

根癌农杆菌介导的粳稻遗传转化

Agrobacterium-mediated Genetic Transformation of Japonica Rice

陈秋红, 陈太钰, 林拥军, 陈浩*

作物遗传改良国家重点实验室, 华中农业大学, 武汉

*通讯作者邮箱: hchen@mail.hzau.edu.cn

引用格式: 陈秋红, 陈太钰, 林拥军, 陈浩. (2018). 农杆菌介导粳稻遗传转化. *Bio-101* e1010174. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010174.

How to cite: Chen, Q. H., Chen, T. Y., Lin, Y. J. and Chen, H. (2018). Agrobacterium-mediated genetic transformation of japonica rice. *Bio-101* e1010174. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010174. (in Chinese)

实验原理: 根癌农杆菌是普遍存在于土壤中的一种革兰氏阴性细菌, 它能在一定条件下趋化性地感染植物的受伤部位, 并诱导产生冠瘿瘤。根癌农杆菌中含有 Ti 质粒, 其上有一段可转移的 DNA (T-DNA)。根癌农杆菌侵染植物细胞后, 可将其 T-DNA 转移并插入到植物细胞的基因组中, 并稳定地遗传给植物细胞后代。经过人工改造的 Ti 质粒可以作为基因工程载体, 将目的基因导入受体植物中。本试验借助根癌农杆菌侵染, 将外源基因导入水稻愈伤组织细胞, 然后通过组织培养技术使被转化的水稻愈伤组织细胞分化再生, 从而获得转基因水稻植株。整个试验过程需要 4~5 个月时间。

实验目的: 将目的基因稳定地转化到粳稻品种(中花 11, 日本晴等)中表达, 从而进行基因功能研究或者改良农艺性状。

关键词: 粳稻, 根癌农杆菌介导, 遗传转化

材料与试剂

1. 吸水纸
2. 滤纸
3. 无菌大平皿
4. 无菌小平皿
5. 粳稻种子
6. 根癌农杆菌工程菌株 *EHA105* (携带含目的基因载体)

7. 95%乙醇
8. 葡萄糖
9. 抗生素 (潮霉素、G418 或除草剂 Basta)
10. 封口胶
11. KT (Kinetin) (Sigma, catalog number: K-0753)
12. 6-BA (6-BenzylaminoPurine) (Sigma, catalog number: B-5898)
13. IAA (Indole-3-acetic acid) (Sigma, catalog number: I-5148)
14. NAA (Naphthalene acetic acid) (Sigma, catalog number: N-0640)
15. 2,4-D (2,4-Dichlorophenoxyacetic acid) (Sigma, catalog number: D-8407)
16. CH (Casein Enzymatic Hydrolysate) (Sigma, catalog number: C-7290)
17. Kanamycin (USB, catalog number: 17924)
18. Cn (Carbenicillin) (GiBco BRL, catalog number: 10177-012)
19. Hn (hygromycin B) (GiBco BRL, catalog number: 10687-010)
20. AS (Acetosringone) (Aldrich chem., CO 01531 EG)
21. Pyridoxine HCl (Sigma, catalog number: P-8666)
22. Nicotinic acid (Sigma, catalog number: N-0765)
23. Inositol (Sigma, catalog number: I-3011)
24. Thiamine HCl (VB₁) (Sigma, catalog number: T-3902)
25. Phytigel HCl (VB₆) (Sigma, catalog number: P-8169)
26. Dimethyl Sulfoxide-DMSO (Sigma, catalog number: D-5879)
27. X-gluc (5-bromo-4-chloro-3-indolyl-D-galactoside) (Sigma, catalog number: B-3783)
28. NH₄NO₃
29. KH₂PO₄
30. KNO₃
31. MgSO₄·7H₂O
32. CaCl₂
33. CaCl₂·2H₂O
34. MnSO₄·4H₂O
35. ZnSO₄·7H₂O
36. KI
37. H₃BO₃

