

GFP 基因在棉花转化中的应用

黄国存¹, 张寒霜², 高鹏², 李俊兰², 朱生伟¹, 孙敬三¹

(1. 中国科学院植物研究所, 北京 100093 2. 河北省农林科学院棉花研究所, 石家庄 050051)

摘要:以绿色荧光蛋白 GFP 基因为报道基因, 用花粉管通道和农杆菌介导的转化方法将外源基因导入棉花 (*Gossypium hirsutum* L.), 分别获得转化幼胚、幼苗和转化愈伤组织。用手持紫外灯结合显微镜检术能够快速地对转化子进行活体筛选鉴定, 比用 GUS 检测方法有明显的优越性。本研究不但为花粉管通道转化法的可行性提供了新的证据, 同时也建立了 GFP 用于棉花基因工程研究的检测技术体系。

关键词: 绿色荧光蛋白, 花粉管通道, 棉花, 报道基因, 转化

中图分类号: Q785 文献标识码: A 文章编号: 0253-977X(2001)02-0131-04

The Use of Green Fluorescent Protein Gene in Cotton Transformation

HUANG Guo-cun¹, ZHANG Han-shuang², GAO Peng²,
LI Jun-lan², ZHU Sheng-wei¹, SUN Jing-san¹

(1. Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China;

2. Institute of Cotton, Hebei Academy of Agricultural and Forestry Sciences, Shijiazhuang 050051, China)

Abstract: With the Green Fluorescent Protein gene (GFP) as a reporter gene, the transgenic embryos, seedlings and calli of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) were obtained by the method of pollen tube pathway and Agrobacterium-mediated techniques separately. The GFP gene under the control of the 35S Cauliflower Mosaic Virus promoter produced bright green fluorescence easily detectable and screenable in cotton tissue by fluorescence microscopy and a hand-held ultraviolet lamp. The screenable marker aided and facilitated the rapid segregation of individual transformation events, drastically reduced the quantity of tissue to be handled. The GFP can be screened in vivo without destroying the materials, so it is more practical and useful than GUS. The use of GFP could advance the development of cotton gene engineering.

Key words: green fluorescent protein (GFP); pollen tube pathway; cotton; reporter gene; transformation

花粉管通道 (pollen tube pathway) 转化法是周光宇提出 DNA 片段杂交理论之后设计的将自花授粉后外源 DNA 导入植物的转基因技术。棉花胚珠在授粉之前珠心是一个封闭的体系, 授粉之后从珠孔到胚囊的一些珠心细胞退化形成一条能让花粉管通过的通道细胞, 以利于花粉管进入胚囊。外源 DNA 可以从这个通道进入胚囊参与到受精前后的卵细胞

中去。

在转基因植物研究中, 过去用过的几个报道基因其产物都属于蛋白酶, 检测时需加入相应的底物, 再通过不同的生化手段获得基因表达的信息。另外, 这些检测方法一般都对植物材料有破坏性, 不能进行活体检测。人们迫切需要一种检测操作简单, 能活体观察, 又不需任何外源底物或辅助因子的报

收稿日期: 2000-04-17; 修回日期: 2000-11-03

基金项目: 国家九五攻关项目; 本文为第一作者博士学位论文的一部分。

作者简介: 黄国存 (1967-) 男, 博士, 主要从事植物基因工程研究工作。孙敬三 (1937-) 河北冀州人, 研究员, 博导, 通讯联系人。电话: 010-62591431-6236。

道基因,而克隆于海洋动物水母(*Aequorea victoria*)体内的绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)基因就能满足以上要求,它作为一种新颖的非酶性报道基因正引起人们的广泛兴趣^[1]。由于 GFP 含有特殊的六肽生色团结构,所以当用蓝紫光照射激发时能发出肉眼清晰可见的绿色荧光,无需任何底物或辅助因子。GFP 基因也能耐受氨基末端融合而保持其天然蛋白的活性,它在研究植物亚细胞定位、植物与微生物的关系和信号传导方面都有广泛的应用,而它作为有效的报道基因用于植物的遗传转化比蛋白酶报道基因更为快捷方便。GFP 用于水稻^[2]、小麦^[3]、玉米^[4]、甘蔗^[5]等作物的转化已有报道,我们试图将 GFP 基因用花粉管通道法转入棉花,从而为该转化方法提供新的证据,同时对 GFP 在农杆菌介导的遗传转化中的应用也进行了探讨。

1 材料与方 法

1.1 实验材料

棉花(*Gossypium hirsutum* L.)品种“93-2”和“89-30”用于农杆菌转化实验;“冀 123”用于花粉管通道法转化实验。“冀 123”四月下旬播种,于七月下旬至八月上旬大田盛花期进行花粉管途径转化。

