

薹白 EPSP 基因对亚麻的转化及检测

李博¹, 黄丽华¹, 蒋向¹, 李育强², 张学文^{1*}

(1.湖南农业大学 生物科学技术学院, 湖南 长沙 410128; 2.湖南省棉花科学研究所, 湖南 常德 415101)

摘 要: 薹白 EPSP 基因编码 5-烯醇丙酮莽草酸-3-磷酸合酶, 对除草剂草甘膦具有一定的抗性。利用该基因构建植物表达重组体。薹白 EPSP cDNA 重组到植物表达载体 pWM101 中, 构建成 35S 启动子控制的植物组成型表达载体, 利用农杆菌介导法将其转入亚麻, 经过潮霉素筛选获得了抗性的愈伤组织, 诱导分化后获得了亚麻苗。经特异引物的 PCR 扩增, 证明目的基因已经整合到亚麻基因组中, 对转基因亚麻愈伤组织及幼苗进行的草甘膦抗性检测表明, 转基因亚麻对草甘膦的耐受性明显提高。

关 键 词: 亚麻; 薹白 EPSP 合成酶基因; 遗传转化

中图分类号: Q786 文献标志码: A 文章编号: 1007-1032(2010)01-0012-05

Conversion and detection of *Linum usitatissimum* with EPSP gene

LI Bo¹, HUANG Li-hua¹, JIANG Xiang¹, LI Yu-qiang², ZHANG Xue-wen^{1*}

(1.College of Bioscience and Biotechnology, HNAU, Changsha 410128, China; 2.Institute of Cotton Science of Hunan, Changde, Hunan 415101, China)

Abstract: EPSP gene encodes the enzyme of 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase. The enzyme in *Allium macrostemon* Bunge shows some glyphosate resistance. It may improve the glyphosate resistant ability if transformed into flax (*Linum usitatissimum* L.). In this study, the gene cDNA (*EPSPsA*) was formerly cloned from *Allium macrostemon* and Bunge was inserted into the vector pWM101 to construct a recombinant expression gene. The gene is under the control of a consistent expression promoter 35S. The recombinant gene was transformed into fiber flax by *Agrobacterium tumefaciens* mediated callus transformation. The transformed calluses are subject to hygromycin screening and resistance callus are induced in induction and differentiation culture. The transformed seedlings are obtained and verified by PCR. The *EPSPsA* gene was integrated into genome of the flax. The glyphosate resistance detection of transgenic flax callus and seedlings proved that the *EPSPsA* can improve the glyphosate tolerance of flax.

Key words: flax; *Allium macrostemon* Bunge EPSPs cDNA; transformation

亚麻是最早取得转基因成功的作物之一, 1987 年通过愈伤组织转化获得了亚麻转基因植株^[1]。McHugen 等 1989 年建立了根癌农杆菌介导的亚麻遗传转化系统, 将 ALS 基因导入亚麻, 获得了抗除草剂草胺磷的转基因品种, 并已经进入商业化生产^[2]。抗磺隆类除草剂转基因品种 CDC Triffid 于 1996 年获得转基因品种登记证书^[3]。Zhan Xiang-can 等发现利用发根农杆菌浸染亚麻下胚轴和子叶

可以形成发根并可发育成再生植株^[4]。王玉富等以亚麻幼苗下胚轴为外植体, 利用抗除草剂 Basta 的目的基因 Barnase 和 GUS-INT 基因, 采用农杆菌介导法进行了亚麻转基因^[5]。王毓美等以几丁质酶基因对亚麻的遗传转化, 经抗性小芽生根筛选及叶片抗性检测, 推断几丁质酶基因已经整合到亚麻基因组中^[6]。康庆华等^[7]利用农杆菌介导法进行亚麻黑亚 11 号和黑亚 9 号转抗除草剂 Basta 基因转化, 获

收稿日期: 2009-10-12

基金项目: 湖南省科学技术厅项目(07JJ5040)

