

抗氧化剂对农杆菌介导的大豆下胚轴 *GUS* 基因瞬时表达的影响

汲逢源 王戈亮 许亦农*

(中国科学院植物研究所光合作用与环境分子生理学重点实验室, 北京 100093)

摘要 大豆(*Glycine max*)下胚轴作为大豆遗传转化的外植体材料,能快速高频再生不定芽。然而,在遗传转化过程中褐化影响基因转化效率。在该研究中,我们用含有 *GUS* 染色基因和 *hpt* II(Hygromycin phosphotransferase II)筛选基因的农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*) LBA4404 侵染大豆下胚轴,并用组织化学定位法测定了 *GUS* 基因的瞬时表达,以确定大豆的优化基因转化条件。结果显示,在共培养基中加入硫代硫酸钠、L-半胱氨酸以及二硫苏糖醇等抗氧化剂,可以有效地抑制大豆下胚轴在组培过程中褐化的发生,并大幅度提高农杆菌在下胚轴的瞬时表达率。这些结果说明抗氧化剂可以降低这种影响并有效提高基因转化效率。

关键词 大豆 下胚轴 农杆菌 *GUS* 基因 瞬时表达

THE EFFECTS OF ANTIOXIDANTS ON THE TRANSIENT EXPRESSION OF *GUS* GENE IN SOYBEAN HYPOCOTYLS MEDIATED BY *AGROBACTERIUM TUMEFACIENS*

Ji Feng-Yuan WANG Ge-Liang and XU Yi-Nong*

(Key Laboratory of Photosynthesis and Environmental Molecular Physiology, Institute of Botany, Chinese Academy of Sciences, Beijing 100093, China)

Abstract Soybean hypocotyls have advantages of higher regeneration frequency and faster formation of adventitious shoots, and often be used in soybean transformation mediated by *Agrobacterium tumefaciens*. But the browning and necrosis of hypocotyls during co-cultivation greatly affects the efficiency of the transformation. The effects of antioxidants on the transient expression efficiency of *GUS* (β -glucuronidase) gene in soybean hypocotyls mediated by *Agrobacterium tumefaciens* were studied by adding antioxidants (thiosulfate, L-cysteine, and dithiothreitol) in the co-cultivation medium, and the transient expression efficiency of the *GUS* gene was measured by histochemically method. The results showed that the antioxidant in the co-cultivation medium increased the transient expression efficiency up to 23.4% in hypocotyls. Further investigation demonstrated that higher transient expression efficiency was associated with concomitant decreases in the levels of hypocotyl browning. The stable expression of *GUS* gene in hypocotyls was found in the cambium cells, which was formed as deep blue zone on the hypocotyls. Our results also showed that concentration of *Agrobacterium tumefaciens* and co-cultivation time were the important factors that affected the transient expression efficiency of *GUS* gene in hypocotyls. In our experiments, the highest transient expression efficiency of *GUS* gene obtained by inoculating hypocotyls in *Agrobacterium tumefaciens* (OD₆₀₀ 0.6) and co-cultivating for 3 days in the darkness. All results suggested that antioxidants could efficiently improve transient expression efficiency of *GUS* gene in soybean hypocotyls.

Key words Soybean, Hypocotyls, *Agrobacterium tumefaciens*, *GUS* gene, Transient expression

大豆(*Glycine max*)不但是世界上最重要的油料作物,也是世界上最重要的植物蛋白源。利用基因工程对大豆进行产量和品质改良,对满足人类对大豆的需求具有重要作用。但是,大豆的遗传转化效

率低一直是大豆基因工程改良的主要限制因子。人们试图通过多种途径提高大豆转化效率,包括农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)介导的子叶节转化途径。但是,以子叶节作为外植体的方法不定芽诱导

