

根癌农杆菌介导的人骨形成蛋白-3 成熟肽基因向油菜转化的研究*

张大鹏, 郭蔼光

(西北农林科技大学 生命科学学院, 陕西 杨凌 712100)

[摘 要] 用根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) 共培养法, 将骨形成蛋白-3 成熟肽(hBM P-3m) 基因导入甘蓝型自交系油菜(*B. rassaica napus* L.) 品种秦油-3 号, 并获得了 hBM P-3m 基因整合到油菜基因组中的植株。试验所用外植体为油菜 4~5 d 苗龄的下胚轴; 根癌农杆菌为 LBA 4404, 其 Ti 质粒 pCAMB IA-hBM P3m 含 hBM P-3m 基因。切取 2 mm 左右的下胚轴侵染根癌农杆菌后在分化培养基(MS+50 mg/L 6-BA+0.3 mg/L NAA) 上共培养 2 d, 然后转到附加 25 mg/L 潮霉素和 500 mg/L 羧苄青霉素的分化培养基上。切下分化出的茎芽, 插入附加 25 mg/L 潮霉素的生根培养基(MS+0.4 mg/L BA) 中, 形成完整的植株。经 PCR 检测和 Southern blot 分析, 证实 hBM P-3m 基因已插入到油菜细胞基因组中。

[关键词] 人骨形成蛋白-3 成熟肽(hBM P-3m); 油菜; 下胚轴; 根癌农杆菌

[中图分类号] Q 813.1⁺2

[文献标识码] A

[文章编号] 1671-9387(2004)05-0041-04

利用基因工程技术将一些药用蛋白基因导入植物, 从而使植物能够大量生产这类药用蛋白, 这已经成为目前植物基因工程研究的一个重要方向^[1]。通过这种方式, 不仅可以大大降低本来昂贵的药品生产成本, 而且简化了贮存方式。因此, 国际植物基因工程研究的一个新的发展趋势, 就是利用转基因植物来生产药物, 如用转基因马铃薯生产人的血清蛋白, 用转基因烟草和番茄生产人的胰岛素等^[1]。本研究利用构建好的人骨形成蛋白-3 成熟肽(hBM P-3m) 基因的植物表达载体 pCAMB IA-hBM P3m, 通过根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens* LBA 4404) 介导法转化油菜, 期望将 hBM P-3m 基因转入植物并能进行表达, 为植物医药基因工程研究

作一定探索。

1 材料与方法

1.1 植物材料

供试的甘蓝型油菜为秦油-3 号。种子经表面灭菌后接种到无激素的 MS 培养基上, 萌发 5 d 左右切取下胚轴, 作为组织培养和遗传转化的起始材料。

1.2 根癌农杆菌

根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株为 LBA 4404(pROK2, pCAMB IA-hBM P3m)。质粒 pCAMB IA-hBM P3m 含 hBM P-3m 基因和 Hyg 标记基因(图 1)。质粒由本研究室构建。

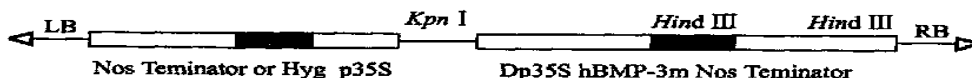


图 1 植物表达载体 pCAMB IA-hBM P3m T-DNA 结构

Fig. 1 Sketch map of T-DNA of plant expression vector pCAMB IA-hBM P3m

质粒 pCAMB IA-hBM P3m 起初保存于大肠杆菌中, 碱裂解法提取后通过电击法(电压 2.5 kV, 电容 25 μ F, 阻抗 400 Ω), 将质粒转化到根癌农杆菌 LBA 4404 中。在含 50 mg/L Rif 和 50 mg/L Kan 的

YEB 培养基中进行筛选培养。参照文献^[1]提取阳性克隆农杆菌中的小质粒, 质粒经 Hind III 酶切, 电泳鉴定, 确定是否得到含双元载体的根癌农杆菌 LBA 4404(pROK2, pCAMB IA-hBM P3m)。

* [收稿日期] 2003-12-10

[基金项目] 杨陵示范区专项基金; 西北农林科技大学生物技术中心开放课题资助项目

[作者简介] 张大鹏(1973-), 男, 陕西武功人, 讲师, 在读硕士, 主要从事生物化学与分子生物学研究。

[通讯作者] 郭蔼光(1942-), 女, 陕西临潼人, 教授, 博士生导师, 主要从事生物化学与分子生物学研究。

根癌农杆菌 LBA 4404 (pROK2, pCambia-hBM P3m) 在加有 50 mg/L Rif 和 50 mg/L Kan 的 YEB 培养基上划线培养和保存。转化试验之前挑取单菌落接种到 50 mL YEB 液体培养基中, 于 28 °C 振荡培养(200 r/min)过夜。

