

白细胞介素-4 基因转化胡萝卜的研究

高 金 秋^{1,2}, 于 丽 杰¹, 陶 雷^{1,3}

(1. 哈尔滨师范大学 生命科学与技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150025; 2. 白城师范学院 生命科学学院, 吉林 白城 137000;

3. 东北林业大学 生命科学学院, 黑龙江 哈尔滨 150040)

摘 要:以胡萝卜‘长城红玥’与‘开拓者’胚轴为受体材料,研究了菌种、预处理、农杆菌菌液浓度、侵染时间和共培养时间对胡萝卜胚轴转化率的影响。结果表明:C58C1 菌株对胡萝卜胚轴伤害较小;‘长城红玥’以 7 日龄无菌苗于 4℃ 预处理 3 d,经 3.2×10^7 个/mL 农杆菌菌液侵染 6 min,共培养 3 d,转化率可达 60%;‘开拓者’以 7 日龄无菌苗于 4℃ 预处理 3 d,经 4.8×10^7 个/mL 农杆菌菌液侵染 10 min,共培养 4 d,或 7 日龄无菌苗于 4℃ 预处理 10 d,经 3.2×10^7 个/mL 农杆菌菌液侵染 10 min,共培养 2 d 转化率可达 100%;但 2 个品种均以 7 日龄无菌苗于 4℃ 预处理 3 d,经 1.6×10^7 个/mL 农杆菌菌液侵染 2 min,共培养 2 d,可得最多转化苗。

关键词:胡萝卜;白细胞介素-4 基因(*il-4* 基因);遗传转化;根癌农杆菌

中图分类号:Q 943.2;812 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)24-0115-05

近年来,随着基因工程等生物技术的不断发展,已有 10 余种药用蛋白或疫苗在胡萝卜中成功表达^[1]。白细胞介素-4(*il-4*)由 Howard 于 1982 年发现,是一种结构复杂、功能广泛的免疫调节因子,由辅助性 T 细胞产生,作用于体内多种免疫活性细胞包括 B 细胞、T 细胞、巨噬细胞等,增强免疫球蛋白(IgE)介导的体液免疫和杀伤细胞的杀伤能力^[2]。目前市售白细胞介素-4 是由原核或酵母表达纯化工艺生产的重组人白细胞介素-4^[3-4],价格较昂贵;而以胡萝卜(*Daucus carota*)作为生物反应器生产白细胞介素-4 尚鲜见报道。胡萝卜作为生产药用蛋白的生物反应器具有生产成本低、产量高、安全等优点,且胡萝卜作为人们食用最多蔬菜之一,为人们提供多种营养(含有丰富的糖类、蛋白质、脂肪、纤维素和胡萝卜素——维生素 A 的前体)^[5],可凉拌生食,能避免因高温蒸煮导致的营养因子破坏。如果通过食用转基因蔬菜就能达到预防和治疗疾病的目的,这在医学上将具有重要的现实意义。

1 材料与方法

1.1 试验材料

外植体:‘开拓者’和‘长城红玥’7 日龄无菌苗经预处理后的胚轴(如无特殊说明该文所指胡萝卜胚轴皆为这 2 个品种)。其种子来源分别为辽宁园艺种苗有限公司和中种集团承德长城种子有限公司出售的商业用种。

质粒与菌种:供试质粒 P2IL4(图 1)和 P4IL4(图 2)为哈尔滨师范大学植物学科黑龙江省重点实验室构建,并已被分别转入根癌农杆菌菌株 EHA105(pEHA105, Rif^r)和 C58C1(pMP90, Rif^r)中,重命名为 E-P2、C-P2、E-P4 和 C-P4;含 P4IL4 质粒的植物筛选标记为 PPT。



图 1 P2IL4 质粒的部分图谱

Fig. 1 Part of P2IL4 plasmid map



图 2 P4IL4 质粒的部分图谱

Fig. 2 Part of P4IL4 plasmid map

PCR 扩增体系为 10 μ L,其中 10 \times PCR buffer 1 μ L;上下游引物各 0.1 μ L (20 μ mol/L);dNTP 0.8 μ L (2.5 mmol/L each);*rTaq* 0.08 μ L (5 U/ μ L);以上试剂由大连宝生物有限公司提供,剩余体积由无菌水补齐。

1.2 试验方法

1.2.1 遗传转化体系的建立 无菌苗的培养:在超净工

第一作者简介:高金秋(1976-),女,硕士,讲师,研究方向为植物分子生物学,现主要从事基因工程及植物组织培养等的教学工作。E-mail:wawa760824@yahoo.com.cn.

