

# Preliminary Study on *Agrobacterium*-Mediated Transformation of *DR1372* Gene into *Brassica napus* L.\*

Siwei Zhang<sup>1</sup>, Wenbo Zhou<sup>1</sup>, Xin Zhang<sup>1</sup>, Cuina Chen<sup>1</sup>, Qilin Dai<sup>1</sup>, Jin Wang<sup>2#</sup>

<sup>1</sup>School of Life Science and Engineering, Southwest University of Science and Technology, Mianyang

<sup>2</sup>Biotechnology Research Institute, Chinese Academy of Agricultural Sciences, Beijing

Email: weiweizhibei@163.com, #wjdsz@vip.sina.com

Received: Jan. 2<sup>nd</sup>, 2013; revised: Jan. 10<sup>th</sup>, 2013; accepted: Jan. 16<sup>th</sup>, 2013

**Abstract:** The *DR1372* containing a special domain called WHY was cloned from *Deinococcus radiodurans*. This WHY domain may be involved in the mechanism of drought resistance. In this study, the plant expression vector *DR1372-pBI121* was constructed and introduced into *Brassica napus* L. mediated by *Agrobacteria*. Several factors affecting genetic transformation efficiency were explored and the *Agrobacterium*-mediated genetic transformation system was set up in *Brassica napus*. This study provides essential materials for later research on *DR1372* gene.

**Keywords:** *DR1372*; *Brassica napus* L.; Genetic Transformation; Drought-Tolerance

## 农杆菌介导 *DR1372* 基因转化甘蓝型油菜\*

张思维<sup>1</sup>, 周文波<sup>1</sup>, 张新<sup>1</sup>, 陈翠娜<sup>1</sup>, 代其林<sup>1</sup>, 王劲<sup>2#</sup>

<sup>1</sup>西南科技大学生命科学与工程学院, 绵阳

<sup>2</sup>中国农业科学院生物技术研究所, 北京

Email: weiweizhibei@163.com, #wjdsz@vip.sina.com

收稿日期: 2013年1月2日; 修回日期: 2013年1月10日; 录用日期: 2013年1月16日

**摘要:** *DR1372* 基因是在耐辐射奇球菌(*Deinococcus radiodurans*, *DR*)基因组中克隆得到的一个基因, 其蛋白序列存在一个 WHY 功能域, 此功能域可能参与油菜的抗旱过程。本研究首先构建植物 *DR1372-pBI121* 表达载体, 然后利用农杆菌介导法将目的基因 *DR1372* 成功转入甘蓝型油菜中, 并对影响油菜再生频率以及遗传转化效率的几个因素进行了探讨, 初步建立了油菜转 *DR1372* 基因遗传转化体系, 为 *DR1372* 基因的功能研究奠定了基础。

**关键词:** *DR1372*; 油菜; 农杆菌介导; 遗传转化

### 1. 引言

耐辐射奇球菌因其对电离辐射、干燥、紫外线及一些 DNA 损伤试剂显示超强的抗性, 一直倍受生物

医学界的关注<sup>[1]</sup>。Battista 等推测, 在耐辐射球菌中的抗逆性研究将用于引导较高生物体的抗逆性研究<sup>[2]</sup>。*DR1372* 基因就是在耐辐射奇球菌基因组中克隆得到的一个基因, 对 *DR1372* 蛋白序列进行分析, 其内部存在一个 WHY 功能域非特异性结合位点。Francesca 等人研究证实, WHY 功能域与脱水素具有同源性, 是参与植物水分胁迫应答以及超敏应答的一类功能域

\*基金项目: 转基因生物新品种培育重大专项(2009ZX08009-091B), 国家自然科学基金(30871555), 教育部新世纪优秀人才支持计划(NCET-08-0940), 四川省教育厅(09ZA034)和西南科技大学博士研究基金(11zx7104), 农业部公益性行业科研专项(201103007)。

#通讯作者。

[3]。脱水素是一类亲水性蛋白质，它们在胚胎发生后期阶段产生，对低温、外源 ABA、干旱、盐渍以及脱水胁迫反应迅速，进而在植株中积累<sup>[4,5]</sup>。这些间接证据表明，*DR1372* 基因可能会参与植物的抗旱性应答。

