

农杆菌介导菊花双菌共转化法中部分影响因素的研究

孙 磊, 张启翔

(北京林业大学园林学院, 国家花卉工程技术研究中心, 北京 100083)

摘 要:用 XhoI 酶切质粒 pCambia1301 自身环化后得到 T-DNA 区只含 GUS 基因的重组质粒 pCambia1301-GUS, 通过液氮冻融法将质粒 pCambia1301-GUS, pCambia1300 转入农杆菌 LBA4404 和 EHA105 中, 并对菊花进行叶盘共转化实验, 根据共培养 3d 后叶片中 GUS 的瞬间表达及其稳定共转化率, 测定了不同农杆菌菌株搭配及其不同浓度配比对共转化效率的影响, 结果表明:在两种农杆菌菌液浓度比为 1:1 时, 其中 EHA105/pCambia1300 与 EHA105/pCambia1301-GUS 组合, 共转化效率要高于其它菌株的组合, 而在 EHA105/pCambia1300 与 EHA105/pCambia1301-GUS 组合中, 两种菌液浓度比为 1:2 时共转化效率最高。

关键词:菊花; 共转化; GUS 瞬时表达

中图分类号:S 682.1⁺1 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2007)04-0206-04

随着商业化植物转基因品种的不断出现, 人们越来越关注环境安全和食品安全问题, 因为抗性选择标记及其蛋白质产物并不是基因工程的目的产品, 可能是有毒或过敏的, 对人类健康和生物环境造成一些负面影响, 当转基因植株分化形成后, 这些标记基因一般来说都是多余的, 并且还限制了多次重复转化。因此人们对培育无选择标记的转基因植物的呼声越来越高, 研究人员尝试了各种去除选择标记的方法, 其中共转化是一个简单有效的方法。

共转化的原理是将目的基因和标记基因单独组装到两个质粒上, 或一个质粒的两个不同 T-DNA 区段上, 然后共同转化受体细胞, 由于二者可同时插入同一细胞的不同染色体上, 通过筛选和分子鉴定获得转基因共整合的植株作为育种对象, 在 F₁ 分离世代选择标记基因和目的基因不连锁的植株作为育种对象, 即可获得仅含目的基因而不含标记基因的理想转基因株。这种方法比较简单, 适用于多种转化体系, 但共转化频率要高且共转化的 DNA 在受体细胞中必须处于不连锁的位点上。

用于农杆菌介导的共转化又可分为三个途径, 第一种叫双 T-DNA 法(超级双元载体), 即共转化是通过与一个农杆菌菌株共培养完成的, 该菌株只含有一个双元

质粒, 在其不同的 T-DNA 上分别含有一个选择标记基因及一个目的基因。Komari^[1]等在研究共转化时, 构建了分别含有抗生素基因和 GUS 基因的超级双元载体用于水稻转化, 共转化率达到 47%, 经后代的有性杂交筛选, 选择标记基因与目的基因约有一半能独立分离。第二种叫双质粒法, 即共转化是通过与一个农杆菌菌株共培养完成的, 该菌含有两个不同的双元质粒, 分别含有一个选择标记基因及一个目的基因。用不同双元载体质粒上分别带有 nptII 和 GUS 基因的农杆菌菌株共培养油菜和烟草, 经卡那霉素筛选出 34 株油菜和 100 株烟草, 其中表现出 GUS 活性的分别为 21 株和 52 株。油菜和烟草的共转化率分别为 62% 和 52%, 其中共转化株的后代植株中只表达一个基因的机率分别为 40% 和 58%。这表明两个不同的 T-DNA 插入到不同位点^[2]。第三种叫双菌法, 不含选择标记基因和含选择标记基因的两个农杆菌菌株共培养, 通过选择标记基因来进行转化植株的筛选, 然后共转化株通过有性杂交分离出无选择标记基因的转基因植株, Buck^[3]用此方法转化拟南芥和烟草获得 18% 的共转化率。

