

中国中文核心期刊 中国科技核心期刊 中国百种杰出学术期刊(2011) 中国高校精品科技期刊

西南大学学报

自然科学版

JOURNAL OF SOUTHWEST UNIVERSITY

NATURAL SCIENCE EDITION

XINAN DAXUE XUEBAO
ZIRAN KEXUE BAN



重庆市重点学术期刊建设工程出版专项资金资助期刊

10
2013

第35卷第10期
中国·重庆

CHONGQING CHINA



西南大学学报

(自然科学版)

第 35 卷 第 10 期

总第 226 期

2013 年 10 月 20 日出版

目 次

· 专家特稿 ·

广东省中部沿海地区风暴潮灾害风险综合评估 李国胜, 李 阔 (001)

· 农业科学 ·

- 遮荫处理对云抗 10 号茶树春梢生化成分含量的影响 阎意辉, 袁文侠,
关文玉, 倪婷婷, 李 璐, 李家华 (010)
- 基于 EGARCH(1, 1)-M 模型的国际石油价格与中国股指收益率的关联实证
..... 李晓阳, 黄毅祥 (015)
- 石漠化地区桑根际 AM 真菌多样性及桑壮苗培育研究 施松梅, 陈 珂,
涂 波, 杨晓红, 黄先智 (024)
- 转基因锦橙中甲型肝炎病毒衣壳蛋白融合基因的遗传和表达稳定性研究 彭爱红,
雷天刚, 许兰珍, 刘小丰, 何永睿, 姚利晓, 陈善春 (031)
- 云南 35 份茶树良种生化成分多样性分析 堵源康, 秦廷发, 王子浩, 杨柳霞,
丁建平, 胡艳萍, 邵宛芳, 李家华 (036)

· 生命科学 ·

- 硝普钠(SNP)对盐胁迫下半夏幼苗叶片生理特性和球茎总生物碱含量的影响
..... 徐封丰, 谢英赞, 方 文, 王朝英, 何 平 (042)
- 单倍体川桑(*M. notabilis* Schneid)愈伤组织诱导及丛生芽分化培养 王茜龄,
余亚圣, 何宁佳, 赵爱春, 曾其伟, 余茂德 (050)

· 数理科学与化学 ·

- Sylow p -子群为循环群的 $10p^n$ 阶非交换群的非交换图 吉晓娟, 周 伟 (056)
- 正则密码群并半群的两个等价刻画 王正攀, 潘慧兰, 冷 静 (060)
- 关于 Smarandache 函数的最小公倍数积 陈国慧 (063)
- 关于 Smarandache-Pascal 数列的几个猜想 刘宝利 (067)
- 具有调和势和耗散非线性项的薛定谔方程的解的存在性及集中现象
..... 肖氏武, 丁 凌 (071)
- 关于保不交算子的注记 冯 颖, 陈金喜 (075)

- FC-空间中的匹配定理及其对一般拟平衡问题系统的应用 文开庭 (079)
de Sitter 空间中具有平行单位平均曲率向量的完备类空子流形 宿志强, 刘建成 (083)

· 工程技术 ·

- 一种分层差异型 P2P 存储系统的设计与仿真 刘 敏, 陈志刚 (088)
平面倒立摆系统的自校正仿人协调控制 唐永川, 刘 枫,
祁 虔, 李祖枢, 高 帆 (094)
基于神经网络观测器的起重机吊重摆角速度软测量研究 钟 斌, 何培祥 (105)
《西南大学学报》(自然科学版) 刊载论文下载量及引用情况统计分析 孙 凡 (111)

· 地球与环境科学 ·

- 新型农村社区人居环境变化研究——以重庆市忠县天子村社区为例 蔡 进,
邱道持, 赵梓琰, 王 静 (117)
典型丘陵山区遥感影像分类方法研究 徐 钊, 温小荣, 余光辉 (125)
收费公路免费对假日旅游经济的拉动作用研究
——以 2012 年“十一黄金周”为例 杨晓霞, 唐 飞, 向 旭, 宗会明 (133)
中国人口结构与经济结构耦合的关联分析 何海林, 涂建军,
孙祥龙, 王 娜, 林 曦 (140)
暴雨条件下岩溶槽谷区地下河水化学特征变化分析
——以重庆青木关姜家泉为例 吴金权, 蒋勇军, 郑 洁,
廖文娥, 罗 建, 蒯 瑞 (146)

