

pCAAFP66 表达载体的构建及其大豆遗传转化的研究

赵印华¹, 陈颖珊¹, 郭丽琼^{1,2}, 覃凤云¹, 林俊芳^{1,2}

(1. 华南农业大学 食品学院, 广东 广州 510642; 2. 华南农业大学 生物质能研究所, 广东 广州 510642)

摘要:以 pCambia3301 为载体骨架, *afp* 为目的基因, 构建了大小为 9 868 bp 的大豆表达载体 pCAAFP66, 该载体带有抗冷冻蛋白基因 *afp* 和筛选标记基因 *bar*。以大豆品种华春 3 号和华春 6 号的胚尖和子叶节为外植体, 应用农杆菌介导法进行遗传转化, 以草甘膦 (PPT) 为筛选底物。结果表明: 在胚尖转化体系中, 华春 3 号和华春 6 号初转化频率分别为 7.0% 和 4.0%, 在子叶节转化体系中, 2 个品种都未获得转化植株。

关键词: 抗冷冻蛋白; 载体构建; 农杆菌介导; 大豆遗传转化

中图分类号: S565.1 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-9841(2011)04-0541-05

Construction of Expression Vector pCAAFP66 and Its Transformation into Soybean by *Agrobacterium*-mediated Method

ZHAO Yin-hua¹, CHEN Ying-shan¹, GUO Li-qiong^{1,2}, QIN Feng-yun¹, LIN Jun-fang^{1,2}

(1. College of Food Science, South China Agricultural University, Guangzhou 510642; 2. Institute of Biomass Research, South China Agricultural University, Guangzhou 510642, Guangdong, China)

Abstract: Plant expression vector pCAAFP66 (9868 bp), which contained the target gene *afp* and the screening marker *Bar* gene, was constructed for soybean transformation. The anti-freezing gene *afp* was transformed into embryonic tip and cotyledonary node of soybean using *Agrobacterium*-mediated method and PPT as selective agent. Identification indicated the *afp* gene was successfully transformed into Huachun 3 and Huachun 6 through the embryonic tip transformation system, with transformation rates 7.4% and 4.0%, respectively. Whereas in the cotyledonary node system no transformed plants was obtained. Analysis of the embryonic tip and cotyledonary node approach revealed that significant differences existed in the regeneration and transformation rate between two genotypes; even with the same genotype, different explants materials had totally different transformation rates.

Key words: *afp* gene; Vector construction; *Agrobacterium*-mediated; Soybean genetic transformation

倒春寒(日平均气温 $\leq 12^{\circ}\text{C}$, 维持期 $\geq 3\text{d}$)是南方春大豆播种育秧期的主要灾害性天气, 严重限制了大豆的种植和生产, 也影响大豆的总产量和品质。目前采用常规育种方法来提高大豆的抗寒性尚缺乏优良的种质资源, 随着基因工程的发展, 通过转基因技术将抗冷冻基因转入大豆, 成为提高大豆抗寒能力有效途径之一。

抗冷冻蛋白(Antifreeze proteins, AFPs), 亦称热滞蛋白(Thermal hysteresis proteins, THPs)具有降低水的冰点的特性, 是一类具有降低生物体液冰点和抑制冰晶生成功能的生物活性蛋白, 在提高动植物抗冻耐寒能力方面起着重要的作用^[1]。自 20 世纪 80 年代鱼类等 *afp* 结构研究清楚以后, 人们试图将 *afp* 转入作物中来提高其抗寒性。Wallis 等^[2] 将一段融合有植物血球凝集素(PHA)信号肽的合成抗

冻蛋白在马铃薯中表达, 第一次证明植物的抗寒表型与抗冻蛋白表达的相关性; 郭丽琼等^[1] 将抗冷冻蛋白基因成功转化草菇中; 王艳等^[3] 将昆虫抗冻蛋白基因转化烟草中, 并获得抗寒转化烟草植株。该研究将来源于 Budworm(一种鳞翅目昆虫)的抗冷冻蛋白基因作为目的基因, 以大豆成熟种子胚尖、子叶节为受体, 应用根癌农杆菌介导法对大豆进行了遗传转化, 旨在探讨昆虫抗冻蛋白在大豆中表达情况, 以期为南方大豆的抗寒转基因育种提供新的思路 and 理论依据。

