

番茄自花授粉后导入抗病毒基因的研究

王傲雪¹, 李景富¹, 徐香玲¹, 谢立波², 李桂英¹

(1. 东北农业大学园艺学院, 哈尔滨 150030; 2. 黑龙江省农科院园艺分院, 哈尔滨 150069)

摘要: 设计基因型、DNA 浓度和处理方法三个因素, 通过花粉管通道法向番茄中导入 TMV-CP 和 CMV-CP 二价的抗病毒基因, 试验共做 489 朵花, 但仅有 91 朵花继续发育结果, 而其它大部分花凋落, 经 Km(卡那霉素)筛选, 共得到 6 株转基因植株。经 PCR、Southern Blotting 检测, 证实基因已整合到番茄基因组中。

关键词: 花粉管通道法; 番茄; 抗病毒基因; 转化

中图分类号: S641.203.6 **文献标识码:** A **文章编号:** 1001-0009(2002)04-0054-02

花粉管通道法是我国科学家周光宇于 70 年代提出的。为了探索植物基因工程技术, 周光宇多次调查粮食等作物的远缘杂交并广泛实践, 对那些亲缘关系远的杂交所产生的染色体水平以下的杂交成功现象提出了 DNA 片段杂交假设。在这一假设基础上, 分析了杂交成功经验, 从而设计了自花授粉的外源 DNA 导入技术。在花粉管通道法应用早期, 研究工作者主要是导入外源植物总 DNA, 并且观察和证实了后代的变异。现在, 目的基因通过该法导入受体植株也获得了成功, 进一步证实了该法的有效性。

花粉管通道法的转基因技术虽然转化频率低, 但其简单、方便, 而且不需要复杂的仪器和组织培养。迄今, 已在棉花、水稻、大豆、小麦、黄瓜、番茄和茄子上取得了一定的成绩, 证实了该方法的可行性, 为植物基因工程开辟了一条新的道路。

在该方法中, 导入时间是技术的关键, 由于不同作物的花器构造、大小及开花授粉受精的时间不同, 因此在利用该方法时要根据作物本身的特性掌握授粉后 DNA 导入的时间, 确保该法的有效性。据报道, 在番茄开花 180°~270°时, 具有较好的效果。本实验就是根据这个参数来设计进行。

1 材料和方法

1.1 番茄品种和试剂

番茄品种组培大黄、P₂₆和 T₀₉₃由本室保存。各种限制酶、Taq 酶购自日本 TaKaPa 公司。引物由中科院微生物所合成。其它试剂均为国产分析纯或化学纯。

1.2 菌株和载体

本实验所用菌株为大肠杆菌 DH5α, 含有 pBTC-8 质粒, 该质粒为带有 TMV-CP 和 CMV-CP 二价基因的 pB1121 载体, 由哈尔滨师范大学赠送。

1.3 质粒提取

按文献碱裂解法大量提取 pBTC-8 质粒, 试验中进行了改进, 用 5 M LiCl 沉淀 RNA, TE 溶解质粒 DNA, 终浓度为 1 μg/ul(微克/微升)。

1.4 试验设计

试验选取三个因素, 具体水平如表 1。

表 1

因素	水 平		
	1	2	3
基因型	组培大黄	P ₂₆	T ₀₉₃
DNA 浓度(ug/ul)	2 天	4 天	
处理方法	剪去柱头	剪去 1/2 柱头	子房注射

1.5 试验采取的正交表

采用 L₉(3⁴)正交表, 取正交表的前三列组成新正交表。

1.6 导入方法

在适宜时期, 采取如下处理: 剪去柱头, 滴上 DNA 溶液 10 ul~15 ul(微升), 隔 4 h(小时)~5 h(小时)再滴一次; 剪去 1/2 柱头; 其它同上; 子房注射: 将微量进样器刺入子房, 注入 DNA 溶液 10~15 ul(微升), 其它同上。

