

甜菜碱醛脱氢酶(BADH)基因转化大豆的研究

尚丽霞¹, 蔡勤安¹, 于志晶¹, 杨向东¹, 孟凡钢^{2*}, 马瑞^{1*}

(1. 吉林省农业科学院农业生物技术研究所, 长春 130033; 2. 吉林省农业科学院大豆研究所, 长春 130033)

摘要:本研究利用农杆菌介导法将甜菜碱醛脱氢酶(BADH)基因导入大豆, 以提高大豆的耐盐性。对 132 棵转化植株进行了 PCR 检测, 获得 64 棵阳性植株, 阳性率达到 48%。对 PCR 阳性植株进一步进行 Southern 杂交分析, 证明 *BADH* 基因已经整合到大豆基因组中。

关键词:大豆; *BADH* 基因; 遗传转化

中图分类号: S565.103.53

文献标识码: A

文章编号: 1003-8701(2016)02-0035-04

Transformation of Soybean with Betaine Aldehyde Dehydrogenase (BADH) Gene

SHAN Lixia¹, CAI Qin'an¹, YU Zhijing¹, YANG Xiangdong¹, MENG Fangang^{2*}, MA Rui^{1*}

(1. *Agro - Biotechnology Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033*; 2. *Soybean Research Institute, Jilin Academy of Agricultural Sciences, Changchun 130033, China*)

Abstract: Betaine aldehyde dehydrogenase (BADH) gene was transferred into soybean by using agrobacterium in order to enhance the salt tolerance of soybean. PCR analysis for 132 transformed soybean plants showed that 64 plants were positive and the ratio of positive plant was 48%. Southern blot indicated that *BADH* gene had been integrated into the genome of soybean.

Key words: Soybean; *BADH* gene; Genetic transformation

盐碱地的存在是一个世界性问题, 盐碱地的面积占陆地总面积的 10% 左右, 不同类型的盐碱地存在于全世界的 100 多个国家。我国盐碱地面积世界排名第三, 严重影响了盐碱地区的生态环境和农业生产。东北、西北、华北及滨海地区是我国盐碱地的主要分布区, 有类型不同的盐碱地约 9913 万 hm^2 ; 土壤的盐渍化对农业生产带来了巨大影响, 发生盐渍化的耕地面积约 760 万 hm^2 ^[1-2]。由于工业的发展、海水倒灌等因素, 盐碱地存在继续扩大的趋势。对盐碱地的改良, 主要是通过物理或化学的方法, 这些方法不但成本高, 而且极易带来土壤的次生盐渍化; 所以, 种植

耐盐碱植物, 是对盐碱地改良的最经济有效的措施。大豆的耐盐能力较弱, 土壤盐渍化严重影响大豆的营养生长和生殖生长。因此, 通过转基因技术提高大豆的耐盐碱能力、培育耐盐碱大豆新品种, 不仅可以扩大耕地面积、增加粮食产量, 还可以改良生态环境, 对促进农业可持续发展具有重大意义^[3]。

甜菜碱 (betaine) 作为季铵化合物, 具有维持细胞内渗透压、保护酶活性、稳定细胞膜结构等作用, 被认为是最好的渗透调节剂。在高等植物中, 甜菜碱是由胆碱在两种关键酶 [胆碱单加氧酶、甜菜碱醛脱氢酶 (BADH)] 的催化下形成的。甜菜碱醛脱氢酶是甜菜碱合成过程中的关键酶, 这种酶在干旱和盐胁迫下活力大大增加, 从而显著提高甜菜碱的积累量^[4-5]。BADH 由单一核基因编码, 能够提高植物的抗逆能力。目前, *BADH* 基因已从甜菜^[6]、菠菜^[7]、高粱^[8]、大麦^[9]、山菠菜^[10] 等多种植物和微生物中克隆。其中, 许多 *BADH* 基因已成功导入到烟草, 转基因植株的 *BADH* 酶活性和耐盐性都显著地得到了提高^[11]。郭北海等^[12]

收稿日期: 2015-11-10

基金项目: 吉林省科技发展计划项目 (20130206005NY); 农业部转基因专项 (2014ZX0800403B-002)

作者简介: 尚丽霞 (1967-), 女, 研究实习员, 主要从事作物遗传转化研究。

通讯作者: 孟凡钢, 男, 副研究员, E-mail: mengfg2013@163.com

马瑞, 男, 研究员, E-mail: ruimaa@126.com

成功将 *BADH* 基因转入小麦,并获得了 *BADH* 基因高效表达的转化植株。郭岩等^[13]利用基因枪法将山菠菜的 *BADH* 基因成功导入水稻,获得了转化植株,转基因株系能耐浓度 0.5% 的 NaCl。经试验证明,*BADH* 基因导入植物后,植物的耐盐性获得了明显的提高。

