中国细胞生物学学报 Chinese Journal of Cell Biology 2016, 38(2): 193–201 DOI: 10.11844/cjcb.2016.02.0340

教学研究

植物转基因技术在高校本科生实验课程中的应用及方案设计

宋宏涛[1] 李万杰[2] 向本琼[1]* 聂频文[1]

([1]北京师范大学生命科学学院实验教学中心, 北京 100875;
[2]北京师范大学细胞增殖及调控生物学教育部重点实验室, 北京 100875)

摘要 植物转基因技术是生物学研究的常用技术, 也是高校生物学系本科生实验教学的重要内容之一。该文结合不同的植物转基因技术手段, 对原有的植物转基因技术在实验课程中的应用方案进行了重新整合设计, 从转基因植株的获得、筛选到多层次鉴定转基因效果等, 科学完整地设计了综合实验课程, 探究了实验的实施和可行性, 并给出了具体的课程实施建议。该教学实验设计也为高校生物学实验课程改革作了全新的探究和尝试。

关键词 植物转基因; 综合实验; 实验课程改革

The Application and Experimental Project Design of Plant Transgenic Technology in the Undergraduate Experimental Course

Song Hongtao[1], Li Wanjie[2], Xiang Benqiong[1]*, Nie Pinwen[1]

([1]*Experimental Teaching Center, College of Life Science, Beijing Normal University, Beijing 100875, China*;
[2]*Key Laboratory of Cell Proliferation and Regulation Biology, Ministry of Education, Beijing Normal University, Beijing 100875, China*)

Abstract The plant transgenic technology is commonly used in biology research, and it is one of important contents in undergraduate experimental teaching courses. In this paper, the experimental project for plant transgenic technology is re-integrated and designed by combing multiple plant transgenic technologies. The comprehensive experimental project includes the production of transgenic plants, screening of transgenic plants and multi-level identification of transgenic effects. We also explore the feasibility of implementation for the experimental project, and give some detailed suggestions for its implementation. The experimental teaching design can be considered as a new exploration and attempt for the reform of the undergraduate biology experimental course.

Keywords plant transgenic; comprehensive experimental project; reform of experimental course

1 引言

1.1 课程设置背景

2009年, 教育部联合中组部、财政部启动实施了"基础学科拔尖学生培养试验计划"(又名"珠峰计划"), 目标是针对高水平研究型大学的优势基础学科, 建立一批国家青年英才培养基地, 建立高等学校拔尖学生重点培养的体制机制, 吸引优秀的学生投身到基础科学研究, 形成拔尖创新人才培养的良好氛围, 并努力使受计划支持的学生未来能成为相关基础学科领域的领军人物[1-2]。2010年, 北京师范大学开始实施"基础学科拔尖学生培养试验计划"并创立励耘学院, 分别设置数学、物理、化学、生命科

收稿日期: 2015-10-27 接受日期: 2015-12-21
北京师范大学教学建设与改革项目(批准号: 12-02-16)资助的课题
*通讯作者。Tel: 010-58807721, E-mail: xiangbq@bnu.edu.cn
Received: October 27, 2015 Accepted: December 21, 2015
This work was supported by the Teaching Construction and Reform Project of Beijing Normal University (Grant No.12-02-16)
*Corresponding author. Tel: +86-10-58807721, E-mail: xiangbq@bnu.edu.cn
网络出版时间: 2016-02-22 16:53:59
URL: http://www.cnki.net/kcms/detail/31.2035.Q.20160222.1653.002.html

学(生物学)四个专业方向[3]。针对拔尖学生培养目标，需要对已有生物学专业的实验课程内容进行改革，北京师范大学生命科学学院在拔尖学生的实验课程培养方案方面进行了探索改革[3]。

日本学者思田彰指出，“创新型人才能够构思和创造有价值的东西，具有创造能力”。北京大学、清华大学、中山大学等国内著名高校生物专业近年已经根据自身的特点实行了实验教学改革，并且形成了具有特色的教学模式[4]。北京师范大学生命科学学院结合原有的实验课程体系设计了生物学综合实验I~IV(共四个模块)[3]，本文主要针对生物学综合实验模块III中的“植物转基因技术的应用”实验内容进行了探究和设计。

1.2 植物转基因技术

早在20世纪70年代，人们就开始对植物转基因开展研究。20世纪80年代初，转基因矮牵牛[5]和转基因烟草[6]获得成功后，植物基因工程发生了质的飞跃，植物转基因技术得到了广泛的应用和发展。近年来，随着高等植物的细胞培养、组织分化和再生以及基因重组技术发展日趋成熟，植物转基因技术进入了快速发展的新阶段[7,23]。

目前，用于植物细胞外源基因导入的方法和技术有很多种，主要分为载体介导法和DNA直接导入法。载体介导法主要分为农杆菌介导法和病毒介导法；DNA直接导入法包含化学物质诱导法、电击穿孔法、脂质体法、显微注射法、基因枪法、花粉管通道法等。在这些方法当中，农杆菌介导的基因转化法有较为明显的优势：可插入大片段的外源基因；外源基因转入时的拷贝数低，并优先插入具有转录活性的区域；基因沉默现象少，基因转化的效率高，尤其在双子叶植物当中(高达80%~90%)，在单子叶植物中稍低(可达20%~30%)[8]；转化再生的植株毋需原生质体培养再生，并且通常是可育的，转入的外源基因通常呈预期的孟德尔遗传[7]。农杆菌介导的瞬时表达提供了一种快速分析基因型功能的方法[24]。农杆菌介导的瞬时表达是将目的基因插入共整合载体或双元载体，转化根癌农杆菌。通过真空渗透或针管注射入植物叶片组织中。检测构建含目的基因的载体能否正确表达，同时也可快速获知目的蛋白有无活性[25]。“浸花法”在拟南芥当中的研究较多，是指在拟南芥合适的发育时期，用含有表面活性剂silwet-77的5%蔗糖溶液悬浮农杆菌，并用此菌液浸染花序的方法。这种方法不用进行愈伤组织培养，能够在短时间之内对作物进行遗传改良，并且利于大批量的工作[26]。正是具有这些明显的优势使得农杆菌介导的外源基因转化的方法越来越成为各种植物基因转化的主要方法，并形成了较为成熟的体系。

