



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 102304543 A

(43) 申请公布日 2012.01.04

(21) 申请号 201110237660.8

(22) 申请日 2011.08.18

(71) 申请人 普罗米绿色能源(深圳)有限公司

地址 518057 广东省深圳市南山区科智西路
科技园工业区厂房 25 栋 2 段 3 层西

(72) 发明人 王梅珍 孙怀娟 许文钊 潘文欢
李耿光

(74) 专利代理机构 深圳市维邦知识产权事务所
44269

代理人 黄莉

(51) Int. Cl.

C12N 15/82(2006.01)

A01H 4/00(2006.01)

A01H 5/00(2006.01)

权利要求书 2 页 说明书 8 页

(54) 发明名称

利用卡那霉素抗性基因作为筛选标记对麻疯树进行基因转化的方法

(57) 摘要

本发明涉及一种利用卡那霉素抗性基因作为筛选标记对麻疯树进行基因转化的方法,包括以下步骤:制备麻疯树外植体以及农杆菌液,外植体经农杆菌浸染后进行共培养;共培养后的外植体经脱菌后接入筛选培养基 C13KC 进行培养,从而获得抗性愈伤组织;将抗性愈伤组织转入分化培养基 SR13KC,分化出抗性不定芽;以及将抗性不定芽转入生根培养基 R2KC,从而获得转基因植株。利用本发明的方法,使利用农杆菌介导对麻疯树的遗传转化操作简便,价格低廉,为导入功能基因对麻疯树进行遗传改良,获得高产,高油,抗寒等新品种,奠定了良好的基础。

1. 一种利用卡那霉素抗性基因作为筛选标记对麻疯树进行基因转化的方法,其特征在于,包括以下步骤:

步骤(1),分别制备麻疯树外植体以及农杆菌菌液,再将外植体经农杆菌液浸染后进行共培养;

步骤(2),将共培养后的外植体脱菌后接入筛选培养基 C13KC 进行培养,从而获得抗性愈伤组织,所述筛选培养基 C13KC 是含有 1.0-3.0mg/L 的 6-苄基嘌呤、0.25-1.0mg/L 的 3-吲哚丁酸、1-50 mg/L 的卡那霉素以及 50-200mg/L 的特美汀的 MS 培养基;

步骤(3),将抗性愈伤组织转入分化培养基 SR13KC 进行培养,分化出抗性不定芽,所述分化培养基 SR13KC 是含有 1.0-3.0mg/L 的 6-苄基嘌呤、0.25-1.0mg/L 的 3-吲哚丁酸、1-50mg/L 的卡那霉素以及 50-200mg/L 的特美汀的 MS 培养基;以及

步骤(4),将抗性不定芽转入生根培养基 R2KC 中进行培养,从而获得转基因植株,所述生根培养基 R2KC 是含有 0.1-1.0mg/L 的 3-吲哚丁酸,1-50mg/L 的卡那霉素,50-200mg/L 的特美汀的 1/2MS 培养基。

2. 如权利要求 1 所述的利用卡那霉素抗性基因作为筛选标记对麻疯树进行基因转化的方法,其特征在于:步骤(1)中,共培养时采用 C13A 固体培养基,该 C13A 固体培养基是指含 1.0-3.0mg/L 6-苄基嘌呤,0.25-1.0mg/L 3-吲哚丁酸,50-200 μ M 乙酰丁香酮,20-30 g/L 蔗糖,7 g/L 琼脂的 MS 培养基,pH 5.8-6.0。

3. 如权利要求 1 所述的利用卡那霉素抗性基因作为筛选标记对麻疯树进行基因转化的方法,其特征在于:步骤(1)中,麻疯树外植体的制备经由以下步骤:挑选麻疯树种子经消毒后,取出完整的胚和子叶,接种于 MS 培养基培养萌发,获得子叶,切制成外植体,本步骤中采用的 MS 培养基含有 20-30g/L 蔗糖和 7g/L 琼脂,pH5.8-6.0。

4. 如权利要求 3 所述的利用卡那霉素抗性基因作为筛选标记对麻疯树进行基因转化的方法,其特征在于:步骤(1)中,制备麻疯树外植体时,将完整的胚和子叶接种于 MS 培养基后先暗培养 2-4 天,再光照培养 10-12 天,种子即萌发,光照培养条件是:温度 23-26 $^{\circ}$ C,光照 12-16 小时/天,光照强度 1800-2000 lx。

5. 如权利要求 2 所述的利用卡那霉素抗性基因作为筛选标记对麻疯树进行基因转化的方法,其特征在于:步骤(1)中,准备农杆菌菌液、浸染及共培养的具体步骤为:

