

宗桦, 胡霞, 陈学宏. 侧枝萌发诱导基因(*LIF*)的原核表达与农杆菌介导转化麻风树幼叶[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(9): 14–19.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.09.004

# 侧枝萌发诱导基因(*LIF*)的原核表达 与农杆菌介导转化麻风树幼叶

宗桦<sup>1</sup>, 胡霞<sup>2</sup>, 陈学宏<sup>3</sup>

(1. 西南交通大学建筑学院, 四川成都 610031; 2. 乐山师范学院生命科学院, 四川乐山 614004;

3. 西南交通大学生命科学与工程学院, 四川成都 610031)

**摘要:**麻风树(*Jatropha curcas* L.)的有限分枝是限制麻风树油产量的最主要因素之一,为了奠定基因调控麻风树分枝的基础,研究并优化了侧枝萌发诱导基因 *LIF*(lateral shoot-inducing factor)的原核表达条件,并成功获得了重组蛋白。通过研究农杆菌浓度、抗生素浓度建立了稳固高效的麻风树农杆菌((LBA4404)高效转化体系;将 *LIF* 基因转入麻风树基因组中,通过 GUS 染色、PCR、Southern blot 检测,确定了 *LIF* 基因已经成功转化入麻风树基因组中,获得了高达  $(23.91 \pm 5.78)\%$  的转化率。

**关键词:**麻风树;侧枝萌发诱导基因(*LIF*);幼叶;农杆菌

**中图分类号:**Q943.2

**文献标志码:**A

**文章编号:**1002-1302(2015)09-0014-06

属于大戟科的麻风树(*Jatropha curcas* L.)是一类具有极强抗旱性的大灌木或小乔木,其种子中含油丰富,并能较容易地转化成纯度能满足美国和欧洲标准的生物柴油<sup>[1]</sup>。此外,麻风树油还可应用于制造肥皂、化妆品、染料等产品<sup>[2-4]</sup>。然而,由于麻风树的种子产量较低,极大地限制了麻风树油的推广应用。迄今为止,提高麻风树种子的产量仍是一件十分困难的事情,这是由于麻风树的种子产量受到多种因素影响,如自然环境<sup>[5]</sup>、麻风树的分枝形态<sup>[6]</sup>、基因型<sup>[7]</sup>、经营管理方法<sup>[8]</sup>等。在这些因素当中,麻风树结果母枝的分枝形态被认为是最重要的制约因素之一,因此许多学者认为增加麻风树结果母枝的数量就能有效地提高麻风树种子的产量<sup>[8-9]</sup>。

近年来,世界各国都开始关注植物分枝发育控制机理的研究,通过采用包括突变体分离、定位、克隆相关基因和相关基因分析等分子生物技术等方法,不断加深对植物分枝发育的认识。目前在许多物种,如矮牵牛<sup>[10-11]</sup>、烟草<sup>[12]</sup>、番茄、豌豆、玉米、水稻和拟南芥<sup>[13]</sup>中都开展了突变体作为分枝的变化模式研究。2005年,Nakagawa等从矮牵牛中克隆出了侧枝萌发诱导基因 *LIF*,是目前唯一一个被报道的分枝基因<sup>[14]</sup>。

Nakagawa等研究发现,*LIF*基因在矮牵牛、烟草、拟南芥中过量表达均可以导致植株分枝明显增多,高度明显降低,叶片小化<sup>[14]</sup>,由此 Nakagawa等推断,*LIF*基因在双子叶植物中能保守地表达,可以调控双子叶植物的分枝<sup>[14]</sup>。进一步研究发现,*LIF*编码的蛋白属于一种 TFⅢA 型锌指蛋白,具有这种类型结构域的蛋白一般是结合 DNA 作为转录因子参予多种植物的调控过程。然而由于 *LIF* 被发现的时间短,因此针对

*LIF* 诱导的蛋白的功能研究还未开展。再加上植物分枝的形成是一个受多种因素影响的复杂的生物学现象,因此,针对单个基因开展蛋白纯化研究对于了解其在植物形态构成上的功能有一定的难度。而通过重组的方式在大肠杆菌中进行原核表达为 *LIF* 基因的功能研究提供了一个良好的途径。众所周知,大肠杆菌是现代分子生物学研究中最常用的材料之一,目前除了已经掌握了它的分子生物学和分子遗传学方面的大量资料外,在基因表达方面也有深入研究。大肠杆菌遗传背景清楚,容易培养,能大规模发酵,并具有大量可供选择利用的克隆和高效表达载体<sup>[15]</sup>。

本研究构建了 *LIF* 原核表达载体,转入大肠杆菌 BL21 中,将转化子进行诱导表达,获得重组蛋白,摸索表达的最优条件,为进一步探讨 *LIF* 的功能奠定基础。同时,将 *LIF* 基因转入麻风树基因组,了解 *LIF* 基因在麻风树中的表达方式,为基因调控麻风树的分枝做好准备工作。

## 1 材料与方法

### 1.1 植物材料和菌株

试验所用矮牵牛(*Petunia hybrida* Vilm)种苗种植在温室(14 h 光照/10 h 黑暗,室温 22 ℃)中。成熟麻风树种子来源于攀枝花市。种苗种植于盛满沙和营养土的塑料钵中,于温室中生长 2 个月(16 h 光照/8 h 黑暗,室温 28 ℃)后,取第 1~3 节上的叶片用作试验。灭菌后的麻风树幼叶切成为 1 cm<sup>2</sup> 的小块,接入愈伤组织诱导培养基中预培养 2 d。

