

基因枪对大豆进行 *PSY* 基因的转化研究^{*}

龚学臣¹ 季 静² 王 罡² 王 萍³

(1. 河北北方学院农业科学系, 张家口 075131; 2. 天津大学农业与生物工程学院, 天津 300072; 3. 淮海工学院海洋学院, 江苏连云港 222005)

摘要 以 3 个大豆品种的体细胞胚为受体, 以 *PSY* 为目的基因, 应用基因枪法对大豆进行了遗传转化, 实验结果表明: 不同大豆基因型的体细胞胚对抗性选择标记(Hyg)的敏感性存在极显著差异; 高渗处理的培养基加入 0.4mol/L 甘露醇有利于 *PSY* 基因的导入; 对已获得 10 株抗性再生苗, 经 PCR 和 PCR-Southern 分析鉴定, 有 4 株为阳性, 初步证明外源基因 *PSY* 已整合到大豆的基因组中。

关键词 基因枪; *PSY* 基因; 大豆; 体细胞胚; 遗传转化

中图分类号 S 565.1 文献标识码 A 文章编号 1000-9841(2006)02-0137-04

八氢番茄红素合成酶(Phytoene synthase, *PSY*)是类胡萝卜素生物合成过程中关键酶之一, 它催化 GGPP(牻牛儿基牻牛儿基焦磷酸)转变成类胡萝卜素合成途径上第一个类胡萝卜素分子-八氢番茄红素。许多研究表明该酶是类胡萝卜素合成的限速酶, 通过转化 *PSY*, 可以加速催化反应, 促进相应类胡萝卜素合成^[1~3]。

类胡萝卜素是一类营养元素, 有益于人类的健康, 增强人体免疫力, 延缓机体衰老, 预防癌症, 减少因缺乏维生素 A 而引起的夜盲症、幼儿弱视等一系列眼病^[4]。类胡萝卜素是脂溶性物质, 而且它的存在可有效地延缓植物油的氧化。如果能将类胡萝卜素合成酶基因导入大豆, 用来提高大豆类胡萝卜素的含量, 对提高大豆品质, 促进人类健康均具有十分重要的意义。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料、质粒和菌株

大豆品种(品系)吉林 30、九 9313、长农 9 的种子分别由吉林省农科院、吉林市农科院、长春市农科院提供。

利用上述大豆品种未成熟胚子叶诱导的体细胞胚作为遗传转化的外植体。三个大豆品种(品系)的体细胞胚由原军需大学植物分子生物学实验室提供。

根癌农杆菌 EHA101 和来自枸杞的 *PSY* (1.3kb)基因由季静教授提供, 质粒 pEbisPSYHyg 上构建有目的基因 *PSY* 和植物抗性筛选标记潮霉素磷酸转移酶基因 *Hpt*。

1.1.2 主要仪器与试剂

美国产 Bio-Rad PDS1000/He 基因枪、法国产 UNOH Biometra DNA 扩增仪、日本产 KUBOTA 7930 高速冷冻离心机、上海产 THZ-82A 恒温水浴摇床、江苏产 DY-3A 型电泳仪、美国产凝胶成像系统。Taq DNA 聚合酶、SDS、DNA 回收试剂盒、潮霉素(Hyg)、卡那霉素(Kan)、壮观霉素(Spec)和头孢霉素(Cef)购自北京鼎国公司, 蛋白胨、酵母提取物购自 Oxoid 公司, 乙酰丁香酮(AS)购自北京五洲东方科技发展有限公司东北代表处, 激素类及其它化学试剂等均购自长春金鑫公司, 为分析纯。

1.1.3 培养基

大豆体细胞胚基因枪法遗传转化各时期所用培养基见表 1。

1.2 方法

1.2.1 基因枪轰击大豆体细胞胚的遗传转化

* 收稿日期: 2005-09-21

项目来源: “国家植物转基因技术研究开发与中试基地建设”专项课题(项目编号 J99-B-001)

