

用 PDS-1000/He 型基因枪将外源基因质粒 pZFX₂ 导入小麦细胞的研究*

曾黎琼 程在全 段玉云 寸守铄

徐增富

(云南省农业科学院生物技术研究所, 昆明 650223)

(中山大学生物工程研究中心, 广州 510275)

Study on introduction of foreign NPT II gene into cells of wheat Zeng Liqiong, Cheng Zaiquan, Dun Yuyun, Cun Shouxian (Biotechnology Institute, Yunnan Academy of Agricultural Sciences, Kunming 650223), Xu Zengfu (Biotechnological Center, Sunyatsen University, Guangzhou 510275), *J. Plant Resour. & Environ.* 1999, 8(3): 61~63

Foreign NPT II gene was introduced into calli and mature embryos of wheat strains 922-267, 942-114 and 953-1575 by using PDS-1000/He particle delivery system. Plasmid pZFX₂ contains the NPT II (neomycin phosphotransferase) and glycolate oxidase gene which can increase the wheat plant resistance to insects. After selection culture based on MS medium containing 100 µg/mL Kanamycin, resistant calli were selected. Green plants were regenerated from part of resistant calli. Through this test, we found that the optimum pressure of bombarding calli was 1 100 psi. Using this pressure, more resistant calli were obtained. Mature embryos were bombarded at pressure of 1 300 psi. It is worth to notice that the green plants derived from transformed mature embryos were easier than those from transformed calli.

关键词 基因枪; 小麦; 成熟胚; 胚性愈伤组织; 基因转化

Key words particle bombardment; wheat; mature embryos; calli; gene transformation

小麦是世界上分布广、种植面积大的粮食作物,选育高产、优质、抗病等优良性状的小麦新品种具有重要的意义。近年来,随着植物遗传转化技术的不断完善,小麦的遗传转化也取得较大突破,先后采用基因枪法、花粉介导法、PEG法和激光穿刺法等,将NPT II、Bar、GUS等基因导入小麦细胞中^[1],为小麦的生物技术育种奠定了基础。基因枪法是籍高速运动的金属微粒将附着于其表面的核酸分子引入受体细胞中的一种遗传物质导入技术。它本质上是一种物理过程,不受受体基因型的限制,而且能缩短获得转基因植株的周期,因此,被广泛应用于植物(尤其是禾本科植物)的遗传转化。小麦是举世公认的最难转化的重要农作物,利用基因枪转化技术进行小麦遗传转化的,取得了很大进展。用基因枪法将GUS和Bar基因导入小麦胚性愈伤组织和幼胚盾片组织中,获得了小麦转基因再生植株。1997年国内傅荣昭等用基因枪法将人工雄性不育基因导入小麦,并获得了转基因再生植株^[2]。本研究用PDS-1000/He型基因枪将质粒pZFX₂导入小麦胚性愈伤组织和成熟胚中,经卡那霉素筛选,获得了抗性愈伤组织和再生绿苗。

1 材料与 方法

1.1 植物材料及质粒的构建和提取

小麦材料为922-267、942-114和953-1575三个品系。质粒pZFX₂含有抗蚜虫的乙醇酸氧化酶基因(GOS)和抗卡那霉素的基因(NPT II),pZFX₂的制备采用碱法提取,PEG法纯化,得到的pZFX₂溶解在TE(pH 8.0)中,浓度调为1 µg/µL, -20℃保存。

1.2 微粒子子弹的制备

* 云南省应用基础研究基金资助课题

曾黎琼:女,1968年8月生,助理研究员,双学士,主要从事水稻、小麦等禾本科作物的基因转化研究。

收稿日期:1999-02-04

1.2.1 金粉的处理 取 60 mg 金粉于离心管中,加入 1 mL 无水乙醇,充分振荡 3 min,在 10 000 r/min 情况下,离心 1 min,吸去上清液,再加入 1 mL 无菌水,充分振荡后,10 000 r/min 离心 1 min,重复上述操作步骤 3 次,最后,将金粉悬浮于 600 μ L 无菌水中,置 4℃ 保存。

