

转基因结球大白菜分子生物学检测

马伟¹, 屈淑平², 崔崇士², 谢家全¹

(1. 黑龙江中医药大学, 黑龙江 哈尔滨 150040; 2. 东北农业大学, 黑龙江 哈尔滨 150036)

摘要: 采用农杆菌介导法将 TuMV-CP 基因导入结球大白菜中, 建立了高效的大白菜离体再生体系、遗传转化体系, 并对转基因植株进行分子生物学检测, 证实得到的再生植株为转基因植株, 目的基因已在部分植株上表达。同时, 对转基因植株的后代进行检测, 分析该基因所控制性状的遗传稳定性以及基因表达情况, 为大白菜基因工程抗病毒病育种奠定基础。

关键词: 大白菜; 再生植株; 农杆菌; TuMV-CP 基因

中图分类号: S 634.103.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2007)12-0189-03

结球大白菜 (*Brassica campestris* L. ssp. *pekinensis* (Lour.) Olsson) 是我国栽培蔬菜中分布最广, 人们最喜欢食用的蔬菜之一, 在人们日常生活中起着举足轻重的作用。由于病毒病的危害, 在苗期一旦大流行, 常造成局部地区绝产和大面积减产, 严重影响人们生活。芜菁花叶病毒 (TuMV) 属于马铃薯 Y 病毒组 (Potyvirus), 广泛存在于世界各地, 能感染多种重要的蔬菜, 特别是感染十字花科蔬菜。研究的目的是利用农杆菌介导将抗芜菁花叶病毒基因导入结球大白菜中, 对得到抗病毒的结球大白菜转基因植株, 进行分子生物学检测, 为结球大白菜在分子水平抗病毒病育种奠定理论基础。

1 材料与方

1.1 材料

植物受体材料: 供试大白菜 4 个品种二牛心 (A1)、耐病 60 天 (A2)、高潮二牛心 (A3)、东农 901 (A4) 由东北农业大学结球大白菜育种研究室提供。质粒: 表达载体质粒 pBTU 携带芜菁花叶病毒外壳蛋白基因 (TuMV-CP, Turnip mosaic virus coat protein), 具有串联的 35S 启动子和 NOS 终止子, NPT II 筛选标记基因 (Km^r 标记), 该载体由哈尔滨师范大学遗传教研室提供。菌种: 发根农杆菌 R1000 (pRiA4b, Sm^r 标记) 由日本筑波大学遗传学研究中心镰田博先生惠赠。根癌农杆菌 EHA105 (pEHA 105, Cm^r 标记) 为黑龙江省农业科学院惠赠。

1.2 方法

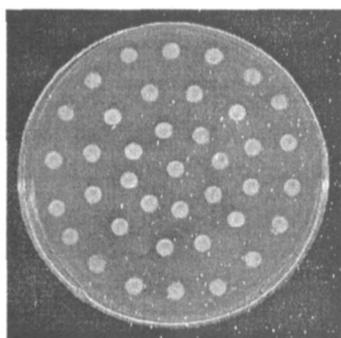


图1 外植体子叶

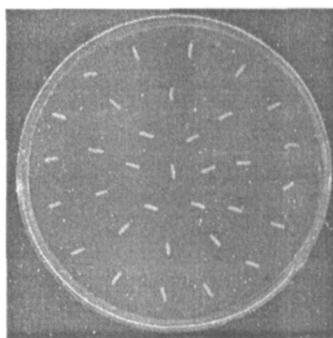


图2 外植体下胚轴

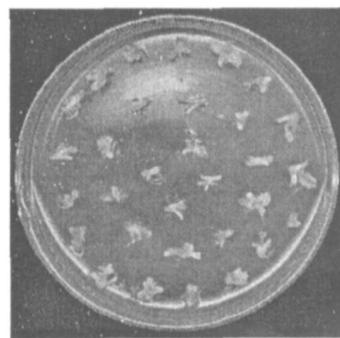


图3 外植体子叶节

农杆菌介导转化法转化的外植体 (子叶、子叶节、下胚轴): 结球大白菜无菌苗培养 5 d 后, 用打孔器打成直

径为 5~6 mm 的子叶圆片, 同时切大小为 5 mm 的下胚轴, 用于遗传转化^[1,2] (见图 1、2、3)。

转基因植株的检测方法: PCR-Southern 杂交检测和转基因植株的 RT-PCR 检测。

2 结果与分析

2.1 转基因植株当代 (T₀) 的 PCR-Southern 杂交检测

对 T₀ 代的不同基因型的不同外植体得到的抗性植株进行检测, 检测结果见表 1、表 2、表 3。

第一作者简介: 马伟 (1969-), 女, 博士, 硕士生导师, 研究方向: 植物遗传育种。E-mail: shwkj@neau.edu.cn.