作者简介: 龚学臣(1963-), 男, 硕士, 副教授, 研究方向植物基因工程。E-mail: gxc2004@yeah.net

通讯作者: 季静, 教授。

表1 大豆体细胞胚基因枪法遗传转化培养基
Table 1 Medium of tissue culture and transformation for somatic embryo of soybean by particle bombardment

培养基 Medium	组成成分 Composition	pH 值 pH - value
继代培养基	MS+10~20mg/L 2, 4-D	5.8
继代筛选培养基	继代培养基+ 20~25mg/L Hyg	5.8
萌发培养基I	MS+10%蔗糖+0.5~1% 活性炭+15mg/L Hyg	5.8
萌发培养基II	MS+0.5~1.0mg/L GA ₃ +10mg/L Hyg	5.8
壮苗培养基	MS+3%葡萄糖	7.0
成苗培养基	1/2 MS+2 倍铁盐	7.0

1.2.1.1 受体材料的预处理

在超净工作台上将大豆体细胞胚摆放在高渗培养基(MS+0.4mol/L 甘露醇)平皿中央,成圆形,直径2cm左右,培养4~6h。

1.2.1.2 微弹的制备

质粒DNA的大量提取与纯化、金粉包弹等都是按照王关林《植物基因工程》^[3]的方法进行。

1.2.1.3 基因枪轰击

以吉林30、九9313、长农9的大豆体细胞胚为受体,以pEbisPSYHyg质粒为供体,进行基因枪轰击遗传转化。轰击过程按Bio-Rad PDS000/He基因枪使用说明书进行,真空度26~30英寸汞柱,气压为1000~1100 Psi,轰击距为9cm,每皿轰击一次。

1.2.1.4 转化体的筛选及植株再生

轰击后的大豆体细胞胚于25℃暗培养2d,转至继代培养基上恢复培养一周,然后转到筛选培养基;4周后再转移至萌发培养基I,15~20d后,转接到萌发培养基II继代2次(30~40d);最后转入壮苗培养基,直至获得转化苗。培养温度为25±1℃,光照16h,光强3000lx。

基因枪轰击大豆体细胞胚遗传转化的步骤为:体细胞胚继代→高渗培养→基因枪轰击→继代筛选→萌发→芽诱导→生根培养→移栽→检测

1.2.2 大豆体细胞胚抗性选择标记(Hyg)适宜浓度的确定

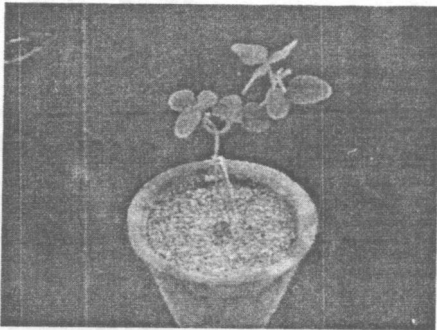
将经继代增殖的吉林30、九9313、长农9体细胞胚,接种到含潮霉素(Hyg)分别为0、5、10、15、20、25mg/L的继代培养基上培养,每一处理接种体细胞胚30~40块,各处理重复3次。4周后调查体细胞胚的褐化情况。大豆体细胞胚褐化率=(体细胞胚的褐化数/体细胞胚的接种数)×100%。

1.2.3 不同高渗培养基对基因枪轰击大豆体细胞胚遗传转化的影响
设三种不同高渗培养基,分别为继代培养基+0.4mol/L甘露醇;继代培养基+0.2mol/L甘露醇+0.2mol/L山梨醇;继代培养基+0.4mol/L山梨醇。以吉林30的体细胞胚为受体,以pEbisPSYHyg质粒为供体,进行基因枪轰击遗传转化。高渗培养时间4~6h,基因枪轰击参数参见1.2.1.3,4周后调查体细胞胚的褐化情况。体细胞胚抗性率(%)=(未褐化的体细胞胚数/体细胞胚的接种数)×100%。

