

子房滴注法将 *GUS* 基因表达框转入大豆的研究

刘建凤¹, 苏 乔¹, 安利佳¹, 冉学忠²

(¹ 大连理工大学环境与生命学院生物科学与工程系, 辽宁 大连 116023; ² 铁岭市农业科学院, 辽宁 铁岭 112616)

摘 要:为了验证大豆子房滴注转化方法的可重复性与遗传稳定性, 将由报告基因 *GUS*、表达调控序列(35S 启动子, NOS 终止子)和 T-DNA 边界序列 3 部分组成的基因表达框转入大豆。对 T₀ 代转化材料进行 *GUS* 组织化学染色分析和 PCR 检测。结果表明:在检测的 340 个幼胚中有 12 个呈 *GUS* 阳性, 且在 180 个转化植株中有 6 个呈 PCR 阳性同时其叶片也呈 *GUS* 阳性, 转化率分别为 3.53% 和 3.33%。Southern 杂交表明外源 *GUS* 基因表达框以低拷贝的形式整合到大豆基因组中。对转基因后代叶片 *GUS* 染色、PCR 分析及 Northern blot 检测结果表明外源基因已遗传给了后代, 其中 S2 株系符合孟德尔分离规律。

关键词:大豆; 无载体; 无选择标记; *GUS* 基因表达框; 子房滴注; 转化

中图分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2009)02-0191-04

Transfer of a *GUS* gene Cassette into Soybean via Ovary-drip Transformation

LIU Jian-feng¹, SU Qiao¹, AN Li-jia¹, RAN Xue-zhong²

(¹ Department of Bioscience and Biotechnology, Dalian University of Technology, Dalian 116024, Liaoning; ² Tieling Academy of Agricultural Sciences, Tieling 112616, Liaoning, China)

Abstract: To validate the reproducibility and genetic stability of the ovary-drip transformation, the *GUS* gene cassette, which was composed of only the *GUS* gene, expression regulatory sequence (35S CaMV promoter, NOS terminator), and T-DNA border sequence at both sides, was introduced into soybean. The results (Histochemistry *GUS* analysis and PCR screening of T₀ generation) showed that 12 out of 340 detected immature embryo were *GUS* positive and six out of 180 transformed plants were PCR positive and *GUS* positive, the rate of the T₀ generation transformation reached 3.53% and 3.33%, respectively. Southern blot analysis confirmed that *GUS* gene was integrated into the soybean genome with low copy numbers. The *GUS* staining, PCR analysis and Northern blot indicated that *GUS* gene was inherited in the transgenic progenies. Moreover, Mendelian segregation was observed in the S2 line.

Key words: Soybean; Vector-free; Marker-free; *GUS* gene cassette; Ovary-drip; Transformation

目前,大豆遗传转化主要采用农杆菌介导法和基因枪法^[1-2],这两种方法依赖于植物再生体系,而大豆组织培养还有一定的难度,很难获得再生植株^[3]。因此建立适宜的遗传转化体系成为转基因大豆研究的重要方向。同时转基因作物的安全性越来越受到人们的重视,其中筛选标记基因和载体骨架序列是影响转基因作物安全性评价的重要因素。实验室在花粉管通道的基础上建立了大豆子房滴注转化方法^[4]。该方法具有操作简便、直接获得转化种子、不需要组织培养、能够实现无载体无选择标记线性基因表达框的转化、理论上适用于任何有性生殖的经济作物遗传转化的特点,因此具有广阔的应用前景。为了验证大豆子房滴注法的操作稳定性和研究外源基因的遗传规律,研究

构建了由 35S 启动子、*GUS* 基因开放阅读框、NOS 终止子和两侧 T-DNA 边界序列共同组成的无载体骨架序列的 *GUS* 基因表达框,通过对转化植株的幼胚与叶片进行 *GUS* 组织化学染色、分子验证以及后代植株的遗传性分析,进一步证明了该转化体系的可重复性与遗传性稳定性,为完善与推广大豆子房滴注转化方法提供了有力的证据,为功能基因转化大豆的应用奠定了基础。

