



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 1995358 B

(45) 授权公告日 2010. 11. 10

(21) 申请号 200610129492. X

傅俊杰

(22) 申请日 2006. 11. 22

(51) Int. Cl.

(73) 专利权人 天津科技大学

C12N 15/82(2006. 01)

地址 300222 天津市河西区大沽南路 1038 号

A01H 4/00(2006. 01)

审查员 邢维玲

(72) 发明人 李兴林 舒庆尧 路福平 夏英武
吴殿星 高年发 张健 崔海瑞

权利要求书 1 页 说明书 6 页

(54) 发明名称

植物种子转化方法

(57) 摘要

本发明专利属于生物技术领域。外源 DNA 进入植物基因组,目前主要有愈伤组织的农杆菌介导和基因枪法等技术。但是,受再生体系难、遗传背景差异导致转化率低等因素,它们仍然处在不断的完善之中。物理手段的使用(如超声波、负压法、脉冲电泳、重离子辐照和 γ 射线辐照等)也同样存在使用材料有限、转化率低等主要问题。其中与本发明相近的 γ 射线辐照,因为辐照材料为愈伤组织,要考虑到再生体系、辐照时期和污染等问题,实际操作受到了很大限制。因此面对许多类型植物的转化技术,还需要进一步的不断改进。本发明专利的主要内容与技术特征是:将在 γ 射线辐照后的植物种子(剂量为:0.01-10Gy,剂量率:为 0.1-2Gy/h),转入携带目的基因质粒的农杆菌或外源 DNA(表达质粒)中悬浮液浸泡 5-300min,然后,在选择性的基质中萌发;鉴定、筛选 GUS 基因瞬间表达的幼苗;利用阳性幼苗可以用作两种后续的处理:一是作为外植体,在选择培养基上进行组织培养获得转基因再生植株;二是将阳性幼苗直接移栽盆内或田间,但其后,要每隔 3-5 天,在各株的所有茎尖处,点滴 50-200 μ l 的相关抗生素(浓度为 50-250mg/l),直至花芽的形成;收获种子进行外源基因鉴定,阳性材料进入下一代种植。本发明在多种植物,特别是在再生体系较难(如单子叶植物)、愈伤组织-农杆菌介导效果差(如十字花科的部分物种等)和转化效率低下等物种的转化上将发挥重要的作用,大大提高转化效率。本项发明在农业生物技术及其应用基础、植物基因组研究等方面有较大的应用价值。

1. 一种以种子为受体的 DNA 转化方法,其特征在于,利用剂量为 0.01-10Gy、剂量率为 0.1-2Gy/h 的 γ 射线辐照植物种子;辐照后的种子转入携带目的基因质粒的农杆菌或外源 DNA 表达质粒中浸泡 5-300min;然后,在选择性基质中萌发;鉴定、筛选 GUS 基因瞬间表达的幼苗;阳性幼苗用作两种后续的处理:一是作为外植体,在选择培养基上进行组织培养获得转基因再生植株;二是将阳性幼苗直接移栽盆内或田间,但其后,要每隔 3-5 天,在各株的所有茎尖处点滴 50-200 μ l、浓度为 50-250mg/l 的抗生素,直至花芽的形成;收获种子进行外源基因鉴定;阳性材料进入下一代种植。

植物种子转化方法

技术领域

[0001] 本发明专利属于生物技术领域。

[0002] 背景技术

[0003] 外源 DNA 进入植物基因组,目前主要有愈伤组织的农杆菌介导和基因枪法等技术。但是,受再生体系难、遗传背景差异导致转化率低等因素,它们仍然处在不断的完善之中。物理手段的使用(如超声波、负压法、脉冲电泳、重离子辐照和 γ 射线辐照等)也同样存在使用材料有限、转化率低等主要问题。其中与本发明相近的 γ 射线辐照,因为辐照材料为愈伤组织,要考虑到再生体系、辐照时期和污染等问题,实际操作受到了很大限制。因此面对许多类型植物的转化技术,还需要进一步的不断改进。

