

# 根癌农杆菌介导大豆转化 *LePT1* 基因的研究

张兴政<sup>1</sup>, 王昌陵<sup>2</sup>, 卢福荣<sup>1</sup>, 韩 阳<sup>1</sup>, 宋书宏<sup>2</sup>

(1. 辽宁大学 生命科学院, 辽宁 沈阳 110036; 2. 辽宁省农业科学院 作物研究所, 辽宁 沈阳 110161)

**摘要:** 采用根癌农杆菌介导大豆胚尖的遗传转化方法将番茄的 *LePT1* 基因导入辽豆 17 基因组中, 以期获得能够高效利用磷素的转基因大豆新品种。PCR 结果表明,  $T_0$  和  $T_1$  代植株基因组均扩增出 1.6 kb 的目的条带, 测序并进行在线 Blast 比对表明该条带与 *LePT1* 基因相同, 与试验预期相一致。结果表明 *LePT1* 基因已成功转入  $T_0$  代植株, 并在  $T_1$  代大豆基因组中稳定遗传。

**关键词:** 大豆; 胚尖; 遗传转化; 根癌农杆菌介导; *LePT1*

**中图分类号:** S565.1

**文献标识码:** A

**文章编号:** 1000-9841(2014)01-0031-04

## Transformation of *LePT1* Gene into Soybean via *Agrobacterium*-mediation

ZHANG Xing-zheng<sup>1</sup>, WANG Chang-ling<sup>2</sup>, LU Fu-rong<sup>1</sup>, HAN Yang<sup>1</sup>, SONG Shu-hong<sup>2</sup>

(1. School of Life Sciences, Liaoning University, Shenyang 110036, China; 2. Crop Institute, Liaoning Academy of Agricultural Sciences, Shenyang 110161, China)

**Abstract:** For the sake of cultivating soybean germplasm with higher phosphorus acquisition efficiency, a *LePT1* gene cloned from tomato genome was transformed into soybean embryos tips via *Agrobacterium*-mediation. PCR results showed 1.6 kb band was amplified from  $T_0$  and  $T_1$  genome respectively, moreover, sequencing and online Blast results indicated that the amplified gene was in accordance with *LePT1*. In summary, the *LePT1* gene was transformed into  $T_0$  plants and inherited steadily in  $T_1$  generation.

**Key words:** Soybean; Embryos tips; Transformation; *Agrobacterium*-mediation; *LePT1*

磷不仅参与植物的正常光合作用、呼吸作用以及能量储备, 还能提高植物的抗逆能力, 是植物在生长发育过程中所必需的大量元素之一。面对土壤中可被植物吸收的可溶性磷素含量非常低<sup>[1]</sup>的现状, 进一步提高植物对磷素的吸收利用能力至关重要<sup>[2-3]</sup>。植物对磷素的吸收主要通过两种磷酸盐转运蛋白系统, 即低亲和力系统和高亲和力系统, 相较于组成型表达的低亲和力转运系统, 低磷诱导型高亲和力转运系统更能体现出植物对低磷胁迫的适应性<sup>[4]</sup>。目前, *LePT1*、*LePT2*、*StPT1* 以及 *StPT2* 等高亲和力磷转运蛋白基因的成功克隆及其相关功能研究也为实现提高植物磷素的吸收能力提供了基因选择和理论基础。

*LePT1* 基因克隆于番茄 (*Lycopersicon esculentum* L.) 基因组, 该基因表达水平受磷缺失显著诱导<sup>[5]</sup>, 使番茄能有效适应低磷胁迫环境。同时, 在低磷胁迫条件下, 转 *LePT1* 基因烟草 (*Nicotiana tabacum*) 和水稻 (*Oryza sativa*) 植株的磷素吸收能力也显著提高<sup>[6-7]</sup>。本研究以大豆胚尖为外植体, 采用农杆菌

