

农杆菌介导法将 SPS 基因导入大豆的研究

宋雯雯, 刘宝辉, 杨明亮, 张颖, 王继安

(东北农业大学大豆研究所, 教育部大豆生物学重点实验室, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘 要: 长期以来, 大豆遗传转化由于受基因型限制, 受体系统不完善、实验结果重复性差等因素, 使农杆菌介导的大豆遗传转化频率低下。农杆菌介导法多以子叶节为受体系统, 但转化体极易形成嵌合体, 导致后期筛选难度加大。基因枪方法的技术难度大、易引起基因沉默。以大豆胚尖为受体, 采用农杆菌介导法将玉米蔗糖磷酸合成酶 (SPS) 基因导入大豆基因组中。由于胚尖具有较强的分生能力, 再生细胞由转化细胞而来, 极大地降低了生成嵌合体的可能性。卡那霉素抗性植株经 PCR 及 Southern 杂交等分子检测, 证明目的基因已导入并整合到大豆基因组中。

关键词: 大豆胚尖; 农杆菌介导; SPS 基因

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2008)03-0387-04

Transformation of SPS Gene into Soybean via Agrobacterium-mediated Method

SONG Wen-wen, LIU Bao-hui, YANG Ming-liang, ZHANG Ying, WANG Ji-an

(Soybean Research Institute, Northeast Agricultural University/Key Laboratory of National Educational Department, Harbin 150030, Heilongjiang, China)

Abstract: The low efficiency of soybean genetic transformation was contributed by restricted soybean genotypes as receptors, the faultiness of tissue culture system, etc. Through Agrobacterium-mediated transformation of cotyledonary node, the most of genetic plants were chimeras. Consequently, it was difficult to select genetic transformation plants. Another popularly used method- Particle Bombardment, whose technique was hard to operate, easily resulted in gene silence. In this research, SPS gene was transformed into embryonic tips of soybean via Agrobacterium-mediated method. The embryonic tip was primary meristem which originated from primordial meristem, therefore it had strong dividing capability. Regeneration cells were derived from genetic cells, which decreased the possibility of being chimeras. The regenerated plants, which were resistant to Kanamycin, were obtained and examined by PCR and Southern blot. The results indicated that the target gene had been transformed into soybean genome.

Key words: Embryonic tips of soybean; Agrobacterium-mediation; SPS gene

大豆遗传转化, 早在 1984 年 DeBlock 等^[1] 和 Horsch 等^[2] 报道了将外源基因导入大豆的研究结果。1988 年, 自 Hinchee^[3] 等和 McCabe^[4] 等分别用两种方法转化大豆成功得到转基因植株以来, 虽然也相继有关于此方面的报告, 但是没有突破性的进展^[5]。目前的大豆遗传转化, 多采用农杆菌介导的子叶节遗传转化体系和基因枪转化未成熟子叶的体细胞胚遗传转化体系。农杆菌介导的子叶节遗传转化, 由于再生细胞和转化细胞不一致, 且由多细胞起源, 易形成嵌合体, 不适于农杆菌转化; 基因枪转化未成熟子叶的体细胞胚, 亦有其缺点, 其悬浮体系建

立的技术难度较大, 继代时间较长 (约 6 个月)^[6], 且易引起基因沉默^[7]。

大豆遗传转化效率低下, 关键是其组织培养再生植株困难及受体系统与转化方法匹配的局限性, 是其未能成为遗传转化模式作物的主要原因之一^[8]。采用农杆菌介导转化法, 以大豆成熟种子胚尖作为受体系统^[9], 降低了转化体是嵌合体的可能性, 因其具有较强的分生能力, 再生细胞由转化细胞而来。而且该体系操作简便, 获得转化体的周期短 (约 3 个月)。转基因成活植株经 PCR 及 Southern 杂交等分子检测, 证明目的基因已导入并整合到大