[0004] 发明内容

[0005] 本发明专利的主要内容与技术特征是:将在 γ 射线辐照后的植物种子(剂量为:0.01-10Gy,剂量率:为0.1-2Gy/h),转入携带目的基因质粒的农杆菌或外源 DNA(表达质粒)中浸泡5-300min,然后,在选择性基质中萌发;鉴定、筛选 GUS 基因瞬间表达的幼苗;利用阳性幼苗可以用作两种后续的处理:一是作为外植体,在选择培养基上进行组织培养获得转基因再生植株;二是将阳性幼苗直接移栽盆内或田间,但其后,要每隔3-5天,在各株的所有茎尖处点滴50-200 μ l 的相关抗生素(浓度为50-250mg/l),直至花芽的形成;收获种子进行外源基因鉴定,阳性材料进入下一代种植。

[0006] 主要用途

[0007] 本发明在多种植物,特别是在再生体系较难(如单子叶植物)、愈伤组织-农杆菌介导效果差(如十字花科的部分物种等)和转化效率低下等物种的转化上将发挥重要的作用,大大提高转化效率。本发明在农业生物技术及其应用基础、植物基因组研究等方面有较大的应用价值。

[0008] 具体实施方式

[0009] 实例 1

[0010] 辐照种子的农杆菌介导 gus 基因的瞬间表达

[0011] 1.1 材料和方法

[0012] 1.1.1 材料

[0013] 物种:取饱满、完好的白菜、小麦、南瓜、芹菜、香菜、玉米、粳稻、籼稻、黑麦、菠菜、莴菜和豇豆等种子;每种取500粒左右供实验使用。

[0014] 农杆菌及质粒:为 LBA4404;携带的质粒为 pKUC(浙江大学舒庆尧教授实验室);含抗生素选择基因为卡那霉素抗性基因和潮霉素抗性基因;报告基因为 GUS 基因(含内含子序列);它们的启动子均为 CaMV 35S 启动子。

[0015] 1.1.2 方法

[0016] 种子辐照:用0.01-10Gy剂量(剂量率为0.1-2Gy/h)的 γ 射线辐照植物种子。

[0017] 摇菌:农杆菌在 LB 液体培养基(其中含50mg/l卡那霉素)25℃条件下,120rpm 摇床培养。指数增长的中后期,菌液 OD₅₅₀ 值为:0.20-0.85 时用做以下实验。

[0018] 浸泡 : 在农杆菌悬浮液中分别加入辐照处理和未处理的种子, 在 15-35℃ 条件下, 浸泡 5-300min。

[0019] 萌发 : 浸泡种子分别点播在含沙土或珍珠岩的盆内 ; 期间, 喷洒适量的无菌水 (含 50mg/L 卡那霉素) 以保湿润。

[0020] gus 瞬间表达鉴定 : 种子萌发, 幼苗长到 3cm 高以上时 (7-25 天内), 剪下植株的少许叶片或根, 切成 $0.5 \times 0.5 \text{ cm}^2$ 大小或 0.5cm 长的小块转入 GUS 染色液中 ; 在遮光条件下染色 6-24 小时, 设置已知未转化材料为阴性对照和转化材料为阳性对照 ; 染色后, 用 95% 乙醇去叶绿素等物质, 直至透明 ; 出现兰色为阳性, 否则为阴性, 由于 GUS 基因含插内含子, 因此可以排除由农杆菌自身造成的假阳性。染色液成分含 : 0.1M K/NaPO₄ 缓冲液, pH7.0 ; 10mM EDTA-Na₂ ; 5mM K₃[Fe(CN)₆] ; 5mM K₄[Fe(CN)₆] · 3H₂O ; 0.1% (v/v) Triton X-100 ; 1ml/mg X-Gluc ; 抽滤灭菌, -20℃ 保存。

[0021] gus 基因表达率的计算。阳性表达率 (%) = GUS 蓝色反应株数 / 浸泡后萌发的总株数。

[0022] 1.2 结果与分析

[0023] 由表 1 可知, 各个物种的未辐照或未经农杆菌介导的植株幼苗均没有检测出 GUS 反应阳性, 表明实验材料存在的内源 gus 基因及其表达被排除。而经过辐照处理的种子, 均表现了高低不等的阳性表达率, 有的高达 80% 以上, 这在发明者所能查阅的文献中, 还没有过报道。

[0024] 表 1 辐照种子农杆菌介导后幼苗的 gus 基因瞬间表达率 (%)

[0025]

