

NPTII 标记转基因棉花再生株的延期筛选

张慧军, 石跃进, 朱永红, 岳建雄, 杨怀义

(山西省农科院棉花研究所, 运城 044000)

新霉素磷酸转移酶 (Neomycin Phosphotransferase II, NPTII) 基因是迄今植物遗传转化中应用最为广泛的选择标记。该基因编码新霉素磷酸转移酶亦称氨基糖苷-3'-磷酸转移酶 (amino glycoside-3'-phosphotransferase II), 其编码产物可使氨基糖苷类抗生素 (aminoglycoside antibiotics) 如卡那霉素 (kanamycin, Km)、新霉素 (neomycin)、G418 等磷酸化而失活。卡那霉素等氨基糖苷类抗生素能与植物细胞叶绿体和线粒体中的核糖体 30S 小亚基相结合, 影响 70S 起始复合物的形成, 干扰叶绿体及线粒体的蛋白质合成, 从而导致植物细胞死亡。NPTII 通过使 ATP 分子上的 γ -磷酸基转移到卡那霉素等氨基糖苷类抗生素分子上, 影响抗生素与核糖体亚基的结合, 从而使抗生素失活。使用 NPTII 基因作为转基因植物的选择标记基因, 可使转基因植物细胞产生对氨基糖苷类抗生素的抗性在一定的选择压下被筛选出来。在棉花转基因中, 由于长期使用卡那霉素会影响到愈伤组织胚状体的分化, 通常为获得较高的转化率, 只对带有 NPTII 标记基因转化的材料在前期进行 1~2 代的 Km 筛选, 故得到的再生株中存在着大量的非转化体呈现出了较高的假阳性率, 为后期工作带来了诸多不便。为克服转化再生株的假阳性率, 2000 年我们对 NPTII 标记转基因棉花再生株的延期筛选进行了研究。通过农杆菌介导法转化带有“NPTII-Bxn”植物表达载体 3PN、G3PN、WAN、G3PS、TS、WATS、W3PN 的晋棉 27 及对照愈伤组织胚状体再生苗。将带有 3~4 片真叶的通过愈伤组织分化的胚状体再生苗移入含有不同浓度 Km 的培养基中, 在 28、1000~1500lx 光照条件下培养并进行筛选。将除草剂溴苯腈配成 $5 \times 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{L}^{-1}$ 的溶液涂抹棉花叶片观察其药害症状。

1 Km 对愈伤胚状体再生苗生长的影响

由于 NPTII 基因所编码的产物能使 Km 失活, 带有 NPTII 基因的转基因再生株能对 Km 产生抗性。故在转化再生苗培养基中加入适量的 Km, 对转化再生株进行再次筛选可淘汰掉大量的非转化体。确定适宜的 Km 选择压是转基因植株筛选的关键所在。为此, 我们在 Km 初次筛选得到的愈伤组织胚状体再生苗生长培养基中分别添加了 50、80、100、150、200、250 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 不同浓度的 Km, 以确定其适宜的选择压力。结果表明, 当 Km 在 50、80 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时转化株和非转化株叶片均呈绿色, 植株生长正常。当 Km 增至 100、150 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 植株在培养基中生长 20 天后, 非转化株叶尖变黄并逐渐扩大, 而转化株生长正常。当 Km 增至 200、250 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 植株在培养基中生长 20 天时, 非转化株叶尖变黄并逐渐干枯, 而转化株虽叶片仍保持绿色但逐渐卷曲萎缩。因此, 由愈伤分化的胚状体再生苗 Km 的适宜选择压应为 100~150 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

2. 转基因愈伤胚状体再生苗的 Km 筛选

以 150 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的 Km 对农杆菌介导的经 Km 初步筛选的转化带有“NPTII-Bxn”的 6 个植物表达载体的晋棉 27 号愈伤组织胚状体再生苗进行了筛选, 其结果表明 (表 1): 在转化初期通过 1~2 代 Km 筛选获得的愈伤组织胚状体再生苗中存在着 29%~49% 的逃逸株, 只有 51%~71% 的再生苗为具有 Km 抗性的转化株。由此可见, 对转化再生苗进行延期筛选可将大量的逃逸苗剔除以保证转基因植株的阳性率。

表 1 利用 Km (150 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 对转化再生苗的筛选

转化载体	再生苗/株	抗性株数	抗性苗比例/%
3PN	30	20	67
G3PN	32	17	53
WAN	35	18	51
G3PS	28	20	71

TS	36	24	67
WATS	36	23	64

3. Km 筛选后转基因植株的抗溴苯腈检测

表 2 Km 抗性苗的抗溴苯腈筛选

转化载体	Km 抗性株数	抗溴苯腈株数	抗溴苯腈植株比例/%
3PN	12	10	83
G3PN	10	9	90
WAN	10	8	80
W3PN	14	13	93
TS	12	11	92
G3PS	12	11	92
WATS	8	7	88

由于抗溴苯腈的 Bxn 基因与 NPTII 选择标记基因位于同一表达盒，二者紧密连锁，故通过 Km 筛选得到的阳性植株应带有 Bxn 基因，为证实 NPTII 选择标记基因 Km 筛选结果的可靠性，对通过 Km 筛选得到的阳性植株进行了抗溴苯腈检测。由表 2 可以看出，通过 Km 筛选所得阳性植株中抗溴苯腈植株平均达到了 88%，抗溴苯腈检测与 Km 筛选结果基本一致，证明了对转化再生株进行 Km 延期筛选的可靠性。

4 小结

通过对转化初期经 1~2 代 Km 筛选获得的愈伤组织胚状体再生株经 100~150mg·L⁻¹ 的 Km 筛选可将大量的逃逸苗除去，既提高了转化率又可在很大程度上减轻实验室及试管苗嫁接、移栽等后期工作，节约试验成本，减少试验空间，不失为一种简便易行、行之有效的筛选方法。（《中国棉花》2002.05）