1 材料和方法

1.1 植物材料

供试的大豆材料品种为铁丰 29,由铁岭市农业科学院提供。质粒 pUC118-*GUS* 由本实验室构建并

收稿日期:2008-11-21

基金项目:辽宁省科技攻关资助项目(2006208001)。

作者简介:刘建凤(1979-)女,博士研究生,现从事植物基因工程研究。E-mail:lj525128@yahoo.com.cn。

通讯作者:苏乔,副教授。E-mail:dsuqiao@yahoo.com.cn。

保存。

1.2 *GUS* 基因表达框的制备

以质粒 pUC118-*GUS* 为模板,采用引物 PT1 与 PT2,通过 PCR 扩增获得 *GUS* 基因表达框(图 1)。扩增片段为 3074 bp。PCR 反应体系为 50 μ L: LA Taq 酶 1.25 U, 10 \times LA PCR 缓冲液 5 μ L, 2.5 mmol \cdot L⁻¹ dNTP 5 μ L, 引物均为 5 pmol, 质粒模板 20 ng。反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 2 min 30 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。扩增产物经氯仿/异戊醇抽提, 乙醇沉淀, 75% 乙醇洗涤吹干后, 溶于转化缓冲液(0.05% Silwet L-77 + 8% Sucrose); 经 1% 琼脂糖凝胶电泳检测确定浓度(200 ng \cdot μ L⁻¹), -20 $^{\circ}$ C 保存备用。

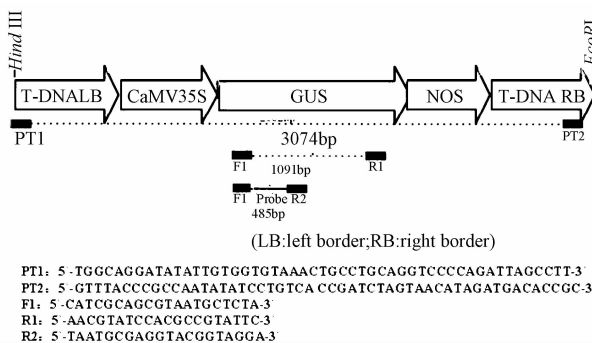


图 1 *GUS* 转化元件构建图以及各引物位点

Fig. 1 Schematic map of the construct used in transformation experiment and the map of the specific primers position

1.3 子房滴注法转化大豆

选取大豆自花授粉 6~8 h 后的完全开放的花朵, 首先用镊子去除同一节上不符合要求的花, 然后将符合要求的花用镊子夹去花瓣, 接着用剪刀完全剪去花柱, 将 6 μ L 转化溶液滴加在子房伤口处, 如果气温较高, 补滴一次。用标签注明品种名、所转基因、日期等, 挂于该节的基部做好标记。用不含有 DNA 的 0.05% Silwet L-77 + 8% Sucrose 溶液滴加到子房伤口处, 收获后的种子做对照。之后, 每隔 3~5 d 检查一次, 摘去该节上新长出的新花蕾, 保证一个茎节上全为转化操作的豆荚。当该节上的豆荚长到 3 cm 时, 为了保证转基因豆荚生长所需要的营养, 可以适当除去此植株上其他节上一定量的豆荚。

1.4 *GUS* 组织化学染色

选取转化 T₀ 幼胚与转基因后代植株叶片放入 X-Gluc 反应溶液(磷酸钠缓冲液 50 mmol \cdot L⁻¹ pH 7.0, 铁氰化钾 0.5 mmol \cdot L⁻¹, 亚铁氰化钾 0.5 mmol \cdot L⁻¹, 0.1% TritonX-100, X-Gluc 0.5 mg \cdot mL⁻¹) 中,

37 $^{\circ}$ C 保温 10~20 h, 观察颜色反应。X-Gluc 染色后的组织进行脱色, 体式显微镜下观察并照相。

1.5 分子检测

1.5.1 PCR 分析 在 3 叶期至 5 叶期, 用 CTAB 法分别提取转基因大豆 T₀ 代和 T₁ 代植株的叶片基因组 DNA^[5], 以此为模板(80 ng) 进行转基因的 PCR 鉴定, 引物为 F1/R1, 扩增片段全长 1091 bp。PCR 反应条件为: 94 $^{\circ}$ C 5 min; 94 $^{\circ}$ C 30 s, 55 $^{\circ}$ C 45 s, 72 $^{\circ}$ C 1 min, 30 个循环; 72 $^{\circ}$ C 10 min。1% 琼脂糖凝胶电泳检测扩增产物。

1.5.2 Southern 杂交 分别取 45 μ g 基因组 DNA 用 HindIII 单酶切, 在 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 采用毛细管法将其转移到 Hybond N⁺ 尼龙膜上, 采用引物 F1/R2 从质粒 pUC118-*GUS* 扩增出 485 bp 片段为探针进行 Southern 杂交。探针标记、杂交与检测按照 DIG High Prime Labeling and Detection Starter Kit(Roche) 说明进行。

1.5.3 Northern 杂交 50 μ g 的总 RNA 在 1% 琼脂糖甲酰胺变性胶上电泳, 电泳缓冲液为 1 \times MOPS, 之后同样采用毛细管法将其转移到 Hybond N⁺ 尼龙膜上, 杂交与检测同上述 Southern 杂交。

