

## 不同调控因子下 GUS 基因在马铃薯块茎中瞬时表达的影响

舒锐<sup>1,2</sup>,姚甜甜<sup>1</sup>,李燕<sup>1</sup>,臧传江<sup>1</sup>,焦健<sup>1</sup>,兰成云<sup>1</sup>,刘少军<sup>1\*</sup>

1. 山东省轻工农副原料研究所, 山东 高密 261500

2. 山东农业大学 园艺科学与工程学院, 山东 泰安 271018

**摘要:** 本文以马铃薯块茎为研究材料, 采用根癌农杆菌介导的瞬时表达方法, 通过组织化学染色法检测 GUS 基因的瞬时表达, 并研究了乙酰丁香酮浓度、真空强度、浸染时间和共培养时间对 GUS 基因瞬时表达的影响。结果表明不同真空强度和共培养时间对 GUS 基因瞬时表达水平的影响差异极显著, 且当真空强度为 1 kPa、共培养时间为 2 d 时表达水平较高。

**关键词:** 马铃薯; GUS; 调控因子; 瞬时表达

**中图分类号:** S532

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-2324(2017)04-0545-04

## The Effects of Different Regulatory Factors on Transient Expression of GUS Gene in Potato Tubers

SHU Rui<sup>1,2</sup>, YAO Tian-tian<sup>1</sup>, LI Yan<sup>1</sup>, ZANG Chuan-jiang<sup>1</sup>, JIAO Jian<sup>1</sup>, LAN Cheng-yun<sup>1</sup>, LIU Shao-jun<sup>1\*</sup>

1. Shandong Light Industry Institute of Agricultural and Sideline Raw Materials, Gaomi 261500, China

2. College of Horticulture Science and Engineering/Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, China

**Abstract:** The GUS gene was transiently expressed in potato tubers by agrobacterium-mediated transformation and the expression the GUS was detected by histochemical staining. The effects of acetyligenone concentration, vacuum intensity, immersion time, and total culture time on the expression of GUS gene was investigated. The results show that the different vacuum strength and co-culture time exhibit the notable influence on GUS expression and the expression levels are higher when the vacuum intensity is 1kPa and the co-culture time is 2 days.

**Keywords:** Potato; GUS; regulatory factors; transient expression

利用根癌农杆菌感染植物受伤组织, 然后将质粒上的外源基因导入并整合到植物细胞的染色体上, 在经过诱导分化产生转基因植株, 这是目前马铃薯块茎最常用的遗传转化方法, 但是通常具有遗传转化和再生效率低、外源基因表达不稳定、转化周期长和费用昂贵等问题。随着植物功能基因组学的发展, 对外源基因在植物细胞内表达功能分析的快速性和高效性要求越来越高。1993年 Rossi 等创建了农杆菌介导的瞬时表达方法, 通过真空抽滤将带有重组质粒的农杆菌渗透到植物细胞, 然后根据目的基因瞬时表达来检测农杆菌介导的 T-DNA 的转化效率<sup>[1]</sup>。与传统的转化方法相比较, 农杆菌介导的瞬时表达方法避免了传统转化方法中繁琐的组织培养过程, 大大缩减了试验时间, 方法更加简单快速, 而且还具有表达效率高、安全性好等优点<sup>[2]</sup>。目前农杆菌介导的瞬时表达方法已经在烟草、拟南芥、莴苣、番茄、草莓、梨等多种植物中得到应用。李静等以莴苣作为研究材料, 以 GUS 基因作为报告基因, 利用农杆菌渗透法, 采用正交实验设计, 分析了培养的菌液浓度、诱导物乙酰丁香酮的浓度、真空抽滤时间和共培养时间等影响因子对莴苣的瞬时表达水平的影响, 建立了较高表达水平的瞬时转化体系<sup>[3]</sup>。

GUS 基因是目前应用最广泛的一种报告基因, GUS 能与底物 4-甲基伞形酮酰-β-D-葡萄糖醛酸苷 (4-methylumbelliferyl-β-D-glucuronide, 4-MUG) 反应产生荧光物质 4-甲基伞形酮 (4-methylumbelliferone, 4-MU), 通过荧光分析可以进行 GUS 活性的定量检测, GUS 作为报告基因来检测外源基因的转化效率方法简单, 灵敏度高<sup>[4]</sup>。本研究以马铃薯块茎为研究材料, 采用根癌农杆菌介导的瞬时表达方法<sup>[5]</sup>, 分析了不同的影响因子: 乙酰丁香酮浓度、真空强度、浸染时间和共培养时间对马铃薯块茎 GUS 基因瞬时表达水平的影响, 以用来研究影响马铃薯块茎中 GUS 报告基

