

利用注射叶片法快速鉴定大豆 *GmCRY1* 和 *GmCRY2* 基因功能

秦正睿^{1,2}, 孙 磊^{1,2}, 李宏宇²

(1. 吉林大学 植物科学学院, 吉林 长春 130062; 2. 中国农业科学院 作物科学研究所, 北京 100081)

摘要: 将大豆隐花色素基因 *GmCRY1*、*GmCRY2* 构建在 N 端含有绿色荧光蛋白 (GFP) 的 pEGAD 载体上, 并转化农杆菌 EHA105 菌株。将含有上述基因的 EHA105 菌液分别注射到大豆单叶及复叶叶片中, 观察长日条件下 (16 h 光照/8 h 黑暗) 和短日条件下 (8 h 光照/16 h 黑暗) 注射植株的开花时间。结果叶片注射含 *GmCRY1* 基因菌液的植株在长日条件下早开花, 通过 RT-PCR 检测表明注射叶片中 *GmCRY1* 成功表达, 而叶片注射含 *GmCRY2* 基因菌液的植株虽然也通过 RT-PCR 检测到基因表达, 但无论长日和短日条件下开花时间均无改变。结果证实注射叶片法可快速鉴定 *GmCRY1* 和 *GmCRY2* 基因对大豆开花时间的影响。

关键词: 大豆; 隐花色素; 根癌农杆菌; 开花时间

中图分类号: S565.1

文献标识码: A

文章编号: 1000-9841(2012)01-0013-04

Rapid Identification of *GmCRY1* and *GmCRY2* Function by Leaf Injection in Soybean

QIN Zheng-rui^{1,2}, SUN Lei^{1,2}, LI Hong-yu²

(1. College of Plant Science, Jilin University, Changchun 130062, Jilin; 2. Institute of Crop Sciences, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing 10081, China)

Abstract: Soybean (*Glycine max*) Cryptochrome 1 (*GmCRY1*) and Cryptochrome 2 (*GmCRY2*) genes were constructed into expression vector pEGAD, and injected into soybean leaves by *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 mediated transformation. The *Agrobacterium tumefaciens* EHA105 with vector pEGAD was used as control. The RT-PCR method was carried on to detect if the *GmCRY1* and *GmCRY2* were transient expressed in the leaves. The transformed plants were grown in different photoperiod light conditions (SD: 8 h light/16 h darkness; LD: 16 h light/8 h darkness) and the flowering data was calculated to conclude the effect of transient expression of *GmCRY1* and *GmCRY2* on the flowering time in soybean. The results indicated that the transient expressed *GmCRY1* in soybean flowered earlier in LD, and the *GmCRY1* expression was detected in the injected leaves through RT-PCR analysis. Although the expression of *GmCRY2* was detected, it had no effect on flowering time in both LD and SD conditions. This result confirmed that the leaves injection method can quickly identify the function of *GmCRY1* and *GmCRY2* genes on soybean flowering time.

Key words: Soybean; Cryptochrome genes; *Agrobacterium tumefaciens*; Flowering time

隐花色素 (Cryptochrome) 是一种普遍存在于动植物中的蓝光受体, 植物中至少有 2 种隐化色素: CRY1 和 CRY2, 能接受蓝光信号、诱导下游的信号转导, 从而引起相关的生理反应^[1-4]。植物中隐花色素的主要功能是参与植物的光形态建成和光周期介导的开花反应。大豆光周期开花的研究对植物开花理论和农业生产研究具有重要意义。由于大豆是典型的短日照作物, 其开花只能在特定的光周期条件下才能完成, 区域间光周期的差异会显著影响大豆的产量^[5]。为了改变农作物的开花习性, 在生产上多采用栽培的手段, 如晚熟大豆品种适时早播, 有利于提早开花, 延长有效花期范围, 提高和发挥晚熟大豆品种生产潜力^[6]。但是这些措施不能从根本上解决大豆光周期广适性问题。

