

抗菌肽 LcI 基因转化杨树阶段研究*

李 陈 颖 李 铃 韩一凡

关键词 抗菌肽 LcI 基因、转化、杨树

杨树(*Populus spp.*)是“三北”防护林和四旁绿化的主要树种,在防风固沙、农田林网、四旁绿化及水土保持方面起着重大作用^[1]。目前,我国林木抗虫抗病主要以化学防治和生物防治两种防治方法为主,这两种方法在80年代森林抗虫和抗菌方面起到过一定的作用,但随着世界范围内人们对于环境保护的日益重视,化学防治的方法已被逐渐淘汰,生物防治也存在很大的局限性。1983年以来,随着一批批抗虫、抗病、抗除草剂等转基因植株的相继出现,植物基因工程显示出巨大潜力^[2-8]。但由于与其它植物相比,树木生长周期长,从事这方面研究的人数较少,在分子生物技术方面还存在诸如转化率低、检测困难等许多不成熟的地方。林木基因工程进展一直比较缓慢。这些难点因转入基因和外植体的不同有很大的差别。如何把不同的抗虫、抗病基因转入到林木基因工程的模式植株杨树中,具有很大的意义。中国林业科学研究院林研所分子遗传室在1993年第一次成功地获得了高表达抗虫的转Bt基因欧洲黑杨树以后,进一步从事了防止转基因树木环境污染以及其它基因和树种的转化研究,都得到了较好的结果^[2,8]。

本文所报道的内容是将一种抗菌肽基因转入杨树及其分子生物学初步测定的工作。该抗菌肽基因是一种从芽孢杆菌(*Bacillus spp.*)中提取出的对水稻白枯病有很强拮抗作用的抗菌基因。经北京大学生命科学中心虫试发现该基因编码的拮抗蛋白对蛀干害虫光肩星天牛的杀虫率可达75%以上^[3]。这种致死原因可能是由于这种蛋白杀死了消化道中帮助天牛消化木材纤维的细菌而引起。鉴于此,本实验室从1993年与北京大学合作开展了抗菌肽LcI基因转化杨树的研究,力图由此培育出一批抗蛀干害虫天牛的转基因苗木,为林业生产服务。

1 材料和方法

1.1 材料

(1) 外植体 美洲黑杨(*P. deltoides* Marsh.)、欧洲黑杨(*P. nigra* L.)、欧美杨(*P. × euramericana* Guinier.) 试管苗由中国林业科学研究院林研所分子遗传室提供。

(2) 菌株来源及保存 实验所用抗菌肽LcI基因由北京大学生命科学中心提供。通过对葡萄芽杆菌中纯化的47 α 抗蛋白测序后,进行人工合成该基因,并在基因前后端分别加上ATG和TAG,因此该基因长约150 bp。再将基因插入到双元载体pBc7的35S启动子和Nos序列之间,从而构成LcI基因的表达载体。

1996—08—20 收稿。

李 研究实习员、陈颖、李铃、韩一凡(中国林业科学研究院林业研究所 北京 100091)。

* 研究工作得到张绮纹先生的帮助,在此表示感谢。

将构建好的根癌土壤杆菌培养在含 50 mg/L 卡那霉素的 LB 培养基中,置于 4 ℃ 冰箱中保存,每半个月活化一次。在转化实验前,用接菌环取新鲜培养基上的菌落,接种到 10 mL LB 液体培养基中,振荡培养 12 h (200 rpm, 28 ℃)。然后在无菌条件下,取菌液 1 mL,以 30 倍的 MS 液体培养基稀释备用。

(3) 实验用酶 购自 Promega 公司。

(4) 主要试剂 碱法提取液 1 50 mmol/L 葡萄糖, 25 mmol/L Tris-HCl (pH8.0), 10 mmol/L EDTA (pH8.0)。8 磅灭菌 15 min, 贮存在 4 ℃ 条件下。

碱法提取液 : 0.2 mol/L NaOH (从 10 mol/L 母液中稀释), 1% SDS, 使用前配制。

碱法提取液 : 3 mol/L 乙酸钾 (pH4.8)。

RNA 酶(不含 DNA 酶): 将 RNase A 以 10 mg/mL 溶于 10 mmol/L Tris-HCl (pH7.5) 和 15 mmol/L NaCl 中。在 100 ℃ 的沸水中煮 15 min, 慢慢冷却到室温。贮存在 -20 ℃ 条件下。

TE 缓冲液: 10 mmol/L Tris-HCl (8.0), 1 mmol/L EDTA。15 磅灭菌 15 min。

氯仿-异戊醇(24:1)取 240 mL 氯仿,加入 10 mL 异戊醇充分混匀。

50 × TAE 缓冲液: 2 mol/L Tris-acetate, 0.05 mol/L EDTA (pH 8.0)。加蒸馏水到 1 000 mL, 使用时稀释 50 倍。

DNA 提取液: . 研磨缓冲液: 蔗糖 150 g/L, NaCl 250 mmol/L, EDTA 50 mmol/L, Tris 50 mmol/L (pH7.5)。