1.3 植物转基因技术在实验课程中的应用及问题

国内高校植物转基因技术应用于实验课程教学中，绝大部分是以烟草为实验材料进行转基因介导，学生的操作大部分只是按部就班的验证性行为。一些高校甚至考虑到实验周期长、实验经费高，采用了演示观摩实验进行替代[9]。内蒙古大学生命科学学院探究了全新的植物细胞工程实验教学体系，通过整合植物组织、细胞和分子三个水平的实验教学内容和操作技术，采用集中讲解、独立操作、全天候开放的实验教学模式[10]。我院原有的植物转基因技术在实验课程中的应用体现在本科生三年级的《生物技术大实验》中，基本内容涉及“农杆菌介导的烟草转基因[绿色荧光蛋白基因(green fluorescent protein gene, *gfp*)]植物的获得”和“利用PCR技术对转基因植株进行鉴定”两大部分。但是，原有的这部分实验课程，学生对实验原理的理解不够深入，学习较为被动，“动手多、动脑少”的现象普遍存在；实验内容的内在联系不够紧密，学生对某项技术的学习也是浅尝辄止，对相关实验技术没有机会深入了解，迫切需要一种多层次多元化的实验教学模式。

鉴于此，我院针对励耘理科实验班学生的有关植物转基因技术的实验课程设置进行了创新性探索和实施。将实验分为两大模块(图1)：转基因植物的获得、转基因植物的筛选及鉴定。在转基因植物的获得部分中，将*gfp*基因作为目的基因，同时也是报告基因，继续采用了技术较为成熟的农杆菌介导的“叶盘法”[11]转化模式植物——烟草。后期在长达6周左右的转化植株筛选过程中，穿插设置了“烟草叶片的‘直接注射法’的外源基因的瞬间转化实验[12]”和“‘浸花法’[13]转化拟南芥的实验”，通过多种转基因技术手段、不同基因转化效果(稳定转化和瞬间转化)和不同转基因部位(叶片、花)等多层次立体化的实践教学模式同时融入了同一个实验模块中。第二模块——转基因植物的筛选和鉴定，从三个不同水平开展：表型直接观察鉴定外源基因的表达活性(蛋白质水平)、植物组织RNA的提取及RT-PCR鉴定外源

基因的表达(转录水平)、基因组DNA的分离及PCR鉴定外源基因的存在和Southern杂交法鉴定转基因插入拷贝数(基因组水平)。这样安排体现了由表及里、从宏观到微观的逐步探究、逐层深入的科学研究思路, 培养和锻炼了学生严谨的科研思维。为了进一步加强和巩固已学实验内容, 让学生综合和归纳学过的内容, 设置课后作业——综合设计实验, 题目为“将某特定基因[如小麦抗倒伏基因咖啡酸甲基转移酶基因(caffeic acid-3-O-methyltransferase, *COMT*)]转入某模式植物中(如拟南芥)”的实验, 目的是让学生巩固与归纳已学的实验方法, 锻炼学生实验设计的水平和应用已学知识的能力。设计实验只写设计报告并不展开实验, 以小组汇报的形式进行考查。

2 教学设计与安排

2.1 教学目的

通过本实验让学生掌握农杆菌介导的转基因方法以及双载体系统的基本原理。掌握“叶盘法”、“注射法”、“浸花法”基因转化的基本原理和相关的实验技术。掌握以*gfp*作为报告基因的转基因植物的检测原理和方法。同时, 实验过程中学习荧光显微镜的使用方法, 并巩固应用分子生物学技术手段进行转基因植物的鉴定。

2.2 教学重点与难点

本实验的教学重点是系统掌握多种转基因技术的原理及多层次鉴定基因转化效果的方法。教学难点在于多种分子生物学技术手段的应用和结果分析。

2.3 实验材料与设备

2.3.1 主要材料 烟草幼苗、拟南芥植株、含T-DNA载体质粒pcambia1300的EHA105农杆菌菌株、*gfp*特异性扩增引物序列(上游引物: 5′-TCT TGT TGA ATT AGA TGG CG-3′, 下游引物: 5′-GTT GAT AAT GGT CTG CTA AT-3′)、内参引物序列[根据烟草组成表达基因*actin*(EU938079.1)设计, 上游引物: 5′-AGG GTT TGC TGG AGA TGA TG-3′, 下游引物: 5′-CGG GTT AAG AGG TGC TTC AG-3′]、silwet-77表面活性剂、乙酰丁香酮(acetosyringone, AS)、2-(N-吗啡啉)乙磺酸(N-morpholino-ethanesulfonic acid, MES)、植物组织培养实验相关试剂、常规植物基因组提取相关试剂、RT-PCR实验相关试剂、Southern杂交实验相关试剂及其他常规生化试剂等。

2.3.2 主要设备 超净工作台、恒温摇床、隔水式恒温培养箱、全天候光照培养箱、体视荧光显微镜及采相系统、1 mL医用注射器、PCR仪、核酸杂交炉、琼脂糖凝胶成像系统、琼脂糖凝胶电泳仪及其他常用实验设备等。

