

番茄 **BADH2** 基因转化水稻

刘俊利 (四川大学生命科学学院, 生物资源与生态环境教育部重点实验室, 四川成都610064)

摘要 用分子生物学手段, 构建含番茄 **BADH2** 基因的过表达载体, 通过农杆菌介导的方法将其导入日本晴幼胚诱导的愈伤组织, 获得了303块潮霉素(Hm)抗性愈伤组织。获得1059个转化植株。随机选择115个T0植株进行Hyp离体叶片筛选, 结果表明, 绝大多数植株均呈抗性, 并且与PCR检测结果相吻合, 说明T0植株中不存在假阳性。

关键词 番茄; 水稻; 农杆菌; 基因转化; **BADH2** 基因

中图分类号 Q785 文献标识码 A 文章编号 0517 - 6611(2006)23 - 6138 - 02

Transgenic Rice with a Gene Encoding for the Betaine Aldehyde Dehydrogenase 2 (**BADH2**) of Tomato

LIU Junli (College of Life Sciences, Sichuan University; Key laboratory of Bio-resources and Eco-environment Ministry of Education, Chengdu, Sichuan 610064)

Abstract With the molecular bio-technology, the calli derived from young embryos of japonica rice cultivars were transferred with **BADH2** gene of tomato, which had been constructed to be overexpression vector mediated with *Agrobacterium*. A total of 303 independent Hygromycin(Hm) resistant calli were obtained, which produced 1059 transformed plantlets. 115 transgenic plants were randomly selected to test Hm resistance with leaf segments screening. The results showed that most of transgenic plants tested were Hm resistance, coincident with the results of PCR, indicating that no escapee was existed in the transformants.

Key words Tomato; Rice; *Agrobacterium tumefaciens*; Gene transfer; **BADH2** gene

培育耐盐性作物品种具有成本低、见效快、长远持久的特点, 是提高盐渍土壤作物产量水平和经济效益的有效方法^[1]。众多研究结果都表明, **BADH** 基因家族和植物的耐盐性、抗旱性有关, 我国学者已经把山菠菜中克隆的 **BADH** 基因成功转入烟草、水稻、小麦、番茄和豆瓣菜^[2-6]等重要农作物中, 但目前尚未见将番茄 **BADH2** 基因转化水稻的报道。笔者通过农杆菌介导的方法, 将构建好的番茄 **BADH2** 基因的过表达载体, 导入粳稻品种日本晴, 最终获得了一定数量的转基因植株, 为进一步培养耐盐性强的水稻种质资源奠定基础。

1 材料与方 法

1.1 供试水稻品种 所用品种为粳稻品种(japonica)日本晴, 由福建农业科学院王峰研究员提供。

1.2 质粒与转化载体 根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)菌株EHA105由中国科学院成都生物研究所惠赠。PHB质粒载体由上海植物生理研究所杨洪全老师提供。

1.3 大肠杆菌菌株 大肠杆菌(*Escherichia coli*)菌株DH5, 为实验室保存, 用于重组子的筛选和质粒的扩增。

1.4 大肠杆菌培养基 LB: 胰蛋白胨10 g/L, 酵母粉5 g/L, NaCl 10 g/L, 用1 mol/L的NaOH调酸碱度至pH值为7.5。SOB: 胰蛋白胨20 g/L, 酵母粉5 g/L, NaCl 0.58 g/L, KCl 0.38 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.25 g/L, MgCl₂·6H₂O 0.20 g/L, 用1 mol/L的NaOH调酸碱度至pH值为7.0。SOC: SOB + 20 mmol/L葡萄糖。

1.5 植物表达载体的构建和农杆菌转化

1.5.1 提取番茄总RNA 反转录cDNA 作PCR 模板。 番茄 **BADH2** 基因长1798 bp(GenBank 登录号为TC154461), 提取番茄AC⁺总RNA, 经反转录为cDNA 作为PCR 模板。

引物序列为: leBAD F1, 5' GCATACACTTTGACA AAAT-ACTG 3'; leBAD R1, 5' GCATGTAACGTGCAATTAGTG 3'。

PCR 反应体系: AC⁺cDNA 模板1 μl, 引物1 μl, 高保真酶23 μl。

反应参数: 94 °C, 5 min; 94 °C, 30 s, 52 °C, 30 s, 68 °C, 2 min, 30 次循环; 72 °C, 10 min。

