一种简便的遗传转化技术在大麦中的应用

马伯军

(浙江师范大学生物系, 金华 321004)

袁妙葆

(杭州大学生命科学学院, 杭州 310012)

王光清 杨金水 葛扣麟

(复旦大学遗传研究所, 上海 200433)

摘要 本文报导一种简便实效的以大麦的愈伤组织小细胞团做为受体, 进行 PEG + 电击法的双重转化新途径, 并对如何提高转化效率进行了探索。

关键词 大麦; 多细胞团受体系统; 部分去壁细胞; PEG + 电击法。

A convenient foreign gene transfer system in barley

Ma Bojun

(Department of Biology, Zhejiang Normal University, Jinhua 321004)

Yuan Miaobao

(College of Life Science, Hangzhou University, Hangzhou 310012)

Wang Guangqing Yang Jinshui Ge Koulin

(Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai 200433)

Abstract In this paper, the authors introduce a new convenient and efficient gene transfer system, which utilizes partially digested barley cells as receptor and a combination of PEG introducing with electroporation. They also make exploration on how to improve transformation rate.

Key words Barley; multicellular receptor system; partially digested cells; PEG + electroporation

对禾谷类作物遗传转化, 选择合适的受体系统是极为重要的, 目前主要有原生质体; 悬浮系及愈伤组织细胞团; 整株无菌苗等几类受体, 对于 PEG 和电击法正常的情况下都要求以原生质体作为受体, 然而禾谷类作物的原生质体培养在高等植物中是比较困难的, 虽然有成功的实例, 但往往局限于某个或某些基因型, 对于当前生产栽培品种很少成功^[1, 2]。我们所建立的技术途径则避开原生质体培养, 以当前生产栽培的当家大麦品种为材料, 对其具高分化潜能的愈伤组织小细胞团进行一定程度的酶解去壁, 使外源基因的导入成为可能, 通过 PEG + 电击法的双重强化处理, 最终获得了转化成功。

1 材料与方 法

1.1 用于基因转化的质粒 DNA 制备

转化用的外源 DNA 是 pBI121 质粒, 其中含有可作选择标记的 NPT- II 基因和 GUS 基因。通过碱变性法制备质粒 DNA, 并用氯化铯梯度超离心加以纯化备用。

1.2 胚性细胞团受体系统的制备

对普通大麦生产栽培品种“舟麦 2 号”幼穗进行诱导, 二月后出现大量的胚性愈伤组织细胞团。将 0.5 g 的 1~2 mm 大小的细胞团放到 10 ml 经过滤灭菌的酶液中, 26 °C 静止酶解 3h。酶解液为: 2% 纤维素酶 R-10、0.5% 离析酶 R-10 和 2% 半纤维素酶溶解于 CPW 溶液 (KH₂PO₄ 27.2 mg/L、KNO₃ 101 mg/L、CaCl₂·2H₂O 1480 mg/L、MgSO₄·7H₂O 240 mg/L、KI 0.16 mg/L、CuSO₄·5H₂O 0.025 mg/L、甘露醇 7.7%、pH5.6), 酶解部分去壁后的细胞团用 CPW 液洗涤 3 次用于转化。

1.3 改进的 PEG + 电击法双重转化处理

按以下步骤进行:

- (1) 上述细胞团取 0.5 g 悬浮于 1 ml CPW 溶液中, 45 °C 热击 10 min 后冰浴 2 min。
- (2) 加入 20 μg pBI 121 DNA、50 μg 小牛胸腺 DNA 和 1 ml 40% PEG, 充分混和后, 室温静止 30 min。
- (3) 每隔 5 min 加入 2 ml F 溶液 (KCl 368 mg/L、CaCl₂·2H₂O 18 400 mg/L、NaCl 800 mg/L、Na₂HPO₄·2H₂O 125 mg/L), 逐步稀释至终体积 10 ml。
- (4) PEG 处理后的细胞团用 W₅ 电击缓冲液 (125 mM CaCl₂·H₂O、154 mM NaCl、5 mM KCl、5 mM 葡萄糖) 洗三次后在 2ml W₅ 液中 25 °C 温育 3 h。
- (5) W₅ 液洗 3 次后, 转到电击杯中, 加入 20 μg pBI 121 DNA 和 50 μg 小牛胸腺 DNA, 加入 W₅ 液至电击杯终体积 0.8 ml, 25 °C 温育 1 h。
- (6) 冰浴 10 min 后电击, 电击仪为 BIO-RAD Gene Transfer。
- (7) 电击后冰浴 15 min, 经洗涤后加以培养。

