

农杆菌携带柞蚕抗菌肽基因转入烟草的研究

黄自然 徐 飞 庄楚雄 管志文

(华南农业大学)

李乃坚 袁四清 崔植琳 戴 冕

(广东农业科学院经作所)

摘要 柞蚕抗菌肽具有广谱杀菌功能,对烟草等茄科作物的青枯病假单胞菌(*Pseudomonas solanacearum*)具有较强的杀菌效果。人工合成抗菌肽基因(122 bp)转入根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*),感染烟草叶盘,诱导成苗。通过对卡那霉素敏感筛选,胭脂碱脱氢酶检定及抗菌肽片段探针杂交,确认抗菌肽基因已转入烟草。现正研究其在烟草中表达及抗青枯病的可能性。

关键词 柞蚕抗菌肽;烟草;基因转导;根癌农杆菌

柞蚕蛹经注射大肠杆菌诱导,使血淋巴产生一系列免疫应答,形成凝集素、溶菌酶及抗菌肽等以抵御病原的感染。经研究证实柞蚕抗菌肽具有广谱杀菌功能^[1],对烟草、桑树等作物的青枯病假单胞菌(*Pseudomonas solanacearum*)具有较强的抑菌效应^[2]。1987年,徐飞等人工设计合成柞蚕抗菌肽的基因^[3],1990年,李丹青等将人工合成抗菌肽基因导入根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*),感染番茄叶盘获得愈伤组织^[4]。本研究是将柞蚕抗菌肽基因通过农杆菌 Ti 质粒携带转入烟草叶盘,诱导成苗,以获得抗青枯病的株系,为抗病育种开拓新途径。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试烟草 NC82,MSG28,K326及 Ti245等均由广东农业科学院烟草研究室提供。柞蚕抗菌肽 D 基因,抗菌肽杀菌活力指示菌大肠杆菌 K12D31及转入抗菌肽基因的根癌农杆菌(SE)由华南农业大学遗传工程研究室提供。烟草青枯病假单胞菌 I 号来自广东省高州县,I 号来自广东省南雄县拱桥。均由广东农业科学院烟草研究室保存并提供。

1.2 方 法

1.2.1 抗菌肽对烟草青枯病假单胞菌的抑菌作用:注射大肠杆菌 HB101于柞蚕滞育蛹,诱导产生抗菌肽。在 LB 培养基上接种大肠杆菌 K12D31,用打孔法各孔注入15 μ l 含抗菌肽的免疫血淋巴,37 $^{\circ}$ C 培养过夜,测定其抑菌圈的直径,以确定其抑菌活力。

1.2.2 叶盘法导入外源基因:从组织培养的无菌烟草植株中剪取叶盘(0.5cm 直径)浸于28 $^{\circ}$ C 培养过夜的含抗菌肽基因的根癌农杆菌悬浊液中,10~60 sec.取出叶盘,用无菌水冲

洗后置于MS培养基中,待农杆菌充分感染。其次,将感染后的叶盘置于无生长素的MS培养基(含500mg/L头孢霉素)中培养2天。取出无污染的叶盘置于含头孢霉素500mg/L及卡那霉素100mg/L的分化培养基中培养2-3周。挑选分化的叶盘置于发根诱导培养基中培养,使形成健康的小苗。将具有4叶及5条幼根的小苗移入消毒的沙盘中练苗待用。

1.2.3 胭脂碱的检测:参照 Otten^[5]及 Hersch^[6]的方法加以修改。选取转基因植株的叶片约200mg,加入0.5mM L-精氨酸、0.5mM α -酮戊二酸及500mg/L先锋霉素的MS培养基中温育24 hr,将叶片转入小离心管中制成匀浆,用磷酸盐缓冲液提取若干次,离心,吸取上清液5 μ l于电泳滤纸上,以精氨酸及胭脂碱作对照。电泳后用新配的非醌氢氧化钠乙醇液显色,在紫外灯下观察结果。