*Escherichia coli* 菌株 BL21、农杆菌菌株 LBA4404 均为笔者所在实验室保存。

### 1.2 矮牵牛 *LIF* 基因开放阅读框获得和原核表达载体构建

1.2.1 *LIF* 基因 ORF 的扩增 提取矮牵牛的 RNA,用 Oligo(dT)<sub>18</sub> 为引物进行反转录,反转录产物作为模板,设计引物 lof33、lof52 进行 PCR 扩增 ORF 序列。酶切位点(下划线部分)分别为 *Bam*H I、*Hind* III。引物序列如下: lof33:

收稿日期:2014-08-28

基金项目:国家自然科学基金(编号:51308464);西南交通大学科技创新项目(编号:A0920502051405-62)。

作者简介:宗桦(1981—),女,江苏宜兴人,博士,讲师,主要从事植物学研究。E-mail:14744632@qq.com。

5' - CCCAAGCTTTTCATAAGAACCTTCTGTGCCTAAACC - 3';  
lof52: 5' - CGCGGATCCATGGAAACTAGTAAAAATCAGC-  
CGTC - 3';反转录引物:Oligo (dT)<sub>18</sub>:5' - GCTGTCAACGAT-  
ACGCTACGTAACGGCATGACAGTG (T)<sub>18</sub> - 3'。反应条件  
为:95 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 40 s,62 ℃ 40 s,72 ℃ 1 min,34  
个循环;72 ℃ 延伸 10 min。将 PCR 产物电泳后进行回收,回  
收按照 DNA 胶回收试剂盒的说明步骤进行。

1.2.2 原核表达载体的构建 原核表达所用质粒载体选用  
pET32<sup>[16]</sup>,含有 T7 启动子、6 个 His 标签,具有 Amp 抗性。将  
胶回收的片段连接到 pMD19 - T 载体上,连接产物转化大肠  
杆菌 DH5α 感受态获得转化子 pMD19 - T - LIF,摇菌 1 h 后  
涂 LB 平板,37 ℃ 过夜培养。于第 2 天挑菌,摇菌后送样测  
序。经测序检测获得 LIF 的 ORF 片段后,摇菌提质粒。用限  
制性内切酶 BamH I、Hind III 双酶切载体 pET32,胶回收线性  
载体。用 T4 连接酶连接目的片段与线性载体(均带有  
BamH I、Hind III 黏性末端)。16 ℃ 连接过夜,获得重组子  
pET - LIF (简称 PL)。随后将重组子转入大肠杆菌 BL21 感  
受态细胞获得转化子 PLB,摇菌后提取质粒,采用酶切、菌落  
PCR 和测序等手段检验目的片段是否正确。同时也将空载  
pET32 用同样的方法转入大肠杆菌 BL21 以获得空白对照转  
化子 pET32 - Empty (简称 PE)。引物均由上海英骏生物技  
术有限公司合成。

1.3 PLB 的诱导表达

挑取重组菌 PLB、PE 分别接种到 15 mL 的 AMP - LB 液  
体培养基中,放置于 37 ℃ 下振荡培养 12 h。再从过夜培养物  
种各取 500 μL 菌液接种于新鲜的 10 mL AMP - LB 液体培养  
基中,37 ℃ 下振荡培养直到菌液的 D<sub>600 nm</sub> = 0.6 ~ 0.7。随后  
将 PLB 菌液均分后放置于不同的诱导温度、诱导时间和添加  
不同浓度的 IPTG 中进行诱导(表 1)。

1.3 矮牵牛 LIF 基因蛋白编码序列 (coding sequence, CDS)  
和植物表达载体的构建

1.3.1 CDS 的扩增 首先在 GenBank 搜索出矮牵牛 LIF 基  
因的编码蛋白 (accession number: AB035093),根据其蛋白序  
列设计出 C1、C2 引物序列用于扩增矮牵牛 CDS,酶切位点分  
别为 Xba I、Sma I 酶切位点(酶切位点见下划线)。引物序

表 1 不同温度、不同时间和不同浓度的 IPTG 对 PLB 的诱导

编号	处理	重组菌	IPTG (g/L)	诱导温度 (℃)	诱导时间 (h)
1	Y0	PE	0.240	37	5
2	Y1	PLB	0.240	20	5
3	Y2	PLB	0.240	30	5
4	Y3	PLB	0.240	37	5
5	J0	PE	0.240	30	4
6	J1	PLB	0.240	30	2
7	J2	PLB	0.240	30	4
8	J3	PLB	0.240	30	6
9	T0	PE	0.240	37	5
10	T1	PLB	0.024	37	5
11	T2	PLB	0.120	37	5
12	T3	PLB	0.240	37	5

列如下:C1:5' - GCTCTAGAATGGAAACTAGTAAAAATCAGC-  
CGTC - 3'; C2:5' - CTACCCGGGTCATAAGAACTTCTT - GT-  
GCCTAAACC - 3'。反应程序为:95 ℃ 预变性 4 min;94 ℃  
30 s,60 ℃ 40 s,72 ℃ 1 min,34 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。  
随后以矮牵牛的 cDNA 为模板,采用 PCR 技术获得 LIF 基因  
的 CDS。