责任作者:于丽杰(1961-),女,博士,教授,现主要从事植物分子生物学等的教学与科研工作。E-mail:yulijie1961@126.com.

基金项目:黑龙江省自然科学基金资助项目(C0014);黑龙江省普通高等学校骨干教师创新能力计划资助项目。

收稿日期:2012-09-11

作台上,将浸泡 2~4 h 的胡萝卜种子用 75%酒精消毒 2 min,无菌水冲洗 1 次,再用安替福民原液消毒 40 min,无菌水冲洗 5 次后,接种于 MS 培养基上,置于 28℃、16 h/d 散射光下培养 7 d。卡那霉素筛选浓度的确定:取‘开拓者’胚轴分别接种于含卡那霉素为 0、5、10、15、25、50、75、100 和 125 mg/L 的胚性愈伤组织诱导培养基上^[6],每个培养皿接种 15 个外植体左右。PPT 筛选浓度的确定:取胡萝卜胚轴分别接种于含 PPT 为 0、0.2、0.4、0.6、0.8 和 1.0 mg/L 的胚性愈伤组织诱导培养基上。每个培养皿接种 15 个外植体。抑菌剂浓度的确定:取胡萝卜胚轴分别接种于含头孢曲松钠为 0、200、300 和 500 mg/L 的胚性愈伤组织诱导培养基上,每个培养皿接种 15 个外植体。最佳菌种的确定:取 7 日龄‘开拓者’无菌苗经 4℃ 3 d 预处理,切取胚轴上段 0.5~1.0 cm,与用 MS 液体培养基稀释至浓度为 1.6×10^7 个/mL 的 4 种根癌农杆菌(E-P2、C-P2、E-P4 和 C-P4)分别侵染 2 min,置于胚性愈伤组织诱导培养基上共培养 2 d,然后用无菌水冲洗胡萝卜胚轴 6 次,将其在含 200 mg/L 头孢曲松钠的无菌水中浸泡 5 min 后,再用无菌水冲洗 1 次,最后接种于含头孢曲松钠 500 mg/L+Kan 7.5 mg/L(P2IL4 质粒)或 PPT 0.7 mg/L(P4IL4 质粒)的胚性愈伤组织诱导培养基上进行筛选培养。4 周后转入含头孢曲松钠 300 mg/L+Kan 7.5 mg/L(P2IL4 质粒)或 PPT 0.7 mg/L(P4IL4 质粒)的 B5 培养基上继续培养。以后每隔 4 周左右继代 1 次,获得抗性植株。胡萝卜的遗传转化:为优化遗传转化方案,采用正交表 $L_9(3^4)$ 进行实验处理(表 1),处理组合见表 3、4,具体实施操作同最佳菌种的确定,菌种为 C-P4。

表 1 因素水平

Table 1 Factors and levels

水平 Levels	A 预处理 Pretreatment	B 农杆菌菌液浓度 Agrobacterium bacterial concentration/个·mL ⁻¹	C 侵染时间 Infection time /min	D 共培养时间 Co-culture days/d
1	7 日龄无菌苗 4℃ 3 d	1.6×10^7	2	2
2	7 日龄无菌苗 4℃ 10 d	3.2×10^7	6	3
3	7 日龄无菌苗室温 3 d	4.8×10^7	10	4

1.2.2 PCR 检测 根据 *il-4* 基因序列,实验室自行设计了 PCR 上、下游引物。取‘长城红玥’和‘开拓者’抗性再生植株叶片 100~200 mg 以 CTAB 法提取总基因组 DNA^[7],以含 *il-4* 的质粒 DNA 为阳性对照,以未转基因植株总 DNA 为阴性对照,以无菌水为空白对照,进行 PCR 扩增。PCR 的扩增条件:95℃预变性 5 min;94℃变性 1 min;52.6℃退火 30 s;72℃延伸 1 min;循环 35 次;72℃延伸 10 min;4℃保温。PCR 产物加 2 μ L 溴酚蓝混匀,1%琼脂糖凝胶电泳,凝胶成像系统检测电泳结果。