试验是将质粒 pCambia1300 和 pCambia 1301-GUS 导入农杆菌 LBA4404 和 EHA105 中, 对菊花进行叶盘共转化, 以此来研究农杆菌不同菌株搭配及不同浓度配比对共转化的影响。

1 材料与方法

1.1 材料与试剂

试验选用的两个地被菊品种‘北林黄’和‘铺地金’取自北京林业大学胖龙温室, 取茎尖, 用自来水冲洗 10~15min, 70% 乙醇浸泡 20~30s, 0.1% 升汞消毒 3.5min, 无菌水洗 3~4 次, 接种于 1/2MS 培养基上诱导

第一作者简介:孙磊(1981-), 男, 博士研究生, 主要研究方向为植物遗传育种。

通讯作者:张启翔, 教授, E-mail: zqx@bjfu.edu.cn.

基金项目:教育部博士点基金(20040022022); 科技部国家转基因专项(JY03-B-28)。

收稿日期:2006-12-10

茎尖腋芽萌发。20d 后接种无菌茎段于生根培养基获得无菌苗,取 20~25d 无菌苗中上部生长健壮、均匀一致的幼嫩叶片经 2d 预培养后进行共转化实验。根癌农杆菌 LBA4404 及 EHA105 由本实验室保存。pCambia1300 和 pCambia1301 植物表达载体由 Australia Cambia 组织惠赠,实验所用的 DNA 限制性内切酶及 DNA maker 均购自 Takara 公司,抗生素主要生化试剂购自上海上海生工,引物由北京奥科生物技术公司合成,其它试剂为国产分析纯,购自北京生化试剂公司。

1.2 培养基

预培养基:MS+6-BA1.5mg/L+NAA0.6mg/L+蔗糖 30%+琼脂 0.55%,共培养基:MS+NAA

0.6mg/L+蔗糖 30%+琼脂 0.55%,pH5.4,分化筛选培养基:MS+6-BA1.5mg/L+NAA0.6mg/L+蔗糖 30%+琼脂 0.55%+头孢霉素 400mg/L+潮霉素 10mg/L,生根筛选培养基:1/2MS+头孢霉素 400mg/L+潮霉素 10mg/L,悬浮培养基:液体 MS, LB 培养基:10g/L NaCl,5g/L 酵母提取物,10g/L 蛋白胨。

1.3 双元载体

用 XhoI 酶切质粒 pCambia1301 后自身环化得到 T-DNA 区段只含有 GUS 基因的载体 pCambia1301-GUS,pCambia1300 的 T-DNA 区段只含有 hpt 基因,(图 1)液氮冻融法将 pCambia1301-GUS, pCambia1300 导入 LBA4404 及 EHA105 中。

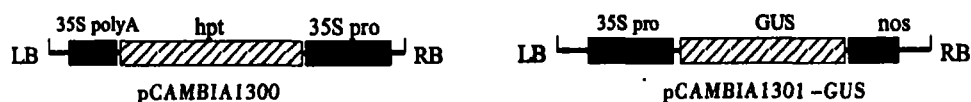


图 1 用于共转化的两个质粒 T-DNA 结构域

1.4 农杆菌介导的共转化

将超低温保存的菌株接种于含 50mg/L 卡那霉素和 30mg/L 利福平的固体培养基中活化后,挑取单菌落接种到 5mL 含 50mg/L 卡那霉素和 30mg/L 利福平的液体 LB 培养基中于 28℃振荡培养过夜,第 2d 按 1%接种量转接入 50mL 含 50mg/L 卡那霉素的液体 LB 液体培养基中,28℃继续培养 6~8h 至 OD 为 0.6 时,将两种菌液分别按 1:2,1:1 和 2:1 的体积比相混合并离心,收集菌体并重悬于适量的液体 MS 培养基中至 OD 为 0.5。将预培养过的叶片放入液体 MS 农杆菌悬浮液中浸泡 10min,然后置于无菌纸上吸去多余菌液,随即转移到共培养基上 24℃~26℃黑暗条件下共培养 2d 转入筛选培养基中,每隔 30d 更换一次培养基,待抗性芽生长至约 2cm 时,转入生根筛选培养基中。