(a) 挑取农杆菌的单克隆于含有抗生素的 YEP 液体培养基中,28 $^{\circ}$ C,200rpm 震荡培养 20-24 小时,然后按照 1:100 的体积比转接,震荡培养至对数生长期,OD₆₀₀=0.8-1.0,将菌液转入 50ml 离心管,常温,4000rpm 离心 20 分钟收集菌体,采用 C13A 液体培养基重新悬浮离心收集的农杆菌,调至 OD₆₀₀=0.3-0.6,28 $^{\circ}$ C 震荡培养 1-2 个小时,获得农杆菌菌液备用,采用的 C13A 液体培养基是指含有 1.0-3.0mg/L 6-苄基嘌呤,0.25-1.0mg/L 3-吲哚丁酸,50-200 μ M 乙酰丁香酮,20-30g/L 蔗糖的 MS 培养基,pH5.8-6.0;

(b) 将切好的外植体放入容器中,加入准备好的菌液进行,置于摇床以不高于 100 转/分的速度震荡 5-15 分钟进行浸染;以及

(c) 取出浸染过的材料,将其置于无菌滤纸上吸除多余的菌液后再接入 C13A 固体培养基,置于 23-26 $^{\circ}$ C 黑暗共培养 2-4 天。

6. 如权利要求 1 所述的利用卡那霉素抗性基因作为筛选标记对麻疯树进行基因转化的方法,其特征在于:步骤(2)进一步包括以下工艺步骤:

(a) 取出共培养后的外植体,置于灭菌后的无菌吸水纸上,吸去菌液;

(b) 将吸去菌液的外植体接入筛选培养基 C13KC 进行培养,所述筛选培养基 C13KC 是指 MS 培养基,含有 1.6-3.0mg/L 6-苄基嘌呤、0.25-1.0mg/L 的 3-吲哚丁酸、1-50mg/L 卡那霉素、50-200mg/L 特美汀、2-3% 蔗糖及 0.7% 琼脂,且 pH5.8-6.0;以及

(c) 置于 23-26℃ 暗培养 14-21 天,获得抗性愈伤组织。

7. 如权利要求 1 所述的利用卡那霉素抗性基因作为筛选标记对麻疯树进行基因转化的方法,其特征在于:步骤(3)采用的分化培养基 SR13KC 是指 MS 培养基,其含有 0.25-1.2mg/L 6-苄基嘌呤、0.1-1.0mg/L 3-吲哚丁酸、0.01-0.2mg/L 赤霉素、1-50mg/L 卡那霉素、50-200mg/L 特美汀、20-30g/L 蔗糖以及 7g/L 琼脂,且 pH5.8-6.0;接好的抗性愈伤组织在 23-26℃,光照培养 30-60 天即可得到抗性不定芽,培养条件为,光照 12-16 小时/天,光照强度 1800-2000 lx。

8. 如权利要求 1 所述的利用卡那霉素抗性基因作为筛选标记对麻疯树进行基因转化的方法,其特征在于:步骤(4)中,首先将抗性不定芽在 0.1-1.0mg/L 的 3-吲哚丁酸溶液中浸泡 2-10 分钟后,再接种到 R2KC 培养基进行生根培养,培养 30-60 天即可生根获得转基因植株,生根培养条件为:23-26℃,光照 12-16 小时/天,光照强度 1800-2000 lx。

9. 如权利要求 1 所述的利用卡那霉素抗性基因作为筛选标记对麻疯树进行基因转化的方法,其特征在于:所述生根培养基 R2KC 是含有 0.1-1.0mg/L 3-吲哚丁酸、1-50mg/L 卡那霉素以及 50-200mg/L 特美汀的 1/2MS 培养基。

10. 如权利要求 1~9 中任一项所述的利用卡那霉素抗性基因作为筛选标记对麻疯树进行基因转化的方法,其特征在于:所述农杆菌携带有目的基因。

利用卡那霉素抗性基因作为筛选标记对麻疯树进行基因转化的方法

技术领域

[0001] 本发明涉及麻疯树的组织培养技术领域及基因工程领域,尤其是指利用卡那霉素作为筛选标记对麻疯树进行基因转化的方法。

背景技术

[0002] 能源危机是当今世界面临的巨大挑战。中国的石油储量仅占全世界的 2%,消费量却居世界第二,因此,迫切地需要寻找一种新型的能源来替代目前广泛使用的化石能源。

[0003] 与化石资源相比,种植能源植物获取生物柴油具有可再生的优势,是解决能源危机的根本途径。目前已发现的能源植物,主要集中在夹竹桃科、大戟科、萝藦科、菊科、桃金娘科以及豆科等。

[0004] 麻疯树(*Jatropha curcas* L.),又名小桐子、柴油树,为大戟科,麻疯树属,多年生落叶灌木或小乔木。小桐子种仁含油量高达 61.5%,可作为生产生物柴油的原料,是最有可能成为未来替代化石能源的树种,具有巨大的开发潜力。小桐子耐干旱贫瘠,分布于热带、亚热带和雨量稀少、条件恶劣的干热河谷地区,主要分布于中国云南、贵州、四川、广东、广西、海南等地。