本实验室把 *DR1372* 基因转入大肠杆菌后，经初步定性分析发现，在大肠杆菌中有稳定细胞膜，调节细胞内外渗透压的作用，初步推测为与调节水分胁迫应答有关的基因。本研究首先构建植物 *DR1372-pBI121* 表达载体，利用农杆菌介导法将 *DR1372* 基因转入油菜中，并对影响油菜再生频率以及遗传转化效率的几个因素进行了探讨，初步建立了转 *DR1372* 基因油菜遗传转化体系，为该基因耐盐抗旱研究提供了植物材料，也为 *DR1372* 包括 WHy 功能域的功能研究奠定了基础。

## 2. 实验材料

### 2.1. 菌株

含有携带基因 *DR1372* 的穿梭质粒(*DR1372 + Z3*)的大肠杆菌 DH5 $\alpha$  由中国农业科学院生物技术研究所提供。

根癌农杆菌 EHA105 以及大肠杆菌 JM109 由本实验室保存。

### 2.2. 植物材料

供试的甘蓝型油菜 84100-18(玻里马细胞质雄性不育恢复系)，由四川大学遗传学实验室提供。

### 2.3. 培养基

LB 液体培养基：用胰蛋白胨 10 g、酵母提取物 5 g、NaCl 10 g，溶于 ddH<sub>2</sub>O 中，定容至 1 L，pH 7.0，高压灭菌；

农杆菌摇菌培养基：LB + Rif 40 mg/L + Str 20 mg/L + 卡那霉素 50 mg/L；

预培养基：MS + 6-BA 2.0 mg/L + AgNO<sub>3</sub> 2.5 mg/L + 2, 4-D 1.0 mg/L + AS 100  $\mu$ mol/L；

筛选培养基：MS + 6-BA 2.0 mg/L + 卡那霉素 10 mg/L + AgNO<sub>3</sub> 2.5 mg/L + Cab 500 mg/L；

生根培养基：1/2 MS + Cef 250 mg/L + NAA 0.15 mg/L。

## 3. 实验方法

### 3.1. 构建 *DR1372-pBI121* 植物表达载体

#### 3.1.1. PCR 扩增目的基因 *DR1372*

根据 *DR1372* 基因序列，利用生物软件 Primer5 设计出该基因的上、下游引物(分别命名为 *DR1372-F*，*DR1372-R*)；根据 *pBI121* 质粒图谱，分别引入 XbaI，SacI 限制性酶切位点，并设计引物如下(加粗标记示酶切位点)：

*DR1372-F*: 5'---GCTCTAGA ATGAAGAAGAT GGCTTTTGCG----3'

*DR1372-R*: 5'--- CGAGCTC TCAAAACACCGA TAAAGGCGC----3'

用试剂盒(TIANGEN)提取 *DR1372 + Z3* 质粒，以此作为模板，在最优扩增体系下进行 *DR1372* 基因 PCR 扩增。电泳验证。

#### 3.1.2. *pBI121* 质粒的提取

用试剂盒(TIANGEN)提取 *pBI121* 质粒。电泳验证。

#### 3.1.3. PCR 产物 *DR1372* 与质粒 *pBI121* 胶回收

PCR 产物经电泳检测后，使用琼脂糖凝胶 DNA 回收试剂盒(TIANGEN)回收扩增的目的片段 *DR1372* 和与质粒 *pBI121*。电泳验证。

#### 3.1.4. *DR1372* 基因和 *pBI121* 的酶切，连接，筛选及鉴定

目的片段 *DR1372* 和 *pBI121* 质粒用 XbaI, SacI(购自 Takara 公司)进行双酶切，37 $^{\circ}$ C 酶切过夜，回收目的片段。将胶回收的目的基因片段和 *pBI121* 质粒大骨架片段，16 $^{\circ}$ C 连接过夜，重组质粒转化 JM109 感受态细胞。然后进行菌落 PCR 初步鉴定，将 PCR 检测出的阳性单克隆摇菌后送华大基因公司测序。最后挑取测序成功的 JM109 单菌落，继代培养，保菌。将保存菌种摇菌提取质粒，得到 *DR1372-pBI121* 植物表达载体。最后，将 *DR1372-pBI121* 植物表达载体导入农杆菌 EHA105 浸染备用，具体参照余云舟等方法<sup>[6]</sup>。