供试质粒 pBIN35S CaM-mGFP4 DNA 用于花粉管通道法转化;然后将此质粒用氯化钙法转入到 LBA4404 菌株中得到双元载体,用于棉花幼苗下胚轴的农杆菌转化。

1.2 实验方法

1.2.1 棉花无菌苗的获得 棉花种子经硫酸脱绒、75% 酒精表面灭菌和 HgCl₂ 消毒后,浸于无菌水中直到露白,剥去外壳后,将棉仁播于固化培养基上,置于 28℃ 下培养 5~6 天。

1.2.2 农杆菌转化 取生长 5~6 天光照下培养的棉花无菌苗下胚轴,剪成 0.5cm 左右的切段,用农杆菌菌液浸染,培养 48h 后转入诱导培养基(MS 无机元素 + B5 有机元素,IAA、2,4-D、KT 各 0.1mg/L)上培养。

1.2.3 花粉管通道转化 质粒 DNA 提取纯化后按 Zhou 等人^[6]的方法注射授粉 24h 左右的棉花子房。由于棉花子房较大,并且含有多个心皮和胎座,适合于花粉管通道转化操作。注射 DNA 时,要选择长势健壮的植株,尽量减轻操作对子房的机械损伤,注射针头要细,插入不能太深。实验最好在早晨温

度较低时进行。

1.2.4 GFP 的荧光检测 经花粉管途径转化的后代,一部分直接用荧光显微镜检测发育 12~16 天的幼胚,一部分留待收获成熟的种子,然后按 1.2.1 的方法得到黄化苗,检测时先用手持紫外灯初步筛选,再用荧光显微镜进一步检测。经农杆菌转化的愈伤组织也用同样方法检测。荧光显微镜为 Olympus New Vanox-T AH-2 型,用蓝光激发。

1.2.5 GFP 的 PCR 检测 两侧引物为:

5'端引物 5' - ATGGTGAGCAAGGGCCAGGA
G - 3'

3'端引物 5' - TTACTIONGTACAGCTCGTCCA
T - 3'

1.2.6 GUS 的检测 按 Jefferson 等人^[7]的方法进行。

1.2.7 转化植株的 Southern 杂交 按宝灵曼公司提供的地高辛标记试剂盒进行。

2 结 果

2.1 用花粉管通道法将 GFP 基因转入棉花

两年的实验结铃率都在 30%~40%,结铃率的高低和不同棉花品种及气候有关。从表 1 可以看出,经过外源 DNA 子房注射后无论幼胚或幼苗,都检出了 GFP 阳性转化后代,转化率分别为 0.7% 和 1.0%。GFP 绿色荧光在棉花幼胚中清晰可见,而未转化幼胚在蓝光激发下发出红色荧光(图 1),两者幼胚外观无明显差异,在可见光下都为乳白色。转化幼苗在手持紫外灯照射下也发出绿色荧光^[8],其下胚轴横切面也和对照存在明显差异(图 2)。GFP 在叶片中表达较弱,只在维管束中绿色荧光比较明显,叶肉细胞则发出黄色荧光,而对照材料整个叶片呈现红色荧光。DNA 杂交结果进一步说明外源基因已整合进入后代基因组中(图 3)。

表 1 以 GFP 为标记用花粉管途径
对棉花转化后的检测结果

Table 1 The detected result of the transformants by the pollen tube pathway method with GFP as a marker

材料 Materials	检测数目 Detected No.	转化数目 Transformed No.	转化率 Transforming frequency
幼胚 Young embryos	950	7	0.7%
种子 Seeds	200	2	1.0%

2.2 GFP 在农杆菌介导的转化愈伤组织中的表达

从表 2 中看出,无论质粒中含有 GUS 还是 GFP 基因,只有 93-2 品种获得了阳性愈伤,说明转化效果存在基因型差异。GFP 也与 GUS 一样作为报道基

因用于农杆菌介导的棉花转化。转化的愈伤组织块及胚性愈伤细胞在蓝光激发下发出绿色荧光,而未转化愈伤组织在蓝光激发下发出黄色或红色荧光。PCR 结果进一步验证了转化结果的真实性。

表 2 带有不同报道基因 GFP 或 GUS 的农杆菌对棉花下胚轴转化的结果

Table 2 The result of transforming cotton hypocotyl explants with Agro-bacterials bearing GFP or GUS

质粒 Plasmid	棉花品种 Cotton variety	接种外植体数 Explants NO.	出愈块数 Calli NO.	阳性愈伤 Transformed NO.
PBI121 - GUS	93 - 2	245	34	2
PBI121 - GUS	89 - 10	210	50	0
PBIN - mGFP4	93 - 2	301	21	4
PBIN - mGFP4	89 - 30	336	44	0

