

提高水稻基因枪转化效率的研究

郑宏红* 何锶洁 戴顺洪 李良材 田文忠

(中国科学院遗传研究所 北京 100101)

摘要 在转化前将受体材料转移到高渗培养基上,即用含有一定浓度的甘露醇和山梨醇的培养基对受体材料进行处理。基因枪轰击后把受体材料转出,结果表明,这样做明显提高了瞬时表达(GUS基因的表达)效果,用可筛选的标记基因(潮霉素磷酸转移酶基因, HPT)试验表明,经高渗处理后,稳定转化的效率也有提高。用基因枪将带有 HTP 基因的粒子轰击其盾片,经过筛选及植株再生,获得了转基因植株,PCR 扩增反应及 Southern 杂交证明了外源基因已整合入水稻的基因组。

关键词 水稻,基因枪转化,瞬时表达频率,成熟胚

近年来,基因枪法应用于水稻的转化,取得了很大进展。Christou 等^[1]以水稻的幼胚为材料获得了成功;Jun Cao 等^[2]用这一方法以水稻的悬浮细胞为受体,将 BAR 基因转入水稻;Liangcai Li 等^[3]对水稻的基因枪转化系统作了进一步改进,提高了转化频率。为了提高基因枪法应用于水稻转化的效率,本文借鉴了 Philippe Vain 等^[4]在玉米上,转化前对受体材料进行高渗处理,提高了瞬时表达和稳定表达的方法,取得了明显的效果。与通常水稻转化采用幼胚作为受体材料^{[1][3]}不同,本文还尝试了把容易获取的水稻的种子胚用于受体材料,成功地获得了转基因植株。

1 材料和方法

1.1 植物材料

供试水稻(*Oryza sativa*, L.)品种:中花9号,中作180,中远1号(粳稻,国内推广品种)。愈伤组织的获取:取授粉后12~15d的未成熟种子,在无菌条件下,先用70%酒精浸洗1min,转入3%的消洁灵(主要成分:NaOCl)溶液中浸泡15~20min,无菌水清洗3次。在无菌条件下剥离幼胚(直径大约1mm),接种在愈伤组织诱导培养基(NB)上,约20d后愈伤组织长出,选择继代一次的愈伤组织作为实验材料。

成熟胚的获取:将成熟种子除去颖壳,无菌条件下,在70%酒精中浸泡3min,转入0.1%升汞中浸泡15min,无菌水洗后,接种在NB培养基上,25℃暗培养10d左右,成熟胚盾片细胞发生分裂而很易剥离,用于基因枪转化。

1.2 培养基

基本成分包括:N6^[5]大量元素,BS^[6]有机成分,B5微量元素,脯氨酸(500mg/L),酶

* 现在工作单位:北京大学生命科学学院蛋白质工程及植物基因工程国家重点实验室,北京100871。

本文于1995年10月30日收到。

解酪蛋白(300mg/L),蔗糖(30g/L),植物凝胶(phytagel, 2.5~3.0g/L), pH5.8。愈伤组织的诱导及继代的培养基:另加入 2mg/L, 2,4-D。分化培养基:基本成分中加入 3mg/L BAP, 0.5mg/L NAA。1/2MS 培养基:1/2MS^[7]基本成分(MS 大量元素, MS 有机成分, MS 微量元素, 铁盐), IAA 0.5mg/L, NAA 0.5mg/L, 蔗糖 30g/L, Phytigel(Sigma)3g/L, pH5.8。

1.3 质粒

pAct1-D:(吴瑞先生提供)Actin 启动子驱动的 GUS 基因;pMON410:(Monsanto 公司提供)13kb, 含 CaMV 35S 启动子调控 HPT 基因(1.3kb);pNG3:(Montagu 先生提供)11.5kb, 含 Nos 启动子驱动的 HPT 基因;pB.t.48.415 CaMV 启动子驱动的 B.t 基因和 HPT 基因(中科院微生物研究所莽克强、田颖川先生提供)。质粒的提取与纯化:参考分子克隆实验指南^[8]。

1.4 在基因枪轰击前后对受体材料进行处理

处理培养基:在继代培养基中以 1:1 比例加入甘露醇,山梨醇,使其在培养基中的终浓度之和为(mol/L) 0.0.25、0.5、0.75、1.0、1.25。

处理方法:将愈伤组织约 50 块(每块大小为 2~3mm)或成熟胚约 20~30 粒置于处理培养基中,在转化前培养 4~5h,转化后培养 12~16h,然后转入愈伤组织继代培养基。

