

耐旱基因 *cspB* 转化大豆的研究

孙雪慧¹, 蔡勤安², 尚丽霞², 马 瑞², 杨向东², 于志晶², 魏 建¹

(1. 长春师范大学, 吉林 长春 130032; 2. 吉林省农业科学院 生物技术研究所/吉林省农业生物技术重点实验室, 吉林 长春 130033)

摘要:为提高大豆的耐旱性,本研究根据大豆偏爱的密码子将来源于枯草杆菌抗旱相关基因 *cspB* 序列进行了优化,并构建了植物表达载体 pCambia3301-*cspB*,利用农杆菌介导法将 *cspB* 基因导入大豆栽培品种 Bert 中。用于遗传转化子叶节外植体共3 800个,经 PCR 和 Southern 鉴定,并结合 PPT 抗性筛选,共获得了 95 棵阳性转基因植株,转化率为 2.5%。经初步筛选,获得了 7 份耐旱性较好的转基因大豆新材料。这些材料将进一步用于耐旱转基因大豆新品种培育工作。

关键词:大豆;耐旱;*cspB* 基因;遗传转化
中图分类号:S565.1 **文献标识码:**A **DOI:**10.11861/j.issn.1000-9841.2017.05.0699

Genetic Transformation of Soybean with Drought Tolerance Gene *cspB* from *Bacillus subtilis*

SUN Xue-hui¹, CAI Qin-an², SHANG Li-xia², MA Rui², YANG Xiang-dong², YU Zhi-jing², WEI Jian¹

(1. Changchun Normal University, Changchun 130032, China; 2. Agro-Biotechnology Research Institute / Jilin Provincial Key Laboratory Agricultural Biotechnology, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China)

Abstract: To improve the drought tolerance of soybean, a vector pCambia3301-*cspB* with drought tolerance related modified gene *cspB*, was constructed. The modified *cspB* gene was introduced into soybean variety Bert by *Agrobacterium*-mediated transformation. In this experiment total 3 800 cotyledonary node explants were infected and 95 independent transgenic plants were obtained by PCR and Southern blot analysis combined with PPT selection. The transformation efficiency was 2.5%. Seven transgenic plants with drought tolerance were selected, which could be used for soybean drought tolerance breeding in further.

Keywords: Soybean; Drought tolerance; *cspB* gene; Genetic transformation

我国是全球严重干旱的国家之一,全球干旱半干旱的耕地面积占总耕地面积的 42.9%,而我国干旱和半干旱耕地面积占到了可耕地面积的 48%^[1]。干旱对农作物的光合作用、产量和生长发育都有一定的影响,也是农业生态环境逐步退化的原因之一^[2]。大豆是需水较多的作物,大豆根系不发达,对干旱胁迫较为敏感^[3]。干旱会造成大豆光合速率、蒸腾速率、气孔导度下降显著,株高、节数和茎粗明显降低^[4]。大豆不同生育时期出现干旱胁迫对产量的影响不同,苗期的轻微干旱对产量有一定的促进作用,但是在开花期、结荚期和鼓粒期出现干旱对产量的影响巨大^[5],产量损失可以达到 50%左右。干旱不仅对大豆生长和产量影响严重,而且对大豆品质也会造成一定程度的影响。干旱胁迫下,大豆籽粒蛋白含量上升,脂肪含量和二者总量下降^[6]。因此,培育抗旱大豆新品种,降低干旱对大豆的影响,对大豆产业的发展及干旱和半干旱耕

地的高效利用意义深远。

冷休克蛋白(cold shock protein, Csp)是生物适应温度降低而产生的一组蛋白,它首先在大肠杆菌中被发现^[7]。多种细胞功能都与冷休克蛋白有直接或间接的关系,在基因表达调控的过程中冷休克蛋白扮演着重要的角色。CSP 家族至少包括 9 个成员,例如 *CspA*、*CspB* 和 *CspG* 等。枯草杆菌中的冷休克蛋白 *CspB* 可以调节细胞生长,对促进植物细胞从逆境中快速恢复起着重要的作用^[8]。*CspB* 的调节可以在翻译水平上进行,原因是 *CspB* 的冷诱导可以通过非冷休克启动子来控制^[9]。根据一些文献报道,冷休克蛋白(CSPs)、枯草芽孢杆菌 *CspB* 和大肠杆菌 *CspA* 能让植物更适应一些不利环境的胁迫^[10-13]。目前已经获得烟草^[8]和玉米^[14]的转 *cspB* 基因植株,植株的抗旱、耐盐性均有所提高。