频率比较低,而且转化后即使在筛选介质浓度相对高的培养基中筛选,部分非转化的不定芽仍可存活,并且,转化的不定芽一般为嵌合体,导致后期鉴定、筛选、传代和纯化的工作量大(邓向阳和卫志明,1998)。另外,有研究表明,通过在共培养阶段添加硫代硫酸钠、L-半胱氨酸以及二硫苏糖醇等抗氧化剂,大豆子叶节转化效率由对照的 0.8% 提高到了 12.7%(Olhoft & Somers, 2001)。但是对于大豆遗传转化来说,仍难以达到要求。大豆下胚轴是一种很好的组织培养材料,从 20 世纪 70 年代开始就已经陆续由其诱导愈伤并再生植株成功(Kaneda *et al.*, 1997; 张晓娟等, 2000)。这种方法操作简单,并且能够高效诱导出愈伤组织(Liu *et al.*, 1997)。

大豆中含有较多的多酚氧化酶和过氧化氢酶,在遇到病原体侵染或物理损伤时,它们氧化酚类化合物,造成外植体伤口的褐变和坏死(Boué *et al.*, 2000; Olhoft & Somers, 2001; Olhoft *et al.*, 2003; Vámos-Vigyázó, 1981),从而阻止农杆菌的侵染,大大降低了外源基因的转化效率。在本研究中,我们通过对 *GUS* 基因在大豆下胚轴瞬时表达的分析,研究了硫代硫酸钠、L-半胱氨酸以及二硫苏糖醇等抗氧化剂对农杆菌介导的大豆转化效率的影响,并对农杆菌转化大豆的不同处理条件予以比较,以确定优化转化条件。

1 材料和方法

1.1 植物材料

本试验选用‘早熟 18 号’、‘科丰 6 号’、‘科新 3 号’和‘黑农 41 号’大豆品种。大豆消毒参考 Di 等(1996)的方法,并做了改进。挑选约 200 粒无病、饱满的大豆种子平铺在敞口培养皿中,放入内置一盛有 100 ml 次氯酸钠原液烧杯的通风橱内的干燥器中,然后沿烧杯壁缓慢加入 3.3 ml 浓盐酸,盖好干燥器,灭菌 24 h。

将灭菌后的种子放置在发芽培养基 GM(1/2B₅ 基本培养基 + 1.5% 蔗糖 + 0.75% 琼脂, pH 5.8)中,置于 25 °C、90 ~ 150 $\mu\text{E}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 光强(光照周期 18/6 h)的条件下发芽 5 ~ 6 d。然后切取紧靠子叶节的部位约 0.5 cm 的下胚轴作为外植体。

1.2 农杆菌制备和转化

本试验采用含有选择标记基因 *hpt* II (Hygromycin phosphotransferase II) 及 *GUS* 报告基因的农杆菌菌株 LBA4404。用三亲杂交的方法,以 pRK2013 为助动质粒将 pCAMBIA1301 导入到根癌农

杆菌 LBA4404 中。农杆菌在含有 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 利福平 (Rif)、50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 卡那霉素 (Kan) 和 50 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 链霉素 (Str) 的 YEP 培养基中 28 °C 振荡培养 24 h,至对数生长期(OD_{600} 约为 0.5),菌液呈桔黄色时可供转化使用。取 30 ml 菌液 10 °C 下 5 000 rpm 离心 4 min,弃上清,收集管底菌体,用液体共培养培养基(MS 基本培养基 + 3.9 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ MES + 0.2 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 硫代硫酸钠 ($\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_3$) + 1.06 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 半胱氨酸(L-cysteine) + 3% 蔗糖(Sucrose) + 0.154 $\text{g}\cdot\text{L}^{-1}$ 二硫苏糖醇(DTT) + 200 $\mu\text{mol}\cdot\text{L}^{-1}$ 乙酰丁香酮(AS) + 2 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 萘乙酸(NAA) + 1 $\text{mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 激动素(KT), pH 5.6)重悬菌体,室温下静置 1 h 后备用。将约 50 个外植体浸入到约 30 ml 重悬后的菌液中,使得外植体在菌液中浸泡 30 min,并不断振荡。之后将外植体取出,在无菌的滤纸上吸干菌液,放在铺有滤纸的共培养培养基(加 0.5% 琼脂的转化培养基)上,在 25 °C 黑暗条件下共培养 5 d。

