

# 含 ipt 基因生长素调控基因根癌农杆菌 转化牵牛萌动种胚同工酶分析

傅桂荣 丁海 汪清胤 黄永芬 贾媛

(哈尔滨师范大学)

**摘要** 以牵牛萌动种胚为受体,用含有 35S 启动子—Gus 基因—ipt 基因—Nos 基因的根癌农杆菌 LBA 4404 及含有 35S 启动子—Gus 基因—生长素调控基因—Nos 基因的根癌农杆菌 LBA 4404 进行转化。通过对转化及对照植株苗期叶的同工酶分析,发现转化植株叶的过氧化物酶同工酶及酯酶同工酶谱带与对照植株有明显差异。转化频率较高。间接验证了外源 DNA 的导入,说明同工酶分析方法可做为转基因植株早期筛选的方法之一。并初步验证用萌动种胚法转化旋花科植物牵牛的可行性。

**关键词** 牵牛萌动种胚 ipt 基因 生长素 调控基因 根癌农杆菌 转化 同工酶

目前,在花卉优良品种的培育方面,基因工程发挥着越来越大的作用。因此,用基因工程方法改变花色、花形和花期已是完全有可能的。

自 1979 年 Marfon<sup>[9]</sup> 首先用根癌农杆菌 Ti 质粒进行烟草原生质体转化以来,高等植物的转化方法已有广泛进展<sup>[1,6,7]</sup>。美国 Monsanto 公司于 1981 年首先将 iaaM 和 iaaH 基因从 Ti 质粒上克隆下来。在与组织特异性不同的启动子连接后通过农杆菌载体稳定整合到矮牵牛(*Petunia hybrida* Vilm.) 的基因组最后获得转基因矮牵牛植株。

植物细胞激动素有控制细胞分裂,限制一些水解酶产生,促进根系生长,改善营养元素分配,进而达到提高产量的作用。美国密苏里大学生化系构建了 SAUR 启动子—Gus 基因—ipt 基因—Nos 基因克隆在 Ti 质粒中转化烟草获得成功<sup>[8]</sup>,并检测了生长素调节基因在完整大豆胚轴和离体胚轴切片中的表达。我们也用这两个基因导入牵牛萌动种胚中,并对转化植株进行鉴定。本实验首先对转化植株苗期叶进行同工酶分析。为转基因植株的早期筛选探讨其有效方法。

## 1 材料和方法

1.1 菌株 根癌农杆菌 LBA 4404 具壮观霉素、卡那霉素和氯霉素抗性。在 Ti 质粒上分别克隆 35S 启动

子—Gus 基因—Nos 基因。用 ZYT 培养基 28℃ 摇床培养 36h,使之达到对数期。上述菌种由美国密苏里大学惠赠。

1.2 受体植物 蓝花牵牛种子是在花店购买的。

1.3 种子处理 温水浸种置于 25℃ 温箱发芽,发芽率为 90%,待胚根稍突破种皮时,用培养至对数期的根癌农杆菌浸染 12h 播种于温床灭菌土中。并以同期未浸菌的种子为对照。

## 2 同工酶分析

取播种 40d 形态特征变异较明显的转化植株叶 6 株。其中转 ipt 基因植株 4 株,转生长素调节基因植株 2 株。取 3 株未浸染菌的正常植株为对照。按以前报道的方法制备酶提取液<sup>[3]</sup>,聚丙烯酰胺凝胶制备、电泳及过氧化物酶同工酶、酯酶同工酶分析方法均与前同<sup>[3,4]</sup>。

## 3 结果与讨论

3.1 过氧化物酶同工酶分析:如图 1 其中 1、4、9 为对样品,显示 6 条谱带相对迁移率分别为 0.4375、0.5063、0.6563、0.6771、0.6979、0.8333。在 6 个转化植株中酶谱差异较明显的是样品 2、5、7。样品 2、3 是转生长素调控基因的植株。样品 5、6、7、8 是转 ipt 基因的植株。样品 2 多显示一条 Rf0.8542 带。样品 5 缺 0.8333 带、0.6563、0.5063 带,多显示一条 0.4688 带。样品 7 缺 0.4375、0.5063、0.6563、0.6771、0.6979 带,多显示 Rf0.3646、0.5208、0.7292、0.7604、0.8229、0.8646、0.8854 带。各谱带及相对迁移率如下。

ipt 基因为植物细胞激动素生物合成基因

省科委“八五”攻关项目、蔡火石生物科学基金资助项目

稿件修回日期:1998-12-28

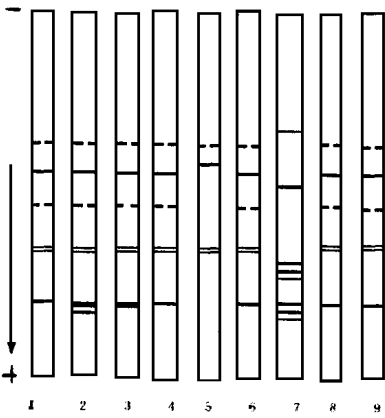


图1 过氧化物酶同工酶谱示意图

谱带	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV
Rf	0.346	0.435	0.468	0.563	0.528	0.656	0.671	0.679	0.792	0.704	0.829	0.833	0.882	0.866	0.888

