

文章编号: 1003-8701(2007)01-0014-03

HAL1 基因转化百脉根(*Lotus cirniculatus*) 的初步研究

韦正乙^{1,2}, 刘艳芝², 王兴智¹, 郭喜英^{1,2},
于志晶², 蔡勤安², 侯敬尧^{1,2}, 邢少辰^{2*}

(1.东北师范大学生命科学院, 长春 130024; 2.吉林省农业科学院生物技术研究中心 吉林 公主岭 136100)

摘要: 以 Bar 基因为标记基因, 以从酵母中克隆的耐盐基因 HAL1 为目的基因, 构建了植物表达载体 pCHAL1。以子叶为外植体, 用农杆菌介导法转化豆科植物百脉根。抗性再生苗经 PCR 方法鉴定, HAL1 基因阳性率为 46.7%。初步证明 HAL1 基因已整合到百脉根基因组中, 且转基因植株的表型正常。

关键词: HAL1; 遗传转化; 百脉根

中图分类号: S5541*.6

文献标识码: A

目前, 耕地盐渍化是全球公认的最严重的自然灾害之一, 它严重地影响着农业的发展, 使大片的耕地变成寸草不生的盐碱地。面对耕地的盐渍化, 单是对现有的农作物进行品种改良, 从长远利益来看, 似乎是治标不治本。因为, 如果不对荒漠和盐碱地进行治理, 它会越来越严重, 虽然植物通过改良获得优良性状, 但其终归有一个极限, 而且育种周期长。这样时间一长, 不仅保证不了农产品的生产, 还要投入大量的资金。因而对盐碱地的治理成为一个重要的课题摆在研究者的面前。生物治理被认为是最有效的一种治理方法, 然而一般的生物(植物)是不能再这样的条件下生长的, 这就不得不借助于基因工程育种。基因工程育种周期短, 而且通过基因工程, 可以赋予一些林木(包括经济林木)、牧草以特殊的耐盐的性状, 栽培在这些土地上。这样一方面, 治理了盐碱地, 另一方面, 还可以有收入, 如有些树可作为工业原料或生产水果、牧草可以饲养牲畜等, 可谓一举两得。

Gaxida 等首先于 1992 年从酵母细胞中克隆到了 HAL1 基因^[1]。该基因的产物是一个与酵母耐盐性相关的蛋白质。虽然 HAL1 的具体作用机制尚未清楚, 但是它可赋予酵母细胞超强的耐盐表型, 所以这是用以在转基因植物中表达的首选酵母调节因子^[2]。

1 方法

1.1 植物表达载体的构建

用 BamHI 和 BstEII 将 HAL1 基因从质粒 pT-easy(HAL1)(本实验室保存)上切下来, 连接到用 BglII 和 BstEII 双切的 pCAMBIA3301 载体上, 经 PCR 和 NcoI、BstEII 双酶切验证, 即获得 HAL1 的植物表达载体 pCHAL1, 其 T-DNA 结构如图 1 所示。

1.2 农杆菌介导的百脉根转化

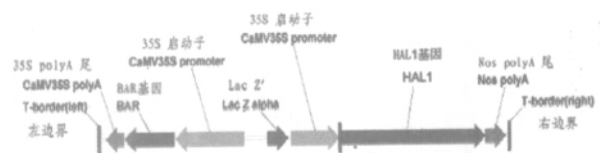


图 1 载体 pCHAL1 的 T-DNA 结构示意图

收稿日期: 2006-11-11

作者简介: 韦正乙(1980-), 在读研究生, 主要从事植物分子生物学与基因工程研究。

通讯作者: 邢少辰

1.2.1 载体 pCHAL1 转化农杆菌

用文献[3]介绍的冻融法将 pCHAL1 转化农杆菌菌株 EHA105 感受态细胞, 转化子用 PCR 验证。PCR 引物为:

上游引物: 5 - GGATCCATGCATTTCAAAGATTTAGG- 3

下游引物: 5 - GGTACCGGTGACCTCAACTATTCTGTGTTGA- 3

PCR 参数为: 94 5 min; 94 50 s, 55 45 s, 72 1 min15 s, 40 个循环; 72 10 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳后用凝胶成像仪分析(图 2C)。