1.3.2 植物表达载体的构建 将 LIF 基因的 CDS 插入表达  
载体 pBI121<sup>[17]</sup>中,LIF 基因的插入位置见图 1,获得重组载体  
pBI121 - LIF。pBI121 载体含有 Npt II 基因,抗卡那霉素  
(Kan);含 GUS 基因作为报告基因;含 CaMV35S 启动子(笔者  
所在实验室保存)。提取重组子 pBI121 - LIF 质粒后,用反复  
冻融法<sup>[18]</sup>将其转化入农杆菌 LBA4404<sup>[19]</sup>感受态细胞中,同  
时也将空载 pBI121 以同样的方法转入 2 种农杆菌感受态中  
以获得空白对照,获得转化子 pBI121 - Empty (简称 PBE)。  
检验后的含有 LIF 基因的农杆菌单菌落接种到 1 mL YEB 液  
体培养基中,培养基中加入 50 μg/mL 链霉素 (Str)、  
100 μg/mL 利福平 (Rif)、100 μg/mL Kan,于恒温摇床上  
27 ℃、200 r/min 摇培过夜。取出 500 μL 培养过夜的菌液转  
入新配制的有同样抗生素的 YEB 液体培养基中,培养直到  
D<sub>600 nm</sub> = 1.0 时,用新鲜的 MS 液体培养基 (pH 值 5.4 ~ 5.8)  
分别稀释为 D<sub>600 nm</sub> = 0.1 ~ 0.5 用于转化。

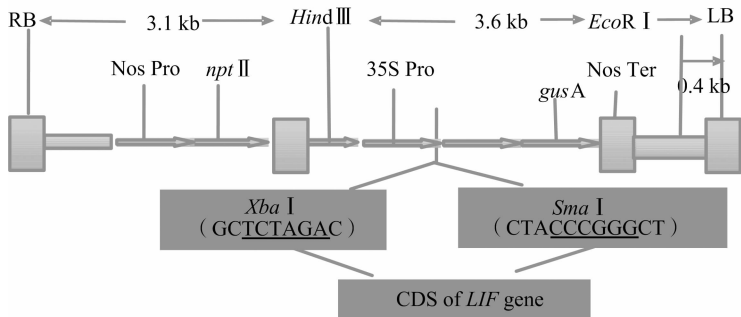


图 1 LIF 基因植物表达载体 pBI121-LIF 构建示意

1.4 培养基成分和培养条件

试验中外植体培养均选用 MS 培养基<sup>[20]</sup>为基础培养基,  
其中蔗糖质量浓度为 3%,琼脂质量浓度为 0.8%,pH 值为  
5.8。外植体的培养均在 28 ℃ 的温室中进行,并保持 16 h 光  
照、8 h 黑暗交替。具体培养基配方如下<sup>[21]</sup>:愈伤组织诱导培

养基 (CI):MS + 2.0 mg/L 6 - BA + 0.05 mg/L 2,4 - D;愈伤  
组织再生培养基 (PR):MS + 0.5 mg/L 6 - BA + 0.5 mg/L KT +  
0.1 mg/L IBA + 0.1 mg/L GA<sub>3</sub>;生根培养基 (RM):MS +  
0.2 mg/L IBA;大肠杆菌 LB 培养基:10 g/L 胰蛋白胨,5 g/L  
酵母提取物,10 g/L NaCl,pH 值 7.0。固体 LB 培养基在以上

成分中添加 15 g/L 琼脂粉。

### 1.5 外植体的转化和选择培养

预培养之后的幼叶外植体浸入 30 mL 含 *LIF* 基因的农杆菌菌液中,在 28 ℃、200 r/min 的摇床上侵染 10 min。用干燥的无菌滤纸吸去多余菌液后将外植体转移到 CI 培养基中,在全暗的温室(28 ℃)中共培养 2~7 d。随后,将外植体转入加入了 300 mg/L 头孢霉素(Cef)的新鲜 CI 培养基中,继续暗培养 3 周。待愈伤组织产生后,马上转入加入了 Kan(0、10、20、30、40 mg/L)、150 mg/L Cef 的新鲜 PR 培养基中诱导抗性丛生芽。经过 4 周的筛选后,将抗 Kan(Kan<sup>R</sup>)的麻风树再生单芽切下并转入加入 Kan 的 RM 生根培养基中。经 3~4 周诱导后,将生根的植株移入放置于温室中的培养钵中,培养钵中加入珍珠岩:沙:土=1:1:1(体积比)的混合基质中练苗 2 周后移入大田。

### 1.6 转基因植株的鉴别

GUS 染色:将共培养后的叶盘、愈伤组织和抗 Kan 的丛生苗切成小块后放在 1.5 mL 的离心管中,加入 GUS 染液,37 ℃ 水浴 16 h<sup>[22]</sup>。植株材料用 70% 的乙醇脱色 2~3 次,在解剖镜和显微镜下进行观察和拍照。

PCR 检测:采用 CTAB 法<sup>[23]</sup>提取转基因麻风树的 DNA,设计引物扩增检验是否获得转基因植株。首先设计了 2 条引物:qc1:5′ - ACCGTCGGGCAAAGACAGATT - 3′;qc2:5′ - GACCGCATCGAAACGCAGCAC - 3′,预期扩增的长度为 538 bp。扩增序列中包含 *LIF* 基因中 246 bp 的序列和 *GUS* 基因中长度为 292 bp 的序列,PCR 反应参数为:95 ℃ 预变性 5 min;94 ℃ 30 s,62 ℃ 40 s,72 ℃ 1 min,34 个循环;72 ℃ 延伸 10 min。

