

# 用基因枪将 GUS 基因导入褐藻 细胞中表达\*

秦松 张健<sup>†</sup> 李文斌<sup>†</sup> 王希华 童顺 孙勇如<sup>†</sup> 曾呈奎

(中国科学院海洋研究所, 青岛 266071)

(中国科学院遗传研究所, 北京 100101)<sup>†</sup>

**提要** 于1993年11月—1994年2月,用高压氦气式基因枪,将 pBI221 质粒 [装有 CaMV 35S 启动子、GUS( $\beta$ -葡萄糖苷酸酶)基因以及 nos 的 3' 调控区] 导入海带和裙带菜组织切块中。48h 后,在海带假根细胞和裙带菜中肋部叶片细胞中检测到 GUS 基因的表达。实验表明,微粒子轰击法是外源基因导入大型褐藻的一个有效途径。CaMV 35S 启动子能够驱动外源基因在海洋藻类中的表达,可作为藻类基因工程的启动元件。

**关键词** 褐藻 基因导入 基因瞬间表达 微弹轰击 CaMV 35S 启动子 GUS 基因

除蓝藻和单细胞绿藻外,外源基因导入大型藻类的工作尚未见成功的报道(秦松等, 1993),在已被转化的单细胞或丝状藻类中,绝大多数为淡水种。海洋藻类基因工程研究的重要性正在为人们所认识,目前的困难在于,缺乏有效的转基因手段和可利用的基因工程元件 (Saga, 1991)。尤其对海带等一些大型褐藻而言,原生质体再生植株尚未成功,需要穿透细胞壁导入外源基因。1987年 Klein 等设计了火药式基因枪,将 CaMV 35S 启动子-CAT (氯霉素乙酰转移酶) 基因轰入洋葱完整细胞中获得瞬间表达。至1991年底,已有8例获得转基因植株的报道(贾士荣等,1992)。Levy (1991) 曾用基因枪法转化红藻江蓠没有成功。本文报道用基因枪将 CaMV 35S 启动子-GUS 基因导入褐藻海带与裙带菜细胞中的瞬间表达结果。

## 1 材料与方 法

**1.1 材料及培养方法** 海带 (*Laminaria japonica*)、裙带菜 (*Undaria pinnatifida*) 于1993年11月—1994年1月采自青岛太平角。选取健康、成熟的小孢子体(长 $\times$ 宽分别为  $15 \times 5\text{cm}^2$ ,  $10 \times 4\text{cm}^2$ ) 用灭菌海水反复洗净,于1.5% KI 中浸泡10min,用蘸有70% 乙醇的脱脂棉球擦洗,放入灭菌海水中待用。切取海带叶状体中部叶片 ( $1 \times 1\text{cm}^2$ ) 10块,假根(直径为0.3cm,长1cm,有分枝)8块;取裙带菜叶状体中部叶片 ( $1 \times 1\text{cm}^2$ ) 10块,中肋部叶片8块(4块来自  $10 \times 4\text{cm}^2$  小孢子体,每块面积为  $1 \times 0.3\text{cm}^2$ ;另4块来自  $30 \times 10\text{cm}^2$  孢子体,每块长1cm,直径为0.8cm),假根(直径为0.3cm,长1cm,有分枝)8块。海带及裙带菜叶片各取4块,均用涂有 pBI221 的金粉轰击一次;另再各取

\* 中国科学院海洋研究所调查研究报告第2336号。国家科委、山东省科委攻关合同项目。博士论文一部分。张培军、李良材教授给予指导,谨致谢忱。

收稿日期: 1994年2月5日,接受日期: 1994年3月18日。

2 块轰击两次;剩余各 4 块均用金粉轰击一次,作为对照。海带及裙带菜假根,各取 4 块均用涂有 pBI221 的金粉轰击一次作为处理;另外 4 块均用金粉轰击作为对照。裙带菜中肋部叶片取 4 块作为处理,4 块作为对照。处理组及对照组轰击后均移入灭菌海水稀释的 MS 培养基 (Murashige et al., 1962) 中培养,48h 后取半数进行组织化学染色,剩余继续培养。

