

# MAR调控的胰岛素样生长因子 - 转化甘蓝的研究

张应华<sup>1, 2</sup> 王小佳<sup>1\*</sup><sup>(1)</sup>西南农业大学园林园艺学院, 重庆市蔬菜学重点实验室, 重庆 400716; <sup>(2)</sup>云南农业大学园林园艺学院, 昆明 650201)

**摘 要:** 采用根癌农杆菌介导法, 将表达框两翼构建了核基质结合区 (matrix attachment region, MAR) 的胰岛素样生长因子- (Insulin-like Growth Factor- , IGF- ) 基因导入甘蓝中, 在含卡那霉素的培养基上连续 4 次筛选, 通过 10 个批次的转化试验, 获得 25 株抗性植株, PCR 检测均呈阳性, 随机选取 5 株进行基因组 Southern 杂交, 结果有 3 株出现了杂交带, 表明 IGF- 基因已成功整合到甘蓝基因组中。

**关键词:** 胰岛素样生长因子- ; 核基质结合区; 甘蓝; 转化

中图分类号: S 635.1 文献标识码: A 文章编号: 0513-353X (2005) 02-0307-03

## Transformation of Cabbage with Insulin-like Growth Factor- Regulated by Matrix Attachment Regions

Zhang Yinghua<sup>1,2</sup> and Wang Xiaojia<sup>1\*</sup><sup>(1)</sup> College of Horticulture and Landscape, Southwest Agricultural University, Key Lab in Vegetable Research of Chongqing, Chongqing 400716, China; <sup>(2)</sup> College of Horticulture and Landscape, Yunnan Agricultural University, Kunming 650201, China)

**Abstract:** Hypocotyl explants of 7 day-old cabbage (*Brassica oleracea* L. var *capitata* L.) seedlings were pre-cultured on bud induction medium (MS + BA 3 mg/L + NAA 0.1 mg/L) for two days. The explants were then infected with *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA105 harboring a plasmid vector containing IGF- gene that flanked by matrix attachment regions (MARs) isolated from the genome of tobacco (*Nicotiana tabacum* L.). After two days of co-culture, the explants were transferred onto agrobacterium-suppressive medium (MS + BA 3mg/L + NAA 0.1 mg/L + Cb 400 mg/L) and cultivated for six days. Through four times of kanamycin-resistant selected culture (MS + BA 3 mg/L + NAA 0.1 mg/L + Km 5 mg/L + Cb 400 mg/L), 25 resistant shoots were obtained from 10 transformation experiments with total 15 200 explants. Some of the resistant regenerated plants were tested by PCR analysis and Southern blot, which showed IGF- gene was integrated into cabbage genome.

**Key words:** Insulin-like growth factor- ; Matrix attachment region; Cabbage; Transformation

## 1 目的、材料与方法

胰岛素样生长因子- (IGF- ) 是一种多功能细胞增殖调控因子, 在神经损伤、糖尿病、生长迟滞、骨质疏松等疾病的治疗中具有广阔的应用前景<sup>[1]</sup>。IGF- 主要存在于人和动物的血液中, 但其含量非常低, 靠纯化天然物质, 无法满足临床利用需要, 通过基因工程生产 IGF- , 可望满足人类治疗和保健的需求。

甘蓝 (*Brassica oleracea* L. var *capitata* L.) 材料为自交系 93131, 农杆菌菌株为 EHA105, 转化所用表达载体为 pBM IGF-M, IGF- 基因是根据甘蓝基因密码偏爱性设计的, 并将起始密码 ATG 周围序列修饰成有利于在植物中转录和翻译的 Kozak 序列。为提高转基因植株中目的基因的表达水平, 用 PCR 方法从烟草中克隆了一段 688 bp 的核基质结合区 (MAR)<sup>[2]</sup>, 构建到表达框的两翼, 表达载体结构见图 1, 箭头表示 MAR 以相同方向排列。

收稿日期: 2004 - 06 - 17; 修回日期: 2004 - 08 - 24

基金项目: 教育部科学技术研究项目 (00227); 重庆市教委科学基金项目 (011813)