2 结果与分析

2.1 抗性选择标记(Hyg)适宜浓度的确定

以吉林30、九9313、长农9继代的体细胞胚为材料,进行潮霉素敏感性试验。结果见图1,方差分析结果见表2。大豆体细胞胚褐化率=(体细胞胚的褐化数/体细胞胚的接种数)×100%。



版图1 大豆转化抗性再生苗

图1 潮霉素对大豆体细胞胚褐化率的影响

Fig. 1 The effect of hyfromycin on frequency of browning in somatic embryo of soybean

表2 潮霉素对大豆体细胞胚褐化率的方差分析

Table 2 The variance analysis of hyfromycin on frequency of browning in somatic embryo of soybean

变异来源 Source	平方和 SS	自由度 DF	均方 MS	F 值 F - value	F _{0.05}	F _{0.01}
重复	0.004	2	0.002	<1	3.21	5.12
基因型	0.241	2	0.120	10.88 **	3.21	5.12
Hyg 浓度	16.633	5	3.327	300.80 **	2.43	3.46
误差	0.487	44	0.011			

注:“ ** ”在0.01水平上显著(“ ** ”Significant at 0.01 level)

由图1及表2可知,不同大豆基因型间体细胞胚对潮霉素的敏感性存在极显著差异。潮霉素浓度在20mg/L时,体细胞胚的褐化率吉林30为

96.7%, 长农 9 和九 9313 低于 85%; 潮霉素浓度在 25mg/L 时, 体细胞胚的褐化率吉林 30 为 100%, 长农 9 和九 9313 在 98.9% 以上。因此, 吉林 30 的筛选压力, 选取潮霉素浓度为 20mg/L, 而九 9313 和长农 9 选取潮霉素浓度为 25mg/L。

2.2 不同高渗培养基对基因枪轰击大豆体细胞胚遗传转化的影响

甘露醇和山梨醇可以调节植物细胞的渗透压, 在基因枪转化中这两种物质都在使用, 但哪一种对大豆体细胞胚性组织细胞的调节作用如何, 还未见报道。本试验对这两种物质在基因枪遗传转化中的作用做了比较, 试验结果表明浓度为 0.4mol/L 甘露醇的高渗处理效果最好, 其体细胞胚抗性率为 50.0%, 0.2mol/L 甘露醇+0.2mol/L 山梨醇处理使用效果次之, 其体细胞胚抗性率为 45.0%, 0.4mol/L 山梨醇高渗处理的效果最差, 其体细胞胚抗性率为 33.3%。

2.3 大豆抗性苗的 PCR 与 PCR-Southern 检测

以吉林 30、九 9313、长农 9 三个大豆品种未成熟子叶诱导的体细胞胚为受体, 利用基因枪进行 *PSY* 基因的遗传转化, 经芽诱导、壮苗培养及潮霉

素筛选获得了 10 株抗性再生苗。其中吉林 30 2 株, 九 9313 5 株, 长农 9 3 株(图 1)。

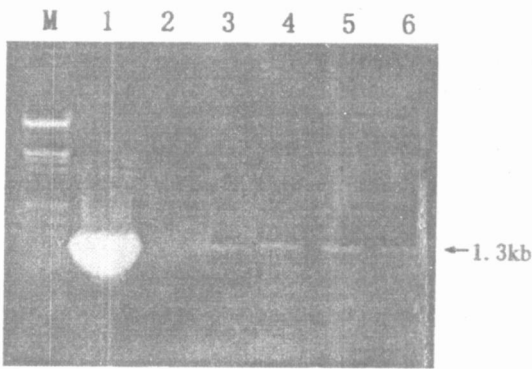


图 2 大豆转化抗性再生苗

Fig. 2 The resistant regenerated plants of transformed soybean

从大豆抗性苗和未转化对照苗叶片提取总 DNA 作为模板进行 PCR 扩增, 未转化株为阴性对照, 含目的基因的质粒为阳性对照。电泳结果表明(图 2), 抗性株和质粒都在 1.3kb 附近扩增出特异条带, 而阴性对照株却未扩增出相应的特异条带, 由此初步说明, 目的基因 *PSY* 已转入大豆细胞内。

