

基因枪转化小麦愈伤组织的影响因素研究^{*}

曹团武¹, 朱建楚¹, 亢福仁², 陈耀锋¹

曹 鑫¹, 赵云祥¹, 任慧莉¹, 李春莲¹

(1 西北农林科技大学 农学院, 陕西 杨凌 712100; 2 榆林学院, 陕西 榆林 719000)

[摘 要] 以小麦愈伤组织为受体材料, 用基因枪法将报告基因 *GUS* 和目的基因 *Psa*g12-*IP*T 导入小麦中。*GUS* 基因表达检测表明, 金粉用量越高, 转化频率越高; 质粒DNA 用量以 20 μ g/枪最佳; 随着愈伤组织培养时间的延长, *GUS* 基因瞬时表达呈明显下降趋势, 至第28天以后趋于稳定。另外, *GUS* 基因瞬时表达检测应在24 h内进行。

[关键词] 转基因小麦; 基因枪; 愈伤组织; *GUS* 基因; 瞬时表达

[中图分类号] S512.103.53

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2005)07-0065-03

小麦是世界上最主要的粮食作物之一, 培育小麦优良品种是小麦稳产、高产的重要途径。自美国学者 Vasil 等^[1]利用基因枪将 *GUS* 和 *Bar* 基因导入小麦品种“Pavon”, 获得世界上第一例转基因小麦植株以来, 利用基因工程对小麦进行遗传改良的现代小麦转基因技术得到了迅速发展^[1~12]。基因枪转化的应用使单子叶植物尤其是禾谷类作物的基因转化研究有了突破性进展。在基因枪转化中, 基因枪的轰击参数, 如微弹速度、射程、金粉用量、轰击次数、真空度、质粒DNA 用量及受体材料的类型、生理状态、接受和整合外源DNA 的能力等对小麦遗传转化效率均有重要影响。本文以 *GUS* 基因为报告基因, 抑制叶片衰老基因 *Psa*g12-*ip*t 为目的基因, 用基因枪轰击小麦幼胚愈伤组织, 通过对 *GUS* 报告基因的检测, 研究了影响基因枪转化频率的几个主要因素及基因枪轰击后愈伤组织继续培养过程中 *GUS* 基因的表达状况, 旨在进一步提高利用基因枪进行小麦遗传转化时的转化效率。

1 材料与方法

1.1 试验材料与培养基

1.1.1 供试品种 供试品种为西北农林科技大学细胞工程实验室培育的普通小麦新品系 9848。

1.1.2 转化载体 转化载体质粒是曹孟良^[9]博士构建的 *PCMLA* 35-1, 含有潮霉素 (*Hym*gromycin)

抗性基因 *HYG*R7、卡那霉素 (*kam*mycin) 抗性基因 *Kan*R 和报告基因 *GUS*。其中 *GUS* 基因编码区有1个能在植物中特异表达的内含子, 使 *GUS* 基因不能在细菌中表达。抑制叶片衰老基因 *Psa*g12-*ip*t 构建在载体 *pMA* 35-1 中, *pMA* 35-1 能在大肠杆菌 DH5 α 中扩增。

1.1.3 培养基 愈伤组织诱导培养基: MS+2, 4-D 20 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 琼脂 5.5 g/L, pH 5.8。

高渗培养基: MS+2, 4-D 20 mg/L + KT 0.3 mg/L + 蔗糖 30 g/L + 甘露醇 0.4 mol/L + 琼脂 5.5 g/L, pH 5.8。

1.2 试验方法

1.2.1 质粒DNA 提取 按大肠杆菌质粒碱裂解抽提法制备质粒DNA^[13]。

1.2.2 愈伤组织诱导 取扬花后14~16 d的小麦幼穗, 检测幼胚大小约1.0 mm的籽粒, 体积分数70%乙醇中漂洗30 s, 在体积分数0.1% HgCl₂中浸泡消毒10 min后, 无菌水洗5次, 于无菌条件下剥取幼胚, 接种于愈伤组织诱导培养基上, 置26℃下散光培养。

