

文章编号: 1005-0906(2008)01-0015-05

转植酸酶基因玉米的获得及其后代的初步鉴定

刘欣芳¹, 高晓蓉², 苏 乔², 安利佳², 李月明¹

(1. 辽宁省农业科学院玉米研究所, 沈阳 116016; 2. 大连理工大学环境与生命学院, 辽宁 大连 116023)

摘 要: 构建了仅含有启动子序列、植酸酶基因和终止子序列的线性基因转化元件(UPN)及其两端分别带有 T-DNA 边界序列(T-UPN)和一段载体序列(V-UPN)的不同线性转化元件, 不含选择性标记基因和载体骨架序列, 采用花粉管通道法对选定的玉米自交系进行转化, 对 728 株 T₁ 代转化玉米 PCR 检测。结果表明, UPN、T-UPN、V-UPN 3 个转化元件的阳性率分别为 0.44%、2.2% 和 1.8%, 平均转化率为 1.5%。检测时, 以种子在果穗上的不同位置分别播种、检测。结果表明, PCR 阳性株都是来源于第 5~9 圈种子, 这个部位的阳性率达到 3.57%, 说明花粉管通道法转化玉米的成功率与种子结实的位置有关。植酸酶比活结果说明外源基因在转化玉米植株内实现了蛋白质水平的表达。

关键词: 花粉管通道法; 玉米; 植酸酶; 线性化基因; 遗传转化

中图分类号: S513.035.3

文献标识码: A

Transconduct *phyA* II Gene into Maize Inbred Lines and the Elementary Apprise of Transgenic Progency

LIU Xin-fang¹, GAO Xiao-rong², SU Qiao², AN Li-jia², LI Yue-ming¹

(1. Corn Research Institute of Liaoning Academy of Agricultural Science, Shenyang 110161;

2. Environment and Life School of Dalian University of Technology, DaLian 116023, China)

Abstract: Three linearized DNA fragments without selectable marker gene and vector backbone were constructed containing *phyA* gene with regulation sequences(UPN) or T-DNA borders(T-UPN) or the plasmid borders(V-UPN). The linearized genes without selectable marker and vector backbone are safe in biology, they were transformed into maize inbred lines respectively via pollen-tube pathway. PCR amplification for three transformants T₁ seeds showed different positive rate, UPN was 0.44%, T-UPN was 2.2% and V-UPN was 1.8%. The results also showed that the ratio of successful transformant by pollen-tube pathway was related to the location of seeds and the time after pollination but not to the lines of maize. The results of phytase activity assays demonstrated that the *phyA* II gene has been expressed at protein levels in the transgenic maize.

Key words: Pollen-tube pathway; Maize; Phytase; Linearized genes; Gene transformation

玉米(*Zea mays* L.)是重要的粮饲作物, 有机磷含量高, 大部分都是以植酸形式存在。单胃动物的消化道中缺乏植酸酶(phytase), 对植酸磷的利用率很低, 植酸还降低植物中矿物质元素的利用价值, 降低蛋白质的利用率。不能被单胃动物所利用的植酸磷由

动物粪便排泄出体外后被土壤、水中的微生物分解, 引起河流、湖泊的富营养化作用, 致使藻类及其它浮游生物迅速繁殖, 水体溶氧量降低, 水质恶化, 从而对生态平衡造成很大的影响。本实验将植酸酶基因转入玉米, 降解玉米体内的磷酸, 提高玉米体内可利用无机磷的含量, 提高玉米的品质。

花粉管通道法(pollen-tube pathway)是利用植物授粉后所形成的天然的花粉管通道, 将外源 DNA 携入胚囊, 以达到遗传转化的目的。这种方法避免了组织培养的过程而直接收获转化的种子, 理论上可用于任何开花植物。本研究构建了不含有载体骨架的基因转化元件, 通过花粉管通道法将植酸酶基因导

收稿日期: 2007-08-30

基金项目: 辽宁省科技基金项目(2001101001)

作者简介: 刘欣芳(1981-), 女, 硕士, 从事生物技术和玉米育种研究。Tel: 024-31029900 E-mail: xinfangliu2002@126.com

