

外源基因在转基因油菜染色体上的定位及分析

刘 勇 李学宝 陈光荣

(华中师范大学生命科学学院, 武汉 430079)

Localization of CryIA(c) Transgene on Chromosomes in Transgenic Oilseed Progeny by *in situ* Hybridization

LIU Yong, LI Xue-Bao, CHEN Guang-Rong

(College of Life Sciences, Central China Normal University, Wuhan 430079, China)

关键词: 转基因油菜; 基因定位; 原位杂交

Key words: Transgenic oilseed plants; Gene localization; *In situ* hybridization

中图分类号: Q 789 文献标识码: A 文章编号: 1000-470X(2001) 01-0067-06

原位杂交技术 (*in situ* hybridization, ISH) 是基因定位的主要技术之一。近来, 随着植物细胞染色体制片技术的发展, 以及酶联放大检测系统的采用, 在植物中已有低拷贝和单拷贝甚至小于 1 kb 的 DNA 序列定位的成功报道^[1, 2]。染色体原位杂交技术不仅可以用于基因的物理作图, 而且可以用来对转基因植物中的外源基因进行染色体定位^[3-5]。研究表明, 外源目的基因在转基因植物中的表达与整合位点有关^[6]。因而, 进行外源基因在转基因植物染色体上的定位以及研究外源基因的整合位点与表达之间的关系, 对于开发和利用转基因植物具有重要意义。

害虫是造成农业减产的主要原因之一。据不完全统计, 全世界每年因虫害引起的作物减产达总产量的 15%, 损失高达数千亿美元。因而, 获得抗虫品种已成为作物育种中的一项十分紧迫的任务。植物基因工程技术的发展为防治害虫开辟了一条新的途径。苏云金杆菌杀虫蛋白 (*Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal protein) 基因是使用最广泛的抗虫基因, 我们经多年研究已成功地将杀虫蛋白基因导入油菜中并获得了可育的转基因油菜^[7, 8]。本文报道了应用染色体原位杂交技术对 CryIA(c) 基因在转基因油菜染色体上定位的结果, 为进一步研究 CryIA(c) 基因在转基因油菜中的整合位点与表达之间的关系打下了基础。

收稿日期: 1999-10-26, 修回日期: 2000-09-01。
基金项目: 国家自然科学基金资助项目(编号: 39670389)。
作者简介: 刘勇(1970-), 男, 讲师(硕士), 主要从事植物分子遗传学研究。

1 材料与方法

1.1 植物材料

实验用植物材料为2个油菜品种及其转基因的后代株系,这2个油菜品种是:中双4号(属甘蓝型油菜,转基因后代株系为 T_3 代,编号为:甘14-3)和望江凉亭(属芥菜型油菜,转基因后代株系为 T_4 代,编号为:芥2-1)。

1.2 方法

1.2.1 染色体制备 取长至1~2 cm的油菜根尖,用饱和 α -溴萘在25℃下处理1.5~2 h,再用甲醇-冰醋酸(3:1)固定2 h以上,水洗后用1 mol/L HCl于25℃酸解30 min,充分水洗后,用4%纤维素酶和4%果胶酶等体积混合液25℃酶解处理20~30 min,火焰干燥法制片。

1.2.2 探针标记 根据华美生物工程公司缺口平移试剂盒产品说明,采用一步法略作修改:10 μ L dNTP混合液,5 μ L 10 \times 缓冲液,5 μ L 探针DNA(含0.7 kb CryIA(c)基因探针),3 μ L Bio-11-dUTP,22 μ L 水,5 μ L 酶液(DNase/DNA polymerase)混匀,15℃反应2.5 h后,加5 μ L 0.5 mol/L EDTA- Na_2 终止反应,用Sepharore CL-6B凝胶离心柱纯化,斑点印迹检测其标记效果。

