

# 根癌农杆菌介导的萝卜遗传转化方法研究

喻晓敏<sup>1</sup>, 吴雷<sup>2</sup>, 王魁<sup>3</sup>, 李世升<sup>2</sup>, 徐漫<sup>2</sup>

(1. 黄冈师范学院 黄冈师范学院学报编辑部, 湖北 黄冈 438000; 2. 黄冈师范学院 湖北省经济林木种质改良重点实验室, 大别山特色资源协同创新中心, 生命科学学院, 湖北 黄冈 438000; 3. 华中农业大学 园艺林学学院, 湖北 武汉 430070)

**摘要:**以“短叶-13”萝卜为试材, 采用浸花法, 使用含有绿色荧光蛋白(GFP)报告基因的根癌农杆菌浸泡生长状态良好的萝卜花序, 研究了农杆菌介导萝卜遗传转化的新方法。结果表明: GFP蛋白能够在萝卜幼根中成功表达。

**关键词:**转基因; 根癌农杆菌; 萝卜; 浸花法

**中图分类号:**S 631.103.6 **文献标识码:**A **文章编号:**1001-0009(2016)06-0099-04

萝卜(*Raphanus sativus* L.)属十字花科(Brassicaceae)萝卜属一年或两年生草本植物, 是油菜的近缘物种。萝卜在世界范围内广泛种植, 且有着十分悠久的种植历史。在长期的进化、栽培及选育过程中, 萝卜品种越发丰富, 在根形、根色、叶形、叶色及风味、收获期和抽苔期等方面表现各有差异。近年来有关萝卜的新型用途也渐渐呈现, 如叶用萝卜、食荚萝卜及油用萝卜等。随着萝卜用途的扩大, 萝卜在人们日常生活中显得日益重要的同时, 也逐渐成为众多学者开展科学研究的重要对象。萝卜的生长发育规律在个体、细胞及分子等多方面、多层次不断得到揭示。随着测序技术的飞速发展<sup>[1]</sup>, 许多物种基因测序工作正在进行, 像蕃茄、黄瓜、大

白菜及大豆等全基因组测序已完成。萝卜测序工作正在开展, 部分测序结果也被陆续公布。例如包含萝卜部分基因信息的数据库已由美国康奈尔大学开发建成, 该库(<http://bioinfo.bti.cornell.edu/radish>)包含大量基因序列信息, 主要有萝卜线粒体全基因组序列、表达序标签(EST)、单基因序列及其功能提示、生物化学信号通路及单核苷酸多样性(SNP)、简单序列重复标记(SSR)和遗传图谱等重要信息。另外, 日本学者也为日本萝卜(Daikon)建立了含有26 606个EST的小型数据库, 这些EST可拼接成10 381个unigene<sup>[2]</sup>。最近, 日本学者公布了萝卜全基因组序列<sup>[3]</sup>, 为深入分析萝卜基因功能以及进一步改良萝卜种质资源提供了极大便利。

为了能更快捷且有针对性的改良萝卜种子、根形及其它重要性状, 将拟南芥已十分成熟的浸花转基因法在萝卜中作了尝试。萝卜遗传体系的建立, 一方面为解读萝卜基因的功能提供方便, 另一方面可极大促进萝卜种质改良及育种水平, 进而为社会经济发展服务。该研究报导了农杆菌成功介导的萝卜遗传转化新方法, 利用绿色荧光蛋白(green fluorescent protein, GFP)及卡那霉

**第一作者简介:**喻晓敏(1984-), 女, 硕士, 编辑, 现主要从事植物生物技术及出版学等研究工作。E-mail:21581872@qq.com.

**责任作者:**李世升(1983-), 男, 博士, 讲师, 现主要从事作物发育与育种等研究工作。E-mail:lishisheng2002@whu.edu.cn.

**基金项目:**湖北省自然科学基金资助项目(2013CFC126); 湖北省教育厅自然科学基金资助项目(D20122703)。

**收稿日期:**2015-12-23

LaSPS protein. The results indicated that the ORF of *LaSPS* gene was 1 269 bp (GenBank accession number KT318734), which encoded a protein of 422 amino acid residues. The *LaSPS* protein which contained solanesyl diphosphate synthase domain was the member of 'polyprenyl diphosphate synthase' family. Bioinformatic analysis indicated that *LaSPS* protein which located in chloroplast had no transmembrane domain and signal peptide. The multiple alignment and phylogenetic analysis indicated that *LaSPS* protein showed the highest homology, 91% similarity, with *AtSPS2* protein from *Arabidopsis thaliana*. The prokaryotic expression vector pET-32a-*LaSPS* was constructed and the recombinant *LaSPS* protein was successfully expressed in *E. coli* BL21 (DE3) cells. This study provided the foundation for follow-up research of its function in plastoquinone biosynthesis pathway.

