

用基因枪法转化水稻获得转基因植株^{*}

许新萍 胡 明 卫剑文 李宝健

(中山大学生物工程研究中心, 广州 510275)

摘 要 从水稻成熟胚诱导的愈伤组织经继代培养后可以产生大量胚性愈伤组织. 将分别含有苏云金杆菌 δ -内毒素基因 [CryI A(b)] 潮霉素磷酸转移酶基因 (hpt) 的质粒混合包裹在金粉上轰击上述胚性愈伤组织. 经过筛选和再生培养, 得到 92个系的潮霉素抗性再生植株. 点杂交结果表明 97.8% 的抗性植株含有 hpt基因, 73.9% 的植株同时含有 CryI A(b)基因和 hpt基因. Southern blot杂交分析进一步证实外源 CryI A(b)基因已经整合到水稻基因组中.

关键词 苏云金杆菌 δ -内毒素基因, 基因枪转化, 转基因水稻植株

分类号 Q 812

近年来, 植物基因工程的迅速发展为水稻抗虫育种提供了新的途径. Fujimoto等^[1]对苏云金杆菌 δ -内毒素基因 CryI A(b)进行改造后, 应用电激法将该基因导入水稻原生质体中, 转基因水稻植株能够高效表达 CryI A(b)基因, 并且对二化螟及稻纵卷叶螟的抗性增强. 在本研究中, 利用基因枪转化系统将人工合成的 CryI A(b)基因导入水稻胚性愈伤组织中, 获得了转基因水稻植株, 为进一步培育抗虫水稻新品种打下基础.

1 材料和方法

1.1 植物材料

供试水稻 (*Oryza sativa* L.) 品种为台北 309. 去壳的种子经灭菌后接在 NB培养基^[2]上, 挑取从种子盾片部位诱导生长的愈伤组织继代于 NB培养基. 使用经过继代培养后得到的胚性愈伤组织作为基因枪转化的靶材料.

1.2 质 粒

质粒 pAct1-D由吴瑞教授赠送, 含 Act-启动子驱动的 gusA基因. p35H由 Fauquet博士赠送, 含 CaMV 35S启动子调控的 hpt基因. pFW Z1由范云六教授赠送, 含 Act 1启动子驱动的人工合成 CryI A(b)基因. 质粒的提取纯化按 Sambrook等^[3]方法进行.

1.3 基因枪转化

转化前 4 h, 将胚性愈伤组织转移到含 0.6 mol/L高渗透压培养基 (NB培养基附加等量甘露醇和山梨醇) 的平皿上, 每皿 50~70块愈伤组织, 放置在平皿中心直径约 2.5 cm 范围

* 华南生物科学与技术研究中心重大项目和美国 Rockefeller基金会资助项目

收稿日期: 1997-04-22 许新萍, 女, 32岁, 讲师

内. 采用 PDS-1000/He 型基因枪 (Bio-Rad 公司) 进行转化. 3 mg 金粉 ($1.0 \mu\text{m}$) 经无水乙醇消毒后, 悬浮于 $50 \mu\text{L}$ 无菌水中, 加入 $1 \mu\text{g} \mu\text{L}$ DNA $5 \mu\text{L}$, 0.1 mol/L 亚精胺 $20 \mu\text{L}$, 2.5 mol/L CaCl_2 $50 \mu\text{L}$, 混匀后离心, 沉淀重悬于 $60 \mu\text{L}$ 无水乙醇, 均匀滴加在 6 片载样膜上. 在共转化实验中, pFWZ16 与 p35H 的摩尔分数比为 4:1. 选用可裂膜的压力为 1 100 psi, 靶材料至载样膜距离为 6 cm, 对靶材料进行轰击, 每皿材料轰击 2 次.

1.4 转化体的筛选及植株的再生

转化后, 愈伤组织在上述高渗培养基上继续培养 16 h. 用 pAct1-D 转化的愈伤组织, 一部分转到 NB 培养基上培养, 用于 GUS 瞬间表达的检测; 其余部分转到含 30~50 mg/L 潮霉素的 NB 培养基上培养, 作为以下共转化实验的对照组. 用 pFWZ16 与 p35H 共转化的愈伤组织, 转到含 30~50 mg/L 潮霉素的 NB 培养基上进行 2 步筛选培养. 约 4 周后, 挑选潮霉素抗性愈伤组织, 转到含 50 mg/L 潮霉素的 RN 培养基^[2]上诱导体胚发生和植株再生. 2~4 周后, 陆续将再生的小植株移植到含 50 mg/L 潮霉素的 MS 基本培养基上进行长根及壮苗培养. 待小植株长到 10 cm 左右时可移栽到土中.

