

胆碱磷酸转移酶基因转化大豆的初步研究^{*}

王桂玲 黄永芬

(哈尔滨师范大学生命科学系, 哈尔滨 150080)

摘要 胆碱磷酸转移酶基因(cpt)是磷脂合成代谢途径上一个关键的酶基因,其基因产物是磷脂酰胆碱(PC),PC做为主要膜脂与膜的流动性和植物的抗寒性有密切关系。本实验用花粉管通道法将质粒 PRDH401(含 35S-35S-AMV-cpt-NOST)导入五个黑龙江常见栽培大豆品种中,对 D₁ 代植株进行卡那霉素抗性筛选、低温筛选和 PCR 检测,初步筛选到转化植株。

关键词 大豆; 抗寒; CPT 基因; 转基因植物

中图分类号 S 565.1 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2005)02-0150-04

在温带、寒温带,作物抗寒性是一个重要的农艺性状,它对作物的丰产、改善品质、扩大栽培地域具有重要意义。大豆耐冷性育种是防御低温冷害的根本方法,在日本研究较早^[1],我国也进行了大量的研究工作^[2-8]。本研究把胆碱磷酸转移酶基因(cpt)导入大豆,拟通过直接导入外源基因的技术解决大豆抗寒问题。

低温诱导的植物抗寒性与脂代谢相关,胆碱磷酸转移酶(CPT)是一个整合的膜蛋白,是磷脂合成途径上一个重要的酶,该酶的产物是磷脂酰胆碱(PC),是生物膜的主要组成成分,与膜的流动性和作物的抗寒性有密切关系。本实验室已将含卡那霉素抗性基因(K^{nar})和 CPT 基因的质粒载体 PRDH401 转入大豆中获得 D₀ 代种子,本研究对该大豆的第一代植株进行卡那霉素抗性筛选、低温筛选后,对可能转化的植株进行 PCR 检测,转化植株扩增出目的基因(1100bp)片段,为进一步的分子生物学鉴定提供了依据。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 大豆品种: 合丰 25, 合丰 35, 绥农 14, 北丰 11, 合丰 39。

1.1.2 MS 培养基(含 50mg/L 卡那霉素)

1.1.3 生化试剂

PCR 扩增使用大连宝生物工程公司的试剂盒,引物由加拿大植物生物技术研究所提供。

配制 MS 培养基的各种氨基酸、抗生素及其他试剂均为国产试剂。

1.2 方法

将转基因处理所获种子各取 50 粒,其中 20 粒用于卡那霉素抗性筛选,另 30 粒用于低温筛选。

1.2.1 卡那霉素抗性筛选

本实验所用植物表达载体 PRDH401 上的筛选标记基因为卡那霉素抗性基因。挑取籽粒饱满、无病斑、无外表损伤的大豆种子在自来水中浸泡 12 小时,取出,用 95%乙醇处理 30 秒,0.2%HgCl₂ 浸泡 7-8 分钟,不断轻轻振荡。然后用无菌蒸馏水冲洗 3-4 次,再用无菌蒸馏水浸泡 1-15 分,在超净工作台上将种子接入含 50mg/L 卡那霉素的 MS 固体培养基上培养(光照 16 小时/天,温度 26℃)。一周后,这时揭去封口膜,室温锻炼 2 天后可移出,栽培在珍珠岩中,每天浇 1/3×MS 液体培养基。待苗长得绿且茁壮,须根较多时移入土中培养。

1.2.2 低温筛选: 将种子播种在珍珠岩中,每天浇 1/3×MS 液体培养基。待长至 3-4 片真叶时进行低温筛选。每天 2℃-5℃低温处理 2-4 小时,共 4 天。在室外 -4℃- -8℃自然温度下处理 12 小时进行低温筛选。选择当对照全部死亡或冻伤而转基因苗未受伤害的继续培养,供进一步筛选。

* 收稿日期: 2005-01-10

基金项目: 黑龙江省教育厅项目(10511031)

