

# 根癌农杆菌介导库拉索芦荟 遗传转化因素优化

潘颖南<sup>1</sup>, 蒙平<sup>1</sup>, 何铁光<sup>1</sup>, 苏宾<sup>1</sup>, 陈廷速<sup>1,2</sup>, 李杨瑞<sup>2</sup>

(1. 广西农业科学院生物技术研究所, 广西南宁 530007; 2. 广西作物遗传改良生物技术重点开放实验室, 广西南宁 530007)

**摘要:** 以美国库拉索芦荟的横切薄片(transverse thin cell layer, tTCL)作为转化外植体, 初步研究了以根癌农杆菌介导的多种因子对芦荟遗传转化的影响。结果表明: 菌株 EHA105 比 LBA4404 及 AGL1 转化率高; 除了乙酰丁香酮(acetosyringone)外, 菌液的预处理和重悬液的 pH 值也是影响转化的主要因子; 菌液的预处理和适合的蔗糖浓度对转化也有促进作用; 感染时间为 12~18 min, 共培养的温度和时间分别以 25 °C 及 5 d 为佳。

**关键词:** 芦荟; 根癌农杆菌; 遗传转化

中图分类号: Q943.1 文献标识码: A 文章编号: 1000-3142(2005)02-0125-04

## Factors optimization for genetic transformation in *Aloe arborescens* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

PAN Ying-nan<sup>1</sup>, MENG Ping<sup>1</sup>, HE Tie-guang<sup>1</sup>, SU Bin<sup>1</sup>,  
CHEN Ting-su<sup>1,2</sup>, LI Yang-rui<sup>2</sup>

(1. *Biotechnology Research Institute, Guangxi Academy of Agriculture Sciences, Nanning 530007, China;*  
2. *Guangxi Cropgenetic Development and Biotechnology Laboratory, Nanning 530007, China*)

**Abstract:** Transient expression of  $\beta$ -glucuronidase(Gus) gene were used to determine the optimized conditions for transformation of transverse thin cell layer(tTCL) of *Aloe arborescens* mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. The results showed that EHA105 was more efficient than both LBA4404 and AGL1 in the genetic transformation. Besides acetosyringone(AS), pretreatment of the *Agrobacterium* liquid and the pH value of the suspension liquid(1/2MS) were also important in the genetic transformation. An appropriate concentration of sugar accelerated the transformation. The optimum infection time was 12 to 18 minutes. The best temperature and co-cultivation time were 25 °C and 5 days, respectively.

**Key words:** *Aloe*; *Agrobacterium tumefaciens*; genetic transformation

芦荟(*Aloe* spp.)属多年生百合科多浆常绿草本植物, 具有广泛的药理活性, 可做药用、饮料、化妆品等, 是一种很有开发前途的经济植物新资源; 开展芦荟的生物技术研究具有重要的理论和应用价值。

目前对于芦荟的遗传转化尚未见报道。我们在用库拉索芦荟表达人表皮生长因子的研究中(陈廷速等, 2002a), 以横切薄片外植体建立了较理想的再生体系(陈廷速等, 2003), 并对影响以根癌农杆菌介导的

收稿日期: 2003-12-19 修订日期: 2004-05-18

作者简介: 潘颖南(1966-), 女, 广西武鸣人, 副研究员, 从事植物组织和细胞培养等工作。

库拉索芦荟遗传转化的一些条件进行了初步研究,旨在建立根瘤农杆菌介导的高效转化体系,为用库拉索芦荟作为生物反应器表达药物积累工作经验。

## 1 材料和方法

### 1.1 实验材料

材料为美国库拉索芦荟(*Aloe arborescens*)的无菌试管苗。在超净工作台上将试管苗的叶片去除,参考周根余等(1999)的方法,沿两边对称叶片的中央纵切(LC1)和沿叶片的中心线纵切(LC2),再横切成约 1 mm 的薄片得到两种薄片(分别为 TCL1, TCL2),作为实验材料。

### 1.2 农杆菌菌株与质粒

根瘤农杆菌菌株为 EHA105、LBA4404 和 AGL1,植物表达载体 p1301EGF(含有 *Gus* 基因、*nptII* 基因、*hpt* 基因、人表皮生长因子基因 *hEGF*、35S 启动子)。