**Keywords:** *Lepidium apetalum*; solanesyl diphosphate synthase; gene cloning; sequence analysis; prokaryotic expression

素(kanamycin)作为选择标签,通过初步的卡那霉素筛选、抗性苗 GFP 片段扩增及 GFP 荧光观察,结果证明外源基因已成功转入萝卜植株体内。

## 1 材料与方法

### 1.1 试验材料

供试“短叶-13”萝卜(*Raphanus sativus* L.)购自武汉大东门种子市场。

根癌农杆菌 GV3101(*Agrobacterium tumefaciens*),质粒 pCambia1301 及含有绿色荧光蛋白基因的质粒,均购自东盛生物公司。

### 1.2 试验方法

**1.2.1 载体的构建** PCR 扩增 psmGFP 中的 GFP 基因片段, BamH I 和 Sac I 双酶切 PCR 产物,同时用 BamH I 和 Sac I 双酶切 pCambia1301。从琼脂糖凝胶中回收纯化 pCambia1301 的大片段,经连接、转化、鉴定,得到重组质粒 pCambia13012GFP。在 A t5g62390 和 A t3g51780 的正、反向引物的 5' 端分别加上 Sac I 酶切位点。Sac I 分别酶切 At5g62390 和 At3g51780 的 PCR 片段。同时用 Sac I 酶切重组质粒 pCambia13012GFP。经连接、转化、鉴定出改造后的质粒分别称 pCambia13012GFP262390 和 pCambia13012GFP251780。

**1.2.2 新载体导入农杆菌** 制备农杆菌感受态细胞,在感受态细胞中加入重组质粒,轻轻混匀,冰浴 30 min,液氮速冻 1 min,迅速移至 37℃ 融化,加入 1 mL LB 液体培养基,28℃ 轻摇培养 4 h。6 000 r/min 离心 2 min,去上清液,重悬菌体后涂布于含 25 mg/L 链霉素和 50 mg/L 卡那霉素的 LB 固体培养基上,28℃ 倒置培养 2 d。挑取单菌落,接种到液体 LB 培养基中,28℃、230 r/min 培养 48 h,菌液用于保存或转化<sup>[4]</sup>。

**1.2.3 根癌农杆菌的培养与浸花** 在浸花处理前 1 d 取适量的根癌农杆菌(含有 GFP 基因)于 50 mL 的 YM 液体培养基中,以 28℃、250 r/min 震荡培养 24 h。收集处于对数生长期的菌,以 4℃、8 000 r/min 离心 8 min,去上清,取菌体在液体 MS 培养基重悬(图 1),同时加入一定量的表面活性剂 silwet-77,使之最终浓度达到 0.02%,然后对萝卜花序进行浸花处理(图 2)。

**1.2.4 种子收集与培养** 待萝卜角果成熟后,收集未经处理的成熟角果,将角果浸泡在 75% 的酒精中灭菌 30 min。在净化工作台的无菌环境下,将胚珠剥离接种到分别含有 0、100、500、1 000 mg/L kana 的 MS 培养基上。将胚珠培养在生长室中,设置光照 14 h、25℃;黑暗 10 h、8℃。约 2 周后观察胚珠的萌发状况。结果显示,未经处理的萝卜胚珠在 0、100、500 mg/L kana 的 MS 培养基上均有萌发,在 1 000 mg/L kana 的 MS 培养基上未萌发。用含 1 000 mg/L kana 的 MS 培养基进行转基因的抗性苗筛选,分别接种非转基因胚珠和转基因胚珠