Southern blot 检测:为了进一步确定 *LIF* 基因已经插入麻风树基因组,先从 PCR 检测呈阳性(PCR<sup>+</sup>)的植株中提出 DNA(20 μg),随后用 *EcoR* I、*Hind* III 于 37 ℃ 酶切过夜。*EcoR* I、*Hind* III 在质粒 pBI121 上各仅有 1 个酶切位点。以重组质粒 pBI121 - *LIF* 为模板用引物 qc1、qc2 扩增 *LIF* 基因的 ORF,按照 PCR Digoxigenin (DIG) Probe Synthesis Kit (Roche Diagnostics)说明制作探针。杂交的具体操作按照 Raffener 的报道<sup>[24]</sup>进行,3 d 后进行拍照(Kodak 8 - 10 X - Omat AR, Rochester)。

### 1.7 数据分析

研究中用到的相关计算公式如下:

存活率 = 有分化能力的幼叶外植体数量/外植体总数 × 100%;

GUS 的瞬时表达率 = GUS 显阳性(GUS<sup>+</sup>)的存活外植体数量/外植体总数 × 100%。

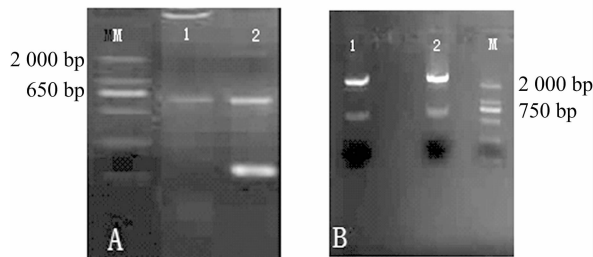
所有的数据均使用 SPSS 统计软件(ver. 11.0)进行 Duncan's 多重分析比较。

## 2 结果与分析

### 2.1 原核表达载体的获得

以反转录的 cDNA 为模板,用引物 lof33、lof52 进行 PCR 扩增 *LIF* 基因的 ORF 序列,获得了 1 条 650 bp 的片段(图 2 - A),胶回收后与载体 pMD19 - T 相连接,并转入 DH5α 感受态获得转化子 pMD19 - T - *LIF*;提取 pMD19 - T -

*LIF* 转化子质粒双酶切后的片段(650 bp),与 *Bam*H I、*Hind* III 双酶切后的 pET32 载体连接,获得重组子 pET - *LIF*;将连接后的产物转入 BL21 感受态,经过菌落 PCR、双酶切(图 2 - B)和测序验证,证明获得了转化子 PLB,原核表达载体 PLB 构建成功。

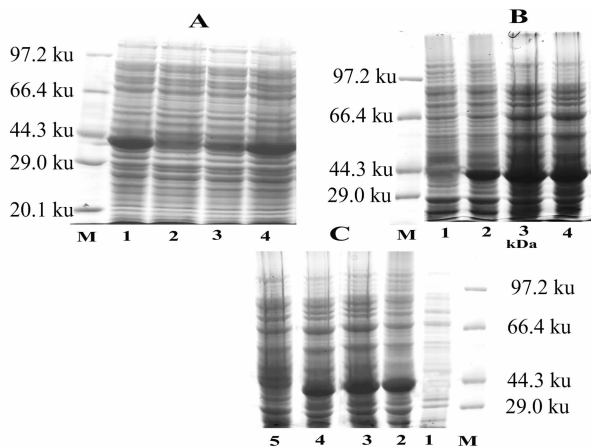


A—*LIF* 基因 ORF 的 PCR 扩增,其中 M 为 DL2000,1~2 泳道为 PCR 扩增的目的带;B—转化子 PLB 质粒的双酶切,其中 M 为 DL2000,1~2 泳道为不同转化子的双酶切

图2 目的 ORF 片段的准备

### 2.2 PLB 诱导表达条件的优化研究

通过图 3 的 SDS - PAGE 分析,比较得出了在不同的诱导条件下重组菌的最佳表达条件,并成功诱导重组蛋白的表达。在不同的诱导温度梯度下,PLB 均比对照多出 1 条约为 43 ku 的目的条带;当诱导温度为设置为 37 ℃ 时,目的条带十分明显;当诱导温度为 30 ℃ 时,也能看到目的条带,但比 37 ℃ 稍弱;20 ℃ 下诱导的 PLB 表达最弱。在不同的诱导时间梯度下,PLB 都比对照多出 1 条约为 43 ku 的目的条带,说明在 2、4、6 h 3 个处理时间内,PLB 均有表达。但 3 个处理时间下的诱导表达量有所不同,诱导 2 h 的条带最弱;而诱导 4、6 h 的条带都很亮,说明这 2 个时间内的融合蛋白诱导表达最强;随着时间从 4 h 延长到 6 h,表达量没有随之增加,表明诱导 4 h 为最佳收获时间。如果菌体过度培养,一方面由于 Amp 逐渐失活,失去选择压后质粒快速丢失,不能增加表达产量;另一



A—不同温度对 PLB 重组蛋白诱导表达的影响, M—蛋白标准分子量, 1—37℃, 2—PE 空白对照, 3—20℃, 4—30℃; B—梯度诱导时间对 PLB 重组蛋白诱导表达的影响, M—蛋白标准分子量, 1—PE 空白对照, 2—诱导 2 h, 3—诱导 4 h, 4—诱导 6 h; C—不同浓度的 IPTG 对 PLB 重组蛋白表达的影响, M—蛋白标准分子量, 1—0 g/L IPTG, 2—0.024 g/L IPTG, 3—0.12 g/L IPTG, 4—0.24 g/L IPTG, 5—PE

