

双 T-DNA 表达载体转化大豆的研究^{*}

张秀春¹ 郭丽琼^{* * 1, 2} 吴坤鑫¹ 林俊扬³ 林俊芳^{* * 1, 2}

(1. 中国热带农业科学院热带生物技术研究所, 热带生物技术国家重点实验室, 海口 571101;
2. 华南农业大学食品学院生物工程系, 广州 510640; 3. 福建省莆田市农业科学研究所, 莆田 351100)

摘要 利用含有筛选标记基因和目的基因 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因的双 T-DNA 共转化表达载体 pLIN61, 经农杆菌 EHA101 介导, 采用子叶节转化法转化大豆, 使用除草剂 Glufosinate 作为筛选剂, 获得了一批携带有玻璃苣 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因的转基因大豆, 转化效率为 2.0%, 共转化频率及实际转化率分别为 56.25%、1.12%。PCR 检测和 Southern 杂交结果证明, 玻璃苣 D6D 已经整合到大豆的基因组上。RT-PCR 检测结果显示, 玻璃苣 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因在转基因大豆的转录水平上得到了表达。

关键词 共转化表达载体; Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因; 转基因大豆

中图分类号 S 565.1 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2005)04-0291-05

γ -亚麻酸(γ -linolenic acid, GLA)是一种多不饱和脂肪酸, 分子式 $C_{18}H_{30}O_2$, 化学名称为 6, 9, 12-十八碳三烯酸, 在碳链的第 6、9、12 位各有一个双键。由于 γ -亚麻酸对人体的激素调节作用和人体脂肪酸代谢中发挥的重要生理作用, 特别是 γ -亚麻酸对治疗心血管疾病、糖尿病以及癌症等疾病的药用价值, 因此, 近年来 γ -亚麻酸已成为学术界研究的热点之一^[1-5]。 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶(Δ^6 -fatty acid desaturase, D6D)是 γ -亚麻酸生物合成的关键酶, 它以亚油酸为底物, 在 C6 和 C7 位之间脱氢形成 γ -亚麻酸, 然后通过碳链延长和进一步脱氢作用形成花生四烯酸、前列腺素类和白三烯类生物活性物质。国内外从 20 世纪 90 年代初开始进行 Δ^6 -DSA 基因的研究, 相继从蓝细菌、高山被孢霉、畸雌腐霉、玻璃苣、线虫、小鼠、斑马鱼、虹鳟鱼等不同物种中克隆了 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因, 并分别在啤酒酵母、烟草、油菜等生物系统中进行了表达^[6-9]。

大豆油脂富含亚油酸, 但不含 γ -亚麻酸或其含量极低。邢来君实验室对不同来源的 20 多个大豆品种的脂肪酸成分分析表明: 大豆种子的亚油酸含量占脂肪酸总量的 40%以上, 最高达 58.3%; 而

γ -亚麻酸含量极低, 普遍检测不到。该实验室进一步研究结果证实, 由于大豆中含有丰富的亚油酸, 所以当低等真菌深黄被孢霉的 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因转入大豆植株后, 能够利用大豆中的亚油酸进行脂肪酸代谢。通过对转基因大豆种子的 GC 分析, 检测到了 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因的代谢产物 γ -亚麻酸, 说明转入的外源基因获得了功能性表达^[10]。

本研究在克隆玻璃苣 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因并构建含有两套 T-DNA 的共转化载体 pLIN61 的基础上^[14], 采用农杆菌介导的转化方法把玻璃苣 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因转入大豆中, 获得了一批转基因大豆植株, 为培育含有 γ -亚麻酸而不含筛选标记基因的转基因大豆奠定基础。本文报道这一研究结果。

1 材料和方法

1.1 材料

1.1.1 大豆品种

* 收稿日期: 2005-03-23

基金项目: 国家自然科学基金项目(30371000), 广东省自然科学基金项目(032239), 广东省科技攻关项目(2005B210201009)和华南农业大学校长基金项目(5100-K03003)

