

大豆成熟种子胚尖基因枪法转化体系的优化

叶 美¹, 张 敏¹, 杨素欣¹, 邵 群¹, 安海龙², 曹子谊¹, 冯献忠¹

(1. 山东师范大学 生命科学学院, 山东省逆境植物重点实验室, 山东 济南 250014; 2. 山东农业大学 生命科学学院, 作物生物学国家重点实验室, 山东 泰安 271018)

摘 要:以山东省主栽大豆品种“荷豆 12”成熟种子胚尖为材料,探讨了 6-BA 和潮霉素浓度等因素对基因枪法遗传转化的影响,并通过报道基因 *GUS* 检测了外源基因的表达和整合情况。结果表明:经 $5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 诱导 16 h,“荷豆 12”胚尖的再生丛生芽数目、丛生芽的伸长速率等综合指标最佳;5 ~ $15\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的潮霉素多步梯度筛选可以提高转化筛选效率。基因枪转化后的胚尖组织和转基因植株后代的叶片中均可以观察到 *GUS* 基因的表达;通过分子鉴定证明外源 *GUS* 基因插入到转基因后代的基因组中。

关键词:大豆;成熟种子胚尖;基因枪法;遗传转化

中国分类号:S565.1

文献标识码:A

文章编号:1000-9841(2011)01-0020-04

Optimization of Biolistics Transformation of Embryonic Tips of Soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] Mature Seeds

YE Mei¹, ZHANG Min¹, YANG Su-xin¹, SHAO Qun¹, AN Hai-long², CAO Zi-yi¹, FENG Xian-zhong¹

(1. Key Laboratory of Plant Stress Research of Shandong Province, College of Life Science, Shandong Normal University, Jinan 250014; 2. State Key Laboratory of Crop Biology, College of Life Sciences, Shandong Agricultural University, Tai'an 271018, Shandong, China)

Abstract: To establish an efficient transformation system of embryonic tips of soybean mature seeds, effects of 6-BA and hygromycin B concentration were studied during biolistics transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill cv ‘Hedou12’]. The *Uida* (*GUS*) gene was employed as a reporter gene to reveal the foreign gene expression and integration. Both number and elongation length of multiple shoot reached the highest values at $5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA for 16 h induction of embryonic tips of mature seeds. The optimal selection scheme of transformants was a gradient concentration of hygromycin B from $5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ to $15\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$. The expression of *GUS* gene was observed in both embryonic tips after particle bombardment and young leaves of progeny transformants. The integration of *GUS* gene into the soybean genome was demonstrated by PCR and sequencing analysis.

Key words: *Glycine max*; Embryonic tips of mature seeds; Biolistics; Genetic transformation

大豆作为一种重要的粮油作物,除了传统的育种技术,转基因技术在其遗传改良上也取得了许多重要的成果,推动了世界范围内大豆产量的持续增加。自从 Hinchey 和 McCabe 等^[1-2]首次报道大豆转化成功以来,很多研究者相继研发了不同的大豆遗传转化方法,但是受转化体系和受体系统的影响,大豆目前仍然是一种转化效率偏低的作物。目前较为成功的大豆转化方法主要有农杆菌介导的转化体系和基因枪转化体系。基因枪转化体系是利用物理的方法,直接将目的基因导入受体细胞,其操作简单,受体较为广泛,且不依赖于细菌菌种和宿主基因型的限制,因而是一种广适用性的转化方法^[3]。随着基因枪转化体系对多拷贝数插入等缺点的进一步完善^[4],将会有助于打破大豆基因型的

局限,对于农杆菌不易感染的优良栽培品种实现综合农艺性状的遗传转化改良。

“荷豆 12”属高产、高蛋白、抗病和抗倒伏的夏大豆优良品种,为山东省的主栽夏大豆品种之一。现以“荷豆 12”成熟种子胚尖为材料,对基因枪转化体系中胚尖植株再生体系和筛选体系进行了优化研究,并以 *GUS* 为报告基因,建立了一套简单高效、重复性好的大豆遗传转化体系,为栽培大豆遗传转化改良提供了一个有效的试验系统。

