

研究报告 Original Papers

农杆菌介导转 *AtNHX1* 基因杨树的获得徐文君¹, 刘兆普^{1,*}, 隆小华¹, 周玮²南京农业大学¹资源与环境科学学院,²生命科学学院, 南京 210095

摘要: 采用根癌农杆菌介导法, 将拟南芥 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白(Na^+/H^+ antiporter)基因(*AtNHX1*)转入杨树。建立了杨树的继代及高频再生系统。经抗生素筛选, 对再生植株进行PCR检测、PCR产物基因测序和杨树基因组DNA的Southern检测, 证实已获得126株转*AtNHX1*基因的杨树植株。

关键词: 转基因杨树; 杨树‘尼娃107’; 根癌农杆菌; *AtNHX1*

Transformation of *Populus×euramericana* with *AtNHX1* Gene Mediated by *Agrobacterium tumefaciens*

XU Wen-Jun¹, LIU Zhao-Pu^{1,*}, LONG Xiao-Hua¹, ZHOU Wei²

¹College of Resource and Environmental Sciences; ²College of Life Sciences, Nanjing Agricultural University, Nanjing 210095, China

Abstract: Na^+/H^+ antiporter gene of *Arabidopsis thaliana* (*AtNHX1*) was transferred into poplar by *Agrobacterium tumefaciens* transferring system. A subculture system and a high frequency regeneration system were established. 126 *AtNHX1* transgenic plants were obtained, verified by PCR test, sequencing of PCR product and Southern blot analysis of genomic DNA of poplar.

Key words: transgenic poplar; *Populus×euramericana* ‘Neva 107’; *Agrobacterium tumefaciens*; *AtNHX1*

1986年Minocha等获得了第1个杨树转基因植株, 十几年来, 杨树转基因技术进展很快, 已有近20个杨树种或杂种获得了转基因植株(饶红宇和黄敏仁1999)。一些重要的目的基因包括抗虫基因、降低木质素基因、抗除草剂基因等已被转入杨树(张峰等2002), 打破了木本植物传统的基因改良进程, 杨树已经成为木本植物在遗传学和分子生物学方面的模式植物(Massim等1998)。大量研究表明, 位于植物质膜和液泡膜上的 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白与植物耐盐性密切相关(Blumwald和Poole 1985; RauschT等1996; Barkla和Pantoja 1996)。本研究选用的拟南芥液泡膜上 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白(Na^+/H^+ antiporter)基因*AtNHX1*, 已在许多植物中转化成功(如番茄、小麦、柠檬、蓝莓), 但在杨树中还未见报道。本试验采用农杆菌介导法将*AtNHX1*高效表达载体转入杨树, 获得Kan抗性植株, 并进行分子检测, 以期获得抗盐性杨树, 为盐碱地的利用提供一个可能途径。

材料与方法

实验所用菌种是含*AtNHX1*植物双元表达载体(pBISN1)的根癌农杆菌(LBA4404), 菌种和质粒均由中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所张宏霞教授提供, 含*AtNHX1*植物双元表达载体(pBISN1)的结构如图1所示。

酶和生化试剂购自上海英骏生物技术有限公司。

杨树(美洲黑杨×欧美杨)品种‘尼娃107’(*Populus×euramericana* ‘Neva 107’), 是欧美杨无性系, 速生, 材质好, 抗寒, 尤其是抗风折能力强, 采自本校资源与环境学院莱州基地。

收稿 2006-11-13 修定 2007-04-05

资助 国家支撑项目计划(2006BAD09A04-05和2006BAD-09A08-03-01)。

* 通讯作者(E-mail: sea@njau.edu.cn; Tel: 025-84396678)。

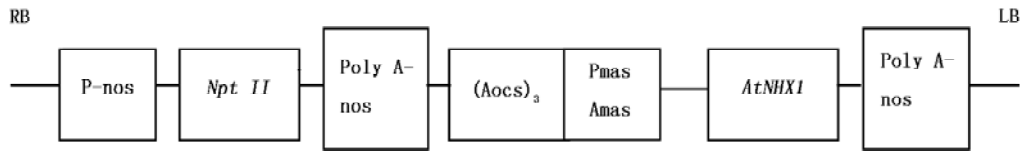


图1 含 *AtNHX1* 基因的植物双元表达载体(pBISN1)结构

Fig.1 The construction of binary vector (pBISN1) containing *AtNHX1* gene

LB 和 RB: Ti 质粒左右边区; *Npt II*: 卡那霉素抗性基因; $(Aocs)_3$ Pmas Amas: 链接在启动子上的 Aocs 三聚体复核物; *AtNHX1*: 目的基因 Na^+/H^+ 逆向转运蛋白基因; P-nos 和 PolyA-nos: 终止子。

