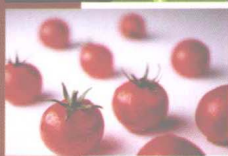


基因工程 研究

徐香玲 李集临 曲 敏 编著

JIYIN GONGCHENG
YANJIU



黑龙江教育出版社

基因工程 研究

第 1 卷 第 1 期 1998 年 1 月

中国科学院遗传研究所 编

1998 年 1 月



基因工程研究

徐香玲 李集临 曲 敏 编著

黑龙江教育出版社

图书在版编目(CIP)数据

基因工程研究/徐香玲,李集临,曲敏编著. —哈尔滨:黑龙江教育出版社,2008.9

ISBN 978-7-5316-5144-4

I. 基... II. ①徐...②李...③曲... III. 基因—遗传工程—研究 IV. Q78

中国版本图书馆 CIP 数据核字(2008)第 143011 号

基因工程研究

JIYIN GONGCHENG YANJIU

徐香玲 李集临 曲敏 编著

责任编辑 宋舒白

封面设计 侯园

责任校对 李树

出版发行 黑龙江教育出版社

哈尔滨市南岗区花园街 158 号 邮编:150001

印刷 哈尔滨太平洋彩印有限公司

开本 787×1092 毫米 1/16

印张 30.25

字数 800 千

版次 2008 年 10 月第 1 版

印次 2008 年 10 月第 1 次印刷

书号 ISBN 978-7-5316-5144-4/G·4017

定价 68.00 元

前 言

基因工程是一项令人瞩目的高新技术,用基因工程技术培育出来的农作物新品种,已在农业生产中发挥了巨大的增产与改良作用。基因治疗有的已从试验阶段转向实施阶段,克隆技术的进展不仅带来了医学革命,也给人类带来莫大的希望。随着新技术革命不断发展,基因工程必将以其巨大的活力改变传统的生产方式和产业结构,迅速向工、农、医等方面渗透,从而推动生产力的迅猛发展。

本书汇编了作者自 1990 年以来在国内发表的有关基因工程研究的主要论文,共分为五个部分:

第一部分,基因的克隆与分子标记。大豆启动功能片段的克隆及其转化的甘草中启动 β -葡萄糖苷酸酶基因的表达,与逆境胁迫相关的酶类 *rd29A* 启动子和 *CBF₂* 基因的克隆及其表达载体的构建,菜豆几丁质酶基因的克隆、序列分析及其表达,羊草乙醛脱氢酶 (ALDH) 基因片段的克隆及表达分析等,共 14 篇论文。

第二部分,植物的遗传转化。*Ri* 质粒介导的几丁质酶基因转化小麦的研究,*Ri* 质粒介导大豆花叶病毒外壳蛋白基因转化大豆的研究,发根农杆菌介导几丁质酶基因和 β -1,3-葡聚糖酶基因转化烟草的研究,发根农杆菌介导的抗病毒基因导入番茄转化系统的建立,利用 *Ti* 质粒介导的二元载体法向小麦导入几丁质酶基因的初步研究等,共 29 篇论文。

第三部分,植物的组织培养。影响大白菜高效离体培养再生的因素,影响小麦成熟胚培养及植株再生因素的研究,*Ri* 质粒诱导的植物发根培养系及其应用,小麦组织培养和基因枪轰击影响因素的探讨,利用组织培养快速繁殖龙胆,*Ri* 质粒转化桔梗再生植株的研究,利用 *Ri* 质粒诱导大豆毛状根的研究,小麦成熟胚培养及其再生体系的初步研究等,共 7 篇论文。

第四部分,转基因植物后代的检测和遗传分析。转抗真菌病基因烟草后代及转几丁质酶基因烟草后代的遗传学分析,利用实时荧光定量 PCR 技术检测转基因烟草,转抗病毒基因烟草后代遗传稳定性的研究,转几丁质酶基因烟草 *T₁* 代的检测与分析等,共 9 篇论文。

