

金属硫蛋白基因转化黄瓜的研究

郑伟¹, 杨苹¹, 李洪志¹, 王艳芳¹, 徐岩¹, 庞实锋^{1,2}

(1. 吉林农业大学 生物反应器与药物开发教育部工程研究中心, 吉林 长春 130118 2. 中山大学 生命科学院, 广东 广州 510275)

摘要:以黄瓜无菌苗子叶切段为外植体,通过叶盘转化法与根瘤农杆菌进行共培养建立了黄瓜的遗传转化体系。比较了不同苗龄,不同侵染时间对黄瓜离体再生的影响,并做了潮霉素敏感性测试。结果表明:苗龄3~4 d的子叶,侵染时间为15 min,潮霉素浓度为25 mg/L最适分化出抗性小苗。最终获得3株抗性植株,经过PCR和RT-PCR检测,初步确定均为阳性转化植株。

关键词:黄瓜;金属硫蛋白(MT);基因;愈伤;绿色荧光蛋白(GFP);转化

中图分类号:S 642.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2009)10-0058-04

黄瓜(*Cucumis sativus* L.)为葫芦科黄瓜属1a生蔓生草本植物。含多种维生素和蛋白质等,性凉、味甘;入肺、胃、大肠经,有清热利水,解毒消肿,生津止渴的功效,是一种常年供应的重要蔬菜。由于黄瓜的遗传基础较狭窄,基因转化是提供外源基因的有效途径^[1-2],成功地进行组织培养,对于黄瓜转基因等研究十分必要^[3-5]。该试验通过农杆菌介导法将金属硫蛋白(MT)基因转化黄瓜子叶,并获得了3株抗性植株,PCR及RT-PCR检测结果显示,其均为阳性转化植株。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验选用津优一号和津研四号2个黄瓜品系(市售)。转化用农杆菌菌株为LBA4404,质粒p139035S-GFPMT、p139035S-MT均由生物反应器与药物开发教育部工程研究中心提供。

1.2 试验方法

1.2.1 载体构建 以pCambia 1390为基本质粒构建了一个用于瞬时表达研究的表达载体p139035S-GFP-MT和一个用于植物的遗传转化的表达载体p139035S-MT,其中含有潮霉素(Hyg)抗性基因。

1.2.2 黄瓜无菌苗的培养 将剥去种皮的黄瓜种子用70%的乙醇浸泡30 s,转入5%的NaClO溶液中消毒

5 min,用无菌水洗3~5次,置于无菌干燥的滤纸上将水吸干,接种到固体MS培养基(附加30%蔗糖,0.75%琼脂粉,pH值为5.8),置于恒温培养箱内25℃培养(16 h光照/8 h暗培养)。取不同苗龄(3~7 d)的黄瓜子叶作为转化材料。

1.2.3 外植体及预培养 将黄瓜子叶切除柄端和尖端,中部再横切,切成长约0.5 cm的片段,叶面朝上平放于预培养基(MS+1.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA+100 μmol/L 乙酰丁香酮+2.0 mg/L AgNO₃+30%蔗糖+0.75%琼脂粉),25℃暗培养2 d。

1.2.4 农杆菌的制备及浓度筛选 先进行菌株活化,然后取过夜培养的活化菌1 mL,加入至50 mL含50 mg/L卡那霉素,50 mg/L链霉素,50 mg/L利福平的LB培养基中,28℃,200 rpm震荡培养,进行2次活化。取OD₆₀₀为0.4~0.6用于侵染。

1.2.5 侵染及共培养 将预培养的外植体进入用MS液体培养基稀释的农杆菌悬浮液中侵染,侵染时间分别为5、10、15、20、25、30 min。然后用无菌滤纸吸去外植体表面多余菌液,在预培养基中共培养3 d。

1.2.6 植物材料对潮霉素耐受力的测定 将外植体分成6组置于附加潮霉素的愈伤培养基(MS+1.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA+2.0 mg/L AgNO₃+30%蔗糖+0.75%琼脂粉),潮霉素浓度分别为0、10、20、30、40、50 mg/L。在培养过程中观察愈伤组织的生长情况,选取对愈伤组织生长具有极大抑制作用的潮霉素浓度作为抗性愈伤组织筛选培养基。

1.2.7 选择培养与植株再生 将共培养3 d的外植体转移至选择诱导培养基(MS+1.0 mg/L 6-BA+1.0 mg/L NAA+2.0 mg/L AgNO₃+25 mg/L Hyg+400 mg/L 特美汀+30%蔗糖+0.75%琼脂粉),筛选抗潮霉素的愈伤组织,每2周继代1次。选取潮霉素抗性的愈伤组织,转入选择分化培养基(MS+1.0 mg/L 6-BA+