1.5 GUS 瞬间表达的检测

在转化后 24 h, 对用质粒 pAct1-D 转化的愈伤组织进行组织化学染色^[4]. 在 Olympus 解剖镜下观察统计 *gusA* 基因表达产物与底物 X-Gluc 反应所产生的蓝点.

1.6 再生植株的分子检测

参照文献 [5] 的方法从水稻叶片组织提取基因组 DNA. 以 1 800 bp *CryI A(b)* 基因编码区片段 (由范云六教授提供), 1 100 bp *hpt* 基因编码区片段 (质粒 p35H 的 *EcoR* 酶切片段) 作为探针, 采用随机引物法进行标记, 分子杂交参照文献 [3] 方法进行.

2 结 果

2.1 GUS 在水稻胚性愈伤组织中的瞬间表达

台北 309 种子接种于 NB 培养基后, 从盾片部位诱导生长出愈伤组织, 经过 1~3 次继代培养, 可以产生大量分散的颗粒状胚性愈伤组织. 本研究采用这种胚性愈伤组织作为基因枪转化的靶材料.

用含有 *gusA* 基因的 pAct1-D 包裹的微粒轰击胚性愈伤组织, 24 h 后检测 GUS 瞬间表达情况, 可以发现每块愈伤组织上都出现大小、深浅不一的蓝色斑点 (图 1a). 块愈伤组织上蓝点数最多可以达到 303 个, 平均每块愈伤组织上有 188 个蓝点, 蓝点分布均匀. 这表明本实验所采用的转化条件可以将外源基因高效地导入水稻胚性愈伤组织的细胞中.

2.2 *CryI A(b)* 基因的导入及潮霉素抗性植株的获得

以 *hpt* 基因作为筛选的标记基因与 *CryI A(b)* 基因进行共转化, 对照组用 *gusA* 基因转化. 转化 16 h 后, 将愈伤组织转移到含 30 mg/L 潮霉素的 NB 培养基上筛选培养. 12 d 后, 部分愈伤组织的生长受到抑制. 将新生长出的愈伤组织转到含 50 mg/L 潮霉素的 NB 培养基上作进一步的筛选. 14~16 d 后, 转化组出现生长旺盛、结构紧密的抗性愈伤组织, 而对照组的生长明显受到抑制 (图 1b). 将抗性愈伤组织转移到含 50 mg/L 潮霉素的 RN 培养基上诱导再生. 一部分愈伤组织继续增长并分化出绿芽, 一些绿芽继而长成小植株 (图 1c). 将再生的绿色小植株移到含 50 mg/L 潮霉素的 MS 培养基中. 2~3 周后, 大多数植株的根系发育正常 (图 1d). 抗性植株移栽到土中后, 多数能够正常生长发育并结实.

