

电击法诱导的欧白英原生质体 转化和转化植株再生

王国英

(北京农业大学,北京 100094)

贺普超

(西北农业大学,咸阳 712100)

Davey, M. R.

(诺丁汉大学植物系,英国)

摘要 本研究使用电击法成功地将带有标记基因 NPT I 的质粒 pCaMVNEO 转入欧白英的原生质体,并获得了再生转化植株。通过用 pDW2 质粒进行的 CAT 基因短暂表达研究,确定了欧白英原生质体转化的电击条件为:电容 30nF、电场强度 1 500V/cm、时间衰变常数 59.4 微秒;质粒 DNA 浓度为 $20\mu\text{g}/2 \times 10^6$ 原生质体。在以上条件下,欧白英原生质体的相对转化率为 12.4%,绝对转化率为 2.4×10^{-4} 。在大多数抗性愈伤组织和从抗性愈伤组织再生的植株中检测到新霉素磷酸转移酶活性。分子杂交结果也证明了在转化植株中存在 NPT I 基因序列,而未转化的对照植株则没有。

关键词 植物遗传转化,欧白英,电击法,原生质体,基因短暂表达

电击法(Electroporation)是近年来才发展起来的一种引入外源基因新技术,它利用高压放电产生的脉冲,使细胞膜产生可逆的“微孔”,从而使大分子通过这一通道进入细胞⁽¹⁻³⁾。由于这一方法可用于所有植物的原生质体,克服了农杆菌转化的“寄主”限制。所以,目前已在许多双子叶植物和一些重要的禾本科作物上取得成功,得到了转化愈伤组织或转化植株⁽²⁻⁹⁾。

欧白英(*Solanum dulcamara*),又名千年不烂心,是一种药用植物,其营养和生殖器官均含有甾类生物碱⁽¹⁰⁾。本研究就是在原生质体培养的基础上,用电击法将带有氯霉素乙酰转移酶(CAT)和新霉素磷酸转移酶(NPT I)基因的质粒片段转入欧白英的原生质体中,并通过卡那霉素抗性选择,得到了抗性愈伤组织及再生植株,NPT I 酶活性测定和分子杂交都证明了外源基因已稳定地转入植物细胞内。

1 材料和方法

1.1 植物材料的培养

从欧白英叶片愈伤组织形成的细胞悬浮培养系分离原生质体。原生质体的培养用 K8P⁽¹¹⁾培养基。七周后,将直径约 1mm 的小细胞团转移到 K8⁽¹²⁾培养基上扩增。愈伤组织在 MSZ(MS 加 1mg/L 玉米素)上诱导分化,分化的幼芽和枝条在无激素的 MS 培养基上诱导生根。

1.2 质粒的结构和制备

本研究使用了 pCaMVNEO 和 pDW2 两个质粒。前者携带一个由 CaMV35S 启动子、NPT I 基因和 NOS 的 poly-A 区域组成的嵌合基因⁽⁴⁾。后者是将来自 Tn9 的 CAT 基因

插入 pDH51 的 Sal I 位点构建的,它也含有 CaMV35S 启动子和终止序列^[33]。质粒的分离用碱性裂解法,纯化用氯化铯-溴化乙锭密度梯度离心。

1.3 电击法诱导 DNA 吸收

分离纯化的原生质体悬浮在电击液中(5mmol/L MES, 6mmol/L MgCl₂, 0.6 mol/L 甘露醇, pH5.8), 浓度 2×10^5 /ml。加入不同量的质粒 DNA 和载体 DNA(小牛胸腺 DNA)。取 350 μ l 的混合液,转入电击槽中(Dia-log, 西德)。用不同的电击电场强度,每个样品连续电击三次,每次间隔 10 秒,电容为 30nF。电击处理后原生质体在冰上放置 15 分钟,再在室温下停留 45 分钟。然后,用培养基稀释,离心后重新悬浮在新鲜培养基中培养。