目前大豆的遗传转化主要是采用农杆菌介导的子叶节转化方法^[7-9]和大豆幼胚转化方法^[10], 但这 2 种方法效率低, 且周期长, 不能快速鉴定基因的功能。目前对大豆基因功能的快速鉴定方法主要有 3 种: 一种为利用发根农杆菌使基因在根部表达, 快速测定基因对盐碱等条件的反应^[11]; 一种为利用病毒为介体的方法^[12]; 最后一种为注射大豆叶片法。该试验将大豆基因 *GmCRY1* 和 *GmCRY2* 转化农杆菌 EHA105, 并注射大豆叶片, 使其在大豆叶片中瞬时表达, 以达到鉴定基因功能的目的。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 大豆品种 垦农 18 (KN18), 由黑龙江八一

收稿日期: 2011-11-21

基金项目: 转基因专项资助项目 (2009ZX08004-010B, 2008ZX08010-004); 国家高技术研究发展计划资助项目 (2006AA10Z107)。

第一作者简介: 秦正睿 (1985 -), 男, 在读硕士, 研究方向为植物分子生物学。E-mail: qzrv@163.com。

通讯作者: 李宏宇 (1970 -), 女, 副研究员, 博士, 研究方向为植物分子生物学与基因工程。E-mail: lihongyu@caas.net。

农垦大学大豆室提供。

1.1.2 菌株和载体 根癌农杆菌 (*Agrobacterium tumefaciens*) 菌株 EHA105; pEGAD 载体, N 端融合绿色荧光蛋白 (*GFP*) 基因。

1.1.3 培养基 LB 培养基: 胰蛋白胨 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 酵母提取物 $5 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 氯化钠 $10 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$, 琼脂粉 $15 \text{ g} \cdot \text{L}^{-1}$ 。含利福平 (*Rif* $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 和卡那霉素 (*Kan* $50 \text{ mg} \cdot \text{mL}^{-1}$) 的 LB 培养基用于培养已转化 pEGAD-*GmCRY1*、pEGAD-*GmCRY2*、pEGAD 质粒的 EHA105 菌株。

1.2 试验方法

1.2.1 大豆培养 大豆采用盆栽, 盆直径为 20 cm, 每盆播种 10 粒大豆种子, 待大豆单叶张开时, 每盆保留长势良好、一致的大豆 2 株, 每个处理种 20 盆。长日条件 (LD) 为: 16 h 光照 8 h 黑暗, 温度 25°C ; 短日条件 (SD) 为: 8 h 光照 16 h 黑暗, 温度 25°C 。

1.2.2 菌液的制备 挑取已转化 *GmCRY1*、*GmCRY2* 基因以及空载体 pEGAD 的阳性单菌落到含有抗生素 (*Rif* + *Kan*) 的液体 LB 培养基中, 28°C , $150 \sim 200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 培养生长至 OD_{600} 值为 $0.6 \sim 0.8$, 然后将菌液均匀涂抹在含有抗生素 (*Rif* + *Kan*) 的固体 LB 平板上, 培养过夜^[13]。当菌体长满 LB 平板表面后, 用涂棒将菌体刮下, 超纯水重悬, 分光光度计测其 OD_{600} 值, 当其为 $0.4 \sim 0.6$ 时即可。并将各菌液分为 2 份, 其中 1 份加入 0.6% 体积的 Silwet L-77 轻轻摇匀。

1.2.3 叶片注射 待大豆单叶完全展开时, 用无针头 10 mL 注射器吸取菌液, 轻压在叶片表面, 使菌液渗入叶片内, 力度要适中, 防止弄破叶片, 每个叶片注射 6~10 个点即可, 每个点直径约 5 mm。第一复叶, 第二复叶以及所有开花前的叶片都采用同样的方法注射。对照为含有 pEGAD 空载体的 EHA105 菌液。注射处理包括 35S::*GFP::GmCRY1*, 35S::*GFP::GmCRY2*, pEGAD, 35S::*GFP::GmCRY1* + Silwet L-77 和 35S::*GFP::GmCRY2* + Silwet L-77 共 5 个处理。

1.2.4 取样及总 RNA 提取 注射后第 5 天分别取单叶和第一复叶, 保存于 -70°C 冰箱, 用于提取 RNA。总 RNA 用 Trizol (Invitrogen) 提取, 并用 DNA 酶 (RNase-free DNase, Promega) 处理以防止基因组 DNA 污染^[14]。

