

# 根癌农杆菌介导乙肝病毒表面抗原基因 转化樱桃番茄体系优化

张艳婷<sup>1</sup>, 郭 斌<sup>1</sup>, 关正君<sup>2</sup>, 戴佳锐<sup>3,4</sup>, 尉亚辉<sup>1</sup>

(1. 西北大学 生命科学学院, 西部资源生物与现代生物技术省部共建教育部重点实验室, 陕西 西安 710069; 2. 运城学院 生命科学系, 山西 运城 044000; 3. 陕西省科学院 酶工程研究所, 陕西 西安 710600; 4. 陕西省酶工程技术中心, 陕西 西安 710600)

**摘 要:**以樱桃番茄为试材,建立了樱桃番茄高频再生体系,并对农杆菌介导乙肝病毒表面抗原(HBsAg)基因转化樱桃番茄的条件进行了优化研究。结果表明:11 d 苗龄的子叶外植体在 MS+6-BA 3.0 mg/L+IAA 0.2 mg/L 的培养基上预培养 2 d 后,用 OD 值为 0.6 的农杆菌侵染 15 min,可使樱桃番茄植株达到最佳的遗传转化效果。

**关键词:**HBsAg 基因;樱桃番茄;优化

**中图分类号:**S 641.203.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)11-0105-05

樱桃番茄(*Lycopersicon esculentum* Mill.)属普通番茄亚种的一个变种,植株根系发达,再生能力强,同大果形番茄相比具有生长势强、结果力强等优点,是研究基因工程的模式植物之一。目前,关于转基因番茄植株的研究已有许多报道<sup>[1-9]</sup>,但对樱桃番茄遗传转化的研究并不多。农杆菌介导遗传转化法简单快速,多为单拷贝插入且遗传稳定性较好<sup>[10]</sup>,经常应用于番茄的遗传转化,但至今转化率仍不高,因此其转化体系仍需进一步优化。建立高效的植物再生及遗传转化体系,是获得并研究转基因植物的前提和保障,该研究旨在通过对不同激素配比及浓度的试验,筛选出樱桃番茄外植体最佳再生培养基,并对其遗传转化系统进行优化研究,为进一步开展樱桃番茄基因工程研究奠定基础。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

樱桃番茄一号种子由西安市蔬菜研究所邓军均惠赠。农杆菌菌株 LBA4404、含有乙肝病毒表面抗原(HBsAg)基因的 pCambia1301 质粒均由西部资源生物与现代生物技术省部共建教育部重点实验室保存。

**第一作者简介:**张艳婷(1986-),女,硕士,现主要从事植物细胞工程等研究工作。

**责任作者:**尉亚辉(1960-),男,博士,教授,博士生导师,现从事基因与细胞工程制药等研究工作。E-mail:weiyahui@nwwu.edu.cn。

**基金项目:**国家自然科学基金资助项目(31000144);陕西省生物技术重点实验室资助项目(08JZ72);陕西省财政专项资助项目;西北大学自主创新类资助项目(10YZZ36);运城学院博士科研启动资助项目(YQ-2011042)。

**收稿日期:**2012-03-19

### 1.2 试验方法

**1.2.1 樱桃番茄无菌苗的繁殖** 取樱桃番茄种子以蒸馏水浸泡 5 h;70%酒精浸泡 30 s 后用 10%(V/V)次氯酸钠消毒 5 min,无菌蒸馏水冲洗 3~4 次,播种于无激素的 MS 培养基<sup>[11]</sup>上。琼脂为 0.7%,pH 5.8,25℃下培养,光照强度为 2 500 lx,光照周期 14 h/d。