[0005] 植物转基因技术可将外源基因导入植物,定向改造植物性状而日益受到人们的重视。根癌农杆菌介导法是最常用的植物基因转化方法之一。根癌农杆菌含有 Ti 质粒,其上有一段 T-DNA 区,农杆菌通过侵染植物伤口进入细胞后,可将 T-DNA 插入到植物基因组中,并且可通过减数分裂稳定的遗传给后代,这一特性成为农杆菌介导法植物转基因的理论基础。Ti 质粒上含有另一个重要的区域,是 Vir 区,它编码实现质粒转移所需的蛋白质。我们将目的基因插入到经过改造的 T-DNA 区,借助农杆菌的感染实现外源基因向植物细胞的转移与整合,然后通过细胞和组织培养技术,再生出转基因植株。

[0006] 然而,麻疯树的研究工作起步较晚,关于麻疯树组织培养和遗传转化技术的报道还很少。2010 年, Pan 等在 African Journal of Biotechnology 上发表文章,以卡那霉素作为筛选剂,利用农杆菌介导法对麻疯树进行转化。该方法是在筛选阶段不添加卡那霉素而获得转基因植株,然而 120 株再生植株只有 1 株生根,成功率太低而不具有实用性。

发明内容

[0007] 本发明所要解决的技术问题是,提供一种利用卡那霉素抗性基因作为筛选标记对麻疯树进行基因转化的方法,以便高效地获得转基因植株。

[0008] 为解决上述技术问题,本发明采用如下技术方案:一种利用卡那霉素抗性基因作为筛选标记对麻疯树进行基因转化的方法,包括以下步骤:

步骤(1),分别制备麻疯树外植体以及农杆菌菌液,再将外植体经农杆菌液浸染后进行共培养;

步骤(2),将共培养后的外植体脱菌后接入筛选培养基 C13KC 进行培养,从而获得抗性

愈伤组织,所述筛选培养基 C13KC 是含有 1.0-3.0mg/L 的 6- 苄基嘌呤、0.25-1.0mg/L 的 3- 吲哚丁酸、1-50 mg/L 的卡那霉素以及 50-200mg/L 的特美汀的 MS 培养基;

步骤(3),将抗性愈伤组织转入分化培养基 SR13KC 进行培养,分化出抗性不定芽,所述分化培养基 SR13KC 是含有 1.0-3.0mg/L 的 6- 苄基嘌呤、0.25-1.0mg/L 的 3- 吲哚丁酸、1-50mg/L 的卡那霉素以及 50-200mg/L 的特美汀的 MS 培养基;以及

步骤(4),将抗性不定芽转入生根培养基 R2KC 中进行培养,从而获得转基因植株,所述生根培养基 R2KC 是含有 0.1-1.0mg/L 的 3- 吲哚丁酸,1-50mg/L 的卡那霉素,50-200mg/L 的特美汀的 1/2MS 培养基。

[0009] 进一步地,步骤(1)中,共培养时采用 C13A 固体培养基,该 C13A 固体培养基是指含 1.0-3.0mg/L 6- 苄基嘌呤,0.25-1.0mg/L 3- 吲哚丁酸,50-200 μ M 乙酰丁香酮,20-30 g/L 蔗糖,7 g/L 琼脂的 MS 培养基, pH 5.8-6.0。

[0010] 进一步地,步骤(1)中,麻疯树外植体的制备经由以下步骤:挑选麻疯树种子经消毒后,取出完整的胚和子叶,接种于 MS 培养基培养萌发,获得子叶,切制成外植体,本步骤中采用的 MS 培养基含有 20-30g/L 蔗糖和 7g/L 琼脂, pH5.8-6.0。

[0011] 进一步地,步骤(1)中,制备麻疯树外植体时,将完整的胚和子叶接种于 MS 培养基后先暗培养 2-4 天,再光照培养 10-12 天,种子即萌发,光照培养条件是:温度 23-26 $^{\circ}$ C,光照 12-16 小时/天,光照强度 1800-2000 lx。

[0012] 进一步地,步骤(1)中,准备农杆菌菌液、浸染及共培养的具体步骤为:

(a) 挑取农杆菌的单克隆于含有抗生素的 YEP 液体培养基中,28 $^{\circ}$ C,200rpm 震荡培养 20-24 小时,然后按照 1:100 的体积比转接,震荡培养至对数生长期, $OD_{600}=0.8-1.0$,将菌液转入 50ml 离心管,常温,4000rpm 离心 20 分钟收集菌体,采用 C13A 液体培养基重新悬浮离心收集的农杆菌,调至 $OD_{600}=0.3-0.6$,28 $^{\circ}$ C 震荡培养 1-2 个小时,获得农杆菌菌液备用,采用的 C13A 液体培养基是指含有 1.0-3.0mg/L 6- 苄基嘌呤,0.25-1.0mg/L 3- 吲哚丁酸,50-200 μ M 乙酰丁香酮,20-30g/L 蔗糖的 MS 培养基, pH5.8-6.0;

