利用卡那霉素对花粉管通道法转基因大豆的筛选研究*

徐鹏飞[1]　张淑珍[1]　吴俊江[2]　韩英鹏[1]　张大勇[1]　李文滨[1]　杨传平[3]

(1. 东北农业大学大豆研究所教育部大豆生物学重点实验室,哈尔滨 150030;
2. 黑龙江省农业科学院,哈尔滨 150086;
3. 东北林业大学,哈尔滨 150040)

摘要　用卡那霉素对花粉管通道法获得的东农46转化当代种子进行初步筛选,结果表明:400ppm卡那霉素能有效抑制非转化大豆植株的正常生长;经Gus染色和PCR检测,从中可以筛选到阳性植株。可见,用此法对转化植株进行初步筛选是经济有效的。

关键词　大豆;花粉管通道法;卡那霉素

中图分类号　S 565.1　　文献标识码　A　　文章编号　1000-9841(2006)03-0275-04

花粉管通道法由于其具有简便易行、避免植株再生障碍的优点,在公认的难转化作物大豆中有着较为广泛的应用。但该法获得的大量后代种子的检测费时费力。卡那霉素抗性是目前农杆菌介导外源基因最为广泛的筛选标记,周思军(2000年)[1]用Gus染色和PCR结合的方法对花粉管通道法转化获得的大豆种子进行过筛选,虽然有一定简化,但仍然是一项复杂、昂贵的工作。

本研究用卡那霉素对带有*NPTII*标记基因的花粉管通道法转化后代进行初步筛选:在附加有适宜浓度卡那霉素的MS培养基上萌发的方法快速地初筛出转基因植株。再结合Gus染色和PCR扩增技术进一步筛选确认转基因大豆。目的是进一步简化由花粉管通道法获得的大量种子中转化株的筛选工作,使其在难转化作物大豆的应用上有着更加实际的意义。

1　材料与方法

1.1　材料

1.1.1　东农46未转化大豆种子及花粉管通道法获得的转基因T_0代大豆种子。

1.1.2　质粒:PGBI121S4ABC(由中国农业科学院郭三堆实验室构建),含有*Bt*、*CPTI*双价抗虫基因,以及*GUS*和*NPTII*选择标记基因。

1.2　方法

1.2.1　花粉管通道法转化抗虫基因

1.2.1.1　质粒DNA的提取

由携带pBGI121S4ABC质粒的DH5α大肠杆菌中提取质粒,电泳及酶切检测。结合电泳估算质粒浓度。

1.2.1.2　外源基因导入

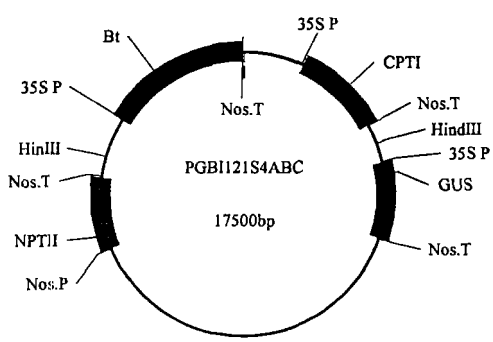

图1　pGBI121S4ABC质粒图谱

Fig. 1　Map of plasmid pGBI121S4ABC

在东农46的大豆盛花期,选择开花前花冠比最高花萼高出1~2mm的花(雷勃钧,1991)[2]或刚刚

* 收稿日期:2005-10-12
基金项目:黑龙江省博士后基金(LBR00092)和黑龙江省科技厅重点项目"大豆马铃薯抗病抗虫基因导入的研究"资助
作者简介:徐鹏飞(1980-),男,硕士研究生,研究方向:大豆遗传育种。
通讯作者:张淑珍,E-mail:dnzhshzh@yahoo.com.cn

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

开过的花，去掉花瓣，用刀片切去柱头，用注射器将质粒 DNA 溶液推入由花粉围成的空腔内，使 DNA 溶液完全浸没子房并在其上方形成一个液滴。将其它非导入的花去净，在下一节上挂牌注明导入的内容和操作的日期。定期检查并去掉同一节上长出的新花蕾。秋后按组合收获导入当代(T_0) 的种子。