38. $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
39. $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$
40. $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$
41. $(\text{NH}_4)\text{SO}_4$
42. $\text{MnSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$
43. $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
44. $\text{Na}_2 \cdot \text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
45. KCl
46. NaH_2PO_4
47. $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
48. KOH
49. HgCl_2
50. Proline
51. Sucrose
52. MS_{max} 储备液(10x) (见溶液配方)
53. MS_{min} 储备液(100x) (见溶液配方)
54. N_6max 储备液(10x) (见溶液配方)
55. N_6min 储备液(100x) (见溶液配方)
56. Fe^{2+} -EDTA 储备液(100x) (见溶液配方)
57. Vitamin 储备液(100x) (见溶液配方)
58. AA_{max} 储备液(10x) (见溶液配方)
59. AA_{min} 储备液(100x) (见溶液配方)
60. 6-BA 储备液(1 mg/ml) (见溶液配方)
61. KT 储备液(1 mg/ml) (见溶液配方)
62. 2,4-D 储备液(1 mg/ml) (见溶液配方)
63. 100 mM AS 储备液(见溶液配方)
64. IAA 储备液(1 mg/ml) (见溶液配方)
65. NAA 储备液(1 mg/ml) (见溶液配方)
66. 1 N KOH 储备液 (见溶液配方)
67. 0.15% HgCl_2 (见溶液配方)
68. 诱导培养基 (见溶液配方)

69. 继代培养基 (见溶液配方)
70. 预培养基 (见溶液配方)
71. 共培养基 (见溶液配方)
72. 悬浮培养基 (见溶液配方)
73. 筛选培养基 (见溶液配方)
74. 分化培养基 (见溶液配方)
75. 生根培养基 (见溶液配方)

注: 以上所有常规试剂如 NH_4NO_3 , KH_2PO_4 等都是由国药化工或光复化工公司提供。

仪器设备

1. 超净台
2. 100 ml、250 ml、500 ml 三角瓶
3. 生根管
4. 枪形镊
5. 小铁勺
6. 酒精灯
7. 水洗杯
8. 剪刀
9. 28 °C 摇床
10. 19 °C 培养箱

实验步骤

注: 本实验所有过程均需无菌操作。

1. 种子消毒及愈伤组织的诱导

准备诱导培养基 (见溶液配方), 分装至 100 ml 的三角瓶中 (每瓶 40-50 ml 培养基), 封膜后 121°C 高温高压灭菌 15 min, 冷却备用。水稻种子去壳后先用 75% 乙醇清洗 1 min (时间不能过长), 再用 0.15% HgCl_2 灭菌 15-20 min, 最后用无菌 dH_2O 洗涤 4-5 次。每瓶诱导培养基中接入 8-12 颗消毒处理后的水稻种子, 30°C 暗培养 40-45 d 诱导愈伤组织的产生 (图 1A)。

2. 愈伤组织的继代

2.1 提前 3 d 配继代培养基 (见溶液配方), 每 50 ml 的三角瓶中分装 25-30 ml 培养基, 封膜后 121°C 高温高压灭菌 15 min, 冷却备用。提前 3 d 配制可使培养基在使用时表面相对干燥, 太湿的培养基不利于愈伤组织长。

2.2 从诱导的愈伤中挑选淡黄色、颗粒状、干燥、活力强的愈伤组织转入继代培养基中暗培养 20 d; 第一次继代时注意将愈伤组织上附着的其他组织如胚乳、芽等去除干净。继代一次的愈伤组织即可进行根癌农杆菌侵染, 用于转化的愈伤最佳最多继代两次。多次继代易使愈伤组织发生体细胞变异且降低转化效率 (图 1B)。

3. 预培养 (如果时间比较紧, 此步骤可省略)

3.1 提前用 500 ml 三角瓶准备适量无菌预培养的培养基 (见溶液配方), 封膜后高温高压灭菌 12 min; 使用前用微波炉熔解, 待冷却至 55°C 左右, 每 250 ml 培养基中加入 300 μ l AS 和 5 ml 50%葡萄糖后, 摇匀倒 8-10 个皿。