### 3.2. 转 *DR1372* 基因油菜遗传转化体系的建立

#### 3.2.1. 油菜无菌苗的培养

将甘蓝型油菜种子用无菌水清洗两次，浸泡 10

min, 用 75% 乙醇消毒 2 min 后, 灭菌水清洗两遍, 然后用浓度为 0.1% 的升汞溶液消毒 15 min, 最后用灭菌水洗 5 遍。把消毒的油菜种子均匀地摆放在无植物激素的 MS 固体培养基上。在 25℃ 室温下进行光照培养, 生长 5~6 d。

### 3.2.2. 外植体的预培养

用剪刀剪取油菜无菌苗紧邻生长点以下约 0.5 cm 长的下胚轴, 置于预培养基上, 光照预培养 1~4 d。

### 3.2.3. 根癌农杆菌浸染浓度以及侵染时间的确定

在 50 mL 农杆菌摇菌培养基中加入 0.5 ml 载有 *DR1372~pBI121* 植物表达载体的 EHA105 菌液, 在 28℃ 下 200 rpm 振荡培养过夜至对数生长期, OD600 约为 1.0 左右。取上述菌液于 4℃ 下 5000 rpm 离心 15 min 后, 弃上清, 收集菌体, 用 MS 液体培养基重悬, 将 OD600 值为 1.0 的菌液稀释为 OD600 = 0.1、0.3、0.4 和 0.5。用上述不同浓度的菌液侵染已知数量的预培养下胚轴, 侵染时间分别为 50 s、90 s、130 s、170 s。侵染期间使外植体充分与菌液接触, 然后取出浸染后的外植体, 在灭菌滤纸上吸干多余菌液, 重新转入预培养基中暗培养 2 d 后观察培养情况。

### 3.2.4. 转基因抗性植株的获得

把暗培养 2 d 后的下胚轴转入到卡那霉素筛选培养基上进行筛选培养, 每两周继代, 直至再生出幼芽。当幼芽长到 1~2 cm 高时, 去掉愈伤组织, 并将幼芽转移到生根培养基中。待其生长到 5~6 cm 高, 根长 5~6 cm 以及根的数量为 10 条以上时, 半敞开培养瓶盖进行炼苗; 待幼苗适应外界环境以后, 移栽到室内灭菌的盆土中(腐殖土:蛭石 = 2:1), 并用 1/2 MS 培养液浇灌, 移栽出一周内给小苗外罩烧杯保湿, 最终得到具有卡那霉素抗性的油菜。

### 3.2.5. 转基因抗性植株的 PCR 检测

取甘蓝型油菜(非转基因型)和转基因再生的卡那霉素抗性植株叶片, 用 CTAB 法提植物总 DNA, 具体方法参照文献《植物基因工程原理与技术》<sup>[7]</sup>。取以上制备的总 DNA 为模板, 在 25 微升反应体系中, 按标准反应程序对 *DR1372* 基因进行 PCR 扩增。具体反应条件为: 94℃, 5 min; 94℃, 1 min; 58℃, 30 s; 72℃, 30 s; 30 cycles; 72℃, 10 min。

## 4. 结果

### 4.1. *DR1372-pBI121* 质粒植物表达载体的构建

#### 4.1.1. *DR1372* 基因的扩增

提取 *DR1372 + Z3* 质粒, 电泳结果如图 1(A)所示, 目标基因条带清晰, 无弥散现象, 可以用于 PCR 扩增。利用 *DR1372-F* 和 *DR1372-R* 引物对 *DR1372* 基因进行 PCR 扩增, 其电泳结果如图 1(B)。 *DR1372* 基因分子大小为 495 bp, 条带位置正确, 并为单一条带。最后对 PCR 产物进行胶回收。

#### 4.1.2. *pBI121* 质粒的提取

提取 *pBI121* 质粒后进行电泳, 其电泳结果如图 1(C)所示, 所提取的目标基因条带清晰, 无弥散现象, 可以进行酶切。

#### 4.1.3. *DR1372* 与 *pBI121* 的双酶切

对 *DR1372* 胶回收产物进行双酶切, 经电泳胶回收后如图 1(D)所示。同时对 *pBI121* 质粒进行双酶切, 其电泳图和胶回收情况见图 1(E)和图 1(F)。

#### 4.1.4. *DR1372-pBI121* 质粒转化大肠杆菌 JM109

*DR1372-pBI121* 质粒转化到 JM109 后, 经培养后挑取抗卡拉霉素单菌落直接进行 PCR 扩增, 其扩增的部分结果如图 1(I), 结果表明: 有多个菌落显示为阳性, 阳性克隆送去测序, 测序反馈结果经基因软件分析, 目的序列与 *DR1372* 序列完全一致, 说明 *DR1372* 外源基因成功导入到了大肠杆菌 JM109 中。