作者简介: 张秀春(1972-), 女, 讲师, 在读博士生, 主要从事植物生物技术工作。

* * 郭丽琼为并列第一作者, 林俊芳为通讯作者, E-mail: linjf@scau.edu.cn

实验所用大豆品种为莆豆8号,由福建省莆田市农业科学研究所提供。

1.1.2 菌种和质粒

根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA101 为本课题组保存。质粒为共转化表达载体 pLIN61, 由本课题组构建^[14]。目的基因玻璃苣 Δ^6 -脂肪酸脱氢酶基因和选择标记基因 bar 分别插在同一质粒两个相互独立的 T-DNA 内(见图1)。

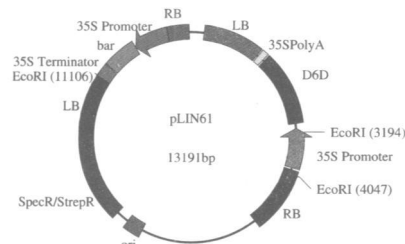


图1 植物共转化表达载体 pLIN61

Fig.1 The plant co-transformation expression vector pLIN61

1.1.3 培养基及其试剂

LB培养基、YEP培养基和MS培养基的成分见文献^[11, 13], B5培养基、农杆菌大豆共培养基、大豆漂洗培养基、大豆丛生芽诱导培养基、大豆伸长培养基、大豆生根培养基的成分见文献^[15, 16]。限制性内切酶为 Promega 公司产品, Taq 多聚酶、dNTP 等 PCR 试剂购自华美生物工程公司, 寡核苷酸引物由上海 Sangon 公司合成。DIG DNA Labeling and Detection Kit 购自 Roche 公司, RNA 提取纯化试剂盒购自上海华舜生物工程有限公司, RT-PCR 试剂盒购自宝生物工程(大连)有限公司, 除草剂 Glufosinate 购自 Sigma 公司。培养基的其它各种试剂为国产分析纯。

1.2 方法

1.2.1 农杆菌的培养与制备

利用三亲交配法^[14]将植物共转化表达载体 pLIN61 引入根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) EHA101 中, 与大豆子叶节共培养的农杆菌菌液的制备见文献^[15]。

1.2.2 大豆的转化和再生

见参考文献^[14, 15]。

1.2.3 大豆再生植株的 PCR 检测

取经除草剂 Glufosinate 筛选过的再生植株, 采用 CTAB 法提取大豆叶片总 DNA, 以其为模板, 进行 PCR 扩增。目的基因 D6D 的 PCR 扩增引物为: DesatF (5' - TTT TTC ATC CAT GGC TGC TCA AAT C - 3') 和 DesatR (5' - TTT TTT CTA

GAT TAA CCA TGA GTG TGA AGA GC - 3'), PCR 反应条件是: 95℃预变性 5min, 循环参数: 94℃ 40s, 52℃ 40s, 72℃ 60s, 33 个循环, 72℃延伸 10min。选择标记基因 bar 的 PCR 扩增引物为: ZH01 (5' - AAG CAC GGT CAA CTT CCG TA - 3') 和 ZH02 (5' - GTT TCT GGC AGC TGG ACT TC - 3'), PCR 反应条件是: 95℃预变性 5min, 循环参数: 94℃ 40s, 56℃ 40s, 72℃ 60s, 33 个循环, 72℃延伸 10min。

1.2.4 大豆再生植株的 Southern 杂交检测

取 10^μg 大豆基因组 DNA, EcoRI 酶切后在 1% 的琼脂糖凝胶上电泳分离。采用向下毛细管印迹法将凝胶上的 DNA 转移到尼龙膜上, 采用地高辛标记检测试剂盒进行 Southern 杂交。目的基因 D6D 的探针标记、尼龙膜预杂交和杂交显影等具体步骤参见试剂盒使用说明书。

