

转 *il-4* 基因甘蓝后代的遗传及表现分析

张 玮 滢, 于 丽 杰

(黑龙江省普通高等学校植物生物学重点实验室, 哈尔滨师范大学 生命科学与技术学院, 黑龙江 哈尔滨 150025)

摘 要:利用农杆菌介导法将 *il-4* 基因转入甘蓝品种“中甘 11”, 用已转化得到的 T_3 、 T_4 代甘蓝品种为试验材料, 通过 PCR 扩增、PCR-Southern 杂交、蛋白质浓度测定和 ELISA 技术, 对 *il-4* 基因转化甘蓝的后代进行了检测, 并对 *il-4* 基因在 T_3 、 T_4 代甘蓝中的传递规律以及后代甘蓝植株的田间表现进行了调查。结果表明: T_3 、 T_4 代转 *il-4* 基因甘蓝阳性植株数较少, 甘蓝中 *il-4* 基因出现性状分离。同时, 田间调查表明, 相对于对照组(非转基因)植株, 转 *il-4* 基因阳性植株的田间抗病性下降, 植株高度降低, 结实率降低, 单株结籽数减少, 生长势等农艺性状降低。

关键词:甘蓝; 白细胞介素-4; 分子检测; 田间分析

中图分类号:S 635. 603. 6 **文献标识码:**B **文章编号:**1001-0009(2012)08-0133-05

甘蓝(*Brassica oleracea*)为十字花科芸薹属 2 a 生植物, 又名结球甘蓝, 在世界各地广泛种植, 具有重要的经济和实用价值。近年来, 随着转基因植物不断深入的研究, 通过农杆菌介导的遗传转化已经取得了一定的进展^[1]。白细胞介素-4(Interleukin, IL-4)是由 T 辅助细胞产生的具有多种生物学功能的一种淋巴因子, 在 20 世纪初被发现, 1986 年其基因克隆成功, 国际上统一命名

为白细胞介素-4。IL-4 功能复杂, 用途广泛, 大小约为 15 kD。IL-4 的主要功能在于抑制细胞免疫, 增强 B 细胞对 T 细胞的相符作用, 促进体液免疫应答, 特别是促进 Ig-E 反应, 增强特异性和非特异性的杀伤功能^[2-3]。同时, 在过敏性和感染性及自身免疫性疾病、肿瘤等方面, IL-4 都具有重要的医疗价值^[4]。

黑龙江省普通高等学校植物生物学重点实验室利用根癌农杆菌介导法将白细胞介素-4 基因转入甘蓝, 对其自交后代 T_3 、 T_4 代植株进行分子生物学检测及遗传表达研究, 为利用甘蓝作为生物反应器生产药用蛋白 IL-4 提供参考。

1 材料与方法

1.1 试验材料

受体品种为“中甘 11”, 其种子来源为中国农业科学院蔬菜花卉研究所。利用根癌农杆菌介导的携带 *il-4*

第一作者简介:张玮滢(1986-), 女, 在读硕士, 现主要从事植物分子生物学研究工作。E-mail: zhangweiying860411@163. com。

责任作者:于丽杰(1961-), 女, 博士, 教授, 现主要从事分子生物学研究工作。E-mail: yulijie1961@126. com。

基金项目:黑龙江省普通高等学校骨干教师创新能力资助项目; 黑龙江省自然科学基金资助项目(C0014); 哈尔滨市学科后备带头人基金资助项目(0071007002)。

收稿日期:2011-12-23

Research on Factory Breeding Tissue Culture Technology of *Lonicera* × *tellmanniana* Spaeth

ZHANG Hui-jie¹, WANG Li-ying^{1,2}, YUAN Ting¹, SUN Hui-hui¹

(1. Beijing Senmiao (Ocean Green) Seedling Limited Company, Beijing 102211; 2. Ningxia Senmiao (Ocean Green) Biological Engineering Limited Company, Yinchuan, Ningxia 750004)