1 材料与方法

1.1 供试材料

大豆品种:“荷豆 12”由济宁市农业科学院提供。

收稿日期:2010-12-15

基金项目:国家转基因重大专项资助项目(2009ZX08009-026B);山东省自然科学基金资助项目(JQ200909)。

第一作者简介:叶美(1986-),女,在读硕士,主要从事大豆转基因研究。E-mail:perfetsky@163.com。

通讯作者:冯献忠(1968-),男,教授,主要从事发育分子生物学研究。E-mail: fengxianzhong@yahoo.com。

载体:pCambia1301(购自 Cambia 公司),带有 *GUS* 基因和 *HPT* 基因。

1.2 试验方法

1.2.1 种子消毒 选取表面光滑、无破损、无病斑、无裂痕的“荷豆 12”成熟大豆种子,以氯气方法灭菌 14 h^[5]。将灭菌后的种子浸泡在无菌水中,黑暗处理 16 h。

1.2.2 基因枪转化及组织培养 在超净台上去掉大豆种皮、子叶和原叶,将下胚轴连同刚萌动的胚尖垂直接种至转化培养基(MS+3%蔗糖+0.8%琼脂,pH 5.7)中进行基因枪转化。采用 PDS 1000/He 型基因枪(Bio-RAD 公司),参照 Elibio 等的方法^[6]并稍有改进,金粉尺寸为 0.6 μm ,轰击时氩压力值为 1 100 psi,真空压力数为 27 inHg,轰击距离为 9 cm。

基因枪轰击后,将材料转移至诱导培养基中(MS+5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA+3%蔗糖+0.6%的琼脂,pH 5.7),28℃,黑暗诱导 16 h;将材料垂直接种至筛选培养基(MS+不同浓度的潮霉素+0.6%的琼脂,pH 5.7)中筛选,在 28℃,16 h 光照/8 h 黑暗的光周期,50 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 的光照强度条件下培养。每周更换 1 次筛选培养基直至抗性苗伸长至 3~5 cm 后,移栽到温室中生长。

1.2.3 转基因植株的 PCR 检测 用 CTAB 法提取植株叶片 DNA^[7],用 *GUS* 基因上的引物对移栽成活植株的 DNA 进行 PCR 检测。*GUS* 引物序列为:引物 1:5'-GCCAAGTCTTTATACCGAAAGGTTG-3';引物 2:5'-TCAGCTCTTTAATCGCCTGTAAGTG-3'。PCR 反应体系的体积为 25 μL ,扩增条件为:94℃预变性 3 min;94℃,30 s,58℃,30 s,72℃,1 min,30 次循环。PCR 产物经 1.0% 的琼脂糖电泳检测,DNA 分子量标准物 D 购自加拿大 BIO BASIC INC.。

1.2.4 *GUS* 表达活性检测 *GUS* 染色参照 Jefferson 等的方法^[8],外植体加入 X-gluc 染色液,抽真空,37℃染色过夜。染色液内含 10 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ EDTA、50 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 磷酸盐(pH 7.0)、0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 铁氰酸钾、0.5 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ 亚铁氰酸钾和 2 $\text{mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ X-gluc。染色后于 70%乙醇中脱色,普通显微镜下观察。

2 结果与分析

2.1 不同 6-BA 浓度对大豆胚尖丛生芽诱导的影响

将“荷豆 12”胚尖分别放置于含有 0、3、4、5、6、7 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 的诱导培养基中,黑暗诱导 16 h 后,移到 MS 培养基上,在 28℃,16 h 光照/8 h 黑暗的光周期,50 $\mu\text{mol} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ 的光照强度条件下培养,观察不同浓度 6-BA 对大豆胚尖丛生芽数目、芽伸长长度的影响。30 d 后,测量丛生芽数目、芽伸

