

## 用微弹轰击法将 GUS 基因导入小麦的完整细胞

吴琴生 姚国顺 麦克·琼斯 刘大钧

(南京农业大学, 南京)

微弹轰击法将外源DNA导入小麦(*Triticum aestivum*)未成熟胚和悬浮细胞系的完整细胞。用pCI GUS作报告基因,质粒DNA涂于钨粉微弹表层,用基因枪轰击使微弹穿透细胞壁进入小麦细胞。处理2天后,用X-glucuronide染色,对GUS基因产物的活性进行鉴定,GUS基因表达的细胞呈深蓝色的小点。小麦幼胚表面的蓝点最多可达40~50个,悬浮细胞系中GUS基因表达的细胞较少。试验表明微弹轰击法是小麦组织水平上进行外源基因导入的一个有效途径。试验对微弹轰击的有关参数及条件进行了讨论。

**关键词** 小麦(*Triticum aestivum*); 基因导入; 基因瞬间表达; 微弹轰击

近年来,应用现代生物技术将外源DNA导入植物细胞,进行作物新品种的培育已有了很大发展<sup>[1]</sup>。但仅以双子叶植物为主,对小麦等重要粮食作物来说仍相当困难。Klein等<sup>[2]</sup>,Sanford等<sup>[3]</sup>提出将DNA涂于钨粉微粒外层,并高速轰击植物组织,使之穿透细胞壁从而携入外源DNA的新技术,称为微弹轰击(Micro-projectile bombardment)。用这个方法最近在玉米<sup>[4]</sup>水稻和一粒小麦<sup>[5]</sup>、大豆<sup>[6]</sup>等作物的基因导入及表达研究中已取得了成功。我国石和平等<sup>[7]</sup>也用此法将外源基因导入了水稻愈伤组织,但有关普通小麦的研究工作目前还做得很少。本文报道作者在英国洛桑试验站进行研究访问期间用微弹轰击法,对小麦未成熟胚和悬浮细胞系进行 $\beta$ -葡萄糖醛酸酶( $\beta$ -glucuronidase(GUS))基因的导入及其成功表达的研究。

### 材料与 方法

#### (一) 植物材料

取小麦品种Timmo和Sicco开花10—

14天后的未成熟胚,在MS盐加3%蔗糖,1mg/L 2,4-D的固体培养基上培养1周。小麦悬浮细胞系(C82d)在MS盐加3%蔗糖1mg/L 2,4-D的液体培养基中每周继代一次,并在基因导入处理前1周将细胞团移至相同成份的固体培养基上生长。用双子叶植物马铃薯块茎碟片(*Solanum tuberosum*)作为GUS基因表达的正对照试验。为在轰击后便于移入染色液处理,植物组织培养时均放在直径为3.5cm的硝酸纤维素滤膜上(孔径45 $\mu$ m),每个培养皿有20个小麦未成熟胚或适量悬浮细胞团均匀放置于滤膜中央。

#### (二) 微弹处理

钨粉微粒直径平均约1.1 $\mu$ m左右,在其表层用质粒DNA涂包的方法与Gordon<sup>[4]</sup>等报道的基本相同仅略有修改:称取1.25mg钨粉,在微量离心管中用1ml无水酒精灭菌10min左右,离心后吸去酒精,在超净台上空气干燥。小麦基因导入所用的质粒为pCI GUS<sup>[8]</sup>,它携带一个由CaMV 35S启动子控制的乙醇脱氢酶内

本文于1991年3月18日收到。

含子-1和GUS结构基因及nos的3'调控区组成的嵌合基因(图1)。吸取25 $\mu$ g无菌质粒DNA(1 $\mu$ g/ $\mu$ l)与离心管中的钨粉混合,再加入500 $\mu$ l 1.1mol CaCl<sub>2</sub>和50 $\mu$ l 100mmol亚精胺然后在4℃下振动混合10min,再用500g离心5min后,吸去550 $\mu$ l上清液,留下25 $\mu$ l钨粉与DNA的混合液作为微弹。试验用的基因枪由英国剑桥Shearline公司制造。植物目标组织小麦未

成熟胚、悬浮细胞团及对照处理马铃薯块茎碟片分别置于轰击室中制止盘下方4或8cm处,吸取2.5 $\mu$ l微弹悬浮液滴在塑料弹前部,并装入枪管约4.0~4.5cm深。加速微弹用的无弹头小口径子弹型号为Winchester-Olin Gray Powder Charge Level 1, East Alton, IL62024, USA。轰击室密封后,再用真空泵抽至28mm水银柱大气压,然后进行击发。

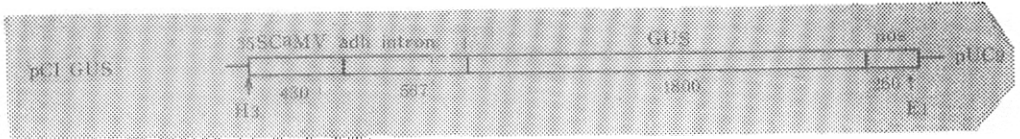


图1 pCI GUS质粒结构图

Fig.1 1:Map of the plasmid pCI GUS

### (三) GUS基因的表达

植物组织经微弹轰击处理后,在25℃黑暗中培养2~3天。鉴定GUS基因产物的染液成份为:0.1mol磷酸缓冲液(pH 7.0)、10mmol EDTA、0.5mmol铁氰化钾、0.5mmol亚铁氰化钾、2.0mmol X-葡萄糖醛酸酐(5-bromo-4-chloro-3-indolyl glucuronide)。将硝酸纤维素滤膜连同植物组织一起移入3.5cm的无菌培养皿,加入1ml染液,置于37℃水浴中培养12~24h,在显微镜或解剖镜下观察GUS基因产物染成的深蓝色小点。

