

刘青, 李朝炜, 朱 昀, 等. 抗逆转基因旱稻转化体系的优化[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(11): 42–45.

doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.011

# 抗逆转基因旱稻转化体系的优化

刘青, 李朝炜, 朱 昀, 苗 苗, 邢文岳, 魏景芳

(河北科技大学生物科学与工程学院, 河北石家庄 050000)

**摘要:**以粳糯型常规旱稻品种“冀早糯 3 号”为受体材料, 利用农杆菌转化法将 *bar* 基因和 *lea-1* 基因转入旱稻细胞, 建立了适用于旱稻的高效转化体系, 最终获得转基因植株, 并对转基因植株进行 PCR 检测。结果表明: 当农杆菌浓度(以  $D_{600\text{nm}}$  表示)为 0.2 时, 转化效果最好。在筛选抗性愈伤时, 除草剂的最佳浓度为 40 mg/L, 对抗性愈伤组织进行预分化能提高其分化率, 对转基因植株进行分子检测, 优化后的转化率提高到 37.5%。

**关键词:**旱稻; 除草剂; 农杆菌; PCR; *lea* 基因

**中图分类号:** Q785; S511.01 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)11-0042-03

近年来, 全球水资源短缺已成为限制工农业及人类生活发展的一大因素, 而旱作农业成为解决水资源短缺问题的关键。旱稻在粮食作物中至关重要, 需水量少, 抗旱性强, 与水稻相比具有许多优势, 是推行旱作农业最佳的粮食作物之一<sup>[1]</sup>。本研究利用农杆菌转化法将 *bar* 基因和 *lea-1* 基因转入冀早糯 3 号愈伤组织中, 培育出抗旱抗盐抗除草剂旱稻新品种, 解决了旱稻种植时田间杂草和土壤干旱的问题, 大大降低了农业生产成本, 从而可以大面积种植旱稻。*bar* 基因是目前抗除草剂基因工程研究中应用最为广泛的一个基因, 也是迄今为止用得最多的一个抗除草剂选择标记基因, 已成功用于小麦<sup>[2]</sup>、水稻<sup>[3]</sup>、玉米<sup>[4]</sup>、油菜<sup>[5]</sup>等作物中。*lea-1* 基因是目前常用的一种抗旱基因, *lea-1* 基因转录翻译出 LEA 蛋白的特殊结构可作为脱水保护剂, 能部分替代水分子, 保持细胞液处于溶解状态, 稳定细胞结构, 调节蛋白和分子伴侣参与植物渗透调节, 在水分胁迫时稳定和保持蛋白质的结构及功能, 可增强细胞对水的保持能力<sup>[6]</sup>。俞嘉宁等在 2004 年在小麦中克隆了 1 个第三组 *lea* 基因 *Ta-LEA3*, 研究发现小麦中该基因的表达与其抗旱性呈正相关<sup>[7]</sup>。Cheng 等将小麦中 LEA 蛋白 *PM1959* 基因转化水稻, 在干旱胁迫或盐胁迫复水后, 第二代植株的干鲜质量均高于对照组<sup>[8]</sup>。本试验将抗草铵膦 *bar* 基因作为选择标记基因, 抗旱基因 *lea-1* 作为目的基因转入冀早糯 3 号细胞中, 建立成熟完善高效的旱稻转化体系, 提高旱稻的转化率, 并对转基因植株进行 PCR 检测。

## 1 材料和方法

### 1.1 旱稻材料

供试材料为粳糯型常规旱稻品种冀早糯 3 号种子。

收稿日期: 2014-11-05

基金项目: 国家转基因生物新品种培育科技重大专项(编号: 2011ZX08001-003)。

作者简介: 刘青(1989—), 女, 硕士研究生, 主要从事生物工程方面的研究工作。E-mail: liuqing12151118@163.com。

通信作者: 魏景芳, 博士, 教授, 主要从事植物细胞工程方面的教学与研究工作。E-mail: wjfang@126.com。

### 1.2 基因

*lea-1* 基因载体结构如图 1 所示。农杆菌菌株 Agl-1, 转化载体为 pCambia3301, 其中含有小立碗藓胚胎晚期丰富蛋白 LEA(Late embryogenesis abundant protein) 基因, basta 抗性基因, 由中国农业科学院生物技术研究所路铁钢老师惠赠。

