

· 药材 ·

四倍体菘蓝转抗虫基因研究I . 根癌农杆菌介导的转基因菘蓝

张磊¹, 许铁峰¹, 谭秋敏², 王子楠², 丁如贤¹, 唐克轩², 张汉明^{1*}

(1. 第二军医大学药学院 生药教研室, 上海 200433; 2. 复旦大学生命科学学院遗传工程国家重点实验室, 上海 200433)

摘要: 目的 将外源半夏凝集素基因 (PTA) 转入四倍体菘蓝以获得鳞翅目昆虫抗性. 方法 构建了以 CaMV 35S 为启动子, 新霉素磷酸转移酶 (NptII) 为选择标记, 带有半夏凝集素基因 PTA 的 pCambia 2200 植物二元表达载体, 应用根癌农杆菌 EHA 105 遗传转化四倍体菘蓝. 结果 菘蓝外植体植株再生率达到 95% 以上, 转化率有 10%. 结论 建立了以 6-BA 和 NAA 为主要激素组合的四倍体菘蓝离体分化再生系统和农杆菌介导的转化系统.

关键词: 菘蓝; 遗传转化; 根癌农杆菌; 半夏凝集素基因; 植株再生

中图分类号: R282.12 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)03-0258-04

Agrobacterium tumefaciens mediated transgenic tetraploid *Isatis indigotica* carrying anti-insect gene from *Pinella Ternata* Agglutinin

ZHANG Lei¹, XU Tie-feng¹, TAN Qiu-min¹, WANG Zi-nan², DING Ru-xian¹,
TANG Ke-xuan², ZHANG Han-ming¹

(1. School of Pharmacy, Second Military Medical University, Shanghai 200433, China; 2. State Key Laboratory of Genetic Engineering, School of Life Sciences, Fudan University, Shanghai 200433, China)

Abstract **Object** *Pinella Ternata* Agglutinin (PTA) gene was conducted into tetraploid *Isatis indigotica* Fort. to get anti-pest species. **Methods** *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation in which the “high toxic” strain EHA105 and the plant binary expression vector pCambia 2200 were adopted under CaMV 35S promoter and neomycin phosphorus transferred enzyme (NptII) served as the selection marker. **Results** The plant regeneration rate of transgenic explants was up to 95% and transgenic frequency was 10%. **Conclusion** An *in vitro* highly efficient plantlet regeneration system and transgenic system mediated by *A. tumefaciens* in the main combination of 6-BA and NAA was established via cotyledon and hypocotyl segments in tetraploid *I. indigotica*.

Key words *Isatis indigotica* Fort.; genetic transformation; *Agrobacterium tumefaciens*; *Pinella Ternata* Agglutinin (PTA) gene; plantlet regeneration

十字花科植物菘蓝 *Isatis indigotica* Fort. 为我国历代常用中药, 其根称板蓝根, 叶称大青叶, 有清热解毒, 凉血利咽的功效, 可防治病毒性感染, 对流行性乙型脑炎, 流行性感冒, 急慢性肝炎, 流行性腮腺炎等均有效^[1]. 其人工四倍体 ($2n=28$) 的抗内毒素及抗病毒作用显著强于二倍体亲本, 是优质高效的新品系, 具有很大的开发利用价值^[2]. 由于国内外对其需求量很大, 因此在我国南北各地广为栽培, 但栽培过程中, 鳞翅目昆虫白粉蛾和小菜蛾所引起的虫害相当严重, 在某些地区虫害造成的损失经常达到 60%~100%. 采用常规抗虫育种和使用化学农

药、生物杀虫剂及生态防治等手段杀虫, 虽然取得了长足进展, 但也带来了一些新的问题. 基因工程技术的发展为培育抗虫药用植物品种提供了新的手段, 从而开辟了药用植物抗虫育种的新时代. 近年来研究进展迅速, 并有一批转基因抗虫作物进入了大田试验, 展现出了美好的应用前景. 抗虫植物基因工程研究发展迅速, 并分离出了大量的抗虫基因, 其中包括以抗鳞翅目害虫为主的苏云金芽孢杆菌杀虫晶体蛋白基因 (*Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein gene, Bt-ICP)^[3]、外源植物凝集素基因 (lectin)^[4]、具有广谱抗虫性的胰蛋白酶抑制剂基

