

几种玉米基因转移技术的研究及转基因植株的获得

王国英 张宏 丁群星 戴景瑞 谢友菊

(北京农业大学生物学院 北京 100094)

摘要 用基因枪、超声波和子房注射法转化玉米,所用质粒 pB48.415 带有 3'端截短的 Bt 毒蛋白基因和潮霉素磷酸转移酶 (hpt) 基因。用基因枪轰击玉米胚性愈伤组织和幼胚,超声波处理玉米胚性愈伤组织,用自制的微玻针注射授粉后 10~20h 的玉米子房,均已成功地获得了转 Bt 基因的玉米植株。点杂交和 Southern 吸印杂交的结果都证明在转基因玉米植株中存在 Bt 毒蛋白基因。

关键词 玉米, 转化, 基因枪, 超声波, 子房注射, Bt 基因

植物基因转移技术的研究不仅具有重要的理论意义,而且具有巨大的应用前景。Fromm 等 1986 年首次用电击法转化玉米原生质体,获得了转化愈伤组织^[1]。Rhodes 等 1988 年首次获得了转基因玉米植株,但这些植株都是不育的^[2]。自从 1987 年康乃尔大学的 Sanford 等人用基因枪转化洋葱表皮细胞取得成功,这一技术很快被用于玉米、大豆、水稻和小麦等重要作物的遗传转化。近几年来,国外已成功地将基因枪轰击法把 hpt 基因、bar 基因和 unidA 基因^[3]、荧光素酶基因^[4]和 Bt 毒蛋白基因^[5]等转入玉米,并得到了可育的转基因植株。我们实验室于 1988 年开始进行玉米遗传转化研究,在原生质体转化获得抗性愈伤组织^[6]的基础上,近年来用基因枪轰击法、超声波处理和子房注射法等转化玉米,均获得了转基因植株及后代,本文将介绍这些实验结果。

1 材料与方 法

1.1 质粒的结构和制备

本研究所用的质粒为 pB48.415,它带有 3'端截短的 Bt 毒蛋白基因和潮霉素磷酸转移酶 (hpt) 基因^[7]。质粒的分离用碱性裂解法,纯化用 PEG 法。

1.2 植物材料的准备

基因枪轰击和超声波处理所用玉米幼胚为授粉后 10~12d 剥离的未成熟胚。在含 2~4mg/L 2,4-D 的 N6 固体培养基上诱导胚性愈伤组织。选发育良好、色泽正常的胚性愈伤组织在同样培养基上继代和保存,该愈伤组织也可作基因枪轰击和超声波转化的受体材料。子房注射所用材料为自交系 P136、P138 和单交种农大 60,授粉后 10~20h 注射。

1.3 基因转化方法

1.3.1 基因枪轰击法:用我国自行研制的火药弹基因枪 JQ-700。将悬浮培养细胞、幼胚

本研究受 863 项目基金资助。
本文于 1994 年 6 月 15 日收到。

或愈伤组织放入直径 6cm 的培养皿中 (含有 N6 固体培养基), 用包裹质粒 DNA 的钨弹进行轰击, 每皿轰击一次⁽⁶⁾。基因枪轰击时玉米材料到微弹出射点间的距离分别为 7cm 和 10cm, 微弹的速度为 450m/s (H) 和 400m/s (L)。轰击后的玉米材料转入含 25 μ g/ml 潮霉素 B 的 N6 培养基上进行选择。以后每 2~3 周转移一次, 选择抗性愈伤组织。

1.3.2 超声波处理法: 在直径 35mm 的无菌超声小室中加入 2ml 超声缓冲液⁽⁹⁾, 然后放入 50~60 个玉米幼胚或愈伤组织, 用声强为 0.5~2W/cm² 的超声波处理 10~45min。然后将玉米材料转移到含有 2, 4-D 的 N6 培养基上培养或含潮霉素的 N6 培养基上选择。

1.3.3 子房注射法: 用自制的微玻针注射授粉后 10~20h 的玉米子房, 每个子房注射 DNA 缓冲液约 3 μ l 左右⁽⁷⁾。注射后在注射区涂上凡士林, 重新套袋隔离至种子成熟。