共培养后将外植体用蒸馏水冲洗,按照 Jefferson (1987)的方法进行 *GUS* 组织化学染色,以未用硫代硫酸钠、L-半胱氨酸以及二硫苏糖醇处理的外植体为对照。

瞬时表达率 = 有 *GUS* 基因瞬时表达的外植体数 / 总外植体数 $\times 100\%$ 。

2 结果与讨论

2.1 抗氧化剂对 *GUS* 基因在大豆下胚轴中瞬时表达的影响

在培养基中加入硫代硫酸钠, L-半胱氨酸和二硫苏糖醇等抗氧化剂可以抑制多酚氧化酶和过氧化氢酶(Mayer & Harel 1979; Richard-Forget *et al.*, 1992; Negishi & Ozawa, 2000),大大提高了农杆菌的转化效率。我们研究了抗氧化剂对大豆‘早熟 18 号’下胚轴外源基因瞬时表达率的影响。如图 1 所示,当把大豆下胚轴培养在不加抗氧化剂的培养基中时, *GUS* 基因的瞬时表达率仅为 2.2%,而将大豆下胚轴培养在含抗氧化剂的培养基中时, *GUS* 基因的瞬时表达率增加到 23.4%,比前者增加了 10 倍。一些研究者认为(Boué *et al.*, 2000; Olhoft & Somers, 2001; Vámos-Vigyázó, 1981),在遇到病原体侵染或物理损伤时,大豆多酚氧化酶和过氧化氢酶会氧化酚类化合物而产生一种深褐色的聚合物,进而造成伤口的褐变和坏死,阻止农杆菌的侵染。这是造成大豆基因的转化效率低的主要原因。我们的研究也清楚地表明,抗氧化剂可以大大降低大豆下胚轴切口的褐化

程度(图 2a、b),说明了 *GUS* 基因的瞬时表达率的提高与抗氧化剂降低大豆下胚轴切口的褐化程度有着密切的关系。因此,在大豆的转基因过程中,在培养基中加入抗氧化剂有可能提高基因转化效率。我们还对 *GUS* 基因在下胚轴组织中的瞬时表达部位进行了研究。如图 2a 所示,染色部位大部分位于下胚轴的维管束形成层组织,呈明显环状分布。这些结果说明,抗氧化剂主要增强了农杆菌对下胚轴的维管束形成层组织细胞的侵染。下胚轴的维管束形成层组织细胞具有很强的分裂能力,当这些组织发生创伤或受环境诱导时会加速细胞分裂,形成愈伤组织或迅速分化(王关林和方宏筠, 1998),这对提高大豆的转基因具有重要作用。虽然大豆下胚轴培养在不加抗氧化剂的培养基中时, *GUS* 基因的瞬时表达率可达 2.2%,但是,染色部位不确定,斑点也很小(未出示结果)。



图 1 *GUS* 基因在大豆下胚轴中的瞬时表达

Fig. 1 Transient expression efficiency of *GUS* gene in soybean hypocotyls

2.2 共培养时间对大豆下胚轴 *GUS* 基因瞬时表达率的影响

农杆菌在创伤部位生存 16 h 后才能将 T-DNA 转移到植物细胞中,因此,共培养时间必须大于 16 h。但是,共培养时间过长,则会因为农杆菌的过度生长而导致植物细胞受毒害而死亡(王关林和方宏筠, 1998)。因此,共培养时间是影响大豆转化效率的重要因素。本实验中,我们进一步研究了有抗氧化剂的情况下,共培养时间对大豆下胚轴基因瞬时表达率的影响,进而确定合适的共培养时间,以获得最佳转化率。图 3 是分别共培养了 2、3、4 和 5 d 后大豆下胚轴中 *GUS* 基因的瞬时表达率。在共培养 2 d 后, *GUS* 基因的表达率是 8%,但是在 3 d 后, *GUS* 基因瞬时表达率大幅度上升,达到 23.4%。共培养 4 和 5 d 后的 *GUS* 基因瞬时表达率基本和共培养 3