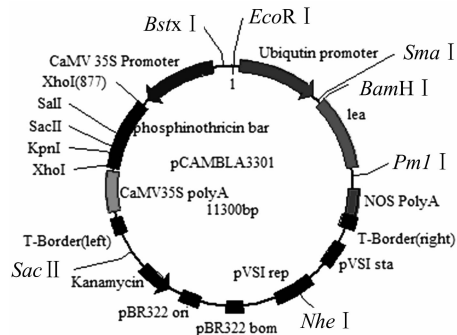


图1 *lea* 基因载体结构

### 1.3 培养基

1.3.1 细菌培养基 YEB: 5 g/L 牛肉浸膏 + 1 g/L 酵母膏 + 5 g/L 蛋白胨 + 5 g/L 氯化钠, pH 值 7.4。AAM: AAM 大量 + AAM 微量 + MS 有机 + 铁盐 + 肌醇 + 0.3 g/L 水解酪蛋白 + 68.5 g/L 蔗糖 + 36 g/L 葡萄糖, pH 值 5.2。

1.3.2 愈伤组织诱导培养基/愈伤组织继代培养基 N6 大量 + B5 微量 + B5 有机 + 麦芽糖 3% + 肌醇 + 水解酪蛋白 0.3 g/L + 精氨酸 0.174 g/L + 天冬氨酸 0.266 g/L + 谷氨酰胺 0.876 g/L + 2,4-D 2 mg/L + 凝胶 0.58%, pH 值 5.8。

1.3.3 农杆菌共培养培养基 N6 大量 + B5 微量 + B5 有机 + 铁盐 + 2,4-D + 肌醇 + 水解酪蛋白 0.3 g/L + 蔗糖 30 g + 葡萄糖 10 g + AS 20 mg/L, pH 值 5.2。

1.3.4 恢复培养基 N6 大量 + B5 微量 + B5 有机 + 蔗糖 3% + 肌醇 + 铁盐 + 水解酪蛋白 0.3 g/L + 脯氨酸 0.5 g/L + 特美汀 500 mg/L + 凝胶 0.58%, pH 值 6.0。

1.3.5 抗性愈伤筛选培养基 N6 大量 + B5 微量 + B5 有机 + 蔗糖 3% + 肌醇 + 铁盐 + 水解酪蛋白 0.3 g/L + 脯氨酸 0.5 g/L + 特美汀 300 mg/L + 草铵膦 30 mg/L + 凝胶 0.58%, pH 值 6.0。

1.3.6 抗性愈伤预分化培养基 N6 大量 + MS 微量 + B5 有机 + NAA 1 mg/L + 6-BA 3 mg/L + ABA 3 mg/L + 蔗糖 3% + 铁盐 + 水解酪蛋白 0.5 g/L + 肌醇 + 特美汀 300 mg/L + 草铵膦 30 mg/L + 凝胶 0.58%, pH 值 6.0。

1.3.7 抗性愈伤分化培养基 N6 大量 + B5 微量 + B5 有机 + 6-BA 1 mg/L + NAA 1 mg/L + 肌醇 + 铁盐 + 水解酪蛋白 0.3 g/L + 蔗糖 3% + 植物凝胶, pH 值 5.8。

1.3.8 生根壮苗培养基 1/2MS + 蔗糖 3% + NAA 0.5 mg/L + 植物凝胶 0.28%, pH 值 5.8。

#### 1.4 旱稻愈伤组织培养

在无菌条件下,用 75% 乙醇浸泡已脱壳种子 2 min,用蒸馏水洗涤 3 次,30% NaClO 浸泡 40 min,冀早糯 3 号种子较其他旱稻种子相比更易染菌,所以浸泡过程中应不断摇晃锥形瓶,浸泡后用蒸馏水洗涤 3 次,重复 1 次;用无菌滤纸吸干种子表面水分,无菌条件下接种到诱导培养基上,在 28 ℃ 黑暗条件下诱导愈伤组织;培养 7 d 待少量愈伤长出后,进行切芽,切芽后接种于诱导培养基中,培养 20 d 后挑选致密、状态佳的愈伤组织进行继代培养。

#### 1.5 农杆菌介导法转化水稻

1.5.1 农杆菌的培养 将 Agl-1 农杆菌菌种(含有 *lea* 及 *bar* 基因)涂布于固体 YEP 培养基(含有 50 mg/L 硫酸卡那霉素和 50 mg/L 利福平)的培养皿中,28 ℃ 过夜暗培养 3 d,从培养皿上刮取适量长出的农杆菌悬浮于液体 AAM 培养基中(内含终浓度为 60 mg/L 的乙酰丁香酮)以备转化之用。

