

## 利用基因枪法将 *Tagsk1* 基因导入敏盐小麦成熟胚愈伤组织提高其耐盐性的研究

# Introduce *Tagsk1* into Salt-sensitive Callus to Improve the Capacity of Salt-tolerance by Microparticle Bombardment

徐 涛<sup>†</sup>, 赵宝存<sup>†</sup>, 葛荣朝, 沈银柱, 黄占景\*

XU Tao<sup>†</sup>, ZHAO Bao-Cun<sup>†</sup>, GE Rong-Chao, SHEN Yin-Zhu and HUANG Zhan-Jing\*

河北师范大学生命科学学院, 石家庄 050016

The College of Biology, Hebei Normal University, Shijiazhuang 050016, China

**摘 要** 以 *Tagsk1*(*Triticum aestivum* L. glycogen synthase kinase 1) 基因的 cDNA 的碱基序列为基础, 设计特异引物由小麦耐盐突变体 RH8706-49 基因组 DNA 进行扩增后, 得到来自于基因组的 *Tagsk1* 基因。采用基因枪法, 利用携带该基因的双元表达载体 pBII21-gsk1 转化敏盐小麦 H8706-34 和中国春的成熟胚愈伤组织, 经 Kanamycin 和 0.5% NaCl 筛选获得耐盐愈伤组织。这些被转化的愈伤组织表现出较高的耐盐性, 并且能够在含盐培养基上进一步分化出根和芽。

**关键词** 基因枪, 转化, 小麦, 成熟胚愈伤组织, *Tagsk1*

中图分类号 S562 文献标识码 A 文章编号 1000-3061(2006)02-0211-04

**Abstract** The *Tagsk1*(*Triticum aestivum* L. glycogen synthase kinase 1) gene derived from the genome of wheat salt-tolerance mutant RH8706-49 was cloned by PCR. The special primers designed according to full length cDNA sequence of *Tagsk1* (AF525086). A binary expression vector pBII21-gsk1 containing *Gus* and *Tagsk1* was constructed. And pBII21-gsk1 was introduced into the callus induced from mature embryos of salt-sensitive wheat H8706-34 and cv. China Spring by particle bombardment. The transformed callus were screened by Kanamycin and 0.5% NaCl. The salt-tolerance callus were obtained, which showed higher ability of salt-tolerance and could differentiate roots and buds on the medium containing 0.5% NaCl.

**Key words** microparticle bombardment, transformation, common wheat, callus of mature embryos, *Tagsk1*

蛋白激酶是植物信号转导通路中的重要分子, 参与了植物生长发育的许多过程<sup>[1,2]</sup>。大量研究表明蛋白激酶广泛参与了植物对干旱、盐胁迫、ABA 诱导及光诱导等的应答反应, 主要负责应激蛋白的蛋白磷酸化过程, 而蛋白磷酸化是生物体中普遍存在的一种调节机制<sup>[3-7]</sup>。我室采用 cDNA-AFLP 技

术, 从小麦耐盐突变体 RH8706-49 盐胁迫下的 cDNA 中获得了糖原合成酶激酶基因 *Tagsk1*(*Triticum aestivum* L. glycogen synthase kinase 1)<sup>[8,9]</sup>, 该蛋白属于 Ser/Thr 家族类蛋白激酶<sup>[8]</sup>, 这一基因已被 GenBank 接受 (AF525086)。Ser/Thr 类蛋白激酶是一个很大的家族, 其参与许多抗逆信号传导, 例如: 在盐胁迫

Received: October 11, 2005; Accepted: December 7, 2005.

<sup>†</sup> They are co-first authors.

This work was supported by two grants from the National Natural Sciences Foundation of China (No. 2004JYA01 & No. 30070471) and two grants from the Nature Sciences Foundation of Hebei Province (No. 301103, No. 2005000164).