1.4 转化后的细胞团的培养、筛选、植株再生以及转基因植株的鉴定

转化后的细胞团在 MS + 2mg/L 2,4-D + 1 000 mg/L LH 上培养 2 周后, 转移到添加 100 mg/L 卡那霉素的选择培养基中筛选, 20 天后把抗性愈伤组织细胞团转移到加 10 mg/L 丙氨酸的 MS + 0.1 mg/L NAA + 0.5 mg/L KT 分化培养基中进行植株再生。转化后细胞团的 GUS、WPT- II 活性检测及再生植株的 Southern 分子杂交见另文^[4]。

2 结果与讨论

2.1 部分去壁程度的确定

酶解部分去壁程度的确定对实验的成败是关键。酶解 2 h 仅有少数原生质体开始释放, 随着酶解时间的增加, 原生质体释放的数量也随之增加, 酶解 5 h 后, 在原生质体释放数增加的同时, 细胞的破碎程度也有所增加, 到 8 h, 原生质体的游离数已基本稳定, 而破碎的细胞数却显著增加。故以 8 h 的原生质体数定为 100%, 从而得出各酶解小时的相对原生质体释放数。据研究, 水稻悬浮系小细胞团当原生质体释放相对比例为 10% 时, 细胞团上的细胞已不同程度的去壁, 以此酶解程度的细胞团进行转化效果最好^[4], 故对于大麦我们确定了酶解 3h 其相对比例为

10%左右时, 用于转化。

2.2 转化强度与存活率、转化率的关系

转化强度与存活率、转化率是密切相关的, 在只用 0.5 KV/cm 电击时, 存活率虽有 35.5%, 但转化率为 0, 而当 PEG + 2.0 KV/cm 时, 则存活率为 0 (表 1)。可见, 在能存活前提条件下, 尽可能增加转化强度, 可以提高转化率。为了比较不同转化参数的转化效果, 对转化后培养 11 周的具有蓝色反应的愈伤组织进行分散、酶解及过筛网等处理, 收集游离细胞, 在倒置显微镜下观察统计蓝细胞和总细胞数的比例, 作为转化率的相对指标。我们的结果表明使用 PEG + 1.5 KV/cm 的转化参数是较为合适的。

2.3 电击前的预培养、预处理对提高转化率的作用

在电击前, 进行 3h 的 W₅电击缓冲液预培养及预培养后的加质粒 DNA 预处理 1h 是十分必要的。同样是 PEG + 1.5 KV/cm 的转化强度未经预培养、预处理的转化率为 17.4%, 而通过预培养、预处理的转化率为 25.1%, 比对照的提高 30.7%, 而存活率并无什么下降。转化率的提高可能是由于受体细胞内的核酸酶在 3h 预培养中逐渐渗漏出来并被洗脱, 从而降低

了对外源 DNA 的降解作用; 在电击前 1h 的质粒 DNA 预处理能使质粒 DNA 与愈伤组织细胞团充分接触, 并渗入间隙, 从而提高转化率。

2.4 问题与展望

由于我们所采用的是小细胞团做为受体, 这就难以避免导致转化子的嵌合现象。但对于嵌合现象可以通过进一步的组织培养和选择等途径, 应该不难解决的。Vasil 等认为组织培养中通过细胞胚发育而来的再生植株一般多来源于单个细胞^[5], 因此, 嵌合体现象也不是绝对不可避免的。总之, 我们认为通过部分酶解去壁, 配以改进的 PEG + 电击法双重转化, 避开了原生质体培养以及价格昂贵的基因枪, 不失为一条简便实效的大麦等谷类作物的遗传转化新途径。

表 1 转化参数对存活率、转化率的影响

Table 1 Effect of transformation parameter on cell survival rare and transformation rate

转化参数	存活率 (%)	转化率 (%)
电击 (0.5 KV/cm)	35.5	0
PEG + 电击 (0.5 KV/cm)	14.5	16.8
PEG + 电击 (1.0 KV/cm)	12.0	17.2
PEG + 电击 (1.5 KV/cm)	11.3	25.1
PEG + 电击 (2.0 KV/cm)	0	0

参考文献

- 1 王光远, 夏镇澳. 水稻原生质体再生成熟植株. 实验生物学报, 1987, 20 (2): 253 ~ 257
- 2 王海波, 李向辉, 孙勇如等. 小麦原生质体培养. 中国科学 (B 辑), 1989, 8: 828 ~ 834
- 3 Ma Bojun, Wang Guangqing, Yang Jinshui, *et al.* Introduction of foreign genes into partially digested barley (*Hordeum vulgare* L.) cells and transgenic plant regeneration. *Journal of Fudan University (Natural Science)* 1996, 3 (2): 139 ~ 144
- 4 Yang JS, Ge KL, Wang YZ, *et al.* Highly efficient transfer and stable integration of foreign DNA into partially digested rice cells using a pulsed electrophoretic drive. *Transgenic Res*, 1993, 2 (1): 245 ~ 251
- 5 Vasil IK *et al.* Developing cell and tissue culture for the improvement of cereal and grass crops. *J. Plant Physiol*, 1987, 128: 193 ~ 218