

## 农杆菌介导的籼稻遗传转化

刘瑜, 凌飞, 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: [hanxin2013@163.com](mailto:hanxin2013@163.com)

引用格式: 刘瑜, 凌飞, 林拥军, 陈浩. (2018). 农杆菌介导的籼稻遗传转化. *Bio-101* e1010175. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010175.

**实验原理:** 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, 并诱导产生冠瘿瘤或发状根。根癌农杆菌和发根农杆菌细胞中分别含有 Ti 质粒和 Ri 质粒, 它们都含有一段可转移的 DNA(T-DNA), 农杆菌通过侵染植物伤口, 可以将 T-DNA 插入到植物基因组中, 并且稳定的遗传给后代。本实验是把目的基因装载到经过改造的 Ti 质粒的 T-DNA 区, 借助农杆菌的感染实现外源基因向水稻愈伤的转移与整合, 然后通过组织培养技术, 再生出转化植株。

**实验目的:** 通过农杆菌介导的遗传转化把目的基因导入到籼稻品种中(MH63, ZS97, 9311 等)。

**关键词:** 籼稻, 根癌农杆菌, 遗传转化

### 材料与试剂

1. 吸水纸
2. 滤纸
3. 大培养皿
4. 小培养皿
5. 封口膜
6. Parafilm
7. 接种环
8. 籼稻种子
9. *EHA105* 农杆菌 (携带含目的基因载体)
10. 乙醇

11. 6-Benzylaminopurine (6-BA) (Sigma, catalog number: B-3408)
12. Kinetin (KT) (Sigma, catalog number: K-0753)
13. Naphthalene acetic acid (NAA) (Sigma, catalog number: N-0640)
14. Indole-3-acetic acid (IAA) (Sigma, catalog number: I-2886)
15. 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) (Sigma, catalog number: D-7299)
16. Kanamycin (USB, catalog number: 17924)
17. Casein Enzymatic Hydrolysate (CH) (Sigma, catalog number: N-4642)
18. Carbenicillin (Cn) (Bio Basic INC., catalog number: CDJ469)
19. Hygromycin B (Hn) (Roche, catalog number: 10843555001)
20. Nicotinic acid (Sigma, catalog number: N-0765)
21. Pyridoxine HCl (VB<sub>6</sub>) (Sigma, catalog number: P-8666)
22. Thiamine HCl (VB<sub>1</sub>) (Sigma, catalog number: T-3902)
23. Inositol (Sigma, catalog number: I-3011)
24. Phytigel (Sigma, catalog number: P-8169)
25. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Sigma, catalog number: D-5879)
26. Acetosringone (AS) (Aldrich chem., CO 01531 EG)
27. Proline
28. Sucrose
29. Agar powder
30. D-sorbitol
31. NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>
32. KNO<sub>3</sub>
33. KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
34. MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O
35. CaCl<sub>2</sub>
36. CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O
37. MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O
38. ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O
39. H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>
40. KI
41. Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O
42. CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O
43. CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O

44.  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
45.  $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$
46.  $\text{Na}_2 \text{EDTA} \cdot 2\text{H}_2\text{O}$
47. Glycine
48. KOH
49.  $\text{HgCl}_2$
50. Glucose
51. MS<sub>max</sub> 储备液(10x) (见溶液配方)
52. MS<sub>min</sub> 储备液(100x) (见溶液配方)
53. N<sub>6max</sub> 储备液(10x) (见溶液配方)
54. N<sub>6min</sub> 储备液(100x) (见溶液配方)
55.  $\text{Fe}^{2+}$ -EDTA 储备液(100x) (见溶液配方)
56. Vitamin 储备液(100x) (见溶液配方)
57. 6-BA 储备液(1 mg/ml) (见溶液配方)
58. KT 储备液(1 mg/ml) (见溶液配方)
59. 2, 4-D 储备液(1 mg/ml) (见溶液配方)
60. IAA 储备液(1 mg/ml) (见溶液配方)
61. NAA 储备液(1 mg/ml) (见溶液配方)
62. 200 mM AS 储备液(见溶液配方)
63. 1 N KOH 储备液(见溶液配方)
64. 0.15%  $\text{HgCl}_2$  (见溶液配方)
65. 50%葡萄糖(见溶液配方)
66. 250 mg/ml CN (见溶液配方)
67. 50 mg/ml Kan (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. 悬浮培养基(见溶液配方)
72. 共培养基(见溶液配方)
73. 筛选培养基(见溶液配方)

