

# 外源基因导入贡柑体胚及其人工种子 构建的初步研究

余焰华 郭惠珊 邹韵霞 李宝健

(生物工程研究中心)

**摘要** 用小细胞团和分散细胞混合物与两种带不同质粒的农杆菌共培养的方法,将质粒PGV3850:1103neo T-DNA上的km抗性基因和Nos/Npt基因、质粒PGV517的Km抗性基因、NPTⅠ基因和毒蛋白基因转入贡柑细胞,在含有卡那霉素的选择培养基上选择出抗性愈伤组织和幼胚。通过Nopalim和NPTⅠ酶性检测、DNA/DNA分子杂交鉴定,证明了Nos基因、NPTⅠ基因已整合到贡柑体胚的细胞基因组中并表达,苏云金杆菌的毒蛋白基因整合到贡柑细胞基因组中,第一次在柑桔类果树实现了外源基因转移。用3%海藻酸钠包埋转化体胚制备人工种子,2粒转基因人工种子已萌发。

**关键词** 转化,外源基因,胚性愈伤组织,人工种子,四会贡柑

近几年来,利用Ti质粒将外源基因导入细胞并获得表达的例子已有几十个之多<sup>[1]</sup>。此外,人工种子的研究也取得很大的进展<sup>[2]</sup>,由于人工种子能在短时间内大量繁殖和应用,使基因工程植物能尽快用于农业生产。

柑桔每年的产量在50~60百万吨之间,经济价值达350~450亿美元<sup>[3]</sup>。然而,柑桔类果树正遭受许多种病虫害的威胁和不良气候(如冰霜)的侵害<sup>[3]</sup>。这些问题的解决迫在眉睫。传统的育种方法费时费工,而且由于生殖屏障的存在,使某些基因的重组难以达到目的<sup>[4]</sup>。因此,应用细胞和组织培养、原生质体的操作、基因工程等方法改良品种是目前柑桔类育种工作的主流<sup>[3]</sup>。贡柑(*Citrus reticulata* Blanco cv. yu dong)是一种优良品种,果实色泽均匀,鲜艳光亮,口感清甜,在古代曾作为贡品。目前贡柑果树数目极少,同样受病虫害的严重威胁。同时,柑桔类组织培养技术已有一定的基础。因此,我们选取了贡柑为实验材料,以求建立这个珍贵品种的外源基因导入和人工种子制备的系统。

## 1 材料和方法

### 1.1 材料

广东省四会贡柑(*Citrus reticulata* Blanco cv. yu dong)珠心胚胚性愈伤组织。

本文1991年6月12日收到

●国家“863”高技术计划资助项目

菌种: 大肠杆菌(*E. coli*) HB101(PLGV neo1103), 农杆菌(*A. tumefaciens*) C<sub>58</sub>C<sub>1</sub>Rif<sup>R</sup>(PGV3850::1103neo), 大肠杆菌(*E. coli*) HB 101(PES<sub>1</sub>), 农杆菌(*A. tumefaciens*) C<sub>58</sub>C<sub>1</sub>Rif<sup>R</sup>(PGV517)。

## 1.2 方法

1.2.1 体胚诱导 按邹韵霞等的方法<sup>[9]</sup>。取在MT+蔗糖8%培养基中继代培养的柑愈伤组织, 接入MT+蔗糖14%的培养基, 14天后, 按30mg/50ml接种量, 接入ZMT+GA<sub>3</sub>4mg/L+蔗糖4%的液体培养基。培养条件: 光强度1000Lx, 光照射时间12h/d, 温度25℃±2, 摇床转速100rpm, 150ml三角瓶加培养液50ml。