第五部分,其他。发根农杆菌 *Ri* 质粒在药用植物生物工程中的应用,*Ri* 质粒的生物学特性与应用,*Ri* 质粒在植物基因工程中的利用,植物遗传转化中头孢类抑菌剂的选择与浓度确定,EST 在小麦研究中的应用,转基因番茄研究的进展等 21 篇论文。

全书共汇集 80 篇论文,仅供有关研究人员、教学人员,生物、农学本科生、研究生参考。

本论文集在材料的整理和收集过程中得到哈尔滨师范大学生物系研究生张海玲、张海涛、孟庆英、徐晶和白晶同学的帮助,在此表示感谢。

作 者

2007 年 12 月 10 日

目 录

第一部分 基因的克隆与分子标记

大豆启动功能片段的克隆及在转化甘草中启动 β -葡糖苷酸酶基因的表达	(3)
Clone and Sequence Analysis of Trehalose Synthesis from <i>Pseudomonas Stutzeri</i>	(11)
cDNA Clone of β -1,3-Glucanase from <i>Phaseolus Vulgaris</i> and Construction of Expressed Vector for Plant	(18)
菜豆几丁质酶基因的克隆、序列分析及其表达	(29)
羊草乙醛脱氢酶(ALDH) 基因片段的克隆及表达分析	(37)
与逆境胁迫相关的 <i>rd29A</i> 启动子和 <i>CBF2</i> 基因的克隆及其表达载体构建	(44)
简单、快速、高效扩增和标记目的基因技术的研究	(50)
抗黄矮病小麦易位系 cDNA 文库的构建	(55)
快速克隆 DNA 大片段的方法	(58)
海藻糖合成酶基因的克隆及序列分析	(61)
<i>rd29A</i> 启动子的克隆及提高烟草抗逆性的研究	(66)
The RAPD analysis of two green pepper lines and two tomato lines mutated by astronautical mutagenesis	(73)
几种重要的分子标记原理及 RAPD 应用	(81)
大肠杆菌表达的真核蛋白产物的复性	(85)

第二部分 植物的遗传转化

Study on the Genetic Transformation of Gentian by Gene Recombinant	(93)
甘草的 Ri 质粒转化研究	(102)
利用 Ri 质粒向大豆导入马铃薯 y 病毒外壳蛋白基因的初步研究	(111)
利用 Ri 质粒向栽培大豆导入马铃薯 y 病毒外壳蛋白基因的研究简报	(115)
Ri 质粒介导 TMV 和 CMV 外壳蛋白基因转化烟草的研究	(117)
黄瓜 RiT - DNA 转化根的植株再生	(122)
Ri 质粒介导马铃薯 Y 病毒外壳蛋白基因(<i>PVY - CP</i>)转化烟草的研究	(126)
用发根农杆菌(<i>Agrobacterium rhizogenes</i>)转化大豆的研究	(131)
利用 Ti 质粒介导的二元载体法向小麦导入几丁质酶基因的初步研究	(138)
发根农杆菌介导的抗病毒基因导入番茄转化系统的建立	(143)
几丁质酶基因表达载体构建及转化烟草的研究	(151)