· 药 学 ·

- 玫瑰孢链霉菌 SWU2010 遗传转化体系的建立和优化 马廷梅, 柳 青,
王 磊, 胡昌华, 廖国建 (153)
重庆产青蒿药材中微量元素与有效成分含量评价及其相关性分析 周 蓓,
武 喧, 蒋 勇, 黎晓敏 (159)

· 心理科学 ·

- 中学生生命意义感发展特点及与学习动机、学习成绩的关系
..... 覃 丽, 王鑫强, 张大均 (165)
无意识目标追求的发生机制初探 陈瑞涵, 杨文静, 李海江, 张庆林 (171)

文章编号: 1673-9868(2013)10-0031-05

转基因锦橙中甲型肝炎病毒衣壳蛋白融合基因的遗传和表达稳定性研究^①

彭爱红^{1,3}, 雷天刚^{1,3}, 许兰珍^{1,3}, 刘小丰^{1,3},
何永睿^{1,2,3}, 姚利晓^{1,2,3}, 陈善春^{1,2,3}

1. 中国农业科学院 柑桔研究所, 重庆 400712; 2. 国家柑桔工程技术研究中心, 重庆 400712;
3. 国家柑桔品种改良中心, 重庆 400712

摘要: 为考察甲型肝炎病毒衣壳蛋白融合基因在转基因锦橙株系及其无性繁殖后代中的遗传和表达稳定性, 以 2 个单拷贝的转基因锦橙株系为试材, 通过嫁接的方式无性繁殖 2 代, 应用 PCR 技术、Southern blot 杂交、Real-time PCR 技术进行研究, 结果表明: 2 个转基因锦橙株系在无性繁殖过程中, 甲型肝炎病毒衣壳蛋白融合基因都能稳定遗传; 甲型肝炎病毒衣壳蛋白融合基因在转基因锦橙株系 JTH1 及其无性繁殖后代之间能够稳定的表达, 而在转基因锦橙株系 JTH2 及其无性繁殖后代之间不能稳定的表达, T₀ 代中目的基因的相对表达量显著高于 T₂ 代。

关键词: 转基因锦橙; 甲型肝炎病毒衣壳蛋白融合基因; 遗传稳定性; 表达稳定性

中图分类号: Q786; S666.3

文献标志码: A

转基因技术已成为一项将外源基因导入受体基因组中行之有效的办法, 但外源基因在宿主基因组内是否能稳定遗传和表达, 直接影响着转基因植物的利用。转基因植物在无性繁殖过程中包括转化细胞分裂繁殖、愈伤组织的诱导等, 这些复杂过程向外源基因的遗传稳定性提出了严峻的挑战。有研究表明转基因在无性繁殖后代中能稳定的遗传和表达, Noel. B 等对甘蔗转基因株系 22.2 无性繁殖 3 代, 并对转基因株系及其无性繁殖后代中 pat 基因进行表达稳定性研究, 表明 pat 基因在转基因株系及其无性繁殖后代中能稳定表达^[1]。杜涛等对 3 年无性繁殖获得的转基因泡桐子代进行遗传稳定性研究, 表明 shiva-1 基因能通过无性繁殖的方式稳定遗传给子代^[2]。丛郁等为创制矮化的苹果砧木, 将 rolC 基因转入乔化砧木八棱海棠中, 并对 3 个株系转 rolC 基因的八棱海棠无性增殖获得的第 1, 2, 3 代继代苗以及通过叶片再生获得的第 1, 2 代再生苗, 应用 PCR、Southern blot 杂交和 RT-PCR 技术, 研究了外源 rolC 基因在转基因八棱海棠无性繁殖过程中的遗传稳定性和转录水平上表达的稳定性的稳定性, 结果表明: 转 rolC 基因八棱海棠在无性繁殖过程中外源 rolC 基因不仅能够稳定遗传, 而且能够在转录水平上稳定表达^[3]。但迄今已在多种植物中观察到转基因在无性繁殖后代中的表达会发生变化, Courtney-Gutterson 等用基因工程的手段将 CHS 基因以有义和反义方向导入开粉红色花的菊花品种‘Moneymaker’中, 获得开白花的转基因植株, 白花转基因植株通过无性繁殖仍能稳定地遗传下去, 但表达不稳定, 导致白花转基因植株的后代中仍有一些花为粉红色^[4]。Andrew J. E. Bettany 等在研究转基因高羊茅的无性繁殖后代中 GUS 基因的表达稳定性时发现, 转基因高羊茅无性繁殖后代中, GUS 基因表达不稳定, T₁、T₂、T₃ 代中 GUS 基因表达量下降, 而在 T₄、T₅ 代中