1.3 培养基^[2]

YEB 培养基: 蛋白胨 50 g/L + 酵母提取物 10 g/L + 牛肉膏 50 g/L + 硫酸镁 20 mmol/L, pH 7.0; 诱导培养基 M_{S1}: M_S + 6-BA 50 mg/L + NAA 0.2 mg/L + 琼脂粉 7.0 g/L, pH 5.8; 再生筛选培养基 M_{S2}: M_{S1} + 羧苄青霉素 500 mg/L + 潮霉素 25 mg/L; 生根培养基 M_{S3}: M_S + BA 0.3 mg/L + 琼脂粉 7.0 g/L + 羧苄青霉素 200 mg/L + 潮霉素 25 mg/L, pH 5.8。

1.4 PCR 引物

扩增 hBM P-3m 基因的特异性引物, 由上海博亚生物公司合成, 分别为:

Primer 1(Plus): 5'-GGAATTCTTATCTAGCGCAAG-3';

Primer 2(Minus): 5'-GGAACTTATGAGCCAGACGCTCCAAT-3'。

1.5 油菜农杆菌介导的遗传转化

1.5.1 选择压力的确定^[3] 将未转化的外植体分别转入含潮霉素(Hyg) 0, 5, 10, 15, 20 和 25 mg/L 的诱导培养基 M_{S1} 上培养, 培养温度为(26±1) °C, 光照为 16 h/d。

未转化的油菜外植体在含有 20 mg/L 潮霉素的诱导培养基上不能生成愈伤组织, 考虑到利用农杆菌转化外植体过程中经常会出现转基因的嵌合体或所谓的“假阳性”现象, 本试验最后将选择压力定在 25 mg/L。

1.5.2 共培养 将含 hBM P-3m 基因的农杆菌单菌落置于 YEB 培养基中, 在 28 °C, 200 r/min 条件下培养约 24 h, 用不含琼脂粉的液体培养基稀释 30~50 倍, 将油菜下胚轴置于稀释后的菌液中浸泡 1~2 min, 取出用无菌滤纸吸干菌液, 转入诱导培养基 M_{S1}, 在温度(26±1) °C, 光照 16 h/d 的条件下培养 2 d。

1.5.3 再生筛选培养 将共培养 2 d 后的材料转入再生筛选培养基 M_{S2}, 培养条件同 1.5.2, 每 10~15 d 更换 1 次培养基。

1.5.4 生根培养 当筛选培养基上愈伤组织长出 2.0 cm 左右的新芽时, 切取小芽将其转移至生根培养基上进行生根培养, 培养条件同 1.5.2。

1.6 转化植株的 PCR 检测和 Southern blot 分析

1.6.1 再生植株的 PCR 分析 采用 CTAB 方法^[4], 分别从转化植株和非转化植株叶片中提取

DNA 作为模板, 用 PCR 技术^[5]扩增再生植株基因组 DNA, 以检测 hBM P-3m 基因是否已经整合到油菜基因组中。取 1 μL 抗性植株总 DNA 作为模板, 以 Primer 1 和 Primer 2 为引物, 按以下程序进行 PCR 扩增: 95 °C 2 min; 94 °C 1 min, 58 °C 1 min, 72 °C 1 min, 循环 30 次; 72 °C 10 min 扩增后, 以质粒 DNA 为阳性对照, 以非转化植株的 DNA 为阴性对照, 用 1% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.6.2 Southern blot 分析 采用武汉博士德公司的试剂盒并按其使用说明书操作。以上述 PCR 扩增产物为模板, 用地高辛为标记物进行随机标记得到探针。转化植株的基因组 DNA 用 *Hind* III 酶切后, 在 0.8% 琼脂糖凝胶上电泳 5 h。DNA 片段分开后通过毛细作用转印至硝酸纤维素膜上, 再用标记好的探针进行杂交、染色。

2 结果与分析

2.1 携带目的基因的质粒向根癌农杆菌的转化及其鉴定

图 2 为大肠杆菌和农杆菌中的质粒经 *Hind* III 酶切的电泳图谱。由图 2 可见, 质粒酶切后出现 2 条带, 通过计算机辅助分析, 条带的分子量分别约为 11 000 bp 和 1 400 bp, 这与质粒在酶切位点切割后应有的理论值接近, 而且 2 种宿主菌的质粒酶切电泳结果基本相同。因此可以证明, 通过电击法已将质粒 pCambia-hBM P3m 转入农杆菌, 携带 hBM P3m 基因的农杆菌能够用于遗传转化。

