

# PEG 介导 BT 基因转化大豆原生 质体获转基因植株<sup>\*</sup>

南相日 刘文萍 刘丽艳 吕晓波 何云霞

(黑龙江省农业科学院生物技术研究中心, 哈尔滨 150086)

卫志明

(中国科学院上海植物生理研究所, 上海 200032)

## 摘 要

通过 PEG 法将 B. T ( *Bacillus thuringiensis* CryIAC) 毒蛋白基因导入到大豆主栽品种黑农 35, 黑农 37, 合丰 25 和合丰 35 的原生质体中, 经 30ml/L 潮霉素筛选, 选择有抗性的愈伤组织进行分化, 获得了三棵再生植株, 移栽后全部成活, 对移栽后植株的总 DNA 进行 PCR 分析, 均显阳性。对 PCR 阳性植株进行 Southern 杂交分析, 证明 B. T 毒蛋白基因已整合到大豆细胞基因组中。

关键词 大豆; B. T 毒蛋白基因; 基因组

## 引 言

大豆是我国重要的粮油作物, 但目前在生产中病虫害成了限制大豆产量、质量和降低出口等级的重要因素。一般认为利用品种抗性是防治病虫害的最为有效的手段。导入具有目的性的抗性基因, 获得转基因抗性品种, 对病虫害的防治具有重要的意义。

外源基因导入大豆, 首例报道见于 1984 年<sup>[6-10]</sup>。而转基因大豆植株诞生于 1988 年, 由 Monsanto 公司报道<sup>[9]</sup>, 这是遗传工程应用于大豆改良上的一个里程碑。此后 McCabe 等<sup>[11]</sup> (1988) 利用基因枪转化大豆未成熟胚的生长点, Christou 等<sup>[5]</sup> (1989) 利用基因枪转化大豆茎尖; Finger 等<sup>[7]</sup> (1991) 用 Biolistics 基因枪转化胚性悬浮细胞; Sato 等<sup>[13]</sup> (1993) 用 Biolistics 基因枪转化未成熟胚茎尖及分裂的大豆悬浮细胞培养物; Stewart 等<sup>[15]</sup>

\* 实验得到中国科学院上海植生所植物分子遗传国家重点实验室资助。

收稿日期 1998-04-24

This paper was received on April 24, 1998.

(1996)利用基因枪转化大豆体细胞胚均获得成功。在国内卫志明等<sup>[3]</sup>(1996)用PEG法,将外源基因导入到大豆的原生质体中获得了27棵转基因植株,其转化效率达到了0.6%。这是通过原生质体途径转化大豆外源基因的首例报导。本文采用原生质体途径,对B.T毒蛋白基因的转化进行了探讨。

## 材料和方法

1 自然条件下种植黑农35黑农37合丰25和合丰35,田间管理按常规。

2 原生质体的游离及提纯:大豆幼嫩荚果的采集和游离提纯原生质体参照卫志明<sup>[2]</sup>的方法,只是酶液的组成稍有改变。酶液的组成为1.0% Cellulase Onozuka RS, 0.1% Pectolyase Y-23, CPW-9M pH5.8  $25 \pm 1^{\circ}\text{C}$ , 50rpm条件下酶解4-5小时。纯化后的原生质体浓度定为 $\times 10^6/\text{ml}$ 。

3 质粒pB48.415的提取:质粒由中国科学院微生物研究所构建。B.T毒蛋白是经修饰过的苏云金杆菌(*Bacillus thuringiensis*) $\delta$ 内毒素基因CryIA(C),其大小为1.8kb。质粒中还有能够在植物中表达的潮霉素磷酸转移酶(HPT)基因和在E.Coli中表达的Amp<sup>r</sup>基因<sup>[1]</sup>。用碱裂解法提取质粒,最终浓度定为1mg/ml。

4 B.T毒蛋白基因的导入及培养:利用PEG法<sup>[4]</sup>,将B.T毒蛋白的基因导入到大豆原生质体,培养7天之后,用30mg/ml潮霉素筛选,细胞培养参照卫志明等<sup>[2]</sup>的方法进行,分化按Sarwan等<sup>[2]</sup>的方法进行。

5 PCR扩增目标DNA:取潮霉素筛选过的再生植株叶片,用CTAB法<sup>[14]</sup>提取总DNA,用PCR技术扩增部分B.T毒蛋白的基因的目标序列。两个引物序列是5'-GGATAACAATCCGAACATA-3' 19bp, 3'-GTCAAAGGGTTAATTGTTC-5' 20bp。反应体积为30 $\mu$ l,模板DNA为0.2-0.5 $\mu$ g  $94^{\circ}\text{C}$ 变性10分钟,然后在 $94^{\circ}\text{C}$ 变性45秒, $50^{\circ}\text{C}$ 退火45秒, $72^{\circ}\text{C}$ 延伸90秒的条件下进行35个循环,最后 $72^{\circ}\text{C}$ 再延伸10分钟。最终扩增出795bp长度的DNA片断。

6 Southern杂交:取PCR反应中显阳性的植株叶片,提取总DNA,按Heddwyn等<sup>[8]</sup>的方法做Southern杂交分析。冻融法回收和纯化PCR反应扩增得到的795bp长度的DNA,利用北京亚辉医药有限公司生产的缺口平移试剂盒标记探针。植物总DNA用Bg1 II酶切消化,电泳,转膜,杂交,X-光自显影。

## 结果与分析

1 抗虫B.T毒蛋白基因的导入及培养

利用PEG法,将质粒pB48.415导入到大豆原生质体中,培养7天之后,加30mg/ml潮霉素进行筛选,一个半月后得到了肉眼可见的细胞团。从潮霉素筛选的愈伤组织数和未经潮霉素筛选的愈伤组织数之间的相对转化效率来看,黑农35的转化效率最高,是0.4%,合丰25的转化效率最低,是0.27%。经过筛选的愈伤组织长到1mm左右时,转到

MSB+ 0.2mg/1NAA+ 0.5mg/1BA的培养基上选择瘤状愈伤组织,再转到分化培养基 MSB+ 0.1mg/1NAA+ 0.5mg/1BA KT ZT+ 0.2mg/1GA<sub>3</sub>+ 250mg/1CH<sub>3</sub> 15mM Glutamine上进行分化<sup>[12]</sup>,得到了两个黑农 35和一个黑农 37的再生植株,移栽后全部成活,并开花,结荚 共获得 12粒种子,其中黑农 35获 9粒,黑农 37获 3粒(见图版)

2 PCR技术扩增目的基因进行检测

利用 CTAB法提取叶片中的总 DNA,以材料和方法中的 PCR反应条件进行扩增,电泳结果,质粒和导入 B. T毒蛋白基因的黑农 35和黑农 37的三个再生植株都扩增出了 795bp长度的目的带,而未转化的对照则无此目的带(图 1).

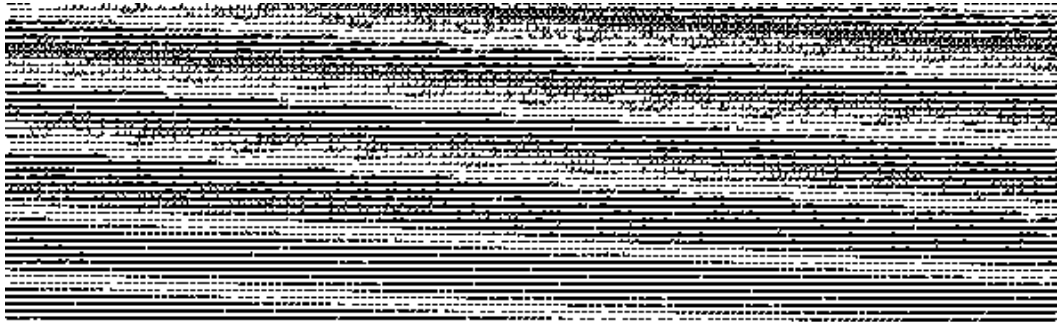


图 1 PCR结果

Fig. 1 Result of PCR

M: Makar, P 正对照质粒

CK 副对照未转化植株

- 1 导入 pB48. 415的黑农 37再生植株
- 2- 3 导入 pB48. 415的黑农 35的再生植株(第一株)
- 4- 5 导入 pB48. 415的黑农 35的再生植株(第二株)

图 2 Southern 吸印

Fig. 2 Southern blot

- 1 导入 pB48. 415的黑农 37,用 Bg1 II酶切
- 2a, 2b 导入 pB48. 415的黑农 35,用 Bg1II酶切(第一株)
- 3a, 3b 导入 pB48. 415的黑农 35,用 Bg1 II酶切(第二株)
- CK 对照, PB 质粒 pB48. 415用 Bg1II酶切, PE 探针

3 Southern 杂交

PCR显阳性的三棵大豆再生植株,提取总 DNA,进行 Southern吸印和分子杂交,结果在 X- 光片上,正对照质粒和转基因植株均显示特征带,副对照未转化植株则没有带(图 2),说明 B. T毒蛋白基因已整合到大豆细胞中。因 Bg1II仅在 B. T毒蛋白基因以外的质粒上有一个酶切位点,在质粒的其他部位无切点,因此在 X- 光片上的条带数应是整合位置数。从图 2中可以看出,黑农 35的两个转基因植株分别有一个和两个整合位点,黑农 37有三个整合位点。

讨 论

目前有不少关于大豆转基因方面的报导<sup>[5 7 9 13]</sup>,但由于得到的后代嵌合体比较多,获

得完全转化体的频率很低。在后代中出现嵌合体的原因有两个方面,一是转化系统,二是抗生素的筛选。虽然大豆原生质体培养比较难,而且再生频率也较低,但通过原生质体途径导入外源基因,由于原生质体本身是单细胞,不会形成嵌合体,获得外源基因的完全转化体的频率比较高。在本实验的结果中可以看出,原生质体途径导入的外源基因在染色体上的整合比较随机,整合位置数也相差很大。在大豆的抗生素筛选方面,潮霉素的筛选效果比卡那霉素好,很少出现假阳性。因此,在大豆的转基因植物筛选时,构建的质粒最好连接潮霉素磷酸转移酶,用潮霉素筛选转化植株,以减少出现假阳性。

## 参 考 文 献

- [1] 丁群星, 谢友菊, 戴景瑞等, 1993, 中国科学, (B辑), 2(7): 707- 713
- [2] 卫志明, 许智宏, 1990, 大豆原生质体培养和植株再生, 植物学报, 32(8): 582- 588
- [3] 卫志明, 黄健秋, 徐淑萍等, 1996, 植物遗传国家重点实验室年报, 36- 37
- [4] 傅荣昭, 孙勇如, 贾士荣主编, 植物遗传转化技术手册, 中国科学技术出版社
- [5] Christou, P. et al., 1989, Inheritance and expression of foreign genes in transgenic soybean plants. Proc. Nat. Acad. Sci. U S A, 86, 7500- 7504
- [6] Deblock, M. et al., 1984, Expression of foreign genes in regenerated plants and their progeny. EMBO J., 3, 1681- 1689
- [7] Finer J.J. McMullen MD, 1991, Transformation of soybean via particle bombardment of embryogenic suspension culture tissue. In Vitro Cell Dev Biol. 27, 175- 182
- [8] Henddwy, J 1994, Plants gene transfer and expression protocols, Methods in molecular biology 49, 161- 179
- [9] Hnchee, M. A. W., et al., 1988, Production of transgenic soybean plants using agrobacterium mediated DNA transfer. Bio/technology, 6, 915- 922
- [10] Horsch, R. B., et al., 1984, Inheritance of functional foreign genes in Plants. Science, 223, 496- 498
- [11] McCabe, D. E. et al., 1998, Stable transformation of soybean (*Glycine Max*) by particle acceleration. Bio / Techonlogy, 6, 923- 926
- [12] Sarwan, K. Dhir et al., 1991, Plantlet regeneration from immature cotyledon protoplasts of soybean (*Glycine Max L.*). Plants Cell Rep. 10, 39- 43
- [13] Sato, S. et al., 1993, Stable transformation Via particle bombardment in two different soybean transformation systems. Plant Cell Rep. 12, 408- 413
- [14] Stewart CN Jr. Via LE 1993, A rapid CTAB DNA isolation technique useful for RAPD fingerprinting and other PCR applications. Biotechniques, 14, 748- 751
- [15] Stewart CN. Jr. et al., 1996, Genetic transformation, Recovery, and characterization of fertile Soybean transgenic for synthetic *Bacillus thuringiensis CryIac* Gene. Plant Physiol. 112, 121- 129

# PEG- MEDIATED TRANSFORMATION AND REGENERATION OF SOYBEAN PROTOPLAST WITH *BACILLUS THURINGIENSIS* **CryIac** GENE

Nan Xiangri   Liu Wenping   Liu Liyan   Lu Xiaobo   He Yunxia

(*Bio. Res. Center, Heilongjiang Academy of Agri. Sci. Harbin, 150086*)

Wei Zhiming

(*Shanghai Institute of Plant Physiology, Academia of Sinica, Shanghai, 200032*)

## Abstract

*Bacillus thuringiensis CryIac* gene was introduced into the protoplast of leading soybean cultivars Heinong35, Heinong37, Hefeng25 and Hefeng35 with the PEG method. Through the screening with 30mg/l hygromycin and the differentiation of selected resistant calli, three regenerated plants were obtained and transplanted successfully. PCR analysis of the DNA from the transplanted plants showed positive reaction. Southern blot analysis of the PCR- positive plants proved that the B. T CryIac gene had integrated into the genome of these plants.

**Key words**   Soybean; *Bacillus thuringiensis CryIac* gene; Genome