

# 转化脂介导小麦原生质体转化及转基因白化苗的再生

朱 祯 孙宝林 刘春明 肖桂芳 李向辉

(中国科学院遗传研究所, 北京 100101)

应用转化脂(Lipofectin)介导转化技术成功地将含有潮霉素磷酸转移酶(Hygromycin phosphotransferase, Hpt)基因的E.coli质粒pCGN1055导入到了小麦(徐州211)原生质体内,并由此获得了转化愈伤组织。根据Hpt抗性及DNA分子杂交证实转化频率高达6.0—8.8%,在分化培养基上转化愈伤组织再生出了白化植株,通过Southern杂交和酶活性检测证明外源Hpt基因存在于转化植株(白化苗)内,并进行了有效的表达。

**关键词** 小麦原生质体; 潮霉素磷酸转移酶基因; 植株再生; 基因表达

通过基因工程的方式将外源基因导入植物细胞内,由此使后代植株发生永久性的遗传变异,已成为当前植物遗传育种的一个发展趋势。通常适用于双子叶植物的根农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)-Ti质粒载体系统难于有效地转化禾本科作物,因此不得不采取其它转化的方式。目前普遍采用基因枪(Particle gun)<sup>[1]</sup>及电激法(Electroporation)<sup>[2]</sup>对禾本科植物进行转化,并已获得了转化玉米及水稻植株。我们发展了一种高效的转化方法——转化脂(Lipofectin)介导转化技术,成功地转化了水稻原生质体<sup>[3]</sup>,并获得了转基因水稻植株<sup>[4]</sup>。此方法具有反应条件温和、转化频率高等特点<sup>[5]</sup>。

由于小麦转化及再生系统的相对不成熟,至今尚未见到获得小麦转化植株的正式报道(Vasil实验室已获得了转基因小麦植株,但未见正式研究论文)。目前这方面的研究工作大部分局限于外源基因在小麦原生质体内的瞬时表达的研究<sup>[5]</sup>,获得的稳定转化子也仅仅停留在转化愈伤组织阶段<sup>[6]</sup>。

小麦原生质体再生植株技术业已在实验室建立<sup>[7]</sup>,在此基础上我们使用转化脂

介导法技术栽培小麦品种徐州211的原生质体进行了转化。

## 材料与方 法

### (一) 质粒及质粒的纯化

E.coli质粒pCGN1055来源于Dr.L. Comai(Calgene Inc, Davis, CA, USA)。其含有植物表达的潮霉素(Hygromycin, Hyg)磷酸转移酶基因(参见图1),质粒的纯化按Maniatis等人<sup>[8]</sup>的方法进行。

### (二) 小麦细胞悬浮系的建立及原生质体的分离

用于建立细胞悬浮系的愈伤组织来源于小麦(徐州211)成熟种子,悬浮培养6—7周后可建立起用于分离原生质体的细胞悬浮系,悬浮系的建立以及原生质体分离的详细过程参见孙宝林等人的方法<sup>[9]</sup>。

### (三) 转化脂介导转化小麦原生质体

除小麦原生质体悬浮在改良的MS培养基内外,操作过程与朱祯等人<sup>[4]</sup>描述的方法相同,转化脂(Lipofectin™ Reagent)购自BRL公司,转化处理过的原生

本文于1992年8月5日收到。

质体最终悬浮在改良的MS培养基内<sup>[9]</sup>。

#### (四) 原生质体的培养及抗性克隆的筛选

原生质体的培养采用琼脂糖珠法<sup>[8]</sup>, 自始至终使用改良的MS培养基。一周后更换新的液体培养基并加入20 $\mu$ g/ml的潮霉素(Hyg)进行筛选, 每2周左右更换新鲜的选择培养基, 每次葡萄糖浓度递减0.05mol/L。具体条件参见文献[3,4]。筛选出的转化愈伤可于含有抗菌素的MS增殖培养基<sup>[9]</sup>上进行继代培养或直接进行分化实验。潮霉素抗性克隆(Hyg<sup>r</sup>)比例及转化频率的计算参见文献[3]。

#### (五) 转化愈伤组织的分化

当转化愈伤生长至直径1mm时, 转移到分化培养基<sup>[9]</sup>(Kinetin 2.5 $\mu$ g/ml, 6-BA 0.5 $\mu$ g/ml, Hygromycin 20 $\mu$ g/ml)上进行植株再生, 培养条件为25 $^{\circ}$ C, 16/8h光暗周期(2000lx)。