图3 PLB 诱导表达条件的优化

方面由于菌体老化和代谢产物的影响,菌体不但不继续生长,反而会死亡、分解,使目的蛋白丢失<sup>[25]</sup>。由图 3 - C 可以看出,只要加入了 IPTG,PLB 就能产生大小约为 43 ku 的重组蛋白。不同浓度的 IPTG 对 PLB 的诱导效果有差异,其中 IPTG 为 0.120 g/L 时诱导的重组蛋白量最大,其次是 0.240 g/L,0.024 g/L 诱导 PLB 表达的量最少,无 IPTG 时无重组蛋白产生。根据表达载体 pET32 的分子量、LIF 基因 ORF 成熟肽分子量的估算,融合蛋白的总分子量应为 43 ku。

2.3 农杆菌侵染最佳浓度

本研究发现,菌液浓度是影响转化效率的关键因素。由表 2 可见,当用  $D_{600\text{ nm}}=0.1$  的 LBA4404 菌液侵染后,愈伤组织产生了数量最多的蓝斑 (GUS<sup>+</sup>) ;随着浓度的升高 ( $D_{600\text{ nm}} > 0.1$ ),多余的菌体改变了培养基的 pH 值,并抑制了愈伤组织的产生,严重制约转化效率。这一现象与 Yong 等的研究结论相一致,他们认为高浓度的农杆菌液反而会产生较低的转化效率<sup>[26-27]</sup>。因此,本研究结果表明, $D_{600\text{ nm}}=0.1$  的农杆菌 LBA4404 最适于麻风树幼叶转化。

2.4 Kan 的筛选效果

在许多木本植物的转化过程中,Kan 都被用于筛选转基因植株<sup>[28-31]</sup>,Kan 的敏感性取决于植物种类、外植体类型<sup>[32]</sup>。本研究表明,不同的浓度梯度 (20、30、40 mg/L) 的 Kan 均能筛选出 PCR 检验呈阳性 (PCR<sup>+</sup>) 的植株 (表 3)。虽然 40 mg/L Kan 对愈伤组织再生有一定抑制作用,但只有高浓度的 Kan 才能完全抑制未转化丛生芽的再生。相比之下,在加入 20、30 mg/L Kan 的培养基中会有部分未转化的丛生芽产生,称之为“逃离”。因此,本研究表明 40 mg/L 是 Kan

用于筛选的最佳浓度。Kan 能有效地筛选出麻风树转基因植株,与 Li 等提出的 Kan 不适用于麻风树的筛选的结论相悖<sup>[33]</sup>。培养 4 周后,待抗 Kan 的丛生芽 (图 4 - C) 长至 2 ~ 3 cm 高时,转入加入 40 mg/L Kan 的 RM 培养基中诱导生根 (图 4 - D)。用 Kan 持续筛选能有效抑制未转化植株的逃离,持续筛选非常必要<sup>[34]</sup>。培养 1 个月后,生根的植株移入培养钵中进行 2 周的炼苗 (图 4 - E)。

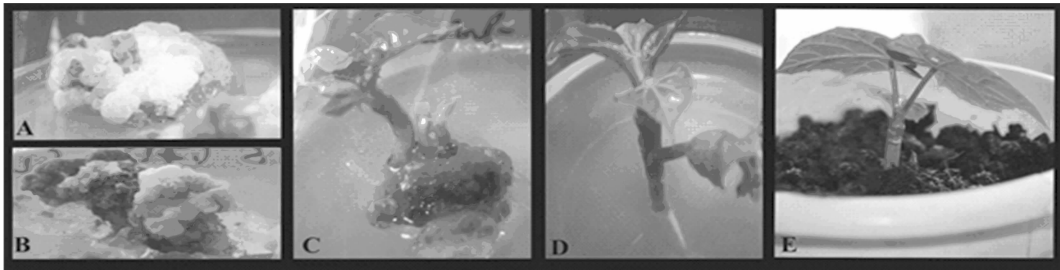
表 2 不同浓度的 LBA4404 对麻风树幼叶盘愈伤组织的诱导和 GUS 染色的影响

LBA4404 浓度 ( $D_{600\text{ nm}}$ )	愈伤组织诱导百分率 (%)	愈伤组织呈现 GUS <sup>+</sup> 的比例 (%)
0.1	80.81 ± 6.51a	68.31 ± 8.82a
0.2	63.23 ± 6.27b	51.52 ± 2.14b
0.3	44.45 ± 5.48c	38.48 ± 2.76c
0.4	19.05 ± 1.47d	18.94 ± 1.13d
0.5	6.79 ± 2.67e	6.79 ± 2.67e

注:表中数据为 3 次重复的平均值 ± 标准差;同列数据后标有不同小写字母表示差异显著 ( $P < 0.05$ )。

表 3 不同浓度的 Kan 对麻风树转化子的筛选影响

Kan 的浓度 (mg/L)	再生 Kan <sup>R</sup> 植株 百分比 (%)	GUS <sup>+</sup> 植株 百分比 (%)	PCR <sup>+</sup> 植株 百分比 (%)
0		9.96 ± 4.37b	4.87 ± 3.85bc
10	48.61 ± 4.61a	14.61 ± 1.15ab	11.21 ± 6.49ab
20	44.09 ± 7.93ab	24.90 ± 7.13a	21.17 ± 1.90a
30	35.41 ± 7.52bc	25.49 ± 7.99a	25.49 ± 7.99a
40	23.91 ± 5.78d	23.91 ± 5.78ab	23.91 ± 5.78a