1.2.2 卡那霉素对未转化大豆生长的抑制及筛选试验研究

参照袁鹰等(2003)[3] 的试验设计，首先进行未转基因大豆种子的卡那霉素适宜浓度筛选试验：取未转化的东农 46 的种子经消毒后分别在附加有卡那霉素浓度为 0、200、300、400、500mg /L 的 MS 培养基上萌发，15d 后取出，观察生根情况。为确保试验的准确性每次试验重复 3 次，每组材料取 30 粒种子进行处理，每组设 1 个对照。以确定卡那霉素对大豆生长抑制的适宜浓度。

1.2.3 卡那霉素对转化大豆的筛选

取花粉管通道法获得的东农 46 转化当代大豆种子在含适宜浓度卡那霉素的 MS 培养基上萌发，15 天后观察。

1.2.4 卡那霉素初筛苗叶片的 *Gus* 染色

取卡那霉素初筛到的植株苗的叶片，用刀片切成薄片放入 0.5 微量离心管内，加入固定 buffer 固定 30min；去掉固定液加入适量 X - Gluc buffer，37 ℃过夜；然后用 95 %酒精脱去叶绿素，最后放入 70%酒精中，找出阳性株。

1.2.5 PCR 检测

1.2.5.1 叶片 DNA 的提取

SDS 法制备植物基因组 DNA，参照《分子克隆实验指南》[4]。

1.2.5.2 PCR 扩增

NPTII 基因的特异 (大连宝生物工程公司合成) 引物 I 序列为：5' GATGGATTGCACGCAGGT3'

引物 11 序列为：5' TCAGAAGAACTCGTCAAG3'

PCR 反应体系

10 XBuffer(MgCl220 mM)(2.5 μl)；dNTP(2.0 μl)；Taq 酶(2U /μl)(1.0μl)；引物 I(1.0μl)；引物 11(1.0μl)；ddH_2O(16.5μl)；模板 DNA 1.0μl)；总反应体积为 25 μl。

PCR 反应程序

94 ℃变性 3 min；94 ℃变性 1 min；55 ℃退火 1 min；72 ℃延伸 1 min；72 ℃延伸 5 min；4 ℃保温。35 个循环。

1.2.5.3 PCR 产物检测

取 5 ~ 10μl PCR 扩增产物于 1%琼脂糖凝胶电泳，以 DL2000 DNA 分子为标准分子量，电泳结果在 Blo RAD 凝胶成相系统分析并打印。

1.2.5.4 PCR - Southern 杂交

参照《分子克隆实验指导》[4]。

2 结果与分析

2.1 质粒的提取及酶切验证

从图 2 和 3(图中 M 为入 EcoT14 I)可以看出，从 DH5α 中提取的质粒质量完好，酶切成 12.8kb 和 4.7kb 两个片段，证明携带着 pBGI121S4ABC 质粒，可以用于遗传转化。参照周思军博士论文(2000)[1]，将质粒用无菌水将浓度调整到 100 ~ 300ng/L 备用。

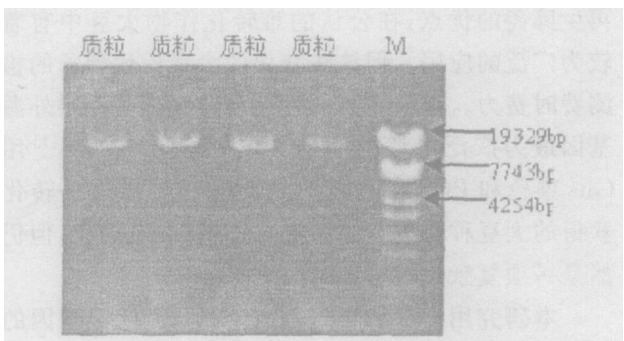

图 2 DH5α 所含质粒

Fig. 2 The plasmid in DH5α

2.2 卡那霉素对未转化大豆东农 46 生长的抑制及筛选试验研究

由表 2 可以看出：随着处理种子卡那霉素浓度的增加，东农 46 生根受到了抑制。在卡那霉素浓度为 300mg /L 时，东农 46 只有 3.3 %的正常植株，其余的种子刚刚萌发根尖长至 1 ~ 2cm 时就变黑死亡；在卡那霉素浓度为 400 和 500mg /L 时，没有一粒种子萌发。因此，本试验采用 400mg /L 的卡那霉素作为萌发试验的临界浓度。

