

# 转番茄 *Bax inhibitor-1* 基因烟草悬浮细胞系的建立

刘金娜, 张秀清, 马秋敏, 车英慧, 王晓曦, 曲桂芹

(中国农业大学 食品科学与工程营养学院 北京 100083)

**摘要:** 利用农杆菌侵染获得转番茄 *Bax inhibitor-1* (*LeBI-1*) 基因的抗性烟草植株, 进行了 PCR 鉴定和共聚焦扫描显微镜检测; 同时以 MS 为基本培养基研究植物生长调节剂的最佳配比和浓度对建立野生型和转基因烟草悬浮细胞素的影响。结果表明: PCR 鉴定为阳性, 并检测到绿色荧光蛋白, 而且 6-BA 浓度在 0.2 mg/L、NAA 浓度为 2.0 mg/L 条件下, 可建立野生型和转基因烟草稳定的悬浮细胞系。

**关键词:** 转基因; 悬浮细胞系; 绿色荧光蛋白(GFP); *Bax inhibitor-1*

**中图分类号:** S 641.2 **文献标识码** A **文章编号:** 1001-0009(2010)24-0149-03

植物细胞悬浮培养由于其分散性好, 细胞形状及细胞团大小大致相同, 而且生长迅速, 重复性好, 易于控制等有利因素, 被广泛应用<sup>[1]</sup>。*Bax inhibitor-1* (BI-1) 是细胞程序化死亡 (Programed Cell Death) 调控过程中少数几个动植物同源的蛋白, 进化上非常保守。*Bax inhibitor-1* 基因过表达可抑制 Bax、真菌毒素及非生物胁迫诱导的细胞死亡<sup>[2,3]</sup>, 已有研究表明, BI-1 基因作为延缓或抑制生物或非生物胁迫引起衰老和死亡的重要调控因子, 并在植物的衰老及与胁迫的相互作用中发挥着重要的作用。因此, 该试验试图建立悬浮细胞系, 从细胞水平研究 *LeBI-1* 基因在植物生物和非生物胁迫中可能的功能。

该研究目的在于鉴定得到转基因植株, 并建立野生型和转基因烟草稳定的悬浮细胞系, 研究确认了烟草愈伤组织及细胞悬浮培养的最佳培养条件, 为在细胞水平研究 *LeBI-1* 基因的功能提供了基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

用于农杆菌转化的烟草为三生烟 (*Nicotiana tabacum* cv. Samsun NN)。经 PCR、Southern blot 鉴定为阳性的植株获得的烟草种子, 经卡那霉素筛选用于后续

的试验。过表达 *LeBI-1* 基因的烟草种子分别编号为 OE1 和 OE2。共聚焦扫描显微镜 (Leica TCS SP5); 以 MS 为基本培养基 30 g/L 蔗糖, pH 5.8, 琼脂 8 g/L。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 转 *LeBI-1* 基因烟草的鉴定** 野生型和转基因植株叶片的 DNA 提取: 首先 65℃ 预热 CTAB 提取缓冲液 (50 mM Tris-Cl pH 8.0; 0.7 mM NaCl; 10 mM EDTA pH 8.0; 2% CTAB; 临用前加 40 mM-巯基乙醇); 约 1 g 叶片于液氮中研磨至粉状, 把粉末倒入含有 2 mL CTAB 缓冲液的离心管中, 颠倒混匀。65℃ 保温 1 h, 期间颠倒混匀几次; 加入等体积酚/氯仿, 颠倒数次, 10 000 r/min 离心 10~15 min; 取上清, 加入 2/3 体积异丙醇, 小心混匀, -20℃ 放置 30 min 以上沉淀 DNA; 10 000 r/min 离心 10 min, 75% 乙醇洗涤; 离心并吹干沉淀, 溶于适量 TE, RNase (10 mg/mL) 至 20 μg/mL, -20℃ 保存; PCR 鉴定: 用 35 S (上游引物 CTg ATg gTT AgA gAg gcT TAC gC 和下游引物 ATA gCT CAA Tgg AAT CCg Ag) 和 GFP (上游引物 gTg CTT CAg CCg CTA CCC 和下游引物 AgT TCA CCT TgA TgC CgT TC) 的 5' 和 3' 引物, 在 0.2 mL 的 PCR 管中加入提取的基因组, 建立 25 μL 反应体系进行 PCR 扩增。扩增产物用琼脂糖凝胶电泳检测是否有目的条带的出现。

