

根癌农杆菌介导的雪莲冷诱导蛋白基因对薰衣草遗传转化的初步研究

邢文超^{1,2} 贡强^{1,*} 赵民安¹ 曹旭¹

¹中国科学院新疆理化技术研究所, 乌鲁木齐 830011; ²中国科学院研究生院, 北京 100039

摘要 预培养6 d的薰衣草下胚轴在添加100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酰丁香酮(AS)的根癌农杆菌重悬液中浸染10 min后共培养2~3 d, 再经过7~10 d的恢复培养之后用包含10 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 潮霉素B和200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 头孢霉素的筛选培养基进行筛选是较为理想的遗传转化条件。通过GFP观察和GUS染色以及对筛选得到的抗性芽的PCR检测证明, 外源目的基因(雪莲冷诱导蛋白基因 *scp*)已整合到薰衣草基因组中, 阳性率为40%。

关键词 薰衣草; 根癌农杆菌介导; 遗传转化; 下胚轴

Genetic Transformation of *Lavandula angustifolia* cv. Munstead by Way of Cold-inducible Protein Gene (*scp*) from *Saussurea involucreta* Mediated by *Agrobacterium*

XING Wen-Chao^{1,2}, YUN Qiang^{1,*}, ZHAO Min-An¹, CAO Xu¹

¹Xinjiang Technical Institute of Physics & Chemistry, Chinese Academy of Sciences, Urumqi 830011, China; ²Graduate University of Chinese Academy of Sciences, Beijing 100039, China

Abstract The factors, including precultivation time, immersion time, cocultivation periods and concentration of acetosyringone (AS), were thoroughly investigated so as to establish the high efficient transformation system mediated by *Agrobacterium tumefaciens* of *Lavandula angustifolia* cv. Munstead. The optimized transformation protocol was obtained when hypocotyls explants precultured for 6 d on regeneration medium were immersed into the diluted *Agrobacterium* suspension containing 100 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AS for 10 min and then were co-cultured for 2–3 d with *Agrobacterium* and finally were subcultured on selection medium after reinforcing cultivation for 7–10 d on the regeneration medium containing 200 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ cefotaxime alone. Evidence for stable integration was obtained by GUS staining assay, GFP observation and PCR assay, and the positive rate was 40%.

Key words *Lavandula angustifolia* cv. Munstead; *Agrobacterium*-mediated; transformation; hypocotyl

薰衣草(*Lavandula angustifolia* cv. Munstead)是唇形科薰衣草属多年生半阴性亚灌木, 有强烈芳香气味, 原产于地中海(姚雷和张少艾 2002), 广泛应用于医药、食品和化妆品生产中(孙捷和范为宇 2004; 王玉芹等 2004)。新疆是我国薰衣草主要的生产基地, 但与地中海地区不同的是, 新疆地处欧亚大陆腹地, 荒漠面积大, 气候干旱, 昼夜温差和季节温差大。环境的差别导致新疆地区种植的薰衣草种质退化, 精油质量下降, 影响了其国际市场竞争力。另外, 根癌农杆菌介导的遗传转化方法由于具有操作简单、培养周期短、导入的外源基因插入的拷贝数低、插入的目的基因完整、外源基因的整合率和表达率高等优点, 是常用的转化手段(于景华等 2002), 迄今所获得

的200种转基因植物中80%以上是用根癌农杆菌转化系统产生的。而目前国内外关于薰衣草遗传转化的研究报告还非常少。1999年, Dronne等(1999)最先报道根癌农杆菌介导大薰衣草(*L. angustifolia* Mill. × *L. latifolia* Medic.)的遗传转化是可行的, 2000年, Nebauer等(2000)又报道了根癌农杆菌介导的宽叶薰衣草(*L. latifolia*)遗传转化方法。但这些研究大多以证明根癌农杆菌介导的薰衣草遗传转化方法的可行性为目的, 并没有

收稿 2006-02-24 修定 2006-08-29

资助 中国科学院西部行动高新技术项目(KGCX2-SW-506)和中科院百人计划项目(2002)。

*通讯作者(E-mail: yunq@ms.xjb.ac.cn, Tel: 0991-3838277)。

使用任何有意义的目的基因, 而且以薰衣草叶盘为外植体建立的遗传转化体系也存在着转化周期长和转化率低等缺点。基于这些, 本文以薰衣草下胚轴为外植体材料, 以雪莲冷诱导蛋白基因 (*Saussurea involucrata* cold-inducible protein, *scp*) 为目的基因, 根据各种影响根癌农杆菌介导薰衣草下胚轴外植体遗传转化频率因素的预备实验结果, 建立了薰衣草高效的遗传转化体系, 为进一步改良薰衣草抗逆性建立基础资料。

