

转果聚糖蔗糖转移酶基因(*Sac B*)美丽胡枝子的获得 Regeneration of Transgenic *Lespedeza thunbergii* Expressing Levansucrase Gene (*Sac B*) from *Bacillus subtilis*

杜金友¹, 陈晓阳^{2*}, 张桂荣¹, 李 伟², 胡冬南², 胡赞民³

DU Jin-You^{1*}, CHEN Xiao-Yang^{2*}, ZHANG Gui-Rong¹, LI Wei², HU Dong-Nan² and HU Zan-Min³

1 河北科技师范学院, 秦皇岛 066600

2 北京林业大学, 北京 100083

3 中国科学院遗传与发育生物学研究所, 北京 100101

1 Hebei Normal University of Science and Technology, Qinhuangdao 066600, China

2 Beijing Forestry University, Beijing 100083, China

3 Institute of Genetics and Developmental Biology, Chinese Academy Sciences, Beijing 100101, China

摘 要 采用农杆菌介导的遗传转化方法, 将来自枯草杆菌的果聚糖蔗糖转移酶基因(*Sac B*) 导入美丽胡枝子, 以提高胡枝子抵御干旱胁迫和盐胁迫的能力。以美丽胡枝子子叶节为外植体, 通过与含有植物双元表达载体 pKP 的农杆菌 LBA4404 共培养, 将 *Sac B* 基因导入美丽胡枝子基因组。经卡那霉素筛选后, 共获得 62 株卡那霉素抗性植株。经 PCR 特异性扩增和 PCR-Southern 杂交, 证明有 5 株再生植株基因组 DNA 中整合了 *Sac B* 基因。通过 RT-PCR 分析, 结果表明 *Sac B* 基因均获得表达。经过 200 mmol/L NaCl 和 5% PEG 模拟胁迫, 发现转基因植株美丽胡枝子中, 可溶性糖含量在任何时候均高于未转化植株, 并比对照拥有更高的抗干旱胁迫和盐胁迫能力。

关键词 美丽胡枝子, 果聚糖蔗糖转移酶基因, 农杆菌介导转化, 干旱胁迫, 盐胁迫

中图分类号 Q781 文献标识码 A 文章编号 1000-306X(2006)06-0940-05

Abstract The *Bacillus subtilis Sac B* gene with the vacuolar targeting signal sequence driven by 35S promotor was transferred into *Lespedeza thunbergii* by *Agrobacterium* mediated method. Total 62 Kan-resistant plants were obtained, of which 5 plants were proved to be transgenic plants. The transgenic plants were characterized by PCR amplification, PCR-Southern hybridization and RT-PCR. The physiological assay results showed that the transgenic plants were more tolerant to stress than the controls under the condition of 200mmol/L NaCl and 5% PEG, respectively, and that the content of soluble sugar in transgenic plants was significantly higher than that of controls in the period of tests (5 ~ 15 days) under salt and PEG stress.

Key words *Lespedeza thunbergii*, *Sac B*, *Agrobacterium*-mediated transformation, drought stress, salt stress

果聚糖是植物组织中重要的渗透调节物质之一, 作为非结构性多糖, 果聚糖主要在植物液泡中积累, 这种积累能够降低细胞液泡水势, 有助于提高植物抵御干旱、低温以及盐胁迫的能力^[1]。美丽胡枝

Received: April 24, 2006; Accepted: June 6, 2006.

This work was supported by Hi-tech Research and Development Program of China(No. 2002AA241111) and Doctor foundation of Hebei Normal University of Science and Technology.