1.5.2 农杆菌转化 为了确定转化侵染时合适的菌液浓度,需要比较不同浓度菌液对愈伤转化效率的影响,挑选生长旺盛的愈伤组织,分别放入 600 nm 处吸光度为 0.1、0.2、0.3 的 AAM 菌悬液中浸染,不断轻轻振荡 20 min 后,倒掉菌液,将愈伤组织置于无菌滤纸上吸干。用小勺将表面干燥的愈伤均匀撒在铺有 1 张无菌滤纸的共培养培养基上,25 ℃ 暗培养 3 d 后转移至恢复培养基,恢复培养基中不含筛选剂,主要作用是抑制农杆菌的生长。

#### 1.6 筛选

愈伤组织在恢复培养基中生长 5 d 后转入筛选培养基中,为了确定转化筛选时合适的除草剂浓度,需要比较不同浓度除草剂对水稻愈伤生长的影响,将经过转化的淡黄色、干爽且呈颗粒状的愈伤组织分别转入含 20、40、60 mg/L 草铵膦的培养基中,各培养基中接 10 板愈伤组织,28 ℃ 暗培养 15 d 后,观察记录愈伤组织的生长、褐化、死亡情况。

#### 1.7 抗性愈伤组织获得、分化、幼苗生根及移栽

将愈伤组织转接于筛选培养基筛选 2 轮,每轮 15 d。挑选出浅色抗性愈伤组织接到预分化培养基上,28 ℃ 暗培养 5~7 d,直到抗性愈伤组织变白。将变白的抗性愈伤组织转入分化培养基上,28 ℃ 下光照培养 30 d 左右,待其出现绿点;当绿点分化成 3 cm 左右的芽时,将芽转接于生根培养基,25 ℃ 光照培养 3 周左右,最后将苗移栽至大田。

#### 1.8 抗性植株的分子检测

按 Edwards 等的方法<sup>[9]</sup>提取待测的叶片总 DNA。引物设计:遵循引物设计原则,利用 DNAMAN 软件设计 PCR 检测引物,引物序列如下:F:5'-AATTTCTTTCTTTTGGATTA 3',R:5'-TGCGGTGCTTATTACTAT 3'。PCR 反应体系(20 μL):

DNA 2 μL, dNTPMix 1 μL, 10 × PCR buffer 2 μL, *Taq* 酶 0.2 μL, P1 1 μL, P2 1 μL, 补水至 20 μL。PCR 反应程序:96 ℃ 3 min;94 ℃ 30 s, 58 ℃ 40 s, 72 ℃ 50 s, 35 个循环;72 ℃ 10 min。

#### 1.9 数据处理

对转基因植株 PCR 结果进行分析,统计基因的转化情况。转化率各指标的统计参照文献[10]。绿苗分化率 = 分化绿苗数/感染愈伤组织数 × 100%;假阳性率 = (绿苗数 - PCR 阳性植株数)/绿苗数 × 100%;转化率 = PCR 阳性植株数/感染愈伤组织数 × 100%。

## 2 结果与分析

### 2.1 愈伤组织的诱导

本研究得出,不含脯氨酸的 NB 培养基比水稻常用的 MS 培养基效果更好,将常用碳源蔗糖改为麦芽糖更有利于诱导旱稻愈伤组织。在培养基中添加 2 mg/L 2,4-D,能使愈伤生长为最适宜转化的粟粒大小,接种 7 d 后进行切芽,否则产生的大量根会影响愈伤组织的生长。20 d 后待愈伤长至图 2 的状态时进行继代。

### 2.2 农杆菌菌液浓度对转化的影响

试验结果表明,600 nm 处吸光度为 0.1、0.2 的菌液侵染后比较容易脱菌,而吸光度为 0.3 的菌液侵染的愈伤组织脱菌后农杆菌会再次生长(图 3)。但吸光度为 0.1 的菌液侵染的愈伤组织在后期筛选过程中死亡率较高,菌液浓度过低会降低转化率。故本试验采用吸光度为 0.2 的菌液进行侵染。