A—幼叶叶盘在 CI 培养基上诱导出具有分化能力的绿白色的愈伤组织; B—少部分愈伤组织褐化死亡; C— 在加入了 40 mg/L Kan 的 PR 培养基上培养 15 d 后愈伤组织产生丛生芽; D—Kan<sup>R</sup> 植株在加入 40 mg/L Kan 的 RM 培养基上生根; E—转基因植株的炼苗

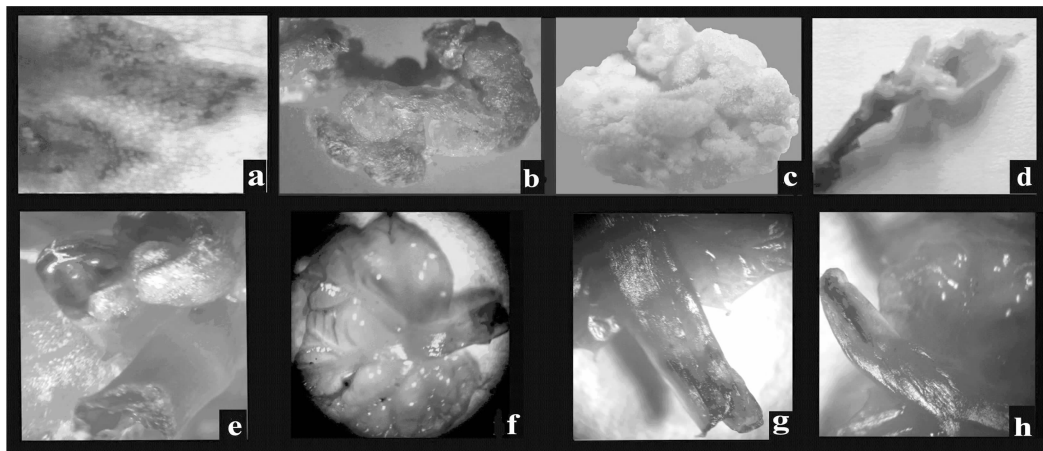
图 4 携带 pBI121-LIF 重组子的农杆菌 LBA4404 转化麻风树幼叶叶盘结果

2.5 GUS 染色分析

为了确认转化子,诱导出的愈伤组织和 Kan<sup>R</sup> 再生植株都需要进行 GUS 染色。经 GUS 染色后,发现有 68% 的愈伤组织出现蓝斑,表明呈现 GUS<sup>+</sup> (表 2)。愈伤培养 4 周后,有 35% 的 GUS<sup>+</sup> 愈伤组织分化出 Kan<sup>R</sup> 丛生芽。用 40 mg/L Kan 筛选出的所有植株都呈现 GUS<sup>+</sup> (表 3)。此外,笔者发现 Kan<sup>R</sup> 植株的蓝斑都沿着茎节和叶柄分布 (图 5 - e 至图 5 - h),在愈伤组织上则是随机分布 (图 5 - b),在根系中无活性。这一现象与 Nakagawa 等在 LIF 基因超表达的矮牵牛中 GUS 蓝斑的分布趋势一致<sup>[14]</sup>。Nakagawa 等推断,LIF 基因可能参与了矮牵牛叶腋处的细胞分裂素的产生过程。此外,本研究在对照植株中未观察到 GUS 蓝斑 (图 5 - c、图 5 - d)。

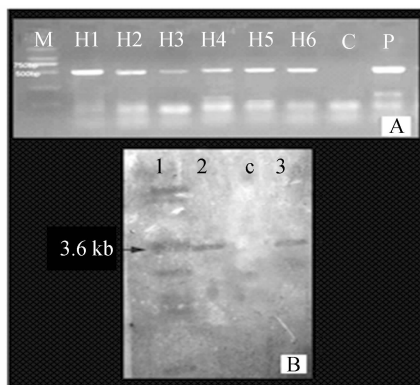
2.6 PCR 和 Southern 检测

GUS<sup>+</sup> 再生苗首先采用 PCR 法一步验证基因转入的真实性。PCR 检测提取了转基因植株的 DNA 为模板,所以消除了残留菌株的干扰,比 GUS 染色更可靠。由图 6 - A 可以看出,随机抽取的 GUS<sup>+</sup> 再生苗均扩增出了预期 0.54 kb 大小片段,未转基因的对照植株无任何条带出现。通过 PCR 检测证明,201 个叶盘在经过 3 个月的转化后,有 48 个产生了转基因植株,所占比例达到 (23.91 ± 5.78) % (表 3),转化效率明显高于 Li 等报道的 13% 的转化率<sup>[34]</sup>。随后,根据 PCR 的检测结果,进一步使用 Southern Blot 最终检测转基因植株。本研究随机抽取了 12 个 PCR<sup>+</sup> 植株以 GUS 基因的部分片段为探针进行 Southern 杂交,预期的杂交片段约为 3.6 kb,图 6 - B 显



a—与农杆菌 LBA4404 共培养 5 d 后的麻风树叶盘的 GUS 瞬时表达; b—诱导出的愈伤组织的 GUS 活性; c—未转化的愈伤组织对照; d—未转化的再生芽对照; e—转基因植株茎节的 GUS 活性表达; f—h—转基因植株叶柄的 GUS 活性表达

图5 GUS 染色鉴别转基因植株



A—PCR 扩增目的基因 540 bp 片段; H1~H6—独立的转基因植株; M—2 kb; C—未转化对照; P—重组质粒 pBI121-LIF。B—随机抽取的 3 个 PCR<sup>+</sup> 植株的 Southern blot; c—对照; 1~3—转基因 PCR<sup>+</sup> 植株