1.2.3 原位杂交及检测 参照Gustafson和Dillé^[1]的方法,略有改进。杂交液包含25 μ L 探针,62.5 μ L 去离子甲酰胺,25 μ L 硫酸葡聚糖,12.5 μ L 20 \times SSC和1.25 μ L ssDNA,100℃变性。染色体制片在60℃下烤片1 h,37℃下用RNase(1 μ g/mL)处理1 h,70℃下在70%甲酰胺中变性3.5 min,后经-20℃70%、95%和100%酒精系列洗涤,37℃杂交过夜。检测时首先用42℃10%去离子甲酰胺、2 \times SSC和0.1 \times SSC系列浸洗,室温下0.1% Triton 100浸洗。依次加羊抗生物素抗体,兔抗羊抗体生物素偶联物和SA-HRP 37℃下各反应30 min,室温下DAB显色5 min,1% Giemsa染色5 min,充分干燥后,用二甲苯透明,树胶封片。

1.2.4 杂交信号观察及统计分析 使用Olympus BH-2相差显微镜观察杂交结果,依据染色体的相对长度和臂比进行不同染色体的识别。选择信号清晰、染色体形态好的分裂相进行显微摄影。通过装配在图象转化装置上的电视荧光屏进行臂比及杂交位点与着丝粒距离的测量,并进行统计分析。

1.2.5 卡那霉素抗性实验 以MS为基本培养基,附加0.1 mg/L NAA,配置不同浓度的卡那霉素。待无菌苗长至1.5~2 cm高,切去根部,留下胚轴长1 cm,在上述含不同浓度培养基中继代培养,每15~20 d继代一次,分别统计各供试植株在该浓度下的生根苗数和未生根苗数,计算生根率。重复实验,每次继代丢去未生根及已经白化的植株,直至全部起始供试去根幼苗均不能生根或白化为止。

2 结果

2.1 油菜染色体核型分析

取用油菜(中双4号和望江凉亭)的根尖细胞制备染色体,改良苯酚品红染色。参照李懋学等^[9]的标准进行核型分析。2种油菜的核型见图版1:1~4,各号染色体的核型指标的平均值见表1。

表 1 甘蓝型和芥菜型油菜染色体相对长度、臂比和类型

Table 1 The chromosomes relative length, arm ratio and classification of *Brassica napus* and *B. juncea*

序号 No.	甘蓝型油菜 相对长度(%) Relative length	臂比 Arm ratio	类型 Classification	序号 No.	芥菜型油菜 相对长度(%) Relative length	臂比 Arm ratio	类型 Classification
1	5. 10+ 2. 55= 7. 65	2. 00	sm	1	4. 86+ 2. 71= 7. 57	1. 79	sm
2	5. 10+ 2. 04= 7. 14	2. 50	sm	2	4. 32+ 2. 71= 7. 03	1. 59	m
3	4. 08+ 2. 76= 6. 84	1. 48	m	3	4. 05+ 2. 71= 6. 76	1. 49	m
4	4. 08+ 2. 55= 6. 63	1. 60	m	4	3. 91+ 2. 71= 6. 62	1. 44	m
5	3. 89+ 2. 44= 6. 33	1. 59	m	5	3. 38+ 3. 11= 6. 49	1. 09	m
6	3. 57+ 2. 55= 6. 12	1. 40	m	6	4. 59+ 1. 76= 6. 35	2. 61	sm*
7	3. 78+ 2. 04= 5. 82	1. 85	sm	7	4. 05+ 2. 17= 6. 22	1. 87	sm
8	3. 57+ 2. 04= 5. 61	1. 75	sm	8	3. 38+ 2. 70= 6. 08	1. 25	m
9	3. 87+ 1. 53= 5. 40	2. 53	sm	9	3. 24+ 2. 71= 5. 95	1. 20	m
10	3. 06+ 2. 14= 5. 20	1. 43	m	10	2. 97+ 2. 71= 5. 68	1. 10	m
11	3. 06+ 2. 04= 5. 10	1. 50	m	11	3. 11+ 2. 03= 5. 14	1. 53	m
12	2. 96+ 2. 04= 5. 00	1. 45	m	12	2. 57+ 2. 31= 4. 88	1. 11	m
13	3. 07+ 1. 73= 4. 80	1. 77	sm	13	2. 70+ 2. 03= 4. 73	1. 33	m
14	2. 55+ 1. 53= 4. 08	1. 67	m	14	2. 84+ 1. 75= 4. 59	1. 62	m
15	2. 04+ 1. 94= 3. 98	1. 05	m	15	3. 51+ 0. 68= 4. 19	5. 16	st
16	2. 05+ 1. 73= 3. 78	1. 18	m	16	3. 24+ 0. 68= 3. 92	4. 76	st
17	2. 14+ 1. 43= 3. 57	1. 50	m	17	2. 70+ 1. 08= 3. 78	2. 50	sm
18	2. 25+ 1. 02= 3. 27	2. 21	sm	18	2. 30+ 1. 35= 3. 65	1. 70	m
19	1. 53+ 1. 53= 3. 06	1. 00	M				
核型类型 Karyotype	2B			核型类型 Karyotype	2B		

* 具随体染色体, 随体长度未计算在内。
* SAT-chromosome, the length of satellites was not included in the chromosome length.

