

文章编号 :1003-8701(2014)01-0001-05

# Na<sup>+</sup> 转运蛋白 *SKC1* 基因转化大豆的研究

于志晶 ,蔡勤安 ,刘艳芝 ,齐广勋 ,马 瑞 \* ,董英山 \*

(吉林省农业科学院农业生物技术研究所 ,长春 130033)

**摘 要 :**本研究构建了水稻 Na<sup>+</sup> 转运蛋白 *SKC1* 基因植物表达载体 pTF-*SKC1* ,标记基因为 *Bar* 基因。以子叶节为外植体 ,利用农杆菌介导法将 *SKC1* 导入大豆中。经过除草剂抗性筛选后获得的再生植株经 PCR 方法鉴定 ,转基因植株阳性率为 50% ,初步证明 *SKC1* 基因已整合到大豆基因组中。耐盐性试验结果表明 ,转基因植株的耐盐性高于对照。

**关键词 :***SKC1* 基因 ;遗传转化 ;大豆

中图分类号 :S565.101

文献标识码 :A

## Genetic Transformation of Na<sup>+</sup> Transporter Gene *SKC1* into Soybean Mediated with *Agrobacterium*

YU Zhi-jing, CAI Qin-an, LIU Yan-zhi, QI Guang-xun, MA Rui\*, DONG Ying-shan\*

(*Institute of Agricultural Bio-Technology Research, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China*)

**Abstract:** In this study the plant expression vector pTF-*SKC1*, harboring a Na<sup>+</sup> transporter gene *SKC1* which is derived from rice and a selection marker gene *bar*, was constructed. The gene was transformed into soybean mediated with *Agrobacterium tumefaciens* by using cotyledon node as explants. PPT resistant regenerated plants were identified by PCR, and the rate of positive plants was 50%. The test for salt-tolerance of the transformed plants showed that over-expressing of *SKC1* in soybean could enhance salt tolerance of the transgenic plant of soybean.

**Keywords:** *SKC1* gene; Genetic transformation; Soybean

土壤的盐渍化影响农作物生长,造成作物减产,甚至颗粒无收。目前,我国盐碱土地面积达 1 亿 hm<sup>2</sup>。在我国的现有耕地中,至少有 800 万 hm<sup>2</sup> 的土地由于不当的灌溉和施肥,导致土壤次生盐渍化,不同程度地影响了作物的产量。通过遗传改良提高作物的抗逆性是解决这一农业问题的最有效途径之一。

近年来,一些与植物耐盐相关基因陆续被克隆并用于转基因研究中,这些基因的表达不同程度地提高了转基因植物的耐盐能力。Falkenberg

等从菠菜(*Spinacia oleracea*)中克隆了 *BADH* 基因(甜菜碱脱氢酶),*BADH* 基因可增强植物的耐盐性<sup>[1]</sup>。在拟南芥(*Arabidopsis thaliana*)中表达脯氨酸脱氢酶(*PRODH*)或将 *PRODH* 敲除均能提高脯氨酸的积累水平并相应提高盐胁迫的耐受能力<sup>[2-3]</sup>。He 等获得了 *AtNHX1* 转基因棉花,转化株的光合效率大为增强,能在 200 mmol/L 的 NaCl 条件下正常生长,且提高了棉纤维的产量和质量<sup>[4]</sup>。Shi 等从拟南芥中克隆了一个 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 逆向转运蛋白基因 *SOS1*,并证明 *SOS1* 基因是 Na<sup>+</sup> 和 K<sup>+</sup> 在液泡中富集所必需的,与植物耐盐性直接相关<sup>[5]</sup>。Apes 等将一个编码液泡膜 Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> 逆向转运蛋白的基因转入拟南芥,耐盐性显著提高,可在含盐量为 200 mmol/L 的 NaCl 土壤中生长<sup>[6]</sup>。

*SKC1* 是从水稻中克隆出的一个耐盐基因,它编码的是一个 HKT 家族的离子转运蛋白(554 个

收稿日期 :2013-05-29

基金项目 :转基因生物新品种培育重大专项(2011ZX08004-002)