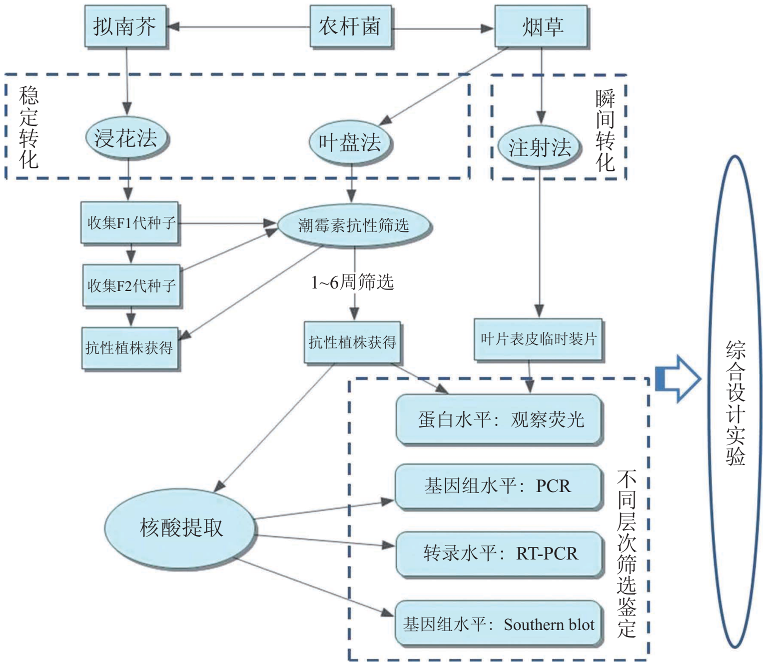


图1 实验方案及流程展示

Fig.1 Experimental program and flow display

表1　建议课时及内容安排

Table 1　Suggestions about class hours and content arrangement

实验	周次	课时数	内容安排
实验准备	1	4	实验总论、介绍本实验总体安排、主要实验内容及农杆菌介导的植物转基因的原理和方法
		4	分组配制MS培养基的母液、植物激素母液, 准备“叶盘法”基因转化所需的外植体消毒的器皿和工具, 配置所需的MS诱导与分化培养基并分装, 配置YEB培养基
		课余	对以上实验用品和试剂进行灭菌
“叶盘法”转化烟草	2	课余	进行农杆菌的活化
		2	讲解“叶盘法”基因转化中的注意事项, 检查预习情况
		4	进行“叶盘法”基因转化的实验操作(外植体的消毒等)
		2	配制“注射法”和“浸花法”基因转化和所需的试剂: YEB培养基、预培养液A、重悬培养基等准备MS培养基更换所需要的器材
“注射法”转化烟草和“浸花法转化拟南芥”	3	课余	灭菌、活化农杆菌、更换MS筛选培养基并准备下次更换培养基的用具
		2	考查预习情况, 集中讲解“注射法”和“浸花法”基因转化的理论知识和实验注意事项
		4	分别使用“注射法”转化烟草; “浸花法”转化拟南芥
		2	更换MS筛选培养基并准备下次更换培养基的用具
转基因植物的检测——表型观察(蛋白质水平)	4	课余	更换MS筛选培养基并准备下次更换培养基的用具
		3	考查预习情况, 讲解转基因植物筛选的常用方法和原理, 讨论*gfp*作为报告基因在植物转基因技术中的应用
		3	在无菌操作台摘取小块实验组和对照组的烟草愈伤组织于荧光显微镜下观察并采相记录结果
		2	更换MS筛选培养基并准备下次更换培养基的用具, 准备植物组织RNA提取需要的试剂和实验用品
转基因植物的检测——植物总RNA的提取和RT-PCR(转录水平)	5	课余	更换MS筛选培养基并准备下次更换培养基的用具
		1	考查预习情况, 集中讲解从转录水平检测转基因植物和RT-PCR的原理和方法
		2	提取实验组和对照组烟草愈伤组织的RNA, 并进行电泳检测
		1.5	测定所提取的RNA的浓度并进行第一链cDNA的合成
		3.5	进行以cDNA为模板的目的基因PCR和电泳检测(PCR期间更换MS筛选培养基并准备下次更换培养基的用具, 准备提取植物基因组DNA所需的试剂和用具)
转基因植物的检测——植物总DNA的提取、PCR鉴定(基因组水平)	6	课余	更换MS筛选培养基并准备下次更换培养基的用具
		2	考查预习情况, 集中讲解基因组提取、PCR和Southern杂交的实验原理
		4	进行烟草愈伤组织基因组DNA的提取和大肠杆菌中pCAMBIA1300重组质粒的提取实验
		1	配制PCR反应体系, 并进行PCR(PCR完成后, 将回收产物存放在4°C即可)
		1	更换MS筛选培养基并准备下次更换培养基的用具, 配制Southern杂交需要的变性液和中和缓冲液, 配制基因组酶切沉淀DNA需要的NaAc溶液。
转基因植物的检测——Southern杂交(转膜)(基因组水平)	7	课余	更换MS筛选培养基并准备下次更换培养基的用具
		1	进行上次课PCR产物的凝胶电泳检测
		4	进行基因组DNA的酶切和酶切产物的琼脂糖凝胶电泳
		3	制作Southern杂交转膜的装置
		课余	转膜后进行预杂交5~6 h, 助教收集膜, 存放于4°C冰箱中
转基因植物的检测——Southern杂交(洗膜检测)(基因组水平)	8	课余	实验前一天将杂交管中的预杂交液倒出, 加入含有适量探针的杂交液, 杂交过夜
		8	进行Southern杂交的洗膜和检测, 布置实验设计课题 设计实验: 利用*gfp*作为报告基因, 将小麦抗倒伏基因咖啡酸甲基转移酶基因(*COMT*)转入拟南芥
设计汇报	9	4	实验设计的小组汇报