本研究依据大豆的密码子,将 GenBank 数据库中枯草芽孢杆菌 *cspB* 基因序列进行了优化,并构建

收稿日期:2017-04-28
基金项目:转基因生物新品种培育重大专项(20148X0800403B-002);吉林省科技厅重点科技攻关项目(20130206005NY)。
第一作者简介:孙雪慧(1992-),女,硕士,主要从事植物遗传研究。E-mail:2433003118@qq.com。
通讯作者:于志晶(1977-),女,硕士,副研究员,主要从事植物分子生物学、遗传转化与代谢工程研究。E-mail:yuzhijing0001@163.com;
魏建(1980-),男,博士,教授,主要从事植物遗传研究。E-mail:148050459@qq.com。

了植物表达载体 pCAMBIA3301-*cspB*。利用农杆菌介导法将优化的 *cspB* 基因导入栽培大豆中,以获得耐旱性较好的转基因大豆新材料,为抗旱转基因大豆新品种培育奠定基础。

1 材料与方法

1.1 材料

大豆品种 Bert 由中国农业科学院作物科学研究提供;农杆菌菌株 EHA105 为本实验室保存。

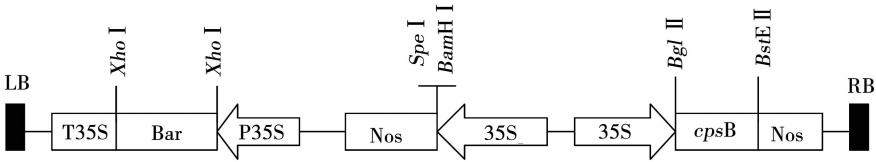


图1 植物表达的载体 pCAMBIA3301-*cspB* T-DNA 结构示意图

Fig. 1 T-DNA of binary vector pCAMBIA3301-*cspB*

1.4 抗性植株 PCR 检测

取涂抹除草剂表现抗性植株的叶片,采用 CTAB 的方法提取总 DNA,进行目的基因 *cspB* 和 *bar* 基因 PCR 的检测。以 *cspB* 基因序列为模板设计引物,引物由上海生物工程服务有限公司合成,大小为 204 bp。上游引物参见于志晶等^[16]的 HSP90 基因的上游引物,下游引物是:5'-TTAGGCCTCTTT-GGTGACATTAGCGC-3'。DNA 模板 100 ng, 10 × buffer 2.5 μL, 2 × mix 12.5 μL, 10 mol·L⁻¹引物(F/R)各 1 μL,加灭菌 ddH₂O 至 25 μL。PCR 扩增反应程序为:94℃ 5 min;94℃ 50 s, 58℃ 55 s, 72℃ 1 min, 30 个循环;72℃ 10 min。扩增产物在 1.0% 的琼脂糖凝胶上进行检测;以 *bar* 基因全序列为模板设计引物,引物由上海生物工程服务有限公司合成,大小为 440 bp。引物序列参见于志晶等^[16] *bar* 基因的引物序列。DNA 模板 100 ng, 10 × buffer 2.5 μL, 2 × mix 12.5 μL, 10 mol·L⁻¹引物(F/R)各 1 μL,加灭菌的 ddH₂O 至 25 μL。PCR 扩增反应程序为:94℃ 5 min;94℃ 50 s, 62℃ 55 s, 72℃ 1 min, 30 个循环;72℃ 10 min。扩增产物在 1.0% 的琼脂糖凝胶上进行检测。

1.5 *bar* 基因表达蛋白的试纸条快速检测

根据免疫层析的原理生产的 *bar* 基因的试纸条已经广泛用于很多植物,如玉米、大豆、棉花,苜蓿等。该试纸条能检测外源基因蛋白在植物中的表达,检测灵敏度可高达 0.1%。本研究选取 7 株 PCR 检测结果阳性的植物材料进行检测。