材料与amp;方法

薰衣草 (*Lavandula angustifolia* cv. Munstead) 品种‘法国孟士德’的种子由新疆芳香科技有限公司提供。挑取饱满的薰衣草种子, 于40℃温水中浸泡, 水凉后继续浸泡24 h。将经过浸泡的薰衣草种子, 流水冲洗30 min, 75%的乙醇漂洗30 s, 无菌水冲洗1次后, 用0.2%的优氯净溶液浸泡20 min, 再用无菌水冲洗4~5次。然后将种子接种于MS固体培养基中, 置于(25±1)℃, 每天8 h光照(光照强度为30 μmol·m⁻²·s⁻¹)、16 h暗培养条件下培养。

用种子萌发的无菌苗的下胚轴(苗龄10 d)为外植体材料进行遗传转化研究。

采用热激转化法把pCAMBIA1304/*scp*转入根癌农杆菌菌株EHA105中, 该质粒含有CaMV35S启动的*scp*、β-葡萄糖苷酸酶基因(*gus*)、绿色荧光蛋白基因(*gfp*)和CaMV35S启动的潮霉素磷酸转移酶基因(*hptII*), 其编码产物对潮霉素B具有抗性。质粒pCAMBIA1304/*scp*由本实验室构建。

外植体预培养时, 取种子萌发的无菌苗的下胚轴剪成0.5 cm大小的茎段接种于直接分化出芽培养基(MS+0.5 mg·L⁻¹ IAA+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA)上进行预培养。

准备菌液时, 挑取含有质粒pCAMBIA1304/*scp*的农杆菌EHA105接种于含有50 mg·L⁻¹卡那霉素的液体YEP培养基(10 g·L⁻¹蛋白胨+10 g·L⁻¹酵母浸膏+5 g·L⁻¹牛肉浸膏)中, 于28℃下、置于160 rpm的摇床上振荡培养过夜, 菌体以3 500×g离心10 min后重悬于MS液体培养基中[附加100 μmol·L⁻¹乙酰丁香酮(acetosyringone, AS)], 调整OD₆₀₀至0.3~0.6之间, 并于28℃中, 置于160 rpm

的摇床上振荡培养1 h后备用。

将经过预培养的下胚轴浸入菌液中, 轻轻摇晃数分钟。用无菌滤纸吸干外植体上的菌液, 接入共培养培养基(MS+0.5 mg·L⁻¹ IAA+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA)中进行共培养, 共培养时间为2~5 d。经过共培养的外植体, 接入恢复培养基[MS+0.5 mg·L⁻¹ IAA+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+200 mg·L⁻¹ 头孢霉素(cefotaxime, cef)]中进行恢复培养, 恢复培养时间为7~10 d。经过恢复培养的外植体接入筛选培养基(MS+0.5 mg·L⁻¹ IAA+2.0 mg·L⁻¹ 6-BA+10 mg·L⁻¹ 潮霉素B+200 mg·L⁻¹ cef)中进行筛选培养, 每15 d继代1次。

以上所有培养基中均加3%的蔗糖、0.6%的琼脂, pH 5.85~5.95。

GUS染色分析时, 分别取经过5 d恢复培养的外植体材料和30 d筛选培养的抗性芽, 按王关林和方宏筠(2002)介绍的方法略有改动, 进行GUS染色分析。

GFP检测时, 取经过60 d筛选培养的抗性芽, 在倒置荧光显微镜(Leica Microsystem Wetzlar GmbH)下观察*gfp*的表达情况。

PCR检测时, 取经过潮霉素B筛选的抗性芽, 按照CTAB法(闫新甫 2003)提取植物基因组DNA, 以其为模板进行PCR扩增。PCR引物由上海生工合成。引物序列分别为: F, 5' TTAAC-CATGGGAGCAGTGCGGCTCGCAGGGC 3'; R, 5' GGTTACTAGTCTATGCGAACGGCCTCTG-GTATGTAC 3'。

PCR反应体系: PCR反应缓冲液(10×) 5 μL, MgCl₂ (25 mmol·L⁻¹) 3 μL, 引物1和引物2 (10 pmol·L⁻¹) 2 μL, dNTP (10 mmol·L⁻¹) 1 μL, 模板(0.1 μg·mL⁻¹) 2 μL, Taq DNA聚合酶(5 U·μL⁻¹) 0.5 μL, 最后加水至50 μL。PCR反应条件: 94℃预变性10 min; 94℃变性40 s, 55℃复性1 min, 72℃延伸90 s, 共35个循环; 最后72℃延伸10 min。

