

利用农杆菌介导法将 *BrCS* 基因导入大豆的研究

张书利^{1,2}, 刘丽君¹, 唐晓飞¹, 魏 峡²

(1. 黑龙江省农业科学院 大豆研究所, 黑龙江 哈尔滨 150086; 2. 东北农业大学 农学院, 黑龙江 哈尔滨 150030)

摘要: 以大豆子叶节作为外植体, 通过农杆菌介导法将含有 *BrCS* 基因的 pCAMBIA3300 的双子叶植物表达载体, 导入到大豆品种黑农 59 和黑农 53 中, 并对黑农 59 遗传转化的影响因素进行了优化, 最终获得了抗性植株。经 PCR 检测和 PCR-Southern 杂交分析, 初步证明了目的基因已整合到大豆的基因组中。

关键词: 大豆; 遗传转化; *BrCS* 基因; 抗冷性; 耐盐性

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2011)04-0569-05

Transformation of *BrCS* Gene into Soybean by *Agrobacterium*-mediated Method

ZHANG Shu-li^{1,2}, LIU Li-jun¹, TANG Xiao-fei¹, WEI Lai²

(1. Soybean Research Institute, Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin 150086; 2. College of Agriculture, Northeast Agricultural University, Harbin 150030 Heilongjiang, China)

Abstract: In this study, plant expression vector pCAMBIA3300-*BrCS* containing-*BrCS*-gene was constructed, and transgenic plants were obtained by *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean (Heinong 59 and Heinong53) cotyledonary nodes. We regenerated plants and optimized the conditions of transformation to increase the efficiency of transformation. PCR and PCR-Southern detection was used to identify the integrated level of *BrCS* gene in transgenic plants; it confirmed the integration of *BrCS* genes into the genome of soybean.

Key words: Soybean; Genetic transformation; *BrCS* gene; Cold-stress tolerance; Salt-stress tolerance

低温和高盐等逆境胁迫是植物生长发育的重要限制因子, 也是影响作物产量的主要非生物胁迫因素^[1-2]。黑龙江省位于我国的最北部, 生长季节低温产生的冷害是对黑龙江农业生产影响最大的气象灾害。阶段性低温冷害频繁发生及其危害程度非常严重, 部分年限的障碍性冷害使大豆落花落荚减产严重。土壤盐碱化是世界性公认的难题, 据统计, 我国东北地区盐碱土面积 384 万 hm^2 , 约占全区总面积的 3.1%, 其中盐碱土耕地总面积 128 万 hm^2 , 占全区总耕地面积的 6.8%^[3]。因此, 改良农作物的抗逆性, 培育抗冷、耐盐农作物抗逆新品种, 已经成为作物品种改良的重要课题。

试验选用李柱刚博士从大白菜中克隆获得的具有抗冷耐盐性的 *BrCS* 基因^[4], 该基因与 *BnCS* 基因的功能相同且序列相近, 刘文萍等^[5]将 *BnCS* 基因导入到黄瓜中, 发现后代的抗冷性显著增强。该试验是将含有 *BrCS* 基因的 pCAMBIA3300 的双子叶植物表达载体, 分别以大豆子叶节为外植体, 通过农杆菌介导法导入到大豆品种黑农 59 和黑农 53 中, 并讨论了

大豆黑农 59 的遗传转化影响因素, 获得了抗性植株。经 PCR 检测和 PCR-Southern 杂交分析, 初步证明目的基因已整合到大豆的基因组中。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 植物材料 大豆转化受体材料为黑农 53 和黑农 59, 由黑龙江省农科院大豆所育种二室提供。

1.1.2 菌株和质粒 含有 *BrCS* 基因的质粒 pCAMBIA2300-*BrCS*, 由黑龙江省农科院生物中心提供; 植物表达载体 pCAMBIA3300、大肠杆菌 DH5 α 、根癌农杆菌 GV3101 由该研究室保存。

1.1.3 试剂 Taq DNA Polymerase、T4 DNA 连接酶购自 TaKa-Ra 公司, 限制性内切酶购自 Promega 公司, 6-Benzylaminopurine (6-BA)、In-dole-3-utyric (IBA) 购自 Sigma 公司, 引物合成和测序均由上海生工完成, 卡那霉素、头孢等均为国产针剂, 其它试剂均为国产分析纯。