1.2.2 基因转化、体胚诱导、筛选 ①取转入MT+蔗糖8%培养基第2~3天的悬浮培养细胞团, 用小铲轻轻压碎, 60目铜网过筛, 离心(500rpm, 5min)收集滤下的小细胞团和分散细胞, 用蔗糖4%溶液洗2次, 离心收集细胞培养物。另一种做法是: 把收集的细胞培养物先放入MT+蔗糖8%+果胶酶1%, pH6.4, 酶解2.5h, 得5~10个细胞构成的细胞团和大量分散细胞, 用蔗糖8%溶液洗涤5次, 每次离心(500rpm, 5min)收集。②20mlLB培养基中接入已活化的农杆菌, 28℃振荡培养16~18h, 菌浓度为5×10<sup>8</sup>个细胞/ml, 再用LB培养基稀释10倍。③在10ml稀释后的菌液中放入550mg的小细胞团和分散细胞混合物, 经不同时间(10min, 20min, 40min, 60min)的共培养后, 用蔗糖4%+Cef 500mg/L(Cef: 先锋霉素)溶液洗涤5~7次, 离心(500rpm, 5min)收集细胞团和分散细胞混合物。④将经共培养后的小细胞团和分散细胞的混合物, 转入MT+蔗糖8%+Cef 500mg/L培养基上培养, 10天后, 转入MT+蔗糖14%+Cef 500mg/L, 接入量为30~40mg/50ml, 继代培养时间为4天, 培养条件同前。⑤经16天后, 出现大量球形胚, 用20目铜网过筛, 滤下的细胞团仍在ZMT+蔗糖4%+GA<sub>3</sub>4mg/L+Cef 500mg/L培养基中诱导体胚; 而铜网上的球形胚转入MT+GA<sub>3</sub>4mg/L+Cef 500mg/L+Km 50mg/L(Km: 卡那霉素)的选择培养基中培养, 20天后, 可见大部分接近死亡, 而少数能抗Km的胚则进一步长大。

## 1.3 人工种子包埋<sup>[2]</sup>

改良MS液体培养基中加入海藻酸钠至浓度为3%(w/v), 7.81kg, 121℃灭菌20min。分成两份, 一份加Km 50mg/L、Cef 500mg/L, 另一份不加抗菌素, 选择对照胚(未经转化处理)和经转化处理并表现为抗km的体胚, 前者加进不含抗菌素的包埋介质, 后者加进含抗菌素的包埋介质, 平均直径为0.8cm, 滴入无菌的60mol/L CaCl<sub>2</sub>溶液, 停留20min, 无菌水冲洗后, 将含对照胚的人工种子接入MT+NAA 0.5mg/L+蔗糖4%固体培养基, 抗性胚的人工种子接入MT+NAA 0.5mg/L+Km 50mg/L+Cef 500mg/L+蔗糖4%的固体培养基, 培养条件同前。

## 1.4 NPT II 检测

取100mg筛选的抗性胚, 参照文献[6]的方法得到反应液点样于WhatmanP81滤纸上, -70℃曝光1~2天, 冲洗x-光底片。

## 1.5 Nopaline检测

取抗Km抗性胚和对照胚, 按文献[7]的改良方法检测, 紫外检测电泳结果, 拍照。

## 1.6 DNA/DNA分子杂交

1.6.1 杂交探针的制备 在Amp 100 $\mu$ g/ml的LB培养基中, 加入1%体积的E.coli:HB 101(PES1)种子液, 按文献[8]方法制备PES1质粒DNA. 取微量制备的PES1DNA 0.5 $\mu$ l(含量2 $\mu$ g/ $\mu$ l)用BamHI(5 $\mu$ l/ $\mu$ l)酶切, 电泳检测酶切结果见图1. 另取制备的PES1DNA 150 $\mu$ l, 用低熔点琼脂糖挖块法回收所需DNA(含C<sub>rp</sub>基因)片段. 经分离提纯的该DNA片段5 $\mu$ l(约1 $\mu$ gDNA), 用切口移位(Nick Translation)法制备 $\alpha$ -<sup>32</sup>P-DNA探针, -20 $^{\circ}$ C保存备用.

1.6.2 植物DNA的提取 各取1g以农杆菌转化的抗Km抗性胚和未转化的对照胚, 按文献[9]方法, 分别提取抗性胚和对照胚的DNA. 电泳结果见图2.

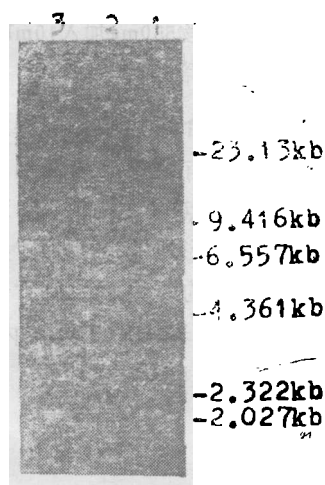


图1 PES1经BamHI酶切后电泳图

Fig.1 Restriction digestion analysis of plasmid PES1  
1.  $\lambda$ DNA + Hind III  
2. PES1 + BamHI  
3. PES1