1.2.2 DNA 的处理 取 50 μ L 金粉悬浮液,加入 5 μ L 质粒 pZFX₂液,指弹 5 次,滴加 50 μ L 2.5 mol/L CaCl₂液,指弹 5 次,再加入 20 μ L 0.1 mol/L 的亚精胺,振荡 3 min 后,在室温下放置 10 min,10 000 r/min 离心 1 min,弃上清液,加入 230 μ L 无水乙醇,振荡后,在 10 000 r/min 情况下,离心 20 s,弃上清液,沉淀悬浮于 60 μ L 无水乙醇中,供 5~10 枪用。

1.3 用基因枪将质粒 pZFX₂导入小麦胚性愈伤组织

小麦种子用 75% 酒精灭菌 5 min,再用 0.1% HgCl₂灭菌 20 min,无菌水冲洗 3 次,置于 MS+2,4-D 2~3 mg/L+KT 0.5~1 mg/L 的培养基中诱导愈伤组织,1 个多月后,选择生长良好的愈伤组织切成直径为 0.5~2 mm 的小块,置于铺有滤纸的 MS+2,4-D 1 mg/L+KT 1 mg/L 的继代培养基中过渡培养 4~5 d 后,用 PDS-1000/He 型基因枪将质粒 pZFX₂导入小麦胚性愈伤组织中^[1],共培养 4~7 d,将愈伤组织转入 MS+2,4-D 1 mg/L+KT 1 mg/L+Kan 100 mg/L 的继代培养基中筛选培养,1~2 个月后,转到 MS+6-BA 2~3 mg/L+NAA 0.5~1 mg/L+LH 400 mg/L 的培养基中分化培养。

1.4 用基因枪将质粒 pZFX₂导入小麦成熟胚

小麦种子用 75% 酒精灭菌 5 min,再用 0.1% HgCl₂灭菌 7 min,无菌水冲洗 3 次,加入少量无菌水放置大约 48 h,重复上述灭菌过程,切割胚后,平铺于小培养皿中心,用 PDS-1000/He 型基因枪将质粒 pZFX₂导入切割胚中,枪击后,置于 MS+2,4-D 2 mg/L+KT 1 mg/L+Kan 80~100 mg/L 的培养基中诱导愈伤组织,1~2 个月后,转到 MS+6-BA 2~3 mg/L+NAA 0.5~1 mg/L+LH 400 mg/L 的培养基中分化培养。

2 结果与分析

2.1 影响基因枪法进行小麦基因转化的理化因素

不同轰击力度、阻挡网与靶细胞的距离、样品室的真空度、轰击次数、DNA 的纯度与浓度、DNA 沉淀剂的浓度等因素,都对转化频率有一定影响。采用 1 100、1 300、1 550 psi 三种轰击力度,分别以不同的阻挡网与靶细胞的距离对不同材料进行轰击,均获得抗 Kan 的愈伤组织及部分绿苗(见表 1)。结果表明,分别采用 1 100 和 1 300 psi 的轰击力度对愈伤组织和成熟胚进行轰击效果较好,分化情况较理想。在轰击愈伤组织前,将愈伤组织切碎,平铺在垫有滤纸的培养皿中央,减少细胞团的相互遮盖,增加轰击的有效面积,这样可提高转化频率。在轰击成熟胚时,采用轰击两次的办法,提高转化频率(见表 2)。质粒 pZFX₂的浓度控制在 0.75 μ g/枪左右,浓度过高,微粒子严重结块,浓度过低,则受体获得质粒 DNA 的机率降低,从而影响转化率。

表 1 不同轰击力度轰击小麦胚性愈伤组织的转化效果

Tab 1 The transformation of embryogenic calli of wheat bombarded at various pressures

小麦品系 Wheat strain	轰击力度 Rupture pressure (psi)	轰击愈伤组织块数 No. of bombarded calli	获得抗性愈伤组织 Resistant calli		分化出绿点绿苗的块数 No. of regenerated green spots and plants
			块数 No.	百分率 %	
922-267	1 100	630	132	20.95	5
	1 300	359	49	13.65	2
	1 550	169	7	4.14	2
953-1575	1 100	508	130	25.59	5
	1 300	582	34	5.84	1
	1 550	225	9	4.00	0