收稿日期: 2011-04-14

基金项目: 国家转基因重大专项资助项目 (2008ZX08004-002); 现代农业产业技术体系资助项目 (nycyt-004)。

第一作者简介: 张书利 (1984-), 男, 硕士, 研究方向为作物遗传育种。E-mail: qkpx1984@163.com。

通讯作者: 刘丽君 (1958-), 女, 研究员, 从事大豆遗传育种研究。E-mail: nkyssbd@126.com。

1.2 试验方法

1.2.1 pCAMBIA3300-*BrCS* 载体的构建 分别挑取 pCAMBIA2300-*BrCS* 和 pCAMBIA3300 单菌落,用 LB 液体培养基,37℃、200 r·min⁻¹ 培养后,分别提取 pCAMBIA2300-*BrCS* 和 pCAMBIA3300 质粒。用 *EcoR* I 和 *Hind* III 对含有目的基因的 pCAMBIA2300-*BrCS* 质粒进行双酶切,回收含有 35S + *BrCS* + Nos 完整表达结构的片段。再将载体质粒 pCAMBIA3300 用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切,用 T4 连接酶在 22℃ 的条件下将 2 个回收片段连接过夜。片段的连接、连接产物向大肠杆菌转化详见《分子实验克隆指南》^[6]。

1.2.2 遗传转化的优化 参照唐晓飞^[7]的方法。将预培养 1 d 的子叶节放入菌液中侵染,侵染 25 ~ 30 min。之后接种在共培养基培养基(B5 培养基 + 1.7 mg·L⁻¹6-BA + 0.1 mg·L⁻¹IBA + 100 mg·L⁻¹阿魏酸,0.7% 琼脂粉,pH 5.2)上,分别暗培养 1、2、3、4 d。再分别用 0、200、400、500、600 和 700 mg·L⁻¹的头孢噻肟钠无菌水冲洗后,转接到含相应除菌剂浓度的芽诱导培养基(B5 + 1.7 mg·L⁻¹6-BA + 0.1 mg·L⁻¹IBA,0.7% 琼脂粉,pH 5.7)上培养 7 d,待长出丛生芽后将外植体接种到筛选培养基(B5 + 1.7 mg·L⁻¹6-BA + 0.1 mg·L⁻¹IBA + 4 mg·L⁻¹草丁膦,0.7% 琼脂粉,pH 5.7)。

1.2.3 抗性植株的分子检测 选取经草铵膦筛选

的抗性植株的叶片为材料,采用 CTAB 法提取大豆总 DNA。根据 *BrCS* 基因和 *nos* 基因序列设计一段引物进行 PCR 扩增,扩增片段长度为 439 bp 引物由上海生工生物工程有限公司合成,引物序列分别为:P1:5' ATCCTTCTTCCACCTCTT 3';P2:5' AACCC ATCTCATAAATAACG 3'。PCR 反应条件:94℃ 预变性 5 min;94℃ 变性 30 s,55℃ 复性 30 s,72℃ 延伸 30 s,35 个循环后 72℃ 延伸 5min。将上述重复性好的阳性植株进行 PCR-Southern 杂交(DIG 试剂盒方法)检测。

2 结果与分析

2.1 pCAMBIA3300-*BrCS* 载体的构建

植物表达载体 pCAMBIA3300-*BrCS* 的构建过程见图 1,质粒 pCAMBIA2300-*BrCS* 用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切,回收大小约 1 500 bp 的片段(图 2 泳道 1),含有 35S + *BrCS* + Nos 完整表达结构。载体质粒 pCAMBIA3300 用 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切,回收约 8 500 bp 的片段(图 2 泳道 2),连接 2 个回收片段。将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α ,用 100 mg·L⁻¹的 Km 筛选重组子。对得到的重组子也用 *EcoR* I 和 *Hind* III 酶切鉴定(图 2 泳道 3),能切出与 pCAMBIA2300-*BrCS*/*EcoR* I + *Hind* III 和 pCAMBIA3300/*EcoR* I + *Hind* III 同样大小 2 条带的质粒命名为 pCAMBIA3300-*BrCS*。

