

利用农杆菌介导的共转化法获得转基因水稻

刘永巍, 田红刚, 孟巧霞, 孟昭河, 李春光, 张景龙
(黑龙江省农垦科学院水稻研究所, 佳木斯 154025)

摘要:以水稻粳稻品种空育 131、垦稻 12 为材料, 用农杆菌共转化的方法将质粒 p1300 和 p13W8 导入受体材料。结果显示: 两种混合共转化菌液按体积比 1 : 1 时共转化效率最高, 植株转化效率达 4.08% 和 2.63%。将转化植株进行 PCR 鉴定, 13 株转基因植株均能检测到质粒 p1300 的信号, 4 株检测到质粒 p13W8 的信号, 反义蜡质基因的阳性株占转基因植株总数的 30.77%。
关键词: 水稻; 农杆菌介导; 反义蜡质基因; 共转化
中图分类号: S511.035.3 **文献标识码:** A **文章编号:** 1002-2767(2008)03-0005-03

Transgenic Rice Plants Obtained by Agrobacterium-mediated Co-transformation Method

LIU Yong-wei, TIAN Hong-gang MENG Qiao-xia MENG Zhao-he, LI Chun-guang, ZHANG Jing-long
(Rice Research Institute of Land Reclamation Academy of Heilongjiang Province, Jiamus 154025)

Abstract: Both of the plasmid p1300 and plasmid p13W8 were introduced into *Japonica* Rice Kongyu 131 by Agrobacterium-mediated co-transformation, the same two plasmid were introduced into Kendao 12 by the same way. The results showed that the co-transformation efficiency was highest when two kinds of Agrobacterium was 1 : 1 volume, and the co-transformation efficiency were 4.08% and 2.63%, respectively. The transformed plants were screened by PCR method, specific fragments of plasmid p1300 could be screened in 13 transgenic lines, specific fragments of plasmid p13W8 could be screened in 4 transgenic lines. Positive Antisense-Waxy Gene plants were 30.77% of all transformed plants.
Key words: rice; agrobacterium-mediated transformation; Antisense-Waxy Gene; co-transformation

高等植物的基因组一般是由上万个基因组成并由这些基因控制着他们的生长、发育及形成各种农艺性状(产量、质量及各种抗性等)。过去长期以来, 通过基因工程技术, 应用 1 或 2 个基因可以定向地改良某种性状, 然而这远远不能满足育种家们的培育高产、优质、抗病虫害、抗逆境等具有多个优良性状的作物品种的愿望^[1-3]。因而, 近年来, 应用 3 个或 3 个以上的基因对农作物进行改良称之为农作物改良的多基因策略成为必须。
农杆菌介导转化法是目前获得转基因植物的主要方法。用于农杆菌共转化的载体类型较多, 就目

前已有报道的可分为 4 种: 第一种称为双 T-DNA 双元载体(又叫超双元载体), 这种质粒载体上含有两个分离的完整 T-DNA 区, 目的基因与选择基因分别位于两个 T-DNA 区内。第二种称为双右边界双元载体, 这种载体与超双元载体的区别在于它只有一个左边界, 整个结构为第一个右边界—选择基因—第二个右边界—目的基因—左边界。第三种为双菌株双载体法, 即将目的基因和选择标记基因分别构建在两个双元载体的 T-DNA 区上, 再分别导入农杆菌的不同菌株, 然后同时用于转化。第四种是单菌株双载体法, 即将分别含有目的基因和选择标记基因的两个质粒载体导入同一农杆菌菌株中, 再用于转化, 此技术对载体的要求较高, 一般很少使用^[4-7]。

在农杆菌共转化系统中, 双菌系共转化有其独到的优点: 构建简单, 容易推广, 较少带有质粒 DNA 序列, 潜在的副作用较小等。

收稿日期: 2007-12-26
基金项目: 国家“863”资助项目(2001AA241016-2); 黑龙江省农垦总局资助项目(HNKXV-02-01-03)
第一作者简介: 刘永巍(1977-), 女, 黑龙江省北安市通北镇人, 硕士, 助理研究员, 从事植物生物技术育种研究。Tel: 0454-8195237; E-mail: nk_sdslyw@sohu.com.