安利佳为本文通讯作者。Tel: 0411-84706356

E-mail: bioerg@dlut.edu.cn

入玉米,从而获得转植酸酶基因玉米。对转化玉米的 PCR 和植酸酶比活的初步检测,说明植酸酶基因在转化植株内实现了整合和蛋白质水平的表达。

1 材料与方法

1.1 材料

受体材料:玉米自交系丹 340、昌 7-2、Mo17、沈 135 和铁 7922。

质粒:质粒 pUC118/*phyA* II, 含有 *phy* 基因(登录号:AY013315),为大连理工大学环境与生命科学院植物基因工程实验室保存。

1.2 方法

1.2.1 线性基因转化元件的制备

以 pUC118/*phyA* II 质粒作为模板,通过 PCR 的方法将 T-DNA 左右边界各 25bp 序列分别加到玉米泛素基因 -1(*ubi*)启动子的 5'端和 NOS 终止子的 3'端,扩增的产物即为带有 T-DNA 左右边界序列的含有植酸酶基因的线性基因转化元件(T-UPN);以载体一段边界序列为引物,扩增的产物为带有一段载体序列的含有植酸酶基因的线性转化元件(V-UPN);以启动子和终止子的边界序列为引物,扩增的产物为仅含有启动子序列、植酸酶基因和终止子序列的线性转化元件(UPN),转化元件大小为 3.6 kb(图 1)。

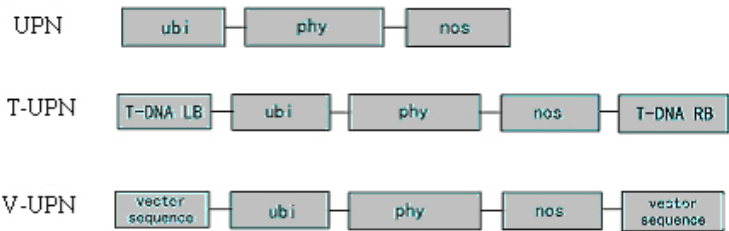


图 1 植酸酶基因转化元件构建图

Fig.1 Constructions of linearized phytase gene

1.2.2 利用花粉管通道技术转化玉米

玉米植株生长至开花期,按常规方法进行雌、雄花套袋隔离、授粉,授粉后在所设时间段内,与穗轴顶部相齐切掉花柱和苞叶,不要伤到雌穗,然后用微量进样器吸取转化元件溶液 100~200 μ L (浓度为 100 ng/ μ L 左右,溶解在 0.1 $\times$ SSC 缓冲液中)均匀地滴在切割后的花柱上,对照植株只转化缓冲液,套袋,待果穗成熟收获。

1.2.3 转化植株的 PCR 检测

将转化后收获的种子种植,待生长至苗期,取叶

片采用 CTAB 法提取玉米总 DNA 进行 PCR 检测。以植酸酶基因的特异性序列为引物,所用 PCR 引物种类和序列如表 1 所示,PCR 反应体系及条件为: 10 $\times$ Buffer²⁺ 2.5 μ L, dNTP 2 μ L, 引物各 1 μ L, 模板 DNA (30~50 ng/ μ L) 1 μ L, Taq 酶 (5 U/ μ L) 0.25 μ L, ddH₂O 17.25 μ L。94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 98 $^{\circ}$ C 变性 30 s, 55 $^{\circ}$ C 复性 45 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 30 s, 30 个循环, 72 $^{\circ}$ C 温浴 7 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 扩增产物经 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 仪使用大连生物工程有限公司生产的 TaKaRa PCR Thermal Cycler。

表 1 PCR 检测引物

Table 1 Primers for PCR amplification

	引 物 Primers	序列 Sequences	扩增片段长度 Fragments
第一组	F4	5'-CCAAGggCAAgAAATACTCC-3'	488bp
	R4	5'-gAgAgACACgCCAgACAAg-3'	
第二组	F423	5'-CTCCAgTCCCTgAACAAATACTACgg-3'	423bp
	R423	5'-ACAgCCATgCAGCggAACAA-3'	

1.2.4 转基因玉米的植酸酶比活的测定

植酸酶活性单位是在 55 $^{\circ}$ C、pH 5.5 条件下每分钟水解植酸释放 1 μ mol 无机磷所需的酶量,为 1 个酶活单位 U。根据国际酶学委员会的规定比活力

用每 mg 蛋白质所含的酶活力单位数表示,对同一种酶来说,比活力愈大,表示酶的纯度愈高。本实验采用考马斯亮蓝法测定玉米总蛋白的含量,采用钼酸铵法测定转基因玉米中无机磷的含量。酶活性公

