

研究论文

Research Article

农杆菌介导热激转录因子 8 基因转化大豆

唐晓飞¹, 刘丽君¹, 高明杰¹, 杨喆¹, 蒲国峰¹, 张雷¹, 魏崑²

1. 黑龙江省农业科学院大豆研究所, 哈尔滨, 150086

2. 东北农业大学, 哈尔滨, 150030

✉ 通讯作者: nkyssbd@126.com; 作者

豆科基因组学与遗传学, 2010 年, 第 1 卷, 第 5 篇 DOI: 10.5376/lgg.cn.2010.01.0005

收稿日期: 2010 年 7 月 23 日

接受日期: 2010 年 10 月 25 日

发表日期: 2010 年 12 月 10 日

本文首次发表在《分子植物育种》印刷版上。现经版权所有人授权, 采用《Creative Commons Attribution License》在《豆科基因组学与遗传学》中文网络版上再次发表与传播。只要对本原作有恰当的引用, 版权所有人允许并同意第三方无条件的使用与传播。

建议的引用格式如下:

Tang et al., 2009, *Agrobacterium*-Mediated Transformation of *hsf8* into Soybean, *Fenzi Zhiwu Yuzhong* (Molecular Plant Breeding), 7(3): 444-450 (DOI: 10.3969/mpb.007.000444) (唐晓飞等, 2009, 农杆菌介导热激转录因子 8 基因转化大豆, 分子植物育种, 7(3): 444-450 (DOI: 10.3969/mpb.007.000444))

摘要 环境胁迫严重影响作物的生长和发育, 热激转录因子(heat shock factor 8, HSF)是一类在热应激反应中起重要作用的蛋白质, 主要功能是在热休克基因的表达过程中与相应热激元件结合, 启动基因的转录过程, 最终促进热休克蛋白(HSP)基因的表达。本文将热激转录因子 8 (*hsf8*)基因构建在植物表达载体 pCAMBIA3300 中, 以大豆子叶节作为受体, 通过农杆菌介导法将 *hsf8* 基因导入品质性状优良的两个高产大豆新品系哈交 5337 和哈交 5489 中, 最后获得转基因植株。在开展大豆遗传转化过程中, 探讨了农杆菌介导大豆子叶节转化体系的影响因素, 优化了转化条件。在共培养后, 采用延迟筛选的方法来提高选择效率。并确定草胺磷筛选浓度为 3.5 mg/L。获得转化质粒 pCAMBIA3300-HSF8 的转基因植株, 其中 T₁ 代 PCR 阳性植株 17 株。采用 Real-time PCR 的方法对 T₁ 代抗性植株进行 *hsf8* 基因的转录水平的相对定量分析, 确定 9 株较非转基因植株哈交 5337 表达量明显提高。有 1 株明显低于哈交 5489 的 *hsf8* 基因表达量。

关键词 大豆; 农杆菌转化; 热激转录因子 8 基因; 耐热性

Agrobacterium-Mediated Transformation of *hsf8* into Soybean

Tang Xiaofei¹, Liu Lijun¹, Gao Mingjie¹, Yang Zhe¹, Pu Guofeng¹, Zhang Lei¹, Wei Lai²

1. Soybean Research Institute, Academy of Agricultural Sciences, Harbin, 150086

2. Northeast Agriculture University, Harbin, 150030

✉ Corresponding author, nkyssbd@126.com; Authors

This paper was first published in *Molecular Plant Breeding*, which redistributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

Abstract Abiotic stresses, such as drought, salinity, extreme temperatures, chemical toxicity and oxidative stress are serious threats to agriculture and the natural status of the environment. Heat-shock transcription factors (HSFs) are important in regulating heat stress response, which mediate expression of heat shock protein (HSP). This research used genetic engineering techniques to insert *hsf8* gene to dicotyledon expression vector pCAMBIA3300 that contains the selection marker gene bar. And pCAMBIA3300-HSF8 has been transferred into new soybean lines Hajiao5337 and Hajiao5489 by *Agrobacterium tumefaciens*. In the process of soybean genetic transformation, we researched the impact of factors on the cotyledons of soybean *Agrobacterium*-mediated transformation, optimized the conversion conditions. We discussed the PGR concentrations, After the co-culture cultivated, delayed selection was used to improve the efficiency of selection. The optimal concentration of glufosinate-ammonium was 3.5 mg/L in selection culture medium. Obtained the T₁ transgenic plant of Hajiao5337 and Hajiao5489 with pCAMBIA3300-HSF8 by *Agrobacterium*-mediated technology, in which 17 plants were confirmed as transgenic plants by PCR. Real-time PCR was employed to investigate the transcription level of *hsf8* gene in T₁ transgenic plants with glufosinate-ammonium resistance, and 9 of them indicated a much higher expression level than that of the control Hajiao5337. Only one transgenic soybean, which expression was lower than Hajiao5489.

