

基因枪轰击成熟花粉粒转化玉米的研究

刘丹梅¹, 杨 君²

(1.辽东学院生物系, 辽宁 丹东 118003; 2.大连理工大学生物科学与工程系, 辽宁 大连 116024)

摘要: 研究了利用基因枪轰击花粉粒再授粉的基因转化途径, 将豇豆胰蛋白酶抑制剂基因(*CpTI*)成功导入玉米受体中。卡那霉素筛选结果表明, 非转化植株经 1 000 mg/kg 卡那霉素溶液处理后白化、死亡, 余下大量健壮、可育的抗性植株, 转化率约 1.59%。通过对抗性植株进行 PCR 和 PCR-Southern 检测, 初步确定 *CpTI* 基因已导入玉米基因组。饲虫实验结果表明, 转化植株具有较强的抗虫性。

关键词: 玉米; 基因转化; 基因枪; 花粉粒

中图分类号: Q78; S513.035.3

文献标识码: A

Studies on Transforming *CpTI* Gene into Maize by Biolistics Bombardment of Pollen

LIU Dan-mei¹, YANG Jun²

(1. Department of Biology, Liaodong University, Dandong 118003, China;

2. Department of Bioscience and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, China)

Abstract: The *CpTI* gene has been delivered into maize through pollen tube pathway by biolistics bombardment of pollen. These plants were carried on further screen of kanamycin and molecular test. Some of them were confirmed to be transgenic plants by assays of PCR and PCR-Southern. The transgenic maize has a certain degree of resistance to corn borer.

Key words: Maize; Genetransformation; Biolistics bombardment; Pollen

玉米是一种重要的粮食和饲料作物, 长期以来, 育种学家通过常规技术已培育出大量优良品种。利用基因工程手段可以打破物种间和远缘杂交不亲和性的限制和障碍, 自从 1974 年花粉管通道技术开始尝试并使用后, 人们发展了多种转化手段 (朱生伟等, 2000; 施中华等, 1998)。例如: 将外源 DNA 滴涂在柱头断面上、人工培养的花粉粒与外源 DNA 溶液混合后授粉、将外源 DNA 注射入子房等 (Hess D, 1980; De wet, et al. 1985)。也有人尝试用基因枪轰击、电击、显微操作等手段先将外源基因导入花粉, 再授粉获得转化体, 但未能取得完备的实验证据。我们通过基因枪轰击成熟花粉粒再授粉的方法, 进行了大量的转化实验, 将抗虫的 *CpTI* 基因导入玉米, 为作物育种提供了一种可重复性强、应用范围广、简单、经济的转化体系。

1 材料与方法

1.1 植物材料

本实验所用玉米自交系 3187、3188、3104、5104 和 3103 由大连农科所提供。

1.2 质粒

供试质粒为 PAP1D-*CpTI*, 由中科院遗传所提供。其中含有抗虫的豇豆胰蛋白酶抑制剂基因(*CpTI*)的完整片段, 其启动子为来源于水稻的 *actin I* 基因, 植物筛选标记为 NPT II, 细菌筛选标记为 *cb* 和 *str*。

1.3 转化操作

1.3.1 质粒 DNA 的提取和纯化, 参照 Maniatis T, et al. 1992。

1.3.2 基因枪轰击

(1) 对玉米自交系雄穗套袋 24 h 后, 选取花粉丰富的植株收集花粉, 均匀铺于直径为 3 cm 的培养皿中。

(2) 洗涤钨粉。取 100 ng 钨粉(直径为 1.0 mm)溶

收稿日期: 2004-12-22

作者简介: 刘丹梅(1973-), 女, 辽宁丹东人, 硕士, 从事植物基因工程研究。Tel: 0415-2124472 13190205266

E-mail: ddliudanmei@163.com

于 1 mL 无水乙醇中,在旋涡振荡器上振荡 1~2 min 后离心尽量移去乙醇,再用无菌水洗去残留乙醇,加入 1 mL 无菌水重悬沉淀密闭储存于 4℃。

(3)制备微弹 DNA。取微粒重悬液 25 μ L,加入 25 μ L 质粒 DNA (1 μ g/ μ L) 溶液,25 μ L 2.5 mol/L CaCl_2 溶液,10 μ L 0.1mol/L 亚精胺,充分振荡后室温静置 10 min 后,离心去上清液,加 60 μ L 无水乙醇重悬,供 5~6 次枪击用,每次枪击加样 8~10 μ L。

