

野生型发根农杆菌 K₅₉₉的解毒

向太和¹,杨剑波¹,David A. Somers²

(1. 安徽省农业科学院水稻研究所、农业部水稻遗传育种重点开放实验室,合肥 230031;

2. 美国明尼苏达大学农学及植物遗传系,明尼苏达,圣保罗 55108)

摘要:本研究利用 DNA 重组技术构建了来源于质粒 pJBJ₁₀₆、pBluescript SK(+) 和 pUCD₈₀₀ 的新质粒 pXT₃sacB, 利用该质粒通过同源重组切除了野生型发根农杆菌 K₅₉₉ 中 Ri 质粒的 T-DNA。解毒后的 K₅₉₉ 获得了氨苄/羧苄青霉素抗性和 10% 蔗糖抑制生长的选择标记。解毒后的 K₅₉₉ 菌株可能对农杆菌转基因技术是有益的。

关键词:发根农杆菌 K₅₉₉; 解毒

中图分类号: Q933 文献标识码: A

文章编号: 0253-9772(2001)04-0336-05

Disarming of Wild Type *Agrobacterium rhizogenes* K₅₉₉

XIANG Tai-he¹, YANG Jian-bo¹, David A. Somers²

(1. Rice Research Institute, Key Laboratory of Rice Genetics and Breeding of Agricultural Ministry,

Anhui Academy of Agricultural Sciences, Hefei 230031, China; 2. Department of Agronomy

and Plant Genetics, University of Minnesota, St. Paul, MN 55108, USA)

Abstract: In this study, the new plasmid pXT₃sacB was constructed from pJBJ₁₀₆, pBluescript SK(+) and pUCD₈₀₀. The wild type T-DNA of *Agrobacterium rhizogenes* K₅₉₉ which induces hair root was deleted with pXT₃sacB by homologous recombinant. A disarming K₅₉₉ contains selective markers of resistance to ampicillin/carbencillin and the growth inhibition by 10% sucrose. It could be a novel useful strain for gene transfer via *Agrobacterium*-mediated method.

Key words: *Agrobacterium rhizogenes* K₅₉₉; disarming

农杆菌转基因技术是农作物转基因方法中应用最广泛的一种技术。农杆菌按其对所植物的致毒性可以分为根癌农杆菌和发根农杆菌,它们分别含有与致瘤和生根有关的 Ti 和 Ri 质粒;按其利用植物体的碳源和氮源可分为章鱼碱型、胭脂碱型、黄瓜碱型、农杆菌碱型及琥珀碱型等农杆菌。不论是 Ti 质粒还是 Ri 质粒都含有一段可转移的 DNA (transferred DNA, T-DNA), 这是农杆菌转基因技术的基础。T-DNA 的转移与 3 种因素有关, 即 Ti 或 Ri 质粒的右端, Vir 区域, 染色体 Vir 基因 *chrA*、*chrB* 和 *pscA*^[1,2]。根癌和发根农杆菌的致毒是由于 T-DNA

转移并整合到植物细胞中, 其中 T-DNA 中与植物激素合成有关的基因(致瘤或发根基因)在植物体中表达, 从而引起致瘤或生根, 但农杆菌感染植物体后形成的冠瘿及根状毛细胞难以分化成正常植株。1983 年, Zambryski 等和 Fraley 等分别切除了野生型根癌农杆菌的 T-DNA, 替换上选择性标记, 并从转化的细胞组织再生出可育植株^[3,4]。虽然有报道从发根农杆菌转化而来的根状物再生出植株, 但其再生频率较低且易出现不正常植株, 因此, 若对野生型发根农杆菌的 T-DNA 解毒, 并替换上筛选标记将是非常有意义的^[5]。

收稿日期: 2000-09-26; 修回日期: 2000-12-22

基金项目: UNDP 项目“CPR/96/104”资助。Funded by the Project of UNDP(No. CPR/96/104)

