

大豆花粉管通道法转化 *lkt50* 基因

李文霞¹, 李文滨², 宁海龙², 吕文河¹

(1. 东北农业大学农学院, 哈尔滨 150030; 2. 东北农业大学大豆研究所, 国家教育部大豆生物学重点实验室, 哈尔滨 150030)

摘要 采用花粉管通道法, 将外源基因 *lkt50* 向大豆品种东农 48 和品系东农 96-02 导入。通过卡那霉素筛选, 从所获得的种子苗中初选转化植株, 进一步进行 PCR、Southern blot 及 RT-PCR 分子生物学检测。结果表明: 在 14 株卡那霉素抗性材料中利用 *nptII* 基因的特异性引物有 7 株 PCR 阳性, 利用 *lkt50* 基因特异性引物有 2 株 PCR 阳性, 并且 2 株 Southern blot 及 RT-PCR 检测均呈现阳性, 因此认为花粉管通道法可以用于大豆的转基因研究和应用。

关键词 大豆; 花粉管通道法; *lkt50*

中图分类号 S565.103.53 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)05-0653-04

TRANSFORMING *lkt50* GENE TO SOYBEAN BY POLLEN TUBE PATHWAY

LI Wen-xia¹, LI Wen-bin², NING Hai-long², LÜ Wen-he¹

(1. College of Agronomy, Northeast Agricultural University, Harbin 150030; 2. Soybean Research Institute of Northeast Agricultural University, Key Laboratory of Soybean Biology in Chinese Ministry of Education, Harbin 150030)

Abstract *lkt50* gene was introduced into soybean cultivar Dongnong 48 and strain Dongnong 96-02 via pollen tube pathway. The transformed plants were primary screened from seedling by spraying kanamycin, and further the transformed plants was determined by molecular biological methods including PCR, Southern blot and RT-PCR. The results indicated that the identification of 14 Km resistant plants was determined by PCR with the use of the primers of *nptII* and *lkt50*, and seven and two plants were found to be positive respectively. Furthermore, the detections by Southern blot and RT-PCR revealed that the two plants were found to be positive. The pollen tube pathway is an effective, feasible method for soybean transgene.

Key words Soybean; Pollen-tube pathway; *lkt50* gene

运输热 (Shipping fever) 是牛发病和死亡的主要原因, 在全球占据牛因病死亡率的 30%, 造成严重经济损失, 仅在北美年损失达 1 亿美元^[1]。为此

病, 目前许多研究向接种疫苗的方向努力, 已有许多不同的死菌或活菌疫苗问世, 以注射方式注入牛蹄, 为防止此病的发生和流行起到了重要的作用, 是一

收稿日期: 2007-05-14

基金项目: 黑龙江省科技攻关项目“大豆、马铃薯抗病和抗虫基因工程的研究”(GB04B101)

作者简介: 李文霞 (1974-), 女, 博士, 讲师, 研究方向为植物分子生物学。Tel: 13796674549, E-mail: wxlee2006@yahoo.com.cn

通讯作者: 李文滨教授, E-mail: wenbinli@yahoo.com; 宁海龙副教授, E-mail: ninghailong1975@163.com; 吕文河教授, E-mail: whlu@mail.neau.edu.cn

种有效而经济的方法。白细胞毒素 (*lkt50*) 成为预防性疫苗研究的主要靶抗原^[2,3]。该基因已在加拿大通过细菌实验证明对牛的运输热具有良好疗效,之后又在转基因三叶草中得到高度表达^[4]。本研究目的是以大豆作为生物反应器,将 *lkt50* 基因转化大豆,创造可抵御牛运输热的可食性植物疫苗。

用于大豆的转基因技术,现国际上比较成功的是基因枪和农杆菌介导法,但这种技术要求有一个很好的组织培养技术程序,需要精细操作的技能和昂贵的实验条件,需要时间,且转化率和成功率不是很高,受基因型限制^[5]。花粉管通道法属于种质转化系统,转化过程依赖植物自身的种质系统,在整体植物上转化,转移的 DNA 可为质粒 DNA 或裸露 DNA,这一技术省略了组织培养的过程,为此,本研究采用花粉管通道法将 *lkt50* 基因转化大豆。