2.2 转基因油菜的染色体原位杂交

用生物素标记的 CryIA(c) 基因探针进行原位杂交, 结果表明, 在甘 14-3 株系中, 观察了 206 个分裂相细胞, 82 个具有杂交信号, 检出率为 39. 81%; 在芥 2-1 株系中观察了 179 个分裂相细胞, 69 个具有杂交信号, 检出率为 38. 54%(图版 I: 5, 6; 表 2)。在同时进行的对照组油菜分裂相细胞中, 没有检测到杂交信号(图版 I: 7, 8)。

表 2 转基因油菜原位杂交统计分析

Table 2 Assay of *in situ* hybridization in transgenic *Brassica napus* and *B. juncea* plants

转基因油菜株系* Transformant	染色体 Chromosome	信号距着丝点百分距离 Percent distance from the centomere	观测细胞总数 The number of cells observed	检出信号细胞数 The number of cells with singal	检出率(%) Detection rate
甘 14-3	1	22. 22 ± 1. 12**	206	82	39. 81
芥 2-1	7	80. 00 ± 3. 28	179	69	38. 54

* 甘 14-3: T₃ 代转基因甘蓝型油菜; 芥 2-1: T₄ 代转基因芥菜型油菜; ** 标准差。
* The third generation of transgenic *Brassica napus* plant, the fourth generation of transgenic *B. juncea* plant;
** Standard deviation.

通过核型分析, 以染色体长度、臂比、着丝点位置确定杂交信号的位置。在 Olympus BH-2 相差显微镜下, 观察到的杂交信号总是出现在转基因油菜甘 14-3 有丝分裂相中第 1 号染色体长臂和芥 2-1 有丝分裂相中第 7 号染色体短臂(图版 I: 5, 6)。它们与着丝粒的

百分距离分别为 22.22 ± 1.12 和 80.00 ± 3.28 (表 2)。

2.3 转基因油菜后代株系的卡那霉素抗性分析

以培养 1 周左右的转基因油菜后代株系的去根幼苗为材料,对 4 个株系的转基因油菜后代植株进行了 Km 抗性试验,其中 3 个为芥菜型油菜株系,1 个为甘蓝型油菜株系,结果列于表 3。

表 3 转基因甘蓝型油菜和芥菜型油菜后代卡那霉素抗性分析
Table 3 Analysis of transgenic *Brassica napus* and *B. juncea* progenies resistant to kanamycin

卡那霉素浓度 Km concentration		芥 2-1*	芥 2-2	芥 9-5	芥 CK	甘 14-3	甘 CK
15 mg/L	总苗数	97	125	229	70	102	52
	生根苗数	97	125	229	0	102	0
	未生根苗数	0	0	0	70	0	52
	生根率(%)	100	100	100	0	100	0
20 mg/L	总苗数	97	125	229		102	
	生根苗数	71	123	192		67	
	未生根苗数	26	2	37		35	
	生根率(%)	73.2	98.4	83.8		65.7	
30 mg/L	总苗数	60	93	172		60	
	生根苗数	39	64	101		40	
	未生根苗数	21	29	71		20	
	生根率(%)	65.0	68.8	58.7		66.7	
50 mg/L	总苗数	39	55	71		24	
	生根苗数	2	7	6		1	
	未生根苗数	37	48	65		23	
	生根率(%)	5.1	12.7	8.5		4.2	

* 试验用转基因油菜芥 2-1、2-2、9-5 为 T₄ 代,甘 14-3 为 T₃ 代。
* The transgenic *Brassia juncea* plants 2-1, 2-2, 9-5 were at the fourth generation of transformed plants; the transgenic *Brassia napus* plant 14-3 was at the third generation.

