

# 多聚鸟氨酸介导外源基因的直接转化法<sup>\*</sup>

南相日

(黑龙江省农业科学院生物技术研究中心, 哈尔滨 150086)

**摘要** 利用多聚鸟氨酸可以改变本来都带负电荷的原生质体或外源 DNA 表面电性, 使其中之一带正电荷, 从而达到原生质体和外源 DNA 正负相吸, 并且促进外源 DNA 进入到原生质体中。本实验采用以多聚鸟氨酸改变外源 DNA 表面负电荷为正电荷的方法。在大豆品种黑农 35 和黑农 37 的多聚鸟氨酸介导 BT 基因的实验结果表明, 这种方法是行之有效的, 而且转化效率达到 0.33%

**关键词** 多聚鸟氨酸; 原生质体; 外源 DNA

植物遗传转化是植物遗传工程的关键步骤之一。尽管目前转化方法很多, 但还没有极为完善的转基因手段。植物遗传转化技术大致分为载体转化技术和直接转化技术。载体转化技术是根据农杆菌侵染植物细胞的特性来设计的。而直接转化方法, 如 PEG 电激法、基因枪等克服了前者受宿主细胞的限制, 利用化学或物理方法来达到转化的目的, 具有非特异性的特点。总的看来直接转化基因技术比载体转化技术有更广泛的应用前景。本文结合我们在大豆原生质体方面的工作, 介绍另一种直接转基因的方法—多聚鸟氨酸法。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 植物材料: 大豆 (*Glycine max.* L) 种子黑农 35 和黑农 37 由黑龙江省农科院大豆研究所提供

1.1.2 质粒: 质粒 pGBI4A2B 和 pB48.415 (分别来源于中国农科院生物工程中心和中国科学院微生物研究所) 都含有 BT 基因。除此之外 pGBI4A2B 质粒中含有 GUS 基因和新霉素磷酸转移酶 (NPTII) 基因, pB48.415 质粒中含有潮霉素磷酸转移酶 (HPT) 基因。

### 1.2 方法

1.2.1 原生质体游离: 取开花后 10–15 日的幼荚, 表面用 70% 酒精消毒, 剥皮, 去胚取子叶, 剪切成 1mm 宽的窄条, 放入酶液中于黑暗 ( $25 \pm 1^\circ\text{C}$ , 50rpm) 酶解 4–6 小时。酶液组成为: 1.0% Cellulase Onozuka RS, 0.1% Pectolyase Y-23, CPW-9M (9% 甘露醇),

\* 本实验得到中科院上海植生所植物分子遗传国家重点实验室资助。

收稿日期 1999-05-26

Received on May 26, 1999

pH5. 6 提纯原生质体按卫志明等<sup>[1]</sup>(1990)的方法,最后将原生质体浓度调整到  $2 \times 10^6$  /ml

1. 2. 2 质粒的提取: 碱裂法<sup>[5]</sup>提取质粒,把最终浓度调整为 2mg /ml

1. 2. 3 多聚鸟氨酸 (Poly- L- Ornithine简称 PLO)转化步骤: 参考大木规等<sup>[4]</sup>(1994)的方法,并做了一些改进。首先将质粒 DNA 不同浓度的小牛胸腺 DNA 和 PLO在 0. 05M 磷酸缓冲液 (pH5. 6)的存在下冰浴中混合 10min(1M 甘露醇 1. 25ml, 0. 5M 磷酸缓冲液 0. 25ml, 40ug /mlPLO 0. 5ml, 20ug /ml质粒 DNA0. 5ml),然后与等体积的原生质体 ( $5. 0 \times 10^6$  /2. 5ml, 0. 5M 甘露醇)相混合,置冰浴中, 70rpm振荡 10min,然后再静止 5min 这时反应的最终浓度是: 质粒 DNA 2ug /ml, PLO 4ug /ml,原生质体  $1. 0 \times 10^6$  /ml, 0. 5M 甘露醇 低速离心 (80× g)收集原生质体, K<sub>8P</sub> 无激素培养基洗涤两次,用 K<sub>8P</sub> 初始培养基把原生质体浓度调整到  $2 \times 10^5$  /ml,分装到 ϕ60mm培养皿中约 2ml/皿,黑暗 25± 1℃培养 培养 7d后,转化 pGBI4A2B质粒 DNA的原生质体中加 50mg /l卡那霉素进行筛选,转化 pB48. 415质粒 DNA的原生质体中加 30mg /l潮霉素进行筛选

1. 2. 4 β- 葡糖苷酸酶 (GUS)的组织化学分析<sup>[3]</sup>: 取经卡那霉素筛选的转 pGBI4A2B质粒 DNA的愈伤组织,放入 X- gluc染色液中,37℃保温过夜,观察蓝色愈伤组织 染色液的组成是: 2mMX- gluc, 50mM 磷酸钠缓冲液 pH7. 0, 0. 1% TritonX- 100, 1mM 铁氰化钾 亚铁氰化钾