1 材料和方法

1.1 材料

DNA 供体:质粒 pBlkt50 由加拿大圭尔夫大学微生物系馈赠,图谱见图 1,带有目的基因 *lkt50* 和选择标记基因 *npt II*。

受体材料:大豆品种东农 48 和品系东农 96-02。

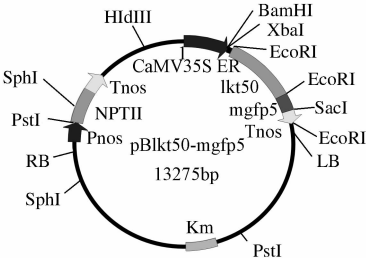


图 1 质粒 pBlkt50 图谱

Fig.1 The map of pBlkt50

1.2 方法

1.2.1 转化及转基因植株获得

取大豆植株中上部花,将节间内其它非转化的花用镊子逐一去净,再用镊子轻轻地将转化的花逐一去掉花瓣,用刀片切去柱头顶端,用 1 mL 注射器将质粒 DNA 溶液(约 15 μ L)推入有花萼围成的空腔内,使 DNA 溶液完全浸没子房并在其上方形成一个液滴。用转化花附近的叶子将花包住,牙签固定。每隔一周检查一次,摘去该节上新长出的花蕾。

将转化一代(D_1)的种子播种于温室内营养钵中,用 250 ~ 450 mg L^{-1} 卡那霉素溶液加 0.05% Tween 20 在两片复叶完全展开后开始喷洒,隔日喷一次,浓度递增,连喷 5 次后选择抗性植株。

1.2.2 分子检测 从卡那霉素抗性植株和未转化对照植株叶片提取总 DNA 作为模板进行 PCR 扩增检测,后者为阴性对照,质粒为阳性对照。引物 *npt II*-1: 5'-GGTGCCTGAATGAAC TG-3'; *npt II*-2: 5'-TAGCCAACGCTATGTCCT-3' 和 *lkt50*-1: 5'-GAGTTACAGGCAGAACGTG TC-3' *lkt50*-2: 5'-TT-GAGGTGATCCGCTCGCCAT-3'。PCR 反应体系中含有 25 mmol L^{-1} MgCl_2 1.8 μ L, 10 mmol L^{-1} dNTP 0.4 μ L, PCR 引物(1 μ M) 1, 2 各为 3.0 μ L, Taq 酶(5 U μ L⁻¹) 0.4 μ L, 模板 DNA 约 50 ng 总反应体积 20 μ L。*npt II* 基因扩增反应条件为: 94 $^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min, 然后扩增 35 个循环(94 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 54 $^{\circ}\text{C}$ 1 min, 72 $^{\circ}\text{C}$ 2 min), 最后 72 $^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min, 4 $^{\circ}\text{C}$ 终止反应。*lkt50* 基因扩增反应条件为退火温度 64 $^{\circ}\text{C}$, 其它同 *npt II* 基因。

对 PCR 阳性的植株进行 Southern 杂交检测,提取 D_1 代苗期植株上幼嫩叶片总 DNA, 采用地高辛标记和检测试剂盒(DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit II) 进行 Southern 杂交检测。

对 Southern 阳性的植株进一步进行 RT-PCR 鉴定, TRIzol 法制备植株总 RNA, 利用 M-MLV 逆转录酶合成 cDNA, 以未转基因大豆 RNA 为阴性对照, 以质粒为阳性对照, 在 20 μ L 体系中加入 cDNA 或质粒 DNA 为模板, 进行 RT-PCR。

2 结果与分析

2.1 转化 *lkt50* 基因

共转化 2040 朵花, 其中东农 48 为 1630 朵, 东农 96-02 为 410 朵, 获得 1018 粒种子, 包括 847 粒东农 48 和 171 粒东农 96-02。为从大量的转化后代中筛选出少数的转化植株, 用 250 ~ 450 mg L^{-1} 卡那霉素溶液加 0.05% Tween 20 在两片复叶完全展开后开始喷洒, Tween 20 是一种表面展开剂, 添加在卡那霉素溶液中能够使药液均匀地分散在叶片表面, 避免局部浓度过高造成坏死(图 2)。