1.2.5 反转录 用 Revert Aid First Strand cDNA Synthesis 试剂盒 (Fermentas) 合成 cDNA 的第一链。反应体系 ($20 \mu\text{L}$) 及程序: Total RNA $2 \mu\text{g}$; Oligo (*dT*)₁₈ Primer ($100 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) $1 \mu\text{L}$; Nuclease-Free

Water $12 \mu\text{L}$; PCR 仪中 65°C 反应 5 min; 然后依次加入 $5 \times$ Reaction Buffer $4 \mu\text{L}$; RiboLock RNase Inhibitor ($20 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) $1 \mu\text{L}$; $10 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$ dNTP Mix $2 \mu\text{L}$; Revert Aid M-MuLV Reverse Transcriptase ($200 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) $1 \mu\text{L}$; PCR 仪中 42°C 反应 60 min, 然后 70°C 条件下 5 min 终止反应。

1.2.6 PCR 检测 用 *GFP* 基因的引物检测转化植株, 引物序列为: *GFP-F* ($5'$ to $3'$): TCAAG-GACGACGGGAAGTACA; *GFP-R* ($5'$ to $3'$): GCTGT-TACAACTCAAGAAGG。PCR 反应总体系为 $25 \mu\text{L}$, 包括大豆 cDNA $1 \mu\text{L}$, dNTP ($2.5 \text{ mmol} \cdot \text{L}^{-1}$) $2.5 \mu\text{L}$, 正反向引物 *GFP-F/R* ($10 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$) 各 $1 \mu\text{L}$, LA *Taq* 酶 ($5 \text{ U} \cdot \mu\text{L}^{-1}$) $0.3 \mu\text{L}$, $10 \times$ Buffer $2.5 \mu\text{L}$, ddH₂O $16.7 \mu\text{L}$, 共 $25 \mu\text{L}$; PCR 程序: 94°C 预变性 5 min; 94°C 变性 30 s; 55°C 退火 30 s; 72°C 延伸 30 s; 30 个循环, 72°C 延伸 5 min, 16°C 保温, 琼脂糖凝胶电泳检测 PCR 产物。

1.2.7 统计大豆开花时间 开花时间为种子出苗到开第一朵花的天数, 分别对长日照和短日照条件下的植株进行统计, 记录结果。

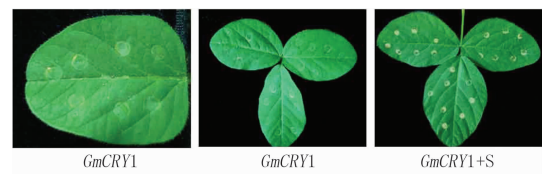
1.3 数据分析

采用 SPSS 13.0 和 Excel 2003 进行数据分析。

2 结果与分析

2.1 叶片注射后表现

注射完菌液的叶片完整无破损, 叶片表面的一层白斑, 是注射留下的印迹, 印迹较清楚 (图 1), 表明菌液已注射到叶片中, 这样的叶片可用于取样以检测基因的瞬时表达情况。



GmCRY1 + S; *GmCRY1* + Silwet L-77

图 1 注射后叶片形态

Fig. 1 Leaf blade shape after injection

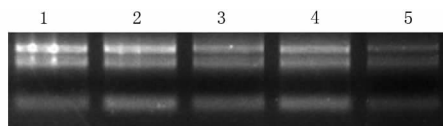
2.2 RNA 提取及电泳分析

RNA 琼脂糖凝胶电泳一般为 3 条带 (28S、18S、5S), 上面 2 条带较完整。图 2 是提取的 RNA 在 1.5% 琼脂糖凝胶上电泳的结果, 可以看出只有 *GmCRY2* (第一复叶) 有轻微的降解, 可能会对反转录有一定影响, 其余 RNA 质量良好。

2.3 反转录 cDNA 的 PCR 检测

用反转录得到的 cDNA 作模板进行 PCR 检测, 从琼脂糖凝胶电泳结果 (图 3) 可以看出, 条带大小

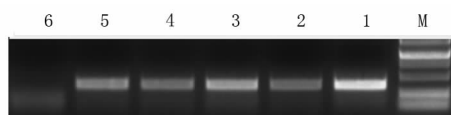
一致,而 ddH₂O 阴性对照没有出现条带,说明反转录的 cDNA 可用于 RT-PCR 方法检测 *GFP* 表达情况。