作者简介: 向太和(1965-), 男(汉族), 安徽省人, 硕士, 副研究员, 主要研究方向: 农作物转基因及分子标记。电话: 0551-5146549,

E-mail: ahri@mail.hf.ah.cn

野生型发根农杆菌 K₅₉₉是由 Allen Kerr 分离而得,它感染大豆后在诱导生根方面非常有效^[6]。本研究的目的是通过构建一种新质粒,再以该质粒对野生型发根农杆菌 K₅₉₉进行解毒,以期获得一个有益的农杆菌转基因系统。

1 材料与方 法

1.1 实验用菌种和质粒

实验用菌种和质粒见表 1。细菌的培养在 37℃,LB 培养基,液体培养转速为 230~250r/min。农杆菌的培养在 28℃,LB 或 YEM 培养基,液体培养转速为 180~200r/min。

1.2 质粒 DNA 的制备

细菌质粒 DNA 的制备用 QIAprep miniprep Kit (QIAGEN Co.)。农杆菌质粒 DNA 的制备用 QIAGEN plasmid mini kit(QIAGEN Co.)。

1.3 新质粒的构建

(1)所有的酶切反应均为 37℃,2~3h,65℃ 20min 灭活酶,酶切产物在 1% agarose 电泳 1.5~2h,3~5V/cm。(2)DNA 酶切片段的提纯用 QIAEX II extraction Kit(QIAGEN Co.)。(3)提纯的 DNA 片段,粘性末端的补平或切除用 DNA 聚合酶 I (Klenow)大片段或 T₄ DNA 聚合酶(New England Biolab),按使用说明进行。(4)连接反应:粘性末端的连接,插入片段和载体的摩尔比例为 2:1,每 25μl 反应加 0.5μl 连接酶(New England Biolab,400u/μl),16℃,12h。钝端的连接,插入片段和载体的摩尔比例为 10:1,每 25μl 反应加 2μl 连接酶,16℃,24h。连接反应结束后在 65℃,10min 灭活连接酶,置 4℃暂时保存供转化所用。(5)DH5α 感受态细胞的制备及转化:感受态细胞的制备采用 CaCl₂ 法,转化采用冻融法^[7]。筛选出的转化子单菌落于 37℃、220~250r/min、含适宜抗生素的液体培养基中过夜培养,提取质粒,酶切鉴定。

1.4 农杆菌的转化解毒

参照 Walkerpeach CR 和 Velten J 介绍的三亲交配法^[8],略有改动。具体步骤如下:(1)挑选 K₅₉₉ 单菌落接种于 LB + Str 50mg/L 液体培养基中,28℃,180~200r/min,36~48h。挑选 pXT₃sacB 单菌落于 LB + Km 25mg/L + Ap/Cb 50mg/L 液体培养基中,37℃、230~250r/min、12h。(2)以上培养物各取 1ml,8000r/min 离心 2min,收集菌体,加 1ml

LB 重悬,8000r/min 离心 2min,收集菌体,如此洗菌 2 次,最后加 100μl LB 使菌体重悬,将 3 种菌液等体积混匀。(3)在不含任何抗生素的 LB 平板上,放 1 张灭菌的微孔滤膜(0.2μm),滴加 150μl 上述混合菌液,使菌液在膜上均匀展开,28℃培养 24h。(4)把滤膜放入 5ml LB 中漂洗振荡,使菌体均匀悬浮,将菌液用 LB 按 1×、5×、10×、50×、100× 的比例稀释后,取 100μl 涂于含 LB + Str 25mg/L + Cb 50mg/L 的筛选培养基上,28℃培养 3d。(5)将获得的单菌落在 LB + Str 25mg/L + Cb 50mg/L 的固体培养基上划线培养 2~3 次,重新选取单菌落。(6)将得到的单菌落转入 LB + Str 25mg/L + Cb 50mg/L 液体培养基中悬浮培养 36~48h,28℃,180~200r/min。取生长旺盛的菌液在 LB + Km50mg/L 固体培养基上划线,检测其对 Km 的抗性,挑选对 Km 敏感的转化子;同时取 100μl 悬浮菌液涂布于 LB + 10% 蔗糖(蔗糖过滤灭菌,下同)培养基,28℃培养,观察其生长情况。