作者简介 :于志晶(1977-),女,助理研究员,硕士,主要从事植物分子生物学和遗传转化研究。

通讯作者 :董英山,男,研究员,博士,E-mail :ysdong@263.net

马 瑞,男,研究员,博士,E-mail :ruimaa@126.com

氨基酸),专一运输  $\text{Na}^+$ ,不参与运输  $\text{K}^+$ 、 $\text{Li}^+$  等其他阳离子。*SKC1* 主要在木质部周围的薄壁细胞中表达,它在受到盐胁迫时,根部表达量显著提高而在地上部的表达不发生变化<sup>[7]</sup>。*SKC1* 的作用机理:当植物受到盐胁迫,使大量  $\text{Na}^+$  通过木质部流液由根部向地上部运输,使大量  $\text{Na}^+$  在地上部积累,而 *SKC1* 可以主动将  $\text{Na}^+$  从木质部运出,通过其他钠离子转运蛋白,将  $\text{Na}^+$  从韧皮部重新运回根部并通过根部排出体外,从而降低地上部  $\text{Na}^+$  含量,减轻其造成的毒害;而植物体内  $\text{K}^+$  和  $\text{Na}^+$  在运输过程中存在竞争, $\text{Na}^+$  对  $\text{K}^+$  的吸收有抑制作用<sup>[8]</sup>,木质部  $\text{Na}^+$  浓度的降低,可以促进  $\text{K}^+$  运输增加,从而降低的  $\text{K}^+$  浓度可以部分恢复。因此,*SKC1* 在盐胁迫的情况下,可以调节水稻地上部分的钾/钠离子平衡,维持高钾、低钠状态,从而提高耐盐性。

本实验构建了 *SKC1* 基因植物表达载体 pTF-SKC1,并进行了大豆的遗传转化,获得了耐盐性提高的转基因大豆。本研究创制了耐盐碱转基因大豆新种质,对培育耐盐碱转基因大豆新品种具有重要的意义。

## 1 材料和方法

### 1.1 试验材料

Willimas 82。

### 1.2 植物表达载体的构建

根据 *SKC1* 基因序列设计引物(两端加上 *Xba*I 和 *Sac*I 酶切位点)并将扩增基因片段连接到用 *Xba*I 和 *Sac*I 双切的 pTF101 载体上,经 PCR

和双酶切验证,获得 *SKC1* 的植物表达载体 pTF-SKC1,其 T-DNA 结构如图 1 所示。*SKC1* 基因由中国科学院上海生命科学研究院植物生理生态研究所林鸿宣和高继平博士提供。

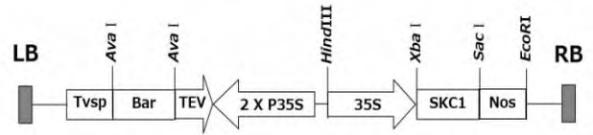


图 1 植物表达载体 pTF-SKC1 的结构示意图

### 1.3 载体 pTF-SKC1 转化农杆菌

用文献[9]介绍的冻融法将 pTF-SKC1 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'-GGC-CATCGTTGAAGATGCCTCTGC-3',下游引物:5'-TCACACGAACATCAGTAGCCTC-3',PCR 参数为:94℃ 5 min;94℃ 50 s;60℃ 45 s;72℃ 1 min 15 s;30 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。

### 1.4 菌液的制备

从新鲜的固体 YEP 平板挑取含有 pTF-SKC1 载体的根癌农杆菌 *EHA105* 单菌落,接种到含有 50 g/L 壮观霉素(Spe)和 25 g/L 利福平(Rif)浓度的 YEP 培养基上,28℃,200 r/min 震荡培养至  $\text{OD}_{600}=0.5$ ,在 4℃,4 000 r/min 离心 10 min,去除上清液,再用重悬培养基重悬  $\text{OD}_{600}=0.5$  备用。

### 1.5 农杆菌介导的大豆遗传转化

大豆品种 Willimas 82 转化体系培养基参考 Zhang 等<sup>[10]</sup>和 Paz 等<sup>[11]</sup>的方法(略有改动)。

