

研究方法

大豆属致瘤农杆菌致瘤后
胭脂碱的测定

蒋兴村 周泽其

(中国科学院遗传研究所)

植物遗传工程研究的迅速发展,特别是在茄科的一些典型材料中,载体、受体,基因转移的成功例子^[1,8],吸引着国内外科研工作者把这种技术应用到主要经济作物的改良上;大豆基因工程就是一个很活跃的领域。大豆起源于我国,有极其丰富的种质资源和具有许多不同特点的基因型。我国科技人员首先用致瘤农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)从1553个大豆属基因型中筛选出94个结瘤基因型,并在无激素的培养基上完成了瘤组织块的脱菌及产生愈伤组织,还测定出其中有胭脂碱的存在^[2,3,4]。这证明了致瘤农杆菌Ti质粒是大豆基因工程的良好载体。所筛选出一批能结瘤的大豆基因型材料,已成为研究大豆基因工程的很好受体。

致瘤农杆菌能感染不少双子叶植物的受伤组织^[6,9],致瘤农杆菌中的Ti质粒含有致瘤基因,在诱发肿瘤期间,Ti质粒上T-DNA整合到植物的基因组中,使植物产生冠瘿瘤,冠瘿瘤细胞含有一些酶,常常产生一些正常植物细胞所没有的不寻常的化合物——胍基氨基酸衍生物(Opine),这种衍生物包括章鱼碱(Octopine)族,胭脂碱(Nopaline)族以及土壤杆菌素一类衍生物。关于章鱼碱和胭脂碱的结构和功能,已有很多研究,它们可决定植物肿瘤性质,章鱼碱能引起双子叶植物产生冠瘿瘤,胭脂碱有可能使某些植物产生畸胎瘤并从瘤组织上分化出幼苗。因此测定它们的存在,是检测T-DNA有没有转移到大豆植株细胞中去的重要标志。我们采用了纸上电泳法^[5,7]进行测定,获得很好的结果,现将具体方法介绍如下。

试验材料: 将用致瘤农杆菌C58处理栽培大豆(*Glycine max* L.)和野生大豆(*G. soja*)而获得的瘤组织块放在无激素的MS培养基上脱菌并使其产生愈伤组织块。对照采用同品种的种子萌发的幼芽。

仪器设备: 电泳仪(DYY-III)一台,电泳槽(卧式)一个,华特曼(Whatman 3mm)滤纸若干张,组织匀浆器数个,4000转小离心机一台,冰箱一台,恒温箱一台,4W紫外灯一个,照相设备一套。

药品的制备及操作方法**1. 提取物缓冲液的制备**

*王连铮、尹光初、邵启全等参加了部分工作。

0.1M 三羟甲基氨基甲烷[Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethane], 0.5M 蔗糖, 0.1% 抗坏血酸 (Ascorbic Acid) 和 0.1% L (+) - 半胱氨酸 [L (+) - Cystein] pH 8.0。

2. 提取物的制备

取组织块 10—50mg, 加上等体积的冷冻缓冲液, 用小号玻璃组织匀浆器在低温条件下磨碎组织, 然后将提取物放入离心机 (3500 转/分) 中离心 5 分钟, 取其上清液进行胭脂碱和章鱼碱的测定。

3. 培养液的制备

A. 章鱼碱脱氢酶培养液的含量: 30mM L-精氨酸 (L-Arginine), 75mM 丙酮酸钠 ($C_3H_3O_3Na$), 16mM 还原型辅酶 I** (β -Nicotinamide Adenine Dinucleotide), 0.2M 磷酸钠 ($Na_3PO_4 \cdot 12H_2O$)。pH 7.0。

B. 胭脂碱脱氢酶培养液的含量

30mM L-精氨酸, 60mM α -酮戊二酸, 16mM 还原型辅酶 I (NADH), 0.2M 磷酸钠, pH 6.8。

4. 反应混合液的配制

将 1 个体积的胭脂碱或章鱼碱脱氢酶培养液加到 1 个体积的提取液上清液中, 在室温 26℃ 条件下放置 1 小时, 使其成为反应混合液即可点样, 进行电泳。

5. 点样

将电泳滤纸 (20×15cm) 的一侧划一条直线, 用毛细玻璃管 (直径 1.0mm) 吸取样品在每一等距离点上点样, 每一样品约 2 μ m 左右, 点的大小以直径 3mm 为佳。同时在另一个点上用含有 0.4mg/ml 章鱼碱*** [Octopine, (α -N-(+)-Propionyl-L-Octopine)], 胭脂碱*** (Nopaline, Monohydrate) 和 L-精氨酸的混合液作样品对照。

6. 电泳

电泳液采用甲酸: 乙酸: 水 (5:15:80 V/V), 倒入平板电泳槽的两端, 将已点样的电泳纸放入电泳槽内, 电压 400 伏, 电泳时间 45—50 分钟, 温度 26℃。电泳结束后取出电泳纸放在 40—60℃ 的烘箱中鼓风吹干。