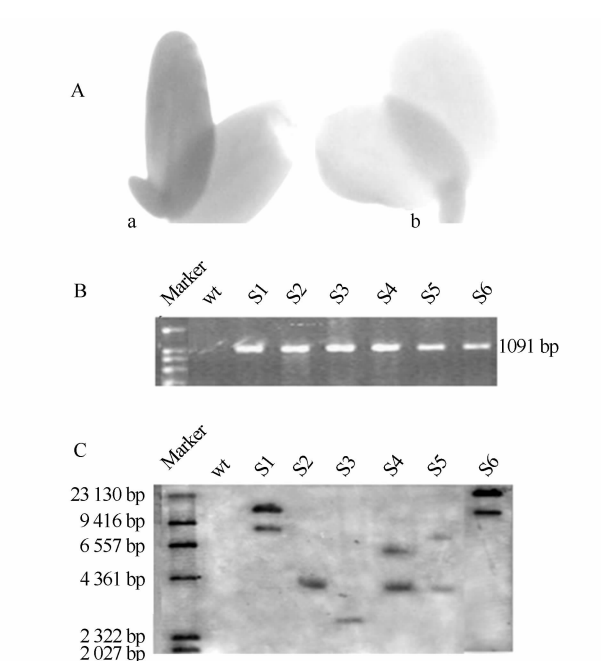
2 结果与分析

2.1 T₀ 代转化大豆的分子检测

对转化 15 d 后的大豆幼胚进行 *GUS* 组织化学染色, 结果表明在采集的 340 个幼胚中有 12 个样品呈 *GUS* 阳性, 转化率为 3.53% (图 2A)。对 180 株 T₀ 代幼苗叶片进行 *GUS* 组织化学染色, 有 6 株叶片呈 *GUS* 阳性。然后对 *GUS* 阳性植株采用特异性引物(F1/R1) 进行 PCR 鉴定, 结果表明 *GUS* 呈阳性的植株 PCR 均为阳性(图 2B), 阳性率为 3.33%。Southern 杂交分析表明 PCR 阳性植株有杂交信号, 且拷贝数为 1~2 个, 而野生型大豆无杂交信号(图 2C), 这说明 *GUS* 基因表达框已整合到大豆的基因组上, 且在大豆基因组中以低拷贝形式整合。

2.2 T₁ 代转基因大豆的 *GUS* 组织化学染色与分子检测

选取 6 株阳性株系后代的叶片进行 *GUS* 组织化学染色, 部分样品呈 *GUS* 阳性(图 3A)。同样对 *GUS* 呈阳性的植株进行 PCR 分析, 结果表明 *GUS* 呈阳性的植株 PCR 均为阳性(图 3B), 各株系后代 PCR 的阳性率统计见表 1, 其中 S2 株系的后代分离



A: *GUS* 组织化学染色:转基因幼胚(a)与野生型幼胚(b);B:PCR 分析(引物 F1/R1);C:Southern 杂交。wt,野生型大豆;S1, S2, S3, S4, S5 和 S6:各转基因株系。
A: Histochemistry *GUS* analysis; *GUS* staining of transgenic immature embryo(a) and wild-type immature embryo(b). B: PCR analysis using primers F1/R1. C: Southern blot analysis. wt: wild-type plants; S1, S2, S3, S4, S5 and S6: transgenic lines.

图 2 T_0 代转化大豆的 *GUS* 组织化学染色与分子检测
Fig. 2 Histochemistry *GUS* analysis and molecular detection of T_0 transgenic