Keywords Soybean, *Agrobacterium*-mediated transformation, Heat shock factor 8 gene (*hsf8*), Heat tolerance

研究背景

大豆是世界上重要的粮食、油料作物, 目前中国大豆

生产总量不能满足国内对大豆消费需求, 其主要原因是大豆产量低。大豆单产水平的提高依赖于大豆品种

对不良生长环境的抗性及对养分的有效利用。环境胁迫如干旱、土壤盐渍化和极端温度等严重影响了作物的生长和发育, 降低了产量(Wang et al., 2003), 其中以温度逆境的影响最大。大豆不耐高温, 如果气温过高或在开花及结荚期出现旱情会导致大豆减产。人们发现热休克蛋白(heat stress/shock protein, HSP)的合成与生物耐热性的获得呈正相关。HSP 的形成能提高有机体的应激能力, 特别是耐热能力(Zhu et al., 2006)。对许多生物进行低于致死温度的热激处理, 可以提高其在逆境下的存活率。对热休克蛋白基因的表达与调控是通过热激转录因子(heat shock transcription factor, HSF)实现的, 且这种调控主要发生在转录水平。在高等生物中, 热激环境使潜在的 HSF 成为一个激活子, 这一过程, 伴随着 HSF 分子内和分子间的相互作用以及 HSF 与热激/胁迫元件(heat stress shock elements, HSE)之间的相互作用。另外, HSFs 作为一种响应逆境的信号转录因子, 还表现一定的耐冷性和抗旱性, 有证据表明植物 HSF 对不同逆境的存在广泛的交叉保护作用(Lee et al., 1995; Lee and Schöffl, 1996; Busch et al., 2005)。

本研究是利用基因工程技术将一种与植物耐高温等逆境相关的 *hsf8* 基因连接到双子叶植物表达载体 pCAMBIA3300 上, 以大豆子叶节作为受体, 通过农杆菌介导法介导将 *hsf8* 基因导入品质性状优良的两个高产大豆新品系哈交 5337 和哈交 5489 中, 采用 Real-time PCR 的方法确定 T₁ 代转基因植株, 并获得了 *hsf8* 基因高效表达的转基因植株。以期通过热激转录因子 *hsf8* 基因在转基因植株中的表达, 来实现和提高大豆靶基因 *HSP70* 等的表达水平, 提高大豆对高温等逆境的耐受性, 并为大豆抗逆新品种的选育提供种质资源。

1 结果与分析

1.1 *hsf8* 基因转化载体的构建

植物基因表达载体构建的技术路线如图 1 所示。质粒 pBI121-HSF8 用 *EcoR* I 和 *Hind*III 双酶切, 回收大小约 2.8 kb 的片段(图 2, 泳道 1), 含有 35S+*hsf8*+*NOS* 完整表达结构。载体质粒 pCAMBIA3300 用 *EcoR* I 和 *Hind*III 双酶切, 回收约 8.5 kb 的片段(图 2, 泳道 2), 连接两个回收片段。将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α , 用 100 mg/L 的 Km 筛选重组子。对

得到的重组子也用 *EcoR* I 和 *Hind*III 酶切鉴定(图 2, 泳道 3), 能切出与 pBI121-HSF8/*EcoR* I +*Hind*III 和 pCAMBIA3300/*EcoR* I +*Hind*III 同样大小两条带的质粒命名为 pCAMBIA3300-HSF8。

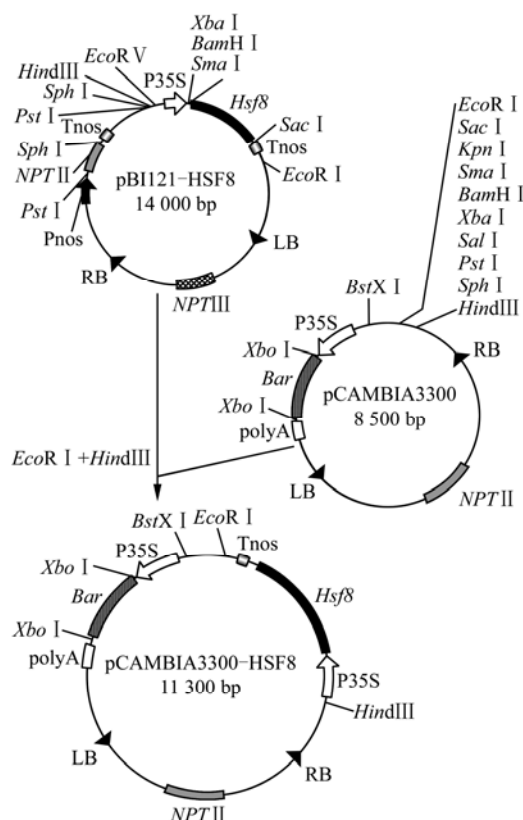


图 1 *hsf8* 基因转化载体构建技术路线

Figure 1 The technology route of constructing transformation vector contains *hsf8*

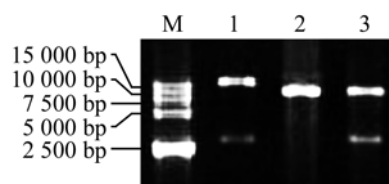


图 2 植物表达载体 pCAMBIA3300-HSF8 的酶切鉴定结果
注: M: DL15000; 1: 质粒 pBI121-HSF8 *EcoR* I 和 *Hind*III 双酶切产物; 2: 质粒 pCAMBIA3300 *EcoR* I 和 *Hind*III; 双酶切产物; 3: 质粒 pCAMBIA3300-HSF8 *EcoR* I 和 *Hind*III 双酶切产物。