* 收稿日期: 2000-10-10

* 通讯作者: Tel 86-21-65513056

因^[5]及以抗鞘翅目害虫为主的疏基蛋白酶抑制剂基因^[6]等。

根癌农杆菌 *Agrobacterium tumefaciens* 是一种天然的生物载体,可通过其 T-DNA 的转移,将外源 DNA 分子整合到受体植物核基因组中实现遗传转化。根癌农杆菌介导的基因转化系统是一个较为完善的植物转化系统,有非常广泛的寄主范围,可用于大多数双子叶植物及一些单子叶植物的转化^[7]。苧蓝的离体培养研究显示苧蓝是容易再生和转化的植物种类^[8,9],便于进行遗传操作。我们建立了根癌农杆菌介导的遗传转化系统,将天南星科植物半夏中克隆得到的半夏凝集素基因构建植物二元表达载体转入苧蓝。

1 材料和方法

1.1 无菌外植体的获得: 将四倍体苧蓝种子先用 75% 乙醇浸泡 1 min 后用无菌水洗 1 次; 然后在 0.1% HgCl₂ 溶液中浸泡 10 min, 最后用无菌水冲洗 3~5 次, 以达到种子表面灭菌的目的。将经过灭菌

处理的种子在无菌操作条件下播种到含蔗糖 3% 的 MS^[10] 空白培养基上, 置于 4 000 lx × 12 h/d 光照, 28℃ 条件下发芽。大约 1 周后种子发芽长出实生苗。将实生苗的子叶剪成 1 cm × 1 cm 的叶盘, 下胚轴剪成 1 cm 长小段供转化使用。

1.2 农杆菌培养和质粒载体构建: 二元载体 pCambia2200 来自于澳大利亚 Cambia 研究院; 中间载体 pBI121 农杆菌株 EHA105 (Str^r, Rif^r, Km^r)、大肠杆菌 DH5α 由本室保存。构建载体 pCambia2200-NpII-Km^r (图 1) 用于转基因。

取用甘油保存于 -20℃ 的农杆菌 50~100 μL 于 2 mL 的 LB 液体培养基中, 并加入相应的抗生素 [如: 利福平 (Rif) 20~50 × 10⁶; 链霉素 (Str) 50~100 × 10⁶; 卡那霉素 (Km) 50 × 10⁶], 在摇床上以 250 r/min 左右, 25℃ 摇菌 24~36 h 至 A₆₀₀ = 1.0。再取新摇菌 100~200 μL 于 30 mL 的 LB 液体培养基中, 并加入相应的抗生素 (浓度、条件同上), 经 12 h 左右, 菌液达到 A₆₀₀ = 1.0 时, 即可用来转化。