1.4 聚乙二醇诱导 DNA 吸收

将分离纯化的原生质体悬浮在 1ml 的 CPW 9M 溶液^[12]中,浓度为 1×10^5 /ml。加入 20 μ g 的质粒 DNA, 80 μ g 的载体 DNA, 混合均匀,室温下放置 5 分钟。然后分别加入 200 μ l、500 μ l 或 2000 μ l 的 PEG 溶液(40%), 混匀,室温下放置 30 分钟。此后,逐次加入 10ml CPW9M 溶液,每次 2ml,间隔 5 分钟。将处理好的原生质体离心,弃去上清液,重新悬浮在新鲜的 K8P 培养基中培养。

1.5 转化细胞和转化体的鉴定

原生质体在处理 36 小时后测定 CAT 酶的活性^[12],研究短暂基因表达,以确定适合的转化方法和条件。对抗性愈伤组织和从抗性愈伤组织再生的植株进行 NPT I 酶活性测定^[12]。植物 DNA 的提取用酚氯仿法,探针标记用随机引物法,DNA 的酶切、电泳、转移及分子杂交均按常规方法进行。

2 试验结果

2.1 电击电压对短暂基因表达的影响

悬浮在电击缓冲液中的原生质体,其电阻值为 $1.98 \pm 0.058k\Omega$ 。电击仪所用电容为 30nF,时间衰变常数为 59.4 微秒。在以上试验条件下,当电击电场强度为 1 500V/cm 时,原生质体提取物中 CAT 酶活性较强。用其它电场强度,如 500V/cm、1 000 V/cm、2 000V/cm 和 2 500V/cm 处理的原生质体 CAT 酶的活性都极低(图 1)。

2.2 质粒 DNA 量对短暂基因表达的影响

当电击电场强度为 1 500V/cm,电容 30nF 时,每毫升原生质体(2×10^6 /ml)加入 5 μ g 质粒 DNA 即可诱导 CAT 酶在原生质体中的短暂表达。而随着质粒 DNA 加入量的增加,CAT 酶的活性增强(图 1)。

2.3 聚乙二醇浓度对短暂基因表达的影响

当每毫升原生质体(10^6 /ml)中加入 20 μ g 质粒 DNA、80 μ g 载体 DNA 时,13.3%的 PEG 能够很好地诱导质粒 DNA 的吸收和 CAT 酶的表达(图 2)。当 PEG 的浓度为 6.7% 或 26.7% 时,虽然 CAT 酶也有少量表达,但酶活性极弱。