Figure 2 Characterization of plant expression vector pCAMBIA3300-HSF8 with endonucleases

Note: M: DL15000; 1: Vector pBI121-HSF8 digested with *EcoR* I and *Hind*III; 2: Vector pCAMBIA3300 digested with *EcoR* I and *Hind*III; 3: Vector pCAMB-IA3300-HSF8 digested with *EcoR* I and *Hind*III

1.2 草铵膦对大豆选择压力试验

根据预备试验结果, 草铵膦的浓度分别设置为 0 mg/L、0.5 mg/L、1 mg/L、1.5 mg/L、2 mg/L、2.5 mg/L、3 mg/L、3.5 mg/L 和 4 mg/L, 9 个浓度的草铵膦对大豆哈交 5337 和哈交 5489 子叶节外植体出芽率的影响结果见图 3, 当草铵膦浓度为 3.5 mg/L 时, 哈交 5337 和哈交 5489 的子叶节分化率均为 6.7%, 显著低于对照, 而且两者的分化芽均表现为白化。最终选择了 3.5 mg/L 的草铵膦浓度作为这两个品系大豆的选择压力。

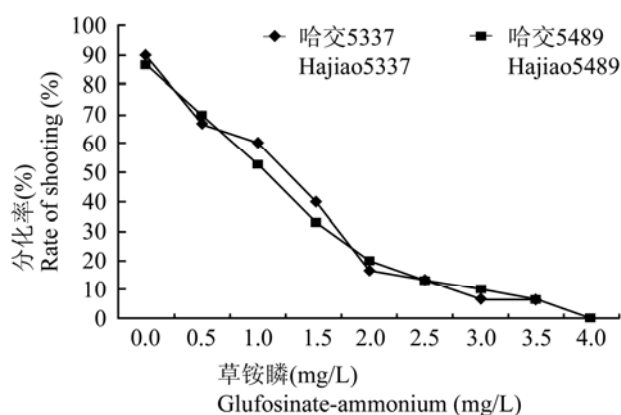


图 3 草铵膦对大豆哈交 5337 和哈交 5489 子叶节丛生芽分化的影响

Figure 3 Effect of glufosinate-ammonium on the shoot regeneration of Hajiao5337 and Hajiao5489 soybean cotyledonry

1.3 T₁ 代植株目的基因

以质粒 pCAMBIA3300-HSF8 为阳性对照, 非转基因再生苗哈交 5337 和哈交 5489 为阴性对照, 以无菌水代替模板 DNA 为负对照, 以抗性植株总 DNA 为模板, 用检测 35s-bar 的引物进行 PCR 扩增。结果如图 4 所示, 表明有 17 株抗性植株呈现 PCR 阳性, 初步证明 *hsf8* 基因已整合到大豆基因组中。

1.4 Real-time PCR 检测 T₁ 代转基因植株 *hsf8* 表达量

以哈交 5337 和哈交 5489 为受体的转基因 T₁ 代植株 *hsf8* 基因表达量的 Real-time PCR 具体检测结果见表 1 及表 2。△△CT 表示目标基因 *hsf8* 和内参基因 *lectin* 的 CT 值的差异, 根据得到的原始 CT 值计算处理后的样品差异表达倍数 ($2^{-\Delta\Delta CT}$), 即 $2^{-\Delta\Delta CT}$ 表示 *hsf8* 基因在转基因植株中的起始浓度与其在未转化植株中的起始浓度的比值。比较了 *hsf8* 基因在各测试植株中的表达量, 其中确定 9 株较非转基因

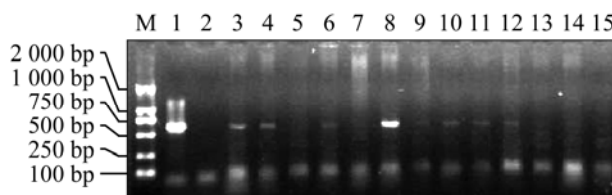


图 4 T₁ 代大豆转基因植株的 PCR 检测部分结果

注: M: DL2000; 1: 质粒 pCAMBIA3300-HSF8 (阳性对照); 2: 水对照; 3~13: 部分 T₁ 转化植株; 14: 哈交 5337 (阴性对照); 15: 哈交 5489 (阴性对照)

Figure 4 The PCR analysis of genomic DNA in putative transgenic soybean plants T₁ generation

Note: M: DL2000; 1: Positive control of pCAMBIA3300-HSF8; 2: Negative control of distill deionized water; 3~13: DNA of T₁ generation from independently trans- formed plants; 14: DNA from untransformed plant Hajiao5337 (negative control); 15: DNA from untrans- formed plant Hajiao5489 (negative control)

植株哈 5337 表达量明显提高。其中表达量较非转基因植株提高 20 倍以上的有 3 株, 提高 15 倍以上的有 3 株, 提高 5 倍以上的有 2 株(图 5)。较哈交 5489 表达量差异比较明显的就是 T07 II-002-2, 低于哈交 5489 中 *hsf8* 基因表达量的 48 倍(图 6)。

