Bt 基因转化龙稻 8 号和龙稻 9 号初探

王彤彤,孟　英,张喜娟,唐　敖,孙　兵,董文军
(黑龙江省农业科学院 耕作栽培研究所,黑龙江 哈尔滨 150086)

摘要:为提高水稻品种抗性,以特种稻龙稻 8 号和龙稻 9 号的成熟种子作为试验材料诱导形成胚性愈伤,分别用携带有 pCDMAR-UBb-Hyg 质粒单价 *Cry1Ab* 基因的菌株 LBA4404 和携带有 pCDMAR-UBAC-Hyg 质粒双价 *Cry1Ac*＋*SCK* 基因的菌株 LBA4404 为 *Bt* 基因的载体,再以农杆菌介导的方法实现 *Bt* 基因对龙稻 8 号和龙稻 9 号基因座的修饰。结果表明:两种质粒的转化率都在 20%～30%,而两个品种的 Bt 蛋白表达阳性几率存在一定的差异。

关键词:水稻;*Bt* 基因;转化率;分化率
中图分类号:S511　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1002-2767(2012)03-0022-03

黑龙江水稻种植面积已超过 333 万 hm^2,成为我国最大的粳稻生产省份,是我国粮食安全的重要保证。自 21 世纪初,二化螟已成为黑龙江省水稻生产的新型虫害,其危害程度有逐年加重的趋势,给水稻生产带来严重的影响[1-4]。目前采取的防御措施都是药剂防治,且防效有限[2-4]。此外,药剂防治带来的风险是药剂残留对生物及环境的负面影响,同时长期用药会使螟虫产生抗药性。解决这一问题的有效方法是培育或选用抗虫水稻品种。目前生产上的水稻品种都不具备抗螟虫的嗜食能力。因此,该项研究通过转 *Bt* 基因增强水稻抗螟虫的嗜食能力来提高水稻的抗虫性,从而提高水稻的产量。

1　材料与方法

1.1　农杆菌菌株质粒

以分别携带有 pCDMAR-UBAC-Hyg 和 pCDMAR-UBb-Hyg 两种质粒的农杆菌株 LBA4404 作为转化的介导材料(由福建省农业科学院生物技术研究所提供)。

1.2　供试材料的外部消毒

龙稻 8 号和龙稻 9 号优良种子由黑龙江省农业科学院耕作栽培研究所提供。将种子去壳消毒,以 75%酒精(化学纯)浸泡处理 3 min,再以 30%次氯酸钠(化学纯)浸泡处理 25 min,之后用无菌水冲洗 5 次,放置于无菌培养皿中用无菌滤纸吸干(约2 h)。之后接种至含有 2,4-D 2 $mg \cdot L^{-1}$ N_6B_5 诱导培养基上。封口置于 25℃暗培养箱中培养。

1.3　愈伤组织诱导

种子培养 7 d 后,取出掐掉叶芽去掉胚乳。T_0 愈伤组织依然留在诱导培养基上置于 20℃培养箱进行培养,7 d 后进行愈伤掐块并转移至新的诱导培养基上作为 T_1 愈伤进行继代培养,25℃暗培养周期 15 d,15 d 之后从 T_1 愈伤组织中选取直径约 1～2 mm 的淡黄色愈伤组织进行下一次继代培养 T_2。15 d 之后再次进行继代培养至 T_3。T_3 愈伤组织培养 15 d 后开始进入感染阶段。

1.4　农杆菌的侵染

在 T_3 愈伤组织中挑选 2～3 mm 的淡黄色健康组织进行育胚,每皿约接种 150～200 粒。25℃暗培养 3 d 后进行感染。在含有 Kan 50 $mg \cdot L^{-1}$ 和 Rif 50 $mg \cdot L^{-1}$ 的 YEB 培养基上划菌 25℃暗培养 2 d。后以 AAM 培养液对 YEB 菌板进行清洗收集菌液调整 OD 值介于 1.0～1.2 后,暗培养 60 min 之后,将菌液与之前选好的愈伤组织混合震荡 1～2 min 置于 25℃培养箱暗培养 30 min。然后再将菌液倾倒,将愈伤置于滤纸上吹干 1～2 h。后接种至含有乙酰丁香酮(AS 100 $\mu mol \cdot L^{-1}$)的培养基上 25℃暗培养 3 d。之后再将愈伤组织用无菌水清洗,以浓度为 250 $mg \cdot L^{-1}$ 的羧卞青霉素浸泡 60 min。置于无菌滤纸上吹干 1～2 h 后,将愈伤