(4)枪击。取悬液 8~10 μ L 滴于挡板凹槽中,用无菌风吹至半干状态,倒悬于挡槽中,准备好发射装置。将样品放入样品室,加阻挡网,调节距离至 4 cm,引发火药弹射击。视情况每个样品可射击 3~4 次,以提高导入率。

1.3.3 授粉

将枪击后的花粉立即对原株雌穗进行人工授粉,再套袋以待结实。

1.4 筛选与鉴定

1.4.1 筛选

将处理当代的种子及对照种子浸于水中约 3~5 d,使其萌发。当种子刚刚开始萌发时,将其置于 1 000 mg/kg 的卡那霉素溶液中浸泡 24 h,然后单株点播于营养钵中,对幼苗进行进一步的筛选,在叶片背部中脉处用刀片割伤,并粘上含卡那霉素溶液的脱脂棉。经过约 40 d 的筛选,将正常非白化的植株移栽于试验田中,观察并统计出苗率。并在田间进行饲虫试验,观察抗性植株的抗虫效果。

1.4.2 PCR 检测

分别取抗性植株和对照植株的叶片,采用氯仿-异戊醇法提取植物 DNA。进行 PCR 扩增(引物 P1:5'-GATGATGCTGCTAAAGGTGT-3';引物 P2:5'-CTTACTCATCATCTTCATCC-3'),反应总体积为 50 μ L,其中包括 10 倍缓冲液,4 种 dNTP(每种各 0.2 mmol),引物各 50 pmol,200 ng 基因组 DNA,1~3 单位 Taq DNA 聚合酶。在 PE-2400 扩增仪上经预变性后,以 95℃变性 30 s,58℃复性 60 s,72℃延伸 60 s 的条件扩增 30 个循环,最后再于 72℃继续延伸 10 min。取扩增产物于琼脂糖凝胶电泳检测,溴化乙锭染色,紫外分析,照相。

1.4.3 PCR-Southern 检测

(1)将 PCR 产物的电泳胶转入适当大小的干净瓷盘中,作好标记,切去多余部分。

(2)在碱性条件下(0.4 mol/L NaOH),进行毛细管方式的吸印。以滤纸桥接触碱液,将电泳胶置于滤纸桥上,上面覆以与电泳胶大小一致的尼龙膜、两张

定性滤纸及一叠裁好的吸水纸,最后压上 500 g 以上的重物。注意不要倾斜及移动位置。

(3)中间换吸水纸 2~3 次,吸印约 20 h。

(4)将膜置于杂交盒中,加入煮沸的洗液(0.1 $\times$ SSC,0.5%SDS)200 μ L 振荡洗涤两次,每次 5 min。

(5)加入预杂交液(5 $\times$ HSB,Denhardt III,Carrier DNA,ddH₂O)65℃振荡水浴 5 h。

(6)以 GibcoBrl 公司的试剂盒标记探针,室温放置 5 h。

(7)在杂交盒中,加入经碱变性的标记探针,65℃振荡水浴约 16 h。

(8)洗膜后于暗室中压 X 光片。-70℃冰箱中放置 5~20 h(视放射强度而定)后,洗片检查,分析。

2 结果与分析

2.1 卡那霉素对转化植株的筛选作用

为了确定适宜的转化子筛选的合适浓度,我们进行了卡那霉素浓度梯度对玉米正常种子的抑制实验。选取 5 个品种的萌发种子浸于含 0、200、400、800、1 000 和 1 500 mg/kg 卡那霉素的溶液中 24 h,然后单株点播于营养钵中,40 d 后观察幼苗的情况(表 1)。结果表明,不同玉米品种的受抑程度虽不同,但均对卡那霉素有一定的抗性。由于所有的幼苗在 1 000 mg/kg 的卡那霉素溶液处理后均不能成活,因此选择 1 000 mg/kg 作为转化种子的选择压。

表 1 卡那霉素对玉米植株的抑制作用

选择压 (mg/kg)	各品种的出苗百分率(%)				
	3187	3188	3104	5104	3103
0	100	100	93	100	96
200	83	57	67	80	70
400	80	23	60	50	50
800	17	0	0	10	3
1 000	0	0	0	3	0
1 500	0	0	0	0	0