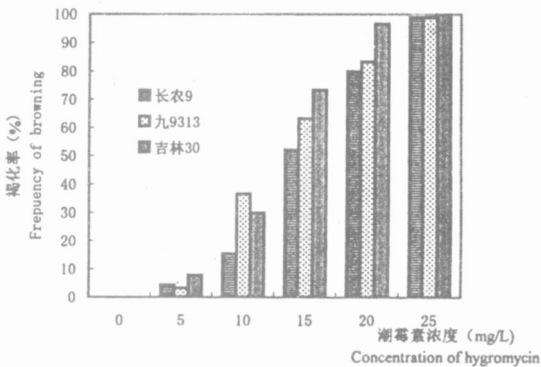
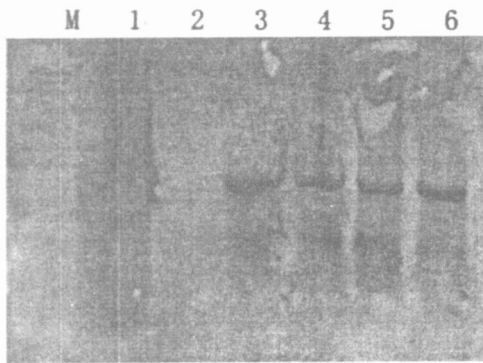


图 3 大豆体细胞胚遗传转化的 PCR 检测

M: λ DNA/EcoRI+HindIII 1: 阳性质粒 pEbisPS YH yg 2: 未转化株 3~6: 转化株

Fig. 3 PCR detection of transformed soybean

M: λ DNA/EcoRI+HindIII 1: Positive control; 2: Untransformed plant; 3~6: Transformed plant

图 4 大豆体细胞胚转化体的 PCR-Southern 检测

M: λ DNA/EcoRI+HindIII 1: 阳性质粒 pEbisPS YH yg; 2: 未转化株; 3~6: 转化株

Fig. 4 PCR-Southern detection of transformed soybean

M: λ DNA/EcoRI+HindIII 1: Positive control; 2: Untransformed plant; 3~6: Transformed plant

基因枪轰击大豆体细胞胚的遗传转化共获得 4 株 PCR 阳性苗, 其中吉林 30 1 株、九 9313 2 株、长农 9 1 株, PCR 阳性率吉林 30 为 50.0%、九 9313 为 40.0%、长农 9 为 33.3%。

对大豆抗性苗进行的 PCR-Southern 杂交结果见图 3。结果表明 PCR 阳性株 DNA 扩增片段与质粒 DNA 扩增特异片段有杂交信号, 且处于同一

位置, 而阴性对照植株则没有杂交信号, 说明被检测阳性株扩增出的 PCR 条带确实为特异性的目标带, 证明 *PSY* 基因确实已整合进大豆再生植株基因组中。

3 讨论

3.1 潮霉素筛选压力试验表明, 大豆体细胞胚筛选

剂潮霉素的适宜浓度吉林 30 为 20mg/L Hyg, 九 9313 和长农 9 为 25mg/L。基因枪轰击大豆体细胞胚, 经潮霉素筛选, 获得了 10 株抗性再生苗。其中吉林 30 2 株, 九 9313 5 株, 长农 9 3 株。经 PCR、PCR – Southern 检测, 获得了 4 株转 *PSY* 基因的大豆苗。

3.2 大豆体细胞胚在进行基因枪轰击时, 高渗处理的培养基加入 0.4mol/L 甘露醇有利于目的基因的导入。在对受体材料进行基因枪轰击时, 预培养、轰击前后的高渗处理, 都可以提高基因枪的转化频率。Vain 等(1993)在玉米胚性细胞^[6]、梁辉等(1989)^[7]在小麦幼胚的基因枪转化研究结果表明, 轰击前用 0.4mol/L ~ 0.5mol/L 甘露醇高渗处理 4 ~ 6h, 轰击后高渗处理 16 ~ 18h, 可显著提高目的基因的表达。陶利珍等(2000)在籼稻、王萍等(2002)^[8]在大豆未成熟子叶基因枪转化中得到与 Vain 等相同的结论, 而且, 还证明了高渗透压的预处理和后处理有协同增效的作用, 只做预处理不做后处理, *GUS* 基因瞬时表达明显降低。本试验研究表明, 高渗处理可以提高大豆体细胞胚的转化效率, 而且用 0.4mol/L 的甘露醇优于用 0.4mol/L 的山梨醇。