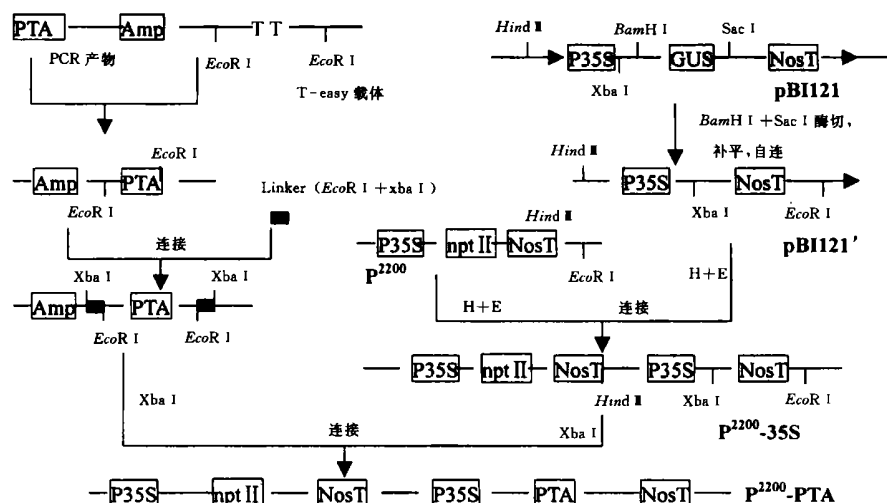


图 1 二元表达载体 P²²⁰⁰-PTA 的构建流程

Fig. 1 Construction flow of binary expression vector P²²⁰⁰-PTA

1.3 叶盘法转化苧蓝: 菌液在无菌的 50 mL 的离心管中以 5 000 r/min 离心 5 min, 去上清液, 再用 30 mL 的 MS 液体培养基重悬。将预先剪好的外植体浸在菌液中 20~30 min 后, 再用无菌滤纸或吸水纸吸去多余的菌液 (无须进一步吸干), 置于 MS₀ 固体培养基 (可覆盖一层无菌滤纸) 上, 25℃ 暗培养 3 d。共培养的外植体先用无菌水冲洗 3 次, 再浸于含头孢霉素 (250 mg/L) 的 MS₀ 液体培养基中 20~30 min, 用无菌滤纸或吸水纸吸干后, 接种于选择分化培养基 (MS+ 6-BA 2 mg/L+ NAA 0.5 mg/L+ Km 100 mg/L+ 羧苄青霉素 (Cb) 300 mg/L) 上进

行光照培养, 每 3 周继代 1 次。以未转化外植体作为对照。约 1~2 个月, 将 2 cm 左右高的幼苗转到生根培养基 (1/2 MS+ Km 50 mg/L+ 头孢噻肟钠 (Cef) 100 mg/L) 上生根。生根是转基因成功的关键, 大多数转基因苗都有较发达的根系, 而非转基因苗在抗性培养基上往往难于生根, 但并没有足够的证据表明可以根据生根与否辨别是否是转基因苗。适当降低抗生素浓度将有利于再生苗的生根。当苗长至 5~6 cm 高时, 先要少量透气, 并在培养基上加水炼苗, 防生菌。待苗适应环境后, 完全置于空气中。移栽温室之前, 先要洗净根部的培养基。直接将无菌苗移

入土中容易造成脱水,甚至死亡。本实验首先将苗移入珍珠岩中用 1/10 MS 营养液培养,生长一段时间后再移入土中可大大提高移栽苗的成活率。

2 结果

表 1 外源激素对苕蓝子叶和下胚轴分化再生的影响

Table 1 Effect of plant growth regulators on tetraploid <i>I. indigotica</i> regeneration from cotyledon and hypocotyl					
生长激素 /mg° L ⁻¹		再生频率 %		植株再生数	
BA	NAA	子叶	下胚轴	子叶	下胚轴
0.0	0.0	0	0	0	0
0.2 ^a	0.5	27.4±2.7	26.8±1.6	11	10
0.2 ^a	1.0	42.3±1.5	44.5±5.8	17	18
0.2 ^a	0.2	66.8±5.9	78.6±6.3	27	31
0.2 ^a	5.0 ^b	0	0	0	0
1.0	0.5	85.2±3.0	87.0±2.2	34	35
1.0	1.0	89.5±4.5	85.3±5.8	36	34
1.0	2.0	83.5±1.6	77.7±3.4	33	31
1.0	5.0 ^b	0	0	0	0
2.0	0.5	94.0±2.2	96.5±1.4	37	40
2.0	1.0	100.0±3.8	86.9±2.7	40	35
2.0	2.0	95.8±4.1	79.2±3.3	38	32
2.0	5.0 ^b	0	0	0	0
5.0	0.5	73.4±4.0	38.6±3.2	29	15
5.0	1.0	64.8±5.1	43.5±3.6	26	17
5.0	2.0	20.4±2.0	28.7±3.2	8	11
5.0	5.0 ^b	0	0	0	0

a 部分外植体上有不定根长出 b 部分外植体形成白色愈伤 (P<0.05)

a Some explants grew unfixed roots b White callus could be seen in explant (P<0.05)

2.2 转化体的筛选及再生: 将与农杆菌共培养 3 d 的苕蓝外植体置于含有 Km 的筛选培养基上进行筛选时, 要保证 Km 的浓度足以杀死非转化外植体, 并不影响转化外植体的生长及分化情况。本实验选择了非转化的苕蓝外植体 (50 每个处理), 鉴定在含有不同浓度 Km 分化培养基的条件下, 能杀死非转化外植体的最佳 Km 的浓度。结果发现在 Km 浓度为 100 mg/L 时, 生长停止, 并不能分化成苗, 因此采用这个浓度为最佳筛选压。

3 讨论

3.1 转化受体的选择: 在四倍体苕蓝的遗传转化中, 最好的转基因受体是子叶和下胚轴。许多结果表明, 通过诱导愈伤获得的再生植株往往具有遗传性状的不稳定性, 而由丛生芽直接分化得到的再生植株在遗传性状上更加稳定^[11]。