#### 4.1.5. *DR1372-pBI121* 质粒转化大肠杆菌 EHA105

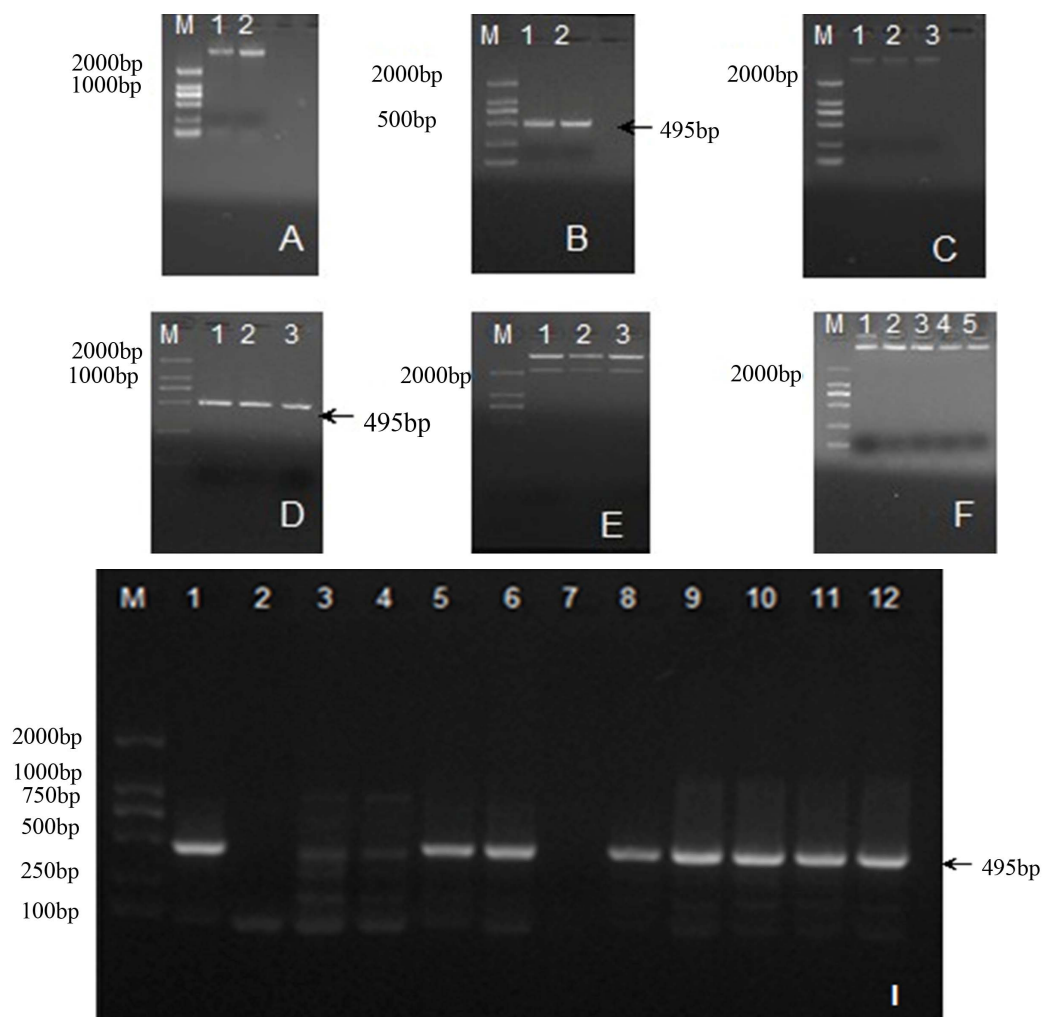
将测序正确的 JM109 单菌落扩大培养后提取质粒并转化 EHA105 感受态, 得到的单菌落进行菌落 PCR 验证, 结果如图 2。由图 2 可知, 可以选择 1~2、4~6 号保菌做浸染外植体用, 阳性率为 66.67%。