比符合 3:1 孟德尔遗传规律。Northern 杂交结果显示转基因植株出现正常的杂交信号(图 3C),而野生型植株则无杂交信号。

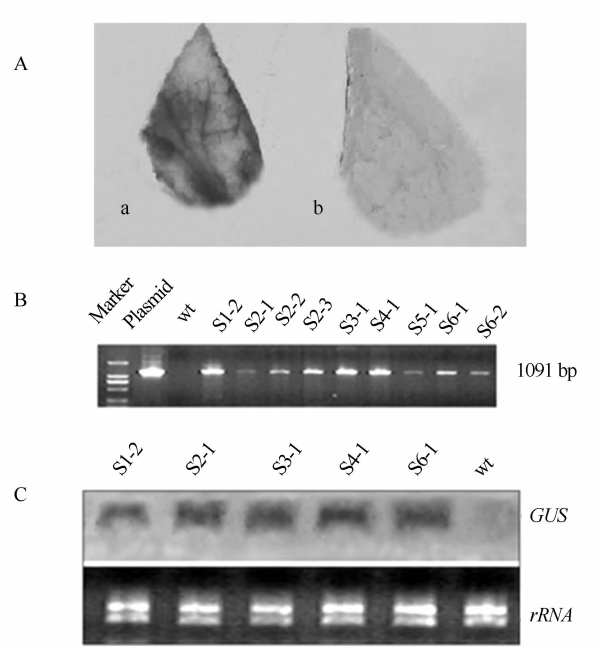
表 1 T_1 代转基因株系后代分离规律

Table 1 Segregation of transgene in T_1 progeny of transgenic lines

株系 Lines	检测(株) No. of plants analyzed	PCR 阳性(株) No. of positive	PCR 阴性(株) No. of negative	理论分离比 Expected ratio	χ^2 值 χ^2 vaule
S1	12	5	7	15:1	55.56
S2	22	17	5	3:1	0.061*
S3	30	15	15	3:1	10
S4	42	15	27	15:1	242.22
S5	21	9	12	15:1	92.83
S6	22	8	14	15:1	123.65

*表示后代分离比符合 3:1 孟德尔遗传规律。 $\chi^2 = 3.84, P < 0.05$ 。

* indicate the segregation ratio of progeny accord with Mendelian inheritance. $\chi^2 = 3.84, P < 0.05$.



A: *GUS* 组织化学染色:转基因植株叶片(a)与野生型植株叶片(b);B:PCR 分析(引物 F1/R1);C:Northern 杂交。wt,野生型大豆;S1-2, S2-1, S2-2, S2-3, S3-1, S4-1, S5-1, S6-1 和 S6-2:各转基因株系后代。

A: Histochemistry *GUS* analysis; *GUS* staining of T_1 transgenic (a) and wild-type plants(b). B: PCR analyses of T_1 transgenic lines, C: Northern blot analysis. wt: wild-type plants; S1-2, S2-1, S2-2, S2-3, S3-1, S4-1, S5-1, S6-1 and S6-2: Progenies of transgenic lines.

图 3 T_1 代转基因大豆的 *GUS* 组织化学染色与分子检测
Fig. 3 Histochemistry *GUS* analysis and molecular detection of T_1 transgenic and wild-type plants

3 讨论

大豆是一种非常重要的农作物,但是相对于水稻、烟草等作物来说,大豆的高效遗传转化一直是植物基因工程领域的难点之一。中国学者建立的花粉管通道法在大豆中已有成功的报道,但在这些报道中转化的 DNA 一般是以基因组 DNA 或质粒 DNA 作为供体导入大豆^[6-10]。本实验室在花粉管通道的基础上建立了高效的子房滴注转化方法^[4],该方法是以为无载体、无选择标记基因表达框为供体进行转化。但是对于一个转基因体系而言,操作稳定性、外源基因的有效表达及遗传稳定性都是应用中的关键问题。为了进一步验证该方法的重复性与遗传稳定性,将无载体无选择标记的 *GUS* 基因表达框转入大豆。对幼胚进行 *GUS* 组织化学染色以及对 T_0 代转化植株进行 PCR 检测和叶片 *GUS* 染色的结果表明转化率为 3.53% 和 3.33%, Southern 杂交

结果表明外源 *GUS* 基因表达框以低拷贝的形式整合到大豆基因组中,与作者转 *GFP* 报告基因的转化率(3.0%)基本一致^[4]。对 T_1 代植株的检测结果表明外源 *GUS* 基因表达框以低拷贝的形式整合到大豆基因组中,转基因已经遗传给了后代,其中 S2 株系后代分离情况符合孟德尔遗传规律。研究中部分转基因株系后代的分离出现了非孟德尔遗传方式,这在其他转化方法如农杆菌介导与基因枪转化中也有相关报道^[12-15]。研究表明转基因植物后代分离会受到转化方法、外界环境和植物自身生物学特性等诸多因素的影响^[11]。综上,大豆子房滴注转化方法具有可重复性与遗传稳定性,为实现目的基因的转化,改良大豆品种奠定了基础。