注:各品种在每个选择压下均以 30 粒种子作为实验材料。

2.2 抗性植株的筛选

表 2 T₁ 代植株出苗情况

品种代号	处理种子 总数(粒)	移栽出苗 数(株)	移栽出苗 率(%)	最终出苗 数(株)	出苗率 (%)
3187	280	17	6.07	3	1.07
3188	430	32	7.44	15	3.49
3104	300	6	2.00	1	0.33
5104	160	9	5.62	3	1.88
3103	400	18	4.50	3	0.75
合计	1 570	82	5.22	25	1.59

选取 T₁ 代种子 1 570 粒进行筛选处理,出现大量死亡或白化现象。经过约 40 d 的筛选,得到正常

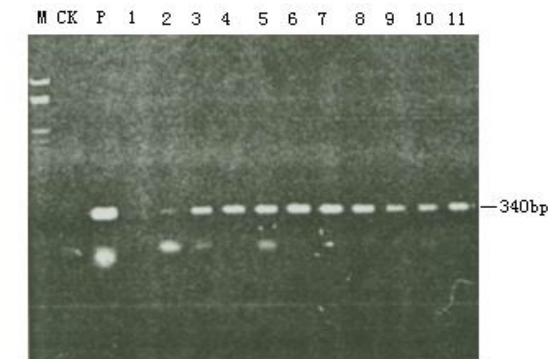
非白化植株 82 株,出苗率为 5.2%。移栽入试验田后仍有白化植株继续出现,4 周后再进行统计,余下健壮可育的 T_1 代植株 25 株,转化率为 1.59%(表 2)。

2.3 饲虫试验结果

对转化植株进行了抽样抗虫性统计,选取两个品种的转化及对照植株各 100 株进行剖秆分析。在转化植株中发现 81 条玉米螟,而在对照植株中则共有 413 条玉米螟,该结果初步证明转化植株具有较强的抗虫性。

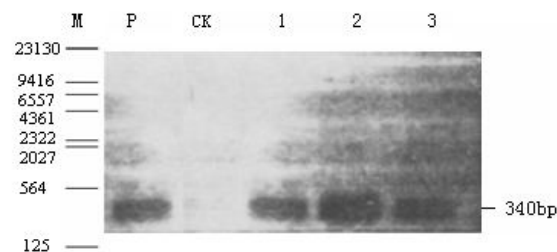
2.4 PCR 及 PCR-Southern 检测结果

当植株成熟时,在获得的 T_1 代植株中随机选取 20 株抗性植株,分别提取 DNA,进行了 PCR 检测,有 8 株显示阳性结果,分别检测到 340 bp 的 *CpTI* 目标带,而非转化处理的对照均无目标带显示(图 1)。在 PCR-Southern 检测中,经检测的 3 个植株均显示出较强的杂交信号(图 2),进一步证明了 PCR 扩增出的目标带是 *CpTI* 目的基因片段。



M 为 λ -DNA HindⅢ/EcoR I marker,CK 为非转化植株,
P 为质粒 DNA,1~11 为转化植株

图 1 PCR 检测结果



M 为 λ -DNA HindⅢ/EcoR I marker,P 为质粒 DNA,
CK 为非转化植株,1~3 为转化植株

图 2 PCR-Southern 检测结果

3 结论与讨论

利用花粉管通道法能够将外源 DNA 直接导入到植物基因组中,产生变异后代,这一方法和结论已经被很多实验证实。通过对植物受精过程的研究发现,在受体组织中同时具备再生感受态和转化感受态的细胞是转化成功的关键。当受精过程开始后,卵

细胞发生急剧的脱分化过程;形成合子后,彻底消除了以前的分化特性,变成核大、质浓和分裂活跃的细胞,具有再生及转化感受态细胞的特点。亚显微结构的观察揭示,在精子进入时,卵细胞的细胞壁还未形成,一些壁物质分散地聚集在细胞膜的表面。因此,这些卵细胞类似未完全酶解的原生质体,为外源基因的进入提供了可能性。邓德旺等采用激光共聚焦显微技术验证了棉花花粉管通道转化的可行性,外源 DNA 以高亲和力荧光探针标记后导入授粉后的子房,通过 Leica 共聚焦激光扫描显微镜观察到花粉管从花柱进入中轴胎座时,需要经过一个折向,沿着中轴座的外周向下生长,在胚珠着生处再折向进入珠孔。外源 DNA 经过胎座上部分传输组织中的花粉管外缝隙、胎座表面、珠孔、花粉管通道进入胚囊,直接转化处于融合期无壁生殖细胞而不是受精卵。黄国存等利用绿色荧光素酶基因进行的工作也验证了花粉管通道是外源基因进入胚囊实现转化的可能途径之一。