1 材料与方法

1.1 供试材料

1.1.1 菌株与质粒 大肠杆菌 TOP10、根癌农杆菌

收稿日期: 2011-03-16

基金项目: 国家转基因生物新品种培育重大专项资助项目(2009ZX08004-007B); 广东省科技计划资助项目(2009A020102004); 华南农业大学“211 工程”三期资助项目(2009C010500001)。

第一作者简介: 赵印华(1984-), 男, 在读硕士, 研究方向为大豆转基因育种。E-mail: zhaoyinhua110@yahoo.com.cn。

通讯作者: 林俊芳(1962-), 男, 博士生导师, 主要从事生物活性物质与生物炼制方面的研究。E-mail: linjf@scau.edu.cn。

(*Agrobacterium tumefaciens*) EHA105、质粒 pTHP4 (含 *afp*)、pCAMBIA3301 载体均由华南农业大学食品学院生物炼制实验室保存; pGEM-T Easy Vector 购自 Promega 公司; 限制性内切酶、T₄ DNA 连接酶及高保真 DNA 聚合酶购自 NEB 公司。

1.1.2 植物材料及其培养基 大豆品种华春3号、华春6号由华南农业大学农学院提供。胚尖转化体系培养基: MSB5 (MS 基本培养基的无机盐浓度 + B5 培养基的有机元素 + 30 g · L⁻¹ 蔗糖), 预培养基 (MSB5 + 3.5 mg · L⁻¹ BA + 0.6% 琼脂), 侵染培养基 (1/2MSB5 + 10 g · L⁻¹ 葡萄糖 + 6.0 mg · L⁻¹ BA + 0.5 g · L⁻¹ MES + 200 μmol · L⁻¹ 乙酰丁香酮), 共培养基 (侵染培养基 + 0.6% 琼脂), 恢复培养基 (1/2 MSB5 + 0.2 mg · L⁻¹ BA + 0.2 mg · L⁻¹ IBA + 300 mg · L⁻¹ 头孢霉素), 筛选培养基 (恢复培养基 + 0.75 mg · L⁻¹ PPT), 生根培养基 (1/2MSB5 + 1.0 mg · L⁻¹ IBA + 250 mg · L⁻¹ 头孢霉素 + 0.25 mg · L⁻¹ PPT)。培养基 pH 均为 5.8。子叶节转化体系培养基: 培养基配制 Nemoto 等的方法^[4] 进行。

1.1.3 引物 根据 *afp* 基因序列考虑到表达载体

构建需要, 在引物设计时加入 *Pml* I 和 *Nco* I 酶切位点, 采用 Primer 5.0 和 Oligo 6.0 分析软件设计 PCR 引物, 其序列如下:

P1: 5'-CCATGGAATCGGCACGAGGAAAGACAT
AT-3'

P2: 5'-CACGTGCATGGCTTAATTAGCACTG-3'

1.2 表达载体 pCAAFP66 的构建

1.2.1 *afp* 基因的重新克隆 以质粒 pTHP4 为模板, 利用引物 P1 和 P2, 采用 PCR 技术扩增目的基因。反应条件: 预变性 94℃ 5 min, 循环参数为 94℃ 40 s, 58℃ 30 s, 70℃ 1 min, 30 个循环, 70℃ 延伸 6 min。回收 PCR 产物并与 TA 克隆载体 PGEM-T Easy 相连、转化, 经 PCR 及酶切验证后, 所得正确重组子命名为 pTHP5。该质粒含有 *afp* 基因和 *Pml* I 和 *Nco* I 酶切位点。

1.2.2 pCAAFP66 载体的构建 用限制性内切酶 *Pml* I 和 *Nco* I 对 pTHP5 质粒和 pCAMBIA3301 质粒进行双酶切, 回收含有 *afp* 基因的目的片段和 pCAMBIA3301 空白载体质粒的大片段, 连接反应, 转化得植物表达载体 pCAAFP66 (图 1)。

