

李 雪, 安胜军, 邵铁梅, 等. 芝麻花粉管介导胰岛素基因的遗传转化[J]. 江苏农业学报, 2016, 32(5): 1013-1017.
doi: 10.3969/j.issn.1000-4440.2016.05.009

芝麻花粉管介导胰岛素基因的遗传转化

李 雪, 安胜军, 邵铁梅, 柴锡庆, 刘 培, 焦 展

(河北化工医药职业技术学院/河北省高校生物反应器与蛋白类药物开发应用技术研发中心, 河北省 石家庄 050026)

摘要: 为建立芝麻油体表达体系这一新型植物生物反应器, 采用花粉管通道法, 将含有胰岛素基因的双元表达载体 PBI121 质粒转入冀黑芝 1 号芝麻。对转化株后代进行卡那霉素筛选、PCR 扩增及 PCR-Southern 杂交检测。结果显示: 胰岛素基因已整合到受体芝麻的基因组 DNA 中, 并获得了 T_5 转化株, 胰岛素基因可以遗传到第 5 代转化株。说明芝麻花粉管介导胰岛素基因的遗传转化油体表达体系可行。

关键词: 芝麻; 胰岛素; 遗传转化; 花粉管通道

中图分类号: S565.303.53 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2016)05-1013-05

Insulin gene transformation into sesame via pollen-tube pathway

LI Xue, AN Sheng-jun, SHAO Tie-mei, CHAI Xi-qing, LIU Pei, JIAO Zhan

(Bioreactor and Protein Drug Research and Development Center of Hebei University/Hebei Chemical and Pharmaceutical College, Shijiazhuang 050026, China)

Abstract: To establish a novel plant bioreactor based on sesame oil body expression system, the binary vector PBI121 containing the insulin gene was transformed into sesame Jiheizhi No.1 via pollen-tube pathway. The transformed plant with Kanamycin resistance was confirmed by PCR amplification and PCR-Southern hybridization. The results showed the insulin gene was integrated into the genome of sesame seeds, and could be passed onto generation T_5 . In conclusion, it is feasible to genetically transform insulin gene into sesame oil body via a pollen-tube mediated pathway.

Key words: sesame; insulin; genetic transformation; pollen-tube pathway

花粉管通道法是指植物授粉后外源基因随着花粉管的萌发进入胚囊, 参与细胞的有丝分裂, 同时整合到受体植物基因组中, 从而达到遗传转化的目的。该方法在 20 世纪 70 年代由中国学者周光宇创建^[1-2], 主要应用于开花植物。自 1983 年周光宇

等^[3]应用该方法转化棉花获得成功, 后来学者在玉米、小麦、水稻、大豆等^[4-11]作物上均用此方法获得了成功, 验证了该方法的可行性, 确定了花粉管通道法在植物遗传转化中的重要地位。

该方法操作简单、成本低廉, 不需要经过组织培养阶段, 不存在植株再生困难的问题, 并且转化后可直接得到转化株种子。相对于其他作物, 芝麻的相关遗传转化研究很少。国内仅甄志高等^[12]一例运用花粉管通道法的报道, 并且转化效率不高。国外利用该方法进行芝麻遗传转化的研究也只有 Were^[13]的报道。因此亟待建立有效的芝麻转基因系统。鉴于芝麻的组织培养和再生技术尚不够成熟, 花粉管通道技术具有一定的应用价值。

收稿日期: 2016-01-29

基金项目: 河北省高等学校科学技术研究重点项目(ZD2010216); 河北省人力资源和社会保障厅 2011 年度河北省人才工程培养项目(35)

作者简介: 李 雪(1979-), 女, 河北赵县人, 硕士, 讲师, 从事植物生物反应器研究。(Tel) 0311-85110352; (E-mail) lixue712@126.com

通讯作者: 安胜军, (E-mail) sjsjan@126.com

胰岛素是控制和治疗糖尿病的重要药物。本研究将胰岛素基因转化冀黑芝 1 号芝麻,建立芝麻的遗传转化体系,并使胰岛素基因和芝麻种子的油体蛋白质融合表达,期望建立芝麻油体表达体系这一新型植物生物反应器,用来生产目的蛋白质。