收稿日期:2011-11-14
基金项目:国家转基因专项资助项目(2008ZX08001-001);黑龙江省自然科学基金重点资助项目(2009HSJ-E-2);哈尔滨市青年基金资助项目(92007RFQYN106)
第一作者简介:王彤彤(1983-),男,黑龙江省哈尔滨市人,学士,研究实习员,从事水稻分子育种研究。E-mail:acierwang@hotmail.com。
通讯作者:孟英(1970-),女,黑龙江省宝清县人,博士,副研究员,从事水稻分子育种研究。E-mail:mengying1209@163.com。

组织接种至含有 Hyg 30 mg·L^{-1} 羧卞青霉素 250 mg·L^{-1} 2,4-D 2 mg·L^{-1} N_6B_5 培养基上。

1.5　抗性继代培养

将接种至含有抗生素培养基的愈伤组织置于 25℃暗培养 15 d，此时愈伤组织呈现黑褐色，将这些愈伤组织再次转移至新的抗性培养基上进行继代培养约 20～30 d 时，在黑褐色愈伤组织中长出新的淡黄色愈伤组织。将这些新的愈伤组织挑选至含有 Hyg 50 mg·L^{-1}，2,4-D 2 mg·L^{-1} N_6B_5 培养基上，画格培养 2～3 d。

1.6　分化与生根

在 H50 上筛选的抗性愈伤，每个格子中的愈伤组织为一个克隆，选取依然生长良好的克隆转移至分化培养基（KT 10 mg·L^{-1}，透明琼脂 3.38 g·L^{-1}，NAA 0.4 mg·L^{-1}）30～35 d 转移至生根培养基。

2　结果与分析

2.1　Cry1Ab 质粒的转化

经 Cry1Ab 质粒感染的龙稻 8 号和龙稻 9 号品种的愈伤组织其转化率在 20%～30%，分化率在 49%～54%，不论是分化率还是转化率都有随继代次数的增多而下降的趋势，龙稻 8 号的分化率和转化率略高于龙稻 9 号；而在不同继代周期感染 Cry1Ab 质粒后的转化率和分化率也没有表现出明显的差异，只有龙稻 9 号的第 5 代愈伤组织感染后的转化率下降幅度较大（见表 1）。

表 1　Cry1Ab 质粒转化结果分析

Table 1　Result of Cry1Ab conversion

愈伤组织代数 Generation of callus	品种 Variety	感染的数量/粒 Infected callus	H50 筛选数量/克隆 H50 fastness callus	分化数量/瓶 Quantity of differentiation	成苗数量/克隆 Seedling number	转化率/% Percentage of conversion	分化率/% Percentage of differentiation
第 3 代愈伤组织	龙稻 8 号	1900	632	578	309	30.42	53.46
Third generation	龙稻 9 号	3020	934	885	451	29.30	50.96
第 4 代愈伤组织	龙稻 8 号	1760	597	546	280	31.02	51.28
Forth generation	龙稻 9 号	2840	841	821	413	28.91	50.30
第 5 代愈伤组织	龙稻 8 号	1400	458	418	212	29.86	50.72
Fifth generation	龙稻 9 号	2360	539	506	252	21.44	49.80

2.2　Cry1Ac+SCK 质粒的转化

与 Cry1Ab 质粒转化相反，经 *Cr1Ab+SCK* 基因的农杆菌介导转化后，龙稻 8 号的愈伤组织转化率略低于龙稻 9 号。分化率龙稻 8 号略高。不同继代次数的培养基随继代时间长度的增加转化率和分化率也都表现下降的趋势，转化率下降的幅度明显大于分化率下降的幅度。龙稻 8 号转化率下降的幅度远低于龙稻 9 号。分化率下降幅度较小，品种间的差距也不大（见表 2）。

表 2　Cry1Ac+SCK 质粒转化结果分析

Table 2　Result of Cry1Ac+SCK conversion

愈伤组织代数 Generation of callus	品种 Variety	感染的数量/粒 Infected callus	H50 筛选数量/克隆 H50fastness callus	分化数量/瓶 Quantity of differentiation	成苗数量/克隆 Seedling number	转化率/% Percentage of conversion	分化率/% Percentage of differentiation
第 3 代愈伤组织	龙稻 8 号	1520	484	435	242	28.62	50.00
Third generation	龙稻 9 号	1720	605	570	297	33.14	49.09
第 4 代愈伤组织	龙稻 8 号	1460	449	402	223	27.53	49.67
Forth generation	龙稻 9 号	1600	517	480	248	30.00	47.97
第 5 代愈伤组织	龙稻 8 号	1100	282	273	140	24.82	49.65
Fifth generation	龙稻 9 号	1580	415	397	201	25.13	48.43

从对龙稻 8 号和龙稻 9 号成熟胚诱导的愈伤组织的 *Bt* 基因转化的最终结果可以看出，龙稻 8 号和龙稻 9 号愈伤组织的转化率基本稳定在 25%～30%，分化率基本稳定在 50%左右。而转