向烟草导入抗真菌病基因的研究	(157)
基因枪法向小麦导入几丁质酶基因的研究	(162)
Ri 质粒介导的几丁质酶基因转化小麦的研究	(169)
Ri 质粒介导 TMV 和 CMV 外壳蛋白基因转化黄瓜的初步研究	(176)
利用发根农杆菌 (<i>Agrobacterium rhizogenes</i>) 介导二元载体向番茄导入 TMV CMV 外壳蛋白基因的研究	(180)
Ri 质粒介导大豆花叶病毒外壳蛋白基因转化大豆的研究	(187)
Ti 质粒介导的 B,t,k- δ 内毒素蛋白基因转化大豆的初步研究	(197)
向大豆导入几丁质酶基因的初步研究	(203)
一种简单、快速的植物转化方法	(210)
发根农杆菌介导大白菜花药的遗传转化研究	(215)
发根农杆菌介导几丁质酶基因和 β -1,3-葡聚糖酶基因转化烟草的研究	(218)
基因重组龙胆遗传转化的研究	(225)
Ri 质粒转化番茄的初步研究	(232)
发根农杆菌转化大豆的研究	(237)
发根农杆菌转化龙胆再生植株的研究	(242)
Ri 质粒转化桔梗再生植株的研究	(247)
利用 <i>Talphi</i> b 综合体进行 <i>Tal</i> 基因转移的研究	(253)
番茄自花授粉后导入抗病毒基因的研究	(261)
第三部分 植物的组织培养	
小麦组织培养和基因枪轰击影响因素探讨	(269)
影响小麦成熟胚培养及植株再生因素的研究	(278)
影响大白菜高效离体培养再生的因素	(282)
小麦成熟胚培养及再生体系建立的初步研究	(289)
唐菖蒲组织培养初探	(293)
Ri 质粒诱导的植物发根培养系及其应用	(296)
利用组织培养快速繁殖龙胆	(299)
第四部分 转基因植物后代的检测和遗传分析	
利用实时荧光定量 PCR 技术检测转基因烟草	(307)
转基因烟草几丁质酶活力的测定与分析	(312)
几丁质酶基因在转基因烟草中表达效率的检测	(316)
转基因烟草植株的检测	(320)
转几丁质酶基因烟草后代的遗传分析	(329)
转抗真菌病基因烟草后代遗传分析	(335)
接头连接 PCR 步行法鉴定转基因烟草	(341)
植物遗传转化中头孢类抑菌剂的选择与浓度确定	(348)
植物遗传转化中抑菌剂的选择	(352)
第五部分 其他	
发根农杆菌的 Ri 质粒在药用植物生物技术研究中的应用	(359)
植物基因工程中 Ri 质粒的研究与应用	(365)

发根农杆菌 Ri 质粒在药用植物生物工程中的应用	(370)
植物谷胱甘肽-S-转移酶的分子生物学研究进展	(375)
叶绿体基因工程的研究进展	(381)
转基因番茄研究进展	(385)
植物组织培养与基因工程在棉花中的应用现状	(390)
植物抗盐机理的研究	(395)
植物热激转录因子的研究进展	(400)
NaCl 胁迫下羊草生理生化特性的初步研究	(407)
利用时间进程法优化活性污泥 DG - DGGE 图谱	(412)
荧光原位杂交法检测厌氧反应器中的硫酸盐还原细菌实验条件优化及应用	(418)
DG - DGGE 分析产氢发酵系统微生物群落动态及种群多样性	(423)
不同 16S rDNA 靶序列对 DGGE 分析活性污泥群落的影响	(431)
应用 ISSR 标记分析三江平原狭叶甜茅不同种群的遗传多样性	(437)
大豆蛋白废水生产单细胞蛋白的菌种选择及其培养条件	(443)
植物抗病分子机制研究进展	(450)
植物抗病基因研究进展	(454)
生物工程技术在中药中的应用与进展	(460)
表达序列标签(EST)分析及其在小麦研究中的应用	(465)
表达序列标签(EST)及其在抗孢囊线虫大豆研究中的应用	(470)

第一部分

基因的克隆与分子标记

大豆启动功能片段的克隆及在转化甘草中启动 β -葡糖苷酸酶基因的表达

董金兰 李洪泉 乔景波 李红卫 刘国平 李集临

将大豆 DNA 的 *Hind* III 和 *Bam*H I 酶切片段连接到 pBI101 载体缺启动子的 *GUS* 基因上游,构建了含有不同 DNA 片段的重组质粒,转化大肠杆菌 C600,获得了具 Km 抗性的转化子。通过三亲交配将上述重组质粒转移至发根农杆菌 R1000 (pRiA₄b) 中,用注射法,将各含重组质粒的发根农杆菌菌液感染甘草外植体,在含 cb 的无激素 MS 培养基上诱发毛状根并再生成植株。转化甘草具 Km 抗性,有甘露碱和农杆菌存在。经组织化学法检测,在转化株 C2 和 C13 的毛根、茎、叶中有靛蓝色沉淀物产生。证明大豆启动功能片段在转化甘草中启动了 *GUS* 基因表达。重组质粒的酶切分析证明 C2 和 C13 大豆 DNA 插入片段均约为 0.8 kb。DNA 分子杂交也证明 C2、C13DNA 与大豆 DNA 和转化株 DNA 有同源性。