(b) 将切好的外植体放入容器中,加入准备好的菌液进行,置于摇床以不高于 100 转/分的速度震荡 5-15 分钟进行浸染;以及

(c) 取出浸染过的材料,将其置于无菌滤纸上吸除多余的菌液后再接入 C13A 固体培养基,置于 23-26 $^{\circ}$ C 黑暗共培养 2-4 天。

[0013] 进一步地,步骤(2)进一步包括以下工艺步骤:

(a) 取出共培养后的外植体,置于灭菌后的无菌吸水纸上,吸去菌液;

(b) 将吸去菌液的外植体接入筛选培养基 C13KC 进行培养,所述筛选培养基 C13KC 是指 MS 培养基,含有 1.6-3.0mg/L 6- 苄基嘌呤、0.25-1.0mg/L 的 3- 吲哚丁酸、1-50mg/L 卡那霉素、50-200mg/L 特美汀、2-3% 蔗糖及 0.7% 琼脂,且 pH5.8-6.0;以及

(c) 置于 23-26 $^{\circ}$ C 暗培养 14-21 天,获得抗性愈伤组织。

[0014] 进一步地,步骤(3)采用的分化培养基 SR13KC 是指 MS 培养基,其含有 0.25-1.2mg/L 6- 苄基嘌呤、0.1-1.0mg/L 3- 吲哚丁酸、0.01-0.2mg/L 赤霉素、1-50mg/L 卡那霉素、50-200mg/L 特美汀、20-30g/L 蔗糖以及 7g/L 琼脂,且 pH5.8-6.0;接好的抗性愈伤组织在 23-26 $^{\circ}$ C,光照培养 30-60 天即可得到抗性不定芽,培养条件为,光照 12-16 小时/天,光照强度 1800-2000 lx。

[0015] 进一步地,步骤(4)中,首先将抗性不定芽在 0.1-1.0mg/L 的 3-吲哚丁酸溶液中浸泡 2-10 分钟后,再接种到 R2KC 培养基进行生根培养,培养 30-60 天即可生根获得转基因植株,生根培养条件为:23-26℃,光照 12-16 小时/天,光照强度 1800-2000 lx。

[0016] 进一步地,所述生根培养基 R2KC 是含有 0.1-1.0mg/L 3-吲哚丁酸、1-50mg/L 卡那霉素以及 50-200mg/L 特美汀的 1/2MS 培养基。

[0017] 进一步地,所述农杆菌携带有目的基因。

[0018] 本发明的有益效果如下:本发明利用卡那霉素抗性基因作为筛选标记,对麻疯树进行基因转化,以获得转基因植株,转化率可达 1-5% 左右(转基因植株数占外植体总数的比例)。因农杆菌介导的转化方法具转化的基因多为单拷贝,且有明确的边界序列,遗传稳定,多数符合孟德尔遗传规律,价格低廉等,为利用植物基因工程技术对麻疯树进行遗传改良,获得高产,高油,抗寒等新品种奠定了良好的基础。

[0019] 本发明选择了麻疯树的成熟种子萌发后的子叶作为外植体,不仅抗性愈伤组织得出率和分化率较高,且不受季节的限制,为大批量进行农杆菌转化奠定了良好的基础。

[0020] 本发明在抗性愈伤组织阶段,分化阶段及生根阶段,分别选择了合适的筛选剂浓度,既避免了非转化愈伤的逃逸及后期大量的分子检测工作,又获得了大量抗性愈伤组织,保证了抗性植株的正常生长和分化。

具体实施方式

[0021] 本发明利用卡那霉素抗性基因作为筛选标记对麻疯树进行基因转化的方法,主要涉及以下步骤:

步骤(1):又包括如下子步骤:种子的消毒及萌发、农杆菌准备、农杆菌转化和共培养;

步骤(2):抗性愈伤组织的诱导;

步骤(3):分化出不定芽;

步骤(4):生根培养。

[0022] 此外,还可进行移栽及检测步骤。

[0023] 下面对各步骤作进一步的具体描述。

[0024] 步骤(1)的具体工艺步骤如下:

1、种子的消毒及萌发

首先采集麻疯树种子,挑取饱满的种子,剥去外壳,经消毒处理后剥去胚乳,将完整的胚和子叶接种在 MS 培养基上萌发,得到无菌苗。

[0025] MS 培养基配方及 pH 值为:20-30g/L 蔗糖及 7g/L 琼脂, pH 5.8-6.0。

[0026] 种子的消毒方法包括以下工艺步骤:

(1) 75% (体积比) 乙醇浸泡 30 秒;

(2) 无菌水洗 2-3 次;

(3) 0.1% 升汞浸泡 3-5 分钟;

(4) 倒出升汞,用无菌水洗 4-6 次,每次 5 分钟;

(5) 加入无菌水,浸泡 2-4 小时;