\* Corresponding author. Tel: 86-31-86654261; E-mail: huanzhanjing@sohu.com

国家转基因专项 (No. 2004JYA01) 国家自然科学基金 (No. 30070471) 和河北省自然科学基金 (No. 301103, No. 2005000164)

信号传导中参与渗透胁迫的 MAPK 级联途径中的三个主要成分都是 Ser/Thr 类蛋白激酶,最近 Zhu JK 提出的 SOS 信号通路中的 SOS 2 也是一类 Ser/Thr 类蛋白激酶<sup>[10]</sup>。前文报道,我们已将该基因导入 *E. coli*,使之耐盐性明显提高<sup>[11]</sup>。但在植物对盐的耐受方面其作用如何尚需研究。

本文报道了我们利用从小麦耐盐突变体 RH8706-49 基因组中克隆到的糖原合成酶激酶基因——*TagSk1* 构建了真核双元表达载体 pBI121-gsk1,而后用基因枪法转化耐盐小麦成熟胚愈伤组织提高其耐盐性的试验结果。

## 1 材料与方法

### 1.1 材料

**1.1.1 植物材料** 小麦耐盐突变体 RH8706-49 和耐盐小麦材料 H8706-34 由本室提供;中国春由中国农科院品种资源研究中心提供。

**1.1.2 菌种和质粒** 大肠杆菌 DH 5 $\alpha$  为本室保存;*TagSk1* 克隆载体 pD-T23 由本室构建;双元载体 pBI121 由本院细胞室馈赠。

### 1.2 方法

**1.2.1 小麦基因组 DNA 的提取及糖原合成酶激酶基因(*TagSk1*)的克隆** 按文献 [13, 14] 少量提取小麦耐盐突变体 RH8706-49 基因组 DNA,检测其纯度和浓度后 4℃ 保存备用。根据小麦耐盐突变体 RH8706-49 *TagSk1* 基因 cDNA 序列<sup>[8]</sup>设计 PCR 特异引物,引物序列如下:

引物 I 5'-CG TCTAGA GTTGGTGTGG  
TGGCTCCTTCC-3' (含 *Xba* I 位点);

引物 II 5'-CG CCCGGG GGGGGCCTCG  
ATCCATGAAC-3' (含 *Sma* I 位点)

以小麦耐盐突变体 RH8706-49 基因组 DNA 为模板,按照常规反应体系利用 Pfu 酶和特异引物进行扩增。PCR 程序为:94℃ 预变性 5min,然后[94℃ 30s,60℃ 1min,72℃ 1min30s] × 35 个循环后,72℃ 保温 10min。克隆、测序。测序工作由上海博亚生物技术有限公司进行。

**1.2.2 pBI121-gsk1 双元表达载体的构建** 对已测序质粒进行 *Xba* I/*Sma* I 双酶切,回收 *TagSk1* 基因,并采用 T4 DNA Ligase 将其与 *Xba* I/*Sma* I 双酶切的双元表达载体 pBI121 作定向连接,筛选出双元表达载体 pBI121-gsk1 (图 1)。

