

基因枪作用下的外源 GUS 基因在 四种红藻组织块中的瞬间表达

TRANSIENT EXPRESSION OF GUS GENE IN FOUR TISSUES OF RHODOPHYTES USING BIOLISTIC PARTICLE DELIVERY SYSTEM

匡梅 王素娟

(上海水产大学渔业学院, 200090)

KUANG Mei, WANG Su-Juan

(Fisheries College, Shanghai Fisheries University, 200090)

李瑶 沈大

(复旦大学遗传学研究所, 上海 200433)

LI Yao, SHEN Da-Leng

(Institute of Genetics, Fudan University, Shanghai 200433)

曾呈奎

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

ZENG Cheng-Kui

(Institute of Oceanology, CAS, Qingdao 266071)

关键词 基因枪, 仙菜, 真江蓠, 龙须菜, 蜈蚣藻, β -葡萄糖苷酸酶基因, 瞬间表达

KEYWORDS Biolistic particle delivery system, *Ceramium tenuissimum*, *Gracilaria asiatica*, *Gracilaria lemaneiformis*, *Graciloupia filicina*, Gus Transient expression

建立合适的外源基因转移系统是大型海藻基因工程的一个重要研究内容。外源基因在大型海藻组织中的瞬间表达可以确定外源基因是否导入海藻组织及研究影响导入的各种因素, 以此来建立合适的 DNA 导入系统。迄今, 秦松等[1994]对海带的遗传转化进行了研究, 用基因枪将 *gus* 导入海带假根和裙带菜中肋获得瞬间表达, *cat* 和 *LacZ* 在海带中获得稳定表达(个人通讯)。在大型红藻中, Cheney 和 Kurtzman 等[1990]首次以摘要的形式报道了用基因枪将 *gus* 导入长心卡帕藻(*Kappaphycus alvarezii*)中得到瞬间表达; Kubler 等[1994]第一次正式报道了电击法在紫菜外源基因导入中的运用; 同年, 王素娟等[1994]在坛紫菜(*P. haitanensis*)中也试用了电击法, 获得了 *gus* 的瞬间表达。Shen 和 Wu[1995]通过基因枪轰击获得了具有氯霉素抗性的细基江蓠组织块嵌合体。

蜈蚣藻(*Graciloupia filicina*)、龙须菜(*Gracilaria lemaneiformis*)、真江蓠(*Gracilaria asiatica*)和仙菜(*Ceramium tenuissimum*)是重要的经济红藻, 具有组织切段再生能力强的特点。本文以这四种红藻的组织切段为材料, 利用基因枪将外源 *gus* 直接导入其中, 研究大型红藻中外源基因导入方法与 CaMV35S 启动子在其中的通用性。

1 材料和方法

1.1 实验材料

蜈蚣藻、龙须菜和仙菜于 1996 年 2 月及 1997 年 2 月采自青岛太平角, 真江蓠于 1997 年 4 月采于山东日照。用消毒海水反复刷洗健康藻体, 培养于 18°C 左右, $40\ \mu\text{mol s}^{-1}\text{m}^{-2}$, 12L:12D, 比重为 1.023 的海水中。实验切取蜈蚣藻组织块(宽 0.3~0.5cm, 长 0.75cm)42 块, 龙须菜组织块(直径 0.2~0.4cm, 2~0.4cm,

长 0.75cm)60 块, 真江藻组织块

仙菜组织切段 0.15 克, 约 1 500 块(直径 20~50 μm, 长 200~500 μm)。

1.2 质粒 DNA 抽提

采用改进的碱裂解法[Sambrook 等 1989], 即增加 7.5M NH₄Ac 纯化一步。经琼脂糖凝胶电泳估计浓度, 调整至 1 μg/μL。所用质粒是 pBI121 和 pCAMBIA1301(图 1, 在 gus 的启动子和编码区之间含有一段 intron), 均以 CaMV35S 为启动子, GUS 为报告因子, 由复旦大学遗传工程国家重点实验室提供。

1.3 微粒子轰击

取组织块平铺于 9cm 培养皿中心直径 3cm 范围内。

DNA 处理: 金粉(微粒半径 1 μm)经处理悬浮于 50 μL 无菌水, 加 5 μL 质粒 DNA(1 μg/μL), 50 μL 2.5M CaCl₂, 20 μL 亚精胺, 混匀, 离心, 去上清, 用无水乙醇洗一次, 悬浮于 50 μL 无水乙醇, 待用。