(6) 剥去胚乳,取完整的胚和子叶,接种于 MS 培养基(20-30g/L 蔗糖,7g/L 琼脂, pH5.8-6.0)中,每瓶培养基接 2-3 颗;

(7) 接好的材料先在暗培养 2-4 天, 然后光照培养 10-12 天。

[0027] 种子萌发的培养条件是, 温度 23-26℃, 光照 12-16 小时 / 天, 光照强度 1800-2000 lx。

[0028] 2、农杆菌菌液的准备

挑取农杆菌的单克隆, 如 EHA105, LBA4404, GV3101 等, 分别含有表达载体 pBI121, 于含有相应抗生素的 YEP 液体培养基中, 28℃, 200rpm 震荡培养 20-24 小时, 然后按照体积比为 1:100 转接 YEP 液体培养基中, 震荡培养至对数生长期, 农杆菌的浓度为 $OD_{600}=0.8-1.0$ 。将菌液转入 50mL 离心管, 常温, 4000rpm 离心 20 分钟收集菌体, 用 C13A 液体培养基重新悬浮农杆菌, 调至 $OD_{600}=0.3-0.6$, 28℃ 培养 1-2 个小时, 即获得农杆菌菌液备用。

[0029] 其中, 所用 YEP 液体培养基配方及 pH 值为: 10g/L 蛋白胨, 5g/L 酵母提取物, 10g/L 氯化钠, pH7.0。

[0030] C13A 液体培养基是指含有 1.0-3.0mg/L 6- 苄基嘌呤、0.25-1.0mg/L 3- 吲哚丁酸、50-200 μ M 乙酰丁香酮及 20-30g/L 蔗糖的 MS 培养基, pH5.8-6.0。

[0031] 3、农杆菌转化和共培养

具体包括如下工艺步骤:

(1) 取灭菌的盘, 中间垫上两层滤纸;

(2) 取出无菌苗, 用剪刀剪下长势较好的子叶, 放入盘中;

(3) 然后加入少量水, 用刀将其切成 0.5×0.5 cm 大小;

(4) 将切好的叶片放入 50 或 100mL 三角瓶中, 加入准备好的菌液, 置于摇床以不高于 100 转 / 分的速度震荡 5-15 分钟;

(5) 取出浸染过的材料, 倒掉菌液, 将叶片放在滤纸上, 吸去多余的菌液, 接入 C13A 固体培养基, 其中 C13A 固体培养基是指含 1.0-3.0mg/L 6- 苄基嘌呤、0.25-1.0mg/L 3- 吲哚丁酸、50-200 μ M 乙酰丁香酮、20-30g/L 蔗糖及 7g/L 琼脂的 MS 培养基, pH 5.8-6.0;

(6) 接好的材料在 23-26℃ 暗培养 2-4 天。

[0032] 步骤(2) 的具体工艺步骤如下:

(1) 取出共培养后的材料, 置于无菌的吸水纸上, 吸去多余的菌液;

(2) 将材料接入筛选培养基 C13KC 进行培养, 该筛选培养基 C13KC 是指 MS 培养基, 含有 1.0-3.0mg/L 6- 苄基嘌呤、0.25-1.0mg/L 3- 吲哚丁酸、1-50mg/L 卡那霉素、50-200 mg/L 特美汀、20-30 g/L 蔗糖及 7g/L 琼脂, pH 5.8-6.0;

(3) 将接好的材料在 23-26℃ 暗培养 14-21 天, 获得抗性愈伤组织。

[0033] 步骤(3) 的具体工艺步骤如下:

(1) 将获得的抗性愈伤组织, 转入分化培养基 SR13KC; 该分化培养基 SR13KC 是指 MS 培养基, 含有 0.25-1.2 mg/L 6- 苄基嘌呤、0.1-1.0 mg/L 3- 吲哚丁酸、0.01-0.2 mg/L 赤霉素、1-50mg/L 卡那霉素、50-200mg/L 特美汀、20-30 g/L 蔗糖以及 7g/L 琼脂, pH 5.8-6.0;

(2) 接好的材料在 23-26 °C, 光照培养 30-60 天即可得到不定芽。培养条件为, 光照 12-16 小时 / 天, 光照强度 1800-2000 lx。

[0034] 步骤(4) 的具体工艺步骤如下:

将分化出的不定芽在 0.1-1.0mg/L 的 3- 吲哚丁酸溶液中浸泡 2-10 分钟后, 再接种到生根培养基上 30-60 天即可生根。所述生根培养基是指 1/2MS 培养基, 其含有 0.1-1.0 mg/L

L 3- 吡啶丁酸、1-50 mg/L 卡那霉素和 50-200 mg/L 特美汀。

[0035] 生根培养条件为, 23-26 °C, 光照 12-16 小时 / 天, 光照强度 1800-2000 lx。

[0036] 通过上述步骤获得的转基因植株再进行移栽, 通常是待再生苗根长到 2 ~ 3cm 时进行炼苗移栽。

[0037] 并且, 可对成活再生转基因植株进行 GUS 染色检测, 以确认基因转化效果, 通常是取成活再生植株的叶片, 置于 GUS 染色液中, 37°C 过夜染色, 蓝色即为转基因植株。

