

文章编号: 0529-6579 (2000) 02-0087-05

基因枪法转化香蕉薄片外植体的参数优化^{*}

王鸿鹤¹, 黄霞¹, 邱国华¹, 黄学林¹, 谭兆平², 黄伟如²

(1. 中山大学生命科学学院, 广州 510275; 2. 广州市蔬菜研究所)

摘 要: 采用果用香蕉 (*Musa* spp.) 的薄片外植体作为转化受体, 通过对 GUS 基因瞬间表达的研究, 找出了较适合的轰击条件和外植体培养条件. 研究表明, 高渗处理对转化的影响较大, 轰击前后对外植体进行高渗处理的瞬间表达率 (14.11%) 是对照 (3.68%) 的 3.86 倍. 预培养外植体转化的瞬间表达率 (17.5% ~ 42.11%) 普遍高于没有预培养的外植体 (12.20%), 并以预培养 6 d 为好. 最适压力和射程分别为 7.584 MPa, 9 cm. DNA 沉淀剂的组成以 CaCl_2 和亚精胺同时存在较佳. 对不同 pH (5.0, 10.0) 下的 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 或 CaCl_2 对瞬间表达率的影响进行研究发现正常 pH (5.0) 的 CaCl_2 优于其他组合. 利用最佳条件组合, 瞬间表达率可达 48.72%, 初步建立了果用香蕉薄片培养的转化体系.

关键词: 基因枪法; 香蕉 (*Musa* spp.); 薄片外植体

中图分类号: Q785 **文献标识码:** A

目前有许多实验室正致力于香蕉 (*Musa* spp.) 转基因的研究并取得了一些进展. 导入的主要是一些报告基因, 其中在 AAA、AAB、ABB 和 BB 等基因型的香蕉中得到了瞬间表达, AAA、AAB 和 ABB 基因型的个别品种得到了稳定表达的转化植株^[1~4]. 在稳定表达的几例报道中, 大多是煮食香蕉和结子香蕉, 在果用香蕉上成功的并不多^[4]. 国内仅有关于瞬间表达的报道, 并没有进行更深入的研究. 我们在建立香蕉薄片培养植株再生体系的基础上^[5], 对影响基因枪法转化的几个重要参数进行比较深入的研究. 通过 GUS 瞬间表达的比较对香蕉基因枪转化参数进行优化, 初步建立了适合 AAA 型果用香蕉的简便, 快速, 可重复的转化体系.

1 材料与方法

1.1 材 料

供试香蕉品种为巴西, 转化材料为 10 代以内的试管苗. 薄片的切取参照文献 [5] 的方法. 供试质粒 DNA 为 pTEW2402 (带有 GUS 基因, NPT II 基因和反义 EFE 基因), 结构如图 1. 质粒 DNA 的分离用碱性裂解法, PEG 法纯化, 调整质量浓度至 $1 \mu\text{g}/\mu\text{L}$.

^{*} 基金项目: 广州市科委高科技资助项目 (960448252)

收稿日期: 1999-06-10 作者简介: 王鸿鹤 (1974~), 女, 博士生 通讯联系人: 黄学林.

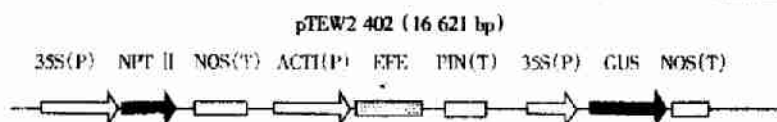


图 1 质粒 pTEW2402 的结构

Fig.1 The construction of plasmid TEW2402

1.2 培养基 (MST)

采用 MS 无机盐, 参照文献 [6] 方法添加适当的维生素和氨基酸。除标明外, 外植体在轰击前 4 h 至轰击后 16 h, 放于附加 0.2 mol/L 甘露醇的 MST 培养基上进行高渗处理, 28 ℃ 暗培养。处理完毕转入正常 MST 培养基上恢复。

1.3 基因枪转化方法

基因枪型号为 PDS-1000/He (BioRad), 转化时外植体置于培养皿中心位置 3 cm 范围内, 每皿约 50 个外植体。金粉悬液的制备及基因枪转化参照文献 [7] 方法, DNA 处理方法根据沉淀剂的不同分别进行处理。