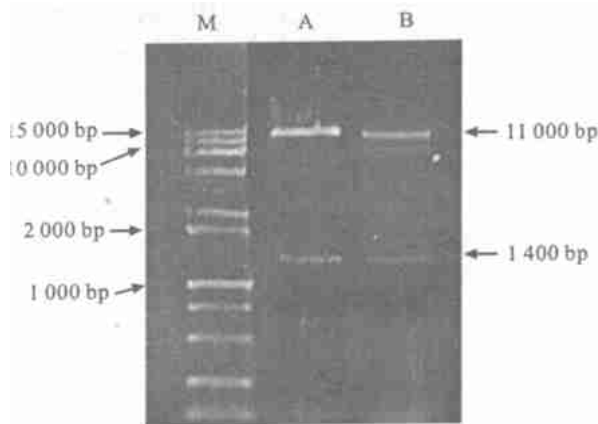


图 2 *Hind* III 酶切筛选 pCambia-hBM P3m
M. 标准分子量; A. 大肠杆菌中的质粒; B. 农杆菌中的质粒

Fig. 2 Screening of pCambia-hBM P3m colony by *Hind* III digestion
M. DNA marker DL 15000+ DL 2000; A. Plasmid from *E. coli*; B. Plasmid from *A. tumefaciens*

2.2 根癌农杆菌感染和抗性植株的再生

油菜下胚轴与农杆菌共培养 2 d 后, 移至附加

羧苄青霉素 500 mg/L 和潮霉素 25 mg/L 的再生选择培养基上进行培养。15 d 后, 下胚轴的末端切口膨大, 陆续长出大小不均一的愈伤组织; 50 d 后可以看到芽的分化(图 3)。而未经感染的外植体则无芽的分化, 并且白化死亡。

将分化出的芽切下, 接入加有潮霉素 25 mg/L 和羧苄青霉素 200 mg/L 的生根培养基中, 诱导生根。约 13 d 即可看到根的形成, 得到抗性植株(图 4)。



图 3 带有抗性芽的外植体

Fig 3 Explant with resistant shoots

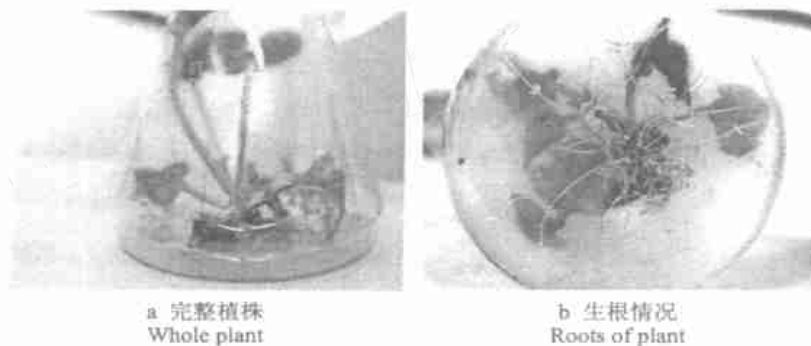


图 4 生根培养基上的转化植株

Fig 4 Plant rooting medium

2.3 转化体的鉴定

2.3.1 油菜转化体的 PCR 分析 以质粒 pCAM-BIA 1301-hBM P3 为阳性对照, 以未转化植株叶片 DNA 为阴性对照, 对转化植株进行 PCR 检测。结果表明, 阳性对照及转化植株扩增出 400 bp 的条带, 而阴性对照没有此条带(图 5), 证明外源 hBM P-3m 基因已经整合到油菜基因组中。



图 5 转基因油菜的 PCR 检测

M. 标准分子量; 1~6 不同转基因油菜植株; 7. 阳性对照(质粒 pCAMBIA-hBM P3m); 8. 阴性对照(未转化油菜)

Fig 5 PCR analysis of transgenic plant

M. Marker; 1- 6 Different transgenic plants;

7. Positive control (pCAMBIA-hBM P3m);

8 Negative control(untransformed)

2.3.2 Southern blot 分析 取经 PCR 鉴定, 证明外源 hBM P-3m 基因已经整合到油菜基因组中的转

化体进行 Southern blot 分析, 结果见图 6。

从图 6 可以看出, 植物 DNA 经 *Hind* III 酶消化后出现多条杂交带, 说明存在多个插入位点, 即 hBM P3m 基因已整合到油菜基因组中。

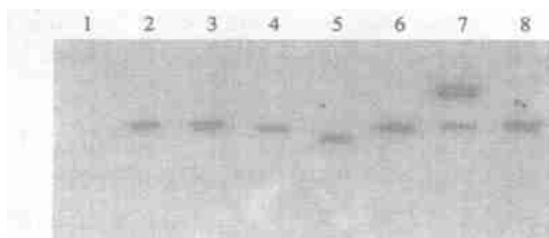


图 6 转基因植株基因组 DNA 的 Southern blot 分析

1. 未经转化的植株; 2~8 转化植株

Fig 6 Southern blot analysis of genome DNA in transgenic plant

1. Non-transformed plant;

2- 8 Transgenic plants

3 讨论

人骨形成蛋白-3(hBM P-3)是骨形成蛋白(bone morphogenetic proteins, BMPs)多肽因子家族的成员, 它能诱导机体内的间充质细胞不可逆地分化为软骨和骨细胞, 对骨骼的发育和成年骨损伤的再生修复起重要作用, 因而有良好的临床应用前景^[6, 7]。