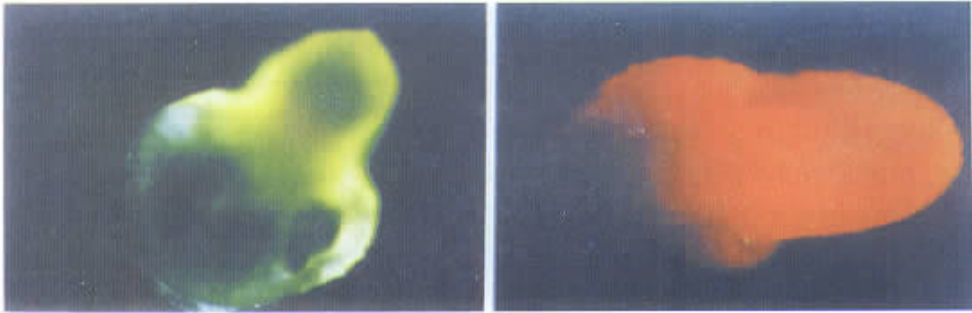


图 1 转化棉花幼胚(左)和对照幼胚(右)在蓝光激发下分别发出绿色和红色荧光

Fig.1 The green fluorescence of a transformed young embryo(left) and red fluorescence of control one(right) with microscopy

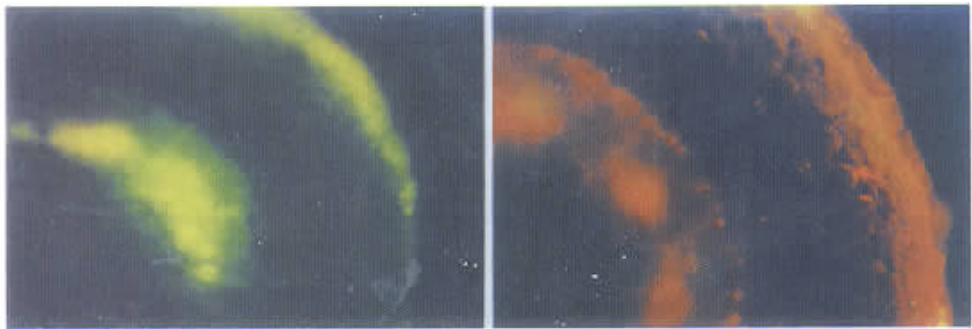


图 2 转化棉花幼苗(左)和对照幼苗(右)横切面在蓝光激发下分别发出绿色和红色荧光

Fig.2 The green fluorescence of a transformed seedling hypocotyl cross section(left) and red fluorescence of control one(right) with microscopy

3 讨论

作为理想的报道基因,一般认为必需满足以下条件(1)受体植物中不含有内在的该报道基因产物(2)基因产物容易定量而且对底物高度敏感(3)作为融合蛋白时也能正常表达并且保持其活性(4)检测时无背景干扰。在研究中曾用过的报道基因有 β -半乳糖苷酶^[9]、胭脂碱合成酶^[10]、章鱼碱合成

酶^[11]、氯霉素乙酰转移酶(CAT)^[12]、新酶素乙酰转移酶(NPTII)^[13]、荧光素酶(LUX)^[14]和 β -葡萄糖苷酶(GUS)^[7]等。由于高等植物中含有很高的内源 β -半乳糖苷酶活性,所以这一报道基因并没得到广泛应用。虽然植物中不存在内源胭脂碱合成酶和章鱼碱合成酶,但由于这两种报道基因检测繁琐,不能定位定量,而且后者不能耐受氨基末端融合,也限制了二者的应用。CAT和NPTII比较符合理想报

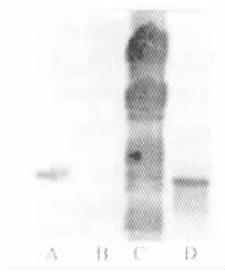


图 3 转化植株的 Southern blotting 分析

A. 转化植株的 DNA 双酶切 GFP 片段 ; B. 对照 ;
C. 标准分子量 DNA ; D. 质粒的双酶切 GFP 片段

Fig. 3 The result of Southern blotting on the transformed seedling

A. total DNA of transformants by two enzymes ; B. control ; C. DNA marker ; D. plasmid *GFP* fragments digested by two enzymes.

