

GUS 基因在农杆菌和甜瓜中的表达差异研究

陶 兴 林

(甘肃农业科学院蔬菜研究所, 甘肃 兰州 730070)

摘 要:以农杆菌和转化的甜瓜组织为试验材料,通过组织化学染色法,来研究 GUS 基因在农杆菌和甜瓜组织中的表达。结果表明,含有 GUS 基因的农杆菌和甜瓜愈伤组织都能被染成蓝色,而不含有 GUS 基因的农杆菌和甜瓜愈伤组织没有被染色,因此在检测转基因植株时,可以减少或避免假阳性的出现,为植物的转化奠定了坚实的基础。

关键词:GUS 基因;组织化学染色法;农杆菌;甜瓜;表达

中图分类号:S 961.6;S 652 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2008)04-0215-03

GUS 基因存在于某些细菌体内,编码 β -葡糖苷酸酶(β -glucuronidase; GUS),该酶是一种水解酶,能催化许多 β -葡糖苷酸酶类物质的水解。在转基因研究中,GUS 基因作为一种常用的指示基因,在检测外源基因的转化上,主要是在研究基因表达调控上具有重要作用。由于绝大多数的植物细胞内不存在内源的 GUS 活

性,许多细菌及真菌也缺乏内源 GUS 活性,因而 GUS 基因广泛用作转基因植物、细菌和真菌的报告基因^[1-3],尤其是在研究外源基因瞬时表达的转化试验中,GUS 基因应用最多。但是目前关于 GUS 在农杆菌中是否表达的研究很少,很多用 GUS 基因作为报告基因的文献也没有提到。因此,在研究中以含有 GUS 基因的农杆菌 EHA105 和不含有 GUS 基因的 EHA105 作为材料,通过 GUS 染色反应,来检测其在农杆菌中和甜瓜转化愈伤组织中的表达,从而为转基因过程更准确地检测转基因植株打下坚实的基础。

作者简介:陶兴林(1977-),男,硕士,主要从事蔬菜育种及在生物技术园艺作物育种中的应用。E-mail:taoxinglin77@126.com。
收稿日期:2008-01-08

[6] 沈永宝,施季森,银杏、板栗不同组织 DNA 提取[J].南京林业大学学报(自然科学版),2001,25(6): 80-82.
[7] Clark M S, 顾红雅,瞿礼嘉.植物分子生物学—手册实验[M].北京:高等教育出版社,1998:5-6.
[8] 明军,张启翔,晏小兰等.梅花基因组 AFLP 银染反应体系的建立

和优化[J].北京林业大学学报,2003,25(3):17-21.
[9] 徐德昌,赵亚华,杜人奎.植物总 DNA 和核 DNA 提取及其纯度的研究[J].宁夏农学院学报,1997,18(3):57.
[10] 李丹,凌定厚.五种马尾松基因组 DNA 方法的比较[J].植物学通报,2000,17(2):168-173.

Comparison of Extraction Methods and ISSR Analysis of Genomic DNA in Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.)

GUI Teng-qin^{1,2,3}, QIAO Ai-min³, SUN Min¹, WANG Xin-yan³, SUN Xue-mei¹

(1. College of Life Science, Southwest University, Chongqing 400715, China; 2. Dept. of Chemistry & Life Science, Qianxinan Teachers' College Xingyi, Guizhou 562400, China; 3. College of Agriculture and Landscape Architecture, ZhongKai University of Agriculture and Technology, Guangzhou, Guangdong 510225, China)

Abstract: Genomic DNA of Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.) was extracted from the leaves of three cultivars of Japanese apricot, 'yuanyangmei', 'huanghoumei' and 'xiaoshanxuan'. Considering that Japanese apricot is rich in secondary metabolites such polyphenols, saccharide and terpene and so on. Three methods were adopted to isolate genomic DNAs of Japanese apricot. The results show that the modified CTAB method is more effective, the quality and quantity of genomic DNA extracted can used at all kinds studied of molecular biology for Japanese apricot. OD_{260/280} was 1.80 or so. When tested through the DNA-ISSR analysis, experiment requirement was met perfectly. In addition, the key steps and main characters in the modified CTAB method were analyzed in detail.

