 金勇丰. 一种木本果树基因组 DNA 提取方法研究. 浙江大学学报, 1997, 23 (6): 621~ 624
- 萨姆布鲁克, 弗里奇, 曼斯阿蒂斯. 分子克隆实验指南. 金冬雁等译. 北京: 科学出版社, 1992. 475~ 483

## Genetic Transformation and Plant Regeneration of Lettuce with Sweet Protein Gene *MBLII*

Liu Jingmei<sup>1,2</sup>, Chen Daming<sup>2</sup>, and Chen Hang<sup>2</sup>

(<sup>1</sup>Department of Horticulture, Zhejiang University, Hangzhou 310029; <sup>2</sup>Beijing Vegetable Research Center, Beijing 100089)

**Abstract:** The sweet protein gene *MBLII* was introduced into lettuce by co-culturing excised cotyledon explants with *Agrobacterium tumefaciens*. The *Agrobacterium* strain LBA4404 contained the binary vector pLX10, which carried sweet protein gene *MBLII*, selective gene *NPTII* and reporter gene *GUS*. The best transformation efficiency was obtained when explants were co-cultured with *Agrobacterium* for 3 days and cultured on the selective medium containing 50 mg/L kanamycine (shoots regeneration rate 58.3%, albino rate 29%). Roots were induced in all adventitious shoots on MSII (MS+ NAA 0.05 mg/L+ Kan 50 mg/L+ carbencillin 300 mg/L). The transgenic nature of regenerants were demonstrated by plant growth on medium containing kanamycine, *GUS* histochemical assay and PCR amplification. 7.6% of all Kanamycine resistant shoots was *GUS* positive. Southern blot results confirmed that the *MBLII* gene had been incorporated into the genome of lettuce.

**Key words:** Sweet protein; Lettuce; Transformation

### 广 告

### 邮售美国芦荟、食用仙人掌苗

芦荟, 可盆栽观赏。大田栽培每亩 2 000 株, 年产鲜叶 10 吨左右; 分蘖苗 3 万株。鲜叶可直接生吃, 菜用, 药用和美容; 可用于保健品、食品、饮料、酒类、医药和化妆品生产。我场现有库拉索美国芦荟 100 万株, 大叶直立紧凑型。壮苗按叶数计价每株带 4 叶 0.4 元, 5 叶 0.5 元, 6 叶 0.66 元, 7 叶 1 元, 8 叶 2 元; 按高度计价 10 cm 0.4 元, 15 cm 0.5 元, 20 cm 1 元, 25 cm 2 元。芦荟鲜叶 6 元/斤, 干粉 80 元/斤。

墨西哥食用仙人掌, 可盆栽观赏。大田栽培每亩种 2 000 株, 年产菜用嫩茎 4 000 斤左右; 发苗 1 万株。嫩茎做菜口感较好, 具有消炎解毒、降血糖血脂等作用。可制成干片出口。我场现有最新引进的无刺墨西哥食用仙人掌米邦塔 10 万株, 壮苗株高 10 cm 10 元, 15 cm 12 元, 20 cm 15 元, 25 cm 20 元, 30 cm 25 元。有稀疏短刺墨西哥食用仙人掌米邦塔 30 万株, 壮苗株高 8 cm 1 元, 10 cm 1.5 元, 15 cm 2 元, 20 cm 3 元。

以上价格含包装邮费, 50 元起邮, 300 元以上办邮政特快专递或火车快件托运。量大优惠: 100 元以上 9 折, 500 元 8 折, 1 000 元 7 折, 赠资料, 款到发货。另有兰花等花木 300 多万株, 价目表函索即寄。

邮政汇款: 云南省石屏县西门园艺场 李冠群, 邮编: 662200, 银行汇款: 云南省石屏县西门园艺场, 开户行: 云南省石屏县建行, 帐号: 26508629, 昼夜值班电话、传真: 0873 4857633, 场长电话: 0873 4851008, 手机: 013808776395, 来人路线: 县城西山路石峰宾馆往南 200 米, 或到石屏后电话联系, 有车接送。