**1.2.2 培养基及植物激素** 取樱桃番茄无菌植株,将其子叶切成小块并将下胚轴切成小段,同时置于不同激素组合的培养基上培养,切割处的伤口紧贴于培养基。

**表 1 再生芽诱导培养基**

Table 1 The components of induction culture media

| 培养基编号<br>No. of culture medium | 基本培养基<br>Basic culture medium | 植物激素<br>Plant growth regulators/mg · L <sup>-1</sup> |      |       |
|--------------------------------|-------------------------------|--|------|-------|
|                                |                               | IAA  | 6-BA | 2,4-D |
| 1                              | MS                            | 0.1  | 2.0  | 0.0   |
| 2                              | MS                            | 0.2  | 2.0  | 0.0   |
| 3                              | MS                            | 0.1  | 2.5  | 0.0   |
| 4                              | MS                            | 0.2  | 2.5  | 0.0   |
| 5                              | MS                            | 0.1  | 3.0  | 0.0   |
| 6                              | MS                            | 0.2  | 3.0  | 0.0   |
| 7                              | MS                            | 0.1  | 3.5  | 0.0   |
| 8                              | MS                            | 0.2  | 3.5  | 0.0   |
| 9                              | MS                            | 0.0  | 2.0  | 0.1   |
| 10                             | MS                            | 0.0  | 2.0  | 0.2   |
| 11                             | MS                            | 0.0  | 2.5  | 0.1   |
| 12                             | MS                            | 0.0  | 2.5  | 0.2   |
| 13                             | MS                            | 0.0  | 3.0  | 0.1   |
| 14                             | MS                            | 0.0  | 3.0  | 0.2   |
| 15                             | MS                            | 0.0  | 3.5  | 0.1   |
| 16                             | MS                            | 0.0  | 3.5  | 0.2   |

**1.2.3 抗生素和选择压对樱桃番茄外植体再生频率的影响** 将无菌樱桃番茄苗的外植体分别接种于筛选出来的最佳组合培养基(MS+3.0 mg/L 6-BA+0.2 mg/L IAA)上,同时在其中添加不同浓度的头孢霉素(Cefotaxime, Cef): 200、300、500、800 mg/L;潮霉素

(Hygromycin, Hyg): 5、10、15、20、25 mg/L。观察抗生素浓度和选择压对樱桃番茄外植体再生情况的影响,并统计其分化率。

1.2.4 樱桃番茄遗传转化过程 将樱桃番茄无菌苗的外植体放在芽分化培养基  $MS_1$  ( $MS+3.0\text{ mg/L } 6\text{-BA}+0.2\text{ mg/L IAA}$ ) 上预培养 2 d。挑取农杆菌 LBA 4404 单菌落(内含 pCambia1301/HB 质粒)接种于 YEB 液体培养基中,28℃ 振荡培养过夜;将活化后的菌液按 1:100 转接入新鲜的 YEB 液体培养基中继续培养至 OD 值为 0.6 左右,将菌液 4 000 r/min 条件下离心 10 min,收集菌体后用等量的  $MS$  液体培养基重悬;将预培养的外植体浸入制备好的菌液中 15 min,然后用无菌滤纸吸干外植体表面多余的菌液,转入发芽培养基,26℃ 下黑暗共培养 2 d,光照培养 1 d;共培养结束后,将外植体转入  $MS_1+500\text{ mg/L}$  头孢霉素的培养基中 25℃ 培养 7 d 后,再将其转入到筛选培养基 ( $MS_1+500\text{ mg/L}$  头孢霉素+20 mg/L 潮霉素)上诱导愈伤组织和不定芽的分化;每隔 20 d 继代 1 次,并逐渐降低原培养基中头孢霉素的浓度,待芽生长到 2 cm 左右时,将其切下置于生根培养基  $MS_2$  ( $MS+0.2\text{ mg/L IAA}+300\text{ mg/L}$  头孢霉素)上,继代 2 次后,转入无头孢霉素的生根培养基中继续培养。

1.2.5 樱桃番茄基因转化过程中外植体类型的选择 分别将苗龄为 7~13 d 樱桃番茄无菌苗的子叶、下胚轴以及幼苗的叶片、茎段作为外植体,预培养 2 d 后用农杆菌 LBA4404 菌液稀释至 OD 值为 0.6 侵染 15 min,转接到发芽培养基上暗培养 2 d,光照下培养 1 d,脱菌后转入筛选培养基中。培养 20 d 后,观察外植体上不定芽生成情况。