Key words: Japanese apricot (*Prunus mume* Sieb. et Zucc.); Genomic DNA; DNA extraction; CTAB; SDS

1 材料和方法

1.1 材料

农杆菌: 含 GUS 基因的农杆菌 EHA105 和不含 GUS 基因的农杆菌 EHA105 是由华南热带农业科学院热带作物生物技术所国家重点实验室提供。甜瓜的转化愈伤组织: X-GLUC。

1.2 方法

1.2.1 菌液的准备 从 pBI121/EHA105 和 EHA105 平板上各挑取 1 个单菌落 pBI121/EHA105 放入含有卡那霉素(Kana)、利福平(Rif)和链霉素(Str)的 YEP 细菌培养基中, 而 EHA105 则放入含有利福平(Rif)和链霉素(Str)的 YEP 培养基中, 在 26 ~ 28 °C、220 rpm 下振荡培养 14 ~ 16 h。

1.2.2 甜瓜组织的准备 用 pBI121/EHA105 和 EHA105 浸染甜瓜的 5 日龄子叶外植体, 在含有卡那霉素和羧苄青霉素的培养基上, 经过选择诱导, 分别获得抗性愈伤组织, 采用组织化学染色对其染色。

1.2.3 X-GLUC 染色液的配制 X-GLUC 染色液 20 mL (50 mM 磷酸钠缓冲液 pH 值为 7.0, 0.1% triton, 100 mM 铁氰化钾/亚铁氰化钾)。操作步骤: 用 20 mL 50 mM 磷酸钠缓冲液, pH 值为 7.0 溶解 X-GLUC, 然后依次加入 0.1% Triton、100 mM 铁氰化钾/亚铁氰化钾, 摇匀并抽气 5 min, -30 °C 保藏备用。

1.2.4 GUS 的活性检测 GUS 的活性检测的方法很多, 有组织化学染色法、荧光测定法以及 GUS 活性比色测定法等^[4,5]。试验采用组织化学检测法^[9]来检测 GUS 的活性。其步骤为: 将经过振荡培养的农杆菌菌液装入 5 mL 离心管中, 在 4 000 rpm 离心 15 min, 弃去上清液, 在其中加入适量的固定液, 室温下温和摇动 30 min, 然后用 50 mM 的磷酸钠缓冲液 pH 7.0 洗 10 min, 重复 2 次, 除去固定液, 用抽真空 5 min 的染色液对农杆菌进行染色, 37 °C 保温 10 h, 最后进行肉眼观察, 并在 Olympus 显微镜下观察 GUS 基因瞬时表达产物: 葡糖苷酸酶和底物 X-GLUC 反应所产生的蓝点。

2 结果与分析

2.1 GUS 报告基因在农杆菌中的表达

使用该法以 X-GLUC 为底物, 通过显色反应直接观察到组织器官中 GUS 基因的活性, 该方法不用将酶从组织中提取出来, 而是使底物进入被检测的植物组织、细胞或原生质体之中, 将被检测材料浸泡在含有底物的缓冲液中保温, 若组织、细胞、原生质体发生了 GUS 基因转化, 表达出 GUS, 在适宜条件下该酶可将 X-GLUC 水解生成蓝色物质, 初始产物并不带有颜色, 为无色的吲哚衍生物, 后经氧化二聚作用形成 5, 5'-二溴-4, 4'-二氯靛蓝染料, 此靛蓝染料使具有 GUS 活性的部位或位点呈现蓝色, 可用肉眼或在显微镜下观察到。

经过 GUS 染色后, 可以直接看到 pBI121/EHA105 被染色, 显蓝色, 而对照 EHA105 没有被染色, 这说明农杆菌 EHA105 没有内源 GUS 活性, 而 GUS 基因是在质粒 pBI121 上(图 1)。

