



## (12)发明专利

(10)授权公告号 CN 104911180 B

(45)授权公告日 2017.11.14

(21)申请号 201410800578.5

C12N 15/84(2006.01)

(22)申请日 2014.12.22

(56)对比文件

(65)同一申请的已公布的文献号

申请公布号 CN 104911180 A

CN 102978236 A, 2013.03.20,

王虹玲等.利用同源转基因技术培育氮高效利用转基因水稻.《浙江农业学报》.2011,第23卷(第5期),862-869.

(43)申请公布日 2015.09.16

(73)专利权人 华中农业大学

地址 430070 湖北省武汉市洪山区狮子山街1号

沈云龙等.马铃薯薯形突变体T-DNA插入侧翼序列分析.《中国马铃薯》.2013,第27卷(第3期),129-135.

(72)发明人 谢婷婷 谢从华 杨月英 许萱  
柳俊

Caius M. Rommens et al..Plant-derived transfer DNAs.《Plant Physiology》.2005,第139卷(第3期),1338-1349.

(74)专利代理机构 武汉帅丞知识产权代理有限公司 42220

审查员 马俊凯

代理人 朱必武

(51)Int.Cl.

C12N 15/11(2006.01)

权利要求书1页 说明书15页  
序列表4页 附图8页

(54)发明名称

马铃薯类T-DNA元件与同源转基因体系及其应用

(57)摘要

本发明公开了25条马铃薯类“T-DNA”元件与同源转基因体系及其应用。发明人通过大量试验研究和探索,最终获得了25条马铃薯类“T-DNA”元件,它们的核苷酸序列为序列表中的序列1至序列25所示。遗传转化表明,马铃薯类“T-DNA”元件及其构建的马铃薯同源转基因载体可在马铃薯安全转基因遗传育种中进行应用,为马铃薯类植物提供了一种无标记无骨架的同源转基因体系。

1. 马铃薯类“T-DNA”元件,它的核苷酸序列为序列表中的序列2所示。
2. 包含权利要求1所述马铃薯类“T-DNA”元件和安全筛选标记基因的马铃薯同源转基因体系。
3. 根据权利要求2所述的马铃薯同源转基因体系,其特征在于:所述的安全筛选标记基因为植物抗盐基因AtNHX1。
4. 权利要求1所述马铃薯类“T-DNA”元件在降低转基因植株中载体骨架的带入频率中的应用。

## 马铃薯类T-DNA元件与同源转基因体系及其应用

### 技术领域

[0001] 本专利属于植物基因工程技术领域。具体涉及25个马铃薯来源的类“T-DNA”元件和1个可应用于马铃薯及其他植物安全转基因的同源转基因体系及应用。其中25个马铃薯来源的类“T-DNA”元件及由此构建的同源转基因体系在提高马铃薯等各类植物转基因安全性等方面具有显著功能,可以在植物安全转基因领域进行应用。

### 背景技术

[0002] 随着全球人口飞速增长,20世纪60年代起始的“第一次绿色革命”面对现今60多亿人的吃饭问题已不堪重负。在2010年2月的美国科促会(AAAS)年会上,有专家预测,全球人口总数将在2050年左右膨胀至90亿。然而,在人口快速增长的同时,全球可耕种的农地、供使用的淡水和其他农业资源却没有多大的变化。为确保食品安全、减少环境损害,突破耕地、水等资源约束,保障全球粮食安全和农产品长期有效供给,归根结底要靠科技创新和应用。推进转基因技术研究与应用,是确保全球粮食安全的重要途径。

[0003] 尽管如此,上个世纪末以来,转基因作物的安全性在全球范围内引起了激烈的争论。总体而言,争论的焦点主要是无法完全确定所转移的其他物种基因在受体生物遗传背景中的全部表现,特别是来源于微生物的基因与功能元件序列在植物中的全部表现无法完全预测,转基因生物一旦进入自然环境,就会扎根繁衍,加上基因逃逸现象等,一旦确证存在风险,要从环境中收回将非常困难(李尉民,岳宁等.转基因生物及其产品的风险与管理.生物技术通报.2000,4:41-44)。

[0004] 为提高转基因作物的安全性,科学家们近年来提出了一种新的转基因策略——内源转基因(Cisgenesis/Intragenesis)。根据目标基因的来源不同,可以将转基因分为内源转基因(Cisgenesis/Intragenesis)和异源转基因(Transgenesis),内源转基因是利用受体物种本身或其近缘野生种的基因进行遗传修饰的转基因技术,异源转基因则是利用不同物种的功能基因,通过转基因将其导入到栽培品种中,育成新品种。内源转基因所用的基因即内源基因(Cisgene)早已存在于受体同物种或其近缘野生种中,因此并没有改变受体物种的基因库。和常规育种相比,内源转基因较常规育种可以简化操作、节约成本,且并无额外的风险,这一观点在世界各地都达成了共识,包括新西兰、北美和欧洲等国家的民意调查结果显示内源转基因技术普遍认为可被接受。因此,利用植物本身固有的功能基因采用内源转基因的策略对作物进行遗传改良,不仅能够有效避免异源基因所带来的各种风险、打消公众对转基因作物安全性的疑虑,而且简化了常规育种繁杂的田间杂交、选择程序,缩短育种周期,最终提高作物育种的效率。

[0005] 马铃薯是粮、菜、饲料和加工原料兼用的农作物,其适应性广、丰产性好、营养丰富、经济效益高,已成为世界上继水稻、小麦和玉米之后的第四大粮食作物。我国是世界上马铃薯生产第一大国,发展马铃薯产业对于保障我国粮食安全、促进农民增收和推动农业和农村经济持续发展具有重大的意义。栽培种马铃薯(*Solanum tuberosum* L.)的遗传基础狭窄,常常需要从野生种和近缘栽培种中引入抗病、优质基因用于栽培品种的遗传改良。但

马铃薯栽培种为同源四倍体作物,遗传分离复杂,且与许多野生种及原始栽培种存在生殖隔离,因此,传统的马铃薯育种技术——杂交育种技术限制了对这些宝贵资源的利用。随着现代科学技术的进步和不同学科间的相互渗透,基因工程育种技术已经融入到马铃薯育种中,产生了一大批靠常规育种方式难以产生的育种材料,丰富了育种资源、加快了育种进程。特别是近十多年来,我国学者利用基因工程技术进行了马铃薯抗病、抗逆及品质改良等多方面的研究,已经取得了一定的成绩,然而,如上所述,公众对基因工程改良品种安全性的担心,极大地限制了转基因马铃薯的商品化进程。

[0006] 为解决马铃薯转基因产品的安全隐患,部分学者已开始着手马铃薯内源转基因技术的研究,现有的报道大多强调了目的性状基因的内源性,然而构建表达载体的DNA序列仍然不能完全使用同源或者近缘物种来源的DNA序列,许多DNA序列仍然来源于微生物,例如:农杆菌来源的T-DNA边界序列等。转基因载体上的异源序列可以随目的基因插入到植物基因组中,其潜在的影响尚无法估计,引发公众对转基因产品的安全的忧虑。总体而言,目前公众对转基因安全的质疑主要包括两个方面,一是来源于不同物种之间的目的性状基因相互转化可能产生的威胁,二是转基因载体上的异源DNA序列元件(如农杆菌T-DNA序列等)随目的性状基因插入到植物基因组中的潜在威胁。目前对于同源目的性状基因的克隆研究已有很多,但针对载体序列的安全性研究还十分有限。因此,开发更加安全的转基因内源DNA序列元件用于遗传改良,是包括马铃薯在内的植物转基因技术研发的当务之急。

[0007] 鉴于内源DNA序列元件对于转基因安全性的重要性,国际上有些学者在综述类文章中对其进行了一些前瞻性的讨论[Conner A J, Barrell P J, et al.. Erasmuson A K, Nap J P, Jacobs J M. E. Intragenic vectors for gene transfer without foreign DNA. *Euphytica*. 2007, 154: 341-353;Rommens, C M, Haring M A, et al.. "The intragenic approach as a new extension to traditional plant breeding." *Trends Plant Sci.* 2007, 12 (9): 397-403],而且两个研究小组已经对内源DNA序列元件做了一些相关研究。新西兰皇家研究院作物与食品研究所的Baldwin等[Baldwin, S., A. Lokerse, et al.. Intragenic vectors: mining plant EST databases for T-DNA border-like sequences. *Proceedings of the 13th Australasian Plant Breeding Conference, Christchurch, New Zealand*. 2006 pp. 946-951]通过分析农杆菌T-DNA元件,发现该元件序列具有两个重要的保守结构域,分别用这两个结构域搜寻植物EST数据库发现,保守结构域在大多数植物的转录本中都广泛存在,搜索、分析及计算机辅助拼接后获得多条植物来源的“T-DNA”序列。经内源转化验证,其中部分植物来源的“T-DNA”序列具有生物学功能。Baldwin等研究的植物“T-DNA”序列虽然完全来自植物转录本且具有生物学功能,但是由于它们是将两个保守结构域进行分别搜索再经计算机拼接组成,因此,它们能否被定义为植物来源的内源DNA元件尚有争议。

[0008] 美国辛普劳公司的Rommens等[Rommens, C. M., O. Bougri, et al.. Plant-derived transfer DNAs. *Plant Physiol* 2005, 139 (3):1338-49]则根据农杆菌T-DNA的两个保守结构域设计简并引物,在马铃薯、水稻等多个植物基因组中分别克隆得到了数条类“T-DNA”元件,经转基因烟草研究,证实了5条马铃薯基因组来源的类“T-DNA”元件具有起始转移功能。相比农杆菌T-DNA起始转移效率,其中4条转移序列起始转移效率在50%到105%之间。其后Rommens实验室又继续利用这些类“T-DNA”元件构建了马铃薯同源转基因体

系,并用于转基因改良马铃薯的低温糖化及油炸后高丙烯酰胺等品质[Chawla, R., R. Shakya, et al.. Tuber-specific silencing of asparagine synthetase-1 reduces the acrylamide-forming potential of potatoes grown in the field without affecting tuber shape and yield. *Plant Biotechnol J* 2012, 10 (8):913-24; Rommens, C. M., H. Yan, K. Swords, et al.. Low-acrylamide French fries and potato chips. *Plant Biotechnol J* 2008, 6 (8):843-53; Rommens, C. M., C. M. Richaël, et al.. Engineered native pathways for high kaempferol and caffeoylquinic acid production in potato. *Plant Biotechnol J* 2008, 6 (9):870-86; Rommens, C. M., J. M. Humara, et al.. Crop improvement through modification of the plant's own genome. *Plant Physiol* 2004, 135 (1):421-31.]。