1.7 采种

采摘完全成熟的番茄果实, 挤出种子于碗中, 发酵 24~48 h(小时)即出现白膜, 用水投洗, 晒干后保存。

1.8 筛选

取收获种子在 2% 蔗糖培养基上培育无菌苗, 超净台下切去根部, 根据已做的 Km 敏感性试验, 将去根的无菌苗置于含 Km(卡那霉素)30 mg/L(毫克/升)的 MSO 培养基上诱导生根。能生根的无菌苗则为有 Km 抗性的无菌苗。

1.9 转基因植株的 PCR 检测

按两个目的基因两端序列, 设计 PCR 引物, 分别为:

TMV~CP 基因的引物为: 5' 端引物: 5' ccttctctctatataaggaggttc3'、3' 端引物: 5' cctgcgtgcaatccatcttg3'

CMV~CP 基因的引物为: 5' 端引物: 5' gattagagtccegcattat3'、3' 端引物: 5' agaccggcaacaggattcaa3'

在 MJ-100PCR 仪上, 95 °C 变性 5 min(分), 然后按 94 °C 变性 50 s(秒), 55 °C 退火 1 min(分), 72 °C 延长 1 min(分)设置 30 个循环, 最后 72 °C 延伸 7 min(分)。在 1% 琼脂糖上电泳后, 紫外灯下检测结果。

1.10 转基因植株的 ELISA 检测

用感染 TMV 和 CMV 的番茄植株和健康的植株做正对照和负对照。每个样品设置三次重复, 试验结果取两个接近的结果, 求平均值。

2 结果和分析

收稿日期: 2002-04-10

2.1 试验共做 489 朵花, 但仅有 91 朵花继续发育结果, 而其它大部分花凋落, 经 Km(卡那霉素)筛选, 共得到 6 株转基因植株, 具体结果如表 2。

表 2 花粉管通道法转化番茄试验结果					
处理组合	处理花朵数	座花数	采果数	试验种子数	阳性数
组合 1	45	12	6	105	1
组合 2	43	7	5	93	0
组合 3	66	8	4	97	0
组合 4	47	16	9	110	0
组合 5	50	10	5	96	0
组合 6	69	5	3	98	2
组合 7	38	7	2	109	1
组合 8	64	11	4	99	2
组合 9	67	15	7	94	0
合计	489	91	45	901	6

2.2 转基因植株的 PCR 检测结果

TMV-CP 基因的大小为 1 kb, CMV-CP 基因的大小为 0.7 kb, PCR 检测结果表明, Km 抗性苗具有与质粒相同的 1 kb 和 0.7 kb 的特异带, 而对照无扩增带, 证明 TMV-CP 基因和 CMV-CP 基因已共同整合到番茄基因组上。

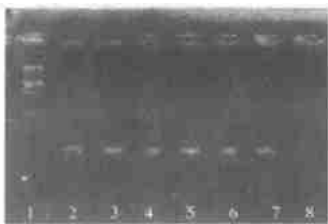


图 1 转基因植株的 TMV-CP PCR 检测结果

1:λDNA/Hind III Marker; 2-7: 转基因植株; 8: 非转基因植株

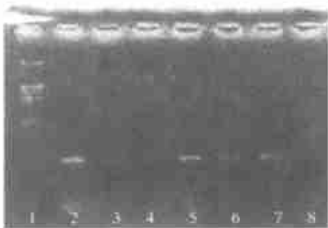


图 2 转基因植株的 CMV-CP PCR 检测结果

1:λDNA/Hind III Marker; 2-7: 转基因植株; 8: 非转基因植株

2.3 ELISA 检测结果

对获得的一株转基因植株进行 ELISA 检测, 结果见表 3, 阴性对照都是 0.01。转基因植株的 TMV 的 ELISA 结果为 0.02, CMV 的 ELISA 结果为 0.06。在本实验中, ELISA 值大于阴性对照的 3 倍, 即为阳性, ELISA 值在 0.04~0.06 之间为低量表达, ELISA 值在 0.07~0.09 之间为中量表达, ELISA 值在 0.1~0.12 之间为高量表达。在本实验的组合 9 中, 共用 77 块愈伤组织, 只获得 1 株转基因植株, 并低量表达