化率及分化率都随着愈伤组织在诱导培养基上培养代数的增加而略有减少。转化率的降低有可能是因为在几十天的培养过程中，愈伤组织老化而无法携带传递更多生物信息所导致的自然凋亡的几率增加的结果。而分化率的降低有可能是因为在长时间异养的条件下导致愈伤组织对某些基因的表达率降低，不表达，甚至是缺失造成的。从而在分化期间，随着愈伤组织代数的增加而白化苗的比率也有明显增加的趋势。经过长期培养的水稻愈伤组织在分化过程中会有一定程度的褐化，很多试验证明褐化的原因是由于切割或剥离使组织受到伤害，从而产生的多酚类化合物，这些化合物在多酚氧化酶的作用下使组织发生褐变[8]。如果添加一定浓度的 ABA[5]、脯氨酸[6]、$AgNO_3$[7]和谷氨酰胺[6]可以一定程度降低分化时褐化的比率。顾之中等在对抑制水稻愈伤组织的褐变研究中所添加的几种抗氧化剂均可减轻愈伤组织在培养过程中的褐化率，同时也诠释了愈伤组织褐化的几个外界因素，即：pH、培养时间、浸泡时间和紫外线等[9-10]。但是抗氧化剂都是具有极强还原性的，例如柠檬酸及其衍生物，虽然有良好的抗氧化性，但裸露在空气中会被空气中的氧气自然氧化。所以在应用抗氧化来减少或减轻愈伤组织褐化率的方法中，要根据试验条件选择适宜的抗氧化剂，对愈伤组织进行保护。

2.3　试纸条检测结果

转两种质粒的龙稻 8 号，Bt 蛋白表达阳性几率都在 26%。而龙稻 9 号转 Cry1Ab 质粒的 Bt 蛋白表达阳性的单株在 32%而转 Cry1Ac+SCK 质粒的龙稻 9 号 Bt 蛋白表达阳性几率仅为 6%。这与预期的结果有一定的偏差。

表 3　试纸条检测结果比较

Table 3　Comparison of test paper result

品种 Variety	Cry1Ab 阳性株/株 $Cry1Ab^+$	Cry1Ac+SCK 阳性株/株 $Cry1Ac+SCK^+$	Cry1Ab 阳性百分比/% Percentage of $Cry1Ab^+$	Cry1Ac+SCK 阳性百分比/% Percentage of $Cry1Ac+Sck^+$
龙稻 8 号　Longdao No. 8	210	157	26.20	26.00
龙稻 9 号　Longdao No. 9	360	45	32.20	6.00

预期结果双价载体在转基因植物中的表达率应比单价载体的表达率低一些，而且在以 *Hgy* 基因为标记的筛选过程中，默认标记基因转入即相当于目的基因转入。而在对龙稻 8 号转基因植株的检查结果中发现，目的基因的表达率基本相同且仅有 26%。而龙稻 9 号转基因植株最后呈现的结果虽然双价载体的表达率明显低于单价载体，但是过低，仅有 6%（对龙稻 9 号转 Cry1Ac+SCK 植株以试纸条的方式检测过 2 次，结果并无任何偏差）。说明在以农杆菌介导的方法对水稻进行转化的时候，有着非常大的随机性。基因可以随机转入或非转入，即便标记基因转入，目的基因也有极大的几率表现出沉默的状态。

3　结论与讨论

试验结果表明，农杆菌对龙稻 8 号和龙稻 9 号的转化率分化率以及成苗率都保持着相对的稳定性，而农杆菌介导转化的方式，始终都是随机插入，甚至多位点多片段的插入，对后期植株的农艺性状影响比较明显，虽然可以应用此方法来有效建立突变体库，但单纯对转基因育种而言，并不是研究者所期望的。在未来的研究中希望能依然通过组织培养的方法，对植株的染色体组进行单拷贝及特定位点的理想化插入。

参考文献：

[1] 吴丽岩，陈继光. 寒地水稻二化螟发生规律和测报方法调查研究[J]. 中国植保导刊，2009(8)：19-20.

[2] 迟力勇，王玉荣. 黑龙江省水稻二化螟的发生规律与防治方法[J]. 黑龙江农业科学，2008(3)：145-146.

[3] 王辉. 水稻二化螟的发生及防治[J]. 北方水稻，2011，44(2)：55.

[4] 庄同春. 寒地水稻白穗产生原因及防治对策[J]. 黑龙江农业科学，2007(6)：30-31.

[5] 姜华，陈静，高晓玲，等. ABA 对水稻愈伤组织、不定胚发育及其植株再生的影响[J]. 作物学报，2006，32(9)：1379-1383.