① 收稿日期: 2012-07-23

基金项目: 岗位科学家项目(CARS-27); 863 计划(2011AA100205); 948 项目(2011-G212); 长江学者和创新团队发展计划(IRT0976); 重庆市自然科学基金(CSTC2011GGA1187)资助。

作者简介: 彭爱红(1974-), 女, 江西萍乡人, 硕士, 助理研究员, 主要从事植物生物技术研究。

通信作者: 陈善春, 研究员。

GUS 基因的表达更稳定^[5]。因此研究外源基因在无性繁殖作物的无性繁殖过程中的遗传和表达的稳定性是非常有必要的。

关于利用植物表达乙型肝炎病毒表面抗原基因和外膜蛋白的研究有很多^[6-7]，而表达甲型肝炎病毒衣壳蛋白的研究却很少。本实验室对甲型肝炎病毒衣壳蛋白融合基因转入柑桔进行了多年的研究，将甲型肝炎病毒衣壳蛋白融合基因转入柑桔品种锦橙中，已获得多个转基因“疫苗型”锦橙株系^[8]。本文通过研究转基因锦橙株系及其无性繁殖后代中甲型肝炎病毒衣壳蛋白融合基因的遗传和表达的稳定性，获得能稳定遗传和表达甲型肝炎病毒衣壳蛋白融合基因的转基因“疫苗型”锦橙株系，从而为利用转基因锦橙生产口服疫苗奠定基础。

1 材料与方法

1.1 试验材料

试验材料为根癌农杆菌介导法获得的 2 个单拷贝的转基因锦橙株系，来自于中国农业科学院柑桔研究所国家柑桔品种改良中心。该转基因株系中目的基因为甲型肝炎病毒衣壳蛋白融合基因。

1.2 试剂

DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 购自 Roche, Trizol 购自 Invitrogen 公司, TaKaRa Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0、PrimeScriptTM RT reagents Kit、SYBR Premix Ex TaqTM Kit、DL2000 Marker、Taq 酶、dNTP、琼脂糖等购自 TaKaRa 公司, 其他化学试剂为国产分析纯。

1.3 转基因锦橙株系及其无性繁殖后代的 PCR 检测和 Southern blot 杂交

对转基因锦橙株系通过嫁接的方式无性繁殖 2 代。采用 CTAB 法提取转基因锦橙株系及其无性繁殖后代和野生型植株的总 DNA, 用紫外分光光度法结合琼脂糖凝胶电泳检测 DNA 的浓度和纯度。

以总 DNA 为模板, 以甲型肝炎病毒衣壳蛋白融合基因的特异引物扩增甲型肝炎病毒衣壳蛋白融合基因, 引物为: P1: 5'-GCAGTGATGGACATTACAGGAGTG-3'; P2: 5'-GATCTGATGTATGCCTGGACTCT-3', 扩增产物长 511 bp。PCR 反应体系为: 10×PCR buffer 2.5 μL, MgCl₂ (25 mmol/L) 1.5 μL, dNTPs (2.5 mmol/L) 1.5 μL, 上下游引物 (10 μmol/L) 各 0.75 μL, template DNA (50 ng/μL) 1 μL, Taq 酶 (5 U/μL) 0.15 μL, 加 ddH₂O 至终体积 25 μL。PCR 反应程序为: 95 °C 变性 5 min, 32 次扩增循环 (94 °C/60 s, 56 °C/45 s, 72 °C/60 s), 72 °C 延伸 10 min。扩增产物用 1.0% 琼脂糖凝胶电泳检测。

将 30 μg 的总 DNA 用 Sma I 进行单酶切, 过夜, 用 0.8% 的琼脂糖凝胶电泳检测酶切是否完全。将完全酶切的产物进行 Southern blot 杂交。探针与上述 PCR 引物相同, 探针的标记和 Southern blot 杂交的具体方法按 DIG-High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit I 试剂盒操作说明进行。