1.5 转基因植株中 GUS 活性检测

转化组织的 β-葡萄糖苷酸活性的检测参照 JEF-FERSON 的方法^[4]。每个处理随机取 15 个叶片放入 GUS 染色液中,置于 37℃温度过夜染色,染色后的组织用 70%的乙醇脱色,检测转化率,同时设置阴性对照。

1.6 菊花转化效率的计算

菊花叶片与农杆菌共培养 3d 后用无菌滤纸吸干直接用于检测 GUS 基因的瞬时表达,瞬时表达率为有 GUS 瞬间表达的叶片数与农杆菌共培养叶片数之比,稳定共转化率用于计算不同菌株浓度配比下抗性芽中含有目的基因的频率,叶片与农杆菌共培养 3d 后,在含潮霉素的选择培养基上进行分化筛选和生根筛选,取部分抗性植株叶片进行 GUS 组织化学染色,稳定共转化率为有 GUS 表达的独立转化株系与所有分化出的独立转

化株系之比。

1.7 转基因植株的 PCR 检测

抗性植株叶片按 CTAB 法^[5]提取植物基因组 DNA,用于 GUS 基因扩增的引物分别为 P1:GGG ATC CAT CGC AGC GTA ATG;P2:GCC GAC AGC AGC AGT TTC ATC。可以扩增出 563bp 的片段。PCR 反应条件为:94℃,5min;94℃,30sec,60℃,45sec,72℃,1min,30 个循环,72℃,10min。

2 结果与分析

2.1 不同菌株搭配对双菌法共转化效率的影响

2.1.1 对 GUS 基因瞬时表达率的影响 以‘北林黄’和‘铺地金’叶片为材料,分别与 3 对不同的农杆菌菌株组合在浓度比均为 1:1 的情况下进行共侵染,共培养 3d 后进行 GUS 化学组织染色,在部分共培养的叶片上可以看到明显的蓝色,据此统计 GUS 瞬时表达率,其结果于表 1。由表 1 中数据可看出,在用 EHA105/pCambia1300 与含 pCambia1301-GUS 载体的不同菌株搭

表 1 不同农杆菌菌株搭配对共培养后叶片中 GUS 瞬间表达率的影响

不同农杆菌菌株搭配	品种	共培养 叶片数	GUS+ 叶片数	GUS 瞬间 表达率
EHA105/pCambia1300	北林黄	90	51	56.7%
	铺地金	90	41	45.5%
EHA105/pCambia1301-GUS	合计	180	92	51.1%
EHA105/pCambia1300	北林黄	90	32	35.6%
	铺地金	90	39	43.3%
LBA4404/pCambia1301-GUS	合计	180	71	39.4%
LBA4404/pCambia1300	北林黄	90	43	47.8%
	铺地金	90	38	42.2%
EHA105/pCambia1301-GUS	合计	180	81	45.0%

配的情况下,不同组合间 GUS 瞬间表达率有一定的差异,且在两个品种中有类似的趋势。EHA105/pCAMBIA1300 : EHA105/pCAMBIA1301-GUS 菌株搭配的 GUS 瞬间表达率最高,两个品种中分别为 56.7% 和 45.5%, LBA4404/pCAMBIA1300 : EHA105/pCAMBIA1301-GUS 搭配的 GUS 瞬间表达率其次, EHA105/pCAMBIA1300 : LBA4404/pCAMBIA1301-GUS 搭配的最低,但 2 个品种也有一定的差别。

2.1.2 对稳定共转化效率的影响 将上述 2.1.1 中经与不同组合的农杆菌共培养后的叶片转入含 10mg/L 潮霉素和 400mg/L 头孢霉素的筛选培养基上进行选择培养,产生的抗性芽转入新鲜的含 10mg/L 潮霉素的生根筛选培养基上进行筛选培养,取部分生根苗的叶片进行 GUS 组织化学染色,在部分抗性植株叶片中可以看到明显的蓝色,说明在这些抗性植株中同时有 GUS 基因的整合与表达,据此,统计获得共转化率,结果列于表 2 中。

