

## 离子注入法将外源 DNA 直接导入小麦的研究

吴丽芳<sup>1</sup>, 尹若春<sup>2</sup>, 谷运红<sup>1</sup>, 吴李君<sup>1</sup>, 余增亮<sup>1</sup>

(1. 中国科学院等离子体物理研究所离子束生物工程学实验室, 安徽 合肥 230031;

2. 安徽大学生命科学学院生物技术系, 安徽 合肥 230039)

**摘要:** 通过离子束介导法将外源 GUS 基因直接导入小麦成熟种子。组织化学染色结果表明: GUS 基因的瞬时表达率可以达到 70% 以上。当代(R<sub>0</sub>)PCR 分析结果表明, 阳性植株的频率与离子注入剂量有关, 适宜的注入剂量为  $7 \times 10^6$  离子/cm<sup>2</sup>。PCR-Southern 和 Southern Blot 分析结果表明外源基因已整合到小麦基因组中, 说明离子束介导外源 DNA 直接导入小麦是可行的。另外还探讨了用离子束介导创造小麦边缘分子杂种的可能性。

**关键词:** 离子注入; GUS 基因; 小麦; 直接导入; 成熟种子

**中图分类号:** Q691.5 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-6737(2001)04-0724-07

现有的遗传转化技术大多依赖于组织培养技术, 但小麦原生质体体系、悬浮细胞系和胚性细胞系的建立比其它作物要困难得多, 且与产量、品质有关的多为数量性状, 相关基因较难克隆, 因而限制了小麦转基因研究的发展。余增亮等人的研究表明: 低能离子束注入植物组织后, 由于溅射作用能够对植物组织和细胞产生刻蚀, 使细胞壁产生局部穿孔, 改变细胞膜透性, 便于外源 DNA 进入细胞<sup>[1]</sup>。根据这一原理, 杨剑波等将潮霉素抗性基因导入水稻成熟胚, 在经过含有潮霉素培养基的筛选培养后, 获得了抗性再生苗<sup>[2]</sup>。作者也建立了离子束介导的小麦成熟胚转化体系<sup>[3]</sup>。

如果能用离子束介导法, 将带有有利用价值的目的基因的野生小麦或远缘物种的 DNA 向小麦进行转移, 对于扩大小麦的遗传基础, 获得丰富的品质资源具有重要意义。本文用广泛使用的报告基因 GUS 基因为供体, 以小麦成熟种子为受体, 研究 GUS 基因在小麦基因组中的整合与表达情况, 探讨离子束介导小麦成熟种子直接转化获得转化植株的可行性。

## 1 材料与方 法

### 1.1 植物材料

三个小麦品种, 皖 9210, 扬麦 5 号, 皖麦 32 号。

### 1.2 质粒

pCAMBIA1301(图 1) 在大肠杆菌 *E. coli* DH5 $\alpha$  中扩增, 该质粒含有潮霉素 (hygromycin) 抗性基因 HPT 基因和 GUS 报告基因, 其中 GUS 基因编码区有一个能在植物中特异表达的内含子, 使 GUS 基因不能在细菌中表达<sup>[4]</sup>。

收稿日期: 2001-05-14

基金项目: 国家重点科技攻关项目(96-538-02-01)资助课题, 安徽省自然科学基金资助项目(99047640)

作者简介: 吴丽芳, 副研究员, 博士, 电话: (0551)5591382, E-mail: lfwu@mail.ipp.ac.cn.

### 1.3 发芽率和存活率测定

经注入的种子连同对照在垫有湿滤纸的培养皿中,置22℃光照培养箱中发芽。有绿色芽点生成的即被认为是发芽种子,7天后统计发芽率。小麦幼苗长至5~8cm高时,移入田间,4~5周后进行存活率统计,以可发育至三叶期以上的幼苗数作为存活率统计标准。

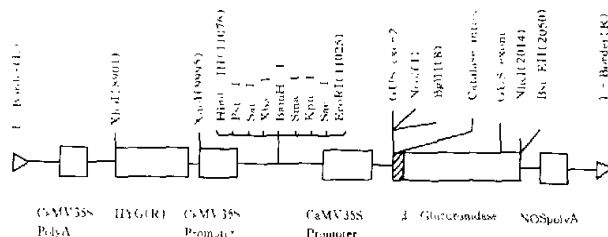


Fig.1 Map of the plasmid pCAMBIA1301

### 1.4 DNA提取

质粒DNA的提取参照《分子克隆实验指南》<sup>[5]</sup>,PEG法纯化,紫外分光光度仪测定 $OD_{260}/OD_{280} = 1.8 \pm 0.02$ ,计算浓度,用 $0.1 \times SSC$  ( $15 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1} \text{ NaCl}, 1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  柠檬酸钠,  $\text{pH}7.0$ )缓冲液稀释至1.作浓度备用。