本试验构建了 *BADH* 基因植物表达载体 pCAMBIA3300-*BADH*,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。

1 材料和方法

1.1 试验材料

供试大豆品种为 Willimas 82。

1.2 植物表达载体的构建

用在两端加上 *Bam*HI 和 *Sac*I 酶切位点的 *BADH* 基因引物扩增基因片段,并将扩增基因片段连接到用 *Bam*HI 和 *Sac*I 双酶切的 pCAMBIA3300 载体上,通过 PCR 和双酶切双重验证,获得目的基因 *BADH* 的植物表达载体 pCAMBIA3300-*BADH*,其 T-DNA 结构如图 1 所示。

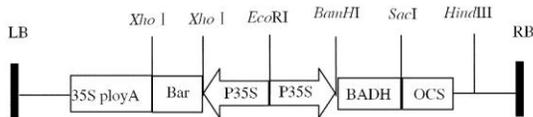


图 1 植物表达载体 pCAMBIA3300-*BADH* 的结构示意图

1.3 载体 pCAMBIA3300-*BADH* 转化农杆菌

根据文献[14]中的冻融法将 pCAMBIA3300-*BADH* 转化到农杆菌菌株 EHA105 中,转化子用 PCR 进行验证,PCR 引物为:上游引物 5'-agaatggc-gtcccaattctctgctc-3',下游引物 5'-ttcaaggagactgtac-catcccca-3',PCR 参数为:94℃ 5 min;94℃ 50 s;58℃ 45 s;72℃ 1 min;30 个循环;72℃ 10 min。PCR 产物用 1% 琼脂糖凝胶跑电泳,用凝胶成像仪照相分析。

1.4 菌液的制备

将甘油管中含有 pCAMBIA3300-*BADH* 载体的农杆菌 EHA105 接种到固体 YEP 培养基上,28℃ 培养 24~48 h,挑取单独的菌落,将其接种到液体 YEP 培养基中,液体 YEP 培养基含有 50 g/L 卡那霉素 (Kan) 和 25 g/L 利福平 (Rif),28℃,150 r/min 震荡培养至 OD₆₀₀=0.5,4℃,5 000 r/min 离心 10 min,去除上清液,再用重悬培养基重悬备用 (OD₆₀₀=0.5)。

1.5 农杆菌介导的大豆遗传转化

大豆品种 Willimas 82 转化体系参考于志晶

等^[15]的方法。

1.6 转化植株的 PCR 检测

用 CTAB 法提取抗性再生苗基因组 DNA,进行 *bar* 基因和 *BADH* 基因的 PCR 检测。*bar* 基因的引物序列是:上游引物 5'-GCACAATCGTCAAC-CACTACATCGAG-3',下游引物 5'-TGAAGTC-CAGCTGCCAGAAACCCAC-3'。PCR 参数为:94℃ 5 min;94℃ 50 s,57℃ 45 s,72℃ 1 min,30 个循环,72℃ 10 min;*BADH* 基因 PCR 引物同上,PCR 参数为:94℃ 5 min;94℃ 50 s,58℃ 50 s,72℃ 1 min,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。

1.7 转化植株的 southern 杂交

选择 PCR 阳性株进行 Southern 杂交,用 CTAB 法大量提取基因组 DNA,用量为 40 μg。杂交探针的制备:以上述的目的基因 *BADH* 引物,以 pCAMBIA3300-*BADH* 质粒作模板进行 PCR 扩增,用回收的 PCR 产物做 Southern 杂交的探针。Southern 杂交采用罗氏公司生产的地高辛试剂盒,具体操作过程根据试剂盒使用说明书进行,限制性内切酶用的是 *Hind* III。

2 试验结果

2.1 载体构建

用连接后的载体为模板进行 PCR 扩增,获得大约 900 bp 大小的片段,初步证明目的基因 *BADH* 已正确连接到植物表达载体 pCAMBIA3300 上。用 *Bam*HI 和 *Sac*I 双酶切载体,得到大约 1 600 bp 的目标片段,说明该基因已正确连接到植物表达载体 pCAMBIA3300 上,即植物表达载体 pCAMBIA3300-*BADH* 构建成功。

2.2 大豆的遗传转化

本试验共侵染了 1 800 个外植体(子叶节),外植体用 5 mg/L PPT 进行了筛选,丛生芽诱导率大约是 90%,不定芽伸长率大约是 30%,生根率大约是 70%,转化率为 3.6%。大豆子叶节遗传转化过程如图 2。本试验最终获得了 64 个 *bar* 试纸条检测阳性苗,图 3 为部分转基因植株 *bar* 试纸条检测结果。

