

电击法玉米转基因技术

曹靖生

(黑龙江省农科院玉米研究所, 哈尔滨 150086)

摘要:本文介绍了电击法转化玉米原生质体的原理、方法及转基因玉米鉴定的方法等。在离体条件下,将欲转入的靶基因与载体质粒重组构建重组 DNA 分子,同时,用去壁液处理玉米未成熟胚的悬浮细胞制备原生质体。将 20~40 μg 的超螺旋重组 DNA 分子与 $1.5 \sim 3 \times 10^6$ 个玉米原生质体细胞混匀后,置于强电场环境中,用 500~750 V/cm 的高电压处理 5 min,使原生质体的细胞膜通透性增强,并使重组分子进入到受体细胞内。在选择培养基中,选择已转入并稳定表达外源基因的转化细胞,再经组织培养形成愈伤组织,并再生成转基因玉米植株,最后用适当的方法对再生植株进行鉴定。

关键词:玉米;转基因;电击法;原生质体;转化

中图分类号:S 513.0352

植物基因转移技术的研究是植物分子生物学及植物生物技术研究的重要内容之一,因为这一研究是植物基因工程的关键所在,不仅具有重要的理论意义,而且具有广阔的应用前景。但是,早期的植物基因转移技术主要集中在豆科等双子叶植物,而玉米、小麦等禾本科单子叶植物的研究却比较落后,这主要是因为双子叶植物有较理想的基因运载载体——来自农杆菌的 Ti 质粒,而单子叶植物却缺乏有效的运载载体,所以,寻找适合于单子叶植物的基因运载载体及建立新的玉米转基因体系及方法便成为单子叶植物基因工程的主攻内容之一。

自从 Fromm 等人 1986 年首次用电击法转化玉米原生质体,获得了转化愈伤组织成功后,1988 年 Rhodes 等人又成功地用电击法获得了转基因玉米植株。此外,国外又相继建立起了用于玉米转基因的基因枪法、PEG 融合法、超声波处理法及子房注射法等技术,从而获得了一系列转入 npt 基因,苏云金杆菌毒素蛋白基因及荧光素酶基因等。转基因玉米植株,使玉米转基因技术进入到新时代,为玉米的远缘杂交育种开辟了广阔的前景。本文主要介绍电击法玉米转基因技术的原理及方法。

1 原 理

在离体条件下将欲转入的靶基因与载体质粒重组构建重组 DNA 分子,同时用玉米未成熟胚的悬浮细胞制备玉米细胞的原生质体。将重组 DNA 分子与玉米原生质体混合后置于强电场环境中,在高电压的作用下,使原生质的细胞膜通透性增强,并使重组分子进入到受体细胞内,然后在选择压力作用下,选择已转入并稳定表达外源基因的转化细胞。再经组织培养形成愈伤组织并再生成转基因玉米植株。

2 方 法

2.1 靶基因的选择及重组 DNA 分子的构建

初期玉米转基因的靶基因都是新霉素磷酸转移酶 II 基因(Npt II),因为该基因编码着对抗生素新霉素的抗性,在合适的调节子的调控下,该基因可在动物细胞和植物细胞内表达。没有该基因的植物细胞对新霉素敏感,在有新霉素的培养基中不能生长,而获得了 Npt II 基因的转化细胞则可在含有新霉素的培养基中生长,因而,Npt II 可作为显性选择标志,便于转化(转基因)细胞的选择。

实验表明,花椰菜花叶病毒(Camv)的 35S 启动子可调控 Npt II 的表达。所以重组分子的构建是将来自转化子 Tn5 的 Npt II 基因(1000 bp)重组到 430 bp 的 CaMV35S 启动子的下游,再与 0.25 kb 的 nos 基因的多腺化区连接,最后插入到质粒 P^{UC8} 内构建成 4.4 kb 长的重组质粒 pCaMVNEO。用电击法将该质粒转入玉米原生质细胞内 20 h 以后,便可在转化细胞内表达抗新霉素活性,使转化细胞在含有新霉素的培养基内生长,而非转化细胞则不能生长,因而该质粒可作为显性选择分子。