1. 2. 5 PCR扩增: 合成两个在 pB48. 415质粒中 B. T毒蛋白基因编码区里的引物, 5'- GGATAACAATCCGAACATC- 3'; 3'- GTCAAAGGGTTAATTGTTC- 5' 转化 pB48. 415质粒 DNA后,经潮霉素筛选的愈伤组织中提取 DNA<sup>[8]</sup>作为模板,做 PCR扩增. 反应条件: 94℃先变性 10min,然后在 94℃变性 45sec, 50℃退火 45sec, 72℃延伸 90sec 的条件下进行 35个循环, 72℃再延伸 10min,最后扩增出 795bp长度的 DNA片段.

## 2 结果与分析

经 PLO 转化之后,并不影响其后原生质体培养中的细胞分裂 转化处理 10d后,统计原生质体的细胞分裂率达 36- 41%。这与未经 PLO处理的对照的结果相差不大. 由于在

表 1 GUS组织化学分析

Table 1 Effect of GUS gene analysis

品种 Varieties	黑农 35 Heinong 35		黑农 37 Heinong 37	
	处理 Treatment	对照 CK	处理 Treatment	对照 CK
未经筛选愈伤数 No. of unselected callus	$1. 7 \times 10^4$		$1. 4 \times 10^4$	
经筛选的愈伤数 No. of selected callus	212	0	151	0
显蓝色愈伤数 No. of blue callus	52	0	43	0
转化率 (%) Transformation rate%	0. 31	0	0. 29	0

\* 对照用 200个伤愈组织进行染色; \* 200 callus were used to dye in CK

PLO的处理过程中,始终保持与初始培养基相同的 0.5M 甘露醇水平,并且用磷酸缓冲液来保持 pH5.6 的条件,这样给原生质体提供了稳定的渗透压条件和 pH条件,避免了处理过程中原生质体的破裂,有利于其后原生质体培养中的细胞分裂。

培养 30d 后,经转化的原生质体都长出一些愈伤组织,而对照则没有(图 1) 对转化 pGB14A2B质粒 DNA 的愈伤组织进行 GUS 组织化学分析表明,黑农 35 显蓝色反应的愈伤组织占经筛选愈伤组织的 24.5%,黑农 37 占 21.8%,平均转化率达 0.30%(表 1) 在转化 pB48.415 质粒 DNA 的愈伤组织中提取 DNA,进行 PCR 扩增(图 2),结果供试的 50 份黑农 35 的样品中有 38 份显阳性,占筛选愈伤组织的 76%,50 份黑农 37 的样品中有 34 份显阳性,占筛选的愈伤组织的 68%,平均转化率达到 0.33%。这说明 PLO 介导的两种质粒 DNA 已进入到原生质体,而且在愈伤组织中有了稳定表达。

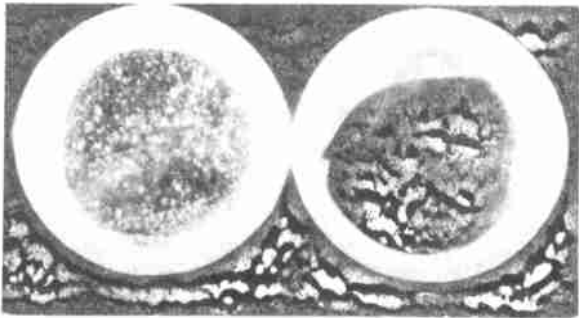


图 1 抗生素筛选结果

Fig. 1 Effect of antibiotic selection  
左: 处理 右: 对照  
Left Treatment Right CK



图 2 PCR 分析结果

Fig. 2 Results of PCR analysis  
1 Marker, 2 质粒, 3 对照 4- 8 转化愈伤  
1 Marker, 2 Plasmid, 3 CK,  
4- 8 Transformed callus