表 2 不同农杆菌菌株搭配对共转化效率的影响

不同农杆菌菌株搭配	品种	抗性植株中有 GUS 表达的独立株系	分化出的独立转化株系	共转化率
EHA105/pCAMBIA1300	北林黄	4	85	4.7%
	铺地金	3	73	4.1%
EHA105/pCAMBIA1301-GUS	合计	7	158	4.4%
EHA105/pCAMBIA1300	北林黄	1	29	3.4%
	铺地金	1	34	2.9%
LBA4404/pCAMBIA1301-GUS	合计	2	63	3.2%
LBA4404/pCAMBIA1300	北林黄	2	54	3.7%
	铺地金	1	24	4.2%
EHA105/pCAMBIA1301-GUS	合计	3	78	3.8%

由表中数据可知,在‘北林黄’中以 EHA105/pCAMBIA1300 : EHA105/pCAMBIA1301-GUS 菌株搭配的共转化率最高,为 4.7%。而在‘铺地金’中以 LBA4404/pCAMBIA1300 : EHA105/pCAMBIA1301-GUS 菌株搭配的共转化率最高为 4.2%,综合在两个品种上的表现来讲,以 EHA105/pCAMBIA1300 : EHA105/pCAMBIA1301-GUS 菌株搭配的共转化率最高为 4.4%,以 EHA105/pCAMBIA1300 : LBA4404/pCAMBIA1301-GUS 菌株搭配的共转化率最低,为 3.2%。

2.2 农杆菌不同浓度对比对双菌法共转化效率的影响

根据 2.1.2 的结果在所用共转化菌种浓度比均为 1:1 的情况下,以同一菌株 EHA105 分别携带不同质粒 pCAMBIA1300 和 pCAMBIA1301-GUS 时的共转化效率最高,因此在研究用于共转化的两种菌株不同浓度对比对共转化效率的影响时,采用了这一组合进行。

以‘北林黄’和‘铺地金’叶片为材料,以农杆菌 EHA105/pCAMBIA1300 和 EHA105/pCAMBIA1301-GUS 在浓度比分别为 1:2、1:1 和 2:1 的 3 种配比下对叶片进行共侵染,共培养 3d 后进行 GUS 化学组织染色,在部分共培养的叶片上可以看到明显的蓝色,据此

统计 GUS 瞬时表达率,其结果见表 3,从 GUS 瞬间表达结果可看出,‘北林黄’在浓度比为 1:2 和 1:1 时的 GUS 瞬间表达率比较接近,在浓度比为 2:1 时较低为 23.3%,‘铺地金’以浓度比为 1:2 时的 GUS 瞬间表达率最高为 52.2%,因此综合两个品种而言,浓度比为 1:2 时 GUS 瞬间表达率最高,达到 55.6%,而在浓度比为 2:1 时最低,仅为 26.1%,究其原因,可能与菌液中 EHA105/pCAMBIA1301-GUS 的浓度有关。将共培养后的叶片进行抗性筛选,分化出的小苗叶片进行 GUS 组织化学染色,统计共转化率,由表 4 可以看出,在‘北林黄’和‘铺地金’中,当以菌株 EHA105/pCAMBIA1300 和 EHA105/pCAMBIA1301-GUS 搭配时在浓度比为 1:2 时,稳定共转化率最高,浓度比为 1:1 时其次,而浓度比为 2:1 时共转化率较低。

表 3 农杆菌 EHA105/pCAMBIA1300 和 EHA105/pCAMBIA1301-GUS 不同浓度配比 GUS 瞬间表达率的影响

不同浓度比	品种	共培养叶片数	GUS+叶片数	GUS 瞬间表达率
1:1	北林黄	90	51	56.7%
	铺地金	90	41	45.5%
	合计	180	92	51.1%
1:2	北林黄	90	53	58.9%
	铺地金	90	47	52.2%
	合计	180	100	55.6%
2:1	北林黄	90	21	23.3%
	铺地金	90	26	28.9%
	合计	180	47	26.1%