Southern杂交检测时, 用HindIII酶切转化及对照植株的基因组DNA。酶切完全后, 在1.0%的琼脂糖凝胶上进行电泳, 再转移到硝酸纤维素膜上。参考奥斯伯等(1999)的步骤进行杂交和检测。所用探针为随机引物标记系统标记的*scp*基因

片段, 约 600 bp。探针制备方法参考宝生物工程(大连)有限公司的随机引物标记试剂盒操作说明书, 略有改动。

结果与讨论

1 转化条件的优化

在遗传转化操作中预培养时间、浸染时间、共培养时间以及AS浓度等因素都会影响遗传转化的效率, 本文考察了其对于遗传转化效率的影响, 最终确定了最佳的遗传转化条件为预培养6 d的薰衣草下胚轴在添加 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AS的农杆菌重悬液中浸染 10 min后共培养 2~3 d, 再经过 7~10 d的恢复培养之后用包含 $10 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 潮霉素 B 和 $200 \text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ cef 的筛选培养基进行筛选培养。另外, 由于农杆菌对植物带来的损伤较大, 若直接用农杆菌对植物材料进行浸染, 会导致大量外植体死亡。经过一定时间的预培养使植物材料对创伤部位有所适应和反应对提高农杆菌的转化率十分重要(于景华等 2002)。表 1~3 的结果显示:

(1) 预培养时间对薰衣草下胚轴的转化率有很大的影响。当预培养时间小于 3 d 时, 外植体大量死亡; 预培养时间大于 9 d 时, 薰衣草下胚轴的再分化已经启动, 转化率明显降低。因此认为预培养时间以 6 d 为宜(表 1)。

表1 预培养时间对*gus*基因瞬时表达率的影响

Table 1 Effect of precultivation time on transient expression of *gus* gene

预培养时间/d	<i>gus</i> 基因瞬时表达的外植体数/个	<i>gus</i> 基因的瞬时表达率/%
3	11	36.1±0.5
6	25	83.3±0.7
9	20	66.7±0.3
12	12	40.0±0.4

每个实验的外植体均为 30 个, 实验结果为 3 次实验的平均值。下表同此。

(2) 农杆菌对外植体的浸染时间直接影响转化的频率和外植体的生长情况。浸染时间太长或太短都不利于农杆菌的转化。浸染时间太短影响农杆菌的附着效果, 导致转化率降低; 浸染时间太长, 外植体常因农杆菌的毒害缺氧而软腐。因此

需要确定合适的浸染时间, 使其既能实现农杆菌对外植体的转化又不会对外植体产生较强的毒害作用。表 2 表明, 随着浸染时间的增加, *gus* 基因的瞬时表达率也随之增加(表 2)。浸染时间为 15 min 的 *gus* 瞬时表达率最高(90%), 但随着浸染时间的延长, 在后续培养过程中很难控制农杆菌的生长, 外植体由于农杆菌的毒害而很难成活。因此, 我们确定最佳的浸染时间为 10 min, 这既能得到较高的转化效率, 又不会由于后续培养中农杆菌过度生长而导致外植体死亡。

表2 不同浸染时间对*gus*基因瞬时表达率的影响

Table 2 Effect of infection time on transient expression of *gus* gene

浸染时间/min	<i>gus</i> 基因瞬时表达的外植体数/个	<i>gus</i> 基因的瞬时表达率/%
3	20	66.7
5	22	73.3
7	24	80.0
10	26	86.7
15	27	90.0

(3) 共培养时间的长短也是影响转化效率的一个重要因素。由于农杆菌附着后不能立即转化, 需要经过一段“细胞调节期”后才能诱发 T-DNA 的转移, 一般的“细胞调节期”为 16 h, 因此共培养时间必须长于 16 h; 但共培养时间太长, 农杆菌过度生长使植物细胞受到毒害而死亡。所以合适的共培养时间是一个好的转化系统所必需的(王关林和方宏筠 2002)。本文结果表明, 共培养时间以 2~3 d 为宜; 共培养时间为 5 d 时由于农杆菌的过度生长, 外植体因缺氧而软腐, 很难再恢复生长。