式计算如下:酶活性 $= (OD - OD_0) \times N / (31 \times K \times T)(U)$ 。其中 OD 为测定样品在 820 nm 下的吸光值,N 为样品的稀释倍数,31 为磷的原子量,K 为标准曲线斜率(本实验中 $K=0.0065$),T 为酶作用时间(本实验中 $T=15\text{ min}$)。最后按以下公式计算植酸酶比活:比活力 = 总活力 U/ 总蛋白 mg。

2 结果与分析

2.1 转化植株的 PCR 检测

将收获的种子按圈播种,得到转化材料 T_1 代植株,主要检测转化阳性率与种子所处的位置相关性。分别以 F4/R4 和 F423/R423 为引物对植酸酶基因进行 PCR 特异性扩增,结果表明在 488bp 和 423bp 处分别有特异性扩增条带(图 2、图 3)。

1 号为质粒;4~9 号为 T_1 代转化玉米样品;2 号为空白对照;
3 号为未转化样品;M 为 DL2000 Marker
1: pBI121/phyA II plasmid;
4-9: T_1 generation9 of transformed maizes;
2: blank control; 3: untransformed maize;
M: DL-2000 marker

图 2 T_1 代转化材料 F423/R423 PCR 检测结果
Fig.2 PCR amplification for phytase gene by F423/R423 primers

1 号为质粒;4~9 号为 T_1 代转化玉米样品;
2 号为空白对照;3 号为未转化样品;M 为 DL2000 Marker
1: pBI121/phyA II plasmid;
4-9: T_1 generation of transformed maizes;
2: blank control; 3: untransformed maize;
M: DL-2000 marker

图 3 T_1 代转化材料 F4/R4 PCR 检测结果
Fig.3 PCR amplification for phytase gene by F4/R4 primers

以 F4/R4 为引物特异性扩增植酸酶基因的 PCR 检测 (PCR 阳性结果重复 3 次相对稳定) 为依据,对 T_1 代转化玉米样品进行了统计(表 2)。

表 2 阳性转化植株和种子位置的关系
Table 2 Relationships of positive transformed plants and the lacion of seeds

转化元件 Conversion	圈 数 The number of laps	PCR 检测数 The number of PCR detection	阳性株数 The number of positive plant	阳性率(%) The positive rate
UPN	I ~ IV	55	0	0
	V	19	0	0
	VI	18	1	5.56
	VII	21	0	0
	VIII	21	0	0
	IX	20	0	0
	X	21	0	0
	XI	18	0	0
	XII	19	0	0
	X III	17	0	0
	总计	229	1	0.44
T-UPN	I ~ IV	60	0	0
	V	21	1	4.76
	VI	25	1	4
	VII	17	1	5.88
	VIII	20	1	5
	IX	16	1	6.25
	X	16	0	0
	XI	18	0	0
	XII	16	0	0
	X III	18	0	0
	总计	227	5	2.20
V-UPN	I ~ IV	50	0	0
	V	16	0	0
	VI	24	0	0
	VII	24	1	4.17
	VIII	28	2	7.14
	IX	28	2	7.14
	X	24	0	0
	XI	28	0	0
	XII	27	0	0
	X III	22	0	0
	总计	271	5	1.85

对 728 株 T_1 代转化材料的 PCR 检测结果表明,UPN、T-UPN、V-UPN 3 个转化元件的阳性率分别为 0.44%、2.2%、1.8%,平均转化率为 1.5%。PCR 阳性株都是来源于果穗的第 5~9 圈的种子,这个部位的阳性率达到 3.57%,表明花粉管通道法转化玉米的成功率与种子所处的位置有关。

2.2 转基因玉米的植酸酶比活分析

在 PCR 阳性 280#、PCR 阴性 281# 和两株相同株系的未转化玉米生长第 3~8 周分别测其酶活性,

比较随着时间的推移玉米植株中植酸酶的表达(表3、图4)。

表3 转化玉米 T₁ 代植株在第 3~8 周的植酸酶活性
Table 3 The phytase activity of T₁ progeny of transgenic maize from the third week to the eighth week