3.2 从继代后的愈伤组织中, 挑选淡黄色、颗粒状、干燥、活力强的愈伤组织组织转入预培养基中, 每个皿接种 60-80 块绿豆大小的愈伤颗粒, 愈伤颗粒较大可用镊子夹碎, 28°C 黑暗条件预培养 3-4 d。

4. 侵染与共培养

4.1 实验前 2 d, 将含有目的基因根癌农杆菌菌株在含有相应抗生素的 LA 平皿上划线, 然后置于 28°C 培养 2 d; 准备悬浮培养基(100 ml/片段) (见溶液配方)及共培养培养基 (250 ml/片段) (见溶液配方), 封膜后 121°C 高温高压灭菌 12 min。准备 250 ml 三角瓶若干、里面垫有多张吸水纸和滤纸大、小平皿, 121°C 高温高压灭菌 30 min, 使用前置于 80°C 烘干。

4.2 取出根癌农杆菌划线平皿, 用接种环接入大约一环农杆菌(视悬浮培养基体积而定)于 100 ml 悬浮培养基中(见溶液配方), 加入 100 μ l AS 和 2 ml 50%葡萄糖, 置于恒温摇床 28 °C, 200 rpm 震荡培养 30 min, 农杆菌悬液浓度约为 OD₆₀₀ =0.3 即可(目测略有一些浑浊)。

4.3 农杆菌悬液震荡培养的同时, 将继代的愈伤组织收集到 250 ml 无菌三角瓶中。

4.4 将 4.3 中制备好的农杆菌悬液倒入装有愈伤组织的三角瓶中直至浸没所有愈伤组织, 静置 10 min。

- 4.5 倒去菌液。取装有吸水纸和滤纸的灭菌小平皿，打开小平皿将装有愈伤的三角瓶倒置于小平皿的滤纸上，尽量沥尽菌液，再把愈伤展铺在无菌大皿的滤纸上，上面盖一张灭菌滤纸，用镊子轻压滤纸以吸干愈伤表面菌液，再抽去吸湿后的滤纸，如此上下各换四次滤纸，最后在愈伤上盖上一张滤纸，盖好大平皿，自然干燥 1-2 h。
- 注意：此步骤不建议打开平皿盖子吹干，因容易导致愈伤组织过度干燥而出现脱水现象。*
- 4.6 在干燥愈伤组织的同时，微波炉加热熔解 250 ml 的共培养基，待冷却至 55°C 左右，加入 300 μ l AS 和 5 ml 50%葡萄糖溶液，摇匀后倒 8-10 个皿。
- 4.7 用镊子 (或勺子) 将干燥的愈伤颗粒转移到共培养基上 (愈伤转移到共培养基上后不要再挪动，减少培养基与愈伤表面的接触，防止农杆菌的过度生长)，封口胶封口。
- 4.8 置于 19 °C 黑暗条件下共培养 3 d。
5. 水洗及筛选(S₁)
- 5.1 准备无菌蒸馏水、大、小平皿 (含有多张吸水纸和滤纸)、250 ml 三角瓶若干，121°C 高温高压灭菌 30 min。大、小平皿灭菌后置于 80 °C 烘干。准备筛选培养基 (见溶液配方)，封膜后高温高压灭菌 15 min。
- 5.2 将共培养后的愈伤组织转移至水洗杯中，倒入灭菌蒸馏水至完全浸没愈伤组织，盖上盖子振荡 20-30 s，倒掉灭菌蒸馏水，如此水洗 3-4 次。加入灭菌蒸馏水至完全浸没愈伤组织，盖上盖子振荡 20-30 s，静置 3-5 min，倒掉灭菌蒸馏水，如此水洗 3-4 次。进行观察，如果水洗杯内的蒸馏水澄清说明农杆菌已经基本清洗干净，否则需要继续水洗。最后倒掉灭菌蒸馏水，加入含 500 mg/L Cn 的灭菌蒸馏水，静置 30 min。
- 5.3 倒去含 500 mg/L Cn 的灭菌蒸馏水，后续干燥愈伤的操作参考 4.5。在干燥愈伤组织的同时，微波炉加热熔解 250 ml 筛选培养基，待冷却至 55°C 左右，加入 400 μ l CN、250 μ l Hn 和 5 ml 50%葡萄糖，摇匀后倒 8-10 个皿。倒皿后应在超净工作台上打开皿盖，用无菌风吹 1.5-2 h (筛选培养基表面不宜太湿，否则筛选时不利于农杆菌的抑制和抗性愈伤的生长)。
- 5.4 愈伤干燥后，用镊子将愈伤颗粒转移到筛选培养基 (建议接种密度 20-25 块愈

