

· 药材 ·

四倍体菰蓝转抗虫基因研究 II . 转半夏凝集素基因菰蓝的分子生物学检测

许铁峰¹, 张磊¹, 刘成洪¹, 谭秋敏², 唐克轩², 郭美丽¹, 乔传卓¹, 张汉明¹⁽²⁰⁾

(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 获得转基因菰蓝的分子生物学证据。方法 对经卡那霉素筛选的抗性再生菰蓝苗进行聚合酶链式反应 (PCR), Southern杂交和 RT-PCR检测。结果 PCR和 Southern杂交检测结果表明, 外源半夏凝集素基因已经整合到转基因菰蓝的基因组中, RT-PCR结果表明其 DNA可以正常转录成 mRNA。结论 可以利用农杆菌介导的基因转化技术培育抗虫的菰蓝新品系。

关键词: 菰蓝; 半夏凝集素基因; 聚合酶链反应; Southern Blot; RT-PCR

中图分类号: R282.1 文献标识码: A 文章编号: 0253-2670(2003)09-0846-04

Agrobacterium tumefaciens mediated transgenic tetraploid *Isatis indigotica* carrying anti-insect gene from *Pinellia ternata* agglutinin (II)

XU Tie-feng¹, ZHANG Lei¹, LIU Cheng-hong¹, TAN Qiu-min², TANG Ke-xuan², GUO Mei-li¹, QIAO Chuan-zhuo¹, 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** To get molecular proof of transgenic *Isatis indigotica* Fort. **Methods** The regenerated *I. indigotica* plantlets on kanamycin-containing media were analysed with polymerase chain reaction (PCR), Southern Blot and RT-PCR methods. **Results** PCR and Southern Blot analysis showed that the foreign PTA gene were inserted into the genome of the transformed *I. indigotica* plants. Further RT-PCR showed that the foreign PTA gene could be transcribed into mRNA normally. **Conclusion** Pest resistant *I. indigotica* can be obtained through *Agrobacterium*-mediated transformation.

Key words *Isatis indigotica* Fort.; *Pinellia ternata* agglutinin; polymerase chain reaction (PCR); Southern Blot; RT-PCR

植物凝集素是指含有至少一个非催化结构域并能够可逆性结合到特异单糖或寡糖上的所有植物蛋白质。自然界中广泛分布,多存在于植株最易受攻击的部位,对病原真菌、细菌、昆虫都有一定的抑制作用^[1]。目前发现有些外源凝集素对同翅目、鞘翅目和双翅目的昆虫有毒性。植物凝集素确切的作用机制现今并未研究清楚,一般认为植物凝集素的抗虫毒性基于它们一旦被害虫摄食,外源凝集素就会在昆虫的消化道中被释放出来,特异结合到昆虫肠的糖缀合物上,这些结合影响了营养物质正常吸收,同时还可能在消化道内诱发病灶,促进消化道内细菌繁殖,对害虫本身造成危害,抑制害虫生长、发育和繁

殖,从而达到杀虫目的。

天南星科属三叶半夏 *Pinellia ternata* (Thunb.) Breit.为我国特有的一种多年生草本药用植物,其块茎为多用途中草药。凝胶过滤法测定半夏凝集素 (PTA)相对分子质量为 4.4×10^4 ,由4个约 1.2×10^4 的相同亚基组成,结合甘露糖,与雪花莲凝集素 (GNA)相似。PTA具有凝集细胞和促使细胞分裂的作用。PTA基因是一种有重要价值的抗虫基因。PTA粗提液对刺吸式同翅目害虫 (如棉蚜等)有显著致死作用^[2]。通过对根癌农杆菌介导获得的转半夏凝集素基因四倍体菰蓝进行了分子生物学检测,分析了外源基因的表达特征。