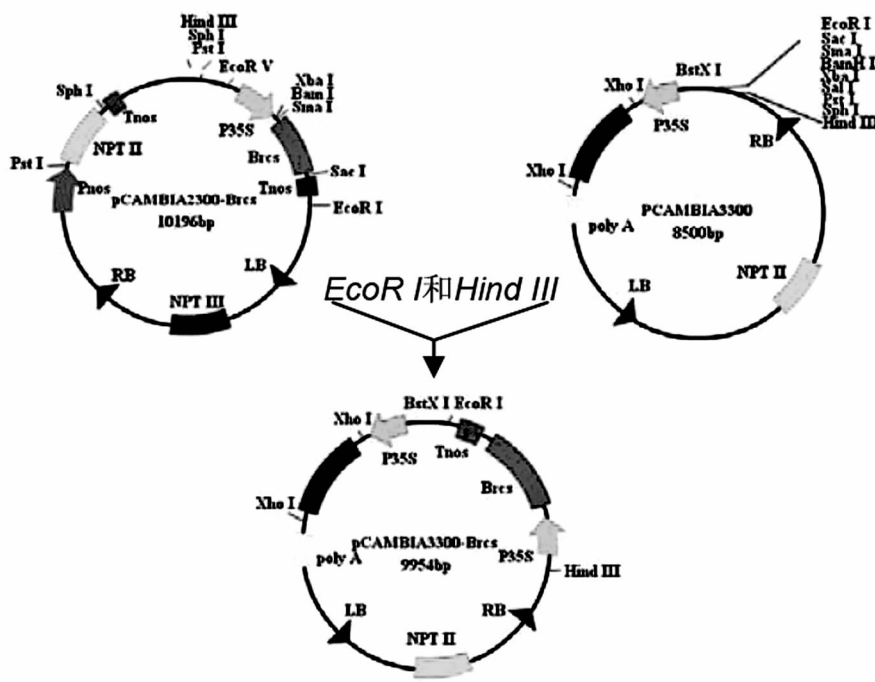
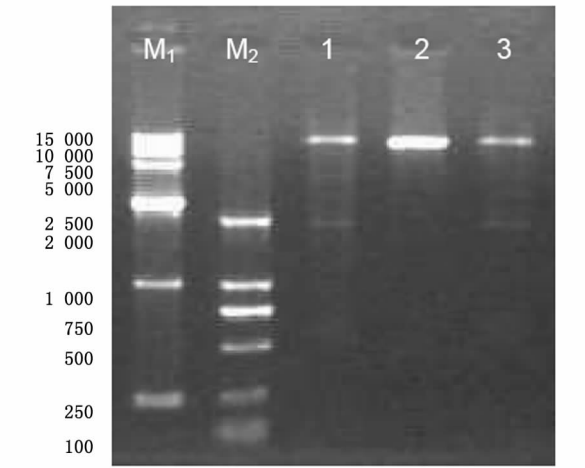


图 1 植物表达载体 pCAMBIA3300-*BrCS* 的构建

Fig. 1 Construction of plant expression vector pCAMBIA3300-*BrCS*



M₁: DL15000; M₂: DL2000; 泳道 1: 质粒 pCambia2300-*BrCS* 的 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切产物; 泳道 2: 质粒 pCambia3300 *EcoR* I 和 *Hind* III 的双酶切产物; 泳道 3: 质粒 pCambia3300-*BrCS* 的 *EcoR* I 和 *Hind* III 双酶切产物。

M₁: DL15000; M₂: DL2000; Lane1: Vector pCambia2300-*BrCS* digested with *EcoR* I and *Hind* III; Lane2: Vector pCambia3300 digested with *EcoR* I and *Hind* III; Lane3: Vector pCambia3300-*BrCS* digested with *EcoR* I and *Hind* III.

图 2 植物表达载体 pCambia3300-*BrCS* 的酶切鉴定结果

Fig. 2 Characterization of plant expression vector pCambia3300-*BrCS* with endonucleases

2.2 遗传转化条件的优化

2.2.1 共培养时间的确定 将黑农 59 经侵染后的子叶节接种到共培养基上分别共培养 1、2、3、4 d, 然后转接到相应的除菌和筛选培养基上进行培养, 24 d 后调查出芽率和污染率。由图 3 可以看出, 随着共培养时间的增加大豆转化频率呈先升高后降低的趋势, 当共培养为 3 d 时, 出芽率最高, 达到了 31.2%, 与李茂福的研究结果基本一致^[8]。但随着共培养时间的延长, 污染率逐渐增加, 脱菌的难度随之增大, 子叶节会由于污染而死亡, 进而导致出芽率降低^[9]。因此, 采用 3 d 作为最适共培养时间。