小麦基因组DNA提取参照卢扬江等的方法<sup>[6]</sup>。叶片DNA微量提取在1.5ml微量离心管中进行。再生苗大量DNA提取时,取叶片0.2~0.5克于无菌研钵中磨碎后加提取液提取。DNA溶解于 $\text{ddH}_2\text{O}$ ,紫外分光光度仪测定浓度。

### 1.5 离子注入处理

将小麦种子消毒后,胚部向上均匀排列于无菌培养皿中,在超净台中吹干,接受能量为30keV的氩离子( $\text{Ar}^{+}$ )束的脉冲式注入处理,处理完成后立即浸入含有质粒pCAMBIA1301 ( $80 \mu\text{g}/\text{ml}$ )的 $0.1 \times SSC$ 导入介质中,26℃温育16小时,种子用 $0.1 \times SSC$ 溶液冲洗3次,无菌滤纸吸干残液,接种到0.6%的琼脂培养基上发芽。设两组对照,一组是将100粒种子置于离子束注入环境中,不接受离子注入处理,浸入含质粒DNA的导入介质中温育(CK1);另一组对照是将100粒种子接受和处理相同的离子束处理,然后浸入不含质粒DNA的导入介质中温育(CK2),对照的其它操作均和处理相同。

### 1.6 GUS组织化学染色

参照Jefferson等<sup>[7]</sup>的方法。

### 1.7 PCR检测

PCR反应引物为gusp1:5'-GGGATCCATCGCAGCGTAATG-3',gusp2:5'-GCCGACAGCAGCAGTTTCATC-3',引物分别与质粒pCAMBIA1301上GUS基因编码链和反义链互补,PCR扩增出563bp的片段,以质粒pCAMBIA1301为阳性对照,以未转化小麦基因组DNA为阴性对照。PCR反应系统包括: $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  Tris.Cl( $\text{pH}8.4$ ), $50 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  KCl, $1.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$   $\text{MgCl}_2$ , $0.2 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$  dNTPs,100ng小麦总DNA(或10ng质粒DNA),2unit Taq DNA聚合酶。反应总体积30 $\mu\text{l}$ ,反应条件:(a)94℃,2min,

(b)94°C 45s, 55°C 45s, 72°C 1min, 30个循环; (c)72°C, 10min。反应结束后取 10 $\mu$ l 扩增产物于 1% 琼脂糖凝胶电泳分析。

### 1.8 植株的 PCR-Southern 及 Southern 杂交检测

参照《分子克隆实验指南》<sup>[1]</sup>, 提取 PCR 阳性植株的基因组 DNA, 用 EcoRI 37°C 酶切过夜, 于 0.8% 琼脂糖凝胶电泳分离, 采用毛细管转移法转移至尼龙膜, BamHI/SacI 双酶切质粒 pBI121 回收 GUS 基因片段为模板, 地高辛随机引物标记为杂交探针。杂交方法参照地高辛标记及检测试剂盒(Boehringer Mannheim 公司)使用手册。

## 2 结果与分析

### 2.1 注入剂量与种子发芽率和存活率的关系

注入剂量是离子束介导转基因中的最重要的物理参数之一, 用能量为 30keV, 剂量为 0-10 $\times 10^6$  离子/cm<sup>2</sup> 的 Ar<sup>+</sup> 对三个小麦栽培品种皖 9210, 皖麦 32 和扬麦 5 号进行了注入试验。图 2 和图 3 显示注入剂量与发芽率和存活率的关系。由图可知, 在低剂量范围内, 离子注入并未引起发芽率和存活率明显降低, 甚至还略有升高。但当剂量达到 4 $\times 10^6$  离子/cm<sup>2</sup> 后, 皖 9210 的发芽率与注入剂量呈显的负相关, 而其存活率在更低的剂量下就表现出相同的趋势; 皖麦 32 发芽率和存活率由基本保持不变到开始急剧下降的临界剂量是 6 $\times 10^6$  离子/cm<sup>2</sup>; 扬麦 5 号的临界剂量则分别是 6 $\times 10^6$  离子/cm<sup>2</sup> 和 4 $\times 10^6$  离子/cm<sup>2</sup>。由此可见, 不同基因型的品种的离子注入的剂量效应是不同的。