DNA 提取液: . 悬浮缓冲液: EDTA 25 mmol/L, NaCl 250 mmol/L, SDS 5 g/L, Tris-HCl (pH 8.0) 250 mmol/L。

1.2 方法

1.2.1 培养基筛选及制备 实验基本培养基为 MS (Murashige 和 Shoog) 培养基,加入 0.2 mg/L BA 和 0.02 mg/L NAA。培养基用母液配制,高压灭菌前用 1 mol/L 的 NaOH 将 pH 调为 5.8,然后在 121 ℃ 下灭菌 15 min。采用过滤灭菌方法在培养基中加入抗生素。

1.2.2 外植体的转化方法 转化采用 Horsch^[10] 发明的叶盘法。具体作法是在无菌条件下,以在生根培养基中培养 8 周的杨树试管苗上部的叶片为外植体,上面划痕浸入稀释的菌液中 5 min,随后用无菌滤纸吸去外植体上残余的菌液,置于不含卡那霉素的诱导培养基上,在 25 ℃ 条件下暗培养 2 d 后,转入含卡那霉素 40 mg/L 和羧苄霉素 500 mg/L 的相应培养基中培养。每半月继代一次,对照为不接种菌液的叶片外植体。培养条件为 25 ℃,光照 12 h/d。

1.2.3 转化再生植株的生根 生根培养基采用 MS 基本培养基并加入 0.02 mg/L NAA。当不定芽长至 1 cm 时便可切下,转入含 500 mg/L 羧苄霉素和 40 mg/L 卡那霉素的生根培养基。生根后的植株在只含 500 mg/L 羧苄霉素的相同生根培养基中快繁后移入温室驯化。

1.2.4 提取质粒 采用普通碱法从根癌土壤杆菌中提取质粒。

1.2.5 植物 DNA 提取方法 取适量组培苗叶片到 Enppendorf 管中,加 600 μL 缓冲液,快速研磨成浆,5 000 rpm 离心 2 min,弃上清液,加入 400 μL 悬浮缓冲液,混匀,70 ℃ 水浴 20 min,8 000 rpm 离心 2 min,取上清液,加入等体积的酚仿溶液,轻轻摇匀,用 8 000 rpm 离心,吸出水相,加入 2/3 体积的异丙醇,沉淀出 DNA,14 000 rpm 离心 5 min,用 70% 乙醇洗两次,抽干,溶于 50 μL TE 备用。

1.2.6 PCR 反应条件 从提取的 156 个 DNA 样品及阳性对照中各取少量 DNA,置于 0.5

mL Eppendorf 管中,并分别加入 $10 \times$ PCR buffer、 $10 \times$ dNTP、LcI 基因特异引物各 $2 \mu\text{L}$, Taq 酶 0.2 U , 双蒸水 $17 \mu\text{L}$, 使离心管内反应体积达 $25 \mu\text{L}$, 然后向各离心管中分别滴入一滴石蜡油, 在 PCR 仪器中反应。反应条件为每循环 94°C 变性 1 min , 55°C 退火 1 min , 72°C 反应 30 s , 共 30 个循环。反应后取反应混合液 $10 \mu\text{L}$ 在 2.0% 的琼脂糖凝胶上电泳, 检测反应产物。电泳后凝胶在溴化乙锭溶液中染色 10 min , 在紫外灯下检查 PCR 产物并照相。

2 结果与分析

2.1 杨树转基因植株的再生

正常的对照外植体接种在不含卡那霉素的培养基中, 10 d 后便开始分化, 继续培养有大量健壮不定芽产生; 而转化的外植体在卡那霉素培养基中分化需 3 周左右。通过对欧洲黑杨、美洲黑杨和欧美杨 3 种杨树进行转化, 发现: 美洲黑杨的转化效率高, 产生的不定芽多且生长速度快, 平均每个外植体在选择培养基中可形成不定芽 3 个左右; 而欧美杨大约产生 2 个不定芽。3 种外植体共获不定芽 218 个。

正常不定芽进入无卡那霉素的生根培养基后, 10 d 左右即可生根, 生根率高达 100%。美洲黑杨转化植株进入卡那霉素的生根培养基则需约 15 d 生根, 欧美杨和欧洲黑杨约需要 22 d 生根, 生根率分别为 94%、66%、小于 1% (欧洲黑杨不定芽的生根率很低, 只有一棵生根)。共 176 株不定芽生根, 并转入正常生长。美洲黑杨生根后, 1 个月的时间可长到 $5 \sim 6 \text{ cm}$, 而欧美杨只能长 $2 \sim 3 \text{ cm}$ 。待株长至 5 cm 时, 将每个植株编号, 切成数段进行快繁并转入温室。