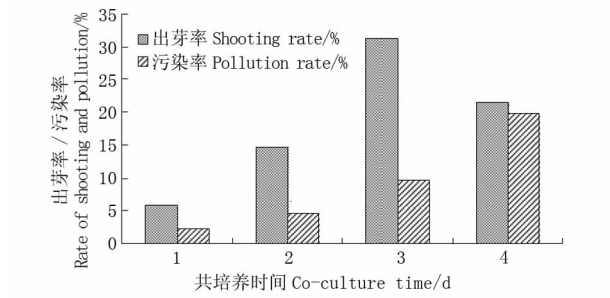


图 3 共培养时间对子叶节转化的影响

Fig. 3 Effect of duration co-cultured with *Agrobacterium* to transformation of soybean cotyledonary node

2.2.2 除菌剂浓度的确定 取已活化的菌液, 分别接种到含有相应抗生素和头孢噻肟钠的 YEB 培养

基中, 28℃、200 r·min⁻¹ 振荡培养后用分光光度计测定菌液浓度。由图 4 可以看出, 随除菌剂浓度的增大, OD₆₀₀ 值逐渐减小; 当除菌剂达到浓度 600 mg·L⁻¹ 后, OD₆₀₀ 值不随除菌剂浓度的增加而减小。将与农杆菌共培养后的大豆黑农 59 的子叶节分别按照 1.2.2 试验方法中所设定的头孢噻肟钠浓度的无菌水冲洗后, 转接到含相应除菌剂浓度的芽诱导培养基上, 观察并统计杂菌污染情况及不定芽的诱导情况。由表 1 可知, 随除菌剂浓度的增大, 不定芽的出芽率稍微减小, 但变化不大, 说明除菌剂对于子叶节不定芽诱导的影响不大。但随着除菌剂浓度的增大, 污染率逐渐减小; 当除菌剂浓度大于 500 mg·L⁻¹ 时, 几乎不会产生污染情况。综合图 4 和表 1 的数据考虑, 最终选取除菌剂浓度为 600 mg·L⁻¹。

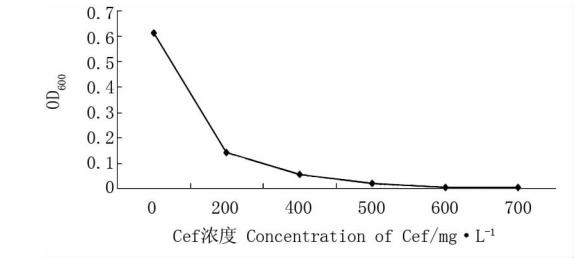


图 4 头孢噻肟钠 (Cef) 抑菌效果

Fig. 4 Influence of Cef on inhibiting propagation of *Agrobacterium*

表 1 头孢噻肟钠 (Cef) 对大豆子叶节不定芽诱导的影响
Table 1 Influence of Cef on shoot different ion of soybean cotyledonary node

Cef 浓度 Concentration of Cef/mg · L ⁻¹	出芽率 Rate of shooting/%	污染情况 Condition of pollution
0	0	++++
200	31.4	++
400	39.2	+
500	37.4	—
600	35.3	—
700	34.6	—

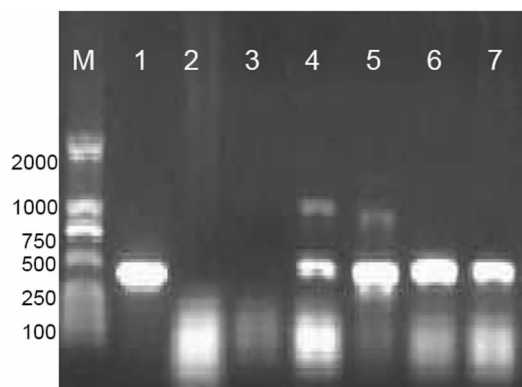
++++ 出现菌且生长很严重; ++ 出现菌且生长不严重; + 有菌但很少; — 无菌出现。

++++ Serious pollution; ++ Slight pollution; + Few pollution; — No pollution.