作者简介: 王桂玲(1964-),女,博士研究生,从事植物基因工程工作。

1.2.3 PCR 检测: 取经卡那霉素抗性筛选、低温筛选过的大豆植株叶片, 用 CTAB 法提取总 DNA, 进行 PCR 扩增, 引物序列为 5/: CAGTTCTAGAGGATGGGATACATAGGAGCACATG, 3/: GCGGATCCGCGTTGAGCTTCCTTCAAGCTTCCT。PCR 反应条件是: 94℃预变性 3min, 经 94℃变性 1min, 55℃退火 50sec, 72℃延伸 2min15sec, 30 个循环后, 72℃再延伸 10min。PCR 反应体系为: 总反应体积为 30 μ L, 包括 1 \times Buffer (- Mg²⁺)、0.2 mM dNTP 混合物、1.5mM MgCl₂、0.5 μ M 引物混合液、50ng 模板 DNA、1.25U Taq DNA 聚合酶。

2 结果与分析

2.1 转化植株的抗菌素筛选实验

本实验用于转化的植物载体 pRDH401 质粒上的报告基因是 NPT II 基因, 此基因的表达产物是新霉素磷酸转移酶, 表现为卡那霉素抗性(Kan⁺)。将卡那霉素抗性作为筛选的第一步可有效的缩小筛选范围。卡那霉素的浓度是根据前人总结设计的, 用含 50mg/L 的 MS 培养基培养大豆种子, 筛选出转基因植株无菌苗(图版 1), 筛选结果见表 1。

从表 1 可以看出, 用 50mg/L 的卡那霉素筛选后, 大部分未转化植株未能成活, 五个品种的转化率在 5% - 15% 之间, 但不能确定成活者即为转基因植株, 仍需做进一步鉴定。

2.2 转化植株的抗寒筛选实验

本实验利用 10 月末的自然温度对转基因植株进行了低温筛选。由于植株在低温下并不会马上死

亡, 需缓苗后才能看出是死是活, 我们经过多次试验

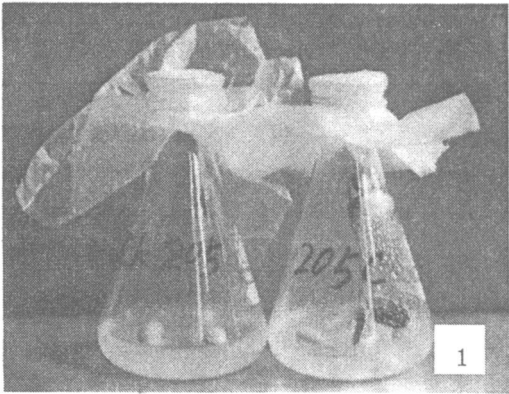


图 1 卡那霉素抗性与非抗性植株

Fig. 1 Transgenic plants of selected by antibiotic

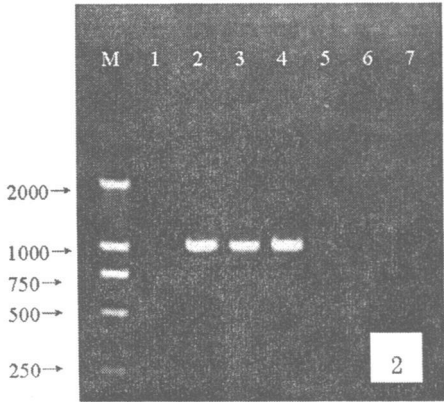


图 2 PCR 检测 M. marker 1. 阴性对照 2. 质粒阳性对照
3. 合丰 39 转化植株 4. 合丰 25 转化植株 5. 6. 7. 未转化植株
Fig 2 PCR detecting; M. marker 1. negative ck;
2. positive ck; 3. transferred plant of Hefeng 39;
4. transferred plant of Hefeng 25; 5 6 7. not transferred plant

表 1 转化植株的卡那霉素筛选结果

Table 1 The transgenic plants selected by antibiotic

品种 Cultivars	合丰 25 Hefeng 25	合丰 35 Hefeng 35	绥农 14 Suinong 14	北丰 11 Beifeng 11	合丰 39 Hefeng 39
种子数 Infection number	20	20	20	20	20
抗性筛选 Kna resistance	死 活 18 2	死 活 17 3	死 活 19 1	死 活 19 1	死 活 18 2
转化率(%) Rate of transformation	10	15	5	5	10