[0038] 通过以上的方法可以实现对麻疯树进行基因转化, 从而使目的基因在植物细胞中得到表达。携带各种不同目的基因的农杆菌, 按上述方法进行介导, 根据插入的目的基因不同, 就可以实现对麻疯树进行定向改造, 从而实现对麻疯树的遗传改良, 以提高其各种特性, 如提高油含量、产量, 抗寒性等。

[0039] 下面结合实例详述描述本发明的实施方案。需要说明的是, 下述实例是说明性的, 不是限定性的, 不能以下述实例来限定本发明的保护范围。

[0040] 实例 1

本实例以农杆菌介导将 GUS 基因转入云南元谋野生麻疯树, 具体阐述本发明创造的方法, 样品的总数量以及经各处理步骤后的存活数量请参考表 1。

[0041] 步骤(1), 具体操作包括:

1、采集云南元谋野生麻疯树种子。挑取饱满的种子, 剥去外壳, 75% 乙醇中浸泡 30 秒, 无菌水冲洗 2 次, 然后在 0.1% 氯化汞中消毒 3 分钟, 无菌水冲洗 5 次, 然后用无菌水浸泡 2 小时后剥去胚乳。取完整的胚和子叶, 接种于 MS 培养基中, 每瓶接 2 颗, 23°C 暗培养 2 天后转入光照培养 10 天, 得到实验用的无菌苗。

[0042] 2、挑取农杆菌 EHA105 (含有表达载体 pBI121) 的单克隆于含有抗生素利福平 (20mg/L), 庆大霉素 (20mg/L) 和卡那霉素 (50mg/L) 的 YEP 培养基中, 28°C, 200rpm 震荡培养 20 小时, 然后按照 1:100 体积比转接至 300mL YEP 培养基中, 震荡培养对数生长期, 农杆菌浓度为 $OD_{600}=0.8-1.0$ 。将菌液转入 50mL 离心管, 常温, 4000rpm 离心 20 分钟收集菌体, 用 C13A 液体培养基 (具体配方为: 含有 1.0mg/L 6- 苄基嘌呤、0.25mg/L 3- 吡啶丁酸、50 μ M 乙酰丁香酮及 20g/L 蔗糖的 MS 培养基, pH5.8) 重新悬浮农杆菌, 调至 $OD_{600}=0.3$, 28°C 培养 1 个小时, 备用。

[0043] 3、取灭菌的盘, 中间垫上两层滤纸。选取生长健壮, 叶面平整均匀的无菌苗子叶, 加入少量水, 切成 0.5×0.5cm (并不限于此尺寸) 大小。将切好的叶片放入 50 或 100mL 三角瓶中, 加入准备好的菌液, 置于摇床以 100 转 / 分的速度震荡 10 分钟。然后取出浸染过的材料, 倒掉菌液, 将叶片放在滤纸上, 吸去多余的菌液, 接入 C13A 固体培养基 (具体配方为: 含 1.0mg/L 6- 苄基嘌呤、0.25mg/L 3- 吡啶丁酸、50 μ M 乙酰丁香酮、20g/L 蔗糖及 7g/L 琼脂的 MS 培养基, pH5.8), 置于 23°C 暗培养 2 天。

[0044] 步骤(2): 取出共培养后的材料 (外植体总数为 1094 块), 置于灭菌后的无菌滤纸上, 吸去菌液, 接入筛选培养基 C13KC (具体配方为: 含有 1.0mg/L 6- 苄基嘌呤、0.25mg/L 3- 吡啶丁酸、1mg/L 卡那霉素、50mg/L 特美汀、20g/L 蔗糖及 7g/L 琼脂的 MS 培养基, pH5.8), 23°C 暗培养 14 天, 获得抗性愈伤组织 936 块, 抗性愈伤组织率为 85.6% 左右, 见表 1。

[0045] 步骤(3): 将获得的抗性愈伤组织, 转入分化培养基 SR13KC (具体配方为: MS 培养基含 0.25mg/L 6- 苄基嘌呤、0.1mg/L 3- 吡啶丁酸、0.01mg/L 赤霉素、1mg/L 卡那霉素、

50mg/L 特美汀、20g/L 蔗糖及 7g/L 琼脂, pH 5.8), 23°C, 光照培养 30 天即可得到抗性不定芽。培养条件为, 光照 12 小时 / 天, 光照强度 1800 lx。分化出芽的抗性愈伤组织为 422 块, 抗性愈伤组织分化率为 45.1 %, 见表 1。

[0046] 步骤(4): 将分化出的抗性不定芽(共 81 株)在 0.5mg/L 的 3- 吲哚丁酸溶液中浸泡 5 分钟后, 接种到生根培养基 1/2MS 培养基上光照培养 30 天即可生根。