1.2.4 DNA 复印杂交:参照 Maniatis^[7] 的方法进行。以柞蚕抗菌肽D的片段(38bp)作探针,用³²P- γ dATP标记后供用。与转化的烟草植株叶片DNA作点杂交。放射自显影后观察其结果。

2 结果 讨论

2.1 柞蚕抗菌肽对烟草青枯病假单胞菌的抑菌效应:选取不同致病毒力的烟草青枯病假单胞菌接种于平板中,每孔注入15 μ l不

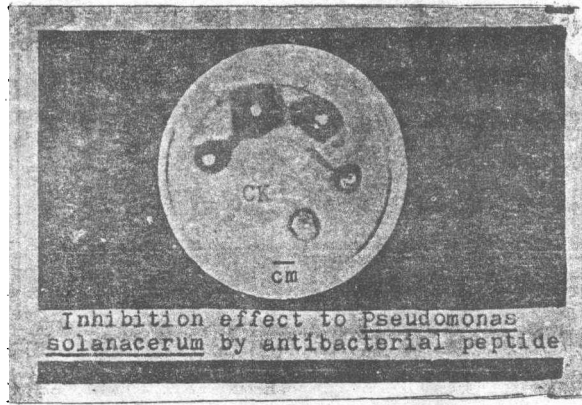


图1 柞蚕抗菌肽对烟草青枯病假单胞菌的抑菌效应
图中央孔为对照,接种青枯病假单胞菌1号,每孔10~15 μ l抗菌肽免疫血淋巴,形成明显的抑菌圈。

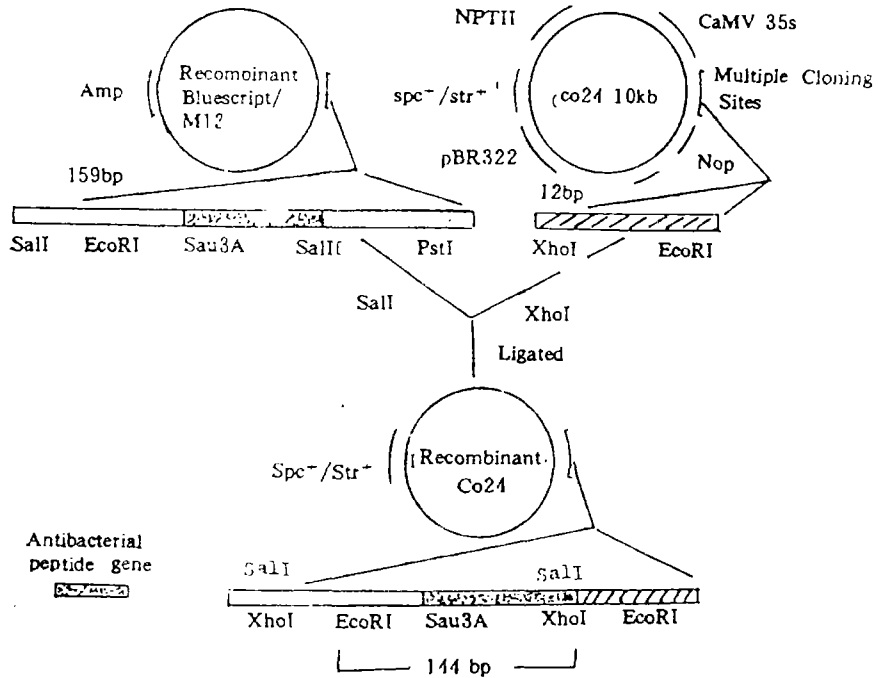


图2 柞蚕抗菌肽基因与过渡质粒 CO24的重组示意图

同稀释度的柞蚕免疫血淋巴。28℃培养观察。以高州青枯病菌 I 号, 2% 菌液 (O. D. 570nm 消光值) 的抑菌效果最好; 拱桥青枯病菌 I 号, 以等量抗菌肽处理菌液 (O. D. 570nm 消光值) 效果最好。说明抗菌肽免疫血淋巴对烟草青枯病假单胞菌有强杀菌效果。见图1。

2.2 抗菌肽基因转入根癌农杆菌:从保存的大肠杆菌 JM103 中提取抗菌肽基因与过渡质粒 CO24 重组。CO24 质粒含有花椰菜病毒 CaMV 35S 启动子, 胭脂碱脱氢酶基因 (Ti-DNA, NOP), pBR322 片段及抗链霉素, 壮观霉素基因。重组后克隆于大肠杆菌 DH5。按“三亲法”的步骤将含抗菌肽基因的 DH5, 含辅助质粒 CO28 的大肠杆菌 PKR2013 及根癌农杆菌 (SE) 三者共培养。选用含卡那霉素 Km 50μg/ml、氯霉素 Cm 25μg/ml、链霉素 Str 70μg/ml 及壮观霉素 Spc 70μg/ml 的 LB 培养基中, 28℃ 过夜, 挑选出白色菌落。挑取 10 个菌落培养扩增后提取重组质粒。用抗菌肽基因探针作 Southern Blot 杂交, 结果有 7 个呈阳性反应。挑选阳性反应明显的菌株作感染烟草之用。见图2。

