

# 超声波辅助处理农杆菌介导大豆胚尖转化转基因植株的获得和分子鉴定

孙式静<sup>1</sup>, 杨素欣<sup>1,2</sup>, 冯献忠<sup>1,2</sup>

(1. 山东省高校系统生物学重点实验室/山东师范大学 生命科学学院, 山东 济南 250014; 2. 中国科学院 东北地理与农业生态研究所/中国科学院 大豆分子设计育种重点实验室, 吉林 长春 130102)

**摘要:**以大豆 Williams 82 成熟胚尖为试验材料, 建立了超声波辅助处理的大豆胚尖农杆菌转化体系, 研究了不同超声波处理时间对报告基因 *UidA* (*GUS*) 瞬时表达的影响和不同草铵膦浓度对大豆转化效率的影响。结果表明: 在超声波处理 2 min 时, 报告基因 *GUS* 的瞬时表达效率达到最高; 在 0.3 ~ 0.6 mg·L<sup>-1</sup> 草铵膦梯度筛选浓度下, 阳性转基因植株的数量最多。对于所获得的转基因株系进行了 PCR 检测和除草剂 Basta 涂抹抗性检测; 实时荧光定量 PCR 检测显示转基因植株的目的基因的表达量达到野生型的 1.7 ~ 42 倍, Southern 杂交检测表明外源基因已经整合到大豆基因组中。

**关键词:** 大豆; 胚尖; 农杆菌转化; 超声波辅助处理

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

DOI: 10.11861/j.issn.1000-9841.2014.06.0808

## Molecular Characterization of the Transgenic Soybean Plants by Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated Transformation Using the Embryonic Tips

SUN Shi-jing<sup>1</sup>, YANG Su-xin<sup>1,2</sup>, FENG Xian-zhong<sup>1,2</sup>

(1. College of Life Science, Shandong Normal University/Key Laboratory of Systems Biology in Universities of Shandong, Jinan 250014, China; 2. Key Laboratory of Soybean Molecular Design Breeding, Northeast Institute of Geography and Agroecology, Chinese Academy of Sciences, Changchun 130102, China)

**Abstract:** *Agrobacterium*-mediated transformation as a practical and common method for introducing specific DNA fragments into plant genomes is well established and the number of transgenic plants produced using this method is increasing. Despite the popularity of the method, low efficiency of soybean transformation is a major challenge for scientists. Modification of transformation method may lead to better understanding of the system and result in high efficiency transformation. In this paper, the sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation (SAAT) system of soybean (*Glycine max*) was set up using embryonic tips of soybean cultivar of Williams 82. The effects of different SAAT duration and glufosinate concentration on transformation efficiency were investigated. The results showed that the transient expression of *UidA* (*GUS*) reporter gene reached the highest with 2 minutes sonication treatment among various time durations. The gradient selection of glufosinate concentration from 0.3 to 0.6 mg·L<sup>-1</sup> produced the highest transformation rate. Transgenic plants were verified by PCR analysis and herbicide paint assay. Real-Time Quantitative PCR showed the expression of target genes in transgenic plant was about 1.7 to 42 times than that in wild type. Southern blot result proved the target gene was integrated into the soybean genome of transgenic plants. This research will provide new information for soybean transformation improvement.

**Key words:** *Glycine max*; Embryonic tips; *Agrobacterium*-mediated transformation; Sonication-assisted treatment

大豆是世界上重要的粮食、油料和饲料作物, 为人类提供了重要的蛋白质和油脂资源。近几十年来, 转基因技术在国外大豆产业的成功应用推动了世界大豆生产的迅速发展, 但是受转化体系和受体系统的影响, 大豆仍然是一种转化效率偏低的作物<sup>[1-2]</sup>。

目前应用于大豆遗传转化最广泛的方法是根瘤农杆菌介导的转化法和基因枪法。基因枪转化法具有插入位点分布随机, 并可同时将多个质粒或

目的 DNA 片段导入植物基因组等优点, 但基因枪法插入的外源基因经常是多拷贝, 给后续的遗传分析带来了困难; 农杆菌介导的转化法具有插入拷贝数较少, 遗传稳定等优点, 但受农杆菌菌株、大豆基因型等因素的影响, 其转化效率仍然较低。超声波辅助的遗传转化方法是近年来逐步发展起来的新型农杆菌转化的方法, Trick 等<sup>[3]</sup>用扫描电镜及光学显微镜观察发现, 超声波处理后使外植体表面及近表面产生大量的细小贯穿通道, 从而使农杆菌与受体

收稿日期: 2014-03-01

基金项目: 国家转基因重大专项 (2014ZX0800943B); 国家自然科学基金 (31271743)。

第一作者简介: 孙式静 (1987-), 女, 硕士, 主要从事大豆遗传转化和分子育种研究。E-mail: liusunshijing@sina.cn。

通讯作者: 杨素欣 (1968-), 女, 博士, 研究员, 主要从事大豆发育分子生物学研究。E-mail: suxinyang@yahoo.com.cn。

材料接触的表面张力减小,农杆菌与受体细胞充分接触,易于外源基因的遗传转化。Santarem 等<sup>[4]</sup>以未成熟子叶为外植体利用超声波辅助进行农杆菌转化,极大地提高了 *GUS* 基因的表达,证明此方法可以大幅度提高转化效率。

本文研究了超声波辅助农杆菌转化大豆成熟胚尖体系,对影响转化效率的因素进行了优化,并对外源基因在转基因植株中的插入和表达进行了分析。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

