

文章编号:1003-8701(2012)04-0010-02

# 玉米茎尖导入 $SAG_{12}$ 基因的初步研究

曲文利<sup>1</sup>, 孙传波<sup>1</sup>, 孟凡梅<sup>1</sup>, 陶蕊<sup>1</sup>, 郭佳<sup>1</sup>,  
李海华<sup>1</sup>, 张举仁<sup>2</sup>, 郝东云<sup>1</sup>, 袁英<sup>1\*</sup>

(1. 吉林省农业科学院生物技术研究中心, 长春 130033; 2. 山东大学生命科学学院, 济南 250100)

**摘要:** 选用玉米优良自交系郑 58 的茎尖为受体, 研究以玉米茎尖为受体进行农杆菌转化体系的可行性, 用农杆菌介导法将耐盐碱基因  $SAG_{12}$  转入玉米中, 获得 110 株转化苗, 经过 300 mg/L 的除草剂(Basta)筛选, 共获得 21 株转基因植株。进一步进行 PCR 检测, 其中 14 株表现阳性, 转化率达 12.73%。初步证明外源基因已经整合到玉米基因组中, 以玉米茎尖作为受体孢子体的转化系统可用于基因转化。

**关键词:** 玉米; 茎尖; 农杆菌介导;  $SAG_{12}$  基因

中图分类号: S513

文献标识码: A

## Transformation of $SAG_{12}$ Gene into Apical Point of Maize Plant

QU Wen-li<sup>1</sup>, SUN Chuan-bo<sup>1</sup>, MENG Fan-mei<sup>1</sup>, TAO Rui<sup>1</sup>,  
GUO Jia<sup>1</sup>, LI Hai-hua<sup>1</sup>, ZHANG Ju-ren<sup>2</sup>,  
HAO Dong-yun<sup>1</sup>, Yuan Ying<sup>1\*</sup>

(1. Center of Agro-Biotechnology, Academy of Agricultural Sciences of Jilin Province, Changchun 130033;  
2. College of Life Science, Shandong University, Jinan 250100, China)

**Abstract:** The  $SAG_{12}$  gene was transferred into the apical point of maize plant of inbred line 'Zheng 58' by Agro-bacterium tumefaciens mediated transformation to study the feasibility of this system. 21 transgenic plants were obtained after selecting with 300mg/L Basta and 14 of them were confirmed positive by PCR amplification. The frequency of transformation reached about 12.73%. The result showed that the foreign gene has integrated into maize genome and the apical point of maize plant can be used as receipt sporophyte for transformation.

**Keywords:** Maize; Apical point; Agro-bacterium tumefaciens mediated;  $SAG_{12}$

目前, 玉米遗传转化方法主要采用农杆菌介导法和基因枪法<sup>[1]</sup>, 其受体主要是幼胚和胚性愈伤组织。受体的基因型决定着遗传转化的成功与否, 而愈伤组织形成的再生植株无性系变异大、周期更长<sup>[2-3]</sup>等缺点也制约着玉米遗传转化研究的发展。因此选择合适的外植体作为玉米遗传转化的受体, 建立不受基因型限制快速、高效的遗传转化体系是转基因研究的重要环节<sup>[4]</sup>。以茎尖作为受体不受基因型的限制, 还可以免除转基因过程中的植株再生

等环节。目前在棉花<sup>[5]</sup>、水稻、高粱、小麦<sup>[6]</sup>以及玉米<sup>[7]</sup>中均有以茎尖作为遗传转化受体的报道。

$SAG_{12}$  是细胞离子平衡的一个重要调节因子,  $SAG_{12}$  的表达使细胞内部  $K^+$  水平提高,  $Na^+$  水平降低, 细胞对盐的耐受性有了显著提高<sup>[8-9]</sup>。研究表明, 利用  $SAG_{12}$  改良植物耐盐性、耐旱性是可行的<sup>[10]</sup>。本试验利用农杆菌介导法将耐盐碱基因  $SAG_{12}$  导入玉米茎尖, 提高玉米的耐盐性和耐旱性, 并研究以玉米茎尖作为遗传转化受体的可行性, 创建新的高效实用的遗传转化体系, 为基因工程改变玉米品质奠定基础。