d 后的相似,说明了此时检测到蛋白为共培养 3 d 时所表达,而 4 和 5 d 时没有新蛋白表达(或没有出现新的蛋白表达在下胚轴)。另外,共培养 5 d 后,外植体开始大幅度褐化甚至开始腐软,不利于诱导不定芽至最终成苗。因此,大豆下胚轴转化的最适共培养时间为 3 d。



图 2 抗氧化剂对大豆下胚轴褐化的影响及 *GUS* 基因在下胚轴中的表达

Fig. 2 The effects of antioxidants on the browning, necrosis of hypocotyls and the location of *GUS* expression in soybean hypocotyls

a: 没有添加抗氧化剂时,在大豆下胚轴伤口处出现褐化和坏死 Browning and necrosis of the cut without antioxidant in CCM b: 添加抗氧化剂后,下胚轴没有褐化现象发生 There was almost no browning in the cut with antioxidant in CCM c. 添加抗氧化剂后, *GUS* 基因在下胚轴中瞬时表达的位置 Location of *GUS* gene expression in soybean hypocotyls



图 3 不同共培养时间对大豆下胚轴 *GUS* 基因瞬时表达率的影响
Fig. 3 The effects of co-cultivation time on transient expression efficiency of *GUS* gene in soybean hypocotyls

2.3 农杆菌菌液稀释浓度对大豆下胚轴 *GUS* 基因瞬时表达的影响

农杆菌浓度越高,侵染的机率就越高,但是也有研究表明,当农杆菌菌液稀释到一定程度时反而会提高转化效率(黄霞等, 2002)。本实验中,设定稀释浓度 1、2 和 5 倍(指将 OD₆₀₀ 为 0.5 的菌液稀释的倍数)。结果表明,随稀释浓度提高,转化效率大幅度降低(图 4)。

2.4 不同大豆品种下胚轴 *GUS* 基因瞬时表达率

王罡等(2002)报道了不同基因型的大豆下胚轴

对于农杆菌敏感性有显著差异。本实验以‘早熟 18 号’、‘科新 3 号’、‘科丰 6 号’和‘黑农 41 号’4 个不同品种为材料, 比较了在加抗氧化剂条件下, *GUS* 基因在不同大豆品种下胚轴中的瞬时表达率。如图 5 所示, 尽管品种不同, 抗氧化剂均能大幅度提高 *GUS* 基因的瞬时表达率。

醇等抗氧化剂可以大幅度提高 *GUS* 基因在大豆下胚轴的瞬时表达率, 并同时降低外植体被侵染部位的褐化和坏死, 这可能与硫代硫酸钠, L-半胱氨酸和二硫苏糖醇等抗氧化剂抑制了多酚氧化酶和过氧化氢酶活性有关。农杆菌与大豆下胚轴共培养时间以 3~4 d 为宜, 转化培养基与用于转化的农杆菌菌液等体积时效果较好, 且此方法无明显品种间差异。