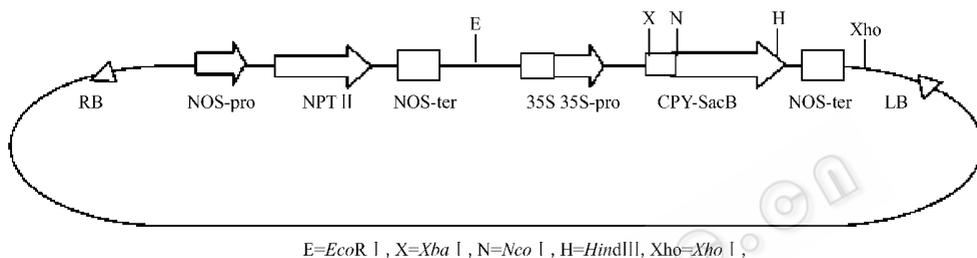
* Corresponding author. Tel: 86-10-62338005; E-mail: xychen@bjfu.edu.cn

国家高技术研究发展计划(863 计划) 项目(No. 2002AA241111) 和河北科技师范学院博士基金资助。

© 中国科学院微生物研究所期刊联合编辑部 <http://journals.im.ac.cn>

子是重要饲料灌木树种,同时也有很高的观赏价值。但是其抗旱以及耐盐碱性均不如同属内其他种,限制了美丽胡枝子的应用。因此,通过进行遗传改良提高其抗逆性有着重要的意义。

枯草杆菌(*Bacillus subtilis*)中的果聚糖蔗糖转移酶(levansucrase)催化以蔗糖为底物合成果聚糖的反应。其编码基因 *Sac B* 已经被克隆并研究^[2,3],而且也获得了 *Sac B* 基因转化的烟草^[4]、番茄^[5]、杨树^[6]。获得的转化植株能够在液泡中积累该基因的表达产物——果聚糖,提高转基因植株的耐胁迫能力。本文将果聚糖蔗糖转移酶基因(*Sac B*)导入美丽胡枝子,以期获得抗逆性强的美丽胡枝子新种质。



E=EcoR I, X=Xba I, N=Nco I, H=HindIII, Xho=Xho I,

图1 植物表达载体 pKP 结构

Fig. 1 Schematic diagram of the plant expression vector pKP

1.1.3 培养基:本研究选用 MS₀ 为基本培养基,美丽胡枝子对抗生素的敏感性不高,选用卡那霉素(Kan)筛选抗性芽,利用羧苄青霉素(Carb)抑制农杆菌。各类培养基的激素配比以及抗生素浓度(mg/L)如下。

子叶节分化 6-BA 0.5mg/L + 2.4-D 1mg/L + NAA 0.5mg/L + Kan 350mg/L + Carb 500mg/L;

不定芽增殖 6-BA 0.1mg/L + NAA 0.5mg/L + Kan 300mg/L + Carb 500mg/L;

不定芽生根 NAA 0.2mg/L + 150mg/L + Carb 300mg/L.

1.1.4 酶、试剂与试剂盒:常规试剂购于北京益利化学试剂公司,PCR 扩增选用的为 TaKaRa 的 Long Taq DNA 聚合酶,TRIzol RNA 提取试剂购自 GIBCO BRL 公司,PCR-Southern 采用 DIG High Prime DNA Labeling and Detection Starter Kit 1 试剂盒,购自 Boehringer Mannheim 公司。

1.1.5 PCR 引物:根据酵母羧肽酶 A 液泡引导序列设计了 5'端引物,根据果聚糖蔗糖酶基因序列设计了 3'端引物。引物序列为

5'端引物 5'-ATGAAAGCAATCACCAGTTTACTAT -3',

3'端引物 5'-CTATTTGTAACTGTTAATTTGTCCTTGT-3'.

1 材料与方法

1.1 实验材料

1.1.1 植物材料:以美丽胡枝子(*Lespedeza thunbergii*)优良株系(03-12)为受体材料。

1.1.2 农杆菌菌种:根癌农杆菌(*Agrobacterium tumefaciens*)LBA4404,根据 Ebskamp Van^[2]der Meer^[3]以及张慧等的经验^[4],连接了酵母羧肽酶 A 液泡引导序列(*cpy*)的 *Sac B* 基因(1.7kb),以及植物表达载体 pKP 由中国科学院遗传与发育研究所胡赞民实验室提供(图1)。

1.2 方法:

1.2.1 美丽胡枝子的转化和再生

外植体材料:采用子叶节分化不定芽的方法实现美丽胡枝子的转化,以萌发 8~12d 的无菌苗为材料,选取子叶充分展开、复叶长出并颜色正常的幼苗,将小叶与叶轴剪开,切去子叶顶端约 1/3 和下胚轴(子叶节留 3~5mm 下胚轴),纵向切开子叶为两瓣,每瓣子叶都带有部分下胚轴,并将主脉切断,远轴面向下,去掉顶芽,即可用于接种。

转化程序(1)依照上面方法,取合适的美丽胡枝子子叶节,接种于 MS₀ 培养基上预培养 2d(2)将叶片在 OD₆₀₀ 值在 0.5 左右的菌液中浸染 30~35min(3)吸干菌液后,在附加 100μmol/L 乙酰丁香酮的 MS₀ 培养基中,黑暗共培养 2d(4)转至含有 350mg/L Kan 和 500mg/L Carb 的不定芽分化培养基中进行筛选抗性植株。

扩繁与生根:获得的抗性植株在不定芽增殖培养基上进行扩繁。转接 3 次后在不定芽生根培养基上生根。

1.2.2 转化植物的 PCR 鉴定:用 SDS 法少量抽提转基因植株叶片 DNA 作为 PCR 检测的模板。2μL 10 × PCR 缓冲液,2μL 2.5μmol/L dNTP 混合液,1μL 待测样品 DNA,引物各 1μL,0.5μL Long Taq 酶,加

ddH₂O 至总体积 20 μ L。将上述溶液混匀,在 PCR 仪上依照如下程序扩增,94 $^{\circ}$ C 预变性 5min,94 $^{\circ}$ C 变性 60s,59 $^{\circ}$ C 退火 60s,72 $^{\circ}$ C 延伸 90s,进行 30 个循环,再延伸 10min。反应结束后,取 15 μ L PCR 产物经 1% 的琼脂糖电泳分离后用凝胶成像系统拍照。

1.2.3 转化植物的 PCR-Southern 鉴定:PCR 产物经琼脂糖凝胶电泳后,在紫外光下切除凝胶上无样品部分,转于 NC 膜上,将烤干的 NC 膜用 2 \times SSC 浸润,通过预杂交,杂交,洗膜,主要步骤参照文献 [7] 操作。将杂交好的 NC 膜用滤纸吸干,进行显色,杂交膜显色完成后自然风干,拍照记录。

1.2.4 转化植物的 RT-PCR 鉴定:mRNA 提取:使用 EZ-10 Spin Column RNA Purification Kit 进行 mRNA 的提取。转化植株新鲜叶片 100mg 经液氮冷冻固化研磨后,装入 1.5mL 离心管,加入 450 μ L RLT 溶液,混旋。加 0.5 倍体积的 100% 乙醇,混匀。过 EZ spin column,10 000 r/min 离心 1min,弃残液。加 500 μ L RW 溶液,10 000 r/min 离心 1min,弃残液。加 500 μ L RPE 乙醇溶液,10 000r/min 离心 2min,弃残液。将 EZ spin column 转至干净无 RNase 的 1.5mL 离心管中,加 30~50 μ L 无 RNase 的水至柱中心部,50 $^{\circ}$ C 温育 2min,10 000r/min 离心 1min,样品于 -76 $^{\circ}$ C 保存。

RT-PCR 逆转录 PCR 反应体系(30 μ L)含:RNA 模板 5 μ g,5 \times Buffer 6 μ L,RNasin 1 μ L(50u),dNTPs 1 μ L(10mmol/L),反向引物 1 μ g,M-MLV 1 μ L(200u),42 $^{\circ}$ C 1.5~2h。PCR 扩增反应体系(30 μ L)含 5 μ L 反转录产物,10 \times Buffer 3 μ L,dNTPs 0.5 μ L(5mmol/L),上下游引物各 0.1 μ g,Taq DNA 聚合酶 2u。PCR 反应程序 95 $^{\circ}$ C 5min,95 $^{\circ}$ C 1min,56 $^{\circ}$ C 1min,72 $^{\circ}$ C 2min,35 个循环,72 $^{\circ}$ C 5min。取 15 μ L PCR 产物经 1% 琼脂糖电泳分离后,用凝胶成像系统拍照。

