

陈 盛,王宁宁,王玉康,等. 一种快速高效筛选甘蓝型油菜转化植株的方法[J].江苏农业学报,2017,33(5):982-985.
doi:10.3969/j.issn.1000-4440.2017.05.004

一种快速高效筛选甘蓝型油菜转化植株的方法

陈 盛¹, 王宁宁¹, 王玉康¹, 陈 松², 曹 维¹, 李 明¹, 朱克明¹, 彭 琦²,
王 政¹, 谭小力¹

(1.江苏大学生命科学研究院,江苏 镇江 212013; 2.江苏省农业科学院经济作物研究所,江苏 南京 210014)

摘要: 为了能够快速高效地筛选出转化的油菜植株,采用农杆菌介导的转基因技术将含有绿色荧光蛋白(GFP)的激活标签载体转化到甘蓝型油菜中,对得到的T₁代油菜种子进行萌发,长出约3 mm胚芽后,通过直接观察绿色荧光的筛选方法得到转基因植株。筛选出的植株经PCR验证,阳性率高达75.37%。该筛选方法具有用时短、效率高、易操作等优点,适用于甘蓝型油菜转化植株的筛选工作。

关键词: 甘蓝型油菜; 转基因; 转化植株筛选

中图分类号: S565.403.53 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-4440(2017)05-0982-04

A rapid and efficient approach to screening transformed plants of *Brassica napus*

CHEN Sheng¹, WANG Ning-ning¹, WANG Yu-kang¹, CHEN Song², CAO Wei¹, LI Ming¹,
ZHU Ke-ming¹, PENG Qi², WANG Zheng¹, TAN Xiao-li¹

(1. Institute of Life Sciences, Jiangsu University, Zhenjiang 212013, China; 2. Institute of Industrial Crops, Jiangsu Academy of Agricultural Sciences, Nanjing 210014, China)

Abstract: In order to rapidly and efficiently screen the transformed plants of *Brassica napus*, *Agrobacterium tumefaciens*-mediated transgenic technique was used to transform the activated marker vector containing GFP (green fluorescent protein) into *B. napus*. Three-milimeter embryos grew from T₁ generation seeds, and the transgenic plants were obtained by direct observation of green fluorescence. PCR confirmed the positive rate of transgenic plants was 75.37%. The screening method has the advantages of short time, high efficiency and easy operation, and is suitable for the screening of transformed plants of *B. napus*.

Key words: *Brassica napus*; gene transformation; screening of transformed plant

甘蓝型油菜(*Brassica napus* L.)在全球范围内被广泛种植,是中国以及世界上最重要的油料作物

之一^[1-7]。中国油菜种植面积占世界油菜种植总面积的30%左右,菜籽油占中国食用油市场的40%以上^[8]。中国是全球植物油消费大国,植物油供给长期处于紧缺状态,国内油料作物只能提供油料消费总量的42%左右,大概58%需要依赖国外进口^[9]。这种国内生产供给不足、过度依赖进口的局面,对国内的食物安全构成了严重威胁。因此,研究与油菜产量、品质及抗性相关的基因功能对于油菜

收稿日期:2017-03-03

基金项目:国家重点研发计划项目(2016YFD0101904);国家自然科学基金面上项目(31471527)

作者简介:陈 盛(1991-),男,安徽宣城人,硕士研究生,研究方向为油菜生物技术。(E-mail) schenxcgq@sina.com

通讯作者:谭小力,(E-mail) xltan@ujs.edu.cn

的育种和生产极其重要。而油菜的遗传转化以及转化后代的高通量筛选是基因功能研究的重要方法之一。功能清楚的基因,也可以转化油菜直接应用于生产。

目前,人们主要通过标记基因、报告基因和荧光蛋白筛选法从大量 T_1 代植株中获得转基因植株。油菜中较常用的筛选标记基因有新霉素磷酸转移酶基因 (*NPTII* 基因,介导对卡那霉素的抗性)、潮霉素磷酸转移酶基因(介导对潮霉素的抗性)、二氢叶酸还原酶基因(介导对氨基蝶呤的抗性)、*BAR* 基因(介导对除草剂 Basta 的抗性)^[10-12]。但利用抗生素筛选转化株有其局限性,例如不同转化株对抗生素浓度要求不同,在田间筛选时要等到植株长到一定大小,外界因素不可控性,组培筛选时需要无菌控制等。近年来,基因编辑技术 CRISPR/Cas9 系统因其操作简单、编辑效率高而广泛应用于功能基因的研究及品种改良^[13]。该系统在拟南芥、水稻等植物的定点编辑中已得到应用^[14-16]。通过这种技术筛选标记基因在转化成功后就要被去除掉,此后只能用 PCR 方法筛选。而荧光蛋白作为一种标记^[17-19],可以克服抗生素标记的缺点。通过荧光蛋白标记筛选转化体,能够大大减少筛选时间和工作量。Stuitje 等将荧光蛋白作为拟南芥转化植株的筛选标记,并成功地在大量 T_1 代种子中挑出转化种子,但是在油菜上进行的相同试验没有成功,由于油菜种子种皮较厚,影响荧光成像,导致筛选失败^[20]。