1: *GmCRY2* (单叶); 2: *GmCRY1* (单叶); 3: KN18;
4: *GmCRY1* (第一复叶); 5: *GmCRY2* (第一复叶)
1: *GmCRY2* (simple leaf); 2: *GmCRY1* (simple leaf); 3: KN18;
4: *GmCRY1* (first compound leaf); 5: *GmCRY2* (first compound leaf)

图2 RNA提取的电泳图谱

Fig. 2 The result of agarose gel electrophoresis of RNA



M: DNA 分子量标准; 1: *GmCRY2* (第一复叶); 2: *GmCRY1* (第一复叶);
3: KN18; 4: *GmCRY1* (单叶); 5: *GmCRY2* (单叶); 6: ddH₂O
M: DNA Marker; 1: *GmCRY2* (first compound leaf); 2: *GmCRY1* (first compound leaf); 3: KN18; 4: *GmCRY1* (simple leaf); 5: *GmCRY2* (simple leaf); 6: ddH₂O

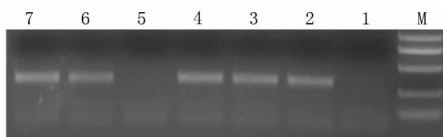
图3 反转录 cDNA 的 PCR 检测

Fig. 3 The detection of cDNA by RT-PCR

2.4 转化植株 RT-PCR 检测

由于目的基因 5'端融合了 1 个绿色荧光蛋白 (*GFP*) 基因,因此可以通过 RT-PCR 检测 *GFP* 的表达情况^[15],来检测转化植株中目的基因 (*GmCRY1* 和 *GmCRY2*) 是否表达。

以 cDNA 为模板,用 *GFP* 基因的引物进行 PCR 扩增,PCR 产物在 1.5% 琼脂糖凝胶上进行电泳,结果表明 (图 4),注射含大豆基因 *GmCRY1* 和 *GmCRY2* 菌液的植株扩增到 *GFP* 片段,而 KN18 未扩增到该片段,说明隐花色素基因 *GmCRY1* 和 *GmCRY2* 已经在注射过的叶片中表达。



M: DNA Marker; 1: ddH₂O; 2: 质粒 pEGAD; 3: *GmCRY2* (第一复叶);
4: *GmCRY1* (第一复叶); 5: KN18; 6: *GmCRY1* (单叶); 7: *GmCRY2* (单叶)
M: DNA Marker; 1: ddH₂O; 2: plasmid pEGAD; 3: *GmCRY2* (first compound leaf); 4: *GmCRY1* (first compound leaf); 5: KN18; 6: *GmCRY1* (simple leaf); 7: *GmCRY2* (simple leaf)

图4 PCR 扩增产物的电泳图谱

Fig. 4 The electrophoretogram of PCR product

2.5 开花时间分析

大豆属于严格的短日照植物,在长日照条件下,开花推迟,生育期延长^[16-17]。统计长日照条件

下注射后的大豆转化植株的开花时间并进行比较,结果 (图 5) 表明,与未注射的 KN18 和注射空质粒 pEGAD 的植株相比,过表达大豆基因 *GmCRY1* 的转化植株在长日条件下早开花,经 *T* 检验分析 $P < 0.05$ 差异显著,其它处理与未注射的 KN18 和注射空质粒 pEGAD 的开花时间相比无明显变化。

