

# 利用 *gus* 基因瞬时表达探讨菊花叶盘基因枪转化参数

孙 磊, 张启翔\*

(北京林业大学 园林学院 国家花卉工程技术研究中心, 北京 100083)

**摘要:** 为了将基因枪转化方法应用于菊花的遗传改良和品种选育, 以 *gus* 基因为报告基因, 利用基因枪方法将其转入菊花外植体内, 通过检测 *gus* 基因在菊花叶盘中的瞬时表达情况, 分析了轰击距离、氦气压力、金粉用量、质粒 DNA 浓度、轰击后培养时间、轰击次数等参数对 *gus* 瞬时表达的影响。结果表明, 以幼嫩叶片为受体材料, 在射程为 6 cm、氦气压力为  $7.584 \times 10^6$  Pa、每枪金粉用量为 400  $\mu$ g、质粒 DNA 用量为 3  $\mu$ g、轰击 2 次的条件下, 2d 后可检测 *gus* 基因的最佳表达活性和最高瞬时表达率。

**关键词:** 菊花; 基因枪; *gus* 基因; 瞬时表达

中图分类号: S682.1<sup>+</sup>1 文献标识码: A 文章编号: 1004-3268(2007)11-0081-04

## Studies on the Transformation Parameters of Leaf Disc of Chrysanthemum in Virtue of Transient Expression of *Gus* Gene by Particle Bombardment

SUN Lei, ZHANG Qi-xiang\*

(National Flower Engineering Technology Research Center, College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083, China)

**Abstract:** In order to apply particle bombardment to the genetic improvement and variety breeding of chrysanthemum, *gus* gene was used as report gene, then transformed into the explants of chrysanthemum by particle bombardment. The transient expression of *gus* gene in the leaf discs of chrysanthemum were examined to analyze the effects of shoot distance, helium pressure, gold particle amount, plasmid DNA concentration, culture-resuming time and bombarding frequency on the expression of *gus* gene. The results showed that, in the conditions of 6 cm shoot distance,  $7.584 \times 10^6$  Pa helium pressure, 400  $\mu$ g gold particle per shoot, 3  $\mu$ g plasmid DNA and bombarding for 2 times, the most active transient expression of *gus* gene could be detected two days after particle bombardment. The transient expression of *gus* gene was also effected by bombarding frequency.

**Key words:** Chrysanthemum; Particle bombardment; *Gus* gene; Transient expression

菊花是全世界著名的观赏花卉之一。多年来常规育种方法在菊花育种中取得了巨大成就, 但菊花的遗传背景复杂, 在传统育种中受到基因资源和远源杂交障碍等不利因素的限制。植物基因工程技术尤其是植物转基因技术的发展为菊花的品种选育和种质创新开辟了新的途径。通过现代遗传转化技术

与传统的育种手段相结合, 不仅可以增加植物的种质库资源, 而且还能改变植物的观赏性状<sup>[1]</sup>。已证明基因枪方法比原生质体电穿孔方法更成功、更简单。从基因枪射出的微弹头实际上能携带基因穿透各种类型细胞壁和细胞膜, 直接进入染色体中, 减少了生物降解的环节, 提高了转化频率。基因枪转

收稿日期: 2007-07-11

基金项目: 教育部博士点基金项目(20040022022); 科技部国家转基因专项(JY03-B-28)

作者简介: 孙 磊(1981-), 男, 湖北恩施人, 在读博士研究生, 研究方向: 园林植物遗传育种。

通讯作者: 张启翔(1956-), 男, 湖北黄冈人, 教授, 主要从事园林植物遗传育种研究。

化技术具有简单、快捷的优点已成为一种常规的转化手段,广泛应用于多种植物的遗传转化<sup>[3]</sup>。在玉米、水稻、棉花等农作物中相继获得了转基因植株<sup>[3~6]</sup>。虽然基因枪的问世使得许多过去认为不能转化的植物获得了成功,但是基因枪转化原理决定了其转化效率受多种因素诸如微粒的直径、飞行速度、外植体细胞的结构、细胞的生理状态等影响。不同植物受体组织的类型以及结构等都存在差异,因此不同的组织类型需要不同的轰击参数,只有在合适的轰击参数下才能获得较高的转化效率。本试验利用 *gus* 基因探讨了基因枪法转化菊花的可行性,比较了不同轰击距离、进气压力、金粉用量、质粒 DNA 浓度、轰击次数等的转化效果,并检测 *gus* 基因的瞬时表达情况,为建立菊花转化体系和转基因育种奠定基础。