Abstract: With *Lonicera* × *tellmanniana* Spaeth as test material, factory breeding tissue culture technology were studied. The results showed that appropriate differentiation medium of *Lonicera* × *tellmanniana* Spaeth was MS+0.6 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA+100 mg/L hydrolyzed milk protein the coefficient of differentiation was 3.2; the best formula for the rooting medium was 1/2MS+0.6 mg/L 6-BA+0.1 mg/L NAA, the rate of rooting was 92%; after acclimatized for 5~7 d, the rate of survival was 90%, when the regeneration plantlets were transplanted to substrate containing peat : vermiculite : perlite (2 : 1 : 1). The industrialization breed rate by tissue culture technology of *Lonicera* × *tellmanniana* Spaeth established through this study was rapid, the stability of regeneration system was well, could provide reference for the future tissue culture propagation technology of the *Lonicera* × *tellmanniana* Spaeth.

Key words: *Lonicera* × *tellmanniana* Spaeth; coefficient of differentiation; survival rate of transplanting

基因的甘蓝,其转化质粒为 P4IL-4(图 1),该质粒为黑龙江省普通高等学校植物生物学重点实验室构建,部分图谱如下。该试验中所用的材料为转 *il-4* 基因甘蓝的 T₃、T₄代自交植株幼苗。

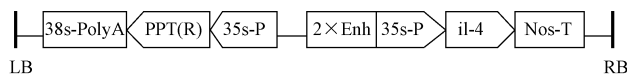


图 1 P4IL-4 质粒的部分图谱

Fig. 1 P4IL-4 part of the plasmid map

1.2 试验方法

1.2.1 转 *il-4* 基因甘蓝的基因组 DNA 提取 以 CTAB 法^[5]提取甘蓝 T₃、T₄代转基因植株的基因组总 DNA^[6]。

1.2.2 转 *il-4* 基因甘蓝的 PCR 检测 为了排除后续 PCR 检测时的假阴性结果,检测所提取的转 *il-4* 基因甘蓝 DNA 的质量,设计内对照 PCR^[7]。以 *il-4* 特异性引物对 T₃、T₄代甘蓝进行 *il-4* 基因的 PCR 检测。试验中所用到的阳性对照为 P4IL-4 质粒,非转基因植株为阴性对照,无菌水为空白对照。内对照 PCR 及 *il-4* 基因 PCR 反应体系(总体积 10 μ L):模板 DNA 1.0 μ L,10 \times PCR 缓冲液 1.0 μ L,dNTP Mixture(各浓度为 2.0 mmol/L) 1.0 μ L,上游引物(浓度为 20 μ mol/L)0.1 μ L,下游引物(浓度为 20 μ mol/L)0.1 μ L,Taq DNA 聚合酶(5 U/ μ L) 0.08 μ L,无菌去离子水 6.72 μ L,其中 10 \times PCR 缓冲液、dNTP Mixture 和 Taq DNA 聚合酶购于大连 TAKARA 公司。*il-4* 基因引物序包括内对照检测引物(rbcL-F: 5'-AATCTTCTACTGGTACATGGAC-3';rbcL-R:5'-TCA TCATCTTTGGTAAAATCAAG-3');*il-4* 基因引物(上游引物:5'-TGACCGTAACAGACATCTTTGC-3';下游引物:5'-TACTCTGGTTGGCTTCCTTCAC-3')。内对照引物和 *il-4* 基因引物的扩增产物长度分别为 433 bp 和 243 bp。反应条件:94 $^{\circ}$ C 预变性 3 min;94 $^{\circ}$ C 变性 46 s, 53.5 $^{\circ}$ C 复性 1 min,72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min,重复 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。结束后置于 4 $^{\circ}$ C 保存。PCR 结束后,用 1.2% 的琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 结果,阳性植株为 3 次检测均出现 *il-4* 非特异条带的植株,其余则视为阴性植株或污染株。