长长度,每个浓度处理 15 个样品,丛生芽数目、芽伸长长度值取 15 个样品的平均值。

从图 1 可知,随着 6-BA 浓度的增加,丛生芽的数目也随之增加,在 5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时达到最大值,之后随着 6-BA 浓度进一步增加,丛生芽数目反而降低;茎伸长长度也表现出同样的趋势,在 5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 处达到最高值,因此确定 6-BA 对丛生芽的最适诱导浓度为 5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 。

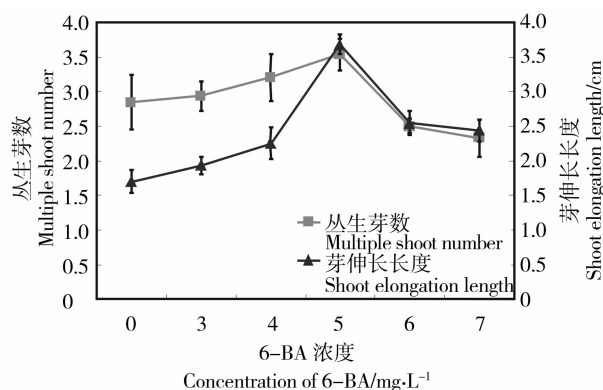


图 1 6-BA 浓度对丛生芽数和茎伸长长度的影响
Fig. 1 Effects of 6-BA concentration on both number and elongation length of multiple shoot

2.2 潮霉素筛选浓度选择

将“荷豆 12”胚尖放置于含 5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 的诱导培养基中,进行黑暗诱导 16 h 后,分别垂直放置于含有 0、5、10、15、20、25、30 和 35 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的潮霉素的筛选培养基中,观察不同浓度的潮霉素筛选对茎伸长长度的影响,以此来确定合适的筛选浓度,30 d 后统计结果,每个筛选浓度样品数目为 10 个,各设 3 次重复。

由图 2 可见,随着潮霉素浓度的增加,对丛生芽伸长的抑制作用增强。没有外加潮霉素时,30 d 时芽长度为 36.68 ± 6.27 mm;在潮霉素浓度为 5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,芽长度为 27.66 ± 2.65 mm;在 10 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,芽长度为 6.53 ± 0.37 mm;15 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 时,芽长度为 4.67 ± 0.88 mm,表明丛生芽的茎基本不会伸长。因此,15 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的潮霉素作为筛选浓度可以有效地抑制非转化外植体的生长。

2.3 转基因植株筛选条件的优化

将 pCambia1301 载体利用上述基因枪方法转化 226 个大豆胚尖,转化的胚尖外植体经 5 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 的黑暗诱导 16 h 后,放置于 15 $\text{mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的潮霉素筛选培养基上筛选 28 d。发现丛生芽产生后,几乎所有的芽都不能有效伸长,逐渐变黄、脱落死亡,28 d 后只筛选到 1 株抗性苗,并且伸长的芽发黄,苗子较弱,移栽后死亡。推测直接将外植体置于高浓度的潮霉素浓度对丛生芽生长的抑制过强,从而导致筛选效率低下。