1 材料和方法

1.1 材料

受体芝麻为河北省农林科学院粮油作物研究所提供的冀黑芝 1 号。

1.2 方法

1.2.1 单株留种方法 初次播种芝麻种子为 T_0 ,花粉管介导后收获种子为 T_1 。 T_1 中随机选取若干种子,经卡那霉素筛选和 PCR 鉴定保留阳性株种子。选取其中 1 株收获的种子若干,进行 PCR 鉴定,留阳性种子,得到 T_2 。同法得到 T_3 、 T_4 、 T_5 。

1.2.2 质粒的构建 含 *NPTII* 报告基因的质粒双元表达载体由本实验中心构建。植物表达载体 pBINOI 为以油菜油体蛋白基因启动子(*NOP*)驱动的 *Ole-Klip27-insulin*,pBINOI 结构如图 1 所示。

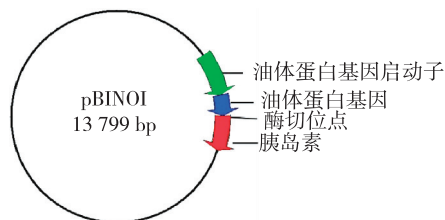


图 1 胰岛素植物表达载体 pBINOI 结构示意图

Fig.1 The structural diagram of insulin plant expression vector pBINOI

1.2.3 质粒 DNA 的提取 质粒 DNA 提取采用 TIANGEN 试剂盒,按照试剂盒说明书操作。

1.2.4 转化方法 花粉管通道转化方法依据刘红艳等^[14]的研究报道操作。用浓度为 50 ng/ μ l、100 ng/ μ l、150 ng/ μ l、200 ng/ μ l 的质粒,分别处理田间种植的开放 4~6 h 的受体材料花 100 朵和温室种植的开放 4~6 h 受体材料花 30 朵。做好标记,成熟后收获 T_1 代种子。统计蒴果率(蒴果率=处理花数/结实花数 \times 100%)、百粒质量。

1.2.5 芝麻转基因后代卡那霉素吸收筛选 用蒸馏水配制浓度为 0 mg/L、50 mg/L、100 mg/L、200 mg/L、300 mg/L、400 mg/L、500 mg/L、600 mg/L、

700 mg/L、800 mg/L、900 mg/L、1 000 mg/L、1 500 mg/L、2 000 mg/L、2 500 mg/L 的卡那霉素筛选溶液备用。将 0.1 g 芝麻种子分别置于上述不同浓度的卡那霉素溶液中浸种催芽 4 d,然后观察种子发芽情况。重复 3 次,确定卡那霉素筛选的临界值,用于转基因植株后代种子的卡那霉素吸收筛选。

1.2.6 PCR 鉴定 经花粉管通道法将胰岛素基因导入受体材料后,收获 T_1 代转化植株的种子,卡那霉素吸收筛选后,种植于温室。待长至 2 片真叶时,提取芝麻基因组 DNA。用胰岛素基因的特异性扩增引物,进行 PCR 扩增。上游引物 pOI2-5 为:5'-C-GGGGTACCTCGTCTAAATTTTCAGCCTATCGACG-3',下游引物 pOI2-6 为:5'-CGAGCTCTTAGTTGCA-GTAATTTTCTAG-3'。扩增程序为:95 $^{\circ}$ C 10 min;95 $^{\circ}$ C 1 min,60 $^{\circ}$ C 1 min,72 $^{\circ}$ C 50 s,72 $^{\circ}$ C 10 min,30 个循环。

1.2.7 探针的制备及 PCR-Southern 杂交检测 探针制备、探针效率检测及 PCR-Southern 杂交均依照 Roche 公司的 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II 试剂盒说明书操作。

1.3 数据分析

所得数据采用 DPS 系统分析。

2 结果与分析

2.1 质粒浓度对受体材料结蒴率的影响

4 种不同浓度的 pBINOI 质粒分别处理大田种植受体材料冀黑芝 1 号 100 朵花和温室种植的受体材料冀黑芝 1 号 30 朵花,共操作 520 朵花,收获后统计蒴果数、百粒质量(表 1)。从表 1 可以看出,温室中处理的蒴果率明显高于大田,但大田中收获的种子百粒质量较高。

表 1 不同质粒浓度处理的受体芝麻结蒴率

Table 1 The seed setting rate of sesame treated with different concentrations of plasmid