通讯作者: 崔崇士。

基金项目: 黑龙江省科技厅青年基金资助项目 (Qc01c19)。

收稿日期: 2007-06-26

表 1 T₀代转基因植株检测结果(子叶)

菌株	基因型	抗性植株数	PCR-Southern 阳性植株数	阳性植株比率/%
EHA105	A1	9	2	33.3
	A2	5	0	0.00
	A3	5	1	20.0
	A4	7	1	28.6
R1000	A1	13	2	23.1
	A2	4	1	22.5
	A3	5	0	0.00
	A4	10	0	0.00

注: 阳性植株比率为 PCR-Southern 阳性株数占抗性植株数的百分比。

表 2 T₀代转基因植株检测结果(下胚轴)

菌株	基因型	抗性植株数	PCR-Southern 阳性植株数	阳性植株比率/%
EHA105	A1	3	1	33.3
	A2	0	—	—
	A3	5	0	00.0
	A4	2	0	00.0
R1000	A1	7	1	14.3
	A2	3	0	0.00
	A3	11	1	9.09
	A4	2	0	0.00

注: 阳性植株比率为 PCR-Southern 阳性株数占抗性植株数的百分比。

表 3 T₀代转基因植株的检测(子叶节)

菌株	基因型	抗性植株数	PCR-Southern 阳性植株数	阳性植株比率/%
EHA105	A1	7	1	14.3
	A2	4	0	0.00
	A3	8	1	12.5
	A4	7	1	14.3
R1000	A1	12	1	8.33
	A2	7	1	14.3
	A3	9	0	0.00
	A4	6	0	0.00

注: 阳性植株比率为 PCR-Southern 阳性株数占抗性植株数的百分比。

对 PCR 检测到的 17 株阳性植株进行 PCR-Southern 杂交分子检测。结果(见表 1、表 2、表 3、图 4、图 5)表明, PCR-Southern 检测到 15 株阳性植株, 基本上可以说 PCR 的检测结果是正确的, 因此进一步从 DNA 水平上证实, TuMV 基因已经导入并整合到结球大白菜基因组中。

2.2 转基因植株当代(T₀)的 RT-PCR 扩增检测

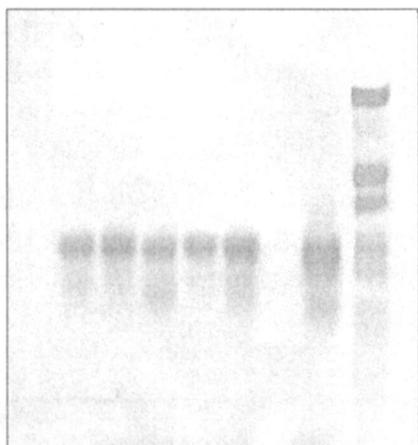


图 4 R1000 转化再生植株 PCR-Southern 检测结果

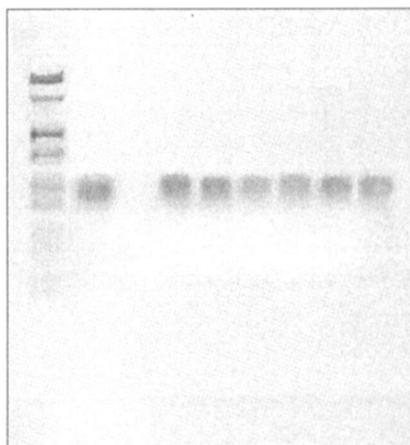


图 5 EHA105 转化再生植株 PCR-Southern 检测结果

注: 图 4 与图 5, 从左至右依次为 Marker 阳性对照、阴性对照、转化植株, 其 Marker 标准分子量 (λDNA/ EcoRI + Hind III) 21227, 5148, 4937, 4268, 3530, 2027, 1904, 1854, 1375, 947, 834, 564, 125)。

表 4 T₀代转基因植株的 RT-PCR 检测的结果

菌株	基因型	PCR-Southern 阳性株数	子叶/株	下胚轴/株	子叶节/株	表达率/%
EHA105	A1		1	0	1	
	A2		0	—	0	
	A3		1	0	1	
	A4		1	0	0	
R1000	A1	15	2	0	1	80.0
	A2		1	1	1	
	A3		0	1	—	
	A4		0	—	—	

RT-PCR 是在 RNA 水平上检测导入的基因是否表达的一种非常灵敏的检测手段。试验对 PCR-Southern 检测为阳性的 15 株植株进行 RT-PCR 检测, 检测的结

表 5 转基因 T₀代检测总结果

菌株	抗性株数	PCR 阳性 植株数	PCR-Southern 阳性植株数	RT-PCR 阳性植株数
EHA105	62	9	8	5
R1000	89	8	7	7
合计	151	17	15	12

果(表 4、图 6)所示。

从表 4 中可见, PCR-Southern 检测得到 15 株阳性植株, 经 RT-PCR 检测得到 12 株呈阳性, 说明导入的基因 80% 可以得到表达, 可见转入的基因, 在后代中表达的机率很高, 但 20% 处于不表达状态, 说明有基因沉默现象存在。