1.1.1 受体材料 以大豆的测序品种 Williams 82 为受体材料(由本实验室大田种植)。

1.1.2 菌种和质粒 超声波处理所用农杆菌菌株为 *EHA105*,菌株携带质粒 *pCambia3301*(购自 Cambia 公司),质粒 *pCambia3301* 含有 *GUS* 报告基因和植株筛选标记基因 *PPT* 乙酰转移酶基因(*Bar*),两个基因表达均由组成型 35S 启动子所驱动。草铵膦浓度试验和转基因植株的检测试验所用农杆菌菌株为 *EHA101*,菌株携带质粒为 *pTF101 + KLU19*,质粒 *pTF101 + KLU19* 含有植株筛选基因 *PPT* 乙酰转移酶基因(*Bar*)和控制种子大小的基因 *KLU19*,两个基因的启动子均为 35S 启动子,质粒 *pTF101* 由爱荷华州立大学的 Kan Wang 博士惠赠。

### 1.2 方法

1.2.1 种子消毒 挑选成熟、饱满、无伤口的大豆种子以单层平铺的方式放于培养皿中,参照刘海坤等<sup>[5]</sup>的方法用氯气将种子灭菌 11 h。将灭菌后的种子在超净工作台吹风 30 min,移除多余的氯气,医用胶带封好,保存 7 d 后用于侵染。

1.2.2 农杆菌的培养和侵染液的制备 将  $-80^{\circ}\text{C}$  保存的菌种在含筛选抗生素的 YEP 固体培养基上划线生长 2 d;挑取单克隆活化到 5 mL 的含筛选抗生素的 YEP 液体培养基中,  $28^{\circ}\text{C}$  活化过夜;从试管中吸取 1 mL 菌液转移到 100 mL 含筛选抗生素的 YEP 液体培养基中,扩大培养至  $\text{OD}_{600} = 0.5 \sim 0.7$ ;将农杆菌菌液转移至 50 mL 离心管中,  $4^{\circ}\text{C}$ ,  $4\,000\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$  离心 20 min,弃上清;用 MS 培养基( $\text{MS} + 3\% \text{ 蔗糖} + 40\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ AS} + 6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ 6-BA}$ ;  $\text{pH}5.7$ )重悬菌体,调节至  $\text{OD}_{600} = 0.5 \sim 0.7$ ,以备侵染。

1.2.3 胚尖的准备和农杆菌侵染及超声波处理 将灭菌的种子浸泡在无菌水中,黑暗处理 16 h,按照 Elibio 等的方法<sup>[6]</sup>在超净工作台上去掉大豆种皮、

子叶和原叶,得到暴露的胚尖。

将准备好的胚尖放入侵染液中,用 KQ-100DB 型数控超声波清洗器(昆山市超声仪器有限公司)功率 50 W 处理 0, 10, 30, 50, 60, 120, 180, 240, 300 s;将处理后的胚尖在侵染液中浸泡 3 h,期间每 30 min 摇晃 1 次。

1.2.4 芽诱导和共培养 感染后的胚尖用吸水纸将多余的农杆菌菌液去除,埋在芽诱导培养基( $\text{MS} + 3\% \text{ 蔗糖} + 0.7\% \text{ 琼脂} + 6\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ 6-BA}$ ;  $\text{pH}5.7$ )里,芽诱导 16 h 后,将胚尖转移到铺有滤纸的共培养培养基( $\text{MS} + 3\% \text{ 蔗糖} + 40\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ AS} + 0.25\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ GA}_3 + 0.8\text{ g}\cdot\text{L}^{-1} \text{ L-Cys} + 154\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ DTT} + 158\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Na}_2\text{S}_2\text{O}_3 + 0.7\% \text{ 琼脂}$ ;  $\text{pH}5.7$ )表面,培养 2 d。芽诱导和共培养均在黑暗中进行。

1.2.5 抗性芽筛选和生根 共培养后,将材料垂直插在 MS 筛选培养基( $\text{MS} + 3\% \text{ 蔗糖} + 50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ Ti-mentin} + 50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ 万古霉素} + 200\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1} \text{ 头孢霉素} + \text{不同浓度草铵膦} + 0.7\% \text{ 琼脂}$ ;  $\text{pH}5.7$ )中筛选,  $28^{\circ}\text{C}$ , 16 h 光照/8 h 黑暗的光周期,  $50\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$  的光照强度条件下培养。每 14 d 更换 1 次筛选培养基,直至抗性苗伸长至 5 cm,转移到生根培养基( $\text{MS} + 2\% \text{ 蔗糖} + 0.7\% \text{ 琼脂}$ ;  $\text{pH}5.4$ )。待根长出 3 ~ 5 cm 时移栽到温室中生长。

1.2.6 转基因植株的 PCR 检测 CTAB 法提取温室生长的转基因植株叶片基因组 DNA<sup>[7]</sup>。根据 *Bar* 基因序列,利用 Primer Premier 5.0 设计引物,PCR 检测上述提取的基因组 DNA。所用检测 *Bar* 基因的引物序列为: OL1943: 5' -GCGAAGTCTTTATAC-CGAAAGGTTG-3'; OL1944: 5' -TCAGCTCTTTAA TCGCCTGTAAGTG-3', PCR 扩增产物长度为 352 bp。PCR 反应体系的体积为 25  $\mu\text{L}$ ,反应程序为:  $94^{\circ}\text{C}$  预变性 3 min;  $94^{\circ}\text{C}$  变性 30 s;  $59^{\circ}\text{C}$  退火 30 s;  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 25 s, 30 次循环;  $72^{\circ}\text{C}$  延伸 10 min。所获 PCR 产物经 1.0% 的琼脂糖凝胶电泳检测。PCR 反应体系中, *Taq* 酶购买自 TAKARA 公司, dNTP 购自生工生物工程(上海)股份有限公司,引物由华大基因合成; DL-2000 DNA Marker 购自 TAKARA 公司。

