



基因枪转化法在棉纤维细胞中瞬时表达 外源基因的研究

于晓玲, 崔百明, 卫海滨, 赵平娟, 彭明*

(中国热带农业科学院 热带生物技术研究所, 海口 571101)

摘要: 试验运用了 0 d, 1 d 的棉胚珠为受体, *GUS* 基因为报告基因, 用基因枪直接对胚珠表皮细胞进行轰击。整个表达载体包括两个部分, 第一部分是由 CaMV35S 调控的 *GUS* 基因, 第二部分是由棉纤维特异表达启动子 (RDL1) 调控的目标基因, 因此目标基因与 *GUS* 报告基因能在同一个单纤维细胞中同时表达, 从而提供了一个直观的在单纤维细胞中验证目标基因的表达与纤维发育关系的方法。研究中对受体棉花胚珠的发育时间、基因枪的轰击压力、轰击距离及轰击次数等影响转化效率的因素进行了分析优化。结果表明, 最佳的转化组合条件是: 以开花一天的棉花胚珠为受体, 当轰击压力为 1100 psi, 轰击距离为 9 cm, 轰击次数为 2 次时可达到的最高的转化率, 并能观察到稳定的 *GUS* 表达。

关键词: 棉纤维; 基因枪; 瞬时表达; *GUS*

中图分类号: S562.035.2 **文献标识码:** A

文章编号: 1002-7807(2007)06-0419-05

Study on Transient Expression of Target Gene in the Epidermal Cells of Cotton Ovules via Particle Bombardment

YU Xiao-ling, CUI Bai-ming, WEI Hai-bin, ZHAO Ping-juan, PENG Ming*

(Institute of Tropical Bioscience and Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences, Haikou 571101, China)

Abstract: Cotton fibers are unicellular trichomes which differentiate from epidermal cells of developing cotton ovules. They have been considered as an ideal model for studying plant cell elongation and cell wall biogenesis. A large number of regulatory genes are involved in the process of fiber differentiation and development. Only a few is known how they control and regulate the entire process of fiber development. Because generating transgenic cotton needs a long period of time and transformation efficiency of cotton is still low, it is necessary to develop a fast and efficient transient expression assay system for characterization of cotton fiber-specific expression genes and promoters as well as test of their function. Cotton ovule culture (0-1 DPA) and β -glucuronidase gene (*GUS*) were used in biolistic transformation experiment. The transient expression vector contains two expression cassettes. *GUS* reporter gene is driven by CaMV35S promoter, the target gene is under control of cotton fiber-specific promoter RDL1. Because *GUS* reporter gene and target gene simultaneously express in single fiber cell, the transient expression assay system could provide an effective method to investigate the relationship between the expression of target gene and the development process of fiber in transformed single cotton fiber cell. The conditions for bombardment were optimized to enhance the transformation

收稿日期: 2006-09-20

作者简介: 于晓玲 (1979-), 女, 硕士, 助研, lingdang01@126.com; * 通讯作者, mmpeng_2000@yahoo.com

基金项目: 国家重点基础研究发展计划 (973); 2004CB117307

efficiency. The result showed that the highest transformation efficiency of *GUS* was obtained when one day postanthesis (DPA) ovules were applied. The optimal condition for bombardment include helium pressures of 1100 psi, distance of 9 cm and bomb times of twice.

Key words: cotton fiber; particle bombardment; transient expression assay; *GUS*

棉纤维是由胚珠外珠被表皮单细胞发育而成的单细胞表皮毛,纤维细胞起始分化后迅速伸长,一般不再分裂,最终纤维长度可达其直径的数千倍。纤维发育经历四个阶段:分化起始、细胞伸长、次生壁加厚及脱水成熟,分别包含了细胞分化、膨胀和纤维合成等生化过程,因此,棉纤维是研究植物细胞伸长和纤维素生物合成的理想模型^[1]。

棉花纤维的生长发育依赖一系列基因的有序表达。尽管已有数十个棉纤维优势表达基因被克隆^[2],但对棉纤维的发育调控的分子机理还知之甚少,其中一个重要原因是棉花的遗传转化较困难。尽管花粉管通道法^[3]、农杆菌介导法^[4-6]和基因枪法^[7-8]均已在棉花转化方面取得了成功,但由于需要大量的人力和物力,以及转化和生长周期长,大规模进行棉纤维基因功能分析非常困难。由此,许多纤维发育的相关研究借助于酵母^[9-10]、烟草^[11]和拟南芥^[12]等模式生物。然而,这些生物对于表述棉纤维特有的生化和调节过程显然是不充分的,因此有必要建立一套快速简单的棉纤维基因功能鉴定的方法。本研究以 *GUS* 为报告基因^[13],采用棉花胚珠离体培养技术^[14]和基因枪转化法,建立棉纤维发育调控基因的瞬时表达体系,以期对棉花纤维基因及其启动子的研究提供新的技术平台。