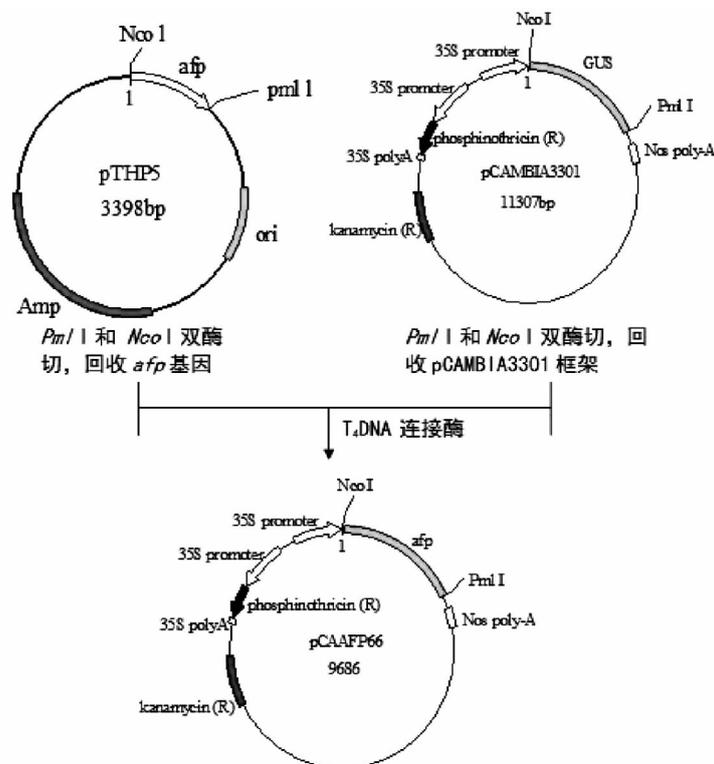


图 1 表达载体 pCAAFP66 构建流程图

Fig. 1 Procedure of the construction of pCAAFP66 expression vector

1.3 表达载体 pCAAFP66 的大豆遗传转化

1.3.1 表达载体导入根癌农杆菌 表达载体 pCAAFP66 向根癌农杆菌 EHA105 的直接转化参照谷俊涛的方法^[5] 进行。

1.3.2 菌液制备 从新鲜的平板挑取含有

pCAAFP66 载体的根癌农杆菌 EHA105 单菌落, 接种到含有 100 g · L⁻¹ 卡那霉素 (Kan) 和 25 g · L⁻¹ 链霉素 (Str) 浓度的 YEP 培养基上, 28℃, 200 r · min⁻¹ 震荡培养至 OD₆₀₀ = 1.0, 在 4℃, 4 100 r · min⁻¹ 离心 10 min, 去除上清液, 再用侵染培养基

重悬 $OD_{600} = 0.5$ 备用。

1.3.3 大豆胚尖外植体的制备及转化 取表面光滑无病斑的大豆成熟种子,用 50 mL NaClO + 2 mL HCl 反应生成的氯气在干燥器中进行大豆种子消毒。经消毒的大豆种子用无菌蒸馏水冲洗 5 次后,在无菌蒸馏水中浸泡 16 ~ 20 h (25℃),去掉种皮,去除子叶和原叶,分离得到胚尖外植体,将胚尖转接到预培养基中培养 28 h,最后把胚尖放入制备好的侵染液中 25℃, $200 \text{ r} \cdot \text{min}^{-1}$ 黑暗摇晃 20 h。用无菌滤纸吸干胚尖表面残留的菌液,接种在铺有一层无菌滤纸的共生培养基上,25℃,黑暗培养 5 d。共培养后将胚尖用无菌水冲洗 5 次,用无菌滤纸吸掉胚尖表面残留的水,再将胚尖接种于恢复培养基上。5 d 后,将胚尖接种与含有 $0.75 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PPT 筛选培养基上培养,每隔 7 d 续代 1 次。待抗性苗长约 3 cm 时,把抗性苗切下转入含有 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PPT 的生根培养基中。在生根培养基中培养 14 d 左右,待根系发达,经炼苗移入盆中栽培。

统计侵染总外植体数量和抗性再生植株数量计算初转化效率,初转化效率计算公式如下:

初转化效率 (%) = (抗性再生植株/侵染总外植体数) × 100

1.3.4 大豆子叶节外植体的制备及转化 子叶节转化法采用 Shou 等^[7]的方法进行。

2 结果与分析

2.1 克隆载体 pTHP5 的鉴定

重组质粒 pTHP5 经 *Pml* I 和 *Nco* I 双酶切鉴定和 PCR 鉴定,得到目的片段大小与预期一致(图 2),表明已成功构建了 pTHP5。

2.2 表达载体 pCAAFP66 的构建

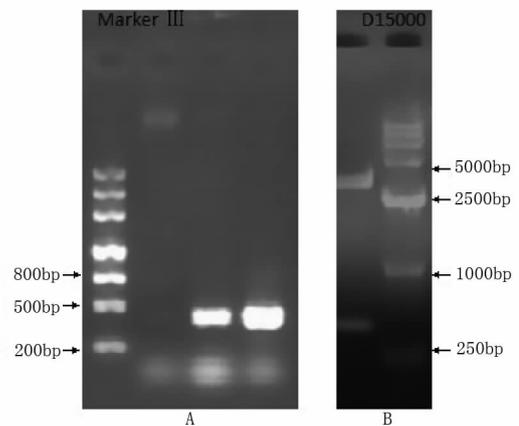
重组质粒 pCAAFP66 经 *Sal* I 酶切鉴定(1 400 bp, 8 000 bp);并以 pCAAFP66 为模板,以 P1、P2 为引物进行 PCR 扩增鉴定,获得 400 bp 左右的目的带。酶切鉴定和 PCR 扩增鉴定得到目的片段大小与预期大小一致(图 3),表明表达载体 pCAAFP66 构建成功,该载体含有 *afp* 基因和筛选标记 *bar* 基因。同时,质粒送往上海生工公司测序。序列结果表明,各连接点序列完全无误。

2.3 不同大豆品种胚尖遗传转化结果

大豆胚尖经共生和恢复培养后,在筛选培养基上培养 7 d 左右出现抗性不定芽。把具有抗性不定芽的胚尖转移到新的筛选培养基上,21 d 左右抗性不定芽可长至约 3 cm 高。再将 3 cm 左右的抗性芽切下转入含有 $0.25 \text{ mg} \cdot \text{L}^{-1}$ PPT 的生根培养基,1 d 左右可生根。在生根培养基中培养 14 d 左右,

待根系发达,经炼苗移入盆中栽培,转化植株的生长过程如图 4。

对华春 3 号和华春 6 号大豆胚尖遗传转化效果进行比较,统计抗性外植体数和抗性再生植株。163 个华春 3 号侵染外植体和 149 个华春 6 号侵染外植体获得抗性外植体数分别为 52 和 13 个,抗性再生植株分别为 12 和 6 株。结果表明,无论是抗性外植体数,还是抗性再生植株,华春 3 号都优于华春 6 号,华春 3 号和华春 6 号初转化效率分别为 7.4% 和 4.0%。大豆品种华春 3 号更适合胚尖遗传转化。

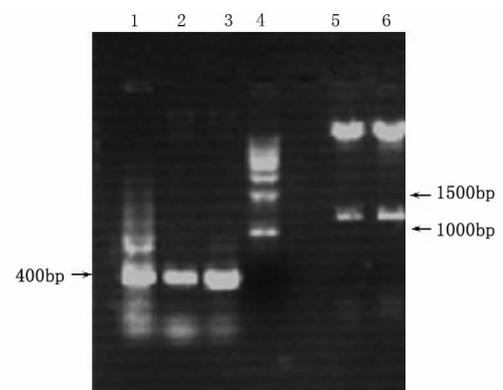


A:PCR 扩增鉴定;B:重组质粒 pTHP5 的 *Pml* I 和 *Nco* I 双酶切鉴定

A:PCR amplification of recombinant plasmid pTHP5 with primer P1 and P2;B:Recombinant plasmid pTHP5 digested by *Pml* I and *Nco* I

图 2 重组质粒 pTHP5 的酶切及 PCR 鉴定

Fig.2 Identification of recombinant plasmid pTHP5 with enzyme digestion and PCR amplification