2.4 细胞团对卡那霉素的抗性

培养基中加入卡那霉素能够杀死原生质体形成的细胞团,使细胞空化,从而大大抑制细胞克隆的形成(表 1)。结果表明,卡那霉素加入的时间越早,其抑制效果越明显。但高浓

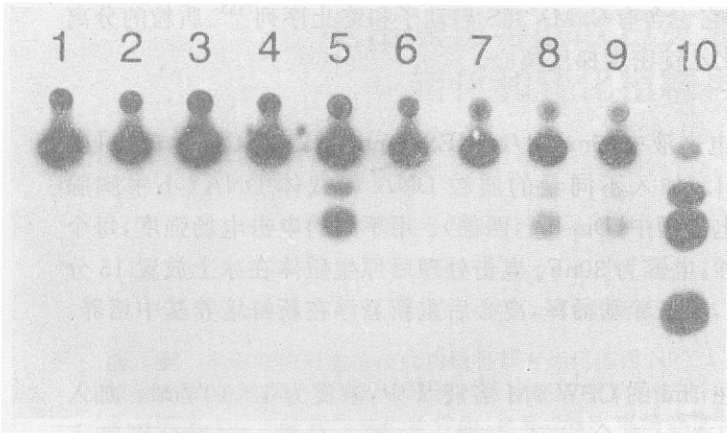


图 1 电击处理后原生质体 CAT 酶活性测定

Fig. 1 CAT assay of protoplasts after

o
a
b
c
d

electroporation with pDW2
o. Origin spot, a. Unreacted chloramphenicol, b. 1-acetyl chloramphenicol, c. 3-acetyl chloramphenicol, d. 1, 3-diacetyl chloramphenicol, 1. EP1500-plasmid, 2. EP-CT DNA, 3. EP500 + 20 μ g pDW2, 4. EP1000 + 20 μ g pDW2, 5. EP1500 + 20 μ g pDW2, 6. EP2000 + 20 μ g pDW2, 7. EP2500 + 20 μ g pDW2, 8. EP1500 + 20 μ g pDW2, 9. EP1500 + 5 μ g pDW2, 10. CAT (5 units)

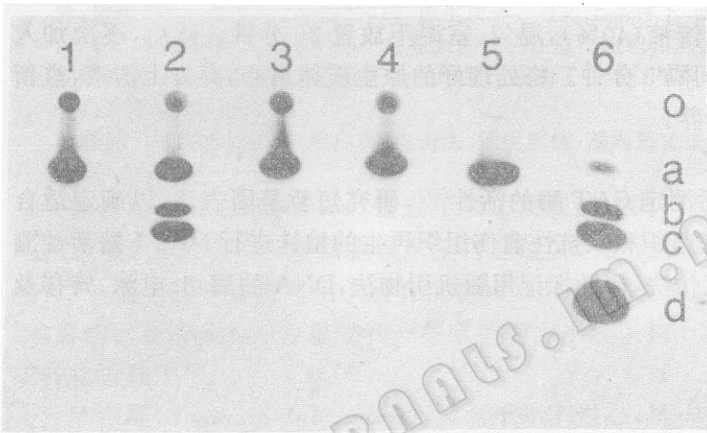


图 2 PEG 处理后原生质体 CAT 酶活性测定

Fig. 2 CAT assay of protoplasts after

PEG-mediated pDW2 plasmid uptake

o. Origin spot, a. Unreacted chloramphenicol, b. 1-acetyl chloramphenicol, c. 3-acetyl chloramphenicol, d. 1, 3-diacetyl chloramphenicol, 1. PEG26.7 (26.7%), 2. PEG13.3, 3. PEG6.7, 4. PEG13.3-CT DNA, 5. PEG 13.3-plasmid, 6. CAT (5 units)

度的卡那霉素(50 μ g/ml 和 100 μ g/ml)不论在原生质体培养一周后加入或三周后加入,均可完全抑制细胞克隆(1—2mm)的形成。所以,我们在以后的转化试验中,在原生质体培养三周后加入 50 μ g/ml 卡那霉素来选择抗性转化细胞团。

2.5 抗卡那霉素细胞克隆的选择

电击处理的原生质体与未处理的原生质体一样,能在 K8P 培养基中形成细胞壁,正常分裂、生长。根据前面的预备试验,当培养 21 天时,在培养基中加入卡那霉素(50 μ g/ml),选择具有抗性的转化细胞克隆。表 2 列出了各个不同处理中抗性细胞克隆的比率和相对转化率。从结果可以看出,在电击处理时只加载体 DNA,而不加 pCaMVNEO 质粒,

或同时加入载体 DNA 和 pDW2 质粒,均不能产生抗卡那霉素的细胞克隆。只有在加入载体 DNA 的同时,也加入 pCaMVNEO 质粒才能诱导抗卡那霉素细胞克隆的产生。pDW2 质粒的加入虽然并不阻止 pCaMVNEO 质粒诱导的转化,但它似乎降低了相对转化率。

表 1 卡那霉素加入时期和浓度对原生质体起源细胞克隆生长的影响

Table 1 Kanamycin-sensitivity of protoplasts-derived cell colonies during culture

Culture days prior to addition of kanamycin	Concentration of kanamycin(μ g/ml)				
	0	10	25	50	100
7	100*	3.0	0.6	0	0
14	100	4.9	1.1	0	0
21	100	4.5	1.7	0	0

* After 50 days of culture, the cell colonies of 1—2mm in diameter were counted. The data represent four replicates.