(20) 收稿日期: 2002-11-13

* 通讯作者 Tel (021) 65513056

1 材料和方法

1.1 转基因植株的 PCR鉴定: 为了初步验证外源基因是否转入植物细胞内, 对抗生素抗性植株进行了 PCR检测。经 Km抗性筛选存活的 114株转基因四倍体苕蓝, 每株各摘取一小片叶 (0.1 g), 微量提取基因组 DNA, 用 PTA基因引物 99011PXF1和 99011PXR1进行 PCR分析, 扩增 PTA基因。

1.1.1 植物 DNA抽提方法: SDS提取法参照文献方法^[3]。

1.1.2 转基因水稻植株中 PTA基因的 PCR检测: PTA基因的 PCR引物 (引物 1和 2由 Sangon公司合成) 序列 PXF1 (5'-ATGGCCTCCAAGCTCCT-CCT-3' $M_w = 6\ 051.0$); PXR1 (5'-GCTTATT-AATTCACCTTCTCCGTC-3' $M_w = 7\ 266.0$)

PCR反应体系: H₂O 15.8 μ L, 10 $\times$ Buffer 2.5 μ L, 25 mmol/L MgCl₂ 1.5 μ L, 引物 1 (20 ng μ L) 1 μ L, 引物 2 (20 ng μ L) 1 μ L, dNTP (2.5 mmol/L) 1 μ L, 模板 2 μ L, Taq酶 (5 U μ L) 0.2 μ L, 总体积 25 μ L。

PCR反应条件: 94 $^{\circ}$ C /3 min $\rightarrow$ [94 $^{\circ}$ C /40 s $\rightarrow$ 58 $^{\circ}$ C /30 s $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C /40 s] $\times$ 35 cycles $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C /5 min $\rightarrow$ 4 $^{\circ}$ C, 保存。

电泳检测条件: 0.8%的琼脂糖凝胶, $\times$ TAE电泳缓冲液, 70 V, 45 min。在 FR-200型凝胶电泳成像系统上用 Smart View软件进行扫描记录。

1.2 Southern Bolt分析: 由于 PCR只能证明在转基因植株体内存在外源目的基因片段, 而不能完全确定外源目的基因片段已整合进植物基因组, 且 PCR可能存在假阳性结果, 因此进一步采用 Southern Blot分析验证。将抽提好的苕蓝植株总 DNA (10 μ g), 用 Sac I酶切过夜, 上样于 0.8% 琼脂糖胶,

电压 50 V, 电泳时间 9 h后转到尼龙膜上, 转移方法和探针的制备见《分子克隆实验指南》, 预杂交 2 h后, 68 $^{\circ}$ C杂交过夜。杂交后洗膜, 先室温下用 $2\times$ SSC/0.1% SDS溶液洗 30 min (两次), 然后在 55 $^{\circ}$ C室温下轻摇孵育 40 min, 将尼龙膜用塑料薄膜包起来, 在暗室里将尼龙膜对 X光片曝光大约 7 d后, 进行显影液 8 min, 水浴 1 min, X光片定影液 16 min, 流动水冲洗 5 min后观察。

1.3 One Step RT-PCR的方法: 提取 6棵 PTA基因的 Southern Blot分析阳性植株与 1棵未转化植株, 抽提植物的总 RNA, 进行 RT-PCR检测^[4]。在 RNase-free 0.2 mL PCR管中加入 (50 μ L体系) 10 $\times$ One Step RT-PCR buffer 5 μ L, MgCl₂ (25 mmol/L) 10 μ L, dNTP Mixture (10 mmol/L) 5 μ L, RNase Inhibitor (40 U μ L) 1 μ L, AMV Rtase XL (5 U μ L) 1 μ L, AMV-Optimized Taq (5 U μ L) 1 μ L, 上游特异引物 (20 μ mol/L) 1 μ L, 下游特异引物 (20 μ mol/L) 1 μ L, Total RNA ($\leq 1 \mu$ g) 1 μ L, RNase Free ddH₂O 24 μ L, Total 50 μ L/Sample。