1 材料和方法

1.1 质粒 DNA 的提取

试验所用质粒 pRDBI 质粒由本实验室构建, pRDBI 质粒包含 *GUS* 报告基因和目的基因两个表达框,分别置于 CaMV35S 和棉纤维特异启动子 RDL1 的调控之下(图 1)。

Maxipreps 质粒提取试剂盒(Promega 公司)提取,提取后,采用酒精重新沉淀、洗涤质粒 DNA, TE 溶解备用。

1.2 植物转化受体取材时间的选择及材料预处理

供试棉花品种为柯字棉 312(所用材料由国家棉花种质资源中期库提供),以 DOA (day of anthesis,开花当天)和 1 DPA (days postanthe-

sis,开花后 1 天)的子房为外植体,75%乙醇表面灭菌 10 s,95%乙醇浸入处理 90 s 后,快速将子房火焰灼烧,无菌条件下剥离胚珠,接种于 BT^[14] 固体培养基(含 0.25% PhytigelTM)平板,培养皿直径 9 cm,每皿 10 个子房的胚珠(约 200 个胚珠);以供基因枪轰击用。

1.3 基因枪轰击转化受体

基因枪为 BioRad 公司的 PDS-1000/HE Bioblastic 型,试验选用的金粉直径为 1 μm ,氦气压力为 1100 psi,真空压力为 13.75 psi。基因包被的过程:用 50%的无菌甘油,将金粉配置成终浓度为 60 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$ →充分涡旋→50 μL 金粉悬液,按顺序加入 6 μL 质粒 DNA(1 $\text{g} \cdot \text{L}^{-1}$),50 μL 2.5 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 无菌 CaCl_2 溶液,20 μL 0.1 $\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 亚精胺(过滤灭菌,现用现配)→充分涡旋 10 min,静置 1 min,12000 $\text{r} \cdot \text{min}^{-1}$,4 $^{\circ}\text{C}$,3 min→70%乙醇洗涤沉淀一次→无水乙醇洗涤一次→加入 60 μL 无水乙醇,温和振荡悬浮金粉,取 10 μL 上样轰击。轰击条件分别做轰击次数为 1 次和 2 次,轰击距离为 6 cm 和 9 cm 的处理。每种处理至少要做 3 次重复,以未轰击材料 *GUS* 染色为阴性对照。

1.4 棉纤维离体培养

基因枪轰击后的胚珠,无菌条件下立即转入新鲜的 BT 液体培养基上(转接过程中操作要小心,使胚珠漂浮于培养基表面,尽量要胚珠被轰击面朝上),培养基激素配比为 1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 GA_3 和 0.1 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 IAA,32 $^{\circ}\text{C}$,暗培养。取培养 2 d、3 d、4 d、7 d 等不同时期的纤维进行 *GUS* 组织化学分析。

1.5 *GUS* 组织化学检测

参照 Jefferson^[13]的方法进行:将胚珠浸入染色液(50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ pH7.0 磷酸钠缓冲液,1 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ X-Gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl- β -D-glucuronic),0.1% Triton X-100,4 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 亚铁氰化钾,100 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 氯霉素)中,37 $^{\circ}\text{C}$ 振荡培养 4 h,镜检。

2 结果与分析

2.1 轰击参数对转化效果的影响

试验结果表明,使用 1100 psi 的可裂圆片(控制

微弹速度),采用不同的射程时,蓝点在纤维组织中的位置不同。蓝点在射程为 3 cm 时明显较射程为 12 cm 时深入内层细胞,但 3 cm 与 12 cm 射程时,转

化率很低(数据未列出)。6 cm 和 9 cm 射程的瞬间表达蓝点数较高。射程结合轰击次数对比试验,9cm 射程基因枪轰击 2 次时转化率最高(表 1)。

表 1 不同轰击距离和轰击次数对棉花纤维 GUS 表达的影响

Table 1 The effects of bombardment on GUS transient expression under different distancs and times