花粉管通道法由于不依赖于组织培养和再生植株等体外培养过程,但是因转化效果不稳定、重现性差等原因,至今没有得到广泛接受和应用。

粒子轰击为 DNA 导入植物细胞的瞬时基因表达和稳定转化研究提供了一种快速的方法。但多数利用粒子轰击的转化方法都需要建立受体植物离体培养系统,给转化工作带来了很大的麻烦。我们首次尝试把粒子轰击和花粉管通道的方法结合使用,从而简化了操作程序,并提高了转化效率。本实验利用了花粉是完整带壁细胞及短时间离体仍可存活的特点,用高速粒子将外源 DNA 携带入花粉细胞中,再经过植物的双受精过程,使外源 DNA 整合并遗传给后代。

花粉的活力高低是实验成败的关键。为保持花粉活力,应尽量缩短花粉离体时间和减小轰击对花粉的伤害。如有条件,应将基因枪安排在试验田附近进行枪击。自收集花粉至再授粉的时间应控制在 2 h 以内。轰击次数与花粉受伤害程度直接相关,但增加轰击次数会相应提高花粉接受外源 DNA 的几率。对轰击次数进行设定梯度的筛选,我们认为每个样品轰击 3~4 次为最佳。

参考文献:

[1] 朱生伟,黄国存,孙敬三. 外源 DNA 直接导入受体植物的研究进展[J]. 植物学通报,2000,17:11-16.
[2] 施中华. 花粉作为外源基因媒介的植物遗传转化[J]. 植物学通报,1998,15:6-10.

(上接第 27 页)

- [3] Hess D. Investigations on intro- and interspecific transfer of anthocyanin genes using pollen as a vector[J]. Pflanzenphysiol, 1980, 98: 321-327.
- [4] De wet J M J. The experimental manipulation of ovules tissue[J]. Longman Inc Y. N., 1985, 197.
- [5] Ohta Y. High-efficiency genetic transformation of maize by a mixture of pollen and Exogenous DNA[J]. Proc Natl Acad Sci., USA, 1986, 83: 715-719.
- [6] Maniatis T, Samrook J, Fristch E F. Molecular Clone, A Laboratory Manual[M]. Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1992.
- [7] Zhou G Y, Weng J. Introduction of exogenous DNA into cotton embryos[J]. Method in Enzymology, 1983, (101): 433-448.
- [8] 龚蓁蓁, 沈蔚芳, 周光宇, 等. 授粉后外源 DNA 导入植物技术-DNA 通过花粉管通道进入胚囊[J]. 中国科学(B), 1988, (6): 611-614.
- [9] Potrykus I. Gene transfer methods for plants and cell cultures[J]. Ciba Found Symp, 1990, 154: 198-208.
- [10] 谢道昕, 范云六, 倪万潮, 等. 苏云金杆菌(*Bacillus huringiensis*) 杀虫晶体蛋白基因导入棉花获得转基因植株[J]. 中国科学, 1991, (4): 367-373.
- [11] 谢道昕, 范云六, 倪丕仲, 等. 苏云金杆菌杀虫基因导入水稻栽培品种中花 11 获得转基因植株[J]. 中国科学, 1991, (8): 830-834.
- [12] 邓德旺, 郭三堆, 杨志民. 棉花花粉管通道法转基因的分子细胞学机理研究[J]. 云南大学学报, 1999, (3): 124-125.
- [13] 黄国存, 董越梅, 孙敬三. 以 GFP 为标记用花粉管通道途径导入外源 DNA[J]. 科学通报, 1998, 43(23): 2531-2533.
- [14] Shou H X, Palmer R G, Wang K. Irreproducibility of the soybean pollen-tube pathway transformation procedure[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 2002, 20: 325-334.