2.3 转化植株的分子检测

2.3.1 转基因植株的 PCR 检测

以 *bar* 基因和 *BADH* 基因的引物对获得的再生植株进行 PCR 检测,除阴性对照外,其他转基因大豆均扩增出约 500 bp (*bar* 基因)和 900 bp (*BADH* 基因)的特异条带,如图 4 和图 5 所示,初

步证明目的基因 *BADH* 已整合到大豆基因组中。

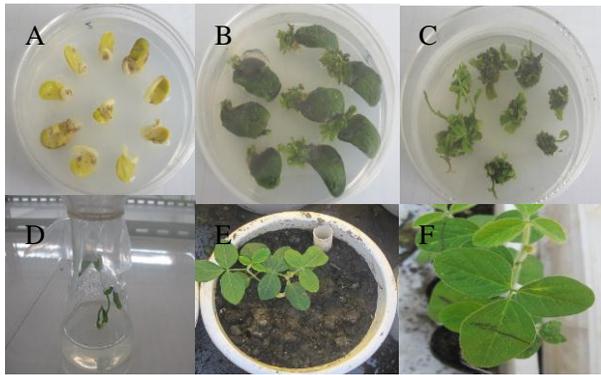


图2 大豆子叶节遗传转化过程
A: 共培养, B: 芽诱导, C: 芽伸长, D: 生根,
E: 移栽, F: PPT 抗性植株筛选

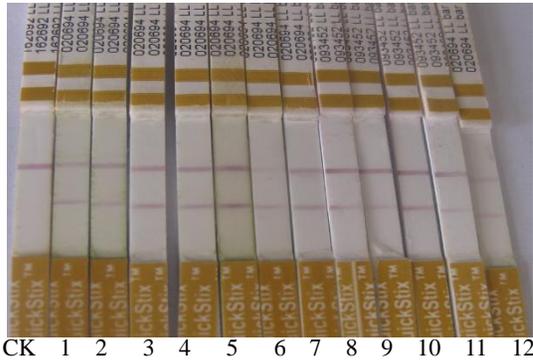


图3 转化植株 bar 试纸条检测
CK: 非转基因植株, 1 ~ 12: 转基因植株

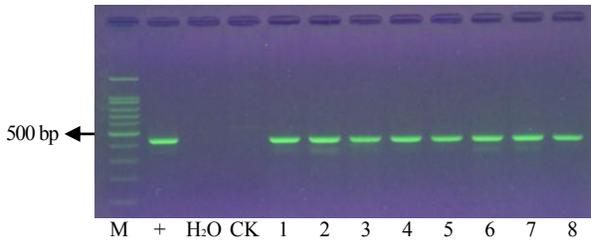


图4 转基因植株 *bar* 基因 PCR
M: 100 bp marker, +: 质粒, H₂O: 水对照, CK : 未转基因材料,
1 ~ 8: 转基因材料

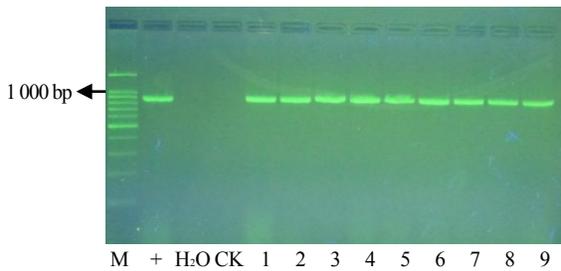


图5 *BADH* 转基因植株 PCR
M: 1000 bp marker, +: 质粒, H₂O: 水对照, CK : 未转基因材料,
1 ~ 9: 转基因材料

2.3.2 转基因植株的 southern 杂交检测

选择 PCR 阳性植株的其中 4 株进行 Southern blot 分析, 结果显示, 单拷贝植株 1 株, 2 个拷贝植株 3 株(图 6), 证明目的基因 *BADH* 已整合到转化受体的染色体组中, 且以低拷贝整合为主。