RT-PCR的反应条件为: 逆转录 50 $^{\circ}$ C /30 min $\rightarrow$ 预变性 94 $^{\circ}$ C /3 min $\rightarrow$ 合成 [94 $^{\circ}$ C /40 s $\rightarrow$ 58 $^{\circ}$ C /30 s $\rightarrow$ 72 $^{\circ}$ C /40 s] $\times$ 40 cycles $\rightarrow$ 延伸 72 $^{\circ}$ C /5 min $\rightarrow$ 4 $^{\circ}$ C 保存。

2 结果

2.1 PTA基因的 PCR分析: 114株 Km抗性植株的 DNA用 PTA基因引物 99011PXF1和 99011PXR1进行 PCR分析, 有 28株得到约 870 bp的扩增片段, 与质粒 pCAMBIA2200-PTA中 PTA基因的扩增产物大小一致, 可以初步表明 PTA基因已经转入这 28株再生苕蓝植株中。结果见图 1。

2.2 对转基因苕蓝所含 PTA基因进行 Southern



M-DL2000, 片段大小依次为 2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100 bp 阳性-用阳性质粒为模板, 所得的扩增片段为 870 bp 阴性-用非转基因植株的 DNA为模板 1-11为转 PTA基因的 T₀代植株, 其中 4为 PCR阴性植株

M-DL2000 molecular marker sequence as 2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100 bp Positive plasmid as positive control to get amplified fragment 870 bp and DNA of wild type as negative control 1-11 to PTA transgene T₀ plantlets 4 PCR negative plantlets

图 1 转 PTA基因植株的 PCR结果

Fig. 1 PCR analysis of PTA transgene plantlets

Blot分析: 用 Eco RI和 Pst I酶切质粒 PTA, 得到含半夏基因片段, 大小分别为 3.9, 3.0, 0.9 kb, 充当阳性对照及 marker 随机选取未转化的苕蓝及 PCR

阳性的苕蓝植株, 抽提总 DNA, 用 Hind III (探针中不含此酶切位点) 消化总 DNA, 杂交。3和 4的杂交结果分别为三条和两条带, 未转化的苕蓝无条带。证

明半夏凝集素基因已经转入苕蓝基因组中,且整合入多个拷贝 结果见图 2

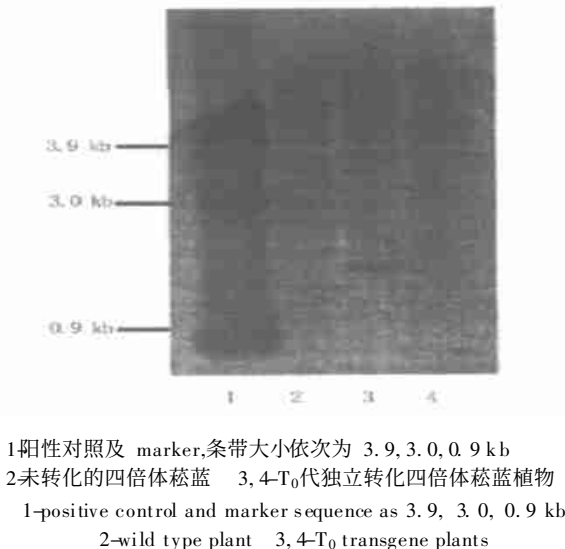


图 2 PTA基因的 Southern Blot 分析
Fig. 2 Southern Blot analysis of PTA transgene.