7. 染色

染色液的配制: 甲液, 0.02% 菲醌** (Phenanthrene-quinone) 无水乙醇溶液; 乙液, 10% NaOH 溶于 60% 乙醇 (W/V) 中。染色时将甲、乙两液等体积混合后立即使用。

8. 荧光反应观察和照相

将染色后烘干的电泳纸, 放在波长 254nm 的紫外灯 (4W) 下观察其荧光反应点。并在暗室中用附带近拍装备的照相机照相, 光圈 F8, 时间 2 秒。胶卷为 21° 全色片。

严格地按上述操作程序进行试验, 就能获得清晰的图片。图 1 中的 1 代表野生大豆瘤组织获得的愈伤组织, 在胭脂碱的等位点上有较强的荧光点; 说明有胭脂碱存在。2 为野生大豆的幼芽, 不存在章鱼碱和胭脂碱。3 为栽培大豆瘤组织获得的愈伤组织, 同 1 一样有胭脂碱而无章鱼碱的存在。4 为栽培大豆幼芽, 无章鱼碱和胭脂碱存在。A.O.N., 最上 A. 为 L-精氨酸的荧光点、中间 O. 为章鱼碱的荧光点, 下面 N. 为胭脂碱的荧光点。

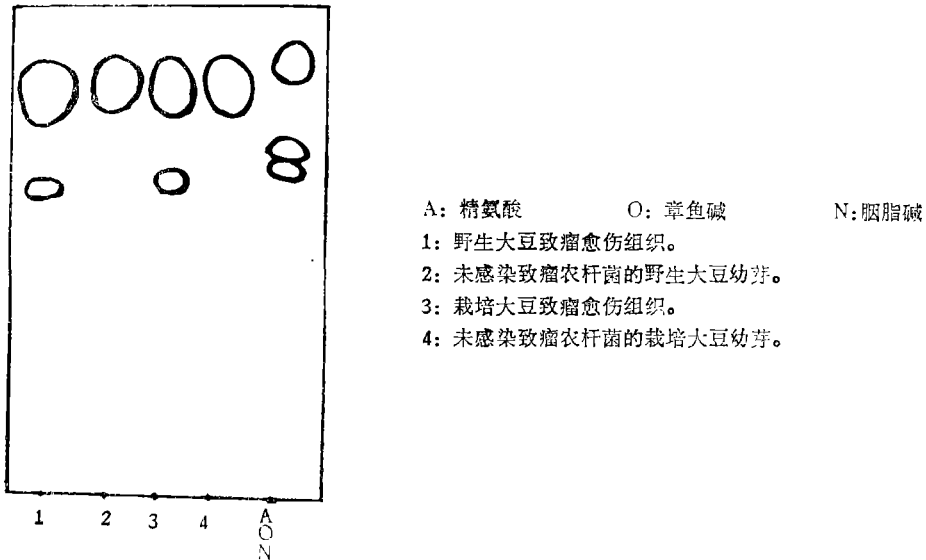


图 1. 致癌野生大豆、栽培大豆愈伤组织章鱼碱、胭脂碱测定结果

实验中注意事项

1. 电泳所用的滤纸以 3mm 以上厚度为佳。太薄的滤纸上胭脂碱、章鱼碱类物质在纸上扩散太大，荧光点难以集中，影响试验效果。
2. 提取组织液时，如果没有低温条件，也可在常温下用匀浆器快速磨碎组织块，其试验效果也较好。
3. 电泳时电压保持在 400V 左右，电压低时混合的胭脂碱和章鱼碱不易分开，影响试验结果。
4. 染色时，甲、乙两染色液必须现配现用，放置时间稍长混合液产生沉淀将影响染色效果。
5. 电泳液可多次使用。

**为美国 sigma 公司生产。

***为美国 Calbiochem 公司生产。

参 考 文 献

1. 蒋兴村, 邵启全等: 1983, 遗传学报 10:287—293。
2. 王连铮, 邵启全等: 1984, 中国科学 (B辑), 2:137—142。
3. 简玉瑜, 邵启全等: 1983, 吉林农业科学(2):18—19。
4. Aerts, M. et al.: 1977, Plant Science Letters, 17:43—50。
5. Mancel De Cleere et al.: 1976, Botamica Review, 42:389—466。
6. Otten, L. A. et al.: 1978, Biochemica et Biopy Acta 572:479—500。
7. Otten, L. A. et al.: 1981, MGG, 183:209—213。
8. Ream, L. W.: 1982, Science, 218:854—859。

**DETERMINATION ON NOPALINE DEHYDROGENASE FROM
TUMOR CALLUS OF SOYBEAN PLANTS CAUSED BY**

Agrobacterium tumefaciens

Jiang Xingcun Zhou Zeqi

(Institute of Genetics, Academia Sinica)

Abstract

This report described method of paper electrophoresis for determination of nopaline and lysopine dehydrogenases from calia of tumor-cells of soybean plants caused by *Agrobacterium tumefaciens*. The results determined showed that T-DNA of Ti-plasmid from *A. tumefaciens* has been transfered into cells of soybean plants and produced tumors, which was cultured on MS medium. The callus containing nopaline dehydrogenase was obtained. The method reported here is a useful analytical one for soybean genetic engineering.