科学通报
第41卷 第4期 CHINESE SCIENCE BULLETIN 1996年2月

转化脂介导甘蓝转化获得转基因植株

薛红卫 卫志明 许智宏
(中国科学院上海植物生理研究所植物分子遗传国家重点实验室，上海 200032)

关键词 转化脂(Lipofectin) 甘蓝(*Brassica oleracea*) 原生质体 转基因植株

如何将外源基因高效地导入植物原生质体是转化技术中的一个关键问题．除了常用的PEG法和电激法外，由于脂质体(Liposome)在作为植物细胞工程载体时具有人造性、稳定性、广宿主性和超载性等特点，脂质体介导法已越来越为人们所重视．目前，在采用不同方法的基础上，通过脂质体介导已对水稻、芜菁、野胡萝卜、烟草等材料进行了不同基因的转化，得到了令人较为满意的结果．

甘蓝(*Brassica oleracea*)是中国和世界上广为栽培的重要蔬菜作物，目前的转化主要仍集中于以外植体为材料的农杆菌(根癌农杆菌和发根农杆菌)介导的组织水平上的转化，而由于各种因素的影响和限制，在原生质体水平进行转化的成果较少，至今尚未有再生转基因植株的报道[1]．我们在PEG法转化甘蓝获得转基因植株的基础上，结合PEG法使用转化脂介导转化甘蓝原生质体获得转化植株，为甘蓝在原生质体水平上进行有用基因的遗传转化奠定了基础．

1 材料和方法

1.1 植物材料

无菌苗体系的建立 供试的甘蓝品种为主栽品种“夏光甘蓝”，种子来源于上海蔬菜种子供应站．甘蓝种子经流水冲洗10～12 h后，于70%乙醇中浸泡30 s，再以含5%有效氯的消洁灵溶液表面灭菌30 min，用无菌水洗涤1次后，于0.1%的$HgCl_2$溶液中处理5～7 min，无菌水漂洗干净后，播种于不含任何激素的MS_0固体培养基上，于黑暗中萌发3 d后，移于光下，取萌发6 d的无菌苗下胚轴作为游离原生质体的材料．

1.2 原生质体的分离和培养

在分离原生质体过程中，所用的酶液组成为：2%纤维素酶(Cellulase Onozuka R-10)，0.3%离析酶(Macerozyme Onozuka R-10)，3 mmol/L MES，溶于附加9%甘露醇的改良的CPW盐溶液(CPW-9M)中．原生质体的培养采用液体浅层法，基本培养基为K8p培养基，附加0.4 mol/L葡萄糖、1.5 mg/L BA、0.5 mg/L NAA和0.5 mg/L 2, 4-D．在培养过程中，愈伤组织的增殖和分化培养基分别为MS+1.5 mg/L BA+0.2 mg/L 2, 4-D和MS+2.0 mg/L ZT+1.0 mg/L BA，分化芽生根培养基为1/2MS+0.5 mg/L的IBA．

1995-03-25收稿，1995-07-12收修改稿

1) 薛红卫，卫志明，许智宏．甘蓝的原生质体培养及其遗传转化．植物学通报，1996(待发表)

1.3 转化质粒

所用质粒为 pBI222/DH5α. 质粒片段长度为 4.8 kb, 含有 CaMV35S 启动子, hpt (hygromycin phosphotransferase, 潮霉素磷酸转移酶) 基因. 所用质粒的提取和纯化方法按分子克隆实验指南中的方法进行, 经 $CsCl_2$ 密度梯度超离心纯化后的质粒 DNA 分子经灭菌后, 溶解于 TE 缓冲液中, 其终浓度为 1 mg/mL.

1.4 转化步骤

(1) 将洗涤纯化后的原生质体悬浮至含有 15 mmol/L $CaCl_2$, 3 mmol/L MES 的 0.4 mol/L 甘露醇 (pH5.6) 的洗涤溶液中, 离心 (400 ～ 500 r/min, 5 min) 后调整原生质体密度为 2×10^6 个/mL.