作者简介: 李博(1985-), 男, 湖南长沙人, 硕士研究生; *通讯作者: xwzhang@hunau.net

得了转化的愈伤组织^[8]。黑龙江省亚麻原料工业研究所与中科院遗传研究所合作进行兔防御素 NP-1 基因^[9]在转基因亚麻中的表达及其对亚麻枯萎病^[10]和立枯病^[11]的抗性研究,目前已获得了转基因植株。

亚麻作为草本作物,在规模化栽培过程中杂草控制比较困难,抗除草剂的基因工程研究中,最受关注的是抗草甘膦的基因工程。草甘膦是一种环境友好型除草剂,其作用的靶为芳香族氨基酸合成过程的关键酶 EPSP 合成酶。EPSP 催化 3-磷酸莽草酸 (S3P) 与磷酸烯醇式丙酮酸 (PEP) 合成 5-烯醇式丙酮酸-3-磷酸莽草酸 (EPSP)^[12-14],草甘膦是 PEP 的类似物,它能与 PEP 竞争性抑制 EPSP 合成酶的活性,阻断 EPSP 的合成,从而阻断植物芳香族氨基酸的合成,导致植物死亡^[15]。

蒋向等^[16]从具有较强草甘膦抗性的葱属植物薤白 (*Allium macrostemon* Bunge) 中分离克隆了其 EPSP 合成酶基因 *EPSPsA* cDNA, 并对该基因的表达进行了分析。笔者利用已克隆的抗草甘膦薤白 *EPSPsA* cDNA, 构建植物表达 *EPSPsA* 重组载体转化亚麻, 以探讨薤白抗草甘膦 *EPSPsA* cDNA 的表达及抗草甘膦的作用。

1 材料与方 法

1.1 材 料

供试亚麻由中国农科院麻类研究所提供。大肠杆菌 *InVαF'* 和根癌农杆菌 LBA4404, 克隆的薤白 *EPSP* 基因 cDNA (pMD-EPSPsA) 质粒、植物表达载体 pWM101 由湖南农业大学细胞生物学研究室保存。

亚麻培养采用 MS + 2 mg/L KT、3.5 mg/L IAA + 适量氨基酸进行共培养; 共培养基 + 50 mg/L 潮霉素 B + 500 mg/L 头孢曲松钠进行筛选培养; MS + 0.02 mg/L 6-BA + 0.01 mg/L NAA + 50 mg/L 潮霉素 B + 500 mg/L 头孢曲松钠进行愈伤组织诱导和发芽; MS + 0.01 mg/L NAA 诱导生根; YEB 培养基: 0.5 g/L MgSO₄ + 1 g/L 酵母提取物 + 5 g/L 胰化蛋白胨 + 5 g/L 牛肉浸膏 + 5 g/L 蔗糖 + 15 g/L 琼脂。

1.2 方 法

1.2.1 表达载体的构建

通过 BioEdit 软件分析 *EPSP* 基因中的酶切位点, 结合植物表达载体 pWM101 上的多克隆位点, 在克隆载体 pMD-EPSPsA 上、下游分别引入 *Xba* I 和 *Pst* I 限制内切酶的酶切位点, 设计引物分别为上游引物 P1: 5'-AACTGCAGGATGGTTCAGCAATGCTGAC-3' 和下游引物 P2: 5'-GCGTCGACCCATCGAAGCACCTGGTTC-3', 构建表达载体 (图 1)。用热激法将重组质粒转化大肠杆菌进行 Amp 抗性筛选和 X-gal/IPTG 蓝白斑筛选, 选取白色菌落做菌落 PCR。将检测为阳性的菌落进行液体培养, 强碱法制备质粒 DNA, 以限制性内切酶 *Xba* I 和 *Pst* I 酶切。检测重组质粒插入目的片段的情况后, 采用电击转化法将构建正确的表达载体 pWM-EPSPsA 转化农杆菌 LBA4404。