2.2 转基因植株的 PCR 扩增检测

将导入外源 DNA 后收获的 D_1 代大豆种子全部种在温室中, 通过卡那霉素筛选鉴定转基因植株, 共

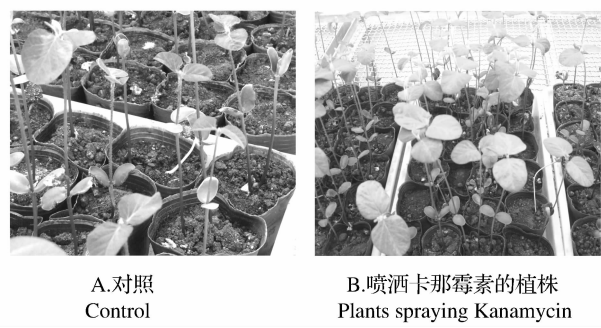
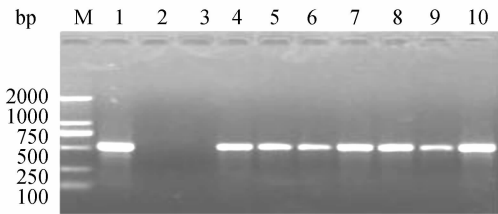


图2 喷洒卡那霉素鉴定转基因植株
Fig.2 Identification of the transgenic plants by spraying Kanamycin

获得 14 株卡那抗性植株,其中东农 48 为 9 株,东农 96-02 为 5 株。如图 3 所示,在 14 株卡那霉素抗性材料中,利用 *nptII* 基因的特异性引物有 7 株扩增出了 500 bp 的条带,其中东农 48 为 6 株,东农 96-02 为 1 株。利用 *lkt50* 基因特异性引物有 2 株扩增出了 1.2 kb 的条带(电泳图中特异条带同图 5),全部为东农 48。



M:Marker;1:阳性对照;2:负对照;3:未转化的植株;
4~10:转化的植株
M:Marker;1: Positive control;2: Negative control;3: Non-transformed plant; 4-10:Transformed plants

图3 转基因大豆的 PCR 扩增结果

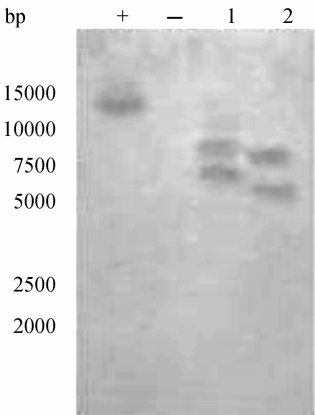
Fig.3 PCR analysis of putative transgenic plants

2.3 转基因植株的 Southern 杂交分析

对用 *lkt50* 基因设计的引物进行 PCR 检测呈阳性的 2 株东农 48 进行 Southern blot 杂交检测,提取大豆基因组 DNA,用限制性内切酶 *Hind* III 进行酶切,同时以酶切质粒作为阳性对照,未转基因植株酶切基因组 DNA 作为阴性对照。结果 2 株均检测到杂交信号,且都为两个拷贝,如图 4 所示,酶切质粒也呈现杂交信号,而未转化的大豆则无杂交信号,说明 *lkt50* 基因已整合进大豆基因组当中。

2.4 转基因植株的 RT-PCR 鉴定

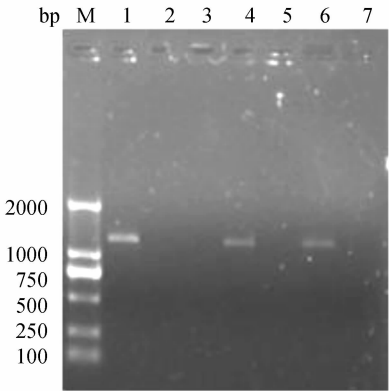
Southern 杂交为阳性的 2 株植株进行 RT-PCR 检测时,扩增出与阳性对照一致的特异条带(1.2



+ :阳性对照; - :未转化植株;1,2:转化东农 48
+ :Positive control; - : Non-transformed plant;1,2: Transformed Dongnong 48

图4 转 *lkt50* 基因大豆植株的 Southern blot 杂交
Fig.4 Southern blot analysis of transgenic soybean plants expressing *lkt50*

kb),而未转基因对照植株未扩增出相应条带(图 5)。RT-PCR 结果表明,整合到大豆基因组中的 *lkt50* 基因已被 *CaMV35S* 启动子启动,转录为完整的 mRNA,在 RNA 水平上得到了表达。