M-DL2000片段大小依次为 2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100 bp 1-为非转化植株 2- 8转 PTA基因经 Southern Blot分析为阳性的 T₀代转基因植物,其中 2- 5为 RT-PCR阳性,6- 8为 RT-PCR阴性
M-DL2000 molecular marker sequence as 2 000, 1 000, 750, 500, 250, 100 bp 1-wild type 2- 8-T₀ transgenic plantlets which Southern Blot is positive 2- 5 give the 870 bp positive band and 6- 8 are negative

图 3 转 PTA基因的转基因植物的 RT-PCR分析
Fig. 3 RT-PCR analysis of PTA transgene plantlets

他们在受体植物中的表达,整合的拷贝数过高容易导致基因沉默) 所以农杆菌法尽管转化效率不高,还受到菌种和植物材料的限制,但仍广泛应用于转基因植物的研究 从 PCR结果来看,本实验的转化率有 25%。不同的农杆菌和不同的植物品种转化率不同

3.2 转基因的遗传表达:农杆菌介导的转化和直接转化已被广泛用于转入外源基因。但是在转化中,只有小部分植物细胞接受外源 DNA的整合,大多数细胞仍保持非转基因状态。T-DNA在植物染色体中的整合是随机发生的,既可以单拷贝方式整合,也可以多拷贝方式整合,大量拷贝数会导致基因的沉默^[5]。用 Southern杂交的方法可以估计外源 DNA整合到植物细胞中的拷贝数 对 DNA进行酶切时选用的是插入片段内部没有识别位点的限制酶,由于插入片段是随机插入苕蓝基因组中的,如果是多

2.3 对转基因苕蓝所含 PTA基因进行 RT-PCR分析:为了证明转基因植株所含 PTA基因是否在植株中表达,就需要从植物的总 RNA中检测是否有 PTA基因的 DNA转录成 mRNA 发现有 4棵阳性植株扩增出与目的片段大小一致的条带(870 bp),初步证明转入的 PTA基因发生了转录,能够表达 结果见图 3

3 讨论

3.1 转基因的方法:转基因技术发展至今,已有许多转基因方法得到广泛应用,如:农杆菌法、基因枪法、PEG法、电击法、脂质体法和超声波介导法 在以上这些转基因方法中,采用农杆菌转化具有许多明显的优势 农杆菌介导的转化法可以避免许多栽培品种的原生质体难于再生的问题,而且相对于直接转化法来讲,外源基因整合入受体基因组更为精确,通常为单拷贝或低拷贝整合,并大多符合孟德尔遗传(外源基因在受体植物中整合的拷贝数会影响

拷贝整合,酶切后含有不同拷贝的酶切片段长度可能不同,就可以通过电泳将其分开,从而估计插入片段的拷贝数 分子杂交结果证明,在农杆菌介导的转基因四倍体苕蓝植株中,不同转基因植株具有不同 PTA基因杂交条带,说明这些植株为独立转基因植株 PTA基因的拷贝数大多数为 1- 3个左右 与基因枪法介导的植物遗传转化相比,农杆菌法可获得较多的单拷贝转基因植株,表达效果好^[6] 6株转化苕蓝以总 RNA为模板进行反转录,然后再经 PCR扩增,有 4株得到特异的 cDNA扩增条带,表明半夏凝集素基因实现了转录^[7]。但是由于在提取 RNA,作 RT-PCR分析时,没有对各个植株的 RNA作定量分析,所以扩增出的目的条带的明亮对比不能代表 mRNA表达量的高低

3.3 植物凝集素的研究现状及问题:抗虫基因工程相对起步较晚,有许多方面需进一步研究改进^[8] 植

物凝集素对刺吸式害虫杀虫性同 BT 的杀虫性相比效果不尽如意,一方面有必要深入研究清楚其作用机制,从而制订相应策略提高抗虫效果,比如从蛋白质结构、凝集素的结合位点相互作用等方面研究入手;另一方面应着手新的抗虫基因的克隆

在植物中表达凝集素要求相对较高的水平才具有较好的抗虫效果,要求构建强的高效表达载体,采用合适的强启动子,针对害虫取食部位是韧皮部可采用特异性表达启动子。随着越来越多植物凝集素的鉴定和对它们结构功能及其基因的深入研究,凝集素在农业、医学等领域及生命科学研究中用途越来越广泛。凝集素参与植物体内组成防卫和诱导防卫的机制及其基因克隆和转化研究,仍将是一个活跃的研究领域。

References

[1] Van Damme E J M, DeClercq N, Claessens F, *et al.* Molec-

ular cloning and characterization of multiple of isoforms of the snowdrop lectin [J]. *Planta Med*, 1999 (186): 35-43.