将通过抗性选择的细胞克隆转移到含 50 μ g/ml 卡那霉素的 MSP1 培养基上,它们大多可以继续生长(表 3)。而未经选择的 EP-plasmid 或 EP+pDW2 处理所形成的细胞克隆转接在同一培养基上则停止生长(见图版 I-A)。

表 2 电击处理欧白英原生质体的转化率

Table 2 Transformation frequency of bittersweet protoplasts after electroporation

Treatment ⁽¹⁾	Plating frequency ⁽²⁾ %	Number of colonies from 8.75×10^{-4} protoplasts		Relative transformation frequency (%)	Absolute transformation frequency ($\times 10^{-4}$)
		Km-free medium	medium with 50 μ g/ml Km		
Ep-Plasmid	19.3	169	0	0	0
Ep+pDW2	17.5	130	0	0	0
Ep+pDW2+pCaMVNEO	18.4	156	13	8.3	1.5
Ep+pCaMVNEO	20.1	170	21	12.4	2.4

(1) Ep: electroporation; -plasmid: no addition of plasmid; +plasmid: addition of 20 μ g plasmid.

(2) Plating frequency: percentage of protoplasts forming 10-cell colonies after 15 days of culture. Data represent mean of three replicates.

表 3 不同来源细胞克隆在含有卡那霉素的 MSP1 培养基上的生长

Table 3 Growth of calli derived from various resources on MSP1 containing 50 μ g/ml kanamycin

Treatments	Mean No. of calli (1—2)mm per dish ⁻¹	Normal calli (%)
Ep-plasmid	45	0
Ep+pDW2	43	0
Ep+pDW2+pCaMVNEO	55	81.0
Ep+pCaMVNEO	50	81.4

* Data represent 3 replicates in EP-plasmid and EP+pDW2, 5 replicates in the other 2 treatments.

2.6 抗卡那霉素细胞克隆的培养和再生

抗卡那霉素的细胞克隆在含 50 μ g/ml 卡那霉素的 MSP₁ 培养基上培养四周后,转入含同样浓度抗生素的 MSZ 培养基中再生。四周后,约有 10—20% 的愈伤组织可以再生出幼芽(图版 I-B)。将再生出的枝条转入不含激素的 MS 培养基中,约两周后大部分生根,长成小植株。

2.7 抗性愈伤组织和植株中 NPT I 检测

随机选择八个抗卡那霉素的愈伤组织和六个从愈伤组织再生的植株,进行新霉素磷酸转移酶活性的分析。同时也分析未转化的愈伤组织和植株,用水稻转化和未转化的愈伤组织作为对照(见表 4)。结果表明,所测定的六个从抗性愈伤组织再生的植株均具有新霉素磷酸转移酶活性,而测定的八个愈伤组织中却有两个不具有酶活性。正常植株、未经转化的愈伤组织和植株均不具有这种酶活性。从结果还可以看出,转化愈伤组织中酶的活性远比枝条中高。但 6 号样品中酶的活性也极高。

表 4 抗性愈伤组织和植株中 NPT II 酶活性测定⁽¹⁾

Table 4 Activity of NPT II in the kanamycin-resistant calli and plants regenerated from them

Sample ⁽²⁾	Mean count	Sample ⁽²⁾	Mean count
1	56 \pm 14	13	38 \pm 10
2	45 \pm 13	14	335 \pm 27
3	71 \pm 19	15	272 \pm 25
4	138 \pm 21	16	460 \pm 22
5	102 \pm 28	17	70 \pm 14
6	401 \pm 31	18	36 \pm 13
7	152 \pm 24	19	345 \pm 34
8	103 \pm 14	20	330 \pm 30
9	145 \pm 22	21	355 \pm 23
10	49 \pm 15	22	68 \pm 26
11	40 \pm 21	23	190 \pm 26
12	47 \pm 13		

(1) The sample spots were cut off and counted for one min using a liquid scintillation counter on the second day after assay.