1.2.5 抗逆性鉴定:利用 200mmol/L NaCl 和 5% PEG 模拟胁迫,检测转基因苗的生长情况,并采用蒽酮比色法^[8]分别测定胁迫 5、10、15d 时的可溶性糖含量。

2 结果与分析

2.1 美丽胡枝子的转化

美丽胡枝子子叶节与含有植物表达载体的农杆菌共培养后,转入含卡那霉素以及羧苄青霉素的 MS 培养基上筛选抗性芽,经过多轮筛选,在大约 600 个外植体中,最后获得无菌抗性苗 62 株,抗性芽出芽率为 10.3%。将获得的抗性植株进行 PCR 检测。

2.2 转基因美丽胡枝子的 PCR 以及 PCR-Southern 检测

提取抗性植株材料叶片 DNA,进行 PCR 检测,结果在 62 株抗性植株中,有 5 株均检测出扩增片段(图 2)与预期片段大小(1.7kb)一致。并且通过 PCR-Southern 杂交,初步证实了外源基因已经整合至美丽胡枝子植株中。

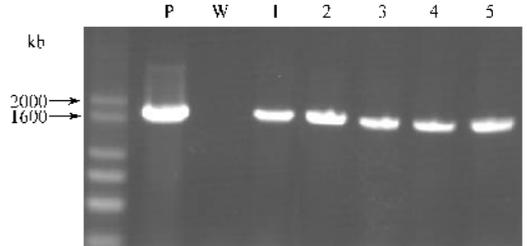


图 2 美丽胡枝子转化 *cpy-Sac B* 基因的 PCR 检测
Fig.2 PCR analysis of *cpy-Sac B* gene in transgenic plants
P: plasmid control; W: negative plant; 1~5: positive plants.

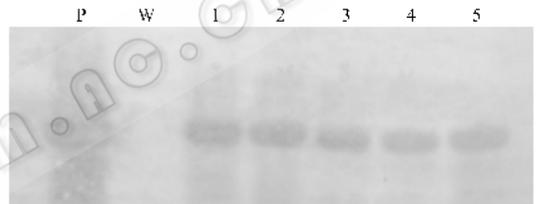


图 3 转化 *cpy-Sac B* 基因的 PCR southern 杂交结果
Fig.3 PCR southern blotting analysis of *cpy-Sac B* gene
P: plasmid control; W: negative plant; 1~5: positive plants.

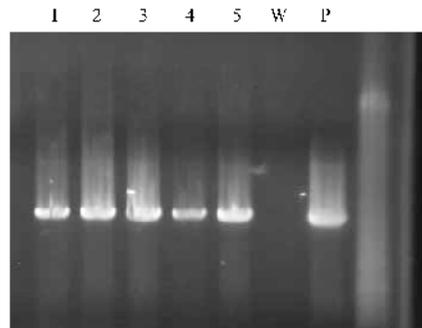


图 4 美丽胡枝子转化 *cpy-Sac B* 基因的 RT-PCR 检测
Fig. 4 RT-PCR analysis of *cpy-Sac B* gene
P: plasmid control; W: negative plant; 1~5: positive plants.

2.3 转基因美丽胡枝子的 RT-PCR 检测

取经过 PCR 检测的转基因植株材料,提取 mRNA,进行 RT-PCR 检测,结果显示,5 份材料均检测到表达信号(图 4)。表明外源基因在转基因美丽胡枝子中已正常表达。