**1.2.2 烟草种子的消毒与播种** 将野生型和转 *LeBI-1* 基因的烟草种子用无菌水浸泡 1 min, 用浓度 75% 酒精浸洗 1 min, 无菌水再洗 1 次, 在浓度 3%~4% NaClO 溶液中浸洗 7 min; 经无菌水洗 5~6 次后, 播种于不含植物生长调节剂的 1/2MS 培养基上。将培养瓶封好放在 (25±2)℃ 组织培养室暗培养, 待其发芽。

**1.2.3 基本培养基的配制与灭菌** 基本培养基: MS+3% 蔗糖+1% 硬度为 900 的琼脂粉, 再根据需要加入适

第一作者简介: 刘金娜 (1986), 女, 在读硕士, 研究方向为食品生物技术。E-mail: anna.liujinna@gmail.com。

通讯作者: 曲桂芹 (1970), 女, 副教授, 现主要从事食品生物技术方面的研究工作。

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30500352); 国家公益性行业 (农业) 科研专项资助项目 (200803033-B0602-03); 中央高校基本科研业务费专项资助项目 (2001-1-83)。

收稿日期: 2010-10-25

量植物生长调节剂; 液体培养基: MS+3%蔗糖, 再根据  
需要加入适量植物生长调节剂; 播种培养基: 1/2MS+  
3%蔗糖+1%硬度为 900 的琼脂粉。用浓度 1M NaOH  
调其 pH 为 5.8~6.0, 放入高压灭菌锅中, 121℃下灭菌  
15 min, 灭好菌后趁热将培养基分装在培养瓶或者平皿中。

1.2.4 无菌材料的培养及愈伤组织的诱导与继代培养

外植体的接种: 播种 3~4 d 种子开始发芽, 将种子移  
到 16 h/8 h 光周期下培养, 用剪刀取发芽四周的烟草叶  
片。用剪刀和镊子将叶子切成 2 mm×2 mm 的小块接  
种于含有植物生长调节剂的培养基上, 放置于 (25±

2)℃、16 h 光/8h 暗的光周期下培养。愈伤组织的诱导  
与继代培养: 以 MS 作为基本培养基, 在其中添加不同浓  
度的 NAA, 2, 4-D 和 6-BA。2 或 3 种激素的浓度组合设  
18 个处理(表 1), 3 次重复。将烟草无菌外植体接种到  
不同的激素配比(表 1)的 MS 培养基上 28℃暗培养 2~3  
周, 观察接种培养的外植体生长分化的情况。选择使烟  
草细胞脱分化程度高, 培养生长快的培养配方, 以此为  
基础对所添加的激素做进一步细微的调整处理。并用  
此培养基进行继代培养, 以及在此基础上调整作为建立  
烟草悬浮细胞的生长培养基<sup>[46]</sup>。

表 1 MS 基本培养基中添加各种植物生长激素处理

激素	处理																	
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16	17	18
2,4-D	0	0	0	0	0	0	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	0.5	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0
6-BA	0.2	0.5	0.2	0.5	0.2	0.5	0.2	0.5	0.2	0.5	0.2	0.5	0.2	0.5	0.2	0.5	0.2	0.5
NAA	1.0	1.0	1.5	1.5	2.0	2.0	1.0	1.0	1.5	1.5	2.0	2.0	1.0	1.0	1.5	1.5	2.0	2.0

1.2.5 悬浮细胞系的建立 经 3~4 代驯化继代, 取 2 g  
FW 疏松易碎的愈伤组织放入盛有 50 mL MS 液体培养  
基的 250 mL 三角瓶中, 在摇床上 120 r/min, 25℃, 黑暗  
或弱光下培养。培养初期 悬浮细胞培养物可能呈现粘  
稠状, 可以进行短间隔(2~3 d)更换新鲜培养基, 继代一  
段时间后, 这种情况可自行消失。大概 7~9 d 按 30%~  
40%接种量继代培养 1 次, 继代时将培养物摇匀, 静置片  
刻, 用吸管吸取培养基中部的培养物(此处细胞团小而  
均一, 细胞质浓厚), 加入另一无菌三角瓶中, 然后添加  
新鲜培养基<sup>[78]</sup>。另外, 可用 20 目无菌细胞筛过滤, 以除  
去大细胞团; 用 80 目无菌细胞筛过滤细胞悬浮液, 得到  
较纯净的细胞悬浮液。

