

梨韧皮部特异表达启动子 AtSUC2驱动下的 GUS 基因的转化和表达

孙清荣^{1*}, 孙洪雁¹, 赵衍², 茹斯·海门得², 罗伯特·戴维斯²

(¹山东省果树研究所, 山东泰安 271000; ²美国农业部百思维尔农业研究中心, 植物分子病理实验室, 马里兰 20705, 美国)

摘要: 以 'Old Home' 梨无菌苗叶片为外植体, 利用根癌农杆菌介导将专一在韧皮部表达启动子 AtSUC2驱动下的 GUS基因转入 'Old Home' 中。筛选出了 'Old Home' 梨叶片高效遗传转化的最佳条件: 农杆菌和外植体在液体培养基上共培比在固体培养基上共培转化率提高 5 倍。PCR 分析和 Southern 杂交鉴定表明 GUS 基因已整合到转基因植株的基因组中, 组织化学检测和 Western 杂交鉴定证明了 GUS 基因在转基因植株韧皮部中的表达。

关键词: 梨; 启动子; 韧皮部特异表达; 基因转化

中图分类号: S 661.2 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2008) 04-0487-06

Transgene Expression in Pear (*Pyrus communis* L.) Driven by Phloem-specific Promoter AtSUC2

SUN Qing-rong^{1*}, SUN Hong-yan¹, ZHAO Yan², Rosemarie Hammond², and Robert E. Davis²

(¹Shandong Institute of Pomology, Tai'an, Shandong 271000, China; ²Molecular Plant Pathology Laboratory, USDA Agriculture Research Service, Beltsville, MD 20705, U.S.A.)

Abstract: Leaves of 'Old Home' pear (*Pyrus communis* L.) *in vitro* were selected as explants. GUS (-glucuronidase) reporter gene (*uidA*) under the control of the *Arabidopsis* sucrose-H⁺ symporter gene (AtSUC2) promoter which is phloem-specific was introduced into 'Old Home' by *Agrobacterium tumefaciens*. Optimal conditions were established for efficient transformation from leaf explants of 'Old Home'. High transformation efficiency was achieved by an improved induction stage following initial *Agrobacterium* infection. In the induction stage, *Agrobacterium* cells and parent leaf explants were co-cultivated on a liquid induction medium, which yielded a five-fold increase of transformation frequency over conventional co-cultivation on a solid medium. The integration was checked by PCR and Southern hybridization. The expression of *uidA* gene was analyzed by GUS histochemical detection and Western Blot analysis.

Key words: pear; promoter; phloem-specific expression; transgene

梨树易感梨衰退病 (Garcia-Chapa et al., 2003)。该病害由专门寄生于韧皮部薄壁细胞的植原体细菌引起, 主要发生在欧洲和北美, 造成梨树大量死亡, 在我国被列为检疫性病害。

控制梨衰退病的发生比较困难, 目前没有有效的治疗方法并且缺少抗或耐植原体病的梨品种。人工工程化抗性基因的出现为植物疾病的控制提供了新的途径。

为了进行抗植原体病的基因工程改良, 确定在韧皮部表达的启动子是非常需要的。

拟南芥蔗糖-H⁺ AtSUC2 基因专一在光合成叶片的韧皮部伴胞中表达 (Stadler & Sauer, 1996;

收稿日期: 2007-12-27; 修回日期: 2008-02-27

基金项目: 山东省优秀中青年科学家科研奖励基金项目 (01DS48)

* E-mail: qingrongsun@hotmail.com; sunqr@sdip.cn

Stadler et al, 2005)。AtSUC2基因的启动子活性已在转基因的拟南芥、烟草及草莓中得到了证明 (Truernit & Sauer, 1995; Inláu et al, 1999; Zhao et al, 2004)。AtSUC2启动子和 GFP融合研究表明在伴胞中产生的 GFP蛋白可以通过胞间连丝进入相邻的筛管分子并在韧皮部内迁移 (Inláu et al, 1999)。但是针对梨衰退植原体病开展基因工程研究国内外还未见报道。

本研究旨在建立梨有效的转化和再生体系, 并证明专一韧皮部表达启动子 AtSUC2能指导 GUS基因在梨转化植株中的韧皮部中表达, 为进行梨抗植原体病基因工程育种奠定基础。

1 材料与方法

1.1 植物材料

‘Old Home’梨 (*Pyrus communis* L.) 无菌苗从美国俄勒冈 Corvallis国家种质资源库获得。无菌苗在 MM培养基 ($MS + BA 1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + BA 0.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{蔗糖 } 30 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$) 上保存和增殖。