2.4 转基因美丽胡枝子的抗逆性检测

将经过分子检测的植株扩繁,然后转入含有

组培苗的生长情况,5d时观测到对照植株缓慢生长,局部黄化,10d已经较大面积黄化,15d基本停止生长,局部有落叶,而转化植株生长正常(图5,图6)。

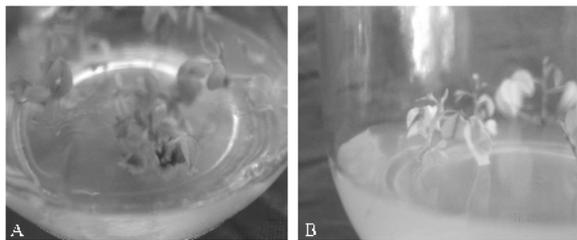


图5 200mmol/L NaCl胁迫下转基因美丽胡枝子与对照的生长情况

Fig.5 Growth situation of transgenic *L. thumbergii* and the control under 200mmol/L NaCl stress

A: transgenic plants; B: control.

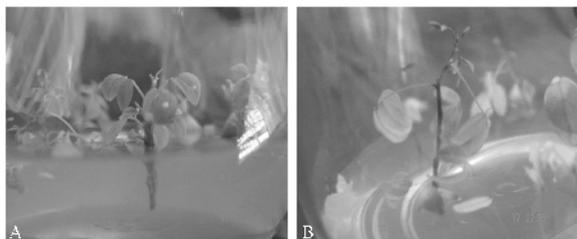


图6 5%PEG胁迫下转基因美丽胡枝子与对照的生长情况

Fig.6 Growth situation of transgenic *L. thumbergii* and the control under 5% PEG stress

A: transgenic plants; B: control.

2.5 NaCl胁迫下转基因美丽胡枝子可溶性糖含量检测

选择1,2,3号转基因美丽胡枝子和未转化的组培苗材料,接入含有NaCl 200mmol/L的分化培养基,在5d,10d,15d时取0.1~0.2g材料,测定可溶性糖含量,从图7可以看出,在任何时候转基因美丽胡枝子的可溶性糖含量均高于未转化植株,而转化植株之间差别不大。随着胁迫时间的延长,未被转化的亲本植株(CK)中,可溶性糖含量先升高后下降,15d后其含量已经下降到5.7mg/g.F.W,也可以看到叶片变白,有落叶(图5);而此时,转化植株生长正常。从图5中可以直观地看到,在NaCl胁迫下转基因美丽胡枝子可溶性糖含量变化。结果显示,转基因美丽胡枝子拥有更高的抗盐性,显然与Sac B基因表达有关。

2.6 PEG胁迫下转基因美丽胡枝子可溶性糖含量检测

选择1,2,3号转基因美丽胡枝子,接入含有PEG 5%的分化培养基,对照同前,在5d,10d,15d时

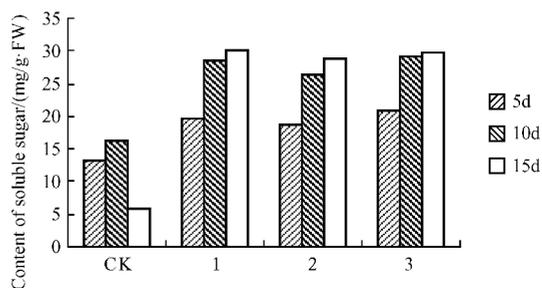


图7 NaCl胁迫下转基因美丽胡枝子可溶性糖含量变化

Fig.7 Changes in the content of soluble sugar of transgenic plants under 200mmol/L NaCl stress

1 2 3: transgenic plants; CK: control.

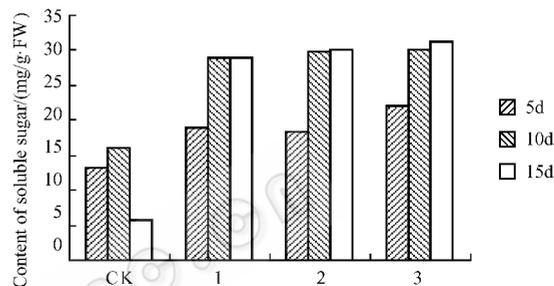


图8 5%PEG胁迫下转基因美丽胡枝子可溶性糖含量变化

Fig.8 Changes in the content of soluble sugar of transgenic plants under 5% PEG stress

1 2 3: transgenic plants; CK: control.