1.2.7 *GUS* 表达活性检测 *GUS* 染色参照 Jefferson 等的组织化学染色方法并加以改进<sup>[8]</sup>,外植体加入 1 mL 的 X-gluc 染色液,染色液内含  $10\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ EDTA}$ 、 $50\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ 磷酸盐}(\text{pH}7.0)$ 、 $0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ 铁氰酸钾}$ 、 $0.5\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ 亚铁氰酸钾}$ 和  $2\text{ mmol}\cdot\text{L}^{-1} \text{ X-gluc}$ ,抽真空,  $37^{\circ}\text{C}$  染色 16 h 后于 70% 乙醇中脱色,体视显微镜下观察。

1.2.8 转基因植株的实时荧光定量 PCR 检测 根据天根生化科技(北京)有限公司的 TRNzol-A<sup>+</sup> Re-

agent 试剂盒说明书提取植株幼嫩叶片总 RNA, 利用 NEB 公司的 First Strand Synthesis Protocol with AMV Reverse Transcriptase 试剂盒反转录成 cDNA, 对目的基因 *KLU19* 的表达进行了实时荧光定量检测, 扩增目的基因片段的引物序列为: OL1009: 5'-GATGTTTTGCTTGATTTGGAGAAGG-3'; OL1010: 5'-CTTTGCTTGGATTTCAGGGTGGAG-3', 扩增片段的长度为 166 bp。扩增内参基因 *Actin* 的引物序列为: OL1016: 5'-CGGTGCTTCTATCTTGGCATC-3'; OL1017: 5'-GTCTTTTCGCTTCAATAACCCTA-3', 扩增片段的长度为 248 bp。实时荧光定量 PCR 所用试剂盒为 BIO-RAD 公司 iTaq™ Universal SYBR<sup>R</sup> Green Supermix 试剂盒。实时荧光定量 PCR 反应体系: iTaq™ Universal SYBR<sup>R</sup> Green 2 × Mix 10 μL, 10 μmol·L<sup>-1</sup> 正向引物 0.4 μL, 10 μmol·L<sup>-1</sup> 反向引物 0.4 μL, 50 ng·μL<sup>-1</sup> 模板 DNA 1 μL, 灭菌蒸馏水 8.2 μL, 总体积 20 μL。PCR 反应程序采用两步法: 预变性 95℃ 30 s; 变性 95℃ 15 s, 延伸 60℃ 1 min, 45 个循环。实时荧光定量 PCR 在美国安捷伦 Stratagene 公司实时荧光定量 PCR 仪 Mx3005P 上进行, 实验结果利用仪器所带的 Mixpro 软件分析。

1.2.9 转基因植株的 Southern 杂交检测 转基因植株的基因组 DNA 提取采用 CTAB 大量制备法<sup>[9]</sup>, 取 20 μg 植物基因组 DNA, 用限制性内切酶 *EcoR* V 和 *Pst* I (购自 NEB 公司) 完全酶解, 采用 Sambrook 等分子克隆实验指南中的向上的毛细管转移方法将 DNA 从胶上转至带正电荷的尼龙膜 (Hyband N+, Amersham) 上。以 pTF101 + *KLU19* 质粒为模板扩增检测探针, 用于扩增探针的两个引物序列分别为: OL2037: 5'-TCTTCACGGGTTCACACCTCACAG-3'; OL2038: 5'-CAGGTTC GGAATGTCTGCTTCGGAT-3', 探针长度 908 bp。探针的制备和 Southern 杂交的步骤按地高辛标记试剂盒 II (罗氏公司) 说明书进行。