介导法<sup>[8]</sup>将 *LePT1* 基因转入大豆, 以期获得能对磷素高效吸收利用的大豆新种质。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 植物材料 大豆 (*Glycine max* L. Merrill) 品种辽豆 17, 由辽宁省农业科学院惠赠。

1.1.2 植物表达载体及菌株 *LePT1* 基因克隆于番茄 (*Solanum lycopersicum*) 基因组, 其基因序列登录号为 AF022873.1; 以卡那霉素抗性为筛选标记的 pCambia2300-*LePT1* 融合植物表达载体<sup>[7]</sup>和根癌农杆菌菌株 LBA4404, 由本实验室保存。

1.1.3 大豆遗传转化过程培养基 所用培养基的基本培养基是 MSB 培养基, 即含有 MS 基本盐以及  $B_5$  有机物, 其中 1/2MSB 为 MS 微量元素减半, 其他营养成分不变。

在大豆遗传转化过程中, 将获得的大豆胚尖外植体接种于添加有  $3.5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  BAP 的 MSB 培养基进行预培养, 预培养后转接至添加有  $5 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  BAP

收稿日期: 2013-06-07

基金项目: 辽宁省科技厅资助项目 (201202083)。

第一作者简介: 张兴政 (1986-), 男, 在读博士, 主要从事大豆分子育种研究。E-mail: zxx20051986@163.com。

通讯作者: 韩阳 (1962-), 女, 博士, 教授, 主要从事植物生物技术研究。E-mail: hanyang\_0802@163.com。

宋书宏 (1964-), 男, 博士, 研究员, 主要从事大豆遗传育种和栽培生理研究。E-mail: sshun@163.com。

和  $200\ \mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$  AS 的液体以及固体 1/2MSB 培养基中进行农杆菌的侵染转化以及共培养,将侵染后的胚尖外植体转接于添加有  $0.2\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA、 $0.2\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BAP 和  $300\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Cef 的固体 1/2MSB 培养基进行恢复培养,然后将其转至含有  $0.2\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA、 $0.2\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  BAP、 $60\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Km 和  $300\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  Cef 的固体 1/2MSB 培养基中诱导丛生芽以及诱导丛生芽的伸长,待芽长至  $3\sim 4\ \text{cm}$  时,将丛生芽切下转至含有  $0.8\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$  NAA 的固体 1/2MSB 培养基中诱导其生根。此过程所用培养基除生根培养基中蔗糖含量为 2% 外,其他均为 3%,同时固体培养基中添加 0.6% 的琼脂。

## 1.2 根癌农杆菌介导大豆胚尖的遗传转化

1.2.1 灭菌 选取没有病斑、颗粒大且饱满的大豆种子放于培养皿中,并放于一充满氯气的密闭容器中熏蒸  $14\sim 16\ \text{h}$ 。

1.2.2 浸泡 大豆种子经消毒灭菌处理后,于无菌水中  $28^\circ\text{C}$  浸泡  $16\sim 20\ \text{h}$ 。

1.2.3 预培养 将浸泡后的种子剥除种皮,并用无菌镊子小心剥取大豆胚尖,去除胚尖刚刚萌动的原叶,将胚尖的胚根向下垂直接种至预培养培养基(PM)中,置于  $25^\circ\text{C}$ ,  $16\ \text{h}$  光照培养  $1\ \text{d}$ 。

1.2.4 侵染 将活化好的含有 *LePT1* 基因的农杆菌菌液,于  $4\ 000\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$ ,  $4^\circ\text{C}$  离心  $10\ \text{min}$  并弃上清,并用等体积的胚尖共培养培养基(CCM 液体)将离心菌体重悬。将预培养后的胚尖外植体置于菌液中于  $28^\circ\text{C}$ ,  $120\ \text{r}\cdot\text{min}^{-1}$  暗培养侵染  $20\ \text{h}$ ,侵染结束后用无菌滤纸将多余菌液擦干备用。