项目	Item	样品编号 Sample No.			
		280	281	CK1	CK2
第3周	酶活 OD 值	0.200	0.132	0.122	0.127
	总蛋白 OD 值	0.405	0.510	0.441	0.469
	比活 U/mg	1.708	0.879	0.949	0.924
第4周	酶活 OD 值	0.162	0.107	0.118	0.117
	总蛋白 OD 值	0.309	0.421	0.435	0.399
	比活 U/mg	1.879	0.890	0.934	1.014
第5周	酶活 OD 值	0.374	0.197	0.188	0.168
	总蛋白 OD 值	0.369	0.390	0.403	0.410
	比活 U/mg	3.549	1.747	1.621	1.417
第6周	酶活 OD 值	0.396	0.142	0.126	0.116
	总蛋白 OD 值	0.313	0.364	0.298	0.390
	比活 U/mg	4.507	1.363	1.512	1.031
第7周	酶活 OD 值	0.409	0.099	0.088	0.090
	总蛋白 OD 值	0.349	0.296	0.210	0.298
	比活 U/mg	4.114	1.194	1.583	1.085
第8周	酶活 OD 值	0.164	0.082	0.075	0.078
	总蛋白 OD 值	0.158	0.361	0.294	0.340
	比活 U/mg	4.185	0.795	0.921	0.812

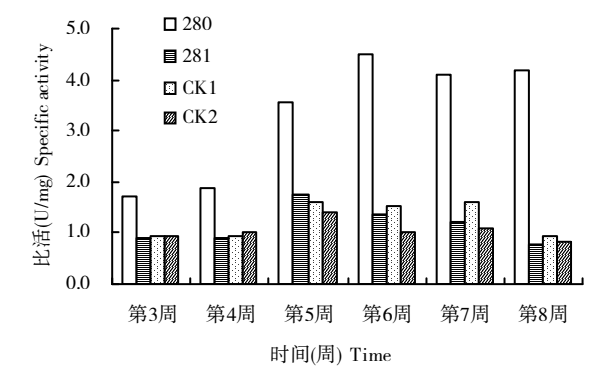


图4 T₁ 代转化玉米的酶活检测
Fig. 4 The phytase activity of T₁ progeny of transgenic maize

从测定结果来看,280# 植酸酶比活比 281# 和未转化的对照样品有明显的提高,在第 5~8 周均达到 2 倍以上。从玉米植株不同发育时期自身体内的植酸酶蛋白积累水平来看,281# 和未转化样品第 6 周的植酸酶比活在不同时期也有变化,但都比 280# 低很多,而且他们之间的比活检测情况相似,未表现出差异。可以认为,外源植酸酶基因在转化玉米中得到了表达。

3 讨论

花粉管通道法具有操作简单,具有无基因型限制的特点,可在任何开花植物和不同物种之间实现基因的转移,避免了植物组织培养过程中可能会产生的对植物基因型的依赖和各种无法预测的体细胞变异对后代的不利影响,一般也不会形成嵌合体,纯化速度快。

到目前为止,花粉管通道法应用于玉米遗传转化的报道较多。1983 年,Dewet 采用 Hess 的技术转移玉米叶斑病抗性基因获得成功;1986 年,Ohta 在美国科学院院报上报道了将外源 DNA 与玉米花粉混合授粉,得到当代高频率供体胚乳基因的表达;1993 年,丁群星等报道用子房注射法将 *Bt* 毒蛋白基因导入玉米,获得可育的转基因玉米植株;王景雪等用花粉管通道法分别将几丁质酶基因和 *Bt* 基因导入玉米;2000 年,祁永红报道了将大豆总 DNA 直接导入自交授粉后的玉米自交系中,获得具有稳定变异的株系;2001 年,Wang 等报道采用超声波辅助的与质粒 DNA 溶液混合后的花粉进行授粉,将几丁质酶基因导入玉米自交系植株,分子生物学检测表明外源基因整合入受体基因组;2002 年,王罡等利用授粉后外源 DNA 溶液滴加柱头的方法将 *Bt* 毒蛋白基因导入了多个优良的玉米自交系,经 T₀ 代植株的 PCR 筛选检测到阳性植株;2005 年,关淑艳等利用花粉管通道法将淀粉分支酶基因反义表达载体转入玉米自交系,对转化的玉米植株进行 PCR 检测,初步证明外源目的基因已整合到玉米基因组中;2005 年,李余良等利用子房注射法将 *Bt* 基因导入超甜玉米,经 PCR 和 Southern-blot 分析,证明抗虫基因已经整合在超甜玉米基因组中,并且为单拷贝。T₁ 代植株 PCR 检测结果表明,*Bt* 基因能够在转基因后代中稳定遗传,基因分离符合 1:1 的孟德尔遗传分离规律。