枪数/皿	轰击距离 /cm	质粒浓度 /($\mu\text{g} \cdot \text{枪}^{-1}$)	金粉浓度 /($\mu\text{g} \cdot \text{枪}^{-1}$)	处理 2 d		处理 7 d	
				转化率/ (个·胚珠 ⁻¹)	转化量/ (个·皿 ⁻¹)	转化率/ (个·胚珠 ⁻¹)	转化量/ (个·皿 ⁻¹)
2	9	1	0.5	8	144	5	16
2	6	1	0.5	7	85	2.1	8
1	9	1	0.5	3	40	1.25	5
1	6	1	0.5	3	34	1.3	4

注:转化率=培养皿中蓝点总数/已转化的胚珠总数。

2.2 外植体取材时间的选择及材料转接对纤维生长的影响

DOA 的胚珠在基因枪轰击后进行纤维培养过程中,90%胚珠逐渐沉入培养基底部,不能生成纤维,而 1 DPA 的胚珠则有 95%以上的漂浮于液

体培养基表面,从而产生纤维;DOA 胚珠轰击后即使长出纤维,7 d 后基本上检测不到蓝色转化纤维。说明基因枪转化法中外植体的取材时间在 1 DPA 较好;棉胚珠经金粉轰击后,转接至液体培养基过程中,如果把胚珠的轰击面接触培养基,

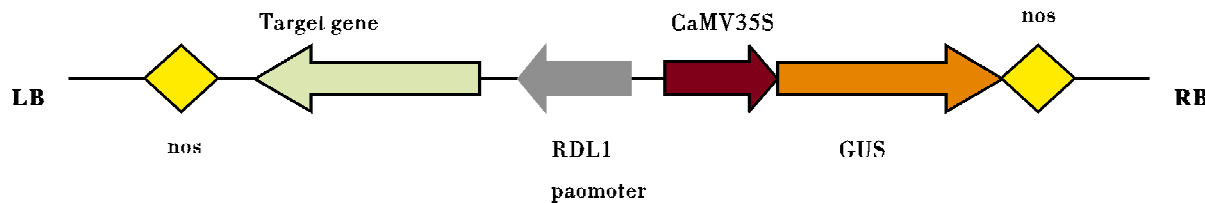
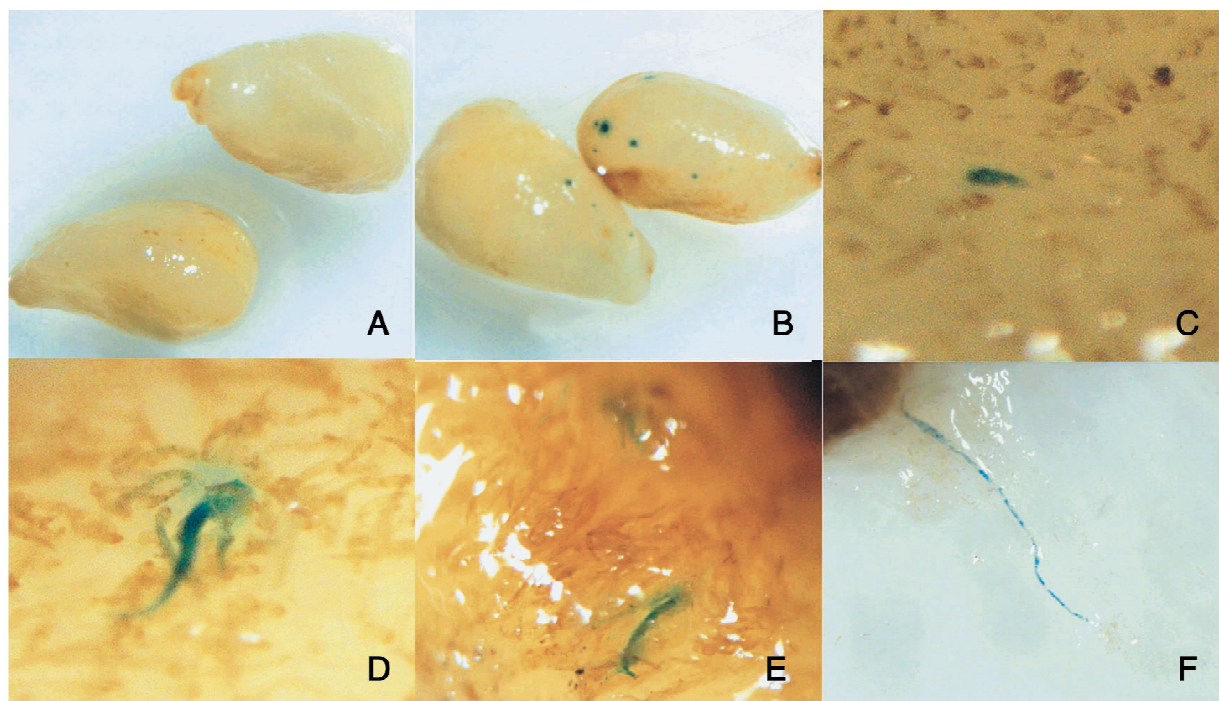