另外, 共培养之后外植体的生长能力变弱, 如果直接对其进行筛选培养, 已经转化的细胞由于生长能力变弱而导致对抗生素抗性变弱而死亡。因此, 共培养之后将外植体接入不含筛选剂的培养基上进行一段时间的恢复培养是必要的, 待外植体恢复正常生长能力后, 再转移到筛选培养基上进行筛选培养。本文中以恢复培养 7~10 d 的效果为最好。

(4) 植物和菌株相互作用的基础是细菌具有趋

化性, 即菌株对植物细胞所释放的化学物质产生趋化反应。研究表明, 根癌农杆菌对一些酚类化合物具有趋化性。根癌农杆菌Ti质粒的Vir区基因对T-DNA的转移起介导作用, 而这些酚类化合物正是Vir区基因活化的诱导物。其中, AS被证明是诱导能力最强的酚类化合物(于景华等2002)。本文测定不同浓度AS下的*gus*基因的瞬时表达率结果(表3)表明, 添加 $100 \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ AS的*gus*瞬时转化效率提高64%, 进一步提高AS浓度(200

表3 AS浓度对*gus*基因瞬时表达率的影响Table 3 Effect of AS concentration on transient expression of *gus* gene

AS 浓度 / $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$	<i>gus</i> 基因瞬时表达的外植体数/个	<i>gus</i> 基因的瞬时表达率/%
0	7	23.3±0.4
100	25	83.3±0.7
200	25	83.3±0.6