**收稿日期:** 2015-07-14

**修回日期:** 2015-12-07

**作者简介:** 舒锐(1987-),男,硕士研究生,主要从事园艺植物栽培育种研究. E-mail:shrhero@163.com

**\*通讯作者:** Author for correspondence. E-mail:wly459@sohu.com

因瞬时表达的关键因素和最佳条件, 对于将来建立马铃薯块茎高效瞬时表达体系提供依据。

## 1 材料和方法

### 1.1 植物材料和菌株

本研究采用鄂马铃薯 (*Solanum tuberosum* L.) 3 号品种 (E3) 的块茎作为转化受体材料。

根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株为 LBA4404, 中间载体为 pBI-121。

### 1.2 农杆菌的制备

取 10 μL 低温保存的菌液, 接种于 10 mL 液体 YEB (内含 50 mg/L Rif 和 50 mg/L Kan) 培养基中, 28 °C, 250 r/min 培养 20~24 h, 再取 1 mL 菌液接入 40 mL 液体 YEB 培养基, 28 °C, 250 r/min 培养大约 6 h。

将 40 mL 菌液在 4 °C 5000 r/min 离心 10 min, 去上清得到菌体。加入 40 mL MS 液体培养基重新悬浮, 将菌液 OD<sub>600</sub> 值调整至约 0.8, 室温 (22 °C) 静置 1 h 后备用。

### 1.3 影响因子的设置

以 LBA4404[pBI-121] 浸染马铃薯 E3 块茎, 按照如下设置的处理进行实验。

将马铃薯 E3 块茎纵切成 1~3 mm 薄片, 用蒸馏水洗净, 在含不同诱导物乙酰丁香酮浓度 (0、200、400 μmol/L) 的菌悬液中以不同真空强度 (1、10、101 kPa) 浸染抽滤 (10、20、30 min), 然后将薯片用无菌水冲洗 1 次, 放在用无菌水浸湿的滤纸的培养皿中暗培养 (2、4、6 d)。培养后取薯片进行 GUS 组织化学染色, GUS 定量检测。

设置 4 个影响因子 (乙酰丁香酮浓度、真空强度、浸染时间、共培养时间), 3 个不同水平试验 (表 1), 采用 L<sub>9</sub> (3<sup>4</sup>) 正交表进行正交设计, 试验重复 3 次。最后分析 GUS 定量检测结果。

### 1.4 GUS 基因瞬时表达的检测

根癌农杆菌介导的实验材料培养完成后进行 GUS 组织化学染色<sup>[6]</sup>, 将薯片放入烧杯中, 加入 GUS 染色液 (20 mmol/L X-Gluc, 0.2 mmol/L Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.2 mmol/L NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.1 % Triton X-100, 10 mmol/L K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, 180 mmol/L EDTA) 将薯片浸泡, 37 °C 染色 9 h 后倒掉染色液, 加入 75% (V/V) 工业酒精进行脱色。荧光分析法测定 GUS 活性并记录实验数据。

试验所得数据用 SAS 统计分析软件进行方差分析, 并对平均数用新复极差法进行多重比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同影响因子处理的 GUS 表达情况

对 4 个影响因子设置的 9 种处理均获得了瞬时表达的马铃薯块茎, 但不同处理组合的 GUS 活性不同, 如表 1 所示。

表 1 不同影响因子处理的 GUS 表达情况

Table 1 Expression level of GUS activity

处理 Treatment	影响因子 Influence factors				GUS 活性/nmol MU/min/mg protein GUS activity
	乙酰丁香酮浓度/μmol/L acetosyringone concentration	真空强度/kPa vacuum intensity	浸染时间/min Infection time	共培养时间/d co-incubation time	
1	0	1	10	2	9.90±2.32 A
2	0	10	20	4	6.39±0.80 BA
3	0	101	30	6	2.89±1.94 BAC
4	200	1	20	6	5.18±1.21 BDC
5	200	10	30	2	8.89±3.75 DC
6	200	101	10	4	2.59±0.76 DC
7	400	1	30	4	6.06±0.57 DC
8	400	10	10	6	2.46±0.83 D
9	400	101	20	2	5.10±3.13 D

注: 同一列中不同字母表示处理间差异极显著 ( $P < 0.01$ )。Note: Different letters in a column mean significant differences ( $P < 0.01$ ) .