图 1 重悬后的菌液

Fig. 1 The resuspended bacteria



图 2 花蕾的浸花处理

Fig. 2 Dipping the flower buds

至观察其萌发状况。

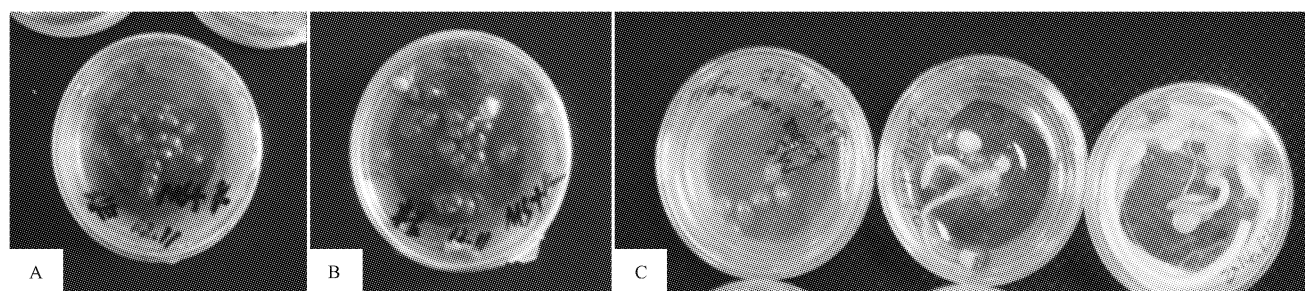
**1.2.5 萝卜胚珠 DNA 的提取** 提取萌发后的转基因萝卜胚珠的 DNA 样本 5 个以及非转基因的野生型萝卜胚珠 DNA 样本 1 个,共 6 个样本。以下为 DNA 提取的简易方法:①取接种后萌发的胚珠子叶 2 片分别放入 6 个 1.5 mL 的离心管中,向离心管中各加入 400  $\mu$ L DNA 提取液(extraction buffer),研碎样品。②待样品研磨充分后,将离心管放入离心机,12 000 r/min 离心 6 min。③离心后,分别取 6 个样品的上清液各 300  $\mu$ L,转移到另外 6 个洁净的离心管中,向其中各加入 100  $\mu$ L 氯仿,摇匀后放入离心机,以 12 000 r/min 的速度离心 12 min。重复步骤③1 次。④离心后,分别取 6 个样品的上清液 200  $\mu$ L,转移到另外 6 个洁净的离心管中,向其中各加入 200  $\mu$ L 的异丙醇,摇匀后放入离心机,12 000 r/min 离心 5 min。⑤离心后去上清液,向 6 个离心管中各加入 300  $\mu$ L 的酒精清洗沉淀,洗净后沥干加入 50  $\mu$ L 的蒸馏水溶解沉淀,得到 6 个样品的 DNA 溶液。

**1.2.6 PCR 扩增** 以提取的 DNA 样品以及质粒 pCambia1301 为模板,进行 PCR 扩增。PCR 体系如下(10  $\mu$ L):Taq DNA 聚合酶 0.2  $\mu$ L、模板 0.5  $\mu$ L、Mg<sup>2+</sup> 0.5  $\mu$ L、引物各 0.5  $\mu$ L、dNTP 1  $\mu$ L、缓冲液 1  $\mu$ L、H<sub>2</sub>O 5.8  $\mu$ L。PCR 反应条件如下:98℃ 2 min;然后 95℃ 30 s;



58℃ 30 s;72℃ 30 s 共进行 35 个循环,最后在 72℃ 延伸 10 min,完成后保存于 4℃ 环境中。产物进行琼脂糖凝胶电泳检测。

1.2.7 绿色荧光蛋白的表达 该试验转入的外源基因为绿色荧光蛋白报告基因,其基因所产生的蛋白质在蓝色波长范围的光线激发下,会发出绿色荧光。利用 Olympus IX 51 荧光显微镜观测萝卜幼根在蓝光激发下的荧光信号。



注:A,非转基因胚珠;B,转基因胚珠;C,胚珠在 MS 培养基(含 1 000 mg/L kana)上的连续生长 1 周状况调查。

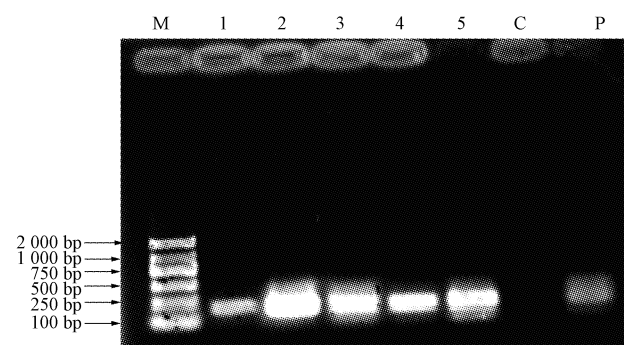
Note: A, Non-transgenic ovule; B, Transgenic ovule; C, The continued observation of ovule growth on MS medium with 1 000 mg/L kana.

