

# 农杆菌介导水稻快速转化

## Agrobacterium-mediated Rapid Transformation of Rice

崔莹, 蔡朝霞, 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](mailto:hchen@mail.hzau.edu.cn)

引用格式: 崔莹, 蔡朝霞, 林拥军, 陈浩. (2018). 农杆菌介导水稻快速转化. *Bio-101* e1010176. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010176.

How to cite: Cui, Y., Cai, C. X., Lin, Y. J. and Chen, H. (2018). Agrobacterium-mediated rapid transformation of rice. *Bio-101* e1010176. Doi: 10.21769/BioProtoc.1010176. (in Chinese)

**实验原理:** Toki 等(2006)发现, 水稻成熟胚在诱导愈伤 1 d 后可以被农杆菌侵染, 诱导愈伤 5 d 后可以被高效转化。Toki (1997)研究表明在 32 °C、光照条件下, 水稻愈伤组织可以快速分裂。在该条件下进行筛选培养, 14 d 可以得到明显的抗性愈伤组织。本实验的目的是在实验室已有的遗传转化方法基础上, 参考 Toki 等(1997, 2006)发表的部分实验参数, 建立快速的水稻转化方法, 以缩短遗传转化周期。本实验在 32 °C、光照条件下诱导愈伤, 对诱导 5 d 的水稻愈伤组织进行侵染, 随后在 32 °C、光照条件下以潮霉素作为筛选剂进行筛选培养, 14 d 后获得了抗性愈伤组织, 对抗性愈伤组织进行分化培养, 获得稳定的转化植株。从愈伤组织诱导到转化再生植株生根, 整个实验周期约为 50 d。

**关键词:** 水稻成熟胚, 农杆菌介导, 快速转化

### 材料与试剂

1. 滤纸
2. 水稻种子
3. 75%酒精
4. 吐温 20
5. 农杆菌菌株 EHA105 (携带含目的基因载体)
6. 6-Benzylaminopurine (6-BA) (Sigma, catalog number: B-3408)
7. Kinetin (KT) (Sigma, catalog number: K-0753)

8. Naphthalene acetic acid (NAA) (Sigma, catalog number: N-0640)
9. Indole-3-acetic acid (IAA) (Sigma, catalog number: I-2886)
10. 2, 4-Dichlorophenoxyacetic acid (2, 4-D) (Sigma, catalog number: D-7299)
11. Kanamycin (USB, catalog number: 17924)
12. Casein Enzymatic Hydrolysate (CH) (Sigma, catalog number: N-4642)
13. Carbenicillin (Cn) (Bio Basic INC. catalog number: CDJ469)
14. Hygromycin B (Hn) (Roche, catalog number: 10843555001)
15. Nicotinic acid (Sigma, catalog number: N-0765)
16. Pyridoxine HCl (VB<sub>6</sub>) (Sigma, catalog number: P-8666)
17. Thiamine HCl (VB<sub>1</sub>) (Sigma, catalog number: T-3902)
18. Inositol (Sigma, catalog number: I-3011)
19. Phytigel (Sigma, catalog number: P-8169)
20. Dimethyl Sulfoxide (DMSO) (Sigma, catalog number: D-5879)
21. Acetosringone (AS) (Aldrich chem., CO 01531 EG)
22. Agar powder (日本分装, catalog number: BM0212)
23. Glycine (日本分装, catalog number: BA0802)
24. Proline (进口分装, catalog number: A1122)
25. D-sorbitol (上海生工, catalog number: SB0491)
26. NH<sub>4</sub>NO<sub>3</sub>
27. KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>
28. KNO<sub>3</sub>
29. MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O
30. CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O
31. MnSO<sub>4</sub>·4H<sub>2</sub>O
32. ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O
33. H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub>
34. KI
35. Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O
36. CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O
37. CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O
38. (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>
39. FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O

40. Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O
41. KOH
42. HgCl<sub>2</sub>
43. Glucose
44. Sucrose
45. LB 培养基
46. 封口胶
47. MS<sub>max</sub> 储备液(10x) (见溶液配方)
48. MS<sub>min</sub> 储备液(100x) (见溶液配方)
49. N<sub>6max</sub> 储备液(10x) (见溶液配方)
50. N<sub>6min</sub> 储备液(100x) (见溶液配方)
51. Fe<sup>2+</sup>-EDTA 储备液(100x) (见溶液配方)
52. Vitamin 储备液(100x) (见溶液配方)
53. 6-BA 储备液(1 mg/ml) (见溶液配方)
54. KT 储备液(1 mg/ml) (见溶液配方)
55. 2, 4-D 储备液(1 mg/ml) (见溶液配方)
56. IAA 储备液(1 mg/ml) (见溶液配方)
57. NAA 储备液(1 mg/ml) (见溶液配方)
58. 200 mM AS 储备液 (见溶液配方)
59. 1 N KOH 储备液 (见溶液配方)
60. 0.15% HgCl<sub>2</sub> (见溶液配方)
61. 50% 葡萄糖 (见溶液配方)
62. 250 mg/ml Cn (见溶液配方)
63. 50 mg/ml Kan (见溶液配方)
64. 诱导培养基 (见溶液配方)
65. 悬浮培养基 (见溶液配方)
66. 共培养基 (见溶液配方)
67. 筛选培养基 (见溶液配方)
68. 分化培养基 (见溶液配方)

