

刘 艺,周罗琴,黄 苛,等. 利用双 T-DNA 载体获得无筛选标记的转基因猕猴桃[J]. 江苏农业科学,2013,41(6):56-57.

利用双 T-DNA 载体获得无筛选标记的转基因猕猴桃

刘 艺,周罗琴,黄 苛,苑 平,朱 杰,田宏现

(吉首大学,湖南吉首 416000)

摘要:以美味猕猴桃品种米良 1 号的当年生嫩枝及叶片为外植体,构建了 1 个双 T-DNA 载体 pCAMBIA1300-actin-term-2,通过根癌农杆菌 EHA105 菌株作为介导,将 *aco* 反义基因导入米良 1 号猕猴桃中。通过后代植株的遗传分离,以期获得无潮霉素筛选标记的转基因植株。结果表明,愈伤组织预培养 20 d,侵染 30 min,EHA105 菌液浓度 $D_{500} = 0.6$,培养 5 d,经 PCR 法检测证明 *aco* 反义基因已转入转化植株基因组中。

关键词:ACO 反义基因;遗传转化;双 T-DNA 载体

中图分类号: S663.403.6 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2013)06-0056-02

筛选标记方便了目的植株的筛选,但在完成目的植株的筛选之后,筛选的标记基因就显得多余,甚至对环境产生危害。在现代生物技术研究,多次发现抗生素类筛选标记基因导致对现有的抗生素药物产生抗性的超级细菌和由于抗除草剂类筛选标记基因所导致产生的超级杂草,有关筛选标记基因的安全性存在着很大的争议^[1]。寇娅丽等分别从转化、转导、接合 3 种水平转移的机制分析了抗生素标记基因水平转移发生的可能性^[2];贾士荣也曾从水平转移过程的复杂性来分析其可能性^[3]。筛选标记基因的水平转移可能性成为转基因食品安全性评估中的重要组成部分,如何获得无筛选标记的转基因植物成为现代生物研究的热点。本试验构建了一个双 T-DNA 载体 pCAMBIA1300-actin-term-2,2 个 T-DNA 结构顺序相连,中间没有其他插入序列^[4],采用共转化法将构建在 2 条不同 T-DNA 上的标记基因 *hpt* 和目的基因 *aco* 转入米良 1 号猕猴桃当中,经过后代分离,以期获得无筛选标记的转基因米良 1 号猕猴桃。

“米良 1 号”猕猴桃是吉首大学教授石泽亮几十年如一日在凤凰腊尔山台地开展研究获得的科研结晶。米良 1 号是以当地野生富硒猕猴桃作父本杂交,育出的堪与世界优良品种媲美的新品种。米良 1 号猕猴桃以个大、微生素丰富著称,单个最大的超过 0.3 kg。湖南省凤凰县米良 1 号猕猴桃栽培面积超过 2 000 hm²,利用猕猴桃开发“果王素”等系列保健食品和饮料,产品畅销中国国内市场。米良 1 号丰产性强,在湖南省海拔较高的山区栽培或低海拔的湖区栽植,嫁接苗栽后 2 年均普遍挂果,第 3 年就有一定的产量,第 4 年开始进入盛

果期,产量可达 15 t/hm² 左右^[5-8]。

1 材料与方

1.1 材料

受体植物材料:选取优良单株上无病虫害的米良 1 号 1 年生硬枝和当年生嫩枝及叶片为材料。

根癌农杆菌菌株为 EHA105,质粒为 pCAMBIA1300-actin-term-2,为中国科学院亚热带农业生态研究所提供。该质粒结构如图 1,其中含有潮霉素磷酸转移酶基因(*hpt*)。试验所使用的连接酶、试剂盒、限制性内切酶、聚合酶均购自 TaKaRa 公司,乙酰丁香酮、抗生素等主要生化试剂都采购于上海生物工程有限公司。引物由华大基因合成,其他试剂均采用国产分析纯。