1.2.2 百脉根转化

外植体准备: 百脉根种子, 经表面消毒, 浸泡 24 h 后, 置于放有湿润滤纸的培养皿中, 光照培养 2 d 后, 将发芽种子接种于 MS₀ 培养基中。7 d 左右取无菌苗子叶, 顶端切去 1/3 作为外植体, 并全部埋入培养基 I 中预处理 3 d。转化所需的培养基见表 1。

表 1 百脉根转化所需的培养基

培养基	成分	pH
MS ₀ 液体	MS 盐 + MS 有机 + 4 g/LMES	5.6
	MS 盐 + MS 有机 + 0.1 mg/L 6-BA + 3% 蔗糖 + 0.8% 琼脂	6.0
	MS 盐 + MS 有机 + 0.1 mg/L 6-BA + 3% 蔗糖 + 4g/L MES + 0.6% 琼脂	5.6
	MS 盐 + MS 有机 + 0.1 mg/L 6-BA + 3% 蔗糖 + 500 mg/L Cef + 0.8% 琼脂	6.0
	MS 盐 + MS 有机 + 2 mg/L + 3 mg/L Basta + 0.8% 琼脂	6.0

菌液准备: 将带有 pCHAL1 的 EHA105 农杆菌涂在含有 50 mg/L Rif、50 mg/L Kan, pH7.0 的 YEB 平板上活化, 挑取单菌落, 用液体 YEB 培养基培养至 OD₆₀₀ 值在 0.6 ~1.0 之间, 收集菌体, 用 MS₀ 液体培养基重悬至 OD₆₀₀ 为 1.0, 温育 4 h 左右备用。

转化: 将预处理 3 d 的外植体在制备的工程菌液中浸泡 30 min, 吸干菌液, 转入培养基 II 中共培养 1~3 d。

诱导、分化、再生筛选: 共培养后的外植体转入培养基 III 中抑菌, 每隔 2 周继代 1 次(此过程中即有不定芽分化), 2 个月后将带有不定芽的外植体转移到培养基 IV 上筛选。当非转化的外植体及不定芽被筛选致死时, 将抗性不定芽切下, 在 MS₀ 培养基上生根。

1.3 再生苗的 PCR 检测

按文献[3]介绍的 CTAB 法提取抗性再生苗基因组 DNA, 用作 PCR 检测的模板。PCR 引物同上, PCR 参数为: 94 5 min; 94 50 s, 53 50 s, 72 1 min15 s, 40 个循环; 72 10 min。PCR 产物经 1%琼脂糖凝胶电泳后用凝胶成像仪分析。

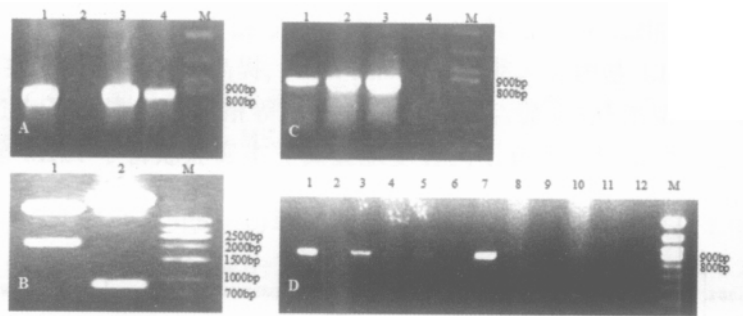


图 2—A pCHAL1 的 PCR 检测

1, pT-easy(HAL1)阳性对照; 2, H₂O 对照; 3, 4, 不同的克隆; M, marker

图 2—B pCHAL1 NcoI/BstEII 双酶切鉴定

1, pCAMBIA3301 对照; 2, pCHAL1; M, marker

图 2—C 农杆菌 EHA105 的 pCHAL1 转化检测

1, pT-easy(HAL1)阳性对照; 2, 3, 不同的克隆; 4, H₂O 对照; M, marker

图 2—D 再生苗的 PCR 检测

1, pT-easy(HAL1)阳性对照; 11, H₂O 对照; 12, 非转化苗阴性对照; 2~10, 不同抗性再生植株; M, marker

2 结果

2.1 载体构建

以连接后的载体为模版,经 PCR 扩增,获得约 900bp 大小的片段,初步证明 HAL1 基因已正确链接到载体 pCAMBIA3301 上。设计引物时引入的 BstEII 位点经酶切后产生能与 BglII 切的末端相连,从而使该两个限制性位点消失,但载体 pCAMBIA3301 上有一 NcoI 位点,恰好在原来的 BglII 位点旁,因而可用于鉴定。载体经 NcoI 和 BstEII 双切后,获得约 900bp 的目标片段,说明该基因已正确连接,即植物表达载体 pCHAL1 构建成功。见图 3A、B。