1.2.3 金粉微弹制备 称取12 mg金粉, 用500 μ L 体积分数为70%乙醇洗涤2次, 无菌水洗涤1次, 体积分数50%无菌甘油调节浓度至40 μ g/ μ L, 于4℃保存备用。取金粉悬液(40 μ g/ μ L) 50 μ L, 依

^{*} [收稿日期] 2004-09-14

[基金项目] 国家转基因专项(JY03-B-23-02); 陕西省科技攻关项目(2003K03-G1-04)

[作者简介] 曹团武(1977-), 男, 陕西杨凌人, 在读硕士, 主要从事农业生物技术研究。

[通讯作者] 陈耀锋(1956-), 男, 陕西岐山人, 教授, 博士生导师, 主要从事作物遗传育种和农业生物技术研究。

次加入质粒 DNA ($1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$) $10 \mu\text{L}$, CaCl_2 (2.5 mol/L) $50 \mu\text{L}$, 0.1 mol/L 亚精胺 (0.1 mol/L) $20 \mu\text{L}$, 涡旋振荡 5 min , 室温下放置 20 min , $3\,000 \times g$ 离心 90 s , 弃上清, 加 $600 \mu\text{L}$ 体积分数 70% 乙醇洗涤 2 次, 无水乙醇悬浮沉淀, $3\,000 \times g$ 离心 90 s , 弃上清, 再用无水乙醇悬浮并依次产生质量浓度分别为 $40, 30, 20$ 和 $10 \mu\text{g}/\mu\text{L}$ 的金粉微弹悬液, 每种金粉悬液均取 $10 \mu\text{L}$ 至微弹载体, 无菌条件下吹干。

1.2.4 基因枪转化 将培养 $15 \sim 17 \text{ d}$ 的小麦幼胚愈伤组织转入高渗培养基处理 $4 \sim 6 \text{ h}$ 后, 用 PDS1000/He 型基因枪轰击转化。金粉微粒直径为 $1.0 \mu\text{m}$, 轰击时氦气压力为 7.689 MPa , 轰击距离为 9 cm 。轰击后愈伤组织在高渗培养基上恢复培养 24 h 后转入愈伤组织诱导培养基, 在 26°C 散光下继续培养。

1.2.5 GUS 检测 将基因枪轰击后的小麦幼胚愈伤组织, 浸泡在 X-GLUC 染色液(安海龙等^[8])中, 于 37°C 保温 $20 \sim 24 \text{ h}$ 后, 在体积分数 70% 乙醇中浸泡 20 min , 体积分数 45% 乙醇中浸泡 20 min , 在