**1.2.3 愈伤组织的诱导与继代** 分别取耐盐小麦

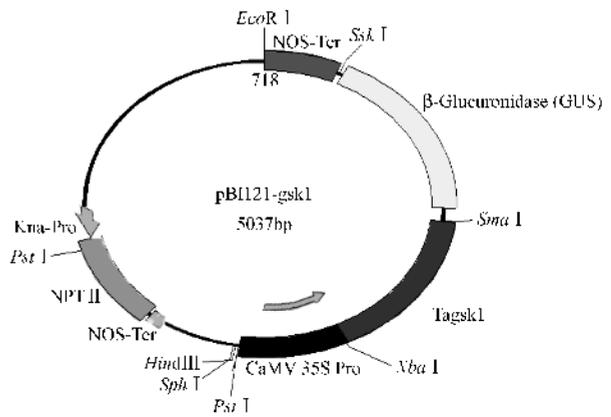


图 1 重组质粒 pBI121-gsk1 的物理图谱

Fig. 1 Physics map of recombinant vector pBI121-gsk1

H8706-34 和中国春的种子,按文献 [14] 提供的方法,于超净台上用 70% 的乙醇浸泡 5min,再用 0.1% 的 HgCl<sub>2</sub> 消毒 10min,无菌水冲洗 3~4 次,然后盛于无菌烧杯中,无菌水浸泡过夜。次日于超净台上剥离胚,盾片朝上置于愈伤组织诱导培养基上(MS + 2,4-D 2mg/L(单位下同) + 蔗糖 3.0% + 6-BA 0.5 + 琼脂 0.7%, pH5.8),25℃ 暗培养,诱导愈伤组织。接种 7~10d 后,将愈伤组织转接到继代培养基(MS + 水解乳蛋白 300 + L-谷氨酰胺 500 + 酵母浸出膏 1000 + 2,4-D 1.0 + KT 0.2 + PVP 0.01 + 蔗糖 3.0% + 活性炭 0.25% + 琼脂 0.7% pH5.8)上。

**1.2.4 质粒的提取、纯化和基因枪轰击转化** 本试验所构建的 pBI121-gsk1 质粒携带一个由 35S 启动子控制下的 *gus* 基因和具有 Kanamycin 抗性的 *NPT-II* 基因。质粒保存于 *E. coli* DH5 $\alpha$  中,采用上海生物工程技术服务有限公司生产的 UNIQ-200 柱式质粒大量抽提试剂盒对质粒 DNA 进行提取和纯化。

轰击前,选取继代 3~4 次处于对数生长期的粒状致密的愈伤组织分割成约 2mm 大小,然后转移到高渗培养基 I (MS + 山梨醇 0.2mol/L + 甘露醇 0.2mol/L + 蔗糖 3.0% + 琼脂 0.7% pH5.8)上进行渗透处理 4h,其间按文献 [12] 的方法制备好 DNA 的浓度为 1 $\mu$ g/ $\mu$ L 微弹,利用 BIO-RAD 公司生产的气动式基因枪 Biolistic PDS-1000/He Particle Delivery System,按照说明书介绍的方法,在样品室真空度达 85 以上,样品室高度为 6cm 的条件下对处理材料进行轰击,每皿轰击 1 次,轰击后的材料再转入高渗培养基,暗培养 2d (条件同前)。

**1.2.5 愈伤的筛选与分化** 上述材料培养 2d 后转接于筛选培养基 I (MS + L-谷氨酰胺 200 + Kna 50 + 羧苄青霉素 500 + 2,4-D 1.0 + KT 0.2 + NAA 0.05 +

蔗糖 3.0% + 琼脂 0.7% pH5.8) 在 25℃ 光照下培养 15~20d 后弃掉褐化的愈伤组织块, 将生长旺盛的转入筛选培养基 II, (将筛选培养基 I 的 Kanamycin 浓度改为 25mg/L 并添加 0.25% 的活性炭, 以防愈伤组织褐化)。为了减少高浓度抗生素对抗性愈伤生长的不利影响, 在初筛后逐渐降低培养基中的 Kanamycin 浓度, 使之由 50→25→15。继代 2~3 次后产生的抗性愈伤组织, 转入含盐分化培养基 (1/2 MS + LH 500 + L-谷氨酰胺 200 + NaCl 0.5% + Kna15 + 羧苄青霉素 500 + KT 0.2 + NAA 2.0 + 蔗糖 3.0% + 活性炭 0.5% + 琼脂 0.7% pH5.8), 对抗性愈伤进行耐盐性鉴定。

### 1.3 分子检测

愈伤组织基因组 DNA 的提取参照王关林等<sup>[13]</sup>的方法进行。PCR 扩增体系为 20 $\mu$ L, 扩增程序为: 94℃ 预变性 3min [94℃ 15s, 60℃ 30s, 72℃ 1min]  $\times$  30 个循环后, 72℃ 保温 10min; 根据质粒中 *NPT- II* 基因序列设计引物如下 (其扩增片段约为 500bp):