表 1 大豆转化所需要的培养基

培养基	成分	pH
萌发培养基(GM)	B5 无机物 + B5 有机物 + 2%蔗糖 + 1mg/L 6-BA + 1.5%植物凝胶	5.8
共培养培养基(CCM)	1/10B5 无机物 + B5 有机物 + 3%蔗糖 + 20 mmol/L MES + 0.25 mg/L $\text{GA}_3$ + 1.67 mg/L 6-BA + 200 $\mu\text{mol/L}$ AS + 400 mg/L Cys + 1 mmol/L DTT + 0.5%琼脂	5.2
菌体重悬培养基(REM)	1/10B5 无机物 + B5 有机物 + 3%蔗糖 + 20 mmol/L MES + 0.25 mg/L $\text{GA}_3$ + 1.67 mg/L 6-BA + 200 $\mu\text{mol/L}$ AS + 400 mg/L Cys + 1 mmol/L DTT	5.2
不定芽诱导培养基(SIM)	B5 无机物 + B5 有机物 + 3%蔗糖 + 3 mmol/L MES + 1.67 mg/L 6-BA + 100 mg/L Cef + 250 mg/L Tic + 0.7%琼脂	5.7
不定芽伸长培养基(SEM)	MS 无机物 + B5 有机物 + 3 mmol/L MES + 3%蔗糖 + 50 mg/L 天冬氨酸 + 100 mg/L L-焦谷氨酸 + 0.1 mg/L IAA + 0.5 mg/L $\text{GA}_3$ + 1 mg/L 玉米素核苷 + 100 mg/L Cef + 250 mg/L Tic + 0.7%琼脂	5.7
生根培养基(RM)	MS 无机物 + B5 有机物 + 2%蔗糖 + 3 mmol/L MES + 1.5%植物凝胶	5.6

#### 1.5.1 种子萌发

挑选表面光滑、无病斑的成熟种子,用氯气表面消毒 24 h。将其放到超净台上吹风至种子无明显氯气味,接种于萌发培养基 GM 上,温度 23℃,黑暗培养 36 h。

#### 1.5.2 外植体制备

萌发后将种子去掉种皮,保留子叶和下胚轴,用解剖刀将 2 片子叶沿下胚轴的方向平行切开,去除腋芽,在子叶节部位划 4~5 刀。

#### 1.5.3 农杆菌的侵染及共培养

将划完刀的外植体放入装有工程菌的菌体重悬培养基(REM)中,侵染 30 min,中间不断摇晃。侵染结束后,将子叶节外植体近轴面向下,放入带有一层滤纸的共培养培养基 CCM 中,23℃黑暗培养 5 d。

#### 1.5.4 不定芽诱导

5 d 后,将外植体的子叶节和大约 2 cm 的下胚轴部分插入不定芽诱导培养基 SIM 中。14 d 后取出外植体,将下胚轴与培养基接触部分切出新的伤口,转入含有 5 mg/L 筛选剂草丁膦的芽诱导培养基中。

#### 1.5.5 不定芽的伸长

14 d 后,将外植体的子叶切掉,将下胚轴与培养基接触部分切出新的伤口,转入不定芽伸长培养基中,每 14 d 继代 1 次,直到不定芽伸长到 3~5 cm。

#### 1.5.6 生根及移栽

当不定芽伸长到 3~5 cm 时,将其从基部切下,在 0.2 mg/mL IBA 中蘸一下,转入培养基 RM 中进行生根。待根系发育完好,经炼苗后移入盆中栽培。统计浸染外植体总数和抗性再生植株总数,计算初转化效率,计算公式为:

$$\text{初转化效率}(\%) = (\text{抗性再生植株} / \text{侵染总外植体数}) \times 100\%$$

#### 1.6 转化植株的 PCR 检测

用 CTAB 法<sup>[9]</sup>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℃ 5min; 94℃ 50 s, 60℃ 50 s, 72℃ 1min 15s, 40 个循环, 72℃ 10min。PCR 产物经 1% 琼脂糖凝胶电泳后用凝胶成像仪分析。