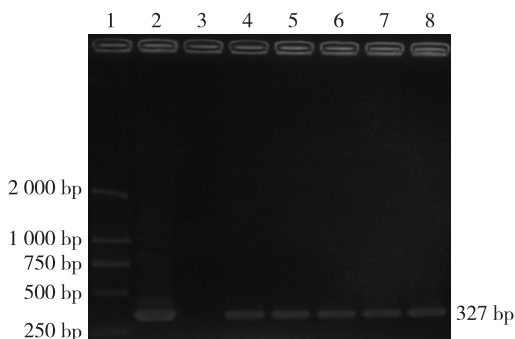
质粒浓度 (ng/ μ l)	大田			温室		
	处理 花数	蒴果率 (%)	百粒质量 (g)	处理 花数	蒴果率 (%)	百粒质量 (g)
50	100	39	0.25	30	60	0.16
100	100	42	0.23	30	50	0.15
150	100	43	0.26	30	57	0.15
200	100	28	0.21	30	43	0.10

2.2 卡那霉素抗性筛选临界值的确定

用 0~500 mg/L 卡那霉素浸种催芽 4 d, 发芽种子的根系长度基本一致; 而当卡那霉素浓度达到 600 mg/L 时, 发芽种子根系明显变短, 并且下胚轴严重弯曲; 当卡那霉素浓度达到 2 500 mg/L 时, 发芽种子基本没有根系。所以选定卡那霉素浓度 600 mg/L 为种子卡那霉素抗性筛选的临界值。

2.3 PCR 扩增鉴定

PCR 扩增结果(图 2)表明, $T_1 \sim T_5$ 代植株基因组中均扩增到与阳性对照质粒同样大小的片段, 而且片段大小与胰岛素目的基因片段大小一致, 均为 327 bp。由此证明: 外源基因已经整合到芝麻基因组中, 并且遗传到了后代。



1: Marker; 2: 阳性对照; 3: 阴性对照; 4~8: $T_1 \sim T_5$ 代植株样品。

图 2 转胰岛素基因芝麻植株的 PCR 扩增

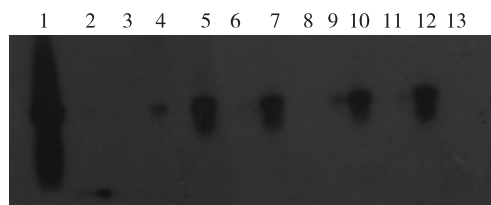
Fig.2 PCR assay of transgenic sesame plants with insulin gene

2.4 PCR-Southern 杂交鉴定

为了排除 PCR 假阳性样品, 将 PCR 阳性产物转于膜上, 用胰岛素基因特异探针与其杂交, 结果显示部分样品假阳性, 但还有部分样品(5、7、10、12)的 PCR 产物有很强的杂交信号, 4、9 号样品的杂交信号明显可见(图 3), 证明这 6 个样品的胰岛素基因已经整合进冀黑芝 1 号芝麻基因组 DNA 中。

2.5 转基因后代卡那霉素抗性遗传性状分离的卡方检验

6 个 PCR-Southern 阳性植株 T_1 代成熟结实后收获种子, 通过百粒质量和总质量计算共获得约 20 000 粒种子。每个株系随机抽取 50 粒种子, 用 600 mg/L 卡那霉素筛选。对卡那霉素抗性和非抗性种子观察值进行统计, 分析转基因后代的遗传规律。卡方适合性检验结果(表 2)显示, 卡那霉素抗性和非抗性性状的分离不符合 3:1 的分离规律, 说



1: 阳性对照; 2~12: 转化植株 T_1 代; 13: 阴性对照。

图 3 T_1 代转基因植株 PCR-Southern 杂交检测结果

Fig.3 Detection of T_1 transgenic plants by PCR-Southern blotting

明此 6 株阳性植株胰岛素基因为非单位点插入, 胰岛素基因没有作为显性基因遗传给后代。因为花粉管通道法和其他转化法基因整合类似, 均是随机整合进植物基因组中的, 因此外源基因在转化后代中的遗传呈多样化。而转基因的分离方式与基因的插入方式和拷贝数有关, 多拷贝数整合会导致基因分离的复杂性, 直接影响转基因后代孟德尔遗传规律的符合性。

表 2 T_1 代单株种子卡那霉素抗感的 χ^2 检验

Table 2 χ^2 test to kanamycin resistance and susceptibility of regenerated plants T_1

株系	筛选种子总数	卡那霉素抗、感种子数比例	理论值	P 值
1	50	10:40	37.5:12.5	0
2	50	3:47	37.5:12.5	0
3	50	6:44	37.5:12.5	0
4	50	2:48	37.5:12.5	0
5	50	8:42	37.5:12.5	0
6	50	9:41	37.5:12.5	0