3.2 酯酶同工酶分析 如图2 其中1、4、9 为对照样品显示3 条谱带, 相对迁移率分别为0.9158、0.7579、0.5158。样品2、3 缺0.5158 带, 多0.5789、0.5474 两条谱带。样品6 缺0.5158 带, 多0.5474 带。样品7、8 多一条0.5417 带。各谱带及其相对迁移率如下:

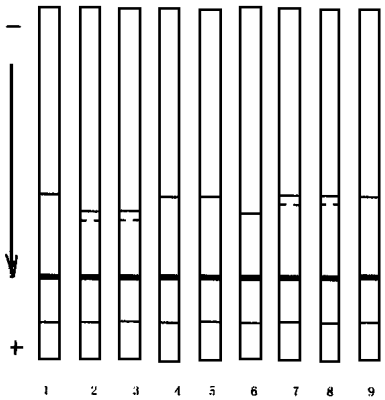


图2 酯酶同工酶谱示意图

谱带	I	II	III	IV	V	VI
Rf	0.5158	0.5417	0.5474	0.5789	0.7579	0.9158

综上所述, 由于两基因的表达, 引起了转基因牵牛的生理生化变化, 从而导致了转基因植株的过氧化物酶同工酶及酯酶同工酶的表达变化。也进一步说明了两基因表达在田间性状变化上起到了作用。但各个处理差异并不完全相同, 这由于酯酶和过氧化物酶同工酶是多基因控制的。外源基因插入植物染色体的位置不同, 很有可能引起各个基因表达情况并不完全相同, 导致同工酶谱并不完全一致。

转化植株与对照植株在株高、叶形等形态特征方面均有明显差异。转化植株生长均比对照植株迟缓。转*ipt* 基因植株比对照植株迟2~5d。转生长素调控基因植株比对照植株迟5~10d, 并出现叶形畸变、畸

变形态各异, 同一植株叶形差异也比较大; 说明外源基因已整合到转基因牵牛基因组中。从而引起牵牛形态特征的变化。因此, 用基因工程的方法改变花色、花形, 延长花期是完全可行的。关于对萌动种胚的转化, 许耀等认为这种受体态种胚的胚性细胞酶活性加强、呼吸作用骤然上升, 糖类、蛋白质以及核酸的合成和转化也迅速地进行, 这时的萌动种胚对外界因子的作用十分敏感, 有利于种胚细胞的转化。我们用根癌农杆菌转化牵牛萌动种胚, 使Ti 质粒及其携带的目的基因转移, 并整合到胚细胞的细胞核中, 从而实现对植物种胚的转化, 短期内获得转基因植株。

用萌动种胚法转化旋花科植物属尝试性实验。经同工酶分析的初步检测, 此法适于牵牛的转基因工作。

## 参考文献

- 1 刘春明. 遗传. 1989, 11(4): 39~42
  - 2 刘耀等. 实验生物学报. 1991, 24(2): 109~117
  - 3 汪清胤. 遗传. 1981, 3(6): 28~30
  - 4 张士文. 哈师大学报. 1984, 2: 105~108
  - 5 汪清胤. 大豆科学. 1994, 13(2): 116~102
  - 6 Horsck B. B et al Scceence 1985, 227: 1229~1231
  - 7 Kuairk O. D T Can J Genet Cytol 1986, 28: 808~817
  - 8 Li Y, et al; Devel qpmental Biolgy. 1992, 153: 386~395
  - 9 Marton. L et al; Natuce 1979, 227: 129~131
- (邮编 150080)

## 巧绑黄瓜蔓

1 叶放阳面, 瓜放阴面 绑蔓时要使黄瓜叶片均匀地摆放在架杆的阳面, 把黄瓜瓜条摆放在架杆的阴面。这样黄瓜瓜条直。

2 采用S 形绑蔓法 在瓜条未座稳之前, 要控制瓜蔓生长, 防止窜秧。绑蔓时要使瓜蔓的弯曲程度大些、绑的道数多些、绳子绑的紧些、密些; 瓜座稳之后则相反。一般1 棵瓜秧绑蔓12~15 道即可。

3 注意绑蔓弯曲程度 根据前后排的高低程度不同来确定绑蔓的弯曲程度。前排瓜架较低, 可以采用长线弯曲, 使瓜叶分布均匀, 并使前排黄瓜的生长点保持一致, 且高度不超过后排。

4 整枝打杈, 适量留瓜 根据其品种特性和温度条件以及栽植密度不同, 保留1~2 条瓜蔓, 及时除去多余瓜蔓。每隔3~4 片叶留1 条瓜, 土壤肥力差, 适当少留些, 反之多留些。

5 注意松蔓打尖 当瓜蔓长到100cm 左右, 瓜纽不多时, 注意及时把已绑好的3~4 道蔓松开, 把瓜秧放到离地33~67cm 高的瓜架上绑好。下放瓜蔓时要使前排低于后排。当黄瓜蔓爬满瓜架时, 要及时打尖, 去除下边的老叶、病叶。(欧阳清)