### 1.3 培养基及培养条件

(1)薄片芽诱导培养基(AM<sub>1</sub>):改良的 MS+BA 3.5 mg/L(单位下同)+IBA 0.3;(2)丛芽增殖培养基(AM<sub>2</sub>):改良的 MS+BA 2.5+IBA 0.2;(3)生根培养基(AM<sub>3</sub>):改良的 MS+NAA 0.5;(4)重悬菌液的培养基(AM<sub>4</sub>):1/2 改良的 MS+AS(acetosyringone)150 μmol/L+蔗糖 100 g/L+1/4V YEB,不加琼脂,pH 5.0;(5)共培养阶段的培养基(AM<sub>5</sub>):AM<sub>1</sub>+AS 100 μmol/L,培养温度为 26 °C;(6)筛选培养基(AM<sub>6</sub>):AM<sub>1</sub>+Cef(cefotaxime)400+Hyg(hygromycin)5。以上培养基如无特别说明均附加蔗糖 3%,琼脂 0.56%,pH5.8,培养温度为 25 °C;除壮苗生长和生根在光照下培养外,其余均进行暗培养。

### 1.4 农杆菌在转化前的预处理

取菌液接种于 YEB+Kan(kanamycin)25 mg/L 的培养基中,在 28 °C 和 180~250 rpm 的条件下振荡培养至 OD<sub>600</sub> 为 0.8~1.0。将培养好的菌液在 4 500 rpm 条件下离心 10 min,然后将菌体重悬于 AM<sub>4</sub> 培养基中(1:1),28 °C 条件下振荡培养 8~10 h 用于转化。

### 1.5 库拉索芦荟横切薄片与农杆菌共培养

将准备好的库拉索芦荟横切薄片移入准备好的菌液中,在 27 °C、120 rpm 条件下振荡 15 min,取出薄片转入 AM<sub>5</sub> 培养基中培养 4 d,再转入 AM<sub>6</sub> 进

行筛选。

### 1.6 *Gus* 报告基因的检测

外植体转化 4 d 后,参考改进的 Jefferson (1987)的方法,将外植体置于 X-Gluc 染色液(X-Gluc 0.89 mg/mL, chloramphenicol 250 mg/mL, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.0 mol/L, methano 120%, pH7.0~8.0)中,37 °C 水浴 4~8 h,镜检观察。瞬时表达率(%)=(*Gus* 基因瞬时表达的外植体数/总外植体数)×100%。每个处理检测的外植体数量为 20 个,3 次重复,结果为平均值,对照为未进行转化的薄片。

## 2 结果与分析

### 2.1 农杆菌菌株、菌液浓度及外植体侵染时间对 *Gus* 基因瞬时表达率的影响

不同农杆菌菌株和菌液浓度对库拉索芦荟薄片的 *Gus* 基因瞬时表达率的影响如图 1,在所供试的三个菌株中以 EHA105 的侵染能力最强,AGL1 的侵染能力最差;并以稀释一倍的菌液浓度效果为最好。本实验主要使用菌株 EHA105 来进行转化。

在一系列侵染时间的实验中,外植体在 EHA105 菌液中侵染时间长达 120 min 仍可检测到 *Gus* 基因瞬时表达,但由于农杆菌长得过于旺盛会对筛选不利,侵染时间以 15 min 为好(图 2)。另外还发现侵染菌液预处理时间对 *Gus* 基因瞬时表达率有影响(图 3)。当农杆菌振荡培养到 OD 值为 0.8 时,经离心后用 BM<sub>4</sub> 培养基进行悬浮。在重悬液中加入 1/4 YEB 的培养基能使库拉索芦荟的薄片周围长出农杆菌,*Gus* 基因的瞬时表达率也提高了;而用不加 YEB 的重悬液来侵染材料时,仅有部分薄片周围长有农杆菌;这可能与库拉索芦荟本身含有抑制细菌生长的物质有关系。

### 2.2 农杆菌重悬液 pH 值及蔗糖浓度对 *Gus* 基因瞬时表达率的影响

从图 4 可知,重悬液 pH 值过高或过低对 *Gus* 基因瞬时表达率影响很大,以 pH 值在 5.2~5.5 之间 *Gus* 基因的瞬时表达率为高,而且相当稳定。而农杆菌重悬液中的蔗糖浓度对库拉索芦荟的转化也有影响(图 5),在 100~120 g/L 蔗糖浓度时其 *Gus* 基因的瞬时表达最好。但蔗糖 100 g/L 时对其芽分化较好,因此采用此蔗糖浓度。

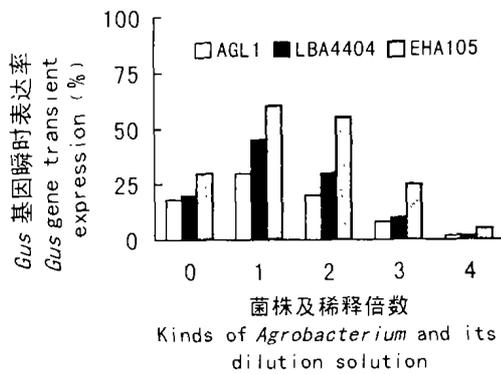


图 1 菌株及稀释倍数对 *Gus* 基因瞬时表达率的影响  
Fig. 1 Effect of kinds and concentration of *Agrobacterium* on *Gus* gene transient expression