(2) Sample number: 1—Untransformed shoots; 2—Shoots derived from protoplasts electroporated without plasmid; 3—Shoots derived from protoplasts electroporated with pDW2; 4—9—Shoots derived from protoplasts electroporated with pCaMVNEO and selected on media containing 50 μ g/ml kanamycin; 10, 11—Calli, the same origin as 2, 12, 13—Calli, the same origin as 3, 14—21—Calli, the same origin as 4—9; 22—Untransformed rice calli (T309); 23—transformed rice calli using pCaMVNEO (T309).

2.8 分子杂交

植物 DNA 酶切电泳后,用溴化乙锭染色。照像后,将琼脂糖胶上的 DNA 用 Southern 吸印法转移到尼龙膜上。从杂交后的放射自显影结果可以看出,五个从抗性愈伤组织再生的植株均具有与 pCaMVNEO 质粒相同的 1.0kb 杂交带,而对照植株则没有(图 3)。

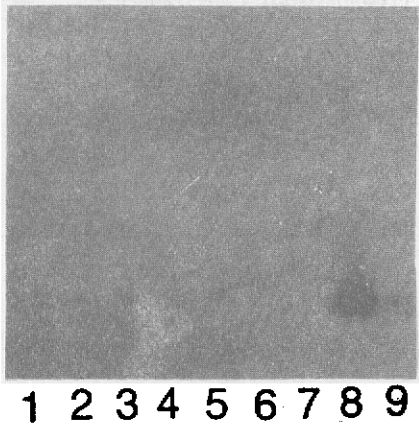


图 3 转化植株的 Southern 吸印杂交

Fig.3 Southern blot analysis of plants derived from kanamycin resistant calli

10 μ g of plant DNA were digested using BamH I. After digestion of pCaMVNEO with BamH I, a 1.0kb fragment of NPT I gene was labelled using ³²P-dCTP and used as hybridisation probe. Lane 1—5, DNA from NPT I positive plants, Lane 6. DAN from untransformed plant; Lane 7. empty, Lane 8,9. BamH I digested pCaMVNEO (100pg and 10pg).

1 kb

1 2 3 4 5 6 7 8 9

3 讨 论

电击影响细胞膜透性的两个主要因素是电场强度(V/cm)和电脉冲持续时间(用时间衰变常数来表示)。用高压、短脉冲持续时间^[2,6,9]或低压、长脉冲持续时间^[3,4]诱导植物原生质体吸收外源 DNA 均已取得成功。我们选用 30nF 的电容,电击缓冲液电阻为 1.98k Ω ,故时间衰变常数固定为 59.4 微秒。在这一条件下,对 500—2 500V 不同电击电压诱导欧白英原生质体吸收 pDW2 质粒的效果进行了比较。结果表明,欧白英的原生质体对电击电场强度十分敏感,当电场强度达到 1 500V/cm 时,原生质体提取物的 CAT 酶活性较强(图 1)。随着电压的进一步升高,原生质体的成活率明显降低(数据未列出)。

质粒 DNA 的量显著地影响转化效果。我们的试验结果表明,随着质粒 DNA 浓度的提高,原生质体中 CAT 酶的活性增强,这与其它研究者的结论是一致的^[2,3]。