1.4 转基因锦橙株系及其无性繁殖后代的 Real-time PCR 分析

转基因锦橙株系及其无性繁殖后代的总 RNA 提取: 以转基因锦橙株系及其无性繁殖后代的幼嫩叶片为材料, 提取总 RNA; RNA 的提取用 Trizol 试剂盒进行, 操作按说明书; 用紫外分光光度法结合琼脂糖凝胶电泳检测 RNA 的浓度和纯度, 并将 RNA 的浓度稀释为 500 ng/μL, -80 °C 保存备用。

RNA 样品的反转录: 利用 PrimeScriptTM RT reagents Kit 试剂盒进行 RNA 的反转录, 操作按说明书, 反转录产物保存在 -20 °C 的冰箱中。

标准品的制备: 以反转录产物为模板 DNA, 用 *actin* 基因作内参, *actin* 的引物为: 上游引物, 5'-CATCCCTCAGCACCTTCC-3'; 下游引物, 5'-CCAACCTT AGCACTTCTCC-3'。目的基因所用引物: 上游引物, 5'-GTCTTTTGCTTTGGATCAGGAAG-3'; 下游引物, 5'-TGCTGACCAACTGAATCTGAAG-3'。在 PCR 仪上分别扩增任一样品的内参和目的基因, 然后利用 Agarose Gel DNA Purification Kit Ver. 2.0 纯化产物, 然后将纯化产物用紫外分光光度仪定量, 以 2 ng 为初始浓度, 然后进 10 倍梯度稀释, 得到 6 个不同浓度的标准品^[9]。

转基因锦橙株系及其无性繁殖后代的 Real-time PCR 分析: 利用 SYBR Premix Ex TaqTM 试剂盒, 在 Bio-Rad IQ5 PCR 仪上同时进行标准品、样品内参、目的基因的扩增。25 μL 反应体系中包含: SYBR Premix Ex TaqTM (2×) 12.5 μL, PCR 上游引物 (10 μM) 0.5 μL, PCR 下游引物 (10 μM) 0.5 μL, 反转录产物 1 μL, ddH₂O 10.5 μL。反应条件为: 95 °C 预变性 90 s; 95 °C, 30 s, 57 °C, 20 s, 72 °C, 20 s, 40 个循环; 72 °C, 60 s, 65.0

~95.0 ℃ 做溶解曲线, 每 0.3 ℃ 读一次板. 每个样品设 3 个重复, 进行 3 次独立的试验.

2 结果与分析

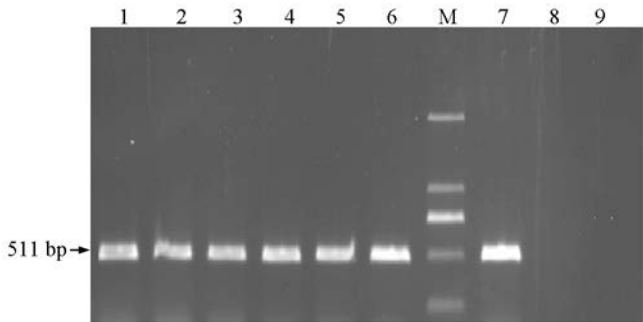
2.1 甲型肝炎病毒衣壳蛋白融合基因在转基因锦橙株系及其无性繁殖后代中的遗传稳定性

2.1.1 转基因锦橙株系及其无性繁殖后代的 PCR 检测

将 2 个转基因锦橙株系分别编号为 JTH1 和 JTH2, 对这 2 个转基因株系无性繁殖 2 代, 获得 JTH1-T₁、JTH1-T₂ 和 JTH2-T₁、JTH2-T₂, 运用 PCR 技术对这 2 个转基因锦橙株系及其无性繁殖后代进行检测, 初步表明目的基因在 2 个转基因锦橙株系的无性繁殖过程中可以遗传给后代(图 1).

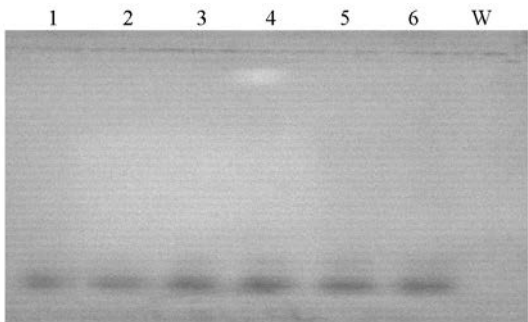
2.1.2 转基因株系及其无性繁殖后代的 Southern blot 杂交

由于 PCR 技术容易产生假阳性的结果, 因而有必要对这 2 个转基因株系及其无性繁殖后代进行进一步的 Southern blot 杂交, 以确定 PCR 阳性植株是否为真正的转基因植株. 对 2 个转基因锦橙株系及其无性繁殖后代进行 Southern blot 杂交, 结果表明, 目的基因在 2 个转基因锦橙株系及其无性繁殖后代中能稳定遗传(图 2).