## 2 结果与分析

### 2.1 不同时间超声波处理对 *GUS* 基因瞬间表达的影响

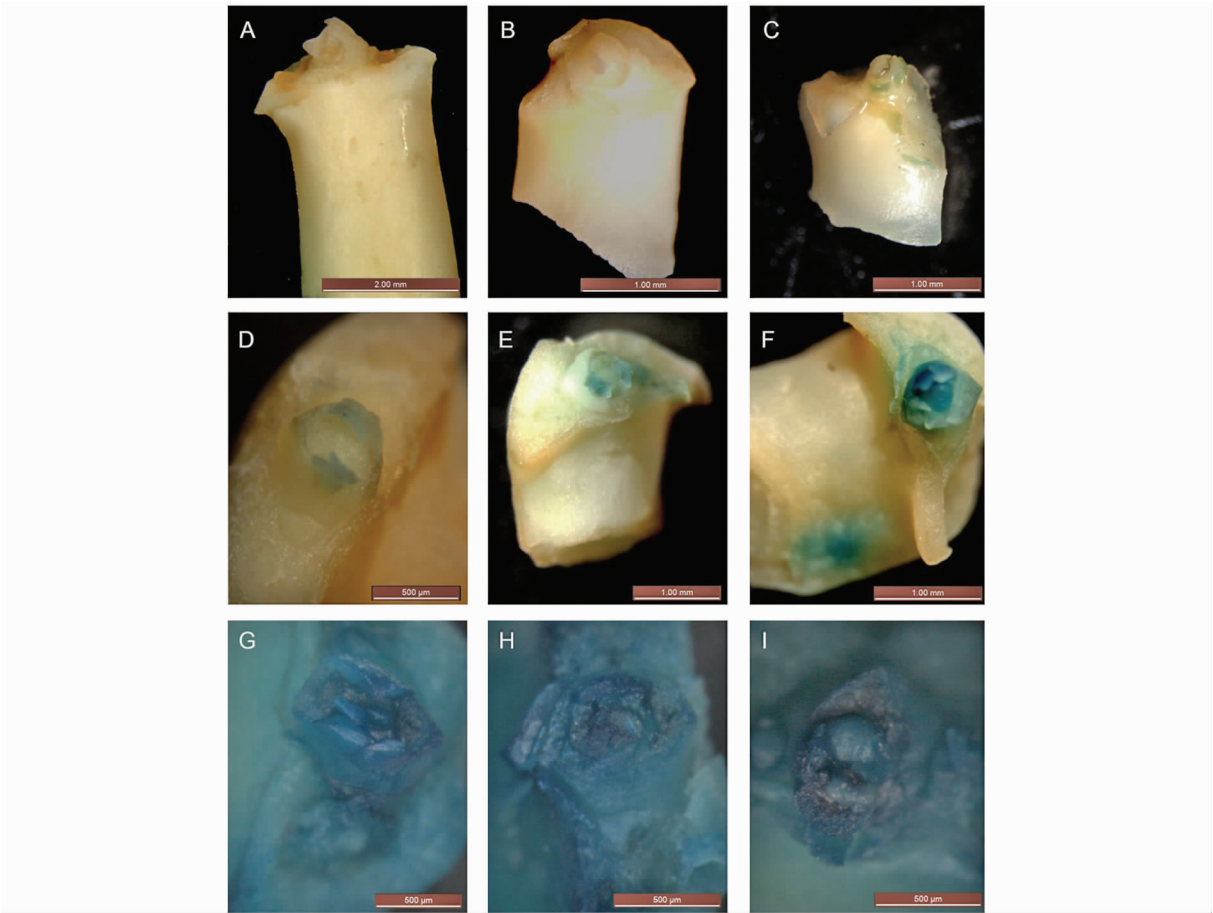
将 Williams 82 胚尖浸泡在农杆菌侵染液中, 每 80 个胚尖用数控超声波清洗器分别处理 0, 10, 30, 50, 60, 120, 180, 300 s 后, 经黑暗诱导 16 h 和黑暗共培养 2 d 后, 胚尖的 *GUS* 瞬间表达的阳性率分别为 0, 0, 15%, 35%, 60%, 88%, 92%, 98% 和 100%。在没有超声波处理的对照组和超声波处理低于 30 s 时, *GUS* 几乎没有瞬间表达 (图 1A ~ B); 当超声波

处理时间增加到 30 s 后, 所处理胚尖的 *GUS* 瞬时表达显著升高; 其后随着超声波处理时间的增强, *GUS* 染色效果也越来越明显 (图 1C ~ I)。在超声波处理 120 s 时, 胚尖的 *GUS* 瞬间表达的阳性率可高达 88%, 此时 *GUS* 染色主要集中在生长点周围 (图 1F)。当处理时间长于 120 s 时, *GUS* 的染色范围向周围其他组织延伸, 当处理时间大于 180 s 后, *GUS* 的染色扩展到了整个组织 (图 1G ~ I)。由于超声波处理时间越长对胚尖外植体造成的伤害越大, 根据 *GUS* 的瞬时表达率和染色范围, 后续实验确定超声波处理时间为 120 s。

### 2.2 草铵膦筛选浓度选择

将 Williams 82 胚尖在侵染液中超声波处理 120 s 后, 分别垂直放置于含有 0, 0.3, 0.6, 0.9 和 1.2 mg·L<sup>-1</sup> 的草铵膦的筛选培养基中, 每个筛选浓度样品数为 80 个, 28 d 后统计芽长大于 5 cm 的数目。结果显示, 当在培养基中不加筛选剂草铵膦时, 28 d 后 50% 的胚尖都可以伸长到 5 cm; 在筛选浓度为 0.3, 0.6, 0.9 和 1.2 mg·L<sup>-1</sup> 时芽长大于 5 cm 的比率分别为 13.75%、6.25%、5.00% 和 3.25% (图 2A), 从图中可以看出 0.3 mg·L<sup>-1</sup> 的草铵膦足以抑制非抗性芽的伸长。