表 1 实验用菌种和质粒

Table 1 Bacterial strain and plasmid used in the study

菌种或质粒	筛选标记及浓度	分子大小(Kb)
大肠杆菌(<i>E. Coli</i>)		
DH5α		
HB ₁₀₁		
发根农杆菌 (<i>Agrobacterium rhizogenes</i>)		
K ₅₉₉	Streptomycine(Str) 50 mg/L	
质粒		
pJBJ ₁₀₆	Kanamycine(Km) 25mg/L	约 8.5
在 DH5α 中	Streptothricin 100mg/L	
pBluescript SK(+)	Ampicillin(Ap)或 Carbenicillin(Cb)	2.958
在 DH5α 中	50mg/L	
pUCD ₉₀₀	Km 50mg/L	14.5
在 HB ₁₀₁ 中	Sucrose(Suc) 5%(致死)	
pRK ₂₀₁₃	Km 50mg/L	
在 HB ₁₀₁ 中		

1.5 PCR 反应

PCR 反应所用的上游引物为 5' AGAGTTGCT AGCTCTTGATCCGGCAAAC 3', 下游引物为 5' TACCAAACGACGAGCGTG 3'。该引物能扩增出 681bp 的 Ap/Cb 抗性基因片段。PCR 反应程序为 94℃10min 后,按 94℃1min,55℃1min,72℃2min 进

行 25 个循环, 72℃ 延伸 5 min, 4℃ 保存。每个反应体积 (25 μl) 含模板 DNA (10 ~ 50 ng/μl) 2 μl, dNTP (2 mmol/L, BICO BRL 公司) 2 μl, 引物 (10 pmol/L) 各 2 μl, Tag 酶 (5 u/μl, Promega 公司) 0.4 μl, 10 × 缓冲液 (含 25 mmol/L MgCl₂, Promega 公司) 25 μl, ddH₂O 11.6 μl。反应产物在 1% 琼脂糖电泳分析。

1.6 Southern blot 分析

杂交探针为 pXT₃ *sacB* 质粒经 *Bam*HI + *Xho*I 酶切所得到的约 2.1 kb 片段, 该片段含 *Ap*/*Cb* 抗性基因。探针的标记用 Promega 公司的 Prime-α-Gene 标记试剂盒 (α-³²P-dCTP 标记)。标记探针用 ProbeQuant G-50 柱提纯 (Amersham Pharmacia 公司)。待测质粒 DNA 经 *Eco*RI 37℃ 酶切过夜, 0.8% 琼脂糖电泳。杂交膜为 Hybond-N, 杂交方法参照 Sambrook 等的方法^[7], 杂交结果用 Fuji X-ray 胶片感光 5h 显示结果。

1.7 感染大豆子叶的实验

大豆种子 (基因型 A₃₂₃₇) 用 Cl₂ 过夜消毒 (氯气由 100 ml 5.24% NaOCl + 3.5 ml 12 mol/L HCl 产生)。消毒后的种子培养于 SA 培养基 (5% 蔗糖、0.8% 琼脂), 28℃, 14h 光照, 10h 暗培养/天。生长旺盛的发根农杆菌用 LB 培养基清洗两次后重悬于 LB 培养基中。培养 7 天的大豆子叶, 用解剖刀纵横深切数刀, 直接滴加农杆菌菌液于伤口处, 继续在上述条件下培养 7 ~ 10d 后观察结果。