#### (六) Hpt酶活性分析

实验按Datta等人的方法<sup>[10]</sup>进行, 薄层层析板(PEI-cellulose F TLC plate)购自美国Merck公司。

#### (七) 植物DNA的分离及分子杂交

从植物组织中分离DNA按Zolan等人的方法<sup>[11]</sup>进行, 并经一次CsCl-EtBr超离心纯化。DNA条带杂交(Slot Blot)按Bio-Rad公司提供的方法进行。Southern blot过程按Southern程序<sup>[12]</sup>进行, 采用BRL公司提供的随机引物(Random Primer)方法标记杂交探针。

## 结果与讨论

#### (一) 转化细胞的培养和筛选

建立分散性好、生长旺盛、具有分化潜能的小麦细胞悬浮系, 是成功培养转化原生质体的关键。先期实验表明, 实验中

使用的细胞悬浮系具有上述特点, 由此分离的原生质体已成功地再生出了正常植株<sup>[7,9]</sup>。

使用同一细胞悬浮系分离原生质体用于转化实验, 经转化处理的原生质体培养一周左右, 当第一次细胞分裂出现时开始用抗菌素(Hyg 20 $\mu$ g/ml)对转化子进行筛选。10天左右转化细胞进行了第二次分裂, 两个星期左右即可形成抗性小细胞团。在选择条件下总共培养5周后, 转化实验组内即可形成大量肉眼可见的抗性小愈伤组织, 而作为对照的非转化实验组内, 细胞的生长受到了明显的抑制。两次实验结果表明潮霉素抗性(Hyg<sup>r</sup>)克隆所占比例分别为6.0%和8.8%。抗性愈伤组织可在选择固体培养基(MS增殖培养基)上连续继代培养。

#### (二) 转化克隆的鉴定

随机筛选23个Hyg<sup>r</sup>克隆, 用以分离DNA, 使用Hpt结构基因序列(pCGN 1055/EamHI小片段, 1.08kb, 参见图1)为探针进行DNA分子杂交(Slot blot), 结果证实所有被检样品均呈现出很强的杂交信号, 而作为对照的非转化组织的DNA样品不能与探针杂交(图片略), 上述结果说明以Hyg(20 $\mu$ g/ml)筛选小麦转化细胞克隆是相当有效的, Hyg<sup>r</sup>克隆即可被视为转化克隆, Hyg<sup>r</sup>产生频率即可视为转化频率。在Hyg<sup>r</sup>克隆内不存在假阳性转化子, 这与使用Npt-II基因作选择标记转化水稻原生质体时所得结果有相当大的差异, 从后者实验中得到的卡那霉素抗性(Km<sup>r</sup>)克隆当中含有大量的假阳性转化子, 同样的受体细胞而使用Hpt基因作选择标记时则不存在上述现象<sup>[3]</sup>。综上所述使用Hpt基因而不是Npt-II基因作为转化的选择标记, 在禾本科植物的转化实验中可能更为有效。

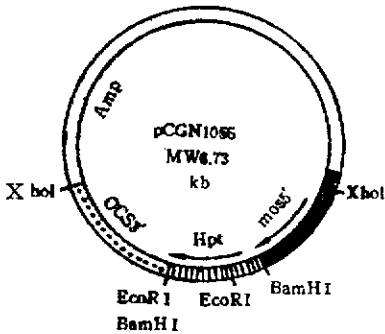


图 1 *E. coli* 质粒 pCGN1055 图谱

Fig. 1 The map of pCGN1055

□—pACY184 sequence, ■—5' region (1.48kb) of mannopine synthetase gene (mas) from T-DNA of pTiAs, ▨—Hygromycin phosphotransferase (Hpt) gene (1.08kb), ▩—The sequence of Poly (A) Signal from 3'-end of octopine synthetase (1.68kb)

### (三) 转化愈伤组织的植株再生

转化愈伤在分化培养基内培养 2 周左右, 几乎所有用于分化的材料都可以再生出芽, 4 周左右再生芽可长至 4—5 cm。继续培养 1—2 周, 部分再生芽可分化出根(图版 I-1)。不幸的是所有再生苗均是白化体, 将白化苗连同少量愈伤一同转移至新的分化培养基内, 再生苗可连续继代培养。