2.2 百脉根的转化

外植体抑菌的过程中边缘有突起,产生愈伤组织,并分化出不定芽。带有 1cm 左右不定芽的外植体在含 3mg/L Basta 的筛选培养基上经过 30 d 的筛选即可筛选出抗性苗。抗性苗极易生根,在 MS₀ 培养基中 7d 即有根发生,获得再生苗(图 3)。抗性苗的表型正常,没有出现生长迟缓、植株矮化等现象。

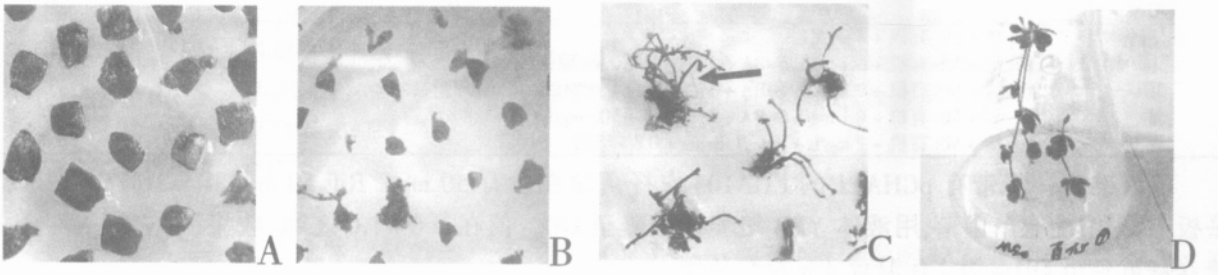


图 3 百脉根的转化过程

A, 农杆菌浸染过的外植体; B, 外植体产生不定芽; C, 除草剂筛选, 箭头表示已筛选出抗性苗; D, 转基因苗。

2.3 抗性植株的 PCR 检测

以 30 株不同抗性植株的基因组 DNA 为模板作 PCR 检测, 结果呈阳性的有 14 株, 阳性率为 46.7%。部分检测结果见图 2D。

3 讨论

在构建载体的过程中,我们采用的一目标基因替换原型载体报告基因(pCAMBIA3301 上的报告基因 GUS)的方法,是一种比较便捷的方法。此法的另一个好处是载体不至于过大,利于转化:实验表明,此载体与原型载体 pCAMBIA3301 的转化率(数据未发表)相当。

Bordas 等率先将 HAL1 基因导入甜瓜(Cucumis melo),提高了转基因植株在组培条件下的耐盐性^[4]。自 Bordas 之后,HAL1 在拟南芥、番茄、燕麦、水稻和烟草等植物中也得到了表达^[5-11],耐盐检测表明,转 HAL1 基因植株的耐盐性比野生型有不同程度地提高。本实验获得了 HAL1 转基因植株,相关的耐盐性评价正在进行中。

参考文献

- [1] Gaxiola, R., de Larrinoa, I.F., Villalba, J.M., Serrano, R. A novel and conserved salt-induced protein is an important determinant of salt tolerance in yeast. EMBO J. 1992, 11, 3157-3164.
- [2] Ramon Serrano, Francisco A. Cullianz-Macia, Vicente Moreno, Genetic engineering of salt and drought tolerance with yeast regulatory genes[J]. Scientia Horticulturae 1999 78: 261-269.
- [3] 王关林,方宏筠.植物基因工程(第二版)[M].北京:科学出版社,2002:776-777,744.
- [4] Bordas, M., Montesinos, C., Debauza, M., Salvador, A., Roig, L.A., Serrano, R., Moreno, V. Transfer of the yeast salt tolerance gene HAL1 to Cucumis melo L. cultivars and in vitro evaluation of salt tolerance[J]. Transgenic Res. 1997,6, 41-50.
- [5] Yang SX., Zhao XY, Zhang Q, He YK, Zhang H, Luo D. HAL1 mediates salt adaptation in Arabidopsis thaliana [J]. Cell Res, 2001,11 (2):142-148.
- [6] Gisbert C, Rus AM, Bolarin MC, Lopez-Coronado JM, Arrillaga I, Montesinos C, Caro M, Serrano R, Moreno V. The yeast (下转第 46 页)