实验结果表明,在卡那霉素浓度为 15 mg/L 时,芥 2-1、芥 2-2、芥 9-5 和甘 14-3 株系的生根率为 100%;随着 Km 浓度的升高,4 个转基因油菜株系的生根能力随之下降。但在各供试株系中,生根率存在着显著差异。其中,芥 2-2 生根率最高,其余依次为芥 2-1,芥 9-5,甘 14-3。对照组试验中,未转化油菜切除根的幼苗生根能力在 Km 浓度为 15 mg/L 时即被完全抑制。

3 讨论

目前对于 T-DNA 介导的外源基因与植物核 DNA 的整合机制还没有完全明了。大量的研究表明,在 Ti 质粒介导的植物遗传转化中,外源基因是以非正常重组的方式整合到植物染色体上的,整合位点并不固定而是随机地插入整个基因组中^[3,5,10-12];但有研究认为,在整合过程中外源基因优先插入到转录活跃区^[13]。外源基因主要以单拷贝或呈串连的多拷贝在单一位点整合^[4,5,10-12],也有在同一染色体或不同染色体的多个位点上的整合情况发生^[10,14];整合到植物染色体上的外源基因非常稳定^[4,11,12]。我们用生物素标记的 CryIA(c) 基因作探针,对 2 个转 CryIA(c) 基因油菜的后代株系芥 2-1(T₄ 代)和甘 14-3(T₃ 代)中的外源基因进行了染色体原位杂交定位。结果在 2 个株系的不同染色体上都检

测到了杂交信号,表明外源杀虫基因不但已整合到油菜的核基因组中,而且还可以稳定地遗传给后代。在同时进行的对照实验中,没有检测到杂交信号,表明正常油菜基因组中没有该基因,杂交信号是由于外源 CryIA(c) 基因整合到油菜染色体上所导致的结果。

外源目的基因在转基因植物中的稳定表达,是转基因植物研究中的关键问题。研究显示^[15-17],在转基因植物中,外源基因以多拷贝形式插入常导致基因表达失活,而单拷贝插入的基因表达一般不会受到抑制。引起多拷贝插入的基因表达失活的原因,一般认为是:①多拷贝的重复序列之间异位配对抑制基因转录;②重复序列中的一个插入基因以反式作用的沉默子方式抑制其他插入基因的表达。本试验所用的转基因油菜,分子杂交结果证明,外源基因以单拷贝插入到油菜基因组^[7,8]。我们对 T₄ 代转基因油菜芥 2-1、芥 2-2、芥 9-5 和 T₃ 代甘 14-3 植株的后代株系 K_m 抗性试验表明(表 3),外源基因在转基因油菜后代植株中能稳定地表达。同时,有研究显示,外源基因的表达与插入位点之间存在着位置效应^[18],但其确切的原因却未完全研究清楚。我们比较分析了各供试株系的 K_m 抗性强度(表 3),其中芥 2-2 株系的 K_m 抗性最高,其余各株系的 K_m 抗性大小依次为芥 2-1、芥 9-5、甘 14-3。各株系的 K_m 抗性存在着明显的差异,表明外源基因的表达可能与基因插入位点不同有关。

致谢:在进行油菜染色体原位杂交实验中,得到武汉大学生命科学院宋运淳先生、刘立华先生等的技术指导和支持,在此表示真诚的感谢!

参考文献:

- [1] Gustafson J P, Dillé J E. The chromosome location of *Oryza sativa* recombination linkage groups. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1992, **89**: 8 646 - 8 650.
- [2] Song Y C, Gustafson J P. The physical location of fourteen RFLP markers in rice (*Oryza sativa* L.). *Theor Appl Genet*, 1995, **90**: 113 - 119.
- [3] Ambro P F, Matzke A J M. Localization of *Agrobacterium rhizogenes* T-DNA in plant chromosome by *in situ* hybridization. *EMBO J*, 1986, **5**: 2 073 - 2 077.
- [4] Ambros P E, Matzke M A, Matzke A J M. Detection of a 17kb unique sequence(T-DNA) in plant chromosomes by *in situ* hybridization. *Chromosoma*, 1986, **94**: 11 - 18.
- [5] Mouras A, Saul M W, Essad S. Localization by *in situ* hybridization of a low copy chimaeric resistance gene introduced into plants by direct gene transfer. *Mol Gen Genet*, 1987, **207**: 204 - 209.
- [6] Ferre J, Escriche B, Bel Y. Biochemistry and genetics of insect resistance to *Bacillus thuringiensis* insecticidal crystal proteins. *FEMS Microbiol Lett*, 1995, **132**: 1 - 7.
- [7] 李学宝, 郑世学, 董五辈, 等. 甘蓝型转基因抗虫油菜及其抗性分析, 遗传学报, 1999, **26**(3): 262 - 268.
- [8] 李学宝, 秦明辉, 施荣华, 等. 芥菜型油菜抗虫转基因植株及后代的研究. 生物工程学报, 1999, **15**(4): 482 - 488.
- [9] 李懋学, 陈瑞阳. 关于植物核型分析的标准化问题. 武汉植物学研究, 1985, **3**(4): 297 - 302.
- [10] Marco W, Anton G M, Stephen G, et al. Chromosomal localization of foreign genes in *Petunia hybrida*. *Mol Gen Genet*, 1986, **202**: 6 - 15.
- [11] Yan-San C, Richard A, Donna G, et al. Locations and stability of *Agrobacterium*-mediated T-DNA insertions in the *Lycopersicon* genome. *Mol Gen Genet*, 1986, **204**: 64 - 69.
- [12] Cheng M, Joyce E, Pang S Z, et al. Genetic transformation of wheat mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. *Plant Physiol*, 1997, **115**: 971 - 980.
- [13] Patient R K, Allan. Active chromatin. *Curr Opin Cell Biol*, 1989, **1**: 454 - 457.

[14] Deborah S, Gregory A , Sharon E, *et al.* Modification of *Brassica* seed oil by antisense expression of a stearyl-acyl carrier protein desaturase gene. *Proc Natl Acad Sci USA* , 1992, **89**: 2 624 — 2 628.

[15] Matzke M A, Matzke A J M . Gene interactions and epigenetic variation in transgenic plants. *Dev Genet*, 1990, **11**: 214 — 223.

[16] Assaad F F, Tucker K L, Singer E R. Epigenetic repeat-induced gene silencing (RIGS) in *Arabidopsis*. *Plant Mol Biol*, 1993, **22**: 1 067 — 1 085.

[17] Vaucheret H, Elmayan T, Thierry D, *et al.* Flank matrix attachment regions (M ARs) from chicken, beaan, yeast or tobacco do not prevent homology-dependent *trans*-silencing in transgenic tobacco plants. *Mol Gen Genet*, 1998, **259**: 388 — 392.

[18] Neuhuber F, Park Y-D, Matzke A J M , *et al.* Susceptibility of transgene loci to homology-dependent gene silencing. *Mol Gen Genet*, 1994, **244**: 230 — 241.

图 版 说 明

图版 : 1. 甘蓝型油菜中期分裂相; 2. 芥菜型油菜中期分裂相; 3. 甘蓝型油菜染色体核型分析图; 4. 芥菜型油菜染色体核型分析图; 5. CryIA (c) 基因探针与甘 14-3 株系原位杂交结果, 箭头示杂交信号; 6. CryIA (c) 基因探针与芥 2-1 株系原位杂交结果, 箭头示杂交信号; 7. CryIA (c) 基因与对照甘蓝型油菜原位杂交结果; 8. CryIA (c) 基因与对照芥菜型油菜原位杂交结果

Explanation of plate

Plate : 1. Metaphase chromosomes in *Brassia napus*; 2. Metaphase chromosomes in *Brassia juncea*; 3. Karyotype analysis of *Brassia napus*; 4. Karyotype analysis of *Brassia juncea*; 5. Metaphase chromosomes in transformant 14-3 showing a hybridization site with probe CryIA (c), the signal is indicated by arrow; 6. Metaphase chromosomes in transformant 2-1 showing a hybridization site with probe CryIA (c), the signal is indicated by arrow; 7. *in situ* hybridization of wild-type *Brassia napus* using CryIA (c) gene as the probe; 8. *in situ* hybridization of wild-type *Brassia juncea* using CryIA (c) gene as the probe