伤/皿), 封口胶封口。

5.5 置于暗培养室筛选培养 20 d (第一次筛选 S₁) (图 1C)。

6. 第二次筛选(S₂)

6.1 准备 S₂ 阶段筛选培养基 (见溶液配方), 封膜后高温高压灭菌 15 min; 微波炉加热熔解 250 ml 筛选培养基, 待冷却至 55°C 左右, 依次加入 300 μl CN、250 μl Hn、5 ml 50%葡萄糖, 混匀后倒 8-10 个皿; 倒皿后在超净工作台上打开皿盖, 用无菌风吹 1.5-2 h (筛选培养基表面不宜太湿, 否则筛选时不利于农杆菌的抑制和抗性愈伤的生长)。

6.2 从 S₁ 培养基上挑选干燥的、没有农杆菌污染的愈伤, 转移到 S₂ 培养基上(每皿接种 20 到 35 块愈伤)。

6.3 暗培养 20 d, 观察是否长出新鲜嫩黄的抗性愈伤, 如果还没有抗性愈伤继续转皿进行 S₃ 筛选培养(除培养基中加入的 CN 可适当减少(200 μl/250 ml)外, 其余配置与灭菌方法同 S₁ 和 S₂)。一般粳稻品种经筛选两次即 S₂ 阶段就能长出抗性愈伤 (图 1D)。

7. 分化

7.1 提前 3-4 d 准备分化培养基 (见溶液配方), 100 ml 三角瓶中加入 40-50 ml 分化培养基, 封膜后 121°C 高温高压灭菌 15 min。

7.2 挑取淡黄色、致密、干燥、生长旺盛的抗性愈伤小块, 每一团只挑一个抗性愈伤 (因为来源于同一团的愈伤组织大多数情况下基因型一致), 注意不要挑到长有农杆菌的愈伤。每瓶分化培养基中均匀放置 3-4 小块抗性愈伤, 因为愈伤组织细胞在分化培养基上会继续生长, 放得太密容易导致不同的愈伤块长到一起无法区别 (图 1E)。

7.3 光培养 (28°C、光照 14 h/黑暗 10 h) 30-40 d, 待分化出幼苗有 3-5 cm 高后即可进行生根培养, 光培养期间要及时把污染长菌的材料清理掉。

8. 生根

8.1 准备生根培养基 (见溶液配方), 向每根生根管中加入 4-5 cm 厚的培养基, 封膜后 121°C 高温高压灭菌 15 min。准备灭菌的空平皿 4-5 个。