通过以上结果, 初步表明 *hsf8* 基因表达量在转基因后代植株发生明显变化是由于目标基因 *hsf8* 的插入引起的。

2 讨论

大豆的遗传转化系统效率低且重复性差, 是大豆基因工程研究的难题。转化率的提高有赖于建立完善的再生体系、遗传转化体系以及确立合理的筛选策略(李明春等, 2006; Paz et al., 2006)。本文采用一种改良的筛选方式, 采取共培养之后先进行恢复培养的方式。感染过的子叶节经 5~7 d 的恢复培养后, 待分化出小芽后再进行高选择压的筛选培养, 这样分化能力明显提高。这与前人报道的结果基本相同(刘圣君等, 2007)。同时需要注意的是恢复培养的时间也不要过长, 可能由于未转化细胞的过度增殖分化, 抑制了转化细胞的生长, 不利于最终转化效率的提高。另外选用 *bar* 基因作为筛选标记基因受基因型的限制较小, 几乎所有品种都可以转化, 可相对提高遗传转化效率。

大量研究表明, 农杆菌对不同植物的侵染能力存在着很大差异。因此, 在遗传转化研究中两者的匹配

表 1 以哈交 5337 为受体的转基因植株 T₁ 代植株 *hsf8* 基因表达量的 Real-time PCR 检测
Table 1 Real-time PCR identification of the T₁ generation of transform *hsf8* to Hajiao5337

样品 Samples	引物 Primers	CT (dRn)	Δ CT CT _{target} - CT _{hskg}	$\Delta\Delta$ CT Δ CT _{ample} - Δ CT _{calibrator}	$2^{-\Delta\Delta CT}$ Relative quantity (dRn)
H ₂ O	<i>hsf8</i>	No CT	-	-	-
H ₂ O	<i>lectin</i>	No CT	-	-	-
哈交 5337	<i>hsf8</i>	32.06	1.02	0.00	1.000 00
Hajiao5337	<i>lectin</i>	31.04	-	-	-
T07 I -003-1	<i>hsf8</i>	34.30	-0.39	-0.02	1.017 10
T07 I -003-1	<i>lectin</i>	34.69	-	-	-
T07 I -003-2	<i>hsf8</i>	28.40	0.54	-0.48	1.389 01
T07 I -003-2	<i>Lectin</i>	27.86	-	-	-
T07 I -005-1	<i>hsf8</i>	29.68	-3.60	-4.62	24.384 56
T07 I -005-1	<i>Lectin</i>	33.28	-	-	-
T07 I -005-2	<i>hsf8</i>	27.04	-0.44	-1.46	2.743 13
T07 I -005-2	<i>lectin</i>	27.48	-	-	-
T07 I -006-1	<i>hsf8</i>	30.43	0.78	-0.24	1.179 66
T07 I -006-1	<i>Lectin</i>	29.65	-	-	-
T07 I -006-2	<i>hsf8</i>	26.35	-1.86	-2.88	7.298 77
T07 I -006-2	<i>Lectin</i>	28.21	-	-	-
T07 I -006-3	<i>hsf8</i>	36.16	4.18	4.55	0.042 50
T07 I -006-3	<i>Lectin</i>	31.98	-	-	-
T07 I -007-1	<i>hsf8</i>	29.69	-0.64	-1.66	3.146 02
T07 I -007-1	<i>Lectin</i>	30.33	-	-	-
T07 I -007-2	<i>hsf8</i>	25.50	-3.06	-4.08	16.861 91
T07 I -007-2	<i>Lectin</i>	28.56	-	-	-
T07 I -007-3	<i>hsf8</i>	30.26	0.95	1.32	0.400 69
T07 I -007-3	<i>Lectin</i>	29.31	-	-	-
T07 I -010-1	<i>hsf8</i>	32.58	2.22	2.59	0.165 97
T07 I -010-1	<i>Lectin</i>	30.36	-	-	-
T07 I -010-2	<i>hsf8</i>	32.91	-2.63	-2.26	4.793 46
T07 I -010-2	<i>Lectin</i>	35.54	-	-	-
T07 I -010-3	<i>hsf8</i>	27.43	-1.72	-2.74	6.670 27
T07 I -010-3	<i>Lectin</i>	29.15	-	-	-
T07 I -014	<i>hsf8</i>	25.97	-4.12	-5.14	35.217 15
T07 I -014	<i>Lectin</i>	30.09	-	-	-
T07 I -015-1	<i>hsf8</i>	27.93	-1.57	-2.59	5.996 08
T07 I -015-1	<i>Lectin</i>	29.50	-	-	-
T07 I -015-2	<i>hsf8</i>	28.04	-2.93	-3.95	15.308 50
T07 I -015-2	<i>Lectin</i>	30.97	-	-	-
T07 I -015-3	<i>hsf8</i>	26.78	-3.42	-4.44	21.587 62
T07 I -015-3	<i>lectin</i>	30.20	-	-	-

选择十分重要, 即选择农杆菌与植物之间有着高感染力的配合直接影响着转化效率。试验中, 选用了 GV3101 和 LBA4404 两种农杆菌对两个大豆品系进行转化, 两种菌株对大豆子叶节均具有较强的感染能力。但是比较来看 GV3101 的活性要好于 LBA4404, 产生的抗性芽数较多些, 然而正是由于菌的活性好就使得共培养后较难除菌, 影响了抗性