(2) 将转化脂 (Lipofectin™ Reagent, BRL) 用双蒸水稀释至 50 μL (0.4 μg/μL), 与质粒 DNA 分子 50 μL (1 μg/μL) 混合, 于室温下放置 10 ～ 20 min, 使其形成转化脂: DNA 复合物.

(3) 取出 0.5 mL 原生质体悬浮液, 在室温下加入 100 μL 转化脂: DNA 复合物, 混匀后室温放置 10 min, 然后 (a) 于 28℃ (或 37℃) 下孵育 2 (或 6) h; (b) 加入 30%PEG (MW 为 6 000, 溶解于 0.4 mol/L 甘露醇, 0.1 mol/L 的 $Ca(NO_3)_2$, 3 mmol/L 的 MES 中, pH5.8) 溶液至终浓度为 12%, 在室温下静置处理不同的时间 (10, 15, 20, 30 min) 后用含有 0.3 mol/L 甘露醇的 0.2 mol/L $CaCl_2$ 溶液慢慢稀释至 10 mL.

(4) 离心 (500 r/min, 3 min) 收集原生质体, 用培养基洗涤一次后进行液体浅层培养.

1.5 转化后抗性愈伤组织的筛选及抗性植株的再生

在培养后 7 ～ 10 d 时加入 20 μg/mL 的 Hyp 进行筛选, 所形成的愈伤组织转入扩增培养基进行扩增, 待愈伤组织长至 3 ～ 5 mm 大小时, 转入分化培养基, 待分化成芽后, 切取芽于生根培养基中诱导生根以形成完整转化植株.

1.6 转化植株的检测

植物 DNA 经 BamH I 酶切后, 在 0.8% 的琼脂糖凝胶上电泳过夜, 然后转移至尼龙膜 Hybond™-N^+ 上, 以 BamHI 酶切 pBI222 质粒产生的 hpt 基因作探针, 进行 Southern blotting 分析.

2 结果与讨论

2.1 转化脂: DNA 复合物的形成

转化脂主要由强正电荷的 N-[1-(2, 3-dioleyloxy) propyl] N, N, N-trimethylammonium chloride (DOTMA) 组成, 借助于 DOTMA 的强正电荷, 转化脂可与带负电荷的 DNA 分子自发地形成复合物, 由于转化脂与 DNA 形成的复合物与动植物细胞膜的结构相似, 从而可高效地转化动、植物细胞, 并在一定程度上避免了嵌合体现象的出现, 较之外植体水平上的转化 (如叶盘法等) 具有更大的优越性.

转化脂与 DNA 的结合是按一定比例进行的, 在不同的报道中, 对于转化脂的使用量以及与质粒 DNA 的比例均有不同, 而这可能依赖于所用的载体及细胞类型. 由于我们在以往的实验中, 发现对于每 10^6 的甘蓝下胚轴原生质体, 50 μg 的质粒 DNA 是最适的用量[1], 因此我们在实验中仍旧选用 50 μg 的质粒 DNA 分子进行转化; 同时由于脂质体对于原生质体具有一定的毒性作用 (对此不同的报道有不同的看法: 甘苏生 (1987) 认为 3×10^6 的原生质体与 1 ～

2 μmol 的脂质体混合为最适，否则过多的脂质体会引起原生质体的破碎；Sporlein 等 (1991) 则认为，对于 2×10^5 的原生质体，以 60 μg/mL 为最适)，在我们的实验中，发现对于每 10^5 的原生质体，当转化脂的量超过 20 μg 时，易引起原生质体破碎，当使用量超过 50 μg 时，原生质体几乎全部破碎，因此对于甘蓝原生质体，20 μg 可能是较适的用量．一般而言，当转化脂与质粒 DNA 混合超过 10 min 后，均可自发形成转化脂:DNA 复合物．