第一作者简介:郑伟(1983-),男,吉林延吉人,硕士,研究方向为植物生物反应器。E-mail: zhengwei1521@163.com。

通讯作者:庞实锋(1975-),男,广东茂名市人,博士,讲师,现从事遗传学教学科研工作。E-mail: psf1975@sina.com。

基金项目:十一“863”计划生物反应器重大专项资助项目(2007AA100503);吉林省科技发展重点计划资助项目(20070922);高等学校科技创新工程重大项目培育资金资助项目(708018);长春市科技计划资助项目(06GG150)。

收稿日期:2009-05-21

2.0 mg/L AgNO₃+25 mg/L Hyg+400 mg/L 特美汀+30%蔗糖+0.75%琼脂粉), 筛选抗潮霉素的再生小芽。待抗性芽长至约3~5 cm 时, 将其从外植体上分开, 转移至选择生根培养基(1/2MS+0.1 mg/L IAA+25 mg/L Hyg+400 mg/L 特美汀+30%蔗糖+0.7%琼脂粉), 继续长芽及生根。培养温度为 25~26℃, 每天光照 16 h, 光照强度为 2 000 lx。当小苗根系发达到一定程度, 打开瓶盖, 练苗 2~3 d, 取出小苗, 洗净根部培养基, 小心移栽到灭菌土中继续培养。

1.2.8 绿色荧光蛋白表达检测 利用基因工程手段将绿色荧光蛋白(Green fluorescent protein, GFP)基因连在目的基因 MT 后, 用农杆菌介导法转化黄瓜子叶。待其长出抗性愈伤, 用抗性愈伤做切片, 在激光扫描共聚焦显微镜下观察 GFP 基因的表达情况^[5]。

1.2.9 转基因植株的鉴定 黄瓜基因组 DNA 的分离及 PCR 检测: 用植物基因组 DNA 提取试剂盒提取转基因植株叶片总 DNA。用基因组 DNA 作为模板, 以 MT 的两端引物扩增目的基因 MT。黄瓜总 RNA 的分离及 RT-PCR 检测用高纯总 RNA 快速提取试剂盒从 PCR 阳性的转化植株中提取总 RNA, 用通用型 RT-PCR 试剂盒进行 RT-PCR 检测, 对 MT 的 mRNA 转录表达进行检测。

2 结果与分析

2.1 苗龄与黄瓜芽再生

由图 1 可知, 苗龄对芽再生能力有明显影响, 其中 3~4 d 苗龄的芽再生率较高, 达到 50% 左右。随着苗龄增加, 芽再生率逐渐下降, 6~7 d 苗龄的再生率很低, 甚至不再生。经统计学分析, 津优一号与津研四号 2 个品种无显著差异。

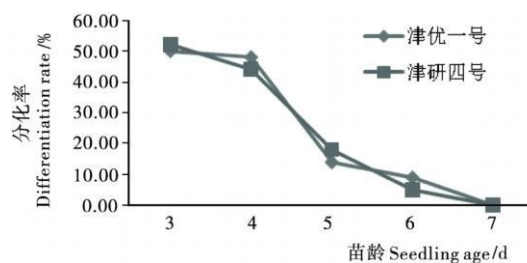


图 1 苗龄对黄瓜离体再生的影响

Fig. 1 Effect of different seedling age on cucumber *in vitro* regeneration

2.2 侵染时间对转化效率的影响

图 2 表明, 侵染时间对转化效率影响很大。侵染时间过长, 会导致外植体死亡, 很难得到抗性芽; 侵染时间过短, 不能让足够的农杆菌附着于外植体切口处, 会使转化率降低。试验最适侵染时间为 15 min。经统计学分析, 津优一号与津研四号 2 个品种无显著差异。