苗的获得, 将头孢的使用浓度提高到 600 mg/L 时仍会有除菌不净状况, 若再加大除菌剂的使用量对抗性芽的生长会有所影响, 所以在选择活性好的菌株的同时还要考虑除菌问题, 以及除菌剂选择。

在基因表达的研究中, 常用的方法有 Northern 印迹, RT-PCR 定量法等, 而 Real-time PCR 比 Northern 印迹,

表 2 以哈交 5489 为受体的转基因植株 T₁ 代植株 *hsf8* 基因表达量的 Real-time PCR 检测

Table 2 Real-time PCR identification of the T₁ generation of transform *hsf8* to Hajiao5489

样品 Samples	引物 Primers	CT (dRn)	Δ CT CT _{target} - CT _{hskg}	$\Delta\Delta$ CT Δ CT _{sample} - Δ CT _{calibrator}	$2^{-\Delta\Delta$ CT Relative quantity (dRn)
H ₂ O	<i>hsf8</i>	No CT	-	-	-
H ₂ O	<i>lectin</i>	No CT	-	-	-
哈交 5337	<i>hsf8</i>	27.55	-1.24	0	1.000 00
Hajiao5337	<i>lectin</i>	28.79	-	-	-
T07 II -002-1	<i>hsf8</i>	28.84	-1.86	-0.62	1.546 77
T07 II -002-1	<i>lectin</i>	30.70	-	-	-
T07 II -002-2	<i>hsf8</i>	34.02	4.37	5.61	0.020 57
T07 II -002-2	<i>Lectin</i>	29.65	-	-	-
T07 II -003	<i>hsf8</i>	28.65	-0.61	0.63	0.648 25
T07 II -003	<i>Lectin</i>	29.26	-	-	-
T07 II -010-1	<i>hsf8</i>	29.27	0.81	1.84	0.280 86
T07 II -010-1	<i>lectin</i>	28.46	-	-	-
T07 II -010-2	<i>hsf8</i>	29.16	0.68	1.92	0.265 32
T07 II -010-2	<i>Lectin</i>	28.48	-	-	-

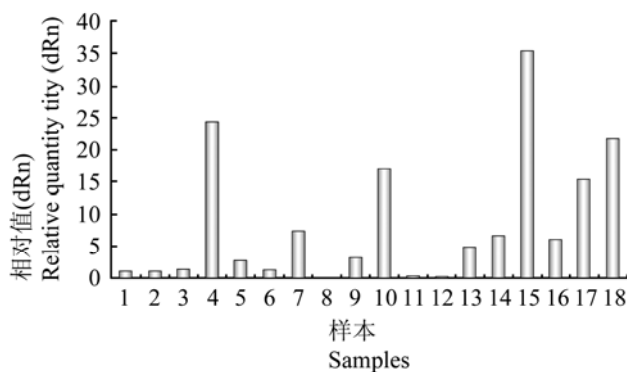


图 5 T07 I 各转基因植株 T₁ 代与哈交 5337 的 *hsf8* 基因表达值比较图

注: 1: 哈交 5337; 2: T07 I -003-1; 3: T07 I -003-2; 4: T07 I -005-1; 5: T07 I -002-2; 6: T07 I -006-1; 7: T07 I -006-2; 8: T07 I -006-3; 9: T07 I -007-1; 10: T07 I -007-2; 11: T07 I -007-3; 12: T07 I -010-1; 13: T07 I -010-2; 14: T07 I -010-3; 15: T07 I -014; 16: T07 I -015-1; 17: T07 I -015-2; 18: T07 I -015-3

Figure 5 Real-time PCR analyses of *hsf8* expressions from individual T07 I transgenic plants of T₁ generation and non-transgenic plants Hajiao5337

Note: 1: Hajiao5337; 2: T07 I -003-1; 3: T07 I -003-2; 4: T07 I -005-1; 5: T07 I -002-2; 6: T07 I -006-1; 7: T07 I -006-2; 8: T07 I -006-3; 9: T07 I -007-1; 10: T07 I -007-2; 11: T07 I -007-3; 12: T07 I -010-1; 13: T07 I -010-2; 14: T07 I -010-3; 15: T07 I -014; 16: T07 I -015-1; 17: T07 I -015-2; 18: T07 I -015-3