从以上分析以及以往的实验结果可以看出: 美洲黑杨是一种比较成熟的外植体材料, 适于作一些探索性转基因研究。而欧洲黑杨和欧美杨则需要进一步研究其转化条件。

2.2 PCR 反应结果分析

通过 PCR (聚合酶链式反应), 在 40 mL/L 卡那霉素生根培养基上诱导生根的 176 株植株中筛选。共选出阳性植株 11 株, 其中以美洲黑杨为外植体的有 8 株, 以欧美杨为外植体的有 2 株, 以欧洲黑杨为外植体的有 1 株。图 1 为 6 株 PCR 反应结果。从图 1 可以看出被检测的 6 个杨树 DNA 样品, 均产生约 150 bp 的预期产物, 在琼脂糖凝胶电泳图中与阳性对照处于同一位置, 这说明外源 DNA 序列 LcI 基因已插入杨树基因组中这些植株已被转化。在分子生物学检测过程中, 有时会出现一些比预期片段大或者小的片段, 这可能是: (1) 引物的错误配对引起。(2) DNA 变性不彻底, 开始几个循环没有扩增出全长特异序列致使后面的循环扩增出大多数的片段变小。而特异全长片段量很少, 在凝胶中带不清晰。(3) 外源 DNA 插入过程中发生基因重组。前两种情况可以通过提纯 DNA、严格设计引物以及改变反应条件来克服。上述 3 种情况可

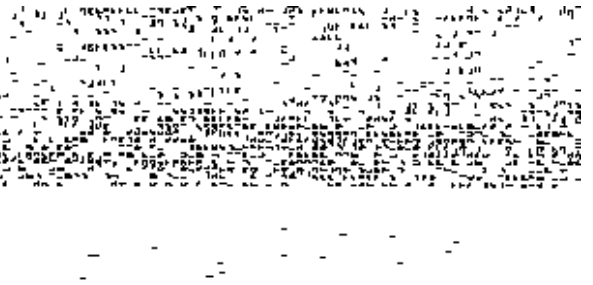


图 1 转化植株 PCR 产物电泳照片

样 1: 质粒 pBc7PCR 产物 (阳性对照); 样 2~7: 转化植株 DNA 的 PCR 产物。分别为: cc-271-206、204、192、173、cc-b-169、cc-3n-30; 样 8: 非转基因植株 (阴性对照)

以通过提纯该片段进行测序分析来断定。如果出现第一种情况, 则可能通过片段序列得到一些 T-DNA 异入外源基因的规律。

另外, 杨树基因组结构存在某些特殊的地方(例如: 重复序列多、不易提纯等), 使杨树转基因株的分子生物学检测相对比较困难。这就需要在设计引物的时候要特别注意引物的特异性。在提取 DNA 的时候在每一步都十分仔细, 宁可少提取一些也一定要在质量上保重。

本文报道的内容是阶段性进展, 目前已检测出外源基因已经转入杨树基因组中。要知道转入的基因表达状况以及抗天牛的程度, 有待进一步研究。

参 考 文 献

- 1 田颖川, 李太元, 莽克强, 等. 欧洲黑杨抗虫转基因的研究. 生物工程学报, 1993, 9(4): 291 ~ 297.
- 2 刘进元, 刘 , 潘乃遂, 等. 拮抗菌 A014 的筛选及分泌抗菌蛋白的条件. 植物学报, 1991, 33(2): 157 ~ 161.
- 3 伍宁丰, 范云六. 含苏云金芽孢杆菌杀虫蛋白基因的杨树工程植株的建立. 科学通报, 1991, 9: 705 ~ 708.
- 4 陈颖, 韩一凡, 李铃, 等. 苏云金杆菌杀虫晶体蛋白基因转化美洲黑杨的研究. 林业科学, 1995, 31(2): 97 ~ 103.
- 5 中华人民共和国林业部科学技术司编. “七五”国家重点科技攻关林业项目重大成果选编. 1993, 8(1): 507 ~ 509.
- 6 Edwards K, Johnstone C, Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis, Nucleic Acids Research, 1991, 19(6): 1349.
- 7 Klopfenstein N B, Shi N Q, Kernan A., et al. Transgenic *Populus* hybrid expresses a wound inducible potato proteinase inhibitor -CAT gene fusion. Can. J. For. Res., 1991, 21: 1321 ~ 1328.
- 8 Steven H, Streuss G H, Barry G. Prospects for genetic engineering of insect resistance in forest trees, Forest Ecology and Management, 1991, 43(3, 4): 181 ~ 209.
- 9 陈颖, 李强, 李玲, 等. 抗虫转基因欧洲黑杨的 Western 印迹法分析. 林业科学, 1996, 32(3): 274 ~ 276.
- 10 傅荣昭, 孙勇如, 贾士荣主编. 植物遗传转化技术手册. 北京: 中国科学技术出版社, 1994. 88 ~ 90.

Transformation of Antibacterial Gene LcI into Poplar Species

Li Yi Chen Ying Li Ling Han Yifan

Abstract Leaves of in vitro *Populus deltoides*, *P. nigra* and *P. euramericana* were used as explant to be transformed with antibacterial gene LcI which was synthesized according to the sequence of antibacterial protein of *Bacillus* spp. It was demonstrated that the insect mortality of this antibacterial protein to *Anoplophora glabripennis* was more than 75%. Transformants were selected by 40 mg/L kanamycin, and the rooting percentage was about 80.7% in the rooting media supplemented with 40 mg/L kanamycin. PCR analysis showed that antibacterial gene has been successfully transformed into these poplar chromosomes.

Key words antibacterial gene LcI, transformation, poplar