园 艺 学 报 2001, 28 (4): 356~ 358
Acta Horticulturae Sinica

抗癌基因 *p*53 导入番茄的初步研究

李晓东[1,*] 曹宛虹[1,**] 刘 玲[1] 陈 杭[1] 程智慧[2]
([1] 北京市农林科学院蔬菜研究中心蔬菜种质改良实验室, 北京 100089; [2] 西北农林科技大学园艺学院, 杨凌 712100)

摘 要: 通过根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 介导, 利用特异表达的 *phaseolin* 基因的启动子与人类野生型抗癌基因 *p*53 构建嵌合基因, 对'美味樱桃'番茄进行遗传转化, 获得转化番茄再生植株。通过组织化学法、PCR 扩增及 Southern 杂交检测, 证明人类野生型 *p*53 基因已整合到转基因番茄植株的基因组。

关键词: 番茄; 人类野生型抗癌基因 *p*53; 遗传转化
中图分类号: S 641. 2; Q 785 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2001) 04-0356-03

1 目的、材料与方法

抗肿瘤基因 *p*53 是现在癌基因研究中最引人注目的肿瘤抑制基因[1], 引入野生型 *p*53 基因可能是基因治疗癌症潜在的有效方法[2~4]。目前野生型或突变型 *p*53 基因或蛋白可通过动物或微生物途径获得, 尚未见其在植物中表达的报道。本研究拟通过土壤农杆菌的感染, 将人类野生型 *p*53 基因转入番茄, 以研究其在番茄中的整合、表达等生物学表现, 希望获得表达 *p*53 基因的植株, 以探索借助番茄作为生物反应器生产野生型 p53 蛋白的可能性。

以'美味樱桃'番茄无菌苗子叶作为转化外植体, 根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株为 GV3101, 高效表达载体 pBI121p53ph 由目的基因 *p*53 与含高效启动子的表达载体 pBI121 连接 (图 1)。

采用农杆菌介导的叶盘共培养转化法, 方法如下: 切取叶盘放于 MS+ ZT 2.0 (mg/L, 下同) + IAA 0.05 培养基, 25 ℃光下预培养 24 h; 预培养的外植体在菌液中浸泡 30 min, 无菌纸吸干菌液, 将外植体转入选择诱芽培养基, 置于 28 ℃暗处共培养 2 d 后, 25 ℃光培养; 选择诱芽培养基为 MS+ ZT 2.0+ IAA 0.05+ Kanamycin (卡那霉素, Km) 50+ Carbenicillin (羧苄青霉素, Cb) 250, 生根培养基为 MS+ IAA 0.1+ Km 50+ Cb 100, 培养基中琼脂浓度为 8 g/L, 蔗糖浓度为 30 g/L。对经过 Km 抗性鉴定的转化植株进行 GUS 染色、PCR 扩增、Southern 杂交检测。

2 结果与分析

2.1 转化苗的生长

对照外植体的诱芽率在 85% 以上, 用于转化的外植体的诱芽率较低。在添加 Km 的选择培养基上, 大部分外植体黄化逐渐死亡, 只有少数外植体培养 2 周后出现小芽点, 3~ 4

收稿日期: 2001- 02- 09; 修回日期: 2001- 06- 01
基金项目: 北京市重点实验室资助项目 (951890211)
* 现在华南师范大学生物系做博士后研究。
* * 通讯作者。

周后逐渐分化出幼叶，形成小芽。待芽长出 2~ 3 枚叶片时，切下芽转入生根培养基，幼芽逐渐生出新叶长成幼苗，当幼苗根系发达后移入温室。整个诱导、培养过程中都有 Km 选择压力存在。

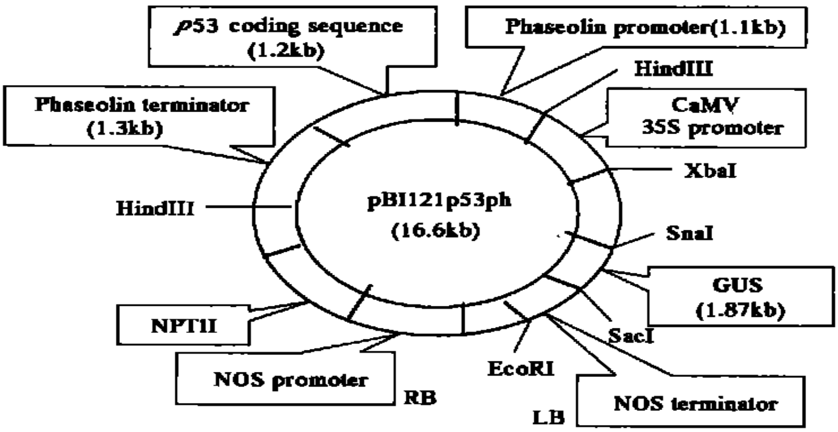

图 1　载体质粒 **pBI121p53ph** 的构建图

Fig. 1　Construction of vector plasmid pBI121p53ph

2.2　组织化学染色法检测

植物表达载体 pBI121p53ph 携带有 GUS 报告基因，因此可通过组织化学染色法进行初步检测。本试验以 X-gluc 为底物，染色结果显示阳性植株的叶片呈蓝色。