1.2 培养基

共培养基:MS+6-BA 0.35 mg/L+TDZ 2 mg/L+蔗糖 25 g/L+乙酰丁香酮 0.1 mmol/L+琼脂 7.2 g/L,pH 值 5.6;筛选培养基:MS+6-BA 0.4 mg/L+NAA 1 mg/L+头孢霉素 600 mg/L+羧苄青霉素 400 mg/L+潮霉素 20 mg/L+蔗糖 25g/L+琼脂 7.2 g/L,pH 值 5.9;预分化培养基:MS+ZT 1.25 mg/L+6-BA 3.5 mg/L+TDZ 0.125 mg/L+蔗糖 25 g/L+羧苄青霉素 400 mg/L+琼脂 7.2 g/L,pH 值 6.2;分化培养基:MS+ZT 1.5 mg/L+蔗糖 25 g/L+羧苄青霉素 400 mg/L+琼脂 7.2 g/L,pH 值 6.2;生根培养基:1/2 MS+IBA 0.75 mg/L+6-BA 0.25 mg/L+蔗糖 12.5 g/L+琼脂 7.2 g/L,pH 值 5.9。

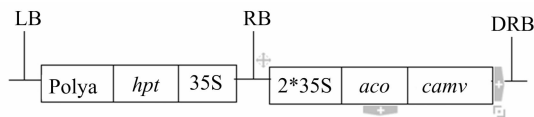


图1 植物表达载体pCAMBIA1300-actin-term-2的T-DNA区

1.3 农杆菌介导法遗传转化

挑取携带目的基因的根癌农杆菌单菌落 EHA105 接种于含潮霉素的 LB 液体培养基中,28 ℃、180 r/min 振荡培养过夜,取 100 μL 该菌液接种于 10 mL 液体 LB 培养基中,相同条

收稿日期:2013-03-22

基金项目:湖南省科技计划(编号:2008JT3008);湖南省高校产学研合作示范基地开放项目(编号:2011jsjk003)。

作者简介:刘 艺(1989—),男,湖南邵阳人,硕士研究生,主要从事植物分子生物学方面的研究。E-mail: autolucifer@foxmail.com。

通信作者:田宏现(1953—),男,湖南保靖人,博士,教授,硕士生导师,主要从事微生物学和林业生物技术方面的研究。E-mail: js-tianhx@163.com。

件下培养到 $D_{\text{max}}=0.6$, $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ 、 $4\text{ }000\text{ r/min}$ 离心 15 min , 用附加 5 mg/L AS (acetosyringone, 乙酰丁香酮)的液体 MS 培养基重悬沉淀, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 200 r/min 振荡培养 2 h , 使 EHA105 的 D 值至 0.6 , 以备侵染材料。以愈伤组织为外植体浸入上述菌液中, $28\text{ }^{\circ}\text{C}$ 轻轻摇动侵染, 侵染时间为 15 min 。侵染后用无菌滤纸吸去表面菌液, 转入共培养基, 温度为 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 暗培养条件下共培养 5 d 。然后将愈伤组织转入筛选培养基, 温度为 $25\text{ }^{\circ}\text{C}$, 暗培养 20 d 后将抗性愈伤转入新的筛选培养基, 筛选抗性愈伤组织。2 次筛选后, 将抗性愈伤转移至预分化培养基, 置于 $25\sim 26\text{ }^{\circ}\text{C}$, 每天 14 h 光照培养, 光强 $1\text{ }000\sim 1\text{ }500\text{ lx}$, 每 20 d 更换 1 次新培养基。当愈伤开始变成红褐色并开始分化出芽时将愈伤转移至分化培养基上。绿苗长至 $3\sim 5\text{ cm}$, 转移到生根培养基, 置光照培养箱中, 条件同预分化。

1.4 转基因植株的 PCR 检测

取米良 1 号猕猴桃再生苗嫩叶 $0.2\sim 1.0\text{ g}$, 采用 CTAB 法提取基因组 DNA。根据载体上的 *aco* 基因序列, 设计合成下列引物。

以基因组 DNA 为模板, 进行 PCR 检测。PCR 反应体系为 $20\text{ }\mu\text{L}$, 反应程序为: $95\text{ }^{\circ}\text{C}$ 预变性 5 min ; $94\text{ }^{\circ}\text{C}$ 变性 35 s ,