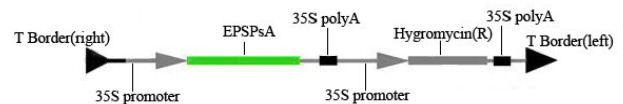


图 1 植物表达载体 pWM101-EPSPsA 的构建

Fig.1 Construction of plant expression vector pWM101-EPSPsA

1.2.2 根癌农杆菌的电激转化

将根癌农杆菌 LBA4404 单菌落接入 5 mL YEB 培养基中, 28 °C 振荡培养过夜。以 10% 的接种量转接至 50 mL YEB 培养液中, 28 °C、150 r/min 振荡培养至对数生长期 (OD_{600} 为 0.8 ~ 1.2)。4 °C、8 000 r/min 离心 10 min, 收集菌体, 用预冷的无菌双蒸水洗涤 4 次, 用无菌预冷 10% 的甘油洗涤, 离心, 以 Bio-Rad 电激仪转化农杆菌。

1.2.3 农杆菌共培养法转化亚麻下胚轴

选择饱满度好、有光泽的供试亚麻种子, 用 75% 的乙醇浸 5 min 后, 用 20% 的漂白液浸 20 min, 再用无菌水冲洗 3 次, 接种到 MS 培养基上, 在 25 °C 黑暗条件下培养 5~7 d。在使用前 2 d 置于 22 °C、每天 16 h 光照条件下培养备用。工程农杆菌 YEB 液体培养基加卡那霉素 50 mg/L、28 °C 摇瓶培养 2 d。将 50 mL 培养物 4 000 g 离心收集细菌, 用 MS 液体培养基悬浮细菌, 使 OD_{600} 值 0.5~0.6。将备用的亚麻下胚轴剪成 0.3~0.5 cm 的小段, 用农杆菌悬浮液浸

10~20 min, 无菌滤纸吸干后分别接种到顶层置滤纸的培养基上, 24~26 °C、每天光照16 h共培养3 d后, 用10 mmol/L MgSO₄ 浸10~20 min, 控制农杆菌的继续生长. 将培养3周的愈伤组织接种到再生植株诱导培养基, 24~26 °C、每天光照14~16 h, 诱导再生植株生长. 将获得的再生芽接种到含有抗性筛选的抗生素的培养基上继续筛选2次. 再生植株3~5 cm 时转接生根培养基上. 诱导生根一个月后, 大部分苗已长出繁茂的根, 将PCR阳性苗移入珍珠岩中培养, 当株高达到20 cm左右, 根系比较发达以后, 移栽至土壤获得转基因亚麻苗, 在移栽的同时种植同品种的未转化种子作对照.

1.2.4 转基因亚麻的PCR检测

取转基因亚麻和对照亚麻嫩叶, 采用安比奥公司GenoDNA Plant Mini Kit试剂盒提取基因组DNA, 作为PCR反应模板. 以P1、P2为引物, pWM-EPSPsA质粒为阳性对照, PCR检测转基因情况.

1.2.5 转基因亚麻的草甘膦抗性检测

将通过潮霉素抗性筛选的愈伤组织接种到草甘膦质量浓度为0、200、400、800、1 200、2 000和3 000 mg/L MS培养基上, 25 °C、6 h光照和8 h黑暗交替培养, 检测转基因亚麻愈伤组织对草甘膦的抗性. 当移栽后的转基因亚麻植株长到10~15 cm时, 用质量浓度为200、400、800和1 000 mg/L草甘膦溶液喷洒叶片, 喷后10~15 d调查植株草甘膦抗性.