1 材料与方法

1.1 材料

供试水稻粳稻(*Oryza sativa* L. Sub. *Japonica*)空育 131、垦稻 12 均由本研究所生物育种室提供。p13W8 质粒含有反义蜡质基因, p1300 含有潮霉素抗性基因。质粒均由中国科学院上海植物生理研究所遗传因子研究组构建并提供。

1.2 培养基

愈伤组织诱导培养基: N₆+2, 4-D 2 mg·L⁻¹+KT 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹+水解酪蛋白 0.5 g·L⁻¹+蔗糖 30 g·L⁻¹+琼脂粉 8 g·L⁻¹, pH5.8。

共培养培养基: N₆+2, 4-D 2 mg·L⁻¹+水解酪蛋白 0.5 g·L⁻¹+蔗糖 30 g·L⁻¹+葡萄糖 10 g·L⁻¹+琼脂粉 8 g·L⁻¹+乙酰丁香酮 100 μmol·L⁻¹, pH5.2。

筛选培养基: N₆+2, 4-D 2 mg·L⁻¹+KT 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹+水解酪蛋白 0.5 g·L⁻¹+蔗糖 30 g·L⁻¹+琼脂粉 8.0 g·L⁻¹+潮霉素(第一次筛选时加 25 mg·L⁻¹;第二次筛选时加 50 mg·L⁻¹)+羧苄青霉素 500 mg·L⁻¹, pH5.8。

预分化培养基中: CC 大量+M_s微量+CC 有机+甘露醇 33.6 g·L⁻¹+6-BA 0.5 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹+KT 0.5 mg·L⁻¹+2, 4-D 1 mg·L⁻¹+蔗糖 30 g·L⁻¹+琼脂粉 8 g·L⁻¹+潮霉素 25 mg·L⁻¹+羧苄青霉素 300 mg·L⁻¹, pH5.8。

分化培养基: MS+6-BA 2.0 mg·L⁻¹+KT 0.5 mg·L⁻¹+水解酪蛋白 0.5 g·L⁻¹+蔗糖 30 g·L⁻¹+琼脂粉 8.0 g·L⁻¹+潮霉素 25 mg·L⁻¹+羧苄青霉素 300 mg·L⁻¹, pH 5.8。

生根培养基: MS+Met 1.0 mg·L⁻¹+NAA 0.5 mg·L⁻¹+水解酪蛋白 0.5 g·L⁻¹+蔗糖 30 g·L⁻¹+琼脂粉 8.0 g·L⁻¹+潮霉素 25 mg·L⁻¹+羧苄青霉素 300 mg·L⁻¹, pH5.8。

1.3 农杆菌培养

取保存的菌种 p1300 和 p13W8 在 YEB 固体培养基上划平板, 28℃培养 2 d。从平板上挑取单菌落接入 5 mL YEB(含 Kan)液体培养基中, 28℃150 r·min⁻¹震荡培养过夜。吸取 1 mL 农杆菌培养液, 转入 50 mL AB(含 Kan)液体培养基中, 在 28℃150 r·min⁻¹震荡培养下过夜。4 000 r·min⁻¹离心, 收集菌体, 并将菌体重悬于 AAM 液体培养基, OD₆₀₀=0.4~1.0 时用于共培养。

1.4 遗传转化

取授粉 12~15 d 未成熟种子, 经 70%乙醇表面消毒后, 用 2%NaClO 溶液消毒 90 min, 无菌水冲洗 3~4 次, 在无菌条件下挑取幼胚接种于诱导培养基, 4 d 后分别按两种菌液体积比 1:1、1:2、2:1 农杆菌菌液感染, 20 min 后取出用无菌吸水纸吸

干, 转入共培养培养基。3 d 后切除胚芽并转入选择培养基。2 周后, 转入新鲜的筛选培养基上继续筛选培养。2 次筛选培养后, 再预分化处理后培养于分化培养基, 置于 26℃, 15 h·d⁻¹光照条件下分化形成小苗。