1.4 GUS 报告基因的检测

外植体转化 2 d 后, 参照文献 [8] 方法, 将外植体置于 X-Gluc 染液中, 37 ℃ 温育 4 ~ 6 h, 压片、镜检、观察 (见图 2)。

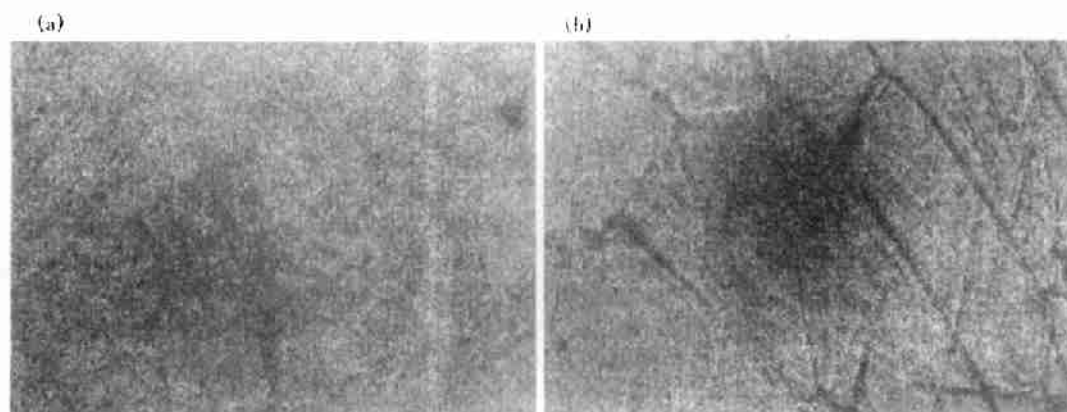
图 2 基因枪转化后外植体上的蓝色斑点, (a) $\times 10$; (b) $\times 100$

Fig.2 The blue spots obtained from the transformed explant

1.5 转化效率计算

$$\text{瞬间表达率 (\%)} = \frac{\text{有 GUS 基因瞬间表达的外植体数}}{\text{总外植体数}} \times 100$$

$$\text{表达指数} = \frac{\text{表达蓝点总数}}{\text{有 GUS 基因瞬间表达的外植体数}} \times 100$$

2 结果与讨论

2.1 微弹速度

PDS-1000/He 是通过调整气压精确地控制微弹速度, 从图 3a 中可以看出, 随着压力的

升高, 瞬间表达率呈下降趋势. 7.584 MPa 压力下瞬间表达率为 16.67%, 表达指数也最高, 优于其他组合.

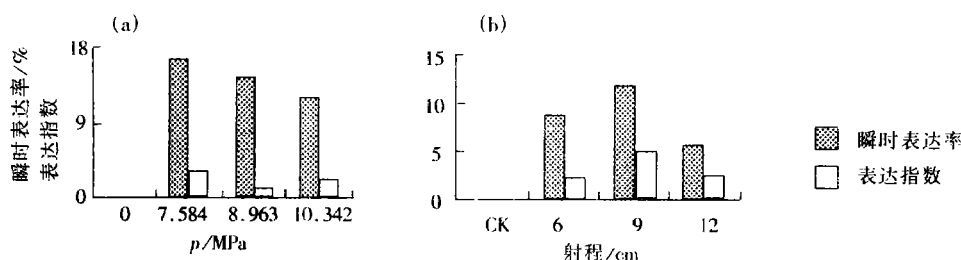


图3 不同压力 (a) 和射程 (b) 对 GUS 基因瞬间表达的影响

Fig.3 Effect of pressure (a) and distance (b) on GUS gene transient expression

2.2 射程

射程影响微弹速度和轰击范围. 从图 3b 中可以看到, 9 cm 的射程得到的表达指数最大, 而且瞬间表达率也最高. 说明 9 cm 的射程比较合适.

2.3 生物因素

2.3.1 甘露醇高渗处理对转化率的影响 转化前 4 h 至转化后 16 h 利用 0.2 mol/L 甘露醇高渗处理薄片外植体可以获得较高的表达率, 较未处理的外植体提高 GUS 瞬间表达率 3.86 倍左右. 如果不对外植体进行高渗处理, 只有个别的外植体能够观察到蓝色表达, 改变其他参数对表达的影响不大. 本研究中其他实验都进行了高渗处理. 值得注意的是高渗处理之后必须用灭菌滤纸仔细的将外植体表面水分吸干, 留有水层会对转化产生较大的影响 (图 4a).