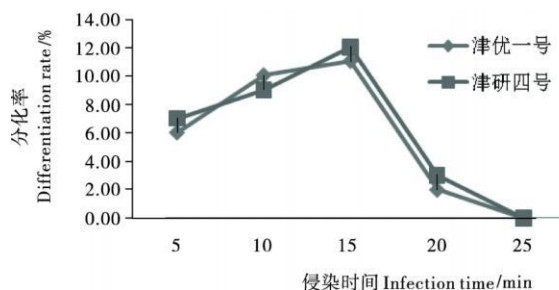


图 2 侵染时间对转化效率的影响

Fig. 2 Effect of different infection time on transformation frequency

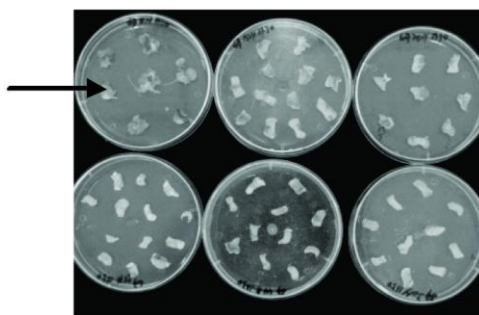
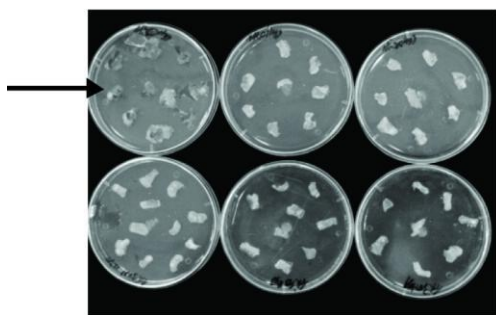


图 3 潮霉素敏感性测试

Fig. 3 Test of hygromycin for screening

2.3 潮霉素筛选浓度的确定

如图 3 指针指示为 4 周后空白对照组黄瓜子叶的愈伤生长情况(左图为津优一号, 右图为津研四号), 沿顺时针方向分别为黄瓜子叶在 Hyg 浓度为 10、20、30、40、50 mg/L 的愈伤培养基中的生长情况。由图 3 可见, 空白对照组的黄瓜子叶的愈伤组织生长良好, 而在含潮

霉素的培养基上愈伤组织生长受到抑制, 在潮霉素浓度为 30 mg/L 的培养基中, 外植体开始变黄, 随着潮霉素浓度的提高, 黄瓜子叶逐渐变黄死亡^[7]。考虑到农杆菌转化中经常会出现转基因的嵌合体或所谓的“假阳性”现象, 另外还考虑到筛选压力太高则很难筛选到转化植株的现象, 因此, 试验最后将抗性愈伤组织的筛选压力

定在 25 mg/L。

2.4 绿色荧光蛋白在黄瓜愈伤中的表达

图 4 为转基因愈伤和空白对照在 Leica DMI4000 激光扫描共聚焦显微镜下观察得到的图片。上面 3 组依次

为转基因愈伤在荧光通道, 透射光通道, 荧光与透射光通道叠加下观察的结果; 下面 3 组为空白对照在 3 种通道下观察的结果。由图 4 可知, 在蓝光照射下转基因黄瓜愈伤组织可观察到较强的绿色荧光, 而空白对照则无荧光。

