

美洲拟鲈抗冻蛋白基因 (afp) 导入番茄酯酶和过氧化物酶同工酶分析

傅桂荣 陈瑛* 刘关君 黄永芬** 汪清胤

(哈尔滨师范大学生物系)

摘要 将纯化的含美洲拟鲈抗冻蛋白基因的外源 DNA 通过花柱道注射法导入番茄品种“中蔬四号”中。对 D₂ 代转基因植株田间观察有变化的各组按一个生育期、三个部位分别取样。进行二种酶的同工酶分析, 均与对照有明显差异。间接验证了外源 DNA 的导入。说明同工酶分析可做转基因植株早期筛选的生化指标。

关键词 抗冻蛋白基因 花柱道注射 番茄 酯酶和过氧化物酶同工酶

关于植物转基因技术, 可分为“载体法”和“DNA 直接导入法”^[1]。花柱道注射法是我国首创的 DNA 直接导入法, 在棉花、水稻、大豆等转基因中已获成功。龚蓁蓁等^[2]用 3H 标记法, 翁坚等^[3]用分子杂交法分别证明了该方法的可行性。

转化结果鉴定有标记基因表达法, 分子杂交法, PCR 技术等, 但所用药品昂贵。同工酶分析法省时省力。可作为分子杂交工作前初步筛选转基因植株一个有效方法。汪清胤等^[4]运用同工酶分析法验证了用花柱道注射法将外源 DNA 转化大豆获得了转基因植株。

番茄具有很高的经济价值。用常规育种很难解决高纬度栽培问题, 如何使番茄具有抗寒性, 进而扩大其栽培地域已成为科学家努力探索的问题。加拿大 Davies 等把美洲拟鲈抗冻蛋白基因转入大西洋鲑鱼中获得表达^[5]。据报导已将抗冻蛋白基因分别转移到郁金香、烟草、油菜中, 获得一定的抗冻能力^[6]。若将抗冻基因转入番茄, 使之具有抗寒性。一方面可使番茄提早上市, 另一方面可扩大番茄栽培地域, 无疑具有明显的经济效益。

目前, 用同工酶分析法验证转抗冻基因成效尚无报道。希望通过酯酶和过氧化物酶同工酶分析为转基因植株的早期筛选提供一个可靠的生化指标。

1. 材料和方法

1. 1. 外源 DNA: 含美洲拟鲈抗冻蛋白基因的 Ti 质粒, 由黑龙江省科学院微生物所提供。

1. 2. 受体植株: 中蔬四号

1. 3. 转基因植株: 将中蔬四号番茄用不同的转基因方法处理。方法及编号如表:

编号	转基因方法	采收方式
T-2	未切* 子房注射 5ul	得四小果单采收
T-3	未切 花柱注射 5ul	得单果
T-5	未切 花柱注射 5ul	单小果
T-7	未切 花柱注射 10ul	混***
T-8	未切 花柱注射 5ul	得两小果
T-9	切** 花柱注射 5ul	单果大 78g
T-10	切 花柱注射 5ul	得单小果
T-11	切 花柱注射 5ul	得 10 大果混***

注: *未切: Ti 质粒未经 ECORI 切以环状形式存在

**切: Ti 质粒经 ECORI 切以链状形式存在

***混: 不同果实种子混放

1. 4. 同工酶分析: 1) 取材: 以番茄生长三次取样, 中蔬四号和转基因植株。苗期: 温室中取样, 番茄已有 2~3 片真叶展开, 子叶宿存, 取子叶、叶, 每个编号的植株各取 2 株。现蕾期: 定植取样, 番茄已有 8~9 片真叶展开。均已现蕾。取根, 每个编号的植株各取六株。2) 聚丙烯酰胺凝胶电泳^[11] 酯酶染色, 过氧化物酶染色、凝胶照像、包干板^[11]

2. 结果

以前我们曾对 103 个样品, 15~17 个番茄品种的过氧化物酶、酯酶同工酶跟踪生育期 11~16 次取样。进行了同工酶分析, 确定了番茄的两种酶的同工酶基本谱型。为对转基因植株进行鉴定, 我们对 D₂ 代田

① 哈医大二院 ** 通讯作者

间观察有变化的各组按三个生育期、三个部位分别取样。进行两种酶的同工酶分析，均与对照有明显差异。两种酶谱均表现，谱带数增加，某些谱带颜色加重，表达部位发生变化。

2. 1. 酯酶同工酶酶谱分析：1) 番茄酯酶同工酶基本谱型^[1]。Rick 等^[8]认为番茄酯酶同工酶共有 9 条谱带。张士文等^[7]将番茄各生育期及不同部位酯酶谱带相互叠加共显示 26 条酶谱带。2) 苗期子叶酶谱：T-7-1 T-7-2 在 B 区比对照多一条带 (B₃)。苗期叶酶谱：T-7-2 在 A 区多一条带 (A₃)，T-3-1 在 A 区多一条带 (A₂)。现蕾期根酶谱：T-3-6' T-2-1'4'6' 在 A 区多一条带 (A₆)；T-3-5'6' T-7-1'4'6' 在 B 区多一条带 (B₁)；T-9-2'3'4'5' 在 A 区多一条带 (A₇) T-3 和 T-7 在 B 区有一条带 (B₄) 颜色全部加深，酶活性加强；T-3-6' 在 A 区有一条带 (A₇) 加宽加深非常显著 (如图 1)。