M: DL2000 Marker; 1: JTH1-T₀; 2: JTH1-T₁; 3: JTH1-T₂; 4: JTH2-T₀; 5: JTH2-T₁; 6: JTH2-T₂; 7: 质粒阳性对照; 8 阴性对照; 9: 水对照. 黑色箭头表示 511 bp 的特异扩增带.

图 1 2 个转基因锦橙株系及其无性繁殖后代的 PCR 检测



1: JTH1-T₀; 2: JTH1-T₁; 3: JTH1-T₂; 4: JTH2-T₀; 5: JTH2-T₁; 6: JTH2-T₂; W: 阴性对照.

图 2 2 个转基因锦橙株系及其无性繁殖后代的 Southern blot 杂交

2.2 转基因锦橙株系及其无性繁殖后代的表达稳定性分析

2.2.1 RNA 的提取

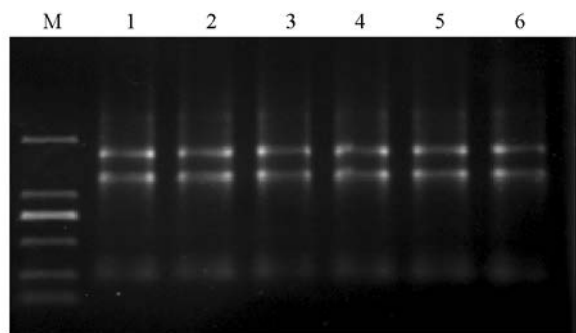
提取的总 RNA 用紫外分光光度计检测 A260/A280, 并进行 1.2% 琼脂糖凝胶电泳, 结果表明所提取的总 RNA A260/A280 在 1.8~2.0 之间, 未见 RNA 的明显降解. 说明所提取的总 RNA 可用来进行下一步的反转录分析的模板使用(图 3).

2.2.2 转基因锦橙株系及其无性繁殖后代中目的基因的表达

本试验采用相对定量的方法来检测目的基因的相对表达量, 选用 JTH1-T₀ 作为参照样品制作标准曲线. 标准曲线的回归方程分别为: $y = -3.319x + 11.537$ 和 $y = -3.257x + 29.909$, 样品内参 *actin* 基因和目的基因的扩增效率分别为 100.1% 和 102.8%, r^2 分别为 0.998 和 0.999. 结果表明参照样品内参 *actin* 基因和目的基因的扩增效率具有可比性, 标准曲线可以很好地为正确量化做基础.

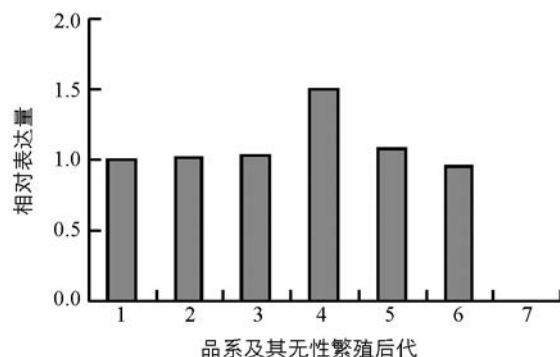
通过对每个样品的目的基因和内参 *actin* 基因分别进行扩增, 获得扩增曲线, 得到每个样品的 Ct 值. 由于目的基因的扩增效率和内参 *actin* 基因的扩增效率具有可比性, 因而根据相对定量的公式 $2^{-\Delta\Delta Ct}$, 得到每个样品中目的基因的相对表达量.

运用 SPSS 13.0 统计分析软件对每个转基因锦橙株系及其无性繁殖后代进行统计学分析, 转基因锦橙株系 JTH1 及其无性繁殖后代之间 $p < 0.05$, 而转基因锦橙株系 JTH2-T₀ 与 JTH2-T₂ 之间 $p > 0.05$. 表明甲型肝炎病毒衣壳蛋白融合基因在转基因锦橙株系 JTH1 及其无性繁殖后代之间能够稳定的表达, 而在转基因锦橙株系 JTH2 及其无性繁殖后代之间不能稳定的表达, T₀ 代中目的基因的相对表达量显著高于 T₂ 代, 但 T₀ 代与 T₁ 代之间, T₁ 代与 T₂ 代之间没有显著差异(图 4).