8.2 用枪形镊将分化出的苗子从分化培养基中取出, 置于灭过菌的空平皿中, 一块愈伤只取 1 棵健壮的幼苗, 用剪刀对幼苗进行清理 (剪去死掉或发黄叶子以及

分化培养基上长出的根), 接入生根管内, 每根管内接入 1 株幼苗 (图 1F)。

8.3 光培养室生根培养 15~20 d, 待新根生长充分后, 进行移栽。

9. 移栽

9.1 揭开生根管封口膜, 加入一些自来水, 光培养室中继续生长 (炼苗) 3-4 d。

9.2 炼苗期间可取叶片小样进行转基因阳性检测。

9.3 将转化幼苗从生根管中取出, 洗净根上的附着培养基, 移栽到准备好土的盆或桶中。

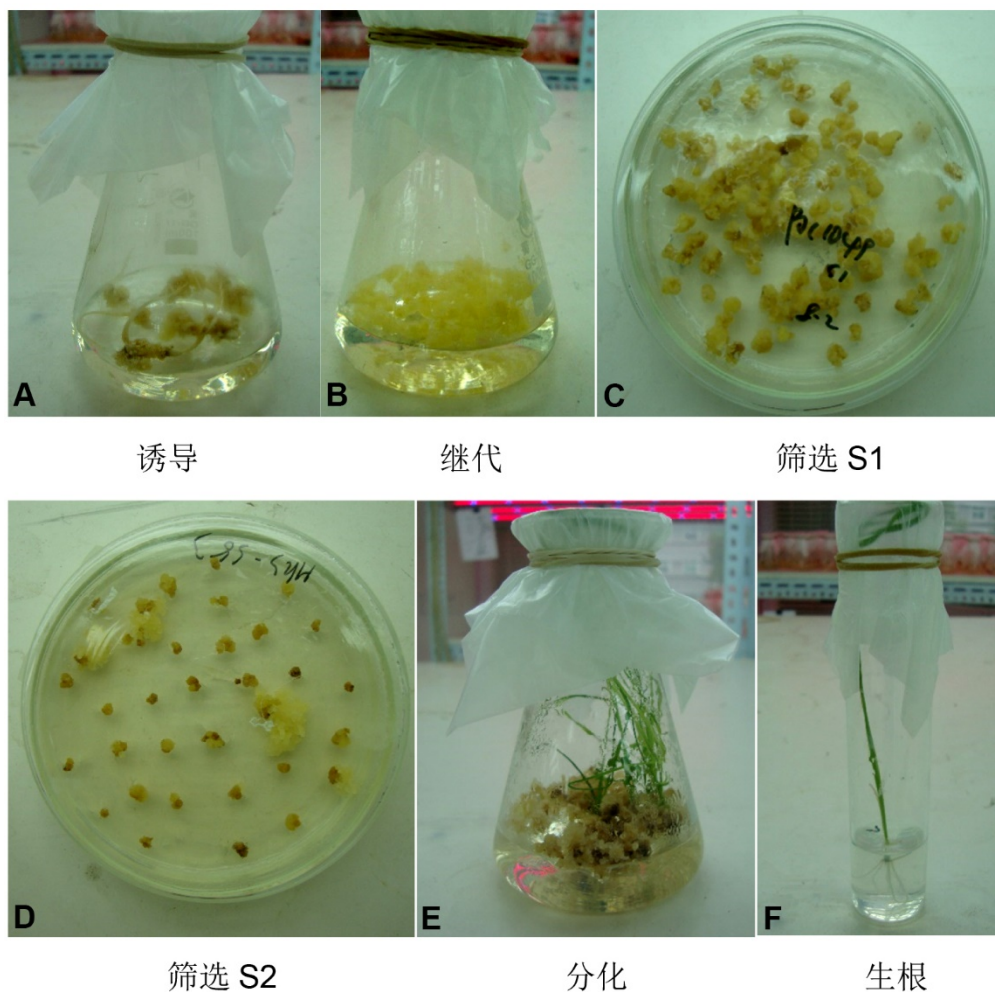


图 1. 农杆菌转化过程

注意事项

1. 除移栽外全过程必须在无菌条件下操作, 防止污染。
2. 污染的材料及时清理, 以免扩大污染。

3. 尽量挑取生长状态好、活力强的愈伤组织进行试验。

溶液配方

一、溶液配制

1. MS_{max} 储备液(10x)

16.5 g NH₄NO₃

1.7 g KH₂PO₄

19.0 g KNO₃

3.7 g MgSO₄·7H₂O

3.32 g CaCl₂ or 4.4 g CaCl₂·2H₂O

先加入三分之二体积的 dH₂O，然后逐个溶解上述试剂，最后加入灭菌蒸馏水定容到 1,000 ml，室温保存。

2. MS_{min} 储备液(100x)

2.23 g MnSO₄·4H₂O

0.86 g ZnSO₄·7H₂O

0.083 g KI

0.62 g H₃BO₃

0.025 g Na₂MoO₄·2H₂O

0.0025 g CoCl₂·6H₂O

0.0025 g CuSO₄·5H₂O

加 dH₂O 定容到 1,000 ml，室温保存

注：Na₂MoO₄ 必须单独溶解，再与其它组分混合。

3. N_{6max} 储备液(10x)

28.3 g KNO₃

4.63 g (NH₄)SO₄

4.0 g KH₂PO₄

1.85 g MgSO₄·7H₂O

1.25 g CaCl₂ or 1.66 g CaCl₂·2H₂O

先加入三分之二体积的 dH₂O，然后逐个溶解上述试剂，最后加入灭菌蒸馏水定容到 1,000 ml，室温保存。

4. N_{6min} 储备液(100x)

0.08 g KI

0.16 g H₃BO₃

0.15 g ZnSO₄·7H₂O

0.44 g MnSO₄·4H₂O or 0.3335 g MnSO₄·H₂O