### (四) 转化植株的分子和酶学鉴定

对再生苗进行 Hpt 酶活性分析证实, 来源于 4 个独立转化再生苗的组织抽提物内均含有 Hpt 酶的活性, 而对照组未显示出任何活性(图版 I-2)。上述结果表明外源基因存在于转化组织内并进行了表达。从上述 4 个克隆分离出的 DNA 经 XhoI 酶解后进行琼脂糖电泳及 Southern 转移, 使

用 Hpt 基因序列(pCGN1055/BamHI 小片段, 1.08kb)作杂交探针进行 DNA 分子杂交, 结果表明在 4.24kb 位置上均显示出了杂交条带(图版 I-3), 这与预期出现的位置是相符的(见图 1), 而对照样品(来源于非转化组织)未显示出任何杂交信号(图版 I-3)。上述结果再次证明外源 Hpt 基因存在于转化组织的基因组内, 并且未观察到可见的分子重排现象。

### (五) 白化苗产生的原因

前期研究, 我们完成了从原生质体再生出正常小麦植株的工作<sup>[7-9]</sup>, 在这个实验中虽然使用了同一来源的细胞悬浮系, 但所获得的转化再生苗均为白化体。我们认为产生白化苗的原因, 是由于用于分离原生质体的细胞悬浮系培养时间过长(14 个月)造成的, 在前一个实验中所使用的细胞悬浮系在当时是新建立的(6 个月)。在进行本实验的同时, 我们还进行了小麦抗盐基因的转化工作, 实验使用的原生质体来自同一细胞悬浮系, 所得到的再生苗也是白化体(未发表结果)。综上所述, 为了得到正常的小麦转化植株, 使用新建立的细胞悬浮系是必要的。

使用转化脂(lipofectin)介导技术转化水稻原生质体已获得了成功, 转化频率分布在 10%—14% 之间<sup>[3,4]</sup>。本项研究再次证明, 此法对小麦原生质体的转化也是同样适用的。除了转化频率高的优点外, 转化脂介导法还具有反应条件温和, DNA 用量少及不需要特殊仪器的优点, 我们认为此法是一种较有发展前途的植物转化技术。

### 参 考 文 献

- [1] Gordon—Kamm, W.J. et al.: *Plant Cell*, 2: 603—618, 1990.
- [2] Shimamoto, K. et al.: *Nature*, 338: 274—276, 1989.
- [3] Zhu, Z. et al.: *Focus*, 12: 41—44, 1990.
- [4] 朱 斌等, 中国科学(B辑), 第二期, 149—155, 1990.