图 1 载体结构图

Fig. 1 The structure of vector



(A) CK, (B,C) 轰击后两天的胚珠, (D) 轰击后 3 天的胚珠, (E) 轰击后 4 天的胚珠, (F) 轰击后 7 天的胚珠

图 2 GUS 组织化学检测

Fig. 2 Histochemical assays for GUS expression in cultured cotton bombarded by pGUS-RDL1

则转化的纤维细胞不再伸长,只有朝向空气的纤维细胞继续发育。

2.3 棉纤维细胞中 GUS 基因的表达

GUS 组织化学检测结果表明,2DPA 的棉花胚珠表皮细胞没有内源 GUS 活性(图 2-A)。DOA 的胚珠在基因枪轰击后 2 d 可检测到 GUS 表达活性,但在 7 d 时基本检测不到;1 DPA 的胚珠在基因枪轰击后 2 d 和 7 d,均可检测到 GUS 表达活性(图 2-B、2-F),但轰击后 2 d 检测时,转化细胞数量多于 7 d 后检测,蓝色细胞数目明显减少,且均为纤维细胞。本试验没有观察到其它表皮细胞有 GUS 表达活性。有趣的是,尽管转化纤维较少(每胚珠最多 20 多个),一些转化纤维却是成束出现的(图 2-D),由于转化率很低,这些纤维来自独立的转化事件的可能性极小。另一个可能性是未分化细胞转化后,经过细胞分裂,然后独立分化成纤维。

3 讨论

棉纤维是大量基因协同有序表达的结果。由于棉花遗传转化周期长,难度大,许多棉纤维基因的功能鉴定首先在拟南芥等模式生物上进行的。然而,尽管棉纤维细胞的起始分化与拟南芥毛刺有相似的调控机制,棉花 MYB 基因甚至可以使拟南芥种皮产生被毛^[12],但对于棉纤维发育的其它 3 个阶段——细胞伸长、次生壁加厚及脱水成熟中,基因功能和调控的研究,拟南芥毛刺模型是无法胜任的,可靠的数据应该来自纤维细胞本身。在合适的培养条件下,棉花离体胚珠的外珠被表皮可以发育成良好的纤维,从形态上看,其发育过程与体内一致。用 GhCesA4 启动子驱动的 GUS 基因作标记,Hee 等发现,GhCesA4 启动子在离体培养的棉纤维中和在棉株上的活性时期是一致的^[15]。因此,我们有可能用离体培养的棉花胚珠,在纤维细胞中瞬时表达棉花基因,从而获知其在纤维发育中的作用。为了有效区分转化和非转化细胞,我们用 35S 驱动 GUS 基因作标记,而外源基因用棉纤维优势表达基因 RDL1^[16]的启动子驱动,因此通过 GUS 组织染色,即可区分出转化外源基因的纤维细胞。

胚珠表皮细胞的有效转化是问题的关键。农杆菌介导法可以很好地保持基因的完整性,使标记基因和目的基因在同一细胞中表达。但由于胚珠是在 BT 液体培养基中培养,经过农杆菌侵染、

洗涤等处理后,大部分胚珠沉入培养基底部,不能形成纤维,故本试验选用基因枪法。

受体细胞内在因素和基因枪转化参数是影响基因枪转化频率的两个主要因素:(1)植物细胞内在因素包括外植体种类和细胞的生理状态等。开花后 0-1 d 是棉纤维细胞的起始时期,此时胚珠表皮细胞基本完成分化,本试验研究对象是棉花纤维细胞,所以试验初步选择 0-1 DPA 的棉花胚珠作为受体。以 DOA 的胚珠为材料,DOA 胚珠轰击后易沉入培养基中,不能生成纤维,而 1 DPA 的胚珠表面纤维细胞已完成分化,并开始伸长,金粉的伤害不会对纤维的生长造成太大的影响,故本试验最终选用 1 DPA 的胚珠作为基因枪轰击的受体材料。(2)本试验就微弹射程、每皿轰击次数等参数对转化效率的影响进行了研究。根据目的细胞在材料中位置的不同来选择气压和射程,棉花成纤维细胞是位于胚珠表皮的一种特化细胞,基因枪轰击时,在气压 1100 psi 及较远的射程(9 cm)转化效果比较理想;合适的轰击次数可以提高转化效率,轰击次数越多,转化效率越高,但对受体细胞的伤害也会相应增加,基因枪轰击一次的成本也越高。因此,确定基因枪轰击射程和次数要对各种因素进行综合考虑。但同时,基因枪转化法本身存在的缺陷——转化率比较低,其原因是基因枪转化法随机性比较强,金粉微粒都是随机射入一定范围内的受体细胞中,这就出现胚珠上蓝点数量多可达 20 多个,少则没有蓝点分布;在微弹射入范围外的胚珠上亦没有蓝点。

