

# 用基因枪法将 *Bt* 基因转入大豆的研究

王晓春<sup>1</sup>, 王 罡<sup>2</sup>, 季 静<sup>2</sup>, 王 萍<sup>2</sup>

(1. 河北北方学院农业科学系, 宣化 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, 连云港 222005)

**摘要** 以大豆品种合丰 25 的体细胞胚为受体, 以 *Bt* 基因为目的基因, 应用基因枪法进行了遗传转化, 经体细胞胚萌发、生根及壮苗培养和卡那霉素选择培养, 获得了完整的抗性再生苗, 经 PCR、PCR-Southern 和点杂交分析鉴定, 初步证明外源基因 *Bt* 已整合到大豆的基因组中。

**关键词** 基因枪; *Bt* 基因; 大豆; 体细胞胚; 遗传转化

**中图分类号** S565.103.53 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)02-0140-04

## PUT *BT* GENE TRANSFORMATION INTO *SMATIC* VIA MICROPROJECTILE BOMBARDMENT

WANG Xiao-chun<sup>1</sup>, WANG Gang<sup>2</sup>, JI Jing<sup>2</sup>, WANG Ping<sup>3</sup>

(1. Department of Agriculture Sciences of Hebei North University, Xuanhua 075131; 2. Tianjin University of Agricultural and Biological Engineering, Tianjin 300072; 3. Huahai Institute of Technology, Marine School, Lianyungang, 222005)

**Abstract** The Somatic embryo of soybean Hefeng 25 were transformed by microprojectile bombardment. The resistant plants to kanamycin were obtained, two positive plants were obtained among them by PCR, and the positive plantlets were further analyzed by dot blotting and PCR-Southern blotting. The results demonstrated that the target *Bt* gene had been transformed into the soybean genome.

**Key words** Soybean; Somatic embryos; *Bt* gene; Genetic transformation

长期以来, 虫害一直是制约大豆高产、稳产、优质的重要因素, 尤其是食心虫每年给大豆生产造成的损失在 10% ~ 15%。随着基因工程的发展, 通过转基因技术将抗虫基因转入大豆, 可能成为提高大豆产量和改善品质的有效途径之一。*Bt* 毒蛋白基因是苏云金芽孢杆菌 (*Bacillus thuringiensis*, *Bt*) 晶体蛋白的简称, 该晶体对鳞翅目、双翅目、鞘翅目的昆虫都有毒杀作用, 而对人、畜、哺乳动物和天敌无害, 是目前使用最广泛的生物杀虫剂<sup>[1,2]</sup>。自从

1987 年康奈尔大学的 Sanford 等人用基因枪转化洋葱表皮细胞获得成功后, 这一技术很快被用来转化其他一系列对农杆菌不敏感的物种和基因型, 1988 年, McCabe 等<sup>[3]</sup>用此法获得转基因大豆植株以来, 已经成为大豆转化的常规技术。大豆遗传转化所用的材料多种多样, 其中体细胞胚团是胚性细胞团, 可以长期继代增殖, 具有两极性等优点, 是基因枪和农杆菌转化的理想的靶组织 (Sato, 1993)<sup>[4]</sup>。Stewart 等 (1996 年)<sup>[5]</sup>用合成的 *Bt* (CryIAC) 基因, 通过基

收稿日期: 2006-11-14

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

作者简介: 王晓春 (1972—), 女, 讲师, 硕士, 主要从事作物栽培与遗传育种工作。Tel: 0313-2111778

通讯作者: 王罡教授, 博士生导师。

因枪轰击悬浮培养的球形体细胞胚,经过潮霉素筛选获得 3 个转基因株系;Parrott 等(1992)用携带 *Bt* 和 *CpTI* 基因微弹轰击各种基因型的大豆品种的胚性悬浮系,得到三个转基因大豆细胞系,已经得到再生植株;Maughan 等(1999 年)用基因枪法首次轰击固体培养的大豆体细胞胚,将牛酪蛋白基因转入大豆,获得可育转基因植株。本研究以固体培养的大豆体细胞胚为受体,以 *Bt* 基因为目的基因,应用基因枪法对大豆进行了遗传转化,为大豆基因工程育种提供理论依据和指导。

1 材料与方法

1.1 材料

1.1.1 植物材料、质粒和菌株 萌发率和再生率较高的大豆品种合丰 25<sup>[7]</sup>的体细胞胚块,由军需大学植物基因工程实验室提供。质粒为双元载体 pG-BI121S4ABC,由中国农业科学院生物技术研究中心郭三堆实验室构建和提供,含有 *Bt* 基因和 *CpTI* 基因、*NPT* II 基因、*Gus* 基因,启动子分别为 35S、35S、NOS 和 35S。