参 考 文 献

- Boué SM, Carter CH, Ehrlich KC, Cleveland TE (2000). Induction of the soybean phytoalexins coumestrol and glyceollin by *Aspergillus*. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 48, 2167 - 2172.
- Deng XY (邓向阳), Wei ZM (卫志明) (1998). Technique of transformation of soybean. *Plant Physiology Communications* (植物生理学通讯), 34, 381 - 387. (in Chinese)
- Di R, Purcell V, Collins GB, Ghabrial SA (1996). Production of transgenic soybean lines expressing the bean pod mottle virus coat protein precursor gene. *Plant Cell Reports*, 15, 746 - 750.
- Huang X (黄霞), Huang XL (黄学林), Li Z (李哲), Chen YF (陈云凤), Li XJ (李筱菊) (2002). Factors affecting the early phase of *Agrobacterium*-mediated genetic transformation of banana. *Acta Scientiarum Naturalium Universitatis Sunyatseni* (中山大学学报自然科学版), 41, 68 - 72. (in Chinese with English abstract)
- Jefferson RA (1987). Assaying chimeric genes in plants: the *GUS* gene fusion system. *Plant Molecular Biology Reporter*, 5, 387 - 405.
- Kaneda Y, Tabei Y, Nishimura S (1997). Combination of thidiazuron and basal medium with low salt concentrations increases the frequency of shoot organogenesis soybeans (*Glycine max* (L.) Merr.). *Plant Cell Reports*, 17, 8 - 12.
- Liu ZH, Wang WC, Yan SY (1997). Effect of hormone treatment on callus formation and endogenous indole-acetic acid and polyamine contents of soybean hypocotyl cultivated *in vitro*. *Botanical Bulletin of Academia Sinica*, 38, 171 - 176.
- Mayer AM, Harel E (1979). Polyphenol oxidases in plants. *Phytochemistry*, 18, 193 - 215.
- Negishi O, Ozawa T (2000). Inhibition of enzymatic browning and protection of sulfhydryl enzymes by thiol compounds. *Phytochemistry*, 54, 481 - 487.
- Olthoft PM, Flagel LE, Donovan CM, Somers DA (2003). Efficient soybean transformation using hygromycin B selection in the cotyledonary-node method. *Planta*, 216, 723 - 735.
- Olthoft PM, Somers DA (2001). L-cysteine increases *Agrobacterium*-mediated T-DNA delivery into soybean cotyledonary-node cells. *Plant Cell Reports*, 20, 706 - 711.
- Richard-Forget FC, Goupy PM, Nicolás JJ (1992). Cysteine as an inhibitor of enzymatic browning: kinetic studies. *Journal of Agricultural Food and Chemistry*, 40, 2108 - 2113.



图 4 不同农杆菌稀释浓度下大豆下胚轴的 *GUS* 基因瞬时表达率

Fig.4 The effects of re-suspend liquid medium dilute consistence on *GUS* gene transient expression efficiency in soybean hypocotyls



图 5 抗氧化剂对不同品种大豆下胚轴 *GUS* 基因瞬时表达率的影响

Fig.5 The effects of different soybean species on soybean hypocotyls *GUS* gene transient expression efficiency

HN41: ‘黑农 41 号’ ‘Heinong41’ KF6: ‘科丰 6 号’ ‘Kefeng6’
KX3: ‘科新 3 号’ ‘Kexin 3’ ZS18: ‘早熟 18 号’ ‘Zaoshu18’

3 结 论

以上实验结果表明, 在转化培养基和共培养培养基中加入硫代硫酸钠、L-半胱氨酸以及二硫苏糖

- Vámos-Vigyázó L (1981). Polyphenol oxidase and peroxidase in fruits and vegetables. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 15, 49 – 127.
- Wang G (王罡), Wang P (王萍), Lin Y (蔺宇), Zhang LB (张领兵), Wu Y (吴颖) (2002). The studies of sensitivity of genotypes in soybean to lines of *Agrobacterium tumefaciens*. *Hereditas* (Beijing) (遗传), 24, 297 – 300. (in Chinese with English abstract)
- Wang GL (王关林), Fang HY (方宏筠) (1998). *Plant Genetic Engineering Theory and Technology*. Science Press, Beijing, 220. (in Chinese)
- Zhang XJ (张晓娟), Fang XP (方小平), Luo LX (罗丽霞), Zhou XA (周新安), Xu ZY (许泽永) (2000). Influence of TDZ and BA on efficiency of plant regeneration via organogenesis in soybean. *Chinese Journal of Oil Crop Sciences* (中国油料作物学报), 22, 24 – 26. (in Chinese with English abstract)

责任编辑: 黄建辉 责任编辑: 刘丽娟