PCR 产物用0.8%的琼脂糖凝胶进行电泳分离、鉴定。获得的产物片段大小正确, 说明通过PCR 反应确以得到目的片段。

加尾反应体系: 取Taq 酶1 μl 于高保真酶PCR 反应产物, POLYA 程序72 °C 15 min。

连接体系(20 μl): 加尾产物5 μl, PMD18-T 载体1 μl, T4 连接酶0.5 μl, 10 × buffer 2 μl 加超纯水至20 μl。4 °C 过夜连接。用连接产物转化预先制备好的大肠杆菌感受态细胞。

长出单菌落后挑单克隆编号摇菌。取菌液快提质粒鉴定重组子。跑电泳, 和Marker 比较。将片段大小正确地克隆, 即初步鉴定出的重组子, 进一步作菌落PCR 鉴定。

1.5.2 基因的序列分析并引入酶切位点。 将PCR 鉴定过的菌液, 送交Invitrogen 上海公司进行测序。序列比对主要通过NCBI 网站BLAST 系统的Nucleotide-nucleotide BLAST (blastn) 进行。测序结果无误。设计1 对新的引物: leBAD_{ox} F: 5' GCAGAGCTCATGGCGATTCCCTAATATACGG 3'; leBAD_{ox} R: 5' CGCTCTAGACCTTGACCACTTGAAAGTTTC 3', 退火温度60 °C。

在上游引物中引入SacI 的酶切位点, 在下游引物中引入XbaI 的酶切位点。表达载体pHB 中也有SacI 和XbaI 的酶切位点。以PCR 反应所得的目的片段为模板, 用新引物做PCR。用SacI 和XbaI 对PCR 产物和pHB 载体都作双酶切。

20 μl 双酶切反应体系中包括: DNA 片段6 μl, SacI 酶0.5 μl, XbaI 酶0.5 μl, 1 × Mbuffer 2 μl, 加水补足至20 μl 体积。于37 °C 酶切1 h 后, 70 °C 10 min 灭活限制性内切酶。

1.5.3 胶回收、连接和转化。 电泳检测酶切片段正确后, 对其进行胶回收纯化。

PCR 产物用0.8%的琼脂糖凝胶进行电泳分离、鉴定。在长波紫外光下用刀片迅速切下含1798 bp 片段的胶块, 用

胶回收试剂盒进行回收、纯化。试验操作按照试剂盒说明进行,最后的回收产物溶于30 μ 去离子水中,取5 μ 进行紫外分光光度计检测,计算浓度后,将终浓度调为100 μ g/ml。

连接体系:胶回收得到的大小合适的DNA片段5 μ , PHB载体1 μ ,连接酶0.5 μ ,连接buffer 2 μ ,加水补足至20 μ 体积。4 过夜连接。通过酶切连接构建得到含目的基因的过表达载体。该质粒载体具有Kan抗性,含3个基因:目的基因,潮霉素筛选标记基因(hpt),抗除草剂基因(bar)。目的基因由2个串联的35S启动子起始和rbcSpolyA终止。潮霉素筛选标记基因(hpt)由35S启动子引导和NospolyA终止。抗除草剂基因(bar),两端由35S启动子引导和35SpolyA终止。hpt和bar用于阳性克隆的筛选并作为转基因植株的检测参考依据。