小心取0.1~0.2g材料,测定可溶性糖含量(图7)。结果与NaCl胁迫下转基因美丽胡枝子的可溶性糖含量变化类似。即在任何时候转基因美丽胡枝子的可溶性糖含量均高于未转化植株,而转化植株之间差别不大。在15d时,转化植株生长正常(图5)。因此,通过转化Sac B基因能够提高美丽胡枝子的抗旱性。

3 讨论

本研究首次获得了转化Sac B基因的美丽胡枝子,并且通过PCR,RT-PCR等技术证实Sac B基因已经整合到美丽胡枝子基因组中并获得正常表达。对转Sac B基因美丽胡枝子的可溶性糖含量以及试管苗的耐干旱、耐盐能力进行了测试,初步证实Sac B基因的转化能够在一定程度上增强美丽胡枝子的耐胁迫能力。

Sevenier等^[9]将Sac B基因导入甜菜,同样观测到了转基因植物细胞内多聚果聚糖含量的增加,转基因植株不仅表现出抗寒特性,同时还具有抗旱、耐盐碱的能力。张慧^[4]将Sac B基因转入烟草观测到Sac B基因在转化植株正常表达并提高烟草的耐盐

能力。Sac B 也能够提高转化植株的抗寒能力^[5], 抗旱能力^[10]。结合本研究的结果, 可以认为 Sac B 基因能够提高植物耐渗透胁迫能力, 是一个较为理想的提高植物非生物胁迫抗性的基因, 应用前景广阔。

REFERENCES(参考文献)

- [1] Wang ZM(王志敏). The Metabolism of Fructan in Higher Plants. *Plant Physiology Communications* (植物生理学通讯), 2000, **36** (1): 71 - 76
- [2] Ebskamp MJ, van der Meer IM, Spronk BA, Weisbeek PJ, Smeekens SC. Accumulation of fructose polymers in transgenic tobacco. *Biotechnology* (N Y). 1994, **12** (3): 272 - 275
- [3] Van der Meer IM, Ebskamp MJM, Visser RGF *et al.* Fructan as a new carbohydrate sink in transgenic potato plants. *The Plant Cell*, 1994, **6**: 561 - 570
- [4] Zhang H(张慧), Dong W(董伟), Zhou JM(周骏马) *et al.* The cloning of levansucrase gene and its engineering of salt-tolerant tobacco plants. *Chinese Journal of Biotechnology*(生物工程学报), 1998, **14**(2): 181 - 186
- [5] Wang G(王关林), Li TS(李铁松), Fang H(方宏筠) *et al.* Obtaining of transgenic tomato of levansucrase gene with resistance to low temperature. *Scientia Agricultura Sinica*(中国农业科学), 2004, **37**(8): 1193 - 1197
- [6] Zhang BY(张冰玉), Su XH(苏晓华), Huang QJ(黄秦军) *et al.* Regeneration of Transgenic Poplar (*Populus alba* × *P. glandulosa*) Expressing Levansucrase from *Bacillus subtilis*. *Scientia Silvae Sinicae*(林业科学), 2005, **14**(3): 48 - 53
- [7] Wang G(王关林), Fang H(方宏筠). *Plant Gene Engineering*. Beijing: Science Publisher, 2002
- [8] Liu YJ(刘永军), Guo SH(郭守华), Yang XL(杨晓玲). *Experiment of plant physiology and biochemistry*. Beijing: Chinese Agricultural Science and Technology Publisher, 2002
- [9] Sevenier R, Hall RD, Van der Meer IL *et al.* High level fructan accumulation in transgenic sugar beet. *Nature Biotechnology*, 1998, **16**: 843 - 846
- [10] Liu WH(刘伟华), Zhao XC(赵秀振), Liang H(梁虹) *et al.* Study on transformation of wheat with SacB gene from *Bacillus subtilis*. *Scientia Agricultura Sinica*(中国农业科学), 2006, **39** (2): 231 - 236