1.2 质粒载体

以质粒 pB II21为骨架, 用专一韧皮部表达启动子 AtSUC2替代 CaMV35S启动子启动下游 GUS报告基因 uidA, 构建成的质粒命名为 pB ISPG, 新霉素磷酸转移酶编码基因 (*npt*) 为植物转化细胞提供抗卡那霉素 (Km) 抗性。

质粒 pB ISPG的 T-DNA结构如图 1。

图 1 质粒 pB ISPG的 T-DNA结构图

Fig. 1 Diagram of T-DNA region of pB ISPG

1.3 菌株培养

表达载体质粒的菌株为 EHA105。将菌株接种于含 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Km的 5 mL LBg (LB培养基附加 0.5%葡萄糖) 培养液中, 28℃振荡培养过夜, 然后转接到 50 mL含 $50 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ Km的 LBg培养液中, 在同样条件下培养至 $OD_{600} = 0.6 \sim 0.8$ 。菌液离心, 沉淀用不定梢诱导培养基 M ($NN69 + TDZ 4 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + NAA 0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{乙酰丁香酮 } 20 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 悬浮, 使其 $OD_{600} = 0.6$, 用于侵染转化。

1.4 转化和转基因植株再生

垂直于叶片中脉预切伤的叶片外植体放入菌液中浸染 30 min。取出叶外植体, 转入两种培养基共培: (1) 固体培养基 M, (2) 铺有一层滤纸的液体培养基 M, 共培养 3 d, 分别接种 30~45个外植体, 重复 2次; 转入预培养培养基: M + 头孢噻肟钠 (cef) $100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1} + \text{羧苄西林 (carb) } 100 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 培养 3 d; 转入筛选培养基: 预培养培养基 + Km $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$, 每周继代 1次, 继代培养 6周产生抗性不定芽。

不定芽转入附加 Km $25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 MM培养基上增殖并进一步进行抗性选择, 淘汰白化梢, 保留绿梢。每个存活的绿梢单独编号, 记做 1个转基因株系。根据产生 Km抗性绿色不定芽叶片数占接种总叶片数的百分数来计算转化率。

转基因植株生长高度达 1 cm以上时转入含 Km $10 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的生根培养基上进行诱导生根。试验重复 2次。

1.5 转基因株系的分子鉴定

用改良 CTAB 法从转基因株系和非转基因对照的新鲜无菌苗组织中提取总 DNA (Tel-Zur et al, 1999)。用 GUS 特定的引物 GUS F 5'-caacgaactgaactggcaga-3' 和 GUS R 5'-ttttgtcacgcgcgtatcag-3' 进行 PCR 扩增。

反应体积 50 μ L, 反应条件: 94 8 min, 94 30 s, 56 45 s, 72 45 s, 35 次循环; 72 10 min。

Southern 杂交分析: 从 PCR 阳性株系和非转基因植株取大约 10 μ g 的基因组 DNA 用 *Xba* 酶切, 在 1% 的琼脂糖凝胶上分离, 将 DNA 转移到带正电荷的尼龙膜上, 用 DIG 标记的 GUS 基因片段作为探针。

用抗 DIG 碱性磷酸酶结合 Fab 片段及其底物 CDP-star 的化学发光法检测杂交信号。

1.6 GUS 基因表达的 Western-Blot 分析

参照 Mohamed 等 (2004) 的方法从两个代表性的转基因植株及非转基因植株的根和绿苗中提取总蛋白。

取 10 μ g 总蛋白在 10% ~ 20% Novex Tris-Glycine 胶 (Invitrogen life technologies) 上电泳, 电泳后将蛋白转移到 PVDF 膜。多克隆抗体抗 α -葡萄糖苷酸酶兔 IgG 用做第 1 抗体, 抗兔 IgG (Fc) AP (Pierce & Warriner) 做第 2 抗体。

杂交信号检测同上述 Southern 杂交。

1.7 GUS 基因表达的组织化学分析

参照 Jefferson (1987) 的 GUS 染色法对转基因株系不同部位的 GUS 基因表达活性进行分析。

2 结果与分析

2.1 共培养方法对转化频率的影响

结果表明, 共培养方法明显影响转化率, 液体共培养比固体共培养产生更多的 Km 抗性转化绿梢, 平均转化率 (52.8%) 是固体培养基 (9.5%) 的 5 倍。

2.2 转基因株系的 PCR 分析和 Southern-Blot 检测

共获得 Km 抗性转化绿梢 62 个, PCR 分析了 40 个转化梢, 都扩增出了预期的目的片段 0.83 kb, 但未转化的对照没检测到扩增片段。

图 2 是几个代表转化梢的 PCR。

图 2 转基因株系 PCR 检测

M: 1 kb DNA 分子量标准; CK: 未转基因对照; 1~11: 转基因株系。

Fig 2 PCR analysis of representative putative transgenic lines

M: 1 kb DNA marker; CK: Non-transgenic control;