1.2.5 共培养 将侵染后并擦干多余菌液的胚尖外植体按胚根向下垂直接种于 CCM 固体培养基中,并于  $25^\circ\text{C}$  条件下暗培养  $5\ \text{d}$ 。

1.2.6 恢复培养 将共培养后的胚尖外植体转入恢复培养基(RCM)中,并于  $25^\circ\text{C}$ ,  $16\ \text{h}$  光照条件下培养  $7\ \text{d}$ 。

1.2.7 芽筛选伸长培养 将恢复培养后的胚尖外植体接种于含有筛选剂卡那霉素(筛选浓度  $60\ \text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ )的芽筛选伸长培养基(SEM)中,并于  $25^\circ\text{C}$ ,  $16\ \text{h}$  光照条件下进行丛生芽的诱导及伸长培养,每  $10\ \text{d}$  更换新鲜培养基继代  $1$  次。

1.2.8 生根 再生芽长至约  $3\sim 4\ \text{cm}$  时,将其切下转入生根培养基中进行诱导生根。

1.2.9 移栽 当再生植株根长至  $2\sim 3\ \text{cm}$  时打开瓶口,在人工气候箱中进行  $5\sim 7\ \text{d}$  的炼苗后移栽到经高压蒸气灭菌后的移栽基质(营养土:草炭:蛭石

比例为  $1:2:1$ )中。

## 1.3 转基因植株 PCR 检测

以遗传转化植株刚长出的三出复叶为材料,从中提取总 DNA 作为 PCR 模板(具体方法参照 Biospin 植物基因组 DNA 提取试剂盒使用说明),用 *LePT1* 基因的特异引物(*LePT1*-F: GGGGTACCT-CAAACTGCATTGTAGTGTATA; *LePT1*-R: GCTCTAG AATGGCGA ACGATTTGCAAGTG)进行 PCR 扩增,PCR 反应体系为:  $94^\circ\text{C}$  预变性  $5\ \text{min}$ ,  $94^\circ\text{C}$  变性  $30\ \text{s}$ ,  $50^\circ\text{C}$  退火延伸  $30\ \text{s}$ ,  $72^\circ\text{C}$  复性  $30\ \text{s}$ ,进行  $30$  个循环。待 PCR 反应结束后,进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,并与质粒目的条带比对一致后,进一步将全部 PCR 产物进行凝胶纯化,切取含有目的条带的琼脂糖,采用凝胶回收试剂盒回收其 PCR 产物,并将回收得到的目的片段基因进行测序鉴定。

## 1.4 T<sub>1</sub> 代植株的获得

待  $T_0$  代植株成熟后,将获得的种子置于铺有  $2\sim 3$  层湿润滤纸的培养皿中,并于黑暗条件下培养  $3\ \text{d}$ ,诱导种子发芽。在移栽前  $1\ \text{d}$  准备好用于移栽的基质(营养土:蛭石 =  $2:1$ ),并浇足水备用,然后将已诱导发芽的种子,按胚根向下垂直种于基质中,并于  $25^\circ\text{C}$ ,  $16\ \text{h}$  光照条件下培养,经正常管理,获得  $T_1$  代植株。