1.2.6 转基因烟草细胞的绿色荧光检测 融合 GFP 的  
*LeBI-1* 的烟草细胞在 488 nm 紫外波长的光激发下, 使用  
520 nm 滤镜观察 会发出绿色荧光。利用这种特点,  
用共聚焦显微镜观察绿色荧光现象, 并进一步确定过表  
达品种<sup>[9-10]</sup>。

2 结果与分析

2.1 转基因植株的初步 PCR 鉴定

无菌苗生长 2 周, 剪取 1~2 片叶子用 CTAB 法提  
取叶片中总 DNA。PCR 检测结果(图 1)表明, 可以扩增  
出预期的 500 bp 和 300 bp 的特异性条带, 但野生型植  
株则未扩增出相应的条带, 初步显示 *LeBI-1* 基因已经  
在 OE1 和 OE2 烟草植株中过表达。

2.2 不同培养基对愈伤组织形成的影响

选用表 1 对各激素诱导烟草愈伤状况进行观察, 所  
有的激素配比都可以诱导外植体产生愈伤组织, 接种 1  
周左右愈伤组织开始形成。2, 4-D 有抑制芽分化的作  
用, 但是对细胞生长是不利的, 超过 0.5 mg/L 就会引起  
愈伤组织的褐变; 6-BA 浓度太高时易导致芽的分化严

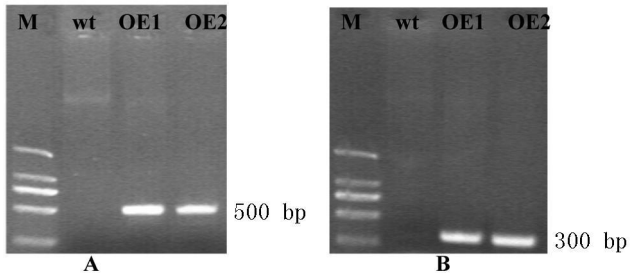


图 1 转基因烟草的 PCR 检测

注: M: 2 000 bp DNA 标准分子量; wt: 野生型烟草; OE1/OE2, *LeBI-1* 过表达烟草; A: 35S 引物扩增 B: GFP 引物扩增。

重, 太低又伴有根的分化; NAA 浓度高时, 愈伤组织颜  
色较深, 有根的分化, 浓度低时芽分化严重。根据其生  
长情况选择使烟草分化程度高, 培养生长快 颜色微黄  
得到疏松易碎愈伤组织的培养基配方。结合观察现象,  
在(处理 5)6-BA 0.2 mg/L+NAA 2.0 mg/L, (处理 10)  
2, 4-D 0.5 mg/L+6-BA 0.5 mg/L+NAA 1.5 mg/L 和  
(处理 12)2, 4-D 0.5 mg/L+6-BA 0.5 mg/L+NAA 2.0  
mg/L 3 种培养基上生长情况要好。烟草愈伤组织的最  
佳诱导培养基为: MS+6-BA 0.2 mg/L+NAA 2.0  
mg/L。

2.3 烟草细胞的绿色荧光检测

为进一步验证 PCR 检测结果的可靠性, 对上述转  
基因细胞系进行报告基因 GFP 的荧光检测。转入融合  
EGFP 的 *LeBI-1* 的烟草细胞在 488 nm 紫外波长的光激  
发下, 使用 520 nm 滤镜观察, 会发出绿色荧光。在共聚  
焦显微镜下, 观察到发绿色荧光的烟草细胞, 绿色荧光  
主要分布在细胞膜和细胞核膜上(图 2)。同样条件下,  
野生型 wt 没有检测到绿色荧光。