2.3.2 预培养时间 预培养可以普遍提高 GUS 基因的瞬间表达率. 没有预培养的外植体瞬间表达率为 12.20%, 而预培养 3、6 和 9 d 后瞬间表达率分别为 17.5%、30% 和 42.11%, 有了不同程度的提高. 预培养 3~6 d 时, 表达指数变化不大, 但培养 9 d 后表达指数却显著下降, 说明预培养时间不宜过长 (图 4b).

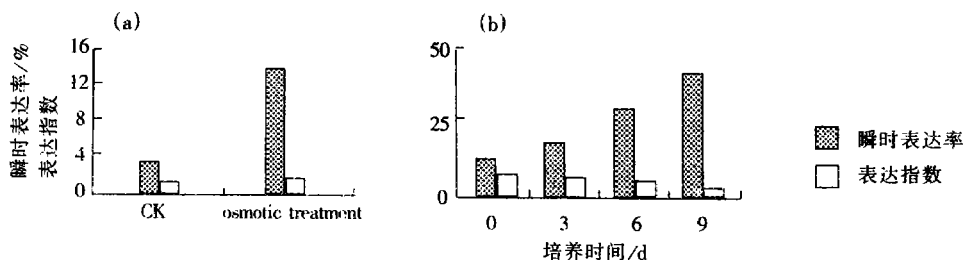


图4 高渗处理 (a) 和预培养 (b) 对 GUS 基因瞬间表达的影响

Fig.4 Effect of osmotic treatment (a) and pre-culture (b) on GUS gene transient expression

2.4 DNA 沉淀剂的影响

2.4.1 DNA 沉淀剂的最佳浓度组合 从图 5a 中可以看出, 只使用亚精胺作沉淀剂瞬间表达率并不低, 但平均每块外植体上的蓝点数却最少. 加入适量的 CaCl_2 可以改善这种状

况,得到的蓝点多分布均匀.加入 PEG 得到的蓝点数也较多,表达指数最高,但瞬间表达率低于 D_1 和 D_2 组合.综合考虑我们认为亚精胺和 CaCl_2 的组合比较适合.亚精胺在微弹载体制备过程中容易引起金粉的凝结,对细胞还有一定的毒害作用,这可能是引起组织伤害和轰击后受体组织再生能力降低的重要原因.

2.4.2 Ca^{2+} 来源及 pH 的影响 从图 5b 可以看出,使用 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 作沉淀剂的瞬间表达率普遍低于使用 CaCl_2 . 提高 pH 值瞬间表达率呈下降趋势.这与 Perl (1992) 在基因枪转化小麦的研究中的结果有所不同.在小麦的转化中,使用 $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 作沉淀剂效果优于 CaCl_2 , pH 从通常的 5.0 提高到 10.0 可提高瞬间表达率.在基因枪转化中 Ca^{2+} 来源及 pH 值对转化的影响可能与不同物种、不同组织来源的外植体有关.

利用研究中所设置的优化参数转化外植体,瞬间表达率最高可以达到 48.72%. 所得到的瞬间表达率比参数优化前的有了较大的提高,但仍不是很理想.而且瞬间表达和稳定表达之间还有一定的距离.进一步的提高瞬间表达率,减小枪击前后组织的伤害,提高枪击后组织的再生能力进而达到稳定表达的目的应该是下一步的重点工作.进一步的转化工作正在进行之中.

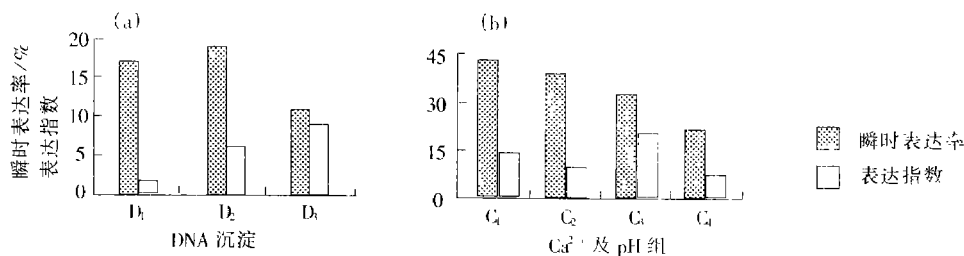


图 5 DNA 沉淀剂 (a) 和不同 Ca^{2+} 来源及 pH 值 (b) 对 GUS 基因瞬间表达的影响

Fig.5 Effect of DNA precipitant (a) and different Ca^{2+} source and pH (b) on GUS gene transient expression