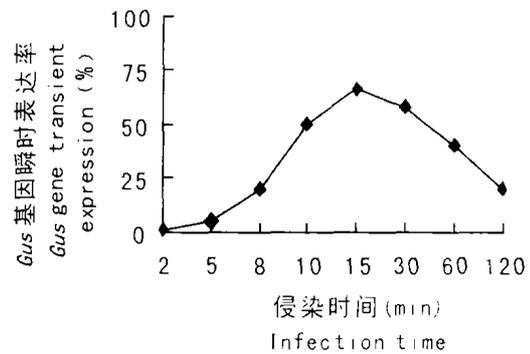


图 4 重悬液 pH 值对 *Gus* 瞬时表达率的影响  
Fig. 4 Effect of pH value of resuspension liquid on *Gus* gene transient expression

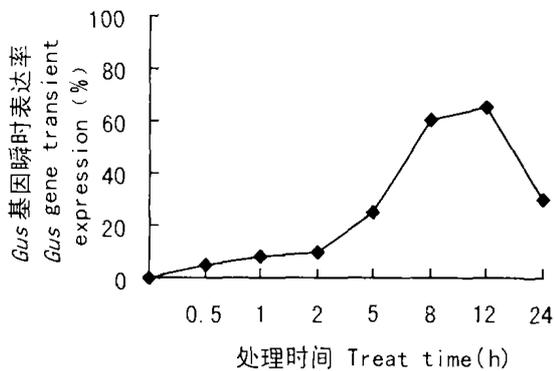


图 2 EHA105 菌株侵染时间对 *Gus* 基因瞬时表达率的影响  
Fig. 2 Effect of infection time of EHA105 on *Gus* gene transient expression

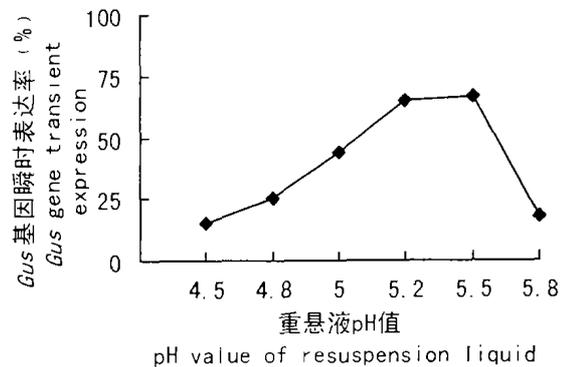


图 5 蔗糖浓度对 *Gus* 基因瞬时表达率的影响  
Fig. 5 Effects of sucrose concentrations on *Gus* gene transient expression

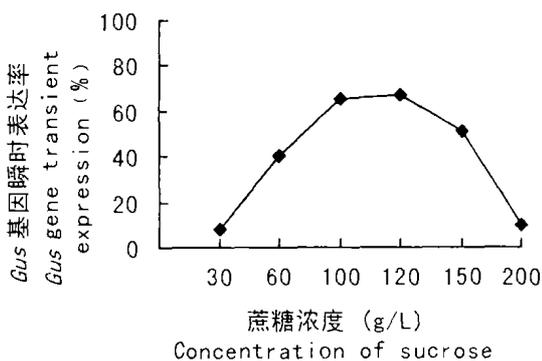


图 3 侵染菌液处理时间对 *Gus* 基因瞬时表达率的影响  
Fig. 3 Effect of treating time of *Agrobacterium* solution on *Gus* gene transient expression

### 2.3 外植体与农杆菌共培养温度及共培养时间对 *Gus* 基因瞬时表达率的影响

在正常的培养温度(25℃)下,*Gus* 基因的瞬时

表达率较高,同时库拉索芦荟薄片不定芽分化也较好。而温度偏高或偏低时 *Gus* 基因的瞬时表达率都较低(图 6)。

共培养时间的长短影响到转化率和下一步的筛选,由图 7 可知,受体与农杆菌共培养 4~5 d,其 *Gus* 基因的瞬时表达率较高;随着培养时间的延长农杆菌生长过多,在筛选时很难抑制农杆菌的生长,检测不到 *Gus* 基因的瞬时表达。此外,由于薄片在菌液中时间过长,因浸泡及缺氧而软腐,丧失芽分化的能力;这与香蕉中遗传转化的情况(陈廷速等, 2002b)是一样的。

### 2.4 *Gus* 基因表达检测

外植体与农杆菌共培养 4 d 后,进行 *Gus* 基因瞬时表达活性的检测,在组织中可测到 *Gus* 活性,显蓝色(图版 I:1)。无 *Gus* 活性者(图版 I:2)及对照(图版 I:3)。