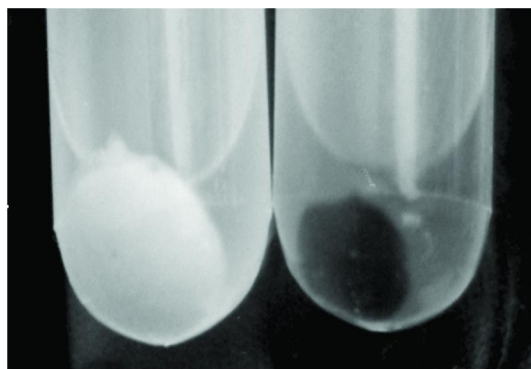


图 1 GUS 在农杆菌中的染色反应

注: 左: EHA105 右: pBI121/EHA105。

在显微镜下观察, 发现有许多淡蓝色的小点在不停的移动, 它们有杆状、念珠状等形状, 这说明 pBI121/EHA105 确实可以被染色, 从大小上来看, 这些蓝色小点的个体非常小, 相当于植物细胞中叶绿体的大小, 也证明了农杆菌很容易通过植物伤口、气孔或者皮孔进入植物体, 与植物细胞紧密接触, 来转化植物细胞, 从而获得转基因植物。

2.2 GUS 报告基因在甜瓜中的表达

GUS-β-葡糖苷酸酶(β-Glucuronidase)是一种水解酶, 可以催化裂解一系列葡糖酸苷类物质, 其中很多水解产物具有发色团或形成荧光物质, 在 GUS 活性作用下, X-GLUC 产生蓝色沉淀, 因为高等植物、细菌和真菌本身不含内源 GUS 活性, 所以 GUS 基因检测并筛选转化植株, 有很强的特异性, 可以防止假阳性的出现。

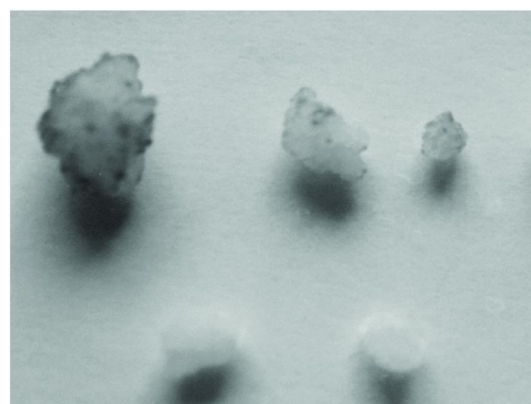


图 2 GUS 在甜瓜转化愈伤组织中的染色反应

注: 上: pBI121/EHA105; 下: EHA105。

将在含有卡那霉素和羧苄青霉素的 MS 诱导选择分化培养基上所得到的愈伤组织进行 GUS 基因检测。从 GUS 染色结果看出, 一部分愈伤组织表现出蓝色反应, 而另一部分则不被染色。这表明被染色的这部分细胞为转化细胞, 内部含有 GUS 基因, 从而出现 GUS 阳性反应。同时, 也证明了甜瓜本身不含内源 GUS 活性。但是被染色的愈伤组织中, 蓝色反应的深浅不一致, 认为深蓝色的为阳性转化细胞, 而淡蓝色反应的愈伤组织中应该含有部分转化细胞和非转化细胞, 因此在以后应该对淡蓝色反应的愈伤组织继续培养, 跟踪检测, 淘汰非转化细胞, 获得真正的转化细胞(图 2)。

3 讨论

随着植物基因工程的发展, 尤其是在转基因方面, 报告基因在转基因植物的检测中具有十分重要的作用, GUS 基因又是目前检测转基因植物的常用报告基因之一。所以 pBI121/EHA105 呈现蓝色给检测转基因植物带来很大的困难。虽然通过检测, 转基因植物的组织或者细胞发生蓝色反应, 但是这并不能说明它就是真正的转基因植株。如果植物体内的农杆菌没有脱干净, 染色就不能说明问题。另外, 如果被检测植物的细胞或组织被一些含有 GUS 基因的细菌所污染, 在植物细胞中的 35S 启动子的作用下, 也会出现蓝色反应, 严重的干扰了检测工作。