1.6 Southern 杂交

对上述 PCR 阳性植株进行进一步的 Southern

1.2 植物表达载体的构建

植物表达的载体 pCAMBIA3301 含有 *bar* 标记基因 35S 启动子,用 *BstE* II 和 *Bgl* II 双酶切 pCAMBIA3301,把目的基因连接到植物表达载体 pCAMBIA3301 上,构建植物表达载体 pCAMBIA3301-*cspB* (图 1),用冻融法将该载体导入农杆菌 EHA105 中,用来转化大豆。

1.3 农杆菌介导的大豆遗传转化

遗传转化方法同于志晶等^[15]的方法。

杂交检测,大量提取基因组的方法采用 CTAB 法,用量为 80 μg,用 *Hind* III 酶切基因组。Southern 杂交试剂盒采用 I 型的罗氏公司的地高辛标记试剂盒。

1.7 转基因植株的耐旱性鉴定

于盆钵种植非转基因和转基因的种子,植株长出 2 片三出复叶时进行干旱处理,采用自然干旱的处理方法,连续 25 d 不浇水后观察结果。

1.8 数据统计

记录侵染外植体数、能诱导出芽的外植体数、能伸长的外植体数、能生根的外植体数和阳性植株数。芽的诱导率(%)=(能诱导出芽的外植体数/侵染外植体数)×100,芽伸长率(%)=(能伸长的外植体数/侵染外植体数)×100,生根率(%)=能生根的外植体数/侵染外植体数)×100,转化率(%)=(阳性植株数/侵染外植体数)×100。

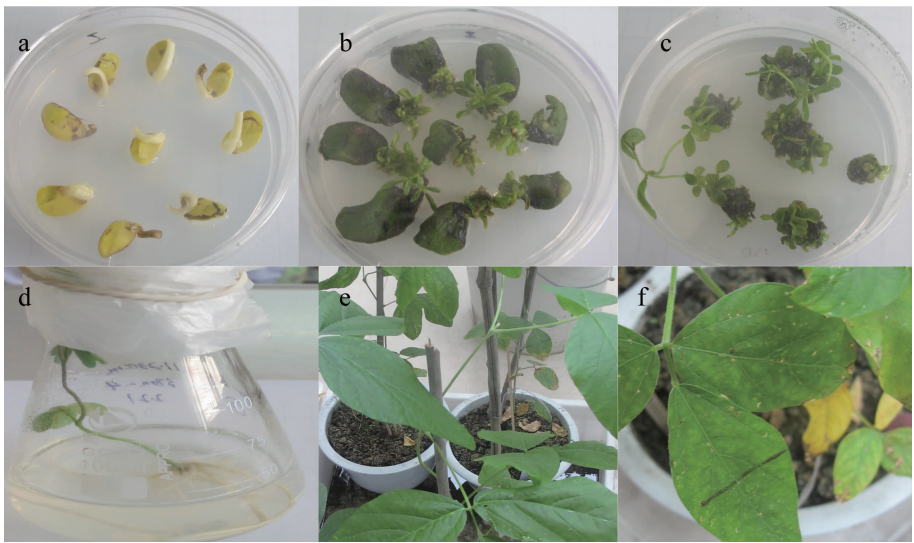
2 结果与分析

2.1 大豆遗传转化的效率

侵染外植体 3 800 个,PPT 筛选浓度为 5 mg·L⁻¹,芽的诱导率为 92%,芽伸长率为 28%,生根率为 80%,共获得阳性转基因苗 95 株,转化率为 2.5%。大豆子叶节遗传转化过程如图 2。