1.2.6 农杆菌介导 *HBsAg* 基因转化樱桃番茄条件优化 将活化后的农杆菌 LBA4404 转入新鲜的 YEB 液体培养基培养至所需的 OD 值,即 OD 值为 0.2、0.4、0.6、0.8、1.0,将预培养 2 d 的无菌番茄苗子叶外植体置于菌

液中 15 min,共培养后转入筛选培养基中。待外植体生长 20 d 后观察其不定芽生长情况。用 OD 值为 0.6 的菌液侵染樱桃番茄外植体,侵染时间分别为 5、10、15、20、25 min,并用灭菌的滤纸吸干外植体上多余菌液,然后转入发芽培养基上暗培养 2 d,光照培养 1 d,20 d 后观察其不定芽生长情况。

1.2.7 转化植株的 PCR 鉴定 取潮霉素抗性苗和未转化苗的新鲜叶片,CTAB 法<sup>[12]</sup>提取总 DNA,进行 PCR 检测。PCR 扩增目的基因的引物为 P1:5' AACGGGATC-CCGCACCATGGAGAACACAACATCA 3'; P2:5' CCCGGAATTCCGGCTTAAATGTATACCCAAAGAC 3'; 反应条件为:94℃ 预变性 5 min;94℃ 30 s,58.4℃ 40 s,72℃ 60 s,35 个循环;72℃ 10 min。扩增结束后,将 PCR 产物用 0.8% 琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.8 Southern blot 杂交检测 提取 0.2 g 新鲜叶片的总 DNA,溶于 40  $\mu\text{L}$  TE 溶液后,吸取 33  $\mu\text{L}$  DNA,用 HindIII 在 37℃ 消化 12 h,然后进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳。凝胶中的 DNA 片段转移至尼龙膜与 DIG 标记的 *HBsAg* 基因探针杂交。

### 1.3 数据分析

所得数据采用 SPSS 17.0 软件处理分析。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同激素组合对樱桃番茄外植体不定芽分化数目和生长的影响

樱桃番茄外植体在培养基上生长 7 d 后,伤口处逐渐膨大,20 d 后膨大的愈伤组织上出现绿色芽点,30 d 后逐渐形成不定芽。由表 2 可以看出,IAA 与 2,4-D 比较,前者对于不定芽诱导的总体情况明显优于后者。当激素配比为 6-BA 3.0 mg/L 和 IAA 0.2 mg/L 时,外植体出芽率达到最大值 86.25%,每个外植体上再生芽个数也为最大值。

表 2 不同激素组合对樱桃番茄外植体不定芽诱导的影响

Table 2 Effect of different combinations of hormones on the regeneration of cherry tomato explants