1.5 基因枪转化

采用 PDS-1000/He 基因枪(Bio-Rad)。取金粉悬液(60mg 金粉用无水乙醇消毒,悬浮于 1ml 无菌水中)50 μ l,加入 5 μ gDNA, 50 μ l 2.5mol/L CaCl₂, 20 μ l 0.1mol/L 亚精胺,充分混匀,离心,用无水乙醇洗沉淀,重新悬浮于 60 μ l 无水乙醇中,均匀滴加在 6 片轰击膜上,按照该基因枪手册所述程序对靶材料进行轰击,其中可裂膜的压力为 1100psi,靶材料距离可裂膜 6cm,每批材料轰击两次。

1.6 瞬时表达的检测

转化后的材料在继代培养基上培养两天后,浸入 X-GluC 染液中于 37 $^{\circ}$ C 培养 8~24h^[9],解剖镜下观察,记录蓝点数[图版 I-D(a)]。

1.7 筛选及再生

使用潮霉素的终浓度为 50mg/L,起始筛选压力为潮霉素 30mg/L,继代 2 次后,转入再生培养基光照培养,再生出小植株[图版 I-D(b)],将小植株转入 1/2 MS 培养基中(潮霉素 50mg/L),待小植株长大,移栽入温室[图版 I-D(c)]。

1.8 转基因植株的分子检测

1.8.1 水稻基因组 DNA 的提取:参照 Dellaporta 等的方法^[10]。

1.8.2 PCR 扩增反应:引物:

引物 1:(为 HPT 编码区中的一段)序列为 5'CGTCTGTCGAGAAGTTTC

引物 2:NOS 终止子的一段序列 5'GTAACATAGATGACACCGCG

扩增反应体系为 50 μ l 包括:引物 1,2 各 10pmol, dNTP 200 μ mol/L, Tag 酶 1 个单位,模板 DNA100~500ng。反应程序:预变性 98 $^{\circ}$ C, 10min;变性 93 $^{\circ}$ C, 1min;复性 55 $^{\circ}$ C, 1.5min;延伸 72 $^{\circ}$ C 2min;共 30 个循环,最后一个循环 72 $^{\circ}$ C 延伸 5min。反应完毕,取 10 μ l 终产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳,观察,拍照。

1.8.3 将 PCR 扩增产物与探针杂交:将有 PCR 扩增产物的凝胶按照 Southern 吸印的方法吸印在尼龙膜上。使用地高辛标记及检测试剂盒(Boehringer Mannheim, Germany)标记 HPT 基因探针,然后按照说明书进行杂交、检测。

1.8.4 Southern 杂交:取 $6\mu\text{g}$ 中花 9 号转化株基因组 DNA 用 EcoR I(能够切下插入目的片段约 0.87kb)和 Hind III(单酶切植物基因组)酶切。PMON410 Smal I 酶切片段(1.1kb)作为阳性对照,未转化的中花 9 号基因组 DNA $6\mu\text{g}$ 作为阴性对照。1%琼脂糖凝胶 40V 电泳 6h,转移到 HYBOND N⁺ 尼龙膜(Amersham)上,用 PMON410 质粒 DNA 中 Smal I 酶切片段(1.1kb)作为探针,用随机引物标记试剂盒(Promega 公司) α -³²P-dCTP 标记,进行杂交。杂交后用 KodakX-光片压片放射自显影。

1.9 对转基因植株当代及后代 GUS 基因表达的检测

取 3~5mm 长的幼嫩叶片,浸入 X-GluC 进行染色^[9]。

2 结果与讨论

2.1 渗透压处理对基因枪转化效果的影响

2.1.1 合适的渗透压可以提高瞬时表达的效果:当中花 9 号的愈伤组织在含有甘露醇、山梨醇的浓度和为 0.5~0.75mol/L 的培养基上处理后,平均每块愈伤组织上获得的瞬时表达蓝点数最多,比对照增加了 150 倍(表 1)。当甘露醇、山梨醇浓度之和高于 0.75mol/L 时,表达的效果反而下降,而且这时的愈伤组织表面色泽晦暗,对材料的后期生长不利。