在原核和真核细胞中高水平的表达外源基因是基因工程的根本目的。启动子是控制基因表达的重要部位,在基因表达的调控方面起着至关重要的作用,是基因工程研究中的重大课题之一。在植物基因工程中启动子研究对构建表达载体、了解基因表达的规律、改良作物品种均有重要意义。近年来有关大豆启动子的分离、克隆与表达的研究,国外已有一些报道:Schöfl 等对大豆热激动基因的 DNA 序列进行了分析并对可能起调控作用的启动子成分做了鉴定^[17];Miao 等获得了大豆谷氨酰胺合成酶(GS)基因的 cDNA,然后将克隆的 3.5kb 的启动子片段与报道基因 *GUS* 融合,GS—*GUS* 融合基因通过农杆菌介导,转化百脉根(*Lotus corniculatus*)植物得到了表达^[14],Hagen 等研究了大豆 GH 启动子在转基因烟草中植物生长素诱导的表达^[7];McClure 等对大豆的植物生长素调节的基因族(SAURs)中的 5 个基因进行了序列分析^[13],李义等又将 SAUR 10A 启动子与 *GUS* 基因融合,导入烟草中发现有组织器官特异性的表达^[11]。

我们利用植物启动子探测载体 pBI 101 在大肠杆菌中克隆了大豆启动功能片段,并鉴定

其在转化甘草中启动 *GUS* 基因的表达。这种随机克隆大豆启动子片段的研究,目前尚未见报道。

材 料 和 方 法

一、菌株及培养基

(一) 菌株

(1) *E. coli* C600(p^BI101): pBI101 是启动子探测质粒,在 *GUS* 基因上游缺失启动子,具有卡那霉素抗性(Km^R)标记;(2) *E. coli* C600(pB I 121): pB I 121 是在 pB I 101 质粒的 *GUS* 基因上游插入了一个800 bp的 CaMV35S 启动子片段,其他同 pB I 101;(3) *E. coli* C600(F⁻ thi-1 thr-1 leu B₆ lacy);(4) *E. coli* HB101(p^RK2013): p^RK2013 在三亲交配中有辅助转移基因的功能,帮助 pB I 101 等质粒从大肠杆菌转移到发根农杆菌中,具有 Km^R 标记;(5) *A. rhizogenes* R1000(pRiA₄b): pRiA₄b 的 T 区基因与诱发毛状根有关,菌株具有链霉素抗性(Sm^R)、维生素 B1 原养型(thi⁺)标记。以上菌株除 *E. coli* C600 由复旦大学赠送外,其他菌株均由日本筑波大学镰田·博先生惠赠。

(二) 培养基

LB、YEB 和 minA 培养基见文献[18]。培养基中抗生素的量(μg/mL): Km 50, Sm 25。

二、植物材料

栽培大豆(*Glycine max*)龙辐 81—9666 号由黑龙江省农科院大豆研究所提供。甘草(*Glycyrrhiza uralensis* Fisch)购于黑龙江省肇源县药材公司。

三、DNA 制备、酶切、连接及细菌转化

大豆总 DNA 制备按 Bendiek^[6] 及陈永强^[1] 的方法抽提叶片中的 DNA。pB I 101 质粒 DNA 按文献[12]方法,碱法抽提粗 DNA,再用氯化铯梯密离心法纯化。DNA 的酶切、连接及转化均参照文献[12]所述条件及方法进行。所用工具酶: *Hind* III、*Bam* H I 及 T4 DNA 连接酶均购于华美生物工程公司。

四、三亲交配

参照日本筑波大学提供的方法^[13]进行。

五、质粒 DNA 电泳检测及分子量测定

按改进的 Kado 方法^[2,10]快速抽提质粒 DNA 采用 0.8% 琼脂糖凝胶、醋酸缓冲液,电压 40V 6~7 h。DNA 分子量测定以 λDNA *Hind* III 酶切片段和 Φk174 DNA *Hinc*II 酶切片段为标准。