(a) 每 20 μL 金粉悬液中 (2 枪用量) 加入

D_1 0.1 mol/L Spd 20 μL ;

D_2 0.1 mol/L Spd 10 μL + 2.5 mol/L CaCl_2 10 μL ;

D_3 0.1 mol/L Spd 5 μL + 2.5 mol/L CaCl_2 10 μL + 40%

PEG 4000

(b) 每 20 μL 金粉悬液中 (2 枪用量) 加入

C_1 2.5 mol/L CaCl_2 20 μL , pH = 5;

C_2 2.5 mol/L CaCl_2 20 μL , pH = 10;

C_3 2.5 mol/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 20 μL , pH = 5;

C_4 2.5 mol/L $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ 20 μL , pH = 10

感谢李宝建教授、许新萍副教授的悉心指导与大力支持.

参考文献:

- [1] SAGI L, PANIS B, REMY S, et al. Genetic transformation of banana and plantain (*Musa* spp.) via particle bombardment[J]. Biotechnology, 1995, 13: 481 ~ 485.
- [2] DUGDALE B, BEETHAM P R, BECKER D K, et al. Promoter activity associated with the intergenic regions of banana bunchy top virus DNA - 1 to - 6 in transgenic tobacco and banana cells[J]. J General Virology, 1998,

- 79(10): 2301 ~ 2311.
- [3] SAGI L, REMY S, PANIS B, et al. Transient expression in electroporated banana (*Musa* spp., cv. 'Bluggoe', ABB group) protoplasts isolated from regenerable embryogenic cell suspensions[J]. Plant Cell Reports, 1994, 13: 262 ~ 266.
- [4] INIBAP Annual Report. International network for the improvement of banana and plantain[M]. France: Montpellier, 1997.
- [5] 黄霞, 黄学林. 果用香蕉薄片培养再生植株[J]. 植物生理学通讯, 1998, 34(4): 268.
- [6] OKOLE B N, SCHUIZ F A. Micro-cross sections of banana and plantains (*Musa* spp.): Morphogenesis and regeneration of callus and shoot buds[J]. Plant Sci, 1996, 116: 185 ~ 195.
- [7] 徐淑平, 叶智明. 基因枪使用方法介绍[J]. 植物生理学通讯, 1998, 34(1): 41 ~ 43.
- [8] JEFFERSON R A. Assaying chimeric genes in plants: The GUS gene fusion system[J]. Plant Molecular Biology Reports, 1987, 11: 38 ~ 47.

Optimization of the Biological and Physical Parameters of Bombardment-Mediated Transformation of Micro-Cross Section Explants of Banana

WANG Hong-he^{*}, HUANG Xia, QIU Guo-hua,
HUANG Xue-lin, TAN Zhao-ping, HUANG Wei-ru

Abstract: Using the transient expression of GUS gene, we optimized the physical and biological condition of bombardment for micro-cross section of fruit banana (*Musa* spp.). The results suggested that osmotic treatment influence expression obviously. Transient expression rates of control and osmotic treatment from 4 h before to 16 h after the bombardment were 3.68% and 14.11%, respectively. Osmotic treatment caused 3.86 folds increase of the transient expression. The GUS expression can be improved several folds by the preculture of explants. The best pressure and the best distance from micro-carrier to target cell were 7.584 MPa and 9 cm, respectively. Calcium ions and spermidine were necessary to the transient expression. The effect of CaCl_2 or $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$ at either pH 5.0 or 10.0 on GUS expression were also studied. CaCl_2 solution at pH 5.0 in the mixture was superior to the others. Under the above optimal conditions, 48.72% of transient GUS expression rate could be obtained.

Keywords: particle bombardment; *Musa* spp.; micro-cross section

* School of Life Sciences, Zhongshan University, Guangzhou 510275, China