[0009] 综上所述,虽然已经认识到内源DNA序列元件的鉴定和利用对于转基因安全性具有重要性,但是目前国际上涉及到的报道多为综述类文章,相关研究类报道较少且较初步,仅Rommens实验室在该领域做出了一定的研究成果。然而,Rommens实验室的研究中使用的简并引物扩增方法并不能够全面寻找马铃薯类“T-DNA”元件,因此,该研究有待进一步全面展开。

### 发明内容

[0010] 随着马铃薯基因组测序框架图的完成,本发明人更加系统、全面地分析了马铃薯类“T-DNA”功能元件,通过分子生物学技术分离和转基因功能验证获得了25条未见报道的马铃薯类“T-DNA”元件,并检测了其中7条元件的起始转移效率,和25条元件的终止转移效率。最终本研究还将这些类“T-DNA”元件与植物抗盐基因AtNHX1一起构建了内源转基因体系,并通过该体系获得了内源转基因马铃薯植株,该体系能够应用于安全转基因研究与育种,势必成为马铃薯等植物安全转基因的重要应用平台。

[0011] 鉴于此,本发明的第一个目的在于提供一系列能够进行马铃薯同源转基因的重要功能元件。

[0012] 为了实现上述目的,发明人通过大量试验研究和探索,最终获得了25条马铃薯类“T-DNA”元件,它们的核苷酸序列为序列表中的序列1至序列25所示。

[0013] 本发明上述的25条马铃薯类“T-DNA”元件,其中具有起始转移功能的马铃薯类“T-DNA”元件7个,优选具起始转移功能类“T-DNA”元件3个,它们的核苷酸序列为表1所示。

[0014] 本发明上述的25条马铃薯类“T-DNA”元件,其中具有终止转移功能的马铃薯类“T-DNA”元件23个,优选具终止转移功能类“T-DNA”元件9个,它们的核苷酸序列为表2所示。

[0015] 表 1 优选具起始转移功能的马铃薯类“T-DNA”序列

[0016]

编号	序列信息
StTL01	CACTACAACCTCAATATATCCTGTAC
StTL02	TAATACTCTGATATATATCCTGCAT
StTL03	AAGTACAGCATCATATATCCTGAGT

[0017] 表 2 优选具终止转移功能的马铃薯类“T-DNA”序列

编号	序列信息
StTL02	TAATACTCTGATATATATCCTGCAT
StTL04	GCATACCTCTGAATATATCCTGCGG
StTL05	CTCTACCCCTAATATATCCTGTGT
StTL07	CCATACTTCACCATATATCCTGTCA
StTL11	TATTACGTTCTGATACATCCTGCAT
StTL12	GGGAACTCGAATATATATCCTGACT
StTL16	TCGTACAAATAAATAAATCCTGCAA
StTL17	GGGGACCACCCCATATATCCTGTTG
StTL18	TTCTACAAAGCAATACATCCTGCAA

[0018] 本发明的第二个目的在于提供了包含上述7个类“T-DNA”元件的起始转移表达载体,其中优选的表达载体3个;以及提供包含上述23个类“T-DNA”元件的终止转移表达载体;其中优选的表达载体有9个。

[0020] 本发明通过试验研究发现,将农杆菌T-DNA右边界序列换作三个优选马铃薯类“T-DNA”元件之一,可显著提高植物转基因的转化效率;将农杆菌T-DNA左边界序列换作九个优选马铃薯类“T-DNA”元件之一,可降低转基因植株中载体骨架的带入频率。经元件改良后的转基因表达载体具有更高的转化效率和更优的安全性。特别适用于构建马铃薯及相关植物的同源转基因体系和安全转基因体系,为提高植物转化效率及安全性提供保障,从而有利于加快转基因产品的商品化进程,降低传统育种成本,缩短传统育种时间,有利于提高育种效率、节约育种的人力物力、减少环境污染。

[0021] 因此,本发明的第三个目的在于提供由上述优选马铃薯类“T-DNA”元件StTL01替换T-DNA右边界、4个StTL04替换T-DNA左边界和抗盐基因AtNHX1作为安全筛选标记基因,共同构建的马铃薯内源转基因体系。本发明通过科学实验研究证实,该体系可以应用在马铃薯中进行内源无标记转化,在马铃薯能够获得无标记基因的同源转基因植株,安全应用于马铃薯转基因育种,有助于加快马铃薯育种进程及相关转基因产品的商品化进程。

[0022] 与现有技术相比,本发明克隆的马铃薯类“T-DNA”元件的起始转移效率较Rommens所得St02提高1.17~2.93倍不等,且首次验证马铃薯类“T-DNA”元件的终止转移功能,寻找到较农杆菌“T-DNA”元件更优的终止转移元件,且9条类“T-DNA”元件的终止转移效率较农杆菌T-DNA高。并且,通过将这些元件与安全筛选标记基因一起构建了马铃薯同源转基因载体,该载体通过转化马铃薯,获得转基因植株,能够有效表达目的基因,为获得马铃薯安全转基因植株提供技术保障。

## 附图说明

[0023] 图1为马铃薯类“T-DNA”序列起始转移效率分析结果图。

[0024] 图2为马铃薯类“T-DNA”序列终止转移效率分析结果图。

[0025] 图3为1~4次重复StTL04序列终止转移效率分析结果图。

[0026] 图4为质粒载体pXR0072构建示意图。

- [0027] 图5为质粒载体pXR0073构建示意图。
- [0028] 图6为酶切检测pXR0074质粒电泳图;其中泳道M:DL15000 marker;泳道1-3:*Hind*III单酶切质粒pXR0074。
- [0029] 图7为质粒载体pXR0074构建示意图。
- [0030] 图8为不同NaCl浓度下外植体的状态图;A:75 mM NaCl B:100 mM NaCl C:150 mM NaCl。
- [0031] 图9为不同激素浓度下外植体的状态图;A:S2分化培养基,B:S2-1分化培养基,C:S2-2分化培养基;黑色箭头指向分化芽产生的位置。
- [0032] 图10为GUS活性组织化学染色分析转化效率图;A图:pBI121;B图:pCAMBIA1302;C图:pCAMBIA 1305;D图:阴性对照。
- [0033] 图11为更换载体骨架的载体构建示意图。
- [0034] 图12为双酶切检测pXR0094质粒电泳图;泳道M:DL15000 marker;泳道1-2:AndI/*Sma*I双酶切质粒pXR0094。
- [0035] 图13为再生植株的PCR检测(At-L/R引物)电泳图;泳道M:DL2000 marker;泳道1:阳性对照;泳道2:阴性对照;泳道3:E3;泳道4-15:再生植株。
- [0036] 图14为再生植株的PCR检测(GUS-L/R引物)电泳图;泳道M:DL2000 marker;泳道1:阳性对照;泳道2:阴性对照;泳道3:E3;泳道4-15:再生植株。
- [0037] 图15为转基因株系的GUS检测图;1-2:转基因株系;E3:阴性对照E3。
- [0038] 图16为94-LBS-F/R(A)和94-LBS-2F/R(B)引物检测阳性植株的载体骨架电泳图;泳道M:DL2000 marker;泳道1:阳性对照;泳道2:阴性对照;泳道3:E3;泳道4-7:GUS染色阳性植株。

### 具体实施方式

[0039] 以下结合具体实施例对本发明做出更详细的描述。根据以下的描述和这些实施例,本领域技术人员可以确定本发明的基本特征,并且在不偏离本发明精神和范围的情况下,可以对本发明做出各种改变和修改,以使其适用各种用途和条件。

[0040] 本发明克隆共计克隆马铃薯类“T-DNA”元件25个,其中3个类“T-DNA”元件较前人研究的St02具有更优的起始转移效率,9个类“T-DNA”元件较农杆菌T-DNA具有更优的终止转移效率。另外,StTL01和StTL05元件与植物抗盐基因AtNHX1被用于构建马铃薯同源转基因载体,该表达载体可以通过农杆菌介导的遗传转化方法或其他转基因方法把目的基因转入马铃薯等各类植物中,通过筛选鉴定获得的无标记、无骨架的同源转基因植株或株系均属于本发明的保护范围。本发明通过在马铃薯体内进行同源转基因,可获得无标记、无骨架的同源转基因马铃薯植株,在各方面提升马铃薯转基因的安全性,本发明研究发现的各优先类“T-DNA”元件和由其构建的马铃薯同源转基因载体及其在各领域的应用均属于本发明保护的范畴。

[0041] 本发明马铃薯类“T-DNA”序列的生物信息学分析

[0042] 根据文献资料报道,并采用同源序列比对软件分析各种农杆菌的T-DNA序列,寻找到T-DNA元件的2个功能保守序列TAC和ATATATCCTG,设计简单的perl语言程序与blastn一起在下载NCBI各马铃薯相关数据库和马铃薯基因组数据库中比对简并序列

NNNTACNNNNNNATATATCCTGNNN (N=A/T/G/C), 在NCBI数据库和马铃薯基因组数据库中各得到5条类“T-DNA”序列, 其中NCBI数据库比对结果有3条为新发现的类“T-DNA”序列, 马铃薯基因组数据库比对结果有4条为新发型的类“T-DNA”序列, 将着些序列与Rommens等研究起始转移效率较高的St02和农杆菌T-DNA一起进行起始转移效率分析。

[0043] 另外, 根据文献资料报道, 含有2个简并性更强功能保守序列DAC和AKAHRTCCTG对类“T-DNA”元件的功能影响较小, 而在数据库比对中能够获得更多的类“T-DNA”元件。因此, 本发明通过在NCBI各马铃薯相关数据库和马铃薯基因组数据库中比对简并序列NNNDACNNNNNAKAHRTCCTGNNN (R=A/G, Y=C/T, M=A/C, K=G/T, S=C/G, W=A/T, H=A/C/, B=C/G/T, V=A/C/G, D=A/G/T, N=A/C/G/T), 去除其中与Rommens等相同的类“T-DNA”序列后, 在两个数据库中分别新发现61条和129条类“T-DNA”序列。

[0044] 马铃薯类“T-DNA”序列的克隆与功能检测载体的构建

[0045] 根据保守序列每个碱基对功能的影响, 选取7条类“T-DNA”序列与St02 (Rommens等研究转化效率最高的类“T-DNA”元件) 一起构建起始转移功能检测载体。具体操作步骤如下。

[0046] 2.1 pCAMBIA1302质粒载体T-DNA右边界序列外侧添加HindIII酶切位点

[0047] 根据pCAMBIA1302质粒载体序列, 在其T-DNA右边界序列旁设计如下4条引物:

[0048] overF1: AACTGCAGAGCAGCTTGAGCTTGGATCAGAT

[0049] *Pst* I

[0050] overR1: AACGCTCTTTTCTTTAGAGCTTGTTTTACCCGCCAATATATCCTGTCAA

[0051] *Hind* III

[0052] overF2: TATATTGGCGGGTAAACAAGCTTCTAAGAGAAAAGAGCGTTTATTAGAATAACG

[0053] *Hind* III

[0054] overR2: CGCGTAACTTAGGACTTGTGCGA

[0055] 通过重叠PCR技术, 以pCAMBIA1302质粒DNA为模板扩增出特异性PCR产物。重叠PCR扩增方法具体为: 先用overF1/overR1和overF2/overR2两对引物分别以pCAMBIA1302质粒载体为DNA模板, 在PCR仪上用pfu高保真酶(购自MBI Fermentas公司, 立陶宛共和国)扩增出单一条带, 用胶回收试剂盒(购自上海生工公司, 中国, 具体过程参见说明书)回收目标条带。然后将上述2种PCR产物混合作为模板, 用overF1和overR2为引物, 在PCR仪上用pfu高保真酶(购自MBI Fermentas公司, 立陶宛共和国)扩增出单一条带。用胶回收试剂盒(购自上海生物工程有限公司, 中国, 具体过程参见说明书)回收目标条带, 用*Pst*I和*Sph*I双酶切, 与同样经*Pst*I和*Sph*I双酶切后的pCAMBIA1302质粒载体大片段连接。取5 $\mu$ L连接产物进行热击转化大肠杆菌DH5 $\alpha$ 感受态(参照J. 萨姆布鲁克等著, 黄培堂等译, 分子克隆实验指南(第三版), 科学出版社, 2002版), 涂布于新配置的含有50 mg/L卡那霉素(Kam)的LB固体培养基上, 37 $^{\circ}$ C培养过夜, 挑选菌斑若干, 于含Kam 50 mg/L的液体LB培养基中, 于37 $^{\circ}$ C 200 r/min振荡培养过夜至浑浊。小量法提取质粒(参照J. 萨姆布鲁克等著, 黄培堂等译, 分子克隆实验指南(第三版), 科学出版社, 2002版), 酶切检测后送2个阳性克隆至上海生物工程有限进行测序, 测序结果正确的质粒载体命名为pCAMBIA1302R, 保存备用。

[0056] 2.2 马铃薯类“T-DNA”序列替代pCAMBIA1302R载体中农杆菌T-DNA右边界序列获得起始转移功能检测载体

[0057] 根据7条优选马铃薯类“T-DNA”元件序列和St02序列, 设计载体构建所需引物如



下:

- [0058] RB-F:CATGGCATGGATGAACTATACAAAG
- [0059] RB-StTL01:CCCAAGCTTCACTACAACCTCAATATATCCTGTACAACACTGATAGTTTAATTCCCGATC
- [0060] *Hind III* StTL01
- [0061] RB- StTL02:CCCAAGCTTTAATACTCTGATATATATCCTGCATAACACTGATAGTTTAATTCCCGATC
- [0062] *Hind III* StTL02
- [0063] RB- StTL03:CCCAAGCTTAAGTACAGCATCATATATCCTGAGTAACACTGATAGTTTAATTCCCGATC
- [0064] *Hind III* StTL03
- [0065] RB- StTL04:
- [0066] CCCAAGCTTGCATACCTCTGAATATATCCTGCGGAACACTGATAGTTTAATTCCCGATC
- [0067] *Hind III* StTL04
- [0068] RB- StTL05:CCCAAGCTTCTCTACCCCCTAATATATCCTGTGTAACACTGATAGTTTAATTCCCGATC
- [0069] *Hind III* StTL05
- [0070] RB- StTL06:CCCAAGCTTCCATACTATCAAATATATCCTGGTGAACACTGATAGTTTAATTCCCGATC
- [0071] *Hind III* StTL06
- [0072] RB- StTL07:CCCAAGCTTCCATACTTCACCATATATCCTGTCAAACACTGATAGTTTAATTCCCGATC
- [0073] *Hind III* StTL07
- [0074] RB-St02
- [0075] CCCAAGCTTCATTACCAACAAATATATCCTGGCCAACACTGATAGTTTAATTCCCGATC
- [0076] *Hind III* St02

[0077] 通过PCR技术,以pCAMBIA1302R质粒DNA为模板及上述引物分别扩增出特异性PCR产物。用HindIII和BstEII分别双酶切PCR产物和质粒载体pCAMBIA1302R,回收PCR酶切产物和pCAMBIA1302R质粒大片段。PCR酶切产物与pCAMBIA1302R质粒的大片段经连接、转化、提质粒、酶切检测和测序(具体方法同上)后,获得测序正确的质粒载体8个,分别命名为pRB-StTL01~07及pRB-St02。其中pRB-StTL01~07等7个载体即为起始功能检测载体,pRB-St02和pCAMBIA1302R分别为包含马铃薯类“T-DNA”元件和农杆菌T-DNA的起始功能检测对照载体。

[0078] 2.3 pCAMBIA1302R质粒载体T-DNA左边界序列内侧添加MluI酶切位点

[0079] 根据pCAMBIA1302R质粒载体序列,在其T-DNA右边界序列旁设计如下4条引物。

[0080] LoverF1:CCGGTGATATTCTCATTTTAGCCATT

[0081] LoverR1:

[0082] TTAAGTTGTCTAAGCGTCAATTACGCGTTGTTTACACCACAATATATCCTGCCA

[0083] *Mlu I*

[0084] LoverF2:

[0085] GGATATATTGTGGTGTAACAACGCGTATTGACGCTTAGACAACCTTAATAACACATT

[0086] *Mlu I*

[0087] LoverR2:GTCCGAGGGCAAAGAAATAGAGTAGAT

[0088] 同上,通过重叠PCR技术,以pCAMBIA1302R质粒DNA为模板先扩增出2条短片段PCR产物,最后再次以短片段PCR产物为模板扩增出一条长片段的特异性DNA(具体方法同前)。用胶回收试剂盒(购自上海生物工程有限公司,中国,具体过程参见说明书)回收目标条带。

用 *Psp* XI 和 *Sac* II 双酶切, 与同样经 *Psp* XI 和 *Sac* II 双酶切后的 pCAMBIA1302R 质粒载体大片段连接、转化、铺平板、提质粒、酶切(同前)。酶切检测后送 2 个阳性克隆至上海生物工程有限进行测序, 测序结果正确的质粒载体命名为 pCAMBIA1302RL, 保存备用。

[0089] 2.4 马铃薯类“T-DNA”序列替代 pCAMBIA1302RL 载体中农杆菌 T-DNA 序列获得终止转移功能检测载体

[0090] 根据 25 条优选马铃薯类“T-DNA”元件序列和 St02 序列, 设计终止转移功能检测载体构建所需引物如下。

[0091] LB-F TTCCGGTGATATTCTCATTTTAGCC LB-St02:

[0092] ATCGACGCGTTcattaccaacaaatatactctgcccCAGCCAGCCAACAGCTCC

[0093] *Mlu*I St02

[0094] LB-StTL01:

[0095] ATCGACGCGTTcactacaactcaatatactctgtacCCAGCCAGCCAACAGCTCC

[0096] *Mlu*I StTL01

[0097] LB-StTL02:

[0098] ATCGACGCGTTaataactctgatatactctgcatCCAGCCAGCCAACAGCTCC

[0099] *Mlu*I StTL02

[0100] LB-StTL03:

[0101] ATCGACGCGTTaagtacagcatcatatactctgagtCCAGCCAGCCAACAGCTCC

[0102] *Mlu*I StTL03

[0103] LB-StTL04:

[0104] ATCGACGCGTTgcatacctctgaatatactctgcccCAGCCAGCCAACAGCTCC

[0105] *Mlu*I StTL04

[0106] LB-StTL05:

[0107] ATCGACGCGTTctctaccccctaatactctctgtgtCCAGCCAGCCAACAGCTCC

[0108] *Mlu*I StTL05

[0109] LB-StTL06:

[0110] ATCGACGCGTTccatactatcaaatatactctgggtgCCAGCCAGCCAACAGCTCC

[0111] *Mlu*I StTL06

[0112] LB-StTL07:

[0113] ATCGACGCGTTccatactteaccatatactctgtcaCCAGCCAGCCAACAGCTCC

[0114] *Mlu*I StTL07

[0115] LB-StTL08:

[0116] ATCGACGCGTTcattacggttctaatacatctctgcatCCAGCCAGCCAACAGCTCC

[0117] *Mlu*I StTL08

[0118] LB-StTL09:

[0119] ATCGACGCGTTatgtaactgataaataaactctgaaaCCAGCCAGCCAACAGCTCC

[0120] *Mlu*I StTL09

[0121] LB-StTL10:

[0122] ATCGACGCGTTtaagacctggtaatatactctgggtcCCAGCCAGCCAACAGCTCC

- [0123] *Mlu*I StTL10
- [0124] LB-StTL11:
- [0125] ATCGACGCGTTattacgttctgatacatcctgcatCCAGCCAGCCAACAGCTCC
- [0126] *Mlu*I StTL11
- [0127] LB-StTL12:
- [0128] ATCGACGCGTTgggaactcgaatatatcctgactCCAGCCAGCCAACAGCTCC
- [0129] *Mlu*I StTL12
- [0130] LB-StTL13:
- [0131] ATCGACGCGTTggtaacaactcaatatatcctgaaaCCAGCCAGCCAACAGCTCC
- [0132] *Mlu*I StTL13
- [0133] LB-StTL14:
- [0134] ATCGACGCGTTatgtactgagccatatgtcctgcatCCAGCCAGCCAACAGCTCC
- [0135] *Mlu*I StTL14
- [0136] LB-StTL15:
- [0137] ATCGACGCGTTttctactacttgatatgtcctgtacCCAGCCAGCCAACAGCTCC
- [0138] *Mlu*I StTL15
- [0139] LB-StTL16:
- [0140] ATCGACGCGTTtctgtaaaataaaatcctgcaaCCAGCCAGCCAACAGCTCC
- [0141] *Mlu*I StTL16
- [0142] LB-StTL17:
- [0143] ATCGACGCGTTggggaccaccccatatcctgttgCCAGCCAGCCAACAGCTCC
- [0144] *Mlu*I StTL17
- [0145] LB-StTL18:
- [0146] ATCGACGCGTTttctacaaagcaatacatcctgcaaCCAGCCAGCCAACAGCTCC
- [0147] *Mlu*I StTL18
- [0148] LB-StTL19:
- [0149] ATCGACGCGTTgcatacaciaagataaatcctgtaa CCAGCCAGCCAACAGCTCC
- [0150] *Mlu*I StTL19
- [0151] LB-StTL20:
- [0152] ATCGACGCGTTaaggacaaatatatatcctgaaCCAGCCAGCCAACAGCTCC
- [0153] *Mlu*I StTL20
- [0154] LB-StTL21:
- [0155] ATCGACGCGTTgcatacagaaacatacatcctgatacCCAGCCAGCCAACAGCTCC
- [0156] *Mlu*I StTL21
- [0157] LB-StTL22:
- [0158] ATCGACGCGTTagaaccacttaatatatcctgtcaCCAGCCAGCCAACAGCTCC
- [0159] *Mlu*I StTL22
- [0160] LB-StTL23:
- [0161] ATCGACGCGTTgacaactacataatatcctgttcCCAGCCAGCCAACAGCTCC