在本研究中,欧白英原生质体的相对转化率高达 12.4%,绝对转化率也达 2.4×10^{-4} 。这一转化率与文献报道的其它双子叶植物^[2,14-16]或一些单子叶植物^[4,6,17]的转化率相近或略高。但低于 Negrutiu 等在烟草原生质体转化中的转化率(绝对转化率约为 $10-40 \times 10^{-4}$)^[9]。新霉素磷酸转移酶的测定结果证明了在抗性愈伤组织和再生抗性植株中含有这种酶活性。但在随机测定的八个抗性愈伤组织中,也有两个没有酶活性。这是因为“逃避选择”,还是转入基因在组织生长过程中失去,或是基因表达被抑制?目前还不清楚,尚需进一步分析。五个从抗性愈伤组织再生植株的分子杂交结果进一步证明了 NPT I 基因的存在。

致谢 本论文的大部分工作是在英国诺丁汉大学 Cocking E. C. 教授的实验室完成的。

参 考 文 献

[1] Andreason G *et al.* Biotechnology, 1988, 6: 650—660.

- [2]Shillito R D *et al.* Bio/Technology, 1985, 3 : 1099—1103.
 [3]Fromm M *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1985, 82 : 5824—5828.
 [4]Fromm M *et al.* Nature, 1986, 319 : 791—793.
 [5]Yang H *et al.* Plant Cell Rep, 1988, 7 : 421—425.
 [6]Zhang H M *et al.* Plant Cell Rep, 1988, 7 : 379—384.
 [7]Davey M R *et al.* Plant Sci Lett, 1980, 18 : 307—313.
 [8]Krens F H *et al.* Nature, 1982, 296 : 72—74.
 [9]Negrutiu I *et al.* Plant Mol Biol, 1987, 8 : 363—373.
 [10]Chand P K and Thesis Ph D, UK, University of Nottingham, 1988, pp. 1—20.
 [11]Kao K N *et al.* Planta, 1975, 126 : 105—110.
 [12]Power J B *et al.* Plant Tissue Culture Laboratory Manual, UK, University of Nottingham, 1989, pp. 56—89.
 [13]Pietrzak M *et al.* Nucl Ac Res, 1986, 14 : 5857—5868.
 [14]Paszowski J *et al.* EMBO J, 1984, 3 : 2717—2722.
 [15]Hain R *et al.* Mol Gen Genet, 1985, 199 : 161—168.
 [16]Meyer P *et al.* Mol Gen Genet, 1985, 201 : 513—518.
 [17]Lorz H *et al.* Mol Gen Genet, 1985, 199 : 178—182.

Transformation of *Solanum dulcamara* Protoplasts and Regeneration of Transgenic Plants