M: DL2000 Marker; 1: JTH1-T₀; 2: JTH1-T₁; 3: JTH1-T₂; 4: JTH2-T₀; 5: JTH2-T₁; 6: JTH2-T₂.

图 3 2 个转基因锦橙株系及其无性繁殖后代的总 RNA



1: JTH1-T₀; 2: JTH1-T₁; 3: JTH1-T₂; 4: JTH2-T₀; 5: JTH2-T₁; 6: JTH2-T₂; 7: 阴性对照.

图 4 2 个转基因锦橙株系及其无性繁殖后代中目的基因的相对表达量

3 讨 论

关于外源基因在转基因植物中的有性阶段遗传稳定性研究国内外均有较多报道, 大部分的研究表明外源基因呈孟德尔遗传^[10-13], 也有遗传不稳定或遗传紊乱现象^[14-15]. 而对于转基因在无性繁殖过程中的稳定性研究较少. 一般认为外源基因一旦整合到植物细胞的基因组后, 其稳定性与核基因是等等的, 能够通过细胞分裂稳定地传递给下一代, 因而从理论上来说, 转基因在无性繁殖过程中是能够稳定遗传的. 但由于外源基因在转基因植株中存在嵌合现象^[16-17], 以及外源基因容易被植物基因组中存在的修饰与限制系统所识别并加以修饰和抑制等原因^[18-19], 使得外源基因不能在受体植物的无性世代中得到稳定遗传, 因而有必要对转基因植株的无性繁殖后代进行筛选, 获得能稳定遗传的转基因株系. 本试验运用 PCR、Southern blot 杂交技术证明甲型肝炎病毒衣壳蛋白融合基因在 2 个转基因锦橙株系及其无性繁殖后代中都能够稳定的遗传.

获得外源基因能稳定遗传和表达的转基因植株是转基因育种的重要环节. 关于外源基因在转基因植株及其无性繁殖后代中能否稳定的表达有不同的结果^[1, 5]. 影响外源基因表达的因素很多, 包括外源基因的整合特性, 外源基因的启动子或编码区域的甲基化以及外界环境因素等. Courtney-Guttererson 等认为导致白花转基因菊花的后代中仍有一些花为粉红, 这是因为环境影响所致^[4]; 同样, Andrew J. E. Bettany 等指出转基因高羊茅无性繁殖后代中, GUS 基因表达不稳定并不是因为转基因的丢失, 也不是启动子的甲基化所致, 可能是受外界环境的影响^[5]. 本研究中的转基因锦橙株系 JTH2-T₀ 代中目的基因的相对表达量显著高于 JTH2-T₂ 代, 其原因有待进一步的研究.

参考文献:

- [1] NOEL B L, SANDRA J S. Stability of Gene Expression and Agronomic Performance of a Transgenic Herbicide-Resistant Sugarcane Line in South Africa [J]. Crop Science, 2003(43): 671—677.
- [2] 杜 涛, 郭剑华, 张海州, 等. 转基因泡桐 shiva-1 基因遗传与表达分析 [J]. 西北植物学报, 2005, 25(12): 2386—2390.
- [3] 丛 郁. 转基因八棱海棠的获得及其表达研究 [D]. 博士学位论文, 南京: 南京农业大学, 2006.
- [4] COURTNEY-GUTTERSON N, NAPOLI C, LEMIEUX C, et al. Modification of Flower Colour in Florist's Chrysanthemum: Production of a White-Flowering Variety Through Molecular Genetics [J]. Bio/Technology, 1994(12): 268—271.
- [5] ANDREW J E B, SUSAN J D, EMMA T, et al. Stability of Transgene Expression During Vegetation Propagation of Protoplast-Derived Tall Fescue (*Festuca arundinacea* Schreb.) Plants [J]. Journal of Experimental Botany, 1998, 49(328): 1797—1804.
- [6] 王逸群, 李 田. 乙肝病毒表面抗原基因对番茄的遗传转化及转基因番茄植株的获得 [J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2008, 30(7): 78—83.
- [7] 王 丹, 童师雯, 张红敏, 等. 乙型肝炎病毒外膜蛋白真核表达质粒的构建和表达 [J]. 西南大学学报: 自然科学版,

2012, 34(6): 25—29.