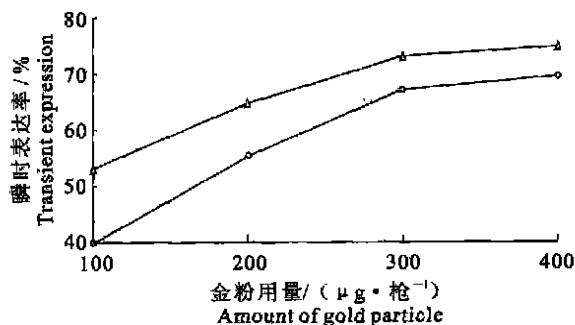


图 1 金粉用量对 GUS 瞬时表达的影响

- - - 愈伤组织; - ○ - 细胞

Fig 1 Effect of amount of gold particle on GUS transient expression

- - - Callus; - ○ - Cell

2.2 质粒DNA 用量对 GUS 基因瞬时表达的影响

当金粉用量为 $150 \mu\text{g}/\text{枪}$ 时, 用不同用量的质粒 DNA 微弹轰击小麦愈伤组织, 其结果如图 2 所示。由图 2 可见, 质粒 DNA 用量影响 GUS 基因的瞬时表达率, 当质粒 DNA 用量为 $0.5 \sim 2.0 \mu\text{g}/\text{枪}$ 时, 随质粒 DNA 用量的增加, GUS 基因表达率呈缓慢上升趋势; 若继续增加质粒 DNA 用量, GUS 基因表达率又呈明显下降趋势。显微镜观察表明, 随质粒 DNA 用量增加, GUS^+ 愈伤组织表面蓝色明显变深, 当质粒 DNA 用量为 $0.5 \sim 2.0 \mu\text{g}/\text{枪}$ 时, GUS^+ 细胞随质粒 DNA 用量的增加蓝色逐渐加深; 但在

体积分数 80% 乙醇的 FAA 固定液中保存, Nikon SM Z 1500 实体显微镜观察照像。同时对固定保存的小麦幼胚愈伤组织进行细胞学压片, Motic 数字显微照像系统观察照像。统计计算幼胚愈伤组织瞬时表达率 (GUS^+ 幼胚愈伤组织数/观察幼胚愈伤组织总数 $\times 100\%$) 和细胞瞬时表达率 (GUS^+ 细胞数/观察细胞总数 $\times 100\%$)。

2 结果与分析

2.1 金粉用量对小麦幼胚愈伤组织和细胞瞬时表达的影响

当质粒用量为 $1.0 \mu\text{g}/\text{枪}$ 时, 用不同用量金粉对小麦愈伤组织进行轰击, 其结果如图 1 所示。由图 1 可见, 随金粉用量的增加, 愈伤组织和细胞瞬时表达率也逐渐增加。金粉用量为 $100 \sim 300 \mu\text{g}/\text{枪}$ 时, GUS 基因瞬时表达率基本呈线性对应关系; 继续增加金粉用量, GUS 基因瞬时表达率增加较缓。对愈伤组织表面的显微镜观察表明, 随金粉用量的增加, 愈伤组织表面颜色逐渐加深。

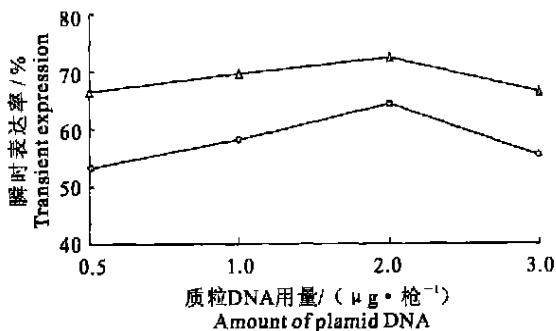


图 2 质粒DNA 用量对 GUS 瞬时表达的影响

- - - 愈伤组织; - ○ - 细胞

Fig 2 Effect of amount of DNA on GUS transient expression

- - - Callus; - ○ - Cell

质粒 DNA 用量达 $3.0 \mu\text{g}/\text{枪}$ 时, 细胞内出现数量不等的蓝黑色小点, 且蓝色明显变淡, 这可能是金粉用量过大出现了金粉微弹结块现象。在 GUS 基因瞬时表达中, 蓝色深浅反映了 GUS 基因表达量的多少, 蓝色越深, 表明 GUS 基因表达量越高。在质粒用量为 $2.0 \mu\text{g}/\text{枪}$ 时, GUS^+ 愈伤组织表面和 GUS^+ 细胞表面蓝色均最深, 说明 GUS 基因表达量最高。

2.3 愈伤组织培养时间对 GUS 基因表达的影响

在质粒 DNA 用量为 $1.0 \mu\text{g}/\text{枪}$, 金粉用量为 $150 \mu\text{g}/\text{枪}$ 时, 分别对小麦组织在轰击后第 1, 2, 4, 8, 16, 28 天的愈伤组织进行组织化学检测, 结果如