重新利用相同的方法将 pCambia1301 载体转

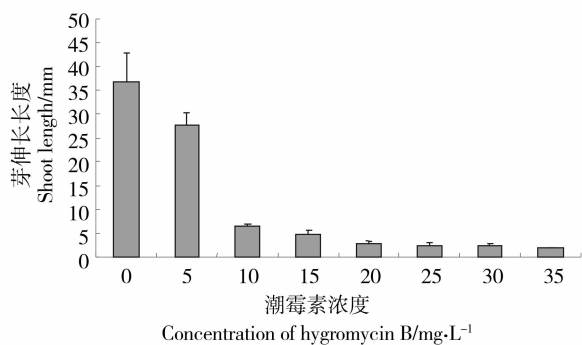


图2 潮霉素浓度对丛生芽伸长的影响

Fig.2 Effect of hygromycin B concentration on shoot elongation length

化262个大豆胚尖,尝试采用潮霉素梯度筛选方法。首先在 $3\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的潮霉素筛选培养基上筛选7 d,之后依次移到 6 、 9 、 12 、 $15\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的潮霉素筛选培养基上各筛选7 d。在 3 和 $6\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的潮霉素筛选浓度的培养基上,所有的外植体均产生绿色的小芽,到 $9\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的潮霉素筛选浓度的培养基上时,丛生芽伸长长度发生差异,约有82个外植体的丛生芽伸长明显快于其它丛生芽,将这些丛生芽移到 12 和 $15\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的潮霉素筛选浓度的培养基上后都可以正常生长,最终筛选出82株抗性苗。通过GUS基因上的PCR引物检测 T_0 代转基因植株,14株有GUS基因的扩增条带,其余66株均无此扩增条带。这表明以 $3\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的潮霉素作为初始筛选浓度筛选压力过低,会造成高达85%的假阳性植株出现。

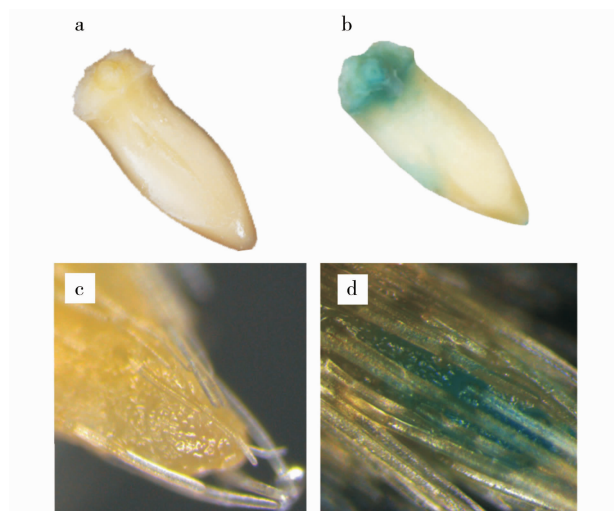
再将pCAMBIA1301载体转化196个大豆胚尖,以 $5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的潮霉素作为初始筛选浓度,继续尝试采用潮霉素梯度筛选方法。首先在 $5\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的潮霉素筛选培养基上筛选7 d,之后转移至 $10\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的潮霉素筛选培养基上筛选7 d,然后移到 $15\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的潮霉素筛选培养基上继续筛选14 d,最终筛选得到了9个抗性植株,PCR检测发现这9株 T_0 代转基因植株均有GUS基因的目的扩增条带。在筛选过程中,抗性丛生芽生长较正常,移栽后容易存活,因此这一梯度筛选浓度是一个比较合理的筛选方案。

2.4 GUS活性的检测

为了追踪转基因的情况,检测了GUS基因在转基因过程中的表达,如图3所示。经转化的胚尖外植体在筛选培养基上筛选1 d后,可以检测到GUS基因的瞬时表达呈现蓝色(图3b),而未转化的胚尖外植体GUS检测没有蓝色(图3a)。

对于利用 $5 \sim 15\text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的潮霉素浓度梯度筛选所获得的9株转基因植株,收获 T_0 代种子,每个株系种植5粒种子。在种植14 d后收获各植株的幼嫩叶片尖端,利用GUS染色检测,检测到其中35