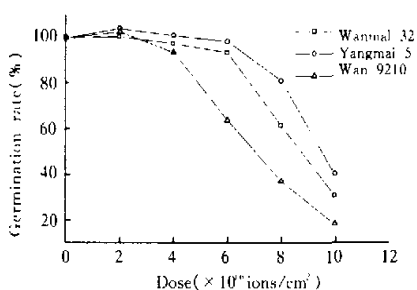


Fig.2 Changes in the germination rate of wheat seeds exposed to ion Beams

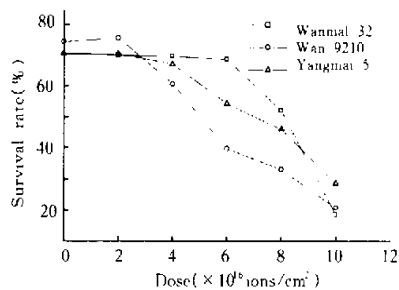


Fig.3 Changes in the survival rate of wheat seeds exposed to ion Beams

### 2.2 GUS 基因转化植株的获得

根据发芽率和存活率试验结果, 选用农艺性状较好, 但对离子注入处理较为敏感的小麦品种皖 9210 进行进一步的转化试验。将处理和对照随机平均分成两份, 进行两种不同的处理: 一组进行组织化学染色, 另一组是 DNA 处理后直接发芽, 三叶期时剪取部分幼苗叶片, 微量提取叶片 DNA, 进行分子检测。

#### 2.2.1 GUS 基因转化种子的组织化学检测

经处理的小麦种子在 0.6% 琼脂培养基上培养一天左右的时间, 即在转化 24 小时后进行 GUS 基因的组织化学染色。注入离子剂量与 GUS 阳性种子表达率的关系见表 1。可以看出: 不同处理剂量下, 表达 GUS 基因特有的蓝色反应的种子比率不同, 随着注入剂量的增加, GUS 基因的表达率有增加的趋势, 但当注入剂量过高时, 表达率又会明显下降。注入剂量为

**Table 1** The results of histochemical staining assay of Wan9210

Dose(ions/cm <sup>2</sup> )	No. of seeds detected	No. of positive	Expression rate of GUS
4 × 10 <sup>6</sup>	63	7	11.1
6 × 10 <sup>6</sup>	71	28	39.4
7 × 10 <sup>6</sup>	51	36	70.6
8 × 10 <sup>6</sup>	80	57	71.3
10 × 10 <sup>6</sup>	72	15	20.8

7 × 10<sup>6</sup> - 8 × 10<sup>6</sup> 离子/cm<sup>2</sup> 时 GUS 基因表达率最高。而对照 CK1 和 CK2 都未表现出阳性反应(表 1 中未列出)。图 4 是 GUS 组织化学染色的结果,对照(左)均未表现出特有的蓝色反应(胚部呈浅色),而部分经注入和 DNA 转化处理的种子(右)显示出蓝色反应(胚部呈深色)。

**Fig.4** Transient expression of GUS gene in wheat seeds (left: check, right: treatment)

### 2.2.2 R<sub>0</sub> 代的分子检测

对 R<sub>0</sub> 代幼苗基因组 DNA 进行 PCR 扩

**Table 2** Results of PCR assays

Dose (× 10 <sup>6</sup> ions/cm <sup>2</sup> )	No. of seeds Detected	No of seedlings/ Survival rate	No. of positive plants/ positive plant frequency
4	63	38/60.3	1/1.6
6	71	28/39.4	2/2.8
7	51	18/35.2	2/3.9
8	80	23/28.8	3/3.7
10	72	13/18.1	1/1.4

增,有部分植株扩增出与阳性对照相同的 563bp 的片段(图 5),阳性植株率最高的注入剂量与 GUS 基因表达率最高的注入剂量一致(表 2)。进一步的 Southern 杂交表明,扩增出的片段的确为 GUS 基因的一部分(图 6)。这一结果表明,通过离子注入介导,外源基因确实导入了小麦细胞中。选取部分经 PCR 检测为阳性的植株提取叶片 DNA,进行 Southern 检测(图 7),所测的 4 个阳性植株均显示出单一的杂交带,说明外源 GUS 基因已经整合到小麦基因组中,且插入基因为单拷贝的。

取 2 株在当代检测为阳性的转化植株的自交后代(R<sub>1</sub>),作 PCR 分析,得到的 GUS 基因阳性植株与阴性植株的分离比分别为:10:3 和 9:4,说明外源基因确实整合至小麦基因组中,且遗传给了后代。



Fig.5 PCR analysis of treated wheat plants (M:  $\lambda$ DNA/*Hind* III + *Eco*RI marker 1: positive check 2: negative check 3-7:  $R_0$  plants of treatment)