用 dH₂O 定容到 1,000 ml, 室温保存。

5. Fe²⁺-EDTA 储备液(100x)

往一个试剂瓶中加入约 300 ml dH₂O 和 2.78g FeSO₄·7H₂O; 往另一试剂瓶中加入约 300 ml dH₂O, 并加热到 70 °C, 然后加入 3.73 g Na₂·EDTA·2H₂O; 都溶解好后, 待溶液冷却至室温, 将两个瓶中的溶液混合, 然后加 dH₂O 定容到 1,000 ml, 4 °C 避光保存。

6. Vitamin 储备液(100x)

0.1 g Nicotinic acid

0.1 g Thiamine HCl(VB₁)

0.1 g Pyridoxine HCl(VB₆)

10 g Inositol

0.2 g Glycine

加 dH₂O 定容到 1,000 ml, 4 °C 保存

7. AA_{max} 储备液(10x)

29.50 g KCl

2.50 g MgSO₄·7H₂O

1.50 g NaH₂PO₄

1.50 g CaCl₂·2H₂O

加 dH₂O 定容到 1,000 ml, 室温避光保存

8. AA_{min} 储备液(100x)

1.0 g MnSO₄·H₂O

0.2 g ZnSO₄·7H₂O

0.0025 g CuSO₄·5H₂O

0.3 g H₃BO₃

0.075 g KI

0.0025 g CoCl₂·6H₂O

0.025 g $\text{NaMoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$

加 dH_2O 定容到 1,000 ml, 室温避光保存

注: Na_2MoO_4 必须单独溶解, 再与其它组分混合。

9. 6-BA 储备液(1 mg/ml)

100 mg 6-BA

加入 1.0 ml 1N KOH 振摇至 6-BA 溶解, 然后加 dH_2O 定容到 100 ml, 室温保存。

10. KT 储备液(1 mg/ml)

100 mg KT

加入 1.0 ml 1N KOH 振摇至 KT 溶解, 然后加 dH_2O 定容到 100 ml, 室温保存。

11. 2,4-D 储备液(1 mg/ml)

100 mg 2,4-D

加入 1.0 ml 1N KOH 振摇 5 min, 然后加 10 ml dH_2O 并振摇至 2,4-D 溶解, 用 dH_2O 定容到 100 ml, 室温保存。