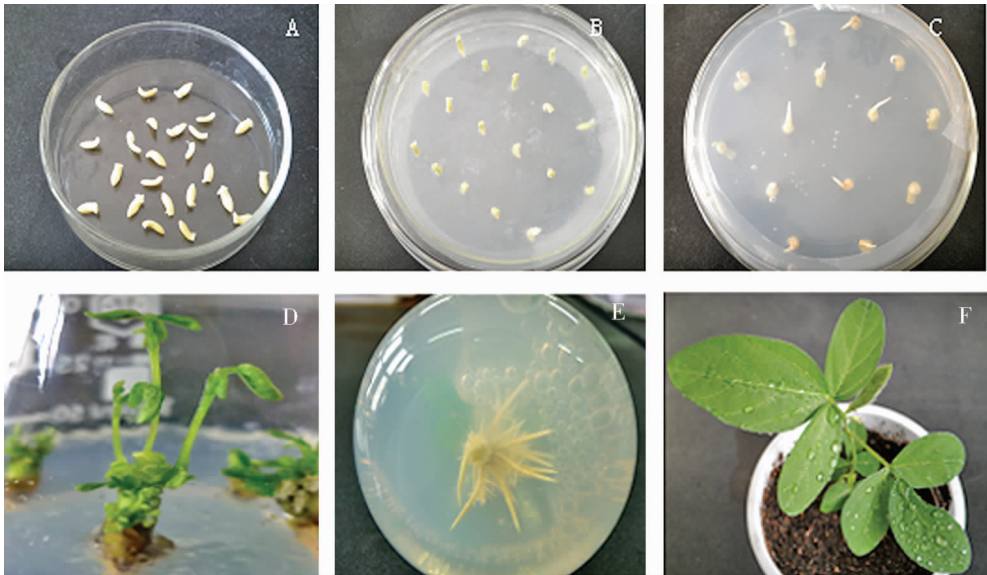
## 2 结果与分析

### 2.1 遗传转化再生植株的获得

以辽豆 17 为材料,经预培养  $1\ \text{d}$  后,切取胚尖作为遗传转化外植体并于含活化 LBA4404 菌体的侵染培养基中侵染  $20\ \text{h}$ ,经共培养  $5\ \text{d}$  以及恢复培养  $7\ \text{d}$  后,将胚尖外植体置于含有筛选剂的芽诱导筛选培养基中进行芽诱导及伸长培养,待芽长至  $3\sim 4\ \text{cm}$  后将其切下并置于生根培养基中诱导其生根,最终获得遗传转化再生植株并移栽至温室中继续培养。主要遗传转化过程见图 1。

### 2.2 T<sub>0</sub> 代大豆转化植株的分子鉴定

2.2.1 PCR 检测 以遗传转化大豆再生植株新鲜叶片为材料,采用 Biospin 植物基因组 DNA 提取试剂盒从大豆叶片中提取其 DNA 作为 PCR 扩增模板,同时以 *pCambia2300-LePT1* 质粒以及本实验室已经成功转化 *LePT1* 的烟草作为阳性对照,以野生型辽豆 17 作为阴性对照,采用 *LePT1* 基因的特异引物进行扩增鉴定。



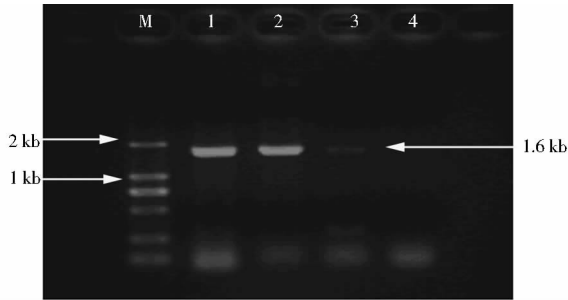
A. 胚尖外植体;B. 预培养;C. 共培养;D. 芽筛选伸长培养;E. 生根培养;F. 遗传转化再生植株。

A. Embryos tip explants; B. Pre-culture; C. Coculture; D. Shoots screening and elongate culture; E. Rooting culture; F. Transformation progeny.

图 1 根癌农杆菌介导大豆胚尖转化 *LePT1* 基因过程

Fig. 1 Transformation of *LePT1* gene into soybean via *Agrobacterium*-mediation process

对扩增产物进行 1% 的琼脂糖凝胶电泳,扩增出预期的 1.6 kb 大小的基因片段(图 2),与目的基因大小一致。



M:DL2000 Marker;1:质粒;2:  $T_0$  代辽豆 17;3: *LePT1* 阳性转化烟草;4:野生型辽豆 17。

M:DL2000 Marker; 1: Plasmid; 2:  $T_0$  generation Liaodou 17; 3: *LePT1* transgene tobacco sample; 4: Wild Liaodou 17.