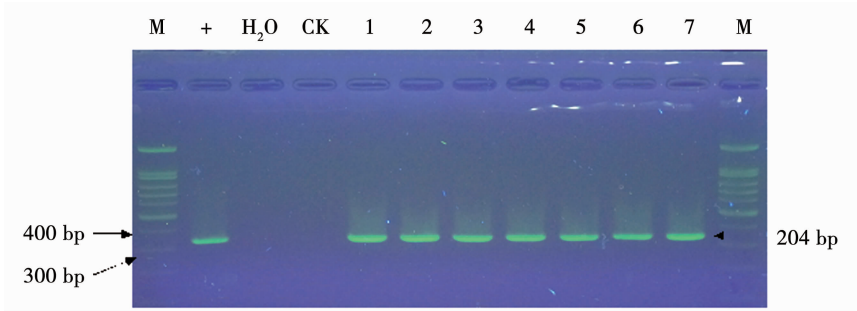
2.2 转基因植株的 PCR 检测

对对照植株和抗性植株进行 PCR 检测,PCR 检测包括目的基因 *cspB* 和 *bar* 基因,检测结果显示对照植株没有扩出特异条带,转基因植株都扩出目的基因 *cspB* (图 3)和 *bar* 基因(图 4)的特异条带,初步证明目的基因 *cspB* 已经被整合到大豆基因组中。



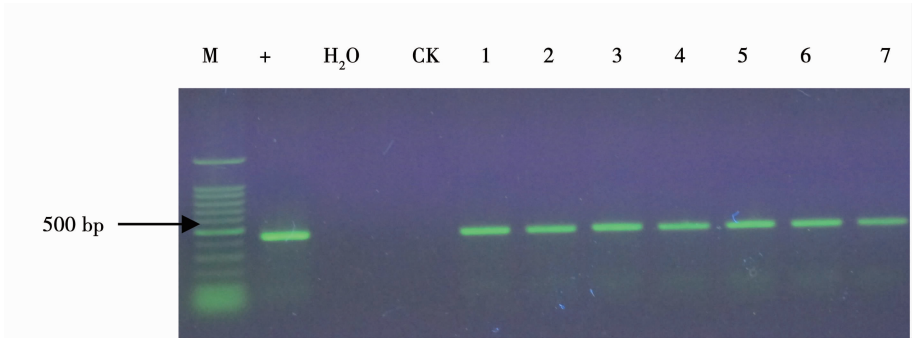
a: 共培养;b:芽的诱导;c:芽的伸长;d:生根;e:转基因的植株; f:转基因植株的 PPT 抗性。
a: Co-culture; b: Induction; c: Elongation;d:Rooting; e: Transformed plants; f: PPT resistance of transgenic plants.

图 2 大豆的遗传转化
Fig. 2 Genetic transformation of soybean



M: DNA marker; 1: 质粒对照; 2: 水对照; 3: 非转基因对照; 4 ~ 10:转基因的植株。
M: DNA marker; 1: Plasmid; 2: H₂O control; 3: Non-transgenic plant control; 4-10: Transgenic plants.

图 3 转基因植株 *cspB* 基因的 PCR 检测
Fig. 3 PCR of transgenic plants



M: DNA marker; 1: 质粒对照; 2: 水; 3: 非转基因的植株; 4 ~ 10:转基因的植株。
M: DNA marker; 1: Plasmid; 2: H₂O control; 3: Non-transgenic plant control; 4-10: Transgenic plants.

图 4 转基因植株 *bar* 基因 PCR 检测
Fig. 4 PCR of transgenic plants for *bar* gene

2.3 bar 基因表达蛋白的试纸条快速检测

采用 *bar* 基因试纸条快速检测了 7 株 PCR 阳性的转化植株,结果显示被检测的 7 株植株的试纸条均为阳性,在蛋白水平证明该基因的表达(图 5)。

2.4 Southern 杂交的检测

挑选了 4 株转基因植株进行 Southern blot 检测,结果均有检测条带,编号 1 泳道是单拷贝植株,编号 2、3 和 4 泳道是双拷贝植株(图 6),结果进一步证明目的基因 *cspB* 已被整合到了大豆染色体组中。

2.5 转基因植株的耐旱性鉴定

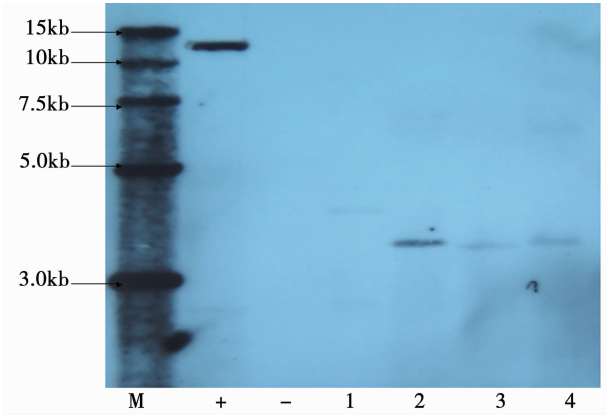
干旱处理 25 d 后,非转基因植株已近萎蔫,而转基因植株长势相对较好(图 7)。



1:对照; 2~8:转基因植株。
1:Control; 2-8:Transgenic plants.