Wang Guoying^{1,2} He Puchao³ Davey M. R.¹

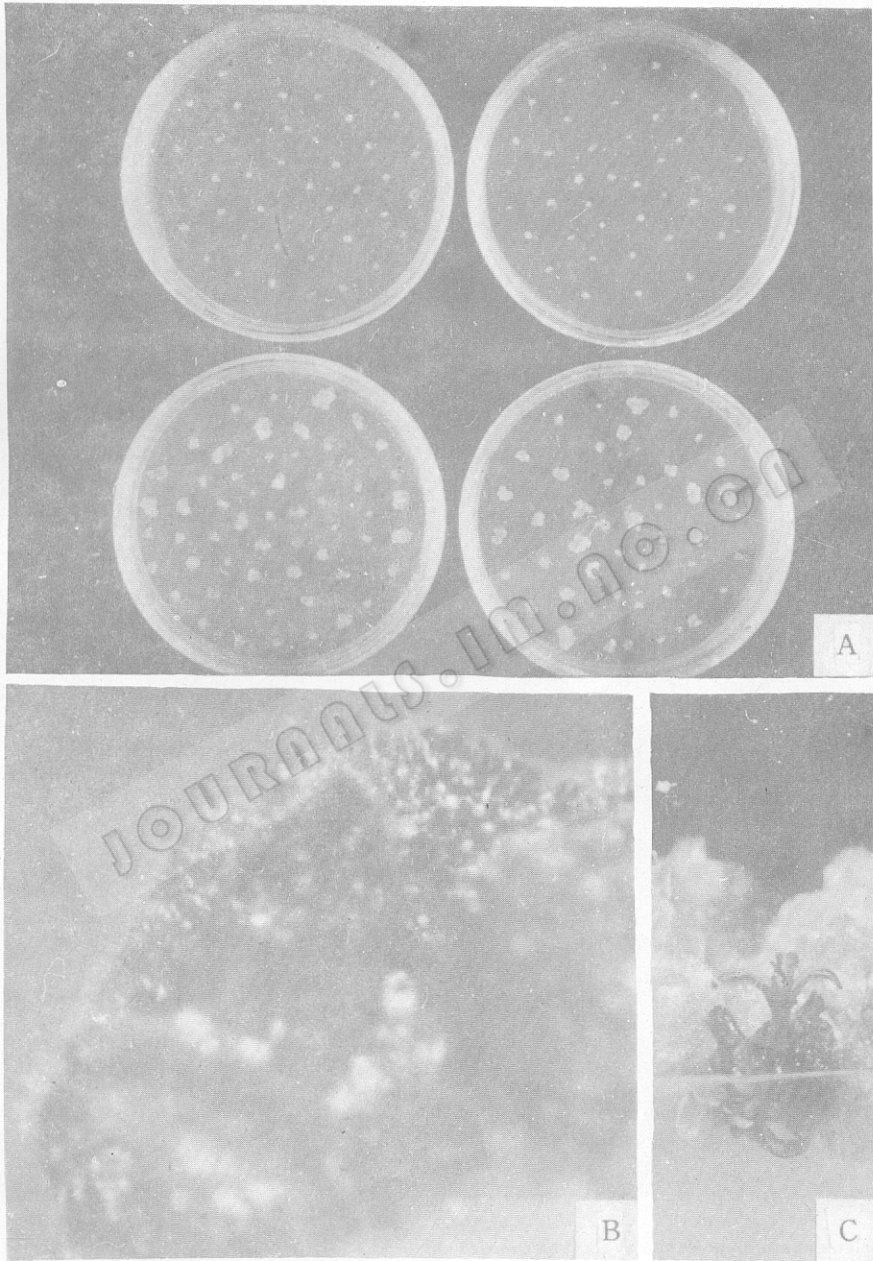
(University of Nottingham, Nottingham NG7 2RD, U K¹)

(Beijing Agricultural University, Beijing 100094²)

(Northwestern Agricultural University, Xianyang 712100³)

Abstract We have achieved successful transformation of *Solanum dulcamara* protoplasts by direct DNA uptake and regeneration of transgenic plants. The plasmids pDW2 carrying CAT gene and pCaMVNEO carrying NPT I gene were used. The electroporation voltage was 1 500V, which gave a field strength of 1 500V/cm with a time decay constant of 59. 4 μ sec. The concentration of plasmid was 20 μ g/2 \times 10⁶ protoplasts. Under these conditions, a very high transformation efficiency was obtained, with relative transformation frequency being up to 12. 4% and absolute transformation frequency 2. 4 \times 10⁻⁴. The activity of NPT I was detected in 75% of the kanamycin resistant calli and all of the plants regenerated from resistant calli. The southern blotting analysis showed that the DNA sequence of NPT I gene derived from pCaMVNEO plasmid existed in the transformed plants of *Solanum dulcamara*.

Key words Transformation, *Solanum dulcamara*, protoplasts, electroporation, transient expression



(A) The selection of kanamycin-resistant calli on MSP1 medium containing 50 μ g/ml of kanamycin. The calli of the above two dishes were respectively derived from EP-plasmid and EP+pDW2 treated protoplasts, and that of the bottom two dishes from EP+pDW2+pCaMVNEO and EP+pCaMVNEO treated protoplasts.

(B) An adventitious bud regenerated from kanamycin-resistant calli.

(C) Adventitious shoots regenerated from kanamycin-resistant calli.