取新鲜采摘的杨树叶片和茎段为外植体消毒后,置于以MS为基本培养基,添加蔗糖 $30\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$,琼脂 $7.5\text{ g}\cdot\text{L}^{-1}$ 以及不同比例的激素和抗生素的培养基上,置于 25°C 培养室,光强 $30\sim 40\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$,光周期 $16\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$, 3~4 周后,根据试管苗的生长情况筛选最佳培养基,即(1)分化培养基:MS+ $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA;(2)生根培养基:1/2 MS+ $0.8\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ IBA。含 *AtNHX1* 基因的菌液活化与培养时,在超净台上,从保存在 -70°C 的菌种保存管中取少量LBA4404(具有利福平Rif抗性)农杆菌菌液,用涂布的方法均匀的涂在含有相应抗生素[*Npt II*, 卡那霉素(Kan)抗性基因]的固体培养基 YEB (YEB+ $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Kan+ $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Rif)平板上, 28°C 倒置培养 48 h,挑单菌落到含同样抗生素的液体 YEB 培养基(YEB+ $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Kan+ $50\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Rif)中, $180\sim 200\text{ r}\cdot\text{min}^{-1}$ 振荡过夜培养至对数生长期,取 1 mL 菌液到 20 mL YEB 液体培养基中继续振荡培养 5~6 h,加入 10 倍体积 MS,振荡培养至 $OD_{600} = 0.5\sim 0.6$,作为转化侵染的菌液备用。

以农杆菌侵染法转化,为了提高转化频率,首先取生长 3~4 周的无菌苗茎段切割成 5 mm 左右大小,置于分化培养基上预培养 2 d,取出经过预培养的茎段置于备好的菌液中侵染 13 min,侵染后用无菌滤纸吸干外植体表面多余的菌液,然后再次放入分化培养基中,置于暗处, 25°C 共培养 2~3 d,待出现肉眼可见的菌斑,立即将茎段转入筛选培养基(MS+ $0.5\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ 6-BA+ $0.1\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ NAA+ $70\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Kan+ $500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Carb),在 25°C 、光强 $30\sim 40\ \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ 和光周期 $16\text{ h}\cdot\text{d}^{-1}$ 下培养,同时以未侵染的茎段作为对照。10 d 后,有抗性芽产生。待抗性芽长到 2 cm 高度,将其切割分开后转入添加了 $500\text{ mg}\cdot\text{L}^{-1}$ Carb 的生根培养基,

诱导生根。

根据已知 *AtNHX1* 基因的序列用 Primer Premier 5.0 软件设计特异引物,上游引物:5'-TCACCTAAACCACGAAGC-3',下游引物:5'-GACCACCAAATCACAACC-3',参照SDS法(王关林和方宏筠 2002),小量提取转化植株和非转化植株的DNA,以 pBISN1 质粒DNA作为对照,进行PCR扩增。PCR扩增条件为: 94°C 4 min, 1 循环; 94°C 30 s, 55.5°C 30 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 7 min, 1 个循环。取PCR产物 $5\ \mu\text{L}$, 1.5% 的琼脂糖凝胶电泳,检测是否有 *AtNHX1* 基因片段。

PCR产物进行琼脂糖凝胶电泳后,在紫外灯下切下可见条带,利用DNA小量回收试剂盒(上海华舜生物工程有限公司),纯化回收DNA;然后将纯化产物酶连($5\ \mu\text{L}$ ligation+ $1\ \mu\text{L}$ T-vector [pmd-19]+ $4\ \mu\text{L}$ 纯化产物, 16°C 保温 8 h);酶连产物转化到大肠杆菌中,获得大肠杆菌菌液,委托上海英骏生物技术有限公司进行DNA测序,核对扩增片段是否与 *AtNHX1* 基因的序列一致(李少骞 2002)。

随机抽取 3 株 PCR 阳性植株进行 Southern 杂交,用 *Bam*HI 酶切对照植株和 PCR 阳性植株的基因组DNA $10\ \mu\text{g}$,在 0.9% 琼脂糖凝胶上 50 V 缓慢电泳 10~15 h,转移到 H-bond TM- N^+ 尼龙膜上,以 ^{32}P 为探针,按照《分子克隆实验指南》方法进行探针杂交和检测。