1:marker 1;2~3:质粒 PCR 产物;4:1 kb DNA ladder;5~6: *Sal* I 酶切产物。

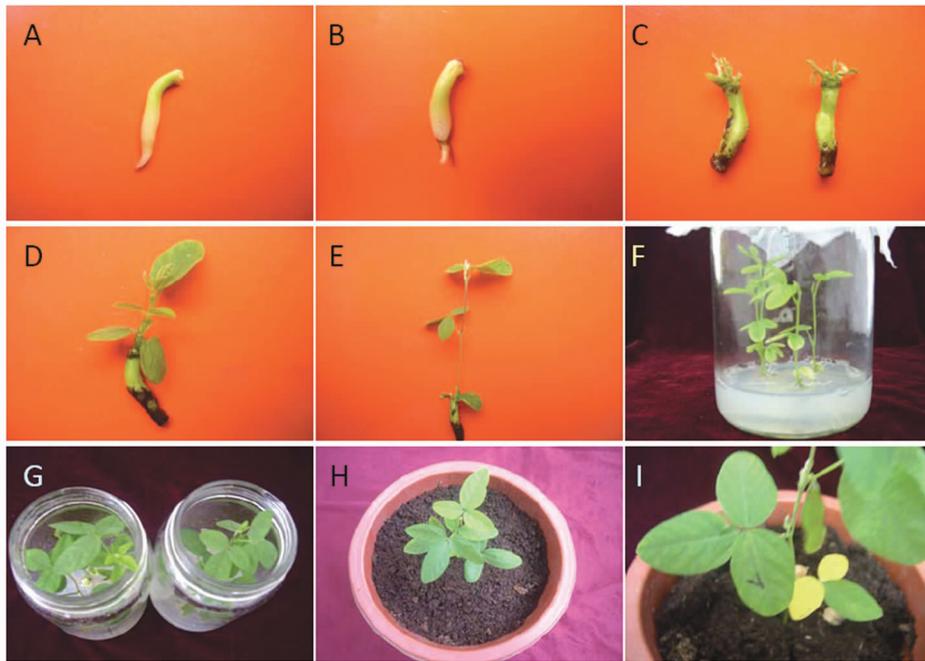
1:marker 1;2-3:PCR product;4:1 kb DNA ladder;5-6: Enzyme digestion with *Sal* I.

图 3 重组质粒 pCAAFP66 的酶切及 PCR 鉴定

Fig.3 Identification of recombinant plasmid pCAAFP66 with enzyme digestion and PCR amplification

2.4 不同大豆品种子叶节遗传转化结果

采用华春 3 号和华春 6 号子叶节进行遗传转



A: 预培养; B: 共培养; C: 生芽; D~E: 伸长培养; F: 生根; G: 炼苗; H: 室外培养; I: 结荚。
A: Preincubate embryonic tip; B: Tips in co-culture; C: Regeneration shoots; D-E: Elongation; F: Radication cultivation; G: Seedlings; H: Outdoor cultivation; I: Pod bearing.

图4 大豆胚尖法再生体系的生长过程

Fig.4 Soybean growth process in embryonic regeneration system

化,在芽诱导阶段,2个品种都长出约40%的抗性芽,每个外植体抗性芽数3~4个(图5B)。在芽诱导培养基中继续培养,发现诱导出的大部分为叶片器官,膨大严重(图5D),少量诱导的芽在伸长阶段也难以拔高,最终黄化死亡(图5F),无法得到转基因植株。结果表明,*afp*基因不适合华春3号和华春6号大豆通过农杆菌介导子叶节遗传转化。

3 讨论

构建植物表达载体力求易改造、方便实用,目前农杆菌介导法常用的中间载体有两类:共整合载体和双元载体。由于双元载体不需要共整合过程,无须要求系统中的2个质粒具有同源序列,构建相对简单,而且转化频率较高,目前农杆菌介导作物遗传转化多采用双元载体进行,周思军等^[7]用pGBI4A2B双元载体将*Bt(cryIA)*基因导入大豆中,王萍等^[8]采用pRdGM-bar双元载体将*GmDREB*基因导入大豆。