2 结果与分析

2.1 质粒 pXT₃ 和 pXT₃ *sacB* 的构建

pJBJ₁₀₆ 由法国国家科学院研究中心的 Jean Brevet 提供 (私人通讯), 该质粒含有 pRi₂₆₅₉ 的左右两边端、黄瓜碱合成酶基因^[9]、带有 35S CaMV 启动子和 NOS 终止子的 *sat*₃ 基因^[10] 以及来源于 pK₁₈ 的 *Km*^R 基因^[11]。pBluescript SK (+) 含有 *Ap*^R/*Cb*^R 基因。pUCD₃₀₀ 由 P. Gay 等构建^[12], 含有 *sacB* 基因, 该基因在蔗糖的诱导下编码果聚糖酶 (levan-sucrase), 催化转移蔗糖到不同的受体, 从而导致果聚糖的合成和蔗糖的水解。含有 *sacB* 基因的大肠杆菌、农杆菌在含有 5% ~ 10% Suc 培养基中会引起细胞的裂解从而致死或抑制生长。图 1 为 pXT₃ 和 pXT₃ *sacB* 构建示意图。

2.1.1 pXT₃ 的构建 pJBJ₁₀₆ 用 *Spe* I 酶切, 用

DNA 聚合酶 I (Klenow) 大片段补平 3' 凹端得钝端。pBluescript SK (+) 用 *Alw*NI + *Ssp*I 酶切, 得 130bp、1281bp 和 1547bp 3 个片段, 其中 1281bp 片段含有 *Ap*^R/*Cb*^R 基因, 该片段 *Ssp* I 切点处为钝端, 用 T₄ DNA 聚合酶切除 *Alw*NI 切点处 3' 凸端得钝端。用 T₄ DNA 连接酶连接含 *Ap*^R/*Cb*^R 基因的片段到 pJBJ₁₀₆ 的 *Spe* I 切点处得 pXT₃ (图 2a、b)。

2.1.2 pXT₃ *sacB* 的构建 pXT₃ 用 *Bam*HI + *Nsi*I 酶切、电泳, 提纯大片段。pUCD₃₀₀ 用 *Bam*HI + *Pst*I 酶切、电泳, 提纯 2.6 Kb 的小片段即含 *sacB* 基因片段。由于 *Nsi*I 和 *Pst*I 切点处粘性末端互补, 用 T₄ DNA 连接酶连接两片段即得 pXT₃ *sacB* (图 2c、d)。带有该质粒的 DH5α 在含 5% Suc 的培养基上表现为致死。

2.2 野生型发根农杆菌 K₅₉₉ 的解毒

pXT₃ *sacB* 含有 pRi₂₆₅₉ 的两端, K₅₉₉ Ri 质粒和 pRi₂₆₅₉ 都为黄瓜碱型质粒^[6,9], 因而 pXT₃ *sacB* 和 K₅₉₉ Ri 质粒应该共享同源端^[2]。此外, 由于 pXT₃ *sacB* 的复制子来于 pK₁₈, 为 PMB₁, 因此它的宿主仅限于大肠杆菌即 pXT₃ *sacB* 仅能在大肠杆菌中独立复制^[11,13]。在解毒 K₅₉₉ 的过程中, *Ap*^R/*Cb*^R 基因和 *sacB* 基因被用来筛选第一次交换 (在农杆菌中, 用 *Cb* 替代 *Ap*, 筛选效果较好^[8]); 通过第二次交换, *Km*^R 丧失。所以, 仅仅只有双交换 (同源重组) 的转化子才具有 *Cb* 抗性和对 *Km* 及 *Suc* 敏感的特性, 即获得解毒型 K₅₉₉。

在我们的实验中, 通过三亲交配后筛选共获得 6 个具有上述特性的转化子 (分别命名为 D₁K₅₉₉ *sacB*、D₂K₅₉₉ *sacB*、D₃K₅₉₉ *sacB*、D₄K₅₉₉ *sacB*、D₅K₅₉₉ *sacB* 和 D₆K₅₉₉ *sacB*)。这些转化子抗 Str 25 mg/L + Ch 50 mg/L, 但对 *Km* 50 mg/L 敏感, 其生长被 10% *Suc* 有所抑制。这 6 个转化子感染大豆子叶, 感染 20 天后的子叶仍无任何根状毛出现; 而对照受野生型 K₅₉₉ 感染的子叶, 在伤口处产生大量根状毛 (图 3)。