[6] 叶松青，储成才，曹守云，等. 提高水稻转化效率几个主要因素的研究[J]. 遗传学报，2001，28(10)：933-938.

[7] George L，Rao P S. *in vito* induction of pollen embryos and plant-lets in Brasseca sunsea through anther culture[J]. Plant Sci. Lett. 1982，26(1)：111-116.

[8] 陈维伦. 植物生物技术[M]. 北京：科学出版社 1987.

[9] 顾之中，江绍梅，熊友发，等. 水稻愈伤组织发生褐变的影响因素研究[J]. 江西大学农业学报，1992，14(3)206-211.

[10] 顾之中，熊友发，江绍梅. 几种抗氧化剂对水稻愈伤组织抑制褐化效应的研究[J]. 江西大学农业学报，1994，16(3)292-296.

PRRSV 非结构蛋白 2-半胱氨酸结构域的原核表达及抗原表位预测

周　胜,高　歌,孙　荡,鲍梦雅,茅　翔
(南京农业大学 动物医学院,江苏 南京 210095)

摘要:为了获得 PRRSV 非结构蛋白 2-半胱氨酸结构域的高纯度原核表达蛋白以及了解该蛋白的抗原表位,试验以从 PRRSV-VR2332 毒株上提取的病毒全基因组 RNA 为模板,通过 RT-PCR 扩增非结构蛋白 2-半胱氨酸结构域(Nsp2pro)基因,连接构建原核表达载体 SUMO-Nsp2pro,转入宿主菌 Rosetta2,经 IPTG 诱导,获得高浓度的可溶蛋白 Nsp2pro,经亲和层析 His-Bind 后得到高纯度的目的蛋白。同时,运用生物信息学方法对 Nsp2pro 二级结构及抗原表位进行预测。结果显示,Nsp2pro 的 α 螺旋及 β 折叠区域较多,转角区域较少,结构较为复杂,位于蛋白分子表面且亲水的区段很可能是 B 细胞表位的优势区段。获得较高纯度的蛋白,将为后续进一步研究 *Nsp2pro* 基因编码的蛋白在病毒复制过程中的作用奠定基础。

关键词:PRRSV;*Nsp2pro*;基因克隆;原核表达;抗原表位预测
中图分类号:Q78　　**文献标识码**:A　　**文章编号**:1002-2767(2012)03-0025-04

猪繁殖与呼吸综合症(Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome,PRRS)是一种急性猪传染病。1987 年该病首次爆发于美国,2006 年 PRRS 在我国大部分省份流行起来,给养猪业造成了极大的损害[1]。高致病性猪蓝耳病是由猪繁殖与呼吸综合症病毒变异株引起的一种急性高致死性疫病,临床表现为母猪繁殖障碍、呈现流产、死胎、木乃伊胎及弱仔等症状,仔猪及育成猪表现为呼吸系统困难等症状[1]。PRRSV 基因组约为 15 kb,含有 9 个开放阅读框 ORF,其中 ORF1 主要编码非结构蛋白。非结构蛋白 2(nonstructural protein 2,Nsp2)是 PRRSV 编码最大的非结构蛋白,在病毒复制过程中具有重要作用。其半胱氨酸结构域具有顺式和反式切割功能,顺式与反式功能的缺失会影响病毒的复制[2]。通过原核表达具有活性的半胱氨酸蛋白酶结构域,并能获得高纯度的蛋白质,接下来将在家兔身上进行多克隆

收稿日期:2011-12-12
基金项目:南京农业大学大学生创新资助项目(1004A04)
第一作者简介:周胜(1990-),男,江苏省盐城市人,在读学士,从事动物传染病预防研究。E-mail:1718418@njau.edu.cn。
通讯作者:茅翔(1972-),男,安徽省肥东市人,教授,博士生导师,从事重大动物疫病病原分子结构与功能的关系研究。E-mail:xmao@njau.edu.cn。

Preliminary Study on Gene Transformation of Longdao No. 8 and Longdao No. 9 by *Bt* Gene

WANG Tong-tong, MENG Ying, ZHANG Xi-juan, TANG Ao, SUN Bing, DONG WEN-jun
(Crop Tillage and Cultivation Institute of Heilongjiang Academy of Agricultural Sciences, Harbin, Heilongjiang 150086)

Abstract: In order to enhance resistance of rice, bacterial strain LBA4404 which contained two different types of plasmid pCDMAR-UBb-Hyg and pCDMAR-UBAC-Hyg modified *Cry1Ab* and *Cry1AC*+*SCK* separately were used as mediator to carry out locus modifying of Longdao No. 8 and Longdao No. 9. The results showed that conversion percentage of both the two plasmids were between 20% and 30%. But percentage of positive test for Bt protein showed a little difference.

Key words: rice; *Bt* gene; conversion percentage; differentiation rate