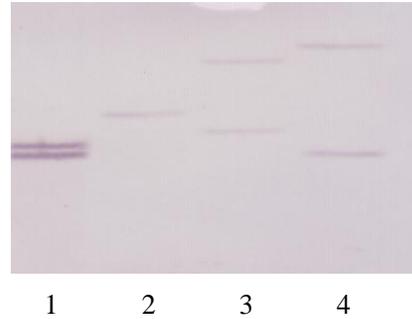


图6 *BADH* 转基因植株 southern 杂交结果
1 ~ 4: 转化植株

3 讨论

在逆境条件下, 如盐碱和干旱, 植物体内可积累大量的甜菜碱^[4]。甜菜碱的主要作用是改善渗透调节和保护细胞膜。目前已从许多植物中克隆出 *BADH* 基因, 例如菠菜^[6]、甜菜^[6], 并将该基因转入多种植物, 提高了转基因植物的耐盐性。付光明等^[17]利用花粉管通道技术将 *BADH* 转入玉米, 对转基因玉米叶片进行了叶绿素和电导率的测定, 结果表明在同样的盐胁迫条件下, 转基因植株所受到的盐伤害明显较对照植株轻, 说明转入的 *BADH* 基因可以提高玉米的耐盐能力。张正国等^[18]利用农杆菌介导法将 *BADH* 基因转入马铃薯, 生理检测表明植株在 0.7% NaCl 浓度下耐盐性相对较高。本研究以大豆品种 Willimas 82 为受体, 转化了 *BADH* 基因, 获得了 4 个转基因株系, 通过对转基因株系的初步耐盐检测, 耐盐能力均比对照高, 相关数据正在整理中。

转基因作物的遗传稳定性在转基因品种选育过程中至关重要。有研究发现, 在转基因品种选育过程中, 被转化的目的基因在其遗传和表达上都存在着不稳定现象, 整合到植物基因组上的外源基因不表达或表达弱甚至丢失。本试验只做了 PCR 和 Southern blot 检测, 并未进行 Northern 和 Western 杂交分析, 因此, 我们需要对后代转基因植株进行深入研究, 并进行田间生物学鉴定, 直至获得纯合稳定的转基因株系。

参考文献:

- [1] 戚志强,玉永雄,胡跃高,等.当前我国苜蓿产业发展的形势与任务[J].草业学报,2008,17(1):107-113.
- [2] 王晓娟,孙月华,杨晓莉,等.苜蓿遗传图谱构建及其应用[J].草业学报,2008,17(3):119-127.
- [3] 余叔文,汤章城.植物生理与分子生物学(第二版)[M].北京:科学出版社,1998:1-853.
- [4] Hanson A D,May A M ,Grumet R, et al. Betaine synthesis in chenopods :Localization in chloroplasts[J].Proc Natl Acad Sci U S A, 1985(82): 3678-3682.
- [5] Arakaw A K,Takabe T,Sugiyama T,et al .Purification of betaine aldehydedehy drogenase from spinach leaves and preparation of its antibody[J].Japanese Biochemical Society,1987(101): 1485-1488.
- [6] McCue K F, Hanson A D. Salt inducible betaine aldehyde dehydrogenase from sugar beet: cDNA cloning and expression[J]. Plant Mol Biol,1992(18): 1-11.
- [7] 贾秀玲,马瑞昆,刘书贞,等.冬小麦气孔与非气孔失水特性的基因型差异研究[J].河北农业大学学报,1995,18(2): 46-51.
- [8] Wood A J, Saneoka H, Rhodes D, et al. Betaine aldehyde dehydrogenase in sorghum[J].Plant Physiology,1996(110): 1301-1308.
- [9] Ishitani M, Nakamura M, Han S Y, et al. Expression of the betaine aldehyde dehydrogenase gene in barley in response to osmotic stress and abscisic acid [J].Plant Mol Biol, 1995(27): 307-315.
- [10] 肖 岗,张耕耘,刘风华,等.山菠菜甜菜碱醛脱氢酶基因研究[J].科学通报,1995,40(8):741-745.
- [11] Holmstrom K O, Welin B, Mandal A, et al. Production of the Escherichia coli betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme required for the synthesis of the osmoprotectant glycine betaine in transgenic plants[J]. Plant Journal, 1994(6): 749-758.
- [12] 郭北海,张艳敏,李洪杰,等.甜菜碱醛脱氢酶(BADH)基因转化小麦及其表达[J].植物学报,2000,42(3):279-283.
- [13] 郭 岩,张 莉,肖 岗,等.转甜菜碱醛脱氢酶基因在水稻中表达及转基因植株的耐盐性研究[J].中国科学,1997,27(2):151-155.
- [14] 王关林,方宏筠.植物基因工程(第二版)[M].北京:科学出版社,2002:1-908.
- [15] 于志晶,蔡勤安,刘艳芝,等.拟南芥抗逆基因 *DREB2A* 转化大豆的研究[J].大豆科学,2013,32(5):606-608.
- [16] Weretilnyk E A, Hanson A D. Molecular cloning of a plant betaine-aldehyde dehydrogenase, an enzyme implicated in adaptation to salinity and drought[J].Proc Nat l Acad Sci USA, 1990(87): 2745-2749.
- [17] 付光明,苏 乔,吴 畏,等.转 *BADH* 基因玉米的获得及其耐盐性[J].辽宁师范大学学报(自然科学版),2006,29(3): 344-347.
- [18] 张正国,张丽莉,卢翠华,等.农杆菌介导 *BADH* 耐盐基因转化马铃薯的研究[J].作物杂志,2012(3):28-31.

(责任编辑:范杰英)