2.2 玉米原生质细胞的制备

转化用的受体玉米细胞为悬浮培养的墨西哥甜玉米(BMS),用 BMS 系悬浮培养时可形成细小的愈伤组织且原生质体易再生出细胞壁及植株。

原生质体的制备方法是将迅速生长完整的 BMS 细胞用去壁液处理 4~5 h,然后用 50 μ m 孔径的尼龙网过滤,500 r/min 离心收集原生质体,用培养液洗涤 3 次后,再悬浮原生质体,使浓度为 $3 \times 10^6 \sim 6 \times 10^6$ 细胞/mL 备用。培养液为 N6ap 无机盐加 0.5 mg/L VB1、1 mg/L 氨基乙酸、10 mmol 乙酸钠、0.2 mol 甘露醇,pH5.8。去壁酶解液为培养液中溶入 1% 的纤维素酶,0.5% 的半纤维素酶和 0.2% 的果胶酶。

2.3 原生质的电击转化

将新制备的 BMS 原生质悬浮细胞($3 \sim 6 \times 10^6$ 细胞/mL),分装到小离心管中,每管 0.5 mL。然后每管内分别加入 75 μ L 的 2 mol KCl、20 μ L 的超声波断裂的小牛胸腺 DNA(2.5 mg/mL),0.5 mL N6ap 培养基(pH8.0),最后加入 20~40 μ g 的超螺旋的重组质粒 DNAP^{CaMVNEO}。

将重组质粒与受体原生质体混匀后,立即转入带有铝箔电极的 0.4 cm 长的小塑料杯中,用高压电泳仪供 200~300 V(500~750 V/cm)的电压处理 5 min。然后用 2 倍体积的 N6ap 培养液(pH5.8)稀释。电压的升高会降低原生质体的生活力。当电压为 250V(625 V/cm)时,原生质的生活力下降 30%~50%。

2.4 转基因细胞的培养及选择

将电击后的原生质细胞置于 0.8 μ m 孔径的微孔滤膜上,然后置于带有 BMS 悬浮细胞培养液的 N6ap 半固体培养基上(渗透压 450 mosM)培养。一周后,将带有原生质的微孔滤膜转入带有 BMS 悬浮细胞培养液及 50~150 mg/L 硫酸卡那霉素的渗透压为 300 mosM 的 N6ap 培养基上,以抑制没表达 Npt II 基因的细胞的生长。在第 14 天时(再过一周),将滤膜转移到只含卡那霉素,而不含 BMS 悬浮细胞培养液的 N6ap 培养基上(180 mosM),再培养一周(电击后的第 3 周),就可长出抗卡那霉素的愈伤组织。然后将愈伤组织直接转移到含有卡那霉素的 N6ap 培养基上继续培养 2 周,便可获得足够的愈伤组织。然后便可诱导植株的再生,并进行进一步的鉴定。

2.5 转基因玉米的鉴定

鉴定获得 Npt II 基因的转基因玉米的常用方法有以下 3 种。

2.5.1 选择法 在培养基中加入适量的硫酸卡那霉素,转入并表达 Npt II 基因的转基因愈伤

组织及植株能够降解卡那霉素,因而能够生长,而没有 Npt II 基因的则在这种培养基中不能生长。

2.5.2 Npt II 活性鉴定 带有 Npt II 基因的愈伤组织及植株,能够表达 Npt II 活性降解卡那霉素。这种活性在没有卡那霉素选择压力的存在下,也可稳定表达 10 个月的时间,将卡那霉素用放射性同位素标记后,用液闪的方法就可测定愈伤组织及转基因玉米植株根、茎、叶中的 Npt II 活性。

2.5.3 基因探针杂交检测法 将来自转座子 Tn5 的 Npt 基因用放射性同位素³²P 标记上作为 Npt 的基因探针,从被鉴定的愈伤组织及植株组织中提取 DNA,然后用斑点杂交法和吸印杂交法进行杂交,如果杂交阳性,说明 Npt 基因已被转入到受体细胞内,如果杂交阴性,说明 Npt 基因没被转入。因为玉米本身不带有 Npt 基因,若杂交阳性,则说明已成功地进行了基因转移。

参 考 文 献

- [1] From M. E, Taylor L P, Walbor V. Nature, 1986, 319: 791 - 793.
- [2] Rhodes C. A, Pierce D A, Mettler I J, et al. Science, 1988, 240: 204 - 207.
- [3] From M E, Morrish F, Armstrong C, et al. Bio - Tech. 1990, 8: 833 - 839.
- [4] Spencer T M, O'Brien J V, Stort W G, et al, Plant Mol. Bio. 1992, 18: 201 - 210.
- [5] Koziel M G, Belend G L, Bowman C, et al, Bio - Tech. 1993, 11: 194 - 200.
- [6] 王关林, 方宏筠主编. 植物基因工程原理与技术, 1998.