## 1 材料与方法

收稿日期: 2012-03-19

基金项目: 吉林省科技发展项目(20076010)

作者简介: 曲文利(1971-), 女, 助理研究员, 从事玉米遗传转化研究。

通讯作者: 袁英, 女, 研究员, E-mail: yuanying2003@sohu.com

## 1.1 供试材料

### 1.1.1 植物材料

供试品种为玉米自交系郑 58 种子 120 粒,由

吉林省农业科学院玉米研究中心提供。

### 1.1.2 植物表达载体

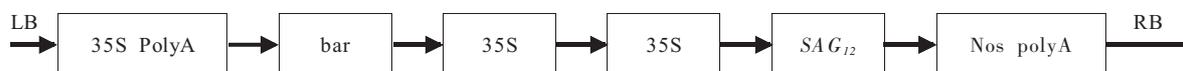


图 1 PC3301- $SAG_{12}$  载体结构简图

### 1.1.3 培养基

YEP 培养基:酵母提取物 10 g/L+蛋白胨 10 g/L+NaCl 15 g/L, pH 为 7.0。

萌发培养基:1/2MS+3%蔗糖+0.7%琼脂, pH 值为 5.8~6.0。

重悬培养基:1/2MS+AS100 $\mu$ mol/L+0.05% Silweet, pH 值为 5.2。

## 1.2 实验方法

### 1.2.1 工程菌的制备

将附有质粒 PC3301- $SAG_{12}$  的农杆菌 E-HA105 在含利福平 50 mg/L 和卡那霉素 50 mg/L 的 YEP 液体培养基中 28 $^{\circ}$ C 震荡培养,培养至对数期 ( $OD_{600}$  值大约为 0.6);8 000 r/min 离心 5 min 收集农杆菌,菌体用重悬培养基悬浮至  $OD_{600}$  值在 0.5 左右,在侵染前向重悬液中加入乙酰丁香酮(AS)100 $\mu$ mol/L 和 0.05%的表面活性剂 Silweet。

### 1.2.2 茎尖农杆菌转化

挑选整齐饱满的郑 58 种子,用 70%的乙醇浸泡 2~5 min,然后用 0.1%  $HgCl_2$  浸泡 10~15 min,再用无菌水冲洗 4 次;将灭菌种子放在无菌的三角瓶中,加适量无菌水在培养箱中 25 $^{\circ}$ C 黑暗条件下萌发;种子发芽后转到萌发培养基上继续生长,待苗长至 3~6 cm 时剥离胚芽鞘和幼叶,暴露出茎尖生长点,用手术刀轻微挫伤用于转化;将茎尖浸泡在重悬液中并置于真空干燥器中,在 50 kPa 压力下侵染 5~10 min;侵染结束后用无菌滤纸吸净种子上多余的菌液,然后放在萌发培养基上,25 $^{\circ}$ C 黑暗条件下继续培养,直至重新长出新叶。

### 1.2.3 转化苗的移栽和筛选

将长出新叶的转化苗用清水洗掉菌体后移栽到花盆中。花盆下部为土壤,上部为 6~8 cm 厚的蛭石,大约 2~3 周后转化苗长至 3 叶期,用 300 mg/L 除草剂(Basta)喷洒在叶片上进行筛选。经过筛选部分植株死亡,部分植株存活,最后将存活的植株移栽到温室中。