了 CMV-CP 基因, 因此该方法还是切实可行的。

表 3		ELISA 检测结果						
编号	阳性	T1	T2	T3	T4	T5	T6	阴性
平均值	0.14	0.02	0.01	0.08	0.1	0.01	0.00	0.01

3 讨论

在本实验中, 不同的基因型条件下都得到了转化植株, 这说明本实验中的基因型都适于花粉管通道法; 且所设计的 DNA 浓度都得到了转化植株, 因此本实验的 DNA 浓度都适于该法; 对于不同方法, 只有剪去 1/2 柱头没有得到转化植株, 这说明该方法并不可靠。

花粉管通道法简单、易行, 具有其它方法无法比拟的优点, 这使该方法有着较广阔的应用前景。但目前该方法并不成熟, 本实验虽然设计了花粉管导入的众多因素, 但并没有得到哪一种组合最好, 说明这些因素都不是该法的主要影响因素, 而且外源基因与植物染色体 DNA 的整合带有很大的随机性。DNA 导入时间为其最主要因素, 要提高该法的转化率, 还应在导入的机理和基础上做进一步研究, 例如花粉管萌发的解剖学研究, 确立花粉萌发至胚囊的时期以及脐带塞和胚胎形成时期等等, 以求该法的高效遗传转化系统。

由于本实验采用的载体为二元质粒, 所以冠瘿碱的检测不能测定目的基因是否导入, 这是二元质粒本身的特性造成的。因此, 直接对目的基因进行分子检测才会得到准确的结果。由于 PCR 技术灵敏度高, 可能会出现假阳性, 本实验用 PCR-Southern 试验进一步证明 PCR 结果具有一定的可靠性, PCR 结果没有出现假阳性。

本实验向番茄导入的抗病毒基因的蛋白产物为病毒外壳蛋白, 这种蛋白对人体无害, 因为我们平时食用蔬菜时也吸食了大量的病毒粒子; 其次, 本实验所用的 NPTII 基因, Fuchs 等经反复试验证明其基因产物的安全性; 第三, 番茄为严格的自交作物, 不容易发生基因扩散而破坏生态平衡, 因此本实验获得的转基因植株具有很好的安全性。

参考文献

[1] 董伟, 陈玲, 吴勇. 黄瓜自花授粉后外源 DNA 导入技术的研究[J]. 园艺学报, 1993(2): 155~160.
[2] 曾君祉, 王东江. 用花粉管途径获得小麦转基因植株[J]. 中国科学(B), 1993(3): 256~262.
[3] 龚秦秦, 沈慰芳. 授粉后外源 DNA 导入植物技术—DNA 通过花粉管通道进入胚囊[J]. 中国科学(B), 1988(6): 611~614.
[4] 徐香玲. 利用发根农杆菌介导二元载体向番茄导入 TMV、CMV 外壳蛋白基因的研究[J]. 植物研究, 1994(4): 416~423.
[5] 徐洵, 刘振乾. DNA 重组技术[M]. 北京: 科学出版社, 1993.
[6] 周光宇. 农业分子育种——授粉后外源 DNA 导入植物的技术[J]. 中国农业科学, 1998(3): 1~6.
[7] 周光宇. 从生物化学的角度来探讨远缘杂交的理论. 中国农业科学, 1978(2): 16~20.
[8] J. 萨姆布鲁克, E. F. 弗里奇, T. 曼尼阿蒂斯. 分子克隆实验指南(第二版)[M]. 金冬雁, 黎孟枫等译. 科学出版社, 1995.
[9] Fuchs RL, Ream Jø, Hammond BG, et al. Safety assessment of the Neomycin Phosphotransferase II (NPTII) protein. Bio/ Technology, 1993 (11): 1543~1546.