

# 含 ipt 融合基因的根癌农杆菌转化 大豆萌动种胚的研究<sup>\*</sup>

## I 苗期子叶的同工酶分析

汪清胤 黄永芬 傅桂荣 许志茹

郑宝江 李洪泉

(哈尔滨师范大学生物系)

### 摘 要

本实验以大豆萌动种胚为受体,用含有 35S 启动子—Gus 基因—ipt 基因—Nos 基因的融合基因根癌农杆菌 LBA 4404 进行转化。通过对转化及对照植株苗期子叶的过氧化物酶同工酶及酯酶同工酶分析,结果表明酶谱有明显差异,过氧化物酶同工酶有两条差异带:Rf0.509 及 Rf0.712;酯酶同工酶有一条差异带:Rf0.531。综合分析,上述三条差异带都显示的转化植株占所分析的转化植株的 14.4%。此法可作为转基因植株早期筛选的方法之一。

**关键词** 大豆萌动种胚;细胞激动素生物合成基因;根癌农杆菌;转化;同工酶

自 1979 年 Marton<sup>[8]</sup>首先用根癌农杆菌 Ti 质粒进行烟草原生质体转化以来,高等植物的转化方法已有广泛发展<sup>[1,5,6]</sup>。其中,利用根癌农杆菌介导外源基因转化植物萌动种胚是一简易可行的方法<sup>[2]</sup>。

植物细胞激动素有控制细胞分裂,限制一些水解酶产生,促进根系生长,改变营养元素分配,进而达到提高产量的作用。美国密苏里大学生物系构建 SAUR 启动子—ipt 基因—Gus 基因—Nos 基因这一融合基因,克隆在 Ti 质粒中,转化烟草获得成功<sup>[7]</sup>。我们也用含有 ipt 融合基因的根癌农杆菌转化大豆萌动种胚,并对转化植株进行鉴定。本实验首先对转化植株苗期子叶进行同工酶分析,为转基因植株的早期筛选探讨一有效方法。之后,

<sup>\*</sup> ipt 基因为植物细胞激动素生物合成基因  
本文于 1993 年 8 月 2 日收到。  
This paper was received on Aug. 2, 1993.

还要用其它方法予以鉴定,实验结果将陆续报道。

材 料 和 方 法

一、菌株 根癌农杆菌 LBA 4404,具壮观霉素、卡那霉素和氯霉素抗性。在 Ti 质粒上克隆 35s 启动子—ipt 基因—Gus 基因—Nos 基因这一融合基因。用 ZYT 培养基,28℃ 摇床培养 36 小时,使达到对数期。上述菌株由美国密苏里大学生化系惠赠。

二、种子处理 大豆种子为黑豆 36 号,由省农科院大豆所惠赠。种子经温水浸种,置 25℃ 温箱发芽,待胚根稍突破种皮时,用手术刀轻轻割破胚根附近种皮,然后用培养至对数期的根癌农杆菌 LBA 4404 菌液浸染 12 小时,播种于温室花盆中,并以同期未浸菌液的种子为对照(也割破种皮)。

三、同工酶分析 取播种 20 天,变异较明显的转化植株子叶共 14 株,取一未浸菌液的正常植株为对照,按以前报道的方法制备酶提取液<sup>[3]</sup>。聚丙烯酰胺凝胶制备、电泳及过氧化物酶同工酶、酯酶同工酶分析方法均与前同<sup>[3,4]</sup>。

相对迁移率计算

$$Rf = \frac{\text{原点到酶带间距离(cm)}}{\text{原点到前沿距离(cm)}} \times 100\%$$

结 果 和 讨 论

一、转化植株与对照植株在发芽率、苗期株高、叶形等田间性状方面均出现明显变异。转化植株发芽率为 90.20%,对照植株发芽率为 95.5%;出苗后一个月内,转化植株颜色发黄,生长不整齐,苗长得矮小(下表),叶片也表现不正常,出现单叶、二叶等畸形叶状。详细状况,将另文报道。

植 株	株 高 (cm) (每盆平均)					平均高度
	1	2	3	4	5	
转化植株	6.3	3.5	4.4	2.9	6.7	5.36
正常植株	18.4	17.7	20.2	19.5	16.8	18.52