本研究用含有 GFP 的激活标签载体转化甘蓝型油菜,将得到的 T_1 代油菜种子萌发后再利用荧光蛋白标记进行转化植株的筛选以消除种皮的影响,并用 PCR 方法对筛选结果进行验证,探索快速高效的油菜转基因植株筛选方法。

1 材料与方 法

1.1 油菜品种和试剂等

油菜品种为中双 11 号。6-苜氨基腺嘌呤(6-BA)、Silwet L-77 表面活性剂和乙酰丁香酮(AS)购自北京拜尔迪生物技术有限公司, Premix Taq 酶和 DNA marker 购自宝生物工程(大连)有限公司,其余试剂均为国产分析纯。含有激活标签载体 pCB260(标记基因为 *GFP* 和 *BAR* 基因,图 1)的农杆菌 GV3101 取自本实验室。

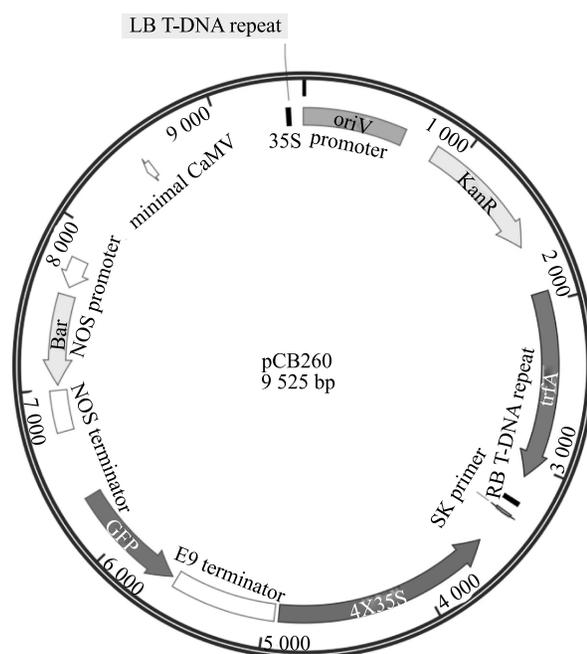


图 1 激活标签载体 pCB260 结构图

Fig.1 The schematic map of activated marker vector pCB260

1.2 农杆菌浸花法转化甘蓝型油菜

取甘油冷冻保存的含有激活标签载体的农杆菌接种至 5 ml LB 液体培养基中, 28 °C、180 r/min 摇床培养过夜,再全部转入 250.0 ml LB 液体培养基中继续培养。直到农杆菌培养液 $OD_{660} = 2.0$ 左右时停止,并向培养基中加入 250.0 μ l Silwet L-77 原液、2.5 μ l 200.0 μ g/L 6-BA 和 250.0 μ l 8 g/L AS。

在油菜大田中,当群体中大部分植株出现花蕾时,用添加了 Silwet L-77、6-BA 和 AS 的农杆菌悬浮液直接浸染油菜花序。浸花前首先剪去已经开花的花蕾,然后再进行浸花。将枝条弯曲,使整个花序浸泡在盛有农杆菌悬浮液的塑料杯中 5 min 左右,摇动塑料杯以确保所有花蕾都被浸染,用羊皮纸袋将浸过的花序完整地套住。浸染过的花序每隔 1 d 再重复浸染 1 次,共 3 次。开花期结束后取羊皮纸袋。种子成熟后收获种子,晒干,脱粒储藏。

1.3 转化体的荧光筛选

在直径 150 mm 的培养皿中放入等面积的滤纸,用自来水将滤纸完全润湿。取 1 000 粒经农杆菌转化后的 T_1 代种子均匀地散布在滤纸上面,室温下放置 12~24 h,当种芽长约 3 mm 时进行荧光筛选。用 Tanon 全自动化学发光/荧光图像分析系统