## 69. 生根培养基 (见溶液配方)

### 仪器设备

1. 超净台
2. 酒精灯
3. 镊子
4. 平皿
5. 三角瓶
6. 生根管
7. 摇床
8. 培养箱

### 实验步骤

#### 1. 愈伤诱导

选取成熟饱满的水稻种子，去壳；75%酒精消毒 1~2 min，倒去酒精；用灭菌蒸馏水冲洗 2 次；加入 0.15%的升汞(含有 0.1%的吐温 20)浸泡 15~18 min，其间摇动数次；倒掉升汞，用灭菌蒸馏水冲洗 5 次。将消过毒的种子接入诱导愈伤培养基 (见溶液配方)，32 °C 光照培养 5~10 d (Toki, 1997; Toki 等, 2006)。

#### 2. 农杆菌划线活化

在侵染的前 2 d, 取农杆菌在含 50 mg/L kanamycin 的 LB 培养基上划线, 置于 28 °C 培养。

#### 3. 农杆菌的悬浮、侵染及共培养

侵染前, 将活化的农杆菌刮入悬浮培养基 (见溶液配方) 中, 28 °C, 180 rpm 震荡培养 3~3.5 h, 然后用悬浮培养基调节菌液浓度至  $OD_{600}=0.1\sim0.2$ 。将诱导 5~10 d 愈伤组织放入农杆菌悬浮液中, 侵染 1.5 min。倒掉菌液, 用灭菌滤纸吸干愈伤表面的菌液。愈伤表面覆盖灭菌滤纸, 超净台吹干 30 min。吹干后将愈伤转入表面覆盖有一层灭菌滤纸的共培养培养基 (见溶液配方), 先 20 °C 暗培养过夜, 然后转入 25 °C 培养箱继续暗培养 2 d。

#### 4. 清菌

共培养完成后，将愈伤组织用镊子转移到空的灭菌容器（建议口比较大的玻璃瓶，便于操作）中。用灭菌蒸馏水反复清洗愈伤 7~8 次，其中前面 3 次可快速清洗，后面 3~4 次清洗时每次浸泡 3-5 min。最后用含有 500 mg/L Cn 的灭菌蒸馏水浸泡愈伤 30 min。倒掉 Cn 溶液，用灭菌滤纸尽量吸干愈伤表面的水分，愈伤表面覆盖一层灭菌滤纸，超净台吹干 1 h。

#### 5. 筛选

将经过清菌后的愈伤摆放到筛选培养基上（见溶液配方），32 °C，光照培养 14 d。

#### 6. 分化

筛选 14 d 后，将抗性愈伤转入分化培养基（见溶液配方），28 °C 培养（光周期为 14 h 光照/10 h 黑暗）。

#### 7. 生根

待抗性愈伤在分化培养基（见溶液配方）上形成 3~4 cm 高的再生苗时，将其转入生根培养基（见溶液配方）培养，至形成完整的植株。

### 实验结果

成熟水稻种子接种到诱导培养基 5-10 d 后，有明显的愈伤组织形成（图 1a、1b）；用农杆菌（含有潮霉素抗性基因 *hpt* 和 *gfp* 表达框架）对愈伤组织进行侵染，共培养 3 d 后，将愈伤组织接种到含有 50 mg/L 潮霉素的筛选培养基上，14 d 后可以观察到新生愈伤组织，用荧光体视显微镜进一步观察，新生愈伤组织产生明显的绿色荧光信号，说明 *gfp* 基因整合到了水稻基因组（图 1c、1d）；将抗性愈伤组织接种到分化培养基，21 d 左右有再生植株形成，用荧光体视显微镜进一步观察，转化再生植株有绿色荧光信号，说明 *gfp* 基因在转化再生植株中稳定表达（图 1e、1f）。采用本实验中的快速转化方法，可以在 50 d 左右获得转化再生植株，相比先前的转化方法（需要 120 d 左右）遗传转化周期大大缩短。