## 2.2 不同影响因子对瞬时表达水平的影响

在农杆菌介导的瞬时表达试验中,不同处理组合对 GUS 基因瞬时表达水平产生了影响。通过对不同处理组合的 GUS 活性数据进行方差分析(见表 2),可以看出,真空强度和共培养时间二因素对 GUS 基因瞬时表达水平的影响差异极显著,而乙酰丁香酮浓度和浸染时间则对 GUS 基因瞬时表达水平影响差异不显著。

表 2 GUS 活性各组间的方差分析  
Table 2 Variance analysis on GUS activity among combinations

因素 Factors	GUS 活性 GUS activity				
	DF	SS	MS	F	Pr>F
区组	2	1.7028074	0.8514037	0.19	0.8291
处理组间	8	170.1847185	21.2730898	4.74**	0.0040
乙酰丁香酮浓度	2	15.50302963	7.75151481	1.90	0.1788
真空强度	2	58.16920741	29.08460370	7.12**	0.0053
浸染时间	2	4.19700741	2.09850370	0.51	0.6068
共培养时间	2	92.31547407	46.15773704	11.30**	0.0007
误差项	18	73.5455333	4.0858630		
总变异	26	243.7302519			

注:表中“\*\*”代表差异显著,“\*\*\*”代表差异极显著。Note:“\*\*” mean  $P<0.05$ ,“\*\*\*” mean  $P<0.01$ .

进一步对真空强度和共培养时间各自的三个水平进行多重比较(见表 3),可以看出,不同真空强度水平对 GUS 基因瞬时表达的影响差异极显著,其中真空强度为 1 kPa 时 GUS 活性最大,该真空强度与 101 kPa 之间的差异达到 0.01 显著水平,与 10 kPa 处理间无显著差异,10 kPa 与 101 kPa 处理间差异显著。由表 3 还可以看出,不同共培养时间水平对 GUS 基因瞬时表达的影响差异极显著,共培养时间为 2 d 时 GUS 基因瞬时表达水平最大,其中,共培养时间为 2 d 时与共培养时间 4 d、6 d 之间的差异均达到 0.01 显著水平,而共培养时间 4 d 和 6 d 处理间差异不显著。

由上述分析可知当真空强度为 1 kPa、共培养时间为 2 d 时 GUS 基因瞬时表达水平到达最优。

表 3 真空强度、共培养时间对 GUS 活性影响的多重比较  
Table 3 Multiple comparisons of the effects of vacuum intensity and co culture time on GUS activity

因素 Factors	水平 Level	平均值 Mean value	差异显著性 Difference significance	
			0.05	0.01
真空强度	1	7.0467	a	A
	2	5.9156	a	AB
	3	3.5256	b	B
共培养时间	1	7.9622	a	A
	2	5.0156	b	B
	3	3.5100	b	B

## 3 讨论

共培养时间是影响马铃薯块茎瞬时表达水平的重要因素,因为农杆菌的附着、T-DNA 的转移及整合都在共培养阶段完成。有研究表明共培养时间过长,则会因为农杆菌的过度生长导致植物细胞受毒害而死亡<sup>[7]</sup>。本试验过程中也发现,共培养时间为 4 d 时有的马铃薯块茎出现腐烂现象,共培养时间越长,腐烂现象越严重,因此培养时间越长反而不利于 GUS 基因的表达。适当的真空渗透处理可以增加农杆菌对植物细胞的附着,有利于基因的表达,但真空强度过大会对植物和农杆菌细胞造成伤害,从而降低瞬间表达效率<sup>[8]</sup>,本试验发现当真空强度为 1 kPa 时马铃薯块茎的 GUS 基因瞬时表达水平最大,真空强度越大,表达水平越低。本试验中乙酰丁香酮浓度对 GUS 基因瞬时表达水平影响差异不显著,可能与马铃薯块茎切片自身就能分泌复合酚类化合物有关,这些酚类物质已经起到了活化 vir 基因的作用<sup>[9]</sup>,所以加入乙酰丁香酮并不能明显提高马铃薯块茎 GUS 基因的表达。试验中农杆菌并没有随着浸染时间的增加而更多的侵入马铃薯块茎,这可能与马铃薯块茎致密的组织结构有关,致密的组织结构可以起到阻止农杆菌侵入的作用,因此可能仅切片表面获得 GUS 基因表达,增加浸染时间对 GUS 基因表达并无太大影响。