图 5 转基因植株 *bar* 基因试纸条检测

Fig. 5 Transgenic plants with *bar* gene test strip



M: Marker; + : 质粒; - :非转基因植株;1 ~ 4: 转基因植株。
M: Marker; + : Plasmid; - : Non transgenic plant control; 1-4:Transgenic plants.

图 6 转基因植株的 Southern 杂交

Fig. 6 Southern blot analysis of transgenic plants



图 7 转基因植株耐旱鉴定(干旱处理 25 d 后的植株生长情况)

Fig. 7 The drought tolerance idenfication of transgenic plants
(growth of transgenic plants after treated with drought stress for 25 days)

3 结论与讨论

众所周知,农杆菌介导的大豆遗传转化中最重要的是提高转化效率,而影响转化效率最重要的因素是大豆的基因型,大豆对农杆菌侵染的敏感性是由大豆本身的遗传因素决定的。已有研究表明,大豆遗传转化效率较低,且高度依赖于基因型^[17-19]。近年来,科研工作者虽然通过筛选易于侵染的基因型来提高大豆的遗传转化效率^[20-27],但转化效率仍然较低且局限于少数几个基因型中。本研究中大豆转化的受体材料为 Bert,该基因型对农杆菌较为敏感,平均转化效率为 2.5%,是一个较好的大豆转基因的受体材料。

外源基因在转基因植物中的拷贝数直接影响插入基因的遗传稳定性和表达量,所以外源基因拷贝数的确定非常重要。多拷贝的转基因植物会造成后代基因分离的复杂,即便是单拷贝,也能形成甲基化,从而导致基因沉默,原因就是在一个位点插入拷贝数不止一个,以致插入的重复序列会自发的配对^[28]。因此,必需选择单位点插入的是单拷贝的转化事件。本研究通过 Southern 杂交来确定拷贝数,从 95 个转 *cspB* 基因转化株系中筛选出 2 个单拷贝插入株系。

cspB 是 RNA 分子的伴侣,它与 RNA 分子有较强的亲和性。原核生物的冷休克蛋白家族的成员之一是 *cspB*,原核生物在遭遇不利条件时,可以诱导表达 *cspB*^[29]。它与 mRNA 结合,防止 mRNA 水解和阻止 mRNA 形成高级结构,从而加速蛋白质翻译过程^[30]。所以,*cpsB* 表达时可以减少生物细胞在不利因素中的损害并且加速生物细胞在改善的条件下的恢复。*cspB* 基因在微生物和植物的耐逆中起着重要作用。*cspB* 基因过表达能显著提高玉米的抗旱性,2012 年美国批准首个转 *cspB* 基因抗旱玉米 Droughtgard™ 商业化种植。本研究以大豆品种 Bert 为受体,转化了 *cspB* 基因,获得了 95 个转基因株系,通过对转基因株系的初步耐旱鉴定,获得了 7 株耐旱性较好的转基因植株,为培育耐旱转基因大豆新材料积累了新的资源。

参考文献

[1] 武维华. 植物生理学[M]. 北京:科学出版社,2003:35-112. (Wu W H. Plant physiology[M]. Beijing: Science Press,2003:35-112.)

[2] 朱代舜. 干旱对植物的影响及其防御途径[J]. 华北农学报, 1964,1(2):29-35. (Zhu D S. Effects of drought on plant and its defense[J]. Acta Agricultura Sinica,1964,1(2):29-35.)

[3] 山仑,陈国良. 黄土高原旱地农业的理论与实践[M]. 北京:

科学出版社,1993:120-129. (Shan L, Chen G L. Theory and practice of dry land agriculture in lodss plateau[M]. Beijing: Science Press,1993:120-129.)