收稿日期: 2008-01-12

基金项目: 国家自然科学基金资助项目 (30471092)。

作者简介: 宋雯雯 (1982-), 女, 硕士研究生, 研究方向为大豆生物技术。E-mail: songwenwen2002@163.com。

通讯作者: 王继安, 研究员。E-mail: wangsoy@yahoo.com.cn。

豆基因组中。

使用大豆成熟种子的胚尖作为外植体,尽管克服了农杆菌介导的子叶节体系嵌合体多和基因枪方法的技术难度大、基因沉默等缺点,但在转化效率方面仍然不高,有待于提高转化效率。

1 材料和方法

1.1 材料

选用合丰 35 大豆品种,以大豆胚尖为受体材料。

工程菌为含 pBI121 质粒的 LBA4404 农杆菌菌株。内含玉米蔗糖磷酸合成酶 (SPS) 基因、NPT II 基因和 GUS 基因 (见图 1)。

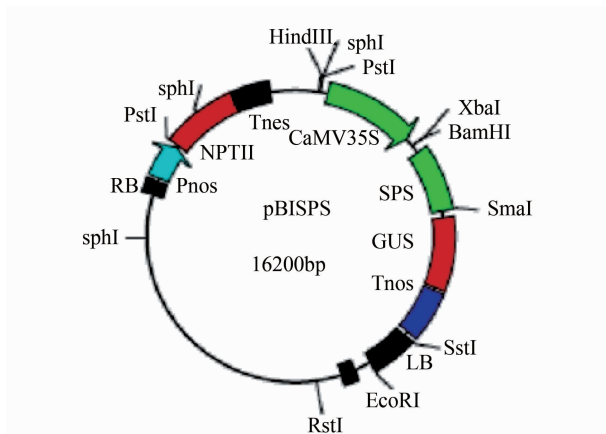


图 1 用于大豆遗传转化的载体的图谱

Fig.1 Structures of vectors used for soybean transformation

1.2 方法

1.2.1 外植体制备 大豆成熟种子消毒后,放至无菌水中,25℃ 浸泡 20 h。去掉种皮,把下胚轴连同刚萌动的胚尖与两片子叶剥离,去掉原叶。胚尖向上垂直接种至 MS 培养基上 (MSsalts + MS-C + B₅-D

+3% 蔗糖)^[8],附加 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA 和 0.6% 琼脂 pH5.6,25℃ 光照培养 (图 2A)。

1.2.2 菌液的准备 农杆菌 LBA4404 单菌落接种于含 50 mg·mL⁻¹ Amp 和 25 mg·mL⁻¹ Str 浓度的 5 mL YEP 液体培养基 (5 g·L⁻¹ yeast extract, 10 g·L⁻¹ peptone, 5 g·L⁻¹ NaCl, pH 7.0), 28℃ 摇床培养过夜,然后将菌液转至含 50 mg·mL⁻¹ Amp, 25 mg·mL⁻¹ Str 浓度的 50 mL YEP 液体培养基中摇至 OD₆₀₀ = 0.6~0.8,菌液于 3000 r·min⁻¹ 离心 10 min 后,将菌体沉淀重悬于 MS 液体培养基附加 3.0 mg·mL⁻¹ 6-BA 和乙酰丁香酮 200 μmol·L⁻¹,将 OD₆₀₀ 调整至 0.6。

1.2.3 浸染与共培养 在含 1.0 mg·L⁻¹ 6-BA 的 MS 培养基上培养 48 h 的胚尖 (图 2B) 转移到制备好的菌体重悬液中,25℃ 浸泡 20 h,浸染后的胚尖在无菌滤纸上把菌液吸干后再转移到共培养培养基上 (MS 培养基附加 3.0 mg·L⁻¹ 6-BA, 0.6% 琼脂和 200 μmol·L⁻¹ 乙酰丁香酮), 25℃ 暗培养 5 d。

1.2.4 恢复培养和筛选 把暗培养 5 d 后的胚尖用无菌水洗净后转移到恢复培养基上 (MS 培养基附加 3.0 mg·L⁻¹ 6-BA, 0.6% 琼脂和 300 mg·L⁻¹ 头孢霉素), 25℃ 光照培养 7 d。恢复培养 7 d 后把胚尖转移到筛选培养基上培养 (MS 培养基附加 3.0 mg·L⁻¹ 6-BA, 0.6% 琼脂, 300 mg·L⁻¹ 头孢霉素和 100 mg·L⁻¹ 卡那霉素)。