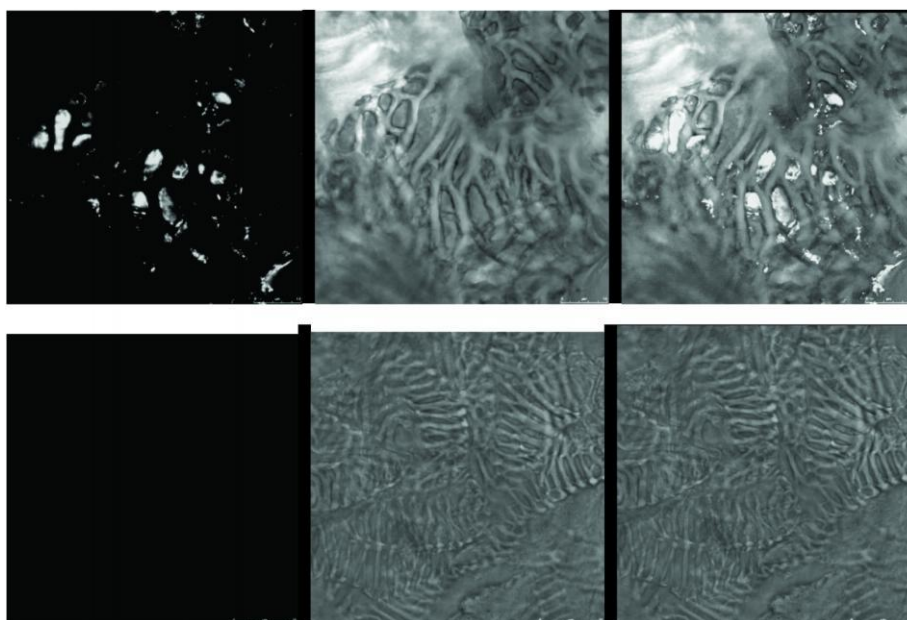


图 4 GFP 在转基因黄瓜愈伤组织中的表达

Fig.4 GFP expression in transformed cucumber callus

2.5 抗性植株的分子检测

2.5.1 转基因黄瓜的 PCR 检测 对转基因黄瓜进行 PCR 鉴定, 如图 5 所示, 有 3 个再生植株经 PCR 检测扩增出目的基因 MT, 且与阳性对照质粒条带在同一位置, 说明目的基因已经整合到黄瓜基因组中, 3 个再生植株为阳性转基因植株, 其它转基因再生植株为假阳性植株。

2.5.2 转基因黄瓜的 RT-PCR 检测 对 PCR 检测为阳性的转基因植株进行 RT-PCR 鉴定, 以确定外源基因 mRNA 的转录表达情况。结果表明, 在所检测的 3 株 PCR 结果呈阳性的再生植株, RT-PCR 也呈阳性。

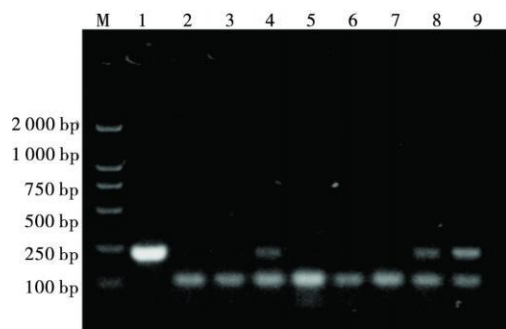


图 5 转基因植株的 PCR 检测

注: M. DL2 000 DNA Maker; 1. 阳性对照(质粒); 2. 空白对照(H₂O); 3. 阴性对照(非转化植株); 4~9. 转化黄瓜植株。

Fig.5 PCR analysis of transformed plants

Note: M. DL2 000 DNA Maker; 1. Positive control(plasmid); 2. H₂O; 3. Negative control(untransformed plant); 4~9. Transformed cucumber plants.

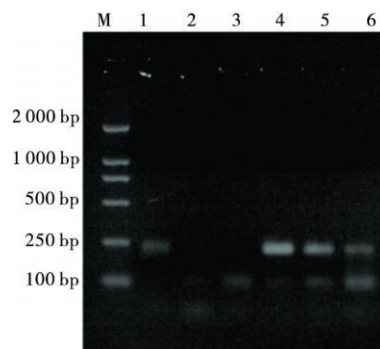


图 6 转基因植株的 RT-PCR 检测

注: M. DNA Maker DL2 00Q 1. 阳性对照(质粒); 2. 空白对照(H₂O); 3. 阴性对照(非转化植株); 4~6. 转化黄瓜植株。

Fig.6 RT-PCR analysis of transformed plants

Note: M. DNA Maker DL2 00Q 1. Positive control(plasmid); 2. H₂O; 3. Negative control(untransformed plant); 4~6. Transformed cucumber plants.

3 讨论

试验采用潮霉素作为选择性抗生素, 对外植体进行筛选。潮霉素是筛选转化体常用的抗生素之一, 以潮霉素作为选择标记已应用于玉米、大豆等植物的遗传转化。在黄瓜的遗传转化过程中, 常用卡那霉素作为筛选标记, 而潮霉素较少。有研究表明, 使用 20~30 mg/L 的潮霉素比使用 50~100 mg/L 的卡那霉素的选择效率更好^[8]。经过潮霉素浓度梯度筛选, 该试验的最适潮霉素浓度为 25 mg/L。

近年来, 绿色荧光蛋白基因(GFP)作为一种非酶报告基因引起人们的广泛兴趣。GFP 基因作为报告基因具有检测方便、材料无需预处理、不需要任何反应底物及辅助因子等优点, 而且植物、微生物本身不含有 GFP, 不会出现假阳性的结果^[9,11]。试验以 GFP 作为报告基因, 对转基因黄瓜愈伤组织中绿色荧光蛋白的表达进行了检测, 结果表明 GFP 与 MT 的融合基因已经整合到黄瓜的愈伤组织中, 并能正常表达, 同时表明, 该文构建的载体能正确地启动外源基因的表达, 可用于植物的遗传转化。