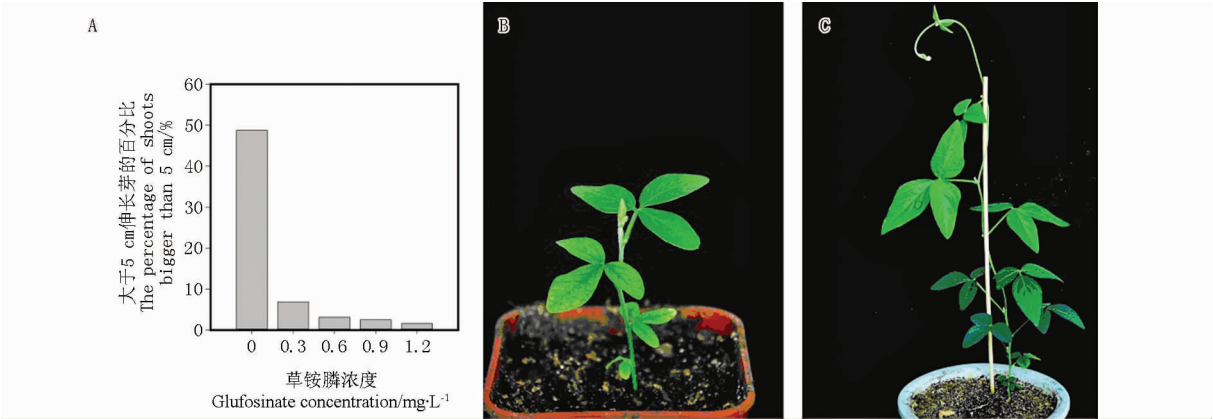
不同草铵膦浓度培养基中的胚尖, 在相应筛选培养基中筛选 56 d 后, 将芽长大于 5 cm 的胚尖转移到生根培养基上, 待主根长于 3 cm 时转移到温室 (图 2B 和图 2C)。在不加草铵膦的培养基中, 56 d 后全部植株都已生根, 转移到温室 73 株成活; 在草铵膦筛选条件为 0.3, 0.6, 0.9 和 1.2 mg·L<sup>-1</sup> 时, 移到生根培养基上的外植体数目分别为 39, 11, 5 和 4 个, 全部外植体都成功生根, 移栽到温室后 55 株成活, 分别获得抗性苗 35, 11, 5 和 4 株。可见, 草铵膦浓度为 0.3 mg·L<sup>-1</sup> 所获得的抗性植株明显高于其他处理组, 在 0.3 与 0.6 mg·L<sup>-1</sup> 草铵膦筛选压之间获得抗性植株的数量产生较大的差异, 推测是由于 0.3 mg·L<sup>-1</sup> 草铵膦筛选压太低, 产生较多的假阳性植株。为了进一步确定更优化的筛选浓度, 重新选取 80 个胚尖, 首先在 0.3 mg·L<sup>-1</sup> 草铵膦筛选压下筛选 14 d, 再转到 0.6 mg·L<sup>-1</sup> 草铵膦筛选压下筛选 14 d, 经统计伸长的芽长大于 5 cm 的比率为 10.0%, 低于在 28 d 时所统计的 0.3 mg·L<sup>-1</sup> 草铵膦筛选压 13.75% 的伸长率, 但明显高于 0.6 mg·L<sup>-1</sup> 草铵膦筛选压 6.25% 的伸长率。外植体继续经过 0.6 mg·L<sup>-1</sup> 草铵膦筛选压的后续 3 轮筛选, 有 21 株抗性苗转移到生根培养基上, 最终转移到温室成活的抗性苗 18 株。



A: 超声波处理的对照组胚尖; B~I: 超声波分别处理 10, 30, 50, 60, 120, 180, 240, 300 s 的胚尖。  
A: Control shoot tip without SAAT; B-I: SAAT for 10, 30, 50, 60, 120, 180, 240 and 300 s, respectively.

图 1 不同时间超声处理对胚尖 *GUS* 染色瞬间表达的影响

Fig. 1 The *GUS* staining of shoot tips with different sonication treatment time



A: 不同草铵膦筛选浓度对胚尖芽伸长的影响; B: 草铵膦抗性苗转移至温室 14 d 后的生长情况; C: 草铵膦抗性苗转移至温室 60 d 后的生长情况。

A: Effects of glufosinate selection concentration on the enlongation of shoots; B: The growth of glufosinate resistance plants after being transferred into greenhouse for 14 days; C: The growth of glufosinate resistance plants after being transferred into greenhouse for 60 days.

图 2 草铵膦抗性芽及抗性植株

Fig. 2 Glufosinate resistance shoots and plants

2.3 转化抗性植株 T<sub>0</sub>代的 PCR 鉴定

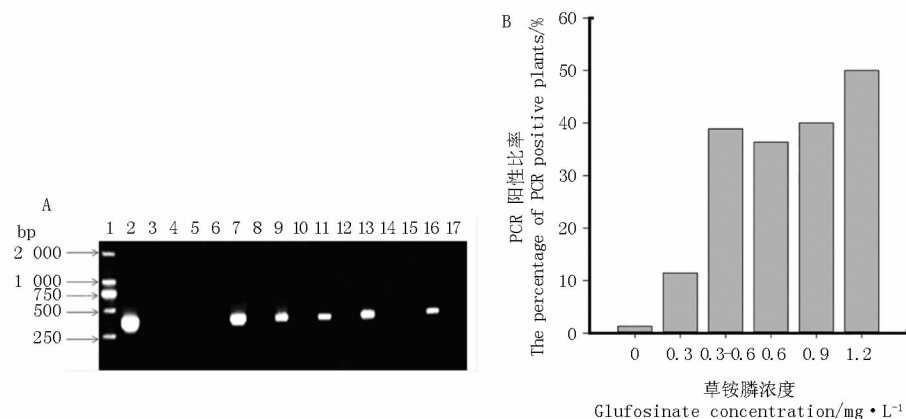
抗性植株在温室生长 30 d 后,提取叶片基因组 DNA,利用 *Bar* 基因的检测引物 OL1943/OL1944,对转移到温室的 73 株转基因植株进行外源导入 *Bar*

基因的 PCR 检测(图 3A)。PCR 结果显示,在草铵膦浓度为 0.3,0.6,0.9 和 1.2 mg·L<sup>-1</sup> 的筛选条件下,分别检测的 PCR 阳性植株为 4,4,2 和 2 株,在移栽抗性植株中 PCR 阳性比率分别为 11.43%、

36.36%、40.00%、50.00% (图 3B), 说明随着草铵膦筛选浓度的增加, 抗性植株中的假阳性率降低。在  $0.3 \sim 0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的梯度筛选条件下, 获得了 7 株抗性植株, 阳性率为 38.89% (图 3B)。

说明在  $0.3 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  草铵膦筛选浓度下, 所获得的转基因植株中假阳性率很高。当草铵膦筛选浓度增加到  $0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  后, 获得的草铵膦抗性苗 PCR

阳性比率的差距逐步缩小。而在  $0.3 \sim 0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的梯度筛选压下, 不仅能够获得抗性植株, 而且 PCR 阳性率也达到了较高的程度, 综合获得草铵膦抗性苗的数量和后代 PCR 检测阳性植株数目, 认为  $0.3 \sim 0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的梯度筛选是比较合适的筛选条件。



A: 转基因植株中 *Bar* 基因的 PCR 鉴定; 泳道 1: M-DL2000 DNA marker; 泳道 2: 阳性对照; 泳道 3: 野生型阴性对照; 泳道 4: 水阴性对照; 泳道 5~17: 转基因植株; B: 不同草铵膦筛选浓度下获得转基因植株的 PCR 检测阳性比率。

A: PCR amplification of DNA fragments of *Bar* gene in transgenic plants; Lane 1: M-DL2000 DNA marker; Lane 2: Positive Control; Lane 3: Wild type negative control; Lane 4: Water negative control; Lane 5-17: Transgenic plants; B: PCR detection positive rate of transgenic plants with different glufosinate concentration screening.