2.6 转基因植株后代遗传稳定性分析

采用单株留种检测方法检测转基因芝麻 T_1 、 T_2 、 T_3 、 T_4 、 T_5 代植株(表 3)。从表 3 中可以看出连续 5 代检测到胰岛素基因, 说明胰岛素基因保持了在后代植株中的遗传传递性。但胰岛素基因在后代中遗传传递率的不稳定性现象也是存在的。由表 3 可知, T_1 代转基因植株的遗传传递率为 30.0%, 而到了 T_2 代其遗传传递率下降了很多, 仅为 15.0%, T_3 代转基因植株的遗传传递率仅有 5.0%, 从 T_4 代开始遗传传递率又开始回升。导入的胰岛素基因随世代的递增, 遗传传递率呈现无规律变化, 可能是由于

胰岛素基因在芝麻自花授粉繁殖过程中存在基因沉默或丢失的现象, T_5 代转基因株系还未表现出稳定性。

表 3 芝麻转胰岛素基因植株后代的 PCR 检测

Table 3 Positive progenies of insulin-transgenic sesame plants by PCR

世代	检测总数	阳性数	遗传传递率或分离比 (%)
T_1	586	175	30.0
T_2	120	18	15.0
T_3	832	42	5.0
T_4	56	21	37.5
T_5	117	49	41.9

3 讨论

卡那霉素即新霉素磷酸转移酶基因 (*npt II*) 是目前植物基因工程中被广泛应用的选择标记^[15-16]。选择标记的作用是在合适的选择压力下将转化子筛选出来。因卡那霉素能干扰一般植物细胞叶绿体及线粒体的蛋白质合成, 引起植物绿色器官的黄化, 最终导致植物细胞的死亡。而真正的转化体含有卡那霉素抗性基因, 能顺利地通过卡那霉素筛选。所以卡那霉素筛选中一般通过观察转化体的叶片颜色, 来判断转化体是否为转化植株。利用卡那霉素培养基筛选转基因种子, 是一个有效的方法。在预试验中采用了卡那霉素培养基筛选种子, 结果显示卡那霉素浓度高达 3 000 mg/L 时才能对普通种子产生抑制, 说明芝麻种子对卡那霉素有高度的耐性, 不适合本研究中应用, 因此采用了卡那霉素浸种法进行筛选鉴定。

卡那霉素浸种筛选法是近年来出现的。扈玉婷等^[17]、孙锋等^[18]研究发现不同浓度的卡那霉素溶液可以用于转基因植株种子的筛选鉴定。吕孟雨等^[19]证明 150 mg/L 卡那霉素溶液对玉米转基因后代种子的筛选准确度达到了 84.8%。王丕武等^[20]发现 300 mg/L 卡那霉素处理后大豆幼苗主根明显变短, 并且无侧根。本研究中 600 mg/L 卡那霉素浸种处理后, 芝麻发芽种子主根也明显变短, 并且弯曲严重。因此可以将主根明显变短这个指示性状, 作为大量转化体的初步筛选指标, 以减少转基因后代的筛选工作量。而李乃坚等^[21]也提出卡那霉素浸种是前期筛选转基因材料的有效措施。

植株结实率是影响花粉管通道法转化效率的因素之一, 而结实率的影响因素较多。在温室因受光照、通风等条件的限制, 结实率远远低于大田自然环境的结实率。为了在较短的时间内获得大量转基因材料, 可以在大田环境下进行花粉管通道法转化。本研究中花粉管通道转化实施时间依据是刘红艳等^[14]的报道, 最佳转化时间的确定还需要更多的试验。

转基因植株后代分离模式复杂, 有的符合孟德尔遗传规律, 有的则偏离, 这与在其他作物^[22-24]上的研究结果一致。本研究中胰岛素基因在转基因芝麻后代的遗传不符合孟德尔规律, 这可能与胰岛素基因在受体染色体上的插入位点和拷贝数有关。外源基因随机整合和多拷贝导致其遗传后代分离不稳定。本研究中外源基因在 T_5 代仍未达到遗传稳定性, 而是随着世代的增加其遗传传递率出现先下降后上升的现象。至于胰岛素基因能否在 T_5 以后的世代中稳定遗传, 还需继续观察。

参考文献:

- [1] 周光宇, 翁 坚, 龚蓁蓁, 等. 农业分子育种—授粉后外源 DNA 导入植物的技术[J]. 中国农业科学, 1988, 21(3): 1-6.
- [2] 龚蓁蓁, 沈慰芳, 周光宇. 授粉后外源 DNA 导入植物的技术—DNA 通过花粉管通道进入胚囊[J]. 中国科学(B), 1988(6): 611-614.
- [3] ZHOU G Y, WONG J, ZENG Y, et al. Introduction of exogenous DNA into cotton embryos[J]. Method in Enzymology, 1983, 101(8): 433-481.
- [4] 谢道昕, 范云六, 倪万潮, 等. 苏云金芽孢杆菌杀虫基因导入棉花获得转基因植株[J]. 中国科学(B), 1991(4): 366-373.
- [5] 郭三堆, 崔洪志, 夏兰芹, 等. 双价抗虫转基因棉花研究[J]. 中国农业科学, 1999, 32(3): 1-11.
- [6] 倪万潮, 郭三堆, 贾士荣. 花粉管通道法介导的棉花遗传转化[J]. 中国农业科技导报, 2002, 2(2): 27-31.
- [7] BOOY G, KRENS F A, HUIZING H. Attempted pollen mediated transformation of maize [J]. Plant Physiol, 1989, 135(3): 319-324.
- [8] LUO Z, WU R. A simple method for transformation of rice via the pollen-tube pathway[J]. Plant Mol Bio Reports, 1988, 6(3): 165-174.
- [9] 孟钊红, 焦改丽, 张焕祥, 等. *GUS* 基因在转基因棉花细胞中的表达及其与 *NptII* 基因、*Bt* 基因表达的相关性[J]. 棉花学报, 2001, 13(4): 243-246.
- [10] 李付广, 崔金杰, 刘传亮, 等. 双价基因抗虫棉及其抗虫性研究[J]. 中国农业科学, 2000, 33(1): 46-52.
- [11] 焦改丽, 李俊峰, 李燕娥, 等. 利用新的外植体建立棉花高效

- 转化系统的研究[J]. 棉花学报, 2002, 14(1):22-27.
- [12] 甄志高, 段 莹, 王晓林, 等. 导入外源 DNA 进行芝麻抗性育种的研究[J]. 中国油料作物学报, 2004, 26(2):31-34.
- [13] WERE, B.A. Genetic Improvement of oil quality in Sesame (*Sesamum indicum* L.); assembling tools[D]. Alnarp: Swedish University of Agricultural Sciences, 2006.
- [14] 刘红艳, 赵应忠. 芝麻花粉附着、萌发与花粉管伸长过程研究[J]. 中国油料作物学报, 2011, 33(2):130-134.
- [15] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 2 版. 北京: 科学出版社, 2002:527-528.
- [16] 王紫萱, 易自力. 卡那霉素在植物转基因中的应用及其抗性基因的生物安全性评价[J]. 中国生物工程杂志, 2003, 23(6):9-13.
- [17] 扈玉婷, 泮玉竹. 卡那霉素浸种对盐芥幼苗生长的影响[J]. 现代农业科技, 2009(12):23-24.
- [18] 孙 锋, 张宽朝, 林 毅. 利用卡那霉素浸种法鉴定抗虫棉[J]. 中国种业, 2006(7):31-32.
- [19] 吕孟雨, 董福双, 张俊敏, 等. 转基因玉米抗卡那霉素筛选方法研究[J]. 西南农业学报, 2010, 23(6):1895-1899.
- [20] 王丕武, 张晓玲, 魏晓明. 卡那霉素(Kanamycin)对大豆种子发芽的影响[J]. 吉林农业大学学报, 1996, 18(4):18-21.
- [21] 李乃坚, 袁四清. 卡那霉素胁迫对转基因烟草种子发芽的影响[J]. 广东农业科学, 1998, 5(4):13-25.
- [22] 吴家和, 张献龙, 罗晓丽, 等. 转新型双抗虫基因棉花的遗传分析[J]. 遗传学报, 2003, 30(7):631-636.
- [23] 江绍玫, 朱速松, 刘世家, 等. 水稻谷蛋白突变体的筛选及遗传分析[J]. 遗传学报, 2003, 30(7):641-645.
- [24] 张 勇, 杨宝玉, 陈士云. 抗除草剂转基因大豆后代遗传分析[J]. 遗传学报, 2006, 33(12):1105-1111.

(责任编辑:张震林)