1.2.3 转 *il-4* 基因的 PCR-Southern 检测 将 PCR 检测 3 次阳性的 T₃ 代甘蓝植株的基因组 DNA 为待测样品,质粒、阴性对照和空白对照均与 PCR 检测中的设置相同,进行 PCR-Southern 检测。试验操作步骤参考 Roche 公司的《DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I》。

1.2.4 转 *il-4* 基因甘蓝的可溶性蛋白提取及聚丙烯酰胺凝胶电泳 采取 PCR 检测 3 次阳性的 T₃ 代甘蓝植株的幼嫩叶片进行可溶性蛋白提取。将提取出的可溶性蛋白进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(表 1)、照相并分析^[8]。

表 1 聚丙烯酰胺凝胶电泳制胶方法

Table 1 The fabrication methods of polyacrylamide gel

	15%分离胶 15% separation gel/ μ L	5.4%浓缩胶 5.4% separation gel/ μ L
ddH ₂ O	1 650	1 100
30% Acr/Bis	3 750	360
1.5 mol/L Tris-HCl(pH 8.8)	1 950	—
0.5 mol/L Tris-HCl(pH 6.8)	—	500
10% SDS	75	20
10% APS	75	20
TEMED	3	3
总体积 Total volume	7 500	2 000

1.2.5 转 *il-4* 基因甘蓝的总可溶性蛋白含量的测定 总可溶性蛋白含量的测定采用 Bradford 法。制备标准曲线:取各浓度梯度的 BSA 溶液测定 595 nm 的光吸收值,以光吸收值对 BSA 含量作图,绘出标准曲线;样品含量的测定:将稀释 4 倍的甘蓝蛋白粗提液在 595 nm 处进行光吸收值测定。仪器将根据标准曲线自动得出样品溶液中可溶性蛋白的含量。

1.2.6 转 *il-4* 基因甘蓝的 ELISA 检测 采用 ELISA 定量分析的方法对转基因甘蓝阳性植株的目的蛋白质(IL-4)含量进行检测,以证明 IL-4 在甘蓝后代中的表达。该试验中检测目的蛋白质表达量的方法为双抗夹心法^[9],购买试剂盒作为抗体来源。具体方法为:(1)包被:在 96 孔酶标检测板中分别加入如下样品,将包被好样品的酶标检测板用保鲜膜封好,于 4 $^{\circ}$ C 包被过夜(16 h);标准蛋白:将标准蛋白从 80 ng/mL 开始,用包被液按 5 倍梯度递减稀释为 6 个梯度,每个浓度包被 100 μ L,重复 2 孔;被测样品:将被测样品用包被液稀释 4 倍,包被 2 孔,每孔 100 μ L;阴性对照:将非转化植株的蛋白粗提液稀释 4 倍,包被 2 孔,每孔 100 μ L;空白对照:加 100 μ L 包被液,重复 2 孔。(2)封闭:吸去孔中液体,每孔加入 200 μ L Wash buffer,间隔浸泡 5 s,重复洗涤 3 次,此过程由洗板机自动完成,然后将板倒扣在干净的吸水纸上并用力拍干(每次洗涤的方法均与此相同)。每孔加入 150 μ L 封闭液,37 $^{\circ}$ C 封闭 2 h。(3)与一抗反应:洗涤 3 次。用抗体稀释液按 1:200 稀释一抗(母液浓度 0.1 mg/mL),每孔加入 100 μ L 稀释好的一抗溶液,37 $^{\circ}$ C 温育 2 h。(4)与二抗反应:洗涤 3 次。每孔加入 1:2 000 稀释的二抗,37 $^{\circ}$ C 温育 1.5 h。(5)酶反应:每孔加入 100 μ L 新鲜配制的 TMB 使用液,37 $^{\circ}$ C 暗反应 30 min。每孔加入 50 μ L 终止液终止反应。(6)读数:将酶标板放入酶标检测仪中,测定 450 nm 的光吸收值。以标准蛋白的光吸收值对相应的 IL-4 含量作图,画出标准曲线。样品中 IL-4 的含量由标准曲线计算得出。