株有不同程度的GUS染色(图3d),而未转化的“荷豆12”则无染色(图3c)。这说明GUS基因既可以在转化后的胚尖外植体中瞬时表达,又可以在潮霉素抗性植株的后代中稳定表达。



a. 未经转化的胚尖;b. 转化后的胚尖;c. 野生型幼叶尖;d. 抗性植株幼叶尖

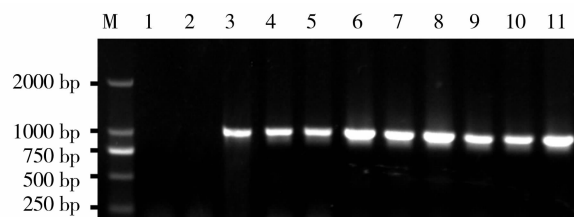
a. Non-transformed embryonic tip; b. Transformed embryonic tip; c. Young leaf tip of wild type plant; d. Young leaf tip of hygromycin resistant plant

图3 转化后的胚尖外植体和幼叶尖GUS染色

Fig.3 Assays for GUS activity in embryonic tip and young leaf tip

2.5 转基因植株后代的分子鉴定

从9个 T_1 代株系中,挑选GUS染色呈阳性的植株各1株,提取幼嫩叶片的DNA,利用PCR检测GUS基因是否插入到大豆基因组中。结果显示:9个转基因株系的代表植株都可以扩增到大小约为1000 bp的目的条带,而作为阴性对照的“荷豆12”野生型植株及水则没有该条带(图4),进一步通过序列测定证实该PCR产物为pCAMBIA1301上的GUS基因片段。



泳道M:DNA分子量标准物D;泳道1:水阴性对照;泳道2:野生型阴性对照;泳道3-11:转基因植株

Lane M: DNA Marker D; Lane 1: Water negative control; Lane 2: Wild type negative control; Lane 3~11: Transgenic plants

图4 PCR检测转基因株系中的GUS基因片段

Fig.4 PCR amplification of DNA fragments of GUS gene in transgenic plants

3 讨论

大豆遗传转化目前仍是植物基因工程公认的难点之一,影响大豆转化效率的因素主要是转化体系和受体系统两方面。随着转化手段的发展,目前已经可以利用大豆植株的多个部分作为外植体进行再生和转化,譬如子叶节、未成熟胚子叶、胚尖、下胚轴、初生叶等。其中,利用胚尖外植体再生系统的方法由于技术相对简单,培养周期短,被广泛地应用于大豆遗传转化中。袁鹰等^[9-10]认为高浓度的 6-BA ($3.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 有利于诱导丛生芽,低浓度 ($1.0 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$) 有利于植株再生;该研究显示用高浓度短时间的 6-BA 诱导有较好的效果, $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 6-BA 诱导 16 h,能显著提高丛生芽的数量和再生效率。抗性植株的筛选是转基因成功的关键步骤之一,该研究结果表明,采用 $5 \sim 15 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ 的潮霉素梯度筛选浓度,有利于抗性丛生芽正常生长,同时又较好地防止了假阳性抗性苗的出现,是一种比较有效的筛选方案。

现在已经研发出很多大豆遗传转化方法,主要包括农杆菌介导法、花粉管通道法、子房注射法、电击法、基因枪法、农杆菌介导和基因枪结合转化法、超声波辅助农杆菌介导法等^[11]。目前应用最为广泛的是农杆菌介导外源基因转化,其中根癌农杆菌介导大豆子叶节的遗传转化系统最为常见;但农杆菌介导大豆遗传转化的频率一直偏低的问题仍然没有解决,同时大量的试验证实不同基因型大豆的转化效率和再生能力存在很大的差异^[12],这在很大程度上限制了其在主栽优良品种上的大规模使用。基因枪法由于其不受基因型的限制,对于农杆菌不能感染的品种,采用该方法可打破基因型的限制;同时由于它具有应用面广、方法简单、转化时间短、转化频率高等优点,因而是大豆遗传转化的一种十分重要的手段^[4,13]。但是由于基因枪轰击的随机性,外源基因进入宿主基因组的拷贝数往往较多,这样转基因后代容易丢失外源基因,引起基因沉默等现象的发生,不利于外源基因在宿主植物中的稳定表达^[14-15]。目前越来越多的试验证实,通过改进试验条件,可以增加单拷贝基因插入的数量^[4],同时基因枪法在多基因转化和新安全型转基因作物培育方面具有不可替代的作用,因此建立高效重复性好的大豆基因枪遗传转化体系对大豆遗传改良的深入研究具有重要的意义。