不同的温度和时间, 最后一次达到了满意的效果。当时的夜间最低气温可达 - 8℃, 中午将温室里培育的大豆幼苗搬到室外, 以便适应气温的逐渐降低。下午 4 时温度已达 - 4℃, 一直到凌晨 4 时, 温度达 - 8℃, 在 - 4℃ ~ - 8℃ 之间持续了 12 小时。对照经温室缓苗后死亡, 而筛选出的若干转基因植株(有

的轻伤, 有的未受伤)能继续存活, 培养后继续对其进行 PCR 检测, 抗冻筛选结果见表 2。

从表 2 看出, 大部分非转化植株在 - 4℃ ~ - 8℃ 低温处理 4 小时后即全部死亡, 而转化株则继续存活。虽然由于自然变异也可能造成个别植株的抗寒能力增强, 但这种概率较低, 可以在进一步的分子

表 2 转化植株的抗寒筛选结果

Table 2 The transgenic plants selected by low temperature

品种 Cultivars	合丰 25 Hefeng 25		合丰 35 Hefeng 35		绥农 14 Suinong 14		北丰 11 Beifeng 11		合丰 39 Hefeng 39	
	T	CK	T	CK	T	CK	T	CK	T	CK
供试植株数 Plants in total	30	30	30	30	30	30	30	30	30	30
2h 后存活株数 Plants survival aft 2h	8	3	9	2	9	3	7	2	9	3
4h 后存活株数 Plants survival aft 4h	6	0	7	0	7	0	5	0	7	0
8h 后存活株数 Plants survival aft 8h	6	0	7	0	7	0	5	0	7	0
12h 后存活株数 Plants survival aft 12h	6	0	7	0	6	0	5	0	7	0
12h 后存活率(%) Survival rate aft 12h(%)	20	0	23.3	0	20	0	16.7	0	23.3	0

生物学检测中得到排除。

2.3 转化植株的 PCR 检测

利用 PCR 对转化植株进行筛选是既方便又灵敏的方法, PCR 能检测目的基因的完整性, 也可估算外源基因整合入植物基因组中的拷贝数。经多次 PCR 试验后, 建立了最佳的 PCR 扩增体系, 从转化植株的总 DNA 中扩增出了 CPT 基因片段(图板 2)。结果如下: 合丰 25 与合丰 39 转化植株的 DNA 扩增出 1100bp 的谱带, 与阳性质粒对照相同, 而阴性对照无此扩增带。

3 讨论

3.1 关于抗菌素筛选问题

在用抗菌素筛选转化植株时, 卡那霉素的浓度对选择结果有一定的影响, 它的工作浓度在 10 – 75mg /L, 具体的选用因植物种类而异。对大豆而言, 较合适的浓度为 50 mg /L^[9]。浓度偏高, 则可能筛选不出转化株; 浓度偏低, 则未转化株也被一同筛选出来, 造成假阳性。因此, 应对卡那霉素做浓度梯度试验, 以选出最佳浓度。

3.2 关于抗寒筛选问题

CPT 基因可通过改变膜脂成分使植物获得抗寒性, 因此进行抗寒筛选是鉴定 CPT 基因是否导入大豆的最直接有效的方法。将低温锻炼后的转化植株进行低温筛选, 在 – 4℃~ – 8℃下, 抗寒植株可存活 12 小时, 而非转化株则在 4 小时内先后死亡。对筛选出的若干转基因植株(有的轻伤, 有的未受伤)继

续培养, 进一步进行分子生物学鉴定。要注意在筛选过程中, 避免过度严寒造成实验材料丧失。

3.3 关于 PCR 检测问题

PCR 是体外快速扩增目的基因 DNA 片段的有效方法, 具有 DNA 用量少、操作简单、成本低等优点。在经过抗菌素筛选或低温筛选之后, 已大大缩小了筛选范围。利用 PCR 对转化植株进行筛选是既方便又灵敏的方法, 但 PCR 易出现假阳性结果, 所以仍需进一步做 Southern 杂交检测。