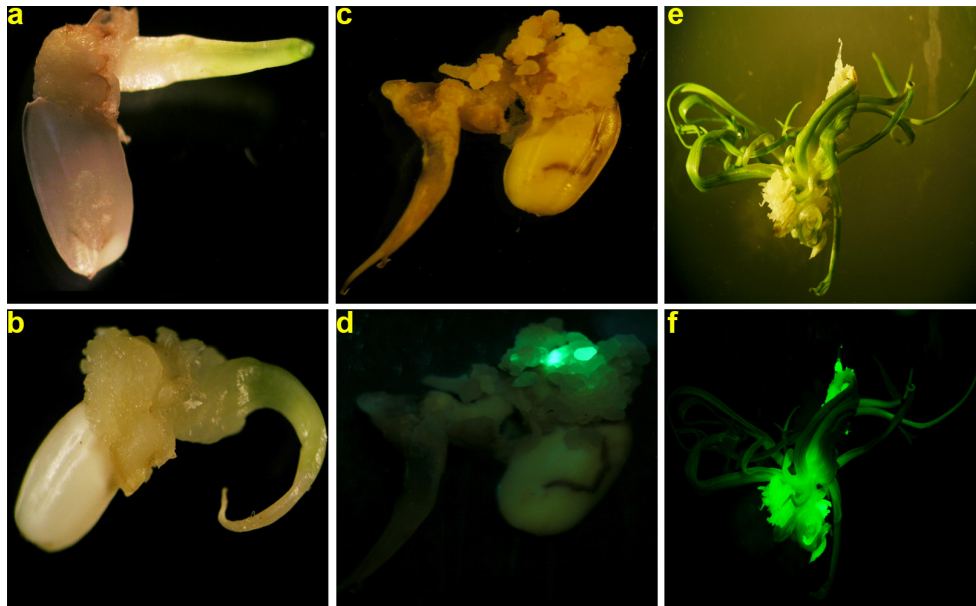


图 1. 农杆菌介导水稻快速转化。a 和 b 分别为诱导 5 d 和 10 d 的水稻愈伤组织；c 和 d 为筛选培养 14 d 形成的抗性愈伤组织；e 和 f 为分化培养 21 d 形成的再生植株。

### 注意事项

1. 本实验方法已在日本晴、中花 11、稻花香、Dongjin 等粳稻品种上获得验证，通过调整培养基也可以用于籼稻材料的遗传转化。
2. 愈伤组织的诱导时间因材料的基因型、种子的质量等而呈现差异，因此诱导愈伤组织后需要经常观察其生长状态，以确定合适的诱导时间。
3. 由于愈伤诱导时间短，一些染有内生菌的愈伤在侵染时不易被识别，导致同一批次侵染的愈伤全部污染。因此首先要保证种子的质量，要求选用内生菌少且活力较高的种子。
4. 筛选过程也可以在封有透气封口膜的三角瓶中进行，以避免水汽凝结影响抗性愈伤组织生长。
5. 在清菌时，可以用镊子将愈伤组织与种子分开，以降低农杆菌污染的概率。
6. 抗性愈伤组织的筛选时间因材料而异，如果筛选时间超过 14 d，则需要更换筛选培养基，以避免农杆菌污染。
7. 为避免分化过程中农杆菌污染，也可以在分化培养基中加入 250 mg/L Cn。

## 溶液配方

### 一、培养基相关母液

#### 1. MS<sub>max</sub> 储备液(10x)

|                                      |        |
|--------------------------------------|--------|
| NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>      | 16.5 g |
| KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>      | 1.7 g  |
| KNO <sub>3</sub>                     | 19.0 g |
| MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 3.7 g  |
| 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 |

Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 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>6max</sub> 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> ·2H <sub>2</sub> O            | 1.66 g |

逐个溶解，然后加蒸馏水定容到 1 L。

#### 4. N<sub>6min</sub> 储备液(100x)

|                                      |        |
|--------------------------------------|--------|
| MnSO <sub>4</sub> ·4H <sub>2</sub> O | 0.44 g |
| ZnSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O | 0.15 g |
| H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>       | 0.16 g |
| KI                                   | 0.08 g |