1.2.3 PCR-Southern 检测 按 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I(Roche)进行 PCR-

Southern 检测。

2 结果与分析

2.1 遗传转化体系的建立

2.1.1 卡那霉素筛选浓度的确定 接种 30 d 后发现,当卡那霉素浓度 ≥ 10 mg/L 时,‘开拓者’的胚轴外植体不分化。当卡那霉素浓度为 5 mg/L 时,‘开拓者’的胚轴有少量的生长。据此,在筛选转化体时,将卡那霉素的选择浓度定为 7.5 mg/L。

2.1.2 PPT 筛选浓度的确定 接种 30 d 后,当 PPT 浓度为 0.6 mg/L 时,‘长城红玥’的胚轴有极少量分化,‘开拓者’胚轴有少量分化。当 PPT 浓度为 0.8 mg/L 时,二者胚轴都不分化。据此,在筛选转化体时,将 PPT 的筛选浓度定为 0.7 mg/L。

2.1.3 抑菌剂浓度的确定 30 d 后观察到外植体都能够正常分化。据此,确定筛选培养基中头孢曲松钠浓度为 500 mg/L,在继代过程中逐渐降至 200 mg/L。

2.1.4 最佳菌种的确定 待抗性植株达 3 片真叶时,进行 PCR 检测。以 PCR 扩增 3 次皆为阳性作为鉴定阳性植株标准,并计算转化率(转化率=PCR 阳性株/筛选标记抗性株 $\times 100\%$)(遗传转化结果分析指标与此相同)。由表 2 可知,当以携带不同质粒的 EHA105 菌株侵染外植体时,其转化效率与携带不同质粒的 C58C1 菌株相比要低得多,被 E-P4 侵染的外植体甚至不能分化出 PPT 抗性的再生植株。这说明对于胡萝卜而言,EHA105 菌株的毒性要强于 C58C1 菌株。对于携带不同质粒的 C58C1 菌株而言,C-P2 的转化率为 36.0%,C-P4 的转化率为 32.1%,二者的转化效率经 χ^2 检验,差异不显著($\chi^2=0.09$, $\chi_{0.05,1}^2=3.84$),说明 2 种质粒无差异。对于转基因食品而言,也许 C-P4 菌株将更具安全性,据此,将转化菌种定为 C-P4。

表 2 菌株对‘开拓者’胚轴遗传转化的影响

Table 2 Effects of different strains on

hypocotyls genetic transformation frequency of ‘Kaituoze’

菌种 Strains	抗性株数 Resistant plants number/株	阴性株数 Negative plants number/株	阳性株数 Positive plants number/株	转化率 Transformation frequency/%
E-P2	6	5	1	16.7
C-P2	25	16	9	36.0
E-P4	0	0	0	0
C-P4	28	19	9	32.1
总数	59	40	19	

2.2 胡萝卜遗传转化体系的优化

当侵染后的胡萝卜胚轴接种在共培养的培养基上时,肉眼观察,胚轴表面无明显的农杆菌菌液,也未见胚轴有明显伤害;共培养 3 d 后可见胚轴周围已有明显的农杆菌菌落出现;抑菌后可见胚轴两端稍有失水性萎蔫,且轻微褐化;侵染后 3 个月左右时,胚轴分化出抗性愈伤组织,侵染后 4 个月左右时,胚轴分化出抗性体细

胚胚;侵染后 5 个月左右胚轴分化出抗性苗。对抗性苗进行 PCR 检测,结果见表 3、4。

由表 3 可知,对‘长城红玥’胚轴转化率的影响,预处理 A>共培养时间 D>农杆菌菌液浓度 B>侵染时间 C;预处理和共培养时间对目的基因的转化率影响更大,其中以在 4℃下预处理 3 d、侵染后共培养 3 d 的效果为好;农杆菌的菌液浓度 B 和侵染时间 C 对胡萝卜的转化率影响相对较小,菌液浓度为 1.6×10^7 个/mL 和 3.2×10^7 个/mL 个处理对转化率的影响差异不大,但随着菌液浓度的增加,转化率有下降趋势, 4.8×10^7 个/mL 处理的转化率明显降低;侵染时间 6 和 10 min 的处理对转化率的影响不明显,侵染 2 min 的处理转化率相对较低。综上所述,‘长城红玥’胚轴的适宜转化条件为 $A_1 B_{1(2)} C_{2(3)} D_2$,从该试验的结果看, $A_1 B_2 C_2 D_2$ 的处理组合转化率最高,达 60.00%。但是,在农杆菌介导的遗传转化体系中,如果过分强调转化率而忽视分化率,则有失偏颇。因为如果外植体在设定的转化条件下不能很好地完成再生过程,不能分化出大量的筛选标记抗性植株,遗传转化也就无从谈起了。综合体细胞胚的分化能力,在后续的转化试验中采用 $A_1 B_1 C_1 D_1$ 转化体系。