1 材料和方法

1.1 材料

试验选用的地被菊品种北林黄茎尖取自北京林业大学胖龙温室,用自来水冲 10~15 min, 70%乙醇浸泡 20~30 s, 0.1%升汞消毒 3.5 min, 无菌水洗 3~4 次,接种于 1/2MS 培养基上诱导茎尖腋芽萌发。20 d 后接种无菌茎段于生根培养基获得无菌苗。取 20~25 d 无菌苗中上部生长健壮,均匀一致的幼嫩叶片为受体材料。预培养基为 MS+6-BA 1.5 mg/L + NAA 0.6 mg/L + 蔗糖 30% + 琼脂 0.55%, 共培养基为 MS+ NAA 0.6 mg/L + 蔗糖 30% + 琼脂 0.55%, pH 5.4, 植物表达载体 pBI121 含有 *gus* 基因,以 CaMV 35S 启动子引导表达,带有 NPTII 选择标记,该质粒由北京林业大学园林植物实验室吕晋惠博士提供。

1.2 主要仪器与试剂

美国 Bio-Rad PDS1000/He 基因枪、蛋白胨、酵母提取物购自 Oxoid 公司; kan (卡那霉素)、carb (羧苄青霉素)、cef (头孢霉素)均购自北京鼎国公司; 其他试剂为国产分析纯, 购自北京生化试剂公司。

1.3 方法

1.3.1 微弹的制备 在 50 μL 金粉悬浮液中(金粉直径 1 μm, 浓度 30 mg/L)依次加入 5 μL 纯化的质粒 DNA (1 μg/μL), 50 μL 2.5 mol/L CaCl<sub>2</sub>, 20 μL 0.1 mol/L 亚精胺, 涡旋 2~3 min, 冰上静置 1 min, 14 000 r/min 离心 20 s, 去上清液, 加 140 μL 70%乙醇清洗, 14 000 r/min 离心 20 s, 去上清液, 再加 100%无水乙醇清洗, 14 000 r/min 离心 20 s, 去上清液, 最后加 48 μL 无水乙醇, 混匀, 用于轰击。

1.3.2 受体材料的准备 取 20~25 d 无菌苗中上

部生长健壮, 均匀一致的幼嫩叶片剪成 0.5 cm × 0.5 cm 大小的叶盘接种到 90 mm 培养皿上, 每个培养皿接种 30 片, 预培养 2 d 用于轰击。

1.3.3 轰击参数的设定 利用 Bio-Rad PDS1000/He 基因枪, 每枪金粉用量分别为 100, 200, 300, 400, 500 μg 等 5 个梯度, 每枪质粒 DNA 用量分别为 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 4, 4.5, 5 μg 等 10 个梯度, 分别设置压力为 6.205 × 10<sup>6</sup> Pa, 7.584 × 10<sup>6</sup> Pa, 8.963 × 10<sup>6</sup> Pa, 10.342 × 10<sup>6</sup> Pa, 轰击距离分别为 3, 6, 9, 12 cm, 轰击次数为 1~3 次。每种处理重复 3 次。按仪器说明书对样品进行微弹轰击, 以未包裹 DNA 的金粉粒轰击样品为阳性对照, 未轰击的样品为阴性对照, 轰击后 25 °C 下, 暗培养 1~10 d, 每天取一部分叶片进行组织化学染色。

1.3.4 *gus* 基因瞬时表达的检测 转化组织的 *gus* 活性的检测参照 Jefferson 的方法<sup>[7]</sup>。染色步骤: (1)剪取样品, 将染液加入至淹没样品为止。(2)真空抽气 5 min, 37 °C 温浴 8 h。(3)先以 20%乙醇清洗样品 20 min, 再以 50%乙醇清洗 30 min。(4)用含 80%乙醇 FAA 固定液, 脱色, 脱至白色, 统计蓝色斑点数量和转化率。

2 结果与分析

2.1 轰击距离对 *gus* 基因瞬时表达的影响

不同的轰击距离对菊花叶片 *gus* 基因瞬时表达的影响见表 1。表 1 结果显示, 阴性对照和阳性对照均无瞬间表达; 当轰击距离为 6 cm, 叶盘靠近培养皿中心区域时瞬间表达率最高, 达到了 30.4%, 平均蓝斑数为 7.2; 其次轰击距离为 6 cm, 叶盘远离培养皿中心区时, *gus* 基因瞬时表达率为 16.7%, 表达活性开始下降, 平均只有 3.5 个蓝斑; 当轰击距离为 9 cm 时, *gus* 基因瞬时表达率和表达活性都下降很多; 轰击距离为 3 cm 时, *gus* 基因瞬时表达率很低, 仅为 6 cm 时的 11.7%; 当轰击距离为 12 cm 时, *gus* 基因没有表达。