2.4 教学安排

2.4.1　学时安排　本实验共分成三个阶段(表1): (1)转基因植物的获得: 叶盘法(8学时)、注射法和浸花法并行(8学时); (2)转基因植株的筛选鉴定: 蛋白水平表型观察(8学时)、基因组水平PCR法鉴定外源基因(8学时)、基因组水平Southern杂交鉴定外源基因转入拷贝数(8学时)、转录水平RT-PCR鉴定外源基因表达(8学时); (3)综合实验设计方案讨论及展示(3学时)。

2.4.2　课前准备　烟草幼苗(提前4个月播种)及拟南芥植株(提前3周播种)培养、农杆菌活化(提前1周)、相关引物合成等。

2.4.3　课后安排　第1、2周需要实验前一天下午接种农杆菌培养、从第1周至第7周, 学生自主安排转化植株的抗性培养基更换(每次2 h)及其他机动安排事项。

2.4.4　分组实验　建议4人为一小组。任务与要求: 协调分工, 通力合作, 包括不同实验流程、实验结果

观察、实验数据分析和实验报告整理。

2.5 实验原理

实验课上教师讲解基本实验原理和实验设计理论, 要求学生提前预习并扩展阅读, 完成如下预习内容。

阅读参考文献[5-7,14], 简述植物转基因技术和转基因植物筛选鉴定的发展历史。参考要点: 早在20世纪70年代, 人们就开始对植物转基因开展研究。近十几年来, 高等植物的组织分化和再生、细胞培养等基因重组技术发展日趋成熟, 植物转基因技术也逐渐发展起来[7]。20世纪80年代初, 转基因矮牵牛[5]和转基因烟草[6]获得成功。

参考阅读文献[15-17], 简述植物转基因及其筛选技术的原理。参考要点: 根癌农杆菌对植物释放的化学物质产生趋化反应, 向植物受伤组织集中。经共培养后, 受伤部位的化学诱导物透过农杆菌的细胞膜使Ti质粒上的*vir*基因活化。*vir*基因产物使Ti质粒上的T-DNA进入植物细胞, 并整合到植物核基因组中。插入在T-DNA左右边界区内的目的基因也随之整合到植物染色体上, 从而使目的基因在植物细胞中得到表达[15]。外源基因导入植物细胞的频率是很低的, 往往只有少部分的受体细胞获得外源DNA。因此, 在对受体植物进行相应的基因转化处理之后, 就必须利用标记基因(marker gene)或者报告基因(reporter gene)对其进行筛选和鉴定。常用的报告基因主要有β-葡萄糖醛酸乙酰转移酶基因(β-glucuronidase, *gus*)、胭脂碱合成酶基因(nopaline synthase gene, *nos*)、荧光素酶基因(luciferase gene, *luc*)和绿色荧光蛋白基因(*gfp*)等[16]。由于*gfp*荧光较为稳定, 较抗光漂白, 在植物中能够稳定存在, 在近年来被广泛利用, 能够代替*gus*起到监测基因表达和高分辨蛋白定位的作用[17]。

列举几种不同的植物转基因方法及其筛选鉴定方法。参考要点见本文引言部分[5-7,15]。抗性筛选(如潮霉素)、表型直接观察(蛋白水平: *gfp*是否有荧光)标记基因的表达、基因组水平(以基因组为模版PCR是否有特异条带)、转录水平(RT-PCR是否有特异条带)、基因组水平鉴定外源基因拷贝数(Southern杂交检测)等。

2.6 实验步骤

实验总体包括三个阶段(图1)。

2.6.1 转基因植株的获得　文献[11]描述了转基因植物的原理概述, 叶盘法详细操作步骤参考曾庆平等的论文[18]。注射法转化烟草叶片, 实验步骤参考黎茵等的论文[12]。浸花法转化拟南芥的实验步骤参考文献[13]。

2.6.2 转基因植株的筛选鉴定　(1)潮霉素抗性筛选。烟草实验: 将共培养处理的烟草叶片转移到凝固后的筛选培养基上(含100 mg/L羧苄青霉素和25 mg/L潮霉素B, 其中羧苄青霉素起到抑制农杆菌生长的作用。过多的农杆菌会抑制叶外植体的生长)。每隔3~4 d继代1次(一周2次), 培养条件为: 光照2 000 lx、温度26 °C、日照16 h。4周后, 转基因细胞分裂生长形成大量愈伤组织并有根、芽分化。拟南芥浸花法实验: 将浸花后的拟南芥培养并收种子, 用含有潮霉素(25 mg/L)的MS平板对种子进行筛选。连续收集F1代和F2代种子进行抗性筛选。(2)表型直接观察法(蛋白水平鉴定)。在无菌操作台取出烟草愈伤组织小块置于载玻片上。打开荧光显微镜, 调焦后在蓝光激发的状态下观察样品的颜色并采相。(3)基因组水平(PCR法)鉴定。植物基因组DNA的提取采用CTAB法[27]。PCR及琼脂糖凝胶电泳步骤[21]。(4)转录水平(RT-PCR法)鉴定外源基因的转录水平。采用Trizol法[19]提取转基因植株的总RNA; 琼脂糖凝胶电泳分析总RNA的提取质量, 并采用紫外分光光度计对RNA样品进行$D_{260/280}$的检测。RT-PCR方法依照采用经典步骤[20]对外源基因*gfp*的表达进行检测。(5)基因组水平(Southern杂交检测)检测外源基因转入拷贝数。植物基因组提取方法同(3)所述步骤。植物Southern杂交实验操作步骤详见文献[21-22]。

2.6.3 学生自主综合实验方案设计　为了进一步加强和巩固已学实验内容, 让学生综合实验学过的内容, 设置课后作业——自主设计综合实验, 题目为“将某特定基因[如小麦抗倒伏基因咖啡酸甲基转移酶基因(COMT)]转入某模式植物中(如拟南芥)”的实验, 目的是对学生已经学过的实验方法进行巩固和综合, 锻炼学生实验设计的水平和对已学知识的应用能力。设计实验只写设计报告并不实施实验, 以小组汇报的形式进行考查。