花粉管通道法目前对其机理还存在一些尚未解决的疑义,是值得研究、应用的转化系统。本研究以来自无花果曲霉的植酸酶基因作为目的基因和筛选基因,利用花粉管通道法将它导入玉米自交系,比较了不同转化时间、不同转化元件和种子在果穗上位置的不同对转化率的影响。

在转化时间上,以东北夏天 7、8 月份玉米花粉状态最好的时候进行操作。对玉米授粉后适合转化的时间进行了探索。对玉米授粉后 18~25 h 转化收获的种子进行检测,在检测出的 PCR 阳性植株中,7

株是授粉后 20 h 转化的,3 株是授粉后 21 h 转化的,1 株是授粉后 23 h 转化的,说明在授粉后 20 h 左右易于外源基因的转化。这和王昱等在授粉 8 ~ 18 h 是最佳转化时间不一致,王昱等的转化元件和本实验不一样,这方面还需要做其他方面的研究以进一步确认最佳转化时间。

本实验首次对收获转基因植株果穗子粒的不同位置分别进行检测,发现玉米的转化成功率与种子在果穗上所处的位置有关。所有转化阳性株都是来源于果穗的第 5 ~ 9 圈种子,也就是位于果穗的中上部,这可能是花丝长度适宜转化元件进入胚囊。果穗上部的子粒由于花丝太短,花粉管可能已经到达胚囊,受精作用已经完成,也可能花粉管已经关闭;果穗下部的子粒由于花丝太长,转化元件会因为渗透作用或者其他原因难于到达胚囊,目前这方面的分析未见报道。

3 个转化元件转化植株的重复 PCR 检测结果表明,转化阳性率 T-UPN 最高,UPN 最低,说明线性转化元件两端的边界序列有利于目的基因的转化和整合,防止在受体基因组内的降解。

基因表达是玉米转基因研究中的热点问题。植酸酶比活结果表明,植酸酶基因已经实现了表达,第 5 周以后转化阳性植株的植酸酶比活比阴性和对照植株要高 2 倍以上,说明植酸酶基因在转化玉米 T₁ 代植株体内实现了积累。

参考文献:

- [1] 王关林,方宏筠. 植物基因工程(第 2 版)[M]. 北京:科学出版社, 2002.
- [2] Dewet J M. Experimental manipulation of the tissues[M]. New York. London longman, 1984.
- [3] Otha Y. High-efficiency genetic transformation of maize ty a mixture of pollen and exogenous DNA[J]. Proc. Natl. Acad. Sci., USA, 1986, 83: 715-719.
- [4] 丁群星,谢友菊,戴景瑞,等. 用子房注射法将 Bt 毒蛋白基因导入玉米的研究[J]. 中国科学(B 辑),1993,23(7):707-713.
- [5] 王景雪,孙毅,崔贵梅,等. 花粉介导法获得玉米转基因植株[J]. 植物学报,2001,43(3):275-279.
- [6] Wang J X., Sun Y, Cui G M, Hu J J. Transgenic maize plants obtained by pollen-mediated transformation[J]. Acta Bot. Sinica, 2001, 43:275-279.
- [7] 关淑艳,张健华,柴晓杰,等. 花粉管通道法将淀粉分支酶基因反义表达载体转入玉米自交系的研究[J]. 玉米科学,2005,13(4): 13-15.
- [8] 李余良,胡建广,苏菁,等. 子房注射法将 Bt 基因导入超甜玉米[J]. 玉米科学,2005,13(1):41-43.
- [9] Duncan D R, Kriz A L, Paiva R, et al. Globulin gene expression in regenerable *Zea mays*(maize) callus[J]. Plant Cell Rep., 2003, 21(7): 684-689.
- [10] Yim Y S, Moak P et al. A BAC pooling strategy combined with PCR-based screenings in a large, highly repetitive genome enables integration of the maize genetic and physical maps[J]. BMC Genomics, 2007, 8: 47.
- [11] Rasco G S, Liu D, Li C P, et al. Characterisation of the expression of a novel constitutive maize promoter in transgenic wheat and maize[J]. Plant Cell Rep., 2003, 21(6): 569-576.