2.2 影响转化的因素

有些报道认为在加入转化脂后，PEG(或/和 PVA) 与 Ca^{2+} 的处理是必需的；而有些报道则认为没有 PEG 的处理同样可导致外源 DNA 分子的转化．我们在 28℃ 和 37℃ 下，分别对加有转化脂的原生质体进行了 2 和 6 h 的孵育处理(未加 PEG)，在以后的培养中，发现原生质体破碎较多且没有抗性克隆的出现；而采用 PEG 处理 (结合 Ca^{2+}) 的原生质体能够出现抗性克隆直至愈伤组织，因此，对于甘蓝原生质体，我们认为 PEG 的处理是必需的．

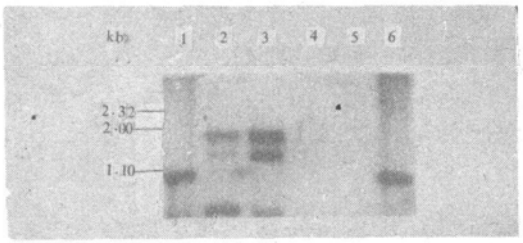


图 1 转化植株的 Southern blotting 分析
所用探针质粒 pBI222 经 BamHI 酶切后产生的 hpt 基因片段(泳道 1.6 1.1 kb)，植物 DNA 经 BamHI 酶切(泳道 2)，未经转化植株对照(泳道 4)

在 PEG 的处理时间上也存在有一定的差异，一般从 10 ～ 30 min 不等．我们在实验中发现，过长时间 (>15 min) 的 PEG 处理易导致原生质体的破碎，因此，一般以 10 ～ 15 min 为宜．

在 PEG 的处理浓度上也有不同的报道，Hussain 等 (1985) 采用 30% 的 PEG[2]，朱祯等 (1992) 采用 13.5% 的 PEG，而 Rouze 等 (1983) 则采用 15% ～ 20% 的 PEG，并且认为当 PEG 浓度为 20% ～ 35% 时，植板率会降低[3]．我们在实验中发现了类似的情况，对于甘蓝原生质体，当 PEG 浓度超过 20% 时，原生质体的破碎急剧增加，因此我们一般使用的终浓度为 10% ～ 12%．

2.3 抗性愈伤的形成及转基因植株的再生

转化后的原生质体进行培养后，一般于 4 个星期左右可形成抗性愈伤组织，将抗性愈伤组织转至含有潮霉素 (Hyp) 20 mg/L 的扩增培养基上 (MS + 1.5 mg/L BA + 0.2 mg/L 2,4-D) 进行扩增；一个月左右后，当小愈伤组织长至 5 mm 大小时，即可将愈伤组织转至分化培养基上 (MS + 2 mg/L BA + 1 mg/L ZT, 附加 Hyp20 mg/L) 进行芽的分化，6 个星期左右可以分化出芽，将芽切下，置于生根培养基中 (1/2 MS + 0.5 mg/L IBA, 附加 Hyp20 mg/L)，一定时间内可生根形成完整转化植株．

对再生植株，以 hpt 基因作探针，对植物总 DNA 进行 Southern blotting 分析，结果(图 1)证实外源基因已插入到甘蓝植物细胞的基因组中，对这些转化植株后代的分析工作正在进行之中．

参 考 文 献

1 薛红卫，卫志明，许智宏．影响甘蓝下胚轴原生质体转化的因素．植物生理学通讯，1994, 30(4): 249～255
2 Hussain M M, Melcher U, Essenberg R C. Infection of evacuolated turnip protoplasts with liposome-packaged cauliflower mosaio virus. Plant Cell Rep, 1985, 4: 58～62
3 Rouze P, Deshayes A, Caboche M. Use of liposomes for the transfer of nuoleic acids: optimization of the method for tobacco mesophyll protoplasts with tobacco mosaic virus RNA. Plant Sci Lett, 1983, 31: 55～64