### 1.2.4 转化植株的 PCR 扩增

用 CTAB 法提取玉米叶片 DNA<sup>[11]</sup>,检测提取 DNA 的质量,然后进行 PCR 检测。

引物序列为 P1 :5'CAGGAACCGCAGGAGT G-GA3' ;P2:5'CCAGAAACCCACGTCATGCC3'。

PCR 反应体系为:反应总体积为 25 $\mu$ L,其中 10 $\times$  PCR Buffer 2.5 $\mu$ L, dNTP Mixture(各 2.5 m/L) 2 $\mu$ L, P1 (10 $\mu$ Mol/L)1 $\mu$ L, P2 (10 $\mu$ mol/L)1 $\mu$ L, Taq 酶 0.125 $\mu$ L, 模版 DNA0.5 $\mu$ L(10ng), ddH<sub>2</sub>O17.875  $\mu$ L, PCR 反应过程为 94 $^{\circ}$ C 预变性 5 min, 1 个循环;94 $^{\circ}$ C 变性 1 min, 55 $^{\circ}$ C 退火 50 s, 72 $^{\circ}$ C 延伸 1 min, 共 35 个循环;72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min。

## 2 结果与分析

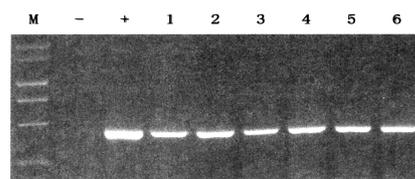
### 2.1 茎尖农杆菌转化

灭菌后的郑 58 种子 120 粒,其中萌发 116 粒。待萌发苗高长到 5 cm 左右时,在无菌工作台上剥离胚芽鞘及幼叶,暴露出茎尖生长点,用手术刀轻微挫伤用于转化;然后浸泡在含有乙酰丁香酮(AS)100 $\mu$ mol/L 和 0.05%的 Silweet 的农杆菌重悬液中( $OD_{600}$  值为 0.5),在 50kPa 压力下侵染 7 min;侵染结束后用无菌滤纸吸净种子上多余的菌液,放在萌发培养基上,25 $^{\circ}$ C 黑暗条件下继续培养,重新长出新叶,共获得 110 株转化苗。

### 2.2 转化苗的除草剂筛选

将获得 110 株转化苗用清水洗掉菌体,移栽到花盆中。2 周后长至 3 叶期,经过 300 mg/L 除草剂(Basta)筛选后,共有 21 株幼苗存活,抗性苗频率为 19.13%。

### 2.3 转基因植株的分子生物学检测



注:M为DNA分子量;-为阴性对照;  
+为阳性对照;1-6为转基因植株。

图 2 转基因植株 PCR 分析

提取抗性植株叶片的基因组(下转第 29 页)

江流域资源与环境,1998,7(3):255-259.

- [4] 史志华,蔡崇法,蔡强国,等. GIS支持下土壤侵蚀潜在危险度的分级研究[J]. 长江流域资源与环境,2002,11(2):190-193.
- [5] 熊亚兰,张科利,宁茂岐. 贵州省土壤侵蚀危险度评价[J]. 贵州农业科学,2011,39(3):122-124.
- [6] 孙希华,闫业超. 济南市土壤侵蚀潜在危险度分级及侵蚀背景的空间分析[J]. 水土保持研究,2003,10(4):80-83.
- [7] 史志华,蔡崇法,蔡强国,等. GIS支持下土壤侵蚀潜在危险度的分级研究[J]. 长江流域资源与环境,2002,11(2):190-193.
- [8] 郭志民,陈志伟,陈永宝. 应用GIS方法对土壤侵蚀潜在危险性进行评价及其时空分布特征研究[J]. 福建水土保持,1999,11(4):40-45.
- [9] 陈学史,常庆瑞,赵业婷. 陕西富县土壤侵蚀潜在危险度评价[J]. 西北农林科技大学学报(自然科学版),2011,39(8):171-177.
- [10] 冯 磊,孙保平,李锦荣,等. GIS方法和USLE模型在退耕还林区土壤侵蚀动态变化评价中的运用——以甘肃定西市安定区为例[J]. 湖南农业科学,2011(11):82-85,89.
- [11] 韩富伟,张 柏,宋开山,等. 长春市土壤侵蚀潜在危险度分级及侵蚀背景的空间分析[J]. 水土保持学报,2007,21(1):39-43.
- [12] 土壤侵蚀分类分级标准 SL190-2007(SL190-20)[S].
- [13] 闵 婕,杨 华,赵纯勇. GIS支持下的土壤侵蚀潜在危险度分级方法研究及应用[J]. 水土保持通报,2005,25(4):61-64.