2.3 抗菌肽基因导入烟草叶盘:含抗菌肽基因的根癌农杆菌感染烟草叶盘后, 在含头孢霉素 500mg/L 的 MS 培养基中培养 7 天。转入含 0.1mg/L 玉米素及 500mg/L 头孢霉素的 MS 培养基中培养 5 天, 转入另加 100mg/L 卡那霉素的上述培养基中培养 30 天, 作为抗卡那霉素试验。未导入抗菌肽基因的叶盘则不能分化, 逐渐枯黄。个别叶盘虽能分化出小点的愈伤组织, 随着时间的延长, 受卡那霉素的作用而变黄枯死, 未能成苗。而导入抗菌肽基因的叶盘则保持绿色, 并分化成苗。烟草叶盘对卡那霉素的抗性达 100mg/L 以上。见图3。

2.4 转基因植株的胭脂碱检测:选取抗卡那霉素的烟草植株, 剪取叶片约 300mg, 对胭脂碱脱氢酶活力进行检测。结果见图4。

由于构建 CO24 质粒时, 胭脂碱脱

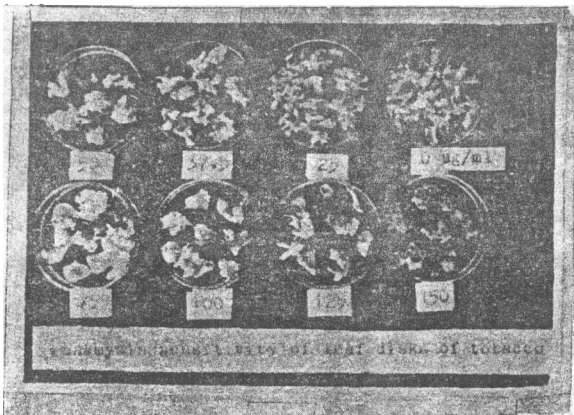


图3 转基因烟草叶盘对卡那霉素敏感性试验

图中数字为培养基中卡那霉素的浓度 (μg/ml) 转入抗菌肽基因的烟草叶盘能在 150mg/L 卡那霉素培养基中分化成苗、长叶生根。

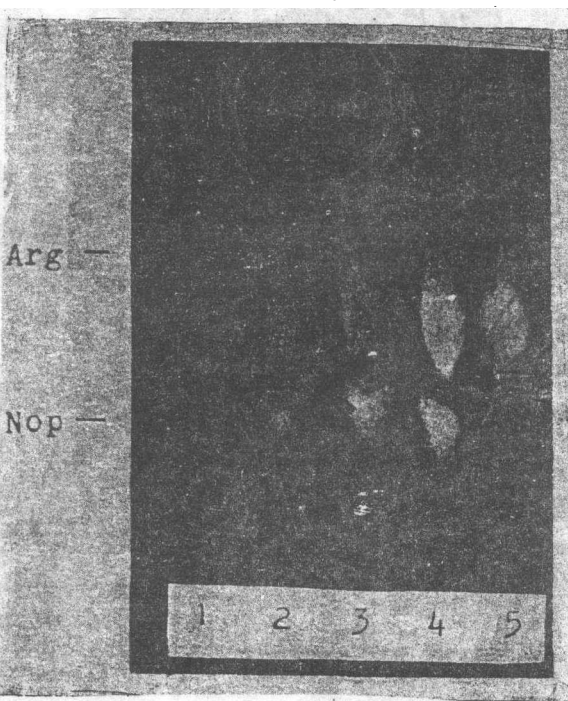


图4 转基因烟草植株中胭脂碱的检测

1, 标准物; 2~4, 转基因植株叶片中检出胭脂碱的形成; 5: 对照区植株。

Arg: 精氨酸; Nop: 胭脂碱。

氨酶基因是在抗菌肽基因的下流,在转化植株中检出胭脂碱的形成,说明胭脂碱脱氢酶基因的表达。揭示抗菌肽基因已导入烟草并有表达的可能。

2.5 转基因烟草的 DNA 杂交:选取胭脂碱阳性的烟草植株,剪取叶片约300mg,提取大分子量 DNA,点于尼龙膜上烘干固定。用 $p^{32}-\gamma$ -dATP 标记抗菌肽基因片段作探针,与烟草叶片 DNA 杂交,结果见图5。对照区烟草 DNA 为阴性反应。而转基因植株中如4C、2D、5D、3E及6F均有明显的杂交信号,说明转基因植株中含有与抗菌肽基因同源性片段。

转基因烟草栽培于消毒沙盘中生长正常。见图6。综合以上的检测结果可以认为由农杆菌 Ti 质粒携带的柞蚕抗菌肽基因已转入烟草叶盘并诱导成株。至于抗菌肽基因表达产物正进行抗菌肽单克隆抗体的制备供作免疫学的检定。抗青枯病的筛选工作待转基因植株正常生长后继续进行。