M:Marker;1:质粒;2:负对照;3:未转基因的 cDNA 作为模板;4,6:转基因植株的 cDNA 作为模板;5,7:转基因植株的总 RNA 作为模板,以检测 DNA 的污染
M:Marker;1:pBlkt50;2:Negative control;3:cDNA of non-transformed plant as template;4,6:cDNA of transformed plants as template;5,7:RNA of transformed plants as template to identify pollution of DNA

图5 转基因植株的 RT-PCR 检测

Fig.5 RT-PCR analysis of transgenic plant

3 讨论

不依赖于组织培养的转基因技术可以减少转化过程所需的时间,而且可以克服基因型限制,扩大应用材料范围^[5]。已有很多学者实践了花粉管通道法转化大豆的研究,并取得了成功,其中刘德璞等^[5~8]利用花粉管通道技术转移了种间、属间材料总 DNA 获得大量优良大豆品系以及转雪花莲凝集素基因获得了抗蚜品系。本研究也证实花粉管通道法可以用于大豆的转基因研究和应用中。

花粉管通道法在转基因大豆的鉴定过程中,应用卡那霉素筛选获得的抗性转基因植株并不能保证目的基因也同时表达。标记基因和目的基因的表达并不是一定同步的,因而还要对卡那霉素抗性植株进一步鉴定。同样,应用卡那霉素对转化植株的初步鉴定也会使部分目的基因整合并表达的转基因植株被遗漏。目的基因和标记基因表达的不同步可能涉及到转基因沉默的问题,也可能是所导入基因片段的不完整插入造成的。如何才能提高选择标记基因与目标基因在转化植物时共同整合的效率,这一问题还有待于进一步深入研究。

参 考 文 献

[1] Griffin D. Economic impact associated with respiratory disease in beef cattle[M]. In: Vestweber, J., St. Jean, G. (Eds.), Veterinary Clinics of North America: Food Animal Practice. Saunders, Philadelphia, 1997, 367 - 377.

[2] Cho H J, Jericho K W F. Induction of immunity against pneumonic pasteurellosis following experimental infection in calves[J]. Canadian Journal of Veterinary Research, 1986, 50: 27 - 31.

[3] Sutherland A D, Donachie W. Cytotoxic effect of serotypes of Pasteurella haemolytica on sheep bronchoalveolar macrophages[J]. Veterinary Microbiology, 1986, 11: 331 - 336.

[4] Lee R W H, Strommer J, Hodgins D, et al. Towards development of an edible vaccine against bovine pneumonic pasteurellosis using transgenic white clover expressing a Mannheimia haemolytica A1 Leukotoxin 50 fusion protein[J]. Infection and Immunity, 2001, 69 (9): 5786 - 5793.

[5] 刘德璞, 袁鹰, 唐克轩, 等. 大豆花粉管通道技术转化雪花莲凝集素(GNA)基因[J]. 分子植物育种, 2006, 5(4): 663 - 669.

[6] 刘德璞, 袁鹰, 庄炳昌. 外源 DNA 导入大豆变异后代的 SOD 同工酶分析[J]. 大豆科学, 1991, 10(3): 194 - 199.

[7] 刘德璞, 廖林, 袁鹰, 等. 导入外源 DNA 获得抗 SMV 大豆[J]. 大豆科学, 1997, 16(4): 277 - 282.

[8] 刘德璞, 袁鹰, 王成武, 等. 导入外源 DNA 大豆后代的抗虫性鉴定与筛选[J]. 大豆科学, 2002, 21(4): 245 - 249.



《农业展望》2008 年征稿及征订启事

《农业展望》是经国家新闻出版总署批准,由中华人民共和国农业部主管,农业部市场与经济信息司指导,中国农业科学院农业信息研究所主办的综合性农业科技类刊物,面向国内外公开发行人。

办刊宗旨:立足于对主要农产品生产、供需、价格及进出口进行分品种分析与预测,密切关注当前农业经济发展进程中一些重大的关键性或热点、焦点问题,重点报道对农业经济形势与农业、农产品贸易的分析与展望,侧重于对农业政策、现代农业、产业发展、农业贸易、国际农业、农产品供需和粮食安全等的长期展望,并且每期都以一定篇幅刊载国内外主要农产品最新数据及供需平衡表。

本刊主要栏目:经济分析、产品预测、国际农业、贸易观察、现代农业、产业发展、数据信息等。

《农业展望》杂志由北京报刊发行局发行,邮发代号为 80 - 283。广告许可证:京海工商广字第 0095 号。本刊为月刊,每期定价 15 元,全年 180