对种子进行荧光和白光拍摄,参照两张照片挑选出带有荧光的种子并种植在营养土中,放入培养箱中培养。

1.4 荧光筛选结果的 PCR 验证

提取植株叶片总 DNA,作为模板。根据 *Bar* 基因表达序列设计并合成引物 Bar-F:5'-CTGAAGTC-CAGCTGCCAGAAA-3' 和 Bar-R: 5'-CTGCAC-CATCGTCAACCACTA-3'。PCR 反应总体积为 20.0 μ l, 其中模板 1.0 μ l, 引物 F/R(5 μ mol/L) 各 1.0 μ l, 2 \times Mix 10.0 μ l, ddH₂O 7.0 μ l。PCR 反应程序: 94 $^{\circ}$ C 10 min; 94 $^{\circ}$ C 1 min, 58 $^{\circ}$ C 1 min, 72 $^{\circ}$ C 40 s, 35 个循环; 72 $^{\circ}$ C 延伸 10 min, 4 $^{\circ}$ C 保存。通过凝胶电泳检测 PCR 扩增片段。

2 结果

2.1 荧光筛选法获得的转化种子

通过农杆菌浸花法将激活标签载体 pCB260 转入到油菜中,获得 T₁代种子。将 T₁代种子萌发后再通过 Tanon 全自动化学发光/荧光图像分析系统观察并筛选转化种子(图 2)。每培养皿挑选出 6 粒左右带有荧光的种子,24 皿总共挑选出 144 粒种子。后期培养过程中有 10 粒种子没有成活,最后得到 134 株植株。

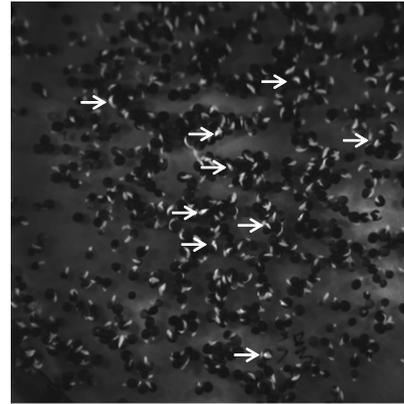
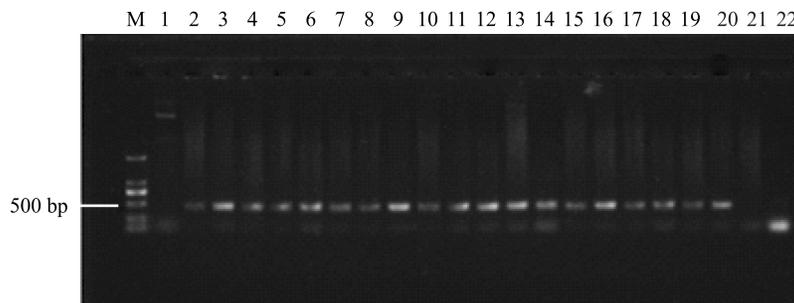


图 2 甘蓝型油菜转化植株种子荧光筛选

Fig.2 Seed fluorescence screening of transformed plants of *Brassica napus*

2.2 荧光筛选结果的 PCR 验证

为了进一步验证荧光筛选的转化种子的真假,将筛选出的种子种在营养土中并放在培养箱中培养,提取幼苗真叶 DNA。以提取的叶片总 DNA 为模板,扩增 *BAR* 基因中 444 bp 的片段。电泳检测扩增片段,可以看到各转化植株有与质粒对照相同的条带(图 3)。在荧光筛选法获得的 134 株转化植株中,PCR 阳性植株有 101 株,阳性率 75.37%。



M:DL2000 DNA marker;1~19:荧光筛选法获得的植株;20:阳性对照(质粒);21:阴性对照(野生型);22:空白对照(水)。

图 3 甘蓝型油菜转化植株的 PCR 鉴定

Fig.3 PCR identification of transgenic plants of *B. napus*

3 讨论

转基因植株的高通量快速筛选,对突变体的产生及功能基因研究特别重要。特别是对于油菜,随着农杆菌浸花法(Floral-dip)^[21-23]的广泛应用,大批量转化种子更需要早期、快速、高效鉴别筛选。GFP

蛋白基因作为报告基因已应用于检测植物转化体并成功用于筛选拟南芥转化种子^[20],但少见于筛选油菜转化体。由于油菜种子的种皮较厚,无法观察到绿色荧光,所以本试验将油菜种子萌发,消除种皮的影响,结果表明是可以实现绿色荧光筛选的,通过 PCR 鉴定验证发现筛选出的带有荧光的种子有

75.37%是阳性的。本方法与抗生素筛选方法相比有操作简单、省时、效率高、不需要无菌条件等优点,是高效快速筛选转化油菜的新方法。但也有不足的地方,由于绿色荧光蛋白需要短波长的紫光激发,产生短波长的绿光,激发和接受都需要专用设备。有研究表明,在亚麻芥中用红色荧光蛋白作为筛选标记时,不需要借助仪器,只需要绿光 LED 手电筒和一副红色镜片的太阳眼镜就可以对干燥种子进行筛选^[24],这种筛选方法更加快速简便。所以我们将继续对油菜转基因植株的筛选方法进行改进。