1.2.5 不定芽的伸长、生根及移栽 将出芽的外植体 (图 2C) 转移至芽伸长培养基 (MS 培养基附加 0.2 mg·L⁻¹ IBA, 0.6% 琼脂, 300 mg·L⁻¹ 头孢霉素和 80 mg·L⁻¹ 卡那霉素) 中,每 10 d 继代一次。等不定芽长至约 4 cm 长时,将其从底部切下转至生根培养基中 (1/2 MS 培养基附加 1.0 mg·L⁻¹ IBA 和

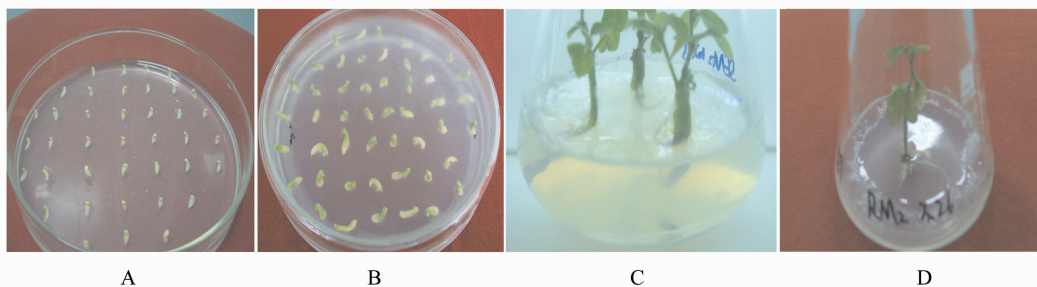


图 2 A. 胚尖刚接种至培养基上; B. 接种 48 h 后的胚尖; C. 丛生芽的伸长; D 抗性植株

Fig.2 A. Embryonic tips just inoculated into germination media; B. Embryonic tips cultured 48 h in germination media; C. Elongating buds; D. Kanamycin-resistant plant

50 mg·L⁻¹卡那霉素)(图 2D),待根长到足够健壮时开瓶炼苗,再移栽到蛭石中,在光照培养箱中生长结实。

1.2.6 抗性植株的分子检测 取经卡那霉素筛选的大豆抗性植株叶片,提取植物基因组 DNA,并进行 PCR、Southern 杂交分子检测。

2 结果与分析

2.1 抗性植株的 PCR 检测

取经卡那霉素筛选的大豆抗性植株叶片,以 SDS 法提取的再生植株叶片总 DNA 为模板,农杆菌介导遗传转化阳性植株检测用 CaMV35S 内部的一段序列(20bp:5'-ggagcatcgtggaaaagaa-3')及 SPS 基因的一段序列(20bp:5'-gacgcacctgctctgttcc-3')设计引物进行 PCR 扩增,反应条件为(30 μL 体系):94℃ 预变性 10 min;94℃ 1 min,55℃ 1 min,72℃ 2 min,30 个循环后;72℃ 延伸 10 min。

PCR 产物经 0.8%~1.0% 的琼脂糖凝胶电泳后(结果如图 3 所示),确定阳性植株,进行下一步的筛选工作。

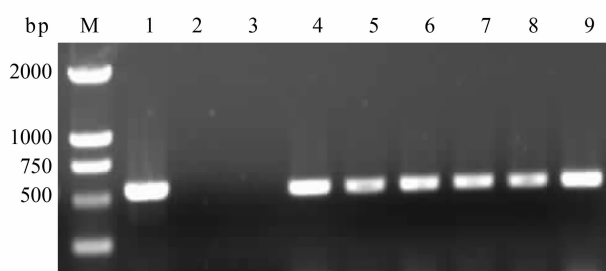


图 3 M:DL2000 DNA Marker;1:阳性对照;2:负对照;3:未转化的植株;4-9:转化的植株

Fig. 3 Lane M: DL2000 DNA Marker; Lane 1: positive control; Lane 2: negative control; Lane 3: wild type; Lane 4-9: PCR positive plants