## 结果与讨论

经过轰击的目标植物组织用GUS-染液培养12—24h后,在小麦未成熟胚、悬浮细胞团及正对照处理组马铃薯块茎碟片上都可看到深蓝色的小点,未经轰击处理或经轰击但无DNA的组织则不显示蓝点。在小麦未成熟胚和马铃薯块茎碟片中GUS基因的蓝色产物明显限于单个细胞中(图版I-A-C),且没有蓝色背景。而

在小麦悬浮系中则可见有单个细胞及至若干个细胞的细胞团显示深蓝色,这可能是悬浮系细胞在培养过程中发生分裂的结果,在悬浮细胞中还偶而出现扩散至相邻细胞的浅蓝色背景,但这种背景很容易与GUS基因产物的深蓝色相区别。

对染色后出现的蓝点数统计的结果表明,受到微弹轰击的小麦未成熟胚上所观察到的蓝点数目最高每个达40~50个(图版I-A, B),平均12个左右。而悬浮系细胞团上的蓝点数目要低得多,每个培养皿最长达36个,导致这种差异的原因可能是这两种外植体材料的生理状态彼此不同,在悬浮培养系的细胞团中含有较多的空瘪细胞。试验中还观察到,微弹轰击后在目标组织上的分布不均匀,往往是集中在目标培养皿的某一部位。各处理间微弹集中的部位及分布面积也不相同,因此不是全部植物组织能受到轰击。试验中,大部分GUS基因的表达出现在目标组织距制止盘4cm处,有时用250 $\mu$ m孔径的不锈钢筛置于目标组织与制止盘间,可避免高速气流将植物组织搅乱。

本试验结果清楚地表明了, GUS 基因可通过微弹轰击法导入小麦组织的完整细胞并成功表达。而植物材料的生理状态和目标组织与靶组织的距离是导入基因的重要因素。这一方法为目前用农杆菌为载体或通过原生质体进行基因导入后再生植株尚有困难的小麦来说提供了一个进行基

因转化的新手段。将微弹轰击法用于小麦未成熟胚、幼穗或花药的愈伤组织等再生能力强的材料, 并采用良好的标记基因如抗生物素、抗除草剂基因等进行选择, 则可望较快地获得小麦的外源基因转化植株。

### 参 考 文 献

- [1] 刘大钧、翁益群: 南京农业大学学报, 13(3):1-12, 1990.
- [2] Klein T.M, et. al.: *Nature*, 327:70-73, 1987.
- [3] Sanford, J.C. et. al., *J.Part.Sci.and Tech.*, 5:27-37, 1987.
- [4] Gordon-Kamm W.J. et al.: *The Plant Cell*, 2:603-618, 1990.
- [5] Wang Y-C et. al.: *Plant Mol. Biol.*, 11:433-439, 1988.
- [6] McCabe D.E.et.al.: *Bio/Technol.*, 6:923-926, 1988.
- [7] 石和平等: 中山大学学报(自然科学)论丛, 8(4):163-165, 1989.
- [8] Lee B.et.al.: *Plant Mol.Biol.*, 13:21-29, 1989.

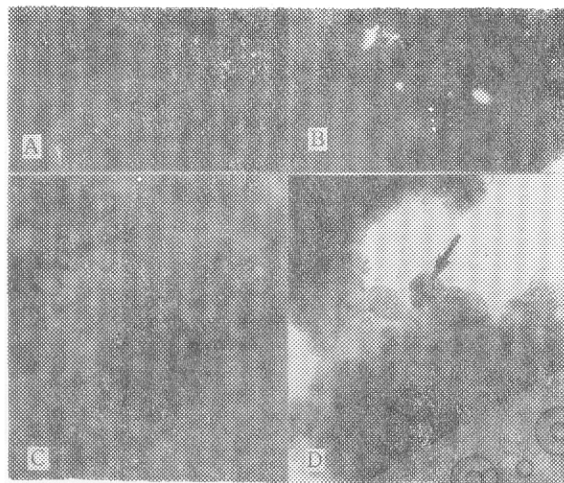
## Transferring GUS Genes into Intact Cells of Wheat by Microprojectile Bombardment

Wu Qinsheng Yao Guoshun Mike Jones Liu Dajun  
(Nanjing Agricultural University, Nanjing)

Foreign DNA had been introduced into intact cells of cultured immature embryos and suspension culture cells of wheat (*Triticum aestivum*), by microprojectile bombardment. Tungsten particles were coated with reporter gene pCI GUS, and passed through cell wall by using a particle gun. Two days after bombardment, activity of GUS product was detected by staining with X-glucuronide. The cells expressing  $\beta$ -glucuronidase gave intense blue coloured spots. Up to 40-50 blue spots showed on the surface of an immature embryo of wheat, but less spots in suspension cells. This approach presents an alternative method to transfer foreign genes into cells of wheat tissue. Some bombardment parameters and conditions were discussed.

### Key words

Wheat (*Triticum aestivum*); gene transfer; transient gene expression; microprojectile bombardment



A, B. 用GUS基因进行微弹轰击后小麦未成熟胚显示的蓝点多达40—50个。

The wheat immature embryo with up to 40—50 blue spots after bombardment with GUS gene

C. 对照处理马铃薯块茎碟片上深蓝色的单个细胞  
Individual dark blue cell observed in potato tuber disc after bombardment

D. GUS基因表达的蓝色小麦悬浮系细胞团。  
Blue cells of wheat cell suspension which expressed GUS gene