3.3 目前, 用于基因枪转化的受体材料十分广泛, 几乎包括所有具有分化能力的细胞或组织, 如: 幼叶、幼胚、幼茎、花粉粒、愈伤组织、胚性组织、成熟胚、悬浮细胞、原生质体等, 在不同作物中, 各种受体都有转化成功的例子。体细胞胚是由具有卵细胞特征的胚性细胞发育而来的, 这些胚性细胞具有很强的接受外源基因的特性, 而且由于胚状体多为单细胞起源, 遗传背景较一致, 无性系变异小, 转化后得

到的嵌合体较少, 是基因转化理想的感受态细胞, 更是基因枪法很好的转化材料。本研究以大豆体细胞胚为受体, 通过基因枪轰击进行的遗传转化, 获得了转化苗。

3.4 通过体细胞胚胎发生得到的再生苗, 在成苗培养基上根易生长, 但难的是保根。这种根在继代时易折断。因此, 我们在继代时应特别小心, 同时适当延长继代时间。如果初生根被折断, 应尽快转到加 0.5 ~ 1.0mg/L IBA 的 1/2MS 的生根培养基中, 诱导再生根。

参 考 文 献

- 1 徐昌杰, 张上隆. 植物类胡萝卜素的生物合成及其调控[J]. 植物生理学通讯, 2000, 36(1): 64 – 70
- 2 陈选阳, 郑金贵, 袁照年. 类胡萝卜素生物合成代谢工程研究进展[J]. 福建农林大学学报(自然科学版), 2003, 32(3): 348 – 352
- 3 Shewmaker C K, Sheehy J A, Daley M. Seed specific over expression of phytoene synthase: increase in carotenoids and other metabolic effects[J]. Plant Journal, 1999, 20(4): 401 – 412
- 4 韩雅珊. 类胡萝卜素的功能研究进展[J]. 中国农业大学学报, 1999, 4(1): 5 – 9
- 5 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 498 – 500
- 6 Vain P. Osmotic treatment enhances particle mediated transient and stable transformation of maize[J]. Plant cell Rep, 1993, 12(2): 84 – 88
- 7 梁辉, 唐顺学, 张弛, 等. 提高小麦基因枪法转化频率的研究[J]. 遗传学报, 1998, 25(5): 443 – 448
- 8 王萍, 王罡, 吴颖, 等. 影响大豆基因枪遗传转化因子的研究[J]. 农业生物技术学报, 2002, 10(3): 66 – 67

GENETIC TRANSFORMATION OF *PSY* INTO SOYBEAN BY PARTICLE BOMBARDMENT

Gong Xuechen¹ Ji Jing² Wang Gang³ Wang Ping¹

(1. Hebei North University, Zhangjiakou, 075131; 2. Tianjin University, Tianjin, 300072;
3. Huaihai Institute of Technology, Marine School, Lianyungang, 222005)

Abstract Using somatic embryogenesis of three varieties of soybean as acceptor, *PSY* gene were transformed into soybean via particle bombardment. The results showed: the sensitivity of somatic embryo of soybean with different genotypes to resistance selective marker (Hyg) is significantly different; high osmotic pressure medium with 0.4mol/L mannitol was beneficial for the transformation of target gene. 10 resistant regenerated plants were obtained from the three varieties, 4 plants gave positive reaction in PCR and PCR – Southern analysis from the gene transferred plants, indicating that *PSY* has been transferred into genome of soybean.

Key words Particle bombardment; *PSY* gene; Soybean; Somatic embryogenesis; Genetic Transformation