| 培养基编号<br>No. of culture<br>medium | 激素 Plant growth<br>regulators / mg · L <sup>-1</sup> |      |       | 外植体总数<br>No. of explants | 出芽外植体数<br>No. of budding explants | 出芽率<br>Frequency of differentiated / % | 再生芽总数<br>No. of regenerated shoots | 每个外植体再生芽个数<br>No. of buds on each explant |
|-----------------------------------|--|------|-------|--------------------------|-----------------------------------|--|------------------------------------|---|
|                                   | IAA  | 6-BA | 2,4-D |                          |                                   |  |                                    |   |
| 1                                 | 0.1  | 2.0  | 0.0   | 80                       | 39                                | 48.75                                  | 128                                | 3.28                                      |
| 2                                 | 0.2  | 2.0  | 0.0   | 80                       | 43                                | 53.75                                  | 173                                | 4.02                                      |
| 3                                 | 0.1  | 2.5  | 0.0   | 80                       | 55                                | 68.75                                  | 198                                | 3.60                                      |
| 4                                 | 0.2  | 2.5  | 0.0   | 80                       | 53                                | 66.25                                  | 216                                | 4.08                                      |
| 5                                 | 0.1  | 3.0  | 0.0   | 80                       | 60                                | 75.00                                  | 401                                | 6.68                                      |
| 6                                 | 0.2  | 3.0  | 0.0   | 80                       | 69                                | 86.25                                  | 498                                | 7.22                                      |
| 7                                 | 0.1  | 3.5  | 0.0   | 80                       | 51                                | 63.75                                  | 204                                | 4.00                                      |
| 8                                 | 0.2  | 3.5  | 0.0   | 80                       | 55                                | 68.75                                  | 231                                | 4.20                                      |
| 9                                 | 0.0  | 2.0  | 0.1   | 80                       | 11                                | 13.75                                  | 29                                 | 2.64                                      |
| 10                                | 0.0  | 2.0  | 0.2   | 80                       | 9                                 | 11.25                                  | 30                                 | 3.33                                      |
| 11                                | 0.0  | 2.5  | 0.1   | 80                       | 21                                | 26.25                                  | 41                                 | 1.95                                      |
| 12                                | 0.0  | 2.5  | 0.2   | 80                       | 13                                | 16.25                                  | 38                                 | 2.92                                      |
| 13                                | 0.0  | 3.0  | 0.1   | 80                       | 22                                | 27.50                                  | 79                                 | 3.59                                      |
| 14                                | 0.0  | 3.0  | 0.2   | 80                       | 30                                | 37.50                                  | 96                                 | 3.20                                      |
| 15                                | 0.0  | 3.5  | 0.1   | 80                       | 19                                | 23.75                                  | 51                                 | 2.68                                      |
| 16                                | 0.0  | 3.5  | 0.2   | 80                       | 39                                | 48.75                                  | 128                                | 3.28                                      |

## 2.2 抗生素和选择压对樱桃番茄外植体分化的影响

在添加不同浓度头孢霉素的再生培养基中,外植体的发芽率并未受到明显抑制,由此可知,头孢霉素对樱桃番茄外植体再生频率的影响并不大。樱桃番茄外植体对潮霉素(Hyg)有很强的敏感性,5 mg/L 的浓度就能有效抑制外植体的生长,当 Hyg 的浓度达到 20 mg/L 时明显抑制樱桃番茄外植体分化丛生芽,而 Hyg 浓度达到 25 mg/L 时,再生芽分化率为 0。因此,20 mg/L 潮霉素可作为樱桃番茄转化过程中有效的选择压。

## 2.3 不同苗龄和类型的外植体对樱桃番茄转化率的影响

由表 3 可看出,农杆菌介导的 *HBsAg* 基因转化樱桃番茄不同类型的外植体时,抗性芽的生成率随着外植体类型的不同存在显著的差异。幼苗叶片、茎段的转化率较低,尤其茎段的转化率极低,仅为 0.56%;随着苗龄的增大,子叶外植体的转化率逐渐提高,当苗龄为 11 d 时,其转化率达到 15.96%;13 d 时转化率下降至 9.43%。而下胚轴外植体则在苗龄 9 d 时达到其转化率的最高值 7.96%。因此,苗龄为 11 d 的子叶外植体更适宜转化。

表 3 不同苗龄和外植体类型对樱桃番茄转化率的影响

Table 3 Effects of age and type of explants on transformation efficiency of cherry tomato

| 外植体类型<br>Type of explants | 苗龄<br>Age of explants/d | 外植体总数<br>No. of explants | 出芽数<br>No. of regenerated shoots | 抗性芽生成率<br>Generation rate of resistant buds/% |
|---------------------------|-------------------------|--------------------------|----------------------------------|---|
| 子叶<br>Cotyledon           | 7                       | 88                       | 5                                | 5.68  |
|                           | 9                       | 75                       | 6                                | 8.00  |
|                           | 11                      | 94                       | 15                               | 15.96   |
| 下胚轴<br>Hypocotyl          | 13                      | 106                      | 10                               | 9.43  |
|                           | 7                       | 84                       | 6                                | 7.14  |
|                           | 9                       | 113                      | 9                                | 7.96  |
| 叶片<br>Leaf                | 11                      | 126                      | 7                                | 5.56  |
|                           | 13                      | 99                       | 5                                | 5.05  |
|                           | —                       | 201                      | 3                                | 1.49  |
| 茎段<br>Stem                | —                       | 178                      | 1                                | 0.56  |