(上接第11页)DNA进行PCR扩增检测,其中14株幼苗检测呈现阳性(图2),据PCR结果,该体系的转化率达12.73%。

### 3 讨 论

本实验以玉米的茎尖分生组织为受体进行遗传转化,用农杆菌介导法将SAG<sub>12</sub>基因成功转入玉米自交系郑58中,获得了14株转基因植株。以玉米茎尖为遗传转化受体,不需经过组织培养过程,为玉米的遗传转化拓宽了受体材料的类型。与传统的幼胚及其胚性愈伤组织为受体遗传转化体系相比,此方法具有简便、快速、工作效率高、实验周期短、取材不受季节限制等优点。

本实验中发现,自交系郑58的发芽率非常高,但在剥离胚芽鞘及幼叶获得玉米茎尖的过程中,有很多幼苗可能由于受到伤害较大而死亡,116株获得110株转化苗。110株转化苗经过300 mg/L除草剂筛选后获得21株抗性植株,抗性苗频率为19.1%。经过PCR分子检测后,其中14株表现为阳性,抗性植株的阳性率高达66.7%,这说明300 mg/L除草剂可以作为郑58的筛选浓度。该体系的整体转化率达到12.73%。另外,本文通过在侵染过程中采用真空压力和添加表面活性剂Silweet的方法促进农杆菌在玉米细胞上的吸附性,这些措施大大提高了转化效率。

### 参考文献:

- [1] 袁 英,李启云,刘德璞,等. 农杆菌介导的玉米遗传转化影响因子的研究[J]. 分子植物育种,2006,4(2):228-232.
- [2] Gould J H, et al. transformation of Zea mays using Agrobacterium tumefaciens and the shoot apex [J]. Plant Physiol, 1991(95): 426-434.
- [3] Ishida Y, Saito H, Ohta S, et al. High efficiency transformation of Zea mays mediated by Agrobacterium tumefaciens[J]. Nature Biotechnology, 1996(14): 745-750.
- [4] 攻 建,杨 芳. 单子叶植物表达载体的构建及农杆菌介导的玉米遗传转化的研究[J]. 生物技术,2007,17(3):2-5.
- [5] 吕素莲,尹小燕,张举仁,等. 农杆菌介导的棉花茎尖遗传转化及转betA植株的产生[J]. 高技术通讯,2004(11):20-25.
- [6] 梁欣欣,张举仁,等. 农杆菌介导法向小麦茎尖导入DREB1A基因的研究初报 [J]. 麦类作物学报,2007,27(1):16-19.
- [7] Roland B. Transient gene expression in Vegetative shoot apical meristem of wheat after ballistic microtargeting [J]. Plant J, 1993(4): 735-744.
- [8] Rios G, Ferrando A, Serrano R. Mechanisms of salt tolerance conferred by over expression of the SAG12 gene in Saccharomyces cerevisiae[J]. Yeast, 1997(13): 515-528.
- [9] Yang S X, Zhao X Y, Zhang Q, et al. HAL1 mediate salt adaptation in Arabidopsis thaliana [J]. Cell Res., 2001, 11(2): 142-148.
- [10] 田吉林,杨玉爱,何玉科. 转SAG<sub>12</sub>基因番茄的耐盐性[J]. 植物生理与分子生物学学报,2003,29(5):409-414.
- [11] 王关林,方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京:科学出版社,1998.