

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

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 (VB₆) (Sigma, catalog number: P-8666)
17. Thiamine HCl (VB₁) (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. NH₄NO₃
27. KH₂PO₄
28. KNO₃
29. MgSO₄·7H₂O
30. CaCl₂·2H₂O
31. MnSO₄·4H₂O
32. ZnSO₄·7H₂O
33. H₃BO₃
34. KI
35. Na₂MoO₄·2H₂O
36. CoCl₂·6H₂O
37. CuSO₄·5H₂O
38. (NH₄)₂SO₄
39. FeSO₄·7H₂O

40. Na₂EDTA·2H₂O
41. KOH
42. HgCl₂
43. Glucose
44. Sucrose
45. LB 培养基
46. 封口胶
47. MS_{max} 储备液(10x) (见溶液配方)
48. MS_{min} 储备液(100x) (见溶液配方)
49. N_{6max} 储备液(10x) (见溶液配方)
50. N_{6min} 储备液(100x) (见溶液配方)
51. Fe²⁺-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% HgCl₂ (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。

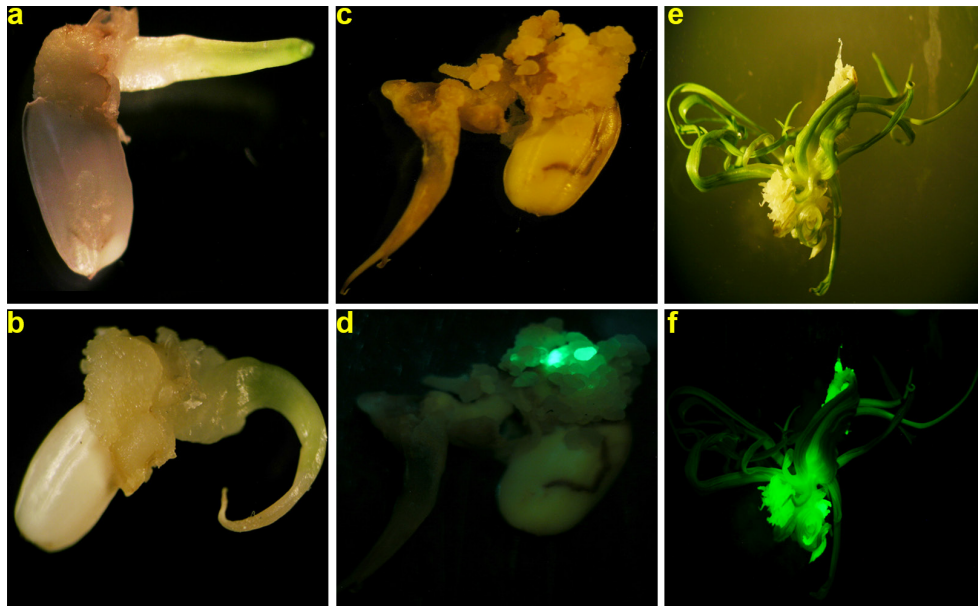


图 1. 农杆菌介导水稻快速转化。a 和 b 分别为诱导 5 d 和 10 d 的水稻愈伤组织；c 和 d 为筛选培养 14 d 形成的抗性愈伤组织；e 和 f 为分化培养 21 d 形成的再生植株。

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_{max} 储备液(10x)

NH ₄ NO ₃	16.5 g
KH ₂ PO ₄	1.7 g
KNO ₃	19.0 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	3.7 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	4.4 g

逐个溶解，然后加蒸馏水定容至 1 L。

2. MS_{min} 储备液(100x)

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

Na₂MoO₄·2H₂O 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_{6max} 储备液(10x)

KNO ₃	28.3 g
KH ₂ PO ₄	4.0 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	4.63 g
MgSO ₄ ·7H ₂ O	1.85 g
CaCl ₂ ·2H ₂ O	1.66 g

逐个溶解，然后加蒸馏水定容到 1 L。

4. N_{6min} 储备液(100x)

MnSO ₄ ·4H ₂ O	0.44 g
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	0.15 g
H ₃ BO ₃	0.16 g
KI	0.08 g

逐个溶解，然后加蒸馏水定容到 1 L。

5. Fe²⁺-EDTA 储备液(100x)

在一个试剂瓶中加入 300 ml 蒸馏水然后加入

FeSO₄·7H₂O 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

Na₂ EDTA·2H₂O 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 (VB₆) 0.1 g

Thiamine HCl (VB₁) 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% HgCl₂

HgCl₂ 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

N₆max 储备液(10x) 100 ml

N₆min 储备液(100x) 10 ml

Fe²⁺-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 ₆ max 储备液(10x)	12.5 ml
N ₆ min 储备液(100x)	1.25 ml
Fe ²⁺ -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 ₆ max 储备液(10x)	12.5 ml
N ₆ min 储备液(100x)	1.25 ml
Fe ²⁺ -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 ₆ 储备液(10x)	25 ml
N ₆ 储备液(100x)	2.5 ml
Fe ²⁺ -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 μ l Hn (50 mg/ml)和 500 μ 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 _{max} 储备液(10x)	100 ml
MS _{min} 储备液(100x)	10 ml
Fe ²⁺ -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 _{max} 储备液(10x)	50 ml
MS _{min} 储备液(100x)	5 ml

Fe ²⁺ -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.