参考文献

- [1] Olhoft P M, Somers D A. l-Cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary- node cells[J]. Plant Cell Report, 2001, 20: 706-711.
 - [2] Droste A, Pasquali G, Bodanese-Zanettini M H. Transgenic fertile plants of soybean [*Glycine max* (L). Merrill] obtained from bombarded embryogenic tissue[J]. Euphytica, 2002, 127: 367-376.
 - [3] 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.
 - [4] Liu J F, Su Q, An J L, et al. Transfer of a minimal linear marker-free and vector-free *smGFP* cassette into soybean via ovary- drip transformation[J]. Biotechnology Letters, 2009, 31(2): 295-303.
 - [5] Doyle J J, Doyle J L. Isolation of plant DNA from fresh tissue[J]. Focus, 1990, 12: 13-15.
 - [6] 雷勃钧, 尹光初, 卢翠华, 等. 外源 DNA 直接导入大豆的研究[J]. 大豆科学, 1991, 10: 58 - 62. (Lei B J, Yin G C, Lu C H, et al. Introduction of DNA into soybean[J]. Soybean Science, 1991, 10: 58-62.)
 - [7] 雷勃钧, 卢翠华, 钱华, 等. 导入外源总 DNA 获得优质高蛋白和双高大豆新品系[J]. 大豆科学, 1995, 14: 203-208. (Lei B J, Lu C H, Qian H, et al. New soybean strains of high protein and double high content obtained from introduction of exogenous total DNA[J]. Soybean Science, 1995, 14: 203-208.)
 - [8] 赵丽梅, 刘德璞, 孙寰, 等. 外源 DNA 导入大豆获得一不育材料[J]. 大豆科学, 1995, 14: 83-87. (Zhao LM, Liu D P, Sun H, et al. A sterile material of soybean gained by introducing exogenous DNA[J]. Soybean Science, 1995, 14: 83-87.)
 - [9] 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, 2: 101-108. (Xu X L, Zou L P, Liu W H, et al. A preliminary study on transferring chitinase gene into soybeans[J]. Soybean Science, 1999, 2: 101-108.)
 - [10] 刘德璞, 李长有. 导入外源 DNA 获得抗 SMV 大豆品系[J]. 松辽学刊(自然科学版), 1995, 3: 40-43. (Liu D P, Li C Y. Obtaining anti- SMV soybean lines by introduction foreign DNA [J]. Song Liao Journal (Natural Science Edition), 1995, 3: 40-43.)
 - [11] 华志华, 黄大年. 转基因植物中外源基因的遗传学行为[J]. 植物学报, 1999, 41: 1-5. (Hua Z H, Huang D N. Genetic mode of exogenes in transgenic plants[J]. Acta Botanica Sinica, 1991, 41: 1 - 5.)
 - [12] 胡张华, 吴关庭, 金卫, 等. 农杆菌介导的水稻转化及 bar 基因稳定遗传[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2005, 31: 126-134. (Hu Z H, Wu G T, Jin W, et al. *Agrobacterium* mediated transformation of rice and stable inheritance of bar gene[J]. Journal of Plant Physiology and Molecular Biology, 2005, 31: 126-134.)
 - [13] Peng J, Wen F, Lister R L, et al. Inheritance of *gusA* and *neo* genes in transgenic rice [J]. Plant Molecular Biology, 1995, 27: 91-104.
 - [14] Romano E, Soares A, Proite K, et al. Transgene elimination in genetically modified dry bean and soybean lines[J]. Genetic Molecular Research, 2005, 4: 177-184.
 - [15] Casas A M, Kononowicz A K, Bressan R A, et al. Cereal transformation through particle bombardment[J]. Plant Breeding Reviews, 1995, 13 : 235-264.
-
- (上接第 190 页)
- [8] Vollenbofer S, Burg K, Schmidt J, et al. Genetically modified organisms in food -screening and specific detection by polymerase chain reaction [J]. Agricultural and Food Chemistry, 1999, 47 : 5038-5043.
 - [9] 王萍, 王军军, 商德虎. 影响大豆子叶节丛生芽形成的诱导因子研究[J]. 吉林农业科学, 2001, (3): 45-49. (Wang P, Wang J J, Shang D H. Effect of induce factors on multiple bud formation of cotyledonary node in soybean[J]. Journal of Jilin Agricultural Sciences, 2001, (3): 45-49.)
 - [10] 李明春, 蔡易, 赵桂兰, 等. 改良大豆子叶节再生体系的研究[J]. 作物学报, 2006, 32(2): 223-227. (Li M C, Cai Y, Zhao G L, et al. Improvement of cotyledon node regeneration system in soybean (*Glycine max*) [J]. Acta Agronomica Sinica, 2006, 32(2): 223-227.)
 - [11] 吴影, 宋丰顺, 陆徐忠, 等. 实时荧光 PCR 技术定量检测转基因大豆方法的研究[J]. 作物学报, 2007, 33(10): 1733-1737. (Wu Y, Song F S, Lu X Z, et al. Detecting genetically modified soybean by Real-time quantitative PCR technique[J]. Acta Agronomica Sinica, 2007, 33(10): 1733-1737.)