[0162] *Mlu*I StTL23

[0163] LB-StTL24:

[0164] ATCGACGCGTTtggtactattatatatgtcctgtctCCAGCCAGCCAACAGCTCC

[0165] *Mlu*I StTL24

[0166] LB-StTL25:

[0167] ATCGACGCGTTatttacaattaaatgtcctgcatCCAGCCAGCCAACAGCTCC

[0168] *Mlu*I StTL25

[0169] 通过PCR技术,以pCAMBIA1302RL质粒DNA为模板及上述引物分别扩增出特异性PCR产物。用HindIII和*BstEII*分别双酶切PCR产物和质粒载体pCAMBIA1302RL,回收PCR酶切产物和pCAMBIA1302RL质粒大片段。PCR酶切产物与pCAMBIA1302RL质粒的大片段经连接、转化、提质粒、酶切检测和测序(具体方法同上)后,获得测序正确的质粒载体25个,分别命名为pLB-StTL01~25及pLB-St02。其中pLB-StTL01~25等25个载体即为终止功能检测载体,pLB-St02和pCAMBIA1302RL分别为包含马铃薯类“T-DNA”元件和农杆菌T-DNA的起始功能检测对照载体。

[0170] 转基因鉴定马铃薯类“T-DNA”序列功能及分析转移效率

[0171] 3.1 起始转移功能检测

[0172] 将构建好的7个起始转移功能检测载体和2个对照质粒载体pRB-St02及pCAMBIA1302R分别转入农杆菌菌株GV3101,然后通过农杆菌浸花法将构建好的各功能检测载体稳定转化Columbia生态型拟南芥。收取转化植株的种子,在抗性培养基上筛选阳性转基因植株,以此分析类“T-DNA”序列是否具有右边界起始转移功能,及分析其起始转移效率。

[0173] 转基因研究结果显示,7个类“T-DNA”序列均能够转化植物,获得转基因阳性植株。重复转化研究后经统计学分析显示,其中StTL01、StTL02、StTL03、StTL04、StTL07等5个类“T-DNA”的起始转移效率达到农杆菌T-DNA转移效率的50%以上(图1)。相比对照农杆菌T-DNA右边界,类“T-DNA”元件中StTL01和StTL02的转移效率显著高于对照( $p < 0.01$ ),St02、StTL03、StTL04和StTL07与对照无显著差异( $p > 0.05$ ),而StTL05和StTL06显著低于对照( $p < 0.01$ )。其中StTL01起始转移效率最高,为农杆菌T-DNA起始转移效率的2.67倍,是St02起始转移效率的2.93倍。

[0174] 经分析,StTL01~07等7个马铃薯类“T-DNA”序列具有右边界起始转移功能,其中StTL01、StTL02和StTL03等3个类“T-DNA”元件起始转移效率较2个对照St02和农杆菌T-DNA均显著升高。其中StTL01起始转移效率最高,为农杆菌T-DNA右边界起始转移效率的2.67倍。

[0175] 3.2 终止转移功能检测

[0176] 将构建好的25个终止转移功能检测载体和2个对照质粒载体pLB-St02及pCAMBIA1302RL分别转入农杆菌菌株GV3101,然后通过农杆菌浸花法将构建好的各终止功能检测载体稳定转化Columbia生态型拟南芥。将收得的拟南芥种子铺抗性平板,筛选阳性转基因植株。每个质粒提取约50份转基因植株的DNA,通过PCR扩增质粒载体骨架序列的方法鉴定T-DNA终止转移效率。PCR扩增引物为:

[0177] LBS-2F CCGCCTTACAACGGCTCTC LBS-R CCGTGGTTGGCTTGTATGGAG

[0178] PCR扩增结果表明,25个被检测的马铃薯类“T-DNA”中具有终止转移功能的类“T-DNA”有24个,只有StTL03不具备终止转移作用。其中,StTL02、StTL04、StTL05、StTL07、StTL11、StTL12、StTL16、StTL17、StTL18等9个马铃薯类“T-DNA”元件的终止转移效率较农杆菌T-DNA左边界序列效率高(图2),其中StTL04的停止转移效率最高(47.1%),其次StTL05、StTL07、StTL17等3个类“T-DNA”元件停止转移效率也达20%以上(图2)。

[0179] 3.3 重复串联LB序列进一步提高终止转移效率

[0180] 为进一步提高终止转移效率,降低质粒载体骨架的带入频率,本研究将StTL04进行多次重复串联,分析多个右边界对马铃薯载体骨架带入的影响。

[0181] 本研究首先根据pLB-StTL04载体序列设计包含StTL04的引物如下。

[0182] 2\*StTL04-F:CGCGCCGCAGGATATATTCAGAGGTATGCACGCGT

[0183] StTL04

[0184] 2\* StTL04-R:CGCGACGCGTGCATACCTCTGAATATATCCTGCGG

[0185] StTL04

[0186] 将上述PCR引物加水溶解至终浓度100uM,1:1混合正向反向两条引物。然后,在PCR仪上依次完成95℃变性30sec,72℃-37℃-25℃各2min等步骤,完成引物的逐步退火,使引物缓慢退火形成二聚体双链。通过MluI单酶切pLB-StTL04质粒载体,回收酶切产物与上述引物二聚体一起经连接、转化、铺Kam抗性平板(具体方法同上)后,直接挑取10个阳性克隆摇菌后送至上海生物工程有限公司测序,获得测序正确的质粒载体命名为pLB-2\*StTL04。其后,将pLB-2\*StTL04进行MluI单酶切,回收酶切产物与引物二聚体连接、转化、铺Kam抗性平板(具体方法同上),挑取10个阳性克隆摇菌后送至上海生物工程有限公司测序,获得测序正确的质粒载体命名为pLB-3\*StTL04。重复上述步骤获得测序正确的质粒载体命名为pLB-4\*StTL04。

[0187] 同前对pLB-2\*StTL04、pLB-3\*StTL04、pLB-4\*StTL04等3个质粒载体进行转基因拟南芥分析载体骨架带入频率。结果显示,2次、3次、4次重复分别将终止转移效率提高到51.85%、83.02%、88.71%,而对照农杆菌T-DNA左边界序列的终止转移效率为12.8%,1个StTL04的终止转移效率为47.1%(图3)。结果说明,多次重复串联马铃薯类“T-DNA”元件StTL04降低了载体骨架的带入频率,提高了终止转移效率。。

[0188] 马铃薯内源表达载体的构建

[0189] 从拟南芥cDNA、gDNA中先后分别克隆1617 bp的*AtNHX1*基因、292 bp的*AtNHX1*终止子序列和794 bp的*AtACT11*启动子,插入质粒载体pXR0057中成功构建了pXR0072载体,具体构建步骤见图4。

[0190] 为去除标记基因并整合类“T-DNA”边界序列,以及加入目的基因GUS,构建了pXR0073载体,具体构建方法为用AseI单切pXR0062质粒载体后连接大片段得pXR0069载体,pXR0069质粒载体用Bgl II和BstE II双切回收大片段与pCAMBIA1305质粒载体Bgl II和BstE II双切的GUS小片段连接得pXR0073(图5)。

[0191] 用EcoRI和PmeI双酶切pXR0072载体,回收小片段(2787 bp),EcoRI和SmaI双酶切pXR0073载体,回收大片段(9570 bp),在T4-ligase的作用下,16℃连接两个片段,连接产物热激转化大肠杆菌DH5α,挑单克隆提取质粒后用HindIII单酶切检测,酶切检测得到的片段大小与预期一致(图6),即得到质粒载体pXR0074载体(pCAMBIA1302-StTL01-*AtNHX1*-GUS-

4\*StTL04) (图7)。

[0192] 马铃薯盐筛选体系优化

[0193] 构建好内源转基因载体后,将载体转化农杆菌菌株GV3101,因采用耐盐基因 *AtNHX1* 代替常规的抗生素标记基因,所以实验中采取NaCl作为选择剂进行转化细胞的筛选,对内源转基因体系进行了摸索。

[0194] 不同浓度NaCl的遗传转化结果

[0195] 将构建好的内源转基因载体pXR0074按本实验室前期建立的快速遗传转化体系进行转化,具体操作步骤如下:

[0196] A. 将含有植物表达载体质粒的农杆菌GV3101接种于加有50 mg/L Km和50 mg/L Rif的LB液体培养基中,于28℃、200 r/min摇床上培养至OD<sub>600</sub>为0.5左右。

[0197] B. 于4000 r/min离心7 min,其沉淀用MS液体培养基重新悬浮。将生长2-3个月、直径约为0.5 cm的试管薯切成1-2 mm的薄片,在上述农杆菌菌液中浸泡10 min,取出后用无菌滤纸吸干表面菌液,转入共培养培养基S1 (MS+0.2 mg/L IAA+0.2 mg/L GA<sub>3</sub>+0.5 mg/L 6-BA+2 mg/L ZT) 中,于24℃暗培养2d。

[0198] C. 将暗培养2d后的薯片用灭菌的单菌水清洗2-3次,用无菌滤纸吸干薯片表面液体,然后将干净的薯片转移至附加NaCl/Km和Cef的分化培养基S2 (MS+0.2 mg/L IAA+0.2 mg/L GA<sub>3</sub>+0.5 mg/L 6-BA+2 mg/L ZT+ NaCl/ Km +400 mg/L Cef) 中,置于光照强度2000 Lx、光周期16 h/d、温度23±1℃的光照培养箱中培养。

[0199] D. 培养1周后薯片周围会有侧芽生长,需剪去侧芽,3-4星期后,从试管薯薄片中央会分化出抗性芽,将其剪下转入附加400 mg/L Cef的生根筛选培养基上诱导生根,从而获得完整植株。

[0200] 在分化培养基S2中加入不同浓度的NaCl进行转化细胞的筛选,其中NaCl的浓度分别为100 mM、150 mM、175 mM、200 mM、225 mM。筛选结果表明在盐浓度较高(225 mM、200 mM、175 mM)的分化培养基中外植体薯片出现不同程度的褐化,在低浓度的分化培养基(100 mM、150 mM)中外植体没有产生褐化,但是外植体周围有较严重的愈伤组织产生。

[0201] 增加6-BA浓度后遗传转化的结果

[0202] 为了解决外植体褐化和周围愈伤组织较多等问题,采取增加分化培养基S2培养基中6-BA浓度的方案进行筛选分化培养。将S2培养基中6-BA浓度提高至原来的2倍(1mg/L),并采取低浓度的NaCl (75 mM、100 mM、150 mM) 进行转化细胞的筛选。图8是分化培养40d后外植体在3种NaCl浓度下的生长状态。3种不同NaCl浓度培养条件下,外植体褐化明显减轻,周围的愈伤组织也略微减少,但未见明显的分化芽产生。