图6 转基因植株的 PCR 与 Southern Blot 分析

示了 3 株 PCR<sup>+</sup> 植株的杂交结果,均获得了预期杂交带。未转基因的对照无任何条带产生,说明载体 c 重组载体 pBI121-LIF 已经成功转化入麻风树基因组 DNA 中。植株 1 产生了 7 条杂交带,说明基因组中插入了多个拷贝,其中有 2 个条带的长度明显 >3.6 kb,推测可能有完整的 T-DNA 拷贝插入;同时观察到有 4 条杂交带 <3.6 kb,说明 T-DNA 有部分插入的拷贝存在,T-DNA 的部分插入是转基因过程中的常见现象。植株 2、植株 3 均只有 1 条 3.6 kb 的杂交带,说明转化为单拷贝,T-DNA 也是部分插入。不同数目的拷贝证明植株为独立个体。

### 3 结论与讨论

植物分枝发育在植物形态建成中具有非常重要的地位,植物的分枝是控制作物结实并进而影响最终产量的重要农艺性状之一,分枝多的植株结实部位多,但影响群体通风透光状况,分枝与主茎的夹角直接影响群体透光性和对光能的利用。然而,由于分枝的基因调控影响因素众多,且机理复杂,因此目前仅处于探索阶段。LIF 基因由于发现时间较晚,其具体功能和作用机理仍未明确。目前只有 1 例进行 LIF 类锌指蛋

白的功能研究,即通过洋葱表皮细胞的瞬时表达 GFP-LIF-GUS 蛋白的研究表明 LIF 基因被转运到细胞核中,为证实 LIF 是 1 种转录因子提供了有力的证据<sup>[14]</sup>。本试验采用 pET32 为表达载体,构建了 LIF 基因原核表达载体,并将转化子进行诱导表达获得了重组蛋白,分析得出了 LIF 所对应蛋白表达的最佳条件,为进一步探讨 LIF 的功能奠定了基础。

麻风树作为一种能源植物,已经引起了世界各国的高度关注。但由于其为木本植物,目前大部分的研究成果都集中在麻风树再生体系的研究上。本研究以麻风树为幼叶研究对象,通过摸索 Kan 浓度成功建立了高效稳固的农杆菌转化体系。与前人的报道(针对麻风树子叶的转化体系)相比,本体系不仅转化效率高、稳定性强,而且在植物材料的选择上更经济、节约,本转化体系的成功建立为研究者大规模的开展麻风树各类基因的研究创造便利。在此基础上,本研究将 LIF 基因顺利转入麻风树基因组中,由于 LIF 基因能在双子叶植物中保守表达,因此具有很强的应用范围。将 LIF 转入麻风树中不仅有助于进一步了解 LIF 基因的作用原理和表达方式,还能为今后开展麻风树分枝的基因调控工作奠定坚实的基础。在今后的研究中,将在田间持续观察转基因苗的分枝能力并计算种子产量。

### 参考文献:

- [1] Alok - Kumar T, Akhilesh K, Hiflur R[J]. Biodiesel production from *Jatropha curcas* with high free fatty acids: an optimized process[J]. Biomass and Bioenergy, 2007, 31(8): 569-575.
- [2] Kandpal J B, Madan M. *Jatropha curcas*: a renewable source of energy for meeting future energy needs[J]. Renewable Energy, 1995, 6(2): 159-160.
- [3] Adebawale K O, Adedire C O. Chemical composition and insecticidal properties of the underutilized *Jatropha curcas* seed oil[J]. African Journal of Biotechnology, 2006, 5(10): 901-906.
- [4] Mazumdar P, Basu A, Paul A, et al. Age and orientation of the cotyledonary leaf explants determine the efficiency of de novo plant regeneration and *Agrobacterium tumefaciens* - mediated transformation in *Jatropha curcas* L. [J]. South African Journal of Botany, 2010, 76(2): 337-344.