参考文献

[1] Hincbee M A W, Connor-Ward D V, Newell C A, et al. Produc-

tion of transgenic soybean plants using Agrobacterium-mediated DNA transfer[J]. Nature Biotechnology, 1988, 6:915-922.

[2] McCabe D, Swain W F, Martinell B J, et al. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration[J]. Nature Biotechnology, 1988, 6: 923-926.

[3] Altpeter F, Baisakh N, Beachy R, et al. Particle bombardment and the genetic enhancement of crops: myths and realities[J]. Molecular Breeding, 2005, 15:305-327.

[4] Lowe B A, Shiva Prakash N, Way M, et al. Enhanced single copy integration events in corn via particle bombardment using low quantities of DNA[J]. Transgenic Research, 2009, 18(6):831-840.

[5] 刘海坤,卫志明. 一种大豆成熟种子的消毒方法[J]. 植物生理学通讯, 2002,38(3):260-261. (Liu H K, Wei Z M. A method for sterilizing mature seeds of soybean[J]. Plant Physiology Communications,2002,38(3):260-261.)

[6] Rech E L, Vianna G R, Aragão F J. High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants[J]. Nature Protocols, 2008, 3:410-418.

[7] 王关林,方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京:科学出版社, 2009:438-440. (Wang G L, Fang H J. Plant gene engineering [M]. Beijing: Science Press, 2009:438-440.)

[8] Jefferson R A, Kavanagh T A, Bevan M W. GUS fusions: β -glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants[J]. EMBO Journal, 1987, 6:3901-3907.

[9] 袁鹰,刘德璞. 大豆组织培养再生植株研究[J]. 大豆科学, 2001, 20(1):10-13. (Yuan Y, Liu D P. Study on plant regeneration from soybean culture[J]. Soybean Science, 2001, 20 (1): 10-13.)

[10] 邱承祥,武天龙. 6-BA 对大豆茎尖诱导再生植株的研究[J]. 大豆科学, 2003, 22(1):32-35. (Qiu C X, Wu T L. Study on 6-BA to the regeneration of tip shoot of soybean[J]. Soybean Science, 2003, 22(1):32-35.)

[11] 王振华,杨德光,张辉,等. 大豆遗传转化技术在转基因大豆研究中的应用[J]. 生物技术通报, 2010(10):60-66. (Wang Z H, Yang D G, Zhang H, et al. Research progress of transgene method in transgenic soybean (*Glycine max*) [J]. Biotechnology Bulletin, 2010 (10):60-66.)

[12] 于洋,侯文胜,韩天富. 农杆菌介导大豆遗传转化技术的研究进展[J]. 大豆科学, 2010, 29 (4):696-701. (Yu Y, Hou W S, Han T F. Approaches to Agrobacterium-mediated transformation in soybean[J]. Soybean Science, 2010, 29 (4):696-701.)

[13] Takeuchi Y, Dotson M, Keen N T. Plant transformation: a simple particle bombardment device based on flowing heliumum [J]. Plant Molecular Biology, 1992, 18(12):835-839.

[14] Hany A, El-Shemy Mutasim M, et al. Molecular control of gene co-suppression in transgenic soybean via particle bombardment [J]. Journal of Biochemistry and Molecular Biology, 2006, 39 (1): 61-67.

[15] Travella S, Ross S M, Harden J, et al. A comparison of transgenic barley lines produced by particle bombardment and Agrobacterium-mediated techniques[J]. Plant Cell Reports, 2008, 27(10): 1601-1609.