[2] YAO J H, Sun X F, Tang K X, *et al.* Molecular cloning of lectin gene from *Pinellia ternata* [J]. *J Fudan Univ Nat Sci* (复旦大学学报·自然科学版), 2001 (40): 461-464.

[3] Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Cloning* (2nd ed) [M]. New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.

[4] Gu H Y, Zai L J, Ming X T. *Plant Gene and Molecular Manipulation* (植物基因与分子操作) [M]. Beijing: Beijing University Press, 1995.

[5] Xu M L, Yang J S, Ge K L. The mechanism integration of foreign DNA fragment into the genome of the explants [J]. *Plant Physiol* (植物生理学通讯), 1996, 32 (3): 234-240.

[6] McKnight T D. Segregation of genes transferred to one plant cell from two separate *Agrobacterium* strains [J]. *Plant Mol Biol*, 1987, 8: 439-445.

[7] Baucombe D C, English J J. Ectopic pairing of homologous DNA and post-transcriptional gene silencing in transgenic plants [J]. *Curr Opin Cell Biol*, 1996, (7): 173-180.

[8] Mao H Z, Tang X, Cao X L, *et al.* Study on insect resisted transgenic *Brassica oleracea* var. *capitata* and the progeny [J]. *Sci Sin (C)* [中国科学(C辑)], 1996, (26): 339-347.

对数期继代对南方红豆杉细胞培养动力学的影响

仇燕,王丽,刘子会,王刚⁽²⁰⁾

(河北师范大学生命科学学院,河北石家庄 050016)

摘要:目的 解决南方红豆杉细胞生长缓慢及代谢水平低下的问题。方法 对对数期(20 d)和静止期(30 d)的红豆杉细胞分别进行继代,在整个生长周期中测定了培养基中的碳源、氮源、磷酸盐的变化并分析了红豆杉细胞生长及紫杉醇的合成情况。结果 对数期继代细胞吸收碳源和硝态氮早于静止期继代的细胞,且前者的比生长速度是后者的1.5倍,紫杉醇含量提高了近4倍。结论 对数期继代有利于生物量的积累及紫杉醇的合成。

关键词:对数期;紫杉醇;动力学

中图分类号: R282.13

文献标识码: A

文章编号: 0253-2670(2003)09-0849-04

Effect of subculture at logarithmic phase on kinetics of cell cultures of *Taxus chinensis* var. *mairei*

QIU Yan, WANG Li, LIU Zi-hui, WANG Gang*

(College of Life Science, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China)

Abstract Object To solve the problem of low growth rate and metabolism level in *Taxus chinensis* var. *mairei* (Lévl.) Cheng et L. K. Fu. **Methods** Cells on logarithmic phase (20 d) and stationary phase (30 d) were subcultured individually. The uptake of carbohydrate, nitrogen and phosphate from the medium was examined, the growth rate of *Taxus* cell and the synthesis of taxol were analyzed too during the whole growth period. **Results** The *Taxus* cell subcultured at logarithmic phase uptook carbohydrate and nitrate earlier than that subcultured at stationary phase. The special growth rate of the former was 1.5 folds of that of the latter. The production rate of taxol was increased by nearly 4 times. **Conclu-**

⁽²⁰⁾ 收稿日期: 2002-11-29

基金项目: 河北省自然科学基金(300162)

作者简介: 仇燕(1977-),女,河北石家庄人,河北师范大学博士研究生,植物学专业,研究方向为植物抗逆生理学。

E-mail: qiu-yan-yan77@sohu.com

* 通讯作者