采用美国 Bio-Rad 公司的 PDS1 000/ He 型微粒子轰击系统(Biolistic Particle Delivery System), 选择压力膜分别为 1 300Psi(蜈蚣藻、龙须菜和真江藻)和 1 100Psi(仙菜), 距离 6cm, 每次轰击取 10 μL 上述悬浮于无水乙醇的金粉, 每皿样品轰击两次, 分别取各试验材料的 1/3(即 14 块蜈蚣藻, 20 块龙须菜和真江藻, 以及约 0.05 克(500 块)仙菜组织切段)作为对照, 以未包裹质粒的金粉轰击两次, 轰击后约 1 小时加入消毒海水, 弱光(10 μmols⁻¹m⁻²)培养。分别于轰击后 24、48 和 72 小时及 5 和 13 天(仙菜)及 4、6、11、16 和 21 天(真江藻)后检测 gus 表达。

1.4 GUS 测定

按 Jefferson 等[1987] 的方法, 染液成份为: 0.1M 磷酸缓冲液(pH = 7.0), 0.5mM 铁氰化钾, 10mMN_a2EDTA, 0.3%(w/v)X-葡萄糖醛酸甙(X-Gluc), 37℃染色过夜, 经脱色后, 显微镜(× 100)下观察, 必要时剖开组织块观察。

2 结果与讨论

两种质粒: pBI121 和 pCAMBIA1301 转化后的 24 和 48 小时(包括真江藻转化后 72 小时)均检测到 gus 瞬间表达结果(表 1)。由表 1 可知, 所有染色的对照组组织块, 均无蓝色背景或斑点。质粒 pBI121 转化的实验组出现明显的蓝色斑点, 位于表皮下的皮层细胞, 蜈蚣藻中斑点大小为该组织块面积的 0.004%, 切面蓝色更加明显(图版-1); 龙须菜组织块中所染成的蓝色由散开的点构成(图版-3); 在皮层细胞中可见染成蓝色的细胞(图版-2)。

质粒 pCAMBIA1301 转化真江藻, 转化后前三天的转化率合计达 25.0%, 其蓝色斑点与蜈蚣藻中相似(图版-4), 但在外皮层、内皮层和中央髓部大细胞中均出现特征的 GUS 蓝色反应(图版-5), 表达率随时间的变化在转化后第 6 天达到 100%的最高转化率, 并且在第 11 天后表达率第二次增加, 在第 21 天再次达到了 100%的表达峰值(图 2), 我们推测是外源 gus 在与受体的基因组 DNA 进行整合并表达过程中, 但还需进一步的 Southern 印迹和 Western 印迹的验证。质粒 pCAMBIA1301 转化仙菜, 在中轴和围轴细胞中均检测到 GUS 表达(图版-6), 表达率随时间的变化见图 3。在转化后的第五天达到表达的高峰, 随之逐渐下降。

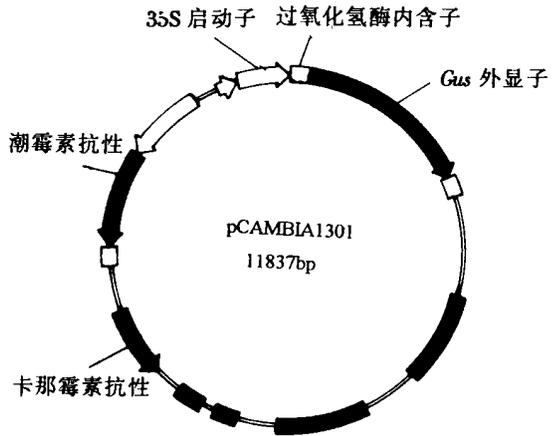


图 1 质粒 pCAMBIA1301
Fig.1 Plasmid pCAMBIA1301

表 1 质粒 pBI121 和 pCAMBIA1301 转化蜈蚣藻、龙须菜和真江蒿的瞬间表达结果

Tab. 1 Transient expression results of *Grateloupa filicina*, *Gracilaria lemaneiformis* and *Gracilaria asiatica* transferred by plasmid pBI121 or pCAMBIA1301

受体	质粒	24 小时	48 小时	72 小时	合计	转化率(%)
蜈蚣藻	pBI121	1/14	3/14	—	4/28	14.3
龙须菜	pBI121	1/20	2/20	—	3/40	7.5
真江蒿	pCAMBIA1301	1/15	3/15	6/10	10/40	25.0
对照		—	—	—	—	—