材料	小麦	玉米	粳稻	籼稻	黑麦	白菜	香菜	芹菜	菠菜	莧菜	豇豆	南瓜
未辐照, 未转化	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
辐照, 未转化	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
未辐照, 转化	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
辐照, 转化	79.78	74.45	94.67	84.29	58.91	41.94	64.81	91.67	79.17	86.36	62.07	74.47

[0026] 1.3 结论

[0027] 来源不同、遗传背景各异的植物种子, 通过适宜的 γ 射线处理, 在农杆菌悬浮液中, 可以获得很高的外源 DNA 瞬间表达 (如 GUS 阳性) 的转化体。

[0028] 实例 2

[0029] 辐照种子的外源质粒 (gus 基因) 转化表现

[0030] 2.1 材料和方法

[0031] 2.1.1 材料

[0032] 物种 : 取饱满、完好的小麦、番茄、白菜和香椿等种子 ; 每种取 500 粒左右供实验使用。

[0033] 农杆菌及质粒 : 为 LBA4404 ; 携带的质粒为 pKUC (来自浙江大学舒庆尧教授实验室) ; 含抗生素选择基因为卡那霉素抗性基因和潮霉素抗性基因 ; 报告基因为 GUS 基因 (含内含子序列) ; 它们的启动子均为 CaMV 35S 启动子。

[0034] 2.1.2 方法

[0035] 种子辐照 :用 0.01-10Gy 剂量 (剂量率为 0.1-2Gy/h) 的 γ 射线辐照植物种子。

[0036] 摇菌 :农杆菌在 LB 液体培养基 (其中含 50mg/1 卡那霉素) 25℃ 条件下, 120rpm 摇床培养。指数增长的中后期, 菌液 OD₅₅₀ 值为 :0.20-0.85 时用于质粒的提取。

[0037] 质粒的提取 :碱裂解法裂解农杆菌 ;异丙醇 - 乙醇粗提质粒 ;PEG 沉淀法纯化质粒 ;溶于 TE 缓冲液 (pH8.0), -20℃ 保存。

[0038] 浸泡 :用 TE 缓冲液将质粒稀释到 20-350ng/ml 浓度, 然后分别加入辐照处理和未处理的种子, 在 15-35℃ 条件下, 浸泡 5-300min 。

[0039] 萌发 :浸泡种子分别点播在含珍珠岩的盆内 ;期间, 喷洒适量的无菌水 (含 50mg/1 卡那霉素) 以保湿润。

[0040] gus 瞬间表达鉴定 :种子萌发, 幼苗长到 3cm 高以上时 (7-25 天内), 剪下植株的少许叶片或根, 切成 0.5×0.5cm² 大小或 0.5cm 长的小块转入 GUS 染色液中 ;在遮光条件下染色 6-24 小时, 设置已知未转化材料为阴性对照和转化材料为阳性对照 ;染色后, 用 95% 乙醇去叶绿素等物质, 直至透明 ;出现兰色为阳性, 否则为阴性, 由于 GUS 基因含内含子, 农杆菌造成的假阳性可以排除。染色液成分含 :0.1M K/NaPO₄ 缓冲液, pH7.0 ;10mM EDTA-Na₂ ;5mM K₃[Fe(CN)₆] ;5mM K₄[Fe(CN)₆] · 3H₂O ;0.1% (v/v) TritonX-100 ;1ml/mg X-Gluc ;抽滤灭菌, -20℃ 保存。

[0041] gus 基因表达率的计算。表达率 (%) = GUS 蓝色反应株数 / 浸泡后萌发的总株数。

[0042] 2.2 结果与分析

[0043] 由表 2 可知, 小麦、番茄、白菜和香椿的种子在未辐照或未经质粒转化的植株幼苗均没有检测出 GUS 反应阳性。而经过辐照处理的种子, 在质粒转化下也表现了高低不等的阳性表达率, 最低香椿也高达 30% 多。

[0044] 表 2 辐照种子质粒介导后幼苗的 gus 基因瞬间表达率 (%)

[0045]

材料及 处理	小麦	番茄	白菜	香椿
未辐照, 未转化	0	0	0	0
辐照, 未转化	0	0	0	0
未辐照, 转化	0	8.51	0	0
辐照, 转化	43.10	66.67	49.82	30.14