#### 1.7 转基因大豆种子萌发期耐盐性测定

将经过 PCR 检测的 T0 代转基因大豆进行编号、收获种子。转基因大豆种子和对照种子用 50 mL NaClO<sub>3</sub>+2 mL HCl 反应生成的氯气在干燥器中进行大豆种子表面消毒 24 h 后,在铺有滤纸、加盖的培养皿中均匀播种,并利用氯化钠进行胁迫处理。处理浓度设置 4 个梯度,分别为 0、100、150 和 200 mmol/L,处理后放入 23℃ 培养箱进行黑暗培养,培养 5~7 d。每个处理的种子量均为 60 粒,各重复 3 次。7 d 后统计发芽情况,计算发芽率。

## 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 900 bp 大小的片段,初步证明 SKC1 基因已正确链接到载体 pTF101.1 上。载体经 XbaI 和 SacI 双切后,获得约 1 600 bp 的目标片段,说明该基因已正确连接,即植物表达载体 pTF-SKC1 构建成功。

### 2.2 大豆的遗传转化

大豆外植体在含 5 mg/L PPT 的培养基上筛选 4 周后,大约有 90% 诱导出丛生芽;将诱导出丛生芽的外植体放在不定芽伸长培养基中,继代 10 周后,大约有 20% 长出不定芽;当不定芽伸长到 3~5 cm 时,将其从基部切下,在 0.2 mg/mL IBA 中蘸 1~2 min 后,转入 RM 培养基中进行生根培养,生根率大约为 50%;大豆子叶节遗传转化过程如图 2。本实验一共浸染了 2000 个外植体,最后获得了 40 个 bar 试纸条检测阳性苗,转化率为 2%。图 3 为部分转基因植株 Bar 试纸条检测结果。

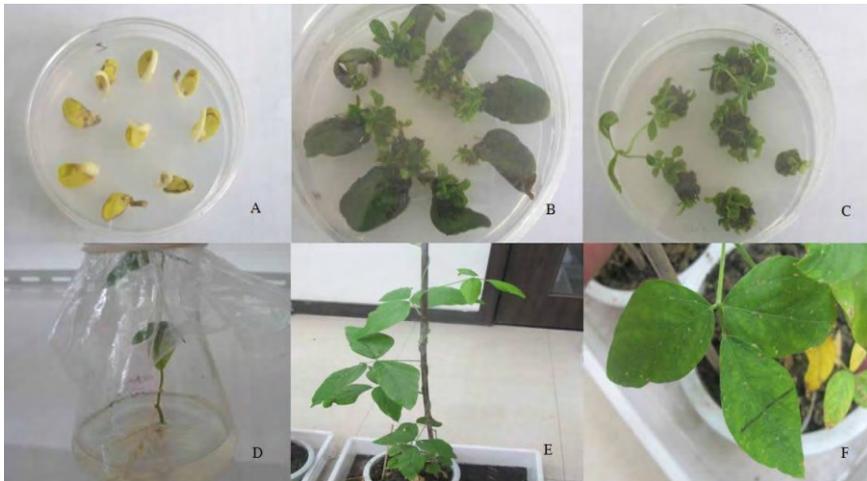


图 2 大豆子叶节遗传转化过程

(A: 共培养, B: 芽诱导, C: 芽伸长, D: 生根, E: 移栽, F: PPT 抗性筛选)