2.2 抗性植株的 Southern 检测

为了进一步证实 SPS 基因的整合情况,选取 PCR 阳性植株进行 Southern blot 杂交检测,CTAB 法提取大豆幼嫩叶片基因组 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。将阳性对照的 PCR 产物(约 500bp)纯化后,用限制性内切酶 Xba I 处理后,进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳。有两条带,其中一条带是 SPS 基因 3' 侧领域约 320bp,一条带是 35S 领域约 180bp。从胶上回收 180bp 条带作为探针。采用地高辛标记和检测试剂

盒(DIG DNA Labeling and Detection Kit, 购自德国 Roche 公司),经预杂交、杂交、洗膜、显影、漂洗、定影等步骤,结果如图 4 所示:PCR 为阳性的 6 株植株中,有 3 株检测到 Southern 杂交信号。其中 1 株为两个拷贝,其余 2 株为单拷贝,而未转化的大豆则无杂交信号,说明 SPS 基因已整合进大豆基因组中。

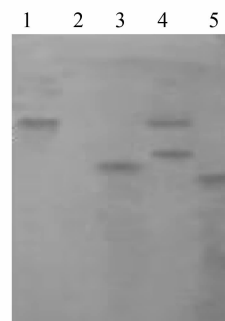


图 4 1:阳性对照,2:阴性对照,3-5:Southern 阳性植株
Fig. 4 Lane 1: positive control, Lane 2: negative control, Lane 3-5: Southern positive plants

3 讨论

3.1 目的基因的选择

蔗糖是光合作用中最先形成的游离糖,在细胞质内形成。蔗糖磷酸合成酶是催化该反应过程的关键酶^[10]。多数研究者认为 SPS 与蔗糖之间存在显著的正相关关系^[11]。蔗糖磷酸合成酶活性越高,大豆叶片中含糖越高,通过基因工程来提高该酶的活性,可能是提高作物产量的另一条途径。大豆是典型的 C₃ 作物,选择 SPS 活性高的 C₄ 植物玉米的 SPS 基因作为靶基因转入到大豆中来,以提高大豆产量。次之,含糖量的提高也会对于改善大豆食用口味具有积极的作用。

3.2 阳性植株 PCR 检测引物设计和 Southern 杂交探针选择

利用 PCR 扩增检测外源基因整合时要以被检植株 DNA 为模板,通常以外源基因 5' 端序列及 3' 末端的互补序列为引物进行扩增,然后用琼脂糖凝胶电泳分离扩增产物,通过特异性扩增条带的有无和分子量的大小可对外源基因是否整合做一初步判断,然后通过 Southern 杂交,若形成杂交体,则可确定外源基因的整合。但是由于大豆基因组中也含有蔗糖磷酸合成酶(SPS)基因,如果在阳性植株 PCR 检测和 Southern 杂交时,仍然以扩增外源全长基因为原则设计引物,和以外源基因的一段作杂交探针,

那么即使检测到特异性条带和杂交条带,也无法判断外源基因已经整合阳性植株基因组中。此研究在阳性植株 PCR 检测时引物是用 SPS 基因的一段序列(20bp)及 35S 内部的一段序列(20bp)设计的。Southern 杂交探针选择的是阳性对照的 PCR 产物(约 500bp)纯化后,用限制性内切酶 Xba I 处理后,进行 1.0% 琼脂糖凝胶电泳。有两条带,其中一条带是 SPS 基因 3'侧领域约 320 bp,一条带是 35S 领域约 180bp,从胶上回收 180bp 条带。这一改进,解决了上述无法判断外源基因是否已经整合到植株基因组中的问题。

4 结论

研究建立了大豆胚尖的再生体系,和子叶节系统及基因枪系统相比较,这个系统具有高效和快速的再生特点。利用根癌农杆菌对大豆成熟种子的胚尖外植体进行遗传转化,获得了整合 SPS 基因的转基因大豆植株。农杆菌介导胚尖 800 个外植体,获得 6 株 PCR 阳性植株和 3 株 Southern 杂交检测的阳性植株。转化频率以 Southern 杂交阳性为指标计算,转化频率为 0.375%。