二、图 1 是过氧化物酶同工酶谱显示情况示意图。其中对照植株样品(15 号)显示 12 条谱带,其相对迁移率分别为 0.108、0.216、0.357、0.369、0.385、0.410、0.420、0.432、0.439、0.566、0.608、0.656。在 14 个转化植株中,酶谱差异较明显的是第 10、11、12 及 14 号样品,多显示一条 Rf0.712 带,14 号样品还比其它各样品多显示一条 Rf0.509 带。第 4、5、8 号样品比对照少显示一条 Rf0.432 带。各谱带及其相对迁移率如下:

谱带 Bands	-      →      +													
	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV
Rf	0.108	0.216	0.357	0.369	0.385	0.410	0.420	0.432	0.439	0.509	0.566	0.608	0.656	0.712

三、图 2 是酯酶同工酶谱显示情况的示意图。其中对照样品(15 号)显示 8 条谱带,

其相对迁移率分别为 0.134、0.205、0.326、0.335、0.350、0.373、0.515、0.594；在 14 个转化植株样品中，与对照明显差异表现在第 6、7、9、10、13、14 号样品多显示一条 Rf0.531 带，12 及 14 号样品还多显示一条 Rf0.617 带。各谱带及其迁移率如下：

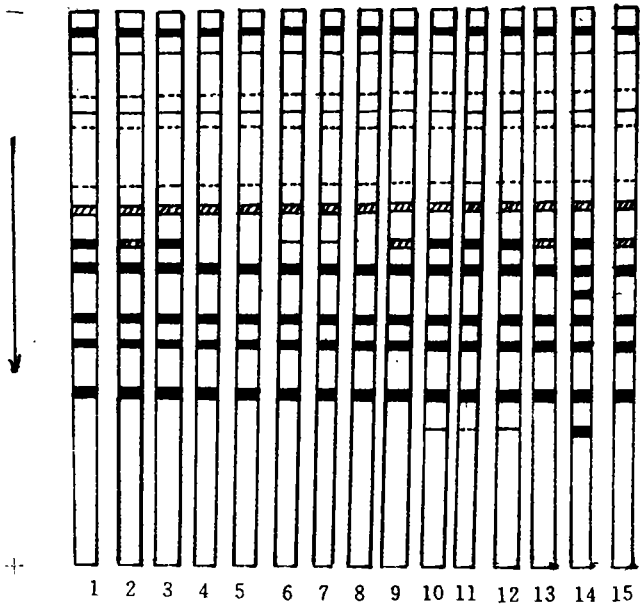


图 1 过氧化物酶同工酶谱 1—14 为转化植株,15 为对照

Fig. 1 Peroxidase isozyme zymograms 1—14: Transformed plants;15: Control plant

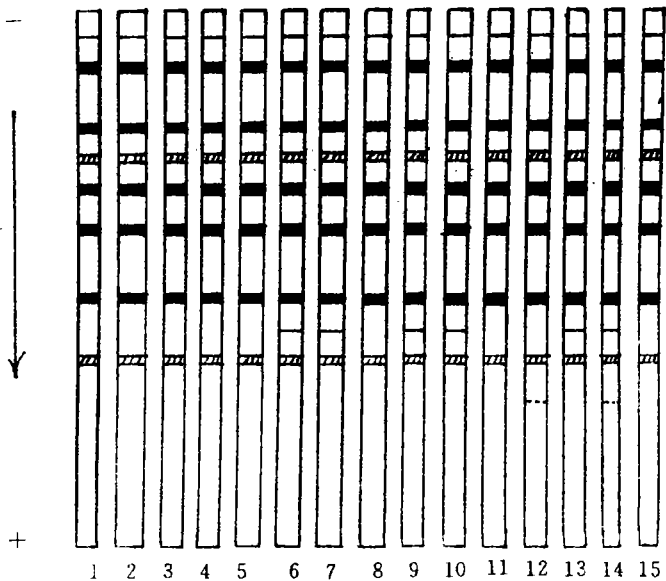


图 2 酯酶同工酶谱 1—14 为转化植株,15 为对照

Fig. 2 Esterase isozyme zymograms 1—14: Transformed plants;15: Control plant

	-      →      +									
谱 带 bands	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X
Rf	0.134	0.205	0.326	0.335	0.350	0.373	0.515	0.531	0.594	0.617