上游引物 5'-GGTGCCTGAATGAACTG-3'; 下游引物 5'-TAGCCAACGCTATGTCCT-3'。反应结束后, 扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳, 观察结果。

## 2 结果与分析

### 2.1 小麦 *Tagsk1* 基因的扩增、克隆和测序

以小麦耐盐突变体 RH8706-49 基因组 DNA 为模板, 经特异引物 PCR 扩增, 扩增产物在 1% 琼脂糖凝胶上电泳检测, 结果表明 1.54kb 处有一特异扩增条带, 与已获得的小麦糖原合成酶激酶基因的全长 cDNA 大小相似。将其回收、连接到 pGEM-T 载体上转化后得到重组子。经 PCR 扩增鉴定后, 得到阳性克隆 p49-3, 并由上海博亚公司进行测序鉴定。测序结果表明, 我们所克隆的 1.54kb 片段的序列与盐胁迫下从小麦耐盐突变体 RH8706-49 中得到的 *Tagsk1* 基因的全长 cDNA<sup>[8]</sup> 的序列完全一致, 说明这一 *Tagsk1* 基因不含内含子。推测这一 *Tagsk1* 可能是进化上比较保守的看家基因, 在植物的生命活动中有重要的功能。又因为 *Tagsk1* 是从小麦盐胁迫状态下分离出的基因, 而且是 Ser/Thr 类蛋白激酶, 所以该基因编码的蛋白极有可能是耐盐信号传导途径中的一个重要酶分子。

### 2.2 双元表达载体的构建及鉴定

用 *Xba I* / *Sma I* 将 *Tagsk1* 基因和双元表达载体 pBI121 分别进行双酶切, 对酶切片段进行回收后作定向连接, 使 *Tagsk1* 基因插入 pBI121 质粒, 并且

与 *NPT- II* 基因紧密连锁, 经筛选得到阳性白斑, 命名为 pBI121-gsk1。该质粒的物理图谱如图 1 所示。对转化子 pBI121-gsk1 进行 *Xba I* / *Sma I* 双酶切鉴定, 结果表明 pBI121-gsk1 重组质粒中含有 *Tagsk1* 基因。

### 2.3 转基因愈伤组织的分子鉴定

Qu 等和 Christou 认为基因枪转化实验中, 报告基因与目的基因很难分离, 其遗传方式是共分离的<sup>[15, 16]</sup>, 也就是说, 我们可以通过检验报告基因来检测目的基因的存在。同时考虑到受体愈伤组织基因组 DNA 含有 GSK, 故我们选择通过检测报告基因说明与之紧密连锁的外源基因的存在。为了进一步验证 pBI121-gsk1 是否转化成功, 所以, 我们设计引物对与 *Tagsk1* 紧密连锁的 *NPT- II* 基因片段 (约 500bp) 进行 PCR 鉴定。随机选取部分抗性愈伤组织, 提取其基因组 DNA 做模板, 进行 PCR 扩增, 结果多数扩增出 *NPT- II* 基因片段 (图 2), 说明外源基因 *Tagsk1* 在所选愈伤组织中转化成功, 已经整合。

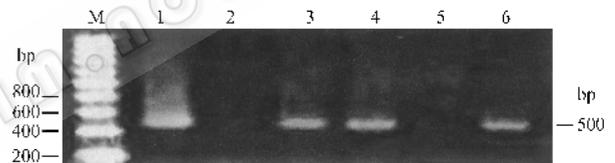


图 2 愈伤组织基因组 DNA PCR 电泳结果

Fig. 2 PCR analysis of callus with *NPT- II* gene

M 200bp DNA ladder; 1, 6: positive control of plasmid pBI121; 2: an escape reaction; 3: positive control of callus transformed pBI121; 4: positive callus transformed pBI121-gsk1; 5: the negative control callus.