[0046] 2.3 结论

[0047] 同实例 1 辐照种子经过农杆菌介导的结果一样, 辐照的种子在质粒直接转化下, 也可以获得外源基因 (如 gus 基因) 瞬间表达率较高的转化体。

[0048] 实例 3

[0049] 瞬间表达的幼苗盆栽 - 卡那霉素选择获得 T0 和 T1 代植株的表现

[0050] 3.1 材料和方法

[0051] 3.1.1 材料

[0052] 材料来源 :取实例 2 的小麦、番茄、白菜和香椿等幼苗, 经过 GUS 染色, 选取兰色阳性植株用于移栽。

[0053] 3.1.2 方法

[0054] 盆内移栽 :阳性植株移栽在含有肥沃沙土的盆内。每间隔 3-5 天, 在所有茎尖上滴

50-200 μ l 的卡那霉素（浓度为 50-250mg/L），直至花芽的形成。

[0055] 植株 GUS 染色的鉴定：苗期 GUS 阳性植株在花期剪取顶部幼茎，一部分用于 GUS 染色，另一部分用于 DNA 提取，进行 PCR 鉴定；其株收获的种子进行无菌水发芽（T1 代），随机取一株根尖进行 GUS 染色，统计阳性表达率（=再次 GUS 染色阳性株数 / 开始阳性反应取样株数），染色方法见实例 1；阳性材料进入下一轮种植。

[0056] 植株 gus 基因 PCR 的鉴定：T0 代的幼茎部分（见 GUS 染色）；T1 代的材料为测定 T1 代 GUS 反应的同一植株的幼叶；CTAB 法提取植物全基因组 DNA；按文献设计 gus 基因引物；含 gus 基因的质粒为阳性对照，未转化植株为阴性对照进行 PCR 扩增；琼脂糖凝胶电泳鉴定，有特异带为阳性植株。

[0057] 3.2 结果与分析

[0058] 由表 3 可知，从质粒介导而来的 GUS 染色阳性幼苗，移栽到盆内，一部分不做任何处理，花期检测 GUS 染色反应和 PCR 鉴定，两者阳性率急剧下降，其中香椿为 0；另外一部分，为卡那霉素处理，所有实验材料仍然维持较高的阳性率，表明保持选择压力是必要的。对花期 GUS 阳性的植株（不论是否经过卡那霉素处理），收获种子，经萌发，测定幼苗 GUS 反应和进行 PCR 鉴定，两者阳性率普遍增高。

[0059] 表 3 GUS 阳性幼苗盆栽后 T0 和 T1 代 GUS 染色阳性表达率（%）和 PCR 阳性率（%）

[0060]

			GUS 染色表达率（%）	PCR 阳性率（%）
小麦	未滴卡那霉素	当代植株	4.00	/
		T1 代幼苗	50.00	100.00
	滴加卡那霉素	当代植株	45.28	49.06
		T1 代幼苗	66.67	79.17
白菜	未滴卡那霉素	当代植株	4.00	/
		T1 代幼苗	50.00	50.00
	滴加卡那霉素	当代植株	35.53	35.53
		T1 代幼苗	85.19	96.30
番茄	未滴卡那霉素	当代植株	12.00	/
		T1 代幼苗	83.33	100.00
	滴加卡那霉素	当代植株	69.66	74.16
		T1 代幼苗	95.16	98.39
香椿	未滴卡那霉素	当代植株	0	0
		T1 代幼苗	/	/
	滴加卡那霉素	当代植株	42.86	57.14
		T1 代幼苗	/	/

[0061] 3.3 结论

[0062] 辐照种子经农杆菌介导或质粒直接转化，瞬间表达阳性的植株只有在适当的选择压力下，其后期和后代可以获得阳性率较高的转化体。

[0063] 实例 4

[0064] gus 基因瞬间表达的番茄和白菜幼苗经过组织培养获得再生植株

[0065] 4.1 材料和方法

[0066] 4.1.1 材料

[0067] 材料来源 :取实例 2 的番茄、白菜和香椿等幼苗,经过幼(子)叶局部和茎尖下段 GUS 染色测定,选取阳性反应的幼叶和茎尖余下部分为外质体用于组织培养。