2.7 实验中需要注意的部分问题

2.7.1 叶盘法实验　农杆菌对外植体生长的抑制作用很强, 建议控制农杆菌菌液在$0.2<D_{600}<0.3$的时候进行浸染; 剪取叶片时, 带有较粗叶脉的外植体在共培养后易以叶脉为轴翘起, 翘起的部分叶片由于

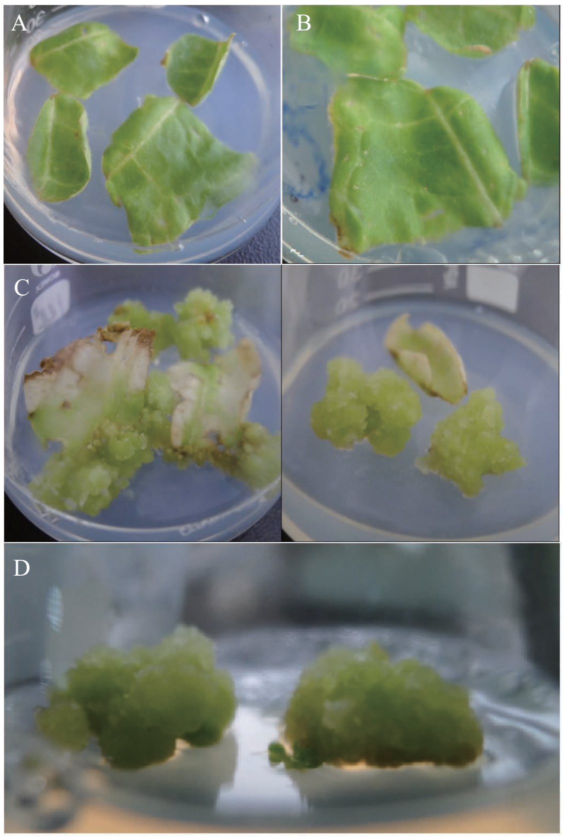
没有接触到MS固体培养基而很难生长出愈伤组织，故建议在剪取外植体的过程当中，除了要避免叶片边缘之外，还应当尽量避免主脉和较粗的叶脉。

2.7.2 注射法实验 将菌液在叶片背面的主脉注射时，阻力较大，菌液易从针口溢出，菌液在叶背面扩散的现象不明显。建议选择稍大叶片背面的侧脉注射，阻力较小，且菌液浸入并扩散的面积大。

2.7.3 浸花法实验 由于silwet-77以及农杆菌对拟南芥花有较强的伤害作用，因此，浸花时间应控制在15~30 s之间，在浸花后要将植株放倒进行避光处理。

2.7.4 表型直接观察(蛋白水平) 在实验组外植体培养2~3周，愈伤组织生长较大且质地相对疏松的时候，即可直接夹取愈伤组织在荧光显微镜下观察，操作比较简单。建议穿插在实验课中进行，亦可以在课余时间完成。

2.7.5 转录水平鉴定试验 植物组织RNA的提取操作比较繁杂，而且操作过程当中如有不当很容易造成RNA的降解。首先，所有用于提取RNA的器具要进行严格的除RNase处理。另外，在选材时应当尽量选择新鲜幼嫩的组织，研磨之前研钵要预冷，研磨组织时动作要快速，并在组织粉末化冻前加入Trizol试剂，转移粉末用的钥匙和盛放粉末的小指管都要在液氮中遇冷。



A: 培养7 d; B: 培养12 d; C: 培养35 d; D: 培养39 d。

A: screening culture for 7 days; B: screening culture for 12 days; C: screening culture for 35 days; D: screening culture for 39 days.

图2 叶盘法转化烟草植株培养外植体

Fig.2 The explants from transgenic tobacco via leaf disc

2.7.6 基因组水平鉴定实验 采用经典的CTAB法提取植物基因组的DNA，所需的试剂和操作步骤都比较简单，但是由于植物细胞匀浆含有多种酶类(尤其是氧化酶类)对DNA的抽提产生不利的影响，在抽提缓冲液中需加入抗氧化剂或强还原剂(如巯基乙醇)以降低这些酶类的活性。

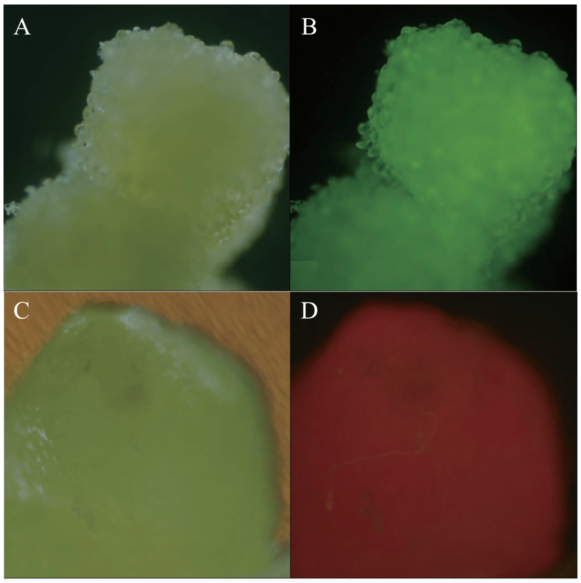
3 实验结果(部分)