74. 预分化培养基(见溶液配方)

75. 分化培养基(见溶液配方)

76. 生根培养基(见溶液配方)

*注：以上所有常规试剂都是由国药化工和光复科技提供。*

## 仪器设备

1. 超净工作台
2. 100 ml 三角瓶
3. 250 ml 三角瓶
4. 500 ml 三角瓶
5. 生根管
6. 剪刀
7. 镊子
8. 小铁勺
9. 酒精灯
10. 28 °C 摇床
11. 19 °C 培养箱

## 实验步骤

1. 诱导愈伤
  - 1.1 成熟种子去掉颖壳，用 75%乙醇浸泡 1 min，然后用 0.15% HgCl<sub>2</sub> 浸泡 15-20 min，最后用无菌蒸馏水漂洗 4~5 次。
  - 1.2 每瓶诱导培养基 (见溶液配方) 接入 8~10 粒种子，26 °C 暗培养 35 d。
2. 继代
  - 2.1 提前 2~3 d 准备好继代培养基 (见溶液配方)，使培养基干燥。
  - 2.2 用镊子将新长出来的愈伤夹成小块，转入新的继代培养基中，每瓶约 20 粒，在 26°C 恒温暗室培养 20 d 后，可以长出颜色鲜黄直径约为 2~3 mm 的胚性愈伤组织颗粒。大小合适的愈伤可以进行预培养，小的就进行第二次继代。
3. 预培养

- 3.1 每 250 ml 预培养基 (见溶液配方) 中加入 250  $\mu$ l AS 与 5 ml 50% (w/v) 葡萄糖并倒皿, 每瓶培养基倒 8~10 个皿。
- 3.2 选取自然分散, 颜色鲜黄, 直径约为 2~3 mm 的胚性愈伤组织颗粒转入预培养基中, 每皿为 80 粒愈伤颗粒, 在 26 °C 恒温暗培养 4 d。
4. 侵染
  - 4.1 提前将含有目的基因的农杆菌菌株划线活化 (28 °C 培养 36-48 h)。
  - 4.2 准备灭菌的悬浮培养基 (见溶液配方), 共培养基 (见溶液配方), 大培养皿, 小培养皿 (里面垫有吸水纸和滤纸, 用前灭菌并置于 80 °C 烘干), 250 ml 无菌三角瓶若干。
  - 4.3 将划线培养的农杆菌刮入悬浮培养基(每 100 ml 培养基加入 100  $\mu$ l AS), 28 °C, 200 rpm 振荡培养 2~3 h, 然后调整菌液浓度至 OD<sub>600</sub>≈0.5。
  - 4.4 收集预培养的愈伤组织到 250 ml 的无菌三角瓶中; 然后把培养好的农杆菌菌液倒入装有愈伤组织的三角瓶中, 浸泡 30 min。
  - 4.5 浸泡完后, 先倒掉菌液, 将装有愈伤组织的三角瓶倒扣于装有滤纸的无菌小皿上, 沥干菌液, 再把愈伤颗粒铺在装有 7 层以上滤纸的无菌大皿上, 从下面抽一张无菌滤纸盖在愈伤上, 用镊子轻压愈伤吸干表面菌液, 弃掉上面滤纸, 重复上述工作至少 4 次, 最后在愈伤颗粒上盖一张滤纸, 盖好大皿, 自然干燥 2 h。
  - 4.6 愈伤干燥时, 每 250 ml 共培养基中加入 250  $\mu$ l AS 和 5 ml 50% (w/v) 葡萄糖并倒皿, 每瓶培养基倒 8~10 个平皿。
  - 4.7 用无菌勺子将充分干燥的愈伤组织均匀地平铺在共培养基上 (铺上之后不要再挪动, 减少培养基与愈伤表面的接触, 防止农杆菌的过度生长), 用 Parafilm 封口。
  - 4.8 19 °C 暗培养 3 d。
5. 水洗与筛选
  - 5.1 准备无菌蒸馏水, 大、小皿 (含有吸水纸和滤纸, 灭菌后置于 80 °C 烘干), 250 ml 三角瓶若干, 筛选培养基。
  - 5.2 用无菌勺子将共培养完成后的愈伤颗粒收集到 250 ml 的三角瓶中, 用无菌的蒸馏水清洗 6 次以上, 直至倒出的蒸馏水清亮即可, 最后加 150 ml 蒸馏水,