表 1 中花 9 号愈伤组织转化的瞬时表达

Table 1 Transient expression of GUS gene of Zhonghua No.9 calli

[M+S](mol/L)	No. of calli	No. of blue spots	No. of blue spots/No. of calli
0.00	37	4	0.1
0.50	31	476	15.4
0.75	42	581	13.8
1.0	26	15	0.5
1.25	26	0	0.00

注:转化质粒:pAct-D, M:甘露醇, S:山梨醇, [M+S]:M 和 S 的浓度之和,其中 M:S=1:1

2.1.2 转化前进行预处理,可以提高稳定转化的效率

表 2 中远 1 号成熟胚转化 HPT 基因后获得的抗性愈伤组织

Table 2 Recovery of hyg^r callus from mature embryos bombarded with HPT gene

Variety	[M+S](mol/L)	No. of mature embryos	hyg ^r callus lines	
			No.	%
Zhongyuan	0.75	28	18	64.3
No. 1	0.50	22	14	63.6
	0.00	20	2	10

注:转化质粒:pNG3, M:甘露醇, S:山梨醇, [M+S]:M 和 S 的浓度之和,其中 M:S=1:1

从表 2 可看出以中远 1 号成熟胚为转化受体,用含有甘露醇、山梨醇的培养基进行处理,用基因枪轰击后,经筛选,获得的抗性愈伤组织数目明显增加,这说明稳定表达的频率

也提高了。瞬时表达频率的提高意味着接受外源 DNA 的细胞数目增加了, 经过后期的筛选, 我们得到的抗性克隆会增加。

在转化前将受体细胞在高渗透压的培养基中预培养并在转化后持续培养一段时间, 植物细胞会维持在质壁分离的状态^[4]。由于细胞内渗透压增加, 在细胞受伤后其内含物不易流出, 从而利于该细胞的存活。另外, 射入的微粒在细胞质粘度很大的环境中, 微粒穿出细胞的可能性降低, 这样有利于外源基因瞬时表达和稳定表达频率的提高。

2.2 用水稻的成熟胚作为基因枪转化受体得到了转基因植株

2.2.1 潮霉素抗性植株的获得:成熟胚与幼胚相比, 取材不受季节的限制, 材料的获取容易, 操作简单, 与愈伤组织和悬浮细胞相比, 没有诱导愈伤组织及建立悬浮细胞系的过程。这样, 使用成熟胚, 一方面缩短了时间, 另一方面减少了长时间组织培养带来的变异以及对育性的影响。表 3 是利用成熟胚作为基因枪转化受体得到潮霉素抗性植株。

表 3 潮霉素抗性植株的获得

Table 3 Regeneration of hyg^r rice plantlets

Varieties	Plasmids	No. of mature embryos	No. of hyg ^r callus lines	hyg ^r plant lines	
				No.	%
Zhonghua No.9	pActl-D + pMON410	25	14	3	12
Zhonghua180	pActl-D + pNG3	27	12	2	7.4

2.2.2 对所得转化植株的分子生物学鉴定:(a)PCR 扩增反应鉴定结果: 采取这 5 株的叶片, 提取基因组 DNA, 进行 PCR 扩增检测。扩增产物经电泳检查, 均得到与阳性对照扩增片段大小一致的含有 HPT 基因的特异性片段。图版 I -A 为其中 PCR 扩增产物的琼脂糖凝胶电泳照片。将含有 PCR 扩增产物的电泳凝胶用 Southern 吸印法吸印在尼龙膜上, 按照 Southern 杂交的方法, 用 1.1kb HPT 基因片段作探针杂交, 从放射自显影照片上可以看出, 5 株均为阳性(图版 I -B), 再次证明, PCR 扩增所得片段确为 HPT 基因上的特异性片段。(b)Southern 杂交法的鉴定结果: 取 PCR 扩增结果为阳性的中花 9 号 1 株的叶片, 提取基因组 DNA, 用 PMON410 经 SmaI 酶切后的回收片段作探针进行 Southern 杂交, 从放射自显影照片上可以看出: 中花 9 号植株未酶切的基因 DNA 与探针杂交后, 有大分子量杂交带(图版 I -C, lane 1), 说明基因组中存在 HPT 基因。基因组 DNA 经 HindIII 单酶切, 有一条约 20kb 的杂交带(图版 I -C, lane 3), 基因组 DNA 经 EcoRI 酶切, 根据 PMON410 的图谱(图 1), 能够杂交出 0.87kb 的 HPT 基因片段以及一条 23kb 左右的大片段, 从图版 I -C 的 lane 2 可以看出, 确有一条略小于阳性对照(1.1kb)的片段。表明 HPT 基因已整合入水稻基因组中, 未转化的对照植株的基因组 DNA 没有杂交信号。