六、直接注射法感染甘草外植体

将发根农杆菌菌悬液注射到无菌幼苗的胚轴、幼茎及子叶。置于含羧苄青霉素(cb) 1mg/mL,无激素的 MS 培养基上,在 25~28℃,光照 12~16 h,光强度 1 000~3 000 lx 条件下培养。待接种处长出毛状根,将毛状根切下移接到含 0.1 mg/mL Km 的上述培养基上直至长

出不定芽。

七、冠瘿碱的检测

按文献[16]方法进行。

八、GUS 基因产物的检测

按 Jefferson 等组织化学分析法^[9]进行。底物 5-溴-4-氯-3-吲哚葡萄糖苷酸(*x*-Glue)由上海植生所赠送。

九、DNA 分子杂交

按文献[2]方法制备植物 DNA,参照文献[12]方法纯化质粒 DNA 及标记探针 DNA。按文献[3]方法进行斑点杂交。

结 果

一、利用 pBI101 载体进行大豆启动功能片段的克隆与筛选

pBI101 载体的 T 区具有 *NOS-NPTII* 基因和缺失启动子的 *GUS* 基因,有许多限制酶单一切点的多聚接头可供植物启动子克隆到 *GUS* 基因上游,并有整合到植物核基因组所需的转移 DNA(T-DNA)左右边界序列。如在 *GUS* 基因上游的酶切位点插入启动功能片段,即可启动 *GUS* 基因表达。我们将 pBI101 DNA 和大豆 DNA 分别用 *Hind* III 和 *Bam* H I 酶切、T4 连接酶连接、转化大肠杆菌 C600,在含 Km 的选择平板上,得到了转化子。经过多次移接、淘汰,最后保留了抗性稳定、长势好的 62 株,转化频率约在 $10^{-7} \sim 10^{-8}$ 。通过质粒 DNA 检测,多数菌株有比原载体质粒带位置稍后的质粒带,检出 6 株质粒分子量比载体 pBI101 明显大或稍大(图 1)。说明有外源 DNA 插入。

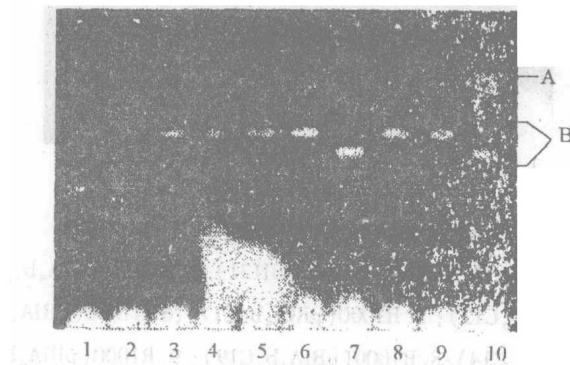


图 1 *E. coli* 转化子的重组质粒 DNA 电泳图

1. C600(pSD—C19); 2. C600 recipient; 3. C600(pSD—C17); 4. C600(pSD—C15);
5. C600(pSD—C14); 6. C600(pSD—C6); 7. C600(pSD—C2); 8. C600(pSD—C13);
9. C600(pB I 121); 10. C600(pBI101)。

A. 染色体带(Bands of chromosome DNA); B. 质粒带(Bands of plasmid DNA)。

二、通过三亲交配,将克隆的重组质粒转移到发根农杆菌中

大肠杆菌克隆的重组质粒不能直接转化植物体,须通过农杆菌感染植物,并将 T-DNA 转移到受体植物细胞,整合到核基因组中,才能在植物体内表达。在三亲交配中,供体、受体及诱动菌三者的菌液浓度达到 $O.D = 0.8 \sim 1.0$ 时,三者混合静止培养约 16 h 后获得转移子的频率较高。pBI101、pBI121 及各重组质粒在 pRK2013 诱动下,以 $10^{-4} \sim 10^{-5}$ 的频率转移至发根农杆菌。而对照组,分别以大肠杆菌 C600 (pBI101) 和 HB101 (pRK2013) 作为供体菌,与发根农杆菌 R1000 (pRiA₄b) 受体菌进行接触转移,在选择平板上均不见转移子。