3 讨 论

输卵管冲胚的胚胎回收率和胚胎质量虽然好于子宫冲胚,但输卵管冲胚易造成输卵管粘连。建议输卵管冲胚在同一供体身上每年最好只做 1 次,而利用子宫冲胚技术在同一供体身上可以重复做。

在试验中出现个别供体未受精卵多,可能与种公羊精液质量有关,所以在生产中要注意加强种公羊的早期饲养管理和配种前的调教及精液品质鉴定。

在试验中出现个别供体羊过度超排使卵巢比正常体积大 3~4 倍,造成回收卵少,这主要是与国产超排药不同批次稳定性差有关。建议在应用中要对国产超排药不同批分别做好用前小群预试,确定合适剂量后再大群使用。由于国产超排药价格明显低于进口超排药,只要通过用前小群预试确定好合适剂量,在生产中广泛使用是可行的。

在子宫冲胚中出现个别供体羊退化胚多,这主要是由于该供体羊子宫内环境差所致。建议在应用推广中要加强对供体羊的选择,对上一个繁殖季节产羔异常、出现子宫污染、产后配种难孕的母羊要剔除,不能做供体羊。

The Effect of Embryo Transfer in Te Ke Syre Meat Sheep

Wang Da-guang, LU Li-liang, WANG Xiao-yang, LANG Hong-yan, WANG Hao

(Branch of Animal Science, Academy of Agricultural Sciences of Jilin Province, Gongzhuling 136100, China)

Abstract: The synchronization of estrus of 60 Te Ke Syre donors was carried out from 2003 to 2005, among which 58 donors were in the state of synchronization of estrus. The rate of synchronization of estrus is 96.67%. The synchronization of estrus of 337 recipients was also carried out, among which 325 recipients were in the state of synchronization of estrus. The rate of synchronization of estrus is 96.44%. The super ovulation of 14 Te Ke Syre donors was carried out in 2003 and 142 yellow bodies were acquired in the ovary and 137 embryos were collected using the technique of flushing the embryos at the oviduct tube. The rate of collecting is 96.48%. There were 126 available embryos among them and all the fresh embryos were transferred into 97 recipients. The pregnancy rate is 56.7%. From 2004 to 2005, the super ovulation of 46 Te Ke Syre donors was carried out and 485 yellow bodies acquired in the ovary and 403 embryos was collected using the technique of flushing the embryos at the Womb. The rate of collecting is 83.09%. There were 327 available embryos among them, 217 fresh embryos were transferred into 186 recipients. The pregnancy rate is 54.92%. Other 110 embryos were frozen and 104 of them were transferred into 80 recipients. Among them 41 recipients were not return to the state of estrus and the pregnancy rate is 51.25%.

Key words: Te Ke Syre meat sheep; Super ovulation; Flushing embryos; Transfer

(上接第 16 页)

- HAL1 gene improves salt tolerance of transgenic tomato[J]. Plant Physiol , 2000,123 :393 - 402 .
- [7] Zhang Q,Wang SF,Zhao YX , Zhao KF ,Zhang H . Cloning of HAL1 gene and characterization for salt tolerance tomato [J]. Chin J Biotech (生物工程学报), 2001,17 : 658 - 662(in Chinese) .
- [8] 田吉林,杨玉爱,何玉科 . 转 HAL1 基因番茄的耐盐性[J] . 植物生理与分子生物学学报, Journal of Plant Physiology and Molecular Biology,2003 , 29(5) :409 - 414 .
- [9] Li Shujuan , Yang Chuanping , Liu Guifeng , Jiang Jing and Fu Chang .Transgenic Tobacco of HAL1 Gene and Its Ability of Salt Tolerance [J].Journal of Northeast Forestry University. Jul,2004 ,32(4):47- 49 .
- [10]Maqbool B , Zhong H , El-Maghraby Y, Ahmad A , Chai B ,Wang W , Sabzikar R , Sticklen B . Competence of oat shoot apical meristems for integrative transformation , inherited expression , and osmotic tolerance of transgenic lines containing HAL1 [J]. Theo A ppl Gen , 2002,105 :201- 208 .
- [11]Rohila J S , Jain GK, Wu R . Genetic improvement of Basmati rice for salt and drought tolerance by regulated expression of a barley HAL1 cDNA[J]. Plant Sci , 2002,163 (3) :525 - 532 .