2.2 卡那霉素对花粉管通道法转化获得的东农 46 T_0 代种子的初步筛选

花粉管通道法转化获得的 1200 个大豆荚，各取一粒种子，共计 1200 粒，在含 400mg/L 浓度的 MS 培养基上萌发，15d 后观察，共获得 12 株生长正常植株。

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net

表 2　卡那霉素(Km)对东农 46 大豆根系生长的抑制

Table 2　Inhibition of Km on root regeneration of soybean Dongnong 46

基因型 Genotype	Km(ppm) Concentration of Km (ppm)	种子数量 No. of seeds	正常植株数 Normal Plants	主根长 (cm) Taproot length	侧根数 No. of fiber	无侧根的直根数 No. of plants without fiber	正常植株百分比(%) Rate of normal plants(%)
东农 46	0	30	30	5.7	15.8	0	100
Dongnong46	200	30	13	5.5	7.5	6.7	43.3
300	30	1	2.8	5.6	4	3.3	
400	30	0	0	0	2	0	
500	30	0	0	0	0	0	

2.3　*Gus* 染色

取卡那霉素初步筛选得到的 12 株植株幼苗叶片,经 *Gus* 染色,共获得 3 株阳性植株。

2.4　PCR 扩增和 PCR – Southern 杂交检测

取 *Gus* 染色阳性植株的幼嫩叶片,经 PCR 扩增和 PCR – Southern 杂交检测,有 2 株为携带有目的基因片段的阳性单株。同时观察到卡那霉素抗性苗的发根数、根系长度与对照无显著差异,表明 400mg/L 卡那霉素能有效抑制东农 46 非转化体幼苗的生长,用其对东农 46 大豆转基因后代进行筛选是完全可行的。

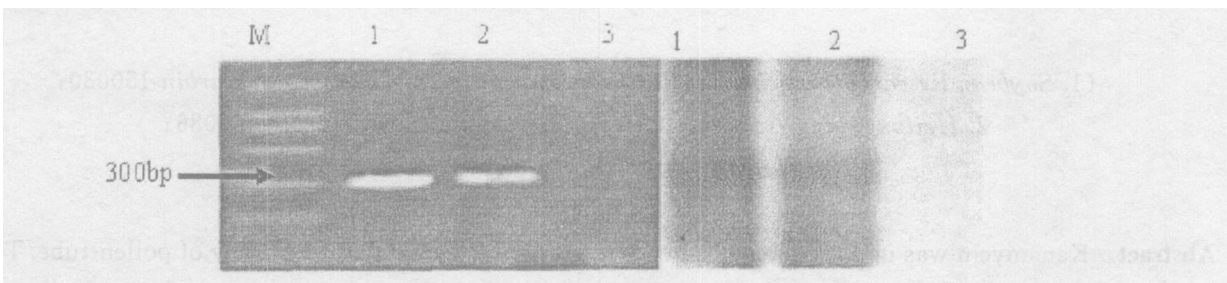

图 3　东农 46 转化植株 PCR 扩增和 PCR Southern 杂交(*NPTII*)

Fig. 3　PCR amplification and PCR – Southern hybridization of Dongnong 46

注: M 为 DL2000, 泳道 1, 2, 3 分别为转化阳性植株和阴性植株

Notation: M is marker of DL2000. Lane 1, 2 and 3 are positive transformation plants and negative transformation plant

3　结论与讨论

3.1　卡那霉素筛选抗性植株的机理

卡那霉素属于氨基糖苷类抗生素,其毒性机理是与植物细胞器叶绿体和线粒体中的核糖体 30S 亚基结合,从而阻止翻译过程干扰蛋白质的合成,导致细胞死亡。而转化细胞获得了对抗生素的抗性,在一定浓度的选择性抗生素的选择培养基上存活下来,而非转化的细胞因不含该抗性基因而被抑制或杀死。

由于本试验中转化所用质粒含有 *NptII* 基因,转化植株对该抗生素具有一定的抗性。但卡那霉素的浓度因不同物种和不同基因型而异。既能有效地抑制非转化细胞的生长,使之缓慢地死亡又不影响转化细胞的正常生长较为适宜。本实验中适合东农 46 转化株的筛选浓度为 400mg/L。