- 以及 300  $\mu$ l Cn, 室温浸泡 30 min。
- 5.3 浸泡完后, 先倒掉菌液, 将装有愈伤组织的三角瓶倒扣于装有滤纸的无菌小皿上, 沥干菌液, 再把愈伤颗粒铺在装有 7 层以上滤纸的无菌大皿上, 从下面抽一张无菌滤纸盖在愈伤上, 用镊子轻压愈伤吸干表面菌液, 弃掉上面滤纸, 重复上述工作至少 4 次, 最后在愈伤颗粒上盖一张滤纸, 盖好大皿, 自然干燥 2 h。
- 5.4 愈伤干燥时, 将每 250 ml 筛选培养基中加入 400  $\mu$ l Cn 与 250  $\mu$ l Hn (终浓度 400 mg/L Cn 和 50 mg/L Hn), 然后倒 8~9 个平皿。
- 5.5 将干燥后的愈伤颗粒转移到筛选培养基(S<sub>1</sub>)中, 每皿摆放约 40 颗愈伤, 暗室 26 °C 恒温培养 15 d。
6. 第二次筛选(S<sub>2</sub>)
- 6.1 准备筛选培养基(见溶液配方), 每 250 ml 培养基中加入 300  $\mu$ l Cn 和 250  $\mu$ l Hn (终浓度 300 mg/L Cn 和 50 mg/L Hn), 倒 8~9 个平皿。
- 6.2 将 S<sub>1</sub> 培养基上干燥的, 没有农杆菌污染的愈伤颗粒转接到新的筛选培养基(S<sub>2</sub>)上, 每皿摆放约 25 粒; 暗室 26 °C 恒温培养 20 d。
- 6.3 在此期间, 观察是否长出新鲜嫩黄的抗性愈伤, 如果没有抗性愈伤出现, 把愈伤组织转接到新的筛选培养基上(S<sub>3</sub>), S<sub>3</sub> 筛选培养基除 Cn 浓度适当降低(终浓度 250 mg/L)外其他同 S<sub>2</sub>。继续暗室 26 °C 恒温培养, 直至长出新的抗性愈伤。
7. 分化
- 7.1 从筛选培养基中将抗性愈伤(每一团只挑一颗抗性愈伤)转移至预分化培养基(见溶液配方)中(含 50 mg/L Hn 和 200 mg/L Cn), 暗室 26 °C 恒温培养一周。
- 7.2 从预分化培养基中挑选无褐化死亡的抗性愈伤转移到分化培养基(见溶液配方)中, 28 °C、光照 14 h/黑暗 10 h 培养 30~35 d。通常一周后愈伤开始转绿, 三周后开始长出幼芽。
8. 生根
- 准备装有 1/4 生根培养基(见溶液配方)的生根管。从分化培养基中挑出幼苗(同一块愈伤组织若分化出多株幼苗, 则挑选长势最好的一株), 用灭菌的剪刀剪去老根和周围附着的愈伤, 然后接入生根管, 28 °C、光照 14 h/黑暗 10 h 培养 10~20 d(根据幼苗大小决定生长时间)。

## 9. 炼苗与移栽

生根完成后开盖，加入自来水继续培养 3 d，然后取出再生植株用水洗掉生根培养基，修剪根部和叶部，移栽到温室。

### 注意事项

1. 整套过程必须在无菌条件下操作，尽量做到少污染。
2. 污染的材料要求及时清理，以免扩大污染。
3. 尽量挑取活力强的愈伤进行试验。
4. 在整个转化过程中，愈伤组织或者分化后的幼苗长至适当状态，应当尽快进行下一步操作（尽量减少组织培养时间可减少体细胞突变）。

### 溶液配方

#### 一、溶液配置

##### 1. MS<sub>max</sub> 储备液(10x)

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	16.5 g	
KNO <sub>3</sub>	19.0 g	
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.7 g	
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	3.7 g	
CaCl <sub>2</sub>	3.32 g or CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	4.4 g

逐个溶解，然后加蒸馏水定容至 1 L。

##### 2. MS<sub>min</sub> 储备液(100x)

MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	2.23 g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.86 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.62 g
KI	0.083 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.025 g
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.0025 g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.0025 g

注：Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 必须单独溶解，再与其它组分混合，加蒸馏水定容到 1 L，室温保存。