道基因的要求,但由于植物中酯酶、磷酸酶和转移酶等催化的竞争反应的影响,降低了报道基因产物的敏感性,也不能准确定量。LUX 检测时需向实验材料内渗入荧光素,由于其基因产物会在过氧化物酶体中积累和外加荧光素能够在维管束中运输,所以在检测整株植物时,荧光产生部位或荧光强度不一定反映 LUX 表达部位或强弱程度,而且该酶稳定性差,催化反应复杂,也没引起广泛重视。GUS 既可以组化定位,又可以荧光测定,是目前常用的报道基因,但由于 GUS 来源于细菌,检测时需要严格的无菌条件,其催化底物 X-Gluc 价格昂贵,再加上植物细胞其他因素的影响以及有些植物材料本身也具有内源 GUS 活性等,随着研究的不断深入,GUS 作为报道基因也逐渐显露出其缺点和不足。GFP 作为报道基因克服了以上众多报道基因的缺点,检测时它不需要任何底物,无须作任何处理,可以活体检测,而且能快速得到转化结果。

对转化后代的筛选鉴定是基因工程的重要组成部分。虽然目的基因中一般含有筛选标记,例如 NPTII,但有些植物对此并不敏感。需借助于报道基因例如 GUS 等进一步验证,检测时应逐棵取样,再经保温、脱色、固定等繁琐步骤,如果转化后代群体较大,获得上百棵或千棵植株,按目前的检测方法,其工作量可想而知。如果以 GFP 为标记,对转化后代的检测会变得轻松快捷。只需用长紫外光源在黑暗中照射幼苗,阳性植株能发出绿色荧光,而对照则发出红色荧光,这样在几分钟内转化与未转化的后代一目了然。在幼苗中检测 GFP 时,苗龄越小,苗子越嫩,GFP 荧光越明显,黄化苗绿色荧光强于绿

苗。虽然植物中不含有 GFP,但细胞壁成分中含有木质素,在蓝光激发下也能发出类似 GFP 的绿色荧光,这种背景荧光较弱,能和 GFP 荧光区分开来;如果 GFP 表达较弱,又存在较强的背景荧光,加入甲苯胺盐可能对消除背景荧光有一定作用^[4]。

参考文献 (References):

- [1] Leffel S M, Mabon S A, Stewart C N. Application of green fluorescent protein in plants [J]. *BioTechniques*, 1997, 23: 912 ~ 918.
- [2] Vain P, Worland B, Kohli A, et al. The green fluorescent protein (GFP) as a vital screenable marker in rice transformation [J]. *Theor Appl Genet*, 1998, 96: 164 ~ 169.
- [3] Pang S, Debover D L, Wan Y, et al. An improved green fluorescent protein gene as a vital marker in plant [J]. *Plant Physiol*, 1996, 112: 893 ~ 900.
- [4] Geest A M, Petolino J F. Expression of a modified green fluorescent protein gene in transgenic maize plants and progeny [J]. *Plant Cell Report*, 1998, 17: 760 ~ 764.
- [5] Elliott A R, Campbell J A, Brettell R S, et al. Agrobacterium-mediated transformation of sugarcane using GFP as a screenable marker [J]. *Aust. J. Plant Physiol*, 1998, 25: 739 ~ 743.
- [6] Zhou G, Weng J, Zeng Y, et al. Introduction of exogenous DNA into cotton embryos [J]. *Methods Enzymol*, 1983, 101: 433 ~ 481.
- [7] Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W. GUS fusions: ? - glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants [J]. *The EMBO Journal*, 1987, 6: 3901 ~ 3907.
- [8] Huang G, Dong Y, Sun J. Introduction of exogenous DNA into cotton via the pollen-tube pathway with GFP as a reporter [J]. *Chinese Science Bulletin*, 1999, 44(8): 698 ~ 701.
- [9] Helmer G, Casadaban M, Bevan M W, et al. A new chimeric gene as a marker for plant transformation: the expression of *Escherichia coli* β -galactosidase in sunflower and tobacco cells [J]. *Biotechnology*, 1984, 2: 520 ~ 527.
- [10] Depicker A, Stachel S, Dhaese P, et al. Nopaline synthase: transcript mapping and DNA sequence [J]. *J Mol Appl Genet*, 1982, 1: 561 ~ 575.
- [11] Degreve H, Dhaese P, Seurinck J, et al. Nucleotide sequence and transcript map of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti plasmid-encoded octopine synthase gene [J]. *J Mol Appl Genet*, 1982, 1: 499 ~ 513.
- [12] Bevan M W, Flavell R B, Chilton M D. A chimaeric antibiotic gene as a selectable marker for plant cell transformation [J]. *Nature*, 1983, 304: 184 ~ 187.
- [13] Herrera-Estrella L, Depicker A, Van Montagu M, et al. Expression of chimaeric genes transferred into plant cells using a Ti-plasmid-derived vector [J]. *Nature*, 1983, 303: 209 ~ 213.
- [14] Ow D W, Wood K V, Deluca M, et al. Transient and stable expression of the firefly luciferase gene in plant cells and transgenic plants [J]. *Science*, 1986, 234: 856 ~ 859.