1 - 11: Putative transgenic lines

Southern Blot检测 T-DNA 插入植物染色体组的数量和位点, 3个 PCR 阳性植株都有杂交信号, 都只插入了一个拷贝, 但插入的位点不同, 而未转化植株没有任何杂交信号 (图 3)。

图 3 转基因株系 Southern 杂交

M: DIG 标记的分子量; CK: 未转基因对照; 1~3: 转基因株系。

Fig 3 Southern-Blot of representative putative transgenic lines

M: DIG-labeled DNA marker; CK: Non-transgenic control;

1 - 3: Representative transgenic lines

2.3 专一韧皮部表达启动子 AtSUC2 启动下 GUS 基因的表达

AtSUC2 启动下的 *GUS* 基因在转基因植株的叶、茎和根的不同组织中都表现很强的活性 (图 4, A、B、C), 但在嫩梢顶部的分生组织、侧芽分生组织及根尖组织中未检测到 *GUS* 活性。这与报道的 AtSUC2 启动的报告基因的表达仅限于源组织的韧皮部的结果 (Zhao et al, 2004) 一致。

图 4 GUS 基因在转基因植株和未转基因对照植株中表达的组织化学分析

A, B, C: 转基因植株, A: 叶; B: 茎; C: 根;

D, E: 未转基因对照, D: 叶; E: 根。

Fig 4 Histochemical analysis of GUS expression in transgenic and non-transgenic plants

A, B, C: Transgenic plants, A: Leaf; B: Stem; C: Root

D, E: Non-transgenic control, D: Leaf; E: Root

未转化的对照无 *GUS* 活性表达 (图 4, D、E)。

2.4 转基因植株中 *GUS* 表达的 Western-Blot 分析

Western 杂交结果证明: 转基因植株中有所期望大小的表达蛋白 (图 5)。但在组织发育的不同阶段, 其表达水平不同: 充分生长具有功能叶片的顶梢比正在生长的嫩梢具有更高表达水平的 *GUS* 活性, 如图 5 中的 1 和 3, 2 和 4。

根中表达水平与充分生长顶梢中的表达水平相似。

这一蛋白表达水平结果与上述 *GUS* 表达的染色结果一致: 幼嫩的分生组织未观察到 *GUS* 染色, 但功能叶片和茎表现很强的 *GUS* 染色。这些结果与前人报道的 AtSUC2 启动子的活性要经历源和库的传递 (Kathryn et al, 2003) 相一致。

图 5 转基因株系 Western 杂交

CK: 未转基因对照植株; 1, 2: 转基因植株 1 和 2 的幼嫩梢;
3, 4: 转基因植株 1 和 2 充分生长的顶梢;
5, 6: 转基因植株 1 和 2 的根。

Fig 5 Western-Blot of representative putative transgenic lines

CK: Non-transgenic control; 1, 2: Young shoot tips of transgenic line 1 and line 2;
3, 4: Fully matured shoots of transgenic line 1 and line 2;
5, 6: Roots of transgenic line 1 and line 2.

3 讨论

本研究的最终目的是将抗植原体的抗菌基因转移到靶细胞中, 用专一调控基因在韧皮部中表达的启动子更具有实际意义, 这样可以缩小或避免不必要的非靶细胞的暴露和抗菌基因的消耗。本研究结果表明 AtSUC2 启动子能够指导 *GUS* 基因专一在梨的韧皮部中表达, 为进一步进行抗植原体的梨转基因工程研究奠定了基础。

将共培养培养基改良为液体培养, 整个试验过程附加 Km 抗性筛选, Km 抗性芽转化率平均为 52.8%, 比汤绍虎等 (2007) 报道的 (‘雪青’梨, 34.24%) 和 Yancheva 等 (2006) 报道的 (‘Spadona’梨, 3%~4%) 大大提高。其原因由于基因型不同之外, 可能与共培养方法有关。本研究为液体共培养, 叶片更易于吸收培养基内的养分及其所含的菌液, 农杆菌侵染植物细胞的可能性更多, 从而获得转化细胞的几率就高, 导致获得转基因植株率高。

References

- Garcia-Chapa M, Medina V, Vinuela A, Laviña A, Batlle A. 2003. Seasonal detection of pear decline phytoplasma by nested-PCR in different pear cultivars. *Plant Pathology*, 52: 513 - 520.
- Inláu A, Truemit E, Sauer N. 1999. Cell-to-cell and long-distance trafficking of the green fluorescent protein in the phloem and symplastic unloading of the protein into sink tissues. *Plant Cell*, 11: 309 - 322.
- Jefferson R A. 1987. Assaying chimeric genes in plants: The *GUS* gene fusion system. *Plant Mol Biol Rep*, 5: 387 - 405.