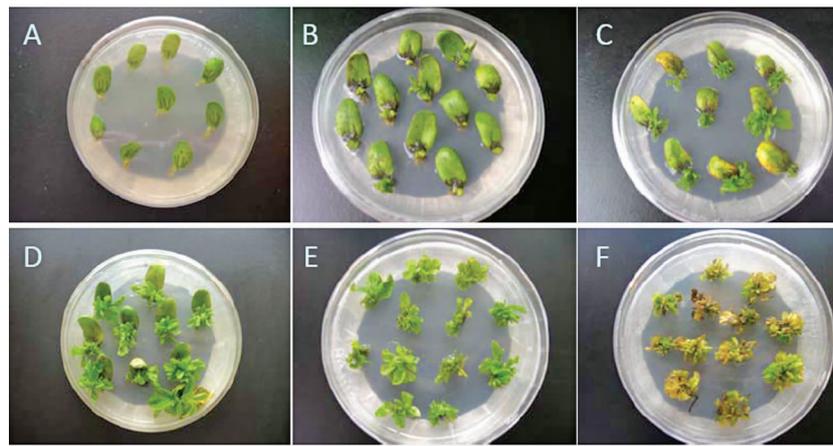
大豆胚尖外植体是目前大豆组织培养器官发生途径中使用较为成熟的一种外植体,以易出芽、再生周期短、操作简单等优点得到广泛的重视,刘海坤等^[9]首次采用农杆菌介导大豆胚尖并获得转基因植株。在农杆菌介导大豆胚尖体系优化过程中发现,无菌水浸泡大豆种子时,水温不能低于15℃,以防止大豆吸收冷水导致吸胀冷害,从而影响

胚尖的再生。另外还发现,无菌水浸泡大豆时间以16~20h最佳,这与Wei等^[10]报道的浸泡28h略有差别,这可能是由于品种不同所致,另外,大豆种子采收后不同保藏方式对大豆浸泡结果都有影响。

在切去大豆胚尖为外植体时,一方面应十分谨慎,避免破坏生长处的细胞,影响胚尖的生长。另一方面,原生长点残留的幼芽必须切除干净,否则诱导出来的不是丛生芽,而是膨大的大豆自身的芽。在预培养阶段根据不同品种来确定预培养时间,以胚尖顶部变成绿色时为最佳预培养时间。从试验结果中得知,大豆种子浸泡时间过长,易导致胚尖组织结构蓬松,活力降低;预培养时间过长,胚尖过于成熟,不利于农杆菌的侵染;预培养时间不足,胚尖活力不强,在侵染的过程中容易褐变坏死。

在转化最后阶段,在将大豆抗性苗切下转入生根培养基时,在抗性苗上应留一点胚尖组织,以便在生根前幼苗能更好的吸收营养,降低幼苗死亡率。如在抗性苗上留过多的胚尖组织,导致吸收足够的营养,反而不利于诱导根的生成,最终难以获得抗性植株。

该试验结果表明不同基因型大豆产生丛生芽数目、出芽率、植株再生率均存在差异,这与刘海坤等^[12]报道一致。华春3号和华春6号在以胚尖为外植体的大豆再生体系过程中都易产生诱导芽,而



A ~ D: 芽诱导; E ~ F: 芽伸长 A-D: Regeneration shoots; E-F: Elongation

图5 大豆子叶节再生体系的生长过程

Fig. 5 Soybean growth process in cotyledon nodes regeneration system

诱导芽的再生率却相差很大,以华春3号再生体系表现为佳。同种基因型不同外植体的材料,农杆菌介导遗传转化结果也有明显的差异。该试验中,以子叶节为外植体,发现子叶节在诱导培养基中外植体膨大严重,诱导出的大部分为叶片器官,少量诱导的芽在伸长阶段也难以拔高,最终黄化死亡,可能原因是子叶节再生率比较低、对基因型依赖型性强^[6],这与段莹莹等^[13]报道一致,而在胚尖遗传转化过程中则能较好地获得抗性植株。