1.2.5 转基因大豆的 RT-PCR 检测

利用 RNA 提取纯化试剂盒提取 PCR 和 Southern 杂交检测均为阳性的大豆植株叶片的总 RNA, 用 RT-PCR 试剂盒进行反转录, 以反转录产物为模板, 以目的基因 D6D 的 DesatF 和 DesatR 为引物进行 PCR 扩增。

2 结果与分析

2.1 大豆转化抗性再生植株的获得及转化频率

大豆子叶节经农杆菌侵染和共培养后, 在含 5mg/L Glufosinate 的抗性诱导培养基上一般经过 3-4 周的诱导培养出现抗性不定芽。抗性不定芽在含 3mg/L Glufosinate 的抗性筛选伸长培养基上一般经过 4-6 周的培养, 抗性不定芽可长成 2cm-3cm 高的抗性再生苗。抗性再生苗在不含 Glufosinate 的生根培养基上一般经过 4-6 周的生根培养, 可长成根长 1cm-3cm 的再生植株。本研究转化 1603 个外植体, 共获得 32 株抗性再生植株, 转化频率为 2.0% (转化频率为抗性再生植株与转化外植体的比值)。

2.2 大豆抗性再生植株的 PCR 检测

大豆再生植株 PCR 扩增选择标记基因 bar 的结果表明, 32 株大豆抗性再生植株全部扩增出与用植物表达 pLin61 作为模板的相同的扩增产物, 大小为 400bp 左右的选择标记基因 bar 的特异条带, 这说明选择标记基因 bar 已转入并整合进所有测试的

32 株大豆抗性再生植株的基因组中(见图 2。部分 PCR 扩增结果未包含其中)。PCR 扩增目的基因 D6D 的结果表明, 移栽成活并抗除草剂的 32 株大豆抗性再生植株中有 18 株扩增出了与用植物表达 pLin61 作为模板的相同的扩增产物, 大小位于 1200bp 左右, 与预期的目的基因扩增产物大小相符, 而未转化的阴性对照植株则无这一特异条带。

这说明目的基因 D6D 已整合在这 18 株大豆抗性再生植株的基因组中(见图 2。由于凝胶电泳中点样槽数目的限制, 部分 PCR 扩增结果未包含在图 2 中)。共转化频率为 56. 25%, 实际转化率为 1. 12% (共转化频率为含目的基因的抗性再生植株与所有抗性再生植株的比值; 实际转化率为含目的基因的抗性再生植株与转化外植体的比值)。

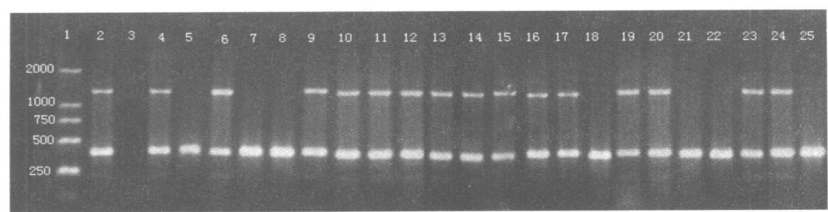


图 2 部分转基因大豆植株的 PCR 鉴定(标记基因 bar 和目的基因 D6D 的 PCR 产物各取 4^μl 混匀电泳)
1 DL2000; 2 以质粒 pG Δ^6 - DSA 为模板的 PCR 产物; 3 野生型大豆 PCR 产物; 4 - 25 转化大豆 PCR 产物.
Fig. 2 Identification of putative transgenic soybeans by PCR. Each sample lane contains the PCR product mixture derived from target gene D6D primers and from selectable marker gene bar primers.
Lane 1 DL2000 DNA ladder; Lane 2: PCR product derived from plasmid pLIN61 template; Lane 3: PCR product derived from wild - type soybean; Lane 4 - 25: PCR product derived from putative soybean transformants.