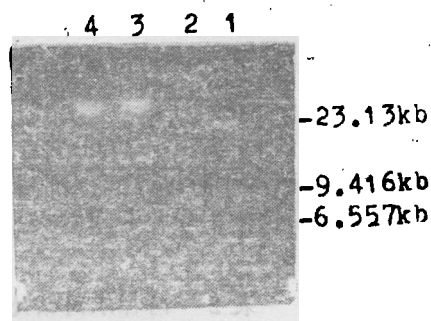


图2 贡柑体胚DNA电泳图

Fig.2 Agarose Gel electrophoresis of embryos DNA of Tribute Citrus  
1.  $\lambda$ DNA + Hind III  
2. PGV3850:1103neo 转化的有Km抗性的体胚DNA  
3. PGC517转化的有Km抗性的体胚DNA  
4. 未转化的贡柑体胚DNA

1.6.3 杂交 按文献[10, 8]无法进行DNA/DNA分子杂交. 将抗性胚DNA、对照胚DNA和质粒PES1 DNA(各1 $\mu$ g)点样于硝酸纤维素膜上, 经预杂交后, 加入200 $\mu$ l以上制备的 $\alpha$ -<sup>32</sup>P-DNA探针进行杂交, 杂交完毕, -20 $^{\circ}$ C曝光2~3天, 冲洗x-光底片.

## 2 结果与讨论

### 2.1 贡柑转基因愈伤组织的建立及转化结果

2.1.1 贡柑愈伤细胞对Km和Cef的反应 为了检验贡柑愈伤细胞是否对Km有天然抗性, 我们配制了含Km为25、75、100、150、200mg/L一系列浓度的MT+蔗糖8%的培养基进行了试验, 结果, 在20天内, 贡柑愈伤细胞在所有测试浓度下都转变成褐黄色, 继而死亡(图版-A),

在附加250、500、750、1000mg/L的Cef的MT + 蔗糖8%的培养基中, 贡柑愈伤细胞正常分裂繁殖, 呈白色, 说明高浓度的Cef对贡柑愈伤细胞几乎没有伤害。

2.1.2 最适转化条件的确定 为了找到合适的转化条件, 我们测试了不同时间共培养, 不同预处理的愈伤细胞的转化实验, 结果见表1, 2。

从表1可以看出, 最适的共培养时间是40min。这里“转化频率”是指在含Km 50mg/L的培养基中存活的抗性体胚所占的比率, 即抗性体胚数比接入含Km 50mg/L的培养基中总的体胚数。

从表2结果看出, 采用酶解后收集的小细胞团和分散细胞的混合体共培养, 得到的转化频率稍高。酶解实验中只采用了1%的果胶酶, 使细胞分散, 有更多的细胞同农杆菌接触, 另一个原因可能是酶解后使细胞壁上农杆菌吸附的特定位点<sup>[11]</sup>暴露, 有利于农杆菌的吸附。由于酶解液中不含纤维素酶, 形成原生质体很少, 形成的这些原生质体, 大部分在这种非高渗的酶解液和共培养液中破裂, 极少量存活的原生质体只有长出新的细胞壁之后被农杆菌吸附<sup>[12]</sup>, 而长出新细胞壁是不能在共培养的40min内完成的<sup>[13]</sup>, 因此, 酶解后转化频率的提高不大可能是由于原生质体被转化的原因。

表1 不同时间共培养对转化频率的影响\*

Tab.1 The influence of different time of cocultivation on the frequency of transformation

共培养时间(min)	10	20	40	60
转化频率( $\times 10^{-4}$ )	12	7	55	51

\* 细胞团与分散细胞混合物550mg加入10ml稀释10倍的菌液中进行共培养

表2 两种不同预处理的细胞的转化结果\*

Tab.2 The effect of defferent pre-treatment on transformation

材 料	转化频率( $\times 10^{-4}$ )
酶解后收集的小细胞和分散细胞	87
轻压碎后过滤离心收集的小细胞团和分散细胞	55

\* 共培养时间为40分钟, 植物材料与细菌的比例同表1

2.1.3 卡那霉素抗性体胚中外源基因整合与表达的分子鉴定 ①DNA/DNA分子杂交验证。为了证实苏芸金杆菌的毒蛋白基因是否整合进贡柑体胚的基因组, 我们提取了用含PGC517的农杆菌转化的有Km抗性的贡柑体胚(图版-B)的DNA与分离的毒蛋白基因(Crp基因)片段进行分子杂交, 杂交结果为阳性(图3), 表明有Km抗性的贡柑体胚DNA中含有与毒蛋白基因片段同源的序列, 即毒蛋白基因已整合进贡柑体胚的基因组中。