表 3 ‘长城红玥’胚轴遗传转化正交实验
结果的直观分析

Table 3 The visual analysis of the orthogonal experiment results in hypocotyls genetic transformation of ‘Changchenghongyue’

试验号 Treatment No.	A	B	C	D	抗性植株数 Resistant plants number/株	阳性植株数 Positive plants number/株	转化率 Transformation frequency/%
1	A ₁	B ₁	C ₁	D ₁	65	19	29.23
2	A ₁	B ₂	C ₂	D ₂	5	3	60.00
3	A ₁	B ₃	C ₃	D ₃	15	5	33.33
4	A ₂	B ₁	C ₂	D ₃	10	2	20.00
5	A ₂	B ₂	C ₃	D ₁	0	0	0
6	A ₂	B ₃	C ₁	D ₂	0	0	0
7	A ₃	B ₁	C ₃	D ₂	16	6	37.50
8	A ₃	B ₂	C ₁	D ₃	6	1	16.67
9	A ₃	B ₃	C ₂	D ₁	0	0	0
T1	122.56	86.73	45.90	29.23			
T2	20.00	76.67	80.00	97.50			
T3	54.17	33.33	70.83	70.00			
\bar{x}_1	40.85	28.91	15.30	9.74			
\bar{x}_2	6.67	25.56	26.67	32.50			
\bar{x}_3	18.06	11.11	23.61	23.33			
R	34.18	17.80	11.37	22.76			

由表 4 可知,对于‘开拓者’胚轴转化率的影响,4 个参试因子的比较结果是预处理(A)>农杆菌菌液浓度(B)>侵染时间(C)>共培养时间(D);虽然 A、B、C 3 个因子相互间对‘开拓者’胚轴转化率的影响差异不大,但它们的水平间对转化率的影响差异较大,而共培养时间对‘开拓者’胚轴转化率的影响相对的要小,共培养时间以 D₁(1 d)或 D₃(3 d)时,转化率高且差异不大。预处理以 A₁(4℃ 3 d)时最好,农杆菌菌液浓度以 B₂

(3.2×10^7 个/mL)最好,侵染时间以 C₃(10 min)最好,共培养时间以 D₁(1 d)或 D₃(3 d)时最好;确定的最佳转化组合应为 $A_1 B_2 C_3 D_{1(3)}$,但表 4 中所显示的最佳处理组合分别为 $A_1 B_3 C_3 D_3$ 和 $A_2 B_2 C_3 D_1$,说明试验因子间有交互作用存在。应选择能满足分析其交互作用的试验设计表进行进一步试验,该试验结果显示的最佳转化处理组合转化率达 100%,但分化率较低,综合体细胞胚的分化能力,在后续试验中采用 $A_1 B_1 C_1 D_1$ 转化体系。

表 4 ‘开拓者’胚轴遗传转化的正交实验
结果的直观分析

Table 4 The visual analysis of the orthogonal experiment results in hypocotyls genetic transformation of ‘Kaituozehe’

试验号 Treatment No.	A	B	C	D	抗性植株数 Resistant plants number/株	阳性植株数 Positive plants number/株	转化率 Transformation frequency/%
1	A ₁	B ₁	C ₁	D ₁	28	9	32.14
2	A ₁	B ₂	C ₂	D ₂	11	6	54.55
3	A ₁	B ₃	C ₃	D ₃	4	4	100
4	A ₂	B ₁	C ₂	D ₃	8	1	12.50
5	A ₂	B ₂	C ₃	D ₁	3	3	100
6	A ₂	B ₃	C ₁	D ₂	0	0	0
7	A ₃	B ₁	C ₃	D ₂	3	0	0
8	A ₃	B ₂	C ₁	D ₃	13	4	30.78
9	A ₃	B ₃	C ₂	D ₁	17	2	11.76
T1	186.69	44.64	62.92	143.90			
T2	112.50	185.33	78.81	54.55			
T3	42.54	111.76	200	143.28			
\bar{x}_1	62.23	14.88	20.97	47.97			
\bar{x}_2	37.50	61.78	26.27	18.18			
\bar{x}_3	14.18	37.25	66.67	47.76			
R	48.05	46.90	45.70	29.79			