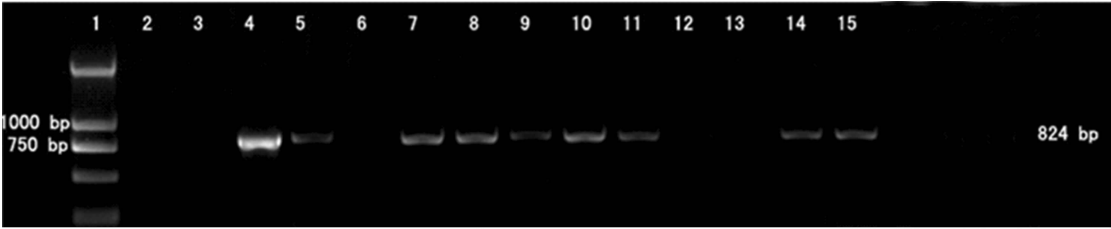
表 1 PCR 检测引物

引物	序列 (5'→3')	退火温度 ($^{\circ}\text{C}$)
Primer - 35S - F	GACGCACAATCCCACCCCTA	56.9
Primer - 35S - R	GTCCCACCAATGAAACACTCCA	56.0
Primer - term - F	GGTGCCTTTCCCACTCCAAATCGTT	61.1
Primer - term - R	CCAGGTTTAGTCGTCTCGTGTCTGGT	60.6

$56\text{ }^{\circ}\text{C}$ 复性 35 s , $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 1.2 min , 30 个循环; $72\text{ }^{\circ}\text{C}$ 延伸 10 min , $25\text{ }^{\circ}\text{C}$ 30 s 。凝胶电泳分析 PCR 产物。

2 结果与分析

抗性植株的 PCR 检测结果。通过转化共获得 20 株具有潮霉素筛选标记的猕猴桃植株, 从中随机选取 11 株提取基因组 DNA, 用 *aco* 基因序列所设计的引物对其进行 PCR 扩增, 扩增结果显示, 其中 8 株成功地扩增出与阳性对照的条带一致的目的条带 (824 bp), 而阴性对照 (无模板对照和野生型米良 1 号猕猴桃植株) 没有目的条带 (图 2), 初步鉴定这 8 株为含有 *aco* 基因的转基因植株。



1—D2000 marker; 2—质粒阳性对照; 3—野生型米良1号猕猴桃; 4—无模板阴性对照; 5~18—待检测抗性植株。
目标片断的大小为 824 bp

图2 转化植株的PCR检测

3 讨论

目前关于转基因食品的安全性问题还存在较大争议; 但是已经有充分的证据证明, 超级杂草是由于转基因植株中广泛使用的抗除草剂标记基因产生了基因漂流现象而引起的。如何获得无抗生素标记基因的转基因植株成为现阶段植物转基因技术的研究热点。本试验利用双右边界双元载体, 通过共转化法获得包含目的基因与筛选标记的转基因植株后, 通过后代分离后可得到无筛选标记的转基因米良 1 号猕猴桃。虽然利用双 T-DNA 载体获得无筛选标记植株的方法简单易行, 但猕猴桃自身提取 DNA 进行 PCR 检测的步骤繁琐且工作量大, 而且猕猴桃挂果需要 3 年或者更长的时间, 仍需要寻找更加便捷的方法以获得无筛选标记的转基因猕猴桃。

参考文献:

[1] 刘苗霞, 张颜睿, 付凤玲. 标记基因在植物转基因中的安全性研

究[J]. 安徽农业科学, 2011, 39(28): 17186-17187, 17227.
[2] 寇娅丽, 石磊. 转基因植物中使用抗生素抗性基因作为标记的安全性评价[J]. 中国抗生素杂志, 2006, 31(10): 577-580.
[3] 贾士荣. 转基因食品中标记基因的安全性评价[J]. 中国农业科学, 1997, 30(2): 1-15.
[4] 孙磊, 张启翔, 周琳陆, 等. 利用双 T-DNA 载体系统获得无选择标记转基因菊花[J]. 园艺学报, 2008, 35(5): 727-734.
[5] 田宏现, 曾艳玲, 谭晓风, 等. 米良一号猕猴桃的组织培养研究[J]. 经济林研究, 2005, 23(1): 7-9.
[6] 蒋超. 人工辅助授粉对猕猴桃晚熟品种金魁产量的影响试验初报[J]. 经济林研究, 2001, 19(4): 23-24.
[7] 李顺文, 鲁旭东, 刘殊. 6-BA 对猕猴桃叶片衰老的调节作用[J]. 经济林研究, 2000, 18(2): 30-31.
[8] 龙成良. 湖南猕猴桃资源及其开发利用途径[J]. 经济林研究, 2000, 18(2): 60-61.