## 4.2 油菜转 *DR1372* 基因遗传转化体系的建立

### 4.2.1. 预培养时间对遗传转化的影响

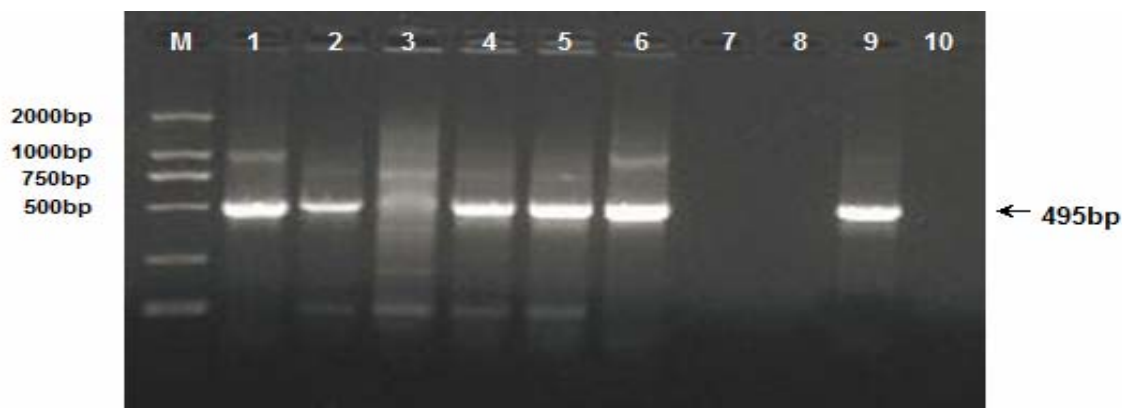
我们的实验结果表明, 对不经过预培养或预培养 1 d 的外植体进行农杆菌浸染, 下胚轴分化不明显, 感染后出现较严重的褐化和死亡现象, 出芽率较低。当预培养时间为 2 d 左右时, 对外植体进行侵染, 出芽率达到最高的 7.86%, 与 Charest<sup>[8]</sup>等人的研究一致。若预培养时间超过 4 d, 外植体切面创伤逐渐愈合致

农杆菌介导 *DR1372* 基因转化甘蓝型油菜



A: *DR1372* + Z3 质粒电泳条带 A: Agarose gel electrophoresis of *DR1372*; B: *DR1372* 扩增条带 B: Agarose gel electrophoresis of *DR1372* PCR product; C: *pBI121* 质粒提取验证 C: Agarose gel electrophoresis of *pBI121*; D: *DR1372* 双酶切后胶回收 D: Agarose gel electrophoresis of *DR1372* digested by XbaI and SacI; E: *pBI121* 双酶切电泳图 E: Agarose gel electrophoresis of *pBI121* digested by XbaI and SacI; F: *pBI121* 双酶切胶回收验证 F: Agarose gel electrophoresis of *pBI121* backbone; I: JM109 菌落 PCR 验证 I: 1: Positive control; 2: Negative control; 3-10: PCR products of JM109 with *pBI121-DR1372* clone.

Figure 1. PCR products of JM109 with *pBI121-DR1372* clone  
图 1. JM109 菌落 PCR 验证



M: DL2000 Maker; 9: 阳性对照; 10: 阴性对照; 1-8: 单克隆菌落 PCR。

Figure 2. Analysis of colony PCR products  
图 2. EHA105 的菌落 PCR 验证

使农杆菌很难侵染，玻璃化率以及白化率急剧增高，从而使出芽率降低。结果表明，对下胚轴进行 2 d 的预培养可得到最高 7.86% 的出芽率(表 1)。

#### 4.2.2. 农杆菌菌液浓度和侵染时间对遗传转化的影响

适宜的农杆菌感染浓度和感染时间是遗传转化成功与否的重要因素<sup>[9]</sup>。我们的试验表明，如果菌液浓度过大或偏低，感染时间过长或不足，会导致外植体被侵染过度致死或未被感染。当农杆菌浓度达到 0.5 以上时，外植体褐化严重，且农杆菌大量生长，无法抑制，外植体在共培养和筛选试验中会慢慢死亡，导致转化率极低；但是当农杆菌浓度小于 0.2 时，经过筛选几乎得不到绿芽。农杆菌菌液浓度在 0.3~0.5 之间处理外植体 90 s，得到了较多的抗性芽。由表 2 可以看出，以 OD600 = 0.4 的菌液处理外植体 90 s，转化