图 2  $T_0$  代转基因辽豆 17 植株 PCR 检测结果

Fig. 2 PCR result of  $T_0$  generation transgenic Liaodou 17

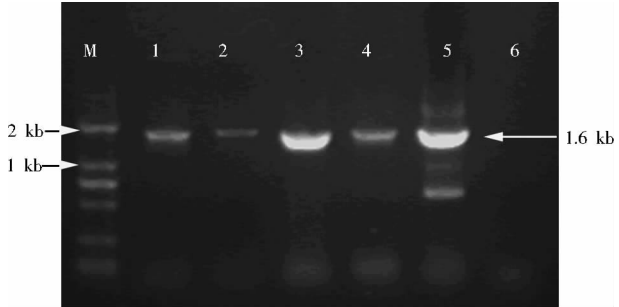
2.2.2 PCR 产物分子测序鉴定 将 PCR 扩增产物进行 2% 凝胶电泳,并对目的条带进行凝胶回收,将回收到的目的条带 DNA 交由上海生工生物技术有限公司进行测序鉴定,并对其测序结果进行在线 Blast 比对。

在线 Blast 比对结果证实,测序结果与 *LePT1* 的 mRNA( GenBank;AF022873. 1) 相一致,证明该基因即 *LePT1* 基因,初步验证该植株为阳性转基因植株。

2.3  $T_1$  代大豆遗传转化植株的分子检测

2.3.1 PCR 检测 以  $T_1$  代大豆植株幼嫩叶片作为检测材料,提取其基因组 DNA 作为 PCR 模板,同时以 pCambia2300-*LePT1* 质粒为阳性对照、野生型辽豆 17 为阴性对照,用 *LePT1* 基因的特异引物进行扩增鉴定。

对扩增产物进行 1% 琼脂糖凝胶电泳检测,结果  $T_1$  代植株成功扩增出大小约为 1.6 kb 的目的条带(图 3),与阳性对照一致,而野生型辽豆 17 则没有该目的条带。结果表明, *LePT1* 基因已成功整合到  $T_1$  代大豆植株中。



M:DL2000 Marker;1,2 和 4,5:  $T_1$  代辽豆 17;3:质粒;6:野生型辽豆 17。

M:DL2000 Marker; 1, 2 and 4, 5:  $T_1$  generation Liaodou 17; 3: Plasmid; 6: Wild Liaodou 17.

图 3  $T_1$  代转基因辽豆 17 植株 PCR 检测结果

Fig. 3 PCR result of  $T_1$  generation transgenic Liaodou 17

### 2.3.2 T<sub>1</sub>代大豆植株 PCR 扩增产物分子测序鉴定

将 PCR 扩增产物进行 2% 凝胶电泳,并将目的条带回收后交由上海生工生物技术有限公司进行测序鉴定,并将获得的测序结果进行在线 Blast 比对。

在线 Blast 比对结果与番茄 *LePT1* 基因一致。表明外源 *LePT1* 基因已成功整合到 T<sub>1</sub>代大豆基因组中,初步表明该基因可在大豆子代中稳定遗传。

## 3 讨 论

植物对磷的吸收和转运主要依靠位于根系细胞膜上的磷转运子来实现,是一种逆浓度的主动运输过程<sup>[9]</sup>,根据环境介质中有效磷浓度的高低,磷转运蛋白基因主要可分为高亲和力蛋白基因家族(*pht1*)和低亲和力蛋白基因家族(*pht2*)两类<sup>[10]</sup>。其中,高亲和力的 *pht1* 磷转运蛋白基因家族,是一种 H<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>/H<sup>+</sup> 共转运子,主要通过质膜上的氢离子浓度梯度来驱动植物对磷的吸收。研究发现,*LePT1* 基因属于高亲和力蛋白基因家族,其能够有效提高番茄在低磷胁迫下对磷素的吸收<sup>[6]</sup>,其基因功能也通过重组敲除磷高亲和转运基因的酵母突变体 PM971 得到了验证<sup>[11]</sup>。本研究已将 *LePT1* 基因成功转入大豆植株。与其他转基因植物一样,*LePT1* 基因在大豆中也可能存在基因沉默和位置效应,以及基因的不稳定遗传。除此之外,外源 *LePT1* 基因的导入对大豆植株除磷素吸收能力以外性状影响的不确定性也将是培育高效优质大豆新品种的另一关键因素。