将获得的具有 Km^R 、 Sm^R 和 thi^+ 基因型的转移子及对照菌株进行 DNA 抽提,经琼脂糖凝胶电泳检测,结果见图 2。带有正确表型的转移子菌株都含有二条质粒带即在染色体后方的一条 pRiA₄b 大质粒带和在染色体前方的一条不同大小的质粒带。对照组发根农杆菌 R1000 (pRiA₄b) 只含有一条大质粒带, pBI101 载体质粒带走在前方,而 pBI121 具有 CaMV35S 启动子,分子量比前者大,走在前者的后方。所有克隆大豆 DNA 片段的重组质粒分子量大于或稍大于 pBI101 质粒。这表明重组质粒及 pBI101、pBI121 对照组质粒通过三亲交配确实被诱动转移至发根农杆菌中。

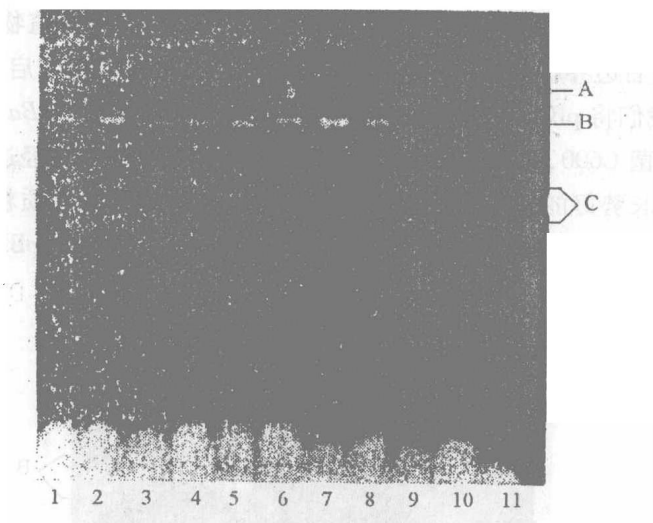


图 2 A. rhizogenea 转移子的质粒 DNA 电泳图

1. R1000(pRiA₄b); 2. R1000(pRiA₄b,pBI121); 3. R1000(pRiA₄b,pBI101);
4. R1000(pRiA₄b,C13); 5. R1000(pRiA₄b,C17); 6. R1000(pRiA₄b,C15);
7. R1000(pRiA₄b,C14); 8. R1000(pRiA₄b,C19); 9. R1000(pRiA₄b,C6);
10. R1000(pRiA₄b,H3); 11. R1000(pRiA₄b,C2)。

A. Ri 质粒带 (Bands of Ri DNA); B. 染色体带 (Bands of chromosome DNA); C. 重组质粒带 (Bands Of recombinant plasmid DNA)。

三、具有不同重组质粒的发根农杆菌注射法感染甘草外植体

实验结果表明发根农杆菌对甘草外植体的感染频率与菌种是否经过活化、菌液的浓度、菌体培养时间有关。我们将各转移子菌株的保藏菌种先在含 Km 平板上培养活化,然后接种到 10 mL 含同

上培养液的三角瓶中,28℃振荡培养过夜或加大接种量,振荡培养7~8 h,菌悬液浓度在 $O.D_{600} = 0.8$ 以上,感染频率高。而不经活化、菌悬液浓度低或培养时间过长,感染频率很低约在5%左右。其次与感染外植体的部位有关。以胚轴接近子叶节的部位注射感染,诱发毛根的频率高。而幼茎诱发毛根的频率较低,子叶可在叶柄处诱发毛根,但感染部位长出毛根的很少。这可能与感染部位的农杆菌受到培养基中 cb 抗生素的抑制,未能实现转化有关。

四、诱发毛根及其再生植株

被感染的胚轴、茎等外植体在含 cb 的无激素 MS 培养基上培养,两周以后在接种部位出现多分枝、不定形的毛状根(图版 I,1)。毛根出现的时间和生长状态与感染后的环境条件有关。一般高湿条件下出现典型特征的毛根。在干燥条件下形成不定形的细胞团块。温度过高或过低都会影响毛根的生长。不同转移子菌株感染甘草诱发毛根的频率最高可达60%~50%,一般为20%~40%左右。