图 3 胚珠的抗性筛选

Fig. 3 The selection of ovule with resistance to kanamycin

## 2.2 抗性苗的 PCR 检测

以构建含 *GFP* 基因的 pCambia1301 质粒为阳性对照,以未转化的野生型萝卜胚珠的 DNA 为阴性对照,琼脂糖凝胶电泳结果如图 4 所示,转基因型的 5 个株系与阳性对照均出现 *GFP* 目标片段大小一致的条带;阴性对照未扩增出对应的基因片段。这说明通过浸花处理,已成功将 *GFP* 基因导入萝卜植株。



注:M,分子质量标准;1~5,转基因型;C,阴性对照;P,阳性对照。

Note: M, Molecular weight standard; 1-5, Turn genotype; C, Negative control; P, Positive control.

图 4 报告基因 *GFP* 的 PCR 扩增结果

Fig. 4 PCR amplification results of reporter gene *GFP*

## 2.3 绿色荧光蛋白基因的蛋白表达水平检测

从图 4 可以看出,转基因型的 PCR 扩增条带与质粒的 *GFP* 序列条带一致,且亮度更高。这不排除

## 2 结果与分析

### 2.1 萝卜胚珠卡那霉素抗性的筛选

试验结果表明,含 1 000 mg/L kana 的培养基能有效抑制非转化萝卜胚珠的萌发。用含 1 000 mg/L kana 的 MS 培养基培养转化后的萝卜胚珠能正常萌发。表明转化的萝卜胚珠已具有卡那霉素抗性,质粒 pCambia1301 已成功导入萝卜胚珠中(图 3)。

由于引物太短、样品间交叉污染、PCR 试剂的污染等原因造成的假阳性。所以,根据绿色荧光蛋白的特点,对绿色荧光蛋白基因的表达水平检测。通过显微镜观察转基因型与非转基因萝卜胚珠萌发后的幼根。结果显示,在转基因型的幼根上可以观察到绿色荧光(图 5),而非转基因型则观察不到荧光信号(图 6)。这说明 *GFP* 基因成功转入萝卜植株,并成功表达。

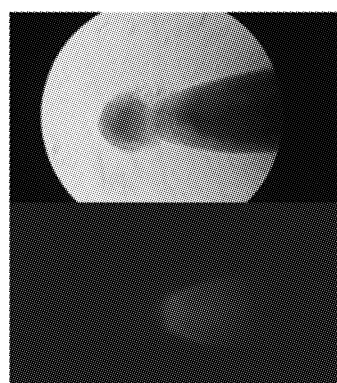


图 5 转基因型蛋白表达水平检测

Fig. 5 The protein expression levels detection of turn genotype

## 3 讨论与结论

### 3.1 受体系统的选择

常用的农杆菌介导的受体有原生质体、愈伤组织

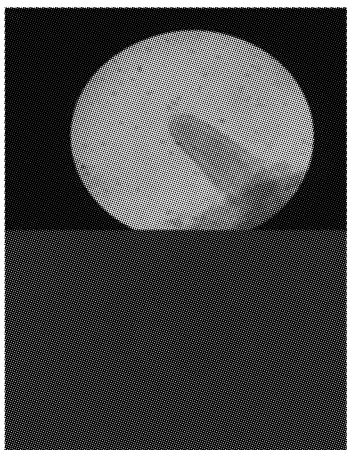


图 6 非转基因型蛋白表达水平检测

Fig. 6 The protein expression levels detection of non-transgenic genotype

等,如叶盘法转化中,通过叶圆片或下胚轴切段、胚性愈伤组织与农杆菌共培养,完成基因转化。在原生质体与农杆菌共培养法,则是以原生质体为受体。以上 2 种转化方法,均需要进行组织培养,操作较复杂,且原生质的培养需要较高的技术要求。浸花法结合了整株感染法的优势,无需组织培养,且操作简单,但是有时间限制。以性细胞为受体,卵细胞在受精后,其细胞质活跃的生理状态为农杆菌转化提供了良好的时机。