2.3 PCR 分析及 Southern blot 分析

PCR 反应结果是 pXT₃ *sacB*、D₁K₅₉₉ *sacB* ~ D₆K₅₉₉ *sacB*, 质粒均能扩增出 619 bp 大小的谱带, 野生型 K₅₉₉ 质粒未能扩增出该谱带 (图 4a), pXT₃ *sacB*、D₁K₅₉₉ *sacB* ~ D₆K₅₉₉ *sacB* 质粒与制备的探针能够杂交出明显的谱带, 而 K₅₉₉ 质粒未显示出

杂交信号(图 4b),该结果说明 *Ap^R/Cb^R* 基因已整合到野生型 K₅₉₉Ri 质粒中。

综上所述,野生型发根农杆菌 K₅₉₉的 T-DNA 被 pXT₃*sacB* 通过同源重组所敲除,即构建了解毒型 K₅₉₉。该解毒型 K₅₉₉获得 Cb^R、Km^S 和 10% Suc

抑制生长的筛选标记。解毒型 K₅₉₉主要优点是感染植物细胞后未引起发根现象,从而有利于转基因后植物细胞的脱分化和分化。利用解毒型 K₅₉₉可望构建出于大豆等农作物转基因非常有效的二元载体或共整合载体系统。

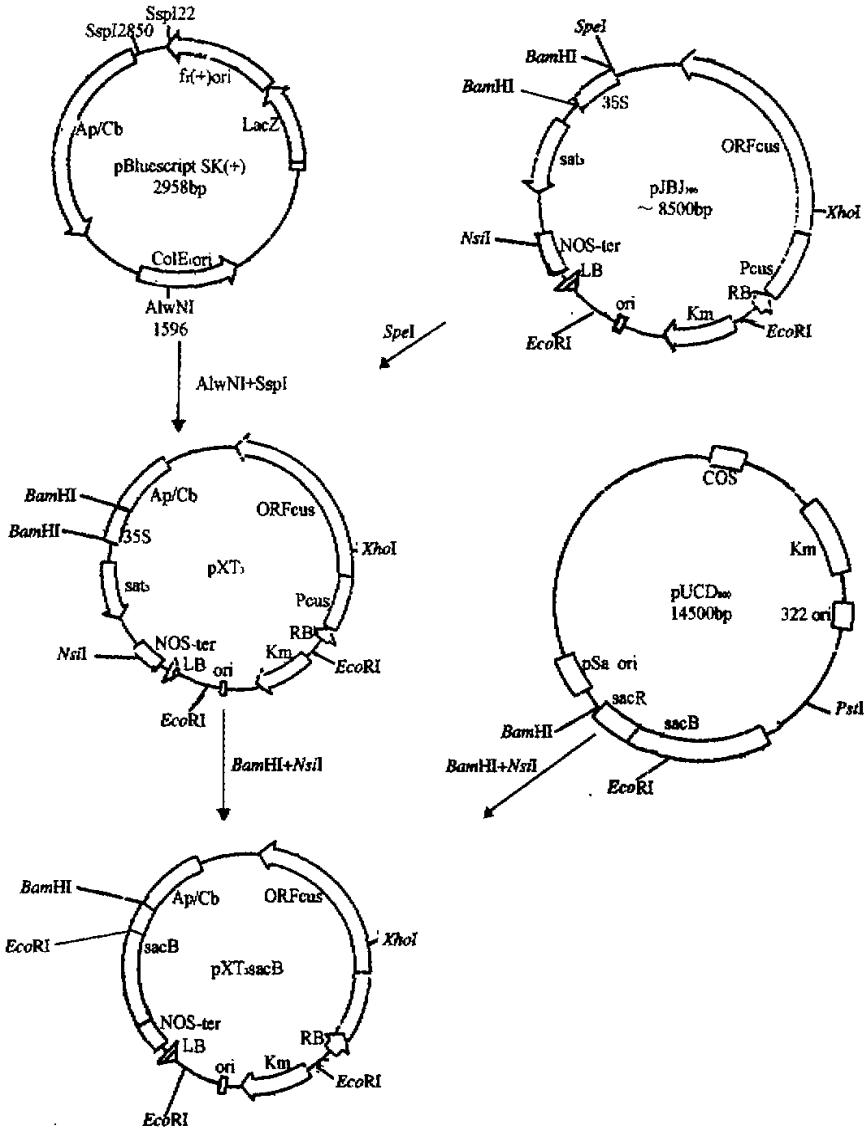


图 1 质粒 pXT₃ 和 pXT₃sacB 构建示意图
Fig.1 Construction of pXT₃ and pXT₃sacB

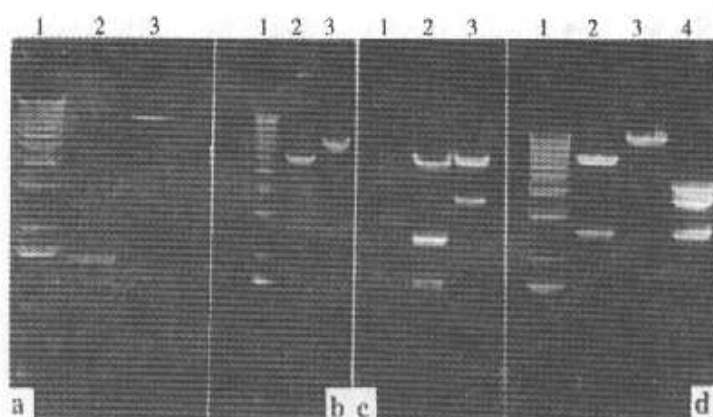