[0203] 更换激素浓度比例遗传转化的结果

[0204] 为进一步解决愈伤组织大量产生和无抗性芽形成的问题,采用50 mM NaCl筛选并降低S2分化培养基中激素浓度的方案进行遗传转化(表3)。结果表明,将NaCl的筛选浓度降低至50 mM,筛选分化培养40天时可以获得抗性芽(图9)。与添加正常激素浓度的S2分化培养基相比,添加1/2激素浓度的S2-1和不添加激素的S2-2分化培养基中愈伤组织形成更少,产生的分化芽更多(表5)。

[0205] 表3 分化培养基的激素浓度

[0206]

激素	S2	S2-1	S2-2
IAA	0.2 mg/L	0.1 mg/L	0 mg/L
GA3	0.2 mg/L	0.1 mg/L	0 mg/L
6-BA	0.5 mg/L	0.25 mg/L	0 mg/L
ZT	2.0 mg/L	1.0 mg/L	0 mg/L

[0207] 6. 瞬时转化分析载体骨架对转化效率的影响

[0208] 由于pCAMBIA系列质粒载体在马铃薯转化中的转化效率研究未见报道,而本研究发现以pCAMBIA1302载体骨架为基础的马铃薯内源转基因载体pXR0074在马铃薯中转化较难获得转基因阳性植株,因此,本研究采取瞬时转化的方法分析pBI121、pCAMBIA1302、pCAMBIA1305等3个质粒载体的转化效率。具体方法为,首先将pBI121、pCAMBIA1302、pCAMBIA1305这3个质粒转化农杆菌菌株GV3101,按本实验室建立的薯片快速转化体系进行马铃薯的农杆菌侵染和共培养(同5.4 A、B两步),共培养3天后用灭菌水清洗农杆菌3-4次,GUS染色观察并统计染色结果。结果显示,3个载体转化效率有明显差异,其中pBI121载体转化后的薯片几乎全部可被GUS染色液染成蓝色且着色较深(图10A),而pCAMBIA1302和pCAMBIA1305载体转化后的薯片可着色薯片较少、染色较浅(图10B、C),对照E3完全不着色(图10D)。统计数据表明,pBI121质粒载体的转化效率为 $89.37 \pm 1.18\%$ ,极显著高于pCAMBIA1302和pCAMBIA 1305质粒载体的转化效率(分别为 $1.57 \pm 1.36\%$ 和 $27.40 \pm 9.66\%$ , $p < 0.01$ ),见表4。

[0209] 表4 瞬时转化分析不同载体的转化效率

[0210]

载体	重复次数	平均转化效率	标准误差	差异显著性
pBI121	3	89.37%	1.18%	A
pCAMBIA1302	3	1.57%	1.36%	B
pCAMBIA1305	3	27.40%	9.66%	C

[0211] 注:LSD测验,不同字母表示差异达极显著水平( $p < 0.01$ )。

[0212] 内源表达载体的优化与表达体系的初步建立

[0213] 7.1内源表达载体的优化

[0214] 根据上述瞬时转化分析的结果,为提高转化效率,采取了替换上述pXR0074内源转基因载体的骨架序列的方案。首先在pBI121载体左边界附近加入*AvrII*酶切位点,构建pXR0090;再将pBI121的RB序列替换为马铃薯来源的StTL01序列,构建pXR0091;同时在pXR0074载体的左边界附近加入*AvrII*酶切位点,构建pXR0092;然后用*AvrII*和*PmeI*分别双酶切pXR0091和pXR0092载体,回收pXR0091的大片段(8599 bp)与pXR0092的小片段(6151 bp),经连接、转化、*AhdI/SmaI*双酶切检测(图12),表明已成功构建大小为14750 bp的内源转基因载体pXR0094(pBI121-StTL01-*AtNHX1*-GUS-4\*StTL04)。为将*AtNHX1*标记的与Km标记的两个载体进行遗传转化效率的比较,在pXR0094载体基础上加入*nptII*编码框,构建了pXR0096载体。具体构建策略见图11。

[0215] 内源表达体系的建立

[0216] 将已构建好的pXR0094和pXR0096载体质粒通过电击法转入农杆菌菌株GV3101,马

铃薯快速遗传转化体系将这两个载体转化鄂马铃薯3号及转心乌两个马铃薯材料(具体操作方法同前)。将pXR0094载体转化的外植体置于添加50 mM NaCl的分化培养基中筛选,将pXR0096载体转化的外植体置于添加50 mg/L Km的分化培养基中进行筛选,统计相关数据(表5)。结果显示,在Km筛选体系中,26.28%的外植体可以产生分化芽,在NaCl筛选体系下不同激素配比S2、S2-1、S2-2分别有4.67%、7.56%、22.61%外植体可以产生分化芽。在NaCl筛选体系下共获得了208株完整的植株,在Km筛选体系中获得了250株抗性芽。在Km筛选体系中,10.8%的分化芽可以在生根筛选培养基中诱导生根,因为在NaCl筛选体系下获得的抗性芽生长势较弱,进行生根筛选将造成植株死亡,因此在生根环节未设置耐盐性筛选,而是直接在普通MS培养基中进行培养,最后采取PCR方式检测阳性植株。

[0217] 表5 安全标记转化统计

载体	分化培养基	筛选处理	外植体总数 A	产生分化芽的外植体数 B(B/A)	获得的总抗性芽数 C	NaCl/Km 筛选生根植株数 D(D/C)	PCR 检测株数 E*	PCR 检测阳性株数 F(F/E)	GUS 检测阳性株数
[0218] pXR0094	S2	50mM NaCl	364	17(4.67%)	32	-	2	0(0.00%)	0
pXR0094	S2-1	50mM NaCl	397	30(7.56%)	46	-	17	5(29.41%)	1
pXR0094	S2-2	50mM NaCl	398	90(22.61%)	130	-	74	17(22.97%)	1
pXR0096	S2	50mg/ml Km	548	144(26.28%)	250	27(10.8%)	11	11(100.00%)	11

[0219] 注: -:表示数据缺失; \*:来自于总抗性芽数的一部分,其它株系丢失。

[0220] 为了对得到的完整植株PCR检测,分别在耐盐基因*AtNHX1*和*GUS*报告基因内部各设计一对引物At-L/R和GUS-L/R。

[0221] At-L: TCGTTCTGGTGC GGTAATAGG

[0222] At-R: GACTTGGGTGATTATCTTGCTATTGG

[0223] GUS-L: CTTGTAGCCGAAATCTGGAATG

[0224] GUS-R: TACCTGGGAGAAGATTCCGAC

[0225] 以完整植株的gDNA为模板,用这两对引物分别对其进行PCR检测,其中At-L/R扩增得到921 bp的特异片段(图13),GUS-L/R扩增得到667 bp的特异性片段(图14)。结果统计如表5中的PCR检测阳性株系数,93株耐盐基因标记的完整再生植株中获得22株阳性植株,11株Km标记的经生根筛选后的再生植株均检测为阳性。对PCR检测为阳性的株系进行了GUS活性组织化学染色的检测,GUS检测阳性株系数列,在鄂马铃薯3号和转心乌材料中分别获得1株阳性株系(图15),其中E3材料的1株转基因植株是在S2-2培养基中获得的,而转心乌材料的转基因株系是在S2-3培养基中获得的(表5)。而Km筛选获得的11株PCR阳性株系均能够成功染色(表5)。

[0226] PCR检测结果显示,Km生根筛选所获得的植株全部为PCR阳性株系,而在S2、S2-1和S2-2三种不同分化培养基上由NaCl筛选所获得的植株分别有0.00%、29.41%和22.97%的植株被检测为PCR阳性株系。GUS染色结果发现,Km筛选所得PCR阳性植株全部可被染色,而



NaCl所得PCR阳性植株有2株可被明显着色。

[0227] 转基因株系的骨架带入分析

[0228] 为了对PCR检测为阳性的耐盐基因标记的转基因株系分析其载体骨架带入的情况,在距离LB左端418bp处设计反向引物94-LBS-R,在LB右端45 bp和141 bp处分别设计正向引物94-LBS-F和94-LBS-2F。

[0229] 94-LBS-F:CCTGTATCGAGTGGTGATTTTGTG

[0230] 94-LBS-2F:TAGTTGCCGTTCTTCCGAATAGC

[0231] 94-LBS-R:GCTTCTTGACTCTTTTGTATTCTATGG

[0232] 以4株NaCl筛选所得GUS染色阳性转基因株系的gDNA为模板,用这94-LBS-F/94-LBS-R和94-LBS-2F/94-LBS-R进行特异性扩增,分别扩增出561 bp和656 bp的特异片段(图16),结果显示4株转基因株系中有1株未带入载体骨架。

[0233] 转基因株系的耐盐性检测

[0234] 取2个GUS检测为阳性的转基因株系(pXR0074-9和pXR0074-36)和对照(E3栽培种)进行耐盐性鉴定。具体操作方法为在MS培养基中加入0 mM、250 mM的不同浓度NaCl,培养15天后观察并统计试管苗在不同培养基中的生根状态和植株生长状态。结果显示,不添加NaCl,植株均能够全部生根且长势较好,无死亡植株,表明实验所用材料生长正常(表6)。在250 mM浓度下,E3的生根率为3.5%,死亡率为26.2%;pXR0074-9和pXR0074-36的生根率分别为13.6%和14.8%,高于对照,死亡率分别为13.6%、21.5%,低于对照(表6)。

[0235] 表6 转基因株系的耐盐性鉴定

NaCl 处理浓度	处理材料	平均生根率	平均死亡率
0 mM	E3	100.0%	0.0%
0 mM	pXR0074-9	100.0%	0.0%
0 mM	pXR0074-36	100.0%	0.0%
250 mM	E3	3.5%	26.2%
250 mM	pXR0074-9	13.6%	21.5%
250 mM	pXR0074-36	14.8%	13.6%

[0001]	序列表	
[0002]	<110> 华中农业大学	
[0003]	<120> 马铃薯类T-DNA元件与同源转基因体系及其应用	
[0004]	<160> 25	
[0005]	<210> 1	
[0006]	<211> 25	
[0007]	<212> DNA	
[0008]	<213> 人工序列	
[0009]	<400> 1	
[0010]	cactacaact caatatatcc tgtac	25
[0011]	<210> 2	
[0012]	<211> 25	
[0013]	<212> DNA	
[0014]	<213> 人工序列	
[0015]	<400> 2	
[0016]	taatactctg atatatatcc tgcac	25
[0017]	<210> 3	
[0018]	<211> 25	
[0019]	<212> DNA	
[0020]	<213> 人工序列	
[0021]	<400> 3	
[0022]	aagtacagca tcatatatcc tgagt	25
[0023]	<210> 4	
[0024]	<211> 25	
[0025]	<212> DNA	
[0026]	<213> 人工序列	
[0027]	<400> 4	
[0028]	gcatacctct gaatatatcc tgcgg	25
[0029]	<210> 5	
[0030]	<211> 25	
[0031]	<212> DNA	
[0032]	<213> 人工序列	
[0033]	<400> 5	
[0034]	ctctaccccc taatatatcc tgtgt	25
[0035]	<210> 6	
[0036]	<211> 25	
[0037]	<212> DNA	
[0038]	<213> 人工序列	