\*通讯作者 Author for correspondence (E-mail: xj@swau.edu.cn)

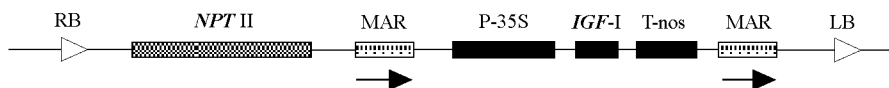


图 1 植物表达载体 pIM IGF-M 结构示意图

Fig 1 Diagram of plant expression vector

甘蓝种子用 70%乙醇消毒 30 s, 0.1%升汞液浸泡 10 min, 无菌水冲洗 4次, 播于 1/2MS固体培养基。切取发芽 7 d的幼苗下胚轴, 在分化培养基 MS+BA 3 mg/L+NAA 0.1 mg/L上预培养 2 d, 培养的光照强度为 3000 lx, 光照时间 16 h/d, 温度 (25 ±2) (下同)。农杆菌在含卡那霉素 (Km) 50 mg/L和链霉素 (Str) 40 mg/L的 YEB培养基上振荡培养过夜 (28 °C, 225 r/min), 次日用相同培养基稀释 50倍, 继续培养 4 h至对数生长期, 4000 r/min离心 5 min收集菌体, 然后用 MS+乙酰丁香酮 (As) 150 mg/L悬浮, 侵染经预培养的外植体 3~4 min, 无菌滤纸吸干后, 重新接回预培养基中, 黑暗条件下共培养 2 d。将共培养后的外植体转到含羧苄青霉素 (Cb) 400 mg/L的分化培养基上进行抑菌培养 6 d, 再转到 MS+BA 3 mg/L+NAA 0.1 mg/L+ Km 5 mg/L+Cb 400 mg/L的筛选培养基中培养。

用 CTAB法提取抗性植株 DNA, 未经转化植株作阴性对照, 进行 PCR检测。Southern杂交用 ECL核酸标记与检测试剂盒 (Amersham) 操作规程进行, DNA提取用上海生工植物 DNA抽提试剂盒, 每个样品 DNA取 10~15 μg, 以未转化植株作阴性对照, Hind III单酶切, 60 V电泳 3 h后用 Bio-Rad 785型真空转膜仪转到尼龙膜上, CL-1000紫外交联仪将其固定。质粒中切下的一段包含目的基因的片段, 用辣根过氧化物酶标记后作探针, 进行杂交。

## 2 结果分析与讨论

### 2.1 转化植株的获得

在筛选培养基上培养 20~30 d后, 外植体开始分化出不定芽, 绝大多数为白色, 只有少数为正常的绿色 (图 2), 切下生长正常的绿色幼芽, 转到相同选择培养基上继续进行抗性筛选, 1周后其大部分又慢慢白化 (图 3), 将少数保持绿色的芽再转到筛选培养基上筛选, 经连续 4次筛选培养后, 以独立抗性芽为单位, 扩繁成无性系, 并转入生根培养基 (MS+NAA 0.1 mg/L+ Km 6 mg/L+Cb 250 mg/L) 中生根。转化苗经 2~3 d炼苗后, 移栽到营养钵中。本研究共进行了 10个批次试验, 由于所采用的甘蓝材料对 Km太敏感, 筛选较困难, 转化 15 200个外植体, 只获得了 25个抗性植株, 转化效率很低。



图 2 外植体上分化出的不定芽, 绝大多数都是非抗性的白化苗

Fig 2 Most of adventitious buds are non-resistant albino ones



图 3 在 Km 5 mg/L的筛选培养基上的转化苗 (右) 和非转化苗 (左)

Fig 3 Comparison of transgenic plantlet (right) and non-transgenic plantlet (left) on the selective medium (containing Km 5 mg/L)