图2 烟草悬浮细胞的绿色荧光检测  
注: wt: 野生型烟草, OE1\OE2, *LeBI-1* 过表达烟草。

3 讨论

愈伤组织的生长状态直接影响着建立的悬浮细胞系的质量。因此,应挑选那些颗粒细小、疏松易碎、呈淡黄色的愈伤组织进行继代,并经过不断“改造”和筛选才能建立稳定的悬浮细胞系。合适的培养基及激素配比,对愈伤组织和悬浮细胞的生长有很大的影响,所以在培养悬浮细胞时应该选择有利于细胞生长的激素组合,促进细胞的更新换代。

该研究表明,适合愈伤组织生长的是处理5培养基附加6-BA 0.2 mg/L+NAA 2.0 mg/L,一般用同样成分的液体培养基进行悬浮细胞的培养,可建立良好的悬浮细胞系。转基因植株的鉴定,通过PCR技术初步鉴定转*LeBI-1*基因植株,但是假阳性率比较高,而Southern检测虽然可靠性高但是过程比较麻烦,耗时长<sup>[1]</sup>。所以直接利用GFP荧光检测,既方便又不会破坏植物组织,尤其是用共聚焦扫描显微镜检测GFP更增加了检测的准确性和可靠性。它为快速、便捷地检测转基因植株提供了一个很好的方法。

参考文献

[1] 赖纳特,约曼.植物细胞和组织培养:实验手册[M].北京:北京大学出版社,1988.

[2] Pennell Roger. Programmed Cell Death in Plants[J]. The Plant Cell, 1997(9): 1157-1688.  
[3] Ellis R E, Yuan J, Horvitz H R. Mechanisms and functions of cell death[J]. Annu. Rev. Cell Biol., 1991(7): 663-698.  
[4] 许智宏,刘桂云.烟草组织培养中愈伤组织和芽形成的细胞学观察[J].植物学报,1980,22(1):1-4.  
[5] 许智宏,王雄,刘桂云.烟草叶组织培养中器官形成的研究[J].植物生理学报,1978,4(2):177-182.  
[6] Gupta G R P, Guha S, Maheshwari S C. Differentiation of buds from leaves of *Nicotiana tabacum* Linn. in sterile culture[J]. Phytomorphol, 1966, 16: 175-182.  
[7] 吴春霞.植物细胞悬浮培养的影响因素[J].安徽农业科学,2009,37(1):36-38.  
[8] 赵文明,杨万年.一种改进的烟草悬浮细胞继代方法[J].植物生理学通讯,2007;43(3):613-614.  
[9] Chalfie M, Tu Y, Euskirchen G, et al. Green Fluorescent Protein as a Marker for Gene Expression[J]. Science, 1994, 263: 802-805.  
[10] Stewart. GFP Help Monitor Transgenic Plants[J]. Biophotonics News, 2000(3): 117.  
[11] 杨明喻,曲桂芹.利用绿色荧光蛋白 GFP 作为报告基因检测转基因植物[J].食品与生物技术学报,2008,27(2):98-102.

(注:该文作者还有纪翔、田慧琴,单位同第一作者。)

Establishment of Suspension Cell Line of Tomato  
*Bax inhibitor-1* Gene in Transgenic Tobacco

LIU Jin-na, ZHANG Xiu-qing, MA Qiu-min, CHE Ying-hui, WANG Xiao-xi, JI Xiang, TIAN Hui-qin, QU Gui-qin  
(College of Food Science and Nutritional Engineering, China Agricultural University, Beijing 100083)

**Abstract:** Using *Agrobacterium* infection acquired transgenic resistant tobacco plants from tomato *Bax inhibitor-1* (*LeBI-1*) gene were detected by PCR and confocal laser scanning microscope. By MS as basic medium, the effect plant growth regulators on the establishment of wild-type and stable suspension cell line of transgenic tobacco. The results showed that PCR identified as positive, and green fluorescent protein was detected, under the conditions in 6-BA concentration was 0.2 mg/L and NAA concentration was 2.0 mg/L can be established of wild-type and stable suspension cells of transgenic tobacco.

**Key words:** transgenic; suspension cell line; green fluorescent protein (GFP); *Bax inhibitor-1*