参考文献

- [1] Cheng T Y, Saka T, Voqui-Dinh T H. Plant regeneration from soybean cotyledonary node segments in culture[J]. Plant Science Letters, 1980, 19: 91-99.
- [2] Donaldson P A, Simmonds D H. Susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and cotyledonary node transformation in short-season soybean[J]. Plant Cell Reports, 19: 478-484.
- [3] Hinchey M A, Conner Ward D V, Newell C A, et al. Production of transgenic soybean plants using *Agrobacterium*-mediated DNA Transfer[J]. Bio-technology, 1988, 6: 915-922.
- [4] McCabe D E, Swain W F, Martinell B J, et al. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration. Bio/Technology, 1988, 6: 923-926.
- [5] 刘海坤, 卫志明. 大豆遗传转化研究进展[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2005, 31(2): 126-134. (Liu H K, Wei Z M. Recent advances in soybean genetic transformation[J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2005, 31(2): 126-134.)
- [6] 李文霞, 宁海龙, 李文滨. 大豆遗传转化的研究进展[J]. 中国农学通报, 2005, 12(31): 67-71. (Li W X, Ning H L, Li W B. Research on progress of transgene system in soybean[J]. Chinese Agricultural Science Bulletin, 2005, 12(31): 67-71.)
- [7] Trick H N, Dinkins R D, Santarn E R, et al. Recent advances in soybean transformation[J]. Plant Tiss Cult Biotechnol, 1997, 3: 9-26.
- [8] 杨荣仲, 谭裕模, 陈如凯. 大豆遗传转化研究进展[J]. 广西农业科学, 2003, 6: 11-14. (Yang R Z, Tan Y M, Cheng R K. Recent advances in soybean genetic transformation[J]. Guangxi Agricultural Sciences, 2003, 6: 11-14.)
- [9] 刘海坤, 卫志明. 利用根癌农杆菌介导转化大豆成熟种子胚尖获得转基因植株[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2004, 30(6): 631-636. (Liu H K, Wei Z M. Transgenic soybean obtained with *agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of embryonic tip of soybean mature seeds[J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2004, 30(6): 631-636.)
- [10] 周平, 叶冰莹, 陈由强, 等. 蔗糖磷酸合成酶研究的新进展[J]. 生物技术通讯, 2006, 17(6): 1001-1003. (Zhou P, Ye B Y, Cheng Y Q, et al. The recent advances on sucrose phosphate synthase [J]. Letters in Biotechnology, 2006, 17(6): 1001-1003.)
- [11] 李雯, 邵远志, 庄军平, 等. 蔗糖磷酸合成酶与香蕉果实成熟、衰老的关系[J]. 园艺学报, 2006, 33(5): 1087-1089. (Li W, Shao Y Z, Zhuang J P, et al. Relationships between the Sucrose phosphate synthase and ripening, senescence of banana fruits[J]. Acta Horticulturae Sinica, 2006, 33(5): 1087-1089.)
- [25] Tewary P K, Oka S. Simplified clonal multiplication of mulberry using liquid shake culture[J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture, 1999, 59: 223-226.
- [26] Tsuru M, Koda M, Inoue M. Comparative effect of different types of cytokinin for shoot formation and plant regeneration in leaf-derived callus of lavender (*Lavandula vera* DC)[J]. Scientia Horticulturae, 1999, 81: 331-336.
- [27] Adaniya S, Minemoto K, Moromizato Z, et al. The use of CPPU for efficient propagation of pineapple [J]. Scientia Horticulturae, 2004, 100: 7-14.
- [28] Di R, Purcell V, Collins G B, et al. Production of transgenic soybean lines expressing the bean pod mottle virus coat protein precursor gene[J]. Plant Cell Reports, 1996, 15: 746-750.
- [29] Meurer C A, Dinkins R D, Collins G B. Factors affecting soybean cotyledonary node transformation[J]. Plant Cell Reports, 1998, 18: 180-186.
- [30] Dang W, Wei Z M. An optimized *Agrobacterium*-mediated transformation for soybean for expression of binary insect resistance genes[J]. Plant Science, 2007, 173: 381-389.

(上接第 378 页)