## 参考文献

- [1] Ozanne P G. Phosphate nutrition of plants-A general treatise [M]//Khasawneh E. The role of phosphorus in agriculture. Madison, W I: American Society of Agronomy, 1980, 1559-5851.
- [2] Schachtman D R, Reid R J, Ayling S M. Phosphorus uptake by plants: from soil to cell [J]. Plant Physiology, 1998, 116: 447-453.
- [3] 王萍,陈爱群,余玲,等. 植物磷转运蛋白基因及其表达调控的研究进展[J]. 植物营养与肥料学报, 2006, 12(4): 584-591. (Wang P, Chen A Q, Yu L, et al. Advance of plant phosphate transporter genes and their regulated expression[J]. Plant Nutrition and Fertilizer Science, 2006, 12(4): 584-591.)
- [4] 路群. 编码水稻磷酸盐转运蛋白基因 *OrLPT1* 的克隆与表达研究[D]. 上海: 上海师范大学, 2005. (Lu Q. Study on the cloning and expression of *OrLPT1*, a gene encoding phosphate transporter in rice (*Oryza sativa* L.) [D]. Shanghai: Shanghai Normal University, 2005.)
- [5] Liu C, Muchhal U S, Uthappa M, et al. Tomato phosphate transporter genes are differentially regulated in plant tissues by phosphorus [J]. Plant Physiology, 1998, 116: 91-99.
- [6] Zhang J, Zhang X, Han Y, et al. Construction of a phosphate transporter gene expression vector and its usage for tobacco transformation [J]. Russian Journal of Plant Physiology, 2013, 60(2): 290-294.
- [7] 洪帅. 番茄磷转运蛋白基因 *LePT1* 和 *LePT2* 在水稻中的功能鉴定[D]. 南京: 南京农业大学, 2011. (Hong S. Functional identification of two tomato phosphate transporter genes *LePT1* and *LePT2* in rice [D]. Nanjing: Nanjing Agricultural University, 2011.)
- [8] 李春风, 张兴政, 韩阳, 等. 根瘤杆菌介导抗菌肽基因转化大豆的研究[J]. 中国油料作物学报, 2012, 34(4): 348-352. (Li C F, Zhang X Z, Han Y, et al. Transformation of anti-microbial peptides gene into soybean via *Agrobacterium*-mediation [J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 2012, 34(4): 348-352.)
- [9] 杨存义, 刘灵, 沈宏, 等. 植物 Pht1 家族磷转运子的分子生物学研究进展[J]. 分子植物育种, 2006, 4(2): 153-159. (Yang C Y, Liu L, Shen H, et al. Advances in the molecular biology of Pht1 family phosphate transporters in plants [J]. Molecular Plant Breeding, 2006, 4(2): 153-159.)
- [10] Muchhal U S, Pardo J M, Raghothama K G. Phosphate transporters from the higher plant *Arabidopsis thaliana* [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of USA, 1996, 93: 10519-10523.
- [11] Daram P, Brunner S, Persson B L, et al. Functional analysis and cell specific expression of a phosphate transporter from tomato [J]. Planta, 1998, 206: 225-233.
- [12] Parrott W A, William E G, Hildebrand D F, et al. Effect of genotype on somatic embryogenesis from immature cotyledons of soybean [J]. Plant Cell Tissue and Organ Culture, 1989, 16(1): 15-21.