1.4 植株的再生和移栽

经过选择的抗性愈伤组织转入高糖培养基 (N6⁺, 50g/L 蔗糖) 诱导胚状体的形成。胚状体在不含激素的 N6 培养基上萌发, 形成幼苗。选根系发育良好, 生长健壮的幼苗移入小花盆中, 用塑料袋包裹保湿。锻炼两周后将植株移入大花盆中。子房注射后所得到的种子直接在大花盆中播种。

1.5 植物 DNA 的提取和杂交

植物 DNA 的提取用 CTAB 法⁽¹⁰⁾。质粒经 EcoR I 酶切、电泳回收 1.2kb (含部分 Bt 基因) 片段作为探针, 用随机引物法标记。酶切、电泳、转移和杂交均按常规方法进行。

2 试验结果

2.1 基因枪转化

用基因枪分别轰击玉米悬浮细胞系、愈伤组织和幼胚, 经过潮霉素抗性筛选均获得了抗性愈伤组织 (表 1)。结果表明, 用悬浮细胞系作受体转化率最高, 愈伤组织次之, 幼胚最差。但由于所用悬浮细胞系已失去分化能力, 所以未得到转化植株。相反, 愈伤组织和幼胚虽然转化效率较低, 但均得到了转化植株。

表 1 基因枪轰击不同受体材料的转化效果

Table 1 The transformation of various cell types after bombardment

Target cell types	Dishes of bombardment	Number of transformants	Mean number of transformants*	Regeneration
Cell suspension	7	15	2.1	No
Embryogenic calli	21	27	1.3	Yes
Immature embryos	15	5	0.3	Yes

*: The calli resistant to hygromycin B after 6 months of selection were designated as transformants. The Dot blotting and Southern hybridization analysis on some of the resistant calli showed that all of them contained a fragment from Bt gene.

通过 GUS 基因短暂表达研究, 我们探讨了基因枪轰击玉米的一些基本参数, 如样品室真空度、微弹速度、样品与微弹出射点之间的距离、微弹大小和上样量、DNA 浓度等, 找到了较适合的轰击条件 (另文发表)。从表 2 的结果可以看出, 微弹速度和样品与微弹出射点之间的距离对玉米的稳定转化有很大影响。当距离为 7cm 时, 微弹速度 400m/s 的转化效率较高, 平均每皿可得到 0.47 个转化体; 而当距离为 10cm 时, 则微弹速度为 450m/s 的转化效率较高, 平均每皿可得到 0.58 个转化体。

表 2 基因枪微弹速度和距离对转化率的影响

Table 2 Effect of microprojectile velocity and sample distance on maize transformation efficiency

Bombardment parameters ^a	Number of dishes bombarded	Number of calli resistant to hygromycin	Mean number of resistant calli per dish
7H	14	2	0.14
7L	96	45	0.47
10H	36	21	0.58
10L	15	4	0.27

^a The numbers represent the distance between the stop screen and samples (cm). The Letters represent microprojectile velocity, H-450m/s, L-400m/s.

2.2 超声波转化

超声波转化法被用来处理玉米未成熟幼胚和胚性愈伤组织都获得成功。现将在不同声强和作用时间处理后玉米愈伤组织的转化结果列于表 3。结果表明, 超声强度和作用时间对玉米愈伤组织的转化均有较大影响。在声强为 $0.5\text{W}/\text{cm}^2$ 时处理 30min 相对转化率达 15.3%; 而处理 10min 相对转化率只有 0.3%。在声强为 $0.75\text{W}/\text{cm}^2$ 的条件下不同处理均可得到较多的抗性愈伤。而将声强提高到 $2.0\text{W}/\text{cm}^2$ 则不能得到成活的抗性愈伤。

表 3 超声波声强和作用时间对愈伤组织转化的影响

Table 3 Effects of the intensity and duration of ultrasonication on transformation frequency