2.3 转基因 T₀代检测总结果

试验过程中发现,转基因 T₀代绝大部分再生植株生长健壮,经低温处理开花结果。但发根农杆菌转化结球大白菜获得的大部分转基因植株结实率低。植株外形上发生了明显的变化,如叶片皱缩,结实率低。这些特征完全符合 Ri 质粒转化植株的特征。

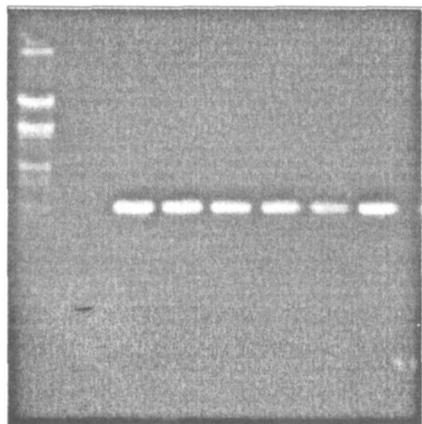


图6 TR-PCR 检测结果

注 以 TuMV-cp 基因序列为引物对提取的质粒 DNA 扩增结果 从左至右依次为: Maker 标准分子量(Pbr322/ BstNI; 1857, 1060, 929, 383, 121, 13); E. coli DH5 α 提取的 pBTU 质粒扩增带, 空白对照; R1000 提取的质粒 DNA 扩增带; EHA105 提取的质粒 DNA 扩增带。

3 讨论

3.1 受体材料的选择

在植物转化过程中寄主本身的参与也是极为重要的。几乎所有研究者的结果都表明,即使同一菌种在不同植物或在不同接种部位,其转化结果都有差异^[3-5]。该研究也证明了这一点,菌株 EHA 105 与 R1000 在不同品种,或在同一品种的不同部位外植体,转化后形成阳性株数都有差异。因而可以确定低日龄优良品种的子叶作为白菜转基因最佳受体材料。

3.2 灵敏的检测手段

RT-PCR 法的高灵敏性使人们在不损伤转基因植株的情况下对不同部位的转入基因表达状况进行检测^[6]。RNA 水平上通过 RT-PCR 进一步确定整合到大白菜基因组 TuMV-cp 基因是否正常的转录。由于 RNA 提取试验条件要求苛刻,并且许多试剂有毒,因而受到了很大的限制。在植物表达检测方面应用的更少,所以试验采用这种方法也是一种新的尝试。试验结果证明,进一步确定外源基因已整合到大白菜中,并在大白菜中表达。同时证明这种检测方法也是可靠的。

3.3 基因沉默现象

基因沉默现象在植物转基因研究中普遍存在。试验也出现了基因沉默现象,转基因沉默现象的发生与外界环境及人为因素紧密相关。不同光照、温度、培养条件、环境胁迫以及有性杂交、嫁接等处理都会造成转基因沉默,所以在将来的白菜转基因中研究外界条件对转基因沉默影响也十分必要。

4 结论

大白菜转基因植株 T₀代,经 PCR、PCR-Southern 检测已证实导入目的基因已整合到植物基因组中,得到阳性株 15 株,但经 RT-PCR 检测只有 12 株表达,证明一部分植株中有基因沉默现象。

参考文献

- [1] 蔡小宁. 影响结球大白菜离体再生及基因转化的因素研究[J]. 江苏农业研究, 1999, 20(3): 67-71.
- [2] 蔡小宁. 建立青菜农杆菌介导法基因转化体系[J]. 江苏农业学报, 1997, 13(2): 110-114.
- [3] 成细华, 刘凡. 白菜类作物转基因技术研究进展[J]. 首都师范大学学报(自然科学版), 2000, 21(2): 64-71.
- [4] 郭亚华, 徐香玲. Ri 质粒介导 TMV 和 CMV 外壳蛋白基因转化甜椒研究[J]. 北方园艺, 2000(4): 17-18.
- [5] 秦新民. 小白菜子叶离体培养再生系统的建立[J]. 广西师范大学学报(自然科学版), 1997, 15(4): 90-93.
- [6] 普淑英, 宫云浩. 用 RT-PCR 技术检测蓝乱病毒的研究[J]. 动物检疫, 1993, 10(6): 17-19.

The Detection by the Method of Molecular Biology in Transforming Chinese Cabbage

MA Wei¹, QU Shu-ping², CUI Chong-shi², XIE Jia-quan¹

(1. Heilongjiang University of Chinese Medicine, Harbin 150040, China; 2. Northeast Agricultural University, Heilongjiang Harbin 150036, China)

Abstract: The Research transforms Chinese cabbage using Agrobacterium-mediated method. A high effective regeneration and genetic transformation system has been established. The detection by the method of molecular biology, has proved that the regenerative plants are transgenic progenies were traced and investigated so that heredity, stability and expression of target gene were researched, the virus resistant, stable plants were expected to obtain so that theoretical base can be established for Chinese cabbage breeding by gene engineering.

Key words: Chinese cabbage; Regenerate plant; Agrobacterium; TuMV-CP gene