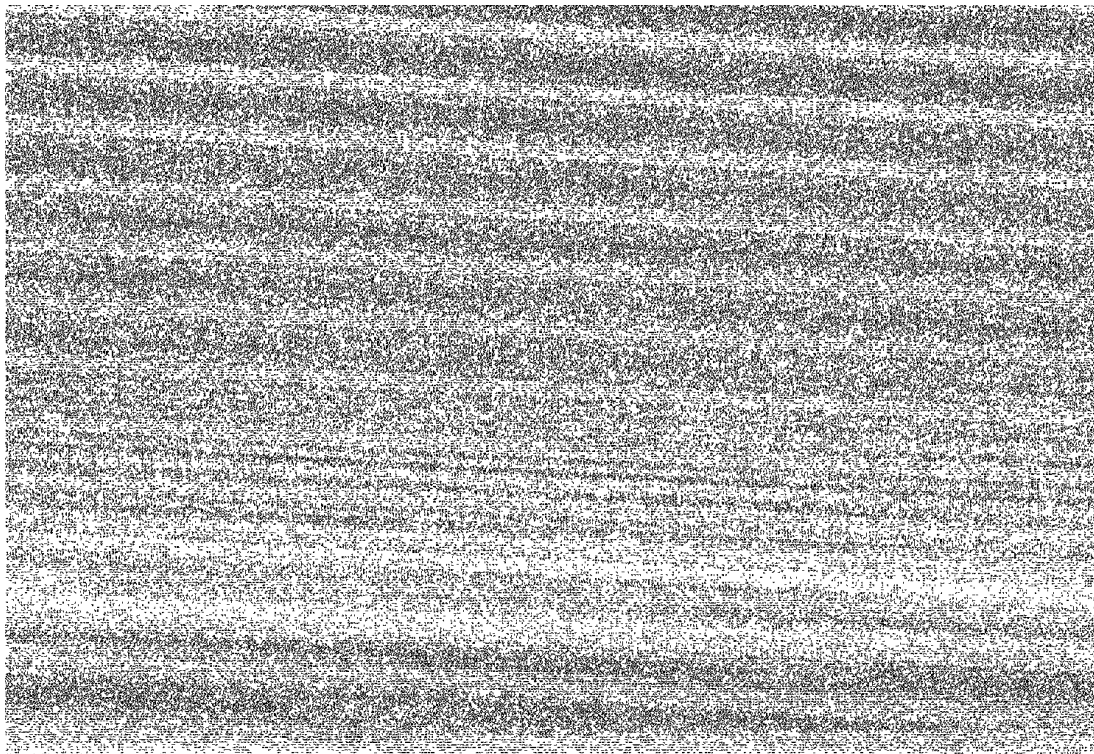


图 1 水稻的转化和再生

Fig. 1 Transformation and regeneration of rice

a 用 pAct1-D 转化的愈伤组织上的 GUS 瞬间表达; b 经基因枪转化处理的愈伤组织在含潮霉素的 NB 培养基上筛选培养 4 周后的生长情况, 左: 用 pAct1-D 转化, 右: 用 pFWZ16 和 p35H 共转化; c 在含潮霉素的 RN 培养基上, 潮霉素抗性愈伤组织再生成株; d 在含潮霉素的 MS 培养基上的再生植株

分别使用第 1 次或第 3 次继代中产生的胚性愈伤组织为靶材料进行了转化实验. 从表可见, 随着继代次数的增加, 抗性愈伤组织的形成率由 44.9% 提高到 71.6%, 但植株再生率却由 61.4% 下降到 37.4%. 因此, 最终的抗性植株系获得率反而稍有降低.

表 1 基因枪法转化水稻胚性愈伤组织的实验结果

Tab. 1 The results of transformation of rice embryogenic calli by the biolistic method

实验序号	靶愈伤组织来源	靶愈伤组织数 (块)	抗性愈伤组织数 (块)	抗性植株系数 (个) ¹⁾	抗性植株系获得率 (%) ²⁾
1	第 1 次继代	156	70	43	27.6
2	第 3 次继代	183	131	49	26.8

1) 由同 1 块抗性愈伤组织所再生的抗性植株作为 1 个系;

2) 抗性植株系的获得率 = (抗性植株系数 / 靶愈伤组织数) × 100%

2.3 潮霉素抗性植株的分子检测

在各抗性植株系中任选 1 株植株提取基因组 DNA, 对 92 株植株进行了点杂交分析, 使用

hpt 基因作探针时, 90 株为阳性杂交结果 (图 2a, 3~ 8, 其余结果未列出). 而用 CryI A (b) 基因探针时, 68 株为阳性结果 (图 2b, 3, 6~ 8, 其余结果未列出), 与上述点杂交作比较时, 发现这些植株全部能够与 hpt 基因探针杂交. 因此, 所检测的植株中, 97. 8% 的植株含有 hpt 基因, 73. 9% 的植株同时含有 CryI A (b) 和 hpt 基因.

任选 1 株点杂交阳性植株进一步作 Southern blot 杂交. 由图 3 可见, 未酶切的基因组 DNA (4 道) 与 CryI A (b) 探针杂交时在高分子量 DNA 区域呈阳性信号, 没有小分子量的杂交片段出现. HindIII 在 pFWZ16 上有 2 个酶切位点, 可以切下 4 500 bp 含 CryI A (b) 嵌合基因片段, 用此酶消化时, 基因组 DNA (5 道) 出现的杂交主带与 pFWZ16 (道) 的杂交带 (4 500 bp) 大小相同. 此外, 有其它大小的杂交带出现 (其中杂交带较弱). 因此, 外源的 CryI A (b) 基因已经整合到该株水稻基因组中, 且可能有 6 拷贝.