1.1.2 培养基 组织培养及基因枪转化用培养基见表 1。

表 1 组织培养及基因枪转化用培养基

培养基 Medium	组成成分 Composition	pH 值 (pH value)
继代培养基 Subculture	MS + 10 - 20 mg/12,4 - D	5.8
高渗培养基 Hypnotoxin	继代培养基 + 0.4 mol/L 甘露醇	5.8
筛选培养基 Ridding	继代培养基 + 卡那霉素(50 mg/L)	5.8
萌发培养基 1 Germination 1	MS + 1% 活性炭 + 10% 蔗糖	5.8
萌发培养基 2 Germination 2	MS + 10% 蔗糖	5.8
壮苗培养基 Optimization root	MS + 3% 葡萄糖	7

1.1.3 主要仪器设备与生化试剂 美国产 Bio - Rad PDS1000/He 基因枪、宁波 RXZ 型智能人工气候箱、日本超低温冰柜、日本 KUBOTA - 7930 高速离心机、德国 UNO II 型 PCR 仪,Gluc、溶菌酶购自 TaKaRa 宝生物工程公司,蛋白胨、酵母购自 Oxoid

公司,亚精胺购自 Sigma 公司,Taq 聚合酶和引物、DNA 聚合酶、SDS、DNA 回收试剂盒及植物基因组 DNA 提取试剂盒购自北京鼎国公司,Hind III 购自 TAKARA 宝生物工程(大连)有限公司,激素类和其他化学试剂均购自长春金鑫公司,N<sup>+</sup> 尼龙膜购自 Amersham pharmacia 公司。

1.2 方法

1.2.1 筛选剂卡那霉素浓度的确定 选用五个基因型大豆的体细胞胚团块,确定选择剂卡那霉素适宜的筛选浓度。卡那霉素浓度设 7 个浓度水平:分别为 0、12.5、25、50、100、200、400 mg/L。大豆的体细胞胚团块不经过农杆菌侵染,直接接种到含有不同浓度的选择剂的继代培养基上,每 15 ~ 20 D 转接一次,1 ~ 2 个月以后,调查结果。

1.2.2 用基因枪法转化大豆体细胞胚

1.2.2.1 微弹的制备 质粒 DNA 的大量提取与纯化、金粉包弹等按照王关林<sup>[6]</sup>《植物基因工程》的方法进行。

1.2.2.2 基因枪轰击 在超净工作台上将大豆体细胞胚团块摆放在高渗培养基平皿中央,每皿约 50 块,摆放成直径 2 cm 圆形,轰击前暗处理 4 h。轰击过程按照 Bio - Rad PDS000/He 基因枪使用说明书进行。真空度 26 - 30 英寸汞柱,轰击距离 6 cm, CaCl<sub>2</sub> 浓度 2.5 mol/L,氦气压力 900Psi - 1100Psi。每皿轰击一次。

1.2.2.3 抗性体细胞胚筛选及植株再生 轰击材料于 25 ℃ 暗培养 2 d,转至继代培养基上恢复培养 1 周,然后转到筛选培养基上连续筛选 4 次,每次 15 ~ 20 d,筛选压力为本实验 1.2.1 所确定卡那霉素的适宜浓度,每次将抗性体细胞胚团分割为 3 mm 左右的小块,培养条件均为 25 ℃,自然光;两个月后,统计抗性体细胞胚块数,然后转移至萌发培养基,3 ~ 4 周后长成小植株。再转入生根培养基,获得转化植株,再统计再生植株数。培养条件均为 25 ℃ 光照 16 h,光强 3 000 lx。

以上数据处理及分析均采用 SPSS10.0 统计软件。

1.2.3 分子检测 按照王关林<sup>[6]</sup>的 SDS 方法提取植物基因组 DNA,并进行 PCR、PCR - Southern 杂交、点杂交分子检测。