基因枪法转化后棉胚珠经过 2-7 d 的培养后进行 GUS 组织化学检测,表明:处理 7 d 的纤维染成蓝色的数量较处理 2 d 的胚珠表面蓝点数量相对少很多。原因可能是目的基因转入已经分化的纤维细胞后,在随后几天内,外源基因即使没有整合到基因组中,亦可得到瞬时表达,蓝点数目较多;随着时间的迁移,只有整合到基因组中的目的基因可继续、稳定的表达,其他的目标基因丢失,组织化学检测不到,蓝色纤维数量减少,造成表 1 的结果。

参考文献:

- [1] KIN H J, Triplett B A. Cotton fiber growth in *planta* and in *vitro*: models for plant cell elongation and cell wall biogenesis [J]. *Plant Physiol*, 2001, 127

- (4):1361-1366.
- [2] 胡根海,喻树迅. 棉花基因克隆研究进展[J]. 棉花学报,2005,17(4):240-244.
- [3] 邓德旺,郭三堆. 棉花花粉管通道法转基因的分子细胞学机理研究[J]. 中国农业科学,1999,32(6):113-114.
- [4] FIROOZABADY E, DeBoer D, Merlo D, et al. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) by *Agrobacterium tumefaciens* and regeneration of transgenic plants [J]. Plant Molecular Biology, 1987,10:105-116.
- [5] UMBECK O, Johnson G, Barton K, et al. Genetically transformed cotton (*Gossypium hirsutum* L.) plants [J]. Bio/Technology, 1987,5:263-266.
- [6] ZAPATA C, Park D H, El-Zik K M, et al. Transformation of a Texas cotton cultivar by using *Agrobacterium* and the shoot apex [J]. Theoretical and Applied Genetics, 1999,98:252-256.
- [7] FINER J J, Me Mullen M D. Transformation of cotton (*Gossypium hirsutum* L.) via particle bombardment [J]. Plant Cell Reports, 1990,8(10):586-589.
- [8] MCCABE D E, Martinell B J. Transformation of elite cotton cultivars via particle bombardment of meristems [J]. Bio/Technology,1993,11:596-598.
- [9] 李园莉,孙杰,李春红,等. 棉花微管蛋白基因 GhTub1 在纤维细胞中的特异表达[J]. 中国科学:C 辑,2002,32(5):385-391.
- [10] 李利红,王海云,李彦,等. 棉花微丝结合蛋白基因 GhPFN1 的表达及功能研究[J]. 自然科学进展, 2002, 12(11): 1213-1215.
- [11] HSU C Y, Creech R G, Jenkins J N, et al. Analysis of promoter activity of cotton lipid transfer protein gene LTP6 in transgenic tobacco plants [J]. Plant Sci,1999, 143: 63-70
- [12] WANG Shui, Wang Jia-wei, Yu Nai, et al. Control of plant trichome development by a cotton fiber MYB gene [J]. Plant Cell, 2004, 16, 2323-2334.
- [13] JEFFERSON R A. GUS fusions: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants [J]. EMBO J, 1987,6:3901-3907.
- [14] BEASLEY C A, Ting I P. The effects of plant growth substances on in vitro fiber development from fertilized cotton ovules [J]. Am J Bot, 1973, 60:130-139.
- [15] HEE J K, Marian Y W, Barbara A T. A novel expression assay system for fiber-specific promoters in developing cotton fibers [J]. Plant molecular Biology Reporter, 2002(3): 7-18.
- [16] LI Chun-hong, Zhu Yong-qing, Meng Yu-ling, et al. Isolation of genes preferentially expressed in cotton fibers by cDNA filter arrays and RT-PCR [J]. Plant Sci, 2002,163: 1113-1120. ●