1.2.7 转 *il-4* 基因甘蓝后代植株的生长势及农艺性状调查 将转 *il-4* 基因甘蓝后代植株与非转基因甘蓝植株进行对比,经过田间抗病性、植株高度、结实率、单株

结籽数、生长势等农艺性状进行调查,得出对比结论。

2 结果与分析

2.1 转 *il-4* 基因甘蓝的 PCR 检测结果分析

转 *il-4* 基因甘蓝 T_3 、 T_4 代内对照 PCR 检测(图 2)可知,在 DL 2 000 marker 433 bp 位置,转基因甘蓝阳性植株及质粒可见清晰的特异性条带,阴性对照及空白对照无条带。内对照 PCR 可有效地提高检测的准确性,排除 PCR 检测时的假阴性结果。

用 *il-4* 特异性引物进行 PCR 扩增(图 3),转基因阳性植株及质粒得到了大小为 243 bp 的清晰特异条带,阴性对照及空白对照无条带,说明操作过程无污染,试验结果可靠。



图 2 转基因甘蓝植株的内对照 PCR

注:M;DL 2 000 marker;1~22;转基因植株;23;空白对照;24:非转化材料阴性对照。

Fig. 2 Detection of the rcbl gene in transgenic cabbage plants using PCR

Note:M;DL 2 000 marker;1~22;Transgenic plants;23;Blank control;24;Negative control.

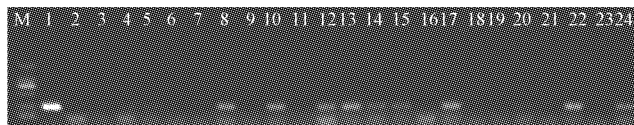


图 3 转 *il-4* 基因甘蓝植株 PCR 检测结果

注:M;DL 2 000 marker;1;阳性对照(质粒);2;阴性对照(非转基因甘蓝植株);3;空白对照;4~24;转基因植株(4、5、8、10、12~15、17、20、22、24 为转基因阳性,其余为阴性)。

Fig. 3 Detection of *il-4* gene in transgenic cabbage plants using PCR

Note:M;DL 2 000 marker;1;Positive control (Plasmid);2;Negative control (non-genetically modified plants);3;Blank control;4~24;genetically modified plants (4, 5, 8, 10, 12~15, 17, 20, 22, 24 were positive plants, other were negative plants).

经过 PCR 检测,在 366 株待测 T_3 代甘蓝植株中,共检测出 17 株 *il-4* 基因阳性植株(表 2、3),阳性率仅为 4.6%。在 673 株待测 T_4 代甘蓝植株中,共检测出 24 株 *il-4* 基因阳性植株,阳性率为 3.6%,阳性率均严重偏低。

表 2 转基因甘蓝 T_3 代检测结果

Table 2 The PCR-selection results of cabbage T_3 generation

T_2 代株号 Number of T_2 generation	待测株 Determinand plant /株	<i>il-4</i> PCR 检测 阳性株 Positive plant/株	<i>il-4</i> PCR detection 阳性率 Positive rate/%
CP ₂ 49-2++	94	3	3.2
CP ₂ 49-5++	14	0	0
CP ₂ 49-10++	101	7	6.9
CP ₂ 49-4+++	63	3	4.7
CP ₂ 49-11+++	64	2	3.1
CP ₂ 58-7+++	30	2	6.7
合计 Total	366	17	4.6

表 3 转基因甘蓝 T_4 代检测结果

Table 3 The PCR-selection results of cabbage T_4 generation

T_3 代株号 Number of T_3 generation	待测株 Determinand plant /株	<i>il-4</i> PCR 检测 阳性株 Positive plant/株	<i>il-4</i> PCR detection 阳性率 Positive rate/%
CP ₂ 49-10-50	380	11	2.9
CP ₂ 49-2-59	80	4	5.0
CP ₂ 49-10-47	30	2	6.7
CP ₂ 58-7-38×49-10-108	8	1	12.5
CP ₂ 49-10-55	40	1	2.5
CP ₂ 49-2-105	70	3	4.3
CP ₂ 49-11-25	40	1	2.5
CP ₂ 49-10-108	25	1	4.0
合计 Total	673	24	3.6