参 考 文 献

1 阴秀卿. 日本北海道大豆耐冷性育种[J]. 世界农业, 1991, (8): 19 – 20

2 邢立群. 大豆萌发期对低温反应特性测定[C]. 全国大豆育种讨论会论文, 1988

3 李育军, 常汝镇. 大豆抗冷性研究: II, 萌发期低温处理对生长发育的影响[J]. 中国油料 1989, (4): 41 – 44

4 李育军, 赵玉田, 常汝镇, 等. 大豆萌发期对 6℃低温的反应[J]. 大豆科学, 1990, 9(2): 136 – 144

5 李育军, 常汝镇, 赵玉田, 等. 大豆室内耐冷筛选及其在田间的应用研究[J]. 大豆科学, 1992, 11(1): 49 – 57

6 郭泰, 齐宁, 刘忠堂, 等. 大豆品种资源及杂种 F₂ 和 F₃ 种子萌发期耐冷性鉴定[J]. 黑龙江农业科学, 1995, 1: 6 – 8

7 郭泰, 刘忠堂. 大豆不同基因组合 F₂、F₃ 种子萌发期耐冷性的研究[J]. 中国油料, 1994, 16(2): 64 – 69

8 齐宁, 刘忠堂, 韩玉章, 等. 大豆种子脂肪蛋白质含量与萌发期耐冷性关系初探[J]. 中国油料, 1990, 3: 39 – 41

9 徐香玲, 高晶, 刘伟华. Ti 质粒介导的 B、t、k – δ 内毒素蛋白基因转化大豆的初步研究[J]. 大豆科学, 1997, 16(1): 6 – 11

THE RESEARCH ON TRANSFERING CPT GENE INTO SOYBEAN

Wang Guiling Huang Yongfen

(Harbin Normal University, Harbin 150080)

Abstract Cold resistance in the low temperature – induced plants is closely related to the synthesis metabolism path of phospholipids. Cholinephospho transferase gene is a key enzyme gene in the synthesis metabolism path of phospholipids. Phosphotidyl choline(PC)is the enzyme gene product of CPT gene and it is the key component of the membrane. . It is closely related with the mobility of membrane and cold resistance.

In this experiment, plasmid PRDH401 which carrying the 35S – 35S – AMV – cpt – NOST fusion gene, was transferred into 5 varieties of soybean by means of the pollen tube pathwa. We got the D₁ generation plants in the next year. Through the selection of kanamycin and low temperature, several transformed seedlings were obtained. PCR of the transformed soybean DNA indicated the integration of cpt gene into the transgenic soybean genome.

Key words Soybean; Cold resistance; CPT gene; Transgenic plants

(接第 160 页)

绥化市北林区种子公司 1994 年以宝交 89 – 5164 为母本, 北 87 – 9 为父本杂交, 系谱法选育而成, 1999 年 F₅ 代决选, 代号为绥北 99 – 1。

14.2 产量表现

2002 ~ 2003 年区试平均公顷产量 2795kg, 较对照品种台湾 292 增产 22. 9%; 2004 年生试平均公顷产量 2840. 8kg, 较对照品种台湾 292 增产 31. 3 %。

14.3 特征特性

鲜食类型, 亚有限结荚习性, 株高 90cm 左右, 分枝少, 主茎节数 16 个, 长叶, 白花, 灰色茸毛, 三、四粒荚多。籽粒黄色、圆形, 种脐黄色, 百粒重 25 ~

27g。蛋白质含量 40. 77%, 脂肪含量 19. 72%。在适应区出苗至成熟 105 天, 需 ≥ 10℃ 活动积温 2200℃ 左右。接种鉴定中抗灰斑病。

14.4 栽培要点

5 月上、中旬播种, 积温高的地方适当晚播能提高产量, 公顷保苗 25 ~ 27 万株, 公顷施农家肥 15t, 磷酸二铵 150kg, 硫酸钾 50kg。采种用时籽粒水份达 13 % 时即可收获, 毛豆用时要注意分期播种, 以延长采摘期, 避免集中上市。

14.5 适应区域

黑龙江省第二、三积温带鲜食栽培。