[8] 胡 蓉, 魏 泓, 陈善春, 等. 甲型肝炎病毒衣壳蛋白融合基因植物表达载体的构建与遗传转化柑橘的研究 [J]. 遗传, 2004, 26(4): 425—431.

[9] 王 艳, 金小宝, 朱家勇, 等. 家蝇抗菌肽基因的表达模式研究 [J]. 中国科学 C 辑: 生命科学, 2009, 39(7): 685—691.

[10] FENG Dao-rong, XU Xin-ping, QIU Guo-hua, et al. Inheritance and Expression of Multiple Disease and Insect Resistance Genes in Transgenic Rice [J]. Chinese Science Bulletin, 2001, 46(2): 102—107.

[11] LIU Yun-jun, WANG Guo-ying. The Inheritance and Expression of cry1A Gene in Transgenic Maize [J]. 植物学报, 2003, 45(3): 253—256.

[12] 刘 志, 郭旺珍, 朱协飞, 等. 转 Bt + GNA 双价基因抗虫棉花中抗虫基因及其抗虫性的遗传稳定性 [J]. 作物学报, 2004, 30(1): 6—10.

[13] 李三和, 林 刚, 张金锐, 等. 转基因小麦外源基因在主栽小麦种质中的遗传规律 [J]. 麦类作物学报, 2005, 259(5): 23—26.

[14] 谢小波, 崔海瑞, 沈圣泉, 等. 水稻转基因植株后代中外源基因异常分离的研究 [J]. 遗传学报, 2002, 29(11): 1005—1011.

[15] 董 静, 张玉平, 潘青华, 等. 外源转入基因 CBF1 在转基因草莓中的遗传分析 [J]. 分子植物育种, 2009, 7(1): 63—66.

[16] ANTONIO D, MAGDALENA C, ROSA M P, et al. Characterisation of Regenerants Obtained Under Selective Conditions After Agrobacterium-Mediated Transformation of Citrus Explants Reveals Production of Silenced and Chimeric Plants at Unexpected High Frequencies [J]. MolecularBreeding, 2004(14): 171—183.

[17] SCHMULLING T, SCHELL J. Transgenic Tobacco Plants Regenerated from Leaf Disks Can be Periclinal Chimeras [J]. Plant Molecular Biology, 1993(21): 705—708.

[18] KUMPATLA S P, CHANDRASEKHARARAM M B, LYER L M, et al. Genome Intruder Scanning and Modulation Systems and Transgene Silencing [J]. Plant Science, 1998(3): 97—104.

[19] BROER I. Stress Inactivation of Foreign Genes in Transgenic Plants [J]. Field Crop Research, 1996(45): 19—25.

Study on the Inheritance and Expression Stability of Hepatitis A Virus Capsid Protein Fusion Gene in Transgenic Jincheng (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck)

PENG Ai-hong^{1,3}, LEI Tian-gang^{1,3}, XU Lan-zhen^{1,3}, LIU Xiao-feng^{1,3},
HE Yong-rui^{1,2,3}, YAO Li-xiao^{1,2,3}, CHEN Shan-chun^{1,2,3}

1. Citrus Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Chongqing 400712, China;
2. National Citrus Engineering Technology Research Center, Chongqing 400712, China;
3. National Citrus Improvement Center, Chongqing 400712, China

Abstract: In order to investigate the stability of inheritance and expression of hepatitis A virus capsid protein fusion gene in transgenic Jincheng (*Citrus sinensis* (L.) Osbeck) lines and their vegetative propagation generations, two single-copy transgenic Jincheng lines were used as experiment materials and propagated vegetatively to produce 2 generations through grafting. PCR, Southern blotting and real-time PCR were performed. The results demonstrated that hepatitis A virus capsid protein fusion gene was stably inherited in the process of vegetative propagation of both transgenic Jincheng lines and was stably expressed between JTH1 and its vegetatively propagated descendant. However, it was not stably expressed between JTH2 transgenic Jincheng line and its vegetatively propagated descendant. The gene relative expression of T0 generation was significantly higher than that of T2 generation.

Key words: transgenic Jincheng; hepatitis A virus capsid protein fusion gene; inheritance stability; expression stability