3.1 转基因植株的获得

通过潮霉素抗性筛选的方法逐步筛选获得*gfp*转基因烟草植株(叶盘法，图2)，用于后续不同层次水平的鉴定。

3.2 随机选取对照组的烟草愈伤组织和实验组(潮霉素筛选阳性)的烟草愈伤组织

分离小块置于荧光显微镜下观察。在蓝光激发下，筛选阳性的愈伤组织呈现明亮的绿色荧光(图3A

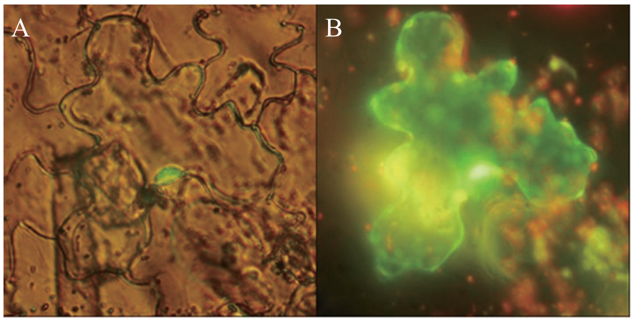


A: 潮霉素筛选为阳性烟草愈伤组织在可见光下; B: 潮霉素筛选为阳性烟草愈伤组织在蓝色荧光激发下; C: 对照组烟草愈伤组织在可见光下; D: 对照组烟草愈伤组织在蓝色荧光激发下。

A: positive tobacco callus under visible light; B: positive tobacco callus under blue fluorescence; C: control tobacco callus under visible light; D: control tobacco callus under blue fluorescence.

图3 蛋白水平——“表型直接观察”的实验结果(50×)

Fig.3 Results of direct phenotype observation on protein expression level (50×)



A: 可见光下; B:蓝色荧光激发下。

A: under visible light; B: under blue fluorescence.

图4 注射法转染后*gfp*基因在叶片细胞中表达情况(400×)

Fig.4 *Gfp* expression in transgenic tobacco leaf via injection (400×)

和图3B), 而对照组的愈伤组织则呈红色(图3C和图3D)。

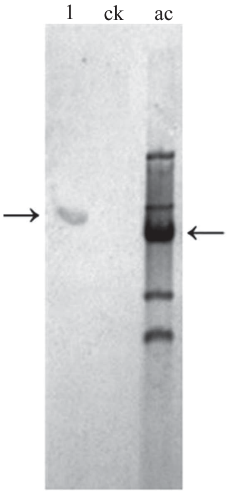
3.3 注射法进行外源基因的瞬时表达实验

含有T-DNA载体pCAMBIA1300的农杆菌EHA105经YEB扩大培养及预培养液A培养后, 由含有MES和AS的MS液体基本培养基重悬, 继而注射到烟草叶片背面。2 d后发现, 有菌液浸入的叶片发黄褐色, 轻轻撕取菌液浸没部位的叶背面表皮, 置于荧光显微镜下观察, 发现有部分细胞在蓝光激发下呈现绿色荧光(图4), 表明*gfp*基因在这些细胞中瞬时表达。

3.4 转基因植株的鉴定(基因组水平和转录水平)

用Trizol试剂微量提取实验组和对照组烟草愈伤组织的RNA, 进行RT-PCR, 实验组PCR产物在约500 bp位置处出现了明显的PCR条带, 而对照组在相应的位置没有出现条带(图5A), 可见*gfp*基因成功转入实验组烟草中并获得了表达。

利用提取的实验组基因组DNA和对照组基因组DNA进行PCR检测。图5B为扩增*gfp*基因(采用了大小为508 bp片段的一对引物和*gfp*全长的引物), 实验组PCR产物在约500 bp位置处出现了明显的PCR

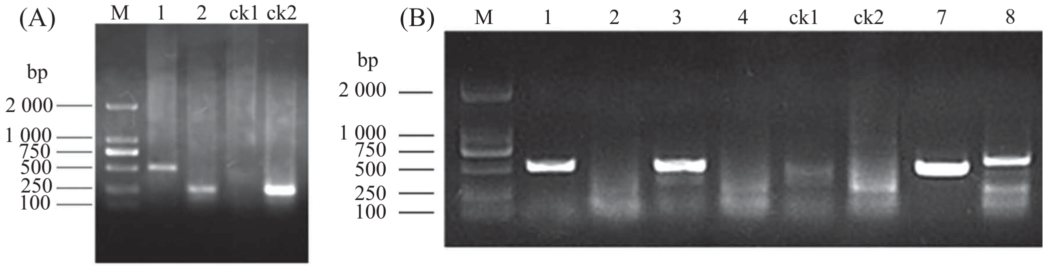


1: PCR检测呈阳性的转基因烟草基因组(箭头所指为*gfp*杂交条带); ck: 对照组烟草基因组; ac: 含有T-DNA载体pCAMBIA1300质粒(箭头所指为*gfp*杂交条带)。

1: positive transgenic tobacco (array is the *gfp* hybridization bands); ck: control tobacco; ac: T-DNA vector pCAMBIA1300 plasmid (array is the *gfp* hybridization bands).

图6 转基因烟草的Southern blot杂交结果

Fig.6 Southern blot results for transgenic tobacco



A: 转基因烟草转录水平RT-PCR检测; M: DL2000标准相对分子质量Marker; 1: 转基因烟草的RNA进行的508 bp *gfp*基因的RT-PCR扩增; 2: 使用内参引物对转基因烟草的actin(EU938079.1)进行的RT-PCR扩增; ck1: 对照组烟草的RNA进行的508 bp *gfp*基因的RT-PCR扩增; ck2: 使用内参引物对对照组烟草actin(EU938079.1)进行的RT-PCR扩增。B: 基因组水平对转基因烟草的PCR检测(508 bp *gfp*和全长*gfp*); M: DL2000标准相对分子质量Marker; 1、3: 均为转基因烟草的基因组进行的508 bp *gfp*的PCR扩增; 2、4: 为转基因烟草的基因组进行的全长*gfp*的PCR扩增; ck1、ck2: 为对照组烟草的基因组进行的508 bp *gfp*和全长*gfp*基因的PCR扩增; 7、8: 为含有T-DNA载体pCAMBIA1300质粒进行的508 bp *gfp*和全长*gfp*基因的PCR扩增。