## 2.4 不同农杆菌浓度和侵染时间对樱桃番茄转化率的影响

由表 4 可知,在侵染时间相同的条件下,不同侵染浓度对樱桃番茄外植体分化率的影响并不显著,OD 值为 0.2 时其分化率最高,但抗性芽生成率较低。OD 值为 0.4 和 0.6 侵染后外植体转化率均较高,OD 值为 0.6 时转化率达到最高,当 OD 值达到 0.8 后,外植体的转化率迅速下降,OD 值为 1.0 时,由于农杆菌浓度过大,侵染结束后大量外植体由于不容易脱菌而染菌死亡。由

表 5 可知,农杆菌在侵染时间不同的条件下,樱桃番茄外植体分化率和转化率明显不同。在侵染 5 min 后,外植体分化率较高,但转化率极低,仅为 8%。侵染时间为 10 min 和 15 min 时,外植体分化率和转化率均较高,分别为 34.69% 和 35.29%,二者差异不明显。随着侵染时间的延长,外植体转化率也有所下降。因此,侵染时间为 15 min 时,最适合樱桃番茄外植体的转化。

表 4 不同农杆菌浸染浓度对樱桃番茄遗传转化的影响

Table 4 Effect of different infection concentrations of *Agrobacterium* on transformation of cherry tomato explants

| 侵染浓度<br>The concentration of <i>Agrobacterium tumefaciens</i> /mg · L <sup>-1</sup> | 外植体总数<br>No. of explants | 分化数<br>No. of budding explants | 分化率<br>Frequency of differentiated /% | 抗性芽个数<br>No. of resistant buds | 抗性芽生成率<br>Generation rate of resistant buds/% |
|---|--------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|---|
| 0.2   | 56                       | 27                             | 48.21                                 | 6                              | 10.71   |
| 0.4   | 63                       | 30                             | 47.62                                 | 21                             | 33.33   |
| 0.6   | 70                       | 33                             | 47.14                                 | 27                             | 38.57   |
| 0.8   | 60                       | 23                             | 38.33                                 | 4                              | 6.67  |
| 1.0   | 56                       | 14                             | 25.00                                 | 0                              | 0   |

表 5 农杆菌不同侵染时间对樱桃番茄遗传转化的影响

Table 5 Effect of different infection time on transformation of cherry tomato explants

| 侵染时间<br>Time of infecting /min | 外植体总数<br>No. of explants | 分化数<br>No. of budding explants | 分化率<br>Frequency of differentiated /% | 抗性芽个数<br>No. of resistant buds | 抗性芽生成率<br>Generation rate of resistant buds/% |
|--------------------------------|--------------------------|--------------------------------|---------------------------------------|--------------------------------|---|
| 5                              | 50                       | 16                             | 32.00                                 | 4                              | 8.00  |
| 10                             | 49                       | 21                             | 42.86                                 | 17                             | 34.69   |
| 15                             | 51                       | 21                             | 41.18                                 | 18                             | 35.29   |
| 20                             | 53                       | 13                             | 24.53                                 | 15                             | 28.30   |
| 25                             | 51                       | 6                              | 11.76                                 | 15                             | 29.41   |

## 2.5 *HBsAg* 基因导入樱桃番茄的分子检测

该研究共产生 32 株再生植株,图 1 为部分再生植株的 PCR 检测结果。由图 1 可知,对照组非转基因植株未扩增出条带,而与阳性对照 pCambia1301-*HBsAg* 扩增出相同条带的再生植株即为转 *HBsAg* 基因植株。经过 PCR 鉴定后,22 株再生植株扩增出与阳性对照相同大小的条带,说明 *HBsAg* 基因已经整合到植株基因组中,初步确定其为转基因植株。