将该过表达载体转化农杆菌感受态,菌落PCR鉴定和酶切鉴定(图1)都证明已获得带有过表达载体的农杆菌,可用于后面转化水稻愈伤组织。

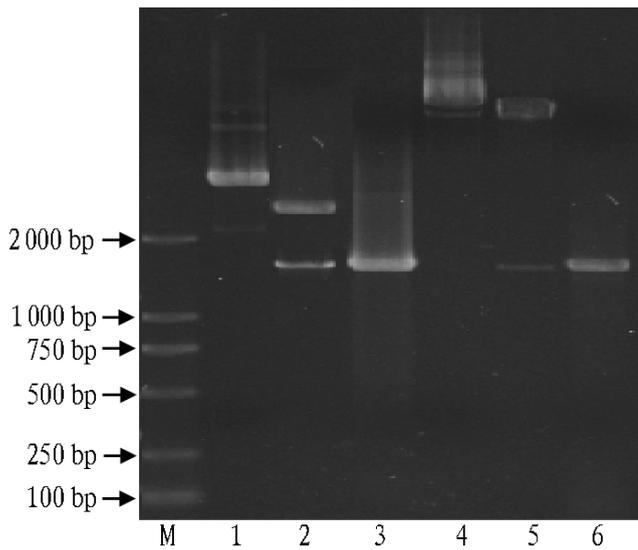


图1 酶切和PCR电泳结果

M为DNA分子量标准,DL2000。1是TMD18(T载体)和LeBAD构成的质粒,大小约为4.5 kb。2是用SacI和XbaI双酶切1对应的质粒后所得的条带,大小分别为2.7、1.8 kb。3是以1对应的质粒为模板,做PCR所扩出的LeBAD条带。4是PHB和LeBAD构成的过表达质粒载体。5是用SacI和XbaI双酶切4对应的质粒后所得的条带,大小分别为12.18 kb。6是以4对应的质粒为模板,作PCR所扩出的LeBAD条带。

1.6 用含目的基因的农杆菌转化水稻

1.6.1 转化材料。所用的转化材料为水稻授粉后12~15 d幼胚诱导形成的胚性愈伤组织。

1.6.2 转化方法。主要参考苏军等^[7]的方法。未成熟种子剥壳,分别用75%乙醇浸泡1 min,再转入25%的次氯酸钠溶液中振荡灭菌25 min,无菌水冲洗3~5次,将幼胚挑出并接种于诱导培养基27 暗培养。

转化程序:水稻愈伤 预培养4 d 农杆菌感染30 min (OD1.5-2.0) 共培养3 d(25 暗培) Hyg筛选(30 ng/L)2次 Hyg筛选(50 ng/L) 分化 生根。

1.6.3 培养条件。诱导培养基:NB+2,4-D2 ng/L,pH值为5.8。预培养培养基:NB+2,4-D2 ng/L,pH值为5.8。

共培养培养基:NB+2,4-D2 ng/L+AS 100 μ mol/L,pH值为5.2。筛选培养基:NB+2,4-D2 ng/L+羧苄青霉素250 ng/L+Hyg 30~50 ng/L,pH值为5.8。分化培养基:NB+

KT 10 ng/L+NAA0.4 ng/L,pH值为5.8。生根培养基:1/2MS,pH值为5.8。

2 结果与分析

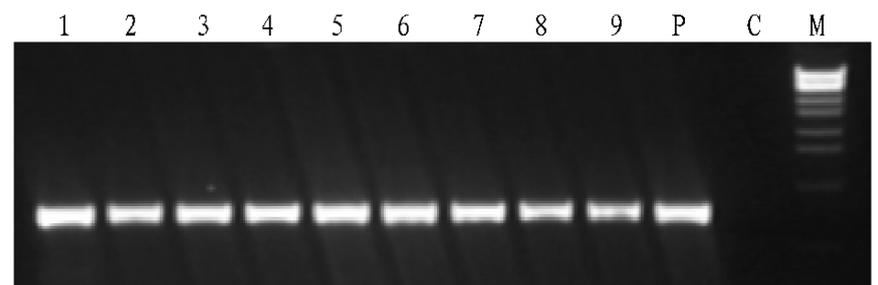
2.1 转BADH2基因水稻植株的获得 用携带相应质粒的农杆菌侵染日本晴幼胚诱导形成的胚性愈伤组织,经过筛选、分化再生培养为完整的转基因植株。

2.2 转化植株叶片的潮霉素(Hm)抗性鉴定 随机取115株T0代转化植株的叶片,并取两株未转化外源基因的组培植株作阴性对照。将所有这些叶片叶尖朝上、断面朝下,浸泡在50 mg/L Hyg水溶液中,3 d后,对照植株叶片被浸没的部分出现明显锈斑,其余叶片中有25片叶子的表型和对照相同,对Hyg表现敏感。91片叶子对Hyg有抗性,完全没有受损,叶片仍然保持墨绿色。初步证明有91棵转化水稻植株对50 mg/L Hyg的水溶液具有抗性,即Hyg基因已经整合到转化植株基因组中,并在转化植株中得到充分的表达。其余25片叶子中Hyg基因没有转入。

2.3 阳性转化株的PCR检测 将上述91棵对Hyg有抗性的植株按CTAB法^[8]提取水稻DNA后,通过PCR的方法检测hpt基因,PCR扩增产物为832 bp(图2)。利用潮霉素抗性基因引物进行扩增,引物序列为: 5' TAC ACA GCC ATC GGT CCA GA 3'; 5' TAG GAG GGC GTG GAT ATG TC 3'。