A: RT-PCR results; M: DL2000 marker; 1: transgenic tobacco results (product length: 508 bp); 2: internal reference gene *actin* RT-PCR results for transgenic tobacco; ck1: *gfp* RT-PCR for control tobacco results (product length: 508 bp); ck2: internal reference gene actin RT-PCR results for control tobacco. B: PCR identification on genome level (508 bp and full length products); M: DL2000 marker; 1,3: PCR results for transgenic tobacco (508 bp product); 2,4: PCR results for transgenic tobacco (full length product); ck1,ck2: separately, PCR results (508 bp and full length products) for control tobacco; 7,8: separately, PCR results (508 bp and full length products) for T-DNA vector pCAMBIA1300 plasmid.

图5 转录水平及基因组水平鉴定外源*gfp*基因

Fig.5 *Gfp* expression identification on transcription and genome levels

条带。对照组没有相应的条带, 初步证明*gfp*基因已整合到烟草基因组中。

将PCR呈阳性的烟草愈伤组织基因组DNA进行Southern杂交分析, 结果显示, PCR扩增呈阳性的烟草基因组DNA可与*gfp*的探针产生杂交信号, 而对照组烟草无杂交信号, 如图6所示。可见, 分子杂交鉴定*gfp*基因转入烟草基因组, 根据结果推断外源基因插入为单拷贝。

4 讨论

从三种转基因实验方法的结果来看, 叶盘法由于需要不断地传代培养、实验周期较长, 但是转化稳定, 且可以得到转基因植株, 学生对于叶盘法实验结果成功率较高、印象深刻。注射法相对来说操作简单且周期短(2~3 d内), 可以观察到*gfp*基因在叶片细胞内的瞬时表达效果, 转化成功率高, 不足之处在于无法稳定转化, 无法获得转基因植株。浸花法采用拟南芥植株为实验材料, 实验周期较长、可以实现稳定转化从而获得转基因植株, 同时也可以让学生了解拟南芥这一模式生物的培养过程。从目前的实验结果看, 不足之处在于实验操作较为复杂、难度大、转化成功率较低。本实验课程设置在参考国内外关于植物转基因技术的相关文献的基础上, 结合我院多年来本科生实验教学的情况, 确定了"转基因技术在植物中的应用"的实验课程内容, 其中涉及到植物组织培养技术、三种转基因方法的实施、PCR技术、Southern杂交技术、DNA凝胶电泳技术等多项基本的科研技能; 同时, 整个实验的内容具有较强的整体性, 内容衔接紧密, 从转基因植物获得、初步抗性筛选、基本表型筛选, 到后来的分子水平最终确定外源基因转化成功, 分别从蛋白质水平、转录水平和基因组水平对其进行检测和鉴定, 有助于学生科研思路的训练; 在转基因植物的获得中, 采用了三种不同的转基因方法对烟草和拟南芥的不同组织部位分别进行基因转化, 有利于学生深入地了解转基因技术, 开拓视野。在实验课程的最后阶段, 让学生独立进行实验设计, 巩固并应用已学的实验方法, 符合励耘理科实验班中培养学生设计实验的能力的目标。

本实验课程适合在拔尖学生实验班或高年级本科生中开设, 从前期的预实验结果及在北京师范大学生命科学学院实施3年(2010级~2013级励耘理科实验班生物方向)的实际效果来看, 实验结果明显、学生反应良好。建议安排在学生已经修完分子生物学实验和植物细胞工程相关理论课程后开设。

特别感谢2009届本科生聂频文同学在本实验方案设置过程中的辛勤付出, 提供了文中很多的预实验结果及图片。

参考文献 (References)

1 国家中长期教育改革和发展规划纲要工作小组办公室. 国家中长期教育改革和发展规划纲要(2010–2020年). 人民日报(National middle and long term education reform and development plan outline working group office. National medium-and long-term plan for education reform and development (2010–2020). People's Daily), 2010-03-01.

2 中组部要讯. 大学生优选计划以特殊措施培养特优学生. 党建研究(Zhongzubu Yaoxun. Preferred College Students project is used to train students with special measures. Dangjian Yanjiu) 2011; 8: 40.

3 李万杰, 宋宏涛, 向本琼. 励耘拔尖学生生物学综合实验的课程设置与探讨. 高等生物学教学研究(电子版)(Li Wanjie, Song Hongtao, Xiang Benqiong. Design and discussion of biology comprehensive experiment for Liyun top innovative talent classes. Biology Teaching in University, Electronic Edition) 2014; 3(4): 31-4.

4 宋卫平, 耿明华. 中国高校生物实验教学体系与模式探讨. 实验技术与管理(Song Weiping, Geng Minghua. Exploration on the university experimental teaching system and mode of biology in China. Experimental Technology and Management) 2009; 26(6): 120-4.

5 Draper J, Davey MR, Freeman JP, Cocking EC, Cox BJ. Ti plasmid homologous sequences present in tissues from Agrobacterium plasmid-transformed petunia protoplasts. Plant and Cell Physiology 1982; 23(3): 451-8.

6 Herrera-Estrella L, van den Broeck G, Maenhaut R, van Montagu M, Schell J, Timko M, *et al*. Light-inducible and chloroplast-associated expression of a chimaeric gene introduced into Nicotiana tabacum using a Ti plasmid vector. Nature 1984; 310(5973): 115-20.

