

# 玉米淀粉分支酶 *SBEIIb* 基因遗传转化 玉米自交系的研究

车昕明<sup>1 3</sup> 郭新梅<sup>2 3</sup> 裴玉贺<sup>2 3</sup> 高学艳<sup>2 3</sup> 宋希云

(1. 青岛农业大学 生命科学学院, 山东 青岛 266109 2. 青岛农业大学 农学与植保学院, 山东 青岛 266109 ,  
3. 青岛农业大学 青岛市主要农作物种质资源创新与应用重点实验室, 山东 青岛 266109)

**摘要:** 以玉米自交系丹黄 25 为试材, 用农杆菌介导法将玉米淀粉分支酶 *SBEIIb* 基因转入玉米中, 探讨了农杆菌介导玉米愈伤组织转化的影响因素。结果表明: 愈伤组织经过 9 d 的继代, 菌液中乙酰丁香酮(AS) 浓度为 10 mg/L, 侵染时间为 20 min, 共培养 60 h 为最佳转化条件。获得的 4 株再生植株经 PCR 分析鉴定, 其中 3 株表现阳性, 证明外源基因已经整合到玉米基因组中。

**关键词:** 玉米; 农杆菌介导; 转化条件; *SBEIIb* 基因

**中图分类号:** Q78; S513.03 **文献标识码:** A **文章编号:** 1000-7091(2011)05-0050-04

## Study on Transformation of Starch Branching Enzyme *SBEIIb* Gene into Maize Inbred Line

CHE Xin-ming<sup>1 3</sup>, GUO Xin-mei<sup>2 3</sup>, PEI Yu-he<sup>2 3</sup>, GAO Xue-yan<sup>2 3</sup>, SONG Xi-yun<sup>1</sup>

(1. College of Life Science, Qingdao 266109, China; 2. College of Agronomy and Plant Protection, Qingdao 266109, China; 3. Qingdao Key Lab of Germplasm Innovation and Application of Major Crops, Qingdao Agricultural University, Qingdao 266109, China)

**Abstract:** The *SBEIIb* gene was transferred into maize inbred line Danhuang 25 by *Agrobacterium tumefaciens* mediated transformation. Factors influenced transformation efficiency was studied. The results showed that 9 days with subculture of callus, AS concentration in the bacilli concentration at 10 mg/L, 20 minutes infection time and co-culture 60 hours were the optimal conditions. PCR analysis on four resistance plants demonstrated that three of them were positive and the foreign gene was integrated into maize genome.

**Key words:** Maize; *Agrobacterium tumefaciens* mediated; Conversion conditions; *SBEIIb* gene

玉米淀粉广泛应用于食品、制糖、医药、化工等领域。特别是直链淀粉, 由于其独特的分子结构和理化性能而被广泛应用于食品、医疗、包装、石油、可降解塑料、印刷线路板及电子芯片等领域<sup>[1-10]</sup>。近年来我国以淀粉、变性淀粉、各种醇类等为代表的玉米深加工产业发展较快, 成为仅次于美国的第二大玉米淀粉加工国。我国自 20 世纪 80 年代起开始选育高淀粉玉米, 但由于缺少农艺性状好、抗性强的种质资源, 高直链淀粉育种未见报道。因此, 通过转基因技术、常规育种等技术相结合, 高效创新种质, 选育优良高直链淀粉玉米杂交种是当前我国玉米淀粉

加工产业发展的迫切需求。

直链淀粉合成主要由 4 个基因控制, 分别为颗粒结合型淀粉合成酶基因 *GBSSI*、淀粉分支酶基因 *SBEI*、*SBEIIa*、*SBEIIb*。淀粉分支酶催化葡萄糖以  $\alpha$ -1, 6 键连接, 形成分支结构<sup>[11, 12]</sup>, 是淀粉生物合成过程中的一个关键酶。其中 *SBEIIb* 对胚乳直链淀粉含量的作用最大, 其编码基因的突变可使玉米胚乳中直链淀粉的含量达到 50%。本试验通过农杆菌介导法将 *SBEIIb* 基因转入玉米自交系丹黄 25 中, 期望选育出直链淀粉含量大幅增加的玉米新种质。