2.3 PCR 扩增结果

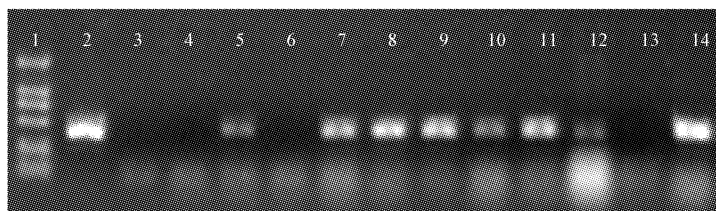
以抗性植株的总 DNA 为模板进行 *il-4* PCR 扩增。由图 3 所示,目的条带在 DL 2000 marker 250~500 bp 之间大约 400 bp 位置,阳性对照和部分 DNA 样品均可见清晰的阳性条带,而阴性对照(未转化植株)和空白对照(水)无特异条带。

2.4 PCR-Southern 检测结果

随机选取 11 株经 PCR 扩增为阳性的植株,进行 PCR-Southern 检测,结果见图 4。试验结果表明,阳性对照有杂交带,阴性对照(未转化植株)、空白对照无杂交带,说明 PCR 结果是可靠的,初步证实 *il-4* 基因已转入胡萝卜中。

2.5 转 *il-4* 基因再生植株的培育

采用上述遗传转化体系,待获得的抗性组培苗长根系比较发达时,先在组培瓶中进行 7 d 左右的昼夜变温练苗(昼温 22℃,夜温 14℃),然后移栽到以纯蛭石为基质的营养钵中,进行半盆栽保湿处理。待移栽后的小苗长出新叶时,再将其移栽到草炭:蛭石=1:1 的营养钵中,1 周后进行常规管理。3 个月左右进行采收,采收后胡萝卜叶柄剪剩 15 cm 左右窖藏。有关窖藏后处理以及转基因后代 *il-4* 表达产物的研究正在进行。

图3 转*iL-4*基因植株PCR检测

注:1:DL 2 000;2:质粒阳性对照;3:空白对照;4:未转化植株;5~14:抗性植株。

Fig. 3 PCR analysis of transferred *iL-4* gene plants

Note: 1: DL 2 000; 2: Plasmid positive control; 3: Blank control; 4: Untransformed plant; 5~14: Resistance plants.

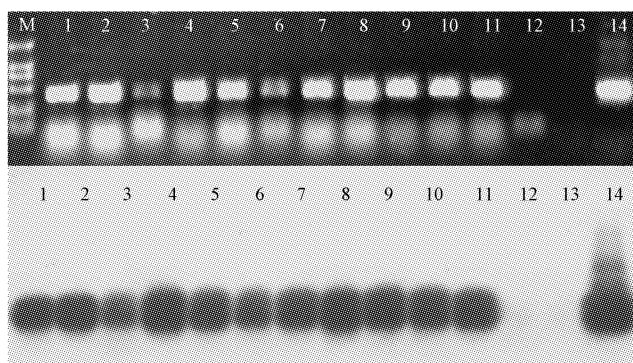


图4 PCR-Southern blot 检测结果

注:M:DL 2 000;1~11:转基因阳性植株;12:未转基因植株;13:空白对照;14:质粒阳性对照。

Fig. 4 Results of PCR-Southern blot

Note: M: DL 2 000; 1~11: Positive plants; 12: Untransformed plant; 13: Blank control; 14: Plasmid positive control.