图3所示。

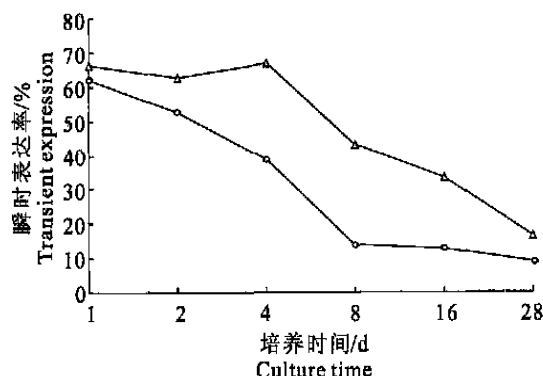


图3 基因枪轰击后愈伤组织培养

时间对 *GUS* 表达的影响

- - - 幼胚; - ○ - 细胞

Fig. 3 Effect of culture time on *GUS*

transient expression after particle bombardment

- - - Immature; - ○ - Cell

由图3可见,在基因枪轰击后,对愈伤组织进行继续培养,*GUS*⁺愈伤组织瞬时表达率及其细胞瞬时表达率均明显下降,但变化趋势不一致。在轰击后1~4 d,*GUS*⁺愈伤组织瞬时表达率的变化不十分明显。但随后,*GUS*⁺愈伤组织瞬时表达率开始明显下降,至第28天时为16.67%。*GUS*⁺细胞数量在轰击后第1天就开始出现明显下降趋势,至第8天降至13.61%;随后逐渐稳定,至第28天时降为9.05%。显微镜观测表明,在基因轰击后2 d内,*GUS*⁺细胞大多具有完整细胞核且有一定形状,即为长度50~

100 μm 的椭圆形胚性细胞,但随着时间的延长,*GUS*⁺细胞继续发育,大多形成无细胞核、无规则形状的巨大细胞,且蓝色逐渐变淡直至消失。

3 结果与讨论

在基因枪转化过程中,转化频率是多个因素综合作用的结果,金粉用量、质粒DNA用量及每皿轰击次数都是影响转化频率的重要因素。本试验用基因枪以不同的金粉用量和质粒DNA用量轰击小麦愈伤组织,所得结果与Altpeter等^[3]和安海龙等^[8]的结果基本一致。米庆莉等^[10]认为,基因枪转化粳稻,约每枪125 μg金粉吸附0.25 μg DNA,*GUS*基因的瞬时表达率最高;增加或减少DNA和金粉用量,表达率又开始下降。刁现民等^[11]用基因枪转化谷子愈伤组织时发现,当每mg钨粉的DNA用量为3 μg时,表达数量最多。本试验研究发现,在一定范围内,金粉和质粒DNA用量的增加与*GUS*基因瞬时表达率的增加基本呈线性关系。当金粉用量和质粒DNA用量超过一定范围时,*GUS*基因表达率会出现明显下降趋势。这可能是因为金粉用量和质粒DNA用量过高,导致金粉微弹结块所致。在显微镜下进行细胞检测,发现细胞中存在数量不等的较大的深蓝色斑点,这正是金粉微弹结块现象的表现。在基因枪转化中,金粉用量越大,对细胞的损伤也就越大,这将直接影响胚性细胞的形成及分化。

[参考文献]