**1.2 微粒子的预处理** 金粉微粒半径为  $1\mu\text{m}$ , 悬于无菌水中,加入  $5\mu\text{g}$  pBI221 质粒 DNA (CaMV35S 启动子-GUS 基因-nos 3' 调控区) (Jefferson et al., 1987),  $2.5\text{mol/L}$   $\text{CaCl}_2$  以及  $0.1\text{mol/L}$  的亚精胺,混匀,离心去上清液,用无水乙醇洗一次,金粉最后悬浮于无水乙醇中待用。采用美国 Bio-Rad 公司的 PDS-1000/He 型微粒轰击系统 (Biolistic Particle Delivery System), 每次将 4 个组织块放在一起轰击表面。

**1.3 检测 GUS 基因表达的组织化学染色** 参照 Perl 等 (1992) 方法,染液成份为  $0.1\text{mol/L}$  磷酸缓冲液 ( $\text{pH} = 7.0$ ),  $0.005\text{mol/L}$  铁氰化钾,  $0.005\text{mol/L}$  亚铁氰化钾,  $0.3\%$  (W/V) X-葡萄糖醛酸酐 (X-Gluc),  $0.5\%$  (V/V) Triton X-100, 在  $37^\circ\text{C}$  染色过夜。在解剖镜 ( $\times 12 - \times 100$ ) 下观察,必要时用灭菌手术刀片剖开组织块观察。

## 2 结果与讨论

对所有染色的对照组组织块的解剖镜观察表明,没有出现蓝色背景及蓝色斑点。用解剖刀沿海带和裙带菜叶片髓部切开,沿裙带菜细中肋 (面积  $1 \times 0.3\text{cm}^2$ ) 髓部切开及沿粗中肋 (直径为  $0.8\text{cm}$ ) 纵向切开,沿海带及裙带菜假根纵向切开,观察切面均未观察到蓝色背景及蓝色斑点。图版 I:1 为对照海带假根外观,图版 I:2 为对照裙带菜细中肋外观。在涂有 DNA 的金粉轰击的处理组中,海带叶片不论轰击一次,还是轰击两次,外观或剖开观察,均未见蓝色背景或斑点。4 块海带假根取两块染色,外观其枝叉处均显示蓝色,用解剖刀从分枝处一分为二,观察断面均可见大量蓝色斑点,约占断面面积的  $30\% - 40\%$ 。图版 I:3 为海带假根断裂处图像。裙带菜假根在 DNA 轰击后未见蓝色,从分枝处切开,或沿纵向切开,亦未见显色。裙带菜叶片中只有中肋部叶片显色 (图版 I:4)。经 DNA 轰击的两块裙带菜细中肋取一块染色,在表皮以下显示若干蓝色斑点,约占表面积  $5\%$ 。两块 DNA 轰击的粗中肋取一块染色,不论从外观观察,还是剖开观察,均无蓝色。裙带菜中肋部以外的叶片,不论轰击一次,还是两次,均无显色反应。

上述结果表明, GUS 基因已被高压气流轰入海带假根细胞和裙带菜中肋部叶片细胞中并且表达, GUS 基因的蓝色显示呈斑点状,没有蓝色背景, GUS 基因可用作褐藻基因工程的报告基因。已有研究表明,其特点是灵敏度高,可用于组织化学定位。本实验在海带叶片中没有发现转化细胞;在裙带菜中只有中肋部叶片具有转化细胞。这一方面可能与轰击的物理参数有关,另一方面可能与组织的物理特性、细胞的生理状态有关。Levy (1991) 采用火药式基因枪用 pBI221 质粒轰击红藻江蓠完整叶状体,没有检测到阳性结果。Cheney 等<sup>1)</sup>曾用微粒轰击枪将 GUS 基因轰入红藻麒麟菜中,利用 CaMV 35S 启动子或 nos 启动子,获得 GUS 基因瞬间表达结果;用 Cab 启动子获得阴性结果,但一直未见正式报道。本文结果提示, CaMV 35S 启动子可用作海藻基因工程的启动元

1) Cheney, D. P. and Kurtzman, A. L., 1992, Progress in protoplast fusion and gene transfer in red algae, Abstracts, XIVth International Seaweed Symposium, Brittany, France, No. 061.