试验以金属硫蛋白(MT)为外源基因, 通过农杆菌介导法对黄瓜子叶进行遗传转化。MT 具有强大的清除自由基的能力及抗辐射和光敏作用, 这使其成为护肤美容的理想佳品^[12]。黄瓜是十分有效的天然美容品。据研究表明, 鲜黄瓜中所含的黄瓜酶能有效地促进机体的新陈代谢, 扩张皮肤毛细血管、促进血液循环、增强皮肤的氧化还原, 有令人惊异的润肤美容效果。为此, 在本身具有美容功效的黄瓜中导入同样具有美容功效的基因 MT, 这将会给基因美容带来不可估量的商机。因此, MT 转基因黄瓜有着广泛的应用前景。

目前为止, 已获得了 3 株抗性植株, 经过 PCR 和 RT-PCR 初步检测, 结果均为阳性, 未鉴定的抗性再生苗还在继续生产。由此初步建立了黄瓜子叶的遗传转化体系, 为今后的遗传转化研究奠定了基础。

参考文献

- [1] 邹金美, 张国广, 陈亮. 黄瓜转基因研究进展[J]. 厦门大学学报(自然科学版), 2008(S2): 236-241.
- [2] 赖来, 潘俊松, 何欢乐, 等. 农杆菌介导的 MADS-box 基因转化黄瓜初步研究[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2007(4): 374-382.
- [3] Lee H S, Kwon E J, Kwon S Y, et al. Transgenic cucumber fruits that produce elevated level of an anti-aging superoxide dismutase[J]. Molecular Breeding, 2003, 11(3): 213-220.
- [4] Vasudevan A, Ganapathi A, Selvaraj N, et al. Factors influencing GUS expression in cucumber(*Cucumis sativus* L.) [J]. Indian Journal of Biotechnology, 2002, 1(4): 344-349.
- [5] Jang J Y, Kwak K J, Kang H S. Expression of a High Mobility Group Protein Isolated from *Cucumis sativus* Affects the Germination of *Arabidopsis thaliana* under Abiotic Stress Conditions [J]. Journal of Integrative Plant Biology, 2008, 50(5): 593-600.
- [6] 庞实锋, 李校堃. 含 aFGF 基因的植物表达载体的构建及其对根瘤农杆菌的转化[J]. 贵阳医学院学报, 2006, 31(4): 301-304.
- [7] 王艳蓉, 陈丽梅, 潘俊松, 等. 黄瓜子叶高效再生体系的建立与遗传转化[J]. 上海交通大学学报(农业科学版), 2006(2): 152-156.
- [8] 孙兰英. 黄瓜遗传转化研究进展[J]. 北方园艺, 2004(3): 10.
- [9] 刘爱荣, 陈双臣. 农杆菌介导 Ds 转座因子的黄瓜遗传转化[J]. 安徽农业科学, 2007(23): 7047-7048.
- [10] Burns C, Gregory K E, Kirby M, et al. Efficient GFP expression in the mushrooms *Agaricus bisporus* and *Coprinus cinereus* requires introns[J]. Fungal Genetics and Biology, 2005, 42, 42: 191-199.
- [11] 杨明瑜, 刘翔, 褚华硕, 等. 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(2): 98-102.
- [12] 郭杰, 王冬艳. 金属硫蛋白与皮肤[J]. 中国美容医学, 2002(3): 270.

Study on Genetic Transformation of Cucumber(*Cucumis sativus* L.) with Metallothionein Gene

ZHENG Wei¹, YANG Ping¹, LI Hong-zhi¹, WANG Yan-fang¹, XU Yan¹, PANG Shi-feng^{1,2}

(1. Engineering Research Center of Bioreactor and Pharmaceutical Development, Ministry of Education, Jilin Agricultural University, Changchun, Jilin 130118, China; 2. College of Life Science, Zhongshan University, Guangzhou, Guangdong 510275, China)

Abstract: In this experiment, we chose cotyledon segments of *Cucumis sativus* L. as explants, and transformation was mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. We compared the effect of different seeding age, different infection time on cucumber in vitro regeneration, and made a test of hygromycin for screening. The results were as follows: seeding age were 3 or 4 day, infection time was 15 minutes, the concentration of hygromycin was 25 mg/L, could best obtain putative transgenic adventitious bud differentiation. Finally, we got three putative transgenic plants, they were all showed the positive transformed plants detected by PCR and RT-PCR.

Key words: Cucumber (*Cucumis sativus* L.); Metallothionein(MT); Gene; Callus; Green fluorescent protein(GFP); Transformation