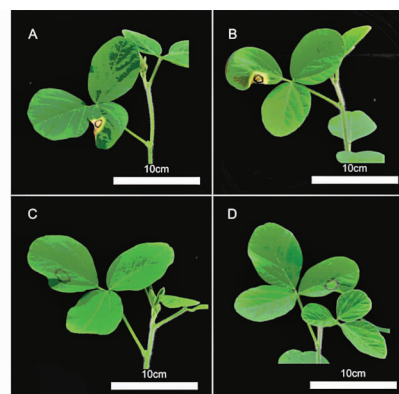
图 3 转基因植株中 *Bar* 基因的 PCR 鉴定和不同草铵膦筛选浓度下获得转基因植株的 PCR 检测阳性比率

Fig. 3 PCR amplification of DNA fragments of *Bar* gene in transgenic plants and PCR detection positive rate of transgenic plants with different glufosinate concentration screening

## 2.4 转化抗性植株的除草剂抗性检测

将抗性植株转移到温室后, 炼苗 14 d, 第 28 天待植株生长足够健壮时对新长出的三出叶涂抹稀释 1 000 倍的 10% Basta 溶液除草剂检测, 5 d 后观察叶片的反应。所检测的抗性植株大部分植株叶片变黄 (图 4B), 15 株植株对除草剂不反应 (图 4C 和图 4D), 其中在草铵膦的筛选条件分别为 0.3, 0.6, 0.9 和  $1.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  时, 分别获得 2, 3, 2 和 2 株除草剂抗性植株, 在转化抗性植株中有除草剂抗性的阳性率分别为 5.71%、27.27%、40.00% 和 50.00%。与上述 PCR 检测结果相比较, 在 0.3 和  $0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  筛选压下, 所获的转基因抗性苗的除草剂抗性的阳性率有所降低, 而在 0.9 和  $1.2 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的筛选浓度时二者相一致, 说明在较高草铵膦筛选压下可以获得更为可靠的草铵膦抗性植株。

在  $0.3 \sim 0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的梯度筛选所获的 18 株转化抗性植株中所检测到的 7 株 PCR 阳性植株中, 有 5 株呈现除草剂阳性反应, 两者的一致率达到 71.43%; 其所检测的转化抗性植株的除草剂阳性检测率达到 27.78%, 与  $0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  筛选浓度 27.27% 的除草剂阳性率相当, 这进一步证明  $0.3 \sim$



A: 野生型; B: 除草剂敏感的植株; C~D: 除草剂抗性植株。  
A: Wild type; B: Herbicide sensitive plant;  
C-D: Herbicide resistant plants.

图 4 大豆幼嫩叶片的除草剂抗性检测

Fig. 4 Herbicide resistant test of soybean young leaves

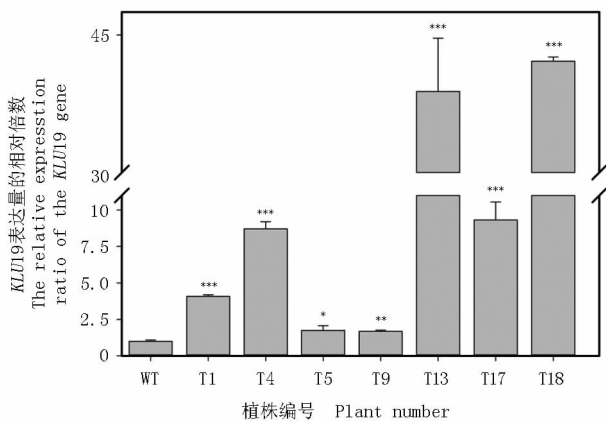
$0.6 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$  的梯度筛选是一个适合的筛选条件, 在此条件下除草剂阳性转基因苗与转化胚尖外植体数目的比率可以达到 6.25%, 因此采用此条件进行后续的实验。

## 2.5 转基因植株的实时荧光定量 PCR 检测

据上述结果, 利用携带 *pTF101 + KLU19* 质粒的农杆菌浸染 200 个 Williams 82 胚尖材料, 超声波



处理 120 s, 0.3 ~ 0.6 mg·L<sup>-1</sup> 的梯度筛选下, 获得了 55 个抗性植株, 转移到温室全部存活, 其中 21 个为 *Bar* 基因 PCR 检测阳性, 15 个为除草剂阳性植株, 除草剂阳性转基因苗与转化胚尖外植体数目的比率为 7.50%。选取 7 株转基因植株单株收取幼嫩的植株叶片, 以 *Actin* 为内参基因, 对 *KLU19* 基因的表达情况进行了实时荧光定量 PCR 检测, 每个样品重复 3 次。检测结果显示, 所检测的 7 株转基因植株的 *KLU19* 基因的表达量都有不同程度的上升, 分别为野生型的 4.08 ± 0.10 倍、8.71 ± 0.48 倍、1.74 ± 0.32 倍、1.68 ± 0.07 倍、38.84 ± 5.81 倍、9.31 ± 1.24 倍和 42.13 ± 0.48 倍。其中 T13 和 T18 植株表达量与野生型相比较上升 30 倍以上, T5 和 T9 表达量变化不明显, 说明在不同的转基因株系中 *KLU19* 基因的表达量存在差异 (图 5)。