2.2 胚性愈伤组织和成熟胚两种受体的比较

用胚性愈伤组织作为基因枪转化的受体, DNA 的导入和转化体的筛选都比较容易进行, 故比较容易获得抗性愈伤组织。但是, 要获得大量均一且再生能力强的胚性愈伤组织并非易事, 从小麦种子诱导胚性愈伤组织需要 1~2 个月或更长的时间。基因枪轰击后, 愈伤组织须经卡那霉素的筛选培养, 再进行分化培养, 周期很长, 对分化极为不利, 造成大多数抗性愈伤组织不分化, 而只有少数抗性愈伤组织分化出绿点或绿苗。

成熟胚具有良好的再生能力, 轰击成熟胚后, 诱导抗性愈伤组织, 再进行分化培养, 周期明显缩短, 因此比较容易获得转基因植株。当然, 以成熟胚作为转基因的受体, 由于细胞分散程度不如愈伤组织等原因, 可能比较容易产生假转化体, 因此, 对转化体进行严格筛选是必不可少的。轰击成熟胚后, 在诱导愈伤组织的培养基中加入卡那霉素对其进行筛选, 从而获得抗性的愈伤组织。

3 讨 论

小麦的组织培养尤其是分化培养比较困难, 当加入卡那霉素等选择压力后, 由于卡那霉素对愈伤组织的伤害作用, 使之几乎不分化, 但是, 转基因的目的是要获得转化的再生植株, 所以, 本实验在后期的抗性愈伤组织分化培养过程中弃除了选择压力, 以利于抗性愈伤组织的分化。当然, 再生植株还有待于进行分子生物学检测, 证实是否是阳性转化体。

基因枪是继农杆菌介导转化法之后又一应用最广泛的遗传转化技术。由于禾本科作物对农杆菌感染不敏感, 因此, 基因枪转化法为禾本科作物的转化提供了可行的手段^[3,4]。在基因枪轰击小麦时, 作者发现只有击中了具有潜在再生能力的胚性细胞、生长点细胞和分生组织细胞, 才能获得转基因植株。小麦的离体培养存在一定难度, 尤其是经过转基因处理后, 对小麦细胞产生一定的创伤, 导致愈伤组织更难分化。在小麦的基因转化实验中, 采取有效措施, 缩短实验周期, 选择分化能力强的材料作为受体, 提高转化率, 具有重要意义。从实验结果可见, 以小麦成熟胚作为受体, 不受基因型的限制, 而且成熟胚具有良好的分化能力, 是进行小麦基因转化的适宜材料。当然, 用基因枪法进行小麦基因转化, 还有待于不断提高转化效率, 使这一方法更好地发挥作用。本实验为进一步获得基因工程抗虫小麦材料奠定了基础。

参 考 文 献

- 1 傅荣昭, 孙勇如, 贾士荣. 植物遗传转化技术手册. 北京: 中国科学技术出版社, 1994.
- 2 傅荣昭, 曹光诚, 马江生. 用基因枪法将人工雄性不育基因导入小麦的研究初报. 遗传学报, 1997, 24(4): 358~361.
- 3 Wan Y, Widholm J M, Lemaux P G. Type I callus as a bombardment target for generating fertile transgenic maize (*Zea mays* L.). *Planta*, 1995, 196: 7~14.
- 4 Perl A. Improvement of plant regeneration and GUS expression in scultellar wheat cell by optimization of culture conditions and DNA microprojectile delivery procedures. *MGG*, 1992, 235: 279~284.

(责任编辑: 许定发)

表 2 基因枪轰击小麦成熟胚的转化效果(两枪/皿)

Tab 2 The transformation of mature embryos after bombardment

小麦品系 Wheat strain	轰击力度 Rupture pressure (psi)	受体块数 No. of bombarded mature embryos	再生苗数 No. of regenerated green plants	转化率 % ¹⁾ Transformation frequency
952-1575	1 300	193	2	1.04
942-114	1 300	98	2	2.04

¹⁾ 转化率 = (再生苗数/受体块数) × 100 %
Transformation frequency = (No. of regenerated green plants/No. of bombarded mature embryos) × 100 %