2.2.3 抗性植株的分子检测 使用草丁膦进行抗性筛选后, 得到了抗性植株。取抗性植株叶片的总 DNA 为模板, 以含目的基因的质粒 pCambia3300-*BrCS* 为阳性对照, 非转基因再生苗黑农 59 和黑农 53 为阴性对照, 以无菌水代替模板 DNA 为负对照, 用已设计的 *BrCS-nos* 引物进行 PCR 扩增。由图 3 和图 4 可以看出, 抗性植株 DNA 都扩增出与质粒 DNA 扩增

产物相同的特异性条带,分子量约为 439 bp,而阴性对照植株则没有扩增出特异性条带。将 PCR 检测重复率高的阳性的转化植株进行 PCR-Southern 检测(图 5),PCR 阳性植株 DNA 扩增片段与质粒 DNA 扩增特

异片段处于同一位置出现杂交信号,而阴性对照植株则没有杂交信号,说明被检测阳性植株扩增出的 PCR 条带确实为特异性的目标带,初步证明 *BrCS* 基因已整合到大豆植株基因组中。

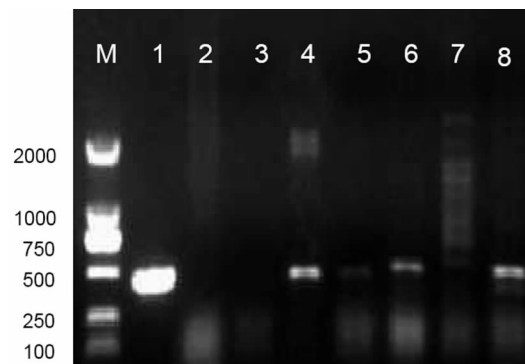


M:DL2000;泳道 1:质粒 pCambia3300-*BrCS*(阳性对照);泳道 2:黑农 59(阴性对照);泳道 3:水对照;泳道 4~7:部分 T₁ 转化植株。

M:DL2000;Lane1:Positive control of pCambia3300-*BrCS*; Lane 2: DNA from untransformed plant Heinong59 (negative control); Lane 3:Negative control of distill deionized water; Lane 4 to 7: DNA of T₁ generation from independently transformed plants.

图 3 以黑农 59 的子叶节作为受体转化 *BrCS* 基因的 T₁ 抗性植株的 PCR 检测部分结果

Fig. 3 The PCR analysis of the resistant plants of soybean Heinong59 T₁ generation using cotyledon node as explant

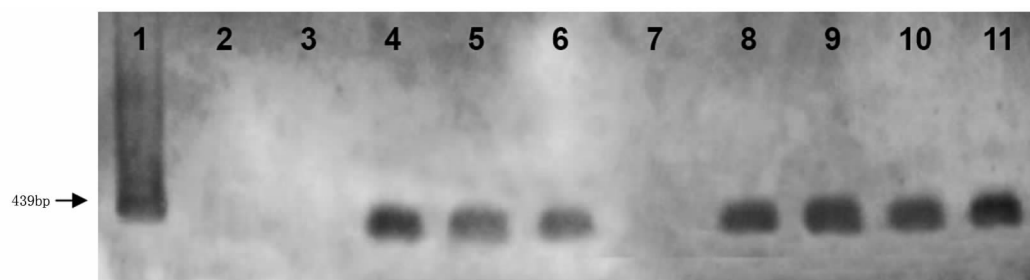


M:DL2000;泳道 1:质粒 pCambia3300-*BrCS*(阳性对照);泳道 2:黑农 53(阴性对照);泳道 3:水对照;泳道 4,6,8:部分 T₁ 转化植株;泳道 5,7:未转化植株。

M:DL2000;Lane1:Positive control of pCambia3300-*BrCS*; Lane 2: DNA from untransformed plant Heinong 53 (negative control); Lane 3:Negative control of distill deionized water; Lane 4,6 and 8: DNA of T₁ generation from independently transformed plants; Lane 5 and 7: Untransformed plant.