7 高俊山, 林 毅, 叶兴国, 马传喜. 植物转基因技术和方法概述. 安徽农业科学(Gao Junshan, Lin Yi, Ye Xingguo, Ma Chuanxi. Summary of the techniques and methods of plant gene transformation. Journal of Anhui Agricultural Sciences) 2003; 31(5): 802-5.

8 叶健明, 唐克轩, 沈大棱. 植物转基因方法概述. 生命科学(Ye Jianming, Tang Kexuan, Shen Daleng. The methods for transferring genes into plants. Chinese Bulletin of Life Sciences) 1999; 11(2): 58-60.

9 王 丽, 司怀军, 张俊莲. 植物基因工程实践教学改革探索与实践. 高教论坛(Wang Li, Si Huaijun, Zhang Junlian. Exploration and practice of practical teaching reform in plant genetic engineering. Higher Education Forum) 2014; 4(4): 64-7.

10 林晓飞, 征 荣, 莫日根. 本科植物细胞与基因工程研究型实验课程的构建与实践. 遗传(Lin Xiaofei, Zheng Rong, Mo Rigen. Research-oriented experimental course of plant cell and gene engineering for undergraduates. Hereditas) 2015; 37(4): 402-6.

11 Horsch RB. A simple and general method for transferring genes into plants. Science 1985; 227(4691): 1229-31.

12 黎 茵, 张已顺. 农杆菌注射渗透法转化烟草实验研究. 实验技术与管理(Li Yin, Zhang Yishun. Study on agrobacterium tumefaciens-mediated transient transformation of tobacco by infiltration. Experimental Technology and Management) 2010; 27(11): 50-2.

13 Steven JC, Andrew FB. Floral dip: A simplified method for agrobacterium-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. Plant J 1998; 16(6): 735-43.

14 Shimonmra O, Johnson FH, Saiga Y. Extraction, purification and properties of aequorin, a bioluminescent protein from the luminous hydromedusan, *Aequorea*. J Cell Comp Physiol 1962; 59: 223-39.

15 Byebier BF, Deboeck F, Greve HD, Montagu MV, Hernalsteens JP. T-DNA organization in tumor cultures and transgenic plants of the monocotyledon *Asparagus officinalis*. Proc Natl Acad Sci USA 1987; 84(15): 5345-9.

16 马三梅, 王永飞. 标记基因和报告基因的辨析. 农业与技术(Ma Sanmei, Wang Yongfei. The difference of marker gene and reporter gene. Agriculture & Technology) 2005; 25(3): 79-80.

17 Jim H, Brad A. GFP in plants. Trends Genet 1995; 11(8): 328-9.

18 曾庆平, 李保健. 叶盘共培养法介导的基因转移与两种转基因植物的鉴定. 中山大学学报论丛(Zeng Qingping, Li Baojian. Leaf-disc coculture mediated gene transfer and the expression and identification of foreign genes in transgenic plants. Supplement to the Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni) 1989; 8(4): 29-39.

19 丁福章, 李继新, 袁有波, 雷 波. 烟草不同组织总RNA的提取方法初探. 中国农学通报(Ding Fuzhang, Li Jixin, Yuan Youbo, Lei Bo. Effectve isolation of total RNA from tobacco tissues. Chinese Agricultural Science Bulletin) 2007; 23(12): 98-101.

20 鲁 燕, 徐兆师, 张瑞越, 刘 丽, 李连成, 陈 明, 等. W6基因的过表达提高转基因烟草的耐盐性. 作物学报(Lu Yan, Xu Zhaoshi, Zhang Ruiyue, Liu Li, Li Liancheng, Chen Ming, *et al*. Overexpression of W6 gene increases salt tolerance in transgenic tobacco plants. Acta Agronomica Sinica) 2008; 34(6): 984-90.

21 向本琼. 现代生物学实验技术指导. 北京: 北京师范大学出版社(Xiang Benqiong. Xiandai Shengwuxue Shiyan Zhidao. Beijing: Beijing Normal University Publication Group) 2009, 121-9.

22 Southern EM. Detection of specific sequences among DNA fragments separated by gel electrophoresis. J Mol Biol 1975; 98(3): 503-17.

23 杨维才. 植物转基因技术——回顾与前瞻. 植物学报(Yang Weicai. Plant transgenic technology: Past and current development. Chinese Bulletin of Botany) 2013; 48(1): 6-9.

24 吴英杰, 姜 波, 张 岩, 李彦邦, 贺 琳, 王玉成. 农杆菌介导的烟草瞬时表达试验条件优化. 东北林业大学学报(Wu Yingjie, Jiang Bo, Zhang Yan, Li Yanbang, Wang Yucheng. Transient expression in tobacco by agrobacterium-mediated transformation. Journal of Northeast Forest University) 2010; 38(9): 110-2.

25 罗 熹, 王 涛, 卢 彪. 植物体瞬时表达ChlFN-γ蛋白研究. 广东农业科学(Luo Xi, Wang Tao, Lu Biao. Analysis of transient expression in plants by ChIFN-γ. Guangdong Nongye Kexue) 2013; 4: 128-30.

26 党智笙, 肖成斌, 马燕林, 马建忠. 农杆菌介导的浸花法(Floral-dip)存在的问题及对策. 中国食品工业(Dang Zhisheng, Xiao Chengbin, Ma Yanlin, Ma Jianzhong. The problems and countermeasures of floral-dip by agrobacterium-mediated. Food and Beverage Industry) 2014; 6: 58.

27 陈昆松, 李 方, 许昌杰, 张上隆, 傅承新. 改良CTAB法用于多年生植物组织基因组DNA的大量提取. 遗传(Chen Kunsong, Li Fang, Xu Changjie, Zhang Shanglong, Fu Chengxin. An efficient macro-method of genomic DNA isolation from actinidia chinensis leaves. Hereditas) 2004; 26(4): 529-31.