[0039]	<400> 6	
[0040]	ccatactatc aaatatatcc tggtg	25
[0041]	<210> 7	
[0042]	<211> 25	
[0043]	<212> DNA	
[0044]	<213> 人工序列	
[0045]	<400> 7	
[0046]	ccatacttca ccatatatcc tgtca	25
[0047]	<210> 8	
[0048]	<211> 25	
[0049]	<212> DNA	
[0050]	<213> 人工序列	
[0051]	<400> 8	
[0052]	cattacgttc taatacatcc tgcac	25
[0053]	<210> 9	
[0054]	<211> 25	
[0055]	<212> DNA	
[0056]	<213> 人工序列	
[0057]	<400> 9	
[0058]	atgtactgat aaataaatcc tgaaa	25
[0059]	<210> 10	
[0060]	<211> 25	
[0061]	<212> DNA	
[0062]	<213> 人工序列	
[0063]	<400> 10	
[0064]	taagacctgg taatatatcc tggtc	25
[0065]	<210> 11	
[0066]	<211> 25	
[0067]	<212> DNA	
[0068]	<213> 人工序列	
[0069]	<400> 11	
[0070]	tattacgttc tgatacatcc tgcac	25
[0071]	<210> 12	
[0072]	<211> 25	
[0073]	<212> DNA	
[0074]	<213> 人工序列	
[0075]	<400> 12	
[0076]	gggaactcga atatatatcc tgact	25
[0077]	<210> 13	

[0078]	<211> 25	
[0079]	<212> DNA	
[0080]	<213> 人工序列	
[0081]	<400> 13	
[0082]	ggtaacaact caatatatcc tgaaa	25
[0083]	<210> 14	
[0084]	<211> 25	
[0085]	<212> DNA	
[0086]	<213> 人工序列	
[0087]	<400> 14	
[0088]	atgtactgag ccatatgtcc tgcat	25
[0089]	<210> 15	
[0090]	<211> 25	
[0091]	<212> DNA	
[0092]	<213> 人工序列	
[0093]	<400> 15	
[0094]	ttctactact tgatatgtcc tgtac	25
[0095]	<210> 16	
[0096]	<211>	
[0097]	<212> DNA	
[0098]	<213> 人工序列	
[0099]	<400> 16	
[0100]	tcgtacaaat aaataaatcc tgcaa	25
[0101]	<210> 17	
[0102]	<211> 25	
[0103]	<212> DNA	
[0104]	<213> 人工序列	
[0105]	<400> 17	
[0106]	ggggaccacc ccatatatcc tgttg	25
[0107]	<210> 18	
[0108]	<211> 25	
[0109]	<212> DNA	
[0110]	<213> 人工序列	
[0111]	<400> 18	
[0112]	ttctacaaag caatacatcc tgcaa	25
[0113]	<210> 19	
[0114]	<211> 25	
[0115]	<212> DNA	
[0116]	<213> 人工序列	

[0117]	<400> 19	
[0118]	gcatacacia agataaatcc tgtaa	25
[0119]	<210> 20	
[0120]	<211> 25	
[0121]	<212> DNA	
[0122]	<213> 人工序列	
[0123]	<400> 20	
[0124]	aaggacaaat atatatatcc tgaac	25
[0125]	<210> 21	
[0126]	<211> 25	
[0127]	<212> DNA	
[0128]	<213> 人工序列	
[0129]	<400> 21	
[0130]	gcatacagaa acatacatcc tgate	25
[0131]	<210> 22	
[0132]	<211> 25	
[0133]	<212> DNA	
[0134]	<213> 人工序列	
[0135]	<400> 22	
[0136]	agaaccact taatatatcc tgtca	25
[0137]	<210> 23	
[0138]	<211> 25	
[0139]	<212> DNA	
[0140]	<213> 人工序列	
[0141]	<400> 23	
[0142]	gacaactaca taatatatcc tgttc	25
[0143]	<210> 24	
[0144]	<211> 25	
[0145]	<212> DNA	
[0146]	<213> 人工序列	
[0147]	<400> 24	
[0148]	tggtactatt atatatgtcc tgtct	25
[0149]	<210> 25	
[0150]	<211> 25	
[0151]	<212> DNA	
[0152]	<213> 人工序列	
[0153]	<400> 25	
[0154]	atttacaatt aatatgtcc tgcac	25