图 4 以黑农 53 的子叶节作为受体转化 *BrCS* 基因的 T₁ 抗性植株的 PCR 检测部分结果

Fig. 4 The PCR analysis of the resistant plants of soybean Heinong 53 T₁ generation using cotyledon node as explant



泳道 1:质粒 pCambia3300-*BrCS*(阳性对照);泳道 2:黑农 53(阴性对照);泳道 3:未转化植株;泳道 4~6:T₁ 黑农 53 转化植株;泳道 7:黑农 59(阴性对照);泳道 8~11:T₁ 黑农 59 转化植株。

Lane 1:Positive control of pCambia3300-*BrCS*; Lane 2:negative control of untransformed plant Heinong 53; Lane 3:Untransformed plant; Lane 4 to 6:PCR-Southern transformed plants of Soybean Heinong 53 T₁ generation; Lane 7:negative control of untransformed plant Heinong 59; Lane 8 to 11:PCR-Southern transformed plants of soybean Heinong 59 T₁ generation.

图 5 T₁ 代抗性植株的 PCR-Southern 检测结果

Fig. 5 The PCR-Southern analysis of the resistant plants in T₁ generation

3 讨论

3.1 共培养时间对遗传转化的影响

共培养过程是遗传转化过程中非常重要的步骤^[10-11]。因为农杆菌附着及其 T-DNA 的转移及整合都在这个时期内完成的,因此共培养技术条件的

掌握是遗传转化的关键^[10-11]。若没有共培养, T-DNA 还没能来得及整合到受体细胞中,所以外植体不会产生再生芽。若共培养时间过短,农杆菌附着、T-DNA 的转移及整合不完全则造成出芽率低的后果。然而共培养时间的过长,会使农杆菌过度生长,脱菌的难度随之增大,就会使外植体由于污染

而死亡,最终导致出芽率降低。

3.2 除菌剂浓度对遗传转化的影响

除菌剂的使用浓度直接关系到其培养的状况,能否抑制住农杆菌的生长。如果除菌剂浓度不足,农杆菌会过度生长,致使培养基污染,对子叶节有毒害,从而导致诱导抗性芽困难;除菌剂浓度适中的情况下,除菌剂对于子叶节不定芽诱导的影响很小;但由于植物细胞也有一定的生物效应,在浓度非常高的情况下,也会对子叶节产生一定的伤害^[12]。

3.3 分子检测中的假阳性现象

PCR 检测方法以其操作简单、便捷和快速等优点被应用于转基因植株的鉴定中。但由于 PCR 扩增过程的影响因素很多,经常使检测结果得出错误结论,对试验造成不必要的损失和麻烦,如在遗传转化的过程中,分别在芽诱导和芽伸长阶段添加抗性筛选剂来抑制非转化细胞的生长,虽然筛选剂的压力越大,选择效率越高,但由于浓度过高,就会抑制细胞的生长,为了减轻筛选剂对细胞生长的影响,在遗传转化过程中,筛选剂的加入量要逐渐降低,这样就有利于非转化细胞继续分化生长,虽然成功筛选出抗性植株,但再生植株往往存在嵌合体现象。由于 PCR 技术的高灵敏性,就会导致 PCR 检测后假阳性现象^[13]。造成假阳性的另外一个原因是非特异性扩增,当退火温度较低时引物可与非靶位点错配,导致扩增出多条带,非特异性扩增在转基因植物的检测中是经常出现的问题^[14-15]。所以,PCR 检测只适用于抗性植株的初步鉴定。还需进行 Southern 杂交、Northern 杂交、Western 杂交分析等分子生物学检测,从整合、转录、翻译的水平上来确定外源基因是否整合到植物基因组中。