收稿日期: 2011-05-05

基金项目: 山东省良种产业化工程; 青岛市自然科学基金(07-2-3-6-jch); 青岛市农业科技支撑项目(09-1-1-70-nsh)

作者简介: 车昕明(1984-), 男, 吉林白城人, 在读硕士, 主要从事分子育种研究。

通讯作者: 宋希云(1961-), 男, 山东安丘人, 教授, 主要从事作物遗传育种研究。

1 材料和方法

1.1 供试材料

- 1.1.1 植物材料 供试品种为玉米自交系丹黄25,由青岛农业大学分子育种实验室提供。
- 1.1.2 植物表达载体 本试验所用的表达载体为 pBAC3300-SBEIIb,含有玉米淀粉分支酶基因

*SBEIIb* 和除草剂筛选基因 *Bar*,载体结构简图如图 1。

- 1.1.3 培养基 玉米愈伤诱导及后期各阶段培养所需培养基为 N6 培养基,通过优化、改良获得;农杆菌的培养基为 YEP 培养基,各种培养基的组成成分如表 1 所示。

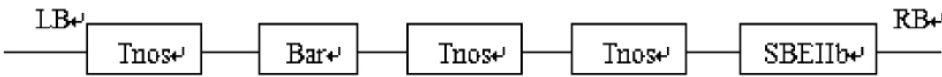


图 1 pBAC3300-SBEIIb 载体结构简图

Fig. 1 Schematic representation of pBAC3300-SBEIIb vector

表 1 培养基成分

Tab. 1 Medium component

培养基 Medium	成分 Component	pH 值 pH value
诱导培养基	N6 基本培养基、甘氨酸 2 mg/L、烟酸 0.5 mg/L、硝酸银 10 mg/L、肌醇 100 mg/L、2 $\mu$ -D 4 mg/L、蔗糖 30 g/L、琼脂粉 7 g/L	5.8
继代培养基	诱导培养基	5.8
共生培养基	诱导培养基、乙酰丁香酮(AS)	5.8
恢复培养基	诱导培养基	5.8
筛选培养基	诱导培养基、卡那霉素 50 mg/L	5.8
分化培养基	诱导培养基、L-脯氨酸 500 mg/L、KT 1.5 mg/L、IBA 0.2 mg/L	5.8
生根培养基	1/2 MS、NAA 0.5 mg/L、蔗糖 30 g/L、琼脂粉 7 g/L	5.8
YEP 培养基	酵母提取物 10 g/L、蛋白胨 10 g/L、NaCl 5 g/L	7.0

1.2 试验方法

- 1.2.1 玉米幼胚愈伤组织的诱导 取人工授粉 11 d 的玉米幼穗作为接种材料,75% 酒精表面灭菌后取其幼胚,在诱导培养基上接种进行诱导,每 15 d 用新鲜培养基继代 1 次,暗培养 3~4 周后形成稳定的 II 型胚性愈伤组织。
- 1.2.2 工程菌的制备 将附有质粒 pBAC3300-SBEIIb 的农杆菌 LBA4404 菌株接种于附加 50 mg/L 卡那霉素和 50 mg/L 利福平的 YEP 液体培养基中,在 28℃ 下振荡培养 24~36 h,培养至对数期( $OD_{600}$  值大约为 0.6),于 4℃、5 000 r/min 离心 10 min 收集菌体,菌体用侵染培养基重悬后等体积分装,添加 AS,使其终浓度分别为 0、10、20、30 mg/L,置冰上备用。
- 1.2.3 农杆菌转化 取生长旺盛的 II 型愈伤组织分别集中于三角瓶中,加入乙酰丁香酮终浓度为 0、10、20、30 mg/L 的菌液,分别侵染 15、20、25、30 min,侵染结束后将愈伤组织置于带滤纸的培养皿中,吸去多余菌液,然后转入共生培养基上,25℃ 暗共培养 24、36、48、60、72 h。