1.5 PCR 检测

引物 Hyg1 序列是: (5' GCTTCTGCGGGCGATTGTGT3') 和 Hyg2 (5' GGTGCGGAGGCTATGGATGC 3'); 引物 W8P1 序列是: (5' CTCTCGGAGAGGTTTCAGCTC 3') 和 W8P2 (5' ATGATAATCATCGCAAGACC 3')。

1.5.1 转基因植株总 DNA 的提取 提取方法参照 CTAB 法。

1.5.2 PCR 反应体系

10X buffer	2.5 μL
25mM Mg ⁺⁺	2 μL
10mM dNTPs	2 μL
primer1	1 μL
primer2	1 μL
Taq 酶	0.3 μL
模板 DNA	1 μL
加 ddH ₂ O 至	25 μL

1.5.3 PCR 反应条件 潮霉素抗性基因检测条件:

94℃ 2 min;
94℃ 30 s; 55℃ 30 s; 72℃ 30 s 30 个循环
72℃ 10 min
End
反义蜡质基因检测条件:
94℃ 5 min;
94℃ 45 s; 58℃ 45 s; 72℃ 1 min 30 个循环
72℃ 10 min
End

2 结果与分析

结果表明(见表 1), 两种混合共转化菌液按体积比 1:1 混合用于转化的效果较其他处理好, 其抗性愈伤率达到 45.92%(空育 131)和 39.47%(垦稻 12), 浓度比为 1:2 时其次, 而浓度比为 2:1 时共转化率较低。

在 1:1 混合菌液共感染 2 个水稻品种的 386 块愈伤组织。经 2 次潮霉素抗性筛选后, 有 165 块表现为抗性。抗性愈伤组织经分化培养共获得 13 株转基因植株, 频率为 3.37%。用 Hyg1 和 Hyg2 引物对这 13 株转基因植株进行 PCR 扩增, 均能检测到质粒 p1300 的信号。而用 W8P1 和 W8P2 引物进行 PCR 扩增, 只有 4 株检测到质粒 p13W8 的信号; 含反义蜡质基因的阳性株占转基因植株总数的 30.77%。在潮霉素抗性基因的检测中, PCR 产物约为 600 bp; 在反义蜡质基因的检测中, PCR 产

物约为 450 bp(见图 1)。

表 1 共转化时农杆菌不同浓度比对植株转化率的影响

浓度比	品种	愈伤数 / 块	抗性愈伤 数/ 块	抗性愈 伤率/ %	转基因 植株/ 份	植株转化 频率/ %
1 : 1	空育 131	196	90	45. 92	8	4. 08
	垦稻 12	190	75	39. 47	5	2. 63
	合 计	386	165	42. 75	13	3. 37
1 : 2	空育 131	195	65	33. 33	4	2. 05
	垦稻 12	192	53	27. 60	2	1. 04
	合 计	387	118	30. 49	6	1. 55
2 : 1	空育 131	198	46	23. 23	2	1. 01
	垦稻 12	195	42	21. 54	0	0
	合 计	393	88	22. 39	2	0. 51

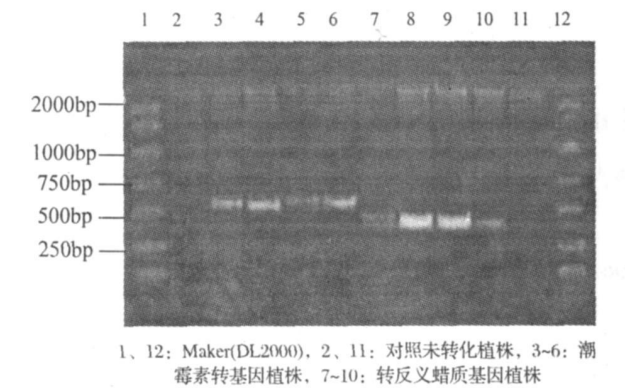


图 1 共转化转基因植株的 PCR 检测

3 讨论

从转基因的安全性考虑, 标记基因的安全性是个潜在问题。基于农杆菌本身就是一个天然的共转化载体, 因此已被用于共转化系统。该系统中标记基因和目的基因分别插入两段 T-DNA, 并以非连锁形式导入植物, 位于不同位点的 2 个基因, 必然会发生分离和重组, 可从其后代中筛选出已导入目的基