### 2.4 转基因愈伤组织的筛选及耐盐鉴定

将敏盐材料——H8706-34 的 162 块愈伤组织, 利用基因枪转化后转接于筛选培养基 I 和 II 上继续培养, 统计结果表明, 褐化死亡率为 36.4%, 存活率为 63.6%, 再将 Kna 筛选后存活的 103 块转基因愈伤组织转接到含 0.5% NaCl 的分化培养基上, 进行抗性筛选 20d 后, 有 13 块分化出了根和芽 (图 3A), 分化率达 12.6%, 而未经转化的对照愈伤组织在含盐分化培养基上的存活率平均为 6.3%, 大部分褐化死亡 (图 3B), 而且存活愈伤组织不能继续分化。这一结果表明, 受体转基因后的耐盐性有了明显的提高, 显然是 *Tagsk1* 基因导入的结果。初步说明 *Tagsk1* 基因与小麦的耐盐性有密切关系, 该基因的超表达可以提高小麦的耐盐性。

文献报道, 多种胞外刺激如光照、冷、热、盐胁迫、伤害等, 在胞内的信号传递过程中均涉及到蛋白激酶的作用<sup>[17, 18, 19]</sup>, 它增强了植物体对逆境的适应

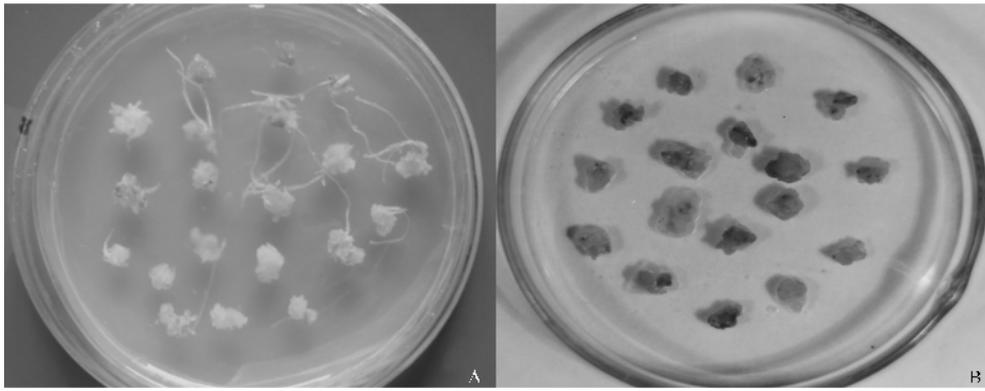


图3 愈伤组织在含盐培养基上的筛选和分化

Fig.3 The screen and differentiation of callus on the differentiate medium containing 0.5% salt.

A :The transgenic callus ; B :The negative control callus.

能力。本研究通过构建双元表达载体 pBI121-gsk1，并转化受体敏盐小麦 H8706-34 和中国春，初步证实了我们从小麦耐盐突变体分离到的糖原合成酶激酶 *Tagsk1* 基因可以提高愈伤组织的耐盐性，但其作用机理仍需进一步研究。