3 讨论

较高的转化效率和较多的转化苗一直是转基因研究追求的目标之一。在农杆菌介导的遗传转化中,影响转化效率和转化外植体分化的因素很多,如基因型、外植体类型、预处理、侵染时间、共培养等。该试验选取了2种市售胡萝卜品种进行遗传转化试验。在转化过程中外植体类型以胚轴为主,在预试验时尝试了子叶、子叶柄和愈伤组织几种外植体类型。从体细胞胚的分化率看,子叶柄分化最好,愈伤组织成苗最快;但侵染之后胚轴最好抑菌,子叶和子叶柄却较难抑菌,侵染后最难抑菌的是愈伤组织,其被清洗后,易碎裂成小块,操作很不方便。根据侵染、抑菌和分化的综合性效果,最后选定胚轴作为最佳外植体。此外还发现,生长在弱光下(800~1 000 lx)的无菌苗胚轴比生长在强光下(1 500~2 000 lx)的更易被诱导脱分化和分化;生长在黑暗条件下的外植体虽然最易被诱导脱分化和分化,但由于其在侵染后受害严重,所以未被采用。认为在800~1 000 lx的光强下培养无菌苗,采取其胚轴作为外植体,比较理想。

预培养是指在农杆菌感染之前,对所感染的材料进行的预处理。采用预培养的方法可以减轻伤害胁迫,调整细胞状态,有利于农杆菌的感染,从而提高转化

率^[7]。预培养的时间因各种植物启动脱分化和再分化的时间各异,是否需要预处理、预处理长短要根据不同植物、不同外植体而确定。该试验的研究结果表明,‘长城红玥’在4℃预处理3 d效果最好;开拓者在4℃预处理3或10 d效果皆好,而王凌健等^[8]的研究结果表明4℃预处理10 d效果最好,可见该因素即使在同一属中也不能一概而论。

共培养是携带目的基因的T-DNA实现其在农杆菌体内加工、向受体细胞转移及整合的过程。共培养时间的长短直接影响目的基因的整合及转化细胞的数量,是能否实现遗传转化的关键^[7]。共培养时间过短,农杆菌感染和DNA转移不充分,转化频率低;时间过长,容易导致外植体受农杆菌伤害及后期除菌困难。该试验结果表明,‘长城红玥’共培养3 d转化效果好,而‘开拓者’共培养2或4 d转化效果好,与郭蓉等^[12]研究结果基本一致。另外,不同侵染液处理会对转化率产生影响。前人^[13-14]的研究成果表明,在侵染液中添加1.0 mg/L的IAA或20 mmol/L的CaCl₂能够促进外植体的转化。课题组也做了相关验证试验,发现确有正效应,在今后转化试验中,可添加它们提高转化效率。

除此之外,转化处理会对外植体的分化与植株再生产生不利影响。根据王晓峰等^[15]的研究成果,转化后由

于农杆菌的侵染、抗生素除菌和筛选压力的综合作用,使得外植体的脱分化、再分化能力明显减弱,对植株再生所需要的激素配比及其它再生条件要求也相应发生变化。在试验中发现,转化后的外植体,其分化胚性愈伤组织及体细胞胚的时间都相应延长,而且分化效果也不如未转化的外植体好。在将生长素 2,4-D 的浓度提高了 5 倍(0.5 mg/L)之后,胚性愈伤组织的分化及体细胞胚诱导的状态都相应得到了改善,而且还缩短了分化所需的时间。转化后的外植体,其分化的愈伤组织较非转化外植体分化的愈伤组织更致密,胚性愈伤少。在继代培养中发现,将愈伤组织进行分割,会利于体细胞胚的分化和再生植株的生长。对愈伤组织进行切割时,组织块不要小于 5 mm×5 mm×5 mm,否则会褐化死亡,该研究结论与黄学林等^[16]的研究成果一致。

该试验对 2 个胡萝卜品种进行了遗传转化操作,尽管从最高转化率角度看,它们的转化程序有差异,但从最多转化苗角度看,皆以 7 d 无菌苗 4℃ 预处理 3 d,经 1.6×10^7 个/mL 农杆菌侵染 2 min,共培养 2 d 为最佳转化方案,可见对同一作物进行遗传转化时,是可以摸索出通用方案的。