### 3. N<sub>6</sub>max 储备液(10x)

KNO <sub>3</sub>	28.3 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	4.0 g
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4.63 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	1.85 g
CaCl <sub>2</sub>	1.25 g or CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 1.66 g

逐个溶解，然后加蒸馏水定容到 1 L。

### 4. 继代 A 储备液(10x)

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	17 g
KNO <sub>3</sub>	19.0 g
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.7 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	3.7 g
CaCl <sub>2</sub>	3.02 g or CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O 4 g

逐个溶解，然后加蒸馏水定容至 1 L。

### 5. 继代 B 储备液(100x)

MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O	10 g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3 g
KI	0.75 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.25 g
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.025 g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.025 g

*注: Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 必须单独溶解，再与其它组分混合，加蒸馏水定容至 1 L, 4°C 保存。*

### 6. Fe<sup>2+</sup>-EDTA 储备液(100x)

在一个试剂瓶中加入 300 ml 蒸馏水，然后加入

FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O                      2.78 g

在另一试剂瓶中加入 300 ml 蒸馏水，并加热到 70 °C，然后加入

Na<sub>2</sub> EDTA·2H<sub>2</sub>O                      3.73 g

都溶解好后，将两个试剂瓶中的溶液混合，70 °C保温2 h，然后加入蒸馏水定容至 1 L, 4 °C避光保存。



## 7. Vitamin 储备液(100x)

Nicotinic acid	0.1 g
Pyridoxine HCl (VB <sub>6</sub> )	0.1 g
Thiamine HCl (VB <sub>1</sub> )	0.1 g
Glycine	0.2 g
Inositol	10 g

加蒸馏水定容到 1 L, 4 °C 避光保存。

 8. AA<sub>max</sub> 储备液(10x)

KCl	29.5 g
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	2.5 g
NaH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	1.5 g
CaCl <sub>2</sub> ·2H <sub>2</sub> O	1.5 g

加蒸馏水定容到 1 L, 室温避光保存。

 9. AA<sub>min</sub> 储备液(100x)

MnSO <sub>4</sub> ·H <sub>2</sub> O	1.0 g
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0.3 g
ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.2 g
KI	0.075 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub> ·2H <sub>2</sub> O	0.025 g
CuSO <sub>4</sub> ·5H <sub>2</sub> O	0.0025 g
CoCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.0025 g

*注: Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub> 单独溶解, 然后与其它组分混合并加蒸馏水定容至 1 L, 室温避光保存。*

## 10. 6-BA 储备液(1 mg/ml)

6-BA	100 mg
------	--------

加入 1.0 ml 1 N KOH 搅拌至 6-BA 完全溶解, 然后加蒸馏水定容到 100 ml, 室温保存。

## 11. KT 储备液(1 mg/ml)

KT	100 mg
----	--------

加入 1.0 ml 1 N KOH 搅拌至 KT 完全溶解, 然后加蒸馏水定容到 100 ml, 室温保存。



## 二、培养基配置

### 1. 诱导培养基

MS <sub>max</sub> 储备液(10x)	100 ml
MS <sub>min</sub> 储备液(100x)	10 ml
Fe <sup>2+</sup> -EDTA 储备液(100x)	10 ml
Vitamin 储备液(100x)	10 ml
2, 4-D 储备液	2.5 ml
Proline	0.5 g
Glutamine	0.5 g
Casein Enzymatic Hydrolysate	0.6 g
Sucrose	30 g
Phytigel	3 g

先加入900 mL蒸馏水，用1 N KOH调至pH值为6.0，加蒸馏水定容至1 L，然后煮沸分装至100 ml三角瓶，高压灭菌。

### 2. 继代培养基

继代 A 储备液(10x)	100 ml
继代 B 储备液(100x)	10 ml
Fe <sup>2+</sup> -EDTA 储备液(100x)	10 ml
Vitamin 储备液(100x)	10 ml
2, 4-D 储备液	3.0 ml
Proline	0.6 g
Glutamine	0.5 g
Casein Enzymatic Hydrolysate	0.8 g
Maltose	30 g
Phytigel	3.0 g

先加入900 ml蒸馏水，用1 N KOH调至pH值为6.0，加蒸馏水定容至1 L，然后煮沸分装至100 ml三角瓶，高压灭菌。

### 3. 预培养基

MS <sub>max</sub> 储备液(10x)	12.5 ml
MS <sub>min</sub> 储备液(100x)	1.25 ml

Fe <sup>2+</sup> -EDTA 储备液(100x)	1.25 ml
Vitamin 储备液(100x)	1.25 ml
2, 4-D 储备液	0.75 ml
Maltose	5.0 g
Agarose	1.75 g