3.2 基本培养基: 不同激素配比、蔗糖浓度对苕蓝外植体再生的影响: 本研究发现, 在苕蓝外植体的分化过程中, MS 培养基要好于 GB^[12]和 White^[13]培养基。6-BA+NAA 是最佳激素配比, 并且最佳浓度

2.1 苕蓝高频离体再生系统的建立: 通过对比试验, 苕蓝植株再生的最佳条件是 MS+BA 2 mg/L+NAA 0.5 mg/L, 蔗糖浓度为 3%, 子叶再生率可达 100%, 下胚轴再生率可达 96.5% (见表 1)。

为 BA 2 mg/L, NAA 0.5 mg/L。3% 的蔗糖浓度以及光照培养最有利于苕蓝外植体的分化和高频再生^[14, 15] (图 2)。

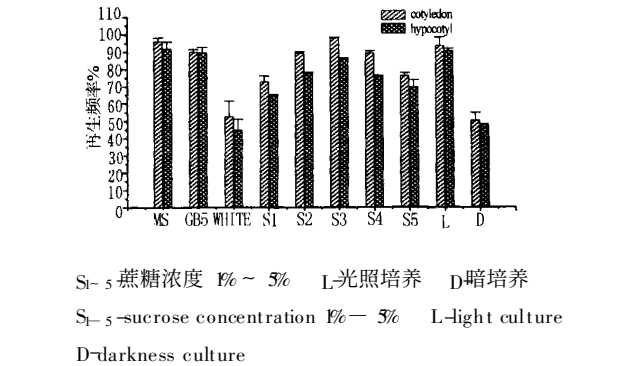


图 2 不同培养条件对苕蓝离体再生系统的影响
Fig. 2 Effect of different culture conditions on tetraploid *I. indigotica* regeneration from cotyledon and hypocotyl

3.3 共培养时几个因素对转化效率的影响
3.3.1 菌液浓度对转化效率的影响: 在农杆菌介导的遗传转化中, 适当的菌液浓度是转化成败的关键问

题之一。菌液浓度过低,会使农杆菌细胞数目不足导致转化效率较低;菌液浓度过高,则由于营养不足造成菌液中死菌数目过多,实际有感染能力的农杆菌数目减少;此外,菌体产生的某些有害代谢产物对植物细胞造成伤害,引起转化效率下降;农杆菌的浓度太高,生长过盛就会造成外植体死亡;并且如果农杆菌在共培养培养基上生长过旺,即使用 500 mg/L 甚至 1 000 mg/L 的头孢霉素也不能将其杀死。选用适当菌液浓度的原则是能够达到最大转化效率的最小菌液浓度。因此在实验中,我们发现当菌液浓度在 A_{600} 值为 1.0~1.6 的范围内时,转化频率会维持在一个相对的稳定的值,不会随着菌液浓度的提高而增加;当菌液浓度过高时,转化频率反而会下降。

3.3.2 共培养的时间对转化效率的影响: 共培养的时间以 3 d 为好,此时转化效率达到最高值,进一步则增加共培养的时间时,转化效率会急剧下降。究其原因可能是由于在共培养基上不含任何抗生素,植物细胞和细菌细胞都可以生长。而细菌细胞的生长周期要比植物细胞的短,生长较快。如果培养时间过长,过度生长的细菌细胞就会抑制植物细胞的正常生长,甚至会造成植物细胞的死亡。

3.3.3 共培养的温度、pH 对转化效率的影响: 共培养的温度在 22℃ 时转化频率较高,因为它具有 2 个优点: 1) 不容易发生质粒的丢失; 2) 比较容易控制细菌的过度生长。缺点是植物细胞的生长也同时会受到一定程度的抑制。出于上述考虑,我们一般选择 25℃。

在农杆菌与植物细胞进行共培养时,使用较低 pH 的培养基有利于转化频率的提高。原因可能是在偏酸的培养条件下,有利于农杆菌 *vir* 区基因的表达,但较低 pH 条件下,培养基的凝固状态较差,不利于试验操作,容易污染。pH 在 4.8~6.2 的范围内,对转化效率的负面影响较小。所以共培养时我们一般选择 pH 5.2 的条件。

(上接第 257 页)