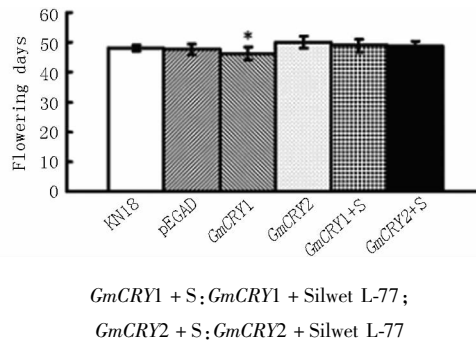


图5 大豆长日条件下各处理的开花时间

Fig. 5 Flowering time of different treatments in LD condition

3 讨论

3.1 叶片注射与大豆转化

在大豆的叶片刚展开时进行注射是关键一步,大豆叶片的生长时期直接影响基因的瞬时表达情况。注射菌液时的力度应适当,菌液能渗入叶内即可。试验中重悬菌液所用溶剂为超纯水,一种方法是直接用超纯水重悬菌液进行注射,另一种是在重悬液中加入表面活性剂 Silwet L-77。但从分子生物学检测和开花时间上看,加入表面活性剂对提高瞬时转化率的效果并不明显,其原因可能是表面活性剂的浓度不合适,注射菌液后会对叶片造成损伤,从图 1 可见,加入 Silwet L-77 的菌液注射部位出现叶片枯死现象,导致菌液无法进入或很少进入到叶片中,因此影响基因的表达。表面活性剂 Silwet L-77 的浓度对瞬时转化效率影响很大,因此这方面的改进还需进一步探索。

叶片对植株开花有重要的作用,新生叶片是 *GmCRY1*、*GmCRY2* 基因表达量最高的部位^[16]。隐花色素基因在植物营养阶段至花的组织生长阶段均起到重要作用,该试验对植株各叶片都进行注射,以保证叶片对植株开花有比较明显的作用,以期获得各处理间有较大表型差异。

传统的大豆转化方法,需要通过对大豆愈伤的诱导转化^[9]等步骤,过程复杂且转化率极低,转化植株从培养基移入土培过程经常会有大量转基因植株死亡,相比较而言,注射叶片法对于鉴定基因功能及观察植株表型更加快速、简便。

3.2 *GmCRY1* 与 *GmCRY2* 在植物开花过程中的作用

大豆中 *GmCRY1*, *GmCRY2* 在拟南芥下胚轴伸长中具有功能互补作用,而且 *GmCRY1* 的效应明显强于 *GmCRY2*。*GmCRY1* 的拟南芥转化植株在短日条件下开花明显比野生型和突变体早,这与拟南芥隐花色素 *CRY2* 的功能类似^[17]。*GmCRY2* 的拟南芥转化植株,虽然比野生型开花早,但却与突变体开花时间差异不明显。在该试验中,初步观察到转 *GmCRY1* 的植株在长日条件下开花明显比未进行任何瞬时转化的垦农 18 和只注射含 pEGAD 空载体菌液的转化植株早,这与 *GmCRY1* 的拟南芥转化植株在短日条件下的功能类似^[18],而在长日照条件下 *GmCRY1* 的作用在拟南芥中不明显,可能因为大豆为短日植物,而拟南芥是长日植物的原因。由此说明, *GmCRY1* 在长日照条件下瞬时表达能促进大豆早开花,为今后进一步研究大豆隐花色素 *GmCRY1* 奠定了基础。