效率最高，达到 8.93%。

#### 4.2.3. 转 DR1372 油菜抗性植株的获得

转 DR1372 抗性植株获得的过程如图 3 所示，共获得卡那霉素抗性植株 169 株，对其进行 PCR 检测如图 4 所示，有 123 株显示出阳性，阳性率为 72.8%。

Table 1. Effect of pre-incubation time on budding rate of rape callus

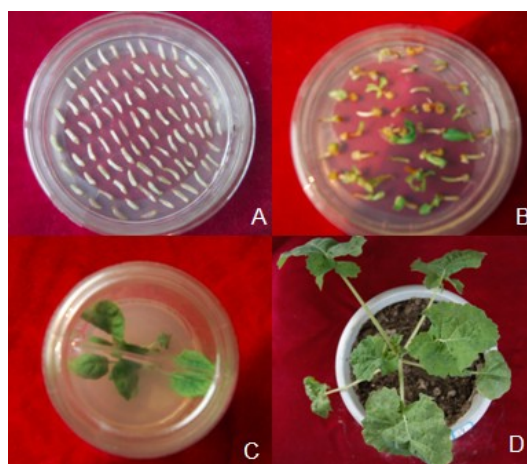
表 1. 预培养时间对抗性芽率的影响

预培养时间(d)	愈伤率(%)	玻璃化率(%)	白化率(%)	出芽率(%)
0	0	0	0	0
1	40.7	0	0	4.12
2	63.9	3.4	2.2	7.86
3	94.6	18.6	13.2	6.45
4	99.3	12.3	17.9	3.37

Table 2. Effect of concentration of bacterium fluid and infection time on budding rate of rapeseed hypocotyls

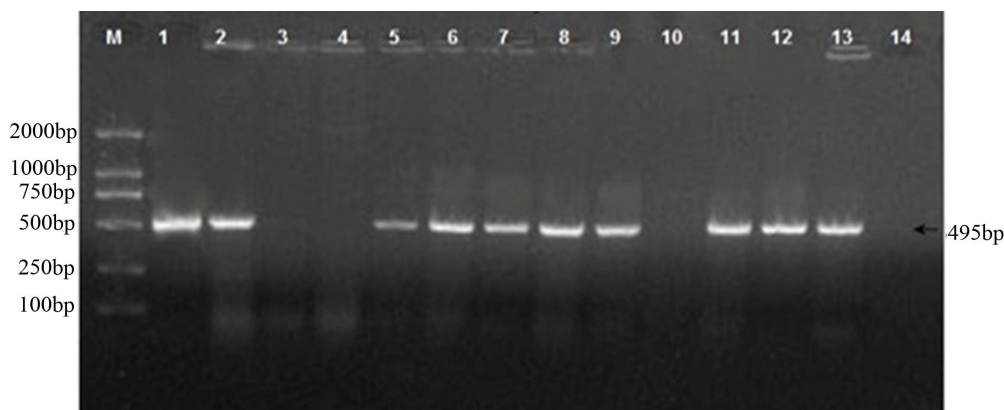
表 2. 农杆菌菌液浓度和侵染时间对抗性芽率的影响

感染时间(s)	菌液浓度(OD600)	侵染下胚轴数	再生绿芽下胚轴数	出芽率(%)
50	0.4	120	3	2.50
	1.0	138	2	1.45
	0.1	145	0	0
	0.3	134	9	6.72
90	0.4	168	15	8.93
	0.5	167	12	7.19
	1.0	182	3	1.65
130	0.1	137	0	0
	0.4	99	2	2.02
170	0.1	116	0	0
	0.5	124	0	0



A: 下胚轴; B: 抗性芽; C: 生根培养; D: 移栽成活苗。

Figure 3. Regenerated seedlings on screening medium with kanamycin  
图 3. 油菜在卡拉酶素筛选培养基上再生的抗性苗



M: DL2000 Maker; 1: 阳性对照; 14: 阴性对照; 2~13: 抗性植株。

Figure 4. PCR test of DR1372 gene in transgenic plants  
图 4. 转 DR1372 基因油菜 PCR 检测

## 5. 讨论

本研究首先构建 DR1372-*pBI121* 载体, 载体上带有一个 GUS 基因, 以及 CaMV35S 强启动子和 NOS 终止子。将植物表达载体 DR1372-*pBI121* 载体导入农杆菌 EHA105 中, 利用农杆菌介导法转化油菜下胚轴, 得到卡那霉素抗性植株 169 株。提取抗性植株基因组 DNA, 经 PCR 检测, 有 123 株显示为阳性, 造成假阳性的原因可能是卡那霉素的筛选压强度不足导致。