## 2.2 转化植株的分子检测

经 PCR 检测, 25株抗性植株都能扩增出预期的目标片段, 部分植株 PCR 扩增结果见图 4。随机选取 5株抗性植株 (不同株系) 进行 Southern blot分析, 结果有 3株出现了杂交带, 另外 2株则没有杂交带 (图 5), 可见 PCR 检测虽然简便快速, 但易出现假阳性, 因此对于转基因植株的鉴定, PCR 方法只能作为初步结果, 尚需作进一步检测分析才能确定其是否属于转基因植株。

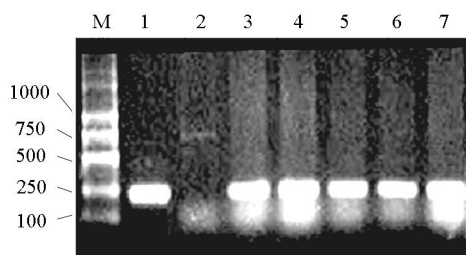


图 4 部分转化植株的 PCR 检测

M. Marker; 1. 阳性对照; 2. 阴性对照 (未经转化植株); 3~7 为转化植株。

Fig 4 PCR analysis of partial transformed plants

M. Marker; 1. Positive control; 2. Negative control (untransformed plant); 3 - 7. Transformed plants

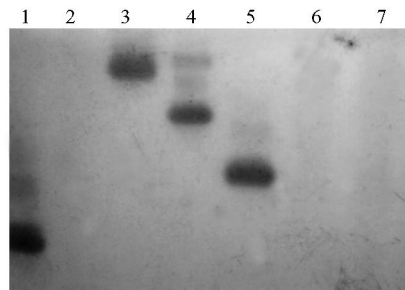


图 5 转基因植株的 Southern 杂交检测

1. 阳性对照 (含 IGF-I 的质粒片段); 2. 阴性对照 (未经转化植株); 3~7 为转化植株。

Fig 5 Southern blot analysis of transformed plants

1. Positive control; 2. Negative control (untransformed plant); 3 - 7. Transformed plants

利用转基因植物作为生产药物的反应器, 因其上游生产较为简单, 直接食用可以大大降低生产成本, 但目前存在着表达效率低下和遗传性不稳定问题, 而且宿主植物仅局限于马铃薯、番茄和烟草等几种常用的模式植物上<sup>[3]</sup>, 本试验通过偏爱密码选用及 MAR 引入所构建的高效植物表达载体转化甘蓝, 成功获得了 IGF- 转基因植株, 为通过 DNA 重组技术生产 IGF- 提供了一条新的可能途径。

## 参考文献:

- 1 徐伟文, 吴岚晓. 胰岛素样生长因子 的临床应用及其前景. 国外医学内分泌学分册, 1999, 19 (6): 270 ~ 273  
Xu W W, Wu L X. The clinical application and prospect of insulin-like growth factor I Foreign Medical Science Section of Endocrinology, 1999, 19 (6): 270 ~ 273 (in Chinese)
- 2 Michalowski S M, Allen G C, Hall G E Jr, Thompson W F, Spiker S. Characterization of randomly-obtained matrix attachment regions (MARs) from higher plants. Biochemistry, 1999, 38: 12795 ~ 12804
- 3 高书颖, 郭蔼光, 金伟波, 范三红. 利用转基因植物生产药用蛋白研究进展. 西北植物学报, 2003, 23 (6): 1044 ~ 1048  
Gao S Y, Guo A G, Jing W B, Fan S H. The development in studying the transgenic plants producing medical protein. Acta Botanica Boreali-Occidentalia Sinica, 2003, 23 (6): 1044 ~ 1048 (in Chinese)

## 新书推荐

### 《柑橘学》 何天富 主编

中华农业科教基金资助图书。全书分为 17 章。分别介绍了柑橘的发展史略、柑橘遗传资源、中国柑橘生态区划、柑橘的生物学、柑橘的代谢生理、柑橘的矿物质营养、柑橘育种、柑橘生物技术、柑橘育苗、果园建立、柑橘园的土壤管理、柑橘对不良环境的适应性及防护技术、柑橘病虫害、柑橘的采后处理及贮藏加工等重要内容。可作为高校师生和研究工作者的参考教材和资料, 供从事于柑橘生产者阅读参考。

定价: 207.00 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。