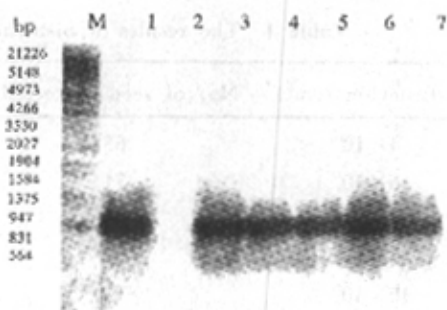


Fig.6 PCR - Southern analysis of  $R_0$  PCR positive plants (M:  $\lambda$ DNA/ *Hind* III + *Eco*RI marker 1: positive check, 2: negative check 3-7:  $R_0$  transformed plants)

### 3 讨 论

在以往有关的研究中,选用的离子注入能量一般为 25-30keV<sup>[2,8]</sup>。余增亮等人的研究表明,随着离子注入能量的增加,生物样品的刻蚀程度加深<sup>[9]</sup>,有利于形成微通道,便于外源基因进入细胞。因此,选用的能量不宜过低,否则会影响转化效果。本研究中用成熟种子作为受体,不同于以胚和悬浮细胞为受体的注入,种子的种皮是外源 DNA 导入的一个很大的屏障,适当提高注入离子能量是有利的。而过高的能量处理,诱变效果明显,易引起后代的不稳定<sup>[10,11]</sup>。因此,我们选用 30keV 作为介导外源 DNA 导入的注入能量,并研究了此能量下的不同注入剂量对小麦发芽率和存活率的影响,结果表明,不同基因型的品种对离子注入剂量的反应是不同的,适于外源 DNA 导入小麦品种皖 9210 的离子注入剂量为  $7 \times 10^6$  离子/cm<sup>2</sup>。

在研究中我们曾尝试去除胚部种皮以减少外源 DNA 进入胚细胞的障碍。在种子消毒后,用镊子撕去胚部种皮,使胚部能够直接接受离子注入。受到离子注入并经过 DNA 处理后的种子,一部分在无菌条件下发芽,待苗长至 5-8cm 后移栽到田间;另外一部分直接插入田间,5 周后统计存活率。发现在无菌条件下生长的剥皮种子的存活率,低于接受相同剂量注入的完整种子的存活率,高于直接插入田间的剥皮种子的存活率,是直接插入田间生长在有菌条件下剥皮种子存活率的 20 倍以上。而外源 GUS 基因的表达效果却与之相反,无菌条件下剥皮种子的有蓝色反应的个体的比例高于完整种子,看来胚部没有种皮的存在,离子注入刻蚀的效果

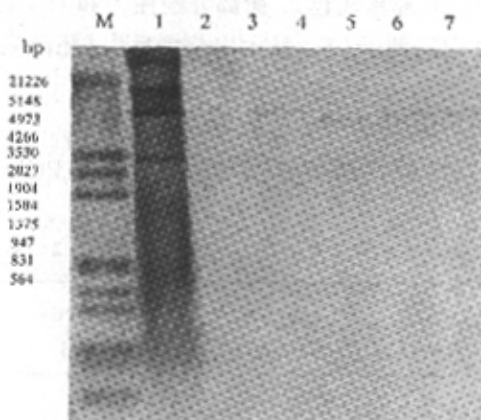


Fig.7 Southern blot analysis of  $R_0$  transformed plants (M:  $\lambda$ DNA/*Hind* III + *Eco*RI marker 1: positive check 2: negative check 3-6:  $R_0$  transformed plants)

是不同的。造成剥皮种子在自然土壤条件下存活率急剧下降的原因可能是完整的种皮为种胚提供了一个无菌的环境,保证了种子的正常发芽和生长。因此,在转化试验中,可采用较低的注入剂量对胚部剥皮种子进行注入处理,来改善外源基因的导入效果,在无菌条件下长成小苗后移入田间。

本研究表明,外源基因可以通过离子束介导进入小麦种胚细胞,实现瞬间表达。当代和子一代的 PCR 分析表明,外源基因已整合到小麦基因组中,并可遗传给后代。从当代 PCR 结果来看,阳性植株率最高可达 3.9%。本研究中两组对照都未获得转化株,说明转化后代的变化不是由于离子注入诱变引起的,离子束介导法与种子浸泡法<sup>[12]</sup>在本质上也是不同的。小麦被认为是最难转化成功的作物之一,这是因为小麦不仅原生质体培养和再生较困难,而且对农杆菌不敏感,限制了许多转基因方法的应用。目前,在小麦上应用最成功的是基因枪法,其转化率也仅为 0.1% - 2.5%<sup>[13]</sup>。