\* 差异不显著; \*\* 差异显著; \*\*\* 差异非常显著。

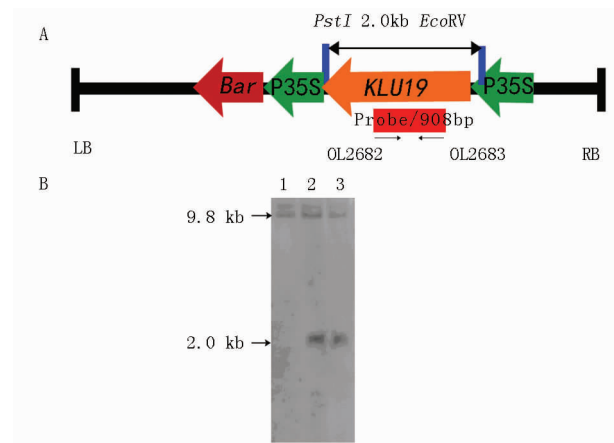
\* no significant difference; \*\* significant difference; \*\*\* very significant difference.

图 5 转基因植株中 *KLU19* 基因的表达

Fig. 5 Expression of *KLU19* gene of transgenic plants

## 2.6 转基因植株的 Southern 杂交检测

以野生型 Williams 82 为对照, 选取上述表达量较高的 2 株转基因植株 T13 和 T18, 大量法提取 DNA, 用限制性内切酶 *EcoR* V 和 *Pst* I 进行酶切, 以 908 bp 的 *KLU19* 基因片段作为探针 (图 6A), 进行 Southern 杂交, 检测外源 *KLU19* 基因的插入情况。Southern 杂交结果显示, 野生型 Williams 82 和 2 株转基因植物中均显示出内源性 *KLU19* 基因 9.8 kb 的杂交条带, 转基因植株中呈现出 2.0 kb 的杂交条带 (图 6B)。这一杂交条带与预期的 pTF101 + *KLU19* 质粒上 *EcoR* V 和 *Pst* I 酶切片段 2.04 kb 大小一致, 说明 pTF101 + *KLU19* 质粒上的 T-DNA 片段插入到转基因植株基因组中。在 9.8 kb 杂交条带的上方出现了一条非预期微弱杂交条带, 推测是由于酶切不完全或基因组中其他同源序列的杂交信号。



A: 杂交探针在 pTF101 + *KLU19* 质粒上位置示意图; LB: T-DNA 左边界; P35S: 35S 启动子; RB: T-DNA 右边界; B: Southern 印迹照片; 泳道 1: 野生型; 泳道 2: 转基因植株 T13; 泳道 3: 转基因植株 T18。

A: The sketch of probe position in pTF101 + *KLU19* plasmid; LB: Left border of T-DNA; P35S: 35S promoter; RB: Right border of T-DNA; B: Southern blot result; Lane 1: Wild type; Lane 2: Transgenic plant T13; Lane 3: Transgenic plant T18.

图 6 转基因植株 Southern 印迹检测 *KLU19* 基因的插入

Fig. 6 Detection of insertions of *KLU19* gene in transgenic plants with Southern blot

## 3 结论与讨论

尽管目前大豆的转化方法有许多成功的报道, 但与水稻等作物相比, 大豆的遗传转化效率仍然较低。限制大豆遗传转化效率的因素, 除了转化的体系之外, 受体系统是一个重要的因素。作为遗传转化体系中的受体系统, 外植体能否高效地接收外源基因的整合, 以及在转化过程中能否有效地筛选到抗性细胞和再生出无性繁殖系是决定转化成败的关键因素。大豆子叶节是目前最为广泛地应用于作为外植体的受体系统, 研究者也利用未成熟胚、胚尖、胚轴、半种子、初生叶、花序等作为受体成功获得了转基因大豆植株<sup>[11-16]</sup>。由于不同外植体类型对农杆菌敏感性及其再生效率不同, 其转化效率也存在明显差异, 利用胚尖作为转化的外植体, 其转基因效率明显高于子叶节和子叶等外植体; 同时, 胚尖具有基因型特异性, 并且胚尖具有较强的分生能力, 再生细胞是由转化细胞产生的, 因而可以降低嵌合体的出现<sup>[17]</sup>。如 Liu 等<sup>[12]</sup>用大豆胚芽尖、胚轴、子叶节分别作为外植体进行 *GUS* 基因的遗传转化, 发现胚芽尖的重生芽发生效率达到 87.7%, 而子叶节和胚轴分别为 40.3% 和 56.4%; 农杆菌胚尖转化系统高于其他外植体转化系统。这与我们以前的研究结果一致<sup>[16, 18]</sup>, 在本试验中利用胚尖作为外植体转化也得到了较高的转化效率。基因型一直被认为是影响大豆转化效率的一个重要因素, 在

前期的不同基因型大豆品种子叶节丛生芽的诱导率比较试验中,Williams 82 处于中等水平<sup>[19]</sup>。Williams 82 作为目前国际上唯一已经完成全基因组测序的栽培大豆品种,建立其高效转化体系对于在清晰的基因组背景上研究大豆基因的功能至关重要,本研究所建立的高效 Williams 82 成熟胚尖转化体系可为今后深入开展这方面的研究奠定基础。