参考文献

- [1] 梁慧敏,夏阳,王大明. 植物抗寒冻、抗旱、耐盐基因工程研究进展[J]. 草业学报,2003,12(3):1-7. (Liang H M, Xia Y, Wang T M. Progress on cold, drought and salt resistance gene engineering in plants[J]. Acta Prataculturae Sinica, 2003, 12(3): 1-7.)
- [2] 程继东,安玉麟,孙瑞芬,等. 抗旱、耐盐基因类型及其机理的研究进展[J]. 华北农学报,2006,21(1):116-120. (Cheng J D, An Y L, Sun R F, et al. Progress on drought, salt gene types and their acting mechanisms[J]. Acta Agriculturae Boreali-Sinica, 2006, 21(1): 116-120.)
- [3] 姚荣江,杨劲松,刘广明. 东北地区盐碱土特征及其农业生物治理[J]. 土壤,2006,38(3):256-262. (Yao R J, Yang J S, Liu G M. Characteristics and agro-biological management of saline-alkalized land in northeast China[J]. Soils, 2006, 38(3): 256-262.)
- [4] Li Z, Zhao L, Sun, X, et al. *Brassica rapa* subsp. *pekinensis* salt and low temperature response protein mRNA, GenBank: AY601678. 1.
- [5] 刘文萍,卢淑雯,刘建新,等. 2009. 农杆菌介导的 *BnCS* 基因对黄瓜遗传转化研究[J]. 北方园艺,2009(1):20-22. (Liu W P, Lu S W, Liu Jian X, et al. *Agrobacterium*-mediated transformation of cucumber for *BnCS* gene[J]. Northern Horticulture, 2009(1): 20-22.)
- [6] J. 萨姆布鲁克, D. W. 拉塞尔. 分子克隆实验指南[M]. 北京: 科学出版社,2008:27-138. (Joseph S, David R. Molecular cloning: A laboratory manual[M]. Beijing: Science Press, 2008: 27-138.)
- [7] 唐晓飞. 农杆菌介导 *hsf8* 基因转化大豆的研究[D]. 哈尔滨: 东北农业大学,2008:23. (Tang X F. Studies on *Agrobacterium*-mediated transformation of *hsf8* into soybean[D]. Northeast Agricultural University, 2008: 23.)
- [8] 李茂福,李睿,傅永福,等. 农杆菌介导大豆遗传转化的影响因素[J]. 山地农业生物学报,2006,25(4):283-286. (Li M F, Li R, Fu Y F, et al. Influencing factors on the efficiency of *Agrobacterium*-mediated soybean transformation[J]. Journal of Mountain Agriculture and Biology, 2006, 25(4): 283-286.)
- [9] 杨荣仲,谭裕模,李松,等. 大豆子叶节再生及农杆菌介导转化研究[J]. 西南农业学报,2003,16(4):33-38. (Yang R Z, Tan Y M, Li S, et al. Studies on regeneration of soybean cotyledon node and *Agrobacterium*-mediated genetic transformation[J]. Southwest China Journal of Agricultural Sciences, 2003, 16(4): 33-38.)
- [10] 李桂兰,乔亚科,杨少辉,等. 农杆菌介导大豆子叶节遗传转化的研究[J]. 作物学报,2005,31(2):170-176. (Li G L, Qiao Y K, Yang S H, et al. Study of the *Agrobacterium*-mediated transformation systems of soybean cotyledonary node[J]. Acta Agronomica Sinica, 2005, 31(2): 170-176.)
- [11] 姬月梅,陈受宜,李英慧,等. 农杆菌介导大豆子叶节遗传转化体系的优化研究[J]. 大豆科学,2008,27(1):27-32. (Ji Y M, Chen S Y, Li Y H, et al. Optimization of genetic transformation system from soybean cotyledon mediated by *Agrobacterium*[J]. Soybean Science, 2008, 27(1): 27-32.)
- [12] 刘尚前,王罡,季静,等. 农杆菌介导法转化大豆最佳条件的研究[J]. 吉林农业大学学报,2007,29(1):44-47. (Liu S Q, Wang G, Ji J, et al. Optimization of conditions for soybean genetic transformation mediated by *Agrobacterium*[J]. Journal of Jilin Agricultural University, 2007, 29(1): 44-47.)
- [13] 崔少彬. *ODREB2B* 基因转化马铃薯及转 *BcBCP1* 基因马铃薯后代鉴定[D]. 哈尔滨: 东北农业大学,2009:37. (Cui S B. The gene transformation of *ODREB2B* gene in potato and identification of transgenic *BcBCP1* gene of the progenies in potato[D]. Northeast Agricultural University, 2009: 37.)
- [14] Hayashi K, Hashimoto N, Daigen M, et al. Development of PCR-based SNP markers for rice blast resistance genes at the *Piz* locus[J]. Theoretical and Applied Genetics. 2004, 108: 1212-1220.
- [15] 刘晋峰,邢达,沈行燕,等. 电化学发光 PCR 技术检测转基因植物[J]. 生物化学与生物物理进展,2004,31(4):375-378. (Liu J F, Xing D, Shen X Y, et al. Detection of genetically modified plant by electrochemiluminescence PCR method[J]. Progress in Biochemistry and Biophysics, 2004, 31(4): 375-378.)