2. 3 转基因大豆的 Southern 杂交证实
以目的基因 D6D 为探针的 Southern 杂交结果(图 3)显示, 目的基因 PCR 检测结果为阳性的大豆抗性再生植株都出现了 Southern 杂交条带, 杂交条带一般为 1 - 2 条, 如图 3 中的 1 号样品。而没有转

化的阴性对照大豆样品没有杂交信号出现(图 3 中的 WT)。杂交结果与 PCR 检测结果一致, 这不仅说明 PCR 检测结果是可靠的, 也进一步证实目的基因 D6D 确实已整合进转基因大豆的基因组中。

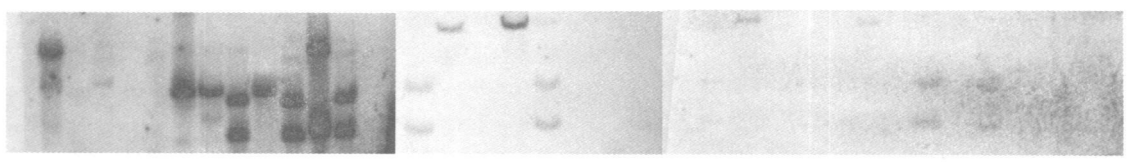


图 3 转基因大豆 T₀ 的 Southern 杂交鉴定
1 - 32 EHA101 介导的转化植株; WT 野生型大豆
Fig. 3 Southern blot analysis on putative primary transformants(T₀) of soybean
Lane 1 - 32: putative soybean transformants mediated by EHA101; WT: wild - type soybean DNA

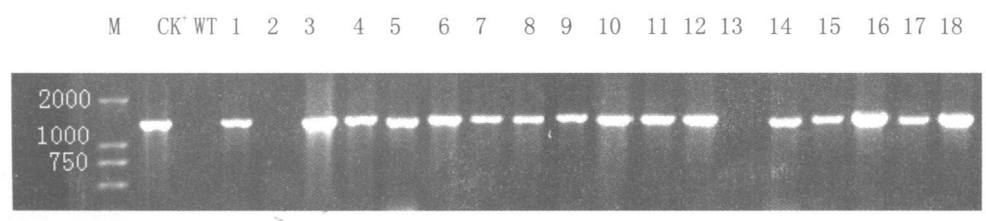


图 4 转基因大豆的 RT - PCR 表达分析
M DL2000; CK+ 以质粒 pLIN61 为模板的 PCR 产物; WT 野生型大豆 PCR 产物; 1 - 18 转化大豆 RT - PCR 产物
Fig. 4 Expression analysis of target gene D6D in transgenic soybeans by RT - PCR
M: DL2000 DNA ladder; CK⁺: PCR product of plasmid pLIN61; WT: wild - type soybean; Lane 1 - 18: transgenic soybean

2. 4 转基因大豆目的基因 D6D 的表达
Southern 杂交结果呈现阳性的转基因大豆植株
©1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

的 RT-PCR 分析结果表明, 大部分转基因大豆植株样品中 RT-PCR 扩增出了与目的基因表达载体 pLIN61(阳性对照)扩增产物一样大小的目的条带(图 4 中的 1 号至 12 号样品), 而没有转化的阴性对照大豆样品没有扩增出特异条带(图 4 中样品 13)。这说明目的基因 D6D 不仅已整合进大豆基因组中, 而且在大部分转基因大豆植株中至少在转录水平上得到了表达。