- [1] Vasil V, Castillo A M, Fromm M E, et al. Herbicide resistant transgenic wheat plants obtained by microprojectile bombardment of regenerable embryogenic callus[J]. Bio Tech, 1992, 10: 667- 674.
- [2] Vasil I K, Vasil V. Transformation of wheat via particle bombardment[J]. Methods in Molecular Biology, 1999, 111: 349- 358.
- [3] Altpeter F, Vasil V, Srevestava V, et al. Accelerated production of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) [J]. Plants Plant Cell Rep, 1996, 16: 12- 17.
- [4] Becher D, Brettschneider R, Lenz H. Fertile transgenic wheat from microprojectile bombardment of scutellar tissue[J]. Plant J, 1994, 5: 299- 307.
- [5] Troy weeks, Olin D, Ann E, et al. Rapid production of multiple independent lines of fertile transgenic wheat (*Triticum aestivum*) [J]. Plant Physiol, 1993, 102: 1077- 1084.
- [6] 付永彩, 丁月云, 刘新仿, 等. 抑制衰老的嵌合基因在水稻中的转化[J]. 科学通报, 1998, 43(18): 1963- 1967.
- [7] 曹孟良, 周智, 张启发. *Psa*g12-*ipt*转基因植物的抗早衰研究[J]. 云南大学学报(自然科学版), 2000, 23(1): 73- 78.
- [8] 安海龙, 卫志明, 黄健秋. 基因枪法转化小麦的金粉用量及转基因植株表型特征分析[J]. 植物生理学报, 2001, 27(1): 21- 27.
- [9] 曹孟良. 自我调控延缓叶片衰老的亚克隆[J]. 湖南师范大学学报(自然科学版), 2000, 23(1): 73- 78.
- [10] 米庆莉, 何德洁, 曹守云, 等. 粳稻及粳稻对基因枪转化反应的差异及提高转化率的研究[J]. 农业生物技术学报, 1998, 6(3): 263- 268.
- [11] 刁现民, 陈振玲, 段胜军, 等. 影响谷子愈伤组织基因枪转化的因素[J]. 华北农学报, 1999, 14(3): 31- 36.
- [12] 林春晶, 王景余, 林秀峰, 等. 基因枪转化粳稻胚性愈伤组织获得转基因植株[J]. 吉林农业大学学报, 2003, 25(1): 8- 12.
- [13] 萨姆布鲁克 J, 斐里奇 E F, 曼尼阿蒂斯 T 著. 分子克隆实验指南[M]. 第2版. 金冬雁, 黎孟枫, 等译. 北京: 科学出版社, 1999.

(下转第72页)

Water level control of Longyangxia reservoir based on BP at the end of year

WANG Yim in, CHANG Jian-xia, HUANG Qiang, XUE Xiao-jie, YU Chang-sheng, XI Qiu-yi

(College of Water Resource and Hydroelectricity Engineering, Xi'an University of Technology, Xi'an, Shaanxi 710048, China)

Abstract: The Longyangxia reservoir has been operating at a low water level for a long time, which has affected the benefits of Longyangxia. In this paper, the main factors related to water level at the end of year of Longyangxia reservoir are discussed by using regress method. The BP model is also introduced for controlling Longyangxia reservoir water level. The prediction results are compared and analyzed between regress model and BP model. Results indicate that the BP model is more reasonable and feasible.

Key words: Longyangxia reservoir; water level at the end of year; back propagation network; water level control; regress analysis

(上接第 67 页)

Abstract ID: 1671-9387(2005)07-0065-EA

Factors of gene transformation affecting wheat callus

CAO Tuan-wu¹, ZHU Jian-chu¹, KANG Fu-ren², CHEN Yao-feng¹

CAO Xin¹, ZHAO Yun-xiang¹, REN Hui-li¹, LI Chu-lian¹

(1 College of Agronomy, Northwest A & F University, Yangling, Shaanxi 712100, China;

2 Yulin College, Yulin, Shaanxi 719000, China)

Abstract: The plasmid *pMA35-1* containing both *GUS* gene and *Psag12-IPT* gene was driven by CAMV35S promoter into wheat callus using ballistic method. Parameters affecting transformation efficiency were studied by *GUS* transient expression. The result showed that it had a remarkable role in the transformation efficiency at a relatively high gold particle amount per bombardment and it was best when coated by 2.0 μ g DNA. The expression efficiency of *GUS* gene reduced with the increase of callus culture time and remained stable after 28 d. The examination of *GUS* gene transient expression should be at 1 d and the examination of *GUS* gene stable expression should be after 28 d.

Key words: transgenic wheat; ballistic; wheat callus (*Triticum aestivum* L.); *GUS* gene; transient expression