但是 BM P_s 主要存在于骨组织中, 在正常骨骼中的含量极微, 限制了 BM P 的基础与应用研究, 所以人们试图通过基因工程技术制备 BM P_s, 并研究其基因及蛋白质结构。因此, 本研究利用油菜的下胚轴作为遗传转化的外植体, 经潮霉素 (Hyg) 抗性筛选, PCR 和 Southern blot 分析, 初步鉴定 hBM P-3m 基因已整合到油菜细胞基因组中。但是, 提取转化植株和非转化植株的总蛋白, 通过 SDS-PAGE 却未发现目的蛋白表达, 推测可能是目的蛋白表达量过低或者整合到油菜细胞基因组中的 hBM P-3m 基因沉默所致, 有待进一步研究。

进行组织培养时, 植物细胞会产生乙烯, 乙烯积累到一定浓度, 就会影响植物的正常发育。因此可通过在培养基中加入 A gNO₃ 来抵制乙烯的产生^[8], 或者通过增加培养基的更换频率来消除这种影响。在

本试验中, 采用了这 2 种方法, 通过比较发现差别不大。所以后续的试验采用了增加培养基更换频率的方法。

在试验过程中还发现, 外植体下胚轴经农杆菌侵染后, 经过共培养, 然后转入再生筛选培养基中, 培养 2 周左右, 可在切口处产生抗潮霉素愈伤组织。此程序中共培养时间的长短对转化频率影响很大。如果共培养时间过长, 将导致农杆菌过度生长, 随后的抗菌素很难抑制其生长, 从而导致试验失败。共培养时间过短, 则会使农杆菌的 T-DNA 转移不够完全, 从而使转化频率降低。本试验采用的共培养时间为 2 d。

此外, 用农杆菌侵染下胚轴时, 农杆菌的浓度不宜过高, 可控制在 OD 值为 0.2 左右; 而且下胚轴侵染时间不能超过 3 min, 否则容易造成外植体腐化。

[参考文献]

- [1] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1999: 45- 58
- [2] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures[J]. *Physiol Plant*, 1962, 15: 473-479
- [3] 党永军. 甘蓝型油菜转化体系的建立及 BM P-3 植物表达载体的构建[D]. 陕西杨凌: 西北农林科技大学, 2000
- [4] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. *Nucl Acids Res*, 1980, 8: 4321- 4325
- [5] Ausubel F M. 精编分子生物学实验指南[M]. 颜子颖, 王海林, 译. 北京: 科学出版社, 1998: 587- 598
- [6] 刘建, 胡蕴玉, 马真胜, 等. 骨折愈合过程中 BM P3 基因表达的实验研究[J]. *中华外科杂志*, 1996, 34(10): 585- 588
- [7] Noden D M. The role of the neural crest in patterning of avian cranial skeletal, connective and muscle tissues[J]. *Dev Biol*, 1983, 96(1): 144- 165
- [8] Chi G L, Barfield D G, Sim G E, et al. Effect of A gNO₃ and aminoethoxyvinylglycine on *in vitro* shoot and root organogenesis from seedling explant of recalcitrant *B rassic a* genotype[J]. *Plant Cell Rep*, 1990, 9: 195- 198

Transformation of *B rassic a napus* with human bone morphogenetic protein 3 mature peptide gene mediated by *A grobacterium tum efaciens*

ZHANG Da-peng, GUO Ai-guang

(College of Life Sciences, Northwest Sci-Tech University of Agriculture and Forestry, Yangling, Shaanxi 712100, China)

Abstract: Seeds of *B rassic a napus* L. cv. "Qinyou-3" were surface-sterilized and germinated hormone-free MS medium. After four to five days, the hypocotyls were excised in such a way. These hypocotyls were used as the explants for tissue culture and genetic transformation. After 2 days of co-cultivation with *A grobacterium tum efaciens* strain LBA 4404, the plasmid of which contains gene of hBM P-3m, the explants were transferred onto selection medium containing 25 mg/L hygromycin and 500 mg/L carbenicillin. About one month, shoots emerged from the explants inoculated. They were excised and transferred onto rooting medium containing 25 mg/L hygromycin. Whole plants were obtained. Transformation was confirmed by PCR and Southern blot analysis.

Key words: *B rassic a napus*; hypocotyls; human bone morphogenetic protein 3 mature peptide (hBM P-3m); *A grobacterium tum efaciens*