将毛根从感染部位切下,置于新鲜的加 Km 和 cb 无激素的 MS 培养基上,继续进行生根培养,毛根分枝伸长,在毛根茂密生长的部分出现瘤状突起,形成不定形的细胞块或愈伤组织。经过4~6周培养开始出现不定芽(图版 I,2)。约1个月后可长成再生植株。再生植株初期除根系生长旺盛,未见异常表型。而移植盆栽后,可见转化株比正常植株矮、叶片大、叶面有皱、叶缘稍向背卷曲。

五、冠瘿碱合成酶活性的检测

发根农杆菌感染甘草,长出毛根,表现出抗 Km,激素自主性生长,这种特异表型和生长特性已经说明甘草再生植株被转化,为获得更直接的证据,对各被转化甘草植株进行了冠瘿碱检测,结果在各毛根样品中均含有甘露碱和农杆菌碱,各再生植株样品中大多数含有上述两种碱,有的有甘露碱,未见农杆菌碱,这种情况可能与冠瘿碱含量低有关。而对照的未转化植株样品中不存在上述两种碱(图3)。上述结果表明发根农杆菌中 Ri 质粒的 T-DNA 区段,已整合到甘草细胞的核基因组中并得到表达。

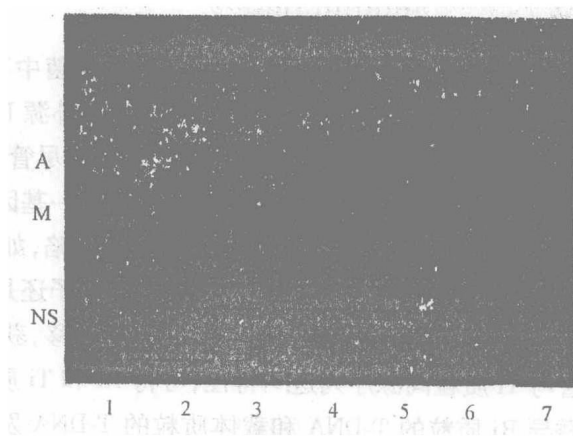


图3 冠瘿碱检测

1. 标准样; 2. 转化株 121; 3. 转化株 C13; 4. 转化株 C2; 5. 转化株 101;
6. 转化株 R1000; 7. 未转化株。

A. 农杆菌碱 (Agropine); M. 甘露碱 (Mannopine); NS. 中性糖 (Neutral sugar)。

六、*GUS* 基因产物的检测

以 x-Gluc 为底物,用组织化学分析法检测了各转化植株的 *GUS* 基因产物。结果在转化株 C2、C13 的毛根、茎、叶或叶柄中发现有靛蓝色沉淀(仅转化株 C2 的叶面未出现颜色反应)。而对照组转化株 101 和未克隆到启动功能片段的转化株均无颜色反应。阳性对照组转化株 121 中有较强的颜色反应。颜色反应表明在被转化植物组织细胞中确有 β -葡萄糖苷酸酶产生。上述结果证明在转化甘草 C2 和 C13 植株中,大豆启动功能片段启动了 *GUS* 基因表达。此实验重复两次结果相同。见图版 I,3-7。

七、核酸限制性内切酶分析

将克隆了大豆启动功能片段的两个重组质粒分别定名为 pSD-C2 和 pSD-C13。将两者及对照组质粒 DNA 分别用 *Hind* III 和 *Bam* HI 消化,经琼脂糖凝胶电泳得到的限制可见经两种酶酶切后,pSD-C2 和 pSD-C13 质粒分别产生两个片段。大片段与对照组 pBI101 载体片段大小相同,约 12kb 左右,而小片段均约为 0.8kb。通过基因扩增 PCR 方法也获得了相同大小的大豆 DNA 插入片段(另文待发)。