RT-PCR 定量法要方便、快速、准确的多, 实时荧光定量 PCR 能检测各种组织细胞中基因的表达丰度, 从而分析基因的表达调控、监控 mRNA 表达模式、

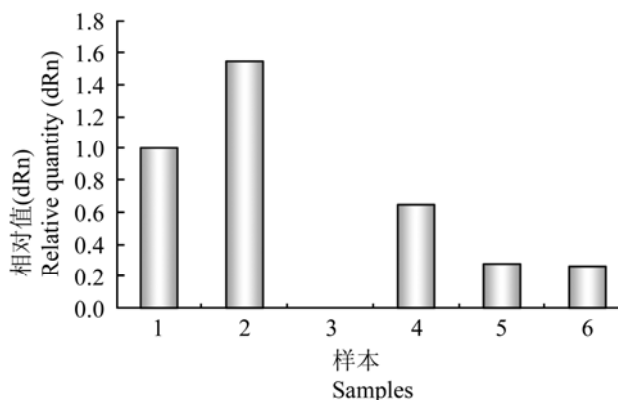


图 6 T07 II 各转基因植株 T₁ 代与哈交 5489 的 *hsf8* 基因的表达值比较柱状图

注: 1: 哈交 5489; 2: T07 II -002-1; 3: T07 II -002-2; 4: T07 II -003; 5: T07 II -010-1; 6: T07 II -010-2

Figure 6 Real-time PCR analyses of *hsf8* expressions from individual T07 II transgenic plants of T₁ generation and non-transgenic plants Hajiao5489

Note: 1: Hajiao5489; 2: T07 II -002-1; 3: T07 II -002-2; 4: T07 II -003; 5: T07 II -010-1; 6: T07 II -010-2

检测组织中少量存在的基因、跟踪细胞群体中克隆、定量分析基因在不同组织中的转录水平等 (Livak and Schmittgen, 2001)。本研究应用 real-time PCR 技术对转基因植株与未转基因的植株 *hsf8* 基因的表达量进行了分析, 因为导入的是大豆本身就存在的内源基因, 所以非转基因的大豆品系哈交 5337 和哈交 5489 本身是有一定的表达量的。从检测结果上看, 有明显超表达和低表达的转基因植株。分

析原因, 高表达是由于目的基因的插入, 增加了基因的拷贝数, 进而增加了目的基因的表达量; 低表达可能是产生了基因沉默现象。

本研究利用基因工程技术将一种与植物耐高温等逆境相关的 *hsf8* 基因构建到双子叶植物表达载体 pCAMBIA3300 中, 以大豆子叶节作为受体, 通过农杆菌介导法介导 *hsf8* 基因进入品质性状优良的两个高产大豆新品系哈交 5337 和哈交 5489 中, 获得转基因植株。在开展大豆遗传转化过程中, 探讨了农杆菌介导大豆子叶节转化体系的影响因素, 优化了转化条件。通过 PCR 及 Real-time PCR 技术检测 *hsf8* 基因在 T₁ 代转基因植株中的整合与表达情况, 证实 *hsf8* 基因已转入到大豆中, 获得转 *hsf8* 基因的新品系。

3 材料与amp;方法

3.1 植物材料

本实验所用大豆转化受体材料为本研究室育成的两个高产新品系哈交 5337 和哈交 5489。

3.2 菌株和质粒

含有 *hsf8* 基因的质粒 pBI121-HSF8 和植物表达载体 pCAMBIA3300 由中国科学院遗传与发育研究所朱保葛老师惠赠。大肠杆菌 DH5 α 购自 TIANGEN 公司, 根癌农杆菌 GV3101 和 LBA4404 由本研究室保存。

3.3 试剂

Taq DNA Polymerase、T₄ DNA 连接酶购自 TaKaRa 公司, 限制性内切酶购自 Promega 公司, Glufosinate-ammonium、6-Benzylaminopurine(6-BA)、Indole-3-utyric (IBA) 购自 Sigma 公司, RNA prep Plant Kit 购自 TIANGEN 公司, Power SYBR[®] Green PCR Master Mix 试剂盒、MicroAmp[™] Optical Adhesive Film Kit 购自 ABI 公司, 反转录试剂购自 Invitrogen 公司, 引物合成和测序均由上海生工完成, 卡那霉素、头孢等均为国产针剂, 其他试剂均为国产分析纯。

3.4 *hsf8* 向 pCAMBIA3300 载体的构建

挑取 pBI121-HSF8 和 pCAMBIA3300 单菌落, 用 LB 液体培养基(Kan⁺), 37 $^{\circ}$ C、200 r/min 培养, 测得 OD₆₀₀=0.4。质粒 pBI121-HSF8 用 *EcoR* I 和 *Hind*

III 双酶切, 回收大小约 2.8 kb 的片段, 含有 35S+*hsf8*+NOS 完整表达结构。载体质粒 pCAMBIA3300 用 *EcoR* I 和 *Hind*III 双酶切, 回收约 8.5 kb 的片段, 连接两个回收片段, T₄ 连接酶 22 $^{\circ}$ C 连接过夜。通过热激法将连接产物转化大肠杆菌 DH5 α 感受态细胞, 用 100 mg/L 的 Km 筛选重组子, 提取阳性质粒转化农杆菌感受态细胞, 涂平板 YEB (Kan⁺, Rif⁺ and Str⁺) 暗培养 48 h, 至菌斑 2 mm 左右。

3.5 农杆菌介导遗传转化

3.5.1 草铵膦筛选浓度确定

根据预备试验结果, 采取延迟筛选方式, 将切取的子叶节在无筛选剂的芽诱导培养基中培养 3 d 左右, 待子叶节上分化的芽点可见时, 将其转到添加有不同浓度草铵膦的芽诱导培养基中对其进行筛选培养。草铵膦的浓度分别为 0、0.5 mg/L、1 mg/L、1.5 mg/L、2 mg/L、2.5 mg/L、3 mg/L、3.5 mg/L 和 4 mg/L。每种处理浓度接种 30 个外植体; 整个试验重复 1 次。于(26 \pm 1) $^{\circ}$ C 下培养 2 周, 计算子叶节的分化率, 分化率按分化的子叶节数占总子叶节数的比率计算。