综上所述,在过氧化物酶同工酶及酯酶同工酶中均显示显著差异带的样品只有 10、14 号,占所占分析转化样品的 14.4%。

四、本实验在转化萌动种胚时,没采取种子表面严格消毒灭菌处理的传统作法,原因是考虑到根癌农杆菌原本就生活在土壤中,其感染双子叶植物能力很强。本实验所用的 LBA 4404,虽按遗传工程需要加以改造,但其对数期的感染能力仍很强,接菌后转化苗形态表现足以证明这点。这可使操作进一步简化。

五、本实验所观察到转化植株与对照植株的同工酶差异,尚不能作为转基因植株鉴定的直接证据,今后需进行 Gus 基因、Nos 基因的表达检测,利用 PCR、分子杂交等技术获得直接证据,我们将陆续报道这些工作的实验结果。由于转基因植株的早期筛选、鉴定工作亦为重要,本实验为此提供一有效方法。

六、用根癌农杆菌转化大豆萌动种胚是否可行? 许耀奎等认为,这种受体态种胚的胚性细胞酶活动加强,呼吸作用聚然上升,糖类、蛋白质以及核酸的合成和转变也迅速地进行。这时的萌动种胚对外界因子的作用十分敏感,胚细胞开始处于活跃分裂状态,子叶对胚芽的包裹不再那么严密。此时利用高活力的农杆菌感染处理萌动种胚并进而与之共培养,就有利于种胚性细胞的转化,因为宿主细胞 DNA 的合成和细胞分裂是农杆菌成功转化的一个重要因素。此外,萌动种胚的微伤处理不仅利于细菌靠近或进入宿主细胞(特别是胚芽处的细胞壁或原生质膜)、刺激受伤部位细胞的分裂,而且伤流液中还会存在着较多的诱导 Ti 质粒 Vir 区基因活化的信号分子。根癌农杆菌对种胚细胞的转化,特别是对胚芽及其分生细胞的转化,有可能使转化植株将整合进的 T-DNA 通过形成配子而传递给转化一代,转化植株的特性通过孟德尔规律遗传<sup>[2]</sup>。

参 考 文 献

[1] 刘春明等:1989,遗传,11(4),39~42  
[2] 许耀等:1991,实验生物学报,24(2),109~117  
[3] 汪清胤等:1981,遗传,3(6),28~30  
[4] 张士文等:1984,哈尔滨师范大学学报(自然科学版),2,105~108  
[5] Horsch, B. B., et al.: 1985, Science, 227:1229~1231  
[6] Kudirka, D. T.: 1986, Can. J. Genet Cytol., 28, 808~817  
[7] Li Y., et al.: 1992, Developmental Biology, 153:386~395  
[8] Marton, L., et al.: 1979, Nature, 227:129~131

## STUDIES ON TRANSFORMATION OF SEED—GERMINATING EMBRYOES OF SOYBEAN BY *Y. tumefaciens* MEDIATED IPT GENE

### I Analysis of the Isozymes of the Seedling Stage Cotyledons

Wang Qingyin Huang Yongfen Fu Guirong

Xu Zhiru Zheng Baojiang Li Hongquan

(Department of Biology, Harbin Normal University)

#### Abstract

The transformation of the seed—germinating embryos of soybean was conducted with the *A. tumefaciens* strain LBA4404 containing CaMV 35S promoter—Gus—ipt—Nos fusion gene.

The analysis of the peroxidase isozymes and esterase isozymes of the seedling stage cotyledons of both the transformed and control plants indicated: The isozymes pattern between the transformed and control plants presented distinct difference; The peroxidase isozymes showed two different bands, Rf 0.509 and Rf 0.712; The esterase isozymes showed one different band; Rf 0.531. To sum up, the transformed plants showing both isozymes different bands account for 14.4% of the total ones which were analysed. This can be used as one of the methods for early screening of transgenic plants.

**Key words** Seed—germinating embryos of soybean; ipt gene; *A. tumefaciens*; Transformation; Isozyme