### 2.3 筛选剂用量的选择

将转化后的愈伤组织恢复 5~7 d 后在不同筛选浓度的培养基中培养 15 d,统计死亡率,20、40、60 mg/L 草铵膦处理死亡率分别为 11%、27%、60%。除草剂对愈伤组织的生长有很强的抑制作用,随着浓度的升高,抑制效果逐渐增强。当浓度为 20 mg/L 时,愈伤组织死亡率只有 11%,褐化现象不明显(图 4-A);当浓度为 40 mg/L 时,愈伤组织明显褐化,死亡率也大幅提升。所以,为了能有效区分转化细胞和非转化细胞,降低转基因植株的假阳性率,本试验除草剂(草铵膦)浓度采用 40 mg/L。把转化后的愈伤组织转到含 40 mg/L 除草剂的选择培养基上,经过 15 d 筛选,观察发现有小部分愈伤组织全部褐化死亡;有些愈伤组织部分褐化,表面松散,虽然没有彻底死亡,但是没有长出乳白色的抗性愈伤组织;另一部分愈伤组织虽然母体褐化,但在生长点长出抗性愈伤组织(图 4-B)。对于最佳筛选剂浓度的确定,要遵循一个原则:既要抑制非转化细胞生长,又不会对转化细胞造成太大损害。本试验采用的除草剂浓度为 40 mg/L,低于这个浓度,大部分愈伤组织得不到控制,很难区分转化细胞和非转化细胞,造成大量假阳性;高于这个浓度,则转化细胞生长也容易被抑制,从而不容易分化。筛选过程为 2 轮,每轮 15 d,由于冀早糯 3 号的抗性愈伤组织在筛选过程中生长良好,优于其他旱稻品种,无需第 3 轮筛选。

### 2.4 预分化对分化率的影响

将筛选出的一部分抗性愈伤组织直接接到分化培养基上,分化率为 38%,而先经过预分化再转入分化培养基的分化率为 56%,后者较优,并且试验发现冀早糯 3 号的分化率

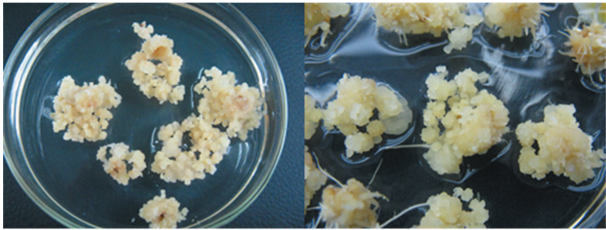
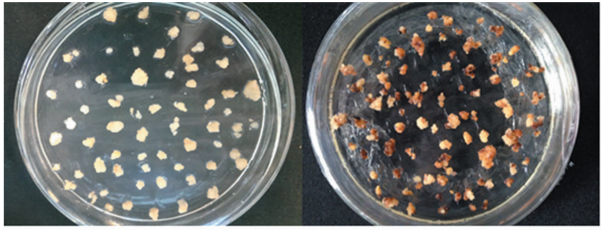
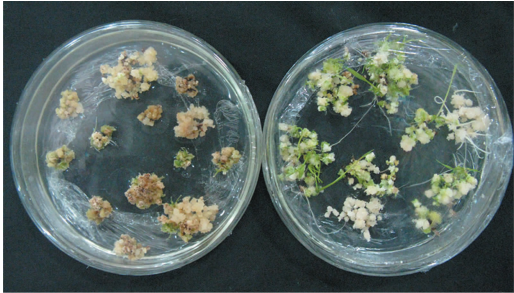


图2 冀早糯3号愈伤组织



A.20 mg/L 草铵膦 B.40 mg/L 草铵膦  
图4 愈伤组织在筛选培养基上生长情况

通过观察发现,经过预分化的愈伤组织为白色胚状颗粒,且颜色鲜亮有光泽,在分化培养基上生长较快,长势较好,未经预分化的愈伤组织颜色发黄暗淡,生长较慢,容易褐化。分化 20 d 后观察,经过预分化的愈伤组织在分化过程中的绿点率高于未经预分化的愈伤组织,并且部分愈伤已分化出苗(图 5)。可见,筛选出的抗性愈伤组织在分化之前先经过预分化处理可提高分化率。

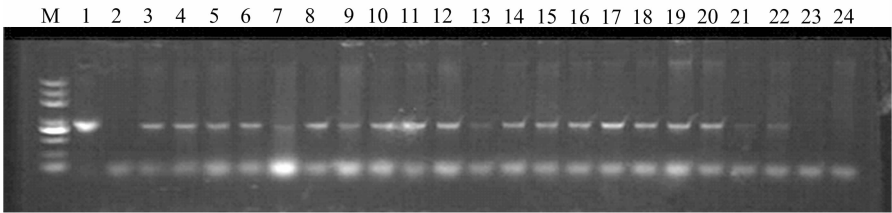


A.未预处理 B.经过预处理  
图5 愈伤组织在分化培养基上生长情况

由于预分化培养基中含有植物内源激素脱落酸(ABA)<sup>[11]</sup>,脱落酸是有关生长活性物质代谢的关键因子,可具有促进植物吸收营养和协调体内代谢的能力,故本试验在预分化培养基中加入 ABA 可有助于愈伤组织分化。