Acoustic intensity / $\text{W} \cdot \text{cm}^{-2}$	Time/min	Number of calli	Number of calli resistant to hygromycin	Percent of resistant calli ⁽¹⁾ / %	Transformation frequency ⁽²⁾ / %
0.5	10	149	1	0.7	0.3
	30	138	47	34.1	15.3
	40	112	31	27.7	12.5
0.75	15	157	44	28.0	12.6
	30	104	21	20.0	9.0
	40	126	27	21.4	9.6
1.0	15	117	29	24.8	11.2
	30	103	8	7.8	3.5
	40	122	2	1.6	0.7
2.0	20	113	(³)	—	—
	30	84	0	0	0
	45	79	0	0	0

⁽¹⁾ The ratios of calli resistant to hygromycin after 6 months of selection in the ultrasonicated calli. ⁽²⁾ 45% of the resistant calli assayed by PCR contained a fragment from Bt gene, therefore the transformation frequency was calculated by the percentage of resistant calli \times 45%. ⁽³⁾ R represents contamination.

2.3 子房注射法

用微玻针直接将质粒 DNA 溶液注射到授粉后 10~20h 的玉米子房, 也获得了转 Bt 基因植株 (表 4)。

表 4 玉米子房注射转化频率统计表

Table 4 Transformation frequency of maize after ovary injection

Date	Number of ovary injected	Number of seedlings analysed	Number of plants transformed	Transformation frequency ^a
1991.7	8640	136	1	1.16×10^{-4}
1992.1	10000	3	1	1.0×10^{-4}
1992.7	2000	224	3	1.5×10^{-3}

^a The transformation frequency was designated as the percentage of transformed plants in the ovaries injected.

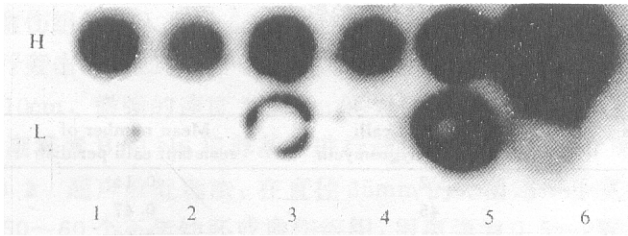


图1 基因枪轰击法获得的部分转基因植株点杂交分析
Fig. 1 Dot blotting analysis on some of the transgenic maize plants derived from microprojectile-bombarded calli

H6, plasmid DNA; L1~L2, DNA from untransformed plants; H1~H5, L3~L6, DNA from resistant calli-derived plants.

3 讨论

早期的玉米遗传转化研究主要用原生质体培养系统。从BMS玉米悬浮细胞系分离原生质体,已建立了适于玉米转化的电击法^[1]、PEG介导法^[11]等转化体系。但由于玉米原生质体培养再生困难,到目前为止仅有一例通过原生质体转化获得转基因植株的报道^[2]。自从基因枪应用以后,玉米的遗传转化研究得到了较快的发展,国外几个不同实验室先后获得了转基因植株^[3~5]。我们用国产的火药弹基因枪成功地建立了玉米的基因枪转化系统,把Bt毒蛋白基因转入国内

常用的玉米材料,并从转化幼胚和愈伤组织再生出转基因植株。本文通过稳定转化愈伤组织块数的统计,认为在基因枪转化中微弹速度和距离之间的组合是十分重要的。如当微弹出射点与轰击玉米愈伤组织之间的距离为7cm时,较低微弹速度(400m/s)转化效率高;而当距离为10cm时,则微弹速度450m/s转化效率较高。超声波处理是近年来才发展起来的一种植物基因转移新方法。我们首次把这一方法用于转化玉米的幼胚和愈伤组织,取得了成功(表2)。超声转化的主要原理是利用超声波在溶液中产生的空化作用(Cavitation),这种作用产生的局部高温、高压和较大的切应力使空泡周围细胞的细胞壁和质膜出现可逆性的孔洞或质膜透性改变,从而使外源DNA进入细胞。在声强较低时,随着超声处理时间的延长玉米愈伤组织的转化率提高。但若超声强度过高或处理时间过长,不仅会损伤植物细胞和组织,而且会使DNA分子断裂(数据未列),从而使玉

2.4 转化愈伤组织和植株分析

转化的玉米愈伤组织和植株分别经过点杂交和Southern吸印杂交,证明Bt毒蛋白基因已插入植物染色体组(图1,2)。对部分转基因植株后代的分析表明,转入的Bt基因可以通过有性生殖传递给后代(资料略)。



图2 基因枪轰击法获得的部分转基因植株 Southern 杂交分析

Fig. 2 Southern blotting analysis on some of the transgenic maize plants derived from microprojectile-bombarded calli

Lane 1~5, DNA from resistant calli-derived plants, lane 6, DNA from untransformed maize plants, lane 7, plasmid DNA.