参考文献:

- [1] 付三雄,周晓婴,张 维,等. 种植密度和施氮量对油菜产量、品质及机收性状的影响[J]. 江苏农业学报,2016,32(3):548-556.
- [2] 涂世伟,郭万里,蒋立希,等. 油菜遗传转化方法的研究进展[J]. 浙江师范大学学报(自然科学版),2012,35(3):338-345.
- [3] 李 晓,杜兴端,陈春燕,等. 四川省油菜种业竞争力评价[J]. 南方农业学报,2015,46(2):349-355.
- [4] 咸拴狮,罗晓丽,王 剑. 油菜转基因研究进展[J]. 山西农业科学,2006,34(3):85-88.
- [5] 谢雅晶,武爱华,刘贤金. 青杂5号甘蓝型油菜的高效再生及农杆菌侵染转化体系的建立[J]. 江苏农业科学,2015,43(12):17-22.
- [6] 任佑华. 天麻抗真菌蛋白基因导入甘蓝型油菜的研究[D]. 长沙:湖南农业大学,2006.
- [7] 刘 晓,景 寅. 转基因油菜研究进展[J]. 现代农业科技,2010,9(9):80-81.
- [8] 沈金雄,傅廷栋. 我国油菜生产、改良与食用油供给安全[J]. 中国农业科技导报,2011,13(1):1-8.
- [9] 王汉中. 我国油菜产业发展的历史回顾与展望[J]. 中国油料作物学报,2010,32(2):300-302.
- [10] 程振东,卫志明,许智宏. 用 PEG 法把外源基因导入甘蓝型油菜原生质体再生转基因植株[J]. 实验生物学报,1994,27(3):341-351.
- [11] 谭小力,戚存扣,张丽丽,等. 不同抗生素对油菜种子萌发的影响[J]. 江苏农业科学,2006(5):27-29.
- [12] 卫志明,黄健秋,徐淑平,等. 甘蓝下胚轴的高效再生和农杆菌介导 *Bt* 基因转化甘蓝[J]. 上海农业学报,1998,14(2):11-18.
- [13] JINEK M, CHYLINSKI K, FONFARA I, et al. A programmable dual-RNA-guided DNA endonuclease in adaptive bacterial immunity[J]. Science, 2012, 337(6096):816-821.
- [14] MIAO J, GUO D, ZHANG J, et al. Targeted mutagenesis in rice using CRISPR-Cas system[J]. Cell Research, 2013, 23(10):1233.
- [15] UPADHYAY S K, KUMAR J, ALOK A, et al. RNA-guided genome editing for target gene mutations in wheat[J]. Bethesda, 2013, 3(12):2233-2238.
- [16] FENG Z, ZHANG B, DING W, et al. Efficient genome editing in plants using a CRISPR/Cas system[J]. Cell Research, 2013, 23(10):1229.
- [17] 赵 华,梁婉琪,杨永华,等. 绿色荧光蛋白及其在植物分子生物学研究中的应用[J]. 植物生理学报,2003,39(2):171-178.
- [18] 王志芳,安建梅,孔建强. 含 DsRed 类似生色团的红色荧光蛋白的发展及应用[J]. 中国生物化学与分子生物学报,2013,29(3):197-206.
- [19] 吴 翔,谭 逵,张 琼,等. 弓形虫新基因 *ux2* 黄色荧光蛋白标记质粒的构建与鉴定[J]. 中国现代医学杂志,2008,18(24):3562-3565.
- [20] STUITJE A R, VERBREE E C, LINDEN K H V D, et al. Seed-expressed fluorescent proteins as versatile tools for easy (co)transformation and high-throughput functional genomics in *Arabidopsis*[J]. Plant Biotechnology Journal, 2003, 1(4):301-309.
- [21] CLOUGH S J, BENT A F. Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*[J]. Plant Journal for Cell & Molecular Biology, 1998, 16(6):735.
- [22] 付绍红,牛应泽,杨洪全,等. 表面活性剂 silwet-77 对 floral-dip 转化甘蓝型油菜效果的影响[J]. 分子植物育种,2004,2(5):661-666.
- [23] 徐光硕,饶勇强,陈 雁,等. 用 in planta 方法转化甘蓝型油菜[J]. 作物学报,2004,30(1):1-5.
- [24] LU C, KANG J. Generation of transgenic plants of a potential oil-seed crop *Camelina sativa* by *Agrobacterium*-mediated transformation[J]. Plant Cell Reports, 2008, 27(2):273.

(责任编辑:张震林)