鉴于 GUS 基因也可以在农杆菌中表达, 在用 GUS 底物 X-GLUC 检测时, 农杆菌菌液可显蓝色, 因此在检测愈伤组织和再生植株中的 GUS 表达时, 需要注意被检测组织中是否仍有农杆菌的存在, 以避免假阳性。经过一些学者研究, 目前检测愈伤组织、转化芽和转化植株中是否有农杆菌存在的方法有以下几种: 第一, 将 GUS 阳性转化芽磨碎, 在 YEP 培养基上涂板, 看有无农杆菌生长^[7]; 第二, 用接种环接触愈伤组织周围, 涂 LB 平板,

看是否有农杆菌生长, 或者对转化愈伤组织进行质壁分离处理, 然后用 X-GLUC 染色, 看 GUS 蓝色是在细胞质中还是在细胞周围^[6]; 第三, 为了从根本上解决这一问题, 以避免假阳性的出现, 可用带有内含子的 GUS 基因(GUS INT), 使其只能在真核细胞中表达, 而不能在农杆菌中表达, 这样便可避免有农杆菌污染的可能性^[8]。除以上方面, 在检测时要有非转化的材料做对照, 由于正常的植物细胞中一般不存在这个酶, 所以对对照染色反应为阴性, 即无蓝色反应。

参考文献

[1] 赵淑清, 李新锋. 转基因植物中报道基因 GUS 的活性检测及其应用[J]. 生命的化学, 2004, 24(1): 71-74.
[2] 徐恒, 黎万奎, 谢志健, 等. 苜蓿愈伤组织诱导及 GUS 基因瞬时表达[J]. 四川大学学报(自然科学版), 2001, 38(6): 905-908.
[3] 王锋. GUS 基因在柑桔原生质体中的瞬时表达[J]. 福建农业学报 1998, 13(2): 1-5.
[4] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社 1998: 585-590.
[5] 莽克强, 陈受宜, 李季伦, 等. 农业生物工程[M]. 北京: 化学工业出版社, 1998.
[6] Franklin C I, Trieu T N, Cassidy BG, et al. Genetic transformation of green bean callus via Agrobacterium mediated DNA transfer[J]. Plant Cell Rep, 1993, 12: 74-79.
[7] Kaneyoshi J, Kobayashi S, Nakamura Y, et al. A simple and efficient gene transfer system of trifoliate orange (Poncirus trifoliata Raf.) [J]. Plant Cell Rep 1994 13: 541-545.
[8] Vancanneyt G, Schmidt R, O'Connor-Sanchez A, et al. Construction of an intron-containing marker gene: Splicing of the intron in transgenic plants and its use in monitoring early events in Agrobacterium mediated plant transformation[J]. Mol. Gen. Genet, 1990, 220: 245-250.
[9] Jefferson R A, Burgess S M, Hirsch D. β -glucuronidase from Escherichia Coli as a gene fusion marker[J]. Proc. Natl. Acad. Sci. 1986, 83: 8447-8451.

GUS Gene Expression in Agrobacterium and Melon

TAO Xing-lin

(Vegetable Research Institute of Gansu Academy of Agricultural Science, Lanzhou, Lanzhou, Gansu 730070, China)

Abstract: The experiment was conduct with agrobacterium and *cucumis melo* L to research expression of GUS by histochemical assay. The result showed that agrobacterium and melon tissue, containing GUS gene, turned up blue and agrobacterium and melon tissue without gus gene hadn't color. Therefore, we could reduce rate of false positive in checking transformant.

Key words: Gus gene; Histochemical assay; Agrobacterium; *Cucumis melo* L; Expression