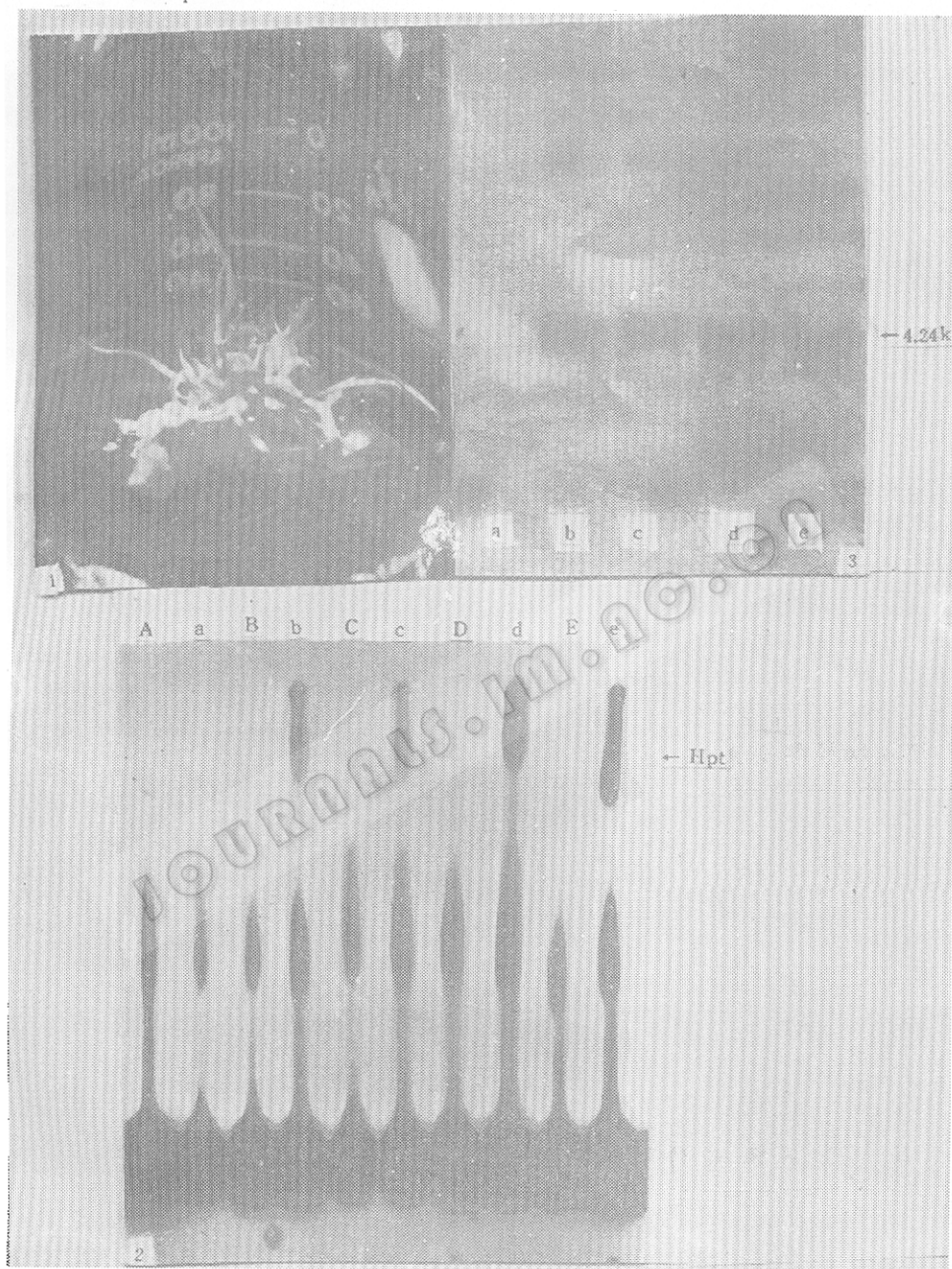
- [5] Brown, C. et al., *Progressing Plant Protoplast Research*, Kluwar Academic Publishers, pp.371—372, 1988.
- [6] Vasil, V. et al., *Bio/technology*, 9: 743—747, 1991.
- [7] 王海波等, 中国科学 (B辑), 第八期, 828—834, 1989.
- [8] Maniatis, T. et al., *Molecnlar Cloning: A laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, 1982.
- [9] 孙宝林等, 生物工程学报, 6(2): 116—119, 1990.
- [10] Datta, S. K. et al., *Bio/technology*, 8: 736—740, 1990.
- [11] Zolan, T. M. E. & Pukkila, P. J., *Mol. Cell Biol.* 6: 195—200, 1979.
- [12] Southern, E. N. J., *Mol. Biol.* 98: 503—517, 1975.

## Lipofectin Mediated Transformation of Wheat Protoplasts and Regeneration of Transgenic Albino Plantlets

Zhu Zhen Sun Baolin Liu Chunming Xiao Guifang Li Xianghui  
(Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing 100101)

*E. coli* plasmid pCGN1055 containing hygromycin phosphotransferase (Hpt) gene under control of plant expression promoter was introduced into wheat protoplasts by lipofectin-mediated transformation, and transgenic albino plantlets were obtained, which were confirmed by assay of Hpt activity and Southern blot. The transformation frequencies were 6.0% and 8.8% according to hygromycin resistance and DNA molecular hybridization (Dotblot). The results indicated the foreign gene existed and expressed in transgenic plantlets.

**Key words:** Wheat (*Triticum aestivum* L.); protoplast; Hpt gene; plantlet regeneration; gene expression



1. The regeneration of albino transgenic plants; Albino plantlets were regenerated with roots after six weeks culture on differentiation medium.
2. Hprt Enzyme Assay for Transgenic plants; lanes B—e contain crude protein extract derived from the four transformed regeneration wheat plants, lanes A and a contain extract isolated from an untransformed wheat plant. Small letters represent enzyme reaction mixtures containing Hygromycin B. Capital letter represent reactions carried out without Hygromycin B. The autoradiogram of the TLC plate shows labelled hygromycin B in lanes b, c, d and e.
3. Result of Southern blot; DNAs come from transformed plants (b, c, d and e) and untransformed plant as control (a), 10 $\mu$ g DNA digested by restriction enzyme XhoI were added per well; and then DNA restriction fragments were separated in a 0.8% agarose gel and transferred to nylon membrane, hybrid probe come from 1.08kb fragment of pCGN1055/BamHI, which contain Hpt coding sequence.