- Kathryn M Wright, Alison G Roberts, Helle J Martens, Norbert Sauer, Karl J. 2003. Structural and functional vein maturation in developing tobacco leaves in relation to AtSUC2 promoter activity. *Plant Physiol*, 131: 1555 - 1565.
- Mohamed F, Lydia F, Nobuyo K, Masumi I, Hideo I. 2004. Acibenzolar-S-methyl-induced resistance to Japanese pear scab is associated with potentiation of multiple defense response. *Phytopathology*, 94 (6): 604 - 612.
- Stadler R, Sauer N. 1996. The *Arabidopsis thaliana* AtSUC2 gene is specifically expressed in companion cells. *Bot Acta*, 109: 299 - 306.
- Stadler R, Wright M W, Lauterbach C, Ammon G, Gahrz M, Feuerstein A, Oparka K J, Sauer N. 2005. Expression of GFP-fusions in *Arabidopsis* companion cells reveals extensive non-specific protein trafficking into sieve elements, and identifies a novel post-phloem domain in roots. *Plant J*, 41: 319 - 331.
- Truernit E, Sauer N. 1995. The promoter of the *Arabidopsis thaliana* SUC2 sucrose- H^+ symporter gene directs expression of beta-glucuronidase to the phloem: Evidence for phloem loading and unloading by SUC2. *Planta*, 196: 564 - 570.
- Tei-Zur N, Abbo S, Myslabodski D, Mizrahi Y. 1999. Modified CTAB procedure for DNA isolation from epiphytic cacti of the genera *Hylocereus* and *Selenicereus* (Cactaceae). *Plant Mol Biol Rep*, 17: 249 - 254.
- Tang Shao-hu, Sun M in, Liao Zhi-hua, Zhou Qi-gui, Li Dao-gao. 2007. Obtainment of transgenic 'Xueqing' pear plants with a synthetic *CryIAC* gene mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Acta Horticulturae Sinica*, 34 (1): 59 - 62. (in Chinese)
- 汤绍虎, 孙 敏, 廖志华, 周启贵, 李道高. 2007. 根癌农杆菌介导 *CryIAC* 基因转化 '雪青' 梨获得转基因植株. *园艺学报*, 34 (1): 59 - 62.
- Yancheva S D, Shizeman L A, Golubowicz S, Yablovitz Z, Perl A, Hanania U, Flaishman M A. 2006. The use of green fluorescent protein (GFP) improves *Agrobacterium* mediated transformation of 'Spadona' pear (*Pyrus communis* L.). *Plant Cell Rep*, 25 (3): 183 - 189.
- Zhao Y, Liu Q, Davis Robert. 2004. Transgene expression in strawberries driven by a heterologous phloem-specific promoter. *Plant Cell Rep*, 23 (4): 224 - 230.

图书推荐

《果树钙素营养与生理》

本书是针对目前我国果实品质下降和生理病害日趋严重的现实编写的。全书共分六章, 比较详细地总结了果树缺钙症、果实钙素营养水平的调节, Ca^{2+} 在树体内的运转与分配规律, 钙与花芽分化、花粉萌发和花粉管生长、结实及发育之间的关系, 钙参与果实成熟衰老和抗逆性的调控机制, 以及典型缺钙症——苹果苦痘病研究的评述等。

本书由关军锋、(德) 索尔编著, 科学出版社 2005 年 7 月出版, 可作为大专院校和科研单位的果树学、植物生理学、植物营养学等相关专业人员的参考书。定价: 52 元 (含邮费)。

《果品品质研究》

《果品品质研究》由关军锋主编, 是根据我国果品生产发展方向和在果品品质研究日益受到重视的前提下编写的。全书共分五篇, 第一篇系统介绍果品品质的概念、风味物质及绿色果品的生产; 第二篇着重阐述了采前果实品质的发育机理及影响因素, 如生态、水分、激素的调控及果实品质的遗传和改良; 第三篇总结了减少采后果实品质损失的策略及途径, 介绍了重要氧化酶的理化性质; 第四篇分析了主要果实生理病害的发生机理和控制途径; 第五篇介绍了果实品质的数学评价方法和常见果品品质的测定技术。定价: 30 元 (含邮费)。

购书者请通过邮局汇款至北京中关村南大街 12 号中国农科院蔬菜花卉所 《园艺学报》编辑部, 邮编 100081。