[4] 张仟雨,李萍,宗毓铮,等. 干旱对大豆生理及产量影响的研究[J]. 华北农学报,2016,31(5):140-145. (Zhang Q Y, Li P, Zong Y Z, et al. Effects of drought on physiology and yield of soybean[J]. Acta Agricultura Sinica,2016,31(5):140-145.)

[5] 赵宏伟,李秋祝,魏永霞. 不同生育时期干旱对大豆主要生理参数及产量的影响[J]. 大豆科学,2006,25(3):329-332. (Zhao H W, Li Q Z, Wei Y X. Effect of drought at different growth stages on main physiological parameters and yield in soybean[J]. Soybean Science,2006,25(3):329-332.)

[6] 张敬荣,高继国,李辰仁,等. 开花至鼓粒期干旱对大豆籽粒化学品质的影响[J]. 大豆科学,1996(1):84-90. (Zhang J R, Gao J G, Li C R, et al. The effect of day condition from flowering to seeding stages on chemical composition in soybean[J]. Soybean Science,1996,15(1):84-90.)

[7] 颜振兰,姚淑敏. 冷休克蛋白及冷休克反应[J]. 聊城师院学报(自然科学版),2000,13(3):59-62. (Yan Z L, Yao S M. Cold shock protein and cold shock responses[J]. Journal of Liaocheng Teachers University(Natural Science Edition),2000,13(3):59-62.)

[8] 徐萍莉,陈丽萍,周秀杰,等. 枯草芽孢杆菌 *cspB* 基因转化烟草的研究[J]. 激光生物学报,2013,22(4):343-347. (Xu P L, Chen L P, Zhou X J, et al. The study of tobacco transformation with *cspB* gene from *Bacillus subtilis*[J]. Acta Laser Biology Sinica,2013,22(4):343-347.)

[9] Graumann P, Wendrich T M, Weber M H W, et al. A family of cold shock proteins in *Bacillus subtilis* is essential for cellular growth and for efficient protein synthesis at optimal and low temperatures [J]. Molecular Microbiology,1997,25(4):741-756.

[10] Romero C, Belles J M, Vaya J L, et al. Expression of the yeast trehalose-6-phosphate synthetase gene in transgenic tobacco plants: Pleiotropic phenotypes include drought tolerance [J]. Planta, 1997,201(3):293-297.

[11] Chmara W, Bohnert H J, Jensen R G, et al. Increased salt and drought tolerance by D-ononitol production in transgenic *Nicotiana tabacum* L[J]. Plant Physiology,1997,115(3):1211-1219.

[12] Claassen M M, Shaw R H. Water-deficit effects on corn. 2. Grain components[J]. Agronomy Journal,1970,62(5):652-655.

[13] Duvick D N. The contribution of breeding to yield advances in maize (*Zea mays* L.) [J]. Advances in Agronomy,2005,86(5):83-145.

[14] 郭嘉,孙传波,杨向东,等. 转 *cspB* 基因玉米获得及其耐碱性分析[J]. 分子植物育种,2017,15(1):145-149. (Guo J, Sun C B, Yang X D, et al. Production of the *cspB* transgenic maize and its sakali-alkali tolerance analysis [J]. Molecular Plant Breeding, 2017,15(1):145-149.)

[15] 于志晶,蔡勤安,刘艳芝,等. 拟南芥抗逆基因 *DREB2A* 转化大豆的研究[J]. 大豆科学,2013,10(32):606-608. (Yu Z J, Cai Q A, Liu Y Z, et al. Transformation of soybean with stress related gene *DREB2A* from *Arabidopsis*[J]. Soybean Science,2013,10(32):606-608.)

[16] 于志晶,尚丽霞,蔡勤安,等. 水稻热激蛋白基因 *HSP90* 转化大豆的研究[J]. 大豆科学,2016,35(2):222-227. (Yu Z J,

Shang L X,Cai Q A, et al. Transformation of heat shock protein gene HSP90 of rice into soybean[J]. Soybean Science, 2016,35 (2):222-227.)