2.5 T<sub>0</sub> 代转化苗 PCR 反应结果

提取转化苗叶片 DNA 并进行 PCR 检测,由图 6 可见,3~21 号泳道有条带,并且和作为阳性对照的质粒 DNA 片段大小一致,说明这 20 个样品中含有目的基因,可以确定是阳性植株。将扩增的目的片段进行测序,测序结果与 NCBI 比对,结果表明出自小立腕藨的 *lea-1* 基因已成功转化。



M—marker; 1—质粒DNA阳性对照; 2—野生型样品,作为阴性对照; 3~24—样品  
图6 PCR 检测结果

2.6 数据处理结果

计算得:绿苗分化率 41.2%,假阳性率 9.1%,转化率 37.5%。

3 结论与讨论

冀早糯 3 号为粳糯型早稻新品种,其转化体系与普通早

稻(如粳早 1 号)有一定区别。本试验利用农杆菌转化法将目的基因导入早稻中,建立了适用于冀早糯 3 号的高效转化体系,确定了最适宜的愈伤诱导培养基为 NB+2,4-D(不加脯氨酸),糖源改为麦芽糖,最佳菌液侵染浓度(以  $D_{600\text{ nm}}$  表示)为 0.2,筛选培养基中除草剂最佳浓度为 40 mg/L,将筛选出的乳白色抗性愈伤组织经过 5 d 预分化培养,可提高分化

从上至下依次为600 nm处吸光度为0.1、0.2、0.3的菌液处理  
图3 脱菌3 d 后的生长情况

普遍高于粳早 1 号等其他早稻品种。

殷玲, 吉挺, 李冠华, 等. 中华蜜蜂 *OBP17* 基因 CDS 序列及其表达与抗螨性状的相关性[J]. 江苏农业科学, 2015, 43(11): 45–48.  
doi:10.15889/j.issn.1002-1302.2015.11.012

# 中华蜜蜂 *OBP17* 基因 CDS 序列及其表达与抗螨性状的相关性

殷玲<sup>1</sup>, 吉挺<sup>2</sup>, 李冠华<sup>1</sup>, 牛德芳<sup>1</sup>

(1. 江苏农牧科技职业学院, 江苏泰州 225300; 2. 扬州大学动物科学与技术学院, 江苏扬州 225009)

**摘要:** *OBP17* 是蜜蜂气味结合蛋白质 (odorant binding proteins, OBPs) 家族中的成员, 参与气味分子的识别, 对嗅觉起重要作用。蜜蜂的抗螨性状与嗅觉密切相关, 为研究蜜蜂 *OBP17* 基因的功能及其与抗螨性状的相关性, 以中华蜜蜂头部组织 cDNA 为模板, PCR 扩增 *OBP17* 基因完整 CDS 序列, 利用生物信息学方法分析 CDS 序列及其编码的氨基酸序列, 利用 RT-PCR 方法检测 *OBP17* 基因在不同抗螨性状的中华蜜蜂头部组织中的相对表达量。结果表明, *OBP17* 基因 CDS 全长为 408 bp, 编码 135 个氨基酸的分泌性蛋白, 无跨膜螺旋, 是比较保守的基因; RT-PCR 检测结果显示, 在蜂螨胁迫下的中华蜜蜂头部组织中, *OBP17* 基因的表达量显著高于未受胁迫的抗性群体及受到同等蜂螨胁迫的敏感性群体。中华蜜蜂 *OBP17* 基因的表达变化与蜂螨感染过程相关, 说明 *OBP17* 基因在中华蜜蜂的抗螨行为中起重要作用。

**关键词:** 中华蜜蜂; *OBP17*; 克隆; 生物信息学; 狄斯瓦螨

**中图分类号:** S895.3<sup>+</sup>2 **文献标志码:** A **文章编号:** 1002-1302(2015)11-0045-04

昆虫通过嗅觉受体神经元的调节来识别并区分成千上万种气味复合物, 而气味结合蛋白 (odorant binding proteins, OBPs) 家族则承担特异性识别、转运气味复合物至受体的运输功能<sup>[1]</sup>, 因此气味结合蛋白与昆虫的嗅觉敏感性密切相关。目前, 国内外关于蜜蜂 OBPs 家族的基因功能研究较少, 关于中华蜜蜂 OBPs 家族的研究更少。李红亮等对 ASP2 进