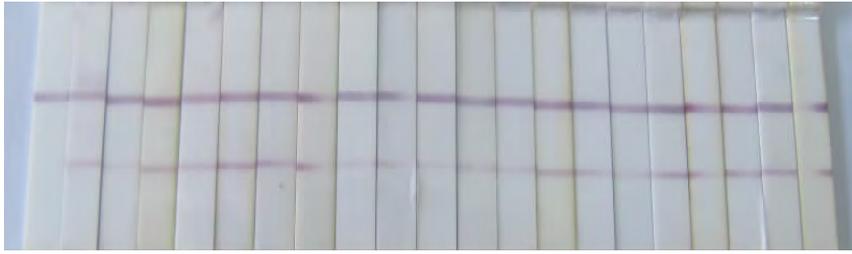


图3 Bar 试纸条检测

CK:非转基因植株, 1~20:转基因植株

### 2.3 转化植株的 PCR 检测

以引物 F:5'-GGCCATCGTTGAAGATGC-CTCTGC-3', R:5'-TCACACGAACATCAGTAGC-

CTC-3'对获得的 40 株再生大豆以及对照进行 PCR 检测,除对照外,其它转基因大豆均扩增出约 900 kb 的特异条带,如图 4 所示,初步证明

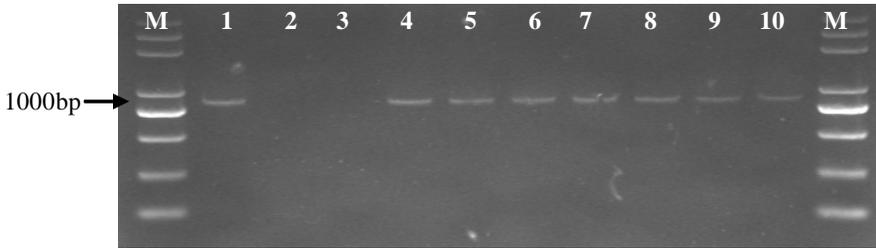


图4 转基因植株的 PCR 检测

M: Marker, 1: 质粒, 2: 水, 3: 非转基因对照, 4~10: 转基因植株

*SKC1* 基因已整合到大豆中。

### 2.4 转基因大豆的耐盐性

植物对盐害的敏感期是苗期,而发芽情况对是否成苗至关重要。因此,发芽率成为耐盐筛选的一个重要指标,发芽率高的植物耐盐性强。随着 NaCl 浓度的不断升高,对照和转基因大豆种子的发芽率逐渐降低,但相比对照而言,转基因大豆的发芽率明显提高(表 2)。在 150 mmol/L 的 NaCl 胁迫下发芽率为 38%,200 mmol/L 的 NaCl 胁迫下发芽率为 10%,而对照种子在 100 mmol/L 的 NaCl 胁迫下发芽率只有 8%。因此,转基因大豆的耐盐性极其显著地高于对照材料。

表 2 转基因大豆在盐胁迫下的发芽情况

NaCl 浓度(mmol/L)	发芽率(%)	
	非转基因植株(对照)	转基因植株
0	98	96
100	8	53
150	0	38
200	0	10

## 3 讨论

影响农杆菌介导大豆转化的 2 个重要因素是大豆基因型和外植体。Hinchee 等<sup>[12]</sup>对 100 多个大豆品种进行筛选,结果认为 Peking 对农杆菌反应最佳。Donaldson 等<sup>[13]</sup>应用了 12 个大豆品种进

行遗传转化,得到遗传稳定的转基因植株的品种只有 AC Colibri。目前,未成熟种子的子叶、子叶节、胚生长点和愈伤组织是遗传转化过程中常用的外植体<sup>[14]</sup>,2007 年 Paula 等<sup>[15]</sup>利用农杆菌 SHA17 侵染无菌苗的上胚轴,转化率可达 6.6%。Hong 等<sup>[16]</sup>对愈伤组织为转化受体的遗传转化体系进行了优化,并得到了很多遗传稳定大豆植株。2010 年 Loganathan 等<sup>[17]</sup>尝试以未成熟的大豆胚芽尖为外植体获得了成功,并获得胚状体。因此,不仅农杆菌转化的基因型对遗传转化至关重要,外植体选择方面也不可忽视。本研究采用已建立的稳定遗传转化体系的 Willimas 82 的子叶节为外植体,希望得到稳定遗传的转基因大豆植株。

在遗传转化过程中,基本技术也非常重要。在外植体的制备过程中,解剖刀应该沿 2 片子叶下胚轴方向进行平行切开,把所有顶芽去掉。为了不影响分化,子叶节有效分化部位所切伤口不宜过深。为了有效提高菌液的侵染率,在对切口进行处理的过程中,刀尖可以蘸上菌液,然后进行划切处理。