PCR反应体系:DNA模板1 μ ,引物1 μ ,10 \times Buffer 2.5 μ ,dNTP 2 μ ,Taq酶0.5 μ ,Mg²⁺ 1.5 μ ,加水补足至25 μ 体积。

反应参数:94 5 min;94 1 min,56 1 min,72 1 min,35次循环;72 8 min。



注:1~9为转化植株,P为pHB质粒作阳性对照,C为未转化植株作阴性对照,M为DNA分子量标准。

图2 部分转化植株hpt基因PCR扩增结果

结果表明,以91棵对Hyg有抗性的植株的DNA为模板,都可以扩出Hyg基因。表明T0转化株中不存在假阳性植株。通过比较上述2种检测方法对相同植株所得的检测结果,发现两者互相吻合,故可认为Hyg离体叶片筛选是可靠的,而且该方法快速、简便、不伤母株。

3 讨论

(1) 干旱和盐渍是影响植物生长和农作物产量的最重要的环境因子。近几年,植物抗旱耐盐生物技术研究取得了可喜进展,特别是通过超量表达、积累低分子量化合物及渗透保护性蛋白等,赋予了转基因植物一定的抗旱耐盐性。

(2) BADH是催化甜菜碱合成的关键酶,细胞中甜菜碱含量与植物的抗逆性有较大的相关性,我国研究人员先后用基因枪和农杆菌介导的方法将山菠菜的BADH转入水稻栽培种中花8号和中花10号中,结果发现转基因水稻的BADH酶的活性有了明显提高(消耗NAD 1 nmol/min定义为

(下转第6184页)

(上接第6139页)

1U,转基因植株BADH为80U,对照组为0),耐盐性状较对照组也有所改善。可见BADH酶活对甘氨酸甜菜碱的积累亦起着至关重要的作用,并且可能催化除甜菜碱醛以外的其他物质生成甜菜碱。

(3) 通过农杆菌介导法,将番茄BADH₂基因的过表达载体导入粳稻品种日本晴,最终获得了一定数量的转基因植株,为进一步证明BADH基因家族的功能,以及与植物抗旱耐盐之间的相互关系,进而培养耐盐性强的水稻种质资源奠定了基础。

(4) 研究基因功能离不开组织培养技术的推动。农杆菌介导的水稻转基因研究,由于技术上的突破,转化效率已大大提高。然而,由于水稻品种或亚种间遗传差异很大,对转化研究的基因型依赖性强,从而增大了水稻转化技术的复杂性和随机性。对于水稻这一重要农作物而言,要建立一套高效、稳定和普遍适用的农杆菌介导转化系统,仍有许

多问题需要进一步研究。在农杆菌的转化试验中,还需要继续对不同受体品种转化时各具体因素进行研究,优化转化程序以获得更高的转化频率。

参考文献

- [1] 赵可夫. 植物抗盐生理 M. 北京: 科学出版社, 1993.
- [2] 刘凤华, 郭岩, 谷冬梅, 等. 转甜菜碱醛脱氢酶基因植物的耐盐性研究[J]. 遗传学报, 1997, 24(1): 54 - 58.
- [3] 郭岩, 张莉, 肖岗, 等. 甜菜碱醛脱氢酶基因在水稻中的表达及转基因植株的耐盐性研究[J]. 中国科学(C辑), 1997, 27(2): 151 - 155.
- [4] 郭北海, 张艳敏, 李洪杰, 等. 甜菜碱醛脱氢酶(BADH)基因转化小麦及其表达[J]. 植物学报, 2000, 42(3): 279 - 283.
- [5] JIA G X, ZHU Z Q, CHANG F Q, et al. Transformation of tomato with the betaine aldehyde dehydrogenase(BADH) gene from *Atriplex noproves* salt tolerance[J]. Hort Cell Rep, 2002, 21: 141 - 146.
- [6] 李银心, 常凤启, 杜立群, 等. 转甜菜碱醛脱氢酶基因豆瓣菜的耐盐性[J]. 植物学报, 2000, 42(5): 480 - 484.
- [7] 苏军, 胡昌泉, 翟红利, 等. 农杆菌介导籼稻明恢86高效稳定转化体系的建立[J]. 福建农业学报, 2003, 18(4): 209 - 213.
- [8] MURRY MG, THOMPSON WF. Rapid isolation of high molecular weight plant DNA[J]. Nucleic Acid Res, 1980, 8: 4321 - 4325.