3.5.2 遗传转化

子叶节制备: 采用氯气消毒法(刘海坤和卫志明, 2002)对选取的大豆种子进行消毒处理。将消毒后的大豆种子接于发芽培养基[1/2 MSB (MS 培养基无机盐成分的 1/2+B5 培养基有机成分的 1/2), 0.7%琼脂粉, pH 5.8]上培养。取 5~6 d 的无菌苗, 从子叶节处纵向切开, 保留 3~4 mm 下胚轴, 切去萌发的顶芽及侧芽, 放入预培养培养基(B5 培养基+1.7 mg/L 6-BA+0.1 mg/L IBA, 0.7%琼脂粉, pH 5.7)。

菌液制备: 从 YEB 培养平板上挑取含有 pCAMBIA 3300-HSF8 的农杆菌 GV3101 和 LBA4404 单菌落, 接于含有抗生素(40 mg/L Rif、50 mg/L Str 和 100 mg/L Kan)的 YEB 液体培养基中, 28 $^{\circ}$ C, 200 r/min 振荡培养 12~24 h 至 OD₆₀₀ 为 0.6 左右。4 000 r/min 离心 10 min, 弃上清, 用等量的 YEB 重悬菌液备用。

转化及筛选培养: 将预培养 1 d 的子叶节放入菌液中侵染, 侵染 25~30 min。之后接种在共培养培养基(B5 培养基+1.7 mg/L 6-BA+0.1 mg/L IBA+100 mg/L 阿魏酸, 0.7%琼脂粉, pH 5.2)上, 暗处培养 3~4 d。用

含 500 mg/L Cef 灭菌水漂洗 4~5 次, 接种到除菌培养基(B5+1.7 mg/L 6-BA+0.1 mg/L IBA+ 600 mg/L Cef, 0.7 %琼脂粉, pH5.7)上培养一周, 待长出丛生芽后将外植体接种到筛选培养基(B5+1.7 mg/L 6-BA+0.1 mg/L IBA+600 mg/L Cef+ 3.5 mg/L 草铵磷, 0.7%琼脂粉, pH 5.7) (唐晓飞等, 2008)。

抗性植株的伸长与生根: 筛选两周后接于伸长培养基(B5+1.7 mg/L 6-BA+0.1 mg/L IBA+600 mg/L Cef+1.75 mg/L 草铵磷, 0.7%琼脂粉, pH5.7); 待丛生芽长至 3~4 cm 时, 从芽基部将芽切下, 并将芽的基部在过滤的 IBA (1 mg/mL)中浸 1 min, 再将芽接入生根培养基 MSB, 待根系发达并有侧根长出后移栽到花盆中。

3.6 转基因植株的 PCR 检测

选取经草铵磷筛选的抗性植株的叶片为材料, 采用 CTAB 法提取大豆总 DNA。根据 CaMV35S 启动子和 *bar* 基因序列设计一段引物进行 PCR 扩增, 扩增片段长度为 594 bp 引物由上海生工生物工程有限公司合成, 引物序列分别为: F: 5'-TTCGCAAGACCCTTCCTC-3'; R: 5'-ACCCACGTCATGCCAGTT-3'。PCR 反应在 ABI 9700 上进行。PCR 反应条件: 94℃ 预变性 5 min; 94℃ 变性 30 s, 55℃ 复性 30 s, 72℃ 延伸 30 s, 30 个循环后 72℃ 延伸 5 min。

3.7 T₁ 代抗性植株的 Real-time PCR 检测

在温室中将 T₁ 代转基因大豆植株与非转基因对照植株(3 周龄幼苗)分别在常温下培养, 分别提取转 *hsf8* 的大豆植株与非转基因对照植株的叶片总 RNA, 并将总 RNA 反转录成 cDNA。以大豆 *lectin* 基因为内参, 目的基因 *hsf8* 及内参各设计 1 对引物。检测 *hsf8* 基因的引物: F: 5'-ATAACTCGGCGGAAACCT-3'; R: 5'-TTGCTGTCGTTGCTCCAT-3'。检测 *lectin* 基因的引物: F: 5'-CTTCGCCGCTTCCTTCAA-3'; R: 5'-GCCCATCTGCAAGCCTTTT-3'。Real-time PCR 反应在 Mx3000p™ 实时荧光定量 PCR 仪上进行。反应条件: 95℃ 预变性 10 min; 95℃ 变性 30 s, 60℃ 复性 1 min, 40 个循环。

设置看家基因为 Normal, 哈交 5337 和哈交 5489 叶片 cDNA 为 Calibrator, T07 I 和 T07 II 的各株系的 T₁ 代植株叶片 cDNA 为 Unknow, 重复 3 次, 设目