八、DNA 分子杂交

将快速抽提的未转化株、转化株 121、C2、C13 的 DNA 及大豆 DNA 各取约 0.3 μ g,分别点样于两张硝酸纤维滤膜上,各自与³²P 标记的 pSD-C2 和 pSD-C13 探针之一进行杂交。杂交后放射自显影结果表明,除未转化株 DNA 不能杂交外,所有转化株 DNA 都能有不同程度的杂交。上述结果证明重组质粒中插入的外源 DNA 片段与大豆 DNA 有同源性。同时也证明重组质粒中的 T-DNA 区段被整合到转化株的核基因组中。不同转化株的杂交强度不同,可能与外源基因拷贝数不同有关。

讨 论

1. 利用 pBI101 载体随机克隆的大豆启动功能片段,在大肠杆菌中不能表达,因而直接筛选是很困难的。我们通过快速质粒 DNA 检测,可初步确定是否有外源 DNA 插入,然后导入植物体检测启动功能的表达,从而确定是否启动功能片段。这种做法尽管初期工作量大、带有盲目性,但本实验表明,从植物核基因组为数繁多的基因群中克隆某一基因的启动子片段是可能的。关键在于植物启动子探测载体的发展^[8,15]。这种方法虽有缺陷,如不了解是何基因启动子等。但在经费少、实验条件差的情况下,采用此法分离植物启动子还是可探索的途径。

2. 实验中采用了二元载体法,利用 Ri 质粒介导外源 DNA 转移,获得转基因植物^[4]。由于 Ri 质粒的 Vir 区存在着与 Ti 质粒同源序列这一特性,可将 Ri 和 Ti 质粒联合使用,由 Ri 质粒提供的 Vir 功能,可以诱导 Ri 质粒的 T-DNA 和载体质粒的 T-DNA 发生双转化。转化甘草中既可检测到冠瘿碱又可检测到 *GUS* 产物,就是双转化的结果。Ri 质粒是基因工程的新载体,近年来国外对 Ri 质粒毛根转化系统研究很多^[4,5],而国内却很少。Ri 质粒的优越处在于①Ri 质粒感染植物可诱发毛根,毛根通过组织培养很易获得再生植株;②一条毛根起源于一个细胞,这一克隆性质和特异表型为转化体的筛选提供了方便。本文描述的转化系统,为植物

基因工程将目的基因导入植物体,提供了简便、有效的方法和途径。

参 考 文 献

- [1] 陈永强. 遗传学报, 1979, 6(1): 38 - 40.
- [2] 杜杰, 等. 生物工程学报, 1988, 4(2): 110 - 118.
- [3] 齐义鹏, 等. 基因工程原理和方法, 四川大学出版社, 1988, 141 - 142.
- [4] 张毅, 等. 生物工程学报, 1989, 5(3): 173 - 178.
- [5] 鎌田・博. 组织培养(特集 Riプラスミド), 1987, 13(6): 182 - 192.
- [6] Bendiek, et al. Plant Physiol. 1976, 42: 959 - 965.
- [7] Hagen, G. et al. Plant Molecular Biology, 1991, 17: 567 - 579.
- [8] Jefferson, R. A. et al. EMBO J. 1987, 6(16): 3901 - 3907.
- [9] Jefferson, R. A. et al. plant Molecular Biology Reporter, 1987, 5(4): 387 - 405.
- [10] Kado, C. I. et al. J. Bacteriol, 1981, 145: 1365 - 1373.
- [11] Li, Y. et al. The Plant Cell, 1991, 3: 1167 - 1175.
- [12] Maniatis, T. E. et al. Molecular Cloning, Cold Spring Harbor Laboratory. 1982.
- [13] McClure, B. A. et al. The Plant Cell. 1989, 1: 229 - 239.
- [14] Miao, G. H. et al. The plant Cell. 1991, 3: 11 - 22.
- [15] Neve, R. L. et al. 1979, Nature, 227: 324 - 325.
- [16] Petit, A. et al. Mol. Gen. Genet, 1983, 190: 204 - 214.
- [17] Schöffl, F. et al. The EMBO J, 1984, 3(11): 2491 - 2497.

本文发表在《遗传学报》, 1993, 20(3)。