离子束介导的外源 DNA 直接导入小麦的技术,绕开了繁琐的组培过程,在小麦种子经离子注入并进行过 DNA 处理后,直接发芽成苗,获得转化植株,可以直接在后代中选择所需的性状,方法简便,易于在生产中推广。这种方法以小麦成熟种子为受体,取材不受季节和作物生长期的限制,是其它方法所不具备的优点。通过离子束介导将带有有实用价值的目的基因的外源基因组 DNA 直接导入技术,创造超远缘分子杂种,对于扩大小麦的遗传基础、丰富小麦种质资源和小麦分子育种是非常有意义的。

#### 参考文献:

- [1] Yu Zenghang, Deng Jianguo, He Jianjun. Mutation Breeding by ion implantation[J]. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*. 1991, B59/60:705 - 708.
- [2] 杨剑波, 吴李君, 吴家道, 等. 应用低能离子束介导法获得水稻转基因植株[J]. 科学通报, 1994, 39(16):1530 - 1534.
- [3] 吴丽芳, 李红, 宋道军, 等. 建立低能离子束介导小麦转基因方法并获得转 GUS 基因植株[J]. 遗传学报, 2000, 27(11):982 - 991.
- [4] Ohta S, Mita S, Hattori T, et al. Construction and expression in tobacco of a  $\beta$ -glucuronidase (GUS) reporter gene containing an intron within the coding sequence[J]. *Plant Cell Physiol*, 1990, 31:805 - 813.
- [5] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*[M], 2nd ed. NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989.
- [6] 卢扬江, 郑康乐. 提取水稻 DNA 的一种简易方法[J]. 中国水稻科学, 1996, 10(4):241 - 242.
- [7] Jefferson RA, Kavanagh TA, Bevan MW, et al. GUS fusion:  $\beta$ -Glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plant[J]. *EMBO J*, 1987, 6:3901 - 3907.
- [8] Yu Zenghang, Yang Jianbo, Wu Yuejin, et al. Transferring GUS gene into intact rice cells by low energy ion beam[J]. *Nuclear Instruments and Methods in Physics Research*. 1993, B80/81:1328 - 1331.
- [9] 余增亮, 邵春林, 杨剑波. 离子刻蚀作物样品的初步研究[J]. 安徽农业大学学报, 1994, 21(3):260 - 264.
- [10] Lanpei W, Hairui Cui, Zhongmou Bao, et al. The Special Effect of Aneuploid Genetic Background Treated by Different Mutagens. 1994. EWAC MEETING.
- [11] 王彩莲, 慎政, 陈秋方, 等. 氟离子注入对水稻诱变效应的初步研究[J]. 核农学报, 1995, 9(1):13 - 19.
- [12] 何毅修, 罗建沅, 李懋学. 通过干种子在 DNA 溶液中吸液以获得转基因酸浆植株[A]. 见:周光宇. 农业分子育种研究进展[C]. 北京:中国农业科技出版社, 1993. 164.

- [13] Ortiz JPA, Reggiardo MI, Ravizzini RA, et al. Hygromycin resistance as an efficient selectable marker for wheat stable transformation[J]. *Plant Cell Reports*. 1996,15:877-881.

### STUDIES ON INTRODUCING EXOGENOUS DNA INTO WHEAT BY ION IMPLANTATION

WU Li-fang<sup>1</sup>, YIN Ruo-chun<sup>2</sup>, GU Yun-hong<sup>1</sup>, WU Li-jun<sup>1</sup>, YU Zeng-liang<sup>1</sup>  
(1. Lab of Ion Beam Biotech, Institute of Plasma Physics, The Chinese Academy of Sciences, Hefei 230031, China; 2. School of Life Science, Anhui University, Hefei 230039, China)

**Abstract:** The exogenous GUS gene was introduced into wheat mature seeds by ion implantation. Histochemical staining showed the temporary expression rate of GUS gene reached more than 70%. PCR assays of  $R_0$  generation displayed that the positive plant rate was related to dosage of implanted ions, and the suitable dosage for transformation was  $7 \times 10^{16}$  ions/cm<sup>2</sup>. Further PCR-Southern and Southern blot assays proved that exogenous gene had integrated into wheat genome. The experiments provided an effective method for DNA delivery into wheat and showed a good prospect of introducing exogenous genomic DNA with helpful gene into wheat.

**Key Words:** Ion implantation; GUS gene; Wheat; Direct delivery; Mature seeds