表 4 农杆菌 EHA105/pCAMBIA1300 和 EHA105/pCAMBIA1301-GUS 不同浓度对比对共转化率的影响

不同农杆菌菌株搭配	品种	抗性植株中有 GUS 表达的独立株系	分化出的独立转化株系	共转化率
1:1	北林黄	4	85	4.7%
	铺地金	3	73	4.1%
	合计	7	158	4.4%
1:2	北林黄	3	32	9.4%
	铺地金	3	46	6.5%
	合计	6	78	7.7%
2:1	北林黄	1	27	3.7%
	铺地金	1	36	2.8%
	合计	2	63	3.2%

2.3 抗性植株 GUS 基因的 PCR 检测

在用于分析的独立转化株系中,部分单株的基因组 DNA 能特异的扩增出 563bp 大小的片断,与阳性质粒对照完全相同,而绝大多数的单株中未扩增出 GUS 基因片段,在未转化植株总 DNA 中也没有扩增出 GUS 片段(图 2),这一结果与抗性植株的叶片 GUS 组织化学染色结果基本一致。说明在部分潮霉素抗性转化植株中,GUS 基因与 hpt 基因发生了共转化。

3 讨论

共转化法做为一种去除选择标记的方法与转座子^[9~10]、同源重组^[11,12]、位点特异性重组^[13~14]等系统相比,更加简单易操作,Ebinuma 等人认为共转化行为受到

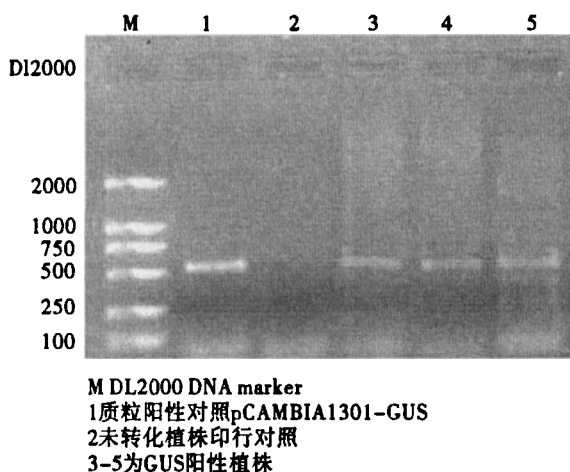


图2 部分抗性植株的总DNA的PCR检测

植物材料、农杆菌菌株类型、组培状态等因素的影响。用双菌法或是单菌法,哪种共转化效率更高,目前并无定论,要想获得较高的共转化率必须要有较高的再生率,并且插入的 T-DNA 处于不连锁的状态,De Block 用双菌法转化油菜时共转化率达到 56%~85%,而试验通过不同农杆菌种类的组合以及不同浓度的搭配对菊花叶片进行共转化,当使用同一菌株 EHA105 时获得了最高共转化率为 9.4%,可能是因为它对菊花的浸染能力更强,当使用同一菌株时,不同浓度的搭配对共转化率也有重要影响。在前人的报道中一般都采用 1:1^[15~17],而试验中 1:2 共转化率最高,初步说明含有目的基因的载体浓度越高,共转化率越高,但是共转化率与不同浓度的变化具体如何相关,以及植物细胞与农杆菌的相互作用还有待更深入的研究。

参考文献:

- [1] Komari T, Hiei Y, Murai N, et al. Vectors carrying two separate T-DNAs for co-transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers[J]. *Plant J* 1996, 10, 165-174.
- [2] De Block M, Debrouwer D. Two T-DNA's co-transformation into *Brassica napus*

by a double *Agrobacterium tumefaciens* infection are mainly integrated at the same locus [J]. *Theor Appl Gene*, 1991, 82, 257-263.