较为满意,且能有效降低血浆 ET 水平,络泰粉针是三七总皂苷制剂。三七总皂苷对缺血脑损伤有较好的保护作用。已有研究表明,ET 的缩血管作用依赖于钙离子的细胞内流,钙离子通道拮抗剂如尼莫地平能逆转其引起的血管收缩。络泰粉针具有钙通道阻断的作用,因此,络泰粉针可能是通过拮抗钙离子,扩张血管而阻断 ET 的作用从而显著降低血浆 ET 水平的。另一方面,由于络泰粉针具有抗自由基损害作用,可抑制脑梗死后再灌注时自由基的反应,

致谢: 本实验四倍体种子由第二军医大学药学院生药教研室乔传卓教授培育并赠送特此感谢。

References

- [1] Chen W S, Li B, Zhang W D, *et al.* New alkaloid from the root of *Isatis indigotica* Fort. [J]. *Chin Chem Lett* (中国化学快报), 2001, 12, (6): 501-502.
- [2] Wang Y, Qiao C Z, Liu S, *et al.* Evaluation on antiendotoxic action and antiviral action *in vitro* of tetraploid *Isatis indigotica* [J]. *China J Chin Mater* (中国中药杂志), 2000, 25 (6): 327-329.
- [3] Alt-Moerbe J, Neddermann P, Von Linting J, *et al.* Temperature-sensitive step in Ti plasmid vir -region induction and correlation with cytokinin secretion by *Agrobacteria* [J]. *Mol Gen Genet*, 1998, (213): 1-8.
- [4] Eizler M E. Plant lectines: molecular and biological aspect [J]. *Annu Rev Plant Physiol*, 1985, 36: 209-234.
- [5] Arumuganathan K, Earle E D. Estimation of nuclear DNA content of plants by flow cytometry [J]. *Plant Mol Biol Rep*, 1994 (9): 229.
- [6] Ayres N M, Park W D. Genetic transformation of rice [J]. *Critical Rev Plant Sci*, 1994 (13): 219-239.
- [7] Cheng M, Fry J E, Pang S Z, *et al.* Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacteria tumefaciens* [J]. *Plant Physiol*, 1997, (115) 5: 971-980.
- [8] Qiong H, Sven B A, Lise N H. Plant regeneration from mesophyll protoplasts in *Isatis indigotica* [J]. *Plant Cell Tiss Org*, 1999 (55): 155-157.
- [9] Fu X, Zhang H M, Ding R X, *et al.* Influence of plant growth regulators on tetraploid *Isatis indigotica* regeneration [J]. *Chin Tradit Herb Drugs* (中草药), 1997, 28 (10): 618-620.
- [10] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures [J]. *Plant Physiol*, 1962 (15): 473-479.
- [11] Singh A K, Chand S, Pattnaik S, *et al.* Adventitious shoot organogenesis and plant regeneration from cotyledons of *Dalbergia sissoo* Roxb, a timber yielding tree legume [J]. *Plant Cell Tiss Org*, 2002 (68): 203-209.
- [12] Gamborg O L. The effects of amino acids and ammonium on the growth of plant cells in suspension culture [J]. *Plant Physiol*, 1970 (45): 372-375.
- [13] White P R. Nutrient deficiency studies and an improved inorganic nutrient for culture of excised tomato roots [J]. *Growth*, 1943 (7): 53-65.
- [14] Chen J T, Chang W. C. Effects of tissue culture conditions and explant characteristic on direct somatic embryogenesis in *Oncidium* 'Gower Ramsey' [J]. *Plant Cell Tiss Org*, 2002, 69 (1): 41-44.
- [15] Vanegas P E, Cruz-Hernandez A, Valverde M E, *et al.* Plant regeneration via organogenesis in marigold [J]. *Plant Cell Tiss Org*, 2002, 69 (3): 279-283.

从而使 ET 合成与释放减少。至于其确切机制,有待进一步研究。

References

- [1] Wei G Z, Zhang J. The increasing of parameters ET level of cerebral patients and clinical significance [J]. *Chin J Intern Med* (中华内科杂志), 1996, 33 (6): 388-390.
- [2] The Fourth National Apoplexy Professional Conference. The main points of all kinds of Apoplexy diagnose [J]. *Chin J Neurol* (中华神经科杂志), 1996, 29 (6): 379-380.
- [3] The Fourth National Apoplexy Professional Conference. The judge Standard of the clinical lack degree of nerve functions of Apoplexy patients [J]. *Chin J Neurol* (中华神经科杂志), 1996, 29 (6): 381-383.