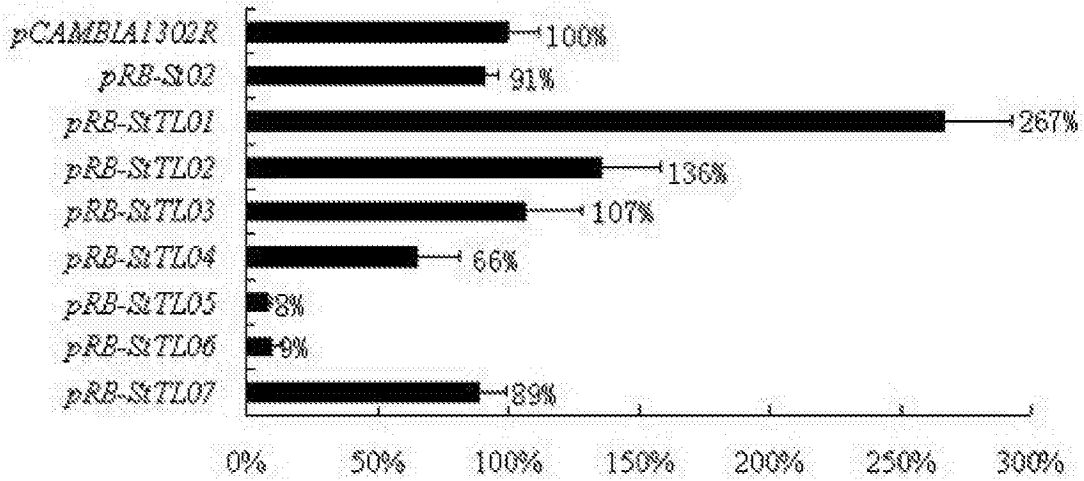


图1

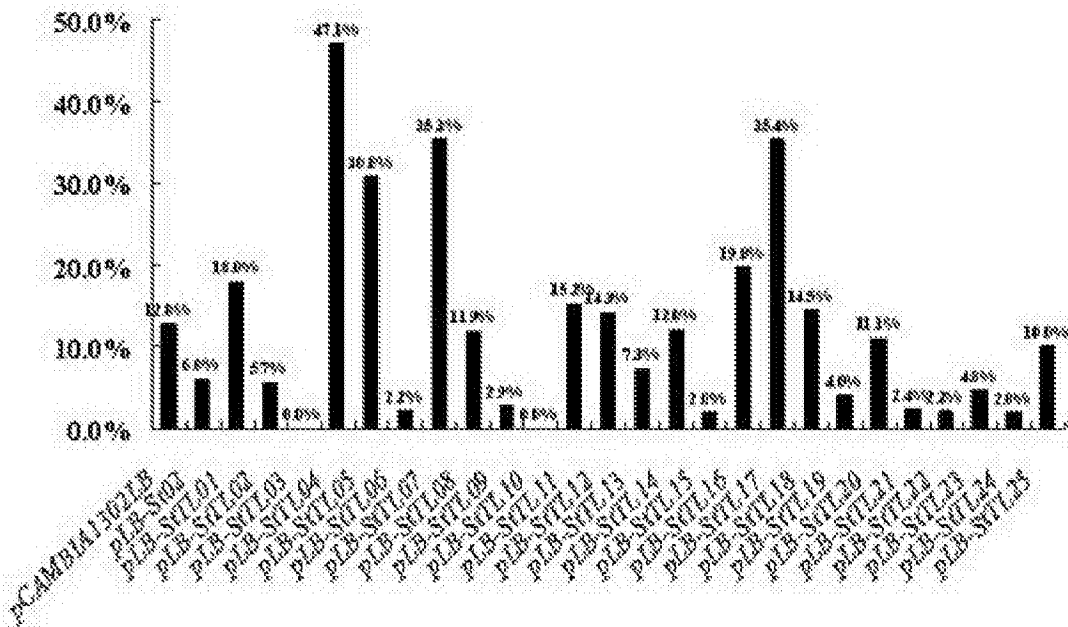


图2

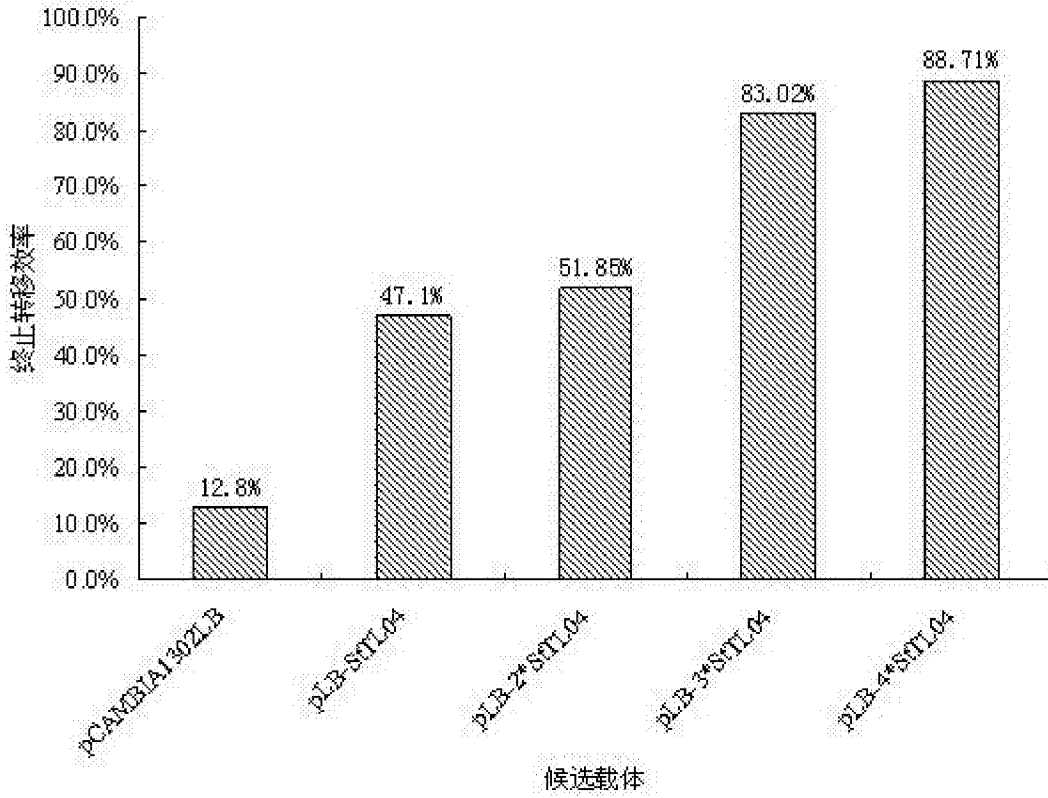


图3

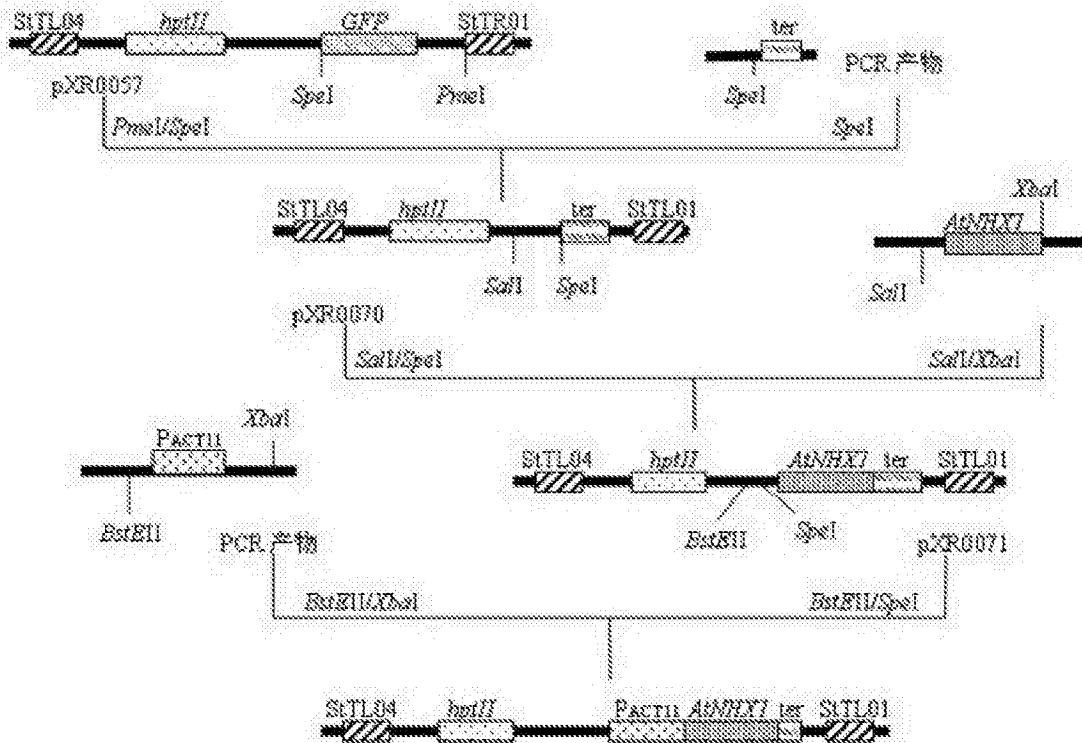


图4

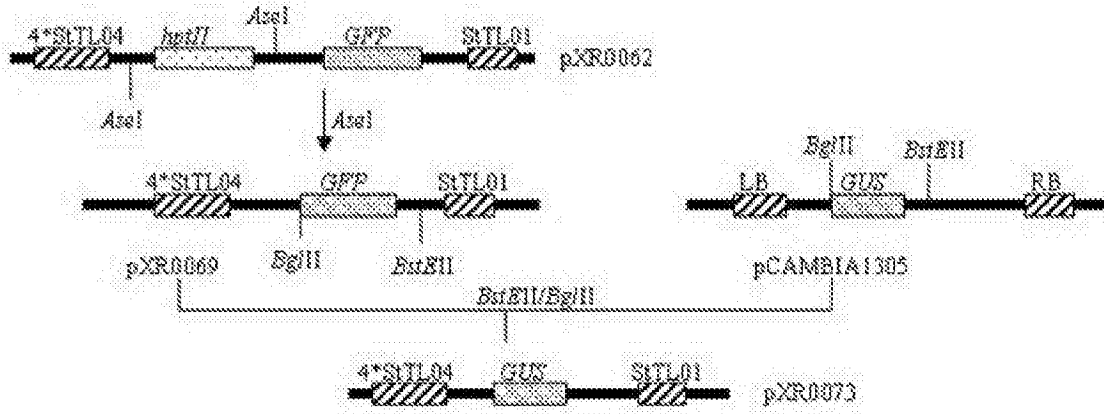


图5

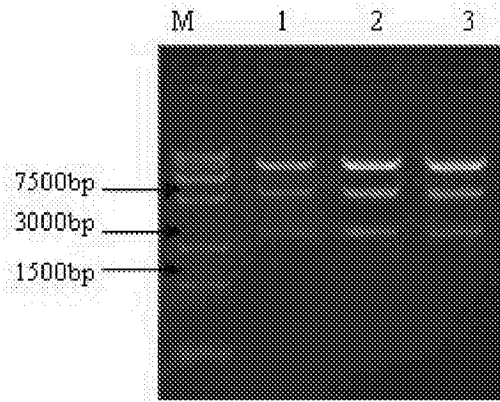


图6

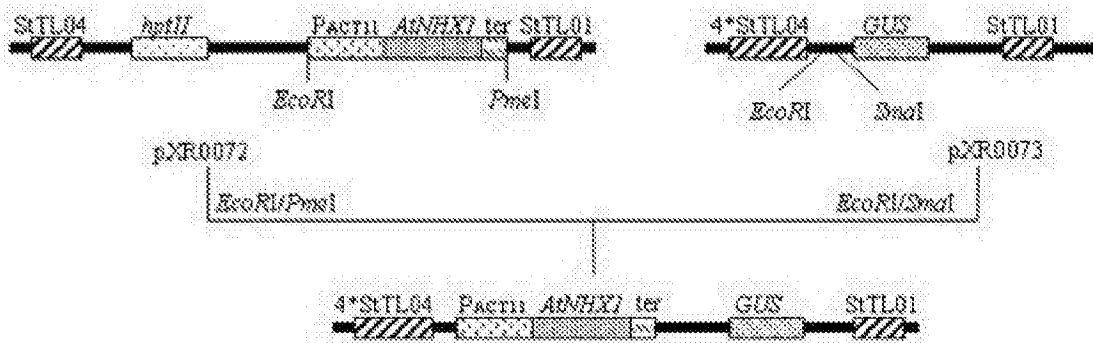


图7



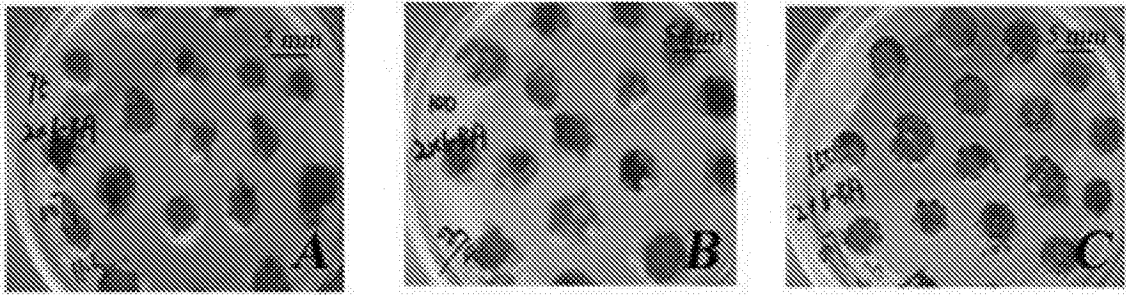


图8