- [3] Buck S De, Jacobs A, Montagu M van, et al. *Molecular Plant-Microbe Interactions*, 1998, (6), 449-457.
- [4] Jefferson R, A. Assaying Chimeric genes in plants the gus fusion system [J]. *Plant Mol Biol. Rep.*, 1987, 5, 389-405.
- [5] Murry M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. *Nucleic Acids Res*, 1980, 8, 4321-4325.
- [6] Miki B, McHugh S. Selectable marker genes in transgenic plants, applications, alternatives and biosafety [J]. *Journal of Biotechnology*, 2004, 107 (3), 193-232.
- [7] Goldsbrough AP, Lastrella CN, Yoder J. Transposition mediated repositioning and subsequent elimination of marker genes from transgenic tomato [J]. *Biotechnology*, 1993, 11, 1286-1292.
- [8] Ebinuma H., Sugita K, Matsunaga E, et al. Selection of marker-free transgenic plants using isopentenyl transferase gene [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1997, 94, 2117-2121.
- [9] Fischer N, Stampacchia O, Kevin R, et al. Selectable marker recycling in the chloroplast [J]. *Mol Gen Genet*, 1996, 251, 373-380.
- [10] Elena Zubko, Charles Scutt, Peter Meyer. Intrachromosomal recombination between attP regions as a tool to remove selectable marker genes from tobacco transgenes [J]. *Nature Biotechnology*, 2000, 18, 442-445.
- [11] Ow D W, Medberry S L. Genome manipulation through site specific recombination [J]. *Crit Rev Plant Sci*, 1995, 14, 239-26112.
- [12] Dale EC, Ow D. W. Gene transfer with subsequent removal of the selection gene from the host genome [J]. *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 1999, 88(23), 10558-10562.
- [13] Ow D. W., The right chemistry for marker gene removal [J]. *Nature Biotechnology*, 2001, 19 (2), 115-116.
- [14] Zuo J, Niu Q. W, Moller SG, et al. Chemical-regulated, site-specific DNA excision in transgenic plants [J]. *Nat Biotechnol*, 2001, 19, 157-161.
- [15] Lu H., Zhou X., Gong Z., et al. Generation of Selectable Marker-free Transgenic Plants Using the Oncogenes (IPT, ROLA, B, C) of *Agrobacterium* as Selectable Markers [J]. *Molecular Biology of Woody Plants*. 2000, 24-26.
- [16] Wu L, Nandi S, Chen L, Rodriguez RL, Huang N (2002). Expression and inheritance of nine transgenes in rice [J]. *Transgenic Res*, 11, 533-541.
- [17] Breitler JC, Meynard D, van Bostel J, et al. A novel two T-DNA binary vector allows efficient generation of markerfree transgenic plants in three elite cultivars of rice (*Oryza sativa* L) [J]. *Transgenic Res*, 2004, 13(3), 271.

A Study on Several Factors Influencing Co-transformation of *Chrysanthemum* with Two *Agrobacterium* Strains

SUN Lei, ZHANG Qi-xiang

(National Flower Engineering Technology Research Center, College of Landscape Architecture, Beijing Forestry University, Beijing 100083)

Abstract: The plasmid pCambia1301 was digested by XhoI and self-linked to get the recombinant plasmid pCambia1301-GUS, pCambia1300 was transformed into *Agrobacterium* LBA4404 and EHA105 using a freeze-thaw method, the effects of either the combinations or the densities of the *Agrobacterium* strains on co-transformation efficiency were tested according to both the GUS transient expression in leaves and the stable co-transformation efficiency. The results showed that the combination with *Agrobacterium* EHA105/pCambia1300 and EHA105/pCambia1301-GUS achieved higher co-transformation efficiency than that of the other bacterium combinations when the same density of these two bacteriums was used to infect the leaves. Additionally, when the concentration proportion of the two *Agrobacterium* EHA105/pCambia1300 and EHA105/pCambia1301-GUS was adjusted to 1:2, the co-transformation efficiency was higher than that of the other concentration proportion.

Key words: *Chrysanthemum*; Co-transformation; GUS transient expression