## REFERENCES (参考文献)

- [ 1 ] Gong XQ( 巩学千 ), Chen SY( 陈受宜 ). Protein kinase : a fast developing field. *Progress in Biotechnology* ( 生物工程进展 ), 1996, **16**( 1 ): 11 - 14
- [ 2 ] Usami S, Banno N, Ito Y *et al.* Cutting activates a 46 kilodalton protein kinase in plants. *Pro Ntl Acac Sci USA*, 1995, **92**: 8660 - 8664
- [ 3 ] Yang HQ( 杨洪强 ), Jia WS( 贾文锁 ), Zhang DP( 张大鹏 ). Effects of water losing on ABA content and activity of protein kinase in apple new roots. *Acta Horticulturae Sinica* ( 园艺学报 ), 2000, **27**( 2 ): 79 - 84
- [ 4 ] Liang XE( 梁小娥 ), Zhang DP( 张大鹏 ), Jia WS( 贾文锁 ). Analysis of protein kinase characteristics in developing apple and grape fruits. *Phytophysiological* ( 植物生理学通报 ), 2000, **26**( 3 ): 257 - 262
- [ 5 ] Yang HQ( 杨洪强 ), Liang XE( 梁小娥 ). Protein kinase and environmental stress signaling cascades in plants. *Communication of Plant Physiology*( 植物生理学通讯 ) 2001, **37**( 3 ): 185 - 191
- [ 6 ] Jianming Li, Kyoung Hee Nam. Regulation of brassinosteroid signaling by a GSK3/SHAGGY-Like kinase. *Science*, 2002, **295**: 1297 - 1301
- [ 7 ] Hai LP, Kyeong TP, Jeong HL *et al.* In hwan H. an Arabidopsis GSK-3/shaggy-like gene that complements yeast salt stress-sensitive mutants in induced by NaCl and abscisic acid. *Plant Physiol*, 1999, **119**: 1527 - 1530
- [ 8 ] Chen GP, Ma WS, Huang ZJ *et al.* Isolation and characterization of *Tagsk1* involved in wheat salt tolerance. *Plant Science*, 2003, **165**: 1369 - 1375
- [ 9 ] Ma WS, Chen GP, Shen YZ *et al.* Isolation and characterization of the wheat cDNA fragments involved in salt stress. *Agricultural Sciences in China*, 2004, **3**( 3 ): 173 - 177
- [ 10 ] Zhu JK. Genetic analysis of plant salt tolerance using arabidopsis. *Plant Physiol*, 2000, **124**: 941 - 948
- [ 11 ] Xu T( 徐涛 ), Ma WS( 马闻师 ), Shen YZ( 沈银柱 ) *et al.* Construction of Triticum aestivum L. Glycogen synthase kinase ( TaGSK1 ) expression vector and its prokaryotic expression. *Scientia Agricultura Sinica* ( 中国农业科学 ) 2004, **37**( 11 ): 1593 - 1597
- [ 12 ] Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T. Molecular cloning a laboratory manual 2nd. Beijing: Science Press, 1993
- [ 13 ] Wang GL( 王关林 ), Fang HJ( 方宏筠 ). The Theory and Technology of Plant Gene Engineering, Beijing: Science Press, 1998, pp. 82 - 110
- [ 14 ] Shen YZ( 沈银柱 ), Liu ZY( 刘植义 ), Huang ZJ( 黄占景 ) *et al.* A study of the salt-resistant variation of inducing matured embryo 's callus and regenerated plants in wheat. *Acta Genetica Sinica* ( 遗传学报 ), 1993, **20**( 3 ): 253 - 261
- [ 15 ] Qu R, De Kochko A, Zhang L *et al.* Analysis of a large number of independent transgenic rice plants produced by the biolistic method. *In Vitro Cell Dev Biol*, 1996, **32**: 233 - 240
- [ 16 ] Christou P. Rice transformation: bombardment. *Plant Mol Biol*, 1997, **35**: 197 - 200
- [ 17 ] Mizoguchi T, Ichimura K, Shinozaki K. Environmental stress response in plants: role of mitogen activated protein kinases. *Trends Biotech*, 1997, **15**: 15 - 19
- [ 18 ] Jonak C, Kiegerl S, Ligterink W *et al.* Stress singling in plants: amitogen activated protein kinases pathway is activated by cold and drought. *Pro Ntl Acac Sci USA*, 1996, **93**: 11274 - 11279
- [ 19 ] Bogre L, Ligterink W, Heberle Bors E *et al.* Mechano sensors in plants. *Nature*, 1996, **383**: 489 - 490