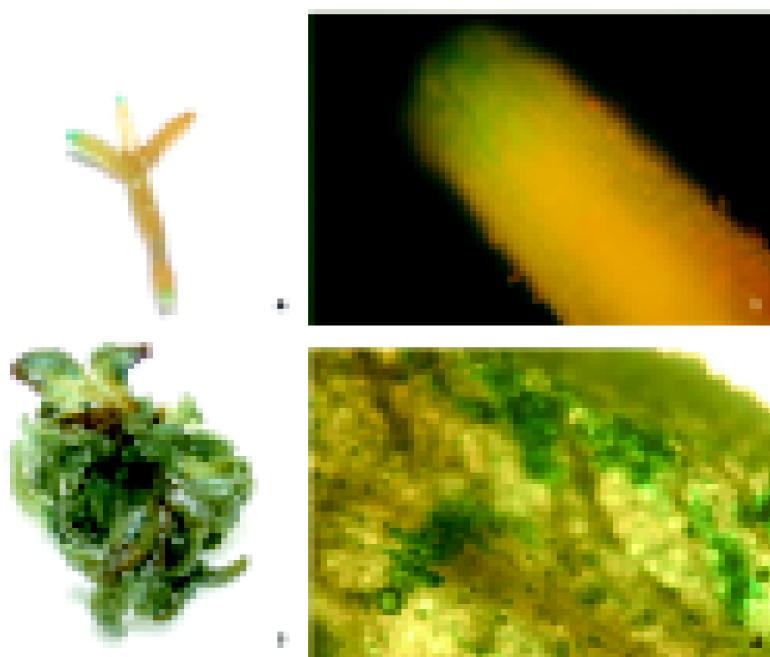


图1 薰衣草下胚轴和抗性芽的GUS染色

Fig. 1 GUS staining of hypocotyls and resistant shoots of *L. angustifolia*

a: 肉眼观察的下胚轴GUS染色; b: 显微镜下观察的下胚轴GUS染色; c: 肉眼观察的抗性芽GUS染色; d: 显微镜下观察的抗性芽GUS染色。

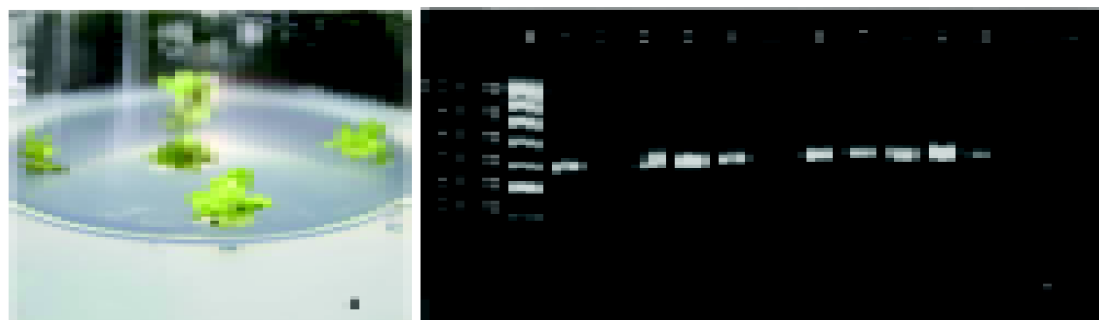


图2 薰衣草抗性芽和PCR检测

Fig. 2 The resistant shoots and PCR test of *L. angustifolia*

a: 抗性芽; b: PCR检测结果。1~11: 转化植株; -: 阴性对照(非转基因植株); +: 阳性对照(质粒); M: DNA标准分子量。

$\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$)对转化效率的影响不明显。

2 *gus*基因的表达

取恢复培养基上生长5 d的下胚轴,经GUS染色后观察,发现*gus*基因在切断处瞬时表达强烈(图1-a)。显微镜观察显示,*gus*基因不仅在切口断面处瞬时表达强烈,而且在组织内部也有较强的瞬时表达(图1-b)。

取经过30 d筛选培养后得到的抗性芽进行GUS染色后,观察*gus*基因在组织内部的表达情况。结果表明,*gus*基因能够稳定表达(图1-c),显微镜观察显示,*gus*基因已整合进植物基因组DNA中(图1-d)。

3 *gfp*基因的表达

取经过60 d筛选培养的抗性芽,在倒置荧光显微镜可以观察到抗性芽中的绿色荧光(结果未列出)。说明外源基因已经进入外植体中,并且可以稳定地表达。

4 抗性芽的PCR检测

随机抽取经过60 d筛选培养的抗性芽20株(图2-a),提取总DNA进行PCR检测,其中8株得到了与阳性对照相同的片段(图2-b),阳性率为40%。

5 抗性芽的Southern杂交检测

PCR检测灵敏、快捷,可对转基因植株进行快速检测,但PCR检测易出现假阳性,只能作为初筛。而Southern杂交可清除操作过程中的DNA污染和转化中的质粒残留所引起的假阳性信号,准确度高,特异性强,是目前检测转基因植株最权威的方法。因此,本实验取PCR检测呈阳性的植物基因组DNA经Hind III酶切消化后以*scp*基因片段为探针进行Southern杂交,结果(图3)表明,外源基因已经稳定整合进入薰衣草基因

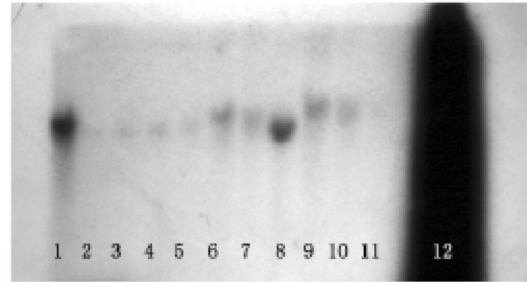


图3 抗性芽的Southern杂交检测
Fig. 3 Southern blotting analysis of resistant shoots of *L. angustifolia*

1~10: 转化植株的基因组DNA; 11: 阴性对照(非转化植株的基因组DNA); 12: 阳性对照(目的基因的PCR产物)。

组中,且都为单拷贝。

参考文献

- 奥斯伯 F, 布伦特 R, 金斯顿 RE, 穆尔 DD, 塞德曼 JG, 史密斯 JA, 斯特拉尔 K 著. 马学军, 舒跃龙译(1998). 精编分子生物学实验指南. 第2版. 北京: 科学出版社, 55~69
- 孙捷, 范为宇(2004). 薰衣草香的生理效应研究. 国外医学: 中医中药分册, 26 (5): 303
- 王关林, 方宏筠(2002). 植物基因工程. 北京: 科学出版社, 393, 831~832
- 王玉芹, 孙亚军, 施献儿(2004). 薰衣草精油的化学成分与药理活性. 国外医药: 植物药分册, 19 (1): 5~8
- 闫新甫(2003). 转基因植物. 北京: 科学出版社, 155~158
- 姚雷, 张少艾(2002). 芳香植物. 上海: 上海教育出版社, 152
- 于景华, 祖元刚, 孔瑾, 石福臣, 聂明珠, 唐中华(2002). 根瘤杆菌介导GUS基因对白桦树转化的研究. 植物研究, 22 (2): 247~251
- Drome S, Moja S, Jullien F, Berger F, Caissard JC (1999). *Agrobacterium*-mediated transformation of lavender (*Lavandula x intermedia* Emeric ex Loiseleur). Transgenic Res, 8 (5): 335~347
- Nebauer SG, Arrillaga I, del Castillo-Agudo L, Segura J (2000). *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of the aromatic shrub *Lavandula latifolia*. Mol Breed, 6 (6): 539~552