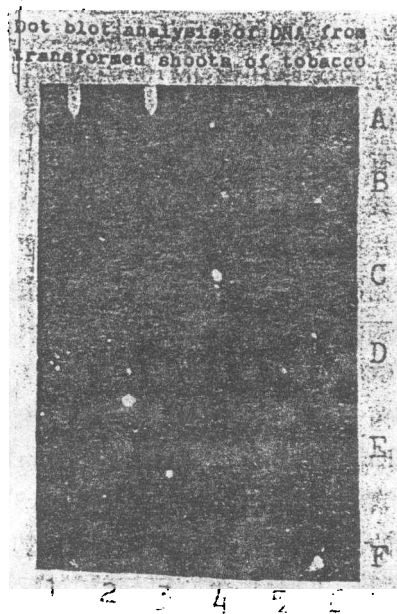


图5 转基因烟草 DNA 点杂交结果

A: 抗菌肽基因; B: 含抗菌肽基因的根癌农杆菌的 DNA; C—F 为烟草植株 DNA; 白色箭头: 对照区烟草 DNA。图示: 4C、2D、5D、3E 及 6F 均有明显杂交信号。



图6 转基因烟草植株的生长情况

参 考 文 献

- 1 黄自然、郑庭辉、梁怡章、屈贤铭.柞蚕抗菌肽的抑菌效应.科学通报, 1986, 14, 1107~09
- 2 李文楚、卢铿明、黄自然、戴祝英、黄大年.柞蚕抗菌肽 D 杀菌机理研究.蚕业科学, 1991, 17 (3): 163~68
- 3 徐飞、施文、王启松, 黄自然.柞蚕抗菌肽 D 基因的合成.科学通报, 1988, 21, 1656~59
- 4 李丹青、徐飞、黄自然、陈章良.人工合成柞蚕抗菌肽 D 导入根癌农杆菌.蚕业科学, 1990, 16 (2): 110~12

- 5 许耀、贾敬芬、郑国曾. 植物组织中冠囊碱合成酶活性检测的一种简便有效方法. 遗传, 1987, 9 (5): 41~43
- 6 Horsch R B., Fry J E. A Simple and general method for transferring genes into plant. Science, 1985, 227: 1229~31
- 7 Otten L. Schilperoort R A. A rapid microscale method for the detection of lysopine and nopaline dehydrogenase activities. Biochim Biophys Acta, 1978, 527: 497~500.
- 8 Hersch R B., et al. Detection of nopaline and octopin in transformed tissue. 1986, Pro Nat Amer Sci, U. S. A., 83: 4428~32.
- 9 Maniatis T. et al. Molecular Cloning. A laboratory Manual. 1982, Cold Spring Harbar Lab. Press New York.

TRANSFER OF SYNTHETIC ANTIBACTERIAL PEPTIDE D GENE OF *ANTHERAEA PERNYI* INTO TOBACCO PLANT

Huang ZiRan Xu Fei Zhuang ChuZiong Guan ZhiWen

(South China Agricultural University)

Li NaiJian Xuan SiQing Que ZhiLin Dai Mian

(Guangdong Academy of Agriculture Science)

Abstract Some inducible antibacterial peptide (AP) were developed from the haemolymph of Chinese oak silkworm, *Antheraea pernyi* pupae. The AP had broad-spectrum inhibition on bacteria such as wilt disease, *Pseudomonas solanacearum* of tobacco etc. The AP-D has been isolated and its amino acid sequence has been determined (36 peptides). We designed the nucleotides sequence of AP-D gene (122 bp) and synthesized by DNA synthesizer. The M13 mp8 DNA was ligated with AP-D gene and transformed into *E. coli* JM103. The recombinant plasmid cut with *Sai* I and *co24* plasmid containing CaMV 35S promoter cut with *Xho* I were ligated and transformed into *Agrobacterium tumefaciens* by triple mating method. A Selected medium containing Km, Cm, Spc and Str was used to select the colonies which had insert with AP-D gene.

A. tumefaciens containing AP-D gene was used to infect the leaf discs of tobacco. After 4 weeks, we found some plantlets differentiation at the redges of leaf discs. These plants were resisted to Km, the nopaline detector and Southern blot hybridization with AP-D gene probe showed that AP-D gene had been integrated into tobacco plant. The expression product should be detected with its monoclonal antibody. We are now studying this in order to introduce the AP-D gene into tobacco plant.

Key Words Antibacterial peptide gene; Chinese oak silkworm; *Antheraea pernyi*; Tobacco; Gene transform; *Agrobacterium tumefaciens*.