在油菜下胚轴浸染农杆菌以后, 预培养时间的长短对细胞正常分化有很大影响。预培养时间过长, 下胚轴切段形成松散型的愈伤组织, 这类愈伤组织转到分化培养基上大多变褐死亡<sup>[10]</sup>。预培养能够促进细胞分裂, 处于分裂状态的细胞更容易与外源 DNA 整合, 从而提高转化率。同时, 在预培养基中加入适量浓度的 6-BA、2, 4-D、AgNO<sub>3</sub> 以及 AS, 也会对转化率产生影响<sup>[11]</sup>。王艳<sup>[12]</sup>等的研究也表明, 添加一定浓度的乙酰丁香酮也能够提高油菜的再生频率及转化率。本研究中, 随着预培养时间的延长, 转化效率先是升高然后降低。适宜的农杆菌感染浓度和感染时间是遗传转化成功与否的重要因素, 菌液浓度过高或过低、侵染时间过长或过短都会直接影响转化率。本研究结果表明, 油菜转 DR1372 基因遗传转化体系的最适宜转化条件为: 甘蓝型油菜苗下胚轴在预培养为 2 d 时, 达到最高的出芽率; 而菌液浓度 OD<sub>600</sub> = 0.4 时为最佳的农杆菌菌液浸染浓度, 最佳的侵染时间为 90 s。

Francesca D. 等人的研究表明, WHy 结构域在植物中具有抗水分胁迫和高敏反应等干燥应答功能<sup>[3]</sup>, 将 DR1372 基因通过基因工程手段转入油菜中可能会

提高油菜的抗旱性, 以此为基础通过培育油菜抗旱品种, 可以降低干旱对油菜产量的影响。WHy 功能域作为一种干旱响应蛋白, 在国内外的研究中鲜有报道, 而且在植物体内的抗水分胁迫应答机制中, 是 WHy 功能域独自发挥了作用还是与某些特定的序列协同发挥响应, 这一问题有待进一步探究。

## 参考文献 (References)

- [1] A. W. Anderson, H. C. Nordon, R. F. Cain, G. Parrish and D. Duggan. Studies on a radio-resistant micrococ-cus. I. Isolation, morphology, cultural characteristics, and resistance to gamma radiation. *Food Technology*, 1956, 10: 575-578.
- [2] E. Cominelli, T. Sala, D. Calvi, et al. Over expression of the arabidopsis AMYB 41 gene alters cell expans ion and leaf surface permeability. *The Plant Journal*, 2008, 53(1): 53-64.
- [3] F. D. Ciccarelli, P. Bork. The WHY domain mediates the response to desiccation in plants and bacteria. *Discovery Note*, 2005, 21(8): 1304-1307.
- [4] J. Ingram, D. Bartels. The molecular basis of dehydration tolerance in plants. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology*, 1996, 47: 377-403.
- [5] 刘广宇, 魏令波等. 植物脱水素研究进展[J]. *生物工程进展*, 2001, 21(2): 35-38.
- [6] 余云舟, 杜娟. 重组质粒导入根瘤农杆菌冻融法的研究[J]. 2003, 25(3): 257-259.
- [7] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程原理与技术(第一版)[M]. 北京: 科学出版社, 1998: 600-601.
- [8] P. J. Charest, L. A. Holbrook, J. Gabard, et al. Agrobacterium mediated transformation of thin cell layer explants from *Brassica napus* L. *Theoretical and Applied Genetics*, 1988, 75(3): 438-445.
- [9] 黄琼华, 杨光伟. 农杆菌介导法将 FPF1 基因导入油菜的研究初报[J]. *西南农业大学学报*, 2002, 24(2): 124-127.
- [10] 蓝海燕, 王长海等. 农杆菌介导法将  $\beta$ -1,3-葡聚糖酶基因导入油菜的研究初报[J]. *中国油料作物学报*, 2000, 22(1): 6-10.
- [11] 石淑稳, 周永明等. 甘蓝型油菜遗传转化体系的研究[J]. *华中农业大学学报*, 1998, 17(3): 205-210.
- [12] 王艳, 曾幼玲等. 农杆菌介导 NHX 基因转化甘蓝型油菜的研究[J]. *作物学报*, 2006, 32(2): 278-282.