发芽期的耐盐性在某种程度上代表转化植株的耐盐程度,但在植株生长后期由于种种原因,植株的耐盐程度会有所变化。因此,需要在不同发育时期对转基因植株的耐盐性进行测定,以便全面地反映它们的耐盐水平。将在转基因植株不同发育时期研究其耐盐性。

## 参考文献：

- [1] Falkenberg P, Storm A R. Purification and characterization of osmo regulatory betaine aldehyde dehydrogenase of *E.coli* [J]. *Biochim Biophys Acta*, 1990(1034): 253-259 .
- [2] Mani S, Vandercotte B, Varmontagu M, et al. Altered levels of proline dehydrogenase cause hypersensitivity to proline and its analogs[J]. *Plant Physiol*, 2002(128): 73-83 .
- [3] Nanjo T, Fujita M, Seki M, et al. Toxicity of free proline revealed in an Arabidopsis T-DNA-tagged mutant deficient in proline dehydrogenase[J]. *Plant Cell Physiol*, 2003(44): 541-548 .
- [4] He C X, Yan J Q, Meng Q W, et al. Expression of an Arabidopsis vacuolar sodium/proton antiporter gene improves photosynthetic performance under salt conditions and increases fiber yield in the field [J]. *Plant Cell Physiol*, 2005, 46(11): 1848-1854 .
- [5] Shi H, Ishitani M. The Arabidopsis thaliana salt tolerance gene SOS1 encodes a putative Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter [J]. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97(12): 6896-6901 .
- [6] Apes M P, Aharon G S. Salt tolerance conferred by overexpression a vacuolar Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> antiporter in Arabidopsis[J]. *Science*, 1999(285): 1256-1258 .
- [7] Ren Z H, Gao J P, Li L G, et al. A rice quantitative trait locus for salt tolerance encodes a sodium transporter [J]. *Nat Genet*, 2005(37): 1141-1146 .
- [8] Epstein E. The essential role of calcium in selective cation transport by plant cells [J]. *Plant Physiol*, 1961 (36): 437-444 .
- [9] 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 .
- [10] Zhang Z Y, Xiang A Q, Staswick Q. The use of glufosinate-ammonium as a selective agent in Agrobacterium-mediated transformation of soybean [J]. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture*, 1999(56): 37-46 .
- [11] Paz M M, Martinez J C, Kalvig A B, et al. Improved cotyledonary node method using an alternative explants derived from mature seed for efficient Agrobacterium-mediated soybean transformation[J]. *Plant Cell Reports*, 2006(25): 206-213 .
- [12] Trick H N, Dinkins R D, Santarém E R, et al. Recent advances in soybean transformation [J]. *Plant Tissue Culture and Biotechnology*, 1997(3): 9-26.
- [13] Donaldson P A, Simmonds D. Susceptibility to Agrobacterium tumefaciens and cotyledonary node transformation in short season soybean[J]. *Plant Cell Reports*, 2000(19): 478-484 .
- [14] Hong H P, Zhang H Y, Olhoft P, et al. Organogenic callus as the target for plant regeneration and transformation via Agrobacterium in soybean[Glycine max L. Merrill][J]. *In Vitro Cellular & Development Biology-Plant*, 2007(43): 558-568 .
- [15] Olhoft P M, Bernal L M, Grist L B, et al. A novel Agrobacterium rhizogenes-mediated transformation method of soybean [Glycine max (L.) Merrill] using primary-node explants from seedlings[J]. *In Vitro Cellular & Developmental Biology-Plant*, 2007(43): 536-549 .
- [16] Sato S, Newell C, Kolacz K. Stable transformation via particle bombardment in two different soybean regeneration systems[J]. *Plant Cell Reports*, 1993(12): 408-413 .
- [17] Loganathan M, Maruthasalam S, Shiu L Y, et al. Regeneration of soybean[Glycine max (L.) Merrill] through direct somatic embryogenesis from the immature embryonic shoot tip [J]. *In Vitro Cell Development biology-plant*, 2010(6): 265-273 .