- 1.2.4 抗性愈伤组织的筛选 将共生培养后的愈伤组织置于恢复培养基上,培养 7 d 左右后置于筛选培养基上进行筛选,每 2 周更换 1 次筛选培养基,每次继代注意淘汰褐色和水渍化的愈伤组织,挑选长势旺盛的愈伤组织进行继代。
- 1.2.5 转化植株的获得 将筛选的抗性愈伤组织转移到分化培养基中,在 27℃、2 000 lx 光强、每天光照 16 h 条件下进行分化生长,直至得到幼苗,待其根系发达,炼苗后移栽于大棚。
- 1.2.6 转化植株的 PCR 检测 根据基因序列设计合成引物,上游引物 P1 为 5'-AGCAGATC-TATCGTGACCGG-3',下游引物 P2 为 5'-GAAGACTCTCTTGAATCGTTACC-3'。用 CTAB 法提取抗性植株的基因组 DNA<sup>[13]</sup>,进行 PCR 检测,反应体系为:模板 DNA 1.0  $\mu$ L,10  $\times$  *Taq* Buffer 2.5  $\mu$ L,dNTP(2.5 mmol/L) 2.0  $\mu$ L,P1(10  $\mu$ mol/L) 1.0  $\mu$ L,P2(10  $\mu$ mol/L) 1.0  $\mu$ L,*Taq* DNA 聚合酶(2.5 U/ $\mu$ L) 0.5  $\mu$ L,dH<sub>2</sub>O 17  $\mu$ L。反应条件为:95℃ 变性 3 min;94℃ 变性 50 s,58℃ 复性 50 s,72℃ 延伸 90 s,共 35 个循环;最后 72℃ 延伸 10 min。

## 2 结果与分析

### 2.1 菌液中 AS 浓度和侵染时间对转化效率的影响

丹黄 25 胚性愈伤组织用含有乙酰丁香酮浓度为 0, 10, 20, 30 mg/L 的菌液分别侵染 15, 20, 25, 30 min。试验结果表明(图 2) 随着侵染时间的延长, 获得抗性愈伤的百分比不断增加, 在侵染时间为 20 min 出现最大值, 之后随着时间的增长, 获得抗性愈伤的数量随之减少。使用含有不同浓度乙酰丁香酮菌液在不同的侵染时间内(15 ~ 30 min), 均能产生抗性愈伤组织, 但形成抗性愈伤组织的数量差异较大, AS 浓度为 0 ~ 10 mg/L 时, 获得抗性愈伤百分比随着其浓度的增大而不断升高, AS 浓度为 10 ~ 30 mg/L 时, 抗性愈伤百分比随着其浓度的增大而不断减少, 当 AS 浓度为 10 mg/L 时出现峰值。因此, 菌液中 AS 浓度为 10 mg/L, 侵染时间为 20 min 时获得的抗性愈伤最多, 比例达到 18.70%。

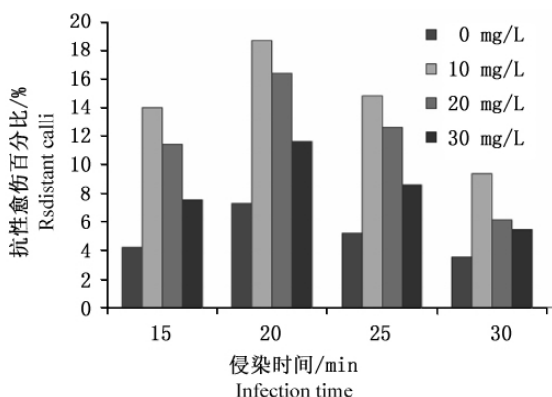


图 2 菌液中 AS 的浓度和侵染时间对转化效率的影响

Fig. 2 Effects of AS concentration in the broth and infection time on transformation frequency