参考文献

- [1] 朱晓艳,于丽杰.转基因胡萝卜的研究进展[J].北方园艺,2012(2):188-190.
- [2] 金伯泉,朱勇,李德敏,等.细胞和分子免疫学[M].2版.北京:科学出版社,2001:139-141.
- [3] 上海创未生物技术有限公司.重组人白细胞介素 4 介绍[EB/OL].
http://www.biopro.net.cn/news/shownews.php?id=31.2010-03-03.
- [4] 资讯频道.重组人白细胞介素-4[EB/OL].http://www.bio1000.com/news/cp/371988.html.2012-06-26.
- [5] Hardegger M, Sturm A. Transformation and regeneration of carrot (*Daucus carota* L.)[J]. Molecular Breeding, 1998(4):119-127.
- [6] 高金秋,于丽杰.胡萝卜体细胞胚再生系统的建立[J].北方园艺,2009(8):73-77.
- [7] 王关林,方宏筠.植物基因工程原理与技术[M].2版.北京:科学出版社,2002:391,393,744.
- [8] 王凌健,倪迪安,陈永宁,等.利用转基因胡萝卜表达肺结核疫苗[J].植物学报,2001,43(2):132-137.
- [9] Desfeux C, Clough S J, Bent A F. Female reproductive tissues are the primary target of Agrobacterium-mediated transformation by the Arabidopsis floral dip method[J]. Plant Physiology, 2000, 123(3):895-904.
- [10] Ye G N, Stone D, Pang S Z, et al. Arabidopsis ovule is the target for Agrobacterium in planta vacuum infiltration transformation[J]. The Plant Journal, 1999, 19(3):249-257.
- [12] 郭蓉,张金文,刘玲,等.胡萝卜遗传转化体系的建立[J].甘肃农业大学学报,2005,40(4):535-539.
- [13] 刘艳军,杨静慧,杨恩芹,等.提高农杆菌基因转化率方法的研究[J].西南农业大学学报,2003,25(2):144-146.
- [14] 何泼,戴群,何放亭.泡桐遗传转化体系的建立[J].山东大学学报(自然科学版),1999,34(3):332-338.
- [15] 王晓峰,鲁瑞芳,彭学贤,等.结球甘蓝外源基因转化再生时的激素条件研究[J].西北农业大学学报,2000,28(1):43-47.
- [16] 黄学林,李筱菊.高等植物组织离体培养的形态建成及其调控[M].北京:科学出版社,1995:19.

Study on Transferred Interleukin-4 Gene in *Daucus carota* L. by Cell Transformation

GAO Jin-qiu^{1,2}, YU Li-jie¹, TAO Lei^{1,3}

(1. College of Life Science and Technology, Harbin Normal University, Harbin, Heilongjiang 150025; 2. College of Life Sciences, Baicheng Normal University, Baicheng, Jilin 137000; 3. College of Life Sciences, Northeast Forestry University, Harbin, Heilongjiang 150040)

Abstract: Taking the hypocotyls of 'Changchenghongyue' and 'Kaituozhe' of *Daucus carota* L. as materials, the effect of the strains, the condition of pretreatment, concentration of *Agrobacterium* suspension, the time of infection and the time of co-cultivation on the transformation of carrot 'Changchenghongyue' and 'Kaituozhe' hypocotyls were studied. The results showed that the C58C1 strain was less damaged for carrot hypocotyls; and the transformation frequency was up to 60% for hypocotyls of 'Changchenghongyue', which derived from pretreatment 7-day-old aseptic plantlets at 4℃ for 10 days, infected with suspension of *A. tumefaciens* at the concentration of 3.2×10^7 cells/mL for 6 mins, co-cultivated for 3 days; and the transformation frequency was up to 100% for hypocotyls of 'Kaituozhe', which derived from pretreatment 7-day-old aseptic plantlets at 4℃ for 3 days, infected with suspension of *A. tumefaciens* at the concentration of 4.8×10^7 cells/mL for 10 min, co-cultivated for 4 days or derived from pretreatment 7-day-old aseptic plantlets at 4℃ for 10 days, infected with suspension of *A. tumefaciens* at the concentration of 3.2×10^7 cells/mL for 10 min, co-cultivated for 2 days; and the transformants were more for both of their hypocotyls, which derived from pretreatment 7-day-old aseptic plantlets at 4℃ for 3 days, infected with suspension of *A. tumefaciens* at the concentration of 1.6×10^7 cells/mL for 2 mins, co-cultivated for 2 days.

Key words: *Daucus carota* L. (carrot); interleukin-4 gene (*il-4* gene); genetic transformation; *Agrobacterium tumefaciens*