2.2.3 共转化:本实验进行的是 HPT 和 GUS 基因共转化, 经过潮霉素筛选, 得到了 5 株转 HPT 基因的植株, 其中有 1 株 GUS 基因表达为阳性[图版 I -D(d)]。

2.2.4 子代分析(T1 代):本实验获得一株 HPT 基因和 GUS 基因共转化植株, 在温室中结实。在子一代的 8 株植株的叶片中, 有 7 株 GUS 基因的表达为阳性, 有 1 株为阴性, 出现了基因分离的现象[图版 I -D(d)], 说明 GUS 基因已经整合入水稻的基因组中。

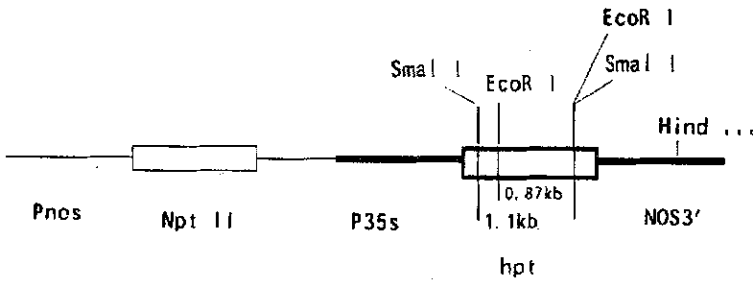


图1 质粒 pMON410 的部分图谱

Fig. 1 Part of plasmid pMON410

参 考 文 献

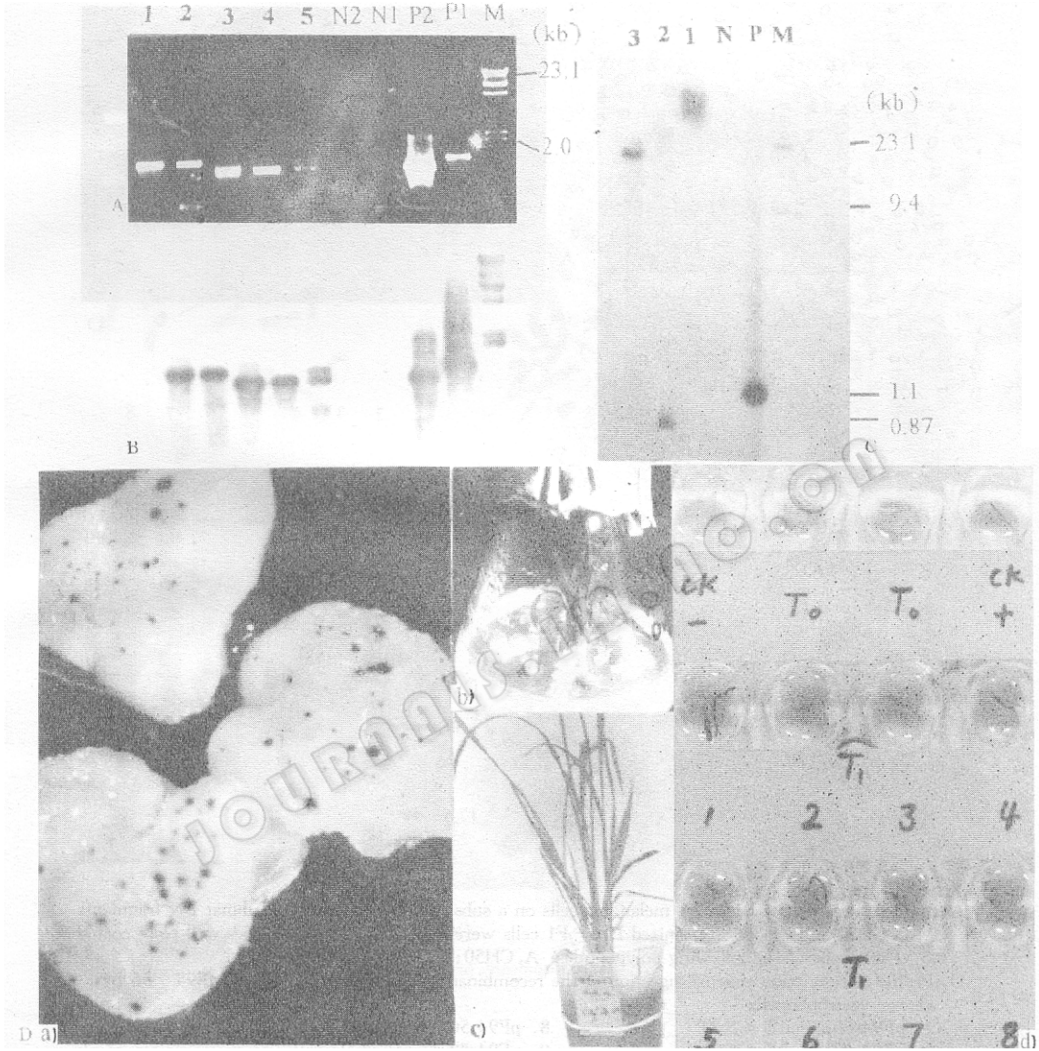
- [1]Christou P Ford T L, Kofron M. *Bio/Technology*, 1991, **9**:957~962.
- [2]Jun Cao, Xiaolan *et al*, *Plant Cell Reports*, 1992, **11**:586~591.
- [3]Li L C, Qu R D, Kochko A *et al*, *Plant Cell Reports*, 1993, **12**:250~255.
- [4]Philippe Vain, Michael D. McMullen *et al*, *Plant Cell Reports*, 1993, **12**:84~88.
- [5]Chu C C, Wang C C *et al*, *Sci Sinica*, 1975, **18**:659~668.
- [6]Gamborg O L, Miller R A and Ojima K J *Exp Res*, 1968, **50**:151~158.
- [7]Murashige T Skoog F *Physiol plant*, 1962, **15**:473~497.
- [8]Sambrook J, Fritisch E F, Maniatis T, *Molecular Clong: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY 1989.
- [9]Jefferson R A *et al*, *EMBO J*, 1987, **6**:3901~3907.
- [10]Dellaporta S L, Wood J *et al*, *Plant Mol Biol report*, 1983, **1**:19~21.