1.2.6 EPSPsA 基因转录表达分析

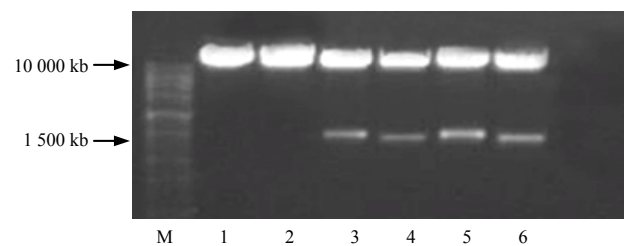
随机选取4个PCR检测阳性的转基因植株, 进行EPSPsA基因的转录表达分析. 取对照亚麻及转基因亚麻叶片, 用Trizol(Introgen)抽提总RNA. 采用Fermentas公司反转录试剂盒将RNA反转录为cDNA, 作为半定量RT-PCR扩增的模板. 以亚麻18S rRNA为内参基因, 扩增引物, 上游引物: 5'-ATGATAACTCGACGGATCGC-3'、下游引物: 5'-CTTGGATGTGGTAGCCGT-3', 扩增片段大小为189 bp. EPSPsA基因扩增引物, 上游引物: 5'-GTTAACGTC AACAGCTTTCAATCTC-3', 下游引物: 5'-ATCCCGACAGTGCTACATATGAGAG-3', 扩增片段大小为539 bp.

18 SrRNA与目的基因采用同机分管扩增.PCR产物经1%琼脂糖凝胶电泳检测, 凝胶照相.

2 结果与分析

2.1 表达载体的构建与鉴定

植物表达载体pWM101-EPSPsA按照重组过程进行构建后转化大肠杆菌InvαF', 在转化平板上随机挑取10个菌, 进行菌落PCR检测. 提取质粒, 用Xba I和Pst I酶切, 获得大小约1.5 kb的预期带(图2).



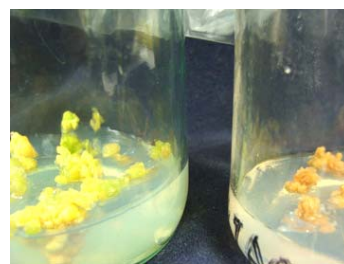
M DNA分子量标准; 1 对照; 2~6 pWM101-EPSPsA的双酶切鉴定.

图2 表达载体pWM101-EPSPsA的双酶切检测

Fig.2 Identification of the pWM101-EPSPsA digested by Xba I and Pst I

2.2 农杆菌共培养转化亚麻

农杆菌转化后的下胚轴转入含头孢曲松钠(500 mg/L)和潮霉素(50 mg/L) MS固体培养基中, 1周后, 对照组下胚轴逐渐褐化死亡. 转基因亚麻下胚轴培养3周后, 分化出不定芽(图3).



左, 转基因下胚轴产生抗性愈伤组织; 右, 对照亚麻下胚轴逐步坏死.

图3 转基因亚麻下胚轴愈伤组织诱导与筛选

Fig.3 Transgenic hypocotyl callus induced and screened

2.3 转基因亚麻的PCR检测

选取10株转基因植株, 分离其叶片基因组DNA, 以蕈白EPSPsA特异性引物进行扩增, 获得了预期大小(1.6 kb)的DNA, 证明蕈白EPSPs基因已经整合入亚麻基因组中(图4).

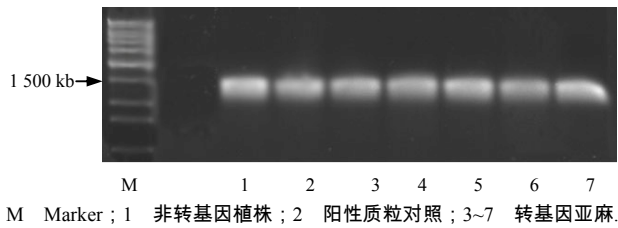
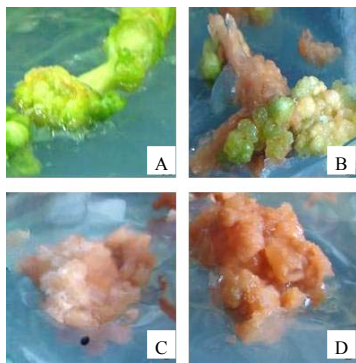