3.2　花粉管通道法在大豆遗传转化中的应用及卡那霉素在转化后代中筛选阳性株的应用

花粉管通道法即指是利用花粉管通道导入外源 DNA 的技术,利用植物受粉后花粉萌发,花粉管穿过花柱进入子房所形成的通道,将外源 DNA 导入受体胚囊转化受体合子胚的方法。它是由周光宇在 80 年代建立并在长期科学研究中发展起来的。利用花粉管通道法进行植物遗传转化,避免了植株再生的障碍,简便易行。由于其特有的优点,在公认的难转化作物大豆中有着较为广泛的应用,并取得了成功[5~7]。

但从转化获得的大量种子中筛选阳性植株是一项费时、费力的工作。卡那霉素对人畜和环境无害,且价格低廉,是转基因植物研究中应用最广泛的筛选试剂。本研究用卡那霉素筛选东农 46 花粉管通道法转化当代种子,结果表明,含 400mg/L 卡那霉素的 MS 培养基能有效抑制非转化大豆的萌发。经

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved.　http://www.cnki.net

Gus 染色和 PCR 检测，从 1200 粒转化当代种子中可以筛选到 2 株阳性植株，表明 400ppm 卡那霉素能有效抑制东农 46 非转化体幼苗的生长，用其对东农 46 大豆转基因后代进行筛选是完全可行的，同时还可以大大提高花粉管通道法转化当代种子筛选工作效率。

参 考 文 献

1 周思君. 大豆抗虫基因转移及其转化系统优化研究[D]. 东北农业大学博士论文, 2000. 1.

2 雷勃钧. 外源 DNA 直接导入大豆的研究[J]. 大豆科学, 1991, 10(1): 58 – 63.

3 袁鹰, 刘德璞, 王玉民, 等. 卡那霉素对大豆生长的抑制及筛选试验研究[J]. 大豆科学, 2003, (4): 62 – 67.

4 黄培堂译《分子克隆实验指南》[M]. 北京: 科学出版社.

5 胡张华, 黄锐之, 刘智宏, 等. 利用花粉管导入法获得转反义 PEP 基因大豆植株[J]. 浙江农业学报. 1999, 11(2): 99 – 100.

6 雷勃钧, 尹光初, 王树林, 等. 外源野生大豆 DNA 导入栽培大豆引起的变异[J]. 中国油料, 1989, 3: 11 – 14.

7 徐香玲, 邹联沛, 刘伟华, 等. 向大豆导入几丁质酶基因的初步研究[J]. 大豆科学, 1999, 18(2): 101 – 108.

THE STUDY ON THE SCREENING OF TRANSGENE SOYBEAN BY WAY OF POLLEN TUBE USING KANAMYCIN

Xu Pengfei[1] Zhang Shuzhen[1] Wu Junjiang[2] Han Yingpeng[1] Zhang Dayong[1]
Li Wenbin[1] Yang Chuanping[3]

(1. *Soybean Research Institute of Northeast Agricultural University*, *Harbin* 150030;
2. *Heilongjiang Acadeng of Agricultural Sciences*, *Harbin* 150086;
3. *North east Forestry University*, *Harbin* 150040)

Abstract Kanamycin was used to screen T_0 seeds of transgene Dongnong 46 by way of pollen tube. The results showed that 400ppm kanamycin could inhibit growth of non transgene plants, and positive plants could be gotten using *Gus* and PCR detection. It was proved that this method wa economic and effective in screening the transgene plants.

Key words Soybean; Pollen tube way; Kanamycin

(上接第 274 页)

from a cross between Hefeng 25, a soybean cultivar with normal linolenic content, and L – 14, a soybean mutant line with only 3% linolenic acid, were used to screen over 500 SSR markers. A total of 90 SSR markers were distributed in twenty linkage groups developed by Cregan et al. (1999). QTL analysis showed that three SSR markers Satt066、Satt424 、Satt476 were relevant to low linolenic acid, whih were distributed in three linkage groups: MLG B2、MLG A2、MLG C1, respectively. The three QTLs accounted for 8.7% 、4.99% and 5.3% of the phenotypic variation in linolenic acid level in this population, respectively. These markers have been tested on F_3 generation.

Key words Soybean; Linolenic acid content; SSR marker; QTL

?1994-2016 China Academic Journal Electronic Publishing House. All rights reserved. http://www.cnki.net