3 讨论

利用转基因技术进行农作物品种改良已经取得了显著的成效。2003 年, 全世界种植的转基因作物已达到 6770 万公顷, 其中转基因大豆有 4140 万公顷, 占转基因农作物总面积的 61.15%。近几年来, 随着转基因农作物产业化的不断扩大和小规模田间释放的不断增多, 转基因农作物的安全性问题日益受到人们的重视, 其可能导致的潜在生态环境风险和食用安全问题已经成为人们关注与争论的焦点。而这些问题的产生主要是由于抗生素或除草剂抗性选择标记基因存留于转基因植物中引起的。选择标记基因只是为了获得转基因植物, 作为转基因操作程序的需要而被引入的。一旦获得转基因植株后, 尤其在转基因产品产业化过程中, 标记基因的存在是多余的, 甚至是有风险的。其潜在的生态环境风险主要有: (1) 抗生素抗性基因会不会转移到微生物中, 使病原菌获得抗性, 从而导致目前临床使用的抗生素失效; (2) 标记基因会不会传播转移到野生亲缘种中, 使杂草获得这种抗性, 变成现有除草剂无法杀灭的“超级杂草”; (3) 具有抗生素或除草剂抗性标记基因的转基因农作物的应用, 会不会破坏生态平衡。

就目前情况看, 培育无选择标记的转基因作物可以减少生物安全问题带来的疑虑, 也是保证转基因技术安全发展的有效办法之一。所以, 培育无抗性标记基因的转基因作物已成为农作物基因工程育种的重要目标^[11-15]。目前, 培育无抗性标记基因的转基因植物的方法主要有三种系统: 共转化系统、特异重组酶转化系统及转座子系统。共转化系统是采用两个质粒或一个含有两套 T-DNA 表达盒的表达载体共同转化植物, 其中一套表达盒含有抗性选择标记基因, 另一套表达盒含有目的基因。它们转化植物后可能整合到植物基因组的同一条染色体或同一条染色体的不同位置上, 在减数分裂过程中, 标记基因和目的基因有可能发生分离, 从而有可能在转基因后代中筛选到只含有目的基因而不含有选择标记

基因的个体。Komari 首先运用这种方法转化植物, 发现转基因后代中约有 40% 的个体选择标记基因与目的基因独立分离, 从而选出无抗性标记基因的转基因植物^[11]。

本研究利用含有两套相互独立的 T-DNA 表达盒的共转化表达载体 pLIN61 转化大豆, 获得转基因当代(T_0 代)大豆植株 32 株(均含有抗性选择标记基因), 其中含有目的基因 D6D 的转基因当代大豆植株 18 株, 共转化频率为 56.25%, 实际转化率为 1.12%。这为筛选出目的基因与抗性选择标记基因相互分离的转基因后代奠定了基础。

参 考 文 献

- 1 Robert K. Furse, Ronald G. Rossetti, Christina M. Seiler, et al. Oral administration of gamma-linolenic acid, an unsaturated fatty acid with anti-inflammatory properties, modulates interleukin- β production by human monocytes[J]. *Journal of Clinical Immunology*, 2002, 22(2): 83-91.
- 2 Undurti N. Das. Abrupt and complete occlusion of tumor-feeding vessels by γ -linolenic acid[J]. *Nutrition*, 2002, 18(9): 767-771.
- 3 Maaike M. B. W. Dooper, Boet van Riel, Yvo M. F. Graus, et al. Dihomo- γ -linolenic acid inhibits tumour necrosis factor- α production by human leucocytes independently of cyclooxygenase activity[J]. *Immunology*, 2003, 110: 348-357.
- 4 Ajay Bakshi, Debabrata Mukherjee, Asha Bakshi, et al. γ -linolenic acid therapy of human gliomas[J]. *Nutrition*, 2003, 19(4): 305-309.
- 5 C. J. A. W. van Gool, M. P. A. Zeegers, C. Thijs. Oral essential fatty acid supplementation in atopic dermatitis - a meta-analysis of placebo-controlled trials[J]. *British Journal of Dermatology*, 2004, 150: 728-740.
- 6 Reddy A. S., Nuccio M. L., Gross L. M., et al. Isolation of a Δ^6 -desaturase gene from the cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC6803 by gain-of-function expression in *Anabaena* sp. strain PCC7120[J]. *Plant Mol Biol*, 1993, 27(7): 293-300.
- 7 Sayanova O., Smith M. A., Lapinskas P., et al. Expression of a borage desaturase cDNA containing an N-terminal cytochrome b5 domain results in the accumulation of high levels of Δ^6 -desaturated fatty acids in transgenic tobacco[J]. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 1997, 94: 4211-4216.
- 8 Deborah S. K., Jennifer M. T., Huang Y. S., et al. Identification of Δ^6 -desaturase from *Mortierella alpina* by heterologous expression in baker yeast and canola[J]. *J. Biol. Chem.*, 1998, 273(45): 29360-29366.
- 9 Tsunehiro A., Yayoi S., Katsuya I., et al. Molecular cloning and functional characterization of rat Δ^6 -fatty acid desaturases[J]. *Biochemical and Biophysical Research Communication*, 1999, 255: 575-579.