图2 质粒 pXT₃ 和 pXT₃,sacB 的酶切图谱

在 a 中, 1: 1Kb ladder, 2: pBluescript SK (+) + *AtwN1* + *SspI*, lane 3: pJBJ₁₀₆ + *SpeI*

在 b 中, 1: 1Kb ladder, 2: pJBJ₁₀₆ + *EcoRI*, 3: pXT₃ + *EcoRI*

在 c 中, 1: 1Kb ladder, 2: pXT₃ + *BamHI* + *NstI*, 3: pUCD800 + *BamHI* + *PstI*

在 d 中, 1: 1Kb ladder, 2: pXT₃ + *EcoRI*, 3: pUCD800 + *EcoRI*, 4: pXT₃,sacB + *EcoRI*

Fig.2 Electrophoretic results of plasmid pXT₃ and pXT₃,sacB digested with endonuclease enzyme

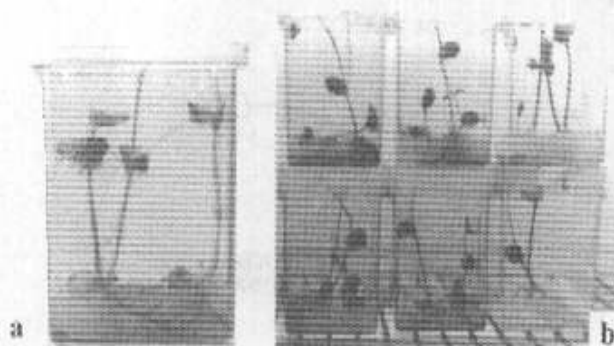


图3 野生型和解毒型 K₅₉₉ 感染大豆子叶对比实验,

a: 野生型 K₅₉₉, b: 解毒型 K₅₉₉

Fig.3 Soybean cotyledon inoculated by wild and disarming K₅₉₉, a: wild type K₅₉₉, b: disarming K₅₉₉