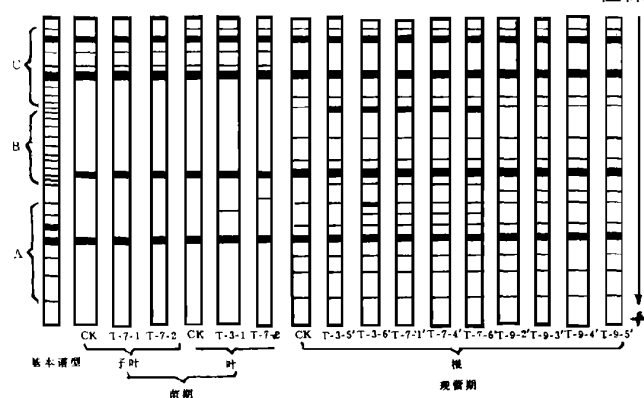


图 1 酯酶同工酶酶谱模式图

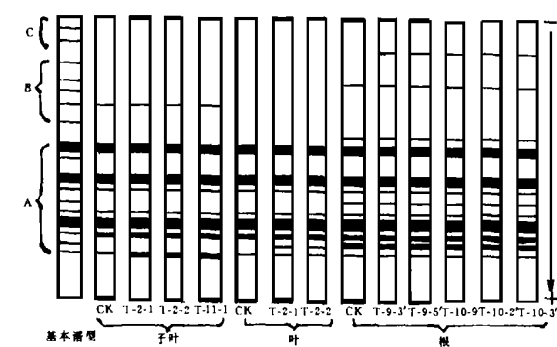


图 2 过氧化物酶同工酶酶谱模式图

2. 2. 过氧化物酶同工酶酶谱分析：番茄过氧化物酶基本谱型^[8]。Rick 等^[9]报导的番茄过氧化物酶谱有 15 条谱带。王海廷等^[8]将番茄不同生育期和不同部位的谱带叠加共显示 17 条谱带，根据王海廷描述的基本谱型来分析过氧化物酶同工酶。苗期子叶酶谱：T-2-1、T-2-2、T-11-1 在 A 区有一条带 A-1

-a 较对照明显加重。苗期叶酶谱：T-2-1 T-2-2 在 A 区多一条带 (A-1-a')。根据报导^[8]，A-1-a' 谱带仅在根酶谱中出现过，在叶酶谱中尚无报导。说明酶表达部位可能发生了变化。现蕾期根酶谱：T-9-3'、5' T-10-1'2'3' 在 C 区多一条带 (如图 2)。

3. 讨论

3. 1. 转基因植株同工酶谱带与对照有许多差异，酶是基因表达的产物，按其固有规律表达同工酶谱出现差异，说明基因间，或基因表达调控间存在差异。进而证实外源 DNA 有可能导入其中，因此同工酶分析作为外源 DNA 导入的。

3. 2. 由于转基因工作后得到大量转基因植株需直接检验，必须用 Southern-blot 法，PCR 技术直接检验。但药品量大，又十分昂贵必须经过初步筛选。转基因植株的酯酶和过氧化物酶同工酶的表达与对照相比酶

谱有明显差异，因而认为可以用同工酶分析法对转基因植株进行初步筛选。

3. 3. 过氧化物酶同工酶酶谱转基因植株 A-1-a 带与对照相比，提早进行了表达，以及 A-1-a' 表达部位发生了变化。对研究外源 DNA 导入与同工酶的变化关系，以及抗冻基因与过氧化物酶、酯酶同工酶的关系具有重要的理论研究意义。

3. 4. 番茄外源 DNA 导入的理论依据是 DNA 片断杂交的假设^[10]，外源 DNA 在受体自花授粉后一定时期能沿着花粉管通道进入胚囊，转化受精卵前、后的细胞，由于这些细胞不具有正常细胞壁，可当做天然的原生质体，易于 DNA 整合，经多种作物实验证明。这一技术是可行的。

3. 5. 我们所导入的抗冻蛋白基因，能否在抗冻性能上产生巨大变化，还有待于进一步测试。

参考文献

1. 程玉忠《植物基因工程进展》遗传 1991. 13 (4)
 2. 龚蓁蓁 沈慰芳 周光宇 黄骏麒 钱思颖 1988: 受粉后外源 DNA 导入植物技术—DNA 通过花粉管通道进入胚囊 中国科学 B 辑 (6) 611—614
 3. 翁坚 沈慰芳 王自 1984: 外源 DNA 导入棉花的分子验证 生物化学与生物物理学报 16 (3) 325—326
 4. 汪清胤 黄永芬 傅桂荣等 1991 外源 DNA 导入栽培大豆的同工酶验证 哈师大自然科学报 1991 (7)
 5. Davies B. C1986 In Basic Methods in Molecular Biology pp 67—336
 6. Daus P. L. 1987 New Biotech 1 (11812): 11
 7. 张士义 王海廷等 1986 番茄不同生育期及不同部位的酯酶 谷草转氨酶同工酶分析 哈师大自然科学报 1986 1 期 (以下文献略——编者)
- (地址: 哈尔滨市和兴路 24 号 邮编 150080)
定稿日期: 1997 年 11 月 3 日