2.2 转 *il-4* 基因甘蓝的 PCR-Southern 杂交

以 *il-4* 基因 PCR 扩增为 3 次阳性的 T_3 代植株 DNA 为模板进行 PCR-Southern 杂交,结果表明(图 4),阴性对照及空白对照均无杂交信号,阳性对照(质粒)及部分样品有杂交信号,初步证实 *il-4* 基因已经导入到 T_3 代甘蓝植株中,也证明了 PCR 扩增检测结果的准确可靠。

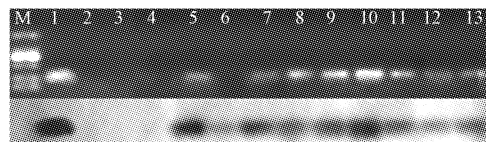


图 4 转 *il-4* 基因甘蓝的 PCR 扩增及 PCR-Southern 杂交结果

注:M;DL 2 000 marker;1;阳性对照;2;阴性对照;3;空白对照(水);4~13;待测 T_3 代甘蓝植株(其中 4、6 未检测出阳性条带,并无杂交信号)。

Fig. 4 PCR amplification and PCR-Southern detection of *il-4* transgenic cabbage plants

Note:M;DL 2 000 marker 1;Positive control;2;Negative control;3;Blank control(water);4~13;to be measured in T_3 cabbage plants(4, 6 is not measured the positive, non-hybrid signal).

2.3 转 *il-4* 基因甘蓝蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶电泳

将提取出的转 *il-4* 基因甘蓝蛋白质进行聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE),提取出的蛋白质经过考马斯亮蓝染色,进行 SDS-PAGE 后,图示条带清晰(图 5)。说明制备的蛋白质样品浓度适合,没有降解,变性后的蛋白质能够在聚丙烯酰胺凝胶中按分子量大小进行分离。

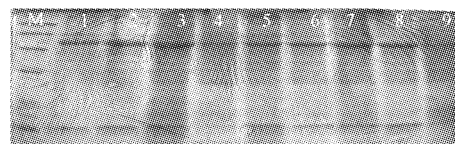


图 5 转 *il-4* 基因甘蓝蛋白质的聚丙烯酰胺凝胶电泳结果

注:M;蛋白分子量 marker;1~9;甘蓝总蛋白。

Fig. 5 The detection result of cabbage protein

Note:M;protein marker;1~9;total protein of cabbage.

2.4 转 *il-4* 基因甘蓝的总可溶性蛋白含量的测定

取各浓度梯度的 BSA 溶液制备 BSA 标准曲线(图

6),该曲线的回归方程为: $y=0.5883x-0.5820$, $R^2=0.9380$ 。用于后续蛋白浓度测定。 T_3 代和 T_4 代共选取28个阳性样品进行含量测定,检测结果显示,其中10株样品的总可溶蛋白含量较高(表4)。

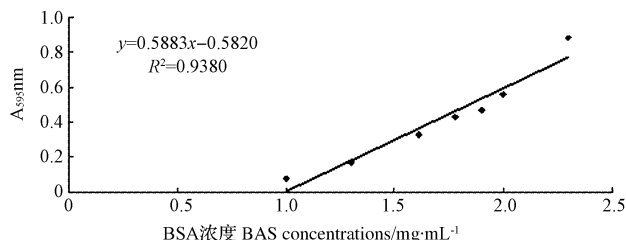


图6 BSA标准曲线

Fig. 6 Standard curve of BSA

表4 转基因植株总可溶蛋白测定结果

Table 4 The result of total protein in the transgenic plants

株系号 Number of lines	总可溶蛋白浓度 Total soluble protein relative concentrations/ $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$
CP ₂ 49-10-47-8	1 086 100
CP ₂ 49-10-50-235	221 820
CP ₂ 49-2-59-15	246 600
CP ₂ 49-10-108-1	156 310
CP ₂ 49-11-25-11	174 980
CP ₂ 49-2-105-37	157 040
CP ₂ 49-2-105-22	490 910
CP ₂ 49-10-50	889 410
CP ₂ 49-10-47	301 990
CP ₂ 49-10-47-8	1 086 100