表 1 轰击距离对 *gus* 基因瞬时表达的影响

处理	轰击距离 (cm)	外植体数 (个)	平均蓝斑数 (个)	瞬时表达率 (%)
阴性对照	—	90	0.0	0.0
阳性对照	6	90	0.0	0.0
不同处理	3 <sup>+</sup>	90	2.1	4.2
	3 <sup>-</sup>	90	1.9	3.5
	6 <sup>+</sup>	90	7.2	30.4
	6 <sup>-</sup>	90	3.5	16.7
	9 <sup>+</sup>	90	2.6	9.7
	9 <sup>-</sup>	90	1.7	5.4
	12 <sup>+</sup>	90	0.0	0.0
	12 <sup>-</sup>	90	0.0	0.0

注: + 表示将叶片置于培养皿中心区域; - 表示将叶片置于远离培养皿中心区域

2.2 氦气压力对 *gus* 基因瞬时表达的影响

在基因枪的轰击参数中,氦气压力对转化效率也有一定的影响,气压大小决定了子弹的速度和入射深度,能否有效地将子弹射入具有分化潜能的细胞层是转化能否成功的关键之一。试验结果表明,在  $7.584 \times 10^6$  Pa 时可以获得最高的 *gus* 基因瞬时表达率,通过显微镜观察 *gus* 基因瞬时表达结果发现,在氦气压力为  $7.584 \times 10^6$  Pa 时有利于微粒子弹的分散,此时子弹密度适当,轰击后对组织的损伤较小。

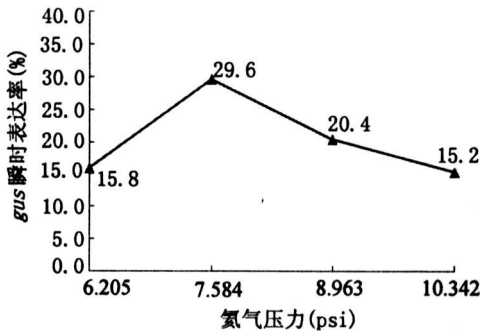


图1 氦气压力对 *gus* 基因瞬时表达的影响

2.3 金粉用量对 *gus* 基因瞬时表达的影响

在基因枪转化过程中,金粉用量是影响 *gus* 基因瞬时表达的关键因素,当质粒用量为  $5 \mu\text{g}/\text{枪}$  时,用不同用量金粉对菊花叶片进行轰击的结果见表2。由表2可知,随金粉用量的增加, *gus* 基因瞬时表达的平均蓝斑数和染色率也增加,金粉用量为  $100 \sim 400 \mu\text{g}/\text{枪}$  时, *gus* 基因瞬时表达率为  $19.7\% \sim 30.4\%$ ,基本呈线性对应关系,高金粉用量使单位面积上的细胞接受的金粉颗粒数增多,进而增加了 *gus* 基因瞬时表达的蓝斑数,但继续增加金粉用量, *gus* 基因瞬时表达率反而降低,这可能是因为高密度金粉容易聚集成块,分散度不好,这将对受体细胞产生较大的机械损伤和震动伤害,影响分化能力和转化效果<sup>[8]</sup>。适量的金粉浓度是获得转化成功的关键。通常在避免对细胞造成较大轰击伤害的同时,应尽量增加金粉用量以提高转化频率,对叶片表面的显微镜观察还发现,随金粉用量的增加,叶片表面颜色逐渐加深。

表2 金粉用量对 *gus* 基因瞬时表达的影响

项目	金粉用量( $\mu\text{g}$ )				
	100	200	300	400	500
外植体数(个)	90	90	90	90	90
平均蓝斑数(个)	3.2	3.8	8.1	8.6	5.9
瞬时表达率(%)	19.7	23.5	25.1	30.4	21.6
抗性芽再生率(%)	0	2.5	3.6	4.9	0.9