### 3.2 报告基因的选择

该试验是为了探索农杆菌介导的新方法,研究通过浸花处理,能否使农杆菌成功地 will 将外源基因导入萝卜植株。选择 *GFP* 作为报告基因,是为了结合胚珠的表型检测,通过分子水平检测以及其后的蛋白表达水平检测,为试验结果提供更有利科学依据。同时作为几种常用的报告基因之一,*GFP* 有着相对分子质量小、对活细胞无害、荧光稳定、容易检测等优点<sup>[6]</sup>。

### 3.3 PCR 检测与蛋白表达水平检测

PCR 检测作为转基因植株的初步筛选方法,优点是快速大量检测。但是,PCR 反应十分敏感,且 PCR 体系的每一种试剂都有可能在试验操作过程中被污染,这些导致检测结果容易出现假阳性。但是作为探究试验,此次并未导入其它目的基因,所以没有进行 Southern 杂交、Northern 杂交以及 Western 杂交等后续的分子检测,而是通过 *GFP* 基因的蛋白表达水平检测进行进一步的证明。在蓝光照射下,转基因萝卜幼根有明显的绿色荧光,但是发光较弱。所以这种检测方法存在的缺点是,如果没有足够的 *GFP* 转录本,就会导致荧光现象不明显,从而检测不出来<sup>[6]</sup>。

### 参考文献

- [1] RAZ T, KAPRANOV P, LIPSON D, et al. Protocol dependence of sequencing based gene expression measurements[J]. PLoS One, 2011, 6(5): e19287. doi:10.1371/journal.pone.0019287.
- [2] SHIRASAWA K, OYAMA M, HIRAKAWA H, et al. An EST-SSR linkagemap of *Raphanus sativus* and comparative genomics of the Brassicaceae[J]. DNA Res, 2011, 18(4): 221-232.
- [3] KITASHIBA H, LI F, HIRAKAWA H, et al. Draft sequences of the radish (*Raphanus sativus* L.) genome[J]. DNA Res, 2014, 21(5): 481-490.
- [4] 邓丽, 刘红, 杨万年. 含绿色荧光蛋白(GFP)基因的植物重组表达载体 pCambia13012GFP262390 和 pCambia13012GFP251780 的构建[J]. 安徽农业科学, 2008, 36(26): 11251-11252.
- [2] 董春林, 张明义, 林忠平, 等. 用花粉管通道法将抗旱耐盐基因导入玉米自交系的研究[J]. 山西农业科学, 2011, 39(5): 392-394.
- [3] 李卫, 郭光沁, 郑国锴. 根癌农杆菌介导遗传转化研究若干新进展[J]. 科学通报, 2000, 45(8): 798-807.
- [4] 刘卫东. 植物转基因技术及安全性研究进展[J]. 南京农专学报, 2002, 18(1): 6-12.
- [5] 杨宇, 李江江, 王项, 等. 报告基因及其研究进展[J]. 生命科学研究, 2011, 15(3): 277-282.
- [6] 杨明瑜, 刘翔, 褚华硕, 等. 利用绿色荧光蛋白 GFP 作为报告基因检测转基因植物[J]. 食品与生物技术学报, 2008, 27(2): 98-102.

## Study on Genetic Transformation in Radish by *Agrobacterium tumefaciens*

YU Xiaomin<sup>1</sup>, WU Lei<sup>2</sup>, WANG Kui<sup>3</sup>, LI Shisheng<sup>2</sup>, XU Man<sup>2</sup>

(1. Journal of Huanggang Normal University, Huanggang Normal University, Huanggang, Hubei 438000; 2. Key Laboratories of Economic Forest Germplasm Improvement and Comprehensive Resources Utilization of Hubei Province/Hubei Collaborative Innovation Center for the Characteristic Resources Exploitation Dabie Mountains/College of Life Science, Huanggang Normal University, Huanggang, Hubei 438000; 3. College of Horticulture and Forestry Sciences, Huazhong Agricultural University, Wuhan, Hubei 430070)

**Abstract:** Taking radish 'Short leaf-13' as material, using dipping flower method, a new method of *Agrobacterium tumefaciens* for genetic transformation in radish (*Raphanus sativus* L.) were researched. The results showed that GFP could successfully be expressed in the root of radish.

**Keywords:** transgenic; *Agrobacterium tumefaciens*; radish; floral dip method