先加入200 ml蒸馏水，用1 N KOH调至pH值为5.6，加蒸馏水定容至250 ml，高压灭菌。使用之前加入5 ml 50%葡萄糖与250  $\mu$ l AS储备液。

#### 4. 悬浮培养基

AA <sub>max</sub> 储备液(10x)	10 ml
AA <sub>min</sub> 储备液(100x)	1 ml
Fe <sup>2+</sup> -EDTA 储备液(100x)	1 ml
Vitamin 储备液(100x)	1 ml
2, 4-D 储备液	0.2 ml
Glutamine	0.0876 g
Asparagine	0.0216 g
Arginine	0.0176 g
Maltose	2 g
Glucose	1 g

用1 N KOH调至pH值为5.4，加蒸馏水定容至100 ml，高压灭菌，使用时加入100  $\mu$ l AS储备液。

#### 5. 共培养基

MS <sub>max</sub> 储备液(10x)	6.25 ml
MS <sub>min</sub> 储备液(100x)	1.25 ml
Fe <sup>2+</sup> -EDTA 储备液(100x)	2.5 ml
Vitamin 储备液(100x)	2.5 ml
2, 4-D 储备液	0.75 ml
Casein Enzymatic Hydrolysate	0.2 g
Maltose	5.0 g
Agarose	1.75 g

先加入200 ml蒸馏水，用1 N KOH调至pH值为5.4，加蒸馏水定容至250 ml，高压灭菌。使用之前加入5 ml 50%葡萄糖与250  $\mu$ l AS储备液。

## 6. 筛选培养基

继代 A 储备液(10x)	25 ml
继代 B 储备液(100x)	2.5 ml
Fe <sup>2+</sup> -EDTA 储备液(100x)	2.5 ml
Vitamin 储备液(100x)	2.5 ml
2, 4-D 储备液	0.625 ml
Proline	0.15 g
Glutamine	0.1 g
Casein Enzymatic Hydrolysate	0.15 g
Maltose	7.5 g
Agarose	1.75 g

先加入200 ml蒸馏水，用1 N KOH调至pH值为6.0，加蒸馏水定容至250 ml，高压灭菌。

## 7. 预分化培养基

N <sub>6max</sub> 储备液(10x)	25 ml
继代 B 储备液(100x)	2.5 ml
Fe <sup>2+</sup> -EDTA 储备液(100x)	2.5 ml
Vitamin 储备液(100x)	2.5 ml
6-BA 储备液	0.5 ml
KT 储备液	0.5 ml
NAA 储备液	50 $\mu$ l
IAA 储备液	50 $\mu$ l
Proline	0.15 g
Casein Enzymatic Hydrolysate	0.15 g
Maltose	5.0 g
Sucrose	2.5 g
Agarose	1.75 g

先加入200 ml蒸馏水，用1 N KOH调至pH值为5.9，加蒸馏水定容至250 ml，高压灭菌。

## 8. 分化培养基

N <sub>6</sub> max 储备液(10x)	100 ml
继代 B 储备液(100x)	6 ml
Fe <sup>2+</sup> -EDTA 储备液(100x)	10 ml
Vitamin 储备液(100x)	10 ml
6-BA 储备液	2.0 ml
KT 储备液	2.0 ml
IAA 储备液	0.2 ml
NAA 储备液	0.2 ml
Proline	0.6 g
Casein Enzymatic Hydrolysate	1 g
Maltose	20 g
Sucrose	10 g
Phytigel	3.0 g

先加入900 ml蒸馏水，用1 N KOH调至pH值为6.0，补蒸馏水定容至1 L，然后煮沸分装至100 ml三角瓶，高压灭菌。

## 9. 生根培养基

MS <sub>max</sub> 储备液(10x)	50 ml
MS <sub>min</sub> 储备液(100x)	5 ml
Fe <sup>2+</sup> -EDTA 储备液(100x)	10 ml
Vitamin 储备液(100x)	10 ml
Sucrose	20 g
Phytigel	3 g

先加入900 ml蒸馏水，用1 N KOH调至pH值为5.8，加蒸馏水定容至1 L，然后煮沸分装至生根管，高压灭菌。