② Nopaline检测。实验结果见图4, 从图4可见, 分别用含有PGC517的农杆菌和含有PGV3850:1103neo的农杆菌转化, 筛选到有Km抗性的贡柑体胚都能检测到2个明亮斑点, 一个在标准精氨酸对应位上, 另一个在胭脂碱对应位点上, 在转化的体胚中有胭脂碱的存在, 表明转入的Nos基因已经表达, 在PGV3850::1103neo的物理图谱里,



图 3 DNA 分子杂交

Fig.3 DNA molecular hybridization

1. 正对照(PES1 DNA)
2. 未转化体胚(对照)
3. PGC517转化后发生的 Km 抗性的贡柑体胚

图 4 Nopaline 检测

Fig.4 Nopaline assay

1. PGC517转化后有Km抗性的体胚
2. PGV3850:1103neo转化后有Km抗性体胚
3. 未转化的贡柑体胚
4. 标准胭脂碱, 5. 标准精氨酸

Nos基因和NPT II 基因紧密连锁,在T-DNA区段里,在PGC517的物理图谱(图5)里,毒蛋白基因(Crp), Nos基因、NPT II 都有T-DNA区段,它们通常随各自的 T-DNA进行共转化,并整合在植物基因组上<sup>[14~16]</sup>。本实验表明,在两种以含有不同质粒的农杆菌转化、筛选的有Km抗性的贡柑体胚里,Nos基因已整合和表达,这给 PGC517 中的 NPT II 基因和毒蛋白基因以及PGV3850::1103neo中的NPT II 基因的整合提供了佐证。

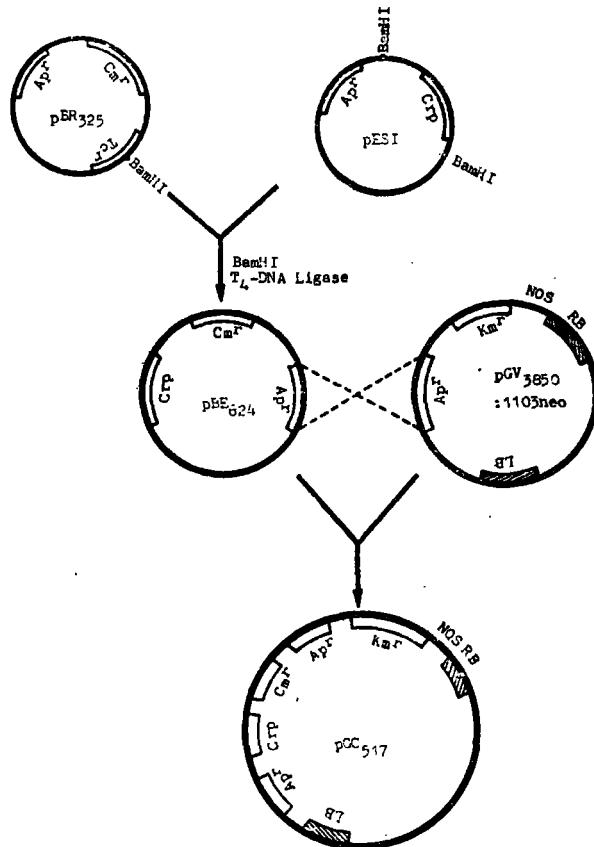


图 5 PGC517 的构建过程

Fig.5 The construction of plasmid PGC517

③ NPT II 酶活性的检测。以两种转化的有Km抗性的贡柑体胚,未转化的对照体胚、含有PGC517的农杆菌为材料,做NPT II 酶活性的检测实验,图6所示的结果显示用两种含不同质粒的农杆菌转化得到的有Km抗性的体胚都有NPT II 酶活性,表现为阳性斑点,说明NPT II 基因在体胚中已表达,在以含PGC517的农杆菌转化筛选到的有Km抗性的体胚中NPT II 基因的表达,为毒蛋白基因的整合提供了佐证。

以上三项实验,证明苏芸金杆菌的毒蛋白基因已整合到贡柑体胚的基因组中。而Nopaline检测和NPT II 酶活性的检测结果,证明PGV3850::1103neo的NPT II 基因已在贡柑体胚的细胞中表达。

本实验所用的含有毒蛋白基因的PES1质粒由美国华盛顿大学的Schnepf提供<sup>[17]</sup>,其毒蛋白基因的启动子是基因本身的启动子,在PGC517农杆菌质粒的构建过程中,没有更换启动子,当毒蛋白基因整合到贡柑体胚细胞的基因组中后,该基因本身的启动子能否在贡柑体胚细胞中启动表达,有待进一步研究。