2.5 转*il-4*基因甘蓝的ELISA检测结果

通过ELISA定量分析的方法可以更好地检测并证明IL-4在甘蓝中的表达。在进行ELISA检测时设置6个不同浓度梯度的标准蛋白溶液,制备标准曲线。得到的标准曲线方程为: $y=0.0031x+0.1224$, $R^2=0.9953$ (图7)。各IL-4含量与其相应的光吸收值存在良好的相关性,该回归方程可以用于待测样品中IL-4的定量分析。

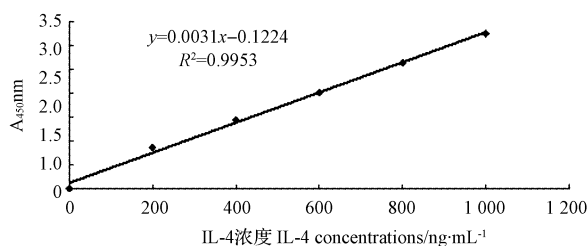


图7 ELISA标准曲线

Fig. 7 Standard curve of ELISA

根据回归方程 $y=0.0031x+0.1224$,以样品的光吸收值大于或等于阴性对照光吸收值的2倍为标准^[10],求出其中所含IL-4的绝对含量(X)及其占总可溶性蛋白(TSP)的相对浓度(表5)。经过检测,其中10份样品为ELISA阳性,在 T_3 代和 T_4 代共28个样品中阳性比例为35.7%。

表5 转基因甘蓝中IL-4的表达量

Table 5 The amount of IL-4 in transgenic cabbage plants

株系号 Number of lines	A ₄₅₀ nm	IL-4 含量 IL-4 content / $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	总可溶性蛋白相对浓度 Total soluble protein relative concentrations / $\text{ng} \cdot \text{mL}^{-1}$	TSP/%
CP ₂ 49-10-47	1.23	357.29	301 990	0.118
CP ₂ 49-2-59-45	1.155	333.097	99 770	0.334
CP ₂ 49-2-59-15	1.435	423.419	246 600	0.170
CP ₂ 49-10-47-8	1.554	461.806	1 086 100	0.043
CP ₂ 49-10-108-1	0.601	154.387	156 310	0.098
CP ₂ 49-11-25-11	1.11	318.581	174 980	0.182
CP ₂ 49-2-105-37	1.712	512.774	157 040	0.327
CP ₂ 49-2-105-22	1.461	431.806	490 910	0.088
CP ₂ 49-10-50-235	1.444	4791.3	221 820	0.192
CP ₂ 49-10-50	2.9073	898.35	889 410	0.101

2.6 转*il-4*基因甘蓝后代植株的生长势及农艺性状调查结果

在甘蓝生长、开花、结籽期间,对转基因甘蓝植株不同株系间、转基因与非转基因植株生长势、抗病性、单荚结籽数、出苗率成活率进行比较。经过统计表明,转基因甘蓝植株较非转基因植株生长势减弱、开花期明显延迟、株高降低、抗病性下降、单荚结籽数减少。原因可能是甘蓝为异花授粉植物,具有很强的杂种优势,后代植株生长势、抗病能力等农艺性状会因为不断的自交导致减弱。