- [5] Openshaw K. A review of *Jatropha curcas*; an oil plant of unfulfilled promise[J]. *Biomass and Bioenergy*, 2000, 19(1): 1–15.
- [6] Achten W M J, Verchot L, Franken Y J, et al. *Jatropha* bio – diesel production and use [J]. *Biomass and Bioenergy*, 2008, 32(12): 1063–1084.
- [7] Ginwal H S, Rawat P S, Srivastava R L. Seed source variation in growth performance and oil yield of *Jatropha curcas* Linn. in central India[J]. *Silvae Genetica*, 2004, 53(4): 186–192.
- [8] Gour V K. Production practices including post – harvest management of *J. curcas* [C]//Singh B, Swaminathan R, Ponraj V, et al. Rashtrapati Bhawan, New Delhi, India; Biodiesel conference toward energy independence – focus of *Jatropha*, 2006; 223–251.
- [9] Abdelgadir H A, Johnson S D, van Staden J. Promoting branching of a potential biofuel crop *Jatropha curcas* L. by foliar application of plant growth regulators[J]. *Plant Growth Regulation*, 2009, 58(3): 287–295.
- [10] Bennett T, Leyser O. Something on the side; axillary meristems and plant development [J]. *Plant Molecular Biology*, 2006, 60(6): 843–854.
- [11] Lewis J M, Mackintosh C A, Shin S A, et al. Overexpression of the maize Teosinte Branched 1 gene in wheat suppresses tiller development[J]. *Plant Cell Reports*, 2008, 27(7): 1217–1225.
- [12] Bereterbide A, Hernould M, Castera S, et al. Inhibition of cell proliferation, cell expansion and differentiation by the *Arabidopsis* *SUPERMAN* gene in transgenic tobacco plants[J]. *Planta*, 2001, 214(1): 22–29.
- [13] Mcstee P, Leyser O. Shoot branching[J]. *Annual Review of Plant Biology*, 2005(56): 353–374.
- [14] Nakagawa H, Jiang C J, Sakakibara H, et al. Overexpression of a petunia zinc – finger gene alters cytokinin metabolism and plant forms[J]. *The Plant Journal*, 2005, 41(4): 512–523.
- [15] Fischer B, Sumner I, Goodenough P. Isolation and renaturation of bioactive proteins expressed in *Escherichia coli* as inclusion bodies [J]. *Arzneimittelforschung*, 1992, 42(12): 1512–1515.
- [16] LaVallie E R, DiBlasio E A, Kovacic S, et al. A thioredoxin gene fusion expression system that circumvents inclusion body formation in the *E. coli* cytoplasm[J]. *Biotechnology*, 1993, 11(2): 187–193.
- [17] Hatanaka T, Choi Y E, Kusano T, et al. Transgenic plants of coffee *Coffea canephora* from embryogenic callus via *Agrobacterium tumefaciens* – mediated transformation [J]. *Plant Cell Reports*, 1999, 19(2): 106–110.
- [18] Holsters M, De Waele D, Depicker A, et al. Transfection and transformation of *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *Molecular & General Genetics*, 1978, 163(2): 181–187.
- [19] Hoekema A, Hirsch P R, Hooykaas P J J, et al. A binary plant vector strategy based on separation of vir – and T – region of the *Agrobacterium tumefaciens* Ti – plasmid [J]. *Nature*, 1983, 303(5913): 179–180.
- [20] Murashige T, Skoog F. A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue cultures[J]. *Physiologia Plantarum*, 1962, 15(3): 473–479.
- [21] 宗桦, 王盛华, 邓新林, 等. 麻疯树叶片高效再生体系与不定芽起源[J]. *应用与环境生物学报*, 2010, 16(6): 789–793.
- [22] Dutta I, Majumder P, Saha P, et al. Constitutive and phloem specific expression of *Allium sativum* leaf agglutinin (ASAL) to engineer aphid (*Lipaphis erysimi*) resistance in transgenic Indian mustard (*Brassica juncea*) [J]. *Plant Sci*, 2005(169): 996–1007.
- [23] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA [J]. *Nucleic Acids Research*, 1980, 8(19): 4321–4325.
- [24] Raffaeiner B, Serek M, Winkelmann T. *Agrobacterium tumefaciens* – mediated transformation of *Oncidium* and *Odontoglossum* orchid species with the ethylene receptor mutant gene *etr1-1* [J]. *Plant Cell, Tiss Organ Cult*, 2009, 98(2): 125–134.
- [25] 刘永庆, 陈溥言, 杜念兴, 等. 生长抑素 (SS) 基因在大肠杆菌 pT7ZZ 表达系统中的克隆与表达 [J]. *中国生物制品学杂志*, 2002, 15(1): 17–20.
- [26] Yong W T L, Abdullah J O, Mahmood M. Optimization of *Agrobacterium* – mediated transformation parameters for *Melastomataceae* spp. using green fluorescent protein (GFP) as a reporter [J]. *Scientia Horticulturae*, 2006, 109(1): 78–85.
- [27] Xu L, Najeeb U, et al. Establishment of *Agrobacterium* – mediated *BT* gene transformation system mat rush (*Juncus effusus* L.) [J]. *Pakistan J. Bot*, 2009, 41(5): 2615–2624.
- [28] Prakash M G, Gurumurthi K. Genetic transformation and regeneration of transgenic plants from precultured cotyledon and hypocotyl explants of *Eucalyptus tereticornis* Sm. using *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology – Plant*, 2009, 45(4): 429–434.
- [29] James D J, Passey A J, Webster A D, et al. Transgenic apples and strawberries; advances in transformation, introduction of genes for insect resistance and field studies of tissue cultured plants [J]. *Acta Horticulturae*, 1993(336): 179–184.
- [30] Fillatti J A, Sellmer J, Mccown B, et al. *Agrobacterium* – mediated transformation and regeneration of *Populus* [J]. *Molecular & General Genetics*, 1987, 206(2): 192–199.
- [31] McGranahan G H, Leslie C A, Uratsu S L, et al. *Agrobacterium* – mediated transformation of walnut somatic embryos and regeneration of transgenic plants [J]. *Nature Biotechnology*, 1988(6): 800–804.
- [32] Klimaszewska K, Lachance D, Pelletier G, et al. Regeneration of transgenic *Picea glauca*, *P. Mariana*, and *P. Abies* after cocultivation of embryogenic tissue with *Agrobacterium tumefaciens* [J]. *In Vitro & Cell Developmental Biology – Plant*, 2001, 37(6): 748–755.
- [33] Li M R, Li H Q, Jiang H W, et al. Establishment of an *Agrobacterium* – mediated cotyledon disc transformation method for *jatropha curcas* [J]. *Plant Cell Tissue and Organ Culture*, 2008, 92(2): 173–181.
- [34] Athmaram T N, Bail G, Devaiah K M. Integration and expression of Bluetongue VP2 gene in somatic embryos of peanut through particle bombardment method [J]. *Vaccine*, 2006, 24(15): 2994–3000.