- 10 李明春, 卜云萍, 王广科, 等. 深黄被孢霉 Δ^6 - 脂肪酸脱氢酶基因在大豆中的表达[J]. 遗传学报, 2004, 31(8): 858 - 863.
- 11 Komai T., Hiei Y., Saito Y., et al. Vectors carrying two separate T - DNAs for co - transformation of higher plants mediated by *Agrobacterium tumefaciens* and segregation of transformants free from selection markers[J]. Plant J., 1996, 10(1): 165 - 174.
- 12 Holger Puchta. Removing selectable marker genes: taking short cut[J]. Trends in Plant Sci., 2000, 5(7): 273 - 274.
- 13 Elena Zubko, Charles Scutt, Peter Meyer. Intra - chromosomal recombination between attP regions as a tool to remove selectable marker genes from tobacco transgenes[J]. Nature Biotechnology, 2000, 18: 442 - 445.
- 14 张秀春, 林俊芳, 郭丽琼. Δ^6 - 脂肪酸脱氢酶基因克隆及其共转化表达载体的构建[J]. 热带作物学报, 2004, 25(4): 63 - 67.
- 15 AiQiu Xing, ZhangYuan Zhang, Shirley Sato, et al. The use of the two T - DNA binary system to derive marker - free transgenic soybeans. In Vitro Cell. Dev. Biol. - Plant, 2000, 36: 456 - 463.
- 16 Olhoft P. M., Lin K., Galbraith J., et al. The role of thiol compounds in increasing *Agrobacterium* - mediated transformation of soybean cotyledonary - nod cells. Plant Cell Report, 2001, 20: 731 - 737.

AGROBACTERIUM - MEDIATED TRANSFORMATION OF SOYBEAN WITH THE EXPRESSION VECTOR CARRYING TWO SEPARATE T - DNAs

Zhang Xiuchun¹ Gou Liqiong^{1,2 *} Wu Kunxin¹ Lin Junyang³ Lin Junfang^{1,2}

(1. State Key Laboratory of Tropical Crop Biotechnology, Chinese Academy of Tropical Agricultural Sciences. Haikou 571101; 2. Department of Bioengineering, College of Food Sciences, South China Agricultural University. Guangzhou 510640; 3. Putian City's Institute of Agricultural Sciences. Putian, 351100)

Abstract The co - transformation expression vector, pLIN61 carrying two separate T - DNAs with selectable marker gene and Δ^6 - desaturase gene was used to transform soybean cotyledonary nodes mediated by *Agrobacterium tumefaciens* strain EHA101. A batch of transgenic soybeans harboring Δ^6 - desaturase gene were obtained through Glufosinate screening. Research results demonstrate that the transformation efficiency, co - transformation frequency and real transformation frequency were 2.0%, 56.25% and 1.12% respectively. PCR detection and Southern analysis confirm that borage Δ^6 - desaturase gene was integrated into soybean genome. RT - PCR detection showed that borage Δ^6 - desaturase gene had expressed at transcriptional level in the transgenic soybeans.

Key words Co - transformation expression vector; Δ^6 - desaturase gene; Transgenic soybean