12. 100 mM AS 储备液

0.196 g AS

10 ml DMSO

用 1.5 ml 离心管分装, 4 °C 保存。

13. IAA 储备液(1 mg/ml)

100 mg IAA

加入 1.0 ml 1N KOH 振摇至 IAA 溶解

然后用 dH_2O 定容到 100 ml, 室温避光保存。

14. NAA 储备液(1 mg/ml)

100 mg NAA

加入 1.0 ml 1N KOH 振摇至 NAA 溶解, 再用 dH_2O 定容到 100 ml, 室温避光保存。

15. 1 N KOH 储备液

5.6 g KOH

用 100 ml dH_2O 溶解, 室温保存。

16. 0.15% HgCl_2

1.5 g HgCl_2

先用 1ml 无水乙醇部分或完全溶解

再用 dH₂O 定容至 1,000 ml, 搅拌 4-8 h, 室温妥善保存。

注: 升汞有剧毒。

二、培养基配置

注: 所有培养基都必须在使用前准备。

1. 诱导培养基

N ₆ max 储备液(10x)	100 ml
N ₆ min 储备液(100x)	10 ml
Vitamin(100x)	10 ml
Fe ²⁺ -EDTA 储备液(100x)	10 ml
2,4-D 储备液(1 mg/ml)	2.5 ml
CH	0.6 g
Proline	0.3 g
Sucrose	30 g
Phytigel	3 g
调 pH 值至 5.9, 补 dH ₂ O 至 1,000 ml	

2. 继代培养基

N ₆ max 储备液(10x)	100 ml
N ₆ min 储备液(100x)	10 ml
Vitamin(100x)	10 ml
Fe ²⁺ -EDTA 储备液(100x)	10 ml
2,4-D 储备液(1 mg/ml)	2.0 ml
CH	0.6 g
Proline	0.5 g
Sucrose	30 g
Phytigel	3 g
调 pH 值至 5.9, 补 dH ₂ O 至 1,000 ml	

3. 预培养基

N ₆ max 储备液(10x)	12.5 ml
N ₆ min 储备液(100x)	1.25 ml

Vitamin(100x)	2.5 ml
Fe ²⁺ -EDTA 储备液(100x)	25 ml
2,4-D 储备液(1 mg/ml)	0.75 ml
CH	0.15 g
Sucrose	5 g
Agarose	1.75 g
调 pH 值至 5.4, 补 dH ₂ O 至 250 ml	

4. 共培养基

N _{6max} 储备液(10x)	12.5 ml
N _{6min} 储备液(100x)	1.25 ml
Vitamin(100x)	2.5 ml
Fe ²⁺ -EDTA 储备液(100x)	25 ml
2,4-D 储备液(1 mg/ml)	0.75 ml
CH	0.2 g
Sucrose	5 g
Agarose	1.75 g
调 pH 值至 5.4, 补 dH ₂ O 至 250 ml	

5. 悬浮培养基

N _{6max} 储备液(10x)	5 ml
N _{6min} 储备液(100x)	0.5 ml
Vitamin(100x)	1 ml
Fe ²⁺ -EDTA 储备液(100x)	0.5 ml
2,4-D 储备液(1 mg/ml)	0.2 ml
CH	0.08 g
Sucrose	2 g
调 pH 值至 5.4, 补 dH ₂ O 至 100 ml	

6. 筛选培养基

N _{6max} 储备液(10x)	25 ml
N _{6min} 储备液(100x)	2.5 ml
Vitamin(100x)	2.5 ml

Fe ²⁺ -EDTA 储备液(100x)	2.5 ml
2,4-D 储备液(1 mg/ml)	0.625 ml
CH	0.15 g
Sucrose	7.5 g
Agarose	1.75 g
调 pH 值至 6.0, 补 dH ₂ O 至 250 ml	

7. 分化培养基

MS _{max} 储备液(10x)	100 ml
MS _{min} 储备液(100x)	10 ml
Vitamin(100x)	10 ml
Fe ²⁺ -EDTA 储备液(100x)	10 ml
6-BA	2.0 ml
KT	2.0 ml
IAA	0.2 ml
NAA	0.2 ml
Sucrose	30 g
CH	1 g
Phytigel	3 g
调 pH 值至 6.0, 补 dH ₂ O 至 1,000 ml	

8. 生根培养基

MS _{max} 储备液(10x)	50 ml
MS _{min} 储备液(100x)	5 ml
Vitamin(100x)	10 ml
Fe ²⁺ -EDTA 储备液(100x)	10 ml
Sucrose	20 g
Phytigel	3 g
调 pH 值至 5.8, 补 dH ₂ O 至 1,000 ml	