在农杆菌介导的遗传转化中,农杆菌对于外植体的有效浸染是决定转化效率的一个关键因素。利用超声波辅助大豆胚尖遗传转化,超声波可以造成细小的穿孔,减小农杆菌进入植物组织的阻力,因而可以大大提高转基因的效率<sup>[3,4]</sup>。利用该方法操作简便,超声波制造的伤口均匀和广泛,比其他机械创伤法更具优势。本试验中,当超声波处理时间增加到 30 s 后 *GUS* 瞬时表达显著升高,在超声波处理 120 s 时 *GUS* 瞬间表达的阳性率可高达 88%,此时 *GUS* 染色主要集中在生长点周围,可以有效地提供农杆菌进入的通道。而当处理时间大于 180 s 后,超声波处理时间越长对胚尖外植体造成的伤害越大,*GUS* 的染色扩展到了整个组织。因此,本试验选择 120 s 为超声波处理时间。

通过对转基因植株的 PCR 鉴定和除草剂双重筛选,发现在 0.3 mg·L<sup>-1</sup> 的草铵膦筛选压下,尽管可以获得较多数目的抗性苗,但假阳性率过高;随着草铵膦筛选压的增加,抗性苗数目依次降低,推测过高浓度的草铵膦不仅对于非转基因的芽伸长有较强的抑制作用,同时对于农杆菌已经侵染进去的植物细胞也产生抑制作用,从而导致转基因效率的降低。在 0.3 ~ 0.6 mg·L<sup>-1</sup> 的草铵膦筛选压下,大于 5 cm 的伸长芽的数量虽然比 0.3 mg·L<sup>-1</sup> 筛选压下获得的数目少,但最终所获得阳性转基因植株比例却比其他筛选压的大。在本试验中,建立了超声波处理大豆胚尖 120 s,草铵膦筛选浓度为 0.3 ~ 0.6 mg·L<sup>-1</sup> 的遗传转化条件,最终除草剂阳性转基因苗与转化胚尖外植体数目的阳性率可以达到 6% 以上,这高于普通的子叶节法。试验同时也证明,通过 PCR 和除草剂的双重筛选,可以有效排除假阳性植株,提高转基因植株筛选鉴定的真实性。

## 参考文献

- [1] 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, et al. Approaches to *Agrobacterium*-mediated transformation in soybean[J]. Soybean Science,2010,29(4):696-701.)
- [2] 杨向东,隋雨,李启云,等. 大豆遗传转化技术研究进展[J]. 大豆科学,2012,31(2):302-315. (Yang X D, Sui L, Li Q Y, et al. Recent advances in soybean transformation[J]. Soybean Science,2012,31(2):302-315.)
- [3] Trick H N, Finer J J. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] embryogenic suspension culture tissue[J]. Plant Cell Reports,1998,17(6-7):482-488.
- [4] Santarem E R, Trick H N, Essig J S, et al. Sonication-assisted *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean immature cotyledons; optimization of transient expression[J]. Plant Cell Reports,1998,17(10):752-759.
- [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, Aragao F J. High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants[J]. Nature Protocols,2008,3(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: beta-glucuronidase as a sensitive and versatile gene fusion marker in higher plants[J]. Embo Journal,1987,6(13):3901-3907.
- [9] Murray M G, Thompson W F. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. Nucleic Acids Research,1980,19(8):4321-4325.
- [10] Sambrook J, Russell David W. Molecular cloning: a laboratory manual. Vol. 3. 1989[K]. US Patents: Cold Spring Harbor Laboratory Press,2009.
- [11] Hwang Y, Dawson J, Sigareva M, et al. Transformation of immature soybean seeds through organogenesis: US Patents, US 2008/0229447 A1[P]. 2008-9-18.
- [12] Liu H K, Yang C, Wei Z M. Efficient *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybeans using an embryonic tip regeneration system[J]. Planta,2004,219(6):1042-1049.
- [13] Ko T S, Lee S, Krasnyanski S, et al. Two critical factors are required for efficient transformation of multiple soybean cultivars: *Agrobacterium* strain and orientation of immature cotyledonary explants[J]. Theoretical and Applied Genetics,2003,107(3):439-447.
- [14] Wang G L, Xu Y N. Hypocotyl-based *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean (*Glycine max*) and application for RNA interference[J]. Plant Cell Reports,2008,27(7):1177-1184.
- [15] Zhong H, Que Q D. Method for transforming soybean (*Glycine max*): US Patents, US 2009/0023212 A1[P]. 2009-1-22.
- [16] 张敏,杨素欣,邵群,等. 一种安全高效大豆转化筛选体系的建立[J]. 生物技术通报,2012(5):66-70. (Zhang M, Yang S X, Shao Q, et al. A High-efficient and safe selection system of soybean transformation[J]. Biotechnology Bulletin,2012(5):66-70.)
- [17] Shan Z, Raemakers K, Tzitzikas E N, et al. Development of a highly efficient, repetitive system of organogenesis in soybean [*Glycine max* (L.) Merr][J]. Plant Cell Report,2005,24(9):507-512.
- [18] 叶美,张敏,杨素欣,等. 大豆成熟种子胚尖基因枪法转化体系的优化[J]. 大豆科学,2011,30(1):20-23. (Ye M, Zhang M, Yang S X, et al. Optimization of biolistics transformation of embryonic tips of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill] mature seeds[J]. Soybean Science,2011,30(1):20-23.)
- [19] 郝荣华,邵群,杨素欣,等. 根瘤农杆菌介导的大豆子叶节转化体系的优化[J]. 大豆科学,2012,31(2):167-172. (Hao R H, Shao Q, Yang S X, et al. Optimization of *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node[J]. Soybean Science,2012,31(2):167-172.)