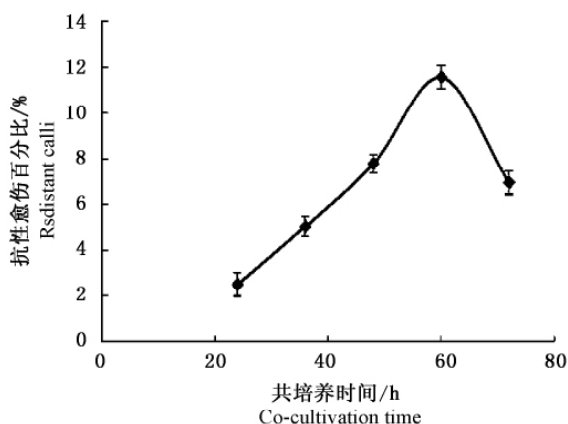


图 3 共培养时间对转化效率的影响

Fig. 3 Effects of co-cultivation time on transformation frequency

### 2.2 共培养时间对转化效率的影响

用含有 AS(浓度为 10 mg/L) 的侵染液处理愈伤组织 20 min 后, 在 25℃ 下进行共培养, 共培养时间设计为 24, 36, 48, 60, 72 h(图 3), 通过记录成活的抗性愈伤组织, 发现在 24 ~ 60 h 随着共培养时间的延长, 获得的抗性愈伤百分比不断提高, 共培养 60 h 时, 获得抗性 II 型愈伤百分比最高, 达到 11.33%, 而共培养 60 h 后随着共培养时间的增长呈下降趋势, 获得抗性愈伤数量不断减少。

### 2.3 不同的继代天数对农杆菌侵染的影响

丹黄 25 幼胚经 14 d 诱导产生 II 型胚性愈伤组织, 继代培养时间为 6, 9, 12, 15 d, 用含有 AS 浓度为 10 mg/L 的农杆菌侵染液侵染 20 min 后, 在 25℃ 下进行共培养 60 h, 结果如图 4 所示, 胚性愈伤组织继代 6 ~ 9 d 期间获得抗性愈伤的数量随着时间的增长而增加, 继代 9 d 后, 抗性愈伤的数量随着继代时间的增长而不断减少, 当继代 9 d, 获得抗性愈伤组织数量最多, 比例高达 10.83%。

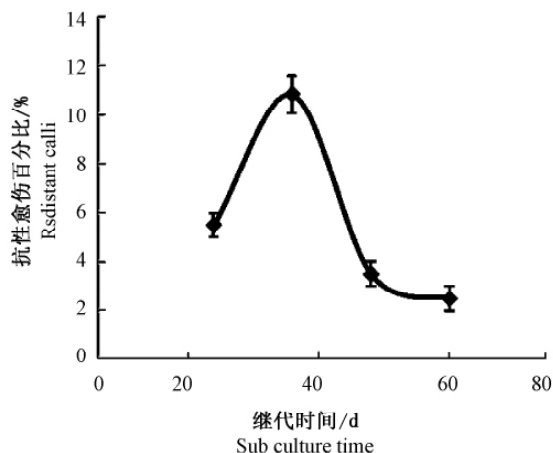
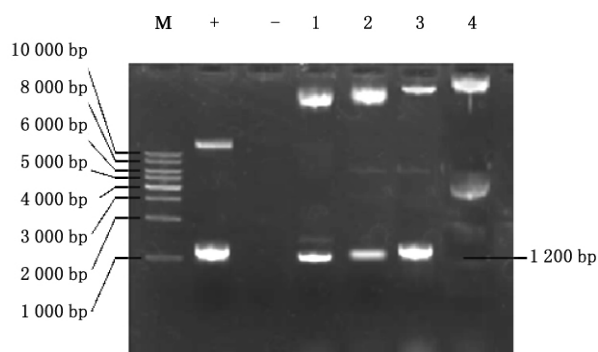


图 4 继代时间对转化效率的影响

Fig. 4 Effects of subculture time on transformation frequency



M. DNA 分子量 (DL2000); -. 阴性对照;  
+. 阳性对照; 1 ~ 3. 转基因植株。  
M. DNA marker (DL2000); -. Indicates negative control;  
+. Indicates positive control; 1 ~ 3. Indicates transgenic plants.

图 5 转基因植株 PCR 分析

Fig. 5 Analysis on transgenic plant PCR

## 2.4 转基因植株的 PCR 检测

通过该转化体系获得的转化植株经过除草剂筛选,得到 4 株抗性植株,提取其基因组 DNA 进行 PCR 扩增检测,PCR 结果显示(图 5),其中 3 株幼苗都扩增出和阳性对照相同的目标条带(1.2 kb),可以初步证明外源基因已经整合到玉米基因组中。