[17] Parrott W A,Hoffman L M,Hildebrand D F,et al. Recovery of primary transformants of soybean[J]. Plant Cell Report,1989,7(8): 615-617.

[18] Yan B,Reddy M S S,Collins G B, et al. *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of soybean [*Glycine max* (L.) Merrill.] using immature zygotic cotyledon explants[J]. Plant Cell Report,2000,19(11):1090-1097.

[19] Paz M M,Shou H,Guo Z,et al. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant[J]. Euphytica, 2004,136(2): 167-179.

[20] Byrne M C,McDonnell R E,Wright M S, et al. Strain and cultivar specificity in the *Agrobacterium*-soybean interaction [J]. Plant Cell, Tissue and Organ Culture (PCTOC),1987,8(1):3-15.

[21] Delzer B W,Somers D A,Orf J H. *Agrobacterium tumefaciens* susceptibility and plant regeneration of 10 soybean genotypes in maturity groups 00 to II[J]. Crop Science, 1990,30(2):320-322.

[22] Donaldson P A,Simmonds D H. Susceptibility to *Agrobacterium tumefaciens* and cotyledonary node transformation in short-season soybean[J]. Plant Cell Reports,2000,19(5):478-484.

[23] 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 explant[J]. Theoretical Applied Genetic ,2003,107(3):439-447.

[24] Paz M M,Shou H,Guo Z,et al. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant[J]. Euphytica,2004,136(2):167-179.

[25] Li W,Ning H, Lyu W,et al. Optimization of the *Agrobacterium*-mediated transformation systems of soybean cotyledonary node[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2008,41(4):971-977.

[26] Wu X X,Li J,Liu W,et al. Optimization study on strain cultivation period and infectious concentration on soybean cotyledonary node via *Agrobacterium*-mediated transformation system[J]. Journal of Northeast Agricultural University,2010,41(1): 1-6.

[27] Song Z Y,Tian J L,Fu W Z,et al. Screening Chinese soybean genotypes for *Agrobacterium*-mediated genetic transformation suitability [J]. Journal of Zhejiang University-Science B, 2013, 14 (4): 289-298.

[28] Elmsyan T,Proux F,Vaucheret A H. Current Biology-comments on *Arabidopsis* RPA2: A genetic link among transcriptional gene silencing,DNA repair, and DNA replication [J] . Current Biology, 2005,15 (21):1919-1925.

[29] 郭建军,龚兴国. 冷激蛋白的研究进展[J]. 生物化学与生物物理进展,2002,29(5): 691-695. (Guo J J,Gong X G. Progress in cold shock protein[J]. Progress in Biochemistry & Biophysics, 2002,29(5): 691-695.)

[30] Lopez M M,Yutani K,Makhatadze G L. Interactions of the cold shock protein cspB from *Bacillus subtilis* with singlestranded DNA. Importance of the T base content and position within the template [J]. Journal of Biological Chemistry, 2001, 276 (18): 15511-15518.

欢迎订阅 2018 年《大豆科学》

《大豆科学》是由黑龙江省农业科学院主管主办的大豆专业领域学术性期刊,也是被国内外多家重要数据库和文摘收录源收录的重点核心期刊。主要刊登有关大豆遗传育种、品种资源、生理生态、耕作栽培、植物保护、营养肥料、生物技术、食品加工、药用功能及工业用途等方面的学术论文、科研报告、研究简报、国内外研究述评、学术活动简讯和新品种介绍等。

《大豆科学》主要面向从事大豆科学研究的科技工作者,大专院校师生、各级农业技术推广部门的技术人员及科技种田的农民。

《大豆科学》为双月刊,16开本,国内外公开发行,国内每期定价:20.00元,全年120.00元,邮发代号:14-95。国外每期定价:10.00美元(含邮资),全年60.00美元,国外代号:Q5587。全国各地邮局均可订阅,也可向编辑部直接订购。

热忱欢迎广大科研及有欢迎关企事业单位刊登广告,广告经营许可证号:2301030000004。
地址:哈尔滨市南岗区学府路368号《大豆科学》编辑部(邮编:150086)
电话:0451-86668735
网址:www.haasep.cn
E-mail:ddkxbjb@126.com

欢迎关注微信公众号!