2.4 轰击后培养时间对 *gus* 基因瞬时表达的影响

在对样品进行轰击后 1~7d 内分别进行 *gus*

检测,研究不同恢复时间对 *gus* 基因瞬时表达的影响,结果如图2所示。在轰击后第2天进行染色, *gus* 基因瞬时表达率最高,为  $26.3\%$ ,平均蓝斑数达 7.9,随着恢复培养时间的延长 *gus* 基因表达活性逐渐衰退,到第七天瞬时表达率只有  $3.1\%$ ,几次重复实验的结果都显示在轰击 2d 后进行组织化学染色 *gus* 基因瞬时表达活性最高,显微镜观测表明,在轰击 2d 后 *gus* 阳性细胞大多具有完整的细胞核,且具有一定形状,但随着时间的延长, *gus* 基因阳性细胞继续发育,大多形成无细胞核、无规则形状的巨大细胞,且蓝色逐渐变淡直至消失。

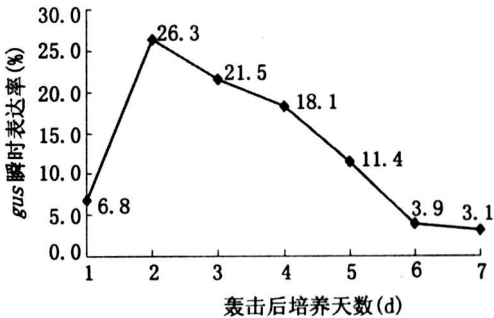


图2 轰击后培养时间对 *gus* 基因瞬时表达的影响

2.5 质粒 DNA 用量对 *gus* 基因瞬时表达的影响

在其他最优化的条件下,用不同量的质粒 DNA 轰击叶片的结果见图3。由图3可见,质粒 DNA 用量影响 *gus* 基因的瞬时表达率,当质粒 DNA 用量为  $0.5 \sim 3 \mu\text{g}/\text{枪}$  时,随质粒 DNA 用量的增加, *gus* 基因表达率呈缓慢上升趋势,若继续增加质粒 DNA 用量, *gus* 基因瞬时表达率又呈明显下降趋势,当增加到  $5 \mu\text{g}/\text{枪}$  时, *gus* 基因表达值急剧下降。在基因枪转化体系中,DNA 用量也是影响 *gus* 基因瞬时表达的关键因素。当 DNA 用量过大时,会使金粉形成团块状,很难将它们完全振动分散开,点样也困难。这些团块状态的微弹在轰击时,穿入细胞的效果很差,且会大量杀死细胞。所以适量的 DNA 用量是转化成功的重要因素。在避免微弹结成团块状的同时,应尽可能增加 DNA 用量来提高转化效率。

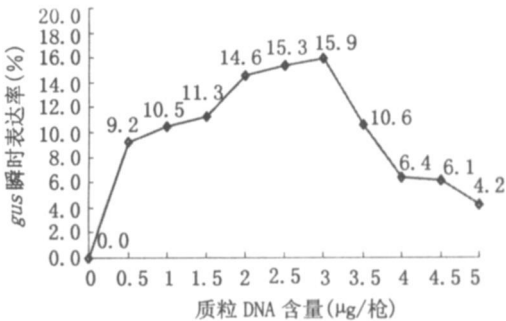


图3 质粒 DNA 用量对 *gus* 基因瞬时表达的影响

## 2.6 轰击次数对 *gus* 基因瞬时表达的影响

在用基因枪转化水稻愈伤时发现, 轰击次数增多并没有显著提高转化效率, 成本却明显增加。本试验结果表明, 轰击 2 枪转化效率明显高于只轰击 1 枪。在基因枪转化中, 增加轰击次数, 在某种程度上是增加了金粉和 DNA 的用量, 转化效率应该提高。但增加枪击次数, 却使成本成倍增加。所以, 在考虑最优性价比的情况下, 应选择适当的枪击次数。