图 4 转基因亚麻的PCR检测
Fig. 4 PCR analysis of transgenic flax

2.4 转基因亚麻愈伤对草甘膦抗性的检测

将转基因愈伤组织接种到含不同质量浓度的草甘膦培养基上，25℃、16 h 光照和 8 h 黑暗交替培养，2 周后观察，对照愈伤组织在草甘膦质量浓度为 50 mg/L 时已全部坏死，而转基因亚麻愈伤组织在 800 mg/L 时仍可以缓慢生长，当草甘膦质量浓度达到 1 200 mg/L 时愈伤才逐步坏死(图 5)。



A 在正常 MS 培养基上生长的转基因亚麻愈伤；B 在含有 800 mg/L 草甘膦 MS 培养基上缓慢生长的转基因亚麻愈伤；C 在含有 50 mg/L 草甘膦 MS 培养基上生长 2 周的对照亚麻愈伤；D 在含有 1 000 mg/L 草甘膦 MS 培养基上的转基因亚麻愈伤。

图 5 转基因亚麻愈伤组织的草甘膦抗性
Fig. 5 Resistance of transgenic tobacco callus to glyphosate

2.5 转基因亚麻植株对草甘膦抗性的检测

转基因亚麻(图6)炼苗后转入土壤栽培，壮苗后以草甘膦进行喷雾处理，1周后对照植株明显变



左未经转化的植株；右经过转化的植株。
图 6 抗除草剂试验2周后结果
Fig. 6 Transgenic flax resistance to glyphosate

黄，而经过EPSPA基因转化的亚麻植株并无枯黄变化，2周后未经转化的植株茎叶完全变白并枯死，说明通过转化使被转化的亚麻植株获得了对草甘膦的抗性。

2.6 EPSPsA 基因转录表达分析

随机选取3株转基因亚麻进行RT-PCR(图7)，在 539 bp处扩增出特异的目的条带，表明EPSPsA基因在转基因亚麻中都有一定量的表达。对照中没有检出EPSPsA，说明引物具有较好的特异性，同时EPSPsA基因的表达是获得草甘膦抗性的关键。根据该结果推测转基因亚麻草甘膦抗性的提高是由于EPSPsA基因的导入和过量表达引起的。

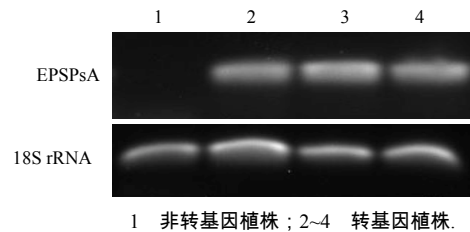


图7 转基因亚麻中EPSPsA 基因的表达
Fig.7 Expression of EPSPsA in transgenic flax plants

3 讨论

抗性EPSP转入植物，提高植物对优良除草剂草甘膦的抗性，是获得抗除草剂农作物的有效方法，但转基因所采用的抗性基因都为来自于细菌的aroA基因^[17]，其转基因的安全性一直令人担忧。植物来源的抗性基因在安全性方面有一定的优势，但转植物源基因的抗性水平往往达不到生产应用的要求。本研究利用薹白EPSPsA基因进行的亚麻遗传转化，亚麻获得了抗草甘膦的能力，抗性水平达到了800 mg/L。抗性的获得一方面由于薹白EPSPsA具有的一定水平除草剂抗性，也有可能由于基因在高水平启动子的作用下，过量表达导致转基因中靶酶大量的累积所致。

经过分子检测结果证明，目的基因已经整合到亚麻基因组中。通过对转基因亚麻进行草甘膦喷雾试验，也可以看出转基因亚麻植株对草甘膦的抗性明显高于未转基因对照组，证明转薹白EPSPsA基因提高亚麻草甘膦抗性的有效性。

参考文献:

- [1] Basiran N, Armitage P, Scott R J, et al. Genetic transformation of flax(*Linum usitatissimum*) by *Agrobacterium tumefaciens* regeneration of transformed shoots via a callus phase[J]. Plant Cell Reports, 1987(6): 396-399.
- [2] Mchughen A. *Agrobacterium* mediated transfer of chl-sulfuron resistance to commercial flax cultivars[J]. Plant Cell Report, 1989(8): 445-449.
- [3] Mc Hughen A, Holm F A. Development and preliminary field testing of a glufosinate ammonium tolerant transgenic flax[J]. Can J Plant Sci, 1995, 75: 117-120.
- [4] Zhan Xiang-can, David A Jones, Allen Kerr. Regeneration of flax plants transformed by *Agrobacterium rhizogenes*[J]. Plant Molecular Biology, 1988, 11(5): 551-559.
- [5] 王玉富, 周思君, 刘燕, 等. 利用农杆菌介导法进行亚麻转基因培养基的研究[J]. 中国麻作, 2000, 22(1): 14-16.
- [6] 王毓美, 李武兴, 陈曦, 等. 几丁质酶基因转化亚麻、红豆草、骆驼刺的同工酶研究[J]. 西北植物学报, 2001, 21(1): 26-31.
- [7] 康庆华. 亚麻转基因试验中抗菌素效果的研究[J]. 中国麻业, 2005, 27(2): 94-97.
- [8] 王关林, 方宏筠. 植物基因工程[M]. 北京: 科学出版社, 2002: 179-185.
- [9] Zhang Wen-He, Zhao Qian, Yu Jing-Juan, et al. Obtaining transgenic maize plants expressing the rabbit defensin (NP-1) gene and evaluation of their disease resistance [J]. Chinese Journal of Agricultural Biotechnology, 2004(1): 55-59.
- [10] E van Rijn, Termorshuizen A J, A H C van. Bruggen storage method affects disease suppression of flax wilt induced by composts[J]. Soil Biology and Biochemistry, 2007, 39(11): 2743-2749.
- [11] Aida H, Afify, Ashour As, et al. Biocontrol of flax seedling blight with mixtures of *Pseudomonas* Spp. [J]. Pakistan Journal of Biological Sciences, 2000, 3(3): 368-371.
- [12] Carlisle S M, Trevors J T. Glyphosate in the environment[J]. Water Air and Soil Pollution, 1988, 39(3): 409-420.
- [13] Alibhai M F, Stallings W C. Closing down on glyphosate inhibition with a new structure for drug discovery [J]. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, 2001, 98(6): 2944-2946.
- [14] Du W S, Wallis N G, Mazzulla M J, et al. Characterization of *Streptococcus pneumoniae* 5-enolpyruvylshikimate-3-phosphate synthase and its activation by univalent cations[J]. Eur J Biochem, 2000, 267: 222-227.
- [15] 马向东, 黄春华, 周俊初. 基因体外诱变[J]. 微生物学通报, 2002, 29(1): 70-72.
- [16] 蒋向, 戴雄泽, 李育强, 等. 薹白 EPSPs 基因在不同组织表达的半定量分析[J]. 湖南农业大学学报: 自然科学版, 2007, 33(5): 542-545.
- [17] 姚姝, 张保龙, 沈新莲, 等. 分别转 CP4 EPSPs 和 aroA 基因拟南芥对草甘膦的抗性[J]. 江苏农业学报, 2006, 22(3): 302-304.

责任编辑: 罗慧敏
英文编辑: 胡东平

简讯

2009年湖南农业大学科技奖励喜获丰收

根据国家奖励办有关通知和湖南省人民政府湘政函[2009]254号文件精神, 湖南农业大学2009年共获得国家、省科学技术成果奖20项, 其中官春云院士主持完成的“油菜化学杀雄强优势杂种选育与推广”获国家科技进步二等奖, 陈立云教授主持完成的“水稻两用核不育系C815S的选育及应用基础研究”获湖南省技术发明一等奖, 邓子牛教授主持的“柑橘优异种质创新及特色品种的选育与推广”和学校主持的“水稻丰产高效技术集成研究与示范”2个项目获得湖南省科技进步一等奖。同时学校还获得湖南省自然科学二等奖2项、三等奖1项, 技术发明二等奖1项, 科技进步二等奖4项, 三等奖8项。

周耀