参考文献

- [1] 郭丽琼,林俊芳,熊胜. 抗冷冻蛋白基因遗传转化草菇的研究[J]. 微生物学报,2005,45(1):39-43. (Guo L Q, Lin J F, Xiong S. Transformation of *Volvariella volvacea* with a thermal hysteresis protein gene by particle bombardment [J]. Acta Microbiologica Sinica, 2005, 45(1): 39-43.)
- [2] Wallis J G, Wang H Y, Guerra D J. Expression of a synthetic anti-freeze protein in potato reduces electrolyte release at freezing temperatures[J]. Plant Molecular Biology, 1997, 35: 323-330.
- [3] 王艳,邱立明,谢文娟,等. 昆虫抗冻蛋白基因转化烟草的抗寒性[J]. 作物学报,2008,34(3):397-402. (Wang Y, Qiu L M, Xie W J, et al. Cold tolerance of transgenic tobacco carrying gene encoding insect antifreeze protein [J]. Acta Agronomica Sinica, 2008, 34(3): 397-402.)
- [4] Nemoto Y, Kisaka M, Fuse T, et al. Characterization and functional analysis of three wheat genes with homology to the *CONSTANS* flowering time gene in transgenic rice [J]. The Plant Journal, 2003, 36(1): 82-93.
- [5] 谷俊涛,赵红梅,刘祝玲,等. 农杆菌介导白三叶草高效遗传转化和转基因植株再生[J]. 草业学报,2007,16(2):84-89. (Gu J T, Zhao H M, Liu Z L. Genetic transformation of trifolium repens using *Agrobacterium tumefaciens* and transgenic plant regeneration with high efficiency [J]. Acta Prataculturae Sinica, 2007, 16(2): 84-89.)
- [6] Shou H X, Guo Z B, Zhang Z Y, et al. Assessment of conditions affecting *Agrobacterium*-mediated soybean transformation using the cotyledonary node explant [J]. Euphytica, 2004, 136: 167-179.
- [7] 周思军,李希臣,刘昭军,等. 通过农杆菌介导法将 *Bt* (*cryIA*) 基因导入大豆[J]. 大豆科学,2001,20(3):157-164. (Zhou S J, Li X C, Liu Z J, et al. Introduction of *Bt* gene into soybean by *Agrobacterium*-mediated transformation [J]. Soybean Science, 2001, 20(3): 157-164.)
- [8] 王萍,郭永来,高世庆,等. 基因枪法将 *GmDREB* 基因导入大豆的研究[J]. 大豆科学,2007,26(3):315-318. (Wang P, Guo Y L, Gao S Q, et al. Transforming *GmDREB* gene into soybean via particle bombardment [J]. Soybean Science, 2007, 20(3): 315-318.)
- [9] 刘海坤,卫志明. 利用根癌农杆菌介导转化大豆成熟种子胚尖获得转基因植株[J]. 植物生理与生物学报,2004,30(6):631-636. (Liu H K, Wei Z M. Transgenic soybean obtained with *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transformation of embryonic tip of soybean mature seeds [J]. Acta Photophysiological Sinica, 2004, 30(6): 631-636.)
- [10] Wei D, Wei Z M. An Optimized *Agrobacterium*-mediated transformation for soybean for expression of binary insect resistance genes [J]. Plant Science, 2007, 173: 381-389.
- [11] Elibio L R, Giovanni R V, Francisco J L. High-efficiency transformation by biolistics of soybean, common bean and cotton transgenic plants [J]. Nature Protocols, 2008, 3: 410-418.
- [12] 刘海坤,卫志明. 大豆遗传转化研究进展[J]. 植物生理与生物学报,2005,31(2):126-134. (Liu H K, Wei Z M. Recent advances in soybean genetic transformation [J]. Acta Photophysiological Sinica, 2005, 31(2): 126-134.)
- [13] 段莹莹,赵琳,陈李森,等. 农杆菌介导的大豆子叶节和下胚轴转化方法的比较及优化[J]. 大豆科学,2010,29(4):590-597. (Duan Y Y, Zhao L, Chen L Y, et al. Comparison and optimization of the *Agrobacterium*-mediated transformation of soybean by using cotyledonary node and hypocotyl explants [J]. Soybean Science, 2010, 29(4): 590-597.)