由于试验中采用了含有 GUS 基因的中间载体 pBI-121, 其可能在农杆菌中表达, 因此进行试验分析排除其可能造成的干扰, 结果表明 GUS 基因在农杆菌中的表达未对本试验结果造成影响, 在此予以说明。

## 4 结论

本研究通过设置不同调控因子来研究 GUS 基因在马铃薯块茎中的瞬时表达情况, 试验发现真空强度和共培养时间是影响马铃薯块茎 GUS 基因瞬时表达水平的关键因素, 并且当真空强度为 1 kPa、共培养时间为 2 d 时 GUS 基因瞬时表达水平最大, 乙酰丁香酮浓度和浸染时间不是影响马铃薯块茎 GUS 基因瞬时表达水平的关键因素。

## 参考文献

- [1] 宋建, 刘仲齐. 农杆菌介导的基因瞬时表达技术及其应用[J]. 天津农业科学, 2008, 14(1): 20-22
- [2] 邱弼, 陶刚, 李奇科, 等. 农杆菌渗入法介导的基因瞬时表达技术及应用[J]. 分子植物育种, 2009, 7(5): 1032-1039
- [3] 李静, 陈敏, 刘现伟, 等. 莴苣高效瞬时表达体系的建立[J]. 园艺学报, 2006, 33(2): 405-407
- [4] 袁思玮, 黄锐之, 罗红兵. GUS 报告基因在植物功能基因研究中的应用[J]. 作物研究, 2008, 22(5): 310-314
- [5] 舒锐, 刘少军, 岳林旭, 等. 农杆菌介导的马铃薯块茎 GUS 基因瞬时表达研究[J]. 天津农业科学, 2013, 19(11): 1-3
- [6] Jefferson RA. Assaying Chimeric genes in plants the gus fusion system[J]. Plant Molecular Biology Reporter, 1987, 5(4): 387-405
- [7] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 194-317
- [8] 于翠梅, 刘限, 马莲菊, 等. 影响农杆菌渗入法瞬间表达重组蛋白系统的若干因素[J]. 生物技术通报, 2007(1): 45-49
- [9] 徐勤青, 刘凤珍, 万勇善. 影响农杆菌介导花生遗传转化率主要因素的研究[J]. 山东农业大学学报: 自然科学版, 2008, 39(2): 161-165

(上接第 539 页)

## 3 讨论

铁皮石斛属于药用价值极高的产品。在快速生长的过程中, 会造成药用成分质量的下降。下一步的研究方向应该是改良培养基的配方以及培养环境来降低或防止此现象。如果要实现大批量的生产, 培养基的成本也是亟待解决的方面, 优化培养基的配方, 使其物美价廉。

另外在炼苗过程中, 建议先使用 135 的条件进行培养, 出芽后立即转移到 233 的条件中。

## 参考文献

- [1] 宋顺, 许奕, 王必尊, 等. 不同培养基成分对铁皮石斛组织培养的影响[J]. 中国农学通报, 2013, 29(13): 133-139
- [2] 李筑. 铁皮石斛炼苗基质的筛选研究[J]. 中国民间医药, 2015, 2(2): 27-28
- [3] 崔现亮. 铁皮石斛生根壮苗培养基及炼苗技术研究[J]. 现代农业科技, 2015, 1(1): 104-108
- [4] 陈希, 黄丹丹. 铁皮石斛的组织培养与快速繁殖研究进展[J]. 海峡药学, 2011, 23(8): 19-22
- [5] 温明霞, 聂振朋, 林媚, 等. 铁皮石斛组织培养与快速繁殖研究进展[J]. 广西农业科学, 2007, 28(3): 227-230
- [6] 宋顺, 许奕, 李敬阳, 等. 铁皮石斛的组织培养与快速繁殖研究进展[J]. 中国农学通报, 2013, 29(33): 286-290
- [7] 远凌威. 三个产地铁皮石斛组织培养及其抗寒生理研究[D]. 信阳: 信阳师范学院, 2011
- [8] 王聪. 铁皮石斛快速繁殖技术研究[D]. 广州: 仲恺农业工程学院, 2014
- [9] 翟明恬, 刘红霞, 王亚妮. 铁皮石斛组织快繁及移栽培养[J]. 东北林业大学学报, 2015, 43(1): 50-53, 71
- [10] 黄勇. 铁皮石斛组织培养技术研究进展[J]. 文山学院学报, 2013, 26(6): 14-19