米转化率大大降低(表 3)。

用自制的微玻针注射玉米子房, 在种子萌发形成的幼苗中选出转基因植株。这种方法简便、易行, 不需要组培条件, 可把目的基因转入任何玉米自交系。若能熟练注射技术并准确把握合适的注射位置和深度, 将可能进一步提高转化频率。

总之, 用以上三种方法转化玉米各有特点。基因枪转化操作简便, 效果稳定, 但设备和消耗品较贵。超声波处理虽然转化效率较高, 但操作较繁琐, 材料易污染, 载体 DNA 分子易断裂。子房注射法虽简便易行, 但必须在田间操作, 且只能在生长季进行。

致谢: 本研究所用质粒 pB48. 415 是由中国科学院微生物研究所田颖川和莽克强先生提供的, 在超声仪使用方面得到清华大学许宁和赵南明先生的协助, 特此致谢。

参 考 文 献

- [1] Fromm M E, Taylor L P, Walbot V. *Nature*, 1986, 319: 791~793.
- [2] Rhodes C A, Pierce D A, Mettler I J *et al.* *Science*, 1988, 240: 204~207.
- [3] Spencer T M, O'Brien J V, Start W G *et al.* *Plant Mol Biol*, 1992, 18: 201~210.
- [4] From M E, Morrish F, Armstrong C *et al.* *Bio/Technology*, 1990, 8: 833~839.
- [5] Koziel M G, Beland G L, Bowman C *et al.* *Bio/Technology*, 1993, 11: 194~200.
- [6] 丁群星, 何庆芳, 赛吉庆等. *中国科学 (B 辑)*, 1992, 22: 142~148.
- [7] 丁群星, 谢友菊, 戴景瑞等. *中国科学 (B 辑)*, 1993, 23: 707~713.
- [8] 王国英, 谢友菊, 米景九等. *中国科学 (B 辑)*, 1995, 25: 71~76.
- [9] Zhang H, Xie Y J, Dai J R *et al.* In: You C B, Chen Z. (eds.) *Agricultural Biotechnology Beijing, China Science and Technology Press*, 1992, p311~312.
- [10] Doyle J J, Doyle J L, Hortorium B L H. *Focus*, 1990, 12: 13~15.
- [11] Maas C, Werr W. *Plant Cell Rep*, 1989, 8: 148~151.

Studies on Three Maize Gene Transfer Techniques

Wang Gouying Zhang Hong Ding Qunxing Dai Jingrui Xie Youju

(Beijing Agricultural University, Beijing 100094)

Abstract Studies on maize transformation have been carried out through bombarding by particle gun, ultrasonication in a DNA buffer or ovary injecting by a self-made microinjector. The plasmid pB48. 415, which carries a 3'-end truncated Bt-toxin protein gene and a hygromycin phosphotransferase (hpt) gene, was used in the transformation. Transgenic maize plants were obtained from immature embryos and embryogenic calli bombarded with particle gun, embryogenic calli ultrasonicated under different conditions or ovaries injected after 10~20h of pollination. The results of Dot blotting and Southern blotting analysis certified the integration of Bt gene into maize genome.

Key words Maize, transformation, particle gun, ultrasonication, ovary injection, Bt gene



1. Selection of immature embryos on medium containing 25mg/L hygromycin B after microprojectile bombardment,
2. Regeneration of resistant calli,
3. Resistant calli-derived plantlets in N6 medium,
4. Transplantation of resistant calli-derived plant into small pots,
5. Transgenic maize plants with tassel ear.