3 结论与讨论

该试验主要对甘蓝 T_3 、 T_4 代植株进行了PCR检测,对后代阳性率进行了比较分析。理论上自交世代的增加会使个体更为纯和,植物转基因遗传的稳定性会有升高的趋势,但在该试验中,阳性率随着自交世代的增加呈逐渐降低的趋势。导致这种现象的原因有很多,如基因沉默、转基因失活、纯和体致死、自交衰退等。将*il-4*基因PCR扩增3次阳性的 T_3 代转基因甘蓝的基因DNA,进行PCR-Southern杂交,出现了杂交带,说明PCR扩增结果可靠,*il-4*基因在甘蓝植株中整合并得到稳定遗传。在ELISA检测中,共得到了10个目的蛋白含量较高的样品,其中,CP₂49-2-59-45占其总可溶性蛋白的含量较高为0.334%。

该试验的主要目的是将外源基因IL-4导入甘蓝受体,检测目的蛋白能否高剂量的表达。试验结果表明,目的蛋白在甘蓝后代中的表达量相对较低,并没有达到提高蛋白表达量的预期目的。在该研究中,转基因甘蓝的生长条件为夏日高温及强日照等,许多研究表明高温能诱导热休克蛋白的表达,同时使其它基因的RNA表达水平降低。光照加强也会影响沉默产生的时间并增加沉默产生的几率^[11-14]。转基因沉默产生的概率可能因环境条件大大增加,同时这些环境条件还可能使*il-4*的表达受到抑制。该试验中植物表达载体采用35S CaMV-35S组成型启动子,并添加2倍增强子序列,但植

物对密码子有一定的偏爱性,*il-4* 可能不符合甘蓝对密码子的偏爱性,从而影响 *IL-4* 表达量^[15]。De Jaeger G 等^[16]研究发现来自菜豆(*Phaseolus vulgaris*)的一个种子特异性启动子,相对于 CaMv35S 启动子而言,可使重组抗体在拟南芥中的表达水平约提高 40 倍。Perlak F J 等^[17]对杀虫毒蛋白基因的密码子进行修饰,增加 GC 含量,去除 ATTTA 序列和潜在的多聚 A 信号,从而提高该基因的表达水平,Twyman R M 等^[18]将人工改造的 LTB 基因转入马铃薯后检测抗原的表达水平,与未经改造的 LTB 基因转入马铃薯相比较,前者的抗原表达水平增加了 3~14 倍。Twyman R M 等^[18]研究认为外源蛋白的表达量为植物可溶性蛋白的 0.1%~1.0%,与其它以转基因甘蓝作为生物反应器的研究结果相比,该研究中检测到的 *IL-4* 表达水平较低,在亲本自交后代中最高表达量仅为总可溶性蛋白的 0.334%。目的蛋白在转基因甘蓝中的表达量相对较低。表达水平低及表达的不稳定性已成为影响转基因应用的一大障碍。可以通过对转基因序列进行密码子优化、选择具有特异性调控作用的启动子和增强子、添加内含子和核基结合序列,以及将转基因定位整合和定位表达等措施来克服转基因沉默,提高转基因的表达水平和遗传稳定性^[19]。*IL-4* 的表达是一个极其复杂的过程,基于以上原因,所以在亲本自交后代及杂交后代的植株中,还需对目的蛋白的表达做进一步的研究和探讨。同时对表达出的目的蛋白要做进一步的安全性检测,使这一分子育种的研究具有更强的现实意义。