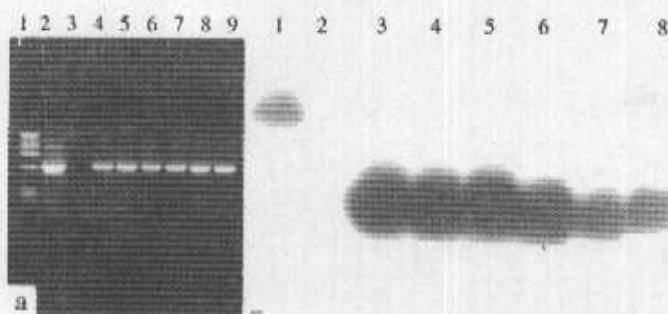


图4 解毒型 K₅₉₉ 的 PCR 和 Southern 印迹分析

在 a 中, 1: $\Phi \times 174$ DNA / *HaeIII* marker, 2: pXT₃,sacB, 3: K₅₉₉, 4-9: D₁K₅₉₉,sacB ~ D₆K₅₉₉,sacB

在 b 中, 1: pXT₃,sacB, 2: K₅₉₉, 3-8: D₁K₅₉₉,sacB ~ D₆K₅₉₉,sacB

Fig.4 PCR and Southern blot assays

参考文献(References):

- [1] Zupan J R, Zambryski P. Transfer of T-DNA from *Agrobacterium* to the plant cell[J]. *Plant Physiol*, 1995, 107: 1041 ~ 1047.
- [2] Petersen S G, Stummann B M, Olesen P, et al. Structure and function of root-inducing(Ri)plasmids and their relation to tumor-inducing(Ti) plasmids[J]. *Physiologia Plantarum*, 1989, 77: 427 ~ 435.
- [3] Zambryski P, Joos H, Genetello C, et al. Ti plasmid vector for the introduction of DNA into plant cells without alteration of their normal regeneration capacity[J]. *The EMBO Journal*, 1983, 2(12): 2143 ~ 2150.
- [4] Fraley R T, Rogers S C, Horsch R B, et al. The SEV system: A new disarmed Ti plasmid vector system for plant transformation[J]. *Bio/Technology*, 1985, 3: 629 ~ 635.
- [5] Simpson R B, Spirlmann A, Margossian L, et al. A disarmed binary vector from *Agrobacterium tumefaciens* functions in *Agrobacterium rhizogenes*[J]. *Plant Molecular Biology*, 1986, 6: 403 ~ 415.
- [6] Savka M A, Ravillon B, Noel G R, et al. Induction of hairy roots on cultivated soybean genotypes and their use to propagate the soybean cyst nematode[J]. *Phytopathology*, 1990, 80(5): 503 ~ 508.
- [7] Sambrook F, Fritsch E F, Maniatis T. *Molecular Clones: A Laboratory Manual* (2nd ed)[M]. Cold Spring Harbor Press, 1989, pp. 74 ~ 1.104.
- [8] Walkerpeach C R, Velten J. *Agrobacterium* - mediated gene transfer to plant cells: cointegrate and binary vector systems. *Plant Molecular Biology Manual* (2nd ed)[M]. Kluwer Academic Publisher, Printed in Belgium, 1994, pp. B1 ~ B19.
- [9] Combari A, Brevet J, Borowski D, et al. Physical map of the T - DNA region of *Agrobacterium rhizogenes* strain NCPPB2659[J]. *Plasmid*, 1987, 18: 70 ~ 75.
- [10] Tietze E, Brevet J. Nucleotide sequence of the bacterial streptomycin resistance gene *sat3* [J]. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1995, 1263: 176 ~ 178.
- [11] Pridmore R D. New and versatile cloning vectors with kanamycin - resistance marker [J]. *Gene*, 1987, 56: 309 ~ 312.
- [12] Gay P, Le Coq D, Steinmetz M, et al. Positive selection procedure for entrapment of insertion sequence elements in gram-negative bacteria[J]. *Journal of Bacteriology*, 1985, 164(2): 918 ~ 921.
- [13] Schafer A, Tausch A, Jager W, et al. A small mobilizable multipurpose cloning vectors derived from the *Escherichia coli* plasmids pK₁₅ and pK₁₉; selection of defined deletions in the chromosome of *Corynebacterium glutamicum*[J]. *Gene*, 1994, 145: 69 ~ 73.