2 结果与分析

2.1 选择压力卡那霉素浓度的确定

见刘尚前论文<sup>[8]</sup>,实验确定选择剂卡那霉素浓度为 100 mg/L,此时大豆体细胞胚褐化率为 80% ~ 100%。

2.2 抗性植株再生以及 PCR 阳性植株

基因枪轰击后的大豆体细胞胚,经过连续两个月的筛选,得到抗性体细胞胚。然后,转入萌发培养

基得到抗性子叶期胚,有正常和不正常的;长成小苗后再转入壮苗培养基继续筛选,一些抗性体细胞胚能够萌发,形成抗性植株;而另一些抗性体细胞胚不能够萌发、生根,随着时间的延长逐渐变白死亡;还有一些植株无根,逐渐变白死亡;一部分抗性植株移栽后成活。结果见表 2、图 1。

表 2 抗性植株再生以及 PCR 阳性植株  
Table 2 PCR resistance and positive plant

轰击体细胞胚总数 Somatic embryos numbers	抗性体细胞块数(2 个月) Fastness somatic embryos numbers	抗性筛选率(%) Fastness ridding frequency	抗性植株数 Fastness planets	PCR 阳性植株数 Positive planets	相对转化率(%) Relative transformation frequency	转化率(%) Transformation frequency
400	50	12.5	65	2	3.0	0.5

抗性筛选率(%) = 抗性胚体细胞胚块数 ÷ 轰击体细胞胚块总数 × 100

相对转化率(%) = PCR 阳性植株数 ÷ 再生植株数 × 100

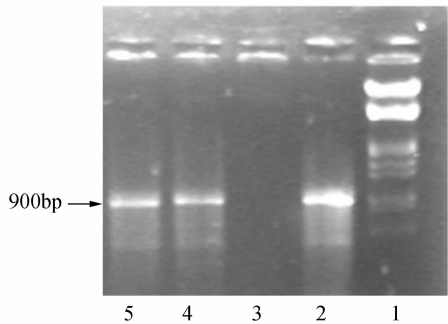
转化率(%) = PCR 阳性植株数 ÷ 轰击体细胞胚块总数 × 100

2.2 分子检测

2.2.1 PCR 检测 取抗性植株叶片,提取基因组总 DNA,以其为模板,分别用 *Bt* 基因 5'端和 3'端引物进行 PCR 扩增。以未转化大豆植株作阴性对照,以质粒为阳性对照,共得到 2 株阳性植株,阳性植株 DNA 扩增出与质粒扩增产物相同的分子量为 900bp 的特异条带,而对照植株则没有扩增到上述片段。实验结果见电泳图 1。初步确定已将 *Bt* 基因转化到大豆中。平均相对转化率为 3%,明显低于抗性体细胞胚 4 次筛选转化率 12.5%。而转化率为 0.5%。

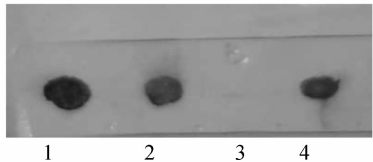
2.2.2 转基因植株的斑点杂交 取 PCR 扩增阳性植株 DNA 进行点杂交,如图 2 所示,结果表明:PCR 阳性植株 DNA 能够与探针发生特异性结合,染色后均出现紫蓝色杂交信号,而非转化植株 DNA 则杂交后没有杂交信号,初步确定目的基因已整合到大豆染色体基因组中。

2.2.3 转基因植株的 PCR - Southern 杂交 为进一步确定外源基因的整合,提取 PCR 阳性植株总 DNA,对 PCR 阳性植株进行 PCR 扩增,同时质粒 *Bt* 作为阳性对照,非转基因植株为阴性对照。扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳,用电转移法将 DNA 转移至尼龙膜上,4 ℃ 备用。用 *Bt* 引物 P1、P2 从质粒



1. 分子量标记为  $\lambda$ DNA/EcoRI + Hind III Marker  
2. 为阳性对照 3. 为未转化植株 4、5. 为阳性植株  
1.  $\lambda$ DNA/EcoRI + Hind III Marker  
2. Masculine check 3. Non-transtormed plant  
4. Masculine plant

图 1 在卡那霉素抗性大豆植株中 *Bt* 基因的 PCR  
Fig. 1 PCR indentification of transformation plant



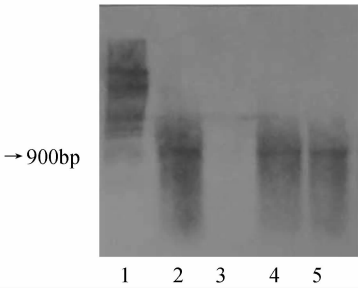
1. 为阳性对照 2、4 为阳性植株  
3. 为未转化植株(阴性对照)  
1. Masculine check 2、4. Masculine plant  
3. Non-transformed plant