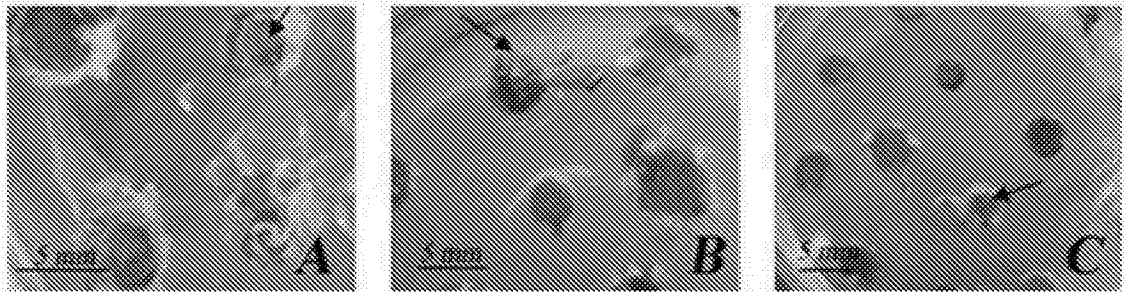


图9

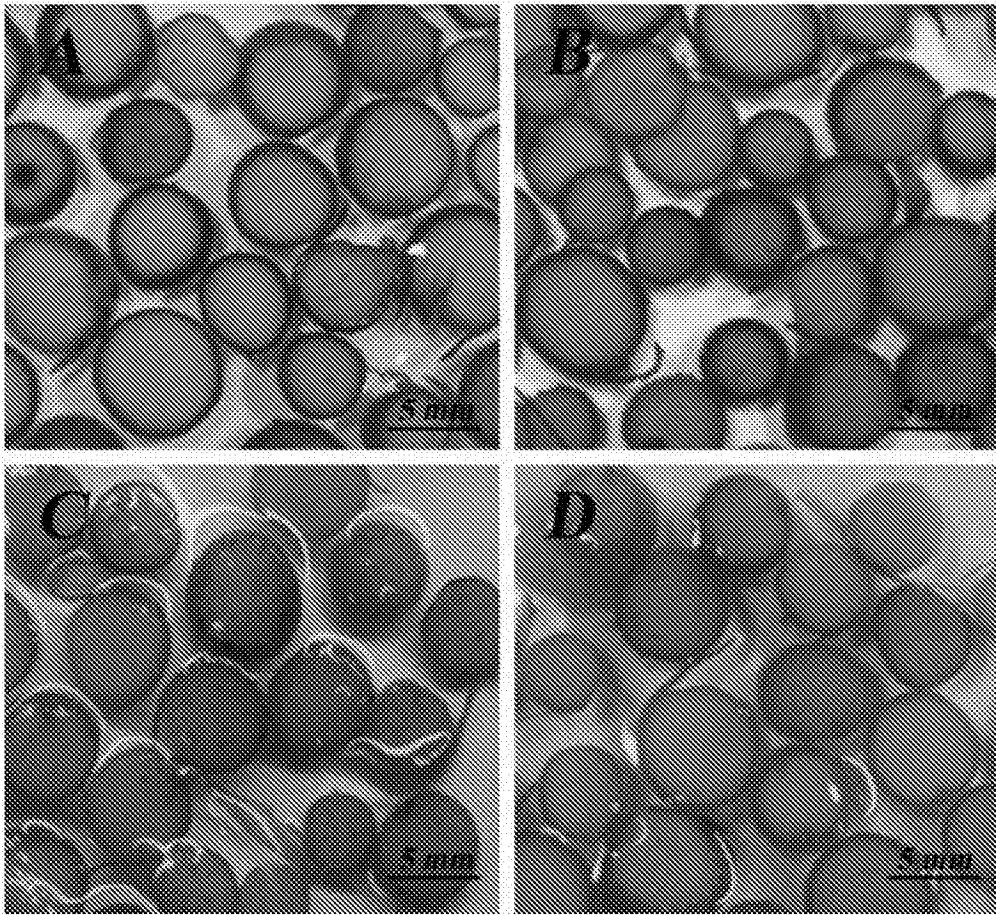


图10

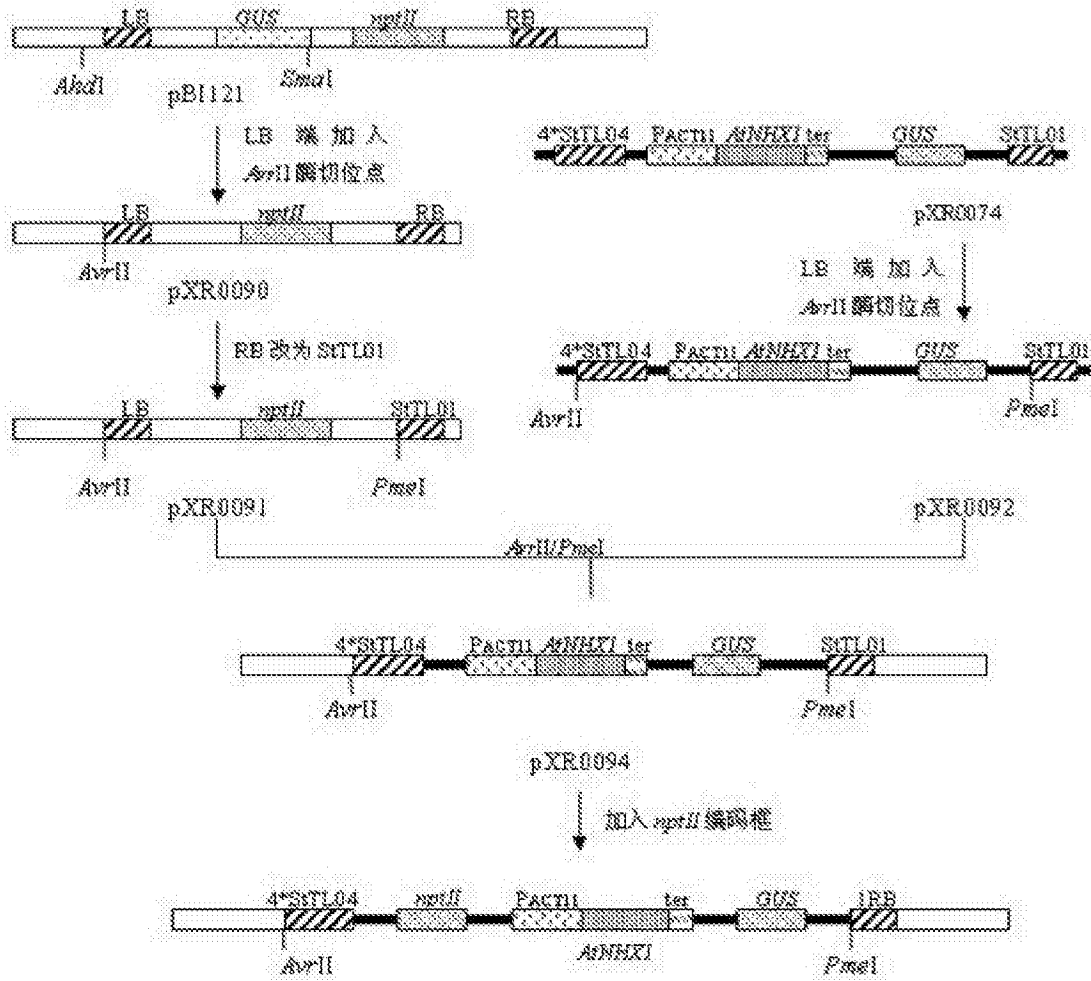


图11

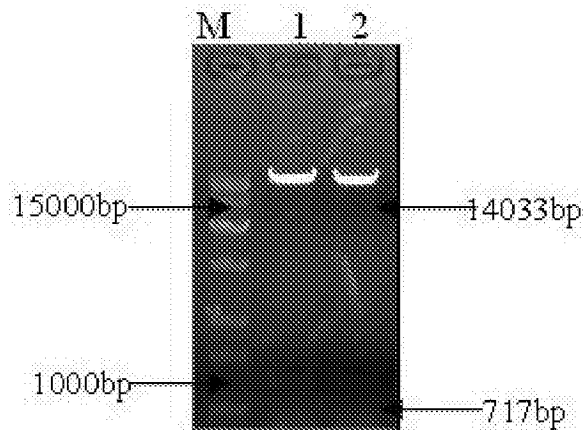


图12

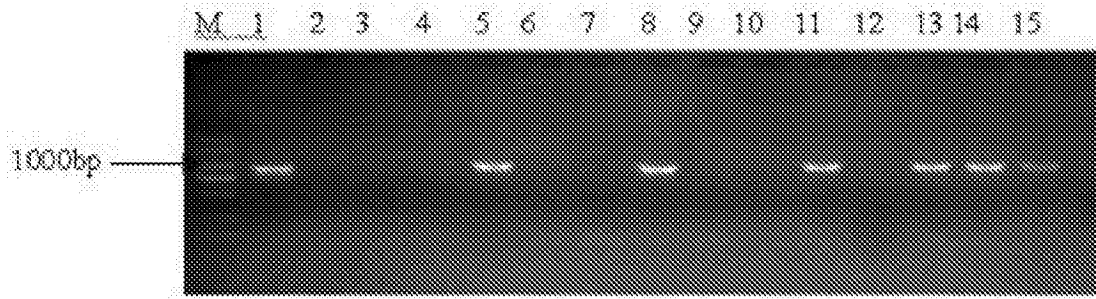


图13

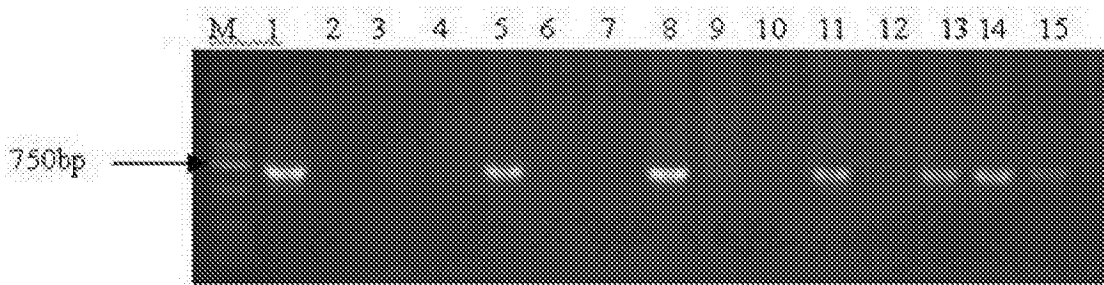


图14

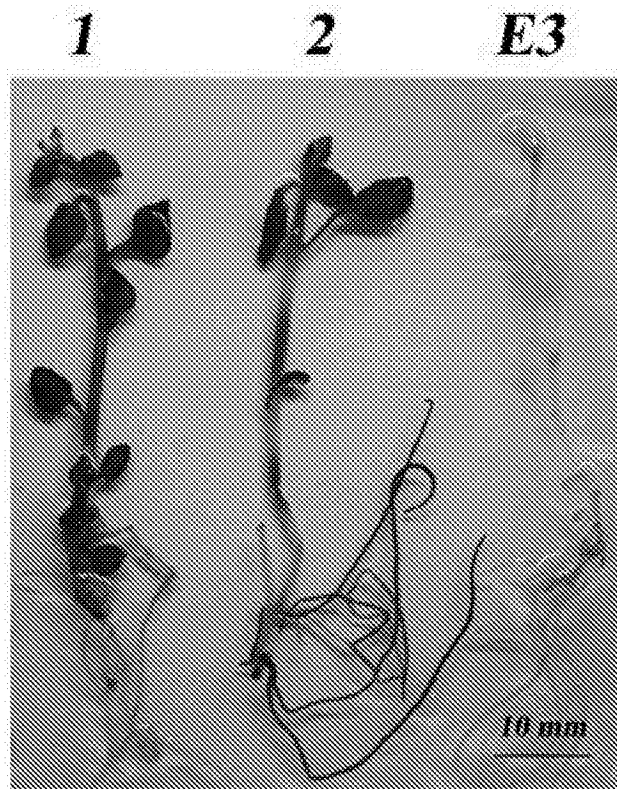


图15

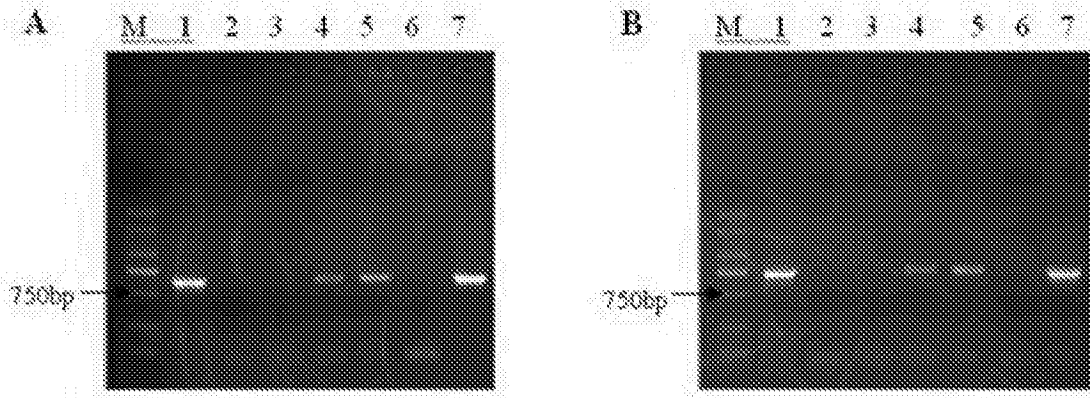


图16