因而无标记基因的转基因植株。

如何进一步提高水稻的农杆菌双菌共转化效率, 仍然有很多值得思考和研究的问题。例如, 双菌所携带的质粒大小可能不同, 它们在不同的农杆菌菌株中的拷贝数可能不同, 会影响共转化时两种菌系细胞吸附在同一个植物细胞上的概率, 从而影响共转化率。在质粒大小不同时, 双菌的浓度比是一个值得进一步研究的问题。

其次, 如果在两个质粒上采用不同的筛选标记, 第一、二轮筛选时先针对一个标记, 第三轮筛选时改筛另一个标记, 也是一种可以尝试的思路。这样可能延长筛选时间, 对于耐继代特性不太好的品种来说, 可能会导致其再生率下降, 但得到的再生苗中共转化率可能会明显提高。在这种思路下, 选用耐继代特性好的品种, 或努力改进品种的组培特性, 显得尤为重要。

参考文献:

[1] 刘巧泉, 张景六, 王宗阳 等. 根癌农杆菌介导的水稻高效转化系统的建立[J]. 植物生理学报. 1998, 24(3): 259-271.

[2] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 744.

[3] 沈革志, 王新其, 殷丽青 等. 通过共转化和花药培养快速获得直链淀粉含量降低且无抗性标记的转基因水稻[J]. 植物生理与分子生物学学报, 2004, 30(6): 637-643.

[4] 刘巧泉, 陈秀花, 王兴稳 等. 一种快速检测转基因水稻中潮霉素抗性的简易方法[J]. 农业生物技术学报, 2001, 9(3): 264-268.

[5] 丁力, 丁月云, 曹守云, 等. 应用农杆菌转化水稻的研究[J]. 高技术通讯, 1998(11): 49-52.

[6] 高振宇, 黄大年. 影响籼稻幼胚愈伤组织形成和植株再生的若干因素[J]. 植物生理学通讯, 1999, 35(2): 113-115.

[7] 陆美芳, 刘巧泉, 于恒秀 等. 农杆菌介导的水稻双载体共转化法中部分影响因素的研究[J]. 生物技术通报, 2005(5): 55-62.

欢迎订阅2008年 《黑龙江农业科学》

《黑龙江农业科学》是黑龙江省农业科学院主办的综合性科技期刊,是全国优秀期刊、黑龙江省优秀期刊、“中国期刊方阵”期刊,中国核心期刊(遴选)数据库,CNKI系列数据库、万方数据库、重庆维普中文科技期刊数据库和华艺电子出版事业群收录期刊。本刊坚持以高新实效为原则,以服务科研、服务生产为宗旨,主要报道最新的农业科研成果、先进技术、发展趋势以及新产品、新品种等,能够全面反映黑龙江省特色、内容丰富、栏目新颖、信息量大、可读性强。设有专家论谈、生物技术、育种栽培、土壤肥料、环境资源、植物保护、畜牧兽医、园林园艺、质量安全、农村能源、食用菌、遥感、三农问题研究、综述、农技推广、品种简介、农业信息等栏目以及各类广告业务宣传,如:新品种、新产品、重点实验室、研究所、企业简介等。本刊发行面广,读者群大:农业科研工作者、农业院校师生、国营农场及农业技术推广部门的科技人员、管理干部和广大农民群众等。

本刊为国际大十六开本,彩色四封,164页,双月刊,刊号:ISSN1002-2767,CN23-1204/S,邮发代号14-61,广告经营许可证号:2301004010072,单月10日出版,每期定价8.00元,全年48.00元。全国各地邮局(所)均可订阅。漏订者可汇款至本刊编辑部补订。

另外,本刊编辑部现有少量 2005~2007 年合订本珍藏版。每册 70.00 元(2007 年 80.00 元),邮费 10.00 元,共计 80.00(2007 年 90.00 元),售完为止。

地 址: 哈尔滨市南岗区学府路368号 《黑龙江农业科学》编辑部
电 话: 0451-86668373
电子信箱: nykx13579@sina.com
邮 编: 150086