实验结果

1 杨树继代和高频再生体系的建立

幼苗继代和高频再生体系的建立,是利用农杆菌介导法基因转化的基础。结果表明,‘尼娃 107’速生杨的组培生长状况和激素比例

表1 不同比例 6-BA 和 NAA 对不同大小茎段和叶片再生芽形成的影响

Table 1 Effects of different proportion between 6-BA and NAA on regeneration buds of different area leaves

茎长度/cm	叶面积/cm ²	6-BA 浓度/mg·L ⁻¹	NAA 浓度/mg·L ⁻¹	叶生芽数/个	茎生芽数/个
0.02	0.05	0	0	3.7	4.5
		0.5	0.1	6.3	6.1
		1.0	0.1	4.2	3.8
0.5	0.10	0	0	3.3	4.7
		0.5	0.1	13.5	18.7
		1.0	0.1	8.6	12.9
0.8	0.15	0	0	3.4	8.5
		0.5	0.1	4.1	7.3
		1.0	0.1	2.5	4.1

每种培养基上培养的叶片和茎段均为 50 片。

以及外植体的选择关系密切。叶面积过小, 叶片容易褐化而死, 面积过大, 叶片主要表现出膨大的趋势, 发黄, 变脆, 不易吸取培养基中养分, 导致再生芽个数下降, 因此从表 1 看, 选择切割 0.1 cm×0.1 cm 的叶片比较合适。6-BA 和 NAA 对再生芽的诱导有明显差异, 添加 6-BA, 再生芽比较紧密, 不容易褐化, 当浓度过高, 再生芽叶片会发红, 发脆, 叶片狭长; 同时添加 NAA, 也能够提高诱导率, 当浓度过高, 生根比较严重, 再生芽变得稀疏, 不利于再生芽的诱导。同样的问题也存在于茎段的分化中(表 1)。所以我们选用的浓度为 0.5 mg·L⁻¹ 6-BA 和 0.1 mg·L⁻¹ NAA, 再生芽紧密, 长势旺。茎段和叶片分化培养基同为 MS+0.5 mg·L⁻¹ 6-BA+0.1 mg·L⁻¹ NAA, 但比起叶片, 茎段的再生芽更加紧密, 叶面宽而平整, 在之后的高选择压的筛选中能保持良好的生长状态, 所以本实验选取茎段作为遗传转化的最佳外植体。

2 杨树的转化和植株的再生

本实验所选用的表达载体含有卡那霉素抗性基因(*Npt II*)序列, 所以我们选用卡那霉素作为筛选抗性苗试剂。为了确定‘尼娃 107’速生杨对 Kan 的本底抗性, 将生长一致的无菌苗接种于含有不同浓度 Kan 的分化培养基上, 2 周后观察它们的生长情况(表 2), 最终确定添加 70 mg·L⁻¹ Kan 的培养基作为筛选培养基。经农杆菌侵染的杨树茎段, 在筛选培养基上, 10 d 左右出现芽点, 开始分化出芽; 而未经侵染的茎段没有芽点出现, 逐渐褐化死亡。待不定芽长到 2 cm 高度, 将其

表2 不同浓度 Kan 对杨树再生芽分化的影响

Table 2 Effects of different concentrations of Kan on regeneration of poplar

Kan 浓度/mg·L ⁻¹	分化率/%	死亡率/%
0	100.00	0
10	95.30	4.70
30	23.22	75.78
50	16.33	83.67
70	0	100

接种数均为 100 个。

切割分开转入含 500 mg·L⁻¹ Carb 生根培养基, 诱导生根。生根后转入温室中培养。总共遗传转化外植体 227 个, 产生卡那霉素抗性不定芽 339 个, 317 个在生根培养基中生根并长大。

3 PCR 检测结果

以未转化杨树植株叶片 DNA 作对照, 在检测的 200 株转化再生小苗中, 126 株呈 PCR 阳性(阳性转化率达 60% 以上), 扩增出一条 555 bp DNA 片段, 与 *AtNHX1* 基因大小相符, 未转化植株没有条带出现(图 2), 初步说明 *AtNHX1* 基因整合到杨树基因组中。

4 PCR 产物的基因测序

委托生物公司进行 PCR 产物基因测序结果, 经过 gene tool 软件的比对, 与已知的 *AtNHX1* 基因序列完全一致。

5 Southern 杂交

杂交膜通过 Typhoon 扫描仪扫描结果见图 3。未转化植株没有杂交信号, 随机抽取的 3 株 PCR 阳性植株有明显信号, 说明 *AtNHX1* 基因已经整