的基因和看家基因 NTC 各一个。绘制扩增曲线, 溶解曲线。将含有相对定量的结果放置一个坐标图上, 数据取 3 次重复的平均值。采用比较 C_T 法($\Delta\Delta C_T$), 相对表达量 = $2^{-\Delta\Delta C_T} = 2^{-(\Delta C_T \text{ 样品} - \Delta C_T \text{ 对照})} = 2^{-[(C_T \text{ 样品} - C_T \text{ 内参}) - (C_T \text{ 对照} - C_T \text{ 内参})]}$ 。

致谢

本研究由国家 863 计划资助项目(2006AA1021F9)和国家转基因重大专项(2008ZX08004-002)共同资助。

参考文献

- Busch W., Wunderlich M., and Schöffl F., 2005, Identification of novel heat shock factor-dependent genes and biochemical pathways in *Arabidopsis thaliana*, Plant J., 41: 1-14 doi:10.1111/j.1365-313X.2004.02272.x PMID:15610345
- Lee J.H., and Schöffl F., 1996, An *Hsp70* antisense gene affects the expression of HSP70/HSC70, the regulation of HSF, and the acquisition of thermo tolerance in transgenic *Arabidopsis thaliana*, Mol. Gen. Gen., 252(1-2): 11-19 doi:10.1007/s004389670002 doi:10.1007/BF02173200
- Lee J.H., Hübel A., and Schöffl F., 1995, Derepression of the activity of genetically engineered heat shock factor causes constitutive synthesis of heat shock proteins and increased thermo tolerance in transgenic Arabidopsi, Plant J., 8(4): 603-612 doi:10.1046/j.1365-313X.1995.8040603.x
- Li M.C., Cai Y., Zhao G.L., Caiyin Q.G.L., Zhou H., Sun W., and Xing L.J., 2006, Improvement of cotyledon node regeneration system in soybean (*Glycine max*), Zuowu Xuebao (Acta Agronomica Sinica), 32(2): 223-227 (李明春, 蔡易, 赵桂兰, 财音青格乐, 周皓, 孙伟, 邢来君, 2006, 改良大豆子叶节再生体系的研究, 作物学报, 32(2): 223-227)
- Liu H.K., and Wei Z.M., 2002, A method for sterilizing mature seeds of soybean, Zhiwu Shenglixue Tongxun (Plant Physiology Communications), 38(3): 260-261 (刘海坤, 卫志明, 2002, 一种大豆成熟种子的消毒方法, 植物生理学通讯, 38(3): 260-261)
- Liu S.J., Huang J.Q., and Wei Z.M., 2007, Factors influencing *Agrobacterium*-mediated cotyledonary-node transformation of soybean (*Glycine max* L.), Fenzi Xibao Shengwu Xuebao (Journal of Molecular Cell Biology), 40(5): 286-294 (刘圣君, 黄健秋, 卫志明, 2007, 影响农杆菌介导的大豆子叶节遗传转化的因素, 分子细胞生物学报, 40(5): 286-294)
- Livak K.J., and Schmittgen T.D., 2001, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and

- the 2 ($-\Delta\Delta C(T)$) method, *Methods*, 25(4): 402-408
doi:10.1006/meth.2001.1262 PMID:11846609
- Paz M.M., Martinez J.C., Kalvig A.B., Fonger T.M., and Wang K., 2006, Improved cotyledonary node method using an alternative explant derived from mature seed for efficient *Agrobacterium*-mediated soybean transformation, *Plant Cell Rep.*, 25(3): 206-213 doi:10.1007/s00299-005-0048-7 PMID:16249869 doi:10.1007/s00299-005-0113-2
- Tang X.F., Liu L.J., Zhang X.M., Xue Y.G., Yang Z., Gao M.J., Zhang L., and Wei L., 2008, Improvement of regeneration system in high-yield soybean lines Hajiao5337 and Hajiao 5489, *Dadou Kexue (Soybean Science)*, 27(2): 203-207 (唐晓飞, 刘丽君, 张小明, 薛永国, 杨喆, 高明杰, 张雷, 魏嵘, 2008, 高产大豆新品系哈交 5337 和哈交 5489 再生条件的优化, *大豆科学*, 27(2): 203-207)
- Wang W.X., Vinocur B., and Altman A., 2003, Plant responses to drought, salinity and extreme temperatures: towards genetic engineering for stress tolerance, *Planta*, 218(1): 1-14 doi:10.1007/s00425-003-1105-5 PMID:14513379
- Zhu B.G., Ye C.J., Lv H.Y., Chen X.J., Chai G.H., Chen J.N., and Wang C., 2006, Identification and characterization of a novel heat shock transcription factor gene, *GmHsfA1*, in soybeans (*Glycine max*), *J. Plant Res.*, 119(3): 247-256 doi:10.1007/s10265-006-0267-1 PMID:16570125



BioPublisher是一个致力于发表生物科学研究论文、开放取阅的出版平台

在BioPublisher上发表论文, 任何人都可以免费在线取阅您的论文

- ※同行评审, 论文接受严格的高质量的评审
- ※在线发表, 论文一经接受, 即刻在线发表
- ※开放取阅, 任何人都可免费取阅无限使用
- ※快捷搜索, 涵盖谷歌学术搜索与知名数据库
- ※论文版权, 作者拥有版权读者自动授权使用

在线投稿: <http://chinese.sophiapublisher.com>