参考文献

- [1] Ritz T, Yoshii T, Helfrich-Foerster C, et al. Cryptochrome: a photoreceptor with the properties of a magneto receptor[J]. Communicative Integrative Biology, 2010, 3(1): 24-27.
- [2] Kami C, Lorrain S, Hornitschek P, et al. Light-regulated plant growth and development[J]. Current Topics in Developmental Biology, 2010, 91: 29-66.
- [3] Zieker D, Jenne I, Koenigsrainer I, et al. Circadian expression of clock and tumor suppressor genes in human oral mucosa[J]. Cellular Physiology and Biochemistry, 2010, 26(2): 155-166.
- [4] Cashmore A R. Cryptochromes: enabling plants and animals to determine circadian time[J]. Cell, 2003, 114: 537-543.
- [5] 杨志攀, 周新安. 大豆光周期遗传育种研究进展[J]. 中国油料作物学报, 1999, 21(1): 67-73. (Yang Z P, Zhou X A. Soybean light cycle genetic breeding research progress[J]. Chinese Journal of Oil Crop Sciences, 1999, 21(1): 67-73.)
- [6] 陈洁敏, 赵九洲, 杨方人, 等. 播期对大豆开花及产量的影响[J]. 大豆科学, 1998, 17(3): 225-229. (Chen J M, Zhao J Z, Yang F, et al. Effect of sowing dates on blooming model and grain yield of soybean[J]. Soybean Science, 1998, 17(3): 225-229.)
- [7] 党尉, 卫志明. 根瘤农杆菌介导的高效大豆遗传转化体系的建立[J]. 分子细胞生物学报, 2007, 40(3): 185-193. (Dang W, Wei Z M. Efficient *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean[J]. Journal of Molecular Cell Biology, 2007, 40(3): 185-193.)
- [8] 李文霞, 李文滨, 吕文河, 等. 农杆菌介导大豆子叶节系统的两个问题突破[J]. 大豆科学, 2008, 27(1): 173-180. (Li W X, Li W B, Lv W H, et al. Breakthrough of two questions on the *Agrobacterium*-mediated soybean cotyledonary node systems[J]. Soybean Science, 2008, 27(1): 173-180.)
- [9] 马丽萍, 胡正, 张保缺, 等. 一种快速、高效的大豆农杆菌转化技术[J]. 中国农业科学, 2008, 41(3): 661-668. (Ma L P, Hu Z, Zhang B Q, et al. A fast and high efficient technique for *Agrobacterium*-Mediated transformation in soybean (*Glycine max* L. Merrill)[J]. Scientia Agricultura Sinica, 2008, 41(3): 661-668.)
- [10] 徐香玲, 李兴华, 刘伟华, 等. Ri 质粒介导大豆花叶病毒外壳蛋白基因转化大豆的研究[J]. 大豆科学, 1996, 15(4): 279-288. (Xu X L, Li X H, Liu W H, et al. Study on transferring soybeans mosaic virus coat protein (SMV-CP) gene into soybean by Ri-plasmid[J]. Soybean Science, 1996, 15(4): 279-288.)
- [11] 王全伟, 李新玲, 张海玲, 等. 转 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因 (*nhaA*) 大豆植株的获得及耐盐性分析[J]. 分子植物育种, 2010, 8(4): 701-707. (Wang Q W, Li X L, Zhang H L, et al. Overexpression of Na^+/H^+ antiporter gene (*nhaA*) improves salt tolerance in soybean[J]. Molecular Plant Breeding, 2010, 8(4): 701-707.)
- [12] 吕山花, 樊颖伦, 吕福堂, 等. 大豆 *GmPDS* 基因的克隆及 VIGS 表达载体构建和鉴定[J]. 生物技术通报, 2010(4): 122-131. (Lv S H, Fan Y L, Lv F T, et al. Construction and identification of VIGS expression vector carrying *GmPDS* gene cloned from *Glycine max*[J]. Biotechnology Bulletin, 2010(4): 122-131.)
- [13] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京: 科学出版社, 2002. (Wang G L, Fang H J. Plant genetic engineering[M]. Beijing: Science Press, 2002.)
- [14] 皮伟, 李名扬. 根瘤农杆菌介导 *FPF1* 基因转化菊花的研究[J]. 西南大学学报(自然科学版), 2007, 29(4): 70-73. (Pi W, Li M Y. Preliminary studies on transgenic chrysanthemum with *FPF1* gene mediated by *Agrobacterium tumefaciens*[J]. Journal of Southwest University (Natural Science Edition), 2007, 29(4): 70-73.)
- [15] 徐纪明, 向太和. 含 *GFP* 植物转基因表达载体的构建及在矮牵牛转基因不定根中的高效表达[J]. 遗传, 2008, 30(8): 1069-1074. (Xu J M, Xiang T H. Construction of a novel vector harboring green fluorescence protein gene (*GFP*) and high expression of *GFP* in transformed roots of *Petunia hybrida*[J]. Hereditas, 2008, 30(8): 1069-1074.)
- [16] Lin C, Shalitin D. Cryptochrome structure and signal transduction[J]. Annual Review of Plant Biology, 2003, 54: 469-96.
- [17] Zhang Q Z, Li H Y, Li R, et al. Association of the circadian rhythmic expression of *GmCRY1a* with a latitudinal cline in photoperiodic flowering of soybean[J]. Proceedings of the National Academy Science, 2008, 105(52): 21028-21033.
- [18] Guo H, Yang H, Mockler T C, et al. Regulation of flowering time by *Arabidopsis* photoreceptors[J]. Science, 1998, 279: 1360-1363.