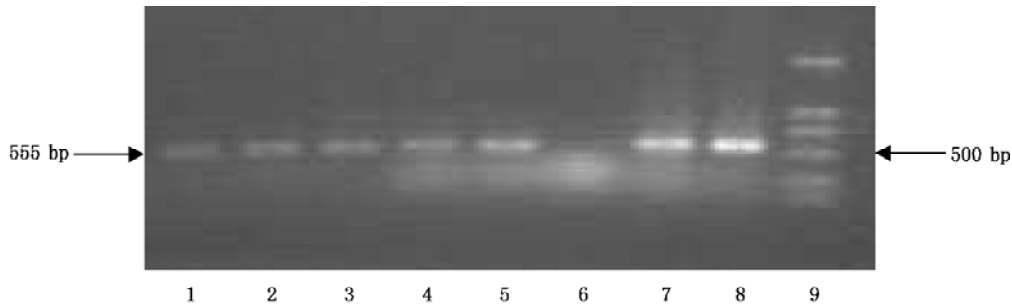


图2 转 *AtNHX1* 基因的PCR 检测

Fig.2 PCR amplification results of *AtNHX1* gene in the transformed plants
1~5 为转化植株; 6 为非转化植株; 7 和 8 为阳性质粒; 9 为 Marker DL2000。

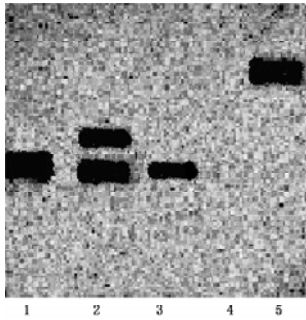


图3 转 *AtNHX1* 基因的 Southern blot 检测
Fig.3 Southern blot analysis of *AtNHX1* gene
in the transformed plants

1~3 为转化植株; 4 为非转化植株; 5 为阳性质粒。

合到杨树基因组中去。转基因植株中外源基因插入的拷贝数不同, 单拷贝之外还有部分双拷贝的存在。

讨 论

本实验研究通过 PCR 检测、PCR 产物的测序以及 Southern blot 杂交结果表明, 根癌农杆菌能够成功介导 *AtNHX1* 基因整合到杨树染色体基因组中, 也是首次将 *AtNHX1* 基因导入 ‘尼娃 107’ 速生杨中。选用杨树茎段作为外植体建立的高频再生体系是高效转化率的保证。本实验共检测出 126 个阳性植株, 阳性转化率达到 60% 以上。有研究表明预培养的时间和菌液浓度都影响着转化结果, 预培养可以促进细胞分裂, 易于整合外源 DNA, 但是时间过长也会使得伤口愈合而影响转化, 2 d 较为适宜; 菌液浓度过低将无法达到侵

染效果, 浓度过高又会导致农杆菌的过量繁殖, 使得抗生素无法达到抑菌效果, 外植体最终会褐化而死, $OD_{600} = 0.5 \sim 0.6$ 较为适宜。杨树是多年生木本植物, 生命周期较长, 因此对其耐盐性的鉴定需要较长一段时间才能获得肯定结果。此外外源基因表达受到多因素控制, 杨树植株幼年和成年对盐胁迫的抗性也未必一致, 所以杨树的田间实验还需要经过多年观察, 本实验的后续工作正在进行中。

参考文献

- 李少骞(2002). 转基因植物外源基因的检测方法及整合位点的研究. 湖南农业大学博士论文, 52~53
- 饶红宇, 黄敏仁(1999). 杨树基因工程研究的现状及展望. 林业科技开发, (4): 3~6
- 萨姆布鲁克 J, 拉塞尔 DW 著, 黄培堂主译(2002). 分子克隆实验指南(第三版). 北京: 科学出版社, 492~499, 502~507
- 王关林, 方宏筠(2002). 植物基因工程(第二版). 北京: 科学出版社, 742~743
- 张峰, 杨维春, 王振平(2002). 转基因杨树的研究进展及应用前景. 山东林业科技, (4): 36~38
- Barkla BJ, Pantoja O (1996). Physiology of ion transport across the tonoplast of higher plant. Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol, 47: 159~184
- Blumwald E, Poole RJ (1985). Na^+/H^+ antiport in isolated tonoplast vesicles from storage tissue of *Beta vulgaris*. Plant Physiol, 78: 163~167
- Confalonieri M, Allegro G, Balestrazzi A, Fogher C, Delledonne M (1998). Regeneration of *Populus nigra* transgenic plants expressing a Kunitz proteinase inhibitor (*KTi3*) gene. Mol Breed, 4: 137~145
- Rausch T, Kirsch M, Low R, Leher A, Viereck (1996). Salt stress responses of higher plants: the role of proton pumps and Na^+/H^+ antiporters. Plant Physiol, 148: 425~433