逐个溶解，然后加蒸馏水定容到 1 L。

#### 5. 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，在 70 °C 保温 2 h，然后加蒸馏水定容至 1 L，4 °C 避光保存。

#### 6. 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 保存。

#### 7. 6-BA 储备液(1 mg/ml)

6-BA 100 mg

加入 1.0 ml 1N KOH 搅拌至 6-BA 完全溶解，然后加蒸馏水定容到 100 ml，4 °C 保存。

#### 8. KT 储备液(1 mg/ml)

KT 100 mg

加入 1.0 ml 1N KOH 搅拌至 KT 完全溶解，然后加蒸馏水定容到 100 ml，4 °C 保存。

#### 9. 2, 4-D 储备液(1 mg/ml)

2, 4-D 100 mg

加入 1.0 ml 1N KOH 搅拌 5 min，然后加 10 ml 蒸馏水搅拌至 2,4-D 完全溶解，用蒸馏水定容至 100 ml，4 °C 保存。

#### 10. IAA 储备液(1 mg/ml)

IAA 100 mg

加入 1.0 ml 1N KOH 搅拌至 IAA 完全溶解，然后用蒸馏水定容至 100 ml，4 °C 避光保存。



#### 11. NAA 储备液(1 mg/ml)

NAA 100 mg

加入 1.0 ml 1N KOH 搅拌至 NAA 完全溶解，然后用蒸馏水定容到 100 ml，4 °C 避光保存。

#### 12. 200 mM AS 储备液

AS 0.39 g

溶解于 10 ml DMSO 中，用 1.5 ml 离心管分装，-20 °C 保存。

#### 13. 1 N KOH 储备液

KOH 5.6 g

用 100 ml 蒸馏水溶解，室温保存。

#### 14. 0.15% HgCl<sub>2</sub>

HgCl<sub>2</sub> 1.5 g

加蒸馏水溶解后定容至 1,000 ml，加入 1,000 μl 吐温 20，混合均匀，放入棕色试剂瓶，室温保存。

#### 15. 250 mg/ml Cn

Cn 2.5 g

超净台中加入灭菌蒸馏水至终体积为10 ml，完全溶解，-20 °C保存。

#### 16. 50 mg/ml Kan

Kan 0.5 g

超净台中加入灭菌蒸馏水至终体积为10 ml，完全溶解，-20 °C保存。

#### 17. 50% 葡萄糖

葡萄糖50 g

加入蒸馏水溶解，定容至100 ml，121 °C灭菌15 min，4 °C保存。

## 二、培养基的配制

### 1. 诱导培养基

N<sub>6</sub>max 储备液(10x)                      100 ml

N<sub>6</sub>min 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    | 0.6 g  |
| CH         | 0.8 g  |
| Sucrose    | 30 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 100 ml 三角瓶，高压灭菌。

## 2. 悬浮培养基

|                                  |          |
|----------------------------------|----------|
| N <sub>6</sub> max 储备液(10x)      | 12.5 ml  |
| N <sub>6</sub> min 储备液(100x)     | 1.25 ml  |
| Fe <sup>2+</sup> -EDTA 储备液(100x) | 1.25 ml  |
| Vitamin 储备液(100x)                | 2.5 ml   |
| Proline                          | 0.15 g   |
| CH                               | 0.2 g    |
| 2, 4-D 储备液                       | 0.625 ml |
| Sucrose                          | 5 g      |

用 1 N KOH 调至 pH 值为 5.2，加蒸馏水定容至 250 ml，高压灭菌，使用时加入 5 ml 50%葡萄糖与 250 μl AS 储备液。

## 3. 共培养基

|                                  |          |
|----------------------------------|----------|
| N <sub>6</sub> max 储备液(10x)      | 12.5 ml  |
| N <sub>6</sub> min 储备液(100x)     | 1.25 ml  |
| Fe <sup>2+</sup> -EDTA 储备液(100x) | 1.25 ml  |
| Vitamin 储备液(100x)                | 2.5 ml   |
| 2, 4-D 储备液                       | 0.625 ml |
| Proline                          | 0.15 g   |
| CH                               | 0.2 g    |
| Sucrose                          | 7.5 g    |
| Agar powder                      | 2 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 μl AS 储备液。

#### 4. 筛选培养基

|                                  |          |
|----------------------------------|----------|
| N <sub>6</sub> 储备液(10x)          | 25 ml    |
| N <sub>6</sub> 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   |
| CH                               | 0.2 g    |
| Sucrose                          | 7.5 g    |
| Agar powder                      | 2 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。使用时加入 250  $\mu$ l Hn (50 mg/ml)和 500  $\mu$ l Cn (250 mg/ml)，倒入灭菌的平皿中，超净台上吹干约 2 h 使用。

#### 5. 分化培养基

|                                  |        |
|----------------------------------|--------|
| 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  |
| KT 储备液                           | 2.0 ml |
| NAA 储备液                          | 0.2 ml |
| Proline                          | 0.6 g  |
| CH                               | 0.8 g  |
| D-sorbitol                       | 30 g   |
| Sucrose                          | 30 g   |
| Phytigel                         | 3.0 g  |

先加入 900 ml 蒸馏水，用 1 N KOH 调至 pH 值为 5.8，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。

#### 6. 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) | 5 ml |
| Vitamin 储备液(100x)                | 5 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。

### 参考文献

1. Toki, S., Hara, N., Ono, K., Onodera, H., Tagiri, A., Oka, S. and Tanaka, H. (2006). [Early infection of scutellum tissue with \*Agrobacterium\* allows high-speed transformation of rice.](#) *Plant J* 47(6): 969-976.
2. Toki, S. (1997). [Rapid and efficient \*Agrobacterium\*-mediated transformation in rice.](#) *Plant Mol Biol Rep* 15: 16-21.