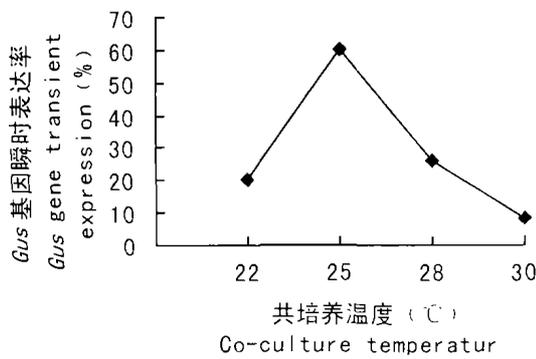


图6 菌株与外植体共培养温度  
Gus基因瞬时表达率的影响

Fig. 6 Effects of co-culture temperature  
on Gus gene transient expression

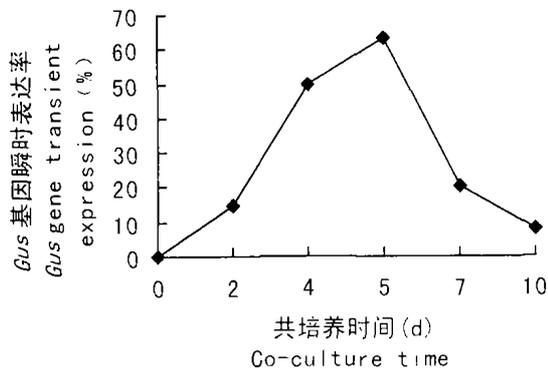


图7 菌株与外植体共培养时间  
Gus基因瞬时表达率的影响

Fig. 7 Effects of co-culture time on Gus  
gene transient expression

### 3 讨论与小结

在以根癌农杆菌介导的库拉索芦荟遗传转化中,除了必须使用AS外,偏酸性的感染条件、适合的共培养温度和时间、蔗糖浓度等诱导vir基因的表达,促进了T-DNA的转移,得到较高的瞬时表达率。重悬液的pH值过高(大于6.0)或过低(小于4.0),都很难检测到有Gus基因的瞬时表达,只有在适当偏酸的培养条件,才有利于农杆菌vir区基

因的表达。农杆菌重悬液pH值对植物的转化有明显影响,特别是在单子叶植物的转化上是一个很重要的因素。一些研究也认为,在农杆菌与植物细胞进行共培养时,使用较低pH(5.2以下)的培养基有利于转化频率的提高(Hiei等,1994)。但在水稻的转化中,pH值在4.8~6.2的范围内,培养基的pH值对转化率影响较小(刘志学等,1999)。看来不同植物遗传转化所要求的条件有较大的差别,需要分别进行研究。

### 参考文献:

- Chen TS(陈廷速), Yang HJ(杨海杰), Zhang J(张军), et al. 2002a. The cloning and identifying of human epidermal growth factor(HEGF) and its expression plasmid construction in plant(人表皮生长因子基因的合成、鉴定及植物表达质粒的构建)[J]. *J Guangxi Univ*(广西大学学报), **27**(2): 122-127.
- Chen TS(陈廷速), Zhang J(张军), Xia NS(夏宁邵), et al. 2002b. Optimization of the conditions for banana(*Musa spp.*) genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*(香蕉农杆菌介导高效转化体系)[J]. *Southwest China J Agri Sci*(西南农业学报), **15**(1): 20-23.
- Chen TS(陈廷速), Zhang J(张军), Xia NSH(夏宁邵), et al. 2003. Plantlet regeneration from transverse thin-cell-layer culture of *Aloe*(芦荟横切薄层培养再生植株)[J]. *Subtrop Plant Sci*(亚热带植物科学), **32**(2): 58.
- Hiei Y, Ohta S, Komari T, et al. 1994. Efficient transformation of rice (*Oryza sativa* L.) mediated by *Agrobacterium* and sequence analysis of boundaries of the T-DNA[J]. *The Plant Journal*, **6**(2): 271-282.
- Zhou GY(周根余), Ding HF(丁洪峰), Shi WM(施望敏), et al. 1999. Fast asexual propagation of *Aloe vera*(芦荟的无性快速繁殖)[J]. *Acta Hort Sin*(园艺学报), **26**(6): 410-411.
- Liu ZhX(刘志学), Zhang X(张旭), Xu YN(徐亚南), et al. 1999. Optimization of the conditions for rice genetic transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens* LBA4404/pCAMBIA series(用LBA4404/pCAMBIA系列转化水稻的最佳条件)[J]. *J Fudan Univ(Nat Sci)*(复旦学报,自然科学版), **38**(4): 339-443.
- Jefferson RA. 1987. Assaying chimeric genes in plants; the Gus gene fusion system[J]. *Plant Molecular Biology Reports*, **11**: 38-47.