行 CDs 的克隆, 并对其功能模式进行分析<sup>[2-3]</sup>; 张小辉等克隆了中华蜜蜂气味结合蛋白 5、9、11、12 的完整基因序列<sup>[4]</sup>; 陈扬等对中华蜜蜂头部 *CSP3* 基因的 CDS 序列进行分析<sup>[5]</sup>。*OBP17* 是蜜蜂气味结合蛋白质家族中的成员, 是低分子量水溶性酸性蛋白质, 有 6 个保守的半胱氨酸位点, 在西方蜜蜂的身体各部位均有表达<sup>[6]</sup>, 但其具体功能却不得而知。

狄斯瓦螨 (*Varroa destructor*) 别称大蜂螨, 是对世界养蜂业威胁最大的蜜蜂病虫害, 对西方蜜蜂产业造成了巨大损失<sup>[7]</sup>, 也是我国最重要、必须严加防范的蜜蜂寄生虫害<sup>[8]</sup>。中华蜜蜂 (*Apis cerana cerana*) 是东方蜜蜂的地理品种, 生活于我国境内, 狄斯瓦螨对其并不造成伤害<sup>[9]</sup>。周婷对我国主要

收稿日期: 2015-01-22

基金项目: 国家自然科学基金 (编号: 31372382); 江苏农牧科技职业技术学院重点科研课题 (编号: NSFRC1401)。

作者简介: 殷玲 (1983—), 女, 江苏泰兴人, 博士, 讲师, 主要从事蜜蜂分子生物学研究。E-mail: lingyin\_txx@163.com。

效率。本试验提取转基因水稻基因组 DNA 并进行 PCR 检测, 结果表明, 利用优化后的转化体系可将转化率提高到 37.5%。本研究结果证明目的基因已成功转入冀旱糯 3 号的细胞中, 而目的基因的插入位点还需要进一步做 tail-PCR 研究。

## 参考文献:

- [1] 侯佩臣, 王晓冬, 王美娟, 等. 干旱胁迫下早稻和水稻对 K<sup>+</sup> 和 Ca<sup>2+</sup> 的动态吸收研究[J]. 安徽农学通报, 2013, 19(23): 5–7, 16.
- [2] 孙重霞, 张桂堂, 梁荣奇, 等. 利用转基因技术改良小麦品质的研究进展[J]. 分子植物育种, 2009, 7(2): 398–406.
- [3] 唐微. 转 *Bar* 基因抗除草剂水稻的培育[J]. 湖北农业科学, 2007, 46(4): 488–490.
- [4] 李国圣, 张卿伟, 张举仁, 等. 玉米丛生芽体系的建立及抗除草剂转基因植株再生[J]. 中国科学: C 辑: 生命科学, 2001, 31(5): 385–391.
- [5] 咸拴狮, 罗晓丽, 王剑. 油菜转基因进展[J]. 山西农业科学, 2006, 34(3): 85–88.

- [6] Deane J E, Roversi P, King C, et al. Structures of the shigella flexneri type 3 secretion system protein MxiC reveal conformational variability amongst homologues[J]. Journal of Molecular Biology, 2008, 377(4): 985–992.
- [7] 俞嘉宁, 张林生, 张劲松, 等. 小麦耐逆基因 - *TaLEA3* 的克隆及在酵母中的功能分析[J]. 生物工程学报, 2004, 6(6): 832–838.
- [8] Cheng Z, Taroglli J, Huang X, et al. Wheat LEA genes *PM80* and *PMA1959*, enhance dehydration tolerance of transgenic rice (*Oryza sativa* L.) [J]. Molecular Breeding, 2002, 10: 71–82.
- [9] Edwards K, Johnstone C, Thompson C. A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis[J]. Nucleic Acids Research, 1991, 19(6): 1349.
- [10] Zhang W, Wu R. Efficient regeneration of transgenic plants from rice protoplasts and correctly regulated expression of the foreign gene in the plants[J]. Theoretical and Applied Genetics, 1988, 76(6): 835–840.
- [11] 江玲, 万建民. 植物激素 ABA 和 GA 调控种子休眠和萌发的研究进展[J]. 江苏农业学报, 2007, 23(4): 360–365.