## 3 结论与讨论

试验结果表明,自交系丹黄 25 愈伤组织经过 9 d 继代转化率非常高,可能是由于经过 9 d 的继代,Ⅱ型胚性愈伤组织得到了充分的发育,超过 9 d 后,由于继代天数过长,愈伤活性下降,从而导致转化效率降低;在侵染过程中,添加适当 AS 可以显著提高玉米抗性愈伤组织的诱导率,原因可能是通过添加 AS 提高了其在玉米愈伤组织含量,AS 诱导侵入玉米愈伤的农杆菌 *Vir* 基因表达,进而提高了转化效率,但是由于 AS 是一种酚类物质,浓度过高不仅影响农杆菌活性,对植物外植体细胞亦有一定损伤,因而导致了转化效率下降和外植体褐化双重的负面影响;在农杆菌介导的遗传体系中,农杆菌和外植体共培养是整个转化过程中非常重要的环节,农杆菌附着后不能立即转化,其 T-DNA 转移和整合到植物体内需要一定的时间,这一段时间称为细胞调节期<sup>[14]</sup>。而且转化不同物种、不同外植体种类,其农杆菌最佳共培养时间不同。但共培养时间太长则会造成农杆菌过度生长,抑菌困难,造成愈伤组织死亡。

本试验通过该体系将 *SBEIIb* 基因转入玉米自交系丹黄 25,最后得到 3 株阳性植株,但是仅使用一种基因型的玉米幼胚,而农杆菌转化玉米自交系胚性愈伤组织的转化频率因玉米愈伤组织基因型不同而有明显差异<sup>[15]</sup>。下一步将选用不同基因型的玉米自交系作为材料,进一步建立和完善该转化体系。本试验对阳性植株的分子检测仅在 PCR 水平上,后期将对阳性植株的表达和后代遗传稳定性上做进一步研究,为选育出高直链淀粉含量的玉米新品种奠定基础。

## 参考文献:

- [1] 张志英,沈建福. 抗性淀粉最新研究进展[J]. 粮油食品科技, 2005, 13(4): 29-31.
- [2] 赵增煜. 高直链玉米淀粉糊化特性及其在可生物降解塑料中应用的探讨[J]. 淀粉和淀粉糖, 2006, 1: 28-30.
- [3] 王凤格,许美玲,马秋刚. 我国特用玉米产业及其发展前景[J]. 粮油食品科技, 2002, 10(2): 37-39.
- [4] 彭泽斌,田志国. 高淀粉玉米的产业化潜力分析[J]. 作物杂志, 2003(6): 10-12.
- [5] 陈艳萍,袁建华,颜伟,等. 高直链淀粉玉米研究进展[J]. 南京农学报, 2002, 18(3): 32-39.
- [6] 刘新香,库丽霞,吴连成,等. 玉米籽粒淀粉含量的遗传效应分析[J]. 河南农业科学, 2008(2): 25-28.
- [7] 张桂堂,卢东长城,孙重霞,等. 利用正义 RNAi 技术提高玉米直链淀粉含量效果的研究[J]. 华北农学报, 2010, 25(4): 92-96.
- [8] 张海艳. 爆裂玉米籽粒品质及淀粉粒形态分析[J]. 华北农学报, 2009, 24(S1): 307-308.
- [9] 赵建武,邱海杰,杨慧勇,等. 特用玉米生产现状及发展对策[J]. 山西农业科学, 2009, 37(3): 3-6.
- [10] 安伟,樊智翔,郭玉宏,等. 高淀粉玉米的品质改良[J]. 山西农业科学, 2002, 30(2): 25-27.
- [11] Clarke B R, Denyer K, Jenner C F, et al. The Relationship between the rate of starch synthesis, the adenosine 5'-diphosphoglucose concentration and the amylose content of starch in developing pea embryos[J]. Planta, 1999, 209: 324-329.
- [12] Denyer K, Johnson P. The control of amylose synthesis[J]. Plant Physiology, 2001, 158: 479-487.
- [13] 王关林,方宏筠. 植物基因工程原理与技术[M]. 北京: 科学出版社, 1998.
- [14] Radke S E, Andrews B M, Molone M M, et al. Transformation of *Brassica napus* L using *Agrobacterium tumefaciens*: developmentally regulated expression of reintroduced napin gene[J]. Theor Appl Genet, 1998, 75: 685-694.
- [15] 黄璐,卫志明. 农杆菌介导的玉米遗传转化[J]. 实验生物学报, 1999, 32(4): 381-389.