2.3　PCR 扩增筛选

取 GUS 检测初步确定的转化番茄植株再进行 PCR 扩增检测。出现大小为 1.2 kb 的 $p53$ 编码序列的特异条带（图 2），表明在该植株中有目的基因片段存在。

2.4　Southern 杂交分析

用经 PCR 检测的转化番茄植株叶片提取总 DNA，限制性内切酶 EcoRI 酶切后转膜，进行 Southern 杂交，结果如图 3 所示。转化番茄植株有杂交带出现，说明 $p53$ 基因已经成功整合到番茄的基因组中，最终获得 5 株转基因番茄植株。

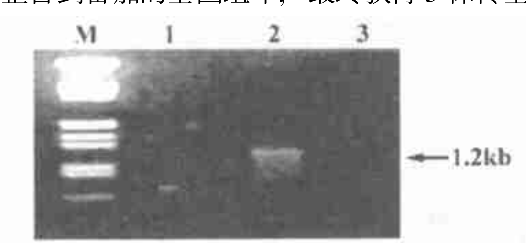

图 2　转基因番茄植株的 **PCR** 检测

M. λDNA/*Hind*III+ *EcoR*I 双酶切分子量标准；

1~ 3 转化番茄植株的不同株系。

Fig. 2　PCR analysis for transgenic tomato plants

M. λDNA/*Hind*III+ *EcoR*I marker;

1– 3. Different lines of transgenic tomato plants.

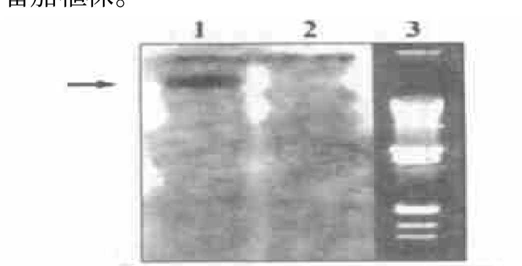

图 3　转基因番茄植株 **Southern blot** 检测结果

1. 转化番茄植株；2. 非转化番茄植株（对照）；

3. λDNA/*Hind*III+ *EcoR*I 双酶切分子量标准。

Fig. 3　Southern blot analysis of transgenic tomato plants

1. Transgenic tomato plant; 2. Untransgenic tomato plant (Control); 3. λDNA/*Hind*III+ *EocR*I marker.

参考文献:

1 Levine A J, Momand J, Finlay G A. The *p*53 tumor suppressor gene. Nature, 1991, 351: 453~456

2 Baker S J, MarkoWitz S, Fearon E. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild type *p*53. Science, 1990, 249: 912~917

3 Palazzo J P, Kafka N J, Grasso L, et al. The role of *p*53, p21WAF1/C1PI, and bcl-2 in radioresistant colorectal carcinoma. Hum. Pathol., 1997, 28 (10): 1189~1195

4 Velaso J A, Medina D L, Romoro J, et al. Introduction of *p*53 induces cell-cycle arrest in *p*53-deficient human medullary-thyroid carcinoma cells. Int. J. Cancer, 1997, 73 (3): 449~455

Preliminary Study on Transformation of Tumor Suppressor Gene *p*53 into Tomato

Li Xiaodong[1], Cao Wanhong[1], Liu Ling[1], Chen Hang[1], and Cheng Zhihui[2]

(*[1]Vegetable Germplasm Improvement Laboratory, Beijing Vegetable Research Center, Beijing* 100089; *[2]Academy of Horticulture, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling* 712100)

Abstract: The strain GV3101 of *Agrobacterium tumefaciens* harboring a plasmid carrying a human wild-type tumor suppressor gene *p*53 driven by the promoter of phaseolin was used to transform cv. Meiwei Cherry of tomato. Leaves of transgenic tomato plants were used for assaying the existence of foreign gene. Results of histochemical assay, PCR amplification and Southern blotting showed that the human wild-type *p*53 gene was integrated into the genome of transgenic tomato plants.

Key words: Tomato; Human wild-type *p*53 gene; Genetic transformation