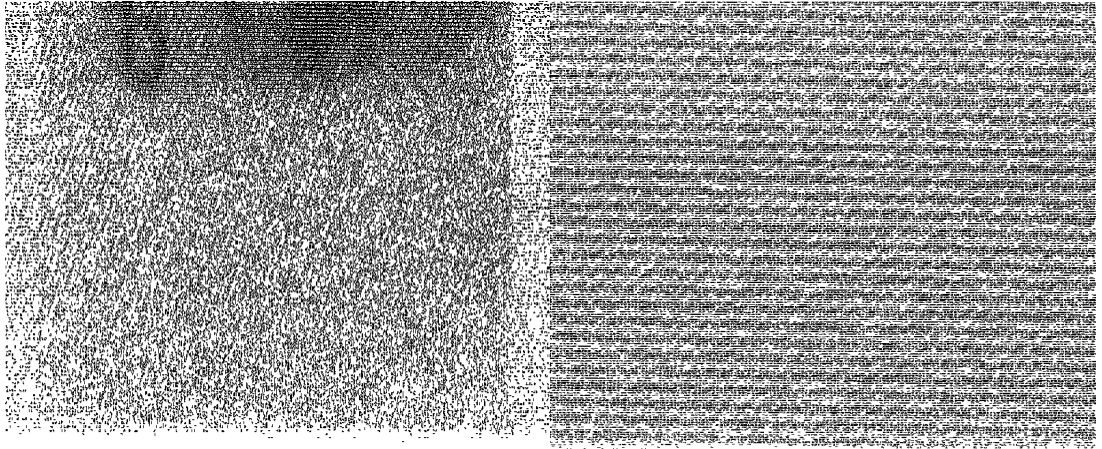


图 2 使用 hpt 基因探针 (a) 或 CryI A (b) 基因探针 (b) 对潮霉素抗性植株进行的点杂交分析

Fig. 2 Dot blot analysis of hygromycin resistant plants, hybridized to the probe of hpt gene (a) or the probe of CryI A (b) gene (b)
1 p35 H (a) 或 pFWZ16 (b); 2 未转化植株; 3~ 8 抗性植株

图 3 使用 CryI A (b) 基因探针点杂交阳性植株进行的 Southern blot 分析

Fig. 3 Southern blot analysis of a putative transgenic plant, hybridized to the probe of CryI A (b) gene
1 HindIII 消化的 pFWZ16; 2, 3 未酶切 (2) 或经 HindIII 消化 (3) 的未转化植株基因组 DNA; 4, 5 未酶切 (4) 或经 HindIII 消化 (5) 的转基因植株基因组 DNA

3 讨论

转化受体材料的选择是植物转化的一大要素. 水稻基因枪转化最常用的靶材料是幼胚和悬浮培养系^[6]. 直接轰击幼胚的盾片细胞, 经筛选培养得到转化愈伤组织继而再生成株, 整个培养周期较短, 有利于植株再生, 但是幼胚的获取受生长季节限制. 悬浮培养细胞增殖速度较快, 继代 1 次可以得到大量供转化的受体材料, 但是过长的培养时间使水稻的植株

再生能力大大降低. 在本研究中, 采用从成熟胚诱导经短期继代培养形成的大量胚性愈伤组织作为靶材料, 从接种到获得转化小植株只需 3~4 个月, 而且转化效率比较高.

本研究中, 目的基因 *CryI A(b)* 和标记基因 *hpt* 在不同的质粒载体 *pFWZ16* 及 *p35H* 上, 采用 *pFWZ16* 与 *p35H* 以 4:1 的分子摩尔比混合进行共转化实验, 对来自不同转化系的 92 株潮霉素抗性植株进行的点杂交分析表明 73.9% 的植株同时含有 *CryI A(b)* 和 *hpt* 基因, 显示出较高的共转化效率. 这个共转化方法省略了将标记基因与目的基因构建在同一载体上的步骤, 大大简化了将目的基因导入水稻的途径.

参 考 文 献

- 1 Fujimoto H, Itoh K, Yamamoto M, et al. Insect resistant rice generated by introduction of a modified δ -endotoxin gene of *Bacillus thuringiensis*. *Bio/Technology*, 1993, 11: 1151-1155
- 2 Li L, Qu R, de Kochko A, et al. An improved rice transformation system using the biolistic method. *Plant Cell Rep*, 1993, 12: 250-255
- 3 Sambrook J, Fritsh E F, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*. 2nd ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989
- 4 Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W. GUS fusions β -Glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants. *EMBO J*, 1987, 6: 3901-3907
- 5 Doyle A. Isolation of plant DNA from fresh tissue. *Focus*, 1990, 12 (1): 13-15
- 6 Zhang S, Chen L, Qu R, et al. Regeneration of fertile transgenic indica (group I) rice plants following microprojectile transformation of embryogenic suspension culture cells. *Plant Cell Rep*, 1996, 15: 465-469

Transgenic Rice Plants Obtained by Biolistic Method

Xu Xinping^{*} *Hu Ming* *Wei Jianwen* *Li Baojian*

Abstract Many embryogenic calli were produced from primary calli induced from mature embryos that had been subcultured on NB medium. The embryogenic calli were bombarded with gold particles coated with the plasmids containing *B. t.* δ -endotoxin gene [*CryI A(b)*], hygromycin phosphotransferase gene (*hpt*). After selection and regeneration, 92 lines of hygromycin resistant plants were obtained. The result of DNA/DNA dot hybridization showed that 97.8% of resistant plants contained *hpt* gene, 73.9% of plants contained *CryI A(b)* gene and *hpt* gene. Southern blot analysis further indicated that the foreign *CryI A(b)* gene has been integrated in rice genome.

Keywords *B. t.* δ -endotoxin gene, microprojectile bombardment, transgenic rice plant

* Biotechnology Research Center, Zhongshan University, Guangzhou 510275