图 2 转基因植株的斑点杂交

Fig. 2 Dot blotting of transformation plant

中扩增出 900bp 长的片段,1% 琼脂糖凝胶电泳,进行回收与纯化,采用随机引物法按 DIG 试剂盒进行探针标记。预杂交、杂交、洗膜、显色等均按照参考

文献。结果显示质粒与探针杂交后在 900bp 处出现一条明显的紫蓝色杂交带,转基因大豆基因组 DNA 杂交后在与质粒位置相似处也出现杂交带,而非转化植株则没有杂交带,进一步证明外源基因 *Bt* 已经整合大豆的染色体基因组中(图 3)。



1. 为 λDNA/EcoRI + Hind III Marker

2. 为阳性对照(*Bt*) 3. 为未转化植株(阴性对照)

4,5 为阳性植株

1. λ DNA/EcoRI + Hind III Marker

2. Masculine check 3. Non-transformed

4,5Masculine plant

图 3 转基因植株的 PCR - Southern

Fig. 3 PCR - Southern identification of transformation plant

### 3 讨论

在植物遗传转化中抗生素的使用浓度受植物材料等因素的限制,由于抗生素对外植体的生长有负作用,因此确定其使用的最低浓度,在大豆转化中是十分重要的。实验表明,大豆体细胞胚对卡那霉素的敏感性在基因型间存在显著差异,而且大豆体细胞胚对卡那霉素反应迟钝,可能是由于大豆本身对卡那霉素有内源抗性。王萍等<sup>[9,10]</sup>的研究也表明:同一基因型大豆而所选用的外植体部位不同,比如子叶、子叶节、胚轴、成熟胚,甚至植株对卡那霉素的敏感性也不同,因此,在以卡那霉素作为选择标记时,不同的基因型、不同的外植体应使用不同的筛选浓度。

本实验用基因枪法得到 2 株阳性植株,这说明大豆的转化率低,分析原因可能有以下几点:(1)外植体细胞表达外源选择抗性基因,从而为其他非转化细胞提供了一道屏障,逃避了选择压力的影响而继续分裂分化;(2)选择压力加的太迟或太少,致使非转化细胞分裂分化。(3)由于 *Bt* 基因片段较大,在转化过程中发生断裂致使转化率低。(4)转化细胞的存活率可能较低。(5)在长时间的转化和筛选培养过程中,大豆对卡那霉素产生抗性以及实验的污染等问题使转化率下降。(6)本实验所用的材料是继代 5 ~ 8 次的,体细胞胚的感受状态及其分化能力可能下降致使转化率较低。

大豆的转化频率太低,仍然需要对转化的受体体系及转化体系进行研究。

### 参 考 文 献

[1] 吴刚,崔海瑞,舒庆尧,等. *Bt* 杀虫晶体蛋白基因极其转基因育种研究进展[J]. 生物工程进展,2000,20(2):45 - 48.

[2] 王忠华,舒庆尧,崔海瑞,等. *Bt* 杀虫基因与 *Bt* 转基因抗虫植物研究进展[J]. 植物学通报,1999,16(1):51 - 58.

[3] McCabe DE, WF Swain, BJ Martinell and P Christou. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by Particle acceleration[J]. Bio. Technol. 1988, 6(92):3 - 6.

[4] Sato S, C Newell, K Kolacz, et al. Stable transform ation via Particle bombsrdment in two different soybean regeneration systems [J]. Plant Cell Rep. 1 993, 12:408 - 413.

[5] Stewart C N, M J Adang, J N All, Genetic transformation, recovery, and characteri zation of fertile soybaen transgenic for a synthetic bacillus thuringiensis cryI Ac gene [J]. Plant Physiology. 1996, 112:21 - 129.

[6] 王关林,方宏筠主编. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京:科学出版社,2002,386 - 389.

[7] 王晓春,刘尚前,季静,等. 影响大豆体细胞胚萌发的因素[J]. 大豆科学,2004,23(2):151 - 154.

[8] 刘尚前,王晓春,季静,等. 用农杆菌介导法将 *Bt* 基因转入大豆的研究[J]. 大豆科学,2007,26(1):103 - 106.

[9] 王萍,吴颖,何娜,等. 抗生素对农杆菌抑制的效果和大豆外植体诱导的影响. 东北师大学报自然科学版. [J]. 遗传学研究学专辑,2000,11:39 - 41.

[10] 王萍,吴颖,王军军,等. 抗生素对大豆愈伤组织的诱导和生长的影响[J]. 遗传,2001,23(4):321 - 324