取 PCR 检测结果为阳性的再生植株进行 Southern 杂交试验,图 2 为其中 4 株再生植株的检测结果。由图 2 可知,非转基因对照植株并未出现杂交信号,而其余再生植株均出现了杂交条带,进一步说明其为转基因植株。另外,*HBsAg* 基因大部分以单拷贝的形式整合到樱桃番茄基因组中,个别植株出现 2 个拷贝的 *HBsAg* 基因。



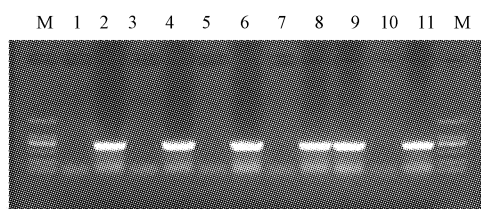


图1 转基因樱桃番茄 DNA 的 PCR 检测结果

注:M. Marker;1. 阴性对照;2、4、6、8、9. 转基因植株;3、5、7、10. 未转化植株;11. 阳性对照。

Fig.1 PCR amplification results of transgenic cherry tomato

Note: M. Marker; 1. Negative control; 2, 4, 6, 8, 9. Transformed plants; 3, 5, 7, 10. Untransformed plants; 11. Positive control.

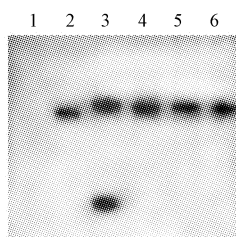


图2 转基因樱桃番茄的 Southern 检测结果

注:1. 阴性对照;2~5. 转基因不同株系;6. 质粒(阳性对照)。

Fig.2 Southern blot analysis of transgenic cherry tomato

Note: 1. Negative control; 2~5. Independent transgenic plants; 6. Plasmid DNA as positive control.

### 3 讨论与结论

外源激素在植物组织培养过程中必不可少。不同激素组合与配比的培养基对同一植物的组织培养有不同的效果,多激素综合使用比单一激素的使用更有利于植物愈伤组织和不定芽的产生。有研究人员在樱桃番茄的组织培养过程中,对各种激素的配比和浓度进行了试验。但由于不同品种樱桃番茄内源激素水平的差异,其外植体出芽率也出现很大的差异。在该试验中,IAA对樱桃番茄不定芽的诱导情况优于2,4-D。在诱导愈伤组织的同时,直接诱导不定芽的分化可以明显的缩短试验进程。从该试验可以看出,虽然省略了愈伤组织诱导的过程,但在分化培养基上,樱桃番茄愈伤组织的诱导和不定芽的分化是同步的,当激素配比为6-BA 3.0 mg/L和IAA 0.2 mg/L时,其不仅能诱导愈伤组织的形成,也能诱导不定芽的分化,且不定芽的出芽率和每个外植体上再生芽个数也达到最大值。

樱桃番茄遗传转化体系的优化,对于获得大量转基因植株具有重要作用。该研究在植物高效组织再生的基础上,系统的研究了苗龄、外植体、抗生素、农杆菌等对番茄遗传转化的影响。子叶外植体因其较强的再生能力,常作为植物高效再生体系建立和遗传转化的材

料。Velcheva M等<sup>[4]</sup>认为苗龄为7 d的子叶能获得更多的转基因植株,这可能是由于子叶处在生理活跃期,易受外界因素的影响,在外源激素作用下易转入脱分化状态,增加了农杆菌的侵染率。随着苗龄的不断变化,抗性芽的生成频率也随之改变。该试验表明,樱桃番茄子叶和下胚轴的转化率都与苗龄密切相关。苗龄为11 d的樱桃番茄子叶外植体更适合转化。另外,农杆菌的侵染时间和浓度对遗传转化效率的影响也很重要,如果菌液浓度过高,不仅容易对外植体切口处造成伤害而影响其再生能力,而且培养基中的抗生素有可能不足以完全抑制农杆菌的生长而导致外植体的死亡。如果外植体在菌液中浸泡时间过长,即使外源基因进入外植体细胞而使其能承受选择压的筛选,外植体也会受到农杆菌毒害而逐渐死亡。若浸泡时间过短,外源基因进入的几率很小,导致转化效率过低甚至没有转化成功。只有在适宜的条件下,外植体才能被诱导出抗性愈伤组织并分化出抗性芽,最终发育成完整的植株。该研究对樱桃番茄的遗传转化体系进行了优化,为构建大量的转基因樱桃番茄植株奠定了基础。