参考文献

- [1] 毛慧珠,唐惕,曹湘玲,等. 抗虫转基因甘蓝及其后代的研究[J]. 中国科学(C 辑),1996,26(4):339-347.
- [2] Pawankar R, Okuda M, Yssel H. Nasal mast cells in perennial allergic rhinitis exhibit increased expression of the Fc epsilon RI, CD40L, IL-4, and IL-13, and can induce IgE synthesis in B cells[J]. J. Clin. Invest, 1997, 99(7): 1492-1499.
- [3] Seah G T, Rook G A. IL-4 influences apoptosis of mycobacterium-reactive lymphocytes in the presence of TNF-alpha[J]. J. Immunol, 2001, 167(3): 1230-1237.
- [4] 及晓宇,于丽杰,汪春蕾,等. 转 *il-4* 基因甘蓝的分子检测及田间分析[J]. 分子植物育种, 2009, 7(3): 1-5.
- [5] 凌春莹,于丽杰,陶雷. 适于转基因大白菜检测的 DNA 高效提取方法[J]. 牡丹江师范学院学报, 2005(2): 19-20.
- [6] 王关林,方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京: 科学出版社, 2002.
- [7] 权洁霞,张艺兵,陈长法,等. 植物转基因成分 PCR 检测内对照系统的建立[J]. 云南植物研究, 2002, 24(3): 333-340.
- [8] 盖新娜,蒋辉,卢静,等. 用 SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳的方法提纯蛋白质[J]. 实验动物科学与管理, 2001, 18(4): 44-45.
- [9] (美)奥斯伯 F M, 金斯伯 R E, 塞德曼 J G. 精编分子生物学实验指南[M]. 马学军,译. 4 版. 北京: 科学出版社, 2005: 475-484.
- [10] Tuboly T, Yu W, Bailey A, et al. Immunogenicity of porcine transmissible gastroenteritis virus spike protein expressed in plants[J]. Vaccine, 2000, 18(19): 2023-2028.
- [11] 郭启兴,于大胜,陈红,等. 植物中转录后基因沉默的启动、传导与抑制[J]. 生命科学研究, 2001(5): 129-133.
- [12] 华志华,黄大年. 植物转基因沉默研究与对策[J]. 生命科学, 1999, 11(2): 51-53.
- [13] 刘月平,赵晓萌,宫飞. 转基因植物中外源基因沉默机制的研究进展[J]. 中国农学通报, 2005, 21(4): 80-83.
- [14] 王英华,夏英武. DNA 甲基化与植物转基因沉默研究进展[J]. 生物工程进展, 2001, 21(3): 23-25.
- [15] Schranz M E, Quijada P, Sung S, et al. Characterization and effects of the replicated flowering time gene *FLC* in *Brassica rapa* [J]. Genetics, 2002, 162: 1457-1468.
- [16] De Jaeger G, Scheffer S, Jacobs A, et al. Boosting heterologous protein production in transgenic dicotyledonous seeds using phaseolus vulgaris regulatory sequences [J]. Nature Biotechnology, 2002, 20(12): 1265-1268.
- [17] Perlak F J, Fuchs R L, Dean D A, et al. Modification of the coding sequence enhances plant expression of insect control protein genes [J]. Proc Natl. Acad. Sci. USA, 1991, 88: 3324-3328.
- [18] Twyman R M, Stoger E, Schillberg S, et al. Molecular farming in plants: host systems and expression technology[J]. Trends Biotechnol, 2003, 21(12): 570-578.
- [19] Butaye K J M, Cammue B P A, Delaure S L, et al. Approaches to minimize variation of transgene expression in plants[J]. Mol. Breed, 2005, 16: 79-91.

Study on Analysis of Genetic and Performance of Offspring Transforming *il-4* Gene into *Brassica oleracea*

ZHANG Wei-ying, YU Li-jie

(Higher Education Key Laboratory of Plant biology, College of Life Sciences and Technology, Harbin Normal University, Harbin, Heilongjiang 150025)

Abstract: The *il-4* gene was transformed into *Brassica oleracea* cv. 'Zhonggan 11' by using Agrobacterium-mediated method. The obtained T_3 and T_4 generation materials were detected by using PCR amplification, PCR-southern blotting, protein concentration determination and ELISA. Meanwhile the genetic rule of *il-4* gene and the phenotypes of progenies were investigated. The results showed that a few positive transgenic cabbage plants were detected in T_3 and T_4 generation. The genetic rule of *il-4* gene in transgenic cabbages didn't according with Mendel law. Meanwhile, the field survey showed that the disease resistance, height, seed setting rate, growth potential decreased comparing to the control.

Key words: cabbage; interleukin-4; molecule detection; field survey