图版 Plate

1. 质粒 pBI121 转化蜈蚣藻 24 小时后 GUS 检测的蓝色斑点。×134;
2. 质粒 pBI121 转化龙须菜 48 小时后 GUS 在皮层细胞中的表达。×134;
3. 质粒 pBI121 转化龙须菜 48 小时后散开的蓝色 GUS 斑点。×67;
4. 质粒 pCAMBIA1301 转化真江蒿 48 小时后 GUS 蓝色斑点。×67;
5. 质粒 pCAMBIA1301 转化真江蒿在内、外皮层和髓部 72 小时后的 GUS 表达。×134;
6. 质粒 pCAMBIA1301 转化仙菜 72 小时后的表达。×134

质粒 pCAMBIA1301 在 *gus* 的 CaMV35S 启动子和编码区之间含有一段 intron, 该 intron 在真核生物中可被自动剪切而表达 GUS 酶活性; 在原核生物中则不能表达。该种质粒在蜈蚣藻中的转化率为 7.2%。由此可见, 大型红藻——真江蒿、蜈蚣藻和仙菜作为真核生物同样具有将该段 intron 剪切并表达 GUS 酶活性的功能。同时, 检测到的 GUS 蓝色均位于相应的组织块的内、外皮层或髓部细胞中, 表明外源 *gus* 确实转入到了大型红藻真江蒿、蜈蚣藻和仙菜组织块中并表达, 排除了有可能存在于这两种红藻中的共生菌或藻表达外源 *gus* 的可能性, 从而避免了假阳性的产生。

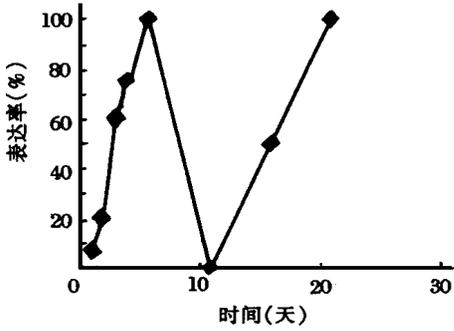


图2 真江蓠 GUS 表达率与时间的关系

Fig. 2 The relationship between the GUS expression rate and time in *Gracilaria asiatica*

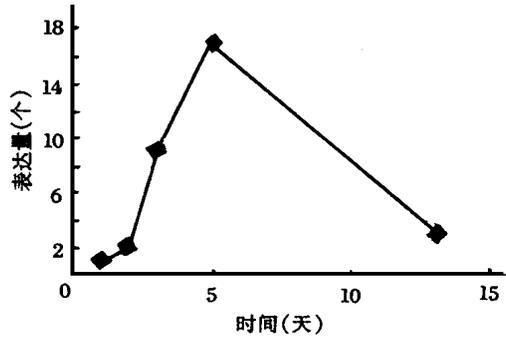


图3 质粒 pCAMBIA1301 转化仙菜的 gus 表达

Fig. 3 The expression of gus in *Ceramium tenuissimum* transferred by plasmid pCAMBIA1301

综上所述, 基因枪可以作为蜈蚣藻、龙须菜、真江蓠和仙菜这四种具较强组织切段再生能力的红藻的有效外源基因导入方法。外源 gus 在基因枪作用下已进入蜈蚣藻、龙须菜、真江蓠和仙菜的组织块中并表达。本文再次证实了 CaMV35S 启动子在海藻中的通用性。

复旦大学遗传工程国家重点实验室资助项目。中国科学院上海植物生理研究所徐淑萍老师在基因枪工作中给予了很多帮助, 上海水产大学何 为老师为本文绘图, 特此致谢。

参 考 文 献

王素娟, 李 晖, 李 瑶等. 1994. 电穿孔法诱导 GUS 基因在坛紫菜原生质体中的瞬间表达. 上海水产大学学报, 3(3): 145 ~ 150.

秦 松, 张 健, 李文斌等. 1994. 用基因枪将 GUS 基因导入褐藻细胞中表达. 海洋与湖沼, 25(4): 353 ~ 356.

Cheney D P, Kurtzman A C. 1990. Direct gene transfer and transient gene expression in a marine red alga using the biolistic method. Abstracts. Fourth International Phycological Congress. No. 232.

Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W. 1987. Assaying chimeric genes in plants; the GUS gene fusion system. Plant Mol Biol Rep, 5(4): 387 ~ 405.

Kubler J E, Minocha S C, Mathieson A C. 1994. Transient expression of the GUS reporter gene in protoplasts of *Porphyra minima*ta (Rhodophyta). J Mar Biotechnol, 1: 165 ~ 169.

Sambrook J, Fritsch E F, Maniatis T. 1989. Molecular cloning a laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, New York.

Shen D, Wu M. 1995. Chromosomal and mutagenic study of the marine macroalga, *Gracilaria tenuistipitata*. J App Phyco, 7: 25 ~ 31.