[0068] 4.1.2 方法

[0069] 番茄的组织培养 :以阳性反应的番茄幼叶余下部分为外质体(12 天内),用 70% 的乙醇洗 45s,无菌水清洗 3 次;再用 3% 次氯酸钠浸泡 15min,无菌水清洗 3-5 次;最后用灭菌滤纸吸干其浮水后转入 MS+1.0mg/lNAA+0.1mg/l 6-BA+50mg/l 卡那霉素培养基诱导形成愈伤组织;两周一次继代培养 2-3 次,愈伤组织转入 MS+0.2mg/l IAA+2.0mg/l 6-BA 培养基诱导幼苗分化;分化幼苗转入 MS+1.0mg/l 6-BA+1.0mg/l IAA 培养基诱导生根;3-5 天练苗后,移栽盆内。

[0070] 白菜的组织培养 :以阳性反应的白菜子叶余下部分为外质体(7 天内),用 70% 的乙醇洗 30s,无菌水清洗 3 次;再用 3% 次氯酸钠浸泡 10min,无菌水清洗 3-5 次;最后用灭菌滤纸吸干其浮水后转入 MS+0.8mg/lNAA+0.2mg/l 6-BA+50mg/l 卡那霉素培养基诱导形成愈伤组织;两周一次继代培养 1 次,愈伤组织转入 MS+0.2mg/l IAA+1.2mg/l 6-BA 培养基诱导幼苗分化;分化幼苗转入 MS+0.5mg/l IAA 培养基诱导生根;3-5 天练苗后;移栽盆内。

[0071] 香椿的组织培养 :以阳性反应的香椿茎尖余下部分为外质体(20 天内),用 70% 的乙醇洗 30s,无菌水清洗 3 次;再用 3% 次氯酸钠浸泡 15min,无菌水清洗 3-5 次;最后用灭菌滤纸吸干其浮水后转入 MS+0.6mg/l2,4-D+100mg/l 卡那霉素培养基诱导形成愈伤组织;两周一次继代培养 3-4 次后,愈伤组织转入 MS+0.4mg/lIAA+2.0mg/l KT 培养基诱导幼苗分化;分化幼苗转入 $\frac{1}{2}$ MS+1.0mg/l IAA 培养基诱导生根;3-5 天练苗后,移栽盆内。

[0072] GUS 染色鉴定 :取再生植株的叶片(每个来源的再生植株只随机选取一株测定);阳性再生植株(T1)收获的种子进行无菌水发芽,取其根尖(随机选取 100 株)进行 GUS 染色;统计阳性表达率,染色方法见实例 1。

[0073] gus 基因 PCR 的鉴定 :取植株的幼叶,CTAB 法提取植物全基因组 DNA;按文献设计 gus 基因引物;以含 gus 基因的质粒为阳性对照(质粒来源于实例 1),未转化植株为阴性对照进行 PCR 扩增;琼脂糖凝胶电泳鉴定,有特异带为阳性植株;PCR 阳性率(%) = 阳性株数 / 测定总株数。每个来源的再生植株只随机选取一株测定(同 GUS 染色测定的材料相对应);T1 代鉴定材料为 GUS 染色测定的随机选取的 100 株苗。

[0074] 4.2 结果与分析

[0075] 实例 3 表明瞬间表达阳性的植株,在无选择压力下,随着它的生长发育,它很快就会失去外源 DNA 片段。因此,开展了实例 4 的研究。由表 4 可知,经过辐照处理的种子,在质粒转化下幼苗期表现阳性的植株,取其叶或茎尖为外植体,经过组织培养获得再生植株,其 GUS 阳性表达率和 PCR 阳性率均超过 60%;而随机抽取的再生植株后代幼苗,GUS 阳性表达率和 PCR 阳性率均超过 80%。

[0076] 表 4 再生植株和 T1 代幼苗的 GUS 染色阳性表达率(%)与 PCR 阳性率(%)

[0077]

物种	测定材料	GUS 阳性表达率(%)	PCR 阳性率 (%)
番茄	再生植株	67.63	76.26
	T1 代幼苗	96.00	96.00
白菜	再生植株	72.22	70.63
	T1 代幼苗	84.00	87.00
香椿	再生植株	66.07	64.29
	T1 代幼苗	/	/

[0078] 4.3 结论

[0079] 对辐照种子通过农杆菌介导或质粒直接转化获得的瞬间表达阳性的植株,可以通过组织培养的手段获得更高而稳定的转化体。