## 3 讨论

Perl 等<sup>[9]</sup>提出, 最适的基因枪转化系统应包括两方面: ①建立一个具有高频再生能力的受体系统。②优化轰击条件, 减少组织受伤程度, 使材料的再生能力尽可能少地受到影响, 从而提高转化效率。对转化系统的优化可以围绕着这两方面展开, 在再生体系建立过程中, 应采用生理状态良好, “感受态”细胞多的材料作为转化受体。受体材料经一段时间的预培养后, 处于生长速度最快的时期, 细胞分裂旺盛, 被轰击后有利于损伤的修复。就轰击条件来说, 氦气压力越大, 微弹获得的推动力越大, 真空度越高, 微弹飞行所受的阻力越小, 速度就越大, 由于微弹对细胞产生一定程度的伤害, 速度过大会加剧这一影响, 另外, 细胞在真空状态下也会受到一定的伤害, 因而通过调整氦气压力和真空度来获得合适的微弹速度是非常必要的。Altpeter 等<sup>[10]</sup>和 Becher 等<sup>[11]</sup>认为: 采用较低的金粒用量 ( $30\mu\text{g}$ ) 获得抗性植株的频率要明显高于高金粒用量 ( $100\mu\text{g}$ ), 较高的金粒用量对细胞本身伤害也相应高一些, 金粒制备质量的好坏直接关系到菊花叶片在轰击后的转化率。我们在试验过程中发现, 只对子弹在使用前进行涡旋振荡的效果比既进行涡旋振荡又进行超声波振荡的效果差很多, 已分装好的隔年金粒如不充分进行超声波处理, 结果比新制子弹差很多, 经 *gus* 染色后, 蓝色斑点数量少, 斑点大且只出现在局部, 这样容易造成嵌合体的形成。到目前为止, 关于用基因枪法转化菊花的报道不是很多, Yepes 等<sup>[12]</sup>用基因枪法转化 6 个品种的菊花叶片, 茎段, 分别在  $6.894 \times 10^6\text{Pa}$ ,  $9.652 \times 10^6\text{Pa}$  可裂膜压力下, 经过 10d 的恢复培养, 然后在含  $10\text{mg/L}$  的卡那霉素的筛选培养基中筛选, 最终获得了 4 个品种的转基因苗。但目前外源基因整合进入植物基因组的机制还不是十分清楚, 整合的随机性较大。用基因枪轰击时, 基因的导入必须有适当拷贝数的基因进入细胞, 同时对细胞的损伤又不至于导致细胞不能修复而死亡, 影响进入细胞基因拷贝数的因素有质粒 DNA 与金粉的比例、轰击时的金粉用量及轰

击次数, 同时, 影响细胞损伤程度的因素除金粉用量及轰击次数外, 还有靶距以及可裂膜片压力, 所以外源基因的成功导入是这几种因素平衡作用的结果, 各因素之间的最佳组合仍有待更多的深入研究。

### 参考文献:

- [1] Jan de Jong, Rademaker W, Monique F, *et al.* Restoring adventitious shoot formation on chrysanthemum leaf explants following cocultivation with *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1993, 32: 263—270.
- [2] 吴娜, 梁月荣, 朱云国. 基因枪技术在植物基因工程研究中的应用[J]. 植物生理学通讯, 2003, 39(3): 279—283.
- [3] Wang G Y, Du T B. Bt virus protein gene transfer into maize by particle bombardment and transgenic maize plants regeneration[J]. Science in China (Series B), 1995, 25(1): 71—76.
- [4] 朱冰, 黄大年, 杨炜. 利用基因枪法获得可遗传的抗除草剂转基因水稻植株[J]. 中国农业科学, 1996, 29(6): 15—20.
- [5] 刘伟华, 李文雄. 基因枪法向小麦导入几丁质酶基因的研究[J]. 西北植物学报, 2003, 23(1): 54—59.
- [6] Jones D. Wheat transformation current technology and applications to grain development and composition [J]. Journal of Cereal Science, 2005, 41(2): 137—147.
- [7] Jefferson R A, Burgess S M, Hirsch D, *et al.* Beta-glucuronidase from *Escherichia coli* as a gene fusion marker[J]. Proc Natl Acad Sci USA, 1986, 83: 8447—8451.
- [8] 梁辉, 赵铁汉, 李良才, 等. 影响基因枪法转化小麦幼胚的几个因素的研究[J]. 遗传学报, 1998, 25(5): 443—448.
- [9] Perl A, Kless H, Blumenthal A, *et al.* Improvement of plant regeneration and *gus* expression in scutellar wheat calli by optimization of culture conditions and DNA—microprojectile delivery procedures[J]. Molecular and General Genetics 1992, 235(2—3): 279—284.
- [10] Altpeter F, Vasil V, Srivastava V, *et al.* Accelerated production of transgenic wheat (*Triticum aestivum* L.) plant[J]. Plant Cell Report, 1996, 16: 12—17.
- [11] Becher D, Brettschnieder R, Lorz H. Fertile transgenic wheat from micro-projectil bombardment of scutellar tissue[J]. Plant J, 1994(5): 299—307.
- [12] Yepes L M, Veronica M, Pang S Z, *et al.* Biolistic transformation of chrysanthemum with the nucleocapsid gene of tomato spotted with virus[J]. Plant Cell Reports, 1995, 14: 694—698.