### 参考文献

- [1] Van Roekel J S C, Damm B, Melchers L S, et al. Factors influencing transformation frequency of tomato (*Lycopersicon esculentum*) [J]. Plant Cell Rep, 1993, 12(12): 644-647.
- [2] Ellul P, Garcia-Sogo B, Pineda B, et al. The ploidy level of transgenic plants in *Agrobacterium* - mediated transformation of tomato cotyledons (*Lycopersicon esculentum* L. Mill) is genotype and procedure dependent [J]. Theor Appl Genet, 2003, 1(6): 231-238.
- [3] 江晓玲, 俞守义, 贺竹梅, 等. 番茄子叶外植体转化系统的优化 [J]. 云南植物研究, 2004, 26(1): 118-120.
- [4] Velcheva M, Faltin Z, Flaishman M, et al. A liquid culture system for *Agrobacterium*-mediated transformation of tomato (*Lycopersicon esculentum* L. Mill) [J]. Plant Science, 2005, 168: 121-130.
- [5] 王全华, 葛晨辉, 曹守军, 等. 番茄组织再生及其遗传转化体系的优化 [J]. 青岛农业大学学报, 2007, 24(1): 24-27.
- [6] 陈珍, 朱斌. 农杆菌介导的番茄遗传转化体系优化研究 [J]. 浙江大学学报, 2008, 34(6): 615-620.
- [7] 梁超, 王景雪, 裴雁曦, 等. 根瘤农杆菌介导的番茄高效遗传转化体系的研究 [J]. 华北农学报, 2009, 24(2): 71-74.
- [8] 张儒, 尉亚辉, 刘科. 乙肝表面抗原基因植物表达载体的构建 [J]. 西北大学学报(自然科学网络版), 2005, 3(4): 1-6.
- [9] 郝浩永, 尉亚辉, 朱剑光, 等. 转基因番茄表达口服乙肝疫苗 [J]. 食品科学, 2007, 28(6): 201-204.
- [10] Hanin E A, Sukhupind A K, Simpson R B. Transformation of cultivated tomato by a binary vector in *Agrobacterium rhizo* genes: transgenic plants with normal phenotypes harbour binary vector T-DNA, but no Ri-plasmid T-DNA [J]. Theor Appl Gen, 1986, 72: 770-777.
- [11] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture [J]. Physiol Plant, 1962, 15: 473-497.
- [12] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程 [M]. 2版. 北京: 科学出版社, 2002: 795-866.

# 莴苣原生质体的分离方法

王 卉<sup>1,2</sup>, 宁慧霞<sup>1</sup>, 刘 敏<sup>1</sup>, 郝秀英<sup>3</sup>, 努尔波拉提<sup>1</sup>, 王晓军<sup>1</sup>

(1. 中国科学院 新疆理化技术研究所, 新疆 乌鲁木齐 830011; 2. 中国科学院 研究生院, 北京 100039;

3. 新疆农业科学院 微生物研究所, 新疆 乌鲁木齐 830091)

**摘 要:**以莴苣无菌苗的幼叶为试材,研究了不同的分离材料、质壁分离时间、苗龄、酶液组合、酶解时间及酶液渗透压等对原生质体分离效果的影响。结果表明:幼叶在含有 13%甘露醇的 CPW 溶液里质壁分离 2 h,获得的原生质体产量存活率均高于其它质壁分离时间;苗龄为 20 d 的幼叶分离得到的原生质体质量高,原生质体呈圆形、内含物多、活力强;酶液组合为 1.0%纤维素酶+0.2%离析酶,25℃黑暗条件下酶解 12 h 可获得大量有较高活力的原生质体;酶解液中添加浓度为 9%的甘露醇较适合原生质体分离。