Some Improvements of the Biolistic Transformation System for *Oryza sativa*

Zheng Honghong He Sijie Dai Shunhong Li Liangcai Tian Wenzhong
(*Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing 100101*)

Abstract Osmotic treatment of the target tissues during particle bombardment significantly influenced the efficiencies of transient β -glucuronidase (GUS) expression and stable transformation of a selectable gene (hygromycin phosphotransferase (HPT) gene). Among different treatments, the supplementation of 0.5~0.75mol/L of sorbitol and mannitol in media resulted in more than 100-fold increase in transient expression and more than 5-fold increase in stable transformation. Mature embryos from seeds of two japonica rice varieties were bombarded with plasmid DNA which contained HPT gene and GUS gene. After selection for hygromycin B resistance and plant regeneration, transgenic plants were obtained. Integration of introduced HPT gene into plant genome was demonstrated by molecular analysis. Mature embryos provide the most convenient materials for biolistic transformation of rice.

Key words Particle bombardment, transgenic rice, osmotic treatment, mature embryos



A. Agarose gel electrophoresis of PCR - amplified DNA from putatively transformed plants. N1 and N2: non - transformed Zhongzuo 180 and Zhonghua No. 9 respectively, P1 and P2: plasmid pNG3 and pMON410, 1~2: putative transformants transformed with pNG3, 3~5: putative transformants transformed with pMON410.
 B. The corresponding autoradiograph after hybridization with a specific HPT probe.
 C. Integration of introduced HPT gene; Southern hybridization of DNA from one transgenic rice Zhonghua No. 9 transformed with pMON410. M: Lambda/Hind III marker, P: positive control, 1.1kb SmaI fragment of pMON410, N: negative control, genomic DNA of non - transformed Zhonghua No. 9, lane 1; undigested DNA, lane 2; genomic DNA digested with EcoRI, lane 3; genomic DNA digested with Hind III .
 D. Recovery of transgenic rice plants and their progeny using mature embryos as the target tissue for bombardment. a) GUS expression in mature embryos of Zhonghua No. 9 2d after bombardment. b) Plantlets of Zhonghua No. 9 regenerated from the hygromycin-resistant calli on medium containing 50mg/L of hygromycin B. c) Transgenic of Zhonghua No. 9 T₀ plant. d) Test of GUS expression in progeny, showing the segregation of GUS gene among the T₁ seedling derived from transgenic T₀ plant.