[0047] 待再生苗根长到 2 ~ 3 cm 时进行炼苗移栽至温室。

[0048] 取成活再生植株的叶片, 置于 GUS 染色液中, 37°C 过夜染色, 蓝色即为转基因植株。

[0049] 表 1 本发明实例中的抗性愈伤组织得出率及分化率

外植体总数(块)	抗性愈伤(块)	抗性愈伤(%)	分化愈伤(块)	愈伤分化(%)	再生植株(棵)	GUS 阳性植株(棵)	转化效率(%)
1094	936	85.6	422	45.1	81	32	2.93

实例 2

本实例以农杆菌介导将 GUS 基因转入云南元谋野生麻疯树, 具体阐述本发明创造的方法, 样品的总数量以及经各处理步骤后的存活数量请参考表 2。

[0050] 步骤(1), 包括如下具体操作:

1、采集云南元谋野生麻疯树种子, 挑取饱满的种子, 剥去外壳, 75% 乙醇中浸泡 30 秒, 无菌水冲洗 3 次, 然后在 0.1% 氯化汞中消毒 5 分钟, 无菌水冲洗 7 次, 然后用无菌水浸泡 4 小时后剥去胚乳。取完整的胚和子叶, 接种于 MS 培养基中, 每瓶接 3 颗, 26°C 暗培养 4 天后转入光照培养 12 天, 得到实验用的无菌苗。

[0051] 2、挑取农杆菌 GV3101 (含有表达载体 pBI121) 的单克隆于含有抗生素利福平 (20mg/L), 庆大霉素 (20mg/L) 和卡那霉素 (50mg/L) 的 YEP 培养基中, 28°C, 200rpm 震荡培养 24 小时, 然后按照 1 : 100 体积比转接至 300mL YEP 培养基中, 震荡培养对数生长期, 农杆菌浓度为 $OD_{600}=0.8-1.0$ 。将菌液转入 50mL 离心管, 常温, 4000rpm 离心 20 分钟收集菌体, 用 C13A 液体培养基(具体配方为 MS 培养基含 3.0mg/L 6- 苄基嘌呤、1.0mg/L 3- 吲哚丁酸、200 μ M 乙酰丁香酮及 30g/L 蔗糖, pH6.0)重新悬浮农杆菌, 调至 $OD_{600}=0.6$, 28°C 培养 2 个小时, 备用。

[0052] 取灭菌的盘, 中间垫上两层滤纸。选取生长健壮, 叶面平整均匀的无菌苗子叶, 加入少量水, 切成 0.5×0.5cm 大小。将切好的叶片放入 50 或 100mL 三角瓶中, 加入准备好的菌液, 置于摇床以 90 转 / 分的速度震荡 10 分钟。然后取出浸染过的材料, 倒掉菌液, 将叶片放在滤纸上, 吸去多余的菌液, 接入 C13A 固体培养基(具体配方为: 含有 3.0mg/L 6- 苄基嘌呤、1.0mg/L 3- 吲哚丁酸、200 μ M 乙酰丁香酮、30g/L 蔗糖及 7g/L 琼脂的 MS 培养基, pH6.0), 置于 26°C 暗培养 4 天。

[0053] 步骤(2): 取出共培养后的材料(外植体总数为 958 块), 置于灭菌后的无菌滤纸上, 吸去菌液, 接入筛选培养基 C13KC (具体配方为: MS 培养基含 3.0mg/L 6- 苄基嘌呤、1.0mg/L 3- 吲哚丁酸、50mg/L 卡那霉素、200mg/L 特美汀、30g/L 蔗糖及 7g/L 琼脂, pH 6.0), 26°C 暗培养 21 天, 获得抗性愈伤组织 762 块, 抗性愈伤组织率为 79.5 % 左右, 见表 2。

[0054] 步骤(3): 将获得的抗性愈伤组织, 转入分化培养基 SR13KC (具体配方为: MS 培养基含 1.2mg/L 6- 苄基嘌呤、1.0mg/L 3- 吲哚丁酸、0.2mg/L 赤霉素、10mg/L 卡那霉素、200mg/L 特美汀、30g/L 蔗糖及 7g/L 琼脂, pH6.0), 26°C, 光照培养 30 天即可得到抗性不定芽。培养条件为, 光照 16 小时 / 天, 光照强度 2000 lx。分化出芽的抗性愈伤组织数为 432

块,抗性愈伤组织分化率为 56.7%,见表 2。

[0055] 步骤(4):将分化出的抗性不定芽(共 76 株)在 0.5mg/L 的 3- 吲哚丁酸溶液中浸泡 5 分钟后,接种到生根培养基 1/2MS 培养基上光照培养 30 天即可生根。