件。在目前高等植物基因工程研究中使用得最多的启动子是 CaMV 35S。Jarvis 等 (1991) 用该启动子驱动了荧光素酶基因在单细胞绿藻——小球藻中的瞬间表达。目前单细胞绿藻转化还可以用 SV40 以及小鼠金属硫蛋白 I 启动子 (Leung, 1988)。大型海藻表达外源基因的启动子目前已知的只有 CaMV 35S。

已有经验表明,基因枪的特点在于转化效率较高,转化受体类型广泛,对于有壁细胞团、组织块的转化操作迅速简便。本文结果表明,尽管转化效率有待改进,基因枪作为一种转基因手段可以有效地将外源基因导入褐藻有壁细胞中表达,这对于原生质体再生困难的藻类是十分重要的;还表明,大型的海洋藻类是可以转化的。海带与裙带菜的组织再生已经成功。可以预料,如采用特殊的标记基因进行选择,获得转基因褐藻的日子已为期不远。

### 参 考 文 献

- 秦松、曾呈奎, 1993, 藻类分子遗传学和基因工程研究的现状和展望 (I), (II), 海洋科学 1:34—37; 2:24—27。  
 贾士荣、曹冬孙, 1992, 转基因植物, 植物学通报 9(2): 3—15。  
 Jarvis, E.E. and Brown, L.M., 1991, Transient expression of firefly luciferase in protoplasts of the green alga *Chlorella ellipsoidea*, *Curr. Genet.*, 19:317—321。  
 Jefferson, R.A., Kavanagh, T.A. and Bevan, M.W., 1987, GUS fusions: glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants, *EMBO J.*, 6(13): 3901—3907。  
 Klein, T.M. et al., 1987, High-velocity microprojectiles for delivering nucleic acids into living cells, *Nature*, 327:70—73。  
 Leung, W.C., 1988, Post-translational modifications of recombinant proteins by eukaryotic algal and fungal cells and its application in protein engineering studies, *In Recent Advances in Biotechnology and Applied Biology*, The Chinese Univ. Press (Hong Kong), pp. 143—154。  
 Levy, I., 1991, Biolistics: potential application to seaweed improvement, *Proceedings of a COST-48 Workshop*, pp. 49—57。  
 Murashige, T. and Skoog, F., 1962, A revised medium for rapid growth and bioassays with tobacco tissue culture, *Plant Physiol.*, 15:473—497。  
 Perl, A. et al. 1992, Improvement of plant regeneration and GUS expression in scutellar wheat cell by optimization of culture conditions and DNA microprojectile delivery procedures, *MGG*, 235:279—284。  
 Saga, N., 1991, Protoplasts and somatic hybridization—controversial discussions “No” side, *Proceedings of a COST-48 Workshop (Spain)*, pp. 25—30。

## TRANSIENT EXPRESSION OF GUS GENE IN PHAEOPHYTES USING BIOLISTIC PARTICLE DELIVERY SYSTEM\*

Qin Song, Zhang Jian<sup>†</sup>, Li Wenbin<sup>†</sup>, Wang Xihua, Tong Shun,  
 Sun Yongru<sup>†</sup>, Zeng Chengkui (C. K. Tseng)  
 (Institute of Oceanology, Academia Sinica, Qingdao 266071)  
 (Institute of Genetics, Academia Sinica, Beijing 100101)<sup>†</sup>