**关键词:**莴苣;幼叶;原生质体;分离

**中图分类号:**S 636. 203. 6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2012)11-0109-04

莴苣(*Lactuca sativa* L.)为菊科莴苣属 1 a 或者 2 a 生草本植物。广泛栽植于世界各地,已成为深受人们喜爱的蔬菜之一。莴苣中碳水化合物含量低,而烟酸(胰岛素激活剂)含量丰富,经常食用对糖尿病患者有益;同时由于富含铁元素,故能防治缺铁性贫血;又因莴苣中钾离子含量为钠盐的 27 倍,因此具有利尿、降血压、预防

心律紊乱的作用<sup>[1]</sup>;此外莴苣还有增进食欲、刺激消化液分泌、促进胃肠蠕动等功能。近年来的研究发现,莴苣中的一种芳香烃羟化脂,能够分解食物中的致癌物质亚硝胺,对于肝癌、胃癌癌细胞的形成有一定的预防作用,也可减轻癌症患者放疗或化疗的反应<sup>[1]</sup>。

目前国内对莴苣的研究大多数集中在栽培<sup>[2]</sup>、品种筛选<sup>[3]</sup>、莴苣生长和品质等方面<sup>[4-6]</sup>。莴苣新品种选育工作正处于起步阶段,具有自主知识产权的品种和类型很有限,我国现有栽培品种主要靠引进国外已有的品种,生产上栽培的同一类型间莴苣的亲缘关系较近,遗传背景狭窄<sup>[7]</sup>,因此需要多角度、多方法开展种质资源的创新工作,开发出品质优良的莴苣新品种,用以满足国内莴苣生产上的需要。转基因莴苣已有报道<sup>[8-9]</sup>,因此,运用原生质体技术进行莴苣种质资源创新也是一个很好的途径。

**第一作者简介:**王卉(1986-),女,在读硕士,现主要从事植物生理生化等研究工作。E-mail:whui0221@yahoo.cn。

**责任作者:**王晓军(1962-),男,硕士,研究员,现主要从事植物资源利用等研究工作。E-mail:wangxj@ms.xjb.ac.cn。

**基金项目:**中科院“西部之光”人才培养计划“西部博士”资助项目(XBBS200913);国家自然科学基金青年基金资助项目(81102737);中科院“西部行动计划高新技术”资助项目(KGCXZ-YW-509)。

**收稿日期:**2012-02-27

## Optimization of *Agrobacterium*-Mediated Transformation of HBsAg Gene into Cherry Tomato

ZHANG Yan-ting<sup>1</sup>, GUO Bin<sup>1</sup>, GUAN Zheng-jun<sup>2</sup>, DAI Jia-kun<sup>3,4</sup>, WEI Ya-hui<sup>1</sup>

(1. Key Laboratory of Resource Biology and Biotechnology in Western China, College of Life Science, Northwest University, Xi'an, Shaanxi 710069; 2. Department of Life Science, Yuncheng University, Yuncheng, Shanxi 044000; 3. Enzyme Engineering Institute of Shaanxi Academy of Sciences, Xi'an, Shaanxi 710600; 4. Enzyme Engineering Technology Center of Shaanxi, Xi'an, Shaanxi 710600)

**Abstract:** Cherry tomatoes were used as the experiment materials, and the high frequency regeneration system was established. Hepatitis B surface antigen (HBsAg) gene was used to transform cherry tomato explant mediated by *Agrobacterium tumefaciens*, and the explant was cultured to optimize the transformation system. The results showed that, the highest transformation efficiency was obtained when 11 d old cotyledon explants were preconditioned on the culture medium of MS + 6-BA 3.0 mg/L + IAA 0.2 mg/L for 2 days, infected with *Agrobacterium tumefaciens* ( $OD_{600}=0.6$ ) for 15 min.

**Key words:** HBsAg gene; cherry tomato; optimization