[0056] 待再生苗根长到 2 ~ 3 cm 时进行炼苗移栽至温室。

[0057] 取成活再生植株的叶片,置于 GUS 染色液中,37℃ 过夜染色,蓝色即为转基因植株。

[0058] 表 2 本发明实例中的抗性愈伤组织得出率及分化率

外植体总数(块)	抗性愈伤(块)	抗性愈伤(%)	分化愈伤(块)	愈伤分化(%)	再生植株(棵)	GUS 阳性植株(棵)	转化效率(%)
958	762	79.5	432	56.7	76	30	3.1

实例 3

本实例以农杆菌介导将 GUS 基因转入云南元谋野生麻疯树,具体阐述本发明创造的方法,样品的总数量以及经各处理步骤后的存活数量请参考表 3。

[0059] 步骤(1),包括如下具体操作:

1、采集云南元谋野生麻疯树种子。挑取饱满的种子,剥去外壳,75% 乙醇中浸泡 30 秒,无菌水冲洗 3 次,然后在 0.1% 氯化汞中消毒 4 分钟,无菌水冲洗 6 次,然后用无菌水浸泡 3 小时后剥去胚乳。取完整的胚和子叶,接种于 MS 培养基中,每瓶接 3 颗,24℃ 暗培养 3 天后转入光照培养 11 天,得到实验用的无菌苗。

[0060] 2、挑取农杆菌 LBA4404 (含有表达载体 pBI121) 的单克隆于含有抗生素利福平(20mg/L),庆大霉素(20mg/L)和卡那霉素(50mg/L)的 YEP 培养基中,28℃,200 rpm 震荡培养 22 小时,然后按照 1:100 体积比转接至 300mL YEP 培养基中,震荡培养对数生长期,农杆菌浓度为 $OD_{600}=0.8-1.0$ 。将菌液转入 50mL 离心管,常温,4000rpm 离心 20 分钟收集菌体,用 C13A 液体培养基(具体配方为:含有 2.0mg/L 6- 苄基嘌呤、0.5mg/L 3- 吲哚丁酸、100 μ M 乙酰丁香酮及 25g/L 蔗糖的 MS 培养基, pH5.9)重新悬浮农杆菌,调至 $OD_{600}=0.5$,28℃ 培养 1 个小时,备用。

[0061] 3、取灭菌的盘,中间垫上两层滤纸。选取生长健壮,叶面平整均匀的无菌苗子叶,加入少量水,切成 0.5×0.5cm 大小。将切好的叶片放入 50 或 100mL 三角瓶中,加入准备好的菌液,置于摇床以 95 转 / 分的速度震荡 10 分钟。然后取出浸染过的材料,倒掉菌液,将叶片放在滤纸上,吸去多余的菌液,接入 C13A 固体培养基(具体配方为:含有 2.0mg/L 6- 苄基嘌呤、0.5mg/L 3- 吲哚丁酸、100 μ M 乙酰丁香酮、25g/L 蔗糖及 7g/L 琼脂的 MS 培养基, pH5.9),置于 25℃ 暗培养 3 天。

[0062] 步骤(2):取出共培养后的材料(外植体总数为 2254 块),置于灭菌后的无菌滤纸上,吸去菌液,接入筛选培养基 C13KC (具体配方为:MS 培养基含 2.0mg/L 6- 苄基嘌呤、0.5mg/L 3- 吲哚丁酸、5mg/L 卡那霉素、150mg/L 特美汀、25g/L 蔗糖及 7g/L 琼脂, pH5.9),25℃ 暗培养 18 天,获得抗性愈伤组织 1767 块,抗性愈伤组织率为 78.4% 左右,见表 3。

[0063] 步骤(3):将获得的抗性愈伤组织,转入分化培养基 SR13KC (具体配方为:MS 培养基含 0.5mg/L 6- 苄基嘌呤、0.5mg/L 3- 吲哚丁酸、0.5mg/L 赤霉素、5mg/L 卡那霉素、150mg/L 特美汀、25g/L 蔗糖及 7g/L 琼脂, pH5.9),25℃,光照培养 30 天即可得到抗性不定芽。培养条件为,光照 14 小时 / 天,光照强度 1900 lx。分化出芽的抗性愈伤数为 1169 块,抗性愈伤组织分化率为 66.2%,见表 1。

[0064] 步骤(4):将分化出的抗性不定芽(共 192 株)在 0.5mg/L 的 3- 吲哚丁酸溶液中浸

泡 5 分钟后,接种到生根培养基 1/2MS 培养基上光照培养 30 天即可生根。

[0065] 待再生苗根长到 2 ~ 3cm 时进行炼苗移栽至温室。

[0066] 取成活再生植株的叶片,置于 GUS 染色液中,37℃ 过夜染色,蓝色即为转基因植株。

[0067] 表 3 本发明实例中的抗性愈伤组织得出率及分化率

外植体总数(块)	抗性愈伤(块)	抗性愈伤(%)	分化愈伤(块)	愈伤分化(%)	再生植株(棵)	GUS 阳性植株(棵)	转化效率(%)
2254	1767	78.4	1169	66.2	192	78	3.5