## 2.2 人工种子包埋的实验结果

如图版-C, D, E所示,包埋后的人工种子在固体培养基上萌发,第9天统计,10粒含对照胚的人工种子有2粒萌发,10粒含毒蛋白基因的人工种子中也有2粒萌发,10粒含NPT II 基因的人工种子有1粒萌发。

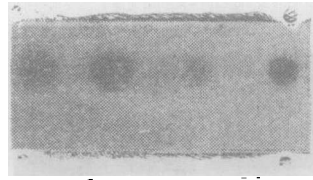


图6 NPT II 检测

Fig.6 NPT II assay

1. 农杆菌(含PGC517)
2. 未转化体胚(对照)
3. PGC517转化后有Km抗性体胚
4. PGV3850:1103neo转化后有Km抗性体胚



图版A~E

Plate A~E

A. 未转化的贡柑愈伤组织有含有Km25, 50, 100, 150, 200mg/L的MT+S8%培养中,培养20天后,黄化死亡; B. 球形胚在选择培养基上培养20天后的结果,抗性胚(箭头所示)存活,为绿色,非抗性胚黄化死亡; C. 包埋后第9天的人工种子萌发情况: 2为对照胚人工种子,2粒萌发; 4为PGV3850:1103neo转化的抗性胚人工种子,1粒萌发; 6为PGC517转化的抗性胚人工种子,2粒萌发; D. 贡柑人工种子; E. 萌发的人工种子(含PGC517转化后,有Km抗性的体胚)

## 参 考 文 献

- 1 Kurt Weising *et al.* Ann Rev Genet, 1988, 22: 421~77
- 2 Redenbaugh K *et al.* Bio/Technology, 1986, 4: 797~801
- 3 Vardi A *et al.* Scirentia Horticulturæ, 1988, 37: 217~230
- 4 Barrett H C. Fruit Var J, 1985, 39: 11~16
- 5 邹韵霞等. 中山大学学报(自然科学)论丛, 1989, 8(4): 110~117
- 6 王金发等. 中山大学学报(自然科学)论丛, 1989, 8(4): 166
- 7 许 耀等. 遗传, 1987, 9(5): 41043
- 8 彭秀玲等. 基因工程实验技术. 1987:5
- 9 RFLP Training Course Laboratory Manual pp5
- 10 蔡良琬等. 核酸研究技术(上册), 1987:p274
- 11 Lippinott B B *et al.* J Bacteriol, 1969, 97: 620~628
- 12 Martton L *et al.* Nature, 1979, 277: 129~191
- 13 邹韵霞等. 中山大学学报(自然科学)论丛, 1989, 8(4): 106
- 14 Zambrysky P *et al.* EMBO J, 1983, 2(12): 2143~50
- 15 Caplan A *et al.* Science, 1983, 222: 815~21
- 16 Zambrysky P *et al.* Genetic Engineering, Principles and Methods, 1984, 4: 253~278
- 17 Schnepf H E *et al.* Proc Natl Acad Sci USA, 1981, 28(5): 2893~2897

## The Transformation and Production of Artificial Seeds in Somatic Embryos of *Citrus reticulata*

Yu Yanhua Guo Huishan Zou Yunxia Li Baojian

**Abstract** A transformation system was first established by cocultivation of *Citrus* embryonic calli with two kinds of *Ajrobacterium turnefaciens* harboring the reconstructed plasmids, PGV3850:1103neo and PGV517, respectively. On the MS based medium containing 4mg/L GA<sub>3</sub>, 500mg/L Cef (Cefazolium naticum) and 50mg/L Km(kanamycin), Kanamycin-resistant transgenic embryonic calli and somatic embryos were selected. Through DNA/DNA molecular hybridization, Nopaline assay and NPT II assay, it is certain that the Nos/Npt gene in T-DNA was transferred into the somatic embryos of *Citrus reticulata* Blanco cv. yu dong, and expressed in the transformed embryos, and the toxic protein gene of *Bacillus thuringiensis* was transferred into the somatic embryos. It is the first example of introducing foreign gene into *Citrus*. Artificial seeds were formed by encapsulating the transgenic embryos resistant to Km(100μg/ml) with 3%(w/v) sodium alginate. Up today, 2 of the artificial seeds have already germinated.

**Keywords** transformation, foreign gene, embryonic calli, artificial seeds, *Citrus reticulata* Blanco cv. yu dong

\* Biotechnology Research Center