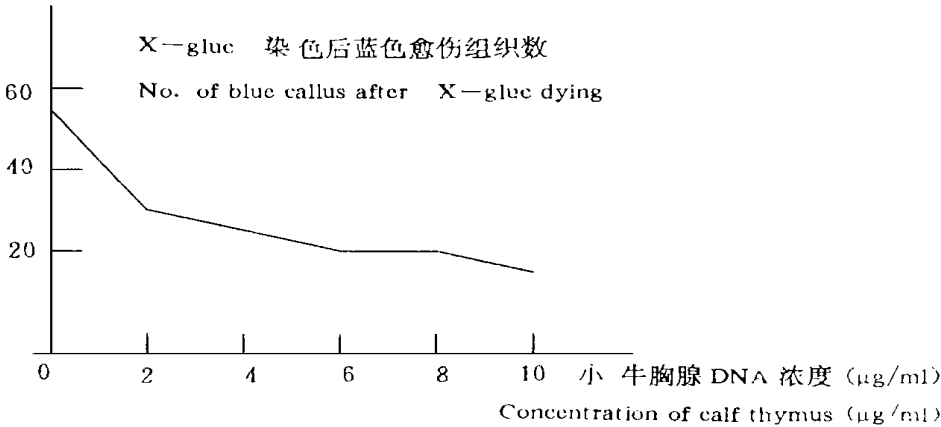


图 3 携带 DNA 对转化效率的影响

Fig. 3 Effect of carrying DNA on transformation efficiency

在质粒 DNA 的转化过程中,加入携带 DNA-小牛胸腺 DNA 的效果不好,加入的浓

度越高越对转化有不良影响(图3)。这可能是因为小牛胸腺DNA和质粒DNA争抢多价阳离子(polycation),使之电性发生改变,而且小牛胸腺的线状DNA比环状质粒DNA更有利于进入到原生质体<sup>[6-7]</sup>,大大减少了质粒DNA的导入机会,因此用PLO介导转化外源基因时,最好不加携带DNA。此结果与大槻等<sup>[4]</sup>的实验结果基本一致。

### 3 讨论

PLO法是一种不同于其他(如PEG)转化法的新的转基因途径,它利用多聚鸟氨酸这个多价阳离子来改变原生质体或外源DNA表面负电荷,使其中之一改变成带正电荷,从而达到原生质体和外源DNA正负相吸,以促进外源DNA进入到原生质体中。这种方法具有较高的转化效率,只要是原生质体再生系统已确立的作物都可以利用了这种方法介导外源基因。在PLO介导外源基因转化过程中要注意以下几点:1. PLO的浓度不要太高,否则可能会使原生质体破裂,PLO的浓度一般 $2-4\mu\text{g/ml}$ 。PLO的分子量最好是 $10-20$ 万之间,太低了效果不好<sup>[4]</sup>。本实验采用了分子量为 $11.4$ 万的Sigma产PLO,转化效果比较好。2. 调整渗透压因植物而异,一般用 $0.5-0.7\text{M}$ 甘露醇。有人认为 $0.7\text{M}$ 甘露醇对原生质体的转化有利<sup>[2]</sup>,但不要与初始培养基的渗透压相差太大。3. 一般使用柠檬酸缓冲液或磷酸缓冲液,在大豆磷酸缓冲液较好。4. 尽可能使用假阳性少的抗生素。在大豆潮霉素比卡那霉素效果好。

### 参 考 文 献

- 1 卫志明,许智宏.大豆原生质体培养和植株再生.植物学报,1990,32(8):582-588
- 2 许智宏,卫志明.植物原生质体培养和遗传操作.杨文定,田波编.原生质体在病毒分子生物学研究中的应用.科学出版社,1995,7
- 3 傅荣昭,孙勇如,贾士荣.植物遗传转化技术手册.北京:中国科学技术出版社,1994,168-170
- 4 大槻义昭,津川秀仁,大槻宽等.ポリオルニチンを用いるプロトプラストへの效率的遺伝子導入法.日本育种杂志(别1),1994,153
- 5 J.萨姆布鲁克, E. F.费里奇, T.曼尼阿蒂斯著.分子克隆实验指南.科学出版社,1992,19-22
- 6 Armstrong C L, Petersen W L, Buchholz W G, et al. Factors affecting PEG-mediated stable transformation of maize protoplasts. Plant Cell Reports, 1990, 9:335-339
- 7 Shillito R D, Saul M W, Paszkowski J, et al. High efficiency direct gene transfer to plants. Bio/Technology, 1985, 3:1099-1103
- 8 Stewart CN, Jr. Via Le. A rapid CTAB DNA solution technique useful for application. Biotechniques, 1993, 14:748-751

## THE TRANSFORMATION OF FOREIGN GENE MEDIATED BY POLY- L- ORNITHINE

Nan Xiangri

*(Biotechnology Research Center, Heilongjiang Academy of  
Agriculture Science, Harbin 150086)*

**Abstract** Poly - L - Ornithine can change the electric charge on the surface of protoplasts or foreign DNA. The protoplasts and the foreign DNA which carry negative electric charge originally become partially carrying positive charge and enhance the introduction of the foreign DNA into the protoplasts. The result on transformation of soybean varieties, Heinong 35 and Heinong 37, with BT gene mediated by PLO showed that the method is feasible and the transformation frequency went up to 0.33%.

**Key words** Poly- L- Ornithine; Protoplast; Foreign DNA