### ABSTRACT

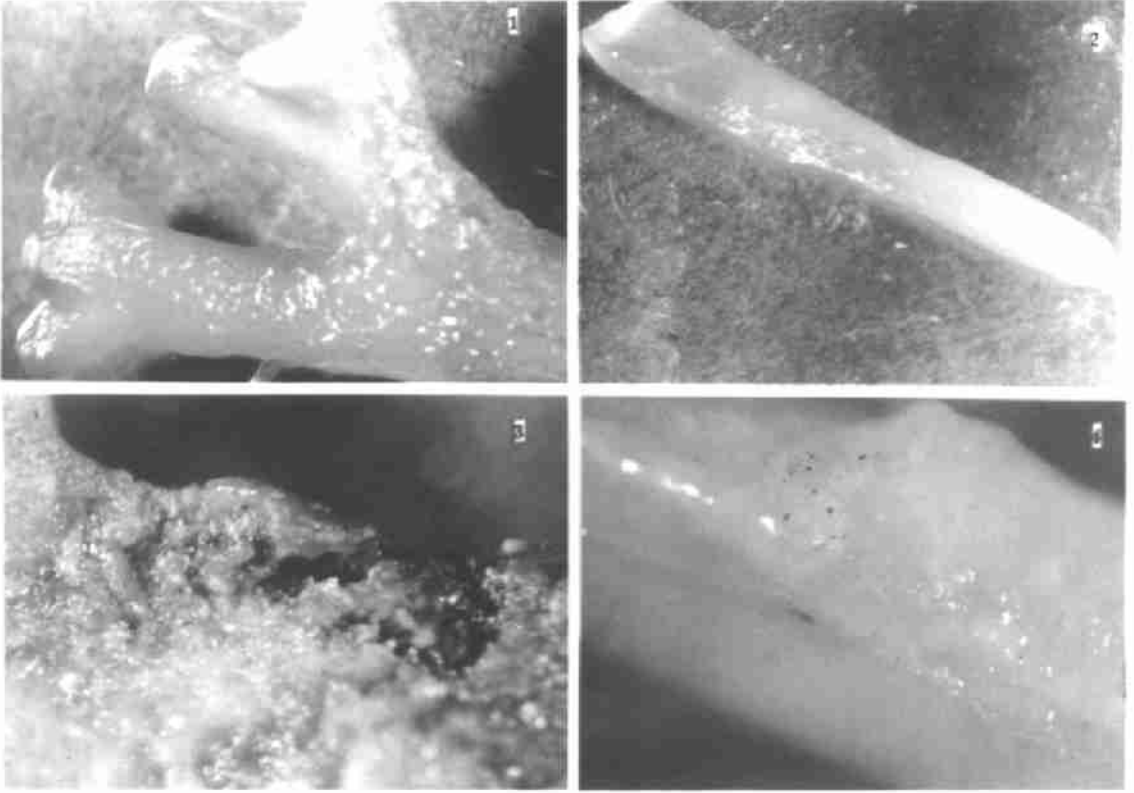
Much progress has been made in recent years in transformation of blue-green

\* Contribution No. 2336 from the Institute of Oceanology, Academia Sinica.

algae and unicellular green algae. Both nuclear and chloroplast transformation have been achieved in *Chlamydomonas*. Only a little progress has been made in gene transfer of eukaryotic macroalgae, the seaweeds. Lack of an indirect transformation system, such as *Agrobacterium* system, made the establishment of direct methods very important. We have little knowledge about promoters in seaweeds. Also, CaMV35S and SV40 have been successfully used in transformation of unicellular green algae. Levy (1991) reported preliminary trials of biolistics with *Gracilaria* but the results were negative. This paper reports study on transient expression of GUS gene in *Laminaria japonica* and *Undaria pinnatifida* using high velocity microprojectiles and CaMV35S as a useful promoter for seaweed transformation, and suggests an applicable transformation mechanism capable of solving the regeneration problems of brown algal protoplasts.

The materials used were healthy young sporophytes of *L. japonica* and *U. pinnatifida* collected from Qingdao. The middle parts of the blade and the rhizoids of *L. japonica* were cut into  $1 \times 1\text{cm}^2$  and  $1 \times 0.3\text{cm}^2$  pieces separately. The blade and the rhizoids of *U. pinnatifida* were cut the same way except that the costae were cut as new material ( $1 \times 0.3\text{cm}^2$ , or 1cm long and 0.8cm diameter). A Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System (Bio-Rad Company, U.S.A.) was used to deliver DNA into intact algal cells. Gold microprojectiles were coated with plasmid pBI221(CaMV35S promoter-GUS gene-nos ter). Control tissues were bombarded with gold microprojectiles without DNA. After two days' culture in MS medium, tissues were stained for histochemical assay. Negative results were obtained for GUS activity in all control tissues. No GUS background reaction was found inside brown algal cells (Plate I:1, I:2) and blue spots were found scattered inside the rhizoids of *L. japonica* (Plate I:3, a cut-open rhizoid) and beneath the surface of costa of *U. pinnatifida* (Plate I:4). These findings indicate that particle bombardment can be used to deliver DNA into many intact algal cells simultaneously and that the foreign gene introduced by this process can be transiently expressed using CaMV35S promoter. An appropriate selection marker can be used to select transgenic seaweeds.

**Key words** Phaeophyte    Gene transfer    Transient gene expression  
Microprojectile bombardment    CaMV35S promoter    GUS gene



图版 I GUS 基因导入褐藻细胞后的瞬间表达

Plate I Transient expression of GUS gene after its introduction into cells of phaeophytes

1, 3. 海带假根(rhizoid of *Laminaria japonica*); 2, 4. 裙带菜叶片中肋(costa of *Undaria pinnatifida*);  
1, 2. 对照,  $\times 12$ (Control); 3, 4. 处理,  $\times 36$ (Transformation group).