

基因枪法将 *GmDREB* 基因导入大豆的研究

王 萍¹, 郭永来², 高世庆³, 马有志³, 程宪国⁴, 李文滨⁵

(1. 淮海工学院海洋学院, 连云港 222005; 2. 长春龙洋大豆生物蛋白股份有限公司, 长春 130041; 3. 中国农业科学院作物栽培育种研究所, 北京 100081; 4. 中国农业科学院土肥所, 北京 100081; 5. 东北农业大学大豆研究所/国家教育部大豆生物学重点实验室, 哈尔滨 150030)

摘要 测定大豆体细胞胚对 PPT 的基础抗性, 用基因枪法将 pRdGM-bar 质粒转化大豆体细胞胚, 得到抗性体细胞胚和抗性植株, 经 PCR、PCRsouthern 检测, 证明 *GmDREB* 基因转入到大豆中。

关键词 大豆; 基因枪; *GmDREB* 基因; 体细胞胚

中图分类号 S565.103.53 **文献标识码** A **文章编号** 1000-9841(2007)03-0315-04

TRANSFORMING *GmDREB* GENE INTO SOYBEAN VIA PARTICLE BOMBARDMENT

WANG Ping¹, GUO Yong-lai², GAO Shi-qing³, MA You-zhi³, CHENG Xian-guo⁴, LI Wen-bin⁵

(1. School of Marine Science and Techology, Huaihai Institute of Technology, Lianyungang 222005; 2. Changchun Long Yang Soybean Biologic Albumen Co. Ltd, Changchun 130062; 3. Institute of Crop Breeding and Cultivation, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; 4. Institute of Soil and Fertility, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 100081; 5. Soybaen Research Institute Key Laboratory of Soybean Biology in Chinese Ministry of Education Northeast Agricultural University, Harbin 150030)

Abstract The basis resistance of somatic embryo in soybean to PPT was tested. Plasmid pRdGM-bar was transformed into somatic embryo of soybean via particle bombardment. The resistant somatic embryos and plantlets were obtained. It was demonstrated that the *GmDREB* gene had been transformed into soybean by polymerase chain reaction and PCR-Southern detection.

Key words Soybean; Particle bombardment; *GmDREB* gene; Somatic embryo

基因枪法遗传转化是进行植物转基因常用方法之一, 多用于对农杆菌不敏感的物种和基因型。McCabe 等^[1]用外源 DNA 包被的钨粒对大豆茎尖分生组织进行轰击, 获得大豆转基因植株, 此后, 这一技术便很快在大豆中得到了应用, 成为大豆转化的主要方法之一。其中, 体细胞胚团块因为可以长期继代增殖, 具有两极性等优点, 是基因枪理想的靶组织。1999 年, Maughan 等^[2]首次用基

因枪轰击在悬浮条件下继代培养后转入固体培养基的体细胞胚, 将牛酪蛋白基因转入大豆, 获得了可育转基因植株。在建立了固体继代增殖大豆体细胞胚的基础上^[3], 用基因枪法对大豆体细胞胚进行 PSY 基因转化的研究^[4]。本文以大豆体细胞胚为受体, 利用基因枪法将抗逆相关基因 *GmDREB* 导入大豆体细胞胚中, 获得了抗性植株, 为运用分子育种方法培育大豆抗逆新品种奠定了理

收稿日期: 2007-02-25

基金项目: 教育部大豆生物学重点实验室资助项目(SB06A07); 国家植物转基因研究与产业化专项(JY03-A-18)

作者简介: 王萍(1957-), 女, 教授, 博士, 主要从事生物技术与植物转基因的研究。E-mail: y_pwang@yahoo.com.cn

论基础。

1 材料与方法

1.1 受体与供体材料

受体为大豆基因型九 9313、九 9568 和黑农 41 的体细胞胚,供试质粒 pRdGM – bar,由中国农科院作物栽培育种所马有志博士惠赠。质粒大小为 6875bp,含有目的基因 *GmDREB*(编码 DREB 转录因子)、植物抗性筛选标记磷化乙酰转移酶基因 bar。

1.2 大豆体细胞胚对 PPT 的基础抗性

在大豆体细胞胚继代培养基中分别加入 0、3、5、7、9、11 mg/L 的 PPT,继代培养一个月后调查体细胞胚的褐化率,以确定大豆体细胞胚转化后最适的 PPT 筛选浓度。

1.3 基因枪轰击大豆体细胞胚

在基因枪轰击大豆体细胞胚前用 0.4 mol/L 甘露醇预处理 4h,轰击过程按 Bio – Rad PDS1000/He 基因枪使用说明书进行,气压为 1100psi,轰击距离 6 cm,每皿轰击一枪。

1.4 抗性体细胞胚筛选及植株再生

大豆体细胞胚经基因枪轰击后在继代培养基上恢复培养 1 周,转到 2 ~ 3 mg/LPPT 筛选培养基上连续筛选 4 次,每次 15 ~ 20 d,然后转移至萌发培养基继续筛选,3 ~ 4 周后长成抗性小植株。

1.5 抗性植株的分子检测

抗性植株大豆叶片 DNA 提取、PCR、PCR – southern 杂交(DIG 试剂盒方法)检测参照王关林方法进行^[5]。*bar* 基因引物序列(5′ – AAGCACGGT-CAACTTCCGTA – 3′,3′ – CAAAGACCGTCGACCT-GAAG – 5′)扩增长度 412 bp,PCR 反应程序为 94℃变性 3 min,(94℃变性 1 min,54℃退火 30 s,72℃延伸 30 s)30 个循环,72℃延伸 10 min;*GmDREB* 基因引物序列(5′ – ATG GAA GAC AGG GAT CAC TGT TGT TC – 3′,3′ – TCA ATC TTG AAG CTC TTC GAG TTT TC – 5′)扩增长度 500bp,PCR 反应程序为 94℃变性 5 min,(94℃变性 1 min,56℃退火 1 min,72℃延伸 1 min)35 个循环,72℃延伸 7 min。

2 结果和分析

2.1 大豆体细胞胚对 PPT 的基础抗性

在继代培养基中加入不同浓度的 PPT 时,大豆基因型九 9313、九 9568 和黑农 41 的体细胞胚的褐化率见图 1。

图 1 PPT 对大豆体细胞胚褐化率的影响
Fig. 1 The effect of PPT on rate of browning
in somatic embryo of soybean

由图 1 可以看出,三个大豆基因型体细胞胚对 PPT 的基础抗性相似,在没有加入 PPT 时,体细胞胚培养一个月时没有发生褐化现象。随着培养基中 PPT 浓度的增加,大豆体细胞胚褐化率逐渐加大,当 PPT 浓度为 2 mg/L 时,褐化率接近 60%;当 PPT 浓度为 3 mg/L 时,褐化率达 80% 左右,其中九 9568 为 82.3%;当 PPT 浓度为 5 mg/L 时,褐化率为 90.2% ~ 96.4%,有 20% 左右的大豆体细胞胚死亡;当 PPT 浓度在 7 mg/L 时,大豆体细胞胚的褐化率达 100%。据此,大豆体细胞胚的 PPT 筛选浓度以 2 ~ 3 mg/L 为好。

2.2 抗性植株的获得及 PCR 检测

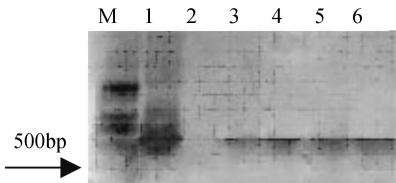
经基因枪轰击的大豆体细胞胚在 2 mg/L PPT 筛选 1 周后转到 3 mg/L PPT 继续筛选,得到抗性体细胞胚转入萌发培养基中得到抗性苗(图 2)。取抗性苗叶片提取 DNA 分别对 *bar* 基因和 *GmDREB* 基因进行 PCR 检测,扩增出与阳性质粒相同的 412bp 的特异带(图 3)和 500bp 的特异带(图 4),而未转化植株没有扩增出特异性条带,初步证明外源基因已经导入大豆中。

整合进大豆植株基因组中。

左:体细胞胚 右:苗
Lift:Somatic embryo Right:Seedling
图2 大豆抗性体细胞胚与抗性苗
Fig.2 Somatic embryo and seedling
selected by PPT in soybean

M:DL2000 1:质粒 2:未转化植株 3~5:抗性植株
M:DL2000 1:Plasmid 2:Untansformed plantlet
3~5:plantlets selected by PPT

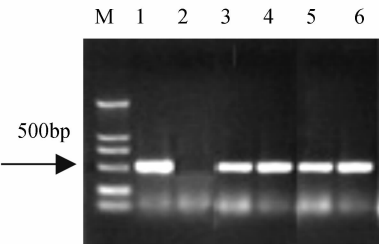
图5 *bar* 基因 PCR-southern 杂交
Fig. 5 PCR-southern blot with *bar* gene



M:DL2000 1:质粒 2:未转化植株 3~6:抗性植株
M:DL2000 1:Plasmid 2:Untansformed plantlet
3~6:plantlets selected by PPT

图6 *GmDREB* 基因 PCR-southern 杂交
Fig. 6 PCR-southern blot with *GmDREB* gene

M:DL2000 1:质粒 2:未转化植株 3~6:抗性植株
M:DL2000 1:Plasmid 2:Untansformed plantlet
3~6:plantlets selected by PPT
图3 *bar* 基因 PCR 检测
Fig.3 PCR detection of *bar* gene



M:DL2000 1:质粒 2:未转化植株 3~6:抗性植株
M:DL2000 1:Plasmid 2:Untansformed plantlet
3~6:plantlets selected by PPT

图4 *GmDREB* 基因 PCR 检测

Fig.4 PCR detection of *GmDREB* gene

2.3 抗性植株的 PCR-southern 杂交

分别对 *bar* 基因和 *GmDREB* 基因的 PCR 阳性大豆植株进行 PCR-southern 杂交,结果表明 PCR 阳性植株 DNA 扩增片段与质粒 DNA 扩增特异片段处均出现杂交信号,而对照未转化植株则没有杂交信号(图5、图6),说明被检测阳性植株扩增出的 PCR 条带确实为目的性的带,证明目的基因已

3 讨论

3.1 大豆体细胞胚对 PPT 的基础抗性

本试验供体为 pRdGM-bar 质粒含有 *bar* 基因,转化植物后以 PPT 作为筛选剂。九 9313、九 9568 和黑农 41 的体细胞胚对 PPT 反应相似,当培养基中加入 2~3 mg/LPPT 时,褐化率达 60%~80%,可以此作为筛选浓度。

3.2 大豆体细胞胚遗传转化的筛选方法

由于基因枪转化是通过外力的作用,将携带质粒的金粉击入受体材料,轰击过程会使受体材料的细胞受到损伤,致使抗性减弱。因此,一定要注意观察体细胞胚的生长状况,依据体细胞胚褐化的程度来调节 PPT 的筛选浓度,尤其是在最初的两周内。本实验中发现,第一周的 PPT 筛选浓度以 2 mg/L 为宜,然后将 PPT 浓度逐渐增加到 3 mg/L,这样可以使受体细胞有一个缓冲的机会。

参 考 文 献

- [1] McCabe Dennis E, Swain William F, Martinell Brian J, et al. Stable transformation of soybean (*Glycine max*) by particle acceleration[J]. Bio/Technology, 1988, 6:923 - 926.
- [2] Maughan PJ, Philip R, Cho M - J, et al. Biolistic transformation, expression and inheritance of bovine β - casein in soybean (*Glycine max*) [J]. In Vitro Cell Biol. ,1999, 35P:344 - 349.
- [3] Wang Ping, Wang Gang, Ji Jing, et al. A novel system for proliferation, maintenance and plantlet germination from somatic embryo of soybean [J]. Acta Botanica Sinica, 2004, 46 (2) : 154 - 158.
- [4] 龚学臣, 季静, 王罡, 等. 基因枪对大豆进行 PSY 基因的转化研究[J]. 大豆科学, 2006, 25(2) : 137 - 140.
- [5] 王关林, 方宏筠主编. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998, 598 - 625.

欢迎订阅 2007 年《大豆科学》

《大豆科学》是由黑龙江省农科院主办的学术性期刊。国内外公开发行, 双月刊, 16 开本, 每期 160 页。国内每期订价: 10.00 元, 全年 60.00 元, 邮发代号: 14 - 95。国外每期订价: 10.00 美元(包括邮资), 全年 60 美元。国外总发行由中国国际图书贸易总公司, 北京 399 信箱。国外代号: Q5587。

《大豆科学》是中国自然科学核心期刊, 中国科学引文数据库来源期刊及国内外多家权威数据库收入期刊源。主要刊登有关大豆的遗传育种, 品种资源, 生理生态, 耕作栽培、病、虫、杂草防治, 营养施肥, 生物技术、食品加工、药理研究和工业用途等方面的科研报告, 学术论文, 国内、外研究进展评述, 研究简报, 学术活动简讯、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。

本刊热忱欢迎广大科研单位及有关企业刊登广告, 广告经营许可证号: 2301004010071。

订阅办法: 全国各地邮局, 如在邮局漏订, 可到编辑部补订。通过邮局汇款至哈尔滨市南岗区学府路 368 号《大豆科学》编辑部。

邮政编码: 150086。

联系电话: 0451 - 86668735。

E - mail: ddkexue@ 126. com

征 订 启 示

编辑部现存有少量过刊: 2005 年 2 ~ 4 期, 订价 21.00 元; 2006 年 1 ~ 4 期, 订价 40.00 元; 2007 年 1、2 期, 每期订价 10.00 元; 还有 2006 年精装合订本, 订价 60.00 元。以上订刊款均含邮资。如需要直接汇款至编辑部即可, 款到即寄书。汇款请写明订阅刊期